基于流式细胞术解析京尼平介导的线粒体功能与炎症变化

潘祥[1]，吴燕婷[2, 3, 4]，周非白[1*]，顾正龙[3, 4]

（1.华南理工大学食品科学与工程学院，广东食品绿色加工与营养调控技术研究中心，广东广州 510640）

（2.广州医科大学附属第五医院泌尿外科，广东广州 510700）（3.复旦大学生命科学学院，上海 200438）

（4.粤港澳大湾区精准医学研究院（广州），广东广州 528441）

摘要：线粒体是细胞主要供能者，也是免疫调节中枢，栀子活性物质可能对线粒体具有保护作用进而发挥抗炎效果。该研究基于流式细胞术评价了栀子苷、京尼平等 9 种栀子代表性成分的促线粒体自噬活性，并评估了关键成分京尼平对线粒体膜电位、线粒体质量、线粒体超氧化物的改变和抗炎效果。结果表明，10 μmol·L^{-1}京尼平激活 293T 和 HeLa 细胞线粒体自噬的比例分别达到了 78.91%和 18.96%。且京尼平可以剂量依赖性地激活两种细胞的线粒体自噬，在 40 μmol·L^{-1}浓度下效果甚至显著强于阳性对照，线粒体自噬激活的细胞比例超过 80%。该研究还发现，京尼平孵育可以显著增加线粒体膜电位至对照组的 1.11~1.15 倍。此外，京尼平还剂量依赖性地增加线粒体活性氧，可能与其促进能量代谢有关。在 THP1-ASC-GFP 细胞中评估京尼平的抗炎能力，结果显示京尼平可以显著减少 ASC 炎症小体的数量，效果具有浓度依赖性。结论，该研究结果表明京尼平可能通过调节线粒体功能发挥抗炎功效，为深入了解京尼平的活性机制提供了新的视角。

关键词：栀子；京尼平；线粒体功能；炎症

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.9.0890

Flow Cytometric Analysis of Genipin-Mediated Changes in Mitochondrial Function and Inflammation

PAN Xiang[1], WU Yanting[2,3,4], ZHOU Feibai[1*], GU Zhenglong[3, 4]

(1.School of Food Science and Engineering, Guangdong Food Green Processing and Nutrition Regulation Technology Research Center, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2.Urology, The Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510700, China) (3.School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China) (4.Greater Bay Area Institute of Precision Medicine (Guangzhou), Guangzhou 528441, China)

Abstract: Mitochondria serve as the primary cellular energy supplier and also function as the immune regulation center. It is suggested that gardenia active substances may exert a protective effect on mitochondria, thereby exhibiting anti-inflammatory properties. Activation of mitophagy activity of nine representative components of gardenia, including geniposide and genipin, was measured using flow cytometry. Modification of mitochondrial membrane potential, mitochondrial mass, mitochondrial superoxide and anti-inflammatory effects of the key ingredient genipin were evaluated. The results indicated that mitophagy was activated in 293T and HeLa cells by 78.91% and 18.96%, respectively, when treated with 10 μmol·L^{-1} genipin. Additionally, genipin was found to dose-dependently activate mitophagy in both cell types, with the effect being significantly stronger than that of the positive control at a concentration of 40 μmol·L^{-1}, resulting in more than 80% of the cells exhibiting activated mitophagy. This study also revealed that the mitochondrial membrane potential was significantly increased to 1.11-1.15 times that of the control after incubation with genipin. Furthermore, genipin was observed to dose-dependently increase mitochondrial reactive oxygen species, which may be linked to its promotion of energy metabolism. The anti-inflammatory capability of genipin was evaluated in THP1-ASC-GFP cells, and the results demonstrated that the number of ASC inflammatory vesicles was significantly reduced in a concentration-dependent manner by genipin. In conclusion, the findings of this study suggest that the anti-inflammatory effects of genipin may

收稿日期：2025-06-26；修回日期：2025-09-06；接受日期：2025-09-17

基金项目：粤穗联合基金重点项目（2022B1515120083）；国家自然科学基金面上项目（32172157）

作者简介：潘祥（1997-），男，硕士，研究方向：食品生物技术，E-mail：1533384300@qq.com

通讯作者：周非白（1988-），女，博士，副教授，研究方向：食品生物技术，蛋白质化学与工程，E-mail：feibaizhou@scut.edu.cn

be exerted by the modulation of mitochondrial function, offering a new perspective for a deeper understanding of the active mechanism of genipin.

Key Words: *Gardenia jasminoides* Ellis; genipin; mitochondrial function; inflammation

炎症是机体抵御外界刺激的重要手段，但过度和慢性炎症会导致机体功能破坏，与衰老和多种疾病的发生发展有着密切关系。作为细胞主要供能者和免疫反应中枢，线粒体在炎症的发生过程中扮演着重要角色，有研究表明线粒体内容物，如线粒体 DNA（Mitochondrial DNA，mtDNA）[1]、心磷脂和细胞色素 C 的释放都会触发炎症开关[2]。尽管线粒体功能障碍与炎症反应的关系错综复杂，但最新的研究表明，线粒体功能障碍先于炎症反应发生[3,4]。因此线粒体可能是缓解炎症反应的关键靶点，保护线粒体功能和维持线粒体稳态可能为改善炎症相关症状提供新的思路。

线粒体稳态的维持机制称为线粒体质量控制（Mitochondrial Quality Control，MQC），包含线粒体自噬、线粒体生物发生、线粒体动力学稳态等[5]。线粒体自噬是 MQC 的重要组成部分，自 2005 年由 Lemasters[6]首次描述后，一直是线粒体研究领域的热点。有研究表明促进线粒体自噬可缓解炎症[7]，因此促线粒体自噬活性可能是抗炎活性物质筛选的合理切入点。

众所周知，天然活性物质是线粒体自噬激活剂的重要来源。栀子（*Gardenia jasminoides* Ellis）是我国首批认定的药食同源资源之一[8]，在《伤寒论》和《神农本草经》中均有记载，具有内用清热解毒、缓解抑郁，外用消肿止痛的功效[9]。栀子中蕴含丰富的环烯醚萜类、黄酮类、西红花素类等活性物质，具有抗氧化、抗炎、护肝、抗糖尿病等多种功效[10]。然而因栀子常与其他食材和药材配伍使用，其中化合物成分复杂，难以区分关键活性物质和其作用机制。

本研究从栀子果实中含量较高的成分种类中选取代表性的 9 种化合物，基于流式细胞术对其激活线粒体自噬和保护线粒体功能的活性进行探究，为加深对栀子活性成分的作用机制理解和拓宽其在功能性食品中的应用提供了支撑，且为未来建立快速高通量的化合物筛选方法提供了思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RPMI 1640 培养基、Dulbecco 改良的 Eagle 培养基（Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM，货号 C11995500BT），购买自赛默飞世尔（苏州）仪器有限公司；特级胎牛血清（货号 MK1124-500），购自深圳迈科斯生物科技有限公司；多西环素（目录号 HY-N0565），购买自 MCE；线粒体膜电位荧光染料、线粒体活性氧荧光染料 MitoSOX™（货号 M36008）、线粒体质量荧光染料 MitoTracker™ Deep Red FM（货号 M22426）、0.25 wt.%胰酶细胞消化液（货号 25200-072）、磷酸盐缓冲溶液（Phosphate Buffered Saline，PBS，pH 值 7.4，货号 C10010500BT），均购买自赛默飞世尔科技（中国）有限公司。HEK293T-mtKeima、HeLa-mtKeima、THP1-ASC-GFP 细胞为复旦大学顾正龙教授课题组赠送。

