

任雪, 石凯欣, 张震, 等. 广陈皮中多甲氧基黄酮提取物对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(3): 248-255. DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.03.028

广陈皮中多甲氧基黄酮提取物对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用

任雪, 石凯欣, 张震, 徐阳, 潘思轶

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 为研究广陈皮中多甲氧基黄酮提取物对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用, 先对广陈皮中多甲氧基黄酮进行提取、分离、纯化和结构鉴定, 再采用鼻腔滴注脂多糖法建立小鼠急性肺损伤模型, 通过测定小鼠肺组织损伤程度、肺组织湿/干质量比、氧化损伤指标活性和促炎细胞因子含量等, 探究其对急性肺损伤的影响。结果显示, 广陈皮中多甲氧基黄酮提取物的主要成分为川陈皮素和桔皮素(约占多甲氧基黄酮提取物的80%), 纯化后川陈皮素纯度可达95%; 250 mg/kg 多甲氧基黄酮提取物和 50 mg/kg 川陈皮素能显著缓解小鼠急性肺损伤。研究结果表明, 多甲氧基黄酮提取物和川陈皮素具有良好的抗氧化和抗炎效果, 对急性肺损伤具有一定的保护作用。

关键词 广陈皮; 多甲氧基黄酮; 川陈皮素; 脂多糖; 急性肺损伤; 抗炎; 功能性成分; 抗氧化

中图分类号 R 285.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)03-0248-08

《中国药典》2015年版中记载, 药材分为“陈皮”和“广陈皮”, 因广陈皮独特的药用价值, 区别于其他陈皮。多甲氧基黄酮(polymethoxyflavones, PMFs)是柑橘属所特有的一类黄酮类化合物^[1], 主要分布在果皮油胞层部位, 具有消炎、抗病毒、抗氧化、清除自由基等生理活性^[2], 对内分泌系统、心肺也具有一定的保健作用^[3]。Li等^[4]研究表明大鼠巨噬细胞中的IL- α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达可以被PMFs抑制, 川陈皮素可调节COX-2的活性, 抑制PGE2的合成, 最后达到抑制关节软骨降解、风湿性关节炎等炎症的效果。研究最广泛的PMFs单体是川陈皮素(nobiletin, NOB)和桔皮素(tangeretin, TAN), 其在柑橘中含量更丰富, 并且均表现出良好的药理活性。Parkar等^[5]建立糖尿病大鼠模型, 研究川陈皮素对心血管的保护效应, 发现川陈皮素可通过抑制氧化应激及炎症信号通路的表达, 使大鼠的心血管功能得到改善。

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是肺部炎症疾病的典型代表之一, 目前临床上多采用机械通气和化学药物进行缓解, 尚无特效的治疗方法^[6], 长期使用药物可能会再次诱发肺部炎症并加重ALI。引起ALI的原因很多, 其中脂多糖是试验中最常采用的诱导因素之一。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是内毒素的主要成分, 进入机体后与细胞表面的Toll样受体4结合, 经MyD88依赖的信号通路的活化及细胞信号的传导, 最终激活以NF- κ B为主的核内因子, 产生级联放大效应^[7], 形成复杂的系统炎症效应, 最终导致肺组织和细胞的损伤。PMFs的生物活性已有相关研究报道, 但PMFs提取物对LPS诱导的ALI的保护作用知之甚少。因此, 本研究通过LPS构建小鼠急性肺损伤模型, 分析PMFs提取物对急性肺损伤小鼠的抗氧化和抗炎效果, 并探讨PMFs提取物中对小鼠急性肺损伤起到保护作用的关键功能因子, 为PMFs功能性成分的开发和研究提供参考。

收稿日期: 2020-09-29

基金项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-26-07B); 中央高校基本科研业务费专项(2662019PY016); 湖北省技术创新专项重大项目(2018ABA072)

任雪, E-mail: rx15713896673@163.com

通信作者: 潘思轶, E-mail: pansiyi@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物、材料与试剂

4 周龄 SPF 级雄性昆明种小鼠 84 只, 体质量 20~22 g, 购于华中农业大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK(鄂)2015-0019。

广陈皮(15 年茶枝柑干燥果皮), 产自广东省江门市新会区; MPO、GSH-PX、MDA 检测试剂盒, 购于南京建成生物工程研究所; TNF- α 、IL-6、IL-1 β 细胞因子 ELISA 试剂盒, 购于北京博奥森生物技术有限公司; 其他试剂为分析纯和色谱纯。

1.2 仪器与设备

全数字化超导核磁共振谱仪, 布鲁克公司; 离子淌度飞行时间质谱仪, 美国 Waters 公司; e2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; HTX 多功能酶标仪, 基因有限公司; 超声波清洗仪, 昆山市超声仪器有限公司; 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; 高速冷冻离心机, 美国贝克曼库尔特有限公司。

