

• 药理与临床 •

基于肺部苦味受体抗哮喘天然活性成分筛选模型的建立与应用

胡毅翔¹, 蔡伟², 张欢欢¹, 余陈欢¹, 俞文英¹, 金晓音¹, 应华忠^{1*}

1. 浙江省医学科学院 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 浙江 杭州 310013

2. 浙江医药高等专科学校中药学院, 浙江 宁波 315100

摘要: 目的 构建以肺部苦味受体 TAS2R14 为靶点的高通量筛选细胞模型, 为寻找高效、低毒的新型抗哮喘天然药物奠定基础。方法 利用同源重组技术将 TAS2R14 受体基因插入 pLVX-basic 质粒, 构建 pLVX-AcGFP1-N1-TAS2R14 重组载体, 并将其转染入 HEK293T 细胞, 建立特异性高表达 TAS2R14 受体基因的细胞株。利用该细胞模型对 120 种苦味中药提取物和单体化合物进行高通量筛选。结果 建立的模型 Z' 因子为 0.69 和 0.66, 筛选发现陈皮提取物及其药效物质柠檬苦素, 白果提取物及其药效物质芦丁、奎宁对 TAS2R14 受体具有显著的激动作用。结论 建立的 TAS2R14 受体激动剂高通量筛选模型稳定性好、灵敏度高, 筛选得到的 3 种中药单体具有潜在的 TAS2R14 受体激动活性。

关键词: 哮喘; 苦味受体; 柠檬苦素; 芦丁; 奎宁

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)05-0775-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.015

Establishment and application of screening model for anti-asthmatic natural active ingredients based on bitter taste receptors in lung tissueHU Yi-xiang¹, CAI Wei², ZHANG Huan-huan¹, YU Chen-huan¹, YU Wen-ying¹, JIN Xiao-yin¹, YING Hua-zhong¹

1. Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

2. Department of Chinese Materia Medica, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China

Abstract: Objective To construct high-throughput screening cell model targeting TAS2R14 receptor and lay the foundation for the search of effective, novel natural anti-asthma drugs with low toxicity. **Methods** The pLVX-AcGFP1-N1-TAS2R14 lentivirus vector carrying green fluorescent protein (GFP) was constructed. The lentiviral vector was transfected into HEK HEK293T cells, collected high titer lentiviral concentration liquid and infected HEK293T cells, established cell model highly specific expressed TAS2R14 receptor gene. The TAS2R14 cell model was used to screen 120 kinds of Chinese herb extracts and chemical monomers. **Results** The calculated Z' values of the cell model were 0.69 and 0.66, and *Citri Reticulatae Pericarpium* extract and its efficacy material limonin, *Ginkgo Semen* extract and its efficacy material rutin and quinine agitated TAS2R14 cell model. **Conclusion** The constructed TAS2R14 cell model is stable and sensitive for screening anti-asthma drugs, and three kinds of Chinese materia medica monomers have the potential agonist the activity on TAS2R14 receptor.

Key words: asthma; bitter taste receptor; limonin; lutein; quinine

哮喘是一种严重影响人类健康的慢性呼吸道疾病, 以气道间断性阻塞和可逆性气道高反应性为主要特征, 是世界公认的医学难题, 被世界卫生组织 (WHO) 列为四大顽症之一^[1]。近 20 年来, 随着全球范围内的空气污染和环境恶化, 哮喘的发病率和

死亡率呈现逐年上升态势, 据统计, 目前全球约有 3 亿人患有哮喘^[2-3]。哮喘的发病机制复杂, 缺乏愈后良好的治疗药物, 临床治疗哮喘的药物主要有抗炎的糖皮质激素类、 β -受体激动剂类和抗白三烯类等, 但这些药物都存在明显的不良反应, 且易产生

收稿日期: 2015-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473339); 浙江省中医药科技计划项目 (2013ZA026); 浙江省卫生高层次创新人才培养计划项目; 浙江省教育厅科研项目 (Y201432540)

