

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230336

· 论 著 ·

玉女煎体外抗炎最佳活性部位筛选及其物质基础研究

吕洁, 王岩松, 杨娟, 雷莉妍*

陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西省创新药物研究中心, 陕西中医药大学, 咸阳 712083

[摘要] **目的** 筛选玉女煎复方体外抗炎的最佳活性部位, 并对其成分进行分析, 探讨其物质基础。**方法** 玉女煎复方采用水提取, 提取物浓缩后经D101大孔树脂进行粗分, 分为水洗脱、30%乙醇-水洗脱、60%乙醇-水洗脱及95%乙醇-水洗脱4个水洗脱部位。采用脂多糖诱导小鼠巨噬细胞炎症模型评价玉女煎水提液及各水洗脱部位的抗炎活性, 使用MTT法和Griess法检测细胞活力和一氧化氮生成量。随后对筛选出的最佳活性部位的抗炎活性进行验证。采用ELISA法检测IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平, 用显微暗场成像法观察细胞形态, 用免疫荧光实验检测细胞内NF- κ B p65表达。最后通过中压色谱分离凝胶柱分离结合活性追踪的方法对最佳活性部位成分进行分离, 用核磁共振仪进行鉴定。**结果** 玉女煎水提液、水洗脱部位、30%乙醇-水洗脱部位及60%乙醇-水洗脱部位均有抗炎活性, 其中水洗脱部位和30%乙醇-水洗脱部位抗炎活性弱于水提液, 60%乙醇-水洗脱部位抗炎活性最强, 95%乙醇-水洗脱部位无抗炎活性。60%乙醇-水洗脱部位对脂多糖诱导的细胞形态改变、NF- κ B p65表达及入核增加的抑制作用最强, 从该部位分离出了sonnerphenolic B、(+)-nyasol、broussonin A、2,4-二甲基苯甲酸和2,4-二羟基苯甲酸5个化合物, 其中3个归属知母。**结论** 60%乙醇-水洗脱部位为玉女煎抗炎的最佳活性部位, 知母可能是其抗炎活性的主要贡献者。

[关键词] 玉女煎; 抗炎作用; 最佳活性部位; 物质基础; 成分分析

[引用本文] 吕洁, 王岩松, 杨娟, 等. 玉女煎体外抗炎最佳活性部位筛选及其物质基础研究[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(1): 64-73. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230336.

Screening of the best anti-inflammatory active fraction of *Yunüjian* *in vitro* and its substance basis

LÜ Jie, WANG Yansong, YANG Juan, LEI Liyan*

Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry, State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic *Qin* Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi Innovation Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To screen the best anti-inflammatory active fraction of *Yunüjian in vitro*, analyze its chemical composition, and explore its substance basis. **Methods** *Yunüjian* decoction was extracted by water. The extract was concentrated, separated by D101 macroporous resin and divided into 4 elution fractions: water elution, 30% ethanol-water elution, 60% ethanol-water elution, and 95% ethanol-water elution. The anti-inflammatory activity of *Yunüjian* water extract and other elution fractions was evaluated by lipopolysaccharide-induced mouse macrophage inflammation model. Cell viability and nitric oxide (NO) production were evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) and Griess method. Then, we validated the anti-inflammatory activity of the best active fraction screened. Interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor α , and IL-6 levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), cell morphology was observed by dark-field microscopy, and intracellular nuclear factor κ B (NF- κ B) p65 was detected by immunofluorescence staining. Finally, the chemical components of the best active fraction were separated by middle chromatogram isolated gel column separation combined with activity tracking method and identified by nuclear magnetic resonance spectrometer. **Results** The water extract, water elution fraction, 30% ethanol-water elution fraction, and 60% ethanol-water elution fraction of *Yunüjian* had anti-inflammatory activity. The anti-inflammatory activities of the water elution fraction and 30% ethanol-water elution fraction were weaker than that of the water extract. The anti-inflammatory activity of the 60% ethanol-water elution fraction was the highest, and the 95% ethanol-water

[收稿日期] 2023-06-15 [接受日期] 2023-10-10

[基金项目] 陕西省教育厅重点科学研究计划(20JY011), 陕西省重点研发计划(2022SF-090). Supported by Key Scientific Research Project of Shaanxi Education Department (20JY011) and Key Research and Development Plan of Shaanxi Province (2022SF-090).

[作者简介] 吕洁, 硕士生. E-mail: 401331937@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 029-38182209, E-mail: liyanlei-2005@163.com

elution fraction had no anti-inflammatory activity. The 60% ethanol-water elution fraction was the most effective in inhibiting the changes of cell morphology and the expression and nuclear translocation of NF- κ B p65 induced by lipopolysaccharide. Five compounds (sonnerphenolic B, (+)-nyasol, broussonin A, 2,4-dimethylbenzoic acid, and 2,4-dihydroxybenzoic acid) were isolated from the 60% ethanol-water elution fraction, and 3 of them were from *Anemarrhena asphodeloides*. **Conclusion** The 60% ethanol-water elution fraction is the best anti-inflammatory active fraction of *Yunüjian*, and the main anti-inflammatory activity may be owed to *Anemarrhena asphodeloides*.

[**Key words**] *Yunüjian*; anti-inflammatory effect; best active fraction; substance basis; component analysis

[**Citation**] LÜ J, WANG Y, YANG J, et al. Screening of the best anti-inflammatory active fraction of *Yunüjian* *in vitro* and its substance basis[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(1): 64-73. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230336.

