

奇楠沉香精油挥发性成分分析及其体外抗炎活性研究

陆含金^{1,2}, 杨胜涛², 袁源², 廖良坤², 周伟², 张怡^{1*}, 李积华^{1,2*}

1. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350002; 2. 中国热带农业科学院农产品加工研究所/农业农村部热带作物产品加工重点实验室, 广东湛江 524001

摘要: 本研究基于挥发性成分分析结合细胞炎症模型探究奇楠沉香精油 (Qi-Nan essential oil, QEO) 对 RAW264.7 细胞抗炎活性的影响。采用 GC-MS 方法, 分析 QEO 挥发性成分; 通过 DPPH 自由基清除率和总抗氧化能力测定, 检测 QEO 的抗氧化活性; 利用生物信息学预测 QEO 与炎症相关的靶点和信号通路; 应用荧光探针法检测一氧化氮 (NO) 和活性氧 (ROS) 水平; 应用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量; 应用 Western blot 检测 P-P65、P65、I κ B- α 和 P-I κ B- α 的表达水平。结果表明: QEO 主要挥发性成分为 2-(2-苯乙基)-色酮 (50.08%)、石竹素 (8.45%)、绿叶烷 (6.46%)、榄香醇 (3.88%)、2-烯丙基-6-甲基苯酚 (2.78%)。QEO 在浓度为 1 mg/mL 时对 DPPH 自由基的清除率为 51.98%, 其总抗氧化能力在 1~10 mg/mL 浓度范围内随着浓度增大而增大。QEO 与炎症的交集靶点有 533 个, KEGG 富集分析显示主要涉及 MAPK、NF- κ B 和 PI3K-Akt 等信号通路。QEO 显著降低 NO、ROS、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的产生和表达水平 ($P < 0.001$); 同时, QEO 显著抑制 P-P65 和 P-I κ B- α 蛋白表达 ($P < 0.001$)。以上研究结果表明, QEO 可通过减少 ROS 的产生, 抑制 NF- κ B 信号通路的激活, 从而显著减少细胞炎症因子的释放, 以达到抗炎作用, 具有开发成炎症抑制剂的潜力。

关键词: 奇楠; 精油; 抗炎; RAW264.7 细胞; 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A

Analysis of Volatile Components of Essential Oil of Qi-Nan Agarwood and Its Anti-inflammatory Activity *in vitro*

LU Hanjin^{1,2}, YANG Shengtao², YUAN Yuan², LIAO Liangkun², ZHOU Wei², ZHANG Yi^{1*}, LI Jihua^{1,2*}

1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Tropical Crop Products Processing of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhanjiang, Guangdong 524001, China

Abstract: The aim of the study was to explore the anti-inflammatory activity of Qi-Nan essential oil (QEO) based on component analysis combined with the cellular inflammation model. The volatile components of QEO were analyzed by GC-MS. The antioxidant activity of QEO was detected by the measurement of DPPH radical scavenging and total antioxidant capacity. Bioinformatics was used to predict the targets and signaling pathways of QEO related to inflammation. NO and ROS levels were detected by fluorescent probe method. ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL-1 β . Western blot was used to detect the expressions of P-P65, P65, I κ B- α and P-I κ B- α . The main components of Qian essential oil were 2-phenethyl-4H-chromen-4-one (50.08%), (-)-caryophyllene oxide (8.45%), patchulane (6.46%), elemol (3.88%), 2-methyl-6-(2-propenyl)-phenol (2.78%). The DPPH radicals scavenging of QEO was 51.98% at a concentration of 1 mg/mL and the total antioxidant capacity increased with the increase of QEO in the concentration range of 1–10 mg/mL. There were 533 intersecting targets of QEO and inflammation, and KEGG enrichment analysis showed that the main signaling pathways involved were MAPK, NF- κ B and PI3K-Akt

收稿日期 2024-03-07; 修回日期 2024-03-19

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2023SHFZ115); 海南省自然科学基金项目 (No. 322QN381); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630122022003)

作者简介 陆含金 (1997—), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物活性。*通信作者 (Corresponding author): 李积华 (LI Jihua), E-mail: foodpaper@126.com; 张怡 (ZHANG Yi), E-mail: zyifst@163.com。

pathways. QEO significantly reduced the production and expression levels of NO, ROS, TNF- α , IL-6 and IL-1 β ($P < 0.001$). Meanwhile, the results of western blot showed that QEO also inhibited the expression of P-P65 and P-I κ B- α proteins ($P < 0.001$). Therefore, QEO can achieve anti-inflammatory activity through reducing the production of ROS, thereby inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway and further drastically decrease the release of pro-inflammatory cytokines. The results demonstrate that QEO has the potential to be developed as an inflammation inhibitor.

Keywords: Qi-Nan; essential oil; anti-inflammatory; RAW264.7 cells; signaling pathway

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.09.019

沉香是瑞香科沉香属 (*Aquilaria*) 或拟沉香属 (*Gyrinops*) 植物含有树脂的芯材^[1], 主要分布于印度、缅甸、老挝、越南、中国、柬埔寨、泰国等亚洲国家^[2]。在我国, 主要分布在广东、海南、广西、福建和台湾等地区。沉香作为一种热带特色作物, 具有抗氧化、镇痛抗炎、降糖等良好功效^[3]。近年来, 随着沉香的市场需求增加, 香农们从白木香天然林内选育出一类具有优良特性的品系, 该品系具有结香早、结香快、结香质量高等优点, 俗称易结沉香, 即为奇楠沉香。奇楠又称伽南、伽楠、伽蓝、棋楠等, 英文名有 Kanankoh、Kyara、Chi-Nan、Qi-Nan 等^[4], 其价格是普通沉香的上百甚至上千倍。随着奇楠人工培育技术逐渐成熟, 奇楠沉香已初步形成产业^[5]。奇楠沉香与普通沉香的主要区别在于其香气更加持久绵长、质地较软, 油脂含量丰富, 提取物得率及色酮含量比普通沉香更高^[6]。张琳等^[7]从奇楠沉香中分离的 6-羟基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮能抑制由 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 的作用, 初步说明奇楠沉香具有抗炎活性。

奇楠沉香精油 (Qi-Nan essential oil, QEO) 作为奇楠沉香最重要的活性成分, 具有多种生物活性, 但目前针对 QEO 的研究主要集中在成分分析鉴定和简单活性评价。有研究团队对从水蒸气蒸馏法提取的 QEO 进行成分分析, 发现其倍半萜类化合物含量差异很大, 分别为 76.31%^[8] 和 90.28%^[9], 说明 QEO 成分可能与品种、品质和种植地等因素有关。余珍^[10]对 3 种不同品种的 QEO 进行研究, 发现 QEO 的主要成分均为倍半萜类、2-(2-苯乙基)色酮类和简单芳香族化合物, 且具有抑制 NO 产生的效果。此外, 陈细钦等^[11]对比了分别用水蒸气蒸馏和超临界萃取的普通沉香精油和 QEO, 结果表明超临界萃取的精油抗氧化活性均强于水蒸气蒸馏精油, 并且 QEO 对于 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞存活率的抑制作用最佳, 这可能是奇楠沉香中的色酮类成分含量远高于普通

