



柑橘类黄酮对 Neuromedin U2 受体的 激活效应及 siRNA 干扰分析

王道庆², 郑旭煦^{1,2*}, 殷钟意¹, 郭莉霞¹, 邓小红¹, 陈刚¹

(1. 重庆工商大学 药物化学与化学生物学研究中心, 重庆 400067;

2. 重庆工商大学 环境与生物工程学院, 重庆 400067)

[摘要] 目的:利用 NMU2R 稳定细胞株和阴性细胞株并通过 siRNA 干扰分析筛选柑橘类黄酮中对 NMU2R 有激活效应的物质。方法:利用 NMU2R 细胞考察 9 种柑橘黄酮对 NMU2R 的激活效应,然后针对激活效应较高的柑橘类黄酮,分别用阴性细胞和 NMU2R 的 siRNA 干扰分析来排除假阳性干扰。结果:柑橘类黄酮中的橙皮苷和川陈皮素能有效激活 NMU2R,橙皮苷和川陈皮素的效能、半效浓度、效价强度分别为 4.688, 318.970 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 200.933 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 4.758, 5.832 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3.124 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:柑橘类黄酮中的橙皮苷和川陈皮素都对 NMU2R 有激活效应。川陈皮素的半效浓度较低,具有药用开发价值。

[关键词] NMU2R;激动剂;橙皮苷;川陈皮素;小干扰 RNA

柑橘类黄酮是一系列具有显著生物活性的黄酮类化合物,主要来自于芸香科柑橘属植物及其栽培变种的果实或果皮中。大多数柑橘类黄酮都有着显著的药理作用,如柑橘皮总黄酮可拮抗大鼠佐剂性关节炎的发展^[1],橙皮苷有抗炎^[2]、抗氧化^[3]、保护心血管系统^[4]等作用,柚皮苷具有降血脂^[5]、抗癌^[6]等功效,川陈皮素能够促进脂质代谢与血糖的代谢^[7]。Neuromedin U (NMU) 是一种神经调节肽,广泛分布在下丘脑、垂体、胃肠道以及泌尿生殖系统,具有刺激平滑肌收缩、抑制摄食、调节能量平衡、抑制胃酸分泌、延缓胃排空和参与下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节等多种功能^[8-9]。在国内,本课题组首次^[10]在细胞水平上建立了 NMU2R 激动剂的报告基因筛选模型 (NMU2R/pcDNA3.1(+)-3 × CRE/3 × MRE/SRE-LUC/pGL3),该模型在受到 NMU2R 激动剂刺激后能剂量依赖地表达荧光素酶^[10],并从天然药物提取物中发现一些黄酮苷类化合物(淫羊藿苷等)能激活 NMU2R^[11];前期研究测定了一些黄酮苷类化合物在细胞水平上激活 NMU2R 表达的 EC₅₀

值^[12],但未验证这些黄酮苷类化合物在细胞水平上的激活效应是否是真阳性。本研究应用 NMU2R 激动剂的报告基因筛选模型,对 9 种柑橘类黄酮化合物进行了筛选,发现柑橘类黄酮中的橙皮苷和川陈皮素能够有效激活 NMU2R,并分别测定了它们的效能、半效浓度及效价强度;最后通过 NMU2R 的 siRNA 干扰分析,验证了橙皮苷和川陈皮素的生物活性非假阳性。

1 材料

1.1 试剂 FBS, DMEM (Hyclone 公司);新橙皮糖苷、野漆树苷、柚皮苷二氢查耳酮、新橙皮苷二氢查耳酮、新橙皮苷、柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素 (Dr. Ehrenstorfer 公司);山羊抗 NMUR2 (N-12), 鼠抗 β -actin 一抗以及 HRP 标记的抗山羊、抗鼠二抗 (Santa Cruz Biotechnology 公司); LipofectamineTM 2000 转染试剂 (Invitrogen 公司); ECL advance (Amersham 公司); PVDF 膜 (Millipore 公司); G418 (Calbiochem 公司); Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega 公司); NMU, Forskolin (Sigma 公司), MTT, DMSO, 青霉素, 链霉素等化学试剂 (Amersco 公司)。

