

# 人参叶多酚 GLP-8 调控 AhR/NLRP3 信号通路抑制 BaP 诱导的气道上皮细胞炎症因子过表达

罗丹<sup>1,2</sup>, 黄云<sup>2</sup>, 罗敏<sup>1,2</sup>, 罗强<sup>2</sup>, 刘杰<sup>2</sup>, 李玉英<sup>1\*</sup>

(1. 西南医科大学附属医院呼吸科, 四川泸州 646000)

(2. 深圳大学医学部过敏反应与免疫学研究所, 广东深圳 518000)

**摘要:** 基于活性追踪方法分离人参叶多酚化合物 (Ginseng leaf polyphenols, GLPs) 并研究其抗环境污染物苯并芘 (Benzo(a)pyrene, BaP) 诱发气道上皮细胞 (16HBE) 氧化、炎症损伤的作用机制。最终分离、鉴定 11 个人参叶多酚化合物 GLP-1~GLP-11, 其中 GLP-8 (Albaspidin AA, Ginseng leaf polyphenol-8) 能够显著抑制 BaP 诱导的 16HBE 细胞损伤; 相比于 BaP 组, GLP-8 使 16HBE 细胞活力提升 13.90%; GLP-8 使 BaP 诱导的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 过量分泌分别降低了 19.30% (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 和 41.30% (25  $\mu\text{g/mL}$ ); GLP-8 使 BaP 诱导的 16HBE 细胞凋亡率分别降低 5.80% (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 和 9.30% (25  $\mu\text{g/mL}$ ); 25  $\mu\text{g/mL}$  GLP-8 作用后, BaP 诱导的炎症因子 IL-33、IL-25、IL-1 $\beta$  及 IL-6 的表达分别减少 60.10%、28.90%、33.50% 及 41.90%; GLP-8 抑制芳香烃受体 (AhR) 及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 信号通路激活。因此得出, GLP-8 具有通过调控 AhR/NLRP3 信号通路抑制 BaP 诱导的 ROS 过量分泌及炎症因子过表达来发挥保护气道上皮细胞活性的功能。

**关键词:** 人参叶; 多酚化合物; 苯并芘; AhR; NLRP3

文章编号: 1673-9078(2022)06-9-19

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0891

## Ginseng Leaf Polyphenol-8 (GLP-8) Inhibits BaP-induced Over-expression of Inflammatory Factors in the Airway Epithelial Cells through Regulating the AhR/NLRP3 Signaling Pathway

LUO Dan<sup>1,2</sup>, HUANG Yun<sup>2</sup>, LUO Min<sup>1,2</sup>, LUO Qiang<sup>2</sup>, LIU Jie<sup>2</sup>, LI Yuying<sup>1\*</sup>

(1. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

(2. Institute of Allergy and Immunology, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518000, China)

**Abstract:** Here, a model of under benzo(a)pyrene (BaP) exposure was established. The isolation of ginseng leaf polyphenols (GLPs) were performed based on an activity tracking method, and the mechanisms underlying their anti-oxidative and inflammatory effects against environmental pollutant benzo(a)pyrene (BaP)-induced oxidation and inflammatory injury in airway epithelial cells (16HBEs) were studied. Finally, 11 ginseng leaf polyphenol compounds GLP-1~GLP-11 were isolated and identified, of which GLP-8 (Albaspidin AA, Ginseng leaf polyphenol-8) could significantly inhibit BaP-induced 16HBE cell damage; Compared with the BaP group, GLP-8 increased the viability of

引文格式:

罗丹, 黄云, 罗敏, 等. 人参叶多酚 GLP-8 调控 AhR/NLRP3 信号通路抑制 BaP 诱导的气道上皮细胞炎症因子过表达[J]. 现代食品科技, 2022, 38(6): 9-19, +73

LUO Dan, HUANG Yun, LUO Min, et al. Ginseng leaf polyphenol-8 (GLP-8) inhibits BaP-induced over-expression of inflammatory factors in the airway epithelial cells through regulating the AhR/NLRP3 signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 9-19, +73

收稿日期: 2021-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31770984; 81803202; 81929001; 81901634); 广东省自然科学基金项目 (2020A1515010029; 2019A1515110010); 深圳市科技计划项目 (KQTD20170331145453160; LHTD20180007); 呼吸疾病国家重点实验室开放项目 (SKLRD-OP-201910); 西南医科大学创新课题 (20091)

作者简介: 罗丹 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 炎症相关疾病肺损伤的发病机制, E-mail: luodanyinl@163.com

通讯作者: 李玉英 (1972-), 女, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向: ARDS 的发病机制及其治疗, 干细胞定向诱导分化及其机制, E-mail: lzhylyhy@126.com

16HBE cells by 13.90%; GLP-8 reduced the excessive secretion of reactive oxygen species (ROS) induced by BaP by 19.30% (GLP-8, 5  $\mu\text{g/mL}$ ) and 41.30% (GLP-8, 25  $\mu\text{g/mL}$ ), respectively. GLP-8 reduced the apoptosis rate of BaP-treated 16HBE cells by 5.80% (GLP-8, 5  $\mu\text{g/mL}$ ) and 9.30% (GLP-8, 25  $\mu\text{g/mL}$ ), respectively. After the GLP-8 treatment (25  $\mu\text{g/mL}$ ), the expressions of BaP-induced inflammatory factors, IL-33, IL-25, IL-1 $\beta$  and IL-6 decreased by 60.10%, 28.90%, 33.50% and 41.90%, respectively; when compared to the BaP group. GLP-8 inhibited the activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) signaling pathways. Therefore, it is concluded that GLP-8 could protect the activities of the airway epithelial cells through regulating the AhR/NLRP3 signaling pathway and inhibiting BaP-induced excessive secretion of ROS and over-expressions of inflammatory factors.

**Key words:** ginseng leaf; polyphenols; benzo(a)pyrene; AhR; NLRP3

研究显示,哮喘发病率及死亡率在全球范围内呈明显升高趋势,预计未来10年,因哮喘导致的死亡率会增加20%,而哮喘患者病情不能得到有效控制是重要的诱因之一<sup>[1]</sup>。在诱发哮喘的诸因素中,大气污染物不仅能诱发、加重哮喘、过敏性鼻炎和急性支气管炎,对肺功能也会造成严重的损伤<sup>[2,3]</sup>。苯并芘(Benzo(a)pyrene, BaP)是多环芳烃化合物,是一种典型的环境污染物。BaP来源广泛,包括香烟烟雾、熏烤油炸食品、工业废水以及受污染的大气等<sup>[4]</sup>。随着工业化进程的推进,城市大气污染状况的加重与呼吸道疾病,尤其是哮喘的发病率有着直接的关系<sup>[5]</sup>。

中药应用于哮喘的临床治疗,具有改善哮喘症状、提高哮喘患者肺功能以及减轻呼吸道炎症的作用。人参(*Panax ginseng* C.A.Mey)是五加科、多年生草本植物,具有改善心功能及提高免疫力的功效<sup>[6,7]</sup>。目前,关于人参的研究多集中于生物活性较佳的人参皂苷及人参多糖<sup>[8]</sup>。其中,人参皂苷的主要药理作用为改善微循环<sup>[9]</sup>、提高组织抗缺氧能力、抑制血小板聚集<sup>[10]</sup>、Ca<sup>2+</sup>拮抗作用、影响前列腺素(PGs)代谢<sup>[11]</sup>、抗肿瘤<sup>[12]</sup>、抗衰老等<sup>[13]</sup>。在实际应用过程中人参叶多是被丢弃部分,但作为人参植物的一部分,研究发现人参叶中也含有多种生物活性成分,并具有抗疲劳、抗高血糖、抗肥胖、抗衰老等作用<sup>[14]</sup>。但人参叶中的酚类成分的抗炎作用却鲜有报道。因此,本文将对人参叶中的多酚类活性成分进行分离、鉴定,并对其抗BaP诱导的气道上皮细胞损伤活性进行研究。本研究对人参叶有效利用及其中含有的生物活性成分应用于哮喘的临床治疗具有重要的指导意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

