

冠突散囊菌来源的 2-6-H-5-B 化合物的抗炎作用及机制研究

徐艳明^{1,2}, 黄壹敏¹, 石杰³, 周捷玲¹, 周鸿艳¹, 蒲洪^{1,3}, 黄勇³, 刘建新^{1*} (1. 湖南医药学院药学院, 新型抗体药物及其智能运输系统湖南省重点实验室, 中药合成生物学研究湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418000; 2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 3. 中南大学湘雅国际转化医学联合研究院, 长沙 410013)

摘要: 目的 研究冠突散囊菌来源的苯甲醛衍生物(2-6-H-5-B)对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用及机制。方法 RAW264.7 细胞经不同浓度的苯甲醛衍生物(2-6-H-5-B)(25, 50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及阳性对照药地塞米松($0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)预处理 1 h 后, 除对照组外, 其余各组给予 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 脂多糖刺激诱导 24 h。采用 Griess 试剂法检测 NO 释放水平, ELISA 法分析 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的表达水平, 以及 Western blotting 检测 AMPK、NF- κ B 和 MAPK 信号通路的蛋白表达情况。结果 化合物 2-6-H-5-B 可以显著抑制活化的巨噬细胞 NO($P<0.01$ 或 $P<0.05$)、TNF- α ($P<0.01$)、IL-6($P<0.01$)和 MCP-1($P<0.01$)的产生, 表现出较好的抗炎活性。研究表明, 2-6-H-5-B 未能明显阻断 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的活化, 但可以显著增加 p-AMPK 的表达。结论 2-6-H-5-B 是一个较有潜力的抗炎药物先导物, 其抗炎活性可能与激活 AMPK 通路相关。

关键词: 苯甲醛衍生物(2-6-H-5-B); 茯砖茶; 冠突散囊菌; 抗炎; RAW264.7 巨噬细胞

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)02-0161-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.02.004

引用本文: 徐艳明, 黄壹敏, 石杰, 等. 冠突散囊菌来源的 2-6-H-5-B 化合物的抗炎作用及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(2): 161-167.

Study on Anti-inflammatory Activity and Mechanism of Compound 2-6-H-5-B from *Eurotium Cristatum*

XU Yanming^{1,2}, HUANG Yimin¹, SHI Jie³, ZHOU Jiuling¹, ZHOU Hongyan¹, PU Hong^{1,3}, HUANG Yong³, LIU Jianxin^{1*} (1. School of Pharmaceutical Sciences, Hunan Province Key Laboratory for Antibody-based Drug and Intelligent Delivery System, Hunan Provincial Key Laboratory for Synthetic Biology of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China; 2. College of Jiamusi, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China; 3. Xiangya International Academy of Translational Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects and mechanisms of anti-inflammatory of benzaldehyde derivatives (2-6-H-5-B) derived from *Eurotium cristatum* in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 cells. **METHODS** RAW264.7 cells were pretreated with benzaldehyde derivative (compound 2-6-H-5-B) (25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and positive control drug dexamethasone ($0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 1 h, then cells were treated with 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ lipopolysaccharide for 24 h except control group. The nitrite concentration in the culture medium was measured as an indicator of NO production by the Griess reagent according to the manufacturer's protocol. The expression levels of TNF- α , IL-6 and MCP-1 in the cultured supernatant were detected by ELISA kits, and the protein expressions of AMPK, NF- κ B and MAPK signaling pathways were analyzed by Western blotting. **RESULTS** The expression of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α ($P<0.01$), IL-6 ($P<0.01$) and MCP-1 ($P<0.01$), as well as the production of NO ($P<0.01$ or $P<0.05$) were inhibited by compound 2-6-H-5-B. Further mechanism studies showed that 2-6-H-5-B failed to inhibit the activation of NF- κ B and MAPK signaling pathways, but increased the expression of p-AMPK significantly. **CONCLUSION** The 2-6-H-5-B is a potential anti-inflammatory drug, and its anti-inflammatory activity may be related to the activation of AMPK pathway.

