壮药三七姜醇提物及含药血清对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症的抗炎作用及机制Δ

梁　洁[1,2,3*]，梁晶春[1]，刘星晨[1]，陈晓思[1]，曹玉嫔[1]，陈　俊[1]，柳贤福[4]，李耀华[1,2]，朱　华[1#]（1.广西中医药大学药学院，南宁　530200；2.广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室，南宁　530200；3.中药固体制剂制造技术国家工程研究中心华南分中心，南宁　530200；4.广西中医药大学赛恩斯新医药学院，南宁　530222）

中图分类号　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）05-0548-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.05.07

摘　要　目的　研究壮药三七姜醇提物及含药血清对脂多糖（LPS）诱导RAW264.7细胞炎症的抗炎作用及机制。**方法**　将三七姜醇提物（75.35 g/kg）或纯净水灌胃大鼠以制备含药血清或空白血清。以RAW264.7细胞为研究对象，将细胞分为正常对照组，LPS组（1 μg/mL），三七姜醇提物高、中、低剂量组（50、25、12.5 μg/mL），4%或15%空白血清组，4%或15%空白血清+LPS组，4%或15%含药血清组，4%或15%含药血清+LPS组，按相应条件培养24 h后，检测各组细胞活力和细胞中一氧化氮（NO）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6含量，以及Toll样受体4（TLR4）、核因子κB（NF-κB）mRNA表达水平，一氧化氮合酶（NOS）、环氧化酶2（COX-2）蛋白表达水平。**结果**　各组细胞培养24 h后，细胞活力差异无统计学意义。与正常对照组比较，LPS组细胞中NO、TNF-α、IL-1β、IL-6含量，TLR4、NF-κB mRNA表达水平和NOS、COX-2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与4%或15%空白血清组比较，4%或15%空白血清+LPS组细胞中上述指标水平显著升高（$P<0.05$）。与LPS组比较，三七姜醇提物各剂量组大鼠上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。与4%或15%空白血清+LPS组比较，4%或15%含药血清+LPS组细胞中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。**结论**　三七姜醇提物及含药血清均可明显减轻LPS诱导的细胞炎症反应，其抗炎机制可能与抑制TLR4/NF-κB信号通路活性，下调COX-2、NOS蛋白表达，减少炎症因子释放有关。

关键词　三七姜；TLR4/NF-κB信号通路；炎症因子；巨噬细胞

Anti-inflammatory effect and mechanism of the ethanol extract and the drug-containing serum of Zhuang medicine *Stahlianthus involucratus* on LPS-induced RAW264.7 cell inflammation

LIANG Jie[1,2,3], LIANG Jingchun[1], LIU Xingchen[1], CHEN Xiaosi[1], CAO Yupin[1], CHEN Jun[1], LIU Xianfu[4], LI Yaohua[1,2], ZHU Hua[1]（1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Key Laboratory of TCM Extraction and Purification and Quality Analysis, Guangxi Colleges and Universities, Nanning 530200, China; 3. South China Branch of National Engineering Research Center for Manufacturing Technology of Traditional Chinese Medicine Solid Preparation, Nanning 530200, China; 4. Faculty of Chinese Medicine Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the anti-inflammatory effect and mechanism of the ethanol extract and the drug-containing serum of Zhuang medicine *Stahlianthus involucratus* on lipopolysaccharide（LPS）-induced RAW264.7 cell inflammation. **METHODS** The drug-containing serum or blank serum was obtained by intragastrical administration of ethanol extract of *S. involucratus*（75.35 g/kg）or purified water. Using RAW264.7 cells as objects, RAW264.7 cells were divided into normal control group, LPS group（1 μg/mL）, *S. involucratus* ethanol extract high-dose, medium-dose and low-dose groups（50, 25, 12.5 μg/mL）, 4% or 15% blank serum groups, 4% or 15% blank serum+LPS groups, 4% or 15% drug-containing serum groups, 4% or 15% drug-containing serum+LPS groups. After culturing for 24 h, cell viability, the contents of nitric oxide（NO）, tumor necrosis factor α（TNF-α）, interleukin 1β（IL-1β）and IL-6 as well as mRNA expressions of Toll-like receptor 4（TLR4）and nuclear factor κB（NF-κB）and protein expressions of nitric oxide synthase（NOS）and cyclooxygenase 2（COX-2）were all detected in each group. **RESULTS** After culturing for 24 h, there was no statistical