1.3 试验方法

1) 广陈皮中 PMFs 的提取。将广陈皮粉碎, 过 2 遍孔径 0.25 mm 筛。称取 20 g 广陈皮粉, 料液比 1:20(g/mL), 提取溶剂为 90% 乙醇, 震荡混合均匀置摇床中于 45℃ 震荡 30 min, 之后超声提取 30 min(100 W, 45℃)。将粗提液抽滤 3 次至澄清透明, 滤渣重新加入 90% 乙醇重复上述操作。合并 2 次乙醇提取液, 45℃ 真空旋蒸, 加入蒸馏水分散搅匀, 冷冻干燥, 获得 PMFs 粗提物, 储存于 -20℃ 冰箱中备用。

2) PMFs 的纯化。称取 PMFs 粗提物溶于 40% 乙醇, 上样体积 250 mL, 上样流速 0.8 L/h, 吸附后, 用 43% 乙醇洗脱柱子, 洗脱速度 1.2 L/h, 洗脱体积 2.4 L, 再用 90% 乙醇解吸, 解吸速度 1.2 L/h, 解吸体积 2 L, 获得富含目标物质的纯化液, 45℃ 真空旋蒸, 冷冻干燥, 获得 PMFs 提取物, 储存于 -20℃ 冰箱中备用。

3) 川陈皮素和桔皮素的制备及结构鉴定。高速逆流色谱采用正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水(1:0.8:1:1, V/V) 的溶剂体系, 将 4 种溶液按比例加入分液漏斗, 混匀后静置分层, 上下相分别为固定相和流动相, 两相分别超声脱气 30 min 备用。另称取 360 mg PMFs 粗提物, 溶于 18 mL 下相, 4 000 r/min 离心得 20 mg/mL 样液。以 30 mL/min 将上相泵入分离管中, 800 r/min, 顺时针旋转, 之后以

3 mL/min 注入下相, 两相平衡后由进样阀注入 18 mL 样液, 通过紫外检测器于 330 nm 检测流出物, 按照色谱峰接收目标馏分, 分离温度 25℃, 再 45℃ 真空旋蒸, 冷冻干燥, 获得目标物单体, 之后通过质谱仪和核磁共振谱仪对其结构进行鉴定。

UPLC-MS 条件: ACQUITY UPLC-BEH C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m) 色谱柱, 流动相: 乙腈-水(0.1% 甲酸), 洗脱梯度: 0~6 min, 25%~50% 乙腈; 6~14 min, 50%~60% 乙腈, 流速 0.21 mL/min, 进样量 1 μ L, ESI 离子源, 正离子模式, 离子源温度 135℃, 脱溶剂气温度 350℃, 脱溶剂气流速 600 L/h, 毛细管电压 3.00 kV, 质量扫描范围 m/z 100~1 000, 单次扫描时间为 1 s。

^1H NMR 条件: 5 mm 核磁管, 频率 600 MHz, 溶剂 CDCl_3 (1% TMS), 控温精度 $\pm 0.1^\circ\text{C}$, 磁场强度 14.1 T, 分辨率 $R \leq 0.60$ Hz, 灵敏度 $S/N \geq 900:1$, 扫描 2 次。

4) 川陈皮素和桔皮素的纯度鉴定。高效液相色谱条件: Agilent C18(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相: 乙腈-水(0.4% 甲酸), 洗脱梯度: 0~15 min, 25%~50% 乙腈; 15~35 min, 50%~60% 乙腈; 流速 1.0 mL/min, 柱温 25℃, 检测波长 330 nm, 进样量 10 μ L。

5) 动物饲养、造模及分组。在 Ye 等^[8] 的研究方法基础上进行适当修改。84 只健康雄性昆明小鼠适应饲养环境后, 随机分成 7 组($n=12$): 对照组、模型组、阳性对照组、NOB 低剂量组(25 mg/kg)、NOB 中剂量组(50 mg/kg)、NOB 高剂量组(100 mg/kg) 和 PMFs 提取物组(250 mg/kg)。在 LPS 滴鼻诱导前对川陈皮素高、中、低剂量组和 PMFs 提取物组连续灌胃 7 d, 每天固定时间给药 1 次, 同时对照组、模型组和阳性对照组给予等体积的生理盐水。阳性对照组在第 7 天造模前腹腔注射地塞米松磷酸钠(10 mg/kg), 1 h 后对模型组、阳性对照组、NOB 高中低剂量组和 PMFs 提取物组滴鼻 LPS(8 mg/kg) 溶液, 空白组给予同体积的生理盐水。造模 6 h 后处死。该研究获得了华中农业大学实验动物中心的伦理学批准。

6) 样本采集。小鼠眼眶静脉丛取血, 室温静置 1 h, 4℃, 3 000 r/min 离心 20 min, 获得小鼠血清, 于 -20℃ 冰箱中保存备用。之后脱颈处死, 快速取出完整肺组织, 于冰冷的灭菌生理盐水中迅速漂洗干净, 用滤纸吸取多余水分。取右肺上叶组织放入

