

栝楼不同部位对卷烟烟气总粒相物诱导人支气管上皮细胞增殖及炎症因子表达的影响

欧阳璐斯¹, 夏婷^{2,3}, 陶红¹, 黄菲¹, 潘晓薇¹, 邢学锋^{2,3}, 胡艳楠^{2,3}, 巫园园^{2,3}(1. 广东中烟工业有限责任公司技术中心, 广东 广州 510385; 2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 3. 广东省中药制剂重点实验室, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 研究栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉)对卷烟烟气总粒相物(Total particulate matter, TPM)诱导的人支气管上皮细胞(BEAS-2B)增殖以及白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达的影响。方法 采用 TPM 诱导 BEAS-2B 建立细胞损伤模型。实验分为空白对照组、模型组($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TPM)、红霉素组(阳性对照, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TPM+ $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 红霉素)及瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉不同浓度给药组[$10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TPM+400、800、1 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 瓜蒌皮/瓜蒌子/天花粉(正丁醇提取物)]。药物作用 24 h 后, 采用 MTT 法检测细胞增殖情况; 采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 的表达; 采用 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的含量。结果 与空白对照组比较, 模型组的 BEAS-2B 细胞增殖受到明显抑制($P<0.01$), 细胞上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 含量明显升高($P<0.01$), 细胞 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达明显上调($P<0.01$)。与模型组比较, 不同浓度组的瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉均可以促进 BEAS-2B 细胞的增殖($P<0.05$, $P<0.01$); 400、800、1 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 瓜蒌皮组的细胞上清液中的 IL-6、TNF- α 含量及 mRNA 表达明显下调($P<0.01$), 800、1 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 瓜蒌皮组的细胞上清液中的 IL-8 含量及 mRNA 表达明显下调($P<0.01$); 400、800、1 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 瓜蒌子组的细胞上清液中的 IL-8、TNF- α 含量及 mRNA 表达明显下调($P<0.01$); 400、800、1 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 天花粉组的细胞上清液中的 IL-6、TNF- α 含量及 mRNA 表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子和天花粉)正丁醇提取物可能通过促进 BEAS-2B 细胞增殖, 抑制 TNF- α 、IL-6、IL-8 等炎症因子表达, 从而发挥其抗炎作用。

关键词: 栝楼; 瓜蒌皮; 瓜蒌子; 天花粉; 正丁醇提取物; 烟气总粒相物; 人支气管上皮细胞; 细胞增殖; 炎症因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)02-0219-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.02.010

The Effects of Different Parts of *Trichosanthes kirilowii* Maxim on Proliferation and Inflammatory Factor Expression of Human Bronchial Epithelial Cells Induced by Total Particulate Matter from Cigarette Smoke

OUYANG Lusi¹, XIA Ting^{2,3}, TAO Hong¹, HUANG Fei¹, PAN Xiaowei¹, XING Xuefeng^{2,3}, HU Yannan^{2,3}, WU Yuanyuan^{2,3} (1. Technology Center, China Tobacco Guangdong Industrial Co., Ltd., Guangzhou 510385 Guangdong, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515 Guangdong, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmaceuticals, Guangzhou 510515 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different parts of *Trichosanthes kirilowii* Maxim (Trichosanthis pericarpium, Trichosanthis semen, and Trichosanthis radix) on cell proliferation and inflammatory factors (IL-6,

收稿日期: 2020-04-03

作者简介: 欧阳璐斯, 女, 工程师, 研究方向: 烟草生物化学基础研究。Email: ouyangls@gdzygy.com。通信作者: 邢学锋, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 中药新药及药效物质基础研究。Email: xxf@smu.edu.cn。