新鲜人参叶购于广州市石牌区二天堂大药房,由暨南大学药学院陈河如教授鉴定;文中使用的检测试剂盒、RIPA缓冲液和RNase购于碧云天生物科技有限公司(上海);16HBE细胞购于中国科学院细胞库

(上海);抗体购于Cell Signaling (CST, USA);其它化学品均购于Sigma或Adamas。

KQ-250B超声波提取器,昆山市超声波仪器有限公司;Hei-VAP Core ML G3 XL旋转蒸发仪,购于德国海道夫公司;Agilent 1100半制备型高效液相色谱仪购于美国安捷伦公司。

### 1.2 人参叶有效成分提取和分析

人参叶酚类成分的提取按照前述方法<sup>[15]</sup>进行,即通过超声提取法对新鲜人参叶(1.92 kg)酚类活性成分进行提取,以水/二氯甲烷(1:1)为提取剂,料液比1:20( $m/V$ , g/mL)萃取,并通过旋转蒸发仪对提取药液浓缩,得人参叶提取物浸膏(87 g)。将二氯甲烷组分(8.25 g)硅胶柱层析,用乙酸乙酯-甲醇梯度体系(100:1、10:1、1:1、0:1)洗脱,得到4个组分。基于BaP暴露诱导的16HBE细胞损伤模型,评价以上4个组分的保护活性,活性最佳部分用于后续分离。将组分1(1.24 g)置于硅胶柱上,用二氯甲烷/甲醇溶剂体系(100:5、20:1、1:1、0:1)梯度洗脱,得5个亚组分。基于BaP暴露诱导的16HBE细胞损伤模型,评价以上5个组分的保护活性,活性最佳部分用于后续分离。组分2(0.71 g)采用半制备型高效液相色谱法(甲醇-水,40:60;流速:3 mL/min),得到GLP-1( $t_R$  5.2 min)、GLP-4( $t_R$  7.8 min)和GLP-11( $t_R$  11.3 min);组分4(0.88 g)采用半制备型高效液相色谱法(甲醇-水,30:70;流速:3 mL/min),得到GLP-2( $t_R$  12.2 min)、GLP-5( $t_R$  15.5 min)和GLP-9( $t_R$  19.4 min);组分5(0.95 g)采用半制备型高效液相色谱法(甲醇-水,50:50;流速:3 mL/min),得到GLP-3( $t_R$  7.8 min)、GLP-6( $t_R$  11.3 min)、GLP-7( $t_R$  17.3 min)、GLP-8( $t_R$  22.5 min)和GLP-10( $t_R$  29.0 min);进一步的GLP-1~11的结构通过<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR和ESI-MS进行分析鉴定。

本项目分析仪器使用ACQUITY UPLC系统联合和Q Exactive HF混合四极杆Orbitrap,并带有ESI离子源和Orbitrap质量分析仪。质谱仪以35000质量分

辨率(200  $m/z$ )运行,配备C18色谱柱(UPLC BEH C18, 2.1×100 mm, 1.7 mm; Waters)结合使用。梯度洗脱所用的流动溶液为水和甲醇,其中含有0.05%的全氟戊酸(PFPA)和0.1%的FA。柱温为40℃,进样量5  $\mu\text{L}$ ,检测波长254 nm,流速0.4 mL/min。质谱扫描范围设置为70~1000  $m/z$ 。在正离子和负离子模式下,MS毛细管温度均为350℃。

### 1.3 细胞培养及细胞活性检测

按参考文献<sup>[16]</sup>所述方法进行细胞培养,即将人支气管上皮(16HBE)细胞培养于10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺等配置的Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培养基中(37℃, 5%  $\text{CO}_2$ )。

GLPs对16HBE细胞的保护活性采用CCK8试剂盒测定:16HBE细胞( $1 \times 10^4$  cells/孔)接种到含有200  $\mu\text{L}$ 培养基的96孔培养板中,过夜。细胞经BaP(1.00  $\mu\text{mol/L}$ )暴露2.0 h后,冷磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2遍,再加入含有5  $\mu\text{g/mL}$  GLPs的培养基培养12 h, CCK8试剂盒检测细胞活力。

### 1.4 细胞内活性氧(ROS)和炎症细胞因子检测

ROS和炎症细胞因子(IL-33、IL-25、IL-1 $\beta$ 及IL-6)检测分别按照相应检测试剂盒说明书进行:16HBE细胞( $5 \times 10^5$  cells/孔)接种于6孔板,过夜;BaP(1  $\mu\text{mol/L}$ )暴露2 h,冷PBS清洗2遍,再加入含有GLP-8(5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ )的培养基培养12 h。据检测试剂盒要求,测量细胞内ROS和炎症细胞因子含量。

### 1.5 线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi\text{m}$ )及细胞凋亡检测

按照参考文献进行线粒体跨膜电位检测,即16HBE细胞( $5 \times 10^5$  cells/孔)接种于6孔板,过夜;然后BaP(1  $\mu\text{mol/L}$ )暴露2 h,冷PBS清洗2遍,加入含有GLP-8(5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ )的培养基培养12 h,收集细胞,冷PBS洗涤。室温,加入含有1  $\mu\text{g/mL}$  JC-1染液孵育30 min。弃上清液,使用流式细胞仪检测<sup>[18]</sup>。

按照参考文献进行细胞凋亡检测,即16HBE细

胞( $5 \times 10^5$  cells/孔)接种于6孔板,过夜;然后BaP(1  $\mu\text{mol/L}$ )暴露2 h,冷PBS清洗2遍,加入含有GLP-8(5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ )的培养基培养12 h,收集细胞Annexin V-FITC/PI孵育,流式细胞仪检测细胞状态<sup>[17]</sup>。

### 1.6 Western blotting 实验

16HBE细胞( $3 \times 10^6$  cells/皿)接种于10 cm培养皿中培养过夜;BaP(1  $\mu\text{mol/L}$ )暴露2 h,冷PBS清洗2遍,加入含有GLP-8(5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ )的培养基培养12 h,收集细胞,采集总蛋白,用Bradford蛋白测定法测定蛋白质含量。参考文献进行Western blotting蛋白分析<sup>[18]</sup>。利用Image J软件对蛋白密度进行分析。

### 1.7 统计分析

用Graphpad Prism 5 (San Diego, USA)进行数据分析;通过Student's  $t$ -检验进行对照和治疗之间的统计学比较。所有实验至少进行3次;数据表示为平均值(mean)±平均值的标准误差(SD); $p < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 人参叶酚类化合物的分离及鉴定

经活性追踪及多种色谱分离方法共分离鉴定出11个人参叶酚类化合物(图1)分别为GLP-1(Oligophculatin A)、GLP-2(Oligophculatin B)、GLP-3(Oligophculatin C)、GLP-4(Oligophculatin D)、GLP-5(Oligophculatin E)、GLP-6(Oligophculatin F)、GLP-7(Albaspidin AP)、GLP-8(Albaspidin AA)、GLP-9(Albaspidin AB)、GLP-10(Methylene-bis-phlorobutyrophenone)、GLP-11(1-[3-[(3-acetyl-2,4,6-trihydroxyphenyl)methyl]-2,4,6-trihydroxyphenyl] butanone)。其中, GLP-1~11均为首次从人参叶中分离获得。

