

• 药理与临床 •

柚皮苷通过肠道菌群代谢产物介导调控 AMPK/SIRT1/NF- κ B 信号通路改善小鼠急性肺损伤

李雯雯^{1,2}, 许虹¹, 张旭瑶¹, 齐育麟^{1,2}, 周凤洁^{1,2}, 李琳^{1,2}, 赵鑫^{1,2}, 潘桂湘¹, 刘蕊^{1,2*}, 李玉红^{1,2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津中医药大学中医药研究院 组分中药国家重点实验室, 天津 301617

摘要:目的 探究柚皮苷对急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 小鼠的治疗作用及机制, 考察柚皮苷的药效作用是否通过肠道菌群代谢产物介导产生。方法 以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 ALI 小鼠为动物模型, 以小鼠存活率、炎症因子表达、肺组织形态等为指标, 明确柚皮苷抗 ALI 的药效作用; 采用 Western blotting 检测小鼠肺组织中腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) /沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) /核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路及闭锁小带蛋白-1 (zonula occluding-1, ZO-1)、Occludin 蛋白表达。将正常小鼠肠道菌液与柚皮苷共孵育, 采用 UPLC-Q TOF MS/MS 法检测柚皮苷经肠道菌转化的代谢产物。体外构建 LPS 诱导的肺上皮细胞炎症损伤模型, 给予柚皮苷及其肠道代谢产物柚皮素与对羟基苯丙酸 [3-(4'-hydroxyphenyl) propanoic acid, HPPA] 干预后, 采用 ELISA 法检测细胞培养上清液炎症因子水平, Western blotting 检测 AMPK/SIRT1/NF- κ B 通路相关蛋白的表达。结果 与模型组比较, 给予柚皮苷干预后, ALI 小鼠血清和肺组织中炎症因子表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肺功能得到明显改善 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肺组织中 p-AMPK/AMPK 值、SIRT1、ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), p-NF- κ B/NF- κ B 值显著降低 ($P < 0.05$)。柚皮苷与小鼠肠道菌群共孵育 24 h 后部分被转化为柚皮素与 HPPA。在细胞炎症模型中, 100 μ mol/L 柚皮素、HPPA 均能显著提高细胞存活率 ($P < 0.01$), 降低细胞培养上清中炎症因子水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 激活 AMPK/SIRT1 通路 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低 p-NF- κ B/NF- κ B 值 ($P < 0.01$), 而柚皮苷未表现出上述作用。结论 柚皮苷通过肠道菌群生物转化产生的代谢物柚皮素与 HPPA 激活 AMPK/SIRT1 通路, 抑制 NF- κ B 表达, 从而改善 LPS 诱导的小鼠 ALI。

关键词: 柚皮苷; 急性肺损伤; AMPK/SIRT1/NF- κ B 信号通路; 肠道菌群; 柚皮素; 对羟基苯丙酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)20-7384-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.20.011

Naringin improves acute lung injury in mice by mediating regulation of AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway through gut microbiota metabolites

LI Wenwen^{1, 2}, XU Hong¹, ZHANG Xuyao¹, QI Yulin^{1, 2}, ZHOU Fengjie^{1, 2}, LI Lin^{1, 2}, ZHAO Xin^{1, 2}, PAN Guixiang¹, LIU Rui^{1, 2}, LI Yuhong^{1, 2}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. State Key Laboratory of Components of Traditional Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of naringin (NG) on acute lung injury (ALI) in mice, as well as to determine whether the pharmacological action of NG is mediated by its intestinal flora-derived metabolites. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS)-induced ALI mice was used as the animal model, the therapeutic effect of NG against ALI was determined

收稿日期: 2025-07-12

基金项目: 天津市科技计划项目 (25JCLMJC00170, 25JCLZJC00100); 国家自然科学基金重点项目 (81830112)

作者简介: 李雯雯, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: liwenwen0404@163.com

*通信作者: 李玉红, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药心血管药理研究。E-mail: yhltem@126.com

刘蕊, 硕士, 主管护士, 从事医学护理研究。E-mail: liurui0061@tjutcm.edu.cn

by survival rate of mice, inflammatory factors expressions and lung tissue morphology. Western blotting was used to detect the protein expressions of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/silent information regulator 1 (SIRT1)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway and zonula occluding-1 (ZO-1) and Occludin in lung tissue of mice. Normal mouse intestinal flora was co-incubated with NG, and the metabolic products of NG transformed by intestinal flora were detected by UPLC-Q TOF MS/MS. An LPS-induced lung epithelial cell inflammatory injury model was constructed *in vitro*, NG and its intestinal metabolic products naringenin (NE) and 3-(4'-hydroxyphenyl) propanoic acid (HPPA) were given for intervention, the levels of inflammatory factors in cell culture supernatant were detected by ELISA, and the protein expressions related to AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway were detected by Western blotting.

Results Compared with model group, after intervention with NG, the expressions of inflammatory factors in serum and lung tissue of ALI mice were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), lung function was significantly improved ($P < 0.05, 0.01$), the value of p-AMPK/AMPK and protein expression levels of SIRT1, ZO-1 and Occludin were significantly increased ($P < 0.01$), the value of p-NF- κ B/NF- κ B was significantly decreased ($P < 0.05$). After co-incubation with mouse intestinal flora for 24 h, part of NG was converted into NE and HPPA. In the cell inflammation model, 100 μ mol/L NE and HPPA could significantly increase cell survival rate ($P < 0.01$), reduce the levels of inflammatory factors in cell culture supernatant ($P < 0.05, 0.01$), activate AMPK/SIRT1 pathway ($P < 0.05, 0.01$), and decrease the value of p-NF- κ B/NF- κ B ($P < 0.01$), while NG did not show the above effects.

Conclusion Naringin activates AMPK/SIRT1 pathway and inhibits NF- κ B through metabolites NE and HPPA produced by biotransformation of intestinal flora, thereby improving LPS-induced ALI in mice.

Key words: naringin; acute lung injury; AMPK/SIRT1/NF- κ B signaling pathway; gut microbiota; naringenin; 3-(4'-hydroxyphenyl) propanoic acid

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由肺泡上皮细胞-内皮细胞屏障破坏引发的肺部弥漫性炎症损伤, 严重时可发展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 具有发病率高、死亡率高的特点^[1]。在感染等外界因素刺激下, 免疫细胞过度释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 与 IL-6 等促炎因子形成的炎症风暴是疾病发展的关键驱动因素^[2]。腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 是一种参与能量代谢调节的重要激酶^[3]。沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 是一种依赖烟酰胺腺苷二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 的脱乙酰酶, 具有抗炎与抗凋亡的作用^[4]。据报道, 活化的 AMPK 可提高细胞内 NAD⁺ 浓度并激活 SIRT1, 从而阻断核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路, 抑制炎症反应^[5]。此外, 激活 SIRT1 可以增加紧密连接蛋白表达, 从而改善脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠肺屏障损伤^[4]。因此, AMPK/SIRT1 通路是治疗 ALI 的重要潜在靶点。

柚皮苷是一种天然黄酮类化合物, 广泛存在于芸香科植物的果皮和果肉中, 具有抗炎、抗氧化、抗凋亡及免疫调节等多种生物活性^[6-7], 也是“三药三方”中宣肺败毒方的主要化学成分之一^[8]。已有多项研究报道, 柚皮苷在 LPS、角叉菜胶等诱导的

