DOI:10.12441/spyswjs.20241231001 [文章编号] 1673-1689(2025)07-0051-13

黄酮类化合物对特应性皮炎中 IL-4/IL-13 的调节作用及构效关系

王悦媛[1,2] 刘 静[1,2] 李 琛[1,3] 陈凤凤[1,2] 杨 成[1,2*] 赵炳天[1,2]

(1. 江南大学化学与材料工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学合成与生物胶体教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 3. 玉溪师范学院化学生物与环境学院,云南 玉溪 653100)

摘要:【目的】探究黄酮类化合物对特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)的改善作用及其构效关系。**【方法】**以白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)和白细胞介素-13(interleukin-13,IL-13)为关键靶点,通过网络药理学筛选黄酮类化合物。在免疫球蛋白 E(immunoglobulin E,IgE)介导的 RBL-2H3 细胞模型中,评价其对炎症因子、细胞脱颗粒活性和钙离子内流的影响,并分析构效关系,最后利用分子对接技术辅助探究其作用机制。**【结果】**网络药理学筛选出的 6 种黄酮类化合物(木犀草素、芹菜素、白杨素、槲皮素、山柰酚、漆黄素)均能够显著抑制 IL-4、IL-13、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)的表达、细胞脱颗粒和钙离子内流。其中 C-5 位含有羟基、C-3 和 C-3'位无羟基的黄酮类化合物(芹菜素和白杨素)的抑制活性最强。C 环的 C-3 位无羟基的黄酮类化合物(木犀草素、芹菜素、白杨素)与 PLCγ、Lyn、ERK 等信号通路有较强的结合能。**【结论】**该研究为开发具有预防和改善 AD 效果的膳食疗法开辟了新思路。

关键词:特应性皮炎;RBL-2H3 细胞;构效关系;黄酮;网络药理学

Modulatory Effects of Flavonoids on IL-4/IL-13 in Atopic Dermatitis and Their Structure-activity Relationships

WANG Yueyuan[1,2] *LIU Jing*[1,2] *LI Chen*[1,3] *CHEN Fengfeng*[1,2] *YANG Cheng*[1,2*] *ZHAO Bingtian*[1,2]

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Chemistry, Biology and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to explore the ameliorating effects of flavonoids on atopic dermatitis (AD) and their structure-activity relationships. [**Method**] Flavonoids were selected through network pharmacology with interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) as key targets. The immunoglobulin E (IgE)-induced RBL-2H3 cell model was employed to evaluate the effects of flavonoids on inflammatory factors, degranulation activities, and calcium ion influx, and the structure-activity relationships were analyzed. Finally, molecular docking was utilized to assist in exploring the action mechanism. [**Result**] All of the six flavonoids (luteolin, apigenin, chrysin, quercetin, kaempferol, and fisetin) screened by network pharmacology had significant inhibitory effects on the expression of IL-4, IL-13, tumor necrosis factor-α (TNF-α), cell degranulation, and calcium ion influx. Among them, flavonoids with a hydroxyl group at the C-5 position and without hydroxyl groups at the C-3 and C-3' positions (apigenin and chrysin) exhibited the strongest inhibitory activities. Flavonoids without a hydroxyl group at the C-3 position of the C ring (luteolin, apigenin, and chrysin)

基金项目:云南省地方本科高校基础研究联合专项面上项目(202301BA070001-086)。

通信作者:杨成(1970—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事皮肤生理学研究。E-mail:cyang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-12-31 **修回日期:**2025-03-19

had relatively strong binding energy with signal pathways such as PLCγ, Lyn, and ERK. [**Conclusion**] This study provided new ideas for the development of dietary therapies for preventing and ameliorating AD.

Keywords: atopic dermatitis; RBL-2H3 cell; structure-activity relationship; flavonoid; network pharmacology

AD是一种常见的皮肤病，具有慢性、复发性和炎症性三大特点。近年来，AD的患病率在全球范围内呈显著上升趋势，约有20%儿童和10%成人受AD影响[1-2]。AD的临床症状主要表现为湿疹样病变，并伴有皮肤干燥和剧烈瘙痒，部分患者的皮肤还会出现皲裂、血痂等，可能会导致患者睡眠障碍、焦虑、抑郁、注意力缺陷等[3-4]问题。

AD的发病机制错综复杂，主要涉及微生物菌群失衡、免疫失调和皮肤屏障功能障碍等[5]。过敏原是AD发病的重要诱因之一，过敏原进入患者体内后，激活肥大细胞后发生脱颗粒反应，并释放多种炎症因子，如IL-4、IL-13、TNF-α等[6-8]。其中，IL-4和IL-13是AD的关键细胞因子，其表达水平升高会诱发Th2型免疫反应和神经源性瘙痒，增加患者搔抓行为，破坏皮肤屏障，从而加重AD症状[9-11]。

目前糖皮质激素是治疗AD的一线临床药物，但长期大量使用会引起皮肤萎缩、毛细血管扩张等不良反应。与此同时，口服抗组胺药也是治疗AD的常用手段之一，虽然可有效抑制过敏反应，但会对人体消化系统和肝肾功能产生不良影响[12]。在当前针对AD开发的新靶点类药物中，度普利尤单抗作为一种通过抑制IL-4/IL-13信号传导来起效的生物制剂，虽已在临床上已取得良好的疗效，但高昂的价格限制了其广泛应用[13]。因此，寻找绿色安全、价格低廉的天然成分作为AD的辅助疗法尤为重要。

黄酮类化合物是饮食中含量最丰富的天然酚类化合物，广泛存在于水果、蔬菜、坚果、谷物和茶叶中，已被证实具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种生物活性，是营养保健和疾病预防的重要膳食补充剂[14-16]。据报道，在食用富含类黄酮的素食2个月后，AD患者的疾病严重程度显著降低[17]。将黄酮类化合物与传统药物联合用于AD治疗，能够降低皮质醇使用量，并对AD相关的伴发疾病（如心理障碍）有抑制作用[18]。Hou等[19]研究发现，在TNF-α和干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）刺激的人永生化角质形成细胞（HaCaT）AD模型中，杨梅素可通过抑制NF-κB和STAT1信号通路发挥抗炎效果，并在卡泊三醇（MC903）诱导的AD小鼠模型中验证了杨梅素的治疗效果。Yoo等[20]研究表明，在1-氯-2，4-二硝基苯（DNCB）诱导的小鼠AD模型中，柚皮素能够通过抑制JAK-STAT信号通路来缓解小鼠AD症状。综上所述，黄酮类单体在治疗AD方面有广阔的应用前景。

传统的化合物筛选手段成本高、周期长且工作量大。随着生物信息学、系统生物学和药理学的快速发展，网络药理学成为了药物筛选和开发的前沿技术，推动了药物研发模式从传统的“一个分子、一个靶点、一种疾病”向新型“网络多靶点”模式转变[21]。分子对接技术是通过结构分析来模拟药物与靶点的相互作用，有助于药物有效成分的快速筛选和机制研究[22]。

作者针对AD的关键靶点IL-4和IL-13，运用网络药理学筛选出6种结构相似的黄酮类化合物，并在IgE介导的RBL-2H3细胞AD模型上进行验证，最后结合分子对接技术分析6种黄酮类化合物与疗效之间的构效关系，为开发预防和治疗AD的膳食辅助疗法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠嗜碱性粒细胞性白血病细胞（RBL-2H3，BNCC100222）：北纳创联生物技术有限公司；胎牛血清：新西兰Newzerum公司；MEM培养基、PBS缓冲液、青霉素-链霉素双抗、胰蛋白酶溶液：美国Gibco公司；ELISA试剂盒（IL-4、IL-13、TNF-α）：美国SAB公司；ELISA试剂盒（组胺）：武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（pH 4.5）：上海源叶生物科技有限公司；钙离子荧光探针（Fluo-3 AM）：上海碧云天生物技术股份有限公司；3-（4，5-二甲基噻唑-2）-2，5-二苯基四氮唑溴盐（methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide，MTT）（纯度≥98%）、抗二硝基苯（anti-dinitrophenol，anti-DNP）-IgE、4-硝基苯基-*N*-乙酰-*β*-*D*-氨基葡萄糖苷（纯度≥99%）：美国Sigma公司；