1.2 主要仪器设备

PTY-523/623L 电子天平，华志（福建）电子科技有限公司；Mini-6K 掌上离心机，杭州佑宁仪器有限公司；Multifuge X1 R Pro 台式水平离心机，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；MIX-2500 涡旋震荡仪，杭州佑宁仪器有限公司；Countess 3 细胞计数仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；SmartFlow Plus 生物安全柜，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；CLM-170B-8-NF 细胞培养箱，益世科（上海）企业发展有限公司；SPARK 多功能酶标仪，瑞士 TECAN 公司；CytoFLEX LX 流式细胞仪，美国贝克曼库尔特有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与传代

所用细胞均培养于恒温 37 ℃，5%（φ）CO_2 的细胞培养箱中，定期向水盘中添加无菌水保持湿度。HEK293T、HeLa 细胞使用含有 10%（φ）胎牛血清和 1%（φ）双抗（青霉素/链霉素）的 DMEM 培养基。THP1 细胞使用含

有 10%（φ）胎牛血清和 1%（φ）双抗（青霉素/链霉素）的 RPMI 1640 培养基。

HEK293T、HeLa 细胞：当细胞汇合度达到 80%以上时，弃掉旧培养基，使用 PBS 润洗后，加入胰酶消化，当在显微镜下观察到细胞变圆呈半贴壁时，加入完全培养基终止消化，并用移液枪重悬，以 1:4 的比例传代。THP1 细胞：初始复苏细胞数约为 1×10^6 个，根据细胞状态，每 2~3 天传代一次，传代比例为 1:2。

1.3.2 栀子主要成分促线粒体自噬活性初筛

HEK293T-mtKeima、HeLa-mtKeima 细胞分别以每孔 8×10^3 个和每孔 3×10^3 个的密度均匀铺在 96 孔板中。待细胞贴壁 24 h 后，弃去旧培养基，加入 200 μL 的质量浓度 15 $\mu g\cdot mL^{-1}$ 的多西环素。48 h 后弃去旧培养基，加入浓度为 10 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 的栀子活性化合物 200 μL。孵育 24 h 后弃去旧培养基，向孔中加入 50 μL 胰酶消化 1 min，然后加入完全培养基终止消化，用排枪轻轻吹打后重悬后使用流式细胞仪检测。检测所用荧光通道为 V610 和 Y610-mCHERRY。

1.3.3 京尼平对线粒体膜电位的影响

将 THP1 细胞以每孔 4×10^4 个的密度铺在 96 孔板中。将京尼平母液稀释后加入对应孔中，至京尼平终浓度为 10、20、30、40、50 $\mu mol\cdot L^{-1}$。孵育 24 h 后向孔中加入终浓度为 100 nmol Ł$^{-1}$ 的四甲基罗丹明甲酯（Tetramethylrhodamine Methyl Ester，TMRM），孵育 30 min。然后使用排枪轻轻吹打分散，使用流式细胞仪检测。检测所用荧光通道为 Y585-PE。

1.3.4 京尼平对线粒体质量的影响

细胞铺板和加样步骤同 1.3.3。孵育 24 h 后向孔中加入终浓度为 100 nmol Ł$^{-1}$ 的荧光探针 MitoTracker™ Deep Red FM，孵育 30 min。然后使用排枪轻轻吹打分散，使用流式细胞仪检测。检测所用荧光通道为 R660-APC。

1.3.5 京尼平对线粒体活性氧的影响

细胞铺板和加样步骤同 1.3.3。孵育 24 h 后向孔中加入终浓度为 100 nmol Ł$^{-1}$ 的 MitoSOX™，再次孵育 30 min。然后使用排枪轻轻吹打分散，使用流式细胞仪检测。检测所用荧光通道为 Y585-PE。

1.3.6 京尼平抑制 ASC 炎症小体的活性检测

使用 THP1-ASC-GFP 细胞进行实验，细胞铺板和加样步骤同 1.3.3。使用终浓度为 10、20、30、40、50 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 的京尼平预保护 2 h 后，加入质量浓度 100 ng mL^{-1} 的脂多糖（Lipopolysaccharide，LPS）刺激 3 h，最后使用流式细胞仪检测。检测所用荧光通道为 B525-FITC。

1.3.7 数据统计与分析

每次实验测定设置至少三个平行复孔，最终结果以平均值±标准偏差进行表示，采用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行 t 检验分析，采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件作图。组间显著性 $P<0.05$ 认为有显著性差异，图中*、**、***分别代表 $P<0.05$、$P<0.01$ 和 $P<0.001$。

2 结果与讨论

2.1 栀子主要成分促线粒体自噬活性初筛

本研究选取栀子果实中含量最高的环烯醚萜类（211.15 mg g^{-1}）、黄酮类（13.89 mg g^{-1}）、西红花苷类（16.18 mg g^{-1}）[11]和有机酸类（2.17 mg g^{-1}，以绿原酸计）[12]，并从中挑选了最具代表性的 9 种活性物质进行初步筛选，这些化合物的相关信息整合并列于表 1。

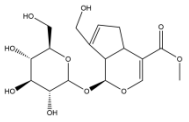
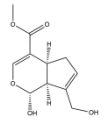
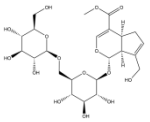
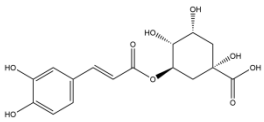
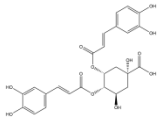
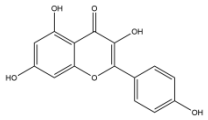
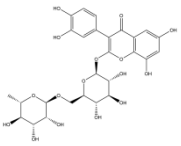
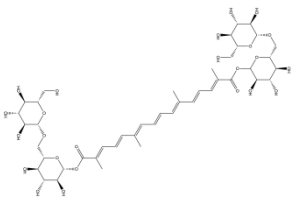
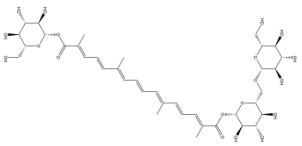
线粒体自噬是调控线粒体稳态的重要途径，有研究表明促进线粒体自噬可以减轻炎症反应[13]，因此以活性物质促进线粒体自噬的效果作为切入点进行初步筛选。以 HEK293T-mtKeima 和 HeLa-mtKeima 细胞为工具，使用不同浓度京尼平孵育 24 h 后，测量细胞中 Keima 蛋白的荧光强度，结果如图所示。图 1A、B 分别为 9 种化合物在 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞中激活线粒体自噬的活性。在两种细胞系的空白对照组中发生线粒体自噬的细胞比例分别为 4.05%和 6.61%，表明细胞在正常生理状态下也会产生水平很低的线粒体自噬以维持自身的线粒体稳态。羰基氰化氯苯腙（Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone，CCCP）是一种氧化磷酸化（Oxidative Phosphorylation，OXPHOS）抑制剂，通过电子传递链的解偶联导致线粒体膜电位丧失[14]，进而通过 PTEN 诱导激酶 1（PTEN Induced Kinase 1，PINK1）/Parkin 通路激活线粒体自噬[15]。在 HEK293T-mtKeima 细胞中以 CCCP 为阳性对照，10 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 的 CCCP 处理后发生线粒体自噬的 293T 细胞比例显著增加至 28.80%（$P<0.01$）。使用可模拟细胞缺氧的去铁胺