KEYWORDS: benzaldehyde derivatives (2-6-H-5-B); Fu Brick Tea; *Eurotium cristatum*; anti-inflammatory; RAW264.7 macrophages

炎症是机体对于外部刺激的一种防御反应, 通常表现为发红、肿胀、发热和疼痛。炎症反应具有两面性, 通常炎症是机体抵抗外来侵略的防

御性反应, 但过强和持续的炎症反应会对机体造成病理伤害甚至死亡^[1]。故抑制过强和持续的炎症反应是针对炎症免疫性疾病(如类风湿关节炎、IgA

基金项目: 怀化市科技计划(应用基础研究类)项目(2018N2203); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201912214019); 湖南医药学院博士科研启动资金项目

作者简介: 徐艳明, 女, 博士, 讲师 E-mail: 34033696@qq.com **共同第一作者:** 黄壹敏, 女, 硕士生 E-mail: 1049927358@qq.com
*通信作者: 刘建新, 男, 博士, 副教授 E-mail: liujianxin3385@126.com

肾病等)的主要治疗思路^[2-3]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁外壁层中独特的化学成分,也称为“内毒素”。LPS可激活单核-巨噬细胞中丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和NF- κ B等炎症信号通路,从而诱导NO、TNF- α 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)等前促炎症性细胞因子和介质的释放,是体外炎症巨噬细胞模型常用的诱导剂^[4]。

茯砖茶是野生茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.]的茶叶经冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)(俗称“金花菌”)后发酵而来。与绿茶相比,其是一种风味独特、制备工艺十分复杂的后发酵黑茶,以往其主要被销往中国西北的部分地区,如陕西、四川等,故又称为“边销茶”^[5]。研究发现茯砖茶提取物中含有多种化学成分,如多酚、多糖、生物碱、三萜、黄酮类等^[6-7],现代药理研究也证实茯砖茶具有抗炎、抗氧化、降血糖、抗肿瘤和免疫调节等功效^[8-9],提示饮用茯砖茶对人体有一定的保健作用。冠突散囊菌作为茯砖茶发酵过程中的优势菌群影响了茯砖茶的质量和功效^[10],其“发花”可促进茯砖茶的品质^[11]。提示冠突散囊菌可能产生具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用的有效物质。

课题组前期从冠突散囊菌培养液中分离得到一系列的苯甲醛类衍生物,通过体外巨噬细胞炎症模型筛选发现化合物2-(2',3'-epoxy-1',3',5'-heptatrienyl)-6-hydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl)benzaldehyde(简称2-6-H-5-B)具有较好的抗炎活性^[12]。为深入研究该化合物的抗炎活性及其作用机制,本研究采用LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞体外炎症模型,系统研究化合物2-6-H-5-B的抗炎活性,并对其抗炎机制进行初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞

RAW264.7小鼠单核巨噬细胞株,购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 试剂

化合物2-6-H-5-B由中南大学湘雅国际转化医学联合研究院黄勇教授课题组提供(化学结构见图1)。LPS(货号:L2880)、地塞米松(货号:D1756)均购自美国Sigma公司;RIPA Buffer 10X(货号:9806S)、anti-iNOS(货号:2982)、anti-p65(货号:

8242)、anti-p-P65(货号:3033)、anti-I κ B α (货号:4812)、anti-P38 MAPK(货号:8690)、anti-phospho-P38 MAPK(货号:4511)、anti-ERK(货号:4695)、anti-p-ERK(货号:4370)、anti-JNK(货号:9252)、anti-p-JNK(货号:4668)、anti-AMPK α (货号:5831)、anti-p-AMPK α 1(货号:2537)、anti- β -actin(货号:3700)抗体均购自美国CST公司;DMEM细胞培养基(货号:12800-017)、胎牛血清(FBS,货号:10270-106)均购自美国Gibco公司。MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(货号:C0009)、一氧化氮检测试剂盒(货号:S0021S)均购自上海碧云天生物技术有限公司;ELISA试剂盒MCP-1/CCL2(货号:88-7391-76)、TNF- α (货号:88-7324-76)、IL-6(货号:88-7064-76)均购自Ebioscience公司。