Δ **基金项目**　广西自然科学基金资助项目（No.2020GXNSFAA238026）；壮瑶药协同创新中心项目（No.桂教科研〔2013〕20号）；广西壮瑶药重点实验室项目（No.桂科基字〔2014〕32号）；广西壮族自治区民族药资源与应用工程研究中心项目（No.桂发改高技函〔2020〕2605号）；广西中医药重点学科壮药学项目（No.GZXK-Z-20-64）；第八批广西壮族自治区特聘专家项目（No.桂人才通字〔2019〕13号）

* **第一作者**　教授，博士。研究方向：中药民族药药效物质基础与质量控制。电话：0771-4953513。E-mail：liangjie1101@126.com

\# **通信作者**　教授，博士生导师。研究方向：中药民族药。电话：0771-4953513。E-mail：zhuhuagx@163.com

significance in the difference of cell viability. Compared with normal control group, the contents of NO, TNF-α, IL-1β and IL-6, mRNA expressions of TLR4 and NF-κB, and protein expressions of NOS and COX-2 were increased significantly in LPS group ($P<0.05$). Compared with 4% or 15% blank serum groups, the levels of above indexes were increased significantly in 4% or 15% blank serum+LPS groups ($P<0.05$). Compared with LPS group, the levels of above indexes were decreased significantly in *S. involucratus* ethanol extract groups ($P<0.05$). Compared with 4% or 15% blank serum+LPS groups, the levels of above indexes were decreased significantly in 4% or 15% drug-containing serum+LPS groups ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The ethanol extract and the drug-containing serum of *S. involucratus* can significantly alleviate LPS-induced inflammatory reaction, the mechanism of which may be associated with inhibiting the activity of TLR4/NF-κB signaling pathway, down-regulating the protein expressions of COX-2 and NOS, and reducing the release of inflammatory factors.

KEYWORDS *Stahlianthus involucratu*; TLR4/NF-κB signaling pathway; inflammatory factors; macrophage

三七姜是姜科姜七属植物姜三七*Stahlianthus involucratus*（King ex Bak.）Craib.的块根和根茎，收录于《广西壮族自治区壮药质量标准》（第二卷），其别名为小田七、竹田七、姜三七等[1]，是广西民族民间药，既可用于跌打损伤、风湿骨痛、吐血衄血、月经过多，还能外用治虫蛇咬伤、外伤出血[2]。本课题组前期研究发现，三七姜醇提物可以明显抑制二甲苯所致的小鼠耳郭肿胀、醋酸引起的小鼠毛细血管通透性增加和小鼠棉球肉芽肿增生[3]。进一步研究发现，原儿茶酸、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛可能是三七姜发挥抗炎的物质基础[4]。但其具体抗炎作用机制尚不明确。

Toll样受体（Toll-like receptors，TLRs）是天然免疫系统中一类保守的模式识别受体，在外界病原体刺激下可激活下游炎症信号通路[5]。TLR4是TLRs家族中的重要成员，在炎症反应发生过程中具有重要作用，核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）作为TLR4信号通路的下游效应因子，在病理条件下，TLR4激活会导致细胞内NF-κB信号转导并产生炎症细胞因子而引发炎症反应[6]。但三七姜是否可通过TLR4/NF-κB信号通路发挥抗炎作用，尚不明确。