参考相关文献<sup>[19]</sup>,通过高效液相色谱仪测得GLP-1~11的纯度>98.0%。

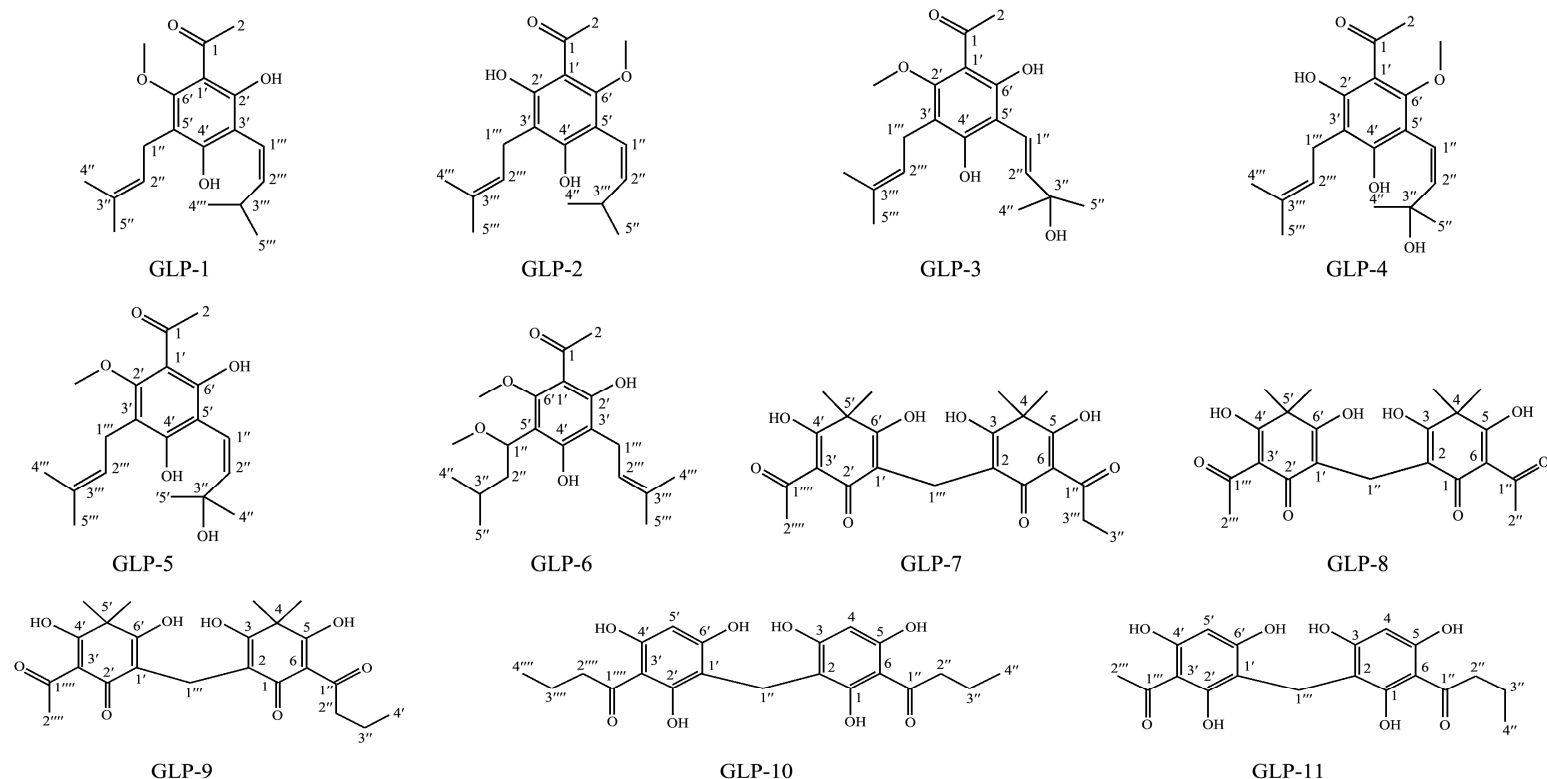


图 1 GLP-1~GLP-11 结构式

Fig.1 GLP-1~GLP-11 structure formula

注: GLP-1: 黄色油状物, HR-ESI-MS 显示准分子离子峰  $m/z$  341.1729  $[M+Na]^+$  ( $C_{19}H_{26}O_4Na$ , 理论计算值: 341.1723), 确定分子式为  $C_{19}H_{26}O_4$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 1; GLP-2: 黄色油状物, HR-ESI-MS 显示准分子离子峰  $m/z$  319.1904  $[M+H]^+$  ( $C_{19}H_{27}O_4$ , 理论计算值: 319.1904), 确定分子式为  $C_{19}H_{26}O_4$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 1; GLP-3: 淡黄色油状物, HR-ESI-MS 显示准分子离子峰  $m/z$  357.1676  $[M+Na]^+$  ( $C_{19}H_{26}O_5Na$ , 理论计算值: 357.1672), 确定分子式为  $C_{19}H_{26}O_5$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 1; GLP-4: 淡黄色油状物, HR-ESI-MS 显示准分子离子峰  $m/z$  357.1678  $[M+Na]^+$  ( $C_{19}H_{26}O_5Na$ , 理论计算值: 357.1672), 确定分子式为  $C_{19}H_{26}O_5$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 1; GLP-5: 黄色油状物, HR-ESI-MS 显示准分子离子峰  $m/z$  335.1855  $[M+H]^+$  ( $C_{19}H_{27}O_5$ , 理论计算值: 335.1853), 确定分子式为  $C_{19}H_{26}O_5$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 1; GLP-6: 黄色油状物, HR-ESI-MS 显示准分子离子峰  $m/z$  373.1985  $[M+Na]^+$  ( $C_{20}H_{30}O_5Na$ , 理论计算值: 373.1985), 确定分子式为  $C_{20}H_{30}O_5$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 1; GLP-7: 黄色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$ : 419.1692  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{22}H_{27}O_8$ , 419.1700), 确定分子式为  $C_{22}H_{27}O_8$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 2; GLP-8: 黄色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$ : 405.1548  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{21}H_{25}O_8$ , 405.1544), 确定分子式为  $C_{21}H_{25}O_8$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 2; GLP-9: 黄色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$ : 433.1856  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{23}H_{29}O_8$ , 433.1857), 确定分子式为  $C_{23}H_{29}O_8$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 2; GLP-10: 淡紫色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$ : 427.1365  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{21}H_{24}NaO_8$ , 427.1363), 确定分子式为  $C_{21}H_{24}O_8$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 2; GLP-11: 淡紫色粉末, HR-ESI-MS  $m/z$ : 377.1232  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{19}H_{21}NaO_8$ , 377.1232), 确定分子式为  $C_{19}H_{21}O_8$ ,  $^1H$  NMR 及  $^{13}C$  NMR 数据总结于表 2。

表 1 化合物 GLP-1~6 <sup>1</sup>H 及 <sup>13</sup>C NMR 数据 (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm)Table 1 NMR data of GLP-1~6 (CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm)