基金项目: 广东中烟工业有限责任公司资助项目(粤烟工[2017]科字第 24 号)。

IL-8, TNF- α) expression of human bronchial epithelial cells(BEAS-2B) induced by total particulate matter(TPM) from cigarette smoke. **Methods** TPM induced BEAS-2B cell inflammatory injury model was established and cells were divided into several groups, including blank control group, model group($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TPM) and Chinese herbal medicine(*n*-butanol extracts of *Trichosanthis pericarpium*, *Trichosanthis semen* and *Trichosanthis radix*) treated groups($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TPM + 400, 800, 1 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), positive control group($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TPM + 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Erythromycin, ERY). After 24 h of culture, the drugs were administered for 24 h. MTT method was used to detect cell proliferation. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of IL-6, IL-8, and TNF- α mRNA. ELISA was used to detect the protein contents of IL-6, IL-8 and TNF- α in cell supernatants. **Results** Compared with the blank control group, the cell proliferation of the model group was inhibited significantly ($P < 0.01$), the expression of IL-6, IL-8 and TNF- α mRNA in supernatant of BEAS-2B cells increased significantly ($P < 0.01$), and the contents of IL-6, IL-8 and TNF- α protein in the supernatant of cells were increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, *Trichosanthis pericarpium*, *Trichosanthis semen* and *Trichosanthis radix* can promote the proliferation of BEAS-2B cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$) at different concentrations. *Trichosanthis pericarpium* at the doses of 400, 800 and 1 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ reduced the of IL-6, TNF- α mRNA expression and the protein contents in cell supernatants ($P < 0.01$). The mRNA levels and protein contents of IL-8 in supernatant of cells of *Trichosanthis pericarpium* 800 and 1 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ groups reduced significantly ($P < 0.01$). *Trichosanthis semen* 400, 800 and 1 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ reduced the IL-8, TNF- α mRNA expression and the protein contents of cell supernatants ($P < 0.01$). *Trichosanthis radix* 400, 800 and 1 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ reduced the IL-6, TNF- α mRNA expression and the protein contents of cell supernatants ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The *n*-butanol extracts of different parts of *Trichosanthes kirilowii* Maxim (*Trichosanthis pericarpium*, *Trichosanthis semen* and *Trichosanthis radix*) can promote the proliferation of BEAS-2B cells, and inhibit the expression of TNF- α , IL-6, IL-8 inflammatory factors' mRNA and protein, to exert the anti-inflammatory effect.

Keywords: *Trichosanthes kirilowii* Maxim; *Trichosanthis pericarpium*; *Trichosanthis semen*; *Trichosanthis radix*; *n*-butyl alcohol extract; total particulate matter of cigarette smoke; human bronchial epithelial cells; cell proliferation; inflammatory factors

研究证实,吸烟能诱发周围气道和肺泡的炎症反应^[1-3],卷烟烟气刺激呼吸道可引起机体活性氧增加,打破细胞内氧化和抗氧化平衡,导致支气管上皮细胞白细胞介素6(IL-6)和白细胞介素8(IL-8)以及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等炎症因子升高^[4-5],进一步诱发炎症反应。卷烟烟气包含大于4 000种化学物质,具有多种氧化性化学成分^[6]。卷烟主流烟气是由气态、蒸气态和固态物质组成的复杂气溶胶,在室温下能通过剑桥滤片(一种玻璃纤维制成的滤片,它能滤除99.5%以上直径大于0.3 μm 的微粒)的烟气部分称为气相物质,而卷烟烟气总粒相物(Total particulate matter, TPM)是被阻留及沉积于捕集器中玻璃纤维滤膜片内表面的主流烟气组分,主要包括焦油、生物碱、水分等^[7]。

葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 或双边栝楼 *Trichosanthes rosthornii* Harms 的成熟干燥果

皮、种子和根分别称为瓜蒌皮、瓜蒌子和天花粉^[8-9]。据报道^[10-13],栝楼不同部位对咳嗽等呼吸系统疾病均有治疗作用。目前关于栝楼对吸烟引起的支气管上皮细胞TNF- α 、IL-6和IL-8等炎症因子的影响尚未见报道。故本研究拟利用TPM诱导人支气管上皮细胞(BEAS-2B)建立细胞损伤模型^[14-15],探讨栝楼不同部位对TPM诱导BEAS-2B细胞增殖及TNF- α 、IL-6、IL-8等炎症因子表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞 人支气管上皮细胞(BEAS-2B),购自美国ATCC细胞库,批号:JNO-20685。

1.2 药物及主要试剂 瓜蒌皮(对照药材,批号:M27J7E9592)、瓜蒌子(对照药材,批号:Z13M6N1)、天花粉(对照药材,批号:C27N8Y49022),均购自上海源叶生物科技有限公司。参

比卷烟 3R4F, 美国肯塔基大学提供; DMEM 培养液(批号: 1924306)、胰蛋白酶(批号: 2152925)、胎牛血清(批号: 1932594C)、磷酸盐缓冲液(PBS, 批号: AC10237760), 均购自美国 Gibco 公司; 硫酸庆大霉素(批号: SLCB4223)、红霉素(批号: E6376)、MTT(噻唑蓝, 批号: M2118), 均购自美国 Sigma 公司; 人 IL-6 ELISA 试剂盒(批号: 0105180750); 人 TNF- α ELISA 试剂盒(批号: 0802190196); 人 IL-8 ELISA 试剂盒(批号: 1229170115), 均购自美国 RayBiotech 公司; Trizol(批号: 157812), 美国 Invitrogen 公司; 无氯仿 RNA 快速抽提试剂盒(批号: B030003018), 美国 Bioteke 公司; Prime Script RT reagent Kit 试剂盒(批号: AJ10935A)、SYBR Premix EX Taq™ II real time PCR 试剂盒(批号: AJ60432A), 均购自日本 Takara 公司。