三七姜所含化学成分多样，其口服给药后，理论上可被吸收入血，进而在人体内循环抵达靶点，当达到一定浓度时可产生相应药理作用[7]。基于此，本研究先将三七姜灌胃给予大鼠，再取其血清；采用脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）刺激巨噬细胞RAW264.7，建立体外炎症细胞模型，进而考察三七姜醇提物和含药血清对RAW264.7细胞的炎症因子释放及TLR4/NF-κB信号通路的影响，初步探索和完善三七姜的抗炎作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。

1.2 实验动物

本研究所用动物为SPF级Waster大鼠，雄性（性别对本研究无影响），体质量（200±10）g，购自湖南斯莱克莱克景达实验动物有限公司，动物生产许可证号为SCXK（湘）2019-0004。大鼠在20～25 ℃的实验室环境中适应性喂养1周。本动物实验方案经广西中医药大学伦理委员会批准（批准号为DW20220108-025）。

1.3 主要仪器

本研究所用主要仪器有HR40-ⅡB2型生物安全柜（青岛海尔生物科技有限公司），MCO-18AIC型CO_2细胞培养箱（日本SAYO公司），DMI3000B型倒置荧光显微镜（德国Leica公司），Epoch型全波长酶标仪（美国Bio-Tek公司），1780型紫外分光光度计（日本Shimadzu公司），Sorvall ST 16R型高速冷冻离心机（美国Thermo Fisher Scientific公司），LightCycler96型实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（瑞士Roche公司），BIO-RADXR型凝胶成像仪、Power Pac Universal型电泳仪（美国Bio-Rad公司）等。

1.4 主要药品与试剂

三七姜药材于2020年3月采自广西南宁武鸣区，经广西中医药大学药学院滕建北教授鉴定为姜科姜七属植物姜三七*S. involucratus*（King ex Bak.）Craib.的块根和根茎；药材洗净后，进行烘干、粉碎处理，然后密封置于干燥阴凉处保存备用。LPS（批号L4391）购自美国Sigma公司；DMEM高糖培养基（批号C11995500BT）购自美国Gibco公司；胎牛血清（批号04-001-1A）购自美国BI公司；CCK-8试剂盒（批号C0040）购自上海碧云天生物技术有限公司；一氧化氮（nitric oxide，NO）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、IL-1β酶联免疫吸附试验（ELISA）检测试剂盒（批号分别为210308N3、210308T2、210308I2、210308I6）购自江苏晶美生物科技有限公司；RIPA裂解液（批号R0020）购自北京索来宝科技有限公司；兔源环氧化酶2（cyclooxygenase 2，COX2）多克隆抗体（批号BS10411R）购自北京博奥森生物技术有限公司；兔源一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）多克隆抗体（批号AF0199）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号AF7018）

购自北京维百奥生物科技有限公司；ECL发光试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗免疫球蛋白G二抗（批号分别为sc-2048、ZB2301）购自北京中杉金桥生物技术有限公司；其余试剂为实验室常用规格。

2 方法

2.1 三七姜醇提物的制备

取三七姜药材适量置于烘箱内烘干后粉碎成粗粉，加入8倍量的80%乙醇溶液加热回流提取3次，每次2 h；过滤，合并滤液，60 ℃减压回收乙醇至药液无醇味，水浴加热浓缩得三七姜醇提物浸膏，备用。取浸膏0.15 g，精密称定，加入0.1%的二甲基亚砜超声（频率50 kHz，功率250 W）溶解，再用DMEM不完全培养基稀释至3 mg/mL，过无菌滤膜，再用完全培养基稀释至所需浓度，现用现配。