二硝基苯-牛血清蛋白质（2，4-dinitrophenyl-bovine serum albumin，DNP-BSA）：英国Biosearch Technologies公司；木犀草素（纯度≥98%）、芹菜素（纯度≥98%）、白杨素（纯度≥98%）、槲皮素（纯度≥98%）、山柰酚（纯度≥98%）、漆黄素（纯度≥98%）：上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

多功能酶标仪：Synergy-H1型，美国Biotek公司；低温离心机：MPW-325R型，波兰MPW公司；激光共聚焦显微镜：LSM710型，德国蔡司公司；微量分光光度计：Nano-300型，杭州奥盛仪器有限公司；实时荧光定量PCR仪：7500型，美国Applied Biosystems公司。

1.3 方法

1.3.1 网络药理学筛选

采用中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP），以IL-4和IL-13为关键靶点，设置类药性≥0.18[21]，筛选出对AD具有潜在抑制活性的黄酮类化合物。以6种黄酮类化合物为检索词，收集其相关靶点；在GeneCard数据库和Therapeutic Target Database数据库中以AD为检索词，收集疾病相关靶点并进行合并与去重；在国际通用的Uniprot蛋白质数据库中，对所有靶点进行标准化处理。利用Venny2.1.0在线平台，取6种黄酮类化合物与AD的交集靶点，分别导入STRING数据库构建蛋白质间的相互作用网络（protein-protein interaction，PPI），限定物种为“智人”，置信度≥0.70，并去除无相互关联的节点，再分别导入Cytoscape软件，利用软件中的“CytoNCA”分析PPI网络中各靶点的拓扑学参数。通过计算节点的连接度（Degree值）量化靶点在网络中的重要性，Degree值越大，则该靶点在网络中作用越强。筛选出各个黄酮类化合物的核心靶点，绘制出“疾病-药物-靶点”网络图。

1.3.2 RBL-2H3细胞培养及细胞毒性测定

将RBL-2H3细胞培养于含体积分数15%的胎牛血清和体积分数1%的青霉素-链霉素双抗的MEM完全培养基中，于37 ℃、体积分数5%的CO_2恒温细胞培养箱中培养，待细胞密度为80%~90%时按照1∶3的比例进行传代培养。

采用MTT法评估6种黄酮类化合物对RBL-2H3细胞的毒性。取对数生长期的RBL-2H3细胞制成细胞悬浮液，以1×10^5个/mL的密度接种至96孔板中，每孔加100 μL细胞悬液，在37 ℃、体积分数5%的CO_2培养箱中培养24 h，用PBS清洗2次，然后加入100 μL MEM基础培养基配制的待测样品。将样品置于培养箱中孵育24 h，用PBS清洗2次，再加入100 μL MEM基础培养基配制的0.5 mg/mL的MTT溶液，在培养箱中反应4 h，弃上清液，然后加入100 μL二甲基亚砜溶液，混匀后在490 nm处测定吸光度，通过吸光度差异计算细胞存活率。

1.3.3 RBL-2H3细胞中炎症因子释放量的测定

取对数生长期的RBL-2H3细胞制成细胞悬浮液，以4×10^5个/mL的密度接种于6孔板中，每孔加入1.5 mL细胞悬液，置于37 ℃、体积分数5%的CO_2培养箱中。待细胞贴壁且汇合度达80%后，用PBS清洗2遍，除对照组外，其他组加入1.5 mL含0.5 μg/mL DNP-IgE的MEM基础培养基孵育过夜。用PBS清洗2遍，样品组加入MEM基础培养基配制的黄酮类化合物（浓度分别为1.25、2.50、5.00 μmol/L），每孔1.5 mL，对照组和模型组加入等量MEM基础培养基，培养箱培养6 h。随后加入终质量浓度为0.5 μg/mL的DNP-BSA孵育4 h，孵育结束后，冰浴10 min终止反应。收集细胞上清液于EP管中，在4 ℃、14 000 r/min条件下离心5 min，收集上清液用于后续试验。按照ELISA试剂盒说明书测定上清液中TNF-α、IL-4、IL-13的质量浓度。

1.3.4 RBL-2H3细胞中炎症因子基因mRNA表达量的测定

按照1.3.3中的步骤对细胞进行处理，其中黄酮类化合物浓度为5.0 μmol/L。终止反应后，去除上清液并用PBS清洗2遍，在低温下用细胞刮刀收集细胞于全新EP管中。用Trizol法提取细胞总RNA并测定其浓度。根据反转录试剂盒操作说明将RNA反转录为cDNA，以cDNA为模板进行RT-PCR扩增。以*GAPDH*为内参，采用$2^{-\Delta\Delta C_t}$法计算目的基因mRNA相对表达量，基因引物序列见表1。

表 1 引物序列表

Table 1 List of primer sequences

目的基因	引物方向	序列（5′—3′）
GAPDH	正向	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG
	反向	CACGACATACTCAGCACCAGCA
IL-4	正向	AACACTTTGAACCAGGTCACAGAA
	反向	CTTCAAGCACGGAGGTACATCA
IL-13	正向	CCAGTGCGGAGATCCACATC
	反向	TCAGGTCCACGCTCCATACC
TNF-α	正向	GGTCCCAACAAGGAGGAGAAGT
	反向	CGCTTGGTGGTTTGCTACGA

1.3.5 甲苯胺蓝法观察细胞形态

取对数生长期的 RBL-2H3 细胞制成细胞悬浮液，以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板中，每孔加入 100 μL 细胞悬液，置于 37 ℃、体积分数 5% 的 CO_2 培养箱中培养 12 h。当细胞贴壁且汇合度达 50% 后，用 PBS 清洗 2 遍，加入质量浓度为 0.5 μg/mL 的 DNP-IgE 孵育过夜。用 PBS 清洗 2 遍，样品组每孔加入浓度为 5.0 μmol/L 的黄酮类化合物 100 μL，对照组和模型组加入等量的 MEM 基础培养基后孵育 6 h。加入终质量浓度为 0.5 μg/mL 的 DNP-BSA 孵育 4 h，冰浴 10 min 终止反应，去除上清液，用 PBS 清洗 2 遍，每孔加入 100 μL 质量分数 4% 的多聚甲醛溶液固定，20 min 后弃上清液，再加入质量分数 1% 的甲苯胺蓝染剂染色 10 min，用 PBS 洗去多余染剂，置于显微镜下观察并拍照记录形态变化。

1.3.6 RBL-2H3 细胞中 *β*-氨基己糖苷酶和组胺释放量的测定

按照 1.3.3 对细胞进行处理，移取 50 μL 各组细胞上清液于 96 孔板中，随后每孔加入 50 μL 显色液（0.1 mmol/L 的 4-硝基苯基-*N*-乙酰-*β*-*D*-氨基葡萄糖苷溶液，溶质为柠檬酸钠缓冲溶液），37 ℃ 孵育 1.5 h，加 100 μL 终止液终止反应，使用酶标仪在 405 nm 处测量吸光度，计算 *β*-氨基己糖苷酶（*β*-hexosaminidase，*β*-hex）的释放率。用 ELISA 试剂盒测定上清液中组胺的释放量。