4%多聚甲醛液中固定,室温保存,用于组织病理学观察;左肺用于测定肺湿/干质量比;其余肺组织立即放入液氮,试验结束后转入 -80°C 冰箱,备用。

7)肺组织病理学观察及肺损伤评分。将固定24 h后的右肺上叶组织取出,脱水、包埋、切片,进行苏木素-伊红(HE)染色。参照 Nishina 等^[9]介绍的方法进行肺损伤评分,每张切片选择3个不同视野,取平均值统计分析。

8)肺湿/干质量比。将取出的左肺在生理盐水漂洗过后,用滤纸吸干肺组织表面水分,称湿质量,之后放入 60°C 的烘箱中,烘干48 h,再次称肺组织干质量,2组数据相除后所得即为湿/干质量比(W/D)。

9)肺组织中氧化损伤指标的测定。从 -80°C 冰箱中取出适量肺组织,制备肺组织匀浆。严格按照 BCA 蛋白测定试剂盒制造商的说明书,测量肺组织匀浆液中蛋白质的水平。MDA、MPO、GSH-PX 均可通过试剂盒显色作用呈现出特殊颜色,通过特定波长可检测出吸光度,再与标准品结合测定样品 MDA、MPO、GSH-PX 的含量或活力。

10)血清中细胞因子含量的测定。按 ELISA 试剂盒说明书操作,对各小组小鼠血清中 TNF- α 、

IL-6、IL-1 β 细胞因子进行测定。在 450 nm 波长处测定 OD 值,根据标准曲线计算其分泌量。

1.4 统计分析

所有试验数据均为3次试验重复的平均值,采用“平均值 $\pm$ 标准差”($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示,使用 SPSS 20.0 软件分析, $P < 0.05$ 认为组间有显著性差异, $P < 0.01$ 认为组间有极显著差异。采用 Origin 9.0 软件制图。

2 结果与分析

2.1 D101 大孔吸附树脂的分离纯化

将纯化前后的 PMFs 粗提物溶液进行高效液相色谱检测,结果如图1所示。经过 D101 大孔树脂吸附后,广陈皮 PMFs 粗提物中 PMFs 成分种类未出现显著增加或减少,PMFs 较完整地保留下来,主要为川陈皮素和桔皮素,而极性较大物质如色素、黄酮等其他杂质成分经过纯化后明显减少,样液颜色浅而澄清。D101 大孔树脂吸附前后粗提物中 PMFs 的组分及含量变化情况如表1所示。富集后川陈皮素和桔皮素分别增加了3.7倍和3.1倍,可知 D101 大孔树脂可以有效吸附 PMFs,实现富集纯化。

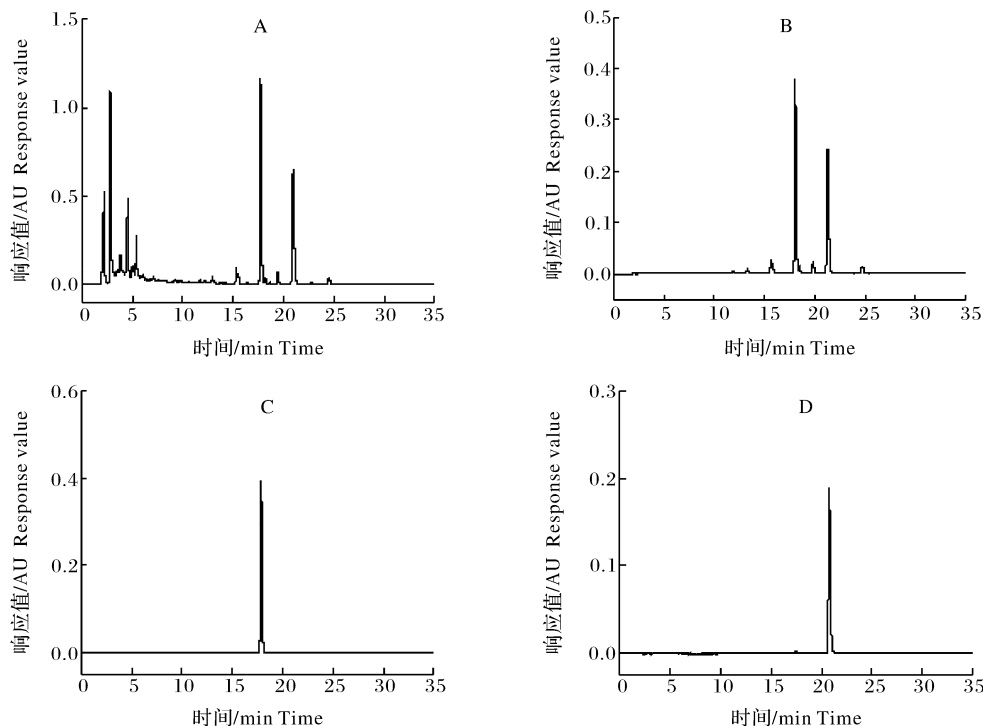
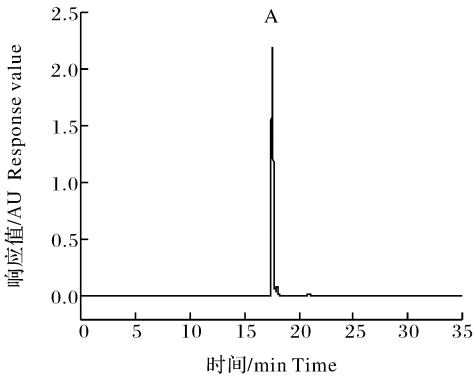