肺损伤中具有抗炎作用, 其可能通过抑制 NF- κ B 信号通路降低炎症反应水平, 缓解小鼠肺损伤^[9-10]。但柚皮苷的口服生物利用度非常低, 难以吸收入血。口服给药后, 未被小肠吸收的柚皮苷会在结肠内蓄积, 与肠道菌群相互作用^[11], 在肠道菌群分泌的 β -葡萄糖苷酶作用下首先水解为柚皮素, 进一步环裂解为对羟基苯丙酸 [3-(4'-hydroxyphenyl) propanoic acid, HPPA], 吸收入血^[12]。而柚皮苷的药效是否通过其肠道代谢产物柚皮素、HPPA 间接发挥作用尚不清楚。因此, 本研究主要探讨柚皮苷减轻小鼠 ALI 的药效作用及机制, 并探究柚皮苷的药效作用是否通过柚皮素、HPPA 介导产生。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2017-0033, 饲养于天津中医药大学动物中心, 动物实验经天津中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 TCM-LAEC2021267)。

人肺上皮细胞 BEAS-2B 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

对照品柚皮苷、柚皮素 (质量分数 > 98%, 批号分别为 DY0099、DY0483) 购自成都乐美天医药科技有限公司; HPPA 对照品 (质量分数 > 98%, 批

号 B20325) 购自上海源叶生物科技有限公司; LPS (来源于大肠杆菌 0111:B4)、地塞米松 (批号分别为 L3023、265005) 购自美国 Sigma 公司; 小鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号分别为 YX-000912M、YX-091206H、YX-E201407M) 购自上海优选生物科技有限公司; 人 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 ELISA 试剂盒 (批号分别为 88-7346-22、88-7261-22、88-7399-22) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; NF- κ B p65 抗体、p-NF- κ B p65 抗体、AMPK α 抗体、p-AMPK α 抗体、SIRT1 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (批号分别为 8242S、3033S、2532S、2535S、9475S、7074S、7076S) 购自美国 CST 公司; 闭锁小带蛋白-1 (zonula occluding-1, ZO-1) 抗体 (批号 61-7300)、Occludin 抗体 (批号 71-1500) 购自美国 Invitrogen 公司; DMEM 高糖培养基 (批号 C3113-0500) 购自上海道鹏生物科技有限公司。

1.3 仪器

PLY-UNR-MS2 型动物肺功能监测系统 (法国 EMKA Technologies 公司); ES-500 型组织包埋机、HS-1125 型摊片机 (金华市华速科技有限公司); PanoramicMIDI 型数字切片扫描仪 (匈牙利 3D Histech 公司); NanoDrop ONE 型超微量生物检测仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CFX96 型实时定量 PCR 系统、PowerPac Basic 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Amersham Imager 600 型凝胶成像系统 (美国 General Electric 公司); 6520 型 UPLC Q-TOF/MS (美国 Agilent 公司); AG3000 型厌氧培养箱 (重庆江雪科技有限公司); MTN-2800W 型氮吹仪 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模、给药与取材

C57BL/6N 小鼠按体质量随机分为对照组、LPS 组、地塞米松 (5 mg/kg) 组和柚皮苷低、高剂量 (40、80 mg/kg) [13-14] 组, 对照组 6 只小鼠, 其余各组 15 只小鼠。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的纯净水, 1 次/d, 连续给药 7 d。实验第 3 天造模, 除对照组外, 其余小鼠尾 iv LPS 溶液 (5 mg/kg), 1 次/d, 连续注射 3 d, 建立 ALI 小鼠模型。实验第 7 天取材, 小鼠摘眼球取血, 4 $^{\circ}$ C、1 000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清进行 ELISA 检测。小鼠解剖后, 取肺与脾组织, 拍照, 称定质量, 制备肺组织切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 观

察肺组织病理学变化。

2.2 细胞培养、分组与给药

BEAS-2B 细胞用 DMEM 高糖培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数生长期的细胞进行实验。细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 加入不同浓度 (3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000 μ mol/L) 的柚皮苷、柚皮素、HPPA 处理 24 h, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, 筛选最佳给药剂量。

设置对照组、模型组和给药组, 模型组加入 5 μ g/mL LPS 处理 24 h, 各给药组加入不同浓度 (25、50、100 μ mol/L) 的柚皮苷、柚皮素、HPPA 与 5 μ g/mL LPS 共孵育 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。

2.3 小鼠肺功能检测

使用 EMKA 动物肺功能检测系统检测各组小鼠肺功能, 肺功能指标包括: 潮气量 (tidal volume, TV)、呼吸频率 (frequency, f)、每分通气量 (minute ventilation volume, MV)、呼气时间 (expiration time, Te)、呼气末暂停时间 (end-expiratory pause, EEP)、呼气中期流速 (expiratory flow 50, EF50)、最大吸气流速 (peak inspiratory flow, PIF) 与最大呼气流速 (peak expiratory flow, PEF)。

2.4 ELISA 法检测炎症因子水平

取“2.1”项下各组小鼠血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平; 收集“2.2”项下各组细胞培养上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-1 β 和 MCP-1 水平。

2.5 qRT-PCR 法检测炎症因子 mRNA 表达水平

取“2.1”项下各组小鼠肺组织, 超声破碎, 取上清, 加入 Trizol 试剂提取 RNA, 将 RNA 反转录为 cDNA, 按照扩增试剂盒说明书进行扩增和 qRT-PCR 分析。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达量。引物序列见表 1。

2.6 Western blotting 检测相关蛋白表达

取“2.1”项下各组小鼠肺组织, 收集“2.2”项下各组细胞, 加入裂解液提取蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭后, 分别加入 NF- κ B、p-NF- κ B、AMPK、p-AMPK、SIRT1、ZO-1、Occludin 与 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜。加入二抗孵育 1.5 h, 洗膜, 上机显影。采用 Image J 与 Gelpro32 软件计算目标条带的灰度值, 以 β -actin 作为内参条带, 计算目的蛋白相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	种属	引物序列 (5'-3')
<i>TNF-α</i>	小鼠	F: CCACCACGCTCTTCTGTCTA R: TGGATGCTCTCATCAGGACAG
<i>IL-1β</i>	小鼠	F: GAAATGCCACCTTTTGACAGTG R: TGGATGCTCTCATCAGGACAG
<i>IL-6</i>	小鼠	F: TTCTTGGGACTGATGCTGGT R: CAGGTCTGTTGGGAGTGGA
<i>MCP-1</i>	小鼠	F: CTTCTGGGCCTGCTGTTCA R: CCAGCCTACTCATTGGGATCA
<i>β-actin</i>	小鼠	F: CTACCTCATGAAGATCCTGACC R: CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC

2.7 柚皮苷与小鼠肠道菌群体外孵育产物检测

2.7.1 样品制备 取健康小鼠粪便制备肠道菌液，设置柚皮苷（300 μg/mL）组、肠道菌液组、柚皮苷（300 μg/mL）+肠道菌液组，在 37 ℃厌氧条件下将柚皮苷与肠道菌液共孵育 24 h。取上清，进行 UPLC-Q-TOF MS/MS 检测。

2.7.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），流动相为乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱：0~1 min，2% A；1~9 min，2%~50% A；9~15 min，50%~98% A；15~20 min，98% A；20~21 min，98%~2% A；21~26 min，2% A。柱温 30 ℃；进样量 2 μL；体积流量 0.3 mL/min。