（Deferoxamine，DFO）作为 HeLa 细胞线粒体自噬的诱导剂[16]，200 μmol·L^{-1} 的 DFO 处理可使 HeLa 细胞线粒体自噬比例显著增加至 29.65%（P<0.01）。阳性对照的成功激活表明所用细胞体系可以定性定量的表征线粒体自噬激活的程度，可以用于对栀子活性物质的初步筛选。

以 10 μmol·L^{-1} 的浓度比较所有 9 种化合物激活线粒体自噬的效果（化合物在此浓度下对细胞无毒）。结果显示，在 HEK293T-mtKeima 中所有化合物均显著增加了细胞线粒体自噬水平，其中京尼平（78.91%，P<0.001）、芦丁（29.78%，P<0.01）和西红花苷I（27.69%，P<0.001）效果最显著。而在 HeLa-mtKeima 细胞中只有京尼平（18.96%，P<0.01）显著增加了线粒体自噬，约为对照组的 3 倍。综合以上结果，发现京尼平在两种不同细胞系中均可以显著增加线粒体自噬水平，表明京尼平具有的作用效果可能更广泛，具有通过线粒体途径缓解炎症的潜力，因此选择京尼平作为进一步研究对象。

表 1 研究所选栀子主要活性成分

Table 1 Research selected *Gardenia jasminoides* Ellis main active ingredient

中文名称	英文名称	化学分类	分子量	结构式
栀子苷	Geniposide	环烯醚萜类	388.37	
京尼平	Genipin	环烯醚萜类	226.23	
京尼平 1-β-D 龙胆双糖苷	Genipin 1-gentiobioside	环烯醚萜类	550.51	
绿原酸	Chlorogenic acid	有机酸类	354.31	
异绿原酸 C	Isochlorogenic acid C	有机酸类	516.45	
山柰酚	Kaempferol	黄酮类	286.24	
芦丁	Rutin	黄酮类	610.52	
西红花苷I	Crocin I	二萜类	976.97	
西红花苷II	Crocin II	二萜类	814.82	

京尼平（Genipin）属于环烯醚萜类，其结构中包含环戊二烯并吡喃环基本骨架、一个酯基和两个羟基[17]。环烯醚萜类化合物以环烯醚萜醇为母核，具有环状烯醚及醇羟基。其中，醇羟基属于半缩醛羟基，性质活泼，易与

糖结合，所以天然存在的环烯醚萜多为苷的形式，京尼平正是栀子苷经 β-葡萄糖苷酶水解后的产物。因此京尼平的醇羟基可能对其活性有重要作用[18]。京尼平在食品领域常用作交联剂，用于药物递送系统和功能性包材的制造[19]。此外，京尼平具有较强的亲脂性，这赋予了京尼平良好的细胞膜穿透性，为京尼平的功效发挥奠定了基础。

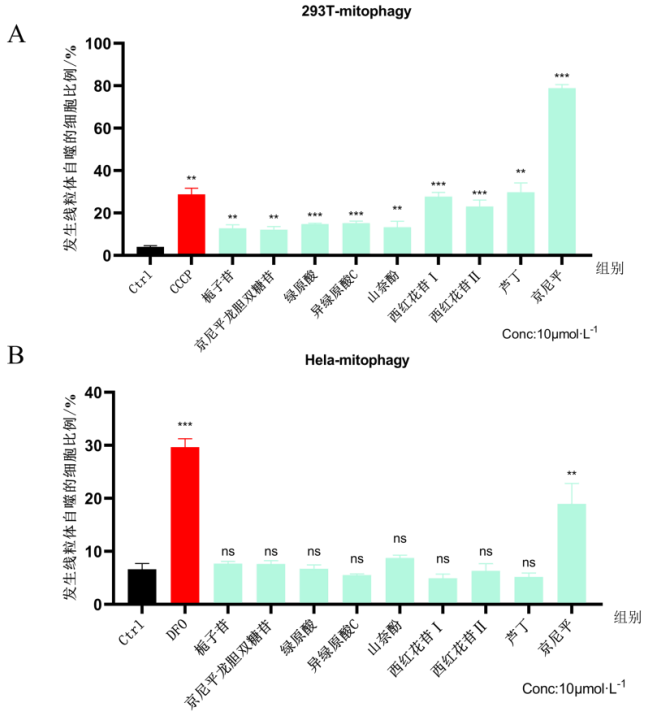


图 1 栀子活性物质对 HEK293T 细胞（A）和 HeLa 细胞（B）线粒体自噬的激活效果

Fig.1 Activating effect of active substances from *Gardenia jasminoides* on mitophagy in HEK293T cells (A) and HeLa cells (B)

注：图中**、***分别代表 P<0.01 和 P<0.001。ns 表示两组之间无统计学差异。

2.2 系统评价京尼平对线粒体功能的影响

以京尼平为研究对象，进一步系统探究其对线粒体功能的影响。THP1 细胞是一种急性单核细胞白血病细胞系，具有接近于人原代单核细胞的形态和功能特征，在炎症和免疫学研究领域有广泛应用。因此通过流式细胞术检测了京尼平对 THP1 细胞的线粒体活性氧、线粒体质量、线粒体膜电位的作用效果，并在 THP1-ASC-GFP 细胞中初步探究了京尼平的抗炎效果，结果如图 2 所示。结果显示，京尼平除了可以显著增强线粒体自噬外（图 2A、B），还可以显著增加线粒体活性氧（图 2C，P<0.001）和线粒体膜电位（图 2E，P<0.01），但不影响线粒体质量（图 2D，P>0.05），表明京尼平处理可以调节线粒体的能量代谢。凋亡相关斑点样蛋白（Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD，ASC）是 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NOD-like Receptor Thermal Protein Domain Associated Protein 3，NLRP3）炎症小体形成所必须的接头蛋白[20]，如图 2F 所示，虽然 10 μmol Ł$^{-1}$ 京尼平处理降低 ASC 蛋白荧光强度没有统计学差异（P>0.05），但荧光强度仍有一定下降趋势，表明京尼平可能具有一定的抗炎作用，需进一步进行浓度梯度实验以确定其功效。

以上结果表明京尼平可以从多个角度对线粒体功能产生影响，其中对线粒体自噬的调控作用最为显著，且具有潜在的抗炎效果。综上所述，京尼平是有潜力的抗炎活性物质。众所周知，线粒体自噬对于细胞是一把“双刃剑”，过度的线粒体自噬也会导致细胞能量供应不足，线粒体网络紊乱，最终导致细胞死亡[21]。因此需要确认京尼平在细胞模型中的量效关系和更高浓度下的安全性。