沉香。在现有关于 QEO 的研究中, 已初步证实其具有抗炎活性, 但鲜有对超临界 CO₂ 萃取法提取 QEO 的抗炎活性进行系统研究的报道。

本研究拟以超临界 CO₂ 萃取法提取的 QEO 作为研究对象, 通过 GC-MS 分析 QEO 挥发性成分, 并对 QEO 的抗氧化活性进行评价。然后, 采用生物信息学手段对 QEO 与炎症相关的靶点、主要活性成分及相关的信号通路进行预测。最后利用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞建立炎症模型验证 QEO 的抗炎活性, 以期对奇楠沉香产业的深入开发和高效利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 奇楠沉香木种植于广东省茂名市茂南区山阁镇黄杰村委会塘尾村 (110°57'9.594"E, 21°42'47.5272"N)。小鼠巨噬细胞 (RAW264.7) 购自中国科学院细胞库。DMEM 培养基、PBS 缓冲液、双抗 (ThermoFisher Scientific Gibco)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 购自 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 Serana 公司; CCK-8 试剂盒、一氧化氮 (NO) 检测试剂盒、活性氧 (ROS) 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; P65、P-P65、P-I κ B- α 、I κ B- α 、 β -Actin、二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.1.2 仪器与设备 气相色谱质谱连用仪, 日本岛津公司; 二氧化碳恒温培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司; 酶标仪, 美国 BIO-TEX 公司; 倒置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; 电泳系统、电转系统, 美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统, 中国 Tanon 公司。

1.2 方法

1.2.1 精油提取和纯化 奇楠沉香木粉碎后过 80 目筛, 准确称取 100 g 放入萃取罐。设置萃取条件为 30 MPa, 45 °C, 二氧化碳流量为 20 L/h, 萃取 4 h。然后将萃取物放入专用的分子蒸馏中进

行分离纯化,并收集馏出物,即获得 QEO。

1.2.2 成分分析 将 QEO 溶解于正己烷中,使用 0.22 μm 尼龙膜过滤,备用。采用 HP-5 弹性石英毛细管柱 (0.25 mm \times 30 m, 0.25 μm), 进样量为 1 μL 。分别设置流速 (1.0 mL/min)、分流比 (30 : 1)、进样温度 (250 $^{\circ}\text{C}$) 和传输线温度 (280 $^{\circ}\text{C}$)。起始温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 3 min, 然后以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 180 $^{\circ}\text{C}$, 再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min。EI 电离 70 eV, 离子源温度为 230 $^{\circ}\text{C}$, 四级杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$, 扫描方式为全扫描, 扫描范围为 35~600 m/z 。

1.2.3 DPPH 自由基清除能力 将 QEO 溶液与 DPPH 的甲醇溶液混合, 常温避光反应 30 min, 测定 517 nm 处的吸光值, 记为 A 。等量的无水乙醇和 DPPH 的甲醇溶液混合作为空白反应体系, 并测得吸光值, 记为 A_0 。以维生素 C (Vc) 作为阳性对照。DPPH 的清除能力按以下公式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

1.2.4 总抗氧化能力 将 FRAP 工作液与 QEO 充分混匀, 室温避光反应 10 min, 蒸馏水调零, 于 593 nm 处测其吸光值, Vc 作为阳性对照。以 FeSO_4 溶液作为标准品绘制标准曲线, 总抗氧化能力值以 Fe^{2+} 含量表示, 单位为 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。

1.2.5 生物信息学分析 在 PubChem 网站检索 QEO 的成分 Smlies, 然后将 Smlies 导入 Swiss Target Prediction 数据库, 使用 Uniprot 数据库校正靶点。以 inflammation 为关键词, 在 GeneCards、Disgenet、OMIM 数据库检索, 结果采用 Venny 2.1.0 构建韦恩图, 获取 QEO 与炎症的交集靶点。将交集靶点导入 String 数据库, 保存蛋白交互信息文件。使用 Cytoscape 3.9.1 软件构建药物成分靶点网络图和蛋白质互作网络图 (protein-protein interaction, PPI)。通过 David 数据库对交集靶点进行 KEGG 和 GO 富集分析, 并使用微生信平台对结果进行可视化。

1.2.6 细胞培养 RAW264.7 细胞采用 DMEM 完全培养基 (10% FBS 和 1% 双抗) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。

1.2.7 细胞活力测定 试验组分别加入不同浓度的 QEO (1、10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 空白组加入等体积的 DMEM 培养基, 于细胞培养箱中孵育 24 h。使用 CCK-8 法检测 QEO 对细胞毒性的影响: 弃除培养液, 加入 CCK-8 试剂, 培养箱中孵

育 30 min, 采用酶标仪在 450 nm 波长下测定每孔吸光值, 计算细胞的活力。

1.2.8 NO 含量测定 试验组加入不同浓度的 QEO (1、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养 2 h, 无 QEO 为空白组 (COG); 然后加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 刺激 24 h, COG 中加入 LPS 处理为模型组 (MOG)。取上清液并依次加入 NO 含量检测试剂, 测定 540 nm 处的吸光值, 根据 NO 标准曲线计算浓度。

1.2.9 NO 荧光强度测定 如 1.2.8 处理细胞后, 吸取并弃除培养基, 加入浓度为 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DAF-FM DA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, 用 PBS 清洗 3 次。利用倒置荧光显微镜拍照并记录细胞荧光强度。

1.2.10 活性氧 (ROS) 含量测定 如 1.2.8 处理细胞后, 吸取并弃除培养基。加入浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DCFH-DA 工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后, 用 PBS 清洗 3 次。利用倒置荧光显微镜拍照并记录细胞荧光强度。

1.2.11 ELISA 检测炎症因子含量 细胞处理同 1.2.8。使用 ELISA 试剂盒对培养基中炎症因子 (TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β) 含量进行检测。

1.2.12 Western blot 检测蛋白表达水平 细胞处理同 1.2.8。使用细胞刮收集细胞后加入裂解液在冰上进行快速裂解, 然后进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 g 高速离心, 吸取上清备用。调整蛋白浓度后进行变性即获得蛋白样品。然后通过电泳和转膜将目标蛋白转移至 NC 膜上, 并采用常温封闭 (1 h)、一抗 (4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜) 和二抗 (常温, 1 h) 孵育得到目标蛋白条带。最后采用化学发光系统进行图像采集。

1.3 数据处理

每次试验重复 3 次以上, 各组数据以平均值 \pm 标准差的形式表示, 使用 Origin 2021 和 Prism 9.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 奇楠沉香精油挥发性成分分析

采用 GC-MS 方法对 QEO 挥发性成分进行分析, 得到总离子流色谱图 (图 1)。结果如表 1 所示, 从 QEO 中鉴定出 37 种成分, 其主要的化合物类别为色酮类 (50.08%)、倍半萜类 (26.28%)、芳香族化合物 (12.59%) (图 2)。通过峰面积归一化法测定相对百分含量前 5 位从高到低依次为 2-(2-苯乙基)-色酮 (50.08%)、石竹素 (8.45%)、