2.7.3 质谱条件 电喷雾电离源（electrospray ionization，ESI），正、负离子模式下检测，ESI 温度 100 ℃，干燥气体温度 350 ℃，干燥气体流量 11.0 L/min，雾化器压力 40 psi（1 psi=6.895 kPa），碰撞电压 135 V，碰撞能量 20 V，扫描范围 *m/z* 100~1 700。

2.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism8.0 软件进行统计分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据符合正态分布的情况下，多组数据比较采用单因素方差分析，数据不符合正态分布，则采用非参数秩和检验。

3 结果

3.1 柚皮苷对 ALI 小鼠肺组织损伤的影响

如图 1-A 所示，模型组小鼠存活率为 75%，柚皮苷高剂量组小鼠存活率为 86.7%，表明给予柚皮苷干预后，ALI 小鼠存活率显著提高。如图 1-B 所示，模型组小鼠肺湿质量、肺脏与脾脏系数均显著高于对照组（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，柚皮苷高

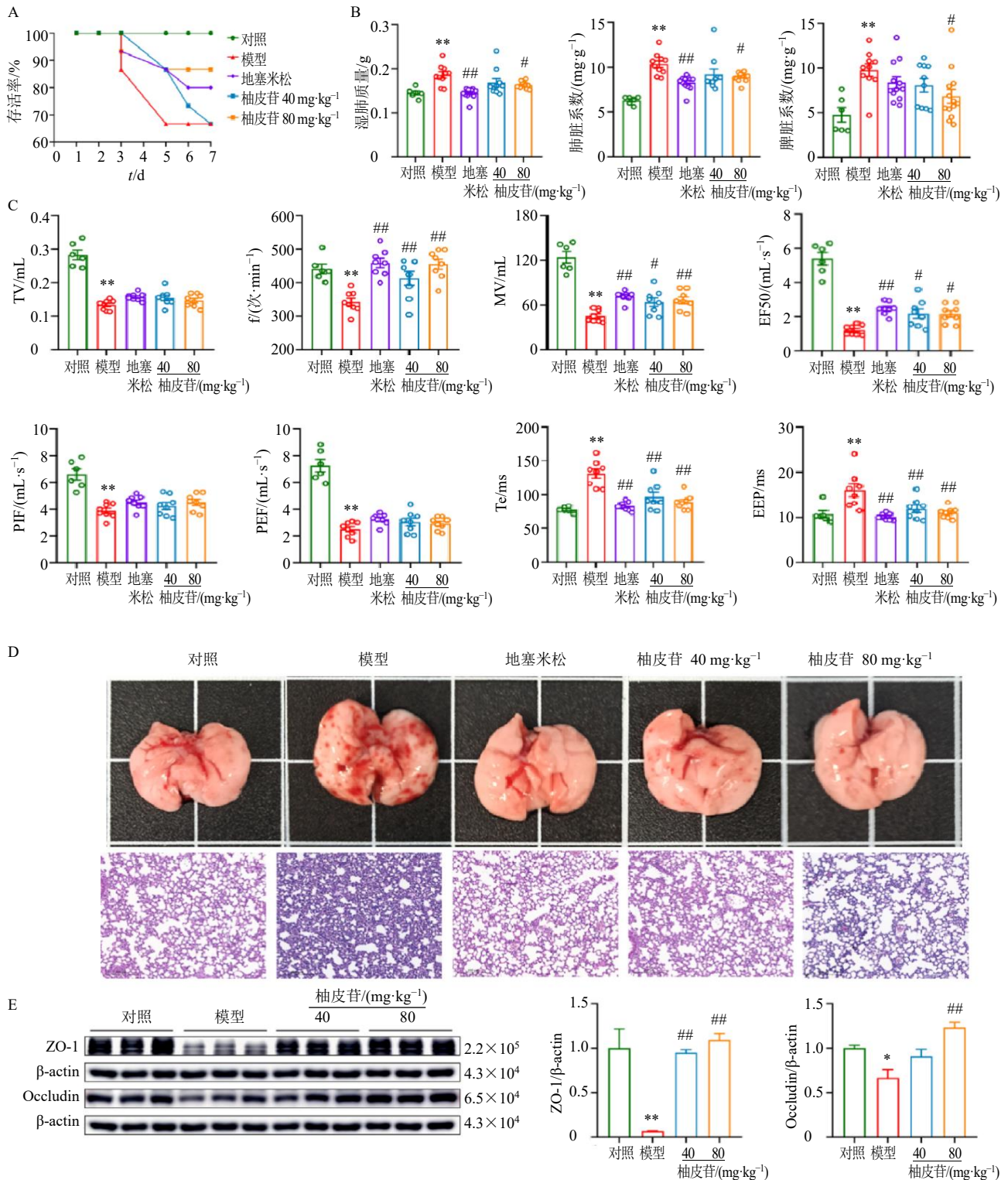
剂量组小鼠肺湿质量、肺脏与脾脏系数均显著降低（ $P<0.05$ ）。如图 1-C 所示，模型组小鼠肺组织通气和气体交换功能受损，柚皮苷给药后可明显改善小鼠肺功能损伤（ $P<0.05$ 、0.01）。如图 1-D 所示，对照组小鼠肺组织形态正常，表面光滑，色泽粉红；与对照组相比，模型组小鼠肺组织体积较大且伴有大量暗红色出血点；柚皮苷各剂量组小鼠肺组织存在少量暗红色出血点，其余部分色泽粉红色。肺组织的 HE 染色可见，对照组小鼠肺泡结构完整，肺泡间隔均匀，无出血或炎性细胞浸润；模型组小鼠肺组织中出现肺泡塌陷，肺间质间隔明显增厚，可见大量炎性细胞浸润；给予药物干预后肺组织病理改变明显减轻。如图 1-E 所示，与对照组比较，模型组小鼠肺组织中 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平显著降低（ $P<0.05$ 、0.01）；与模型组比较，柚皮苷高剂量组肺组织中 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平显著升高（ $P<0.01$ ），柚皮苷低剂量组肺组织中 ZO-1 蛋白表达水平显著升高（ $P<0.01$ ）。以上结果表明柚皮苷能显著提高 LPS 诱导的 ALI 小鼠存活率，改善肺功能，提高紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达，从而缓解小鼠肺组织损伤。

3.2 柚皮苷对 ALI 小鼠血清中炎症因子水平及肺组织炎症因子 mRNA 表达的影响

如图 2-A 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平显著升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，各给药组小鼠血清中 TNF-α 和 IL-1β 水平显著降低（ $P<0.05$ 、0.01），IL-6 水平无明显变化。如图 2-B 所示，与对照组比较，模型组小鼠肺组织中 TNF-α、IL-1β 和 MCP-1 的 mRNA 表达水平显著升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，各给药组小鼠肺组织中 TNF-α、IL-1β 和 MCP-1 的 mRNA 表达水平显著降低（ $P<0.01$ ）。表明柚皮苷能够降低 ALI 小鼠血清与肺组织中炎症因子与趋化因子的表达。