1.3.7 细胞内钙离子的测定

取对数生长期的 RBL-2H3 细胞制成细胞悬浮液，以 1×10^5 个/mL 接种于共聚焦小皿，每皿加入 1 mL，在 37 ℃、体积分数 5% 的 CO_2 条件下培养 24 h。用 PBS 洗 2 遍，除正常对照组外，其他组加入 1.5 mL 含 0.5 μg/mL DNP-IgE 的 MEM 基础培养基孵育过夜。用 PBS 洗 2 遍，样品组每孔加入 5.0 μmol/L 的黄酮类化合物 1.5 mL，对照组和模型组加入等量 MEM 基础培养基，孵育 6 h。用 PBS 洗 2 遍，加入 1 mL 浓度为 5.0 μmol/L 的 Fluo-3 AM，孵育 30 min。用 PBS 洗 2 遍，充分去除残留的 Fluo 3 AM 工作液，随后加入 0.5 μg/mL 的 DNP-BSA，并用激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子荧光强度。

1.3.8 分子对接

配体分子（木犀草素、芹菜素、白杨素、槲皮素、山柰酚、漆黄素）的三维结构从 PubChem 数据库获取，将文件保存为 sdf 格式，输入 Open Babel 软件，输出为 pdb 格式。蛋白质的三维结构通过 PDB 数据库检索获得：Syk（PDB ID：4PUZ）[23]、Lyn（PDB ID：5XY1）、PLCγ（PDB ID：5EG3）[24]、PI3K（PDB ID：1E7U）[25]、AKT（PDB ID：3QKM）[26]、JNK（PDB ID：4Y5H）[27]、ERK（PDB ID：5NGU）[28]、p38（PDB ID：1CM8）[29]，使用 Pymol（Ver. 2.6）去除受体蛋白质结构中的水分子，将共结晶中的抑制剂、离子等小分子与蛋白质分离，提取目标蛋白质。导入 AutoDock Tools-1.5.6 中进行加电荷操作，并对每个残基进行加氢处理，同时对其进行末端残基修复、重新添加力场文件、能量最小化、修复残基及可能存在的原子间碰撞等操作，输出为 pdbqt 格式文件。采用 AutoDock Vina（Ver. 2.0）将配体分子在蛋白质的活性口袋处进行对接，完成后按照能量最低原则进行筛选。

1.3.9 数据处理

试验数据通过 GraphPad Prism 8 软件进行处理与可视化，并采用 ANOVA 进行显著性差异分析。

2 结果与讨论

2.1 黄酮类化合物和核心靶点的筛选

TCMSP 数据库的筛选结果见表 2。木犀草素、漆黄素、芹菜素和白杨素结构相似，均为含 2-苯基色原酮骨架的黄酮类化合物，仅羟基的取代数目和位点不同。为了深入探究黄酮类化合物在 AD 预防与治疗中与 IL-4 和 IL-13 的构效关系，

额外添加了2种结构相似的黄酮类化合物（槲皮素和山柰酚），即以木犀草素、漆黄素、芹菜素、白杨素、槲皮素以及山柰酚作为重点研究对象，化学结构见图1。图2为“疾病-药物-靶点”网络图，除重点关注的IL-4和IL-13外，核心靶点的节点颜色越深，表明AD与化合物的相关性越强。

表2　化合物筛选结果

Table 2　Results of compound screening

靶点	化合物
IL-4	木犀草素、芹菜素、白杨素、漆黄素、大豆苷元、水杨酸、苯乙烯、迷迭香酸、吗啡、粉防己碱、雷公藤内酯醇、吴茱萸碱、芒柄花素、尼古丁、人参皂苷Rf
IL-13	芹菜素、白杨素、苯乙烯

	R_3	R_5	$R_{3'}$	$R_{4'}$
木犀草素	H	OH	OH	OH
芹菜素	H	OH	H	OH
白杨素	H	OH	H	H
槲皮素	OH	OH	OH	OH
山柰酚	OH	OH	H	OH
漆黄素	OH	H	OH	OH

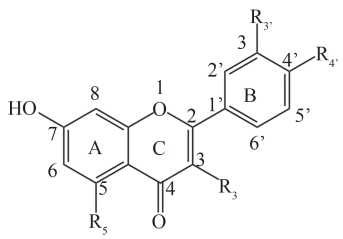


图1　6种黄酮类化合物的化学结构

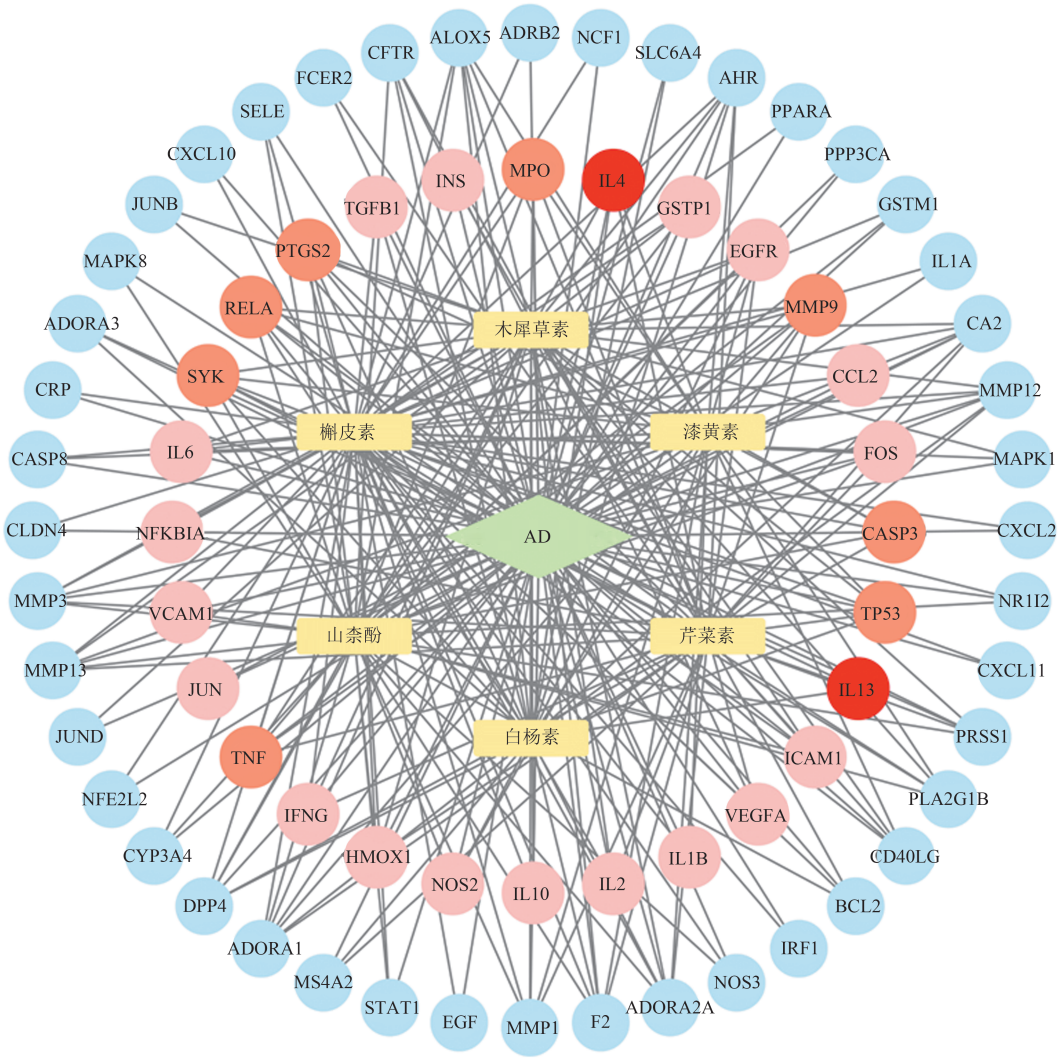
Fig. 1　Structures of six flavonoids

2.2　6种黄酮类化合物的细胞毒性

RBL-2H3是研究肥大细胞分泌的生化途径及人体各种免疫反应的常用体外模型[30]，6种黄酮类化合物对RBL-2H3的细胞毒性见图3。随着样品浓度的增加，其对RBL-2H3细胞毒性也逐渐增强。所有样品在0~5 μmol/L范围内对RBL-2H3细胞具有较低的细胞毒性，细胞存活率均在80%以上[31]。因此，为了探究6种黄酮类化合物的构效关系，后续在RBL-2H3细胞中可用的最大浓度为5 μmol/L。