作者简介: 胡毅翔 (1989—), 男, 湖南郴州人, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: (0571)88215491 E-mail: aahyxaa@163.com

*通信作者 应华忠 (1968—), 男, 浙江金华人, 研究员, 从事动物模型与比较医学研究。Tel: (0571)88215632 E-mail: YHZ0101@126.com

耐药性^[4]。因此,寻找和发现新的抗哮喘药物及治疗靶点是当前研究的热点^[5-7]。

近年来, Deshpande 等^[8]发现肺部气道存在苦味受体 (bitter taste receptors, TAS2Rs), 使用苦味物质刺激肺部气道 TAS2Rs 能从深处打开肺部气道, 引起气道平滑肌舒张和支气管扩张, 其效应甚至优于目前临床最好的哮喘治疗药物, 并且与 β -肾上腺素受体激动剂具有协同作用。TAS2R14 是肺部 TAS2Rs 中表达最高的一种亚型, 其编码基因位于 12 号染色体短臂, 表达于人类呼吸道平滑肌细胞。TAS2R14 受体的活化可导致细胞内钙离子浓度增加, 促使位于细胞膜的钾离子通道开放, 细胞膜超极化, 平滑肌放松和支气管扩张^[9]。因此, TAS2R14 已成为哮喘治疗的新靶点。本研究拟建立特异性高表达受体 TAS2R14 的细胞模型, 用于具有 TAS2R14 激动效应的中药及活性成分筛选, 为研发治疗哮喘等慢性呼吸道疾病的新型药物提供依据。

1 材料

1.1 细胞、慢病毒载体系统及菌株

人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 细胞株、人胚肾细胞 HEK293T 细胞株, 中国科学院上海细胞所; 慢病毒载体系统 (Tronolab)、大肠杆菌菌株 DH5 α , 美国 Invitrogen 公司。

1.2 主要药物与试剂

阳性药地芬尼多 (批号 20150321) 和咖啡因 (批号 20150112), 上海士锋生物有限公司; 中药单体化合物: 柠檬苦素 (质量分数 99.5%, 批号 20141225), 芦丁 (质量分数 99%, 批号 20150224), 奎宁 (质量分数 99.5%, 批号 20150118), 购于西安开来生物工程有限公司; 中药提取物由本实验室提取; MTT, 美国 Sigma 公司; RPMI 1640 培养液、胎牛血清 (FBS), Hyclone 公司; 胰蛋白酶, Invitrogen 公司; Axygen 质粒抽提试剂盒, 美国 Omega Bio-Tek 公司; 引物合成, 上海生工生物工程有限公司; 阳性克隆测序, 南京金斯瑞生物科技有限公司; Trizol, Invitrogen 公司; 基因组 DNA 提取试剂盒, TaKaRa 公司; 琼脂糖, 赛百盛公司; T4 DNA 连接酶, NEB 公司; NucleoSpin RNA Clean-up 试剂盒, MN 公司; RT-PCR 试剂盒, TaKaRa 公司; 其他试剂购自上海试剂公司。

1.3 仪器

LSM-710 激光扫描共聚焦显微镜 (德国 CarlZeiss 公司); CO170S-230-1000 型 CO₂ 培养箱

(美国 New Brunswick Scientific 公司); Realplex.2s 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 仪 (美国 Eppendorf 公司); BMI 3000 荧光倒置显微系统 (Leica 公司)。