3.3 柚皮苷对 ALI 小鼠肺组织中 AMPK/SIRT1 信号通路及 NF-κB 蛋白表达的影响

如图 3-A 所示，与对照组比较，模型组小鼠肺组织中 p-AMPK/AMPK 值和 SIRT1 蛋白表达水平显著降低（ $P<0.05$ 、0.01）；与模型组比较，柚皮苷高剂量组小鼠肺组织中 p-AMPK/AMPK 值和 SIRT1 蛋白表达水平显著升高（ $P<0.01$ ），柚皮苷低剂量组小鼠肺组织中 SIRT1 蛋白表达水平显著升高（ $P<0.01$ ）。



A-小鼠存活率; B-小鼠肺湿质量、肺脏与脾脏系数; C-小鼠肺功能指标; D-小鼠肺组织外观及病理切片 (HE, $\times 200$); E-小鼠肺组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达; 与对照组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$; 与模型组比较: $\#P < 0.05$ $\#\#P < 0.01$, 下图同。

A-survival rate of mice; B-lung wet weight, lung and spleen coefficient of mice; C-lung function indicators of mice; D-appearance and pathological sections of lung tissue of mice (HE, $\times 200$); E-expressions of ZO-1 and Occludin proteins in lung tissue of mice; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ vs control group; $\#P < 0.05$ $\#\#P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 柚皮苷对 ALI 小鼠肺组织损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 13$)

Fig. 1 Effect of naringin on lung tissue injury in ALI mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 13$)

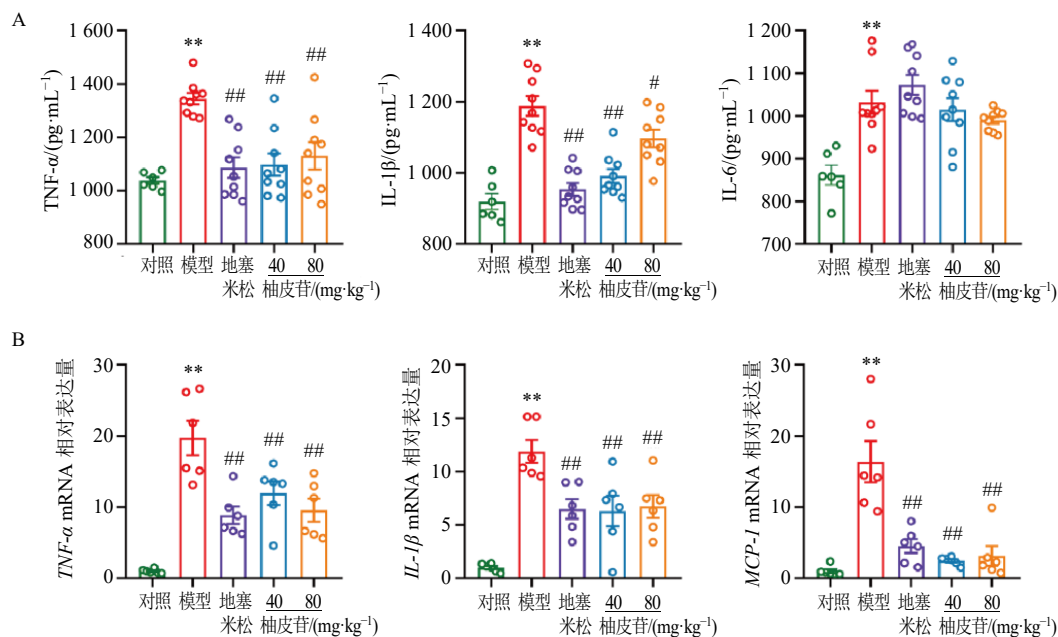


图 2 柚皮苷对 ALI 小鼠血清中炎症因子水平 (A) 及肺组织炎症因子 mRNA 表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 9$)

Fig. 2 Effect of naringin on levels of inflammatory factors in serum (A) and mRNA expressions of inflammatory factors in lung tissue (B) of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 9$)