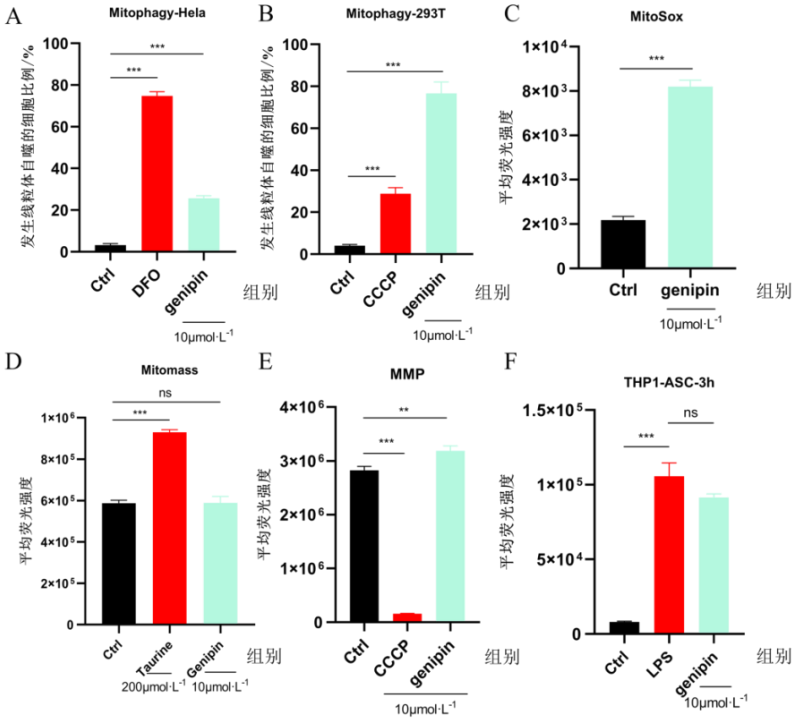


图 2 京尼平对线粒体自噬（A、B）、线粒体活性氧（C）、线粒体质量（D）、线粒体膜电位（E）的影响及其体外抗炎效果（F）

Fig.2 Effects of genipin on mitophagy (A, B), mitochondrial reactive oxygen species (C), mitochondrial mass (D), mitochondrial membrane potential (E) and its anti-inflammatory effect in vitro (F)

注：图中**、***分别代表 $P<0.01$ 和 $P<0.001$。ns 表示两组之间无统计学差异。

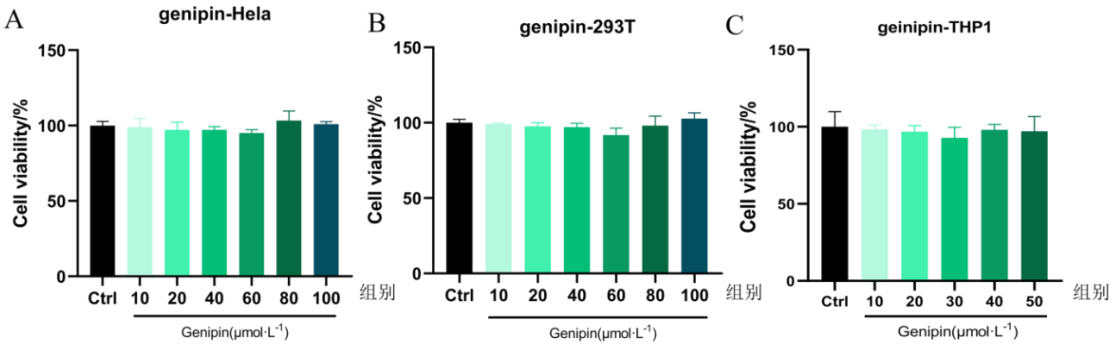


图 3 京尼平对 HeLa（A）、HEK293T（B）和 THP1 细胞（C）活力的影响

Fig.3 Effect of genipin on the viability of HeLa (A), HEK293T (B), and THP1 cells (C)

不同浓度的京尼平对 HeLa、HEK293T 和 THP1 细胞的毒性作用如图 3 所示。可以看到在 10~100 μmol Ł$^{-1}$ 浓度范围内京尼平对 HeLa 和 HEK293T 细胞没有毒性作用（$P>0.05$），在 10~50 μmol Ł$^{-1}$ 浓度范围内对 THP1 细胞无明显毒性（$P>0.05$）。这表明京尼平激活线粒体自噬的效果并不是破坏性的，京尼平可能通过促进线粒体自噬发挥细胞保护作用。进一步在对细胞无毒性的浓度范围内选择浓度梯度，以探究京尼平对线粒体功能的调控作用是否具有浓度依赖性。

2.3 不同浓度京尼平对线粒体自噬的影响

在无毒浓度范围内选择 10~60 μmol Ł$^{-1}$ 浓度范围进行梯度实验。通过流式细胞图可以直观地观察到不同浓度京尼平促进线粒体自噬的效果，如图 4 所示。

京尼平在 HeLa 和 HEK293T 细胞中促进线粒体自噬的效果均有明显的浓度依赖性。在 HeLa 细胞中，10 μmol Ł$^{-1}$ 京尼平激活线粒体自噬的细胞比例为 22.65%，浓度增加至 20 μmol Ł$^{-1}$ 时激活线粒体自噬的细胞比例达到 49.27%，是对照组的 17.90 倍。当浓度继续增加至 40 μmol Ł$^{-1}$ 和 60 μmol Ł$^{-1}$ 时，有超过 80%的细胞线粒体

自噬被激活，甚至显著高于阳性对照组（P<0.001）（图 4A、B）。在 HEK293T 细胞中，相较于空白对照组，10~60 μmol·L^{-1} 的京尼平均可以显著激活线粒体自噬（P<0.01），同样也显著高于阳性对照组的 28.80%（P<0.001）。有趣的是，在 HEK293T 细胞中，虽然在激活的细胞比例方面不同浓度之间没有差异，但从流式细胞图上可以看出随着京尼平浓度的增加，细胞中红色荧光强度有明显增加（Y610-mCHERRY 荧光通道），表明线粒体自噬水平的浓度依赖性升高。正如前文所述的，自噬的增加对细胞是一把“双刃剑”，京尼平可以强烈的激活线粒体自噬但不损害细胞活力，这可能是因为京尼平增加了线粒体网络的周转，在激活线粒体自噬的同时，促进了线粒体生物发生，维持了线粒体网络的动态平衡。据目前研究报道，京尼平可在成肌细胞中激活自噬并促进线粒体生物发生来维持线粒体网络稳态[22]，且在脑皮质细胞[23]中促进自噬并改善相关疾病模型的反应，本研究的结果进一步支持了相关文献的结论，但是文献对京尼平促进线粒体自噬的水平和量效关系并没有明确的表征。因此本实验的结果进一步加深了对京尼平作用的量效关系的理解，且本实验采用的方法可为进一步开发定性定量筛选潜在促线粒体自噬活性化合物的模型提供思路。