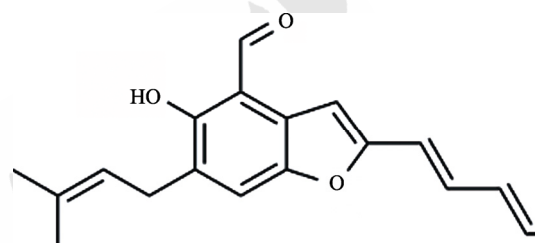


图1 化合物2-6-H-5-B的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of compound 2-6-H-5-B

1.3 仪器

FORMA STERI-CYCLE i160 CO₂细胞恒温培养箱(美国Thermo公司);ECLIPSE Ti2-U倒置荧光显微镜、5424 R低温高速离心机均购自德国Eppendorf公司;PowerPac Basic垂直式电泳仪、2800凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad公司;TriStar S LB 942多功能酶标仪(德国Berthold Technologies公司);UPW-N2-15UV MilliPore Advantage A10自动纯水机(美国MilliPore公司)。

1.4 细胞培养与传代

RAW264.7细胞被接种在含有10% FBS的DMEM培养基中,细胞被放置在含有5% CO₂的37℃恒温细胞培养箱中培养,显微镜下观察待细胞生长至75%~90%时即进行传代或试验。当RAW264.7细胞传至第30代时将被弃用。

1.5 受试化合物的配制

化合物2-6-H-5-B采用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解,母液浓度为100 mmol·L⁻¹,试验时采用DMEM完全培养基稀释成相应测试浓度(DMSO浓度均≤0.1%);阳性对照药物地塞米松

采用灭菌去离子水配制成 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液浓度保存备用, 试验时采用 DMEM 完全培养基稀释成相应测试浓度(DMSO 浓度为 0.025%)。测试时, 对照组和模型组加入同体积不含测试化合物的完全培养基。

1.6 MTT 法检测细胞活力

将 RAW264.7 细胞制备成细胞悬液, 以 $1.4\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL 。孵育 24 h 后, 分别给予 0(对照组), 0(模型组), 25, 50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 2-6-H-5-B(每组平行 4 个复孔)预处理 1 h 后, 除对照组外给予 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 刺激诱导 24 h。随后每孔分别加入 10 μL MTT(终浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h。小心移除上清液, 随后每孔加入 100 μL DMSO 溶液, 摇床避光溶解后用酶标仪检测各孔在 570 nm 处的吸光度值。将对照组的细胞活力设置为 100%, 分别计算出各组细胞的相对活力。

1.7 Griess 试剂法检测细胞上清液中 NO 的水平

将 RAW264.7 细胞制备成细胞悬液, 以 $2.0\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 12 孔板中, 每孔 1 mL。孵育 24 h 后, 给予 0(对照组), 0(模型组), 25, 50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的化合物 2-6-H-5-B、地塞米松 $0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理 1 h 后, 除对照组外给予 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 刺激诱导 24 h。收集各组细胞上清液分别加入 96 孔板中, 每孔 50 μL 。随后分别加入 50 μL Griess Reagent I 孵育 10 min 和 50 μL Griess Reagent II 避光孵育 10 min 后, 酶标仪检测各孔在 570 nm 处吸光度值。根据标准曲线计算出各孔 NO 的浓度。独立重复试验 3 次后, 做统计学分析。

1.8 ELISA 法检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的水平

细胞接种和药物处理方法同“1.7”项。LPS 刺激诱导 24 h 后收集各孔细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书分别检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的表达水平。

1.9 Western blotting 检测蛋白表达水平

细胞接种和药物处理方法同“1.7”项。LPS 刺激诱导后提取各孔细胞总蛋白, 取等量蛋白 30 μg 在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下煮沸 3 min 后, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白质分开, 并湿转至 PVDF 膜, 加入含有 5% 脱脂奶粉的封闭液中封闭 1 h。再加入一抗抗体 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每

次 5 min; 加入二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。采用 Odyssey v3.0 软件(美国 LI-COR 公司)获取图像, 并进行光密度积分值分析, 计算磷酸化目的蛋白与其相应总蛋白或内参照 β -actin 蛋白表达量的光密度积分值之比, 作为目的蛋白表达量的相对含量值。

1.10 统计学分析

实验所得数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据资料由统计软件包(SPSS 17.0)进行单因素方差分析(事后组间多重比较采用 LSD- t 检验), $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 化合物 2-6-H-5-B 对 RAW264.7 细胞活力的影响