1.2 仪器 DRP-9082 型电热恒温培养箱 (上海森信实验仪器有限公司); Reporter 检测系统 (Turner Design); 细胞培养瓶、96 孔分析板 (Corning Costar); -20, -70 °C 冰箱;液氮生物容器;倒置显微镜。

[稿件编号] 20120308005

[基金项目] 重庆高校优秀成果转化项目 (KJZH11212);重庆高校创新团队建设计划 (KJTD201020)

[通信作者] * 郑旭煦, 博士, 教授, 主要从事生物资源与天然药物研究, E-mail: xuxuzheng@ctbu.edu.cn



1.3 材料 NMU2R 细胞株、报告基因质粒(华东师范大学胡应和教授赠送); HEK293 细胞株、pcDNA3.1(+)载体质粒(中国人民解放军第三军医大学赠送)。

2 方法

2.1 阴性细胞构建 阴性细胞株是 pCDNA3.1(+)质粒和报告基因质粒(3 × MRE/3 × CRE/SRE-Luciferase/pGL3)共转染到 HEK293 细胞所得到的瞬时转染细胞株。用含 10% FBS 的 H-DMEM 培养液(pH 7.4),在 37 °C,5% CO₂ 孵箱中培养 HEK293 细胞。细胞达到 70% ~ 90% 融合后,2.5 g · L⁻¹ 胰酶消化,收集细胞并传代于 6 孔板中,接种密度约 1 × 10⁵ ~ 4 × 10⁵ 个/mL,待细胞达 90% ~ 95% 融合度后,用 lipofectamine™ 2000 按 1:5 的比例共转染 pCDNA3.1(+)载体质粒和报告基因质粒(3 × MRE/3 × CRE/SRE-Luciferase/pGL3)。转染 24 h 后,收集细胞,进行荧光素酶响应试验。

2.2 siRNA 干扰 NMU2R 表达 根据 NMU2R (AF272363) 基因信息,设计 2 条针对 NMU2R (AF272363) 基因 CDs 区的 siRNA 序列,序列如下: NMU2R-1 (487, GCGCAACTACCCTTCTTGTT, 47.6%); NMU2R-2 (790, GCCCATGTGGATCTCAATTT, 42.9%)。NMU2R 细胞培养基选用补加体积分数为 10% 的胎牛血清的 H-DMEM 培养基(pH 7.4),细胞于 37 °C,5% CO₂ 孵箱中培养。转染前 1 d,取对数生长期的 NMU2R 细胞,接种密度约 1 × 10⁵ ~ 4 × 10⁵ 个/mL,待细胞达 30% ~ 50% 融合度后,用所得的 2 条 siRNA 质粒分别转染细胞。当 siRNA 转染 24 h 后,提取蛋白或收集细胞接入 96 孔板,分别进行 Western blot 试验或荧光素酶响应试验。

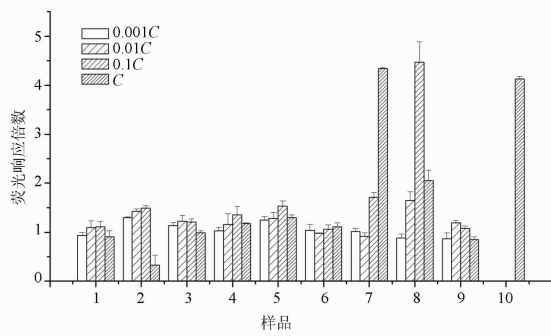
2.3 荧光素酶响应试验 用含 3% 血清的 DMEM 分别收集融合度达到 70% ~ 90% 的 NMU2R 细胞、转染 24 h 后的阴性细胞和 siRNA 干扰 24 h 后的 NMU2R 细胞,接种于 96 孔板中,细胞数约为每孔 2 × 10⁴ ~ 5 × 10⁴ 个,孵育过夜;然后,分别向每个孔中加入待测样品组、待测样品 + Forskolin 组、Forskolin 对照组、NMU 对照组、空白对照组,每组 3 个复孔,培养 6 ~ 8 h 后,向每孔中加入与培养液同体积的 0.5 × Bright-Glo™ 底物试剂,并用荧光检测仪测定荧光素酶响应信号值。