1.3 仪器 CB210 型 CO₂ 细胞培养箱, 德国宾得公司; IX71 型生物光学显微镜, 日本 OLIMPUS 公司; IMark680 型酶标仪, 美国 BIO-RAD 公司; 3-18K 型低温超速离心机, 德国 Sigma 公司; AB 7500 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司。

1.4 卷烟主流烟气总粒相物(TPM)采集 按照 ISO 标准^[16]规定的抽吸模式, 使用转盘吸烟机, 每轮抽吸 20 支 3R4F 卷烟。抽吸模式为: 频率 60 s, 持续时间 2 s, 抽吸容量 35 mL。将捕集有 TPM 的剑桥滤片放入馒头瓶中, 加入二甲基亚砜, 振荡 30 min; 收集萃取液, 制备浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的 TPM 提取物, 在 30 min 内用于实验。

1.5 TPM 溶液及药物配制 采用含 10% 胎牛血清及 100 U·mL⁻¹ 硫酸庆大霉素的 DMEM 培养液。以“1.4”项下 TPM 提取物为母液, 用上述培养液稀释成 10 μ g·mL⁻¹ 浓度的 TPM 溶液^[17]。

取瓜蒌皮 10 g、瓜蒌子 10 g、天花粉 10 g, 分别加入 8 倍量的 70% 乙醇, 回流提取 2、1.5 h; 减压浓缩后挥至无醇味, 分别用正丁醇萃取, 减压浓缩干燥后得正丁醇提取物。然后, 采用上述培养液配制成 10 mg·mL⁻¹ 的母液, 再用其分别稀释成 400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 给药浓度。

1.6 细胞培养及分组 取 BEAS-2B 细胞接种于“1.5”项下培养基, 放入细胞培养箱中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 2~3 d 更换培养液 1 次; 待细胞融合度达到 80% 时即可传代, 取对数生长期细胞进行相关实验。将培养的 BEAS-2B 细胞分为 12 组: 空白对照组、模型组(10 μ g·mL⁻¹ TPM)、红霉素组

(阳性对照, 10 μ g·mL⁻¹ TPM + 5 μ g·mL⁻¹ 红霉素)及瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉不同浓度给药组[10 μ g·mL⁻¹ TPM+400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 瓜蒌皮/瓜蒌子/天花粉(正丁醇提取物)]。

1.7 MTT 法检测 BEAS-2B 细胞增殖情况 取对数生长期 BEAS-2B 细胞, 按 1.6×10⁵·mL⁻¹ 的密度接种于 96 孔板中, 每孔加入 200 μ L 细胞悬液; 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 当细胞生长达 70%~80% 融合度时, 按“1.6”项下进行分组实验。24 h 后给药处理, 加药孵育 24 h 后^[18-19], 每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg·mL⁻¹), 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 4 h; 弃上清, 每孔加入 150 μ L DMSO 溶液, 于 490 nm 波长处检测光密度(OD)值。

1.8 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6、IL-8、TNF- α 的含量 取对数生长期 BEAS-2B 细胞, 按 1×10⁵·mL⁻¹ 的密度接种于 6 孔板中, 每孔加入 1 mL 细胞悬液; 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 当细胞生长达 70%~80% 融合度时, 按“1.6”项下进行分组实验。24 h 后给药处理, 加药孵育 24 h 后, 每孔加入试剂盒中的稀释液 50 μ L, 吸取细胞培养基上清液或标准对照液各 50 μ L, 采用 ELISA 试剂盒进行炎症因子 IL-6、IL-8、TNF- α 的含量测定, 严格按照试剂盒说明书步骤操作。采用酶标仪于 450 nm 波长处测量 OD 值(A); 以标准品的浓度作为横坐标, A 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 再根据标准曲线计算各样品浓度。

1.9 RT-qPCR 法检测 BEAS-2B 细胞的 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达 细胞分组、培养及药物干预同“1.8”项下进行。加药孵育 24 h 后, 弃去各组细胞培养液, 用 PBS 清洗 2 次; 每孔加 Trizol 试剂 1 mL 裂解细胞, 按无氯仿 RNA 快速抽提试剂盒说明书步骤操作, 得总 mRNA 样品。于波长 260 nm/280 nm 处检测光密度值, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.1 之间。按 Prime Script RT reagent Kit 试剂盒说明书步骤进行逆转录反应, 反应条件为 37 °C 水浴 15 min, 85 °C 水浴 30 s; 反应结束后, 分装保存于 -20 °C。然后根据 NCBI 基因库中查询得到的基因 mRNA 序列, 利用 Primer Premier 5.1 软件设计 PCR 引物, 见表 1。通过 NCBI 在线 BLAST 检测特异性, 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 内参照选择 GAPDH。按 SYBR Premix EX Taq™ II real time PCR 试剂盒说明书步骤进行实验, 反应体系为 25 μ L。qPCR 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; 随后 95 °C 变性