LPS 单独刺激未显著影响 RAW264.7 巨噬细胞活力。化合物 2-6-H-5-B 浓度在 25~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时也未显著降低 RAW264.7 巨噬细胞活力, 表明此浓度范围的化合物 2-6-H-5-B 不会影响巨噬细胞的正常生理功能。故选择 25, 50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 这 3 个浓度开展后续抗炎活性及其作用机理研究。结果见图 2。

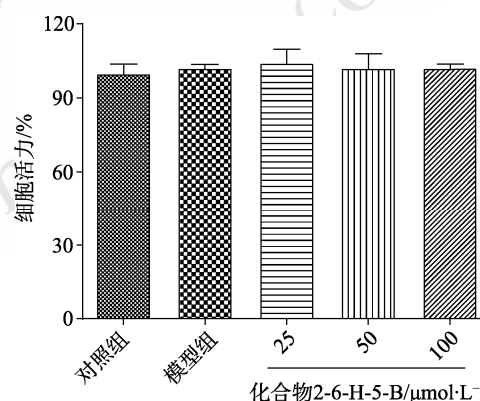


图 2 化合物 2-6-H-5-B 对 RAW264.7 巨噬细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effects of compound 2-6-H-5-B on viability RAW264.7 macrophages($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.2 化合物 2-6-H-5-B 对 LPS 刺激活化的 RAW264.7 巨噬细胞 NO 生成和 iNOS 表达的影响

NO 是炎症反应时的一个重要的炎症介质。首先检测化合物 2-6-H-5-B 对 LPS 刺激活化的 RAW264.7 巨噬细胞 NO 释放的影响。结果见图 3A, LPS 刺激活化 RAW264.7 巨噬细胞后, 亚硝酸盐(NO 的稳定氧化产物)水平显著增加($P<0.01$), 表明 LPS 可诱导 RAW264.7 巨噬细胞活化产生

NO, 进而参与炎症反应。化合物 2-6-H-5-B 干预可呈剂量依赖性地抑制 NO 的释放($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 初步提示其有较好的抗炎活性。阳性对照药物地塞米松也显著性抑制 NO 的生成($P<0.01$), 提示化合物测试结果可信。

iNOS 是诱导合成 NO 的限速酶。为阐明化合物 2-6-H-5-B 抑制 NO 的释放是否与抑制 iNOS 的表达有关。本研究进一步分析了其对 LPS 刺激活化的 RAW264.7 巨噬细胞 iNOS 蛋白表达的影响。在 LPS 刺激下, iNOS 的蛋白水平被显著上调($P<0.01$)(图 3B), 提示巨噬细胞被 LPS 成功活化, 同时诱导生成的 iNOS 则可以进一步促进 NO 的合成和释放。化合物 2-6-H-5-B 可剂量依赖性地抑制 iNOS 的蛋白表达($P<0.05$), 提示在 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型中, 化合物 2-6-H-5-B 通过下调 iNOS 的表达来抑制 NO 的释放。

2.3 化合物 2-6-H-5-B 对 LPS 刺激活化的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 释放的影响

巨噬细胞在炎症反应中的作用主要是通过活化后释放各种前促炎症性细胞因子和趋化因子, 如 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 等。故进一步观察了化合物 2-6-H-5-B 对 LPS 刺激活化的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 释放的影响。LPS 刺激 RAW264.7 细胞后 24 h, TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的蛋白释放水平均被显著上调($P<0.01$), 结果见图 4。化合物 2-6-H-5-B 可剂量依赖性地下调 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的表达水平($P<0.01$)。结果提示, 在炎症反应发生和持续的病理情况下, 化合物 2-6-H-5-B 可抑制活化的巨噬细胞释放前炎症性细胞因子和趋化因子, 而这种抑制作用是抗炎药物必须具备的。阳性药物地塞米松也能显著抑制 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的释放($P<0.01$)。