图1 D101 大孔树脂吸附 PMFs 粗提物前(A)、吸附后(B)、川陈皮素标品(C)、桔皮素标品(D)的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatograms of D101 resin absorbed PMFs before (A), after (B), nobiletin standard (C) and tangeretin standard (D)

表 1 D101 大孔吸附树脂富集前后 PMFs 粗提物的含量变化

Table 1 Changes of PMFs extract content before and after enrichment by D101 resin			
化合物 Compounds	富集前/(mg/g) Before enrichment	富集后/(mg/g) After enrichment	增加倍数 Increase multiple
川陈皮素 Nobiletin	7.99±0.32	29.40±1.76	3.7
桔皮素 Tangeretin	5.72±0.53	17.96±1.10	3.1



2.2 高速逆流色谱制备川陈皮素和桔皮素

用正己烷：乙酸乙酯：甲醇：水(1：0.8：1：1,V/V)体系分离 PMFs 粗提物的川陈皮素和桔皮素,分离时间为 240 min,经分离得到 2 个主要峰:峰 A 和峰 B,保留率 73%,分离效果良好。根据色谱分段收集并检测,峰 A 和峰 B 2 个化合物的纯度分别为 95.08% 和 98.01%,结果见图 2。旋蒸去溶剂后冻干称质量,分别为 7.12、5.83 mg。

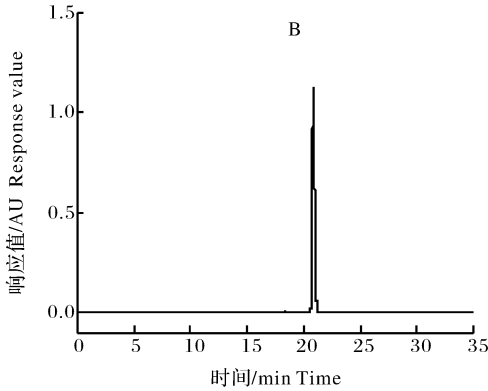


图 2 HSCCC 主要峰(A,B)的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of the main peaks (A,B) of HSCCC

2.3 化合物结构鉴定

对图 2 中的峰 A 和峰 B 进行¹H NMR 和 UP-LC-QTOF-MS/MS 测定,结果如下:

峰 A:ESI-MS (*m/z*):403[M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz,CDCl₃):δ 7.58 (dd,*J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H),7.42 (d,*J* = 2.1 Hz,1H),7.00 (d,*J* = 8.4 Hz, 1H),6.63 (s, 1H),4.11 (s, 3H),4.03 (s, 3H), 4.01~3.94 (m, 12H)。其光谱数据与文献[10-12]报道对照基本一致,故组分 A 鉴定为川陈皮素。

峰 B:ESI-MS (*m/z*):373[M+H]⁺; ¹H NMR (600 MHz,CDCl₃):δ 7.88 (d,*J* = 9.0 Hz, 2H),7.03 (d,*J* = 9.1 Hz, 2H),6.61 (s, 1H),4.10 (s, 3H),4.02 (s, 3H),3.95 (d,*J* = 0.8 Hz, 6H),3.89 (s, 3H)。其光谱数据与文献[10-12]报道对照基本一致,故组分 B 鉴定为桔皮素。

通过以上分析结果可知,在 PMFs 提取物中 80% 约为川陈皮素和桔皮素的混合物,其中川陈皮素含量约占 50%,桔皮素约占 30%,说明川陈皮素是广陈皮中主要的 PMFs,且所得川陈皮素纯度可