GLPs		1		2		3		4		5		6	
position	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	
1	204.9		205.70	-	203.60	-	203.60	-	203.30	-	203.70	-	
2	31.2	2.66 (s)	31.30	2.69 (s)	31.10	2.67 (s)	31.50	2.68 (s)	31.40	2.68 (s)	31.10	2.68 (s)	
1'	115.5	-	115.70	-	115.00	-	115.70	6.52 (overlapped)	113.30	-	114.90	-	
2'	161.3	-	161.30	-	161.10	-	163.90	-	163.60	-	161.30	-	
3'	109.3	-	109.60	-	106.10	-	107.10	-	107.00	-	108.50	-	
4'	161.7	-	162.80	-	158.70	-	157.30	-	158.10	-	162.20	-	
5'	109.9	-	111.10	-	109.10	-	108.60	-	108.8	-	108.90	-	
6'	162.1	-	161.10	-	159.10	-	157.90	-	157.00	-	160.80	-	
1''	23.7	3.30 (d, 6.6)	23.60	3.34 (d, 6.7) (overlapped)	22.50	3.24 (d, 6.8)	22.90	1.09 (d, 6.5)	21.60	3.28 (d, 7.3)	22.50	3.28 (d, 8.0)	
2''	124.6	5.19 (t, 6.6)	124.40	5.21 (t, 6.7) (overlapped)	123.30	5.15 (t, 6.8)	128.00	5.62 (d, 10.0)	122.3	5.22 (m)	123.40	5.21 (t, 8.0)	
3''	132.0	-	132.50	-	131.30	-	142.60	6.64 (dd, 16.2, 7.0)	131.5	-	131.60	-	
4''	18.0	1.76 (s)	18.00	1.80 (s)	18.10	1.78 (s)	33.20	2.46 (m)	18.00	1.79 (s)	21.90	0.95 (d, 5.4)	
5''	25.9	1.66 (s)	25.90	1.71 (s)	25.90	1.69 (s)	22.90	1.09 (d, 6.5)	28.30	1.44 (s)	23.50	0.96 (d, 5.4)	
1'''	117.1	5.87 (d, 10.8)	117.80	6.36	126.80	5.50 (d, 10.0)	110.7	-	128.1	5.60 (d, 10.0)	24.90	1.83 (m)	
2'''	146.2	5.69 (dd, 10.8, 9.9)	143.80	6.35	116.30	6.67 (d, 10.0)	116.90	6.51 (overlapped)	116.9	6.50 (d, 10.0)	57.80	3.39 (s)	
3'''	30.0	2.21 (m)	33.90	2.47 (m)	78.00	-	77.70	-	77.400	-	78.20	4.92 (dd, 12.0, 4.0)	
4'''	22.7	0.92 (d, 6.6)	23.00	1.12 (d, 6.7)	28.50	1.43 (s)	28.40	1.48 (s)	28.30	1.44 (s)	25.80	1.70 (s)	
5'''	22.7	0.92 (d, 6.6)	23.00	1.12 (d, 6.7)	28.50	1.43 (s)	28.40	1.48 (s)	26.00	1.67 (s)	18.00	1.77 (s)	
1''-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44.30	1.81 (m); 1.43 (m)	
6'-OMe	63.40	3.72 (s)	63.40	3.73 (s)	62.90	3.72 (s)	63.20	3.77 (s)	63.20	3.76 (s)	62.80	3.73 (s)	
2'-OH	-	-	-	-	-	13.51 (s)	-	14.19 (s)	-	13.74 (s)	-	13.59 (s)	
4'-OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.54 (s)	

表 2 化合物 GLP-7~11  $^1\text{H}$  及  $^{13}\text{C}$  NMR 数据 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm)Table 2 NMR data of GLP-7~11 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm)

GLPs		7		8		GLPs		9		GLPs		10		11	
Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)		Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	198.8	-		199.5	-	1	199.4	-		1	162.6	-		163.5	-
2	110.9	-		110.8	-	2	110.9	-		2	106.5	-		105.5	-
3	187.7	-		187.7	-	3	187.7	-		3	163.3	-		162.5	-
4	44.6	-		44.6	-	4	44.6	-		4	96.6	5.94 s		96.6	5.95 s
5	173.6	-		173.6	-	5	173.7	-		5	163.3	-		163.7	-
6	108.6	-		108.6	-	6	108.6	-		6	105.6	-		105.5	-
1'	110.8	-		110.8	-	1'	110.9	-		1'	106.5	-		106.5	-
2'	199.5	-		199.5	-	2'	199.5	-		2'	162.6	-		163.2	-
3'	108.1	-		108.1	-	3'	108.2	-		3'	105.6	-		106.6	-
4'	173.4	-		173.4	-	4'	173.4	-		4'	163.3	-		162.7	-
5'	44.4	-		44.4	-	5'	44.6	-		5'	96.6	-		96.5	5.95 s
6'	187.7	-		187.7	-	6'	187.7	-		6'	163.3	-		163.7	-
1''	203.3	-		203.3	-	1''	203.3	-		1''	208	-		208	-
2''	34.9	3.21 q (7.2)		34.9	3.21 q (7.2)	2''	43	3.15 m		2''	46.8	3.05 t (7.4)		46.8	3.06 t (7.4)
3''	29.3	2.72 s				3''	18.3	1.70 m		3''	19.3	1.69 m		19.3	1.69 m
1'''	8.6	1.17 t (7.2)		8.6	1.17 t (7.2)	4''	29.3	2.72 s		4''	16.2	3.65 s		16.2	3.68 s
1''''	207.3			207.3	-	1'''	14.1	1.01 t (7.4)		1'''	14.3	0.97 t (7.4)		14.3	0.98 t (7.4)
2''''	18.1	3.31 s		18.1	3.31 s	1''''	206.4	-		1''''	208	-		205.3	-
4-Me-1	24.3	1.54 s		24.3	1.54s	2''''	18.1	3.31 s		2''''	46.8	-		46.8	-
4-Me-2	25.4	1.47 s		25.4	1.46 s					3''''	19.3	-			
5''-Me-1	24.3	1.54s		24.3	1.53 s					4''''	16.2	-			
5''-Me-2	25.4	1.47s		25.4	1.46 s										

Note: Measured at 500 ( $^1\text{H}$ ) and 125 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Overlapped signals were reported without designating multiplicity.

## 2.2 人参叶酚类化合物保护活性评价

用不同浓度的 GLPs 最终化合物的纯品 (0.01~5.00 mg/mL) 处理 16HBE 细胞 24 h, 并通过 CCK8 测定细胞活力以测定 GLPs 自身细胞毒性。实验结果表明, 与空白对照组相比, GLPs 在低于 3.60 mg/mL 时, 16HBE 细胞活力均无显著性差异。

与空白对照组 (细胞存活率设为 100%) 相比, BaP 暴露使 16HBE 细胞活力降低 19.70%, 由此说明 BaP 暴露对细胞造成了一定的损伤, 进而使其细胞活力降低。而与 BaP 组相比, 经 GLPs 处理后 16HBE 细胞活力升高。其中, GLP-8 组 16HBE 细胞活力提升最为显著; 与 BaP 组相比, 16HBE 细胞活力提升 13.90% (表 3)。由此得出, GLPs 可减轻 BaP 暴露导致的 16HBE 细胞损伤, 进而发挥保护活性。基于 GLP-8 具有最佳抗 BaP 暴露诱导的损伤活性, 进而以 GLP-8 为代表, 研究其潜在的分子作用机制。

表 3 GLP-1~11 增强人气道上皮细胞 (16HBE) 抗 BaP 暴露导致的损伤活性

Table 3 GLP-1~11 enhance protective activity of 16HBE cells against BaP-exposure induced cell viability decline

分组	细胞存活率/%	分组	细胞存活率/%
Control	100±4.11	GLP-6	88.3±2.97
BaP	80.3±3.16 <sup>#</sup>	GLP-7	90.5±3.03
GLP-1	87.5±2.82	GLP-8	94.2±2.99*
GLP-2	87.7±2.76	GLP-9	91.2±3.04*
GLP-3	89.8±2.91	GLP-10	90.2±3.10
GLP-4	89.3±3.03	GLP-11	91.3±3.26*
GLP-5	89.2±2.92	Resveratrol	91.8±3.13*

注: Mean±SD (n=3), <sup>#</sup>表示与 Control 组比较  $p<0.05$ , \*表示与 BaP 组比较  $p<0.05$ 。白藜芦醇 (Resveratrol) 阳性对照物。

## 2.3 GLP-8 抑制 BaP 暴露导致的 16HBE 细胞

### 氧化应激

自由基活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 产生过剩或抗氧化能力下降会诱发 DNA 损伤和 DNA 损伤修复反应及细胞凋亡<sup>[20]</sup>。研究报道, BaP 能够作用于人支气管上皮细胞、肺泡组织使谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-PX)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性降低, 诱发 ROS 及 MDA 含量升高, 进而导致氧化应激, 损伤人支气管上皮细胞及肺泡组织<sup>[21]</sup>。因此, 减少 ROS 的生成是减轻氧化损伤的一种重要策略。如图 2a 所示, BaP 暴露显著诱导了 16HBE 细胞 ROS 的生成, 与空

白对照组相比, BaP 组 ROS 含量升高 247%。GLP-8 处理后, BaP 诱导的 ROS 含量升高被显著抑制, ROS 含量分别降低 19.30% (5  $\mu$ g/mL) 和 41.30% (25  $\mu$ g/mL)。基于此可推测人参叶多酚类化合物可能是通过抑制 BaP 暴露导致的细胞内 ROS 过量产生, 抑制氧化应激发挥保护活性的。