2.2 三七姜醇提物大鼠含药血清的制备

取12只大鼠随机分为空白组和三七姜醇提物组，每组各6只。三七姜醇提物组大鼠按75.35 g/kg（按生药量计算）灌胃（剂量相当于成人临床等效剂量的50倍），空白组大鼠灌胃等体积纯净水，每天灌胃2次，连续给药3 d。第3天灌胃后0.5、1、1.5 h（给药前禁食不禁水12 h），末次给药1 h后用戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉采血，室温静置2 h后，以3 000 r/min离心10 min；无菌分离血清，将3个时间点的血清等比例混合，以0.22 μm微孔滤膜过滤除菌，56 ℃灭活30 min，分装，置于−80 ℃保存。使用时，以DMEM不完全培养基稀释至所需浓度。

2.3 细胞培养

将RAW264.7细胞采用完全培养基[10%胎牛血清（FBS）+1%双抗+89% DMEM不完全培养基]在37℃含5% CO_2的培养箱中培养。

2.4 细胞分组、造模与培养

将RAW264.7细胞按5 000个/孔接种于96孔板中，当其融合度达80%时，分为正常对照组（DMEM培养基+RAW264.7细胞，不作任何处理，培养24 h），LPS组[DMEM培养基+RAW264.7细胞+LPS（终浓度为1 μg/mL，下同），培养24 h]，三七姜醇提物高、中、低剂量组[DMEM培养基+RAW264.7细胞+高、中、低剂量三七姜醇提物（终浓度分别为50、25、12.5 μg/mL，浓度设置参考预实验结果），孵育2 h，然后加入LPS，培养24 h]，4%或15%空白血清组[DMEM培养基+RAW264.7细胞+空白对照组大鼠血清（4%或15%，浓度设置参考预实验结果），培养24 h]，4%或15%空白血清+LPS组[DMEM培养基+RAW264.7细胞+空白对照组大鼠血清（4%或15%），孵育2 h，然后加入LPS培养24 h]，4%或15%含药血清组[DMEM培养基+RAW264.7细胞+三七姜醇提物组大鼠含药血清（4%或15%），培养24 h]，4%或15%含药血清+LPS组[DMEM培养基+RAW264.7细胞+三七姜醇提物大鼠组含药血清（4%或15%），孵育2 h，然后加入LPS培养24 h]。

2.5 细胞活力的检测

采用CCK-8法进行检测。取对数生长期的RAW264.7细胞，按“2.4”项下方法分组、造模、给药与培养，每组设3个复孔。培养结束后，每孔加入CCK-8溶液10 μL，混匀后孵育2 h，采用酶标仪于450 nm波长处测定各孔吸光度（absorbance，A）值，并计算细胞存活率（细胞存活率＝$A_{给药孔}/A_{对照孔}$×100%）。

2.6 细胞中NO、TNF-α、IL-1β、IL-6含量的检测

采用ELISA法进行检测。取对数生长期的RAW264.7细胞，按“2.4”项下方法分组、造模、给药与培养，每组设3个复孔。培养结束后，收集细胞培养液，在室温条件下1 200 r/min离心10 min，取上清液，根据相应试剂盒说明书方法进行操作，测定各孔A值，并计算NO、TNF-α、IL-1β、IL-6含量。

2.7 细胞中TLR4、NF-κB mRNA表达水平的检测

采用RT-PCR法进行检测。取对数生长期的RAW264.7细胞，按“2.4”项下方法分组、造模、给药与培养，每组设3个复孔。培养结束后，采用Trizol试剂提取细胞总RNA，利用逆转录试剂盒制备cDNA，以cDNA为模板进行PCR。PCR反应体系（共20 μL）为GoTaq® qPCR Master Mix 10 μL，上下游引物各0.5 μL，cDNA 1.5 μL，Nuclease-Free Water 7.5 μL。反应条件为95 ℃热变性120 s，95 ℃变性15 s，60 ℃退火延伸30 s，循环40次。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析目的基因的表达水平。PCR引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列（5′→3′）	扩增产物长度/bp
TLR4	上游：TCTGGGGAGGCACATCTTCT	110
	下游：AGGTCCAAGTTGCCGTTTCT	110
NF-κB	上游：AGAAAATGGCGGAGTTTGGG	135
	下游：AGCTGAACAAACACGGAAGC	135
GAPDH	上游：GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	183
	下游：TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	183