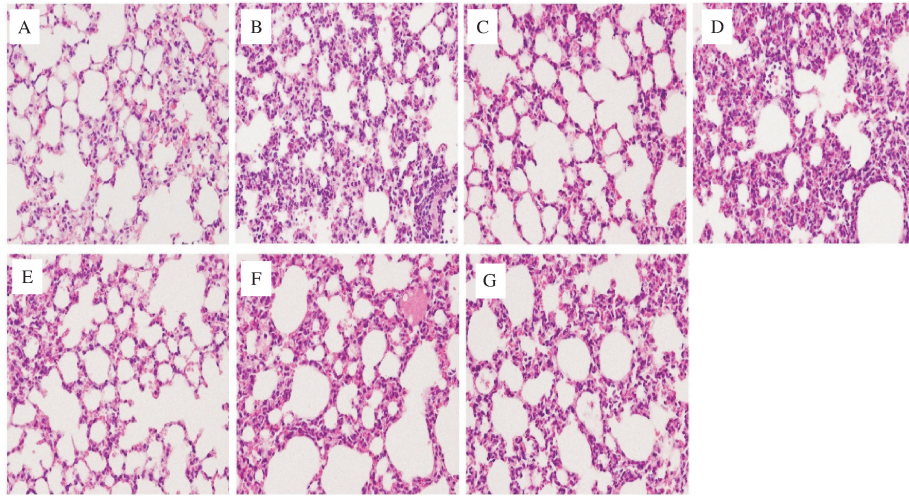
达 95% 以上。

2.4 ALI 小鼠肺组织病理学观察

LPS 诱导的小鼠急性肺损伤的严重程度可以通过肺组织的病理学观察反映出来。如图 3 所示,对照组小鼠肺组织结构正常,肺泡壁薄,肺泡腔清晰可见,未出血和炎性细胞浸润。与对照组对比,模型组小鼠在 LPS 滴鼻 6 h 之后肺组织中肺泡壁和间隔增厚,有大量炎性细胞浸润,损伤明显,肺损伤评分显著升高,说明造模成功。与模型组相比,中剂量川陈皮素组肺组织形态结构较为正常,中性粒细胞浸润程度明显减轻,无明显病理性损伤,可初步推测川陈皮素对急性肺损伤具有一定的保护作用。

2.5 ALI 小鼠肺损伤评分和肺组织湿/干质量比

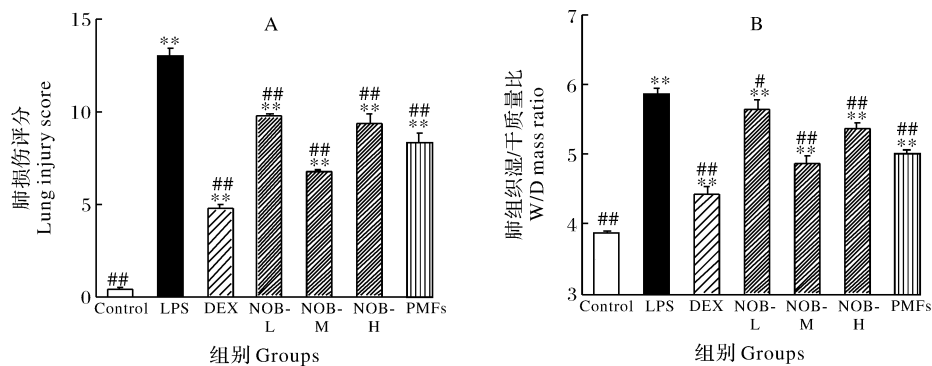
肺的湿/干质量比可以反映肺水肿的严重程度。如图 4 所示,模型组肺组织湿/干质量比明显高于对照组(*P* < 0.01)。相比之下,中剂量川陈皮素组和 PMFs 提取物组有效降低了 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织的湿/干质量比(*P* < 0.01)。



A: 对照组; B: 模型组; C: 阳性对照组; D: 25 mg/kg NOB 低剂量组; E: 50 mg/kg NOB 中剂量组; F: 100 mg/kg NOB 高剂量组; G: 250 mg/kg PMFs 提取物组。A: Control group; B: Model group; C: DEX group; D: 25 mg/kg NOB group; E: 50 mg/kg NOB group; F: 100 mg/kg NOB group; G: 250 mg/kg PMFs group.

图 3 NOB 和 PMFs 作用下 ALI 小鼠的病理学变化(HE, ×400)

Fig.3 Pathological change of ALI mice under the action of NOB and PMFs(HE, ×400)



* ($P < 0.05$) 或 ** ($P < 0.01$) 表示和对照组相比, # ($P < 0.05$) 或 ## ($P < 0.01$) 表示和 LPS 组相比。下同。* ($P < 0.05$) or ** ($P < 0.01$) compared with control group, # ($P < 0.05$) and ## ($P < 0.01$) compared with the LPS group. The same as below.

图 4 NOB 和 PMFs 作用下的 ALI 小鼠肺损伤评分(A)和肺湿/干质量比(B)变化

Fig.4 Lung injury score(A) and changes of lung W/D mass ratio(B) of ALI mice under the action of NOB and PMFs