表1 奇楠沉香精油成分分析
Tab. 1 Composition analysis of QEO

编号 No.	保留时间 RT/min	化合物 Compound	CAS 编号 CAS No.	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content/%
1	9.468	榄香烯 elemene	33880-83-0	C ₁₅ H ₂₄	0.22
2	14.495	没药醇氧化物 α -bisabololoxide	26184-88-3	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0.24
3	15.112	4-(1,5-二甲基-4-己烯基)-3-环己烯-1-酮 4-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-3-cyclohexen-1-one	100572-83-6	C ₁₄ H ₂₂ O	0.21
4	15.399	α -律草烯 α -humulene	6753-98-6	C ₁₅ H ₂₄	0.58
5	15.601	绿叶烷 patchulane	19078-35-4	C ₁₅ H ₂₆	6.46
6	16.422	7,9-二甲基-8-硝基双环[4.3.1]癸烷-10-酮 7,9-dimethyl-8-nitrobicyclo[4.3.1]decan-10-one	129967-66-4	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	0.20
7	17.864	桉叶醇 eudesmol	98683-12-6	C ₁₅ H ₂₆ O	1.02
8	17.965	紫苏醇 p-mentha-1,8-dien-7-ol	536-59-4	C ₁₀ H ₁₆ O	0.52
9	18.126	榄香醇 elemol	639-99-6	C ₁₅ H ₂₆ O	3.88
10	18.239	13-氧杂双环[9.3.1]十五烷 13-oxabicyclo[9.3.1]pentadecane	51547-45-6	C ₁₄ H ₂₆ O	1.45
11	18.842	α -古巴烯-11-醇 α -copanne-11-ol	41370-56-3	C ₁₅ H ₂₄ O	1.08
12	19.361	1,3-双-(2-环丙基, 2-甲基环丙基)-丁-2-烯-1-酮 1,3-bis-(2-cyclopropyl,2-methylcyclopropyl)-but-2-en-1-one		C ₁₈ H ₂₆ O	1.01
13	19.590	异香橙烯环氧化物 isoaromadendrene epoxide	85710-39-0	C ₁₅ H ₂₄ O	0.82
14	20.423	石竹素(-)-caryophyllene oxide	1139-30-6	C ₁₅ H ₂₄ O	8.45
15	20.872	1b,5,5,6a-四甲基-八氢-1-氧杂环丙烷并[a]茛-6-酮 1b,5,5,6a-tetramethyl-octahydro-1-oxa-cyclopropa[a]inden-6-one		C ₁₃ H ₂₀ O ₂	0.32
16	21.520	反式石竹烯 trans-caryophyllene	87-44-5	C ₁₅ H ₂₄	0.46
17	21.631	1,3,3-三甲基-2-乙烯基环己烯 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl-cyclohexene	5293-90-3	C ₁₁ H ₁₈	3.34
18	21.797	异香叶醇 isogeraniol	5944-20-7	C ₁₀ H ₁₈ O	1.76
19	22.384	顺式-(Z)- α -双没药烯环氧化物 cis-Z- α -bisabolene epoxide		C ₁₅ H ₂₄ O	0.59
20	23.461	缬草提取物 valeranal	4176-16-3	C ₁₅ H ₂₂ O	1.10
21	24.332	脱氧疣内酯 deoxysericealactone	19892-19-4	C ₁₆ H ₂₀ O ₄	1.93
22	24.640	4-甲基-3-(2-甲基-2-丙烯基)-2(5H)-呋喃酮 4-methyl-3-(2-methyl-2-propenyl)-2(5H)-furanone	89902-23-8	C ₉ H ₁₂ O ₂	0.20
23	25.343	γ -榄香烯 γ -elemene	339154-91-5	C ₁₅ H ₂₄	0.58
24	25.598	α -甜没药醇 α -bisabolol	515-69-5	C ₁₅ H ₂₆ O	0.24
25	26.412	穿心莲内酯 andrographolide	5508-58-7	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	0.54
26	26.541	α -布黎烯 α -bulnesene	3772-93-8	C ₁₅ H ₂₄	0.30
27	27.026	氧杂环十四烷-4,11-二炔 oxacyclotetradeca-4,11-diyne	6568-32-7	C ₁₃ H ₁₈ O	3.56
28	27.230	除虫菊酯 pyrethrolone	487-67-2	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	0.69
29	28.896	β -缬草烯 β -vatiene		C ₁₅ H ₂₂	0.26
30	32.589	2-(2-苯乙基)色酮 2-phenethyl-4H-chromen-4-one	61828-53-3	C ₁₇ H ₁₄ O ₂	50.08
31	33.055	2-烯丙基-6-甲基苯酚 2-methyl-6-(2-propenyl)-phenol	3354-58-3	C ₁₀ H ₁₂ O	2.78
32	33.180	1-溴-3-甲基-2-丁烯 1-bromo-3-methyl-2-butene	870-63-3	C ₅ H ₉ Br	2.19
33	33.305	3-氨基苯硫酚 3-aminobenzenethiol	22948-02-3	C ₆ H ₇ NS	1.24
34	33.425	6-苄氧基庚-1-烯-4-醇 6-benzyloxyhept-1-en-4-ol		C ₁₄ H ₂₀ O ₂	0.34
35	33.475	2-甲基-3-(苯磺酰基)甲基-2-环戊烯-1-酮 2-methyl-3-(phenylsulfonyl)methyl-2-cyclopenten-1-one	11050-62-7	C ₁₃ H ₁₄ O ₃ S	0.24
36	33.545	2-(2,2,3,3-四甲基环亚丙亚甲基)-4-甲基己酸 2-(2,2,3,3-tetramethylcyclopropylidene)-4-methyl-hexanoic acid		C ₁₅ H ₂₄ O ₂	0.42
37	35.816	邻苯二甲酸二正辛酯 di-n-octyl phthalate	117-84-0	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	0.47