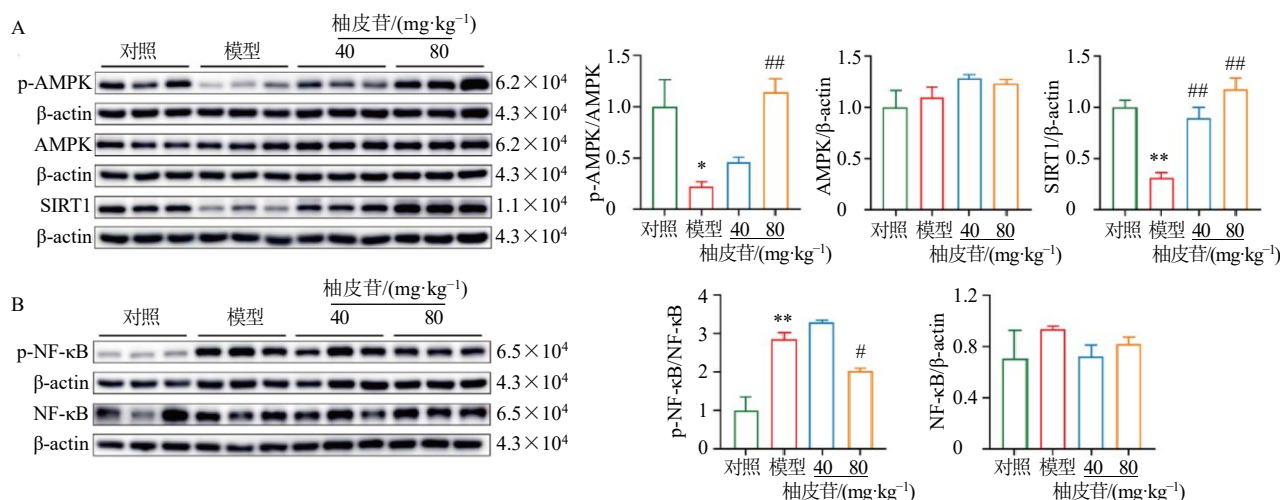


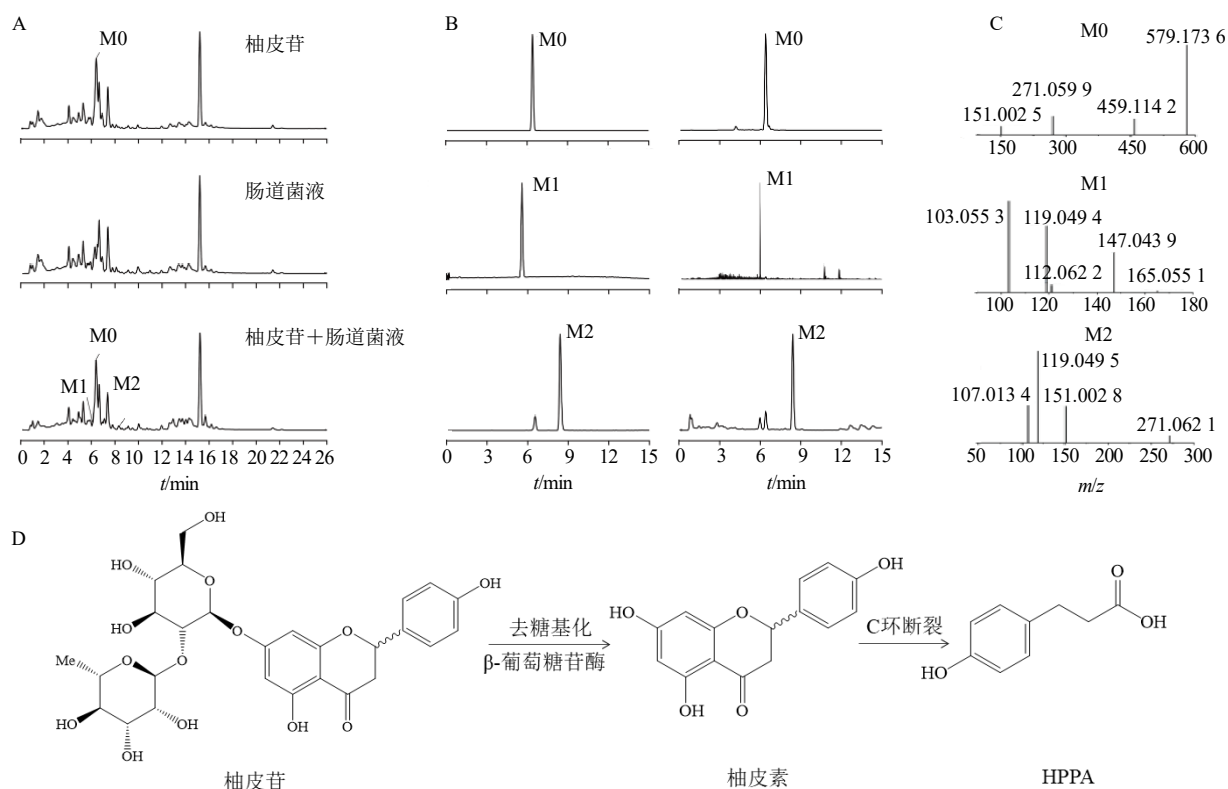
图 3 柚皮苷对 ALI 小鼠肺组织中 AMPK/SIRT1 信号通路 (A) 及 NF-κB (B) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of naringin on protein expressions of AMPK/SIRT1 signaling pathway (A) and NF-κB (B) in lung tissues of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

NF-κB 是炎症过程中关键的转录因子，在 ALI 炎症风暴中起到重要作用。如图 3-B 所示，与对照组比较，模型组小鼠肺组织中 p-NF-κB/NF-κB 值显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，柚皮苷高剂量组小鼠肺组织中 p-NF-κB/NF-κB 值显著降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明柚皮苷可以通过激活 AMPK/SIRT1 信号通路，抑制 NF-κB 活化发挥抗炎作用，从而减轻 ALI 小鼠肺损伤。

3.4 柚皮苷与小鼠肠道菌群共孵育产生的主要代谢物鉴定

各组样品的基峰离子流图见图 4-A，柚皮苷+肠道菌液组分别与柚皮苷组、肠道菌液组对比，以排除 M0（柚皮苷）原型成分与肠道菌液及厌氧培养液中的成分干扰，通过对比标准品保留时间、精确相对分子质量及质谱二级碎片信息（表 2），确定柚皮苷经小鼠肠道菌群介导产生的代谢产物有 M1



A-各组样品基峰离子流图；B-柚皮苷+肠道菌群组 M0、M1、M2 色谱图（右）及其对应的对照品色谱图（左）；C-M0、M1、M2 质谱图；D-柚皮苷经小鼠肠道菌群介导的代谢途径。

A-base-peak ion flow diagrams of samples in each group; B-M0, M1 and M2 chromatograms in naringin + intestinal flora group (right) with their corresponding standard product chromatograms (left); C-M0, M1 and M2 mass spectra; D-metabolic pathway of naringin mediated by intestinal flora in mice.

图 4 柚皮苷与小鼠肠道菌群共孵育主要代谢产物鉴定

Fig. 4 Identification of main metabolites of naringin co-incubation with intestinal flora of mice

表 2 柚皮苷经小鼠肠道菌群介导产生的代谢产物

Table 2 Metabolic products of naringin mediated by mouse intestinal flora

序号	化合物	t_R/min	分子式	相对分子质量	离子模式	实测值 (m/z)	碎片离子 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)
M0	柚皮苷	6.406	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	580.179 2	$[\text{M}-\text{H}]^-$	579.173 6	459.114 2, 271.059 9, 151.002 5	-2.88
M1	HPPA	6.020	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$	166.174 0	$[\text{M}-\text{H}]^-$	165.055 1	147.043 9, 121.062 2, 119.049 4, 103.053 3	3.74
M2	柚皮素	8.419	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	272.068 5	$[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_4]^-$	119.049 5	119.047 6, 105.521 8	6.20

(HPPA) 与 M2 (柚皮素)。M0、M1 与 M2 色谱图与其对应标准品色谱图如图 4-B 所示，M0、M1 与 M2 质谱图如图 4-C 所示。结合文献报道，柚皮苷在肠道菌群分泌的 β -葡萄糖苷酶作用下首先水解为其苷元即柚皮素，进一步环裂解为 HPPA，代谢途径如图 4-D 所示。

3.5 柚皮苷及其肠道代谢产物对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞活力和炎症反应的影响

如图 5-A 所示，3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮苷、柚皮素、HPPA 对 BEAS-2B 细胞存活率均无明显影响，因此，选取 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮苷、柚皮素、HPPA 用于后续实验。如图 5-B 所示，与对照组比

较，模型组细胞存活率显著下降 ($P < 0.01$)；与模型组比较，25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮苷处理后细胞存活率无明显变化，100 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮素、HPPA 处理后细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$)。如图 5-C 所示，与对照组比较，模型组细胞培养上清液中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 及 MCP-1 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮苷处理后细胞培养上清液中炎症因子水平无明显变化，100 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮素和 HPPA 处理后细胞培养上清液中炎症因子水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。以上结果表明，柚皮素和 HPPA 对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞炎症损伤有抑制作用，而柚皮苷未能发挥抗炎作用。