2.6 ALI 小鼠肺组织氧化损伤指标的检测结果

如图 5 所示,与对照组相比,模型组的 MPO 活性和 MDA 含量显著上升($P < 0.01$),GSH-PX 的活

性显著下降($P < 0.01$)。然而,中剂量川陈皮素组和 PMFs 提取物组使 MPO 和 MDA 的含量和活性显著下降,GSH-PX 的活性显著上升。

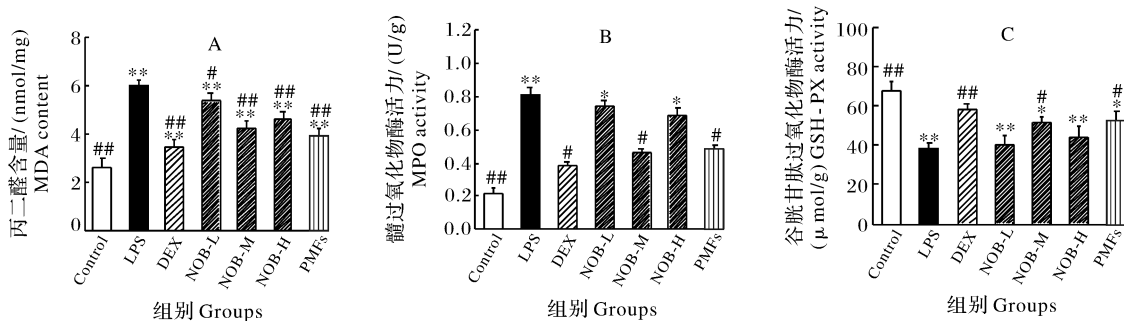


图 5 NOB 和 PMFs 作用下的 ALI 小鼠肺组织中 MDA(A)、MPO(B)和 GSH-PX(C)的活性变化

Fig.5 Changes of MDA(A), MPO(B) and GSH-PX(C) in lung tissue of ALI mice under the action of NOB and PMFs

2.7 ALI 小鼠血清中细胞因子含量

为评估 LPS 刺激下炎症细胞因子的水平,采用酶联免疫吸附法测定 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 在蛋白水平上的表达。如图 6 所示,与对照组相比,LPS 可显著增加 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 促炎因子的含量 ($P < 0.01$)。高、低剂量川陈皮素组对于降低 TNF- α 的含量没有显著性差异,不具有统计学意义,但中剂量川陈皮素组和 PMFs 提取物组则显著改善模型组炎症因子的表达 ($P < 0.01$),阻止这些炎症细胞因子的释放。

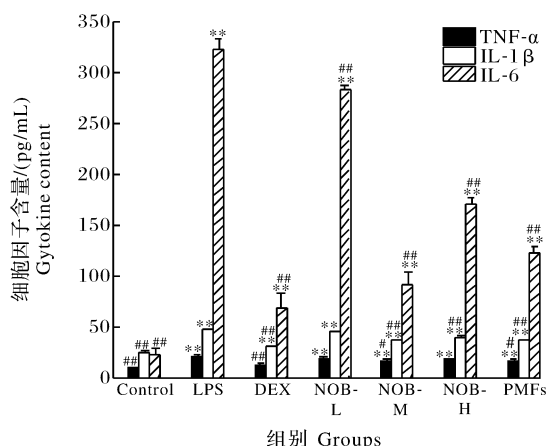


图6 NOB和PMFs作用下的ALI小鼠血清中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的含量变化

Fig.6 Changes of TNF- α , IL-6 and IL-1 β content in serum of ALI mice under the action of NOB and PMFs

3 讨论

3.1 PMFs对小鼠肺组织损伤程度、肺组织湿/干质量比的影响

本研究表明,LPS的刺激导致了以肺泡为主的炎性肺损伤,肺组织病理特征异常改变,氧化损伤指标和促炎因子显著上升,主要是中性粒细胞的活化会促进肺部细胞毒产物的表达,如机体氧自由基和颗粒酶的过量产生。Chignard等^[13]研究发现中性粒细胞可以增加ALI小鼠肺屏障通透性,本研究也证实小鼠经LPS滴鼻后,肺组织被大量中性粒细胞浸润。而经过连续灌胃7d的小鼠情况有所好转,发现PMFs提取物和川陈皮素可有效缓解LPS诱导的小鼠肺组织损伤,减少中性粒细胞聚集,降低肺湿/干质量比,说明PMFs提取物和川陈皮素可防止富含蛋白质的水肿液渗透到肺组织中。这与Li等^[14]采用20 mg/kg川陈皮素滴鼻后,肺湿/干质量比也显著下降的研究结果一致,说明川陈皮素和

PMFs对小鼠肺组织具有一定的保护作用。

3.2 PMFs对小鼠肺组织氧化损伤指标的影响

本研究结果表明,PMFs提取物和川陈皮素使MDA含量和MPO活性下降,GSH-PX活性上升。这与Liu等^[15]研究发现柚皮苷可通过抑制NF- κ B信号通路减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤,同时降低MPO活性的研究是类似的。由此推测,川陈皮素和PMFs可以通过减少氧自由基生成、减弱肺组织的中性粒细胞的积累,起到保护小鼠肺组织的作用。同时,细胞膜的正常结构被细胞膜脂质过氧化破坏后能进一步损伤肺泡中的毛细血管,使血管渗透性增强,内皮细胞完整性被破坏,导致水和大分子成分外渗^[16],最后形成肺水肿,这与上述研究结果也吻合。