2 方法

2.1 表达 TAS2R14 基因慢病毒载体的构建

严格按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 BEAS-2B 细胞基因组 DNA, 用 PCR 法扩增得到 TAS2R14 基因的序列 (序列号 NM_181745), 设计引物, 上游引物为 5'-CACTGGTGAAGTATTGACTGG-3', 下游引物为 5'-GAGATTGCCAAAGCAGTGAGGATGTGACCTGAG-3'。病毒包装系统为四质粒系统, 组成为 pRsv-REV、pMD1g-pRRE、pMD2G、Transfer Vector, 其中 Transfer Vector 含有能表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的片段。限制性内切酶 Sal I、Sac II 双酶切慢病毒载体和 TAS2R14 基因片段, 使其带有黏性末端, DNA 凝胶试剂盒回收。在 T4 DNA 连接酶的作用下进行慢病毒载体和 TAS2R14 基因的连接反应, 反应体系为 10 \times T4 DNA 连接酶 1.0 μ L, 慢病毒载体和 TAS2R14 基因 DNA 片段各 1.0 μ L, 加 ddH₂O 至 10 μ L, 以上试剂混合后反应 12 h。取连接产物转化 DH5 α 感受态菌株, 挑取单克隆菌落, RT-PCR 法筛选阳性克隆。严格按照 Axygen 质粒抽提试剂盒说明书抽提重组质粒, 送南京金斯瑞生物科技有限公司经测序鉴定构建成功。

2.2 慢病毒包装与转染

HEK293T 细胞接种于 12 孔板中, 接种密度为 1 \times 10⁴/mL, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。当细胞密度达到 80% 左右时将慢病毒载体用 CaCl₂ 转染法共转染, 同时加入 10 μ g/mL 聚凝胺以增加感染效率。24 h 后更换为完全培养基, 荧光倒置显微镜下观察, 选择荧光素酶表达较好的细胞, 用有限稀释法挑选单克隆。

2.3 转染效率检测及激光共聚焦观察

倒置显微镜下观察慢病毒感染 HEK293T 细胞 GFP 表达情况, 在 Fluo Star Optima 荧光仪上测定荧光强度, 设定激发光波长 538 nm, 测定对照组 (转染空载体) 和模型组 (慢病毒转染) 细胞荧光强度, 计算相对荧光强度, 采用激光扫描共聚焦显微镜检测 pLVX-AcGFP1-N1-TAS2R14 重组载体表达位置。

相对荧光强度 = 模型组荧光强度 / 对照组荧光强度

2.4 RT-PCR 检测 TAS2R14 mRNA 表达

对照组 (转染空载体) 和模型组 (慢病毒转染) 细胞分别以 1 \times 10⁴/mL 接种于 6 孔板中, 待细胞长

到 90% 左右时每孔加入 1 mL Trizol 提取模型组和对照组细胞总 RNA, NucleoSpin RNA Clean-up 试剂盒纯化 RNA, 利用 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒将细胞总 RNA 逆转录成 cDNA 进行 RT-PCR。引物序列: 人 TAS2R14 上游引物为 5'-CACTGGTGAACTGTATTGACTGG-3', 下游引物为 5'-GAGATTGCCAAAGCAGTGAGGAT-3'。人 18 S 上游引物为 5'-GACTCAACACGGGAAACCTCAC-3', 下游引物为 5'-CCAGACAAATCGCTCCACCAAC-3'。

RT-PCR 反应参数设置: 95 °C、1 min; 95 °C、30 s; 60 °C、30 s; 72 °C、30 s; 95 °C、10 s; 65 °C、40 s; 40 °C、60 s。以人 18 S 为内参, 检测目的基因相对内参基因的表达量。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算模型组目的基因相对对照组的表达量。另以逆转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 取 10 μ L PCR 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外线透射下拍照。

2.5 模型特异性和稳定性考察

使用经典 TAS2R14 受体激动剂地芬尼多和咖啡因来刺激模型细胞, 作为阳性对照组, 阴性对照组则加入等体积的溶剂刺激模型细胞; 选择国际公认的统计学参数 Z' 因子来判断高通量筛选模型稳定性, 计算公式为:

$$Z' = 1 - 3 (SD_{neg} + SD_{pos}) / |M_{pos} - M_{neg}|$$

M_{pos} 阳性对照的平均荧光值, M_{neg} 为阴性对照的平均荧光值, SD_{neg} 为阴性对照的标准偏差, SD_{pos} 阳性对照的标准偏差

当 $Z' < 0.5$ 时, 分析条件不能用于高通量筛选, 还需要进一步优化; 如果 $Z' > 0.5$ 则表示筛选体系有良好的稳定性, 可进行高通量筛选。

2.6 高通量筛选条件优化

将慢病毒转染的 HEK293T 细胞以每孔 1×10^4 密度接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 4、8、12、24、36 h, 检测荧光强度, 确定最佳培养时间。将细胞分别以不同密度 (每孔 5×10^3 、 1×10^4 、 1.5×10^4 、 2.0×10^4 、 2.5×10^4 、 3.0×10^4 个) 接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后检测荧光强度, 确定最佳细胞接种密度。