《景岳全书·新方八阵》中的玉女煎由生石膏、熟地黄、知母、牛膝和麦冬等药物组成,具有滋阴清热作用,临床用于治疗牙周炎和口腔溃疡等炎症性疾病^[1]。有研究显示,玉女煎复方及其各单味药材均具有不同程度的抗炎作用^[2-4]。玉女煎对血热风燥型面部脂溢性皮炎有治疗作用^[5]。生石膏具有良好的清热抗炎作用,可以有效改善热应激引起的小鼠下丘脑炎症^[6]。熟地黄多糖能降低炎症因子IL-1 β 和TNF- α 的表达,改善骨关节炎症状^[7]。知母皂苷B- II (timosaponin B- II, TB- II)能够激活JNK、NF- κ B和MAPK信号通路,减少炎症小体表达,发挥抗炎作用^[8]。知母皂苷元能够抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小胶质细胞上清液中炎症因子表达,减少一氧化氮(nitric oxide, NO)的产生,促进原代小胶质细胞由M1亚型转变为M2亚型^[9]。牛膝总皂苷可以降低骨关节炎小鼠关节渗出液中促炎因子的表达和NALP3炎症小体的活化^[10]。麦冬中的皂苷D可以通过抑制NF- κ B通路减轻LPS诱导的人肺上皮细胞炎症反应^[11]。本课题组前期研究显示,玉女煎及其主要成分芒果苷具有抗炎活性^[12-15]。本研究对玉女煎抗炎的最佳活性部位进行筛选,并初步探讨该部位的抗炎物质基础。

1 材料和方法

1.1 细胞株 小鼠巨噬细胞RAW264.7购自北京协和细胞库。

1.2 主要试剂和仪器 RPMI 1640培养基、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液购自上海达特希尔生物科技有限公司(批号:2244286、2223103),FBS购自澳大利亚Biological Industries公司(批号:2134232),LPS购自美国Sigma-Aldrich公司(批号:0000130083),N-(1-萘基)-乙二胺二盐酸盐

[N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, dihydrochloride, NED]、磺胺购自生工生物工程(上海)股份有限公司(批号:D703BA0016、D505BA0035),MTT购自北京索莱宝科技有限公司(批号:1123A051),通用型细胞组织固定液购自赛文创新(北京)生物科技有限公司(批号:20210115),兔NF- κ B p65单克隆抗体购自上海碧云天生物科技有限公司,CoraLite594标记的山羊抗兔IgG(H+L)购自武汉三鹰生物技术有限公司(批号:20000439),无水乙醇、正丁醇、氯仿、甲醇购自天津市百世化工有限工司,D101大孔树脂、中压色谱分离凝胶(middle chromatogram isolated gel, MCI)购自日本三菱公司。311型细胞恒温培养箱(美国ThermoFisher Scientific公司),SW-CJ-2FD型超净工作台(苏净集团安泰公司),IX73型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司),Thermo Multiskan GO型多功能全波长酶标仪(美国Bio-Tek Instruments公司),Varian Mercury plus-600型核磁共振仪(德国布鲁克公司)。

1.3 玉女煎水提液及不同极性部位提取液的制备 分别精准称取15 g生石膏、30 g熟地黄、6 g麦冬、5 g知母和5 g牛膝,加入10倍量的水中,煎煮1 h,过滤出滤渣,再以8倍量的水继续煎煮1 h,最终收集滤液,使用旋转蒸发仪对其进行浓缩。浓缩后的样品置于-80℃冰箱冷冻过夜,采用真空冷冻干燥机干燥后备用。使用D101大孔树脂吸附样品,然后用去离子水及30%、60%、95%乙醇-水溶液进行洗脱,以获得最佳的吸附效果。将各洗脱液用旋转蒸发仪旋蒸浓缩成稠膏,用真空冷冻干燥机制备为干粉,分别装瓶备用。

1.4 玉女煎水提液及不同极性部位提取液的抗炎活性考察 采用LPS诱导的小鼠巨噬细胞炎症模型评价玉女煎水提液及各洗脱部位的抗炎活性。

1.4.1 RAW264.7 细胞相对活力检测 将RAW264.7 细胞以 2×10^5 个/孔的密度铺到 96 孔板中。将细胞用玉女煎不同极性部位提取液处理 1 h 后,每孔加入 10 μL LPS (终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 24 h。诱导结束后,每孔加入 15 μL MTT,继续培养 4 h。弃上清液,每孔加入 150 μL DMSO,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡 10 min,采用全波长酶标仪检测 450 nm 处的光密度值,计算细胞相对活力。

1.4.2 NO 及炎症细胞因子检测 将RAW264.7 细胞以 2×10^5 个/孔的密度铺到 96 孔板中。将细胞用玉女煎不同极性部位提取液处理 1 h 后,每孔加入 10 μL LPS (终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 24 h。诱导结束后,收集细胞上清液用于后续检测。在新的 96 孔板中加入各组细胞上清液 50 μL ,随后每孔加入 50 μL 磺胺和 50 μL NED 避光反应 10 min,将 96 孔板轻轻震荡混匀后采用全波长酶标仪检测 540 nm 处的光密度值,采用 NO 反应标准曲线计算各待测样品的 NO 含量。另取细胞上清液,采用 ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平。

1.4.3 细胞形态观察 将洁净、无菌的载玻片置于 6 孔板中。取对数生长期的细胞,以 2×10^7 个/孔的密度铺到 6 孔板中。将细胞用玉女煎不同极性部位提取液处理 1 h 后,每孔加入 10 μL LPS (终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 24 h。诱导结束后,用细胞固定液固定细胞。将固定好的样品置于显微镜载物台上,先用普通聚光镜调整光路,调整好光路后将普通聚光镜更换为暗场聚光镜,进行暗场成像并采集图片。

1.4.4 免疫荧光实验 将RAW264.7 细胞以 2×10^4 个/孔的密度铺到 96 孔板中。将细胞用玉女煎不同极性部位提取液处理 1 h 后,每孔加入 10 μL LPS (终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 24 h。诱导结束后弃上清液,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。用固定液固定细胞 15 min 后,每孔加入适量的 0.3% Triton X-100 通透 15 min。随后用 5% 牛血清白蛋白于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,加入 NF- κB p65 抗体 (稀释比例为 1 : 100) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用 PBST 轻轻震荡洗涤 3 次,每次 5 min。加入 CoraLite594 标记的二抗 (稀释比例为 1 : 400) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h,用 PBST 轻轻震荡洗涤 3 次,每次 5 min。最后用 DAPI 细胞核染色液染核,用 PBS 洗涤细胞后,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 玉女煎抗炎活性最佳部位成分考察

1.5.1 正丁醇萃取活性部位 取玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位干燥粉末 12.086 3 g,加纯水 400 mL 溶解,于分液漏斗中加正丁醇 400 mL,萃取,随后将水相与正丁醇相均用旋转蒸发仪蒸干。