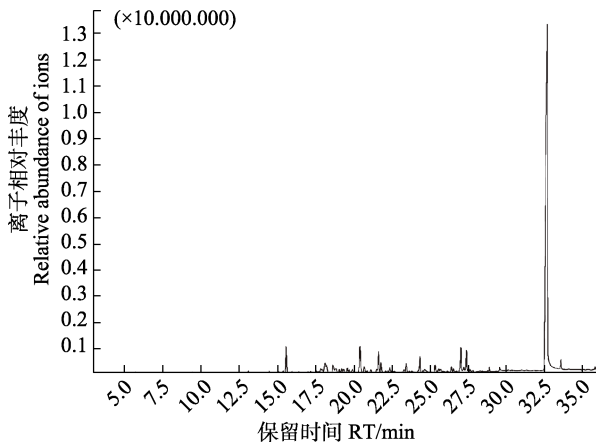


图 1 奇楠沉香精油的 GC-MS 总离子流示意图
Fig. 1 GC-MS total ion chromatogram of QEO

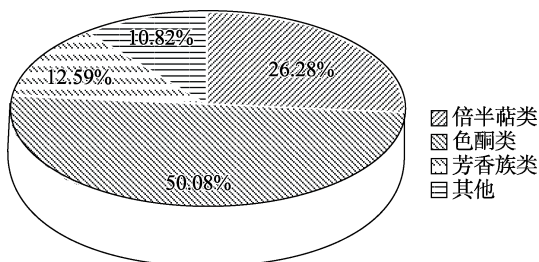
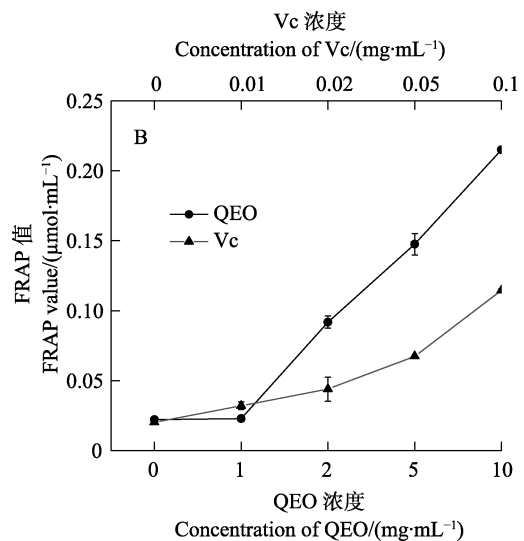
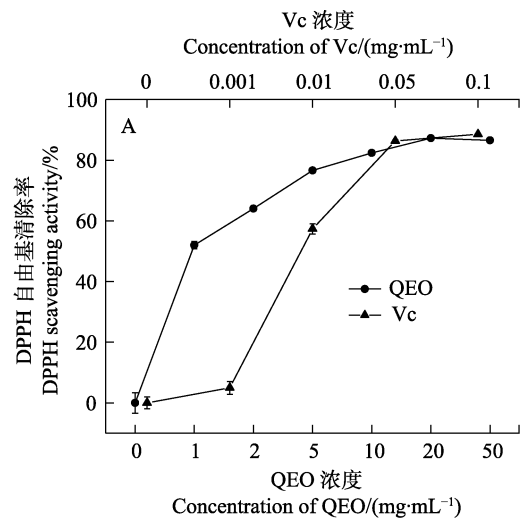


图 2 奇楠沉香精油成分种类分析
Fig. 2 Analysis of types of composition of QEO

绿叶烷 (6.46%)、榄香醇 (3.88%)、2-烯丙基-6-甲基苯酚 (2.78%)。其中, 相对含量最高的成分为 2-(2-苯乙基)-色酮, 说明其为 QEO 的主要挥发性成分。此外, 研究发现从白木香中分离出的 2-(2-苯乙基)-色酮^[12]及其衍生物^[13]能够显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 的过量产生, 表明其具有良好的抗炎活性。

2.2 奇楠沉香精油抗氧化活性的测定

本研究测试 1~50 mg/mL 浓度范围内 QEO 清除 DPPH 自由基的能力。从图 3A 可以看出 QEO 对 DPPH 自由基清除能力随着 QEO 浓度增大逐渐增强, 在浓度为 1 mg/mL 时, QEO 清除率为 51.98%。此外, 可明显看出 QEO 清除 DPPH 自由基的能力在 20 mg/mL 时达到最大值, 说明 QEO 在 1~50 mg/mL 范围具有一定的清除 DPPH 自由基的能力。如图 3B 所示, QEO 总抗氧化能力的结果以每毫升含有的 Fe^{2+} 含量表示。FeSO₄ 标准曲线回归方程为 $y=4.8772x+0.001$, $R^2=0.9998$, 说明线性良好, 可用于抗氧化能力的计算。在 1~10 mg/mL 浓度范围内, 随着 QEO 浓度增大, Fe^{2+} 含量逐渐增加, 表示 QEO 的还原力也逐渐增强, 说明 QEO 的总抗氧化能力与浓度存在一定的量效关系。



A: DPPH 自由基清除率; B: 总抗氧化能力。
A: DPPH scavenging activity; B: Total antioxidant capacity.

图 3 奇楠沉香精油抗氧化活性
Fig. 3 Antioxidant capacity of QEO

2.3 奇楠沉香精油生物信息学分析

通过数据库筛选得到 QEO 活性成分靶点有 594 个, 炎症靶点 15 394 个, QEO 与炎症的交集靶点共有 553 个 (图 4)。图 5A 为 QEO 活性成分交集靶点网络图, 根据 degree 值的大小, 排名前 15 的关键活性成分为紫苏醇、榄香醇、 α -古巴烯-11-醇、1,3-双-(2-环丙基,2-甲基环丙基)-丁-2-烯-1-酮、异香橙烯环氧化物、石竹素、1b,5,5,6a-四甲基-八氢-1-氧杂环丙烷并[a]茛-6-酮、异香叶醇、顺式-(Z)- α -双没药烯环氧化物、缬草提取物、 α -甜没药醇、氧杂环十四烷-4,11-二炔、除虫菊酯、2-(2-苯乙基)色酮、2-甲基-3-(苯磺酰基)甲基-2-环戊烯-1-酮。从图 5A 中可看出 QEO 发挥抗炎活性时具有多成分、多靶点的作用特点。如图 5B 所

示，QEO 发挥抗炎活性的关键靶点主要包括 SRC、MAPK1、AKT、HSP90AA1、PI3K3CA 等。在 David 数据库中对 QEO 作用炎症的 553 个交集靶蛋白进行 GO 注释分析和 KEGG 信号通路富集分析。如图 6A 所示，QEO 发挥抗炎活性可能与细胞质膜上的靶点、以及蛋白磷酸化和 ATP 结合等作用环节有关。KEGG 富集分析得到 186 条信号通路，以 *P* 值作为富集程度显著性标准，取排名前 20 条通路建立气泡图。如图 6B 所示，QEO 作用炎症反应较显著的通路主要有 NF-κB、MAPK 和 PI3K-Akt 等炎症信号通路，以上结果说明 QEO 可能是通过上述信号通路发挥抗炎作用。因此，本研究在生物信息学的基础上重点考察 QEO 对

NF-κB 信号通路的调控作用。

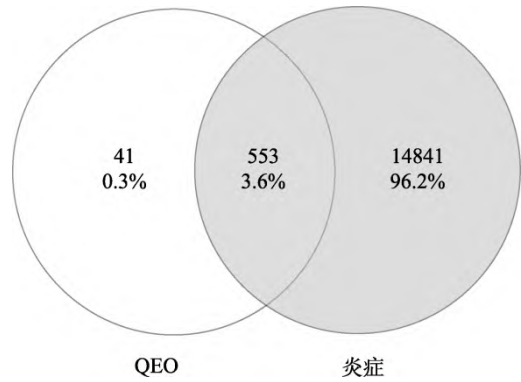
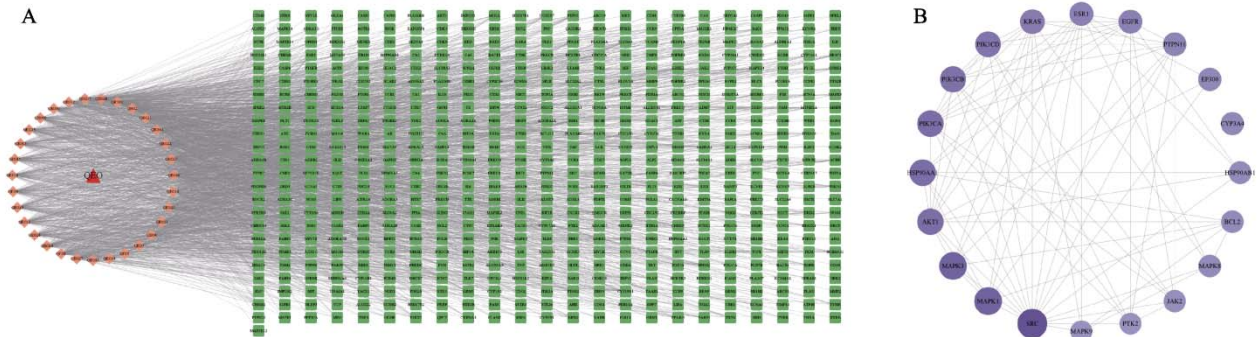