3.3 PMFs对小鼠血清中细胞因子含量的影响

细胞因子分析结果表明,PMFs提取物和川陈皮素可显著缓解LPS诱导的TNF- α 、IL-1 β 和IL-6促炎因子的产生。Liu等^[17]采用橙皮苷灌胃ALI小鼠,测定4h和24h肺泡灌洗液中的TNF- α 和IL-6含量,同样发现其能够显著降低促炎因子的表达。说明黄酮类化合物对LPS诱导的小鼠急性肺损伤具有一定的抗炎作用。因PMFs特殊的结构,相比于黄酮类化合物,多甲氧基基团的低极性决定了其具有高疏水特性及较强的渗透性,更易穿过磷脂双分子层进入细胞膜内发挥作用,被人体吸收,促进细胞的代谢活力,从而发挥更强的抗炎效果。

PMFs在生物体内发生的生物转化并产生的多种代谢产物也可能对LPS诱导的ALI具有一定的抑制作用。早期研究显示桔皮素能以非竞争方式抑制某些细胞色素P450酶在人肝脏微粒体中的表达^[18]。PMFs代谢的关键酶系就是细胞色素P450,能催化羟基化和去甲基化反应。有研究发现,川陈皮素的去甲氧基速度缓慢,半衰期达24h以上,表明其在体内的半衰期可能相当长。Obermeier等^[19]研究发现3'-去甲氧基川陈皮素、4'-去甲氧基川陈皮素和3',4'-二羟基-5,6,7,8-四甲氧基黄酮是川陈皮素在CD-1小鼠尿样和血浆中的代谢产物,并且这些代谢产物与其母体化合物川陈皮素相比,对LPS诱导的iNOS和COX-2表达具有更强的抑制作用。由此推测川陈皮素对LPS诱导的小鼠急性肺损伤可能是与代谢产物共同作用的结果。

上述研究结果发现,PMFs提取物组和不同剂

量川陈皮素组对急性肺损伤小鼠的保护效果从高到低依次是:中剂量组、PMFs 提取物组、高剂量组和低剂量组。推测高剂量组效果不如中剂量组的原因可能是 50 mg/kg 已达到川陈皮素发挥作用的最大值,超过该值后作用效果减弱或趋于无效。另外,也可能是剂量过大抑制了相关信号通路的负反馈调节^[20],导致效果下降。早期体外吸收试验发现,川陈皮素优先沉积在 Caco-2 细胞单层中^[21],孵育 4 h 后发现 48% 以上的川陈皮素渗透入基侧(门静脉)内,说明川陈皮素具有高度渗透性能,更容易在细胞内沉积。由此推测,渗透率可能是导致中剂量组川陈皮素比 PMFs 提取物组作用效果稍强的原因之一。

本试验从广陈皮 PMFs 提取物出发,与现有研究直接用标准品灌胃相比,能更加真实客观地反映广陈皮中功能因子对急性肺损伤小鼠的保护作用,并与川陈皮素进行对比,研究二者的差异,为广陈皮中功能性成分的开发和研究提供理论参考。试验结果表明,PMFs 提取物可通过抑制诱因,减弱或消除氧自由基、促炎细胞因子及炎症介质的过度释放导致的损伤,改善微循环,起到对肺组织细胞的保护作用。此外,对比 PMFs 提取物,川陈皮素对 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用更强,推测川陈皮素可能是 PMFs 提取物中的主要功能因子。今后还需进一步探讨川陈皮素对细胞因子基因表达的影响以及对 MAPK 和 NF- κ B 等信号通路的作用机制。

参考文献 References

- [1] 高蓓. 广陈皮黄酮类化合物和挥发油成分及其活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011. GAO B. Studies on components identification and biological activities of flavonoids and essential oils in PCR 'Chachi' peels[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011(in Chinese with English abstract).
- [2] 陈圣敏, 董杨. 多甲氧基黄酮抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(11): 1493-1495. CHEN S M, DONG Y. The research progress of anti-tumor effect of polymethoxyflavonoids[J]. China pharmacol bull, 2017, 33(11): 1493-1495(in Chinese with English abstract).
- [3] KOU G, WU J, LIU M, et al. Citrus tangeretin reduces the oxidative stress of the myocardium with the potential for reducing fatigue onset and myocardial damage[J]. Journal of functional foods, 2019, 54: 249-253.
- [4] LI G J, WU H J, WANG Y, et al. Determination of citrus juice