2.3　黄酮类化合物对IgE介导的RBL-2H3细胞炎症因子释放的影响

图4为6种黄酮类化合物在1.25 μmol/L（低浓度组，记为L）、2.50 μmol/L（中浓度组，记为M）、5.00 μmol/L（高浓度组，记为H）时对细胞炎症因子的影响。结果显示，与对照组相比，DNP-IgE和DNP-BSA刺激的细胞AD模型组的炎症因子释放量均显著升高，表明IgE介导的RBL-2H3细胞会上调其炎症因子IL-4、IL-13、TNF-α的表达。如图4（a）所示，与模型组相比，6种黄酮类化合物处理后的样品组均显著抑制IL-4的产生。在高浓度下，将芹菜素和山柰酚进行对比，芹菜素对IL-4的抑制活性大于山柰酚，表明C环中C-3位上的羟基会减弱黄酮类化合物对IL-4的抑制活性。在低浓度下，将芹菜素和山柰酚（B环中C-3’位无羟基）分别与木犀草素和槲皮素（B环中C-3’位有羟基）进行对比，芹菜素对IL-4的抑制活性大于木犀草素，且山柰酚的抑制活性大于槲皮素，表明B环中C-3’位有羟基会减弱黄酮类化合物对IL-4的抑制活性。如图4（b）所示，与模型组相比，样品组均能显著抑制IL-13的释放。在中浓度组中，C-5位无羟基的漆黄素对IL-13的抑制效果最差。在低浓度组中，与山柰酚相比，芹菜素C-3位羟基会减弱其抑制活性。如图4（c）所示，除低浓度组的漆黄素（C-5位无羟基）外，其余各浓度组的黄酮类化合物均对TNF-α的释放有显著抑制作用。综上所述，在IgE介导的RBL-2H3细胞AD模型中，6种黄酮类化合物均能显著抑制炎症因子IL-4、IL-13和TNF-α的释放。整体上看，芹菜素和白杨素对3种炎症因子的抑制效果最好，且C环的C-3位无羟基、A环的C-5位有羟基，提高了黄酮类化合物的抑制活性。据报道，IL-4和IL-13是调节AD发病机制的核心，在AD的诱导和维持中发挥关键性作用[11,32]。TNF-α参与全身性炎症反应，能够破坏角质形成细胞的正常结构和功能，诱导角质



黄色长方形—化合物；圆形—靶点；内圈的红色圆形—核心靶点（Degree 值排名前 10）；连线—相互作用。

图 2 “疾病-药物-靶点”网络图

Fig. 2 “Disease-drug-target” network diagram

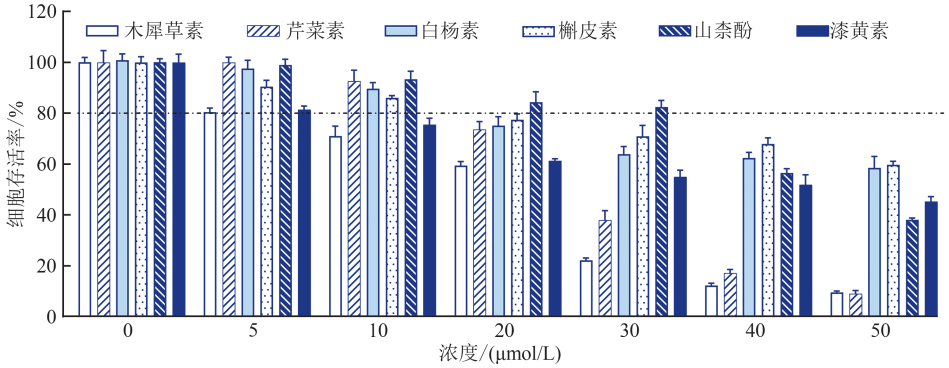
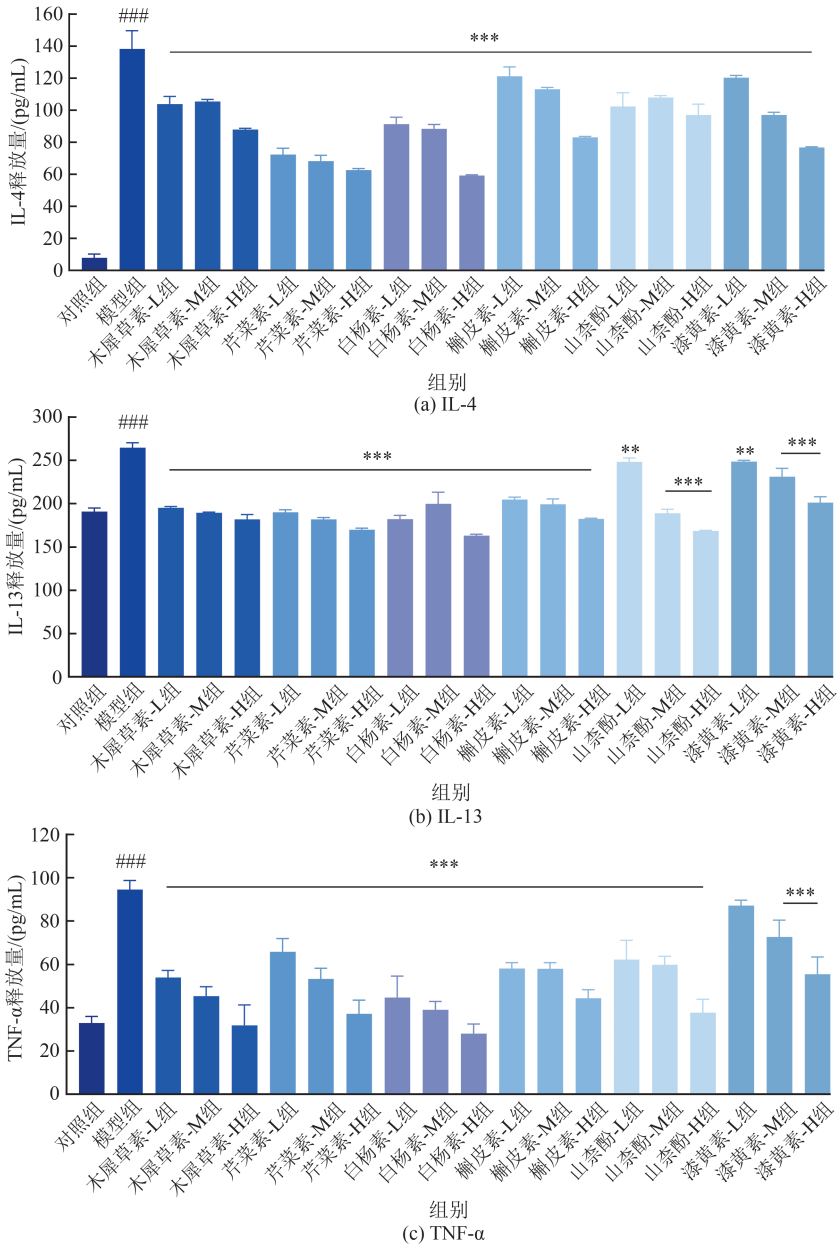