2.7 利用 TAS2R14 细胞模型筛选中药

选用对数生长期贴壁的慢病毒转染的 HEK293T 细胞, 胰酶消化后, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基配成 1×10^4 /mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔接种 100 μ L, 37 °C、5% CO_2 及饱和湿度培养。模型组加入 PBS, 以地芬尼多和咖啡因作

为阳性对照, 在 Fluo Star Optima 荧光仪上测定荧光强度, 设定激发光波长为 538 nm, 24 h 后测定细胞的荧光强度。初筛采用 4 复孔实验, 共测试 120 个中药样品及单体化合物, 样品平均孔荧光强度如大于模型组 50% 以上, 则认为此样品为初筛阳性样品。设置药物浓度梯度 (0、3、10、30、90 μ mol/L) 进行复筛, 并设置相应浓度的药物溶液进行本底对照。复筛 2 次均呈阳性确定为阳性样品, 并在荧光显微镜下观察候选药物对模型细胞荧光强度表达的影响。

采用 MTT 法检测复筛阳性样品对慢病毒转染的 HEK293T 细胞增殖活性的影响, 具体操作步骤: 选用对数生长期的贴壁细胞, 以 1×10^4 /mL 的细胞密度接种于 96 孔培养板, 每孔接种 100 μ L, 置 CO_2 培养箱中过夜。给药组给予相应浓度药物, 空白对照加入等体积的溶剂 (无血清 RPMI 1640 培养基), 37 °C、5% CO_2 培养 36 h。弃去上清液, 每孔加入 20 μ L 新鲜配制的含 0.2 mg/mL MTT 的无血清培养基, 37 °C 继续培养 4 h。小心吸去上清液, 并加入 150 μ L DMSO, 用微型超声振荡器混匀后, 酶标仪检测 570 nm 处吸光度 (A) 值, 参比波长为 450 nm。

2.8 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 荧光报告基因表达检测

激发光波长为 538 nm, 慢病毒转染 pLVX-AcGFP1-N1-TAS2R14 重组载体后, 模型组与对照组比较, 相对荧光强度显著增强, 结果见图 1。倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况, 模型组表达 GFP 的 HEK293T 细胞约占细胞总数的 90% 左右, 证明慢病毒转染成功, 结果见图 2。激光扫描共聚焦显微镜检测 pLVX-AcGFP1-N1-TAS2R14 重组载体表达位置, 荧光主要表达于细胞膜及细胞质, 结果见图 3。

3.2 模型特异性和稳定性评估

分别提取模型组和对照组 HEK293T 细胞株 RNA, 经反转录得到 cDNA, PCR 扩增获得的目的基因片段经凝胶电泳分离后出现特异性条带, 与 TAS2R14 基因片段的理论相对分子质量基本一致, 结果见图 4。RT-PCR 结果显示, 模型组与对照组比较, TAS2R14 mRNA 表达水平升高 2.3 倍, 差异显著, 表明 TAS2R14 细胞筛选模型构建成功, 结果见图 5。

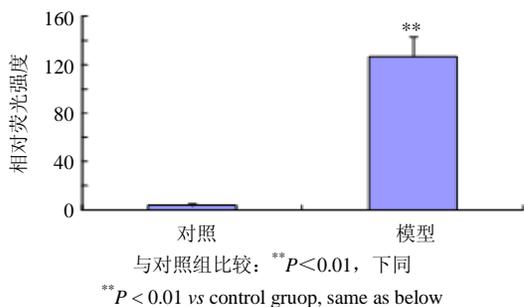


图 1 转染 pLVX-AcGFP1-N1-TAS2R14 重组载体前后相对荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Relative fluorescence intensity before and after transfection of pLVX-AcGFP1-N1-TAS2R14 recombinant vector ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