- coumarins, furanocoumarins and methoxylated flavones using solid phase extraction and HPLC with photodiode array and fluorescence detection[J]. Food chemistry, 2019, 271: 29-38.
- [5] PARKAR N A, BHATT L K, ADDEPALLI V. Efficacy of nobiletin, a citrus flavonoid, in the treatment of the cardiovascular dysfunction of diabetes in rats[J]. Food & function, 2016, 7 (7): 3121-3129.
- [6] 李强. TIPE2 调控巨噬细胞极化缓解脂多糖诱导的急性肺损伤及其机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018. LI Q. TIPE2 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating macrophage polarization[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018(in Chinese with English abstract).
- [7] 孙谋. 脂肪干细胞对脂多糖诱导急性肺损伤大鼠炎症因子表达的影响[D]. 郑州: 郑州大学, 2017. SUN M. Effect of adipose-derived stem cells on inflammatory factors expression in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017(in Chinese with English abstract).
- [8] YE J, GUAN M, LU Y, et al. Protective effects of hesperetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting MD2[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 852: 151-158.
- [9] NISHINA K, MIKAWA K, KODAMA S, et al. The effects of enflurane, isoflurane, and intravenous anesthetics on rat diaphragmatic function and fatigability[J]. Anesthesia and analgesia, 2003, 96 (6): 1674-1678.
- [10] 田红梅. 高速逆流色谱在天然产物中的应用及柑橘功能因子保健产品的开发[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2011. TIAN H M. Application of high-speed counter current chromatography in the research of natural products and development of new health product in the citrus[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2011(in Chinese with English abstract).
- [11] 李成平, 饶桂维, 田红梅, 等. 高速逆流色谱分离制备橘皮中多甲氧基黄酮[J]. 中国食品学报, 2015, 15(6): 117-122. LI C P, RAO G W, TIAN H M, et al. Preparative isolation and purification of polymethoxylated flavones from citrus peel by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chinese institute of food science and technology, 2015, 15(6): 117-122(in Chinese with English abstract).
- [12] 于波, 彭爱一, 齐鑫, 等. 高速逆流色谱法分离纯化青皮中六种多甲氧基黄酮[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3): 425-429. YU B, PENG A Y, QI X, et al. Isolation and purification of six polymethoxyflavones from reticulatae viride by high-speed counter current chromatography[J]. Nat Prod Res Dev, 2010, 22(3): 425-429(in Chinese with English abstract).
- [13] CHIGNARD M, BALLOY V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. American journal of physiology lung cellular and molecular physiology, 2000, 279(6): 1083-1090.
- [14] LI W, ZHAO R, WANG X, et al. Nobiletin ameliorated lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury by suppression of NF-kappaB pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. Inflamm-

- mation, 2018, 41(3):996-1007.
- [15] LIU Y, WU H, NIE Y, et al. Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF-kappaB pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(10):1606-1612.
- [16] 仇佳明. 积雪草粗提取物对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的治疗作用[D]. 长春: 吉林大学, 2015. QIU J M. Protective effects of *Centella asiatica* extract on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[D]. Changchun: Jilin University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [17] LIU X X, YU D D, CHEN M J, et al. Hesperidin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting HMGB1 release[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 25(2):370-376.
- [18] 丁琦. IL-17 在脂多糖诱导的急性肺损伤中的作用及机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2017. DING Q. Role and mechanism of IL-17 in LPS-induced acute lung injury[D]. Suzhou: Suzhou University, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [19] OBERMEIER M T, WHITE R E, YANG C S. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities[J]. Xenobiotica, 1995, 25(6):575-584.
- [20] YANG J, CHEN Y, JIANG K G, et al. MicroRNA-182 supplies negative feedback regulation to ameliorate lipopolysaccharide-induced ALI in mice by targeting TLR4[J]. Journal of cellular physiology, 2020, 235(9):5925-5937.
- [21] MURAKAMI A, KUWAHARA S, TAKAHASHI Y, et al. *In vitro* absorption and metabolism of nobiletin, a chemopreventive polymethoxyflavonoid in citrus fruits[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(1):194-197.

Protective effects of polymethoxyflavones extract from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice

REN Xue, SHI Kaixin, ZHANG Zhen, XU Yang, PAN Siyi

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Environment Correlative Dietology of Ministry of Education,
Wuhan 430070, China

Abstract Polymethoxyflavones (PMFs) in citrus have been of increasing interest due to its extensive biological activities. Nobiletin (NOB), one of the main substances of PMFs, has been reported to exhibit anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, and nerve protection resistance activities. Although the anti-inflammatory activity of PMFs has been already reported, its involvement in lung protection has rarely been reported. This article is aimed to investigate the protective effects of PMFs in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ on acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide in mice. PMFs were extracted from *Citrus reticulata* ‘Chachi’ and purified. The structure of PMFs in citrus was identified. A mouse model of acute lung injury was established by intranasal instillation of lipopolysaccharide. The effects of PMFs on ALI were explored by measuring the degree of lung tissue damage, the wet/dry mass ratio of lung tissue, the activity of oxidative damage indicators, and the content of pro-inflammatory cytokines. The results showed that the main components of the extracted PMFs were the nobiletin and tangeretin (About 80% in the PMFs). PMFs with the contents of 250 mg/kg and NOB with the contents of 50 mg/kg significantly alleviated ALI. It is indicated that PMFs and NOB have good anti-oxidant and anti-inflammatory effects, and have a certain protective effect on ALI.

Keywords *Citrus reticulata* ‘Chachi’; polymethoxyflavones; nobiletin; lipopolysaccharide; acute lung injury; anti-inflammatory; functional components; antioxidation

(责任编辑: 赵琳琳)