2.8 细胞中NOS、COX-2蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。取对数生长期的RAW264.7细胞，按“2.4”项下方法分组、造模、给药与培养，每组设3个复孔。培养结束后，收集细胞，加入300 μL RIPA裂解液，充分混匀，裂解2 h；再以12 000 r/min离心10 min，取上清液。采用BCA试剂盒测定上清液中的蛋白浓度，然后将蛋白进行变性处理，经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转至PVDF膜上；以5%脱脂牛奶封闭1 h，加入GAPDH（稀释度为1∶2 000）、COX-2（稀释度为1∶800）、NOS（稀释度为1∶800）一抗，4 ℃孵育过夜；以PBST洗膜2次，加入相应二抗（稀释度为1∶3 000）室温下孵育1～2 h；以PBST洗膜3次，加

入ECL显色，采用凝胶成像发光系统显影曝光。采用Image J 1.8.0软件进行图像灰度值分析，以目的蛋白与内参（GAPDH）的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

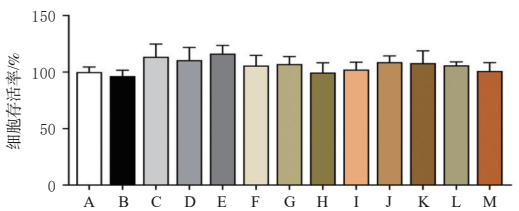
2.9 统计学分析

采用GraphpadPrism 8.3软件进行分析处理，数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 三七姜醇提物及含药血清对RAW264.7细胞活力的影响

各组RAW264.7细胞活力差异无统计学意义（$P>0.05$）。由此可见，1 μg/mL的LPS，低、中、高剂量的三七姜醇提物，4%、15%的含药血清及空白血清均未对细胞生长活力造成影响，因此，所选药物浓度可用于后续实验。结果见图1。



A：正常对照组；B：LPS组；C：三七姜醇提物高剂量组；D：三七姜醇提物中剂量组；E：三七姜醇提物低剂量组；F：4%空白血清组；G：15%空白血清组；H：4%空白血清+LPS组；I：15%空白血清+LPS组；J：4%含药血清组；K：15%含药血清组；L：4%含药血清+LPS组；M：15%含药血清+LPS组

图1 各组RAW264.7细胞活力的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3.2 三七姜醇提物及含药血清对RAW264.7细胞中NO、TNF-α、IL-1β、IL-6含量的影响

与正常对照组比较，LPS组RAW264.7细胞中NO、TNF-α、IL-1β和IL-6的含量显著升高（$P<0.05$）。与LPS组比较，三七姜醇提物各剂量组RAW264.7细胞中上述指标含量均显著降低（$P<0.05$）。与4%或15%空白血清组比较，4%或15%空白血清+LPS组RAW264.7细胞中上述指标含量均显著升高（$P<0.05$）。与4%或15%空白血清+LPS组比较，4%或15%含药血清+LPS组细胞中上述指标含量均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

3.3 三七姜醇提物及含药血清对RAW264.7细胞TLR4、NF-κB mRNA表达的影响

与正常对照组比较，LPS组RAW264.7细胞中TLR4、NF-κB mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与LPS组比较，三七姜醇提物各剂量组细胞中TLR4、NF-κB mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与4%或15%空白血清组比较，4%或15%空白血清+LPS组RAW264.7细胞中TLR4、NF-κB mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与4%或15%空白血清+LPS组比较，4%或15%含药血清+LPS组细胞中TLR4、NF-κB mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