2.4 Western blot 试验 将提取的蛋白用 SDS-PAGE 分离后,转印到 PVDF 膜上,随后用 5% 脱脂

奶粉的 TBST 室温封闭 1 h,然后直接用山羊抗 NMU2R 一抗 4 °C 孵育 12 h,抗体用封闭液稀释约 5 000 倍,TBST 漂洗 3 次,每次 15 min;再用 HRP 标记的二抗继续孵育 1 h,抗体用封闭液稀释约 8 000 倍。在显影之前用 TBST 漂洗 3 次,每次 15 min;再用 HRP 底物(Millipore)室温孵育 5 min 后,暗室显影。将显影后的 PVDF 膜继续用 β-actin 一抗及对应二抗再次进行上述实验,再次显影后,以 β-actin 蛋白为内参,通过条带的吸光度差异,分析 2 条 siRNA 干扰效率。

3 结果

3.1 柑橘类黄酮的荧光素酶活性分析 本文以荧光素酶响应倍数(待测样品 + Forskolin 组响应值除以 Forskolin 对照组响应值)大于 2 为活性判断基准^[10]。对不同浓度的新橙皮糖苷、野漆树苷、柚皮苷二氢查耳酮、新橙皮苷二氢查耳酮、新橙皮苷、柚皮苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素的水溶液进行 NMU2R 细胞株荧光素酶响应实验,同时用 NMU2R 的内源配体 NMU 对照组(5 μmol · L⁻¹)作对照组。500 mg · L⁻¹ 的橙皮苷溶液作用于 NMU2R 细胞时,其荧光响应值倍数明显大于 2;5,50 mg · L⁻¹ 的川陈皮素溶液也能明显引起荧光素酶响应,但是高浓度的川陈皮素的荧光响应倍数反而下降,即 NMU2R 细胞对高浓度川陈皮素产生了药物抵抗,推测川陈皮素的有效浓度范围在一个较低的水平;另外,除橙皮苷和川陈皮素以外的其他柑橘类黄酮对荧光素酶的激活效应却不显著,见图 1。



1. 新橙皮糖苷;2. 野漆树苷;3. 柚皮苷二氢查耳酮;4. 新橙皮苷二氢查耳酮;5. 新橙皮苷;6. 柚皮苷;7. 橙皮苷;8. 川陈皮素;9. 橘皮素;10. 神经介素 U;其中 1 ~ 7,9 号样品的最高质量浓度为 500 mg · L⁻¹,8 号样品的最高质量浓度为 50 mg · L⁻¹,10 号样品的最高浓度为 5 μmol · L⁻¹;由于某些样品溶解度较低,所有样品均用 1% 的羧甲基纤维素钠溶液助溶。

图 1 柑橘类黄酮化合物的荧光素酶活性

Fig. 1 The luciferase activity of citrus flavonoids

同时,根据图 1 结果可知,500 mg · L⁻¹ (约 818 μmol · L⁻¹) 的橙皮苷和 5 mg · L⁻¹ (约 12.5 μmol · L⁻¹) 的川陈皮素都有较高的荧光响应活性,因此分别将 818 μmol · L⁻¹ 的橙皮苷和 12.5 μmol · L⁻¹ 的川陈皮素加入培养有阴性对照细胞株的 96 孔板中,并以空白和 NMU (5 μmol · L⁻¹) 阳性药为对照,进行荧光响应检测,见图 2。NMU 组和空白对照组接近,表明阴性细胞株不能表达 NMU2R;且在样品组、样品 + Forskolin 组的检测中,橙皮苷和川陈皮素的荧光素酶响应值与 NMU 对照组及空白对照组相比,也没有明显差异。