1.5.2 MCI 柱分离正丁醇相 用 36 mL 甲醇溶解正丁醇相,分 2 次和 MCI 拌样,研细装柱,分别用水、50% 甲醇、100% 甲醇以 8 mL/min 流速洗脱 50 min,洗脱液分别蒸干。

1.5.3 MCI 柱分离正丁醇相甲醇洗脱部位 正丁醇相的甲醇洗脱部位干燥后,取粉末称取 6.8 g,加 40 mL 甲醇溶解,分 2 次拌样并装柱,用 75% 甲醇-水冲洗柱子 80 min、甲醇洗脱 70 min,流速均为 10 mL/min,将洗脱的 75% 甲醇相和甲醇相分别蒸干称重。

将甲醇相加甲醇溶解并和反相填料拌样装柱,先用 20% 甲醇-水冲洗柱子 30 min,再用 50%、60%、70%、80%、90%、100% 甲醇分别洗脱 3 个柱体积,收集洗脱液并分别蒸干,用甲醇分别点硅胶板,展开剂用氯仿-甲醇 (体积比为 20 : 1),根据硅胶板各点比移值将合适管中样品进行合并。

1.5.4 化合物的纯化 采用 HPLC 对样品中活性部位的化合物进行纯化。流动相为乙腈-水 (体积比为 40 : 60),流速为 2.5 mL/min。将各峰分别收集在锥形瓶中,于旋转蒸发仪上蒸干,用甲醇洗在西林瓶中,点硅胶板。

1.5.5 化合物鉴定 用核磁共振仪检测 HPLC 分离得到的 4 个峰收集液的碳谱和氢谱,并进行谱图分析。

1.6 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,并采用最小显著性差异法 (方差齐) 或 Dunnett's T_3 法 (方差不齐) 进行事后多重比较。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 玉女煎不同洗脱部位对RAW264.7 细胞相对活力的影响 由表 1 可见,质量浓度为 1、2 mg/mL 的玉女煎 95% 乙醇-水洗脱部位有一定细胞毒性 ($P < 0.01$),其他洗脱部位对细胞相对活力无明显影响。如表 2 所示,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理诱导的

RAW264.7 细胞相对活力约降低为空白组的 85% ($P<0.01$), 玉女煎水提液能对 LPS 诱导的细胞活力降低产生逆转作用并存在浓度依赖性, 当浓度为 1、2 mg/mL 时细胞相对活力与 LPS 组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$); 水洗脱部位对 LPS 诱导的细胞活力降低无明显影响 ($P>0.05$); 30% 乙醇-水洗脱部位质量浓度为 0.5 mg/mL 时能改善 LPS 诱导的细胞活力降低 ($P<0.05$), 但当质量浓度为 1、2 mg/mL 时与 LPS 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 60% 乙醇-水洗脱部位 (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 随着浓度增大对细胞活力的保护作用增强, 与 LPS 组比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$); 95% 乙醇-水洗脱部位则加重了细胞损伤, 细胞相对活力比 LPS 组更低 ($P<0.01$)。

2.2 玉女煎不同活性部位对 RAW264.7 细胞 NO 生成的影响 玉女煎水提液 (0.5、1、2 mg/mL)、60% 乙醇-水洗脱部位 (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 均以浓度依赖方式抑制 LPS 诱导的 NO 生成, 与 LPS 组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); 玉女煎水洗脱部位 (0.5、1、2 mg/mL) 和 30% 乙醇-水洗脱部位 (0.5、1、

2 mg/mL) 也能抑制 NO 生成活性, 但没有明显的浓度依赖性。见表 2。

表 1 玉女煎水提液及不同极性部位对 RWA264.7 细胞相对活力的影响

Tab 1 Effects of water extract and different polarity fractions of *Yunüjian* on viability of RWA264.7 cells

| Group | %, $n=3, \bar{x}\pm s$ | |
|---|------------------------|--|
| | Cell viability | |
| Control | 100.00±0.00 | |
| 0.5 mg·mL ⁻¹ water extract | 99.27±2.06 | |
| 1 mg·mL ⁻¹ water extract | 99.80±1.11 | |
| 2 mg·mL ⁻¹ water extract | 102.50±3.88 | |
| 0.5 mg·mL ⁻¹ water elution fraction | 100.20±3.82 | |
| 1 mg·mL ⁻¹ water elution fraction | 102.10±4.16 | |
| 2 mg·mL ⁻¹ water elution fraction | 101.40±6.01 | |
| 0.5 mg·mL ⁻¹ 30% ethanol-water elution fraction | 100.70±1.87 | |
| 1 mg·mL ⁻¹ 30% ethanol-water elution fraction | 100.00±4.78 | |
| 2 mg·mL ⁻¹ 30% ethanol-water elution fraction | 96.37±4.16 | |
| 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 60% ethanol-water elution fraction | 96.01±2.70 | |
| 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 60% ethanol-water elution fraction | 95.76±1.56 | |
| 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 60% ethanol-water elution fraction | 94.89±2.14 | |
| 0.5 mg·mL ⁻¹ 95% ethanol-water elution fraction | 98.01±1.14 | |
| 1 mg·mL ⁻¹ 95% ethanol-water elution fraction | 92.59±1.93** | |
| 2 mg·mL ⁻¹ 95% ethanol-water elution fraction | 91.40±1.06** | |