表2 各组RAW264.7细胞中NO、TNF-α、IL-1β和IL-6含量的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	NO/（μmol/L）	TNF-α/（pg/mL）	IL-1β/（pg/mL）	IL-6/（pg/mL）
正常对照组	12.44±0.33	155.47±12.28	27.08±3.20	24.03±3.17
LPS组	39.52±2.03[a]	430.27±19.72[a]	102.54±3.27[a]	81.64±3.20[a]
三七姜醇提物高剂量组	22.10±2.10[b]	333.77±12.95[b]	53.09±4.33[b]	52.69±3.52[b]
三七姜醇提物中剂量组	23.71±1.28[b]	295.77±8.75[b]	62.63±3.08[b]	59.38±2.46[b]
三七姜醇提物低剂量组	25.36±0.88[b]	297.50±13.71[b]	68.62±2.22[b]	67.75±4.76[b]
4%空白血清组	9.68±1.40	112.82±4.73	18.91±2.91	16.40±3.46
15%空白血清组	10.57±1.72	108.26±9.20	16.12±3.63	17.25±1.88
4%空白血清+LPS组	17.23±1.59[c]	240.83±13.31[c]	58.22±3.55[c]	40.18±4.23[c]
15%空白血清+LPS组	17.69±1.37[d]	235.57±12.46[d]	50.71±4.02[d]	31.22±3.85[d]
4%含药血清组	10.47±2.54	102.04±3.95	14.51±2.27	13.40±2.93
15%含药血清组	11.40±2.36	113.21±5.52	13.09±2.82	11.46±2.91
4%含药血清+LPS组	12.49±1.25[e]	110.40±13.29[e]	39.80±4.36[e]	26.83±3.67[e]
15%含药血清+LPS组	12.79±1.89[f]	123.30±4.43[f]	30.33±3.20[f]	19.37±3.83[f]

a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与LPS组比较，$P<0.05$；c：与4%空白血清组比较，$P<0.05$；d：与15%空白血清组比较，$P<0.05$；e：与4%空白血清+LPS组比较，$P<0.05$；f：与15%空白血清+LPS组比较，$P<0.05$

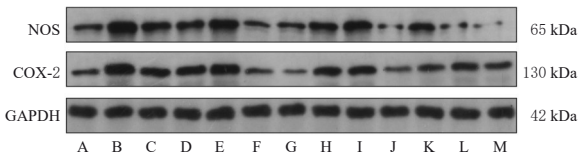
表3 各组RAW264.7细胞中TLR4、NF-κB mRNA表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	TLR4 mRNA	NF-κB mRNA
正常对照组	1.00±0.06	1.04±0.06
LPS组	3.28±0.16[a]	4.04±0.26[a]
三七姜醇提物高剂量组	2.09±0.11[b]	2.53±0.09[b]
三七姜醇提物中剂量组	1.97±0.13[b]	1.97±0.13[b]
三七姜醇提物低剂量组	2.53±0.09[b]	2.09±0.11[b]
4%空白血清组	1.25±0.14	1.78±0.09
15%空白血清组	1.20±0.08	1.72±0.06
4%空白血清+LPS组	1.84±0.03[c]	2.21±0.05[c]
15%空白血清+LPS组	1.86±0.04[d]	2.19±0.06[d]
4%含药血清组	1.06±0.11	1.47±0.05
15%含药血清组	1.60±0.12	1.75±0.22
4%含药血清+LPS组	1.12±0.09[e]	1.53±0.12[e]
15%含药血清+LPS组	1.18±0.13[f]	1.46±0.13[f]

a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与LPS组比较，$P<0.05$；c：与4%空白血清组比较，$P<0.05$；d：与15%空白血清组比较，$P<0.05$；e：与4%空白血清+LPS组比较，$P<0.05$；f：与15%空白血清+LPS组比较，$P<0.05$