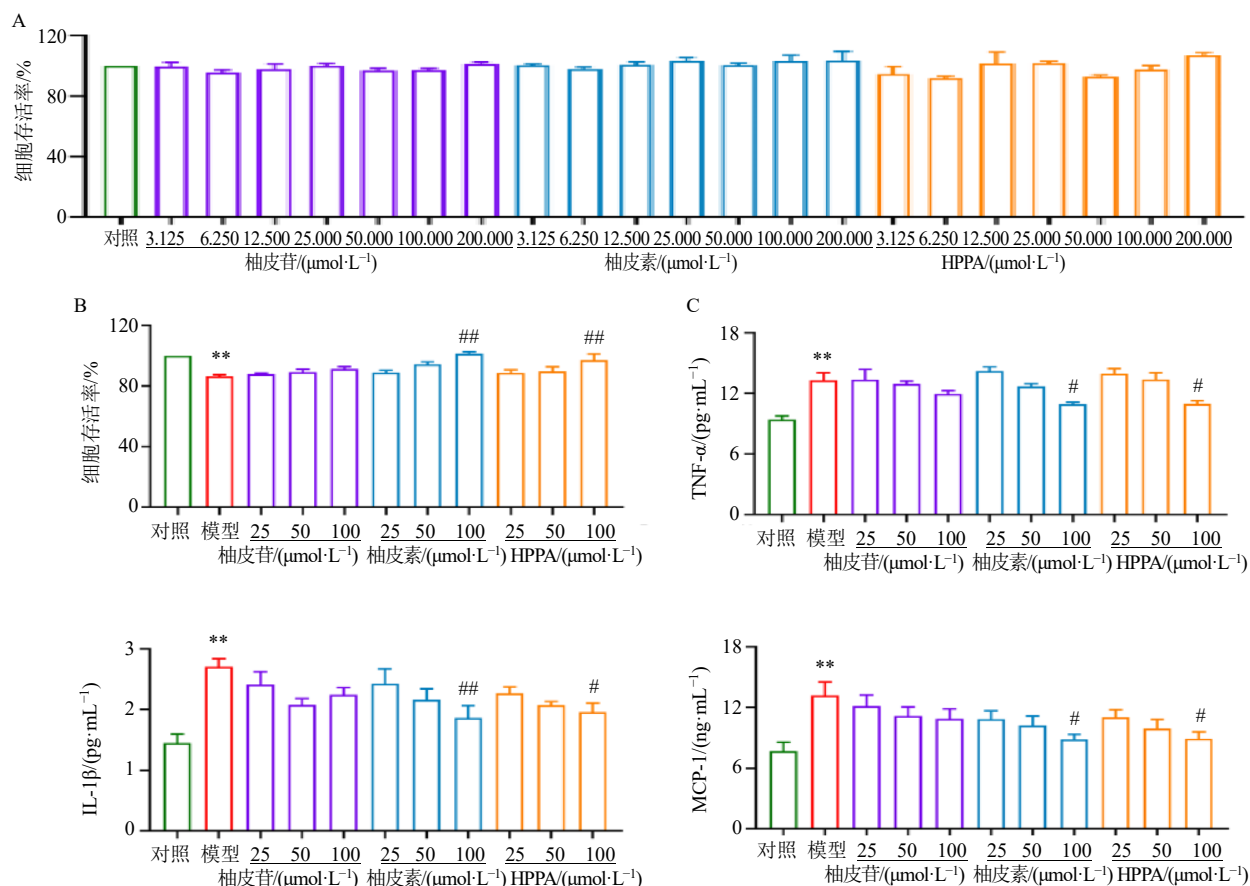


图 5 柚皮苷、柚皮素和 HPPA 对 BEAS-2B 细胞活力 (A) 和 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞活力 (B) 及上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 水平 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of naringin, naringenin and HPPA on BEAS-2B cell viability (A) and viability of BEAS-2B cells induced by LPS (B), levels of TNF- α , IL-1 β , MCP-1 in supernatant (C) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 柚皮苷及其肠道代谢产物对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞 AMPK/SIRT1 信号通路及 NF- κ B 蛋白表达的影响

如图 6-A 所示, 与对照组比较, 模型组 p-AMPK/AMPK 值和 SIRT1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮苷处理后 p-AMPK/AMPK 值和 SIRT1 蛋白表达水平无明显变化, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮素、HPPA 处理后 p-AMPK/AMPK 值和 SIRT1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

如图 6-B 所示, 与对照组比较, 模型组 p-NF- κ B/NF- κ B 值显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮苷处理后 p-NF- κ B/NF- κ B 值无明显变化, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮素、HPPA 处理后 p-NF- κ B/NF- κ B 值显著降低 ($P < 0.01$)。以上结果表明, 柚皮素和 HPPA 可以通过激活 AMPK/SIRT1 信号通路, 抑制 NF- κ B 活化, 从而抑制细胞炎症反应, 而

柚皮苷无此作用。

4 讨论

ALI/ARDS 是一种死亡率极高的危重症, 患者表现为快速进展的呼吸困难、顽固性低氧血症和肺水肿, 常由感染、创伤或脓毒症等诱发。现有治疗手段以机械通气和糖皮质激素为主^[1], 但疗效有限且无法逆转病理损伤。因此, 开发新型有效的治疗药物已成为亟待解决的医学难题。

LPS 又称内毒素, 是一种强有力的炎症反应激活剂, 已被广泛用于诱导与人类 ALI/ARDS 病理特征相似的 ALI 动物模型^[15]。本研究采用尾 iv LPS 建立小鼠 ALI 模型, 探究柚皮苷对 AIL 是否具有保护作用。在 ALI 过程中, LPS 除诱导炎症反应外, 还可通过降解紧密连接蛋白破坏肺屏障^[16], 使血浆蛋白渗入肺泡腔, 导致肺水肿, 进一步阻碍气体交换。肺屏障包含肺上皮细胞屏障和毛细血管内皮屏障, 肺上皮细胞被认为是肺组织的防御细胞, 在肺屏障

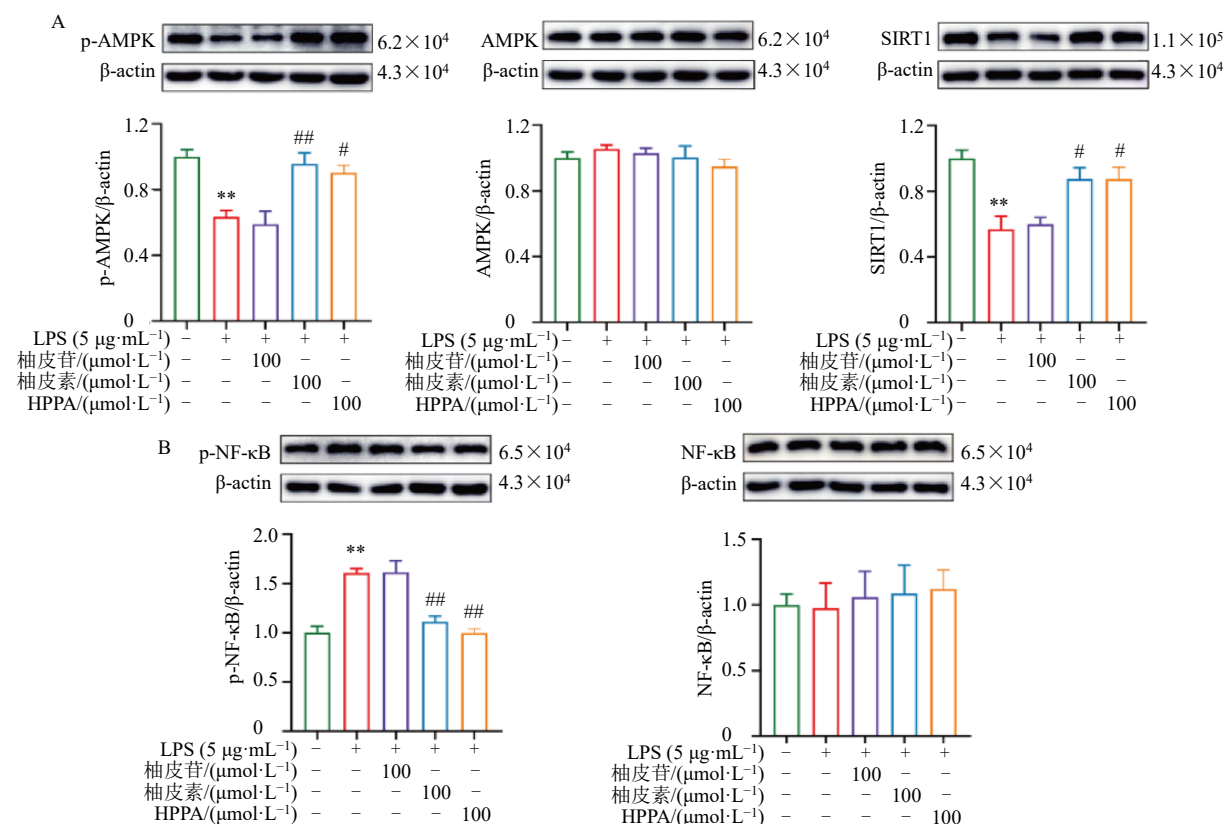


图 6 柚皮苷、柚皮素和 HPPA 对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞 AMPK/SIRT1 信号通路 (A) 及 NF-κB (B) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of naringin, naringenin and HPPA on protein expressions of AMPK/SIRT1 and NF-κB in LPS-induced BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