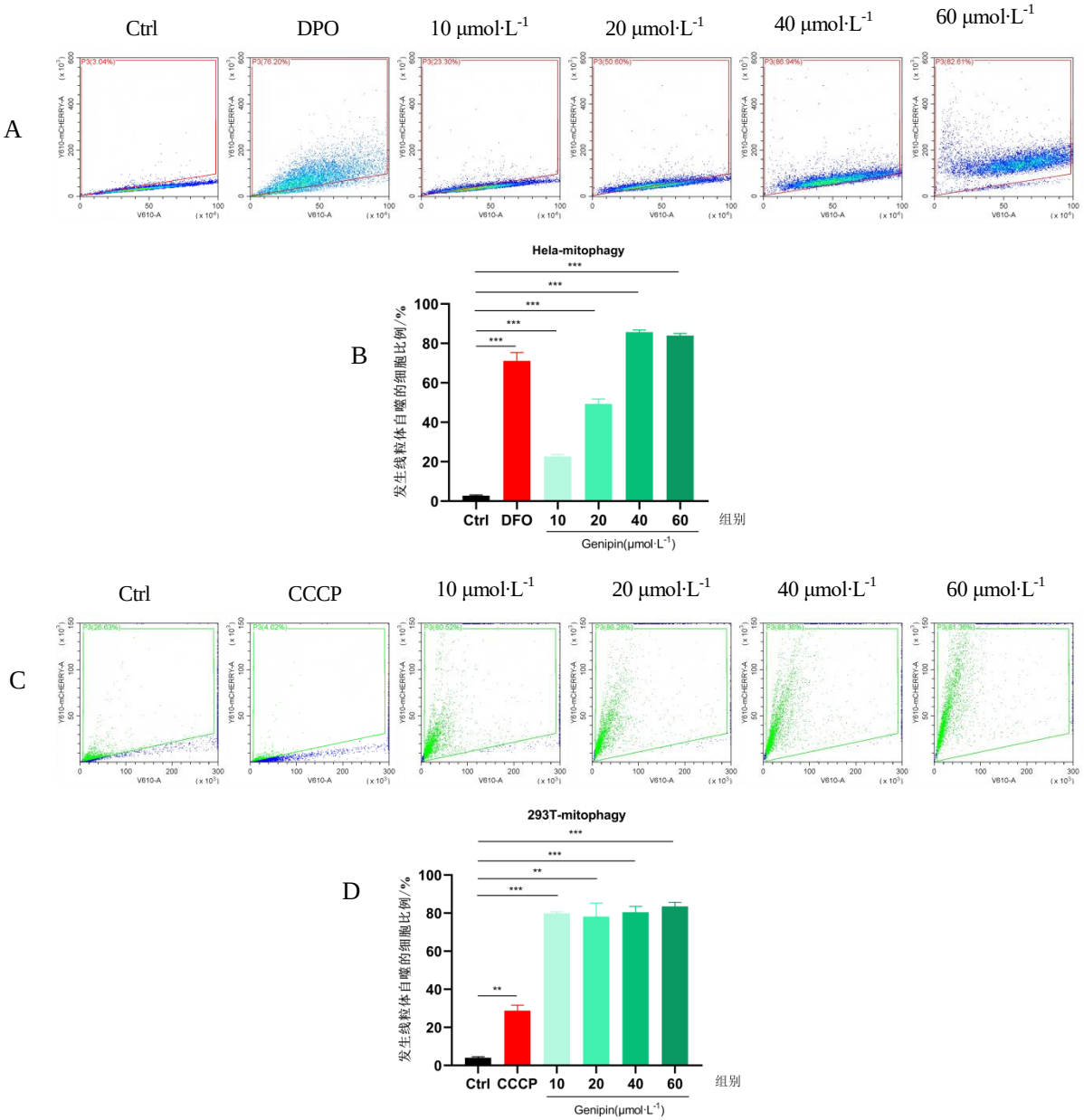


图 4 不同浓度的京尼平在 HeLa 细胞（A、B）和 HEK293T 细胞（C、D）中促进线粒体自噬的效果

Fig. 4 Effect of different concentrations of genipin in promoting mitophagy in HeLa cells (A, B) and HEK293T cells (C, D)

注：图中**、***分别代表 P<0.01 和 P<0.001。

2.4 不同浓度京尼平对线粒体膜电位和质量的影响

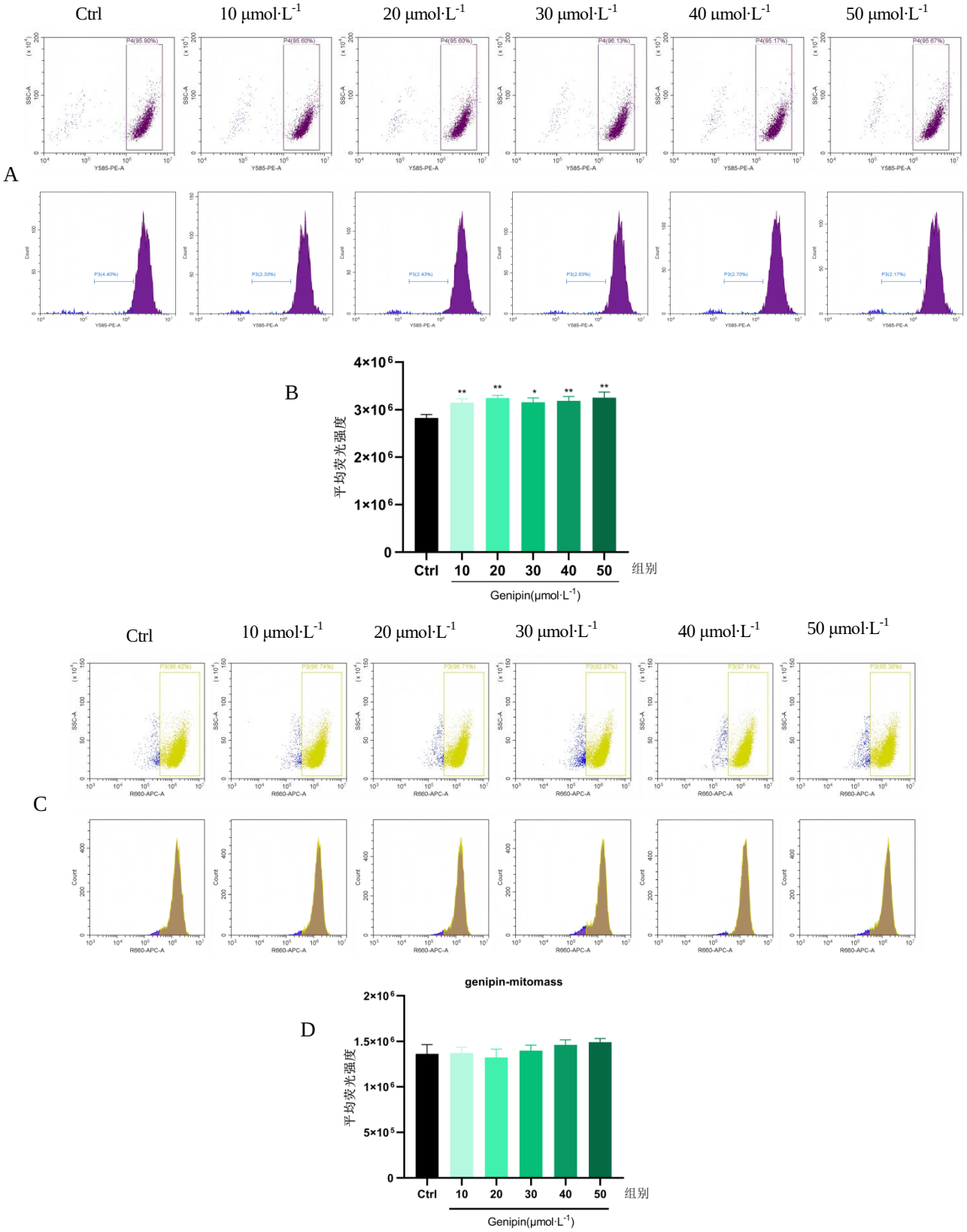


图 5 不同浓度的京尼平对线粒体膜电位（A、B）和线粒体质量（C、D）的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of genipin on mitochondrial membrane potential (A, B) and mitochondrial mass (C, D)