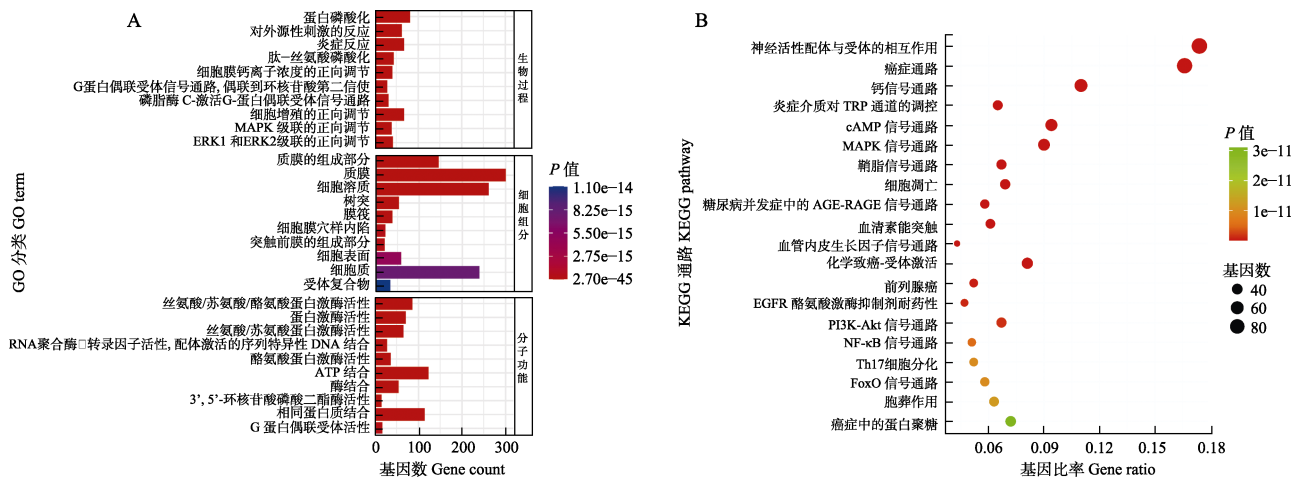
图 4 奇楠沉香精油成分靶点-炎症靶点韦恩图
Fig. 4 Venny diagram of component target-inflammation target



A: 奇楠沉香精油-活性成分-交集靶点网络; B: PPI 蛋白网络。
A: QEO-active ingredients-target network; B: PPI network of key targets.

图 5 奇楠沉香精油抗炎的核心成分及靶蛋白图

Fig. 5 Anti-inflammatory core components and proteins of QEO



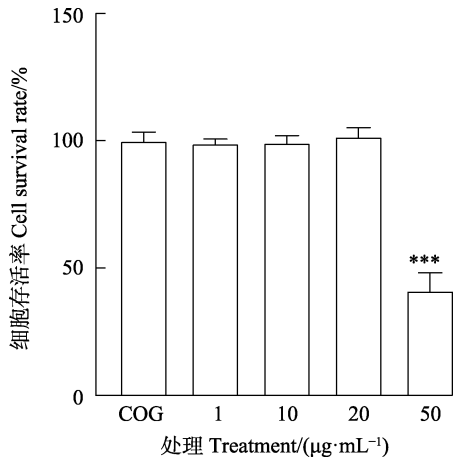
A: GO 功能富集分析; B: KEGG 通路富集分析。
A: GO function enrichment analysis; B: KEGG pathway enrichment analysis.

图 6 奇楠沉香精油 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 6 GO and KEGG enrichment analysis of QEO

2.4 奇楠沉香精油对 RAW264.7 细胞活力的影响
如图 7 所示，将 1、10、20、50 μg/mL QEO

作用于 RAW264.7 细胞 24 h 后对细胞存活率进行检测。与 COG 相比，在 QEO 浓度为 50 μg/mL



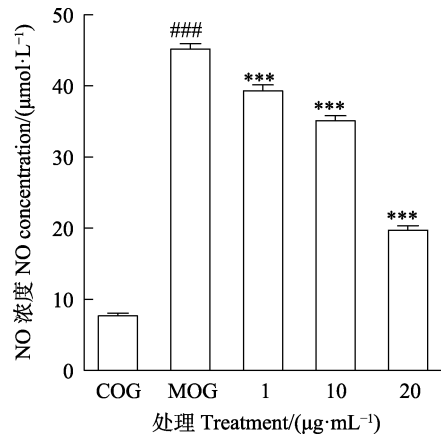
***表示与 COG 比较差异极显著 ($P<0.001$)。
 *** indicates extremely significant difference compared with COG ($P<0.001$).

图 7 奇楠沉香精油对 RAW264.7 细胞存活率的影响
 Fig. 7 Effect of QEO concentration on RAW264.7 cell viability

时, 细胞存活率为 43.24%, 显示出极显著毒性。当 QEO 浓度在 1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内, 细胞活力与 COG 相比均无明显差异。因此, 选取 1、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 QEO 进行后续试验。

2.5 奇楠沉香精油对 RAW264.7 细胞 NO 含量的影响

根据说明书, 以 NaNO_2 作为标准溶液绘制 NO 标准曲线, 回归方程为 $y=0.0082x-0.007$, $R^2=0.9996$, 说明在此浓度范围内线性良好, 可用于 NO 含量的计算。如图 8 所示, LPS 使对照组中的 NO 含量显著升高到 COG 的 5 倍, 说明 LPS 能显著刺激 RAW264.7 细胞产生炎症反应, 而 1、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ QEO 处理组能够极显著地抑制 NO 的过量产生 ($P<0.001$), 且呈浓度依赖性。



###表示与 COG 比较差异极显著 ($P<0.001$); ***表示与 MOG 比较差异极显著 ($P<0.001$).

indicates extremely significant difference compared with COG ($P<0.001$); *** indicates extremely significant difference compared with MOG ($P<0.001$).

图 8 奇楠沉香精油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 产生的影响

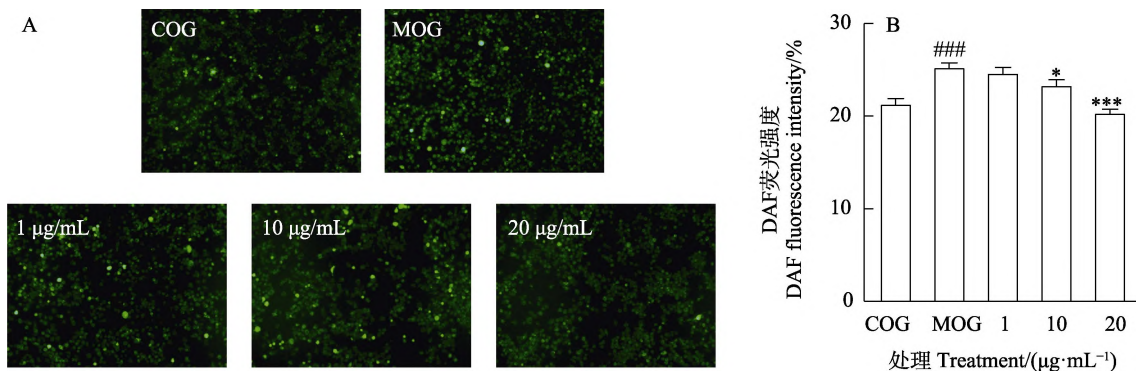
Fig. 8 Effect of QEO on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells

2.6 奇楠沉香精油对 RAW264.7 细胞 NO 荧光强度的影响

如图 9 所示, 与空白组相比, LPS 导致细胞中荧光强度显著增强 ($P<0.001$), 表示 LPS 刺激使得细胞中的 NO 含量显著增加。而加入 QEO 的处理组, 随着 QEO 浓度的增加, 其荧光强度逐渐减弱。说明 LPS 能够刺激 RAW264.7 细胞产生明显的炎症反应, 而 QEO 处理使得这种炎症反应有所缓解。

2.7 奇楠沉香精油对 RAW264.7 细胞 ROS 水平的影响

在 LPS 诱导的炎症过程中, 细胞可能会受到

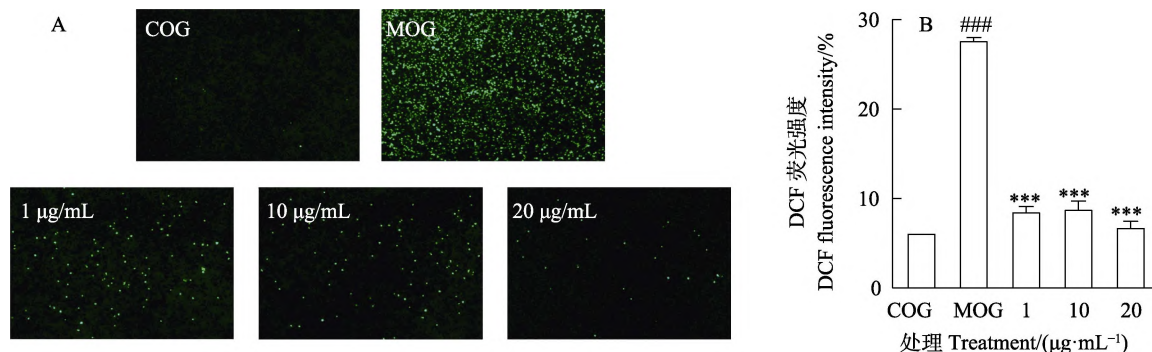


###表示与 COG 比较差异极显著 ($P<0.001$); ***表示与 MOG 比较差异极显著 ($P<0.001$); *表示与 MOG 比较差异显著 ($P<0.05$)。
 ### indicates extremely significant difference compared with COG ($P<0.001$); *** indicates extremely significant difference compared with MOG ($P<0.001$); * indicates significant difference compared with MOG ($P<0.05$)

图 9 奇楠沉香精油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 荧光水平的影响
 Fig. 9 Effect of QEO on NO fluorescence level in LPS-induced RAW264.7 cells

刺激产生过量的 ROS, 导致 ROS 和抗氧化剂之间的失衡, 诱发免疫功能紊乱^[14]。细胞中 ROS 的荧光强度如图 10 所示, 和 COG 相比, LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生了大量的 ROS。但经过 1、

10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ QEO 处理后, 细胞内 ROS 的含量呈浓度依赖性极显著降低 ($P<0.001$), 其中 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ QEO 处理组的荧光水平与 COG 基本一致。



###表示与 COG 比较差异极显著 ($P<0.001$); ***表示与 MOG 比较差异极显著 ($P<0.001$)。### indicates extremely significant difference compared with COG ($P<0.001$); *** indicates extremely significant difference compared with MOG ($P<0.001$)

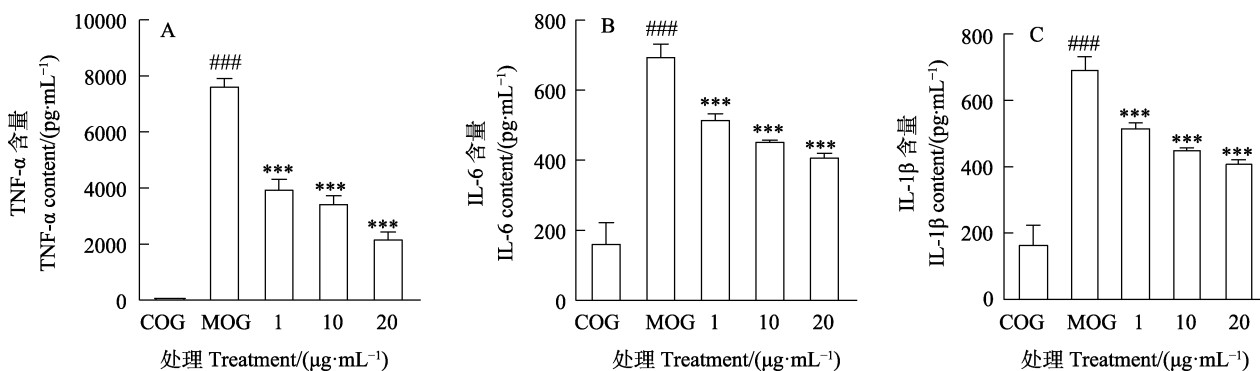
图 10 QEO 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 ROS 水平的影响

Fig. 10 Effect of QEO on ROS levels in LPS-induced RAW264.7 cells

2.8 奇楠沉香精油对 RAW264.7 细胞炎症因子的影响

RAW264.7 细胞被激活时, 炎症因子 ($\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 β) 会过度释放, 这将使炎症反应进一步加重甚至失控, 最终导致机体炎性病理损伤^[15]。如图 11 所示, 与 COG 相比, MOG 中的 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 β 经过 LPS 刺激后, 其含量均

极显著增加 ($P<0.001$), 而在 1、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 QEO 预处理的试验组, $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 β 的含量随着 QEO 浓度的增加呈极显著降低 ($P<0.001$), 说明 QEO 能够剂量依赖性抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子的过度产生。结果表明 QEO 可以显著抑制由 LPS 刺激导致的 RAW264.7 细胞的炎症反应。



###表示与 COG 比较差异极显著 ($P<0.001$); ***表示与 MOG 比较差异极显著 ($P<0.001$)。### indicates extremely significant difference compared with COG ($P<0.001$); *** indicates extremely significant difference compared with MOG ($P<0.001$)

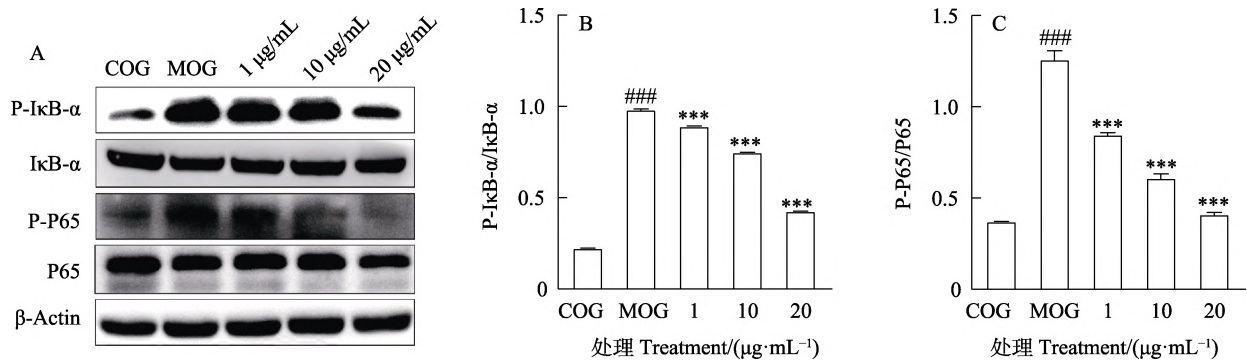
图 11 奇楠沉香精油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子的影响