损伤中首当其冲。ZO-1 与 Occludin 等在维持肺屏障完整性中起重要作用, ZO-1 可以与细胞内的骨架蛋白结合, Occludin 是一种跨膜蛋白, 其羧基端与 ZO-1 的氨基端直接结合, 使细胞相互黏附^[17]。本研究表明, 模型组小鼠肺功能下降, 肺湿质量、肺脏系数与脾脏系数显著升高, 肺组织中 ZO-1 和 Occludin 蛋白的表达显著下降; 肺组织 HE 染色可见肺泡塌陷、肺间质间隔明显增厚、炎性细胞浸润; 血清及肺组织中炎症因子水平显著升高, 表明 ALI 小鼠模型构建成功。给予柚皮苷治疗后, 小鼠肺功能改善, 肺湿质量、肺脏系数与脾脏系数显著降低, ZO-1 和 Occludin 蛋白的表达水平显著上调, 肺组织结构及形态趋于正常, 炎性细胞浸润减少, 血清及肺组织中炎症因子表达明显下降, 表明柚皮苷能够有效改善小鼠肺组织结构和功能的损伤, 并抑制 AIL 小鼠体内炎症因子的释放, 进而发挥治疗作用。

肠道菌群能够对多种黄酮类化合物如槲皮素、山柰酚、木犀草素等进行代谢转化, 其经肠道微生物水解后生成活性更强的代谢产物, 生物利用度显

著提升。肠道菌群介导产生的代谢转化过程可能是这些原型化合物防治多种疾病的关键调节机制之一^[18]。尽管本研究发现柚皮苷具有治疗小鼠 ALI 的药效, 但其口服生物利用度低, 药效作用是否通过肠道代谢产物介导产生尚未可知。已有研究报道, 柚皮苷进入胃肠道后, 首先被人体肠道菌群分泌的糖苷酶水解成苷元柚皮素, 未被吸收入血的柚皮素进一步通过 C 环裂解反应生成 HPPA, 同时肠道微生物介导柚皮苷发生广泛的 I 相代谢^[11]。Guo 等^[19]发现小鼠 *po* 柚皮苷或橙皮苷后, 在肠组织中发现并初步鉴定了包括柚皮素和 HPPA 在内的 7 种代谢产物。本研究将柚皮苷与小鼠肠道菌液共孵育, 采用 UPLC-Q TOF MS/MS 法进一步证实了这种转化。有文献报道柚皮素可以减弱肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞凋亡和炎症反应^[20], HPPA 对 LPS 诱导的肠上皮细胞损伤具有保护作用^[21]。为了进一步验证柚皮苷是否通过肠道菌群介导的代谢产物柚皮素与 HPPA 发挥体内的抗炎活性, 通过体外培养 BEAS-2B 细胞, 考察柚皮苷、柚皮素以及 HPPA 在

体外的抗炎活性及机制。

在急性炎症反应中, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 是关键的转录因子, p65 是最普遍和表达水平最高的亚基之一^[22]。其在肺上皮细胞中的异常激活是驱动 ALI 炎症风暴、屏障破坏和疾病进展的核心机制。LPS 可促进 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 磷酸化进入细胞核, 启动多种促炎因子与趋化因子 (如 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 、 MCP-1) 基因表达, 形成连锁反应, 放大炎症信号, 诱导炎症细胞浸润, 造成组织损伤^[23-24]。本研究发现柚皮苷显著抑制 LPS 诱导的 ALI 小鼠中 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 激活与 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 MCP-1 的表达, 而对 IL-6 的表达无明显影响, 其原因可能为 IL-6 的产生除受到 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 激活的影响外, 还有更复杂的、可能不受柚皮苷影响的调控机制影响, 如 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) -信号转导及转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 通路, 并且其来源细胞更广泛^[25]。体外实验结果发现, 柚皮素与 HPPA 均能降低 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 与 MCP-1 的表达, 抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 激活, 减轻炎症反应, 而柚皮苷未能发挥抗炎作用。推测柚皮苷的抗炎活性由肠道菌群代谢产物柚皮素与 HPPA 介导发挥。

炎症的发生可能涉及细胞代谢途径的改变^[26]。AMPK 是一种广泛存在于真核生物中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是细胞内重要的能量传感器和能量稳态调节器^[27-28]。SIRT1 是一种依赖于 NAD^+ 的去乙酰化酶, 同样参与细胞能量平衡^[4]。有研究表明 SIRT1 可以通过对 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65 进行去乙酰化修饰, 影响其转录活性, 从而减少促炎因子的表达^[29]。在 ALI 过程中, 大量的炎症因子 (如 $\text{TNF-}\alpha$) 可通过激活蛋白磷酸酶 2C 或诱导活性氧过量产生, 直接抑制 AMPK 的磷酸化激活, AMPK 可通过调控 NAD^+ 水平间接影响 SIRT1 的表达^[30]。研究表明, 白藜芦醇等通过激活 SIRT1 通路减轻肺水肿^[31], 内源性 SIRT1 表达上调对大鼠血脑屏障血管通透性增高具有保护作用。敲低 AMPK 明显加重了 LPS 诱导的小鼠 ALI, 而激活 AMPK 则抑制了细胞因子的产生^[32-33]。本研究发现, 在体内实验中, 柚皮苷促进了 ALI 小鼠肺组织中 AMPK 的磷酸化并上调 SIRT1 的表达; 而体外实验结果表明, 柚皮素与 HPPA 均显著上调 AMPK/SIRT1 信号通路相关蛋白表达, 柚皮苷未表现出相同效果。提示柚皮苷通过柚皮素与 HPPA 发挥作用 (图 7)。