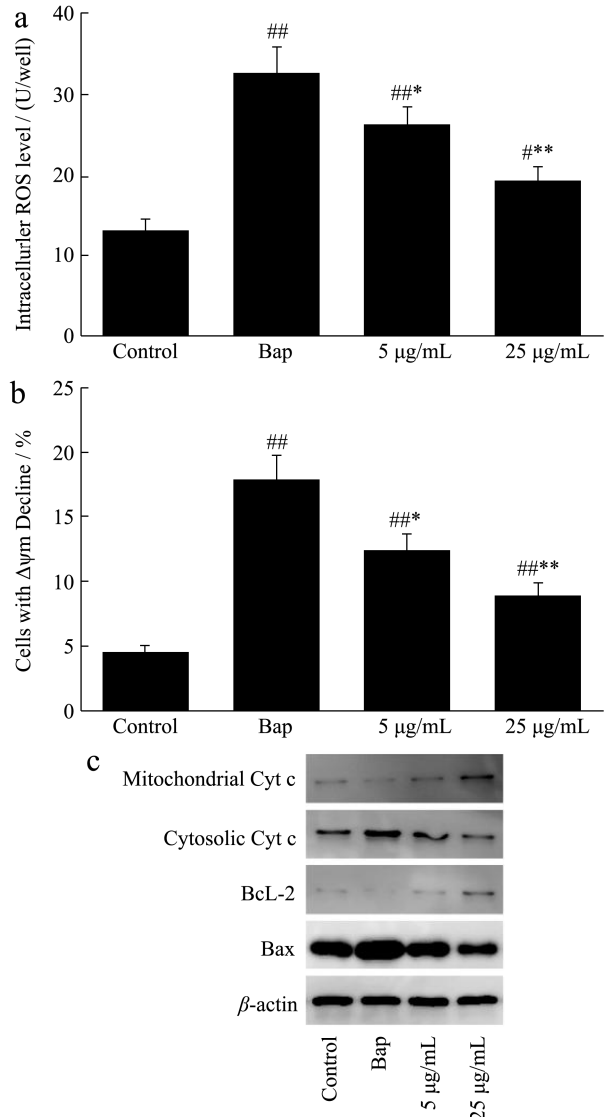


图 2 GLP-8 抑制 BaP 诱导的氧化应激

Fig.2 GLP-8 inhibits BaP-induced oxidative stress

注: 16HBE 细胞 ( $5 \times 10^5$  cells/孔) 接种于 6 孔板, 过夜;

然后 BaP (1.00  $\mu\text{mol/L}$ ) 暴露 2 h, 冷 PBS 清洗 2 遍, 再加入含有 GLP-8 (5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ ) 的培养基培养 12 h。收集细胞, (a) 16HBE 细胞内的 ROS 含量变化检测; (b) 16HBE 细胞  $\Delta\Psi\text{m}$  变化检测; (c) Western blot 检测 GLP-8 对 BaP 暴露导致的 Bcl-2、Bax 及 Cyt c 表达的影响。数据以平均值 $\pm$ 标准差 ( $n=3$ ) 表示,  $^{\#}p<0.05$ ,  $^{\#\#}p<0.01$ , 空白对照组;  $^*p<0.05$ ,  $^{**}p<0.01$ , BaP 组。

细胞凋亡线粒体途径在细胞氧化应激过程中起着重要作用<sup>[22]</sup>。为研究 GLP-8 减轻 BaP 诱导的细胞氧化损伤的潜在机制, 进一步检测了 16HBE 细胞  $\Delta\Psi\text{m}$  的变化情况。如图 2b 所示, 与空白对照组相比 (4.46%), BaP 暴露使 16HBE 细胞  $\Delta\Psi\text{m}$  显著下降 13.33%。而经 GLP-8 共培养后,  $\Delta\Psi\text{m}$  下降被显著抑制, BaP 暴露诱导的  $\Delta\Psi\text{m}$  分别下降 7.87% (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 和 4.46% (5  $\mu\text{g/mL}$ )。GLP-8 能够减少 BaP 暴露导致的 16HBE 细胞内 ROS 积累并抑制 BaP 暴露导致的 16HBE 细胞  $\Delta\Psi\text{m}$  下降。实验结果进一步证实, GLP-8 可能通过抑制 BaP 暴露导致的氧化应激发挥保护 16HBE 细胞作用。

线粒体通透性转变孔 (Mitochondrial Permeability Transition Pore, MPTP) 是位于线粒体内外膜之间由多个蛋白质组成的复合通道。其中, Bcl-2 家族相关蛋白能够调控 MPTP。其次细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS 等也可能直接或间接参与 MPTP 的调控<sup>[23]</sup>。MPTP 开放导致线粒体基质内的高渗透压可能使基质肿胀导致外膜破裂, 释放出细胞色素 C (Cytochrome C, Cyt c)。而 Cyt c 从线粒体释放到细胞浆会降低细胞抗氧化能力, 进而诱发细胞凋亡<sup>[24]</sup>。本实验中, BaP 暴露显著诱导了 Cyt c 从线粒体释放到胞质中 (图 2c)。而 GLP-8 显著抑制了 BaP 暴露导致的 Cyt c 从线粒体到胞质的释放。Bcl-2 家族蛋白对细胞凋亡的调控至关重要, 其中抗凋亡蛋白 (Bcl-2) 和促凋亡蛋白 (Bax) 的比例是调控 MPTP, 决定细胞凋亡进程的关键调控因素<sup>[23]</sup>。因此, 本文检测了 GLP-8 对 BaP 暴露导致的 Bcl-2 家族蛋白 (Bcl-2 和 Bax) 表达变化的影响。如图 2c 所示, BaP 暴露导致的 Bcl-2 下调及 Bax 表达上调, Bcl-2/Bax 比例降低。而 GLP-8 处理后, BaP 暴露导致的 Bcl-2/Bax 比例降低被显著扭转, 这些结果表明 GLP-8 可通过线粒体信号途径减轻 BaP 暴露导致的 16HBE 细胞氧化应激。