** $P<0.01$ vs control group.

表 2 玉女煎水提液及不同极性部位对 LPS 诱导的 RWA264.7 细胞相对活力降低和 NO 生成的影响

Tab 2 Effects of water extract and different polarity fractions of *Yunüjian* on viability decrease and NO production induced by LPS in RWA264.7 cells

| Group | $n=3, \bar{x}\pm s$ | |
|---|---------------------------|---|
| | Cell viability/% | NO/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) |
| Control | 100.00±0.00 | 2.95±0.34 |
| LPS | 85.51±3.39** | 43.04±1.37** |
| LPS+0.5 mg·mL ⁻¹ water extract | 87.41±3.97 | 36.55±4.56 Δ |
| LPS+1 mg·mL ⁻¹ water extract | 95.61±2.75 $\Delta\Delta$ | 22.76±3.55 $\Delta\Delta$ |
| LPS+2 mg·mL ⁻¹ water extract | 97.05±4.54 $\Delta\Delta$ | 14.23±2.79 $\Delta\Delta$ |
| LPS+0.5 mg·mL ⁻¹ water elution fraction | 90.66±5.06 | 36.72±1.80 $\Delta\Delta$ |
| LPS+1 mg·mL ⁻¹ water elution fraction | 88.85±8.83 | 25.77±1.14 $\Delta\Delta$ |
| LPS+2 mg·mL ⁻¹ water elution fraction | 91.84±6.05 | 23.12±3.38 $\Delta\Delta$ |
| LPS+0.5 mg·mL ⁻¹ 30% ethanol-water elution fraction | 97.33±5.32 Δ | 35.12±4.51 Δ |
| LPS+1 mg·mL ⁻¹ 30% ethanol-water elution fraction | 89.14±3.48 | 22.59±2.69 $\Delta\Delta$ |
| LPS+2 mg·mL ⁻¹ 30% ethanol-water elution fraction | 89.61±9.51 | 17.83±4.50 $\Delta\Delta$ |
| LPS+50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 60% ethanol-water elution fraction | 91.75±0.55 $\Delta\Delta$ | 24.54±2.28 $\Delta\Delta$ |
| LPS+100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 60% ethanol-water elution fraction | 93.22±0.70 $\Delta\Delta$ | 16.71±1.34 $\Delta\Delta$ |
| LPS+200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 60% ethanol-water elution fraction | 94.59±1.78 $\Delta\Delta$ | 9.85±0.62 $\Delta\Delta$ |
| LPS+0.5 mg·mL ⁻¹ 95% ethanol-water elution fraction | 75.15±1.01 $\Delta\Delta$ | 44.41±3.18 |
| LPS+1 mg·mL ⁻¹ 95% ethanol-water elution fraction | 68.42±3.11 $\Delta\Delta$ | 47.41±1.24 Δ |
| LPS+2 mg·mL ⁻¹ 95% ethanol-water elution fraction | 68.74±3.87 $\Delta\Delta$ | 47.86±0.66 $\Delta\Delta$ |

** $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs LPS group. LPS: Lipopolysaccharide; NO: Nitric oxide.

2.3 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子分泌的影响 如表 3 所

示, 与对照组相比, LPS 组的 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平均增高 ($P<0.01$); 与 LPS 组比较, NF- κ B

抑制剂 BAY11-7082 (10 μmol/L) 能降低 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的水平 ($P < 0.01$); 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位 (100、200 μg/mL) 能以浓度依赖的方式抑制 LPS 诱导的炎症因子分泌 ($P < 0.01$)。

表 3 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位对 RWA264.7 细胞炎症因子分泌的影响

Tab 3 Effect of 60% ethanol-water elution fraction of *Yunüjian* on secretion of inflammatory cytokines in RWA264.7 cells

| Group | IL-1β | IL-6 | TNF-α |
|--|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Control | 32.65 ± 7.13 | 27.76 ± 7.36 | 221.30 ± 40.25 |
| LPS | 173.60 ± 15.04** | 527.00 ± 19.88** | 1 045.00 ± 126.50** |
| LPS + 50 μg·mL ⁻¹ 60% ethanol-water elution fraction | 142.50 ± 13.42 | 489.30 ± 33.96 | 894.00 ± 51.48 |
| LPS + 100 μg·mL ⁻¹ 60% ethanol-water elution fraction | 102.60 ± 8.83 ^{△△} | 330.30 ± 26.95 ^{△△} | 700.20 ± 66.25 ^{△△} |
| LPS + 200 μg·mL ⁻¹ 60% ethanol-water elution fraction | 74.49 ± 18.75 ^{△△} | 202.90 ± 13.51 ^{△△} | 456.20 ± 29.02 ^{△△} |
| LPS + BAY11-7082 | 55.39 ± 7.39 ^{△△} | 106.00 ± 47.66 ^{△△} | 398.90 ± 68.95 ^{△△} |

BAY11-7082 is an inhibitor of nuclear factor κ B. ** $P < 0.01$ vs control group; ^{△△} $P < 0.01$ vs LPS group. LPS: Lipopolysaccharide; IL: Interleukin; TNF: Tumor necrosis factor.

2.4 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位对 RAW264.7 细胞形态及 NF-κB 表达的影响 如图 1 所示, 对照组 RAW264.7 细胞形态规则, 细胞轮廓清晰; LPS 处理后, 细胞形态变得不规则; 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位不同浓度 (50、100、200 μg/mL) 组及 NF-κB 抑制剂 BAY11-7082 (10 μmol/L) 组细胞形态有所恢复。由图 2 可见, 对照组细胞中 NF-κB 表达量较低; LPS 组 NF-κB 表达量提高, 且出现细胞核移位; 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位不同浓度 (50、100、200 μg/mL) 组 NF-κB 表达有不同程度的降低, 且随着药物浓度的增大 NF-κB 表达降低

更多。

2.5 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位成分分析 通过 HPLC 共分离出了面积较大的 4 个峰, 检测了其 ¹³CNMR 和 ¹HNMR (图 3)。谱图解析发现, 1 号峰为 sonnerphenolic B, 2 号峰为 (+)-nyasol (归属知母), 3 号峰为 broussonin A (归属知母), 4 号峰为 2,4-二甲基苯甲酸和 2,4-二羟基苯甲酸 (归属知母) 的混合物 (组分比例约为 2 : 1), 且在当前很可能是以羧酸盐的形式存在 (表 4)。数据库查询结果显示, sonnerphenolic B 和 2,4-二甲基苯甲酸不能归属到玉女煎中任一味药材。