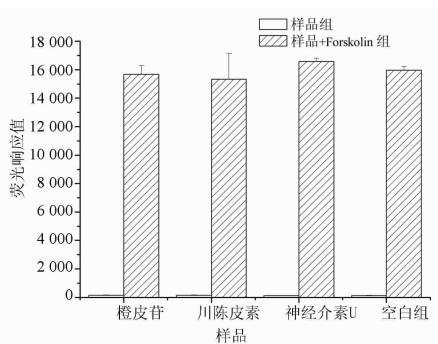
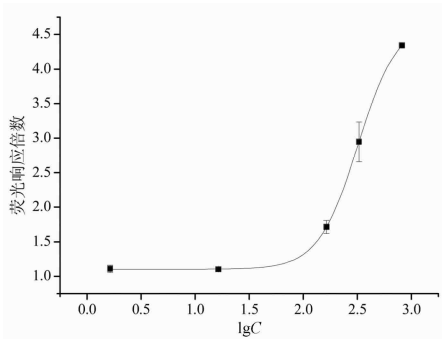


图 2 阴性细胞株中样品对荧光素酶的激活效应
Fig. 2 The luciferase activity of samples in negative cell line

综上所述,橙皮苷和川陈皮素在 NMU2R 细胞株中能明显引起荧光素酶响应,而在阴性细胞株中却不能引起荧光素酶响应。提示橙皮苷和川陈皮素的荧光响应活性可能是由 NMU2R 介导的,即橙皮苷和川陈皮素可能对 NMU2R 具有激活效应。

3.2 橙皮苷和川陈皮素的效能、半效浓度及效价强度测定 为求出橙皮苷和川陈皮素可产生的最大激活效应——效能 (efficacy)、半数有效浓度 (EC₅₀) 及药物激活效应 (响应倍数) 为 2 时的效价强度 (potency), 该研究对不同浓度的橙皮苷和川陈皮素的 NMU2R 活性进行了检测, 将药物浓度 (x) 取对数 (lgC) 及荧光素酶响应倍数 (y) S 曲线拟合, 见图 3, 4, 并得到曲线关系式①, ②, 由关系式①, ②求出橙皮苷和川陈皮素的效能、半数有效浓度及效价强度, 见表 1。橙皮苷和川陈皮素产生的效能均较大, 且两者相差不大; 但 2 种样品的半效浓度与效价却有相差很大, 橙皮苷

的半效浓度与效价远远高于川陈皮素, 即川陈皮素效价强度较大。



C 的单位是 μmol · L⁻¹ (图 4 同)。
图 3 不同浓度橙皮苷的荧光素酶激活效应
Fig. 3 The luciferase activity of hesperidin

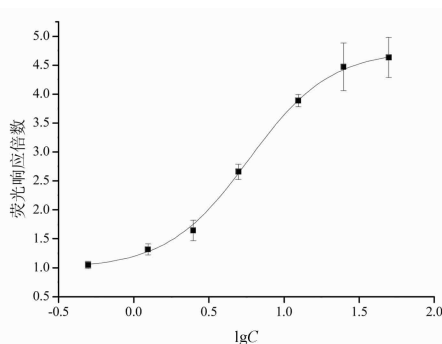


图 4 不同浓度川陈皮素的荧光素酶激活效应
Fig. 4 The luciferase activity of nobiletin

$$y = 4.688 - \frac{3.586}{1 + \exp\left(\frac{x - 2.504}{0.183}\right)} \dots \text{式①}$$

$$y = 4.758 - \frac{3.773}{1 + \exp\left(\frac{x - 0.766}{0.271}\right)} \dots \text{式②}$$

表 1 样品的效能、半效浓度及效价强度
Table 1 The efficacy, EC₅₀ and potency of the samples

样品	效能	EC ₅₀ /μmol · L ⁻¹	效价强度/μmol · L ⁻¹
橙皮苷	4.688	318.970	200.933
川陈皮素	4.758	5.832	3.124