图 3 6 种黄酮类化合物对 RBL-2H3 细胞的细胞毒性

Fig. 3 Cytotoxicity of six flavonoids on RBL-2H3 cells

形成细胞凋亡[33]。因此，在 AD 的发病进程中，6 种黄酮类化合物都对肥大细胞炎症因子具有负调控作用，在预防与治疗 AD 方面具有潜在应用价值。



与对照组相比，###—P<0.001；与模型组相比，**—P<0.01，***—P<0.001。

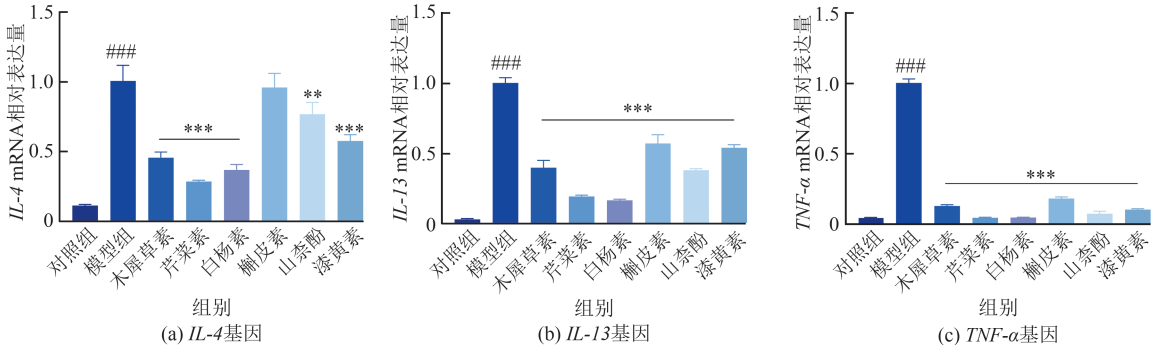
图4　黄酮类化合物对IgE介导的RBL-2H3细胞中炎症因子的影响

Fig. 4　Effects of flavonoids on inflammatory factors in IgE-induced RBL-2H3 cells

2.4　黄酮类化合物对IgE介导的RBL-2H3细胞中炎症因子基因mRNA表达的影响

图5为6种黄酮类化合物在5.0 μmol/L时对细胞炎症因子基因mRNA表达的影响。结果表明，与对照组相比，模型组中各指标的mRNA表达水平均显著升高。如图5(a)所示，与模型组相比，除槲皮素外，其余黄酮类化合物均显著降低了*IL-4*基因mRNA的表达。将木犀草素和芹菜素(C环中C-3位无羟基)分别与槲皮素和山柰酚(C环中C-3位有羟基)进行对比，木犀草素对*IL-4*基因mRNA的抑制活性大于槲皮素，且芹菜素的抑制活性大于山柰酚，表明C环中C-3位羟基会减弱黄酮类化合物对*IL-4* mRNA的抑制活性，此结果与黄酮类化合物对IL-4释放量的影响一致。如图5(b)所示，与模型组相比，6种黄酮类化合物均显著降低了*IL-13*基因mRNA的表达。将木犀草素和芹菜素(C环中C-3位无羟基)分别与槲皮素和山柰酚(C环中C-3位有羟基)进行对比，木犀草素对

IL-13 mRNA的抑制活性大于槲皮素，且芹菜素的抑制活性大于山柰酚，表明C环中C-3位羟基会减弱黄酮类化合物对*IL-13*基因mRNA的抑制活性。将芹菜素和山柰酚（B环中C-3’位无羟基）分别与木犀草素和槲皮素（B环中C-3’位有羟基）进行对比，芹菜素对*IL-13*基因mRNA的抑制活性大于木犀草素，且山柰酚的抑制活性大于槲皮素，表明B环中C-3’位有羟基会减弱黄酮类化合物对*IL-13*基因mRNA的抑制活性。如图5（c）所示，与模型组相比，6种黄酮类化合物均显著降低了*TNF-α*基因mRNA的表达，且在芹菜素、白杨素和山柰酚处理后，*TNF-α*基因mRNA的表达与对照组相当。将芹菜素和山柰酚（B环中C-3’位无羟基）分别与木犀草素和槲皮素（B环中C-3’位有羟基）进行对比，芹菜素对*TNF-α*基因mRNA的抑制活性大于木犀草素，且山柰酚的抑制活性大于槲皮素，表明B环中C-3’位有羟基，减弱了黄酮类化合物对*TNF-α*基因mRNA的抑制活性。总体来看，芹菜素和白杨素对*IL-4*、*IL-13*、*TNF-α*基因mRNA的抑制活性最显著，B环中C-3’位无羟基、C环中C-3位无羟基均可提高黄酮类化合物的抑制活性。



(a) *IL-4*基因　(b) *IL-13*基因　(c) *TNF-α*基因

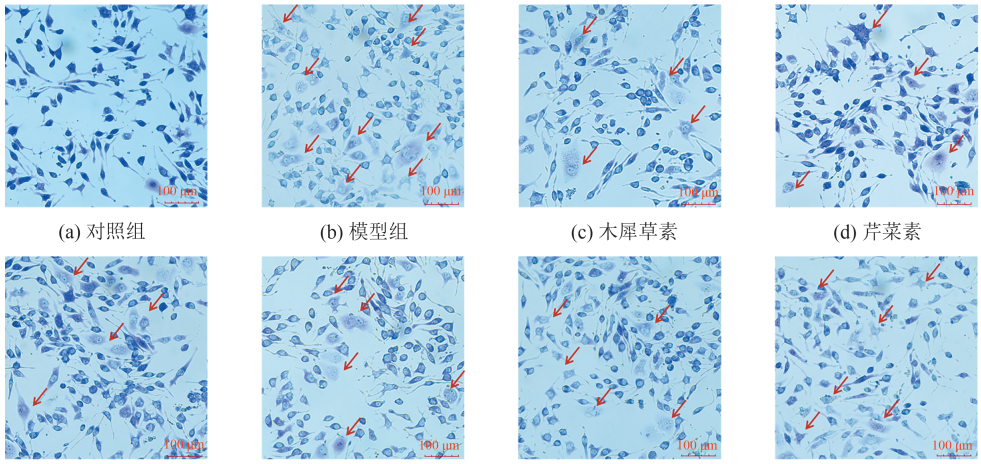
与对照组相比，$^{###}$—P<0.001；与模型组相比，**—P<0.01，***—P<0.001。

图5　黄酮类化合物对IgE介导的RBL-2H3细胞炎症因子基因mRNA表达水平的影响

Fig. 5　Effects of flavonoids on mRNA levels of inflammatory factors in IgE-induced RBL-2H3 cells

2.5　黄酮类化合物对IgE介导的RBL-2H3细胞中脱颗粒的影响

RBL-2H3细胞的甲苯胺蓝染色结果见图6。对照组的细胞多呈梭形，轮廓清晰，形态饱满，整体呈深蓝色；模型组发生脱颗粒后，细胞呈圆形，轮廓不规则，细胞质变得疏松并出现空泡结构，细胞呈浅蓝色。这是由于在细胞脱颗粒的胞吐过程中，细胞膜受到挤压后出现局部褶皱或小泡