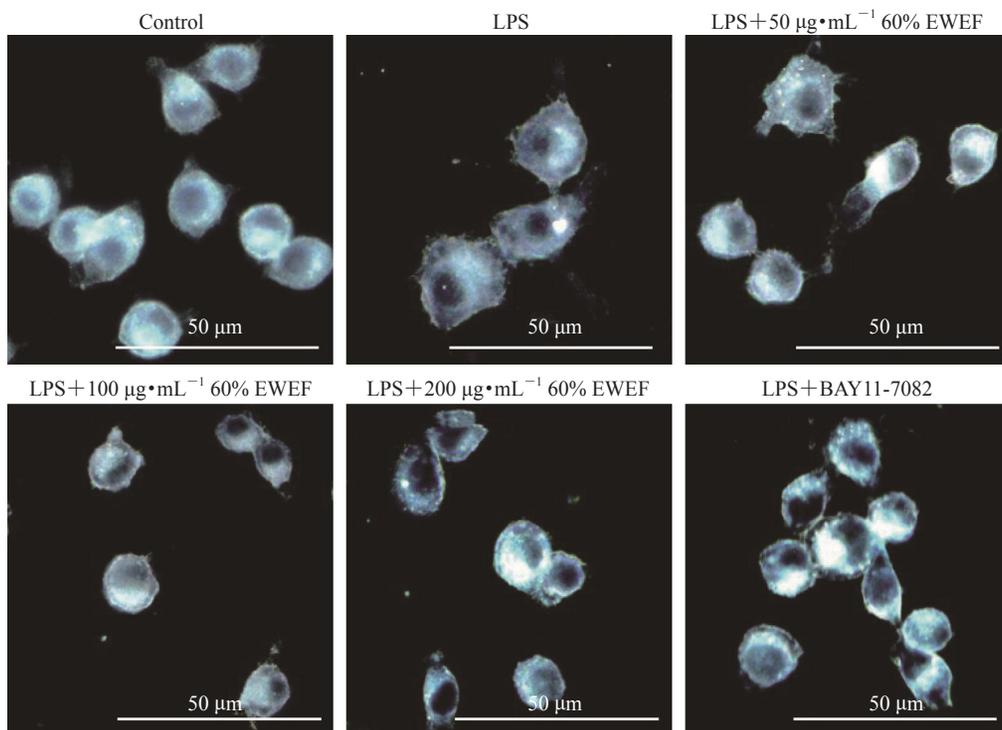


图 1 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位 (EWEF) 对 RWA264.7 细胞形态的影响

Fig 1 Effect of 60% ethanol-water elution fraction (EWEF) of *Yunüjian* on morphology of RWA264.7 cells

The pictures were obtained by dark-field microssopy. BAY11-7082 is an inhibitor of nuclear factor κ B. LPS: Lipopolysaccharide.

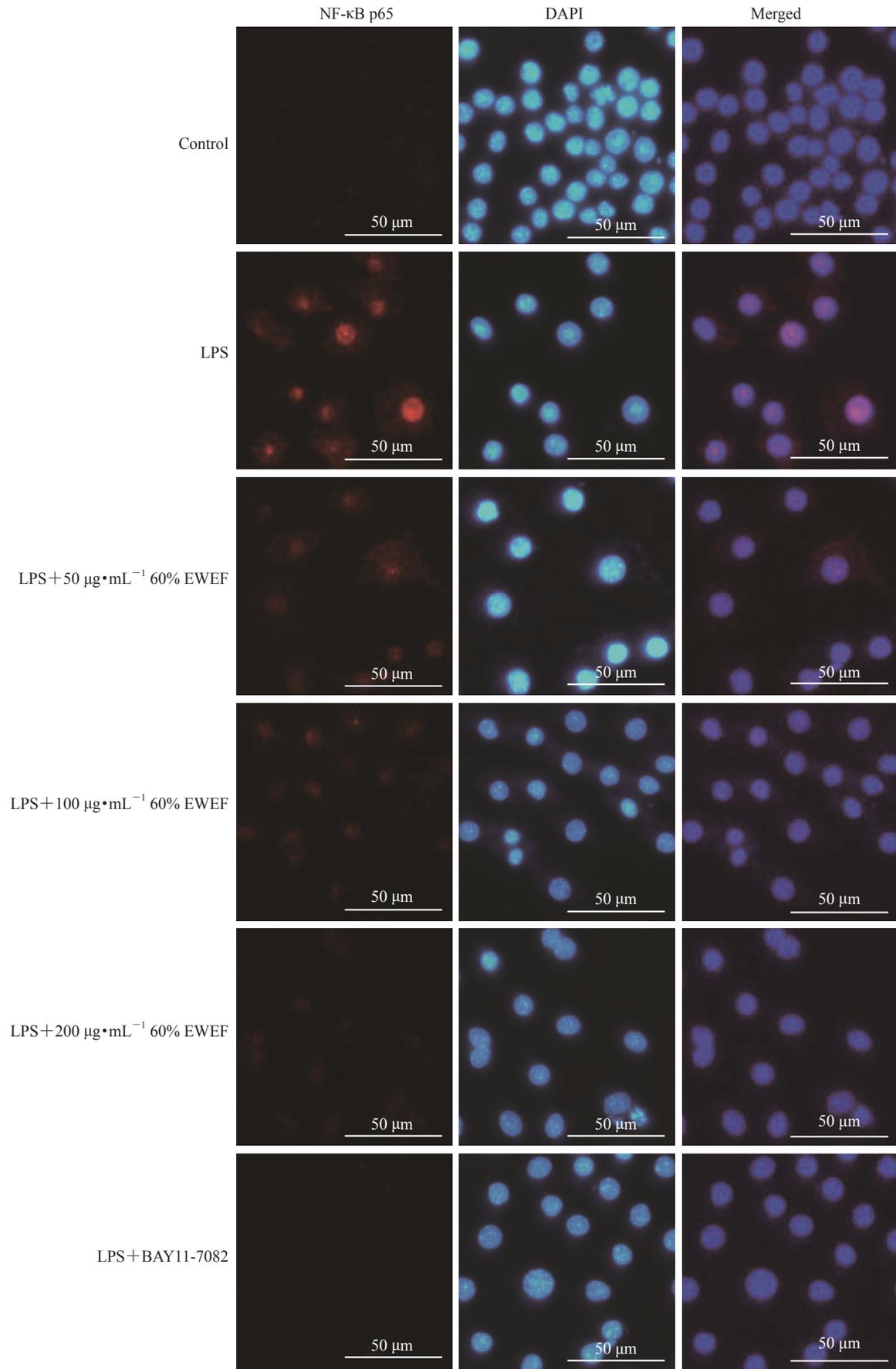


图2 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位 (EWEF) 对 RWA264.7 细胞 NF-κB 表达的影响