Fig. 11 Effect of QEO on inflammatory factors in LPS-induced RAW264.7 cells

2.9 奇楠沉香精油对 RAW264.7 细胞 NF- κ B 信号通路的影响

为了进一步研究 QEO 发挥抗炎活性的作用机制, 通过蛋白免疫印迹实验对 NF- κ B 信号通

路进行研究。如图 12 所示, 当 RAW264.7 细胞被 LPS 刺激后, P-P65 和 P-I κ B- α 蛋白的表达极显著增加 ($P<0.001$)。然而, 经过 QEO 的预处理能极显著下调细胞中 P-P65 和 P-I κ B- α 蛋白的



A: 蛋白印记; B: P-IκB-α 蛋白表达; C: P-P65 蛋白表达; ###表示与 COG 比较差异极显著 ($P<0.001$); ***表示与 MOG 比较差异极显著 ($P<0.001$)。

A: Protein imprinting map; B: P-IκB-α protein expression; C: P-P65 protein expression; ### indicates extremely significant difference compared with COG ($P<0.001$); *** indicates extremely significant difference compared with MOG ($P<0.001$).

图 12 奇楠沉香精油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NF-κB 信号通路的影响

Fig. 12 Effect of QEO on NF-κB pathway in LPS-induced RAW264.7 cells

表达 ($P<0.001$), 并且随着 QEO 的增加, 其磷酸化蛋白的表达水平逐渐下降, 说明 QEO 对于 P65 和 IκB-α 蛋白磷酸化的抑制具有显著效果, 能够抑制 NF-κB 通路的激活, 进而发挥良好的抗炎活性作用。

3 讨论

目前有关沉香的研究不断加深, 沉香功效也得到了更多发掘和利用。QEO 作为奇楠沉香最重要的活性成分, 开发价值巨大。本研究从 QEO 中共鉴定出 37 种成分, 其主要的化合物类别为色酮类、倍半萜类和芳香族化合物, 含量分别为 50.08%、26.28%和 12.59%。大量研究发现从沉香中分离出的色酮类^[16]和倍半萜类^[17]化合物具有较好的抗炎作用, 能够减轻炎症损伤。此外, YANG 等^[18]对野生和人工栽培的奇楠沉香进行成分比较, 发现其中的色酮类含量明显不同, 分别为 72.43%和 95.61%, 本研究结果与此也有较大差异, 这可能与奇楠沉香的种植地、结香方式不同有关。通过体外抗氧化活性试验发现, QEO 在 1~50 mg/mL 浓度范围的 DPPH 自由基清除率和总抗氧化能力随着浓度的增加而上升, 结果表明 QEO 具有较好的抗氧化活性。研究发现大多数的抗氧化剂的有效成分均具有抗炎特性^[19], 综合以上分析表明 QEO 在抗炎方面具有巨大的潜力。

本研究基于上述结果, 采用生物信息学方法预测分析 QEO 的抗炎作用机制。筛选出 QEO 与炎症交集靶点 553 个, 通过拓扑分析得到的成分-靶点网络图可以看出 QEO 中的核心成分类型为倍半萜类化合物和 2-(2-苯乙基)色酮, 这些结果提

示 QEO 具有多组分、多靶点的作用特点。GO 和 KEGG 富集分析结果表明 QEO 主要通过细胞质膜、细胞质、树突等细胞组分参与基因表达的调控, 主要涉及蛋白磷酸化、炎症反应、细胞增殖的正向调节等生物过程, 且发挥抗炎活性与 NF-κB、MAPK、PI3K-Akt 等信号通路有关。其中, NF-κB 是一条经典的与炎症密切相关的信号通路。在炎症过程中, NF-κB 通路能够激活 iNOS, iNOS 是一种重要的功能酶, 可以促使细胞分泌大量的 NO^[20]。为了进一步明确 QEO 在发挥抗炎活性过程中与 NF-κB 信号通路的相关性, 研究使用 RAW264.7 细胞的炎症模型进行验证。研究发现 QEO 在 1~20 μg/mL 浓度范围对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 NO 具有极显著的抑制作用。为了验证上述结果, 本研究对 NO 荧光水平进行分析, 发现 QEO 在 20 μg/mL 时能够显著降低细胞内的 NO 水平, 表现出良好的抗炎活性。

此外, 研究表明 ROS 会在细胞受到刺激后大量产生并激活 NF-κB 信号通路, 促进炎症相关基因的转录和表达^[21]。为了进一步深入探究 QEO 的抗炎活性, 本研究对 RAW264.7 细胞中的 ROS 水平进行检测, 结果发现 QEO 处理显著抑制了细胞氧化应激水平, 减少了 ROS 的表达量。NO 水平的升高可以促使 RAW264.7 细胞分泌促炎因子 TNF-α, 而 TNF-α 又可以调节 IL-6 和 IL-1β 细胞因子级联反应, 使细胞损伤级联效应放大, 加重炎症损伤^[22]。因此, 抑制炎症因子的过度释放是一种有效的抗炎方式。本研究发现 QEO 能够显著降低 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 等炎症因子的含量, 且呈浓度依赖性。此前高小力等^[23]的研究表明白

木香精油能够显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞模型中炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 的产生和释放,这与本研究中的 QEO 发挥抗炎效果的方式一致。此外,本研究发现 QEO 能够下调 P65 和 I κ B- α 蛋白的磷酸化水平,表示 QEO 具有使 P65 和 I κ B- α 的活化受到抑制的作用,说明 QEO 能够通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活,从而表现出良好的抗炎活性作用。

4 结论

综上所述,QEO 的挥发性成分有 2-(2-苯乙基)色酮、石竹素、绿叶烷、榄香醇、2-烯丙基-6-甲基苯酚等,且具有一定的抗氧化能力。生物信息学预测 QEO 与炎症共有 553 个交集靶点,且 QEO 发挥抗炎活性与 MAPK、NF- κ B、PI3K-Akt 等信号通路有关。此外,本研究揭示了 QEO 能够显著抑制由 LPS 诱导的过量 ROS 的产生,抑制 NF- κ B 信号通路的激活,进而抑制 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的大量产生,从而发挥抗炎活性的作用机制。本研究通过挥发性成分分析和分子细胞生物学的方法对 QEO 的抗炎活性进行了阐释,为进一步开发和高效利用奇楠沉香资源提供理论基础。