3.4 三七姜醇提物及含药血清对RAW264.7细胞中NOS、COX-2蛋白表达的影响

与正常对照组比较，LPS组细胞中NOS、COX-2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与LPS组比较，三七姜醇提物各剂量组细胞中NOS、COX-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与4%或15%空白血清组比较，4%或15%空白血清+LPS组RAW264.7细胞中NOS、COX-2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与4%或15%空白血清+LPS组比较，4%或15%含药血清+LPS组细胞中NOS、COX-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图2、表4。



A：正常对照组；B：LPS组；C：三七姜醇提物高剂量组；D：三七姜醇提物中剂量组；E：三七姜醇提物低剂量组；F：4%空白血清组；G：15%空白血清组；H：4%空白血清+LPS组；I：15%空白血清+LPS组；J：4%含药血清组；K：15%含药血清组；L：4%含药血清+LPS组；M：15%含药血清+LPS组

图2　各组RAW264.7细胞中COX-2、NOS蛋白表达的电泳图

表4　各组RAW264.7细胞中NOS、COX-2蛋白表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

分组	NOS	COX-2
正常对照组	0.476 4±0.024 7	0.345 5±0.016 7
LPS组	1.579 8±0.036 9[a]	1.614 3±0.042 1[a]
三七姜醇提物高剂量组	0.792 9±0.028 2[b]	1.040 3±0.055 3[b]
三七姜醇提物中剂量组	0.923 5±0.045 4[b]	1.202 2±0.025 2[b]
三七姜醇提物低剂量组	1.214 9±0.035 9[b]	1.291 1±0.042 6[b]
4%空白血清组	0.369 0±0.012 3	0.420 4±0.046 9
15%空白血清组	0.458 8±0.027 2	0.179 6±0.027 2
4%空白血清+LPS组	0.952 6±0.034 1[c]	0.912 9±0.034 7[c]
15%空白血清+LPS组	1.071 5±0.039 7[d]	0.796 9±0.039 6[d]
4%含药血清组	0.659 1±0.031 8	0.427 1±0.015 3
15%含药血清组	0.812 0±0.026 3	0.540 7±0.026 9
4%含药血清+LPS组	0.340 6±0.015 3[e]	0.670 3±0.044 1[e]
15%含药血清+LPS组	0.329 5±0.035 7[f]	0.591 9±0.038 8[f]

a：与正常对照组比较，$P<0.05$；b：与LPS组比较，$P<0.05$；c：与4%空白血清组比较，$P<0.05$；d：与15%空白血清组比较，$P<0.05$；e：与4%空白血清+LPS组比较，$P<0.05$；f：与15%空白血清+LPS组比较，$P<0.05$

4　讨论

炎症反应是宿主在内外因素刺激之下产生的一种防御性反应，受多种信号通路调控[8]。革兰氏阴性杆菌的组成成分LPS为重要的炎症反应触发剂，可诱导多种细胞因子引发炎症反应[9]。巨噬细胞通过其细胞膜表面表达的TLR4受体识别LPS，进而激活下游信号通路（如NF-κB、丝裂原活化蛋白激酶）[10]。随后，活化的炎症相关信号可诱导一系列促炎症因子的转录、翻译，包括NOS、COX-2、TNF-α、IL-1β、IL-6等[11]，从而参与炎症性疾病的发生与发展。

RAW264.7细胞作为机体内非常重要的免疫细胞和炎症效应细胞，在诱导炎症反应的过程中起着关键作用，其能够在LPS的刺激下释放各种炎症因子，如NO、TNF-α、IL-1β、IL-6等[12]，这些炎症因子的含量增加是判断炎症是否发生的重要指标。NO广泛存在于各种生物体内，机体内适量的NO可在炎症初期快速地清除病原体以缓解炎症反应，但当NO浓度过高时，可导致局部机体组织损伤，从而加重炎症反应[13]。NOS和COX-2是两种诱生型酶，NOS主要在细胞损伤后表达水平上升，从而合成大量NO，进而导致细胞损伤[14]；COX-2是一种诱导型环氧化酶，其在正常机体细胞中表达量很低，但在经LPS刺激的巨噬细胞中表达水平会迅速上升，从而介导炎症介质前列腺素的产生[15]。本研究结果显示，三七姜含药血清和醇提物均可抑制RAW264.7细胞中炎症因子的释放，下调COX-2、NOS蛋白的表达，这说明三七姜含药血清和醇提物均能通过降低凋亡蛋白和炎症因子表达来改善LPS诱导的细胞炎症，并减轻其炎症损伤，且含药血清的百分比越大，抗炎作用越明显。但整体而言，三七姜醇提物的抗炎效用不及含药血清，这可能是因为含药血清经过体内的代谢、转化，产生了其他具有抗炎作用的物质。