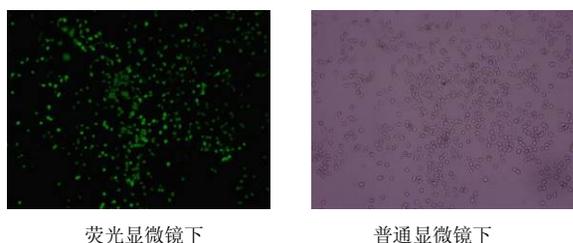


图 2 慢病毒感染 HEK293T 细胞 GFP 表达情况

Fig. 2 GFP expression in lentivirus infected HEK293T cells

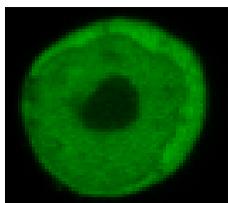
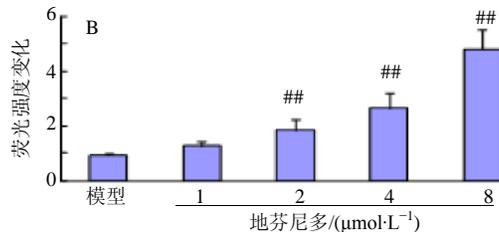
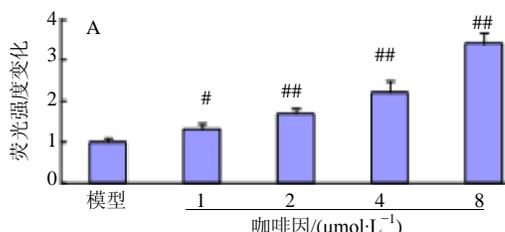


图 3 激光共聚焦检测 HEK293T 细胞 GFP 表达位置

Fig. 3 Position of GFP expression in HEK293T cells detected by laser confocal microscope

分别用地芬尼多和咖啡因刺激 TAS2R14 模型细胞, 24 h 后检测荧光强度, 相对荧光强度与阳性药呈剂量依赖性增长, 8 $\mu\text{mol/L}$ 的地芬尼多诱导倍数可达到 4.9 倍, 8 $\mu\text{mol/L}$ 的咖啡因诱导倍数可达



与模型组比较: #P < 0.05 ##P < 0.01, 图 9 同
#P < 0.05 ##P < 0.01 vs model group, Fig. 9 is same

图 6 咖啡因 (A) 和地芬尼多 (B) 对 TAS2R14 模型细胞的激动作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 6 Agonistic actions of caffeine (A) and diphenidol (B) on TAS2R14 cell model ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

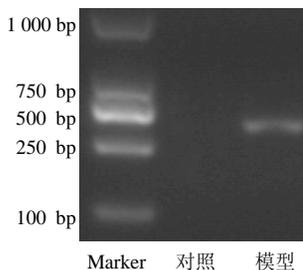


图 4 TAS2R14 产物凝胶电泳图

Fig. 4 Electrophoretogram of TAS2R14 product

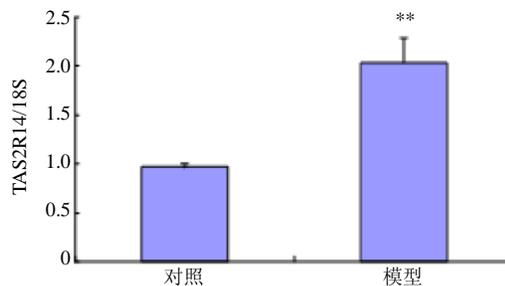


图 5 模型组与对照组 TAS2R14 mRNA 相对表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 mRNA expression of TAS2R14 in control group and model group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