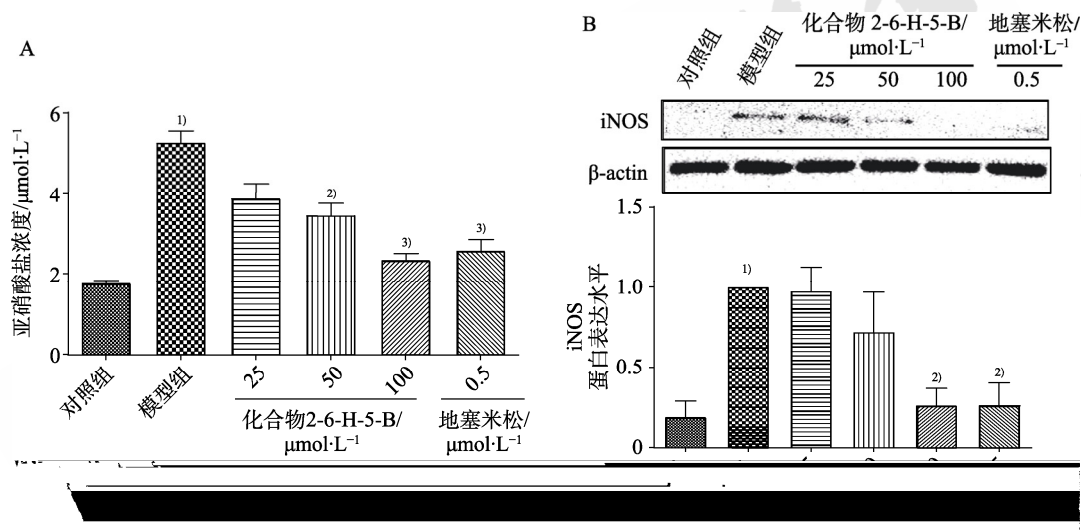


图 3 化合物 2-6-H-5-B 对 LPS 刺激活化的 RAW264.7 巨噬细胞 NO 生成(A)和 iNOS 蛋白表达(B)的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$) 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of compound 2-6-H-5-B on the NO production(A) and iNOS protein expression(B) in LPS-activated RAW264.7 macrophages($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

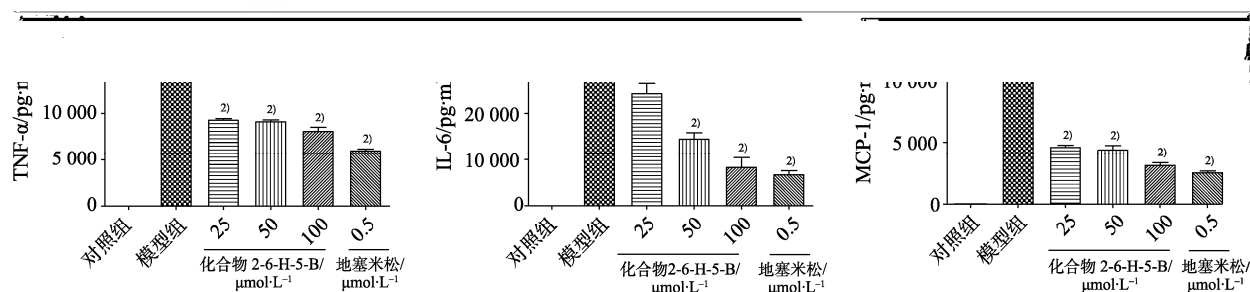


图 4 化合物 2-6-H-5-B 对 LPS 刺激活化的 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 释放的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$) 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effects of compound 2-6-H-5-B on the TNF- α , IL-6 and MCP-1 release in LPS-activated RAW264.7 macrophages($\bar{x} \pm s$, $n=3$) Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$.

2.4 化合物 2-6-H-5-B 对 LPS 刺激活化的 RAW264.7 巨噬细胞 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的影响

为了探究化合物 2-6-H-5-B 的抗炎作用机理,检测了其 2 条经典炎症信号通路 NF- κ B 和 MAPK 的影响。研究表明,化合物 2-6-H-5-B 未能阻止 LPS 诱导的 P65 的磷酸化和 I κ B α 的降解,表明化合物 2-6-H-5-B 不能阻止核转录因子 NF- κ B 的核内转移及其转录活性。对 MAPK 信号通路的影响研究也被观察到为阴性结果,结果见图 5。综上表明,化合物 2-6-H-5-B 抗炎活性的产生与 NF- κ B 和 MAPK 2 条经典炎症信号通路无关。