(a) 对照组　(b) 模型组　(c) 木犀草素　(d) 芹菜素

(e) 白杨素　(f) 槲皮素　(g) 山柰酚　(h) 漆黄素

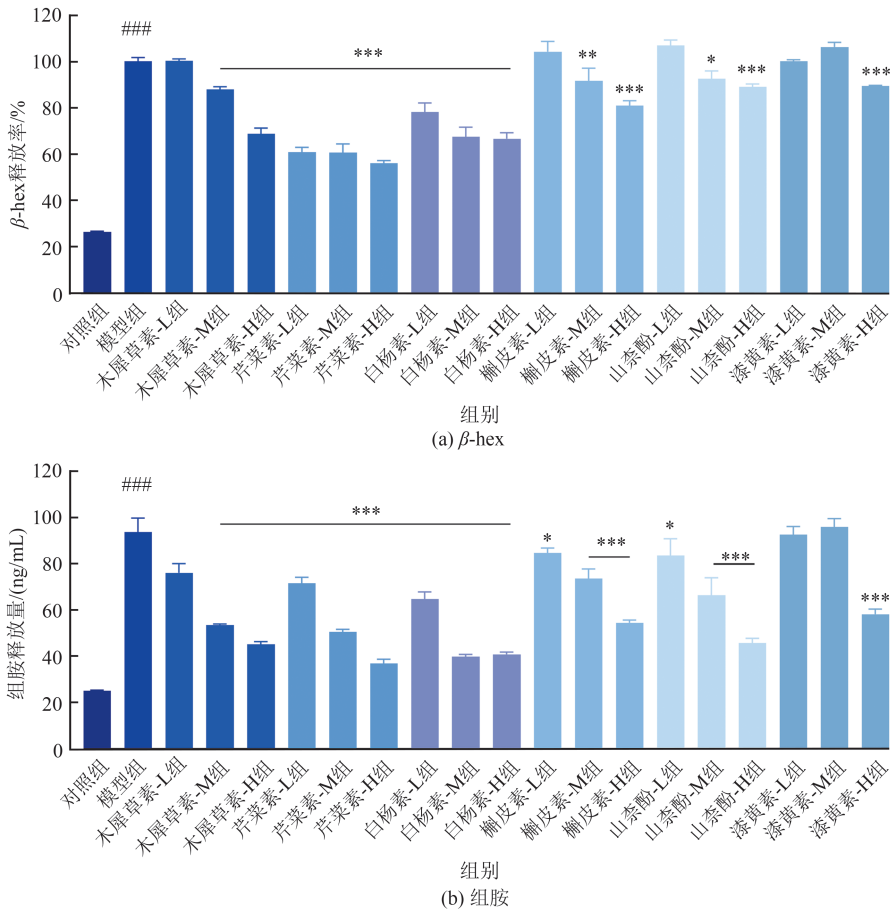
图6　黄酮类化合物对RBL-2H3细胞形态的影响

Fig. 6　Effects of flavonoids on morphology of RBL-2H3 cells

样结构，导致细胞形态发生扭曲。同时，细胞质中存在的大量分泌颗粒在甲苯胺蓝染色后呈深蓝色，当细胞脱颗粒后，细胞质中的分泌颗粒减少，整体细胞颜色变浅[34]。与模型组相比，样品组细胞形态都有所改善，其中木犀草素、芹菜素、白杨素组梭形细胞明显增加，轮廓较清晰，细胞染色较深，形态更接近正常细胞；槲皮素、山柰酚组细胞边缘整齐但多为圆形，细胞染色较浅；漆黄素组细胞呈半皱缩状，细胞膜凹凸不平，细胞多为浅蓝色。从黄酮类化合物的结构来看，C环中C-3位无羟基的黄酮（木犀草素、芹菜素、白杨素）对RBL-2H3脱颗粒形态变化的抑制活性最好，A环中C-5位上没有羟基的漆黄素活性最差。

6种黄酮类化合物在低浓度组（1.25 μmol/L）、中浓度组（2.50 μmol/L）、高浓度组（5.00 μmol/L）对β-hex释放率的影响见图7（a）。与对照组相比，模型组β-hex释放率显著增加；与模型组相比，6种黄酮类化合物均能显著抑制β-hex的释放。在高浓度下，C环中C-3位上没有羟基的黄酮（木犀草素、芹菜素、白杨素）对β-hex的抑制活性最好。在中/低浓度下，A环中C-5位上没有羟基的漆黄素对β-hex的抑制活性最差。这些结果与Mastuda等[35]的结论相符，但未观察到C-3’位和C-4’位上的羟基对抑制活性的影响。β-hex是肥大细胞脱颗粒标志物，检测RBL-2H3细胞β-hex释放率的变化能够间接反映细胞脱颗粒的情况[30]。

6种黄酮类化合物在低浓度组（1.25 μmol/L）、中浓度组（2.50 μmol/L）、高浓度组（5.00 μmol/L）对组胺释放量的影响见图7（b）。与模型组相比，6种黄酮类化合物均能显著抑制组胺的释放。除中/低浓度的漆黄素（C-5位无羟基）外，其余各组黄酮类化合物均对组胺的释放有显著抑制作用。在中/低浓度下，将木犀草素和芹菜素（C环中C-3位无羟基）分别与槲皮素和山柰酚（C环中C-3位有



与对照组相比，$^{###}$—P<0.001；与模型组相比，*—P<0.05，**—P<0.01，***—P<0.001。

图7　黄酮类化合物对IgE介导的RBL-2H3细胞中β-hex和组胺释放量的影响

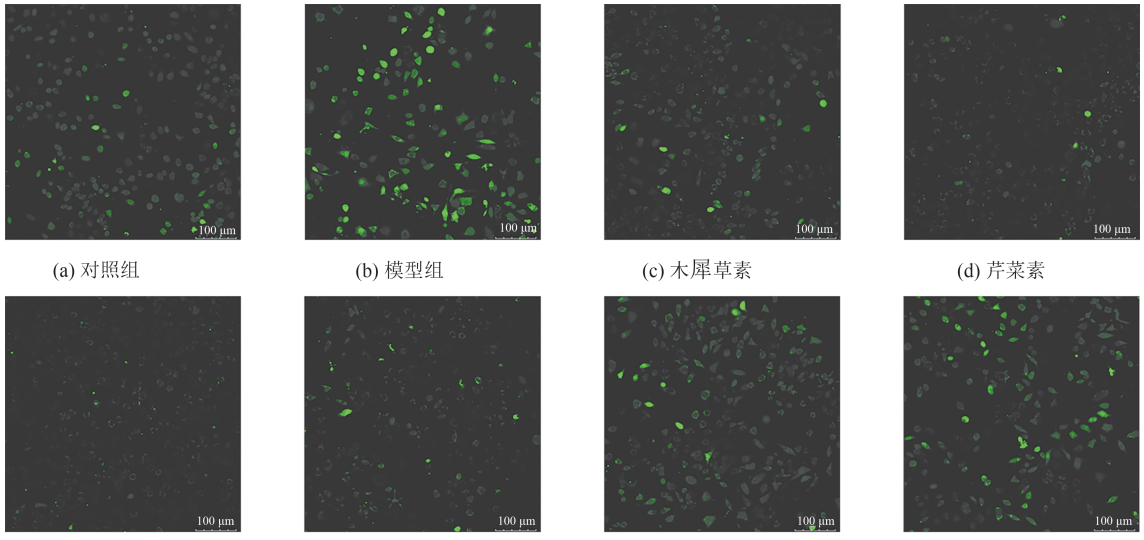
Fig. 7　Effects of flavonoids on the release of β-hex and histamine in IgE-induced RBL-2H3 cells

羟基）进行对比，木犀草素对组胺的抑制活性大于槲皮素，且芹菜素的抑制活性大于山柰酚，表明C环中C-3位羟基会减弱黄酮类化合物对组胺的抑制活性。组胺与β-hex释放机制相似，是过敏反应和炎症反应的关键介质，在AD中会引起皮肤红肿、瘙痒等症状[8]。