30 s; 60 ℃退火 30 s; 反应 40 个循环。扩增反应后进行熔解曲线分析, 判断产物是否有非特异性扩增, 分析扩增曲线, 计算 Ct 值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组间 mRNA 表达水平差异, 模型组基因表达量设为 100。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 qPCR primer sequences and annealing temperature

引物名称	引物序列	退火温度/℃
TNF- α	Forward primer: 5'-TTT GAT CCC TGA CAT GA-3'	60
	Reverse primer: 5'-GGC CTA AGG TCC ACT TGT GT-3'	
IL-6	Forward primer: 5'-CCA CAC AGA CAG CCA CTC AC-3'	60
	Reverse primer: 5'-AGG TTG TTT TCT GCC AGT GC-3'	
IL-8	Forward primer: 5'-AGG ACA AGA GCC AGG AAG AA-3'	60
	Reverse primer: 5'-ACT GCA CCT TCA CAC AGA GC-3'	
GAPDH	Forward primer: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT-3'	60
	Reverse primer: 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'	

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 栝楼不同部位对 TPM 诱导的 BEAS-2B 细胞增殖的影响 结果见表 2。与空白对照组比较, 模型组的细胞活力明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 表明 TPM 能明显抑制 BEAS-2B 细胞增殖。与模型组比较, 分别给予 400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉)干预后, BEAS-2B 的细胞活力明显增强, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, 栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉)正丁醇提取物能够提高 TPM 诱导的 BEAS-2B 细胞活力。

2.2 栝楼不同部位对 TPM 诱导的 BEAS-2B 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6、IL-8 含量的影响 结果见图 1。与空白对照组比较, 模型组 BEAS-2B 细胞上清液中的 IL-6、IL-8、TNF- α 含量均明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。表明 TPM 诱导 BEAS-2B 细胞能够促进炎症因子 IL-6、IL-8、TNF- α 的表达。

与模型组比较, 400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 瓜蒌皮组的细胞上清液中的 IL-6、TNF- α 含量明显下降($P < 0.01$), 800、1 200 ng·mL⁻¹ 瓜蒌皮组的细胞上清液中的 IL-8 含量明显下降($P < 0.01$); 400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 瓜蒌子组的细胞上清液中的 IL-8、TNF- α

表 2 栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉)对卷烟主流烟气总粒相物(TPM)诱导的 BEAS-2B 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effects of different parts of *Trichosanthes kirilowii* Maxim (Trichosanthis pericarpium, Trichosanthis semen and Trichosanthis radix) on TPM induced proliferation of BEAS-2B cells($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