3.3 橙皮苷和川陈皮素的激活效应验证 siRNA 的干扰效率分析: 提取用 siRNA 转染 24 h 的 NMU2R 细胞和正常 NMU2R 细胞中的蛋白质, 用 Western blot 方法分析每个细胞中 NMU2R 蛋白和 β-actin 蛋白的表达水平。然后, 用 β-actin 作为内参,

以正常的 NMU2R 细胞为对照,通过条带的吸光度差异,分析 2 条 siRNA 的干扰效率,见图 5。NMU2R-1 序列(487, GCGCAACTACCCCTTTCTTGTT)和 NMU2R-2 序列(790, GCCCATGTGGATCTCAATTT)都能有效干扰 NMU2R 细胞中 NMU2R 的表达,但 NMU2R-1 序列的干扰效果优于 NMU2R-2 序列。为此,橙皮苷和川陈皮素的激活效应验证选用 NMU2R-1 序列的 siRNA 进行干扰分析。

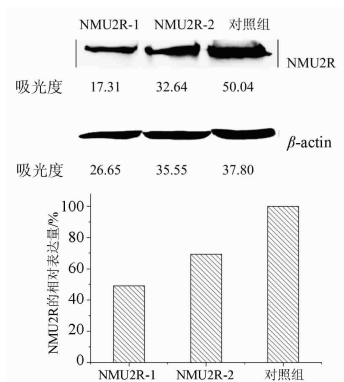


图 5 Western blot 实验结果

Fig. 5 The results of Western blot

siRNA 对样品的干扰分析:以 NMU2R 细胞株作对照,收集用 NMU2R-1 序列的 siRNA 干扰了 24 h 的 NMU2R 细胞,接入 96 孔板,分别用橙皮苷($818 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、川陈皮素($12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 NMU($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)进行 NMU2R 细胞株荧光素酶响应检测,测得荧光响应倍数见表 2。经 siRNA 干扰后的 NMU 组的荧光素酶响应值明显低于未被干扰的 NMU 对照组的响应值且差异具有显著性,表明 NMU2R-1 序列的 siRNA 能够有效干扰 NMU2R 的表达。就橙皮苷和川陈皮素而言,干扰组的荧光素酶响应值明显低于未被干扰组的响应值,而且由 P 可知,2 组的荧光响应倍数的差异具有显著性。提示橙皮苷或川陈皮素在 NMU2R 细胞株中引起的荧光素酶响应与 NMU2R 通路相关。

表 2 siRNA 干扰对样品的荧光素酶活性的影响

Tabel 2 The effects of siRNA interference in the luciferase activity of samples

样品	NMU2R-1 干扰组	对照组	P
橙皮苷	1.871	2.530	0.003 14

川陈皮素	1.572	2.949	0.000 00
NMU	5.624	7.040	0.023 09

4 讨论

以 MRE, CRE 和荧光素酶(luciferase)为报告基因的 NMU2R 激动剂高通量筛选细胞株,当配体与 NMU2R 受体相结合时,细胞产生响应 MRE 和 CRE 的第 2 信使, MRE, CRE 和 luciferase 响应信号通路被激活,荧光素酶报告基因响应这种信号,最终导致荧光素酶表达发生变化^[10],并且这种变化在一定范围内与配体成量效关系。通过检测细胞中荧光素酶的表达量,可以评估配体的功能性作用和进行高通量筛选。本研究首先对 9 种黄酮类化合物进行检测,通过与阴性细胞株检测结果比较,得到橙皮苷和川陈皮素可能对 NMU2R 有激活效应。