注：图中*、**分别代表 P<0.05、P<0.01。

在京尼平孵育 THP1 细胞 24 h 后，使用线粒体靶向的荧光染料对线粒体膜电位和线粒体质量进行检测，流式细胞图及柱状图如图 5 所示。在对 THP1 细胞无毒性的 10~50 μmol·L^{-1} 浓度范围内，京尼平处理可以显著增加线

粒体膜电位（P<0.05 或 P<0.01），相较于空白对照组可以增加约 11%~15%（图 5A、B）。线粒体膜电位本质上是线粒体膜间隙和基质之间质子的浓度差所形成的，电子传递链上的质子泵将氢离子逆浓度梯度泵送到线粒体膜间隙，而后质子顺浓度梯度流过 ATP 合成酶，推动其合成 ATP[24]。在线粒体内膜上有一类蛋白被称为解偶联蛋白，可以帮助膜间隙的质子部分回流至线粒体基质中，其作用是防止电子传递链过载而导致的氧化应激。京尼平被报道为解偶联蛋白 2（Uncoupling Protein 2，UCP2）的特异性抑制剂[25]，可减少其介导的质子泄漏而不会影响正常线粒体功能[26]。有研究表明，与高糖处理的 H9c2 细胞模型组相比，10 μmol Ł$^{-1}$ 京尼平可使线粒体膜电位增加约 7 倍，进而减少细胞因高糖死亡[27]。而本研究结果显示，在细胞正常状态下京尼平同样可增加线粒体膜电位，且在适当浓度范围内并不会导致细胞因氧化应激死亡，证明京尼平可以提高线粒体膜电位，增强线粒体功能。但需注意的是，高浓度的京尼平反而具有细胞毒性，石明珠等[28]研究发现，质量浓度大于 100 μg·mL^{-1}（约合 442 μmol Ł$^{-1}$）的京尼平会显著导致 HK-2 细胞的线粒体膜电位损伤，进而诱发氧化应激和炎症，最终导致细胞死亡。

对于线粒体质量，在使用 10~50 μmol Ł$^{-1}$ 京尼平孵育 24 h 后，相较于空白对照组并没有显著变化（图 5C、D，P>0.05），有研究报道京尼平在肝脏缺血/再灌注后可改善线粒体自噬障碍，同时促进线粒体生物发生[29]。因此，京尼平对线粒体质量的影响并不显著，这可能是京尼平调控线粒体动态稳态的结果。

2.5 不同浓度京尼平对线粒体超氧化物的影响

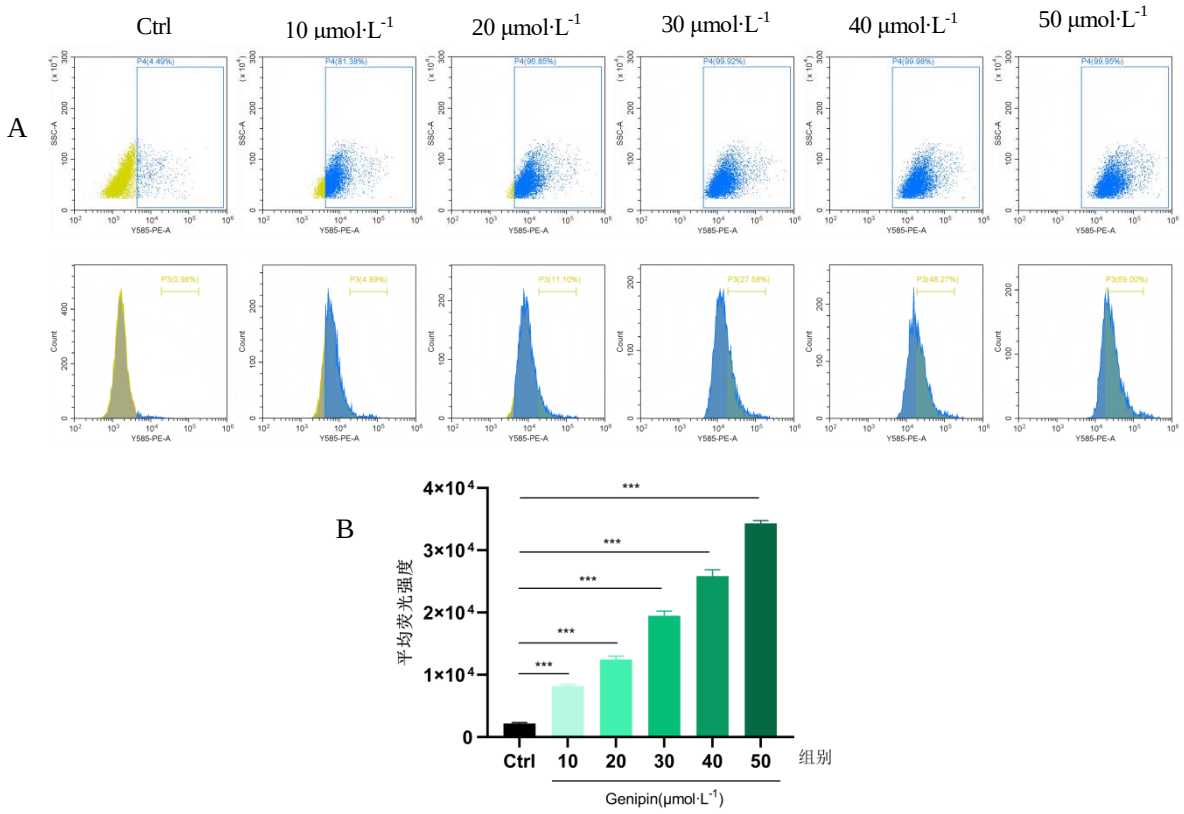


图 6 京尼平对线粒体活性氧影响的流式图（A）和定量柱状图（B）

Fig.6 Flow cytometry graph (A) and quantitative bar graph (B) of the effect of genipin on mitochondrial reactive oxygen species