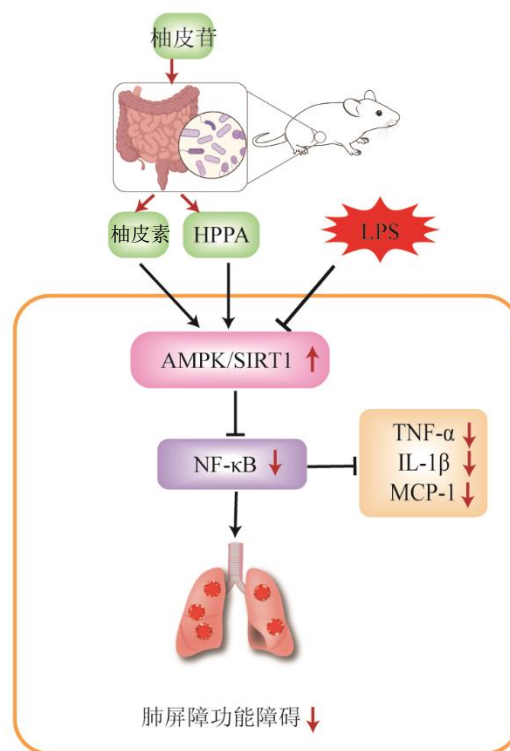


图 7 柚皮苷治疗 ALI 的作用机制

Fig. 7 Mechanism of naringin in treatment of ALI

综上, 柚皮苷通过激活 AMPK/SIRT1 信号通路及抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$, 减轻炎症反应, 改善 LPS 诱导的小鼠肺屏障功能障碍, 从而发挥抗 ALI 的作用; 柚皮苷发挥治疗 ALI 的作用与经肠道菌群生物转化产生的代谢物柚皮素与 HPPA 有关。以上结果说明了柚皮苷治疗 ALI 的作用机制, 但本研究仍存在不足之处, 即缺少反向验证实验进一步确认肠道菌群与药物药效发挥的因果作用, 因此在后续相关实验中考虑补充抗生素清除菌群或粪菌移植等反向验证实验来进一步完善柚皮苷的作用机制, 以期开发安全有效的药物提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Pham T, Rubenfeld G D. Fifty years of research in ARDS. The epidemiology of acute respiratory distress syndrome. A 50th birthday review [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(7): 860-870.
- [2] Reiss L K, Schuppert A, Uhlig S. Inflammatory processes during acute respiratory distress syndrome: A complex system [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2018, 24(1): 1-9.
- [3] Herzig S, Shaw R J. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(2): 121-135.
- [4] Fu C P, Hao S Y, Xu X B, et al. Activation of SIRT1 ameliorates LPS-induced lung injury in mice via

- decreasing endothelial tight junction permeability [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(5): 630-641.
- [5] Tian Y L, Ma J T, Wang W D, *et al.* Resveratrol supplement inhibited the NF- κ B inflammation pathway through activating AMPK α -SIRT1 pathway in mice with fatty liver [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 422(1/2): 75-84.
- [6] 李明霞, 汪玲, 刘秀玲, 等. 柚皮苷通过 PI3K/Akt/mTOR 通路调控宫颈癌细胞活力、侵袭和迁移 [J]. *中草药*, 2025, 56(6): 2017-2024.
- [7] 杨学敏, 张欢欢, 宋立强. 柚皮苷通过减轻氧化应激降低急性肺损伤小鼠内皮通透性的研究 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(10): 2389-2396.
- [8] Wang Y Y, Sang X Q, Shao R, *et al.* Xuanfei Baidu Decoction protects against macrophages induced inflammation and pulmonary fibrosis via inhibiting IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114701.
- [9] Liu Y, Wu H, Nie Y C, *et al.* Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(10): 1606-1612.
- [10] Ahmad S F, Attia S M, Bakheet S A, *et al.* Naringin attenuates the development of carrageenan-induced acute lung inflammation through inhibition of NF- κ B, STAT3 and pro-inflammatory mediators and enhancement of IkB α and anti-inflammatory cytokines [J]. *Inflammation*, 2015, 38(2): 846-857.
- [11] Bai Y, Peng W, Yang C P, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of naringin and active metabolite naringenin in rats, dogs, humans, and the differences between species [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 364.
- [12] Chen T B, Wu H, He Y, *et al.* Simultaneously quantitative analysis of naringin and its major human gut microbial metabolites naringenin and 3-(4'-hydroxyphenyl) propanoic acid via stable isotope deuterium-labeling coupled with RRLC-MS/MS method [J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4287.
- [13] 杨学敏, 张欢欢, 宋立强. 柚皮苷通过减轻氧化应激降低急性肺损伤小鼠内皮通透性的研究 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(10): 2389-2396.
- [14] Zhang H H, Zhou X J, Zhong Y S, *et al.* Naringin suppressed airway inflammation and ameliorated pulmonary endothelial hyperpermeability by upregulating aquaporin1 in lipopolysaccharide/cigarette smoke-induced mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150: 113035.
- [15] Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation [J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 60.
- [16] Wu Y H, Yu X, Wang Y W, *et al.* Ruscogenin alleviates LPS-triggered pulmonary endothelial barrier dysfunction through targeting NMMHC IIA to modulate TLR4 signaling [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(3): 1198-1212.
- [17] Van Itallie C M, Anderson J M. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 157-165.
- [18] 李涛, 李绮丽, 张群, 等. 基于肠道菌群的黄酮类化合物生理功能研究进展 [J]. *中国食品学报*, 2022, 22(2): 357-368.
- [19] Guo X, Li K K, Guo A L, *et al.* Intestinal absorption and distribution of naringin, hesperidin, and their metabolites in mice [J]. *J Funct Foods*, 2020, 74: 104158.
- [20] 陈运庭, 王睿雯, 麦明志, 等. 柚皮素对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞凋亡及 MAPK/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *药物生物技术*, 2023, 30(1): 19-24.
- [21] Lofft Z, Taibi A, Massara P, *et al.* Cranberry proanthocyanidin and its microbial metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, but not 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid, partially reverse pro-inflammatory microRNA responses in human intestinal epithelial cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2022, 66(8): e2100853.
- [22] Christian F, Smith E L, Carmody R J. The regulation of NF- κ B subunits by phosphorylation [J]. *Cells*, 2016, 5(1): 12.
- [23] Malaviya R, Laskin J D, Laskin D L. Anti-TNF α therapy in inflammatory lung diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 180: 90-98.
- [24] Yan C G, Li B Y, Liu X F, *et al.* Involvement of multiple transcription factors in regulation of IL- β -induced MCP-1 expression in alveolar type II epithelial cells [J]. *Mol Immunol*, 2019, 111: 95-105.
- [25] Frigault M J, Maziarz R T, Park J H, *et al.* Itacitinib for the prevention of IEC therapy-associated CRS: Results from the 2-part phase 2 INCB 39110-211 study [J]. *Blood*, 2025, 146(4): 422-436.
- [26] Wu K J, Tian R, Huang J, *et al.* Metformin alleviated endotoxemia-induced acute lung injury via restoring AMPK-dependent suppression of mTOR [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 291: 1-6.
- [27] Mulchandani N, Yang W L, Khan M M, *et al.* Stimulation of brain AMP-activated protein kinase attenuates inflammation and acute lung injury in sepsis [J]. *Mol Med*, 2015, 21(1): 637-644.
- [28] Li Q Y, Luo Y, Guo H B, *et al.* Compound Danshen Tablets ameliorate myocardial ischemia/reperfusion injury-induced ventricular remodeling by regulating autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(3): 548-554.
- [29] Liang H, Cheng R, Wang J Y, *et al.* Mogrol, an aglycone of mogrosides, attenuates ulcerative colitis by promoting AMPK activation [J]. *Phytomedicine*, 2021, 81: 153427.
- [30] Potenza M A, Sgarra L, Nacci C, *et al.* Activation of AMPK/SIRT1 axis is required for adiponectin-mediated preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210654.
- [31] Li T X, Zhang J L, Feng J L, *et al.* Resveratrol reduces acute lung injury in a LPS-induced sepsis mouse model via activation of Sirt1 [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(6): 1889-1895.
- [32] Xing J J, Wang Q L, Coughlan K, *et al.* Inhibition of AMP-activated protein kinase accentuates lipopolysaccharide-induced lung endothelial barrier dysfunction and lung injury *in vivo* [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(3): 1021-1030.
- [33] Kitzmiller L, Ledford J R, Hake P W, *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase by A769662 ameliorates sepsis-induced acute lung injury in adult mice [J]. *Shock*, 2019, 52(5): 540-549.

[责任编辑 李亚楠]