Fig 2 Effect of 60% ethanol-water elution fraction (EWEF) of *Yunüjian* on NF-κB expression of RWA264.7 cells
BAY11-7082 is an inhibitor of NF-κB. NF-κB: Nuclear factor κ B; LPS: Lipopolysaccharide; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

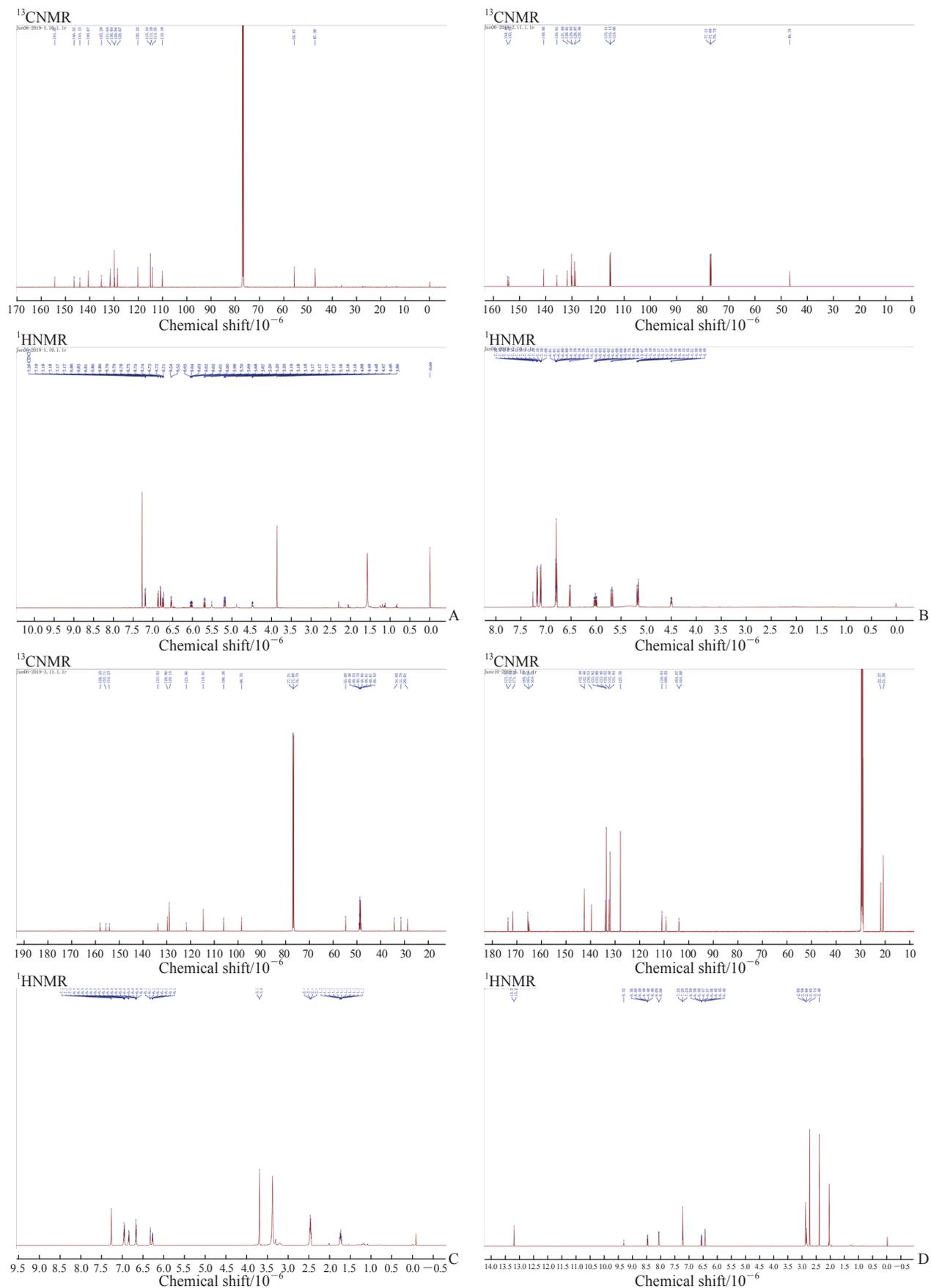


图3 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位 HPLC 分离峰 1~4 的 ¹³CNMR 和 ¹HNMR 谱

Fig 3 ¹³CNMR and ¹HNMR spectra of peaks 1-4 isolated from 60% ethanol-water elution fraction of Yunüjian by HPLC
 A: Peak 1 (sonnerphenolic B); B: Peak 2 ((+)-nyasol); C: Peak 3 (broussonin A); D: Peak 4 (mixture of 2,4-dimethylbenzoic acid and 2,4-dihydroxybenzoic acid). HPLC: High-performance liquid chromatography; ¹³CNMR: Carbon-13 nuclear magnetic resonance; ¹HNMR: Hydrogen-1 nuclear magnetic resonance.

表 4 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位 HPLC 分离峰 1~4 鉴定出的化合物

Tab 4 Compounds of peaks 1-4 isolated from 60% ethanol-water elution fraction of *Yunüjian* by HPLC

| Peak | Structural formula | Chemical formula | Molecular weight | Chemical name |
|------|--------------------|---|------------------------|---|
| 1 | | C ₁₈ H ₁₈ O ₃ | 282.125 6 | Sonnerphenolic B |
| 2 | | C ₁₇ H ₁₆ O ₂ | 252.115 0 | (+)-nyasol |
| 3 | | C ₁₆ H ₁₈ O ₃ | 258.125 6 | Broussonin A |
| 4 | | C ₉ H ₁₀ O ₂ C ₇ H ₆ O ₄ | 150.068 1 154.026 6 | 2,4-dimethylbenzoic acid 2,4-dihydroxybenzoic acid |

HPLC: High-performance liquid chromatography.