2.5 化合物 2-6-H-5-B 对 RAW264.7 巨噬细胞 AMPK 信号通路的影响

研究发现 AMPK 信号通路的激活剂能显著抑制前促炎症性细胞因子的生成^[13],故进一步探讨了化合物 2-6-H-5-B 对 AMPK 信号通路的影响。结果显示,随着时间的延长,化合物 2-6-H-5-B 对磷酸化 AMPK 蛋白表达水平增加越来越明显,表明化合物 2-6-H-5-B 可诱导 AMPK 通路的活化。随后的浓度诱导试验发现,化合物 2-6-H-5-B 可呈浓度依赖关系增加磷酸化 AMPK 的蛋白表达($P<0.05$),而单独的 LPS 刺激未能显著诱导 AMPK 通路的活化,结果见图 6。结果初步表明,诱导 AMPK 通路活化是化合物 2-6-H-5-B 发挥抗炎作用的重要药理机制。

3 讨论

临床上许多与免疫相关的疾病通常会伴有慢性炎症反应,如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、

IgA 肾病等。炎症和免疫也往往同时存在于上述疾病中,而当前临床上用于治疗与炎症和免疫相关的药物也主要通过抑制炎症反应来实现减缓疾病症状和延缓疾病进程^[14]。糖皮质激素具有强大的抗炎作用,且其抗炎作用具有非特异性的特点,故在临床上被广泛用于多种炎症免疫性相关疾病的治疗^[15],因此本实验中选用地塞米松作为阳性对照药物。近年来,生物制剂如 IL-6 抑制剂已在临床中被用于类风湿关节炎治疗且取得较好疗效^[16]。提示抑制炎症反应是治疗炎症免疫性相关疾病的重要方法之一。巨噬细胞在多种炎症免疫性相关疾病的病理中发挥关键作用。许多研究表明,巨噬细胞可被诱导迁移,当其到达局部炎症反应部位时可被多种可溶性刺激因子如 LPS、TNF- α 、IL-1 β 等诱导活化释放各种前促炎症性细胞因子和趋化因子等,进而诱导更多炎症免疫细胞的浸润,维持和放大炎症反应^[17]。故抑制巨噬细胞的活化和前促炎症性细胞因子和趋化因子的释放是减轻炎症反应的重要方法。研究结果发现,化合物 2-6-H-5-B 呈浓度依赖性抑制 LPS 诱导活化巨噬细胞中前促炎症性细胞因子 TNF- α 和 IL-6、炎症介质 NO 和 iNOS 及趋化因子 MCP-1 的表达和释放,其高浓度的抑制作用与阳性对照药物地塞米松相当,提示化合物 2-6-H-5-B 具有较强的抗炎活性,值得对其进一步研究和开发。