#### 2.4 GLP-8 抑制 BaP 暴露诱导的 16HBE 细胞炎症因子分泌

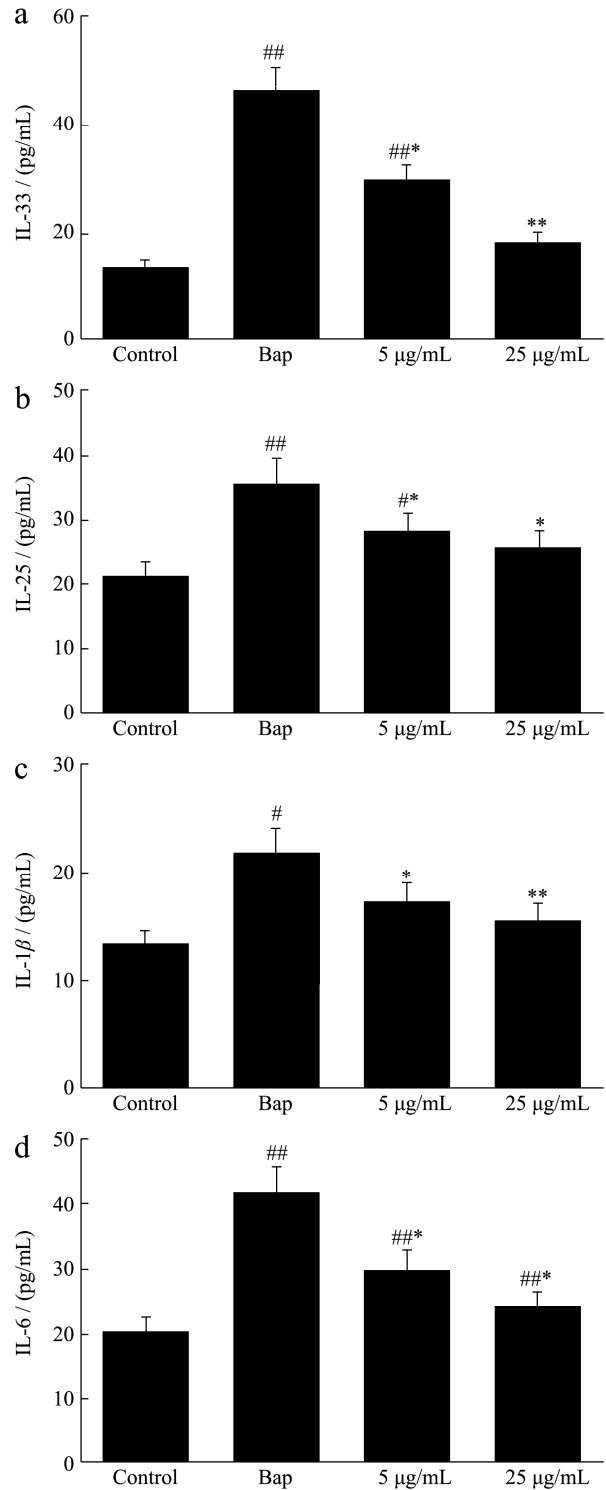


图 3 GLP-8 抑制 BaP 暴露诱导的炎症因子过表达

Fig.3 GLP-8 inhibits the over expression of inflammatory factors induced by BaP exposure

注: 16HBE 细胞 ( $5 \times 10^5$  cells/孔) 接种于 6 孔板, 过夜; 然后 BaP (1.00  $\mu\text{mol/L}$ ) 暴露 2 h, 冷 PBS 清洗 2 遍, 再加入含有 GLP-8 (5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ ) 的培养基培养 12 h, ELISA 检测相关细胞炎症因子含量变化。数据以平均值 $\pm$ 标准差 ( $n=3$ ) 表示,  $^{\#}p<0.05$ ,  $^{\#\#}p<0.01$ , 空白对照组;  $^*p<0.05$ ,  $^{**}p<0.01$ , BaP 组。



研究报道, BaP 暴露能够促进 Der f 1 诱导的上皮细胞因子释放, 进而加重对气道上皮细胞的损伤<sup>[16]</sup>。接下来, 本文研究了 BaP 暴露是否能诱导上皮细胞因子的产生, 以及 GLP-8 是否能抑制这种反应。16HBE 细胞 BaP 暴露后, ELISA 检测发现, IL-33、IL-25、IL-1 $\beta$  及 IL-6 含量显著升高 (图 3); 与空白对照组相比, BaP 暴露使 IL-33、IL-25、IL-1 $\beta$  及 IL-6 含量分别升高 247%、67.90%、62.70% 及 103.20%。相反的, GLP-8 抑制了 BaP 暴露诱导的 16HBE 细胞上皮细胞因子 IL-33、IL-25、IL-1 $\beta$  及 IL-6 的过表达。与 BaP 暴露组相比, GLP-8 (25  $\mu$ g/mL) 使 IL-33、IL-25、IL-1 $\beta$  及 IL-6 的分泌减少 60.10%、28.90%、33.50% 及 41.90%。以上实验结果说明, GLP-8 可能是通过抑制 BaP 暴露导致的炎症细胞因子发挥保护功能的。

## 2.5 GLP-8 抑制 BaP 暴露诱导的 16HBE 细胞凋亡

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡形式, 在细胞凋亡过程中细胞形态会发生显著的变化, 如细胞收缩、核碎裂和染色质凝聚等<sup>[25]</sup>。本实验中, 与空白对照组 (细胞总凋亡率为 7.80%) 相比, BaP 暴露使细胞凋亡显著增加 (BaP 组, 细胞总凋亡率为 24.50%)。而与 BaP 暴露组相比, GLP-8 治疗组细胞凋亡率分别降低 5.80% 和 9.30% (图 4)。细胞凋亡实验为 GLP-8 抑制 BaP 暴露诱导的 16HBE 细胞损伤提供了进一步的证据。

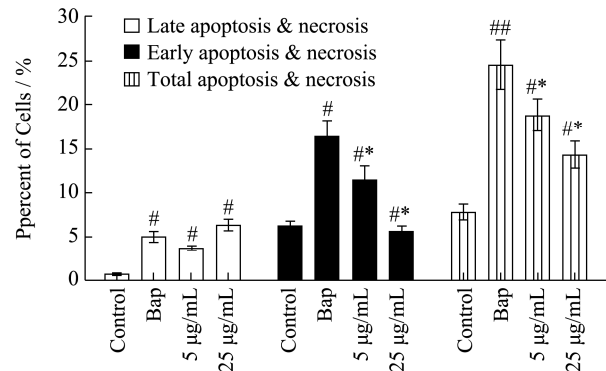
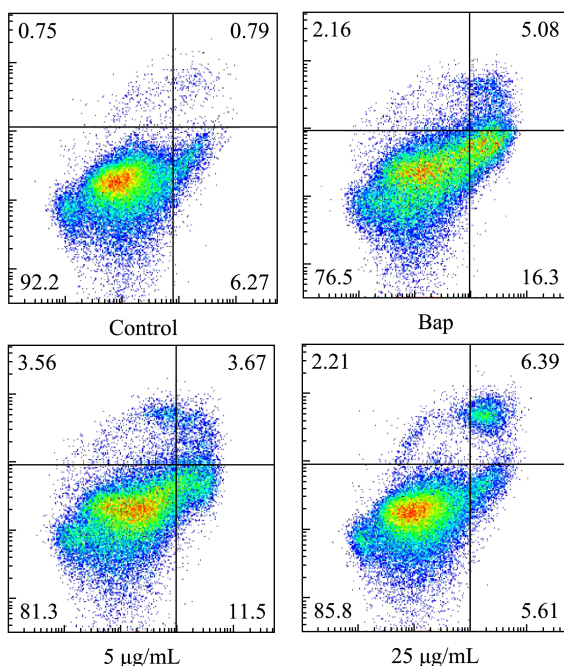


图 4 GLP-8 减少 BaP 诱导的 16HBE 细胞凋亡

Fig.4 GLP-8 reduces BaP-induced apoptosis of 16HBE cells

注: 16HBE 细胞 ( $5 \times 10^5$  细胞/孔) 接种于 6 孔板, 过夜; 然后 BaP (1.0  $\mu$ mol/L) 暴露 2 h, 冷 PBS 清洗 2 遍, 再加入含有 GLP-8 (5  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ g/mL) 的培养基培养 12 h, 收集细胞 Annexin-V-FITC/PI 染色, 流式分析细胞凋亡。数据以平均值  $\pm$  标准差 (n=3) 表示, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , 空白对照组; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , BaP 组。

## 2.6 GLP-8 抑制 BaP 诱导的芳基羟受体 (AhR)

活化及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体激活

研究报道, 芳基羟受体 (AhR) 活化在 BaP 加重尘螨诱发的过敏性哮喘患者炎症细胞因子 IL-33、IL-25 和胸腺基质淋巴细胞生成素 (Thymic Stromal Lymphopoietin, TSLP) 的过表达中具有十分重要的作用<sup>[17]</sup>。为了检测 GLP-8 能否抑制 BaP 暴露诱导的 AhR 活化, 本文检测了 AhR 及其下游主要蛋白细胞色素 P450 亚酶 1A1 (CYP1A1) 的表达情况。结果如图 5a、5b 显示, BaP 暴露使 AhR 及 CYP1A1 的表达显著增加, 而 GLP-8 抑制了 BaP 暴露诱发的 AhR 信号激活。研究报道, BaP 暴露会诱导呼吸道上皮细胞 ROS 产生, 激活 AhR 信号通路并进一步诱发上皮细胞因子过表达。本文的实验结果显示, GLP-8 能够抑制 BaP 暴露诱导的 16HBE 细胞 ROS 过量产生, GLP-8 处理后, ROS 含量分别降低 19.30% (5  $\mu$ g/mL) 和 41.30% (25  $\mu$ g/mL); GLP-8 也能够抑制 BaP 暴露诱导的 16HBE 细胞 AhR 信号通路激活, 与空白对照组 (AhR 表达设为 100%) 相比, BaP 暴露使 AhR 的表达增加 89.10%, CYP1A1 的表达增加 49.32%, 经 GLP-8 处理后, BaP 暴露使 AhR 的表达降低了 40.00%, CYP1A1 的表达降低了 65.50%。