注：图中***代表 P<0.001。

使用靶向线粒体的 MitoSOX 染料对线粒体超氧化物进行了检测，结果如图 6 所示。线粒体膜电位的增加往往会导致线粒体电子传递链和磷酸化的偶联程度的增加。众所周知，在电子传递链运转过程中，并不是所有电子都可以被复合物转运至氧气最终生成水，部分电子会从传递链中泄漏，进而直接与氧气结合生成超氧阴离子[30]。如前所述，京尼平可以通过抑制 UCP2 增加线粒体膜电位，本研究进一步检测了京尼平对细胞线粒体超氧化物的影响。结果显示，10~50 μmol Ł$^{-1}$ 浓度范围内，京尼平孵育 24 h 后，相较于对照组，线粒体活性氧的水平呈浓度依赖性地显著升高（P<0.001）。在 10 μmol Ł$^{-1}$ 时，线粒体超氧化物荧光强度增加至 8 200.00，为空白对照组的 3.76 倍，当浓度提高到 50 μmol Ł$^{-1}$ 时，线粒体超氧化物激增至对照组的 15.73 倍，荧光强度达到了 34 302.33。以往的

文献报道，线粒体活性氧的过度增加会导致细胞氧化应激，最终造成细胞损伤[31]。但有趣的是，根据前文所述，在 10~50 μmol Ł$^{-1}$ 浓度范围内，京尼平并不会对 THP1 细胞产生毒性。这可能是因为京尼平增加了线粒体膜电位，促进了线粒体氧化磷酸化过程的偶联，电子传递链（Electron Transport Chain，ETC）的活跃使得在线粒体内部产生了更多的活性氧，但是细胞并没有发生氧化应激，表明京尼平可能通过其他途径调节细胞的抗氧化能力。线粒体超氧阴离子在超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase，SOD）的作用下转化为 H_2O_2，有文献报道京尼平诱导的 UCP2 抑制强烈增强线粒体 H_2O_2 水平，在 20 μmol Ł$^{-1}$ 浓度下增加了神经元细胞约 40%的 H_2O_2，并促进了 Mn-SOD 的表达[32]，这表明京尼平在增加 ETC 偶联的同时，也可激活细胞抗氧化系统使细胞免受氧化应激，这可能是由于 UCP2 活性抑制而响应线粒体超氧化物产生的细胞代偿反应。

2.6 不同浓度京尼平的抗炎效果

以 THP1-ASC-GFP 细胞系为体外抗炎效果评价模型，对不同浓度京尼平的抗炎效果进行探究。ASC 是细胞内的一种接头适配蛋白，在炎症小体的形成中起到重要作用，通过基因编辑生成 ASC 偶联绿色荧光蛋白的细胞株，就可以通过流式细胞术等手段方便快捷的检测炎症反应。在不同浓度的京尼平预保护 2 h 后，使用 LPS 刺激诱导炎症反应，探究京尼平对炎症反应的调控作用。如图 7 所示，LPS 刺激后细胞中绿色荧光显著增强至 162 730.00（P<0.001），达到了空白对照组的 22.39 倍，表明 ASC 的表达被激活。在 10~50 μmol·L^{-1} 浓度范围内，京尼平预保护呈浓度依赖性地降低了 ASC 的荧光强度，抑制了细胞的炎症反应，并在 20 μmol·L^{-1} 时检测出统计学差异（P<0.05）。在 50 μmol·L^{-1} 京尼平处理后，ASC 炎症小体的荧光强度下降至 146 171.33，相较于 LPS 组下降了 10.17%。有研究报道称京尼平处理可缓解 BV2 细胞炎症反应，在最大 20 μmol·L^{-1} 浓度下可以显著降低炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 的蛋白水平，相较于模型组分别可降低约 70%和 80%[33]。本研究的结果进一步支持并解释了相关文献的结论，ASC 炎症小体是炎症反应的启动因子，京尼平处理可从上游有效控制炎症的发生，进而使得下游炎症效应因子的蛋白表达明显降低。实验结果表明京尼平具有缓解炎症反应的效果。

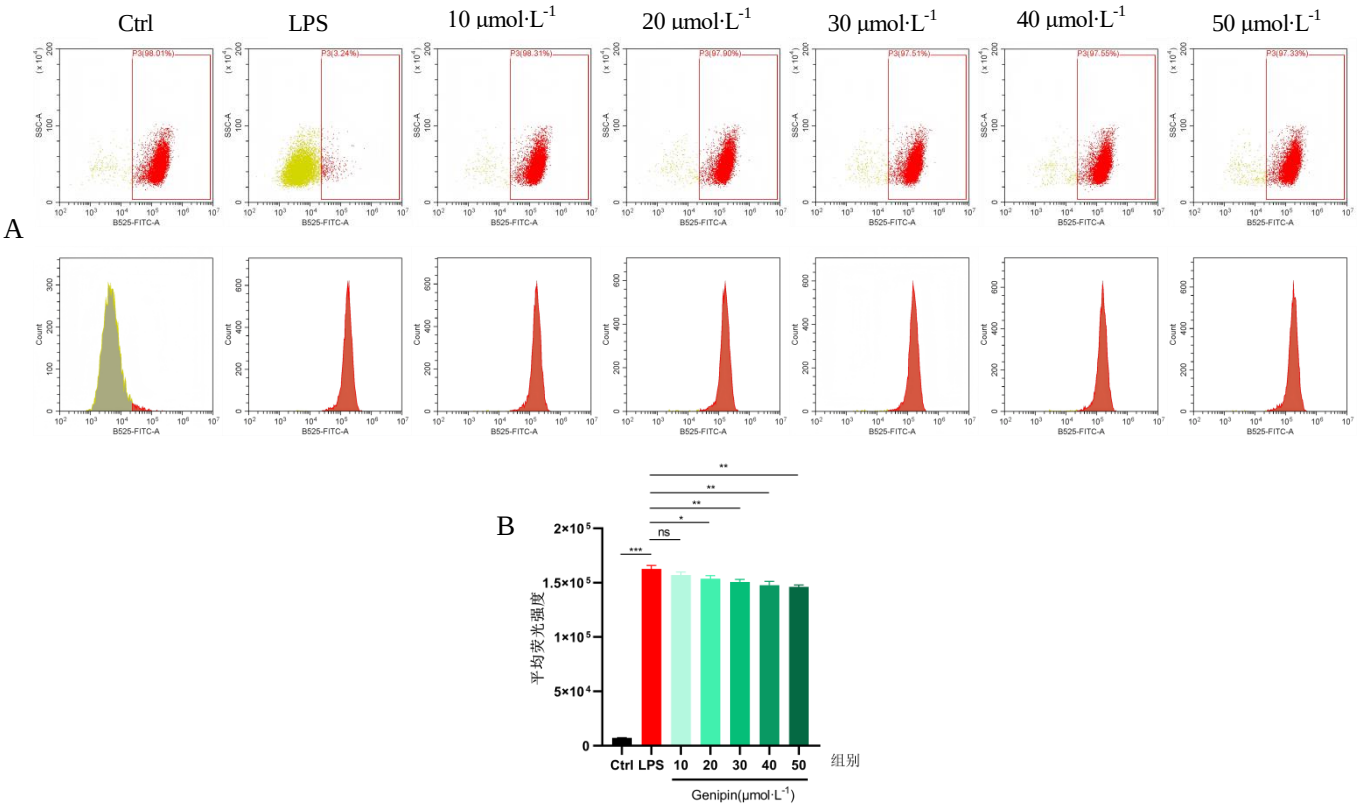


图 7 京尼平降低 ASC 荧光强度的流式图（A）和定量柱状图（B）

Fig. 7 Flow cytometry graph (A) and quantitative histogram (B) of ASC fluorescence intensity reduction by genipin