到 3.8 倍, 结果见图 6。Z'因子反映了筛选体系的可靠性和稳定性, 综合考虑了信号/噪音比和重复性等因素。Z'因子越接近 1, 筛选体系越稳定。阳性药地芬尼多和咖啡因刺激模型细胞 24 h 后检测荧光强度, 计算得到的 Z'因子分别为 0.69 和 0.66, 均大于 0.5, 模型的稳定性良好, 符合高通量筛选要求。

3.3 高通量筛选条件优化

激动剂与受体作用后产生的荧光强度与激动剂与受体相互作用时间相关, 孵育时间为 18~24 h 时, 荧光素酶有最高的表达量, 因此, 后续高通量筛选中确定孵育时间为 24 h。细胞接种数目对测试结果有重要影响, 随着细胞接种密度增加, 荧光强度增加, 基底值也增加, 当细胞接种密度为每孔 2×10^4 个时, 荧光响应值与基底值差值最大, 适于筛选。结果见图 7。

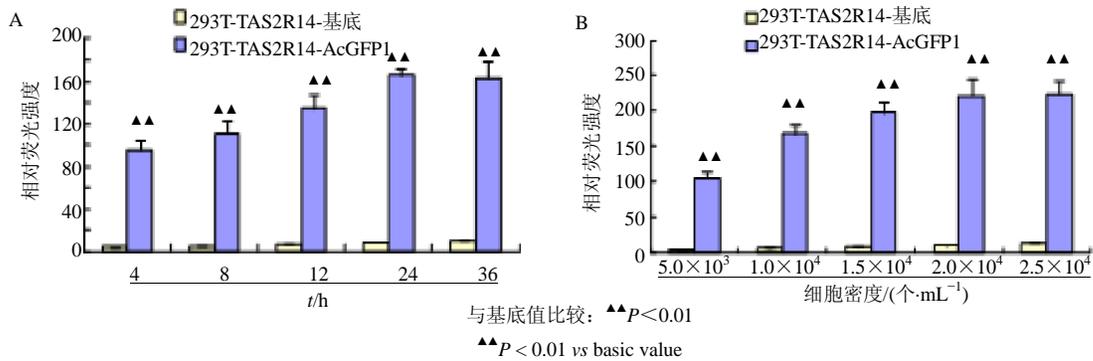


图 7 孵育时间与信噪比的关系优化 (A) 和接种密度与信噪比的关系优化 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 7 Relationship between cultivating time and signal-to-noise ratio (A) and inoculation density and signal-to-noise ratio (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.4 TAS2R14 细胞模型药物筛选的应用

用构建好的 TAS2R14 报告基因系统对 120 种苦味中药提取物进行筛选, 去掉由细胞毒引起的假阳性样品, 筛选出白果、橙皮、鱼腥草的醇提取物对 TAS2R14 细胞模型有明显的激动作用, 相对荧光强度增加 50% 以上, 结果见图 8。选取这 3 种苦味中药中的主要单体成分进行进一步的高通量筛选, 结果发现芦丁、奎宁、柠檬苦素能促进模型细胞的荧光表达。随着芦丁、奎宁、柠檬苦素浓度的增加和作用时间的延长, 对 TAS2R14 模型细胞激动率逐渐增加, 呈明显的剂量和时间依赖效应, 结果见图 9。与模型组比较, 给予相同浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$) 的芦丁、奎宁、柠檬苦素及咖啡因 24 h 后, TAS2R14 报告基因系统荧光强度显著增强, 结果见图 10。MTT 实验结果显示, 给药浓度下, 芦丁、柠檬苦素、奎宁对 HEK293T 细胞增殖无明显影响, 因此排除了细胞增殖对荧光强度的影响, 结果见表 1。

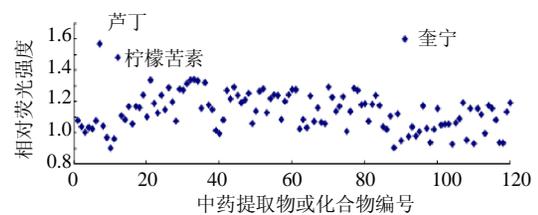


图 8 苦味中药的初步筛选结果 ($n = 5$)