3 讨论

玉女煎复方由生石膏等 5 味药材组成, 具有清脏腑热等功效^[16]。现代药理学研究显示, 中医“热”与炎症有密切关系^[17]。风热血热型患者体内的促炎细胞因子 TNF- α 、干扰素 γ 及 IL-1 表达水平升高, 而抗炎因子 IL-10 表达减少^[18]。本课题组前期研究结果显示玉女煎具有抗炎活性, 对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症有抑制作用, 在体内对大鼠关节炎有改善作用^[13-15]。为了进一步明确玉女煎抗炎的物质基础, 本研究以树脂分离结合活性追踪的方法对玉女煎的最佳抗炎活性部位进行筛选, 并对最佳活性部位含量较大的 4 个峰进行了成分鉴定。

3.1 60% 乙醇-水洗脱部位是玉女煎抗炎的最佳活性部位 本研究首先采用 D101 大孔树脂分离获得玉女煎不同极性部位, 包括水洗脱部位、30% 乙醇-水洗脱部位、60% 乙醇-水洗脱部位和 95% 乙醇-水洗脱部位。采用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型, 通过检测 NO 的分泌量评价抗炎活性。NO 是一氧化氮合酶在 L-精氨酸转化为 L-瓜氨酸的过程中产生的, 可以引起血管舒张、白细胞黏附和血管通透性增加, 是一种重要的炎症细胞因子^[19]。在单核细胞中, LPS 可通过激活 NF- κ B 和 MAPK 信号通路引起 IL-1、TNF- α 、IL-6 及 NO 释

放, 产生炎症反应^[20]。本研究结果显示, 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位具有最强的 NO 分泌抑制活性, 其作用也强于玉女煎水提液。

本研究通过暗场成像观察细胞形态的变化, 用免疫荧光实验检测了 NF- κ B 的细胞核移位水平。炎症发生时, RAW264.7 细胞出现多形性, 发生明显的伪足伸长、变多, 体积增大, 细胞质中出现空泡^[21]。NF- κ B 是一种核转录因子, 静息状态时与其抑制蛋白 I κ B 结合并定位于细胞质中, 当受到 LPS 等触发时 NF- κ B 与 I κ B 解离并移位至细胞核中, 启动下游炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等的表达^[22], 故当细胞发生炎症反应时会出现 NF- κ B 核移位现象^[23]。本研究发现, 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位能抑制 RAW264.7 细胞促炎形态的转变和 NF- κ B 核移位。

3.2 玉女煎 60% 乙醇-水洗脱部位化学成分分析 本研究通过 MCI 柱分离、HPLC 分离及核磁共振仪分析了 60% 乙醇-水洗脱部位的化学成分, 对 HPLC 分离获得的 4 个面积较大的峰进行 ¹³CNMR 和 ¹HNMR 鉴定。结果发现, 峰 1 为化合物 sonnerphenolic B, 峰 2 为化合物 (+)-nyasol, 峰 3 为化合物 broussonin A, 峰 4 为化合物 2,4-二甲基苯甲酸和 2,4-二羟基苯甲酸的混合物 (组成比例约为 2 : 1)。nyasol 是一种类二十酸和

NO生成的广谱抑制剂,可以增加大鼠嗜碱性白血病细胞和小鼠巨噬细胞中类二十烷酸和NO的产生^[24],降低LPS诱导的小鼠小胶质细胞中*IL-1 β* 和*TNF- α* 的mRNA水平,具有很好的抗炎作用^[25]。broussonin A是一种二芳基丙烷天然产物,可以调节NF- κ B、Akt和ERK信号通路,在转录水平上抑制LPS刺激的诱导型一氧化氮合酶表达^[26-27]。sonnerphenolic B是一种酚类化合物,具有潜在的乙酰胆碱酯酶抑制作用^[28]。2,4-二甲基苯甲酸是1,2,4-三甲基苯的代谢产物,具有广谱抗菌活性^[29]。在特异性的*ADCK4*敲除小鼠足细胞中,2,4-二羟基苯甲酸通过上调辅酶Q复合物水平逆转线粒体功能障碍^[30]。查阅PubChem、PubMed、EMBASE、Cochrane Library数据库,未见sonnerphenolic B、2,4-二甲基苯甲酸和2,4-二羟基苯甲酸有抗炎活性的相关报道。

3.3 知母可能是玉女煎抗炎活性的重要贡献者 为了对鉴定出的4个化合物进行药材归属,首先在PubChem数据库中检索分子信息,随后从中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)、传统中药百科全书数据库(The Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine, ETCM)、本草组鉴(HERB)和中医药综合数据库(Traditional Chinese Medicine Information Database, TCMID)等中药数据库获取玉女煎复方中各味药材的化学成分进行比对。结果显示,(+)-nyasol、broussonin A和2,4-二羟基苯甲酸均归属于知母,而sonnerphenolic B、2,4-二甲基苯甲酸无法确定归属,可能是药材在煎煮过程中产生的新化合物。已有研究显示,sonnerphenolic B是植物卵叶海桑中的成分^[25],2,4-二甲基苯甲酸是真菌头孢菌属AL031的次级代谢物^[26]。我们后续将对玉女煎中这2个化合物的来源进行深入研究。

综上所述,本研究筛选出60%乙醇-水洗脱部位为玉女煎的最佳抗炎活性部位,鉴定出含量较大的5个化合物,其中有3个归属于知母,为玉女煎抗炎物质基础的研究奠定了一定的实验基础。

[参 考 文 献]

[1] 王卫,吕佳樾,王欣,等.玉女煎治疗糖尿病及并发症

研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(15):223-231. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220925.