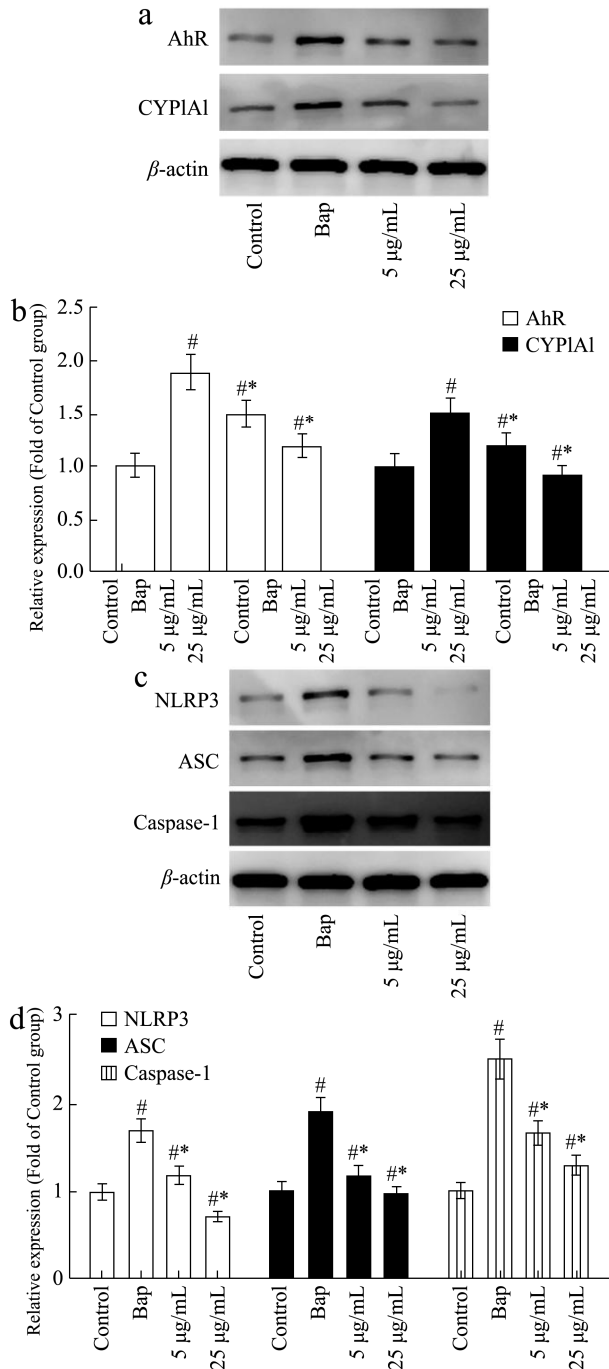


图5 GLP-8 抑制 BaP 暴露诱导的 AhR 信号通路及 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达

**Fig.5 GLP-8 inhibits the AhR signaling pathway and NLRP3 inflammasome-related protein expression induced by BaP exposure**

注: 16HBE 细胞 ( $3 \times 10^6$  cells/皿) 接种于 10 cm 培养皿中培养过夜; 然后 BaP (1.00 μmol/L) 暴露 2 h, 冷 PBS 清洗 2 遍, 再加入含有 GLP-8 (5 μg/mL、25 μg/mL) 的培养基培养 12 h, 收集细胞, 采集总蛋白, Western blotting 检测蛋白 AhR、CYP1A1、ASC、NLRP3 及 Caspase-1 的表达变化。数据以平均值±标准差 (n=3) 表示, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , 空白对照组; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , BaP 组。

NLRP3 炎症小体是由 NOD 样受体 (NOD-like receptor, NLR) 家族成员 NLRP3 蛋白与 ASC 接头蛋白及胱冬肽酶-1 (Caspase-1) 胱冬肽酶形成的一个多蛋白复合物, 其活化后能促进 IL-1β、IL-18 和 IL-33 等多种炎症细胞因子的剪切, 成熟与分泌, 因而在炎症发生过程中起关键作用。NLRP3 炎症小体作为固有免疫的重要组分在机体免疫反应和疾病发生过程中具有重要作用<sup>[26]</sup>。因此, 本实验中进一步检测了 BaP 暴露及 GLP-8 对 NLRP3 炎症小体 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白表达的影响。结果如图 5c、5d 所示, BaP 暴露显著诱导了 NLRP3 炎症小体 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白的表达, 分别增加 69.80%、92.60%、151.20%; 而 GLP-8 抑制了 BaP 暴露诱导的 NLRP3 炎症小体激活, GLP-8 处理后的 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白表达量增加显著降低, 分别为 19.40% (5 μg/mL)、18.58% (5 μg/mL)、67.40% (5 μg/mL)。

### 3 结论

本研究发现环境污染物 BaP 暴露会诱发气道上皮细胞 ROS 过量产生并诱发氧化应激, 激活 AhR 信号通路; 进一步的, BaP 暴露会诱发气道上皮细胞炎症因子分泌并激活 NLRP3 炎症小体, 最终导致细胞凋亡。本文分离的人参叶多酚类化合物具有抗 BaP 诱导的氧化损伤及炎症损伤的活性。其中, GLP-8 能够抑制 BaP 暴露诱导的 ROS 过量产生及炎症细胞因子 (IL-33、IL-25、IL-1β 及 IL-6) 等过表达。进一步研究发现, GLP-8 可能是基于抑制 NLRP3 炎症小体及 AhR 信号通路相关蛋白的表达进而发挥抗炎及抗氧化活性的。同时, 本研究为人参叶有效活性成分的提取及其应用于哮喘的临床治疗方面提供了一定的理论借鉴依据。

### 参考文献

- [1] 汪枫林, 刘德行. TRPV1 在哮喘发病机制中作用的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(8): 1502-1508  
WANG Fenglin, LIU Dexing. Progress in effect of TRPV1 on pathogenesis of asthma [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2020, 36(8): 1502-1508
- [2] 郑鑫, 张志红. 空气污染物对哮喘相关基因 DNA 甲基化影响的研究进展[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(8): 795-800  
ZHENG Xin, ZHANG Zhihong. Research progress on DNA methylation of asthma related genes induced by air pollutants [J]. J Environ Occup Med, 2016, 33(8): 795-800
- [3] 邸沂遥, 关继涛, 阎锡新. 生活环境中主要空气污染物浓度与哮喘患者肺功能、呼出气一氧化氮和血清 IgE 水平的关