注：图中*、**分别代表 P<0.05、P<0.01。ns 表示两组之间无统计学差异。

3 结论

本研究基于流式细胞术初步筛选了 9 种栀子代表性化合物促进线粒体自噬的活性，发现京尼平具有最强的效果。进一步以京尼平为主要研究对象，实验结果表明京尼平既可以调节线粒体自噬、线粒体膜电位、线粒体超氧化物等线粒体功能相关指标，又具有抗炎的效果，以上结果表明京尼平在通过线粒体途径缓解炎症反应方面有极大潜力。但还需要进一步在炎症相关体内外模型的研究中探究二者之间的联系。

参考文献

[1] QUAN S, FU X, CAI H, et al. The Neuroimmune nexus: unraveling the role of the mtDNA-cGAS-STING signal pathway in Alzheimer's disease [J]. Molecular Neurodegeneration, 2025, 20(1): 25.

[2] PEGGION C, CALI T, BRINI M. Mitochondria dysfunction and Neuroinflammation in Neurodegeneration: Who comes first ? [J]. Antioxidants, 2024, 13(2): 240.

[3] LIN M, LIU N, QIN Z, et al. Mitochondrial-derived damage-associated molecular patterns amplify Neuroinflammation in Neurodegenerative diseases [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2022, 43(10): 2439-2447.

[4] WILKINS H M, KOPPEL S J, WEIDLING I W, et al. Extracellular mitochondria and mitochondrial components act as Damage-Associated Molecular Pattern molecules in the mouse brain [J]. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2016, 11(4): 622-628.

[5] FISCHER F, HAMANN A, OSIEWACZ H D. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2012, 37(7): 284-292.

[6] LEMASTERS JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. Rejuvenation Research, 2005, 8(1): 3-5.

[7] LIU Y, WANG M, HOU X, et al. Roles of microglial mitophagy in neurological disorders [J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2022, 14: 979869.

[8] 邵青森.栀子花中化学成分的分离鉴定及生物活性研究[D].宜春:宜春学院,2023.

[9] 秦莎莎.栀子提取物改善胆汁淤积性肝损伤的作用机制研究[D].北京:中国中医科学院,2023.

[10] JIN C, ZONGO A W, DU H, et al. Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit: a critical review of its functional nutrients, processing methods, health-promoting effects, comprehensive application and future tendencies [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2025, 65(1): 165-192.

[11] 张小龙,吴斌霞,朱钊宇,等.山栀子不同部位活性成分含量及抗氧化活性[J].食品工业科技,2024,45(12):10-17.

[12] 胡瑶,雷星宇,李宏告,等.不同产地栀子主要成分含量的测定[J].中国农学通报,2023,39(28):126-130.

[13] JIA M, LV X, ZHU T, et al. Liraglutide ameliorates delirium-like behaviors of aged mice undergoing cardiac surgery by mitigating microglia activation via promoting mitophagy [J]. Psychopharmacology, 2024, 241(4): 687-698.

[14] PARK Y S, CHOI S E, KOH H C. PGAM5 regulates PINK1/Parkin-mediated mitophagy via DRP1 in CCCP-induced mitochondrial dysfunction [J]. Toxicology Letters, 2018, 284: 120-128.

[15] SEABRIGHT A P, FINE N H F, BARIOW J P, et al. AMPK activation induces mitophagy and promotes mitochondrial fission while activating TBK1 in a PINK1-Parkin independent manner [J]. The FASEB Journal, 2020, 34(5): 6284-6301.

[16] GAO K, ZONG H, HOU K, et al. p53N236S activates autophagy in response to hypoxic stress induced by DFO [J]. Genes, 2022, 13(5): 763.

[17] 王菲菲,张聿梅,郑笑为,等.环烯醚萜类化合物的结构和生物学活性研究进展[J].中国药事,2019,33(3):323-330.

[18] YANG Y, YANG Y, HOU J, et al. The hydroxyl at position C1 of genipin is the active inhibitory group that affects mitochondrial uncoupling protein 2 in Panc-1 cells [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e147026.

[19] AHMED R, UL Ain Hira N, WANG M, et al. Genipin, a natural blue colorant precursor: Source, extraction, properties, and applications [J]. Food Chemistry, 2024, 434: 137498.

[20] 徐芳,唐媛媛,朱寒寒,等.ASC 斑点在炎症扩散中的作用[J].生命的化学,2024,44(8):1425-1432.

[21] SHI R, ZHU S, LI V, et al. BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke [J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2014, 20(12): 1045-1055.

[22] LI J, XIE L, DOU Z, et al. Genipin activates autophagy and promotes myoblast differentiation by activating AMPK pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(27): 15190-15197.

[23] 金瑶.京尼平通过 PINK1/Parkin 通路调控线粒体自噬减轻 HtrA2/Omi 突变鼠脑缺血再灌注损伤[D].长春:吉林大学,2021.

[24] KOOPMAN W J, DISTELMAIER F, SMEITINK J A, et al. OXPHOS mutations and neurodegeneration [J]. The EMBO Journal. 2013; 32(1): 9-29.

[25] JI X B, LI X R, DING H, et al. Inhibition of uncoupling protein 2 attenuates cardiac hypertrophy induced by transverse aortic constriction in mice [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 36(5): 1688-1698.

[26] LIU Y, JIANG H, XING F, et al. Uncoupling protein 2 expression affects androgen synthesis in polycystic ovary syndrome [J]. Endocrine, 2013, 43(3): 714-723.

[27] 师岩,徐晶,程昊,等.京尼平抑制高糖诱导的大鼠心肌 H9c2 细胞氧化应激及凋亡损伤[J].中国病理生理杂志,2019,35(2):224-230.

[28] 石明珠,叶田香,刘逸轩,等.栀子苷代谢产物京尼平对 HK-2 细胞损伤及 NLRP3 通路的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2023,28(5):481-488.

[29] SHIN J, LEE S. Genipin protects the liver from Ischemia/Reperfusion injury by modulating mitochondrial quality control [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2017, 328: 25-33.

[30] 耿军伟,于涵,林枝,等.动物细胞中活性氧的生成及代谢[J].生命科学,2015,27(5):609-617.

[31] KOROVESIS D, RUBIO T T, TAVERNARAKIS N. Oxidative stress in age-related Neurodegenerative diseases: An overview of recent tools and findings [J]. Antioxidants, 2023, 12(1): 131.

[32] CARDOSO S, SEICA R M, MOREIRA P I. Uncoupling protein 2 inhibition exacerbates glucose fluctuation-mediated neuronal effects [J]. Neurotoxicity Research, 2018, 33(2): 388-401.

[33] WANG J J, CHEN L, LIANG Z B, et al. Genipin inhibits LPS-induced inflammatory response in BV2 microglial cells [J]. Neurochemical Research, 2017, 42(10): 2769-2776.