NF-κB是炎症反应过程中重要的基因转录调控因子[16]，其家族成员主要包括p65和p50。一般情况下，NF-κB（p50/p65）以二聚体形式存在；在炎症刺激条件下，NF-κB信号通路被激活，NF-κB-p65由细胞质移位至细胞核，进而促进TNF-α、IL-6、IL-1β、NOS等炎症因子的释放[17－18]。NF-κB信号通路活化的标志是p65亚基的磷酸化与核转位[19]。因此，抑制NF-κB的磷酸化水平和核转位是抑制炎症反应的关键。TLR4广泛存在于巨噬细胞、平滑肌细胞等细胞表面，其可以通过NF-κB信号转导，促使炎症因子释放，进而介导炎症反应[20]。本研究结果显示，经三七姜醇提物和含药血清干预后，RAW264.7细胞中TLR4、NF-κB mRNA表达水平均降低。这说明三七姜醇提物和含药血清对RAW264.7细胞的抗炎作用可能与抑制TLR4/NF-κB信号通路活性相关。

综上所述，三七姜醇提物及含药血清均可明显减轻LPS诱导的细胞炎症反应，其抗炎机制可能与抑制TLR4/NF-κB信号通路活性，下调COX-2、NOS蛋白表达，减少炎症因子释放有关。

参考文献

[1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局，广西壮族自治区食品药品检验所.《广西壮族自治区壮药质量标准第二卷（2011年版）》注释[M]. 南宁：广西科学技术出版社，2013：12-13.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：623.

[3] 胡稀，谢珍珍，梁洁. 壮药姜叶三七醇提取物抗炎作用的研究[J]. 大众科技，2017，19(1)：37-38.

[4] 梁洁，陈辉华，杨川川，等. 壮药三七姜乙酸乙酯提取物抗炎、镇痛作用的谱-效关系研究[J]. 中国药房，2021，32(14)：1721-1727.

[5] 张文静，徐新禹. 基于TLR4/NF-κB信号通路探讨绿原酸对糖尿病肾病大鼠肾组织炎症和凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志，2022，31(19)：2629-2635.

[6] HE Y Y，RUGANZU J B，ZHENG Q Z，et al. Silencing of LRP1 exacerbates inflammatory response via TLR4/NF-κB/MAPKs signaling pathways in APP/PS1 transgenic

mice[J]. Mol Neurobiol,2020,57(9):3727-3743.
[7] 唐娟,张青,吴耽,等. 基于血清药理学和血清药物化学研究红禾麻治疗类风湿性关节炎的潜在药效物质基础[J]. 中国中药杂志,2022,47(17):4755-4764.
[8] 王芬,何华亮,刘铜华,等. 中药复方糖耐康对KKAy糖尿病小鼠低度炎症信号通路的影响[J]. 陕西中医,2022,43(8):992-996.
[9] WU X X,GAO H W,HOU Y,et al. Dihydronortanshinone,a natural product,alleviates LPS-induced inflammatory response through NF-κB,mitochondrial ROS,and MAPK pathways[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2018,355:1-8.
[10] 王琴琴,韩珊,李新星,等. 毛蕊花苷对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症模型的作用及其机制研究[J]. 中草药,2020,51(16