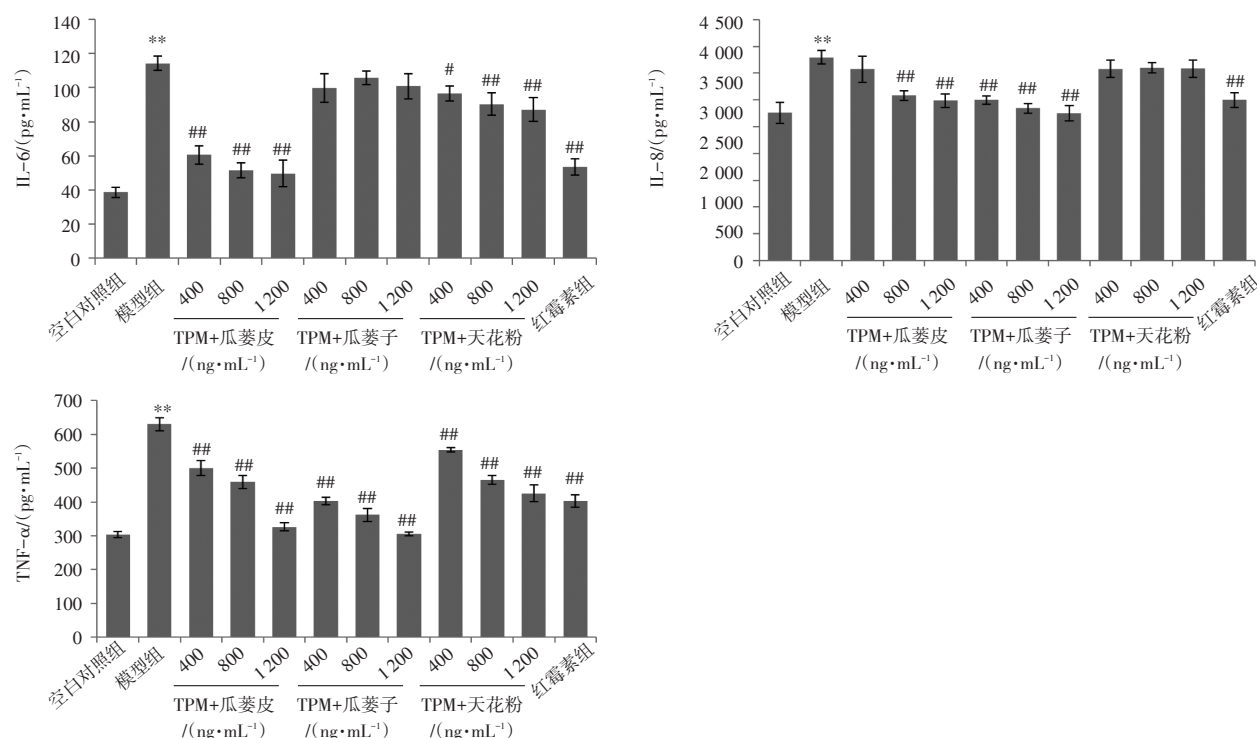
组别	细胞 OD 值
空白对照组	0.976 $\pm$ 0.011
模型组	0.785 $\pm$ 0.008**
TPM+瓜蒌皮 400 ng·mL ⁻¹ 组	0.822 $\pm$ 0.009**
TPM+瓜蒌皮 800 ng·mL ⁻¹ 组	0.817 $\pm$ 0.009**
TPM+瓜蒌皮 1 200 ng·mL ⁻¹ 组	0.805 $\pm$ 0.018*
TPM+瓜蒌子 400 ng·mL ⁻¹ 组	0.817 $\pm$ 0.011**
TPM+瓜蒌子 800 ng·mL ⁻¹ 组	0.813 $\pm$ 0.010**
TPM+瓜蒌子 1 200 ng·mL ⁻¹ 组	0.810 $\pm$ 0.007**
TPM+天花粉 400 ng·mL ⁻¹ 组	0.818 $\pm$ 0.010**
TPM+天花粉 800 ng·mL ⁻¹ 组	0.807 $\pm$ 0.008**
TPM+天花粉 1 200 ng·mL ⁻¹ 组	0.801 $\pm$ 0.009**
红霉素组	0.800 $\pm$ 0.010**

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

含量明显下降($P < 0.01$); 400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 天花粉组的细胞上清液中的 IL-6、TNF- α 含量明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。综合来看, 不同剂量的瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉干预对 TPM 诱导的 BEAS-2B 细胞上清液中的 IL-6、IL-8、TNF- α 含量均有降低作用, 且呈一定的剂量依赖性。

2.3 栝楼不同部位对 TPM 诱导的 BEAS-2B 细胞 TNF- α 、IL-6、IL-8 mRNA 表达的影响 结果见图 2。与空白对照组比较, 模型组 BEAS-2B 细胞的炎症因子 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达水平均明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。表明 TPM 诱导 BEAS-2B 细胞能够促进炎症因子 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 的表达。