LPS 等可溶性刺激因子可作为巨噬细胞膜表面受体(如 Toll 样受体)的配体刺激诱导巨噬细胞内多条炎症信号通路的活化包括 NF- κ B 和

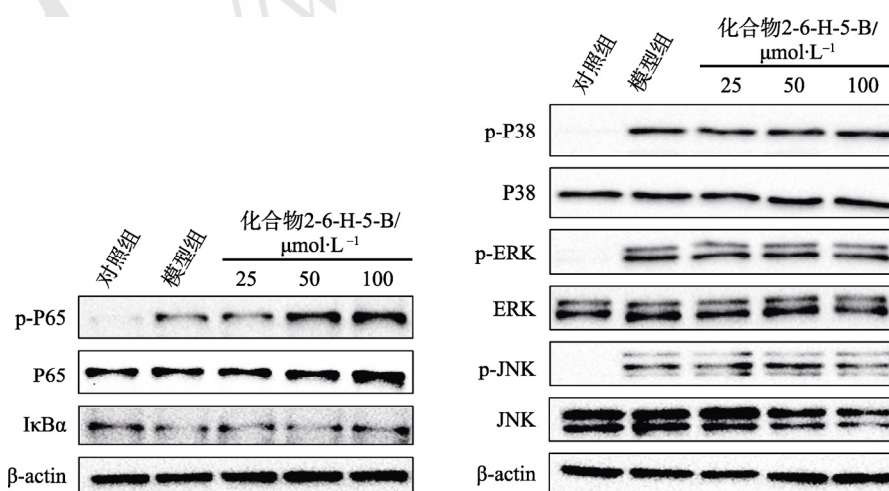


图 5 化合物 2-6-H-5-B 对 LPS 刺激活化的 RAW264.7 巨噬细胞 NF- κ B 和 MAPK 信号通路活化的影响

Fig. 5 Effects of compound 2-6-H-5-B on the NF- κ B and MAPK signaling pathways activation in LPS-activated RAW264.7 macrophages

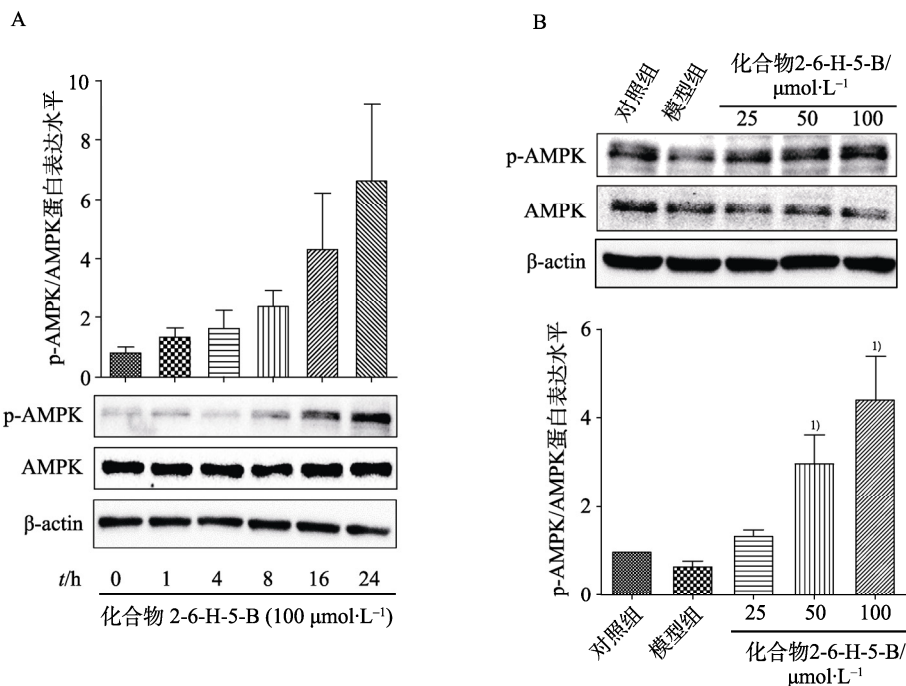


图6 化合物 2-6-H-5-B 对 RAW264.7 巨噬细胞 AMPK 信号通路活化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) 与对照组比较, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 6 Effects of compound 2-6-H-5-B on the AMPK signaling pathway activation in RAW264.7 macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) Compared with the control group, $^{1)}P<0.05$.

MAPK 信号通路等^[4]。但研究结果显示, 化合物 2-6-H-5-B 并未能显著抑制这 2 条经典炎症信号通路的活化, 提示化合物 2-6-H-5-B 抗炎活性的产生与 NF- κ B 和 MAPK 2 条经典炎症信号通路无关, 其可能具有较独特的抗炎机理。AMPK 由 α 、 β 、 γ 3 个亚基构成, 其在维持机体能量平衡、抑制炎症反应、维持氧化还原平衡、生长发育与衰老等方面均有重要意义^[18]。有研究表明, AMPK 的激活剂能显著抑制活化巨噬细胞中前促炎症性细胞因子 TNF- α 和炎症介质 iNOS 的表达^[13], 提示诱导 AMPK 通路活化可抑制炎症反应。本实验研究结果发现化合物 2-6-H-5-B 呈时间和剂量依赖性增加了 AMPK 磷酸化蛋白的表达, 表明化合物 2-6-H-5-B 可能是 AMPK 通路的激活剂, 其抗炎活性可能与激活 AMPK 通路有关。