- [2] YE Q, LIN B, XU P, et al. *Yunvjian* decoction attenuates lipopolysaccharide-induced periodontitis by suppressing NF κ B/NLRP3/IL-1 β pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 2): 117279. DOI: 10.1016/j.jep.2023.117279.
- [3] 李倩,陈香茗,常鑫鑫,等.知母活性成分对脓毒症性心肌损伤模型小鼠的改善作用[J].中国药房,2023,34(1):29-33,39. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.01.06.
- [4] 孙欣彤,于艳华,李梦佳,等.清胃散合玉女煎对牙周炎大鼠炎症因子和细胞外基质金属蛋白酶的影响[J].中华老年口腔医学杂志,2021,19(5):286-290,311. DOI: 10.19749/j.cn.cjgd.1672-2973.2021.05.007.
- [5] 汪胜红.血热风燥型面部脂溢性皮炎加味玉女煎治疗的临床疗效研究[J].中国社区医师,2020,36(21):130-131. DOI: 10.3969/j.issn.1007-614X.2020.21.079.
- [6] 时文凤,曹艳,曹国胜,等.矿物药石膏的研究进展[J].中药材,2021,44(7):1793-1796. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.07.045.
- [7] 凤雯晴,刘凯洋,张嘉宁,等.基于网络药理学和分子对接的熟地黄治疗骨关节炎的作用机制研究[J].中国中药杂志,2022,47(19):5336-5343. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20220427.401.
- [8] 武双敏,李泽运,侯书涵,等.知母皂苷B-II药理活性及作用机制研究进展[J].上海中医药大学学报,2021,35(6):92-96. DOI: 10.16306/j.1008-861x.2021.06.013.
- [9] 杨志友,胡雪琼.知母皂苷元对脂多糖诱导的BV2小胶质细胞亚型M1/M2的极化及其抗炎活性[J].现代食品科技,2020,36(11):1-8. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.11.0406.
- [10] 那莎,段陈方圆,王璐,等.牛膝总皂苷对大鼠急性痛风性关节炎的防治作用及机制研究[J].中国临床药理学与治疗学,2017,22(9):966-971.
- [11] 徐玲文,王华兵,揭凤英,等.麦冬皂苷D预处理对LPS介导的人肺上皮Beas-2B细胞炎性及氧化损伤的抑制作用[J].沈阳药科大学学报,2021,38(12):1302-1308. DOI: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2020.1110.
- [12] 雷莉妍,王瑞成,周瑞,等.基于NF- κ B通路的芒果苷干预脂多糖诱导的细胞炎症作用机制研究[J].中国中西医结合杂志,2019,39(5):597-602. DOI: 10.7661/j.cjim.20190116.096.
- [13] LEI L Y, WANG R C, PAN Y L, et al. Mangiferin inhibited neuroinflammation through regulating microglial polarization and suppressing NF- κ B, NLRP3 pathway[J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(2): 112-119. DOI: 10.1016/S1875-5364(21)60012-2.
- [14] 雷莉妍,王瑞成,唐志书,等.玉女煎对脂多糖诱导的

- BV2 细胞炎性损伤的保护作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(1): 6-10. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2019.01.002.
- [15] 雷莉妍, 王瑞成, 谢培, 等. 玉女煎对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用及机制研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(2): 196-199, 213. DOI: 10.13313/j.issn.1673-4890.2017.2.007.
- [16] 李梦佳, 王宏, 董臣林, 等. 基于网络药理学探讨玉女煎治疗牙周炎的作用机制[J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22(8): 904-909, 914. DOI: 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.08.003.
- [17] LUO W Y, GAO L, ZHAO D D, et al. *Yunvjian* improves glucose and insulin function in diabetic rats by regulating gastric emptying function[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2023, 2023: 8551406. DOI: 10.1155/2023/8551406.
- [18] 陈若曦, 张益生, 孙占学. 玉肤褪红汤对风热血热型激素依赖性皮炎患者的临床疗效及TEWL、血清IL-4、IFN- γ 水平的影响[J]. 中国皮肤性病杂志, 2020, 34(2): 205-208. DOI: 10.13735/j.cjdv.1001-7089.201903135.
- [19] LIY P M, PUZI N N A, JOSE S, et al. Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2021, 246(22): 2399-2406. DOI: 10.1177/1535370221997052.
- [20] XU R, MA L, CHEN T, et al. Sophorolipid suppresses LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells through the NF- κ B signaling pathway[J]. Molecules, 2022, 27(15): 5037. DOI: 10.3390/molecules27155037.
- [21] SUN S, DU Y, YIN C, et al. Water-separated part of *Chloranthus serratus* alleviates lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cell injury mainly by regulating the MAPK and Nrf2/HO-1 inflammatory pathways[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 343. DOI: 10.1186/s12906-019-2755-6.
- [22] SOMENSI N, RABELO T K, GUIMARÃES A G, et al. Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF- κ B pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75: 105743. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105743.
- [23] ZUSSO M, LUNARDI V, FRANCESCHINI D, et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- κ B pathway[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 148. DOI: 10.1186/s12974-019-1538-9.
- [24] LIM H, NAM J W, SEO E K, et al. (-)-nyasol (cishinokiresinol), a norneolignan from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*, is a broad spectrum inhibitor of eicosanoid and nitric oxide production[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(11): 1509-1514. DOI: 10.1007/s12272-009-2102-4.
- [25] LEE H J, LI H, CHANG H R, et al. (-)-nyasol, isolated from *Anemarrhena asphodeloides* suppresses neuroinflammatory response through the inhibition of I- κ B α degradation in LPS-stimulated BV-2 microglial cells[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2013, 28(5): 954-959. DOI: 10.3109/14756366.2012.697057.
- [26] LEE J P, KANG M G, LEE J Y, et al. Potent inhibition of acetylcholinesterase by sargachromanol I from *Sargassum siliquastrum* and by selected natural compounds[J]. Bioorg Chem, 2019, 89: 103043. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103043.
- [27] LEE E J, CHUNG H J, PYEE Y, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression by nyasol and broussonin A, two phenolic compounds from *Anemarrhena asphodeloides*, through NF- κ B transcriptional regulation *in vitro* and *in vivo*[J]. Chem Biodivers, 2014, 11(5): 749-759. DOI: 10.1002/cbdv.201400003.
- [28] NGUYEN T H T, PHAM H V T, PHAM N K T, et al. Chemical constituents from *Sonneratia ovata* Backer and their *in vitro* cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activities[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(11): 2366-2371. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.04.017.
- [29] 毕韵梅, 包蕾, 鲍伟, 等. 头孢霉AL031 真菌次生代谢产物的抗菌活性研究[J]. 中药材, 2004, 27(4): 270-272. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2004.04.019.
- [30] WIDMEIER E, YU S, NAG A, et al. ADCK4 deficiency destabilizes the coenzyme Q complex, which is rescued by 2,4-dihydroxybenzoic acid treatment[J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(6): 1191-1211. DOI: 10.1681/ASN.2019070756.