Fig. 8 Results of primary screening of bitter herbs ($n = 5$)

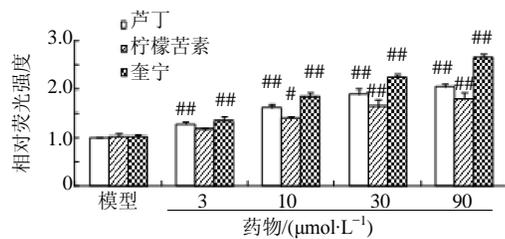


图 9 芦丁、柠檬苦素、奎宁对 TAS2R14 细胞模型的激动作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 9 Agonistic actions of rutin, limonin, and quinine on TAS2R14 cell model ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

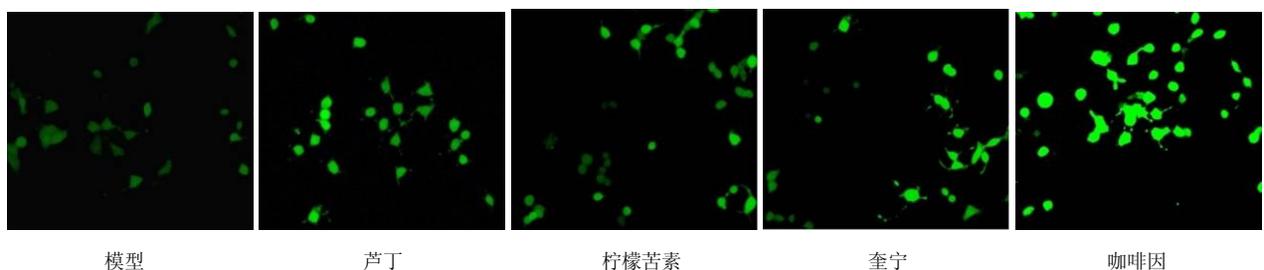


图 10 芦丁、柠檬苦素、奎宁、咖啡因对 TAS2R14 细胞模型的荧光表达影响

Fig. 10 Agonistic actions of rutin, limonin, quinine, and caffeine on fluorescence expression of TAS2R14 cell model

4 讨论

TAS2Rs 属于 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 超家族, 主要表达于口腔味蕾的受体细胞^[10]。近年来研究发现, TAS2Rs 除了在味觉系统表达外, 也可在其他组织器官中表达, 说明 TAS2Rs 除了感知苦味

物质外, 在人体内可能还有其他未被发现的重要生理功能。Singh 等^[11]发现, 在初级神经元细胞中存在 TAS2R4 的转录产物, 此外, TAS2Rs 在胃肠组织中也有表达^[12]。最近研究发现, 在哮喘患儿的白细胞检测到了 TAS2Rs 的高表达。TAS2R14 在人类

表 1 芦丁、柠檬苦素、奎宁对 HEK293T 细胞增殖的影响
Table 1 Effects of rutin, limonin, and quinine on proliferation of HEK293T cells

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	A 值	抑制率/%
芦丁	0	0.948 ± 0.056	—
	3	0.905 ± 0.069	4.5
	10	0.984 ± 0.079	-3.8
	30	0.904 ± 0.087	4.6
	90	0.915 ± 0.084	3.4
柠檬苦素	0	0.898 ± 0.062	—
	3	0.903 ± 0.074	-0.5
	10	0.868 ± 0.056	3.3
	30	0.919 ± 0.082	-2.3
	90	0.857 ± 0.085	4.5
奎宁	0	1.015 ± 0.047	—
	3	0.985 ± 0.076	2.9
	10	0.962 ± 0.103	5.9
	30	0.976 ± 0.025	3.8
	90	0.952 ± 0.054	6.2

呼吸道平滑肌细胞及肺部高表达,接受苦味物质刺激后能引起气道平滑肌舒张和支气管扩张,效果显著,TAS2R14 受体激动剂与 β -肾上腺素受体药物联用能增强其疗效,并能降低其副反应,具有很高的临床应用价值^[13]。