本实验首次证实了来自冠突散囊菌培养中苯甲醛衍生物 2-6-H-5-B 具有很强的抗炎活性, 研究结果也间接地表明茯砖茶经发酵后可能具有较好的抗炎和抗氧化作用, 同时冠突散囊菌也可影响茯砖茶的质量和功效。提示微生物来源的天然产物拥有较独特的抗炎作用机理, 值得对其进行进一步研究和开发。

REFERENCES

- [1] JENTZER J C, LAWLER P R, VAN DIEPEN S, et al. Systemic inflammatory response syndrome is associated with increased mortality across the spectrum of shock severity in cardiac intensive care patients[J]. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2020, 13(12): e006956.
- [2] KÖHLER, GÜNTHER, KAUDEWITZ, et al. Current therapeutic options in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. J Clin Med, 2019, 8(7): 938.
- [3] PENFOLD R S, PRENDECKI M, MCADOO S, et al. Primary IgA nephropathy: Current challenges and future prospects[J]. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2018(11): 137-148.
- [4] LIU J X, TANG J S, ZUO Y H, et al. Stauntonoside B inhibits macrophage activation by inhibiting NF- κ B and ERK MAPK signalling[J]. Pharmacol Res, 2016(111): 303-315.
- [5] PENG X Y, ZHANG W M, LIU S Y, et al. Isolation and identification of "golden-flower" fungus in fuzhuan tea from Hunan area[J]. J Fungal Res(菌物研究), 2011, 9(3): 157-161.
- [6] NAMAL SENANAYAKE S P J. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications-A review[J]. J Funct Foods, 2013, 5(4): 1529-1541.
- [7] 夏莉, 刘石泉, 周文燕. 茯砖茶中黄酮类化合物提取方法优化研究[J]. 化工管理, 2018(35): 81-83.
- [8] ZENG Q, ZHANG H L, XIA F, et al. Effects of Fu brick tea extract on the antioxidant and lifespan of Caenorhabditis elegans[J]. J Shaanxi Univ Sci Technol(陕西科技大学学报), 2019, 37(5): 58-62.

- [9] ZHANG L C, CHEN J Z, PENG X Y, et al. Study on acetylated modification of Fuzhuan Tea polysaccharides and its hypoglycemic activity[J]. Guangdong Chem Ind(广东化工), 2020, 47(10): 22-23.
- [10] HUANGFU R J. Separation and Screening of *Eurotium cristatum* from Fuzhuan Tea[J]. Shengwu Huagong(生物化工), 2019, 5(6): 31-32, 44.
- [11] WANG Y L, QIN J Z, HUANG Y Y, et al. Effect of the quality of Fuzhuan brick tea fermented in *Eurotium cristatum*[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2018, 44(4): 194-197.
- [12] SHI J, LIU J X, KANG D D, et al. Isolation and characterization of benzaldehyde derivatives with anti-inflammatory activities from *Eurotium cristatum*, the dominant fungi species in fuzhuan brick tea[J]. ACS Omega, 2019, 4(4): 6630-6636.
- [13] PEAIRS A, RADJAVI A, DAVIS S, et al. Activation of AMPK inhibits inflammation in MRL/lpr mouse mesangial cells[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(3): 542-551.
- [14] GUO Q, WANG Y, XU D, et al. Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies[J]. Bone Res, 2018(6): 15.
- [15] RONCHETTI S, MIGLIORATI G, BRUSCOLI S, et al. Defining the role of glucocorticoids in inflammation[J]. Clin Sci (Lond), 2018, 132(14): 1529-1543.
- [16] ZHAO J Y, NING H, YANG Y Y, et al. Meta-analysis of efficacy and safety of interleukin-6 inhibitor sirukumab for treatment of rheumatoid arthritis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(1): 60-68.
- [17] MA W T, GAO F, GU K, et al. The role of monocytes and macrophages in autoimmune diseases: A comprehensive review[J]. Front Immunol, 2019(10): 1140.
- [18] PENG X W, ZHOU H H, DAI J, et al. Advances on the anti-inflammatory and protective effect of AMPK activators[J]. Acta Physiol Sin(生理学报), 2019, 71(2): 319-326.

收稿日期: 2021-04-20

(本文责编: 陈怡心)