对于上述脱颗粒的3种评价指标（细胞形态、β-hex、组胺释放量）来说，芹菜素和白杨素对RBL-2H3细胞脱颗粒的抑制活性最佳，且A环的C-5位有羟基、C环的C-3位无羟基均可提高黄酮类化合物的抑制活性。

2.6 黄酮类化合物对IgE介导的RBL-2H3细胞内钙离子的影响

图8为激光共聚焦显微镜测定的RBL-2H3细胞内钙离子荧光图。细胞内钙离子的荧光强度越大，说明细胞内钙离子浓度越高。与对照组相比，模型组的钙离子荧光强度显著增强。用Image J进行定量分析，结果见图9。经5.00 μmol/L的6种黄酮类化合物分别处理后，样品组的细胞内钙离子相对荧光强度均有不同程度降低。此结果表明，A环的C-5位无羟基的漆黄素对细胞钙离子内流的抑制效果最差。芹菜素和白杨素能够将细胞内钙离子浓度恢复至对照组水平，抑制效果最佳。将芹菜素和山柰酚进行对比，芹菜素对细胞钙离子内流的抑制活性大于山柰酚，表明C环中C-3位的羟基会减弱对细胞钙离子内流的抑制活性。因此，A环的C-5位有羟基、C环的C-3位无羟基可提高黄酮类化合物的抑制活性，此结果与黄酮类化合物对RBL-2H3细胞脱颗粒的影响一致。钙离子内流是引发肥大细胞脱颗粒的关键步骤，会迅速触发信号传导，促进炎症因子的释放[36]。因此，6种黄酮类化合物能够通过抑制细胞钙离子内流来减少肥大细胞的脱颗粒程度，进而减少炎症因子的释放。



(a) 对照组 (b) 模型组 (c) 木犀草素 (d) 芹菜素

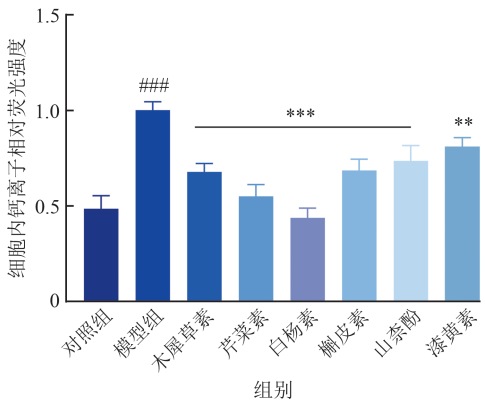
(e) 白杨素 (f) 槲皮素 (g) 山柰酚 (h) 漆黄素

图8 细胞内钙离子荧光图

Fig. 8 Fluorescence images of intracellular calcium ions

2.7 黄酮类化合物对IgE介导的RBL-2H3细胞中信号通路的影响

6种黄酮类化合物与IgE介导的RBL-2H3细胞信号通路的结合能见图10。配体与受体之间的结合能越小，两者相互作用越强，结合能小于−7.0 kcal/mol被认为有较强的结合活性[37]。图10中蓝色越深证明结合能越小，两者结合活性越好。6种黄酮类化合物与所有信号通路的结合能均小于−7.0 kcal/mol，其中结合活性较好的信号通路是PLCγ、Lyn和ERK。C环中C-3位无羟基的黄酮类化合物（木犀草素、芹菜素、白杨素）对PLCγ、PI3K、AKT、JNK、P38靶点的结合能优于C-3位有羟基的黄酮类化合物（槲皮素、山柰酚、漆黄素）。这与钙离子内流、细胞脱颗粒和炎症因子表达水



与对照组相比，###—P<0.001；与模型组相比，**—P<0.01，***—P<0.001。

图9　黄酮类化合物对IgE介导的RBL-2H3细胞中钙离子的影响

Fig. 9　Effects of flavonoids on intracellular calcium ions in IgE-induced RBL-2H3 cells

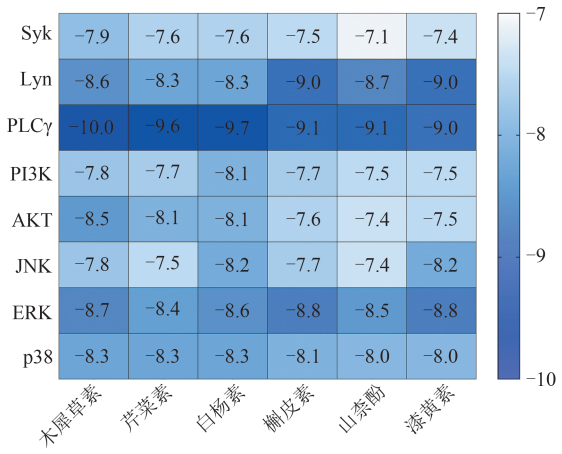


图10　分子对接结合能热图

Fig. 10　Heatmap of binding energy in molecular docking

平等试验结果一致。据报道，在此模型中，IgE与肥大细胞表面的受体FcεRI结合后，会激活Lyn使FcεRI的β链和γ链上的免疫受体酪氨酸活化基序（ITAM）发生磷酸化，为Syk激酶提供结合位点，Syk聚集到细胞膜并与FcεRI结合，随后Lyn进一步磷酸化激活Syk；激活的Syk通过其激酶活性激活PLCγ和PI3K等，启动后续的AKT、ERK、JNK、p38等信号传导过程；PLCγ被激活后可将细胞膜上的磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸（PIP_2）水解成肌醇-1，4，5-三磷酸（IP_3）和二酰基甘油（DAG），IP_3与内质网上的IP_3配体门控钙通道结合，开启钙通道，促使内质网中的钙库释放钙离子，使细胞内钙离子浓度升高[38]。因此，6种黄酮类化合物可能通过上述信号通路抑制肥大细胞脱颗粒和细胞钙离子内流，减少炎症因子的释放，进而对AD起到改善作用。

3　结论

黄酮类化合物具有多种生物活性且来源广泛、种类繁多，能够通过多靶点、多途径对AD发挥改善作用。针对IL-4和IL-13两个关键AD靶点，作者通过网络药理学筛选出6种黄酮类化合物（木犀草素、芹菜素、白杨素、槲皮素、山柰酚、漆黄素），建立了IgE介导的RBL-2H3细胞AD模型。细胞试验表明6种黄酮类化合物均能够抑制AD中的关键炎症因子IL-4、IL-13和TNF-α的释放，同时还能抑制肥大细胞脱颗粒和钙离子内流。整体上看，在C-5位含有羟基、C-3和C-3’位无羟基的黄酮类化合物（芹菜素和白杨素）对3种炎症因子、肥大细胞脱颗粒和钙离子内流的抑制活性最好。利用分子对接技术初步探究其作用机制，发现该过程与Lyn、Syk、PLCγ、PI3K、AKT、JNK、p38、ERK等信号通路相关。构效关系显示，C环中C-3位无羟基的黄酮类化合物（木犀草素、芹菜素、白杨素）对上述靶点的结合能优于C-3位有羟基的黄酮类化合物（槲皮素、山柰酚、漆黄素）。但由于AD是一个复杂的过程，涉及一系列基因的激活、蛋白质的表达和多种物质的调控，各个途径并不是独立存在的，而是相互作用的，故具体的作用机制还需要进一步研究。该研究表明，黄酮类化合物对AD等过敏性疾病具有潜在的预防与辅助治疗作用，为开发绿色安全、成本低廉的膳食黄酮功能性食品以及探寻AD替代疗法提供了新思路。

参考文献

[1] LANGAN S M，IRVINE A D，WEIDINGER S. Atopic dermatitis[J]. The Lancet，2020，396（10247）：345-360.