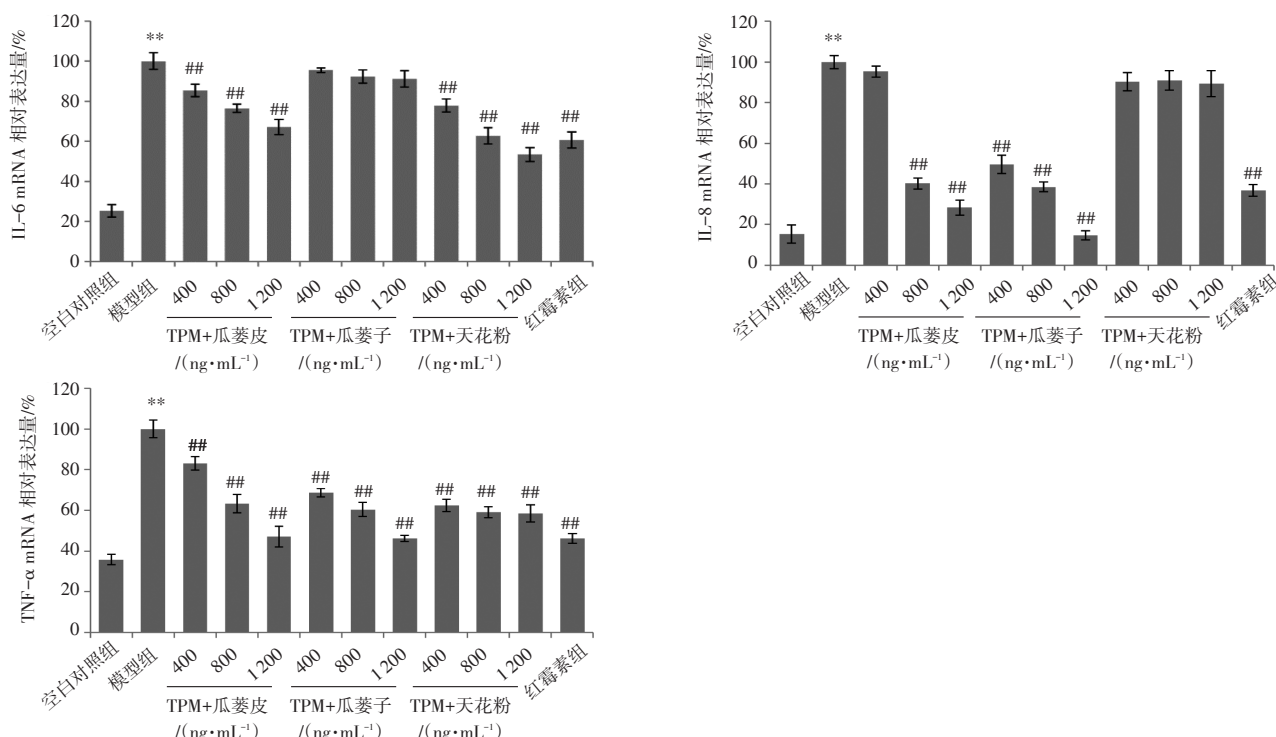
与模型组比较, 400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 瓜蒌皮组的 IL-6、TNF- α mRNA 表达明显下调($P < 0.01$), 800、1 200 ng·mL⁻¹ 瓜蒌皮组的 IL-8 mRNA 表达明显下调($P < 0.01$); 400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 瓜蒌子组的 IL-8、TNF- α mRNA 表达明显下调($P < 0.01$); 400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 天花粉组的 IL-6、TNF- α mRNA 表达明显下调($P < 0.01$)。综合来看, 不同剂量的瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉干预对 TPM 诱导的 BEAS-2B 细胞的 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达均



注：与空白对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

图 1 栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉)对卷烟主流烟气总粒相物(TPM)诱导的 BEAS-2B 细胞上清液中 IL-6、IL-8、TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure 1 Effects of different parts of *Trichosanthes kirilowii* Maxim (Trichosanthis pericarpium, Trichosanthis semen and trichosanthis radix) on the protein expression of IL-6, IL-8 and TNF- α in BEAS-2B cells supernatant induced by TPM($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



注：与空白对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$

图 2 栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉)对卷烟主流烟气总粒相物(TPM)诱导的 BEAS-2B 细胞 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 2 Effects of different parts of *Trichosanthes kirilowii* Maxim (Trichosanthis pericarpium, Trichosanthis semen and Trichosanthis radix) on the relative expression of IL-6, IL-8 and TNF- α mRNA in BEAS-2B cells induced by TPM($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

有下调作用,且呈一定的剂量依赖性。

3 讨论

我国是世界上最大的烟草生产国和消费国,因此吸烟与健康的关系值得深入探讨。研究^[20-24]表明,吸烟能诱发周围气道和肺泡的炎症反应,致炎因素首先诱导免疫应答细胞及黏膜表层细胞表达释放炎症因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1(IL-1)等,并进一步导致其他炎症因子如白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 8(IL-8)、黏附分子的表达释放,最终通过白细胞蛋白酶等终效应因子造成炎症损伤、黏液过度分泌等,使局部的炎症进一步加剧。

支气管上皮细胞 BEAS-2B 来源于烟气作用的靶器官——呼吸道组织,适合作为研究烟气暴露的有效细胞模型^[24-25]。因此,本研究选择 BEAS-2B 细胞模型评价栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子和天花粉)提取物对卷烟主流烟气总粒相物(TPM)刺激细胞增殖及炎症因子表达的影响。有研究^[26-28]报道,红霉素可以抑制吸烟引起的细胞炎症介质的表达,因此本研究选择红霉素作为阳性对照药物。