参考文献

- [1] MA S, FU Y L, LI Y J, WEI P L, LIU Z G. The formation and quality evaluation of agarwood induced by the fungi in *Aquilaria sinensis*[J]. Industrial Crops and Products, 2021, 173: 114129.
- [2] HASHIM Y Z H Y, KERR P G, ABBAS P, SALLEH H M. *Aquilaria* spp. (agarwood) as source of health beneficial compounds: a review of traditional use, phytochemistry and pharmacology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 189: 331-360.
- [3] WANG S, YU Z X, WANG C H, WU C M, GUO P, WEI J H. Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and *Aquilaria* plants[J]. Molecules, 2018, 23(2): 342.
- [4] 白发平, 靳若宁, 唐硕, 王琦, 黄晓德, 陈斌, 童黄锦. 中药沉香化学成分、药理作用及其应用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2022, 12(41): 61-66.
BAI F P, JIN R N, TANG S, WANG Q, HUANG X D, CHEN B, TONG H J. Research and development of chemical constituents and application of chinese medicine agarwood[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2022, 12(41): 61-66. (in Chinese)
- [5] 杨德兰. 绿奇楠致香成分研究和沉香品质价[D]. 海口: 海南大学, 2018.
YANG D L. Study on fragrant constituents in agarwood "Qi-Nan" and quality evaluation of agarwood[D]. Haikou: Hainan University, 2018. (in Chinese)
- [6] 来银芳, 丁宗妙, 华丽萍, 朱顺耀, 李晶晶, 石森林. 沉香大健康产品开发进展与展望[J]. 中草药, 2023, 54(4): 1342-1352.
LAI Y F, DING Z M, HUA L P, ZHU S Y, LI J J, SHI S L. Development and prospect of chinese medicine *Aquilaria sinensis* health products[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(4): 1342-1352. (in Chinese)
- [7] 张琳, 王昊, 董文化, 李薇, 云翠鸿, 袁靖喆, 蔡彩虹, 吴妃, 梅文莉, 戴好富, 李震宇. 栽培奇楠沉香化学成分及其抗炎活性研究[J]. 中草药, 2023, 3(54): 695-703.
ZHANG L, WANG H, DONG W H, LI W, YUN C H, YUAN J Z, CAI C H, WU F, MEI W L, DAI H F, LI Z Y. Chemical constituents from cultivated "Qi-Nan" agarwood and their anti-inflammatory activity[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 3(54): 695-703. (in Chinese)
- [8] 谷田, 彭海刚. 奇楠沉香挥发油化学成分分析[J]. 广东化工, 2012, 39(4): 256-258
GU T, PENG H G. Study on the chemical constituents of volatile oil from *Tagara* agarwood[J]. Guangdong Chemical Industry, 2012, 39(4): 256-258. (in Chinese)
- [9] 王雅丽, 李薇, 曾军, 董文化, 戴好富, 梅文莉. 栽培奇楠沉香精油中致香成分的 GC-MS 分析[J]. 中国热带农业, 2021(1): 90-97.
WNAG Y L, LI W, ZENG J, DONG W H, DAI H F, MEI W L. GC-MS analysis of the fragrant constituents in cultivated "Qi-Nan" agarwood essential oil[J]. China Tropical Agriculture, 2021(1): 90-97. (in Chinese)
- [10] 余珍. 人工栽培奇楠沉香香气成分及生物活性研究[D]. 宜昌: 三峡大学, 2023.
YU Z. Studies on the aroma components and biological activities of cultivated "Qi-Nan" agarwood[D]. Yichang: China Three Gorges University, 2023. (in Chinese)
- [11] 陈细钦, 王灿红, 冯剑, 陈德力, 魏健和, 刘洋洋. 6 种代表性沉香精油的化学成分及抗氧化、抗炎活性比较分析[J]. 中草药, 2022, 18(53): 5720-5730.
CHEN X Q, WANG C H, FENG J, CHEN D L, WEI J H, LIU Y Y. Comparative analysis of chemical constituents and anti-oxidant and anti-inflammatory activities of six representative agarwood essential oils[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 18(53): 5720-5730. (in Chinese)
- [12] WANG S L, TSAI Y C, FU S L, CHENG M J, CHUNG M I, CHEN J J. 2-(2-Phenylethyl)-4H-chromen-4-one derivatives from the resinous wood of *Aquilaria sinensis* with an-

- anti-inflammatory effects in LPS-induced macrophages[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 289.
- [13] YANG H R, WANG P, LIU F Z, YUAN J Z, CAI C H, WU F, JIANG B, MEI W L, DAI H F. Dimeric 2-(2-phenethyl)chromones from agarwood of *Aquilaria filaria*[J]. *Fitoterapia*, 2023, 165: 105422.
- [14] ZHONG J L, MUHAMMAD N, YANG X Y, LI J S. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory activities of eight essential oils obtained from traditional chinese medicines using supercritical fluid extraction coupled molecular distillation[J]. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2022, 25(5): 1145-1158.
- [15] KUNNUMAKKARA A B, SHABNAM B, GIRISA S, HARSHA C, BANIK K, DEVI T, CHOUDHURY R, SAHU H, PARAMA D, SAILO B L, THAKUR K K, GUPTA S C, AGGARWAL B B. Inflammation, NF- κ B, and chronic diseases: how are they linked?[J]. *Critical Reviews in Immunology*, 2020, 40(1): 1-39.
- [16] HU B, LING S J, LIU X, HUANG J B, CUI H, ZHAO Z X. Two new 2-(2-phenylethyl)chromone derivatives and two sesquiterpenes from agarwood of *Aquilaria sinensis* with anti-inflammatory activity[J]. *Fitoterapia*, 2024, 173: 105824.
- [17] LI W, YANG Y L, YANG L, WANG H, DONG W H, CAI C H, YUAN J Z, JIANG B, MEI W L, DAI H F. New sesquiterpenoids bearing 11-methyl ester group of agarwood[J]. *Fitoterapia*, 2020, 143: 104557.
- [18] YANG L, YANG J L, DONG W H, WANG Y L, ZENG J, YUAN J Z, WANG H, MEI W L, DAI H F. The characteristic fragrant sesquiterpenes and 2-(2-Phenylethyl)chromones in wild and cultivated "Qi-Nan" agarwood[J]. *Molecules*, 2021, 26(2): 436.
- [19] SINGH S, BHATT D, SINGH M K, MAURYA A K, ISRAR K M, CHAUHAN A, PADALIA R C, VERMA R S, BAWANKULE D. p-Menthadienols-rich essential oil from *Cymbopogon martini* ameliorates skin inflammation[J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(3): 895-905.
- [20] CHEN Y, FANG Z M, YI X, WEI X, JIANG D S. The interaction between ferroptosis and inflammatory signaling pathways[J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14(3): 205.
- [21] POMA P. NF- κ B and disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(23): 9181.
- [22] FACCHIN B M, REIS G O, VIEIRA G N, MOHR E T B, ROSA J S, KRETZER I F, DEMARCHI I G, DALMARCO E M. Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis[J]. *Inflammation Research*, 2022, 71(7/8): 741-758.
- [23] 高小力, 张倩, 霍会霞, 朱枝祥, 赵云芳, 屠鹏飞, 李军. 沉香精油通过抑制 p-STAT3 和 IL-1 β /IL-6 产生抗炎作用[J]. *中国药学杂志*, 2019, 23(54): 1951-1957.
- GAO X L, ZHANG Q, HUO H X, ZHU Z X, ZHAO Y F, TU P F, LI J. Anti-inflammatory effect of chinese agarwood essential oil via inhibiting p-STAT3 and IL-1 β /IL-6[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2019, 23(54): 1951-1957. (in Chinese)