中医认为,哮喘属于中医“哮病”范畴,其病理因素以痰为根本,多因肺、脾、肾三脏功能失衡,以致水湿内聚为痰,伏藏于肺,“伏痰”遇诱因引触,痰气搏击而发出痰鸣气喘声。止咳平喘的苦味中药之所以能用于治疗哮喘病症,在于其味苦能降泄肺气,且兼燥湿化痰之功效,减少气道阻力的同时,也能抑制过度释放的痰液和炎症介质,减少内源性病理物质的产生,增强机体免疫力,从而扶正祛邪,全面恢复机体功能^[14-15]。而这一功效特点正与“苦味受体可从深处打开肺部气道,扩张支气管”的生物学作用相一致。常用中药中很多都具有苦味成分,主要化学成分大致可归为生物碱类、黄酮类、苷类和萜类等^[16]。而苦味药物的活性与其化学结构与空间构型均有关系,值得深入研究。

本实验以苦味受体 TAS2R14 为切入点,采用地芬尼多和咖啡因为阳性对照,计算建立的 TAS2R14 激动剂高通量筛选模型 Z' 因子分别为 0.69 和 0.66,符合高通量筛选要求。通过对中药提取物样品库的筛选,发现白果、橙皮、鱼腥草的醇提物对模型细胞具有显著的激动作用,进一步实验发现,陈皮中的苦味单体化合物柠檬苦素、白果中的苦味单体化合物芦丁以及奎宁可激动 TAS2R14 模型细胞,提示

其具有潜在的抗哮喘作用。目前已知具有收缩气管作用的苦味受体药物主要有土的宁、氯喹等,但因其强烈的细胞毒性以及副作用,难以作为治疗哮喘的药物投入临床。本实验筛选出的柠檬苦素、芦丁、奎宁毒性较低,对人支气管平滑肌细胞杀伤作用小,且对支气管存在一定的保护作用,为新型抗哮喘药物的进一步研发提供了基础。

参考文献

- [1] 严展鹏, 张晓震, 徐东宁, 等. 从调节性 T 细胞和 Th17 细胞变化探讨抗敏哮喘治疗哮喘机制 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1731-1735.
- [2] Stewart R E, DeSimone D L. New perspectives in gustatory physiology: transduction, development, and plasticity [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1997(1 Pt 1): C1-C26.
- [3] Bai G B, Liu Y, Li Y L, et al. Regulation of Fengxiaofang on expression of gene gob-5 in asthmatic mice [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 68-71.
- [4] 胡静, 廖茂梁, 张铁军. 中药抗支气管哮喘作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 2008-2011.
- [5] Bousquet J, Clark T J, Hurd S, et al. GINA guidelines on asthma and beyond [J]. *Allergy*, 2007, 62(2): 102-112.
- [6] Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma [J]. *Front Microbiol*, 2013, 4(10): 263-278.
- [7] 田苗, 刘永贵, 肖桂芝, 等. 呼吸系统用药的研发进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 114-118.
- [8] Deshpande D A, Wang W C, McIlmoyle E L, et al. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction [J]. *Nat Med*, 2010, 16(11): 1299-1304.
- [9] 叶萍. 苦味受体及其传导机制的研究进展 [J]. 国外医学: 口腔医学分册, 2003, 30(6): 453-454.
- [10] Wong G T, Gannon K S, Margolske R F. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin [J]. *Nature*, 1996, 381(6585): 796-800.
- [11] Singh N, Vrontakis M, Parkinson F, et al. Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(1): 146-151.
- [12] Wu S V, Rozengurt N, Yang M, et al. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2392-2397.
- [13] Behrens M, Brockhoff A, Kuhn C, et al. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319(2): 479-485.
- [14] 王成阳, 李泽庚. 支气管哮喘病因病机及辨证分型研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2012, 11(23): 2860-2862.
- [15] 张铁军, 刘昌孝. 中药五味药性理论辨识及其化学生物学实质表征路径 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 1-6.
- [16] 张雄飞, 黄娟萍, 李碧云, 等. 中药治疗哮喘作用机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 344-377.