栝楼是传统的中药,其价格低廉、来源丰富、毒副作用小,不同部位均有抗炎作用^[29-30]。研究^[29-32]证实,栝楼不同部位在祛痰止咳、抗肿瘤、抗炎等方面的不同作用可能与其所含的化学成分及含量的差异有关。于丹等^[33]研究表明,栝楼不同部位的作用差异可能与其多糖类成分的组成比例和抗氧化作用差异有关。Akihisa T 等^[34]研究表明,瓜蒌子提取物对 12-O-十四酰佛波醇-13-乙酸酯(TPA)诱导的小鼠耳部炎症有一定抑制作用。瓜蒌皮中提取的总氨基酸有良好的祛痰作用,其中天门冬氨酸可以促进细胞免疫,促进骨髓淋巴细胞前体转化为成熟的 T 淋巴细胞和辅助淋巴细胞,有助于减轻炎症程度,减少分泌物^[10]。

为了探究栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子和天花粉)对 TPM 诱导的 BEAS-2B 细胞增殖与炎症因子表达的影响,本研究利用 TPM 诱导 BEAS-2B 细胞建立细胞损伤模型,并从细胞增殖和炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-8 mRNA 及蛋白表达等几方面进行阐释。在预实验中,对栝楼不同部位进行了大范围的给药浓度筛选,筛选出栝楼不同部位的实验浓度为 400、800、1 200、1 600 ng·mL⁻¹。而分别给予 1 600 ng·mL⁻¹ 瓜蒌皮、瓜蒌子、天花粉共同作用后, BEAS-2B 细胞存活率分别为 59.6%、64.2%、62.3%,活力明显

减弱($P < 0.01$),抑制了 BEAS-2B 细胞的增殖,具有一定的细胞毒性,故最终选择栝楼不同部位以 400、800、1 200 ng·mL⁻¹ 为实验浓度。实验结果表明,瓜蒌皮正丁醇提取物对 TPM 诱导 BEAS-2B 细胞的 IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症因子表达均有抑制作用;瓜蒌子正丁醇提取物对 IL-8、TNF- α 炎症因子表达有明显抑制作用,对 IL-6 的抑制作用不明显;天花粉正丁醇提取物对 IL-6、TNF- α 炎症因子有明显抑制作用,对 IL-8 的抑制作用不明显。瓜蒌皮对 3 种炎症因子的抑制作用最佳,并与给药剂量相关,推断其可一定程度地降低 TPM 刺激的炎症程度。由于呼吸道炎症形成机理十分复杂,涉及多种细胞、细胞因子以及多种信号通路,因此栝楼不同部位对呼吸道的抗炎作用机理仍需进行大量的体内外实验进行探究。

综上所述,栝楼不同部位(瓜蒌皮、瓜蒌子和天花粉)正丁醇提取物可能通过促进 BEAS-2B 细胞增殖,抑制 TNF- α 、IL-6、IL-8 等炎症因子表达,从而发挥其抗炎作用。本研究结果可为栝楼不同部位在防治吸烟引起的呼吸系统炎症疾病方面的开发与应用提供参考。

参考文献:

- [1] HEIJINK I H, DE BRUIN H G, VAN D B M, et al. Role of aberrant WNT signalling in the airway epithelial response to cigarette smoke in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Thorax*, 2013, 68(8): 709-716.
- [2] DIVYA M, GERAGHTY P M, HARDIGAN A A, et al. A comparison of the inflammatory and proteolytic effects of dung biomass and cigarette smoke exposure in the lung[J]. *Plos One*, 2012, 7(12): 352-353.
- [3] ZHANG W Y, STEPHANIE C, BOWLER R P, et al. Cigarette smoke modulates PGE 2 and host defence against *Moraxella catarrhalis* infection in human airway epithelial cells[J]. *Respirology*, 2011, 16(3): 508-516.
- [4] FAUX S P, TAI T, THORNE D, et al. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke[J]. *Biomarkers*, 2009, 14(sup1): 90-96.
- [5] THORNE D, DALRYMPLE A, DILLON D, et al. A comparative assessment of cigarette smoke aerosols using an *in vitro* air-liquid interface cytotoxicity test[J]. *Inhalation Toxicology*, 2015, 27(12): 629-640.
- [6] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the danger of tobacco[M]. Geneva: World Health Organization, 2011: 7-21.
- [7] 李维,汪军霞,周海云,等.气相色谱-质谱法测定卷烟主流烟气气相物质和粒相物质中组分含量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2013,