[2] PEZZOLO E，NALDI L. Epidemiology of major chronic inflammatory immune-related skin diseases in 2019[J]. Expert Review of Clinical Immunology，2020，16（2）：155-166.

[3] BAWANY F，NORTHCOTT C A，BECK L A，et al. Sleep disturbances and atopic dermatitis：relationships，methods for assessment，and therapies[J]. The Journal of Allergy

and Clinical Immunology: in Practice, 2021, 9(4): 1488-1500.

[4] SIMPSON E L, BIEBER T, ECKERT L, et al. Patient burden of moderate to severe atopic dermatitis (AD): insights from a phase 2b clinical trial of dupilumab in adults [J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2016, 74(3): 491-498.

[5] SROKA-TOMASZEWSKA J, TRZECIAK M. Molecular mechanisms of atopic dermatitis pathogenesis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(8): 4130.

[6] WANG J, ZHOU Y M, ZHANG H L, et al. Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8: 138.

[7] RANA T S, BANSODE R R, WILLIAMS L L. Anti-allergic and anti-inflammatory signaling mechanisms of natural compounds/extracts in *in vitro* system of RBL-2H3 cell: a systematic review[J]. Cells, 2024, 13(16): 1389.

[8] POTO R, QUINTI I, MARONE G, et al. IgG autoantibodies against IgE from atopic dermatitis can induce the release of cytokines and proinflammatory mediators from basophils and mast cells[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 880412.

[9] WEIDINGER S, BECK L A, BIEBER T, et al. Atopic dermatitis [J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4: 1.

[10] HAMMAD H, LAMBRECHT B N. Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity[J]. Immunity, 2015, 43(1): 29-40.

[11] SILVERBERG J I, KANTOR R. The role of interleukins 4 and/or 13 in the pathophysiology and treatment of atopic dermatitis [J]. Dermatologic Clinics, 2017, 35 (3): 327-334.

[12] ALI S, ION A, ORZAN O A, et al. Emerging treatments and new vehicle formulations for atopic dermatitis[J]. Pharmaceutics, 2024, 16(11): 1425.

[13] ALVARENGA J M, BIEBER T, TORRES T. Emerging biologic therapies for the treatment of atopic dermatitis [J]. Drugs, 2024, 84(11): 1379-1394.

[14] RAKHA A, UMAR N, RABAIL R, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic potential of dietary flavonoids: a review[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 156: 113945.

[15] XIAN D H, GUO M L, XU J X, et al. Current evidence to support the therapeutic potential of flavonoids in oxidative stress-related dermatoses[J]. Redox Report, 2021, 26(1): 134-146.

[16] ZHANG P. The role of diet and nutrition in allergic diseases[J]. Nutrients, 2023, 15(17): 3683.

[17] FLORES-BALDERAS X, PEÑA-PEÑA M, RADA K M, et al. Beneficial effects of plant-based diets on skin health and inflammatory skin diseases[J]. Nutrients, 2023, 15(13): 2842.

[18] ALESSANDRELLO C, SANFILIPPO S, MINCIULLO P L, et al. An overview on atopic dermatitis, oxidative stress, and psychological stress: possible role of nutraceuticals as an additional therapeutic strategy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(9): 5020.

[19] HOU D D, GU Y J, WANG D C, et al. Therapeutic effects of myricetin on atopic dermatitis *in vivo* and *in vitro*[J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154200.

[20] YOO S A, KIM K C, LEE J H. Efficacy and potential mechanisms of naringin in atopic dermatitis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(20): 11064.

[21] TANG L, GAO J F, LI X L, et al. Molecular mechanisms of luteolin against atopic dermatitis based on network pharmacology and *in vivo* experimental validation[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2022, 16: 4205-4221.

[22] LYU A Q, SHAN S J. Molecular docking, network pharmacology and experimental verification to explore the mechanism of Wulongzhiyangwan in the treatment of pruritus[J]. Scientific Reports, 2023, 13: 361.

[23] TUNG M C, TSAI K C, FUNG K M, et al. Characterizing the structure-activity relationships of natural products, tanshinones, reveals their mode of action in inhibiting spleen tyrosine kinase[J]. RSC Advances, 2021, 11(4): 2453-2461.

[24] KÖPRÜLÜ T K, ÖKTEN S, ATALAY V E, et al. Biological activity and molecular docking studies of some new quinolines as potent anticancer agents[J]. Medical Oncology, 2021, 38(7): 84.

[25] CURRIE K S, KROPF J E, LEE T, et al. Discovery of GS-9973, a selective and orally efficacious inhibitor of spleen tyrosine kinase[J]. Journal of Medicinal Chemistry,

2014，57(9)：3856-3873.

[26] SINGH S K，KAPOOR D，SHUKLA D. HerpDock：a GUI-based gateway to HSV-1 molecular docking insights [J]. Computational and Structural Biotechnology Journal，2024，23：3692-3701.

[27] ZHENG K，PARK C M，IQBAL S，et al. Pyridopyrimidinone derivatives as potent and selective c-Jun *N*-terminal kinase (JNK) inhibitors [J]. ACS Medicinal Chemistry Letters，2015，6(4)：413-418.

[28] ABD RAHMAN N I，THAM C L，ABD HAMID R. Inhibition of angiogenesis and metastasis in colorectal cancer cell lines through KRAS-associated signaling pathways by 2-methoxy-6-undecyl-1，4-benzoquinone[J]. Chemico-Biological Interactions，2024，399：111151.

[29] RODRIGUEZ LIMARDO R G，FERREIRO D N，ROITBERG A E，et al. p38γ activation triggers dynamical changes in allosteric docking sites[J]. Biochemistry，2011，50(8)：1384-1395.

[30] PASSANTE E，FRANKISH N. The RBL-2H3 cell line：its provenance and suitability as a model for the mast cell [J]. Inflammation Research，2009，58(11)：737-745.

[31] XIAO H X，KUCKELKORN J，NÜßER L K，et al. The metabolite 3，4，3'，4'-tetrachloroazobenzene (TCAB) exerts a higher ecotoxicity than the parent compounds 3，4-dichloroaniline (3，4-DCA) and propanil[J]. Science of the Total Environment，2016，551/552：304-316.

[32] GANDHI N A，PIROZZI G，GRAHAM N M H. Commonality of the IL-4/IL-13 pathway in atopic diseases [J]. Expert Review of Clinical Immunology，2017，13(5)：425-437.

[33] KIM B E，KIM J，GOLEVA E，et al. Particulate matter causes skin barrier dysfunction[J]. JCI Insight，2021，6(5)：e145185.

[34] XIANG Z，BLOCK M，LÖFMAN C，et al. IgE-mediated mast cell degranulation and recovery monitored by time-lapse photography[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology，2001，108(1)：116-121.

[35] MASTUDA H，MORIKAWA T，UEDA K，et al. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-Induced degranulation，TNF-α and IL-4 production from RBL-2H3 cells [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry，2002，10(10)：3123-3128.

[36] CHEN Y C，CHANG Y C，CHANG H G，et al. Differential Ca^{2+} mobilization and mast cell degranulation by FcεRI- and GPCR-mediated signaling [J]. Cell Calcium，2017，67：31-39.

[37] YE J H，LI L，HU Z X. Exploring the molecular mechanism of action of Yinchen Wuling Powder for the treatment of hyperlipidemia，using network pharmacology，molecular docking，and molecular dynamics simulation[J]. BioMed Research International，2021，2021(1)：9965906.

[38] WU L C，ZARRIN A A. The production and regulation of IgE by the immune system [J]. Nature Reviews Immunology，2014，14(4)：247-259.

（责任编辑：李春丽）