由于影响 MRE, CRE 和 luciferase 响应信号通路的因素很多,可能出现未通过 NMU2R 通路但通过其他方式引起报告基因表达的现象,造成假阳性。阴性细胞株只能通过反面证明橙皮苷和川陈皮素激活 NMU2R 细胞中的报告基因可能与 NMU2R 有关,却不能证明是否真正通过了 NMU2R 通路。因此,本研究构建了能够干扰 NMU2R 表达的 siRNA,检测了 siRNA 干扰对橙皮苷和川陈皮素与荧光素酶响应表达的影响,从而确定橙皮苷和川陈皮素在 NMU2R 细胞株中引起的荧光素酶响应与 NMU2R 通路相关。

总之,该研究利用 NMU2R 激动剂的报告基因筛选模型,从柑橘类黄酮中筛选出 2 种对 NMU2R 受体有激活效应的物质——橙皮苷和川陈皮素,而且在一定浓度范围内橙皮苷和川陈皮素都具有较高的效能。川陈皮素的半效浓度较低,具有药用开发价值。

[参考文献]

- [1] 陈刚,殷钟意,郑旭煦. 柑橘类总黄酮对大鼠佐剂性关节炎的影响及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(10): 1298.
- [2] Teresita G, Alejandra E R, Americo O J, et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat[J]. IL Farmaco, 2001, 56(9): 683.
- [3] Jungsook Cho. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin[J]. Arch Pharm Res, 2006, 29(8): 699.

- [4] Yamamoto M, Suzuki A, Hase T. Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2008, 54(1) : 95.
- [5] Shin Y W, Bok S H, Jeong T S, et al. Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats[J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 1999, 69(5) : 341.
- [6] Ganapathy E, Peramaiyan R, Venkataraman E, et al. Naringenin reduces tumor size and weight lost in *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats[J]. *Nutr Res*, 2008, 28(2) : 106.
- [7] Kazuhiro K, Sachi K, Nobuyasu M, et al. Identification of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, as an enhancer of adiponectin secretion[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(7) : 2062.
- [8] Brighton P J, Szekeres P G, Willars G B. Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles[J]. *Pharmacol Rev*, 2004, 56(2) : 231.
- [9] Budhiraja S, Chugh A. Neuromedin U: physiology, pharmacology and therapeutic potential[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2009, 23(2) : 149.
- [10] 郑旭煦, 欧阳克清, 高虹, 等. 神经介素 NMU2R 受体激动剂的高通量筛选模型研究[J]. *中国药理学杂志*, 2004, 29(3) : 185.
- [11] Zheng X X, Hu Y H, Liu J H, et al. Screening of active compounds as neuromedin U2 receptor agonist from natural products[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005(15) : 4531.
- [12] Fang L Y, Zhang M C, Li C X, et al. Chemical genetic analysis reveals the effects of NMU2R on the expression of peptide hormones[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 404 : 148.

Activating effect of citrus flavonoids on Neuromedin U2 receptor and analysis on siRNA interference

WANG Dao-qing², ZHENG Xu-xu^{1,2*}, YIN Zhong-yi¹, GUO Li-xia¹, DENG Xiao-hong¹, CHEN Gang¹

(1. *Research Center of Medicinal Chemistry and Chemical Biology, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China;*

2. *Environmental and Biological College, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To screen out active substances on Neuromedin U2 receptor (NMU2R) by using stable NMU2R cell lines and negative cell lines and analyzing siRNA interference. **Method:** NMU2R cells were used to observe the activating effect of nine citrus flavonoids on NMU2R cell. Afterwards, false-positive interference of citrus flavonoids that showed higher activating effect was eliminated by using negative cells and analyzing the efficiency of siRNA interference. **Result:** Hesperidin and nobiletin contained in citrus flavonoids were found to effectively activate NMU2R. The efficacy, EC_{50} and potency values of hesperidin were 4.688, 318.970 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 200.933 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, while the efficacy, EC_{50} and potency values of nobiletin were 4.758, 5.832 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 3.124 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** Hesperidin and nobiletin contained in citrus flavonoids can activate NMU2R. Nobiletin shows such a low EC_{50} that it has medicinal value.

[**Key words**] NMU2R; agonist; hesperidin; nobiletin; siRNA

doi:10.4268/cjcm20122224

[责任编辑 张宁宁]