- 49(12): 1468-1474.
- [8] 周淑荣, 董昕瑜, 郭文场, 等. 栝楼的品种简介[J]. 特种经济动植物, 2018, 21(3): 39-43.
- [9] 靳光乾, 刘善新. 栝楼的本草整理[J]. 中药材, 1992, 15(9): 42-44.
- [10] 卢鹏飞, 施伟丽, 王志国, 等. 瓜蒌皮的临床应用及作用机制[J]. 中医杂志, 2013, 54(16): 1428-1431.
- [11] 刘金娜, 温春秀, 刘铭, 等. 瓜蒌的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(5): 843-848.
- [12] 万丽娟, 卢金清, 许俊洁, 等. 瓜蒌子化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4440-4443.
- [13] 冯果, 陈娟, 刘文, 等. 天花粉有效成分及药理活性研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2015, 32(6): 59-62.
- [14] KODE A, YANG S R, RAHMAN I. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells[J]. Respiratory Research, 2006, 7: 132-151.
- [15] RAB A, ROWE S M, RAJU S V, et al. Cigarette smoke and CFTR: implications in the pathogenesis of COPD[J]. 2013, 305(8): 530-541.
- [16] DE-DIN. Cigarettes - Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine: DIN ISO 4387-2011 [S/OL]. (2011-01) [2020-10-28]. <https://www.antpedia.com/standard/6182929.html>.
- [17] 李翔, 尚平平, 彭斌, 等. 影响卷烟烟气总粒相物细胞毒性测试的因素[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(6): 44-46.
- [18] 张巧, 谢惠玲, 邢瑞婷, 等. 香烟烟雾凝集物对BEAS-2B细胞损伤作用及对IL-8表达的影响[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(3): 199-202.
- [19] 张铁梅. 不同构型脂联素对香烟烟雾提取物诱导人支气管上皮细胞TNF- α 和IL-8表达的影响[D]. 太原: 山西医科大学, 2013.
- [20] 杨书玉, 刘士林, 张雪琴. 吸烟与肺部感染在慢性阻塞性肺部疾病中的发病机理探讨[J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(6): 796-797.
- [21] SARNA L, COOLEY M E, DANA O L. The global epidemic of tobacco and cancer[J]. Seminars in Oncology Nursing, 2003, 19(4): 233-243.
- [22] 边疆, 孙涓. 全球烟草流行趋势及中国医学生烟草使用现状[J]. 内蒙古医学杂志, 2011, 43(18): 8-11.
- [23] FAUX S P, TAI T, THORNE D, et al. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke[J]. Biomarkers, 2009, 14(sup1): 90-96.
- [24] RAHMAN I, GILMOUR P S, JIMENEZ L A, et al. Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-induced NF- κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2003, 302(4): 860-864.
- [25] 李翔, 张世敏, 赵俊伟, 等. 卷烟烟气暴露下A549和BEAS-2B细胞促炎性因子的释放变化[J]. 烟草科技, 2016, 49(6): 45-49.
- [26] LI M, ZHONG X, HE Z, et al. Effect of erythromycin on cigarette-induced histone deacetylase protein expression and nuclear factor- κ B activity in human macrophages *in vitro*[J]. International Immunopharmacology, 2012, 12(4): 630-650.
- [27] 刘小敏, 许建英. 红霉素对吸烟大鼠气道上皮细胞NF- κ B和ICAM-1表达的影响[J]. 医学研究杂志, 2009, 37(11): 85-88.
- [28] 李梅华, 钟小宁, 柳广南, 等. 核因子- κ B在红霉素抗炎机制的表达[J]. 广西医科大学学报, 2010, 27(3): 26-28.
- [29] 郭庆梅, 周凤琴, 张卉, 等. 瓜蒌的药用部位采收加工和功效的考证[J]. 中华中医药学刊, 2006, 24(10): 1824-1826.
- [30] 游维丽. 浅谈栝楼皮、栝楼种子和栝楼根的化学成分及药理作用[J]. 当代医药论丛, 2017, 15(23): 163-164.
- [31] 马艳, 周凤琴, 郭庆梅, 等. 药材瓜蒌不同部位的红外光谱分析[J]. 光散射学报, 2011, 23(2): 168-171.
- [32] 滕勇荣, 王连侠, 张永清, 等. 瓜蒌药理研究进展[J]. 药学研究, 2010, 29(7): 417-419.
- [33] 于丹, 张颖, 孟凡佳, 等. 瓜蒌不同部位中多糖类成分的分析及其抗氧化作用研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 37(23): 191-194.
- [34] AKIHISA T, YASUKAWA K, KIMURA Y, et al. Five D: C-friedo-oleanane triterpenes from the seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. and their anti-inflammatory effects[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1994, 42(5): 1101-1105.

(编辑: 邹元平)