- 系[J].山东医药,2017,57(11):84-87
- DI Yiyao, GUAN Jitao, YAN Xixin. Relationship between the concentration of main air pollutants in living environment and lung function, exhaled nitric oxide and serum IgE levels in patients with asthma [J]. Shandong Medical Journal, 2017, 57(11): 84-87
- [4] Carrard J, Marquillies P, Pichavant M, et al. Chronic exposure to benzo(a)pyrene-coupled nanoparticles worsens inflammation in a mite-induced asthma mouse model [J]. Allergy, 2021, 76(5): 1562-1565
- [5] Ibon Eguiluz-Gracia, Alexander G Mathioudakis, Sabine Bartel, et al. The need for clean air: the way air pollution and climate change affect allergic rhinitis and asthma [J]. Allergy, 2020, 75(9): 2170-2184
- [6] Hee-Sook Jee, Kyung-Hoon Chang, Sun-Hee Moon, et al. Anti-*Helicobacter pylori*, Cytotoxic, and anti-inflammatory activities of white ginseng extract [J]. Food Science and Biotechnology, 2008, 17(5): 1106-1109
- [7] Tien-Lam Tran, Young-Ran Kim, Jun-Li Yang, et al. Dammarane triterpenes from the leaves of *Panax ginseng* enhance cellular immunity [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2014, 22(1): 499-504
- [8] Yun Miyong, Yi Youngsu. Regulatory roles of ginseng on inflammatory caspases, executioners of inflammasome activation [J]. Journal of Ginseng Research, 2020, 44(3): 373-385
- [9] Chen W X, Wang F, Liu Y Y, et al. Effect of notoginsenoside R1 on hepatic microcirculation disturbance induced by gut ischemia and reperfusion [J]. World Journal of Gastroenterology, 2008, 1: 29-37
- [10] Whi Min Lee, Sung Dae Kim, Myung Hwan Park, et al. Inhibitory mechanisms of dihydroginsenoside Rg3 in platelet aggregation: critical roles of ERK2 and cAMP [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2008, 60(11): 1531-1536
- [11] 王英婷,黄燮南,王风安.人参皂苷 Rg1 抑制 PGF<sub>2</sub>( $\alpha$ )诱导心肌细胞肥大[J].中国药理学通报,2008,5: 611-615
- WAGN Yingting, HUANG Xienan, WANG Feng'an. Ginsenoside Rg1 inhabits cardiomyocyte hypertrophy induced by prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2008, 5: 611-615
- [12] Bi Xiuli, Xia Xichun, Mou Teng, et al. Anti-tumor activity of three ginsenoside derivatives in lung cancer is associated with Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibition [J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 742: 145-152
- [13] Cheng Y, Shen L H, Zhang J T. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26(2): 143-149
- [14] Hongwei Wang, Dacheng Peng, Jingtian Xie. Ginseng leaf-stem: bioactive constituents and pharmacological functions [J]. Chinese Medicine, 2009, 4(1): 1-8
- [15] 金学俊,栗铭鸿,崔福顺.人参茎叶成分分析及提取物抗氧化活性研究[J].食品科技,2018,43(9):279-284
- JIN Xuejun, LI Minghong, CUI Fushun. Research on content of components and biological activity of extracts from stems and leaves of *Panax ginseng* [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(9): 279-284
- [16] Wang E, Tu W, Do D C, et al. Benzo(a)pyrene enhanced dermatophagoides group 1 (Der f 1)-induced TGF $\beta$ 1 signaling activation through the aryl hydrocarbon receptor-RhoA axis in asthma [J]. Front Immunol, 2021, 15: 643260
- [17] 伍龙果,蔡劲薇,潘吉铭,等.地塞米松通过线粒体途径诱导成骨细胞凋亡的研究[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(3): 380-384,403
- WU Longguo, CAI Jinwei, PAN Jiming, et al. Apoptosis of osteoblasts induced-dexamethasone via the mitochondria pathway [J]. Chin J Osteoporos, 2019, 25(3): 380-384, 403
- [18] Härtlova A, Peltier J, Bilkei-Gorzo O, et al. Isolation and western blotting of latex-bead phagosomes to track phagosome maturation [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1519: 241-248
- [19] 谭丽娟,金学俊,李官浩,等.盐酸水解处理对人参茎叶抗氧化活性的影响[J].食品工业,2016,6:173-176
- TAN Lijuan, JIN Xuejun, LI Guanhao, et al. Effect of hydrochloric acid hydrolysis on antioxidant activity of *Panax ginseng* stems and leaves [J]. The Food Industry, 2016, 6: 173-176
- [20] Zhou Yijing, Zhang Shiping, Liu Changwei, et al. The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK(1) cells [J]. Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA, 2009, 23(2): 288-294
- [21] 杨瑾,刘晓勇,邹云锋,等.苯并芘作用下人支气管上皮细胞切除修复交叉互补蛋白 I 表达的变化[J].毒理学杂志,2009, 23(3):177-180
- YANG Jin, LIU Xiaoyong, ZOU Yunfeng, et al. Dynamic changes of nucleotide excision repair proteins expression and their correlations with levels of DNA damage in human bronchial epithelia cells exposed to benzo(a) pyrene [J]. Journal of Toxicology, 2009, 23(3): 177-180

- [23] Mohammed S Chaudhry, Enrico Velardi, Jarrod A Dudakov, et al. Thymus: the next (re)generation [J]. Immunological Reviews, 2016, 271(1): 56-71
- [24] Steven M Lewis, Adam Williams, Stephanie C Eisenbarth. Structure and function of the immune system in the spleen [J]. Science Immunology, 2019, 4(33): eaau6085
- [25] Harry W Schroeder Jr, Lisa Cavacini. Structure and function of immunoglobulins [J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010, 125(S2): S41-S52
- [26] Rachel L Clement, Joe Daccache, Mostafa T Mohammed, et al. Follicular regulatory t cells control humoral and allergic immunity by restraining early b cell responses [J]. Nature Immunology, 2019, 20(10): 1360-1371
- [27] CHEN Kang, Giuliana Magri, Emilie K Grasset, et al. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA [J]. Nature Reviews Immunology, 2020, 20(7): 427-441
- [28] 李丹,王文千,李明亮,等.蜂王浆对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J].食品与发酵工业,2022,48(1):139-145  
LI Dan, WANG Wenqian, LI Mingliang, et al. Effect of royal jelly on immune function of mice with immunodeficiency [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(1): 139-145
- [29] QI Qiuchen, DONG Zhonghua, SUN Yueyue, et al. Protective effect of bergenin against cyclophosphamide-induced immunosuppression by immunomodulatory effect and antioxidation in Balb/c mice [J]. Molecules, 2018, 23(10): 2668-2682
- [30] LIAO Wei, LIN Jianxin, Warren J Leonard. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy [J]. Immunity, 2013, 38(1): 13-25
- [31] HE Jing, ZHANG Xia, WEI Yunbo, et al. Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Nature medicine, 2016, 22(9): 991-993
- [32] Chi Chiu Mok, Kwok Hungchan, Ling Yinbo, et al. Safety and immune response of a live-attenuated herpes zoster vaccine in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised placebo-controlled trial [J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2019, 78(12): 1663-1668
- [33] WEN Zhengshun, TANG Zhen, GU Lixia, et al. Immunomodulatory effect of low molecular-weight seleno-aminopolysaccharide on immunosuppressive mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123(1): 1278-1288
- [34] Eugene Varfolomeev, Domagoj Vucic. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease [J]. Cytokine, 2018, 101(1): 26-32
- [35] Pankaj Seth, Eva Csizmadia, Andreas Hedblom, et al. Deletion of lactate dehydrogenase-A in myeloid cells triggers antitumor immunity [J]. Cancer Research, 2017, 77(13): 3632-3643
- [36] Deepak Kumar Kaushik, Anindita Bhattacharya, Reza Mirzaei, et al. Enhanced glycolytic metabolism supports transmigration of brain-infiltrating macrophages in multiple sclerosis [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2019, 129(8): 3277-3292

---

(上接第 19 页)

- [22] Mithu Guha, Sanjay Kumar, Vinay Choubey, et al. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway [J]. The FASEB Journal, 2006, 20(8): 1224-1226
- [23] Chen Qun, Xu Haishan, Xu Aijun, et al. Inhibition of Bcl-2 sensitizes mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening in ischemia-damaged mitochondria [J]. PloS One, 2015, 10(3): e0118834
- [24] 周波,刘启辰,张羿,等.瞬时受体电位香草酸亚型 1 激活通过抑制线粒体通透性转换孔开放保护急性心肌梗死小鼠的心肌细胞抗凋亡[J].中国生物化学与分子生物学报,2017, 33(5):514-520  
ZHOU Bo, LIU Qichen, ZHANG Yi, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 1/TRPV1 protects cardiomyocytes against apoptosis in acute myocardial infarct mice by closing mitochondrial permeability transition pore [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 33(5): 514-520
- [25] 冯建芳,章静波.程序性细胞死亡及细胞凋亡[J].生理科学进展,1995,4:373-378  
FENG Jianfang, ZHANG Jingbo. Programmed cell death and apoptosis [J]. Progress in Physiological Sciences, 1995, 4: 373-378
- [26] Xie Q, Shen W W, Zhong J, et al. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate induces IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion through the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 murine macrophage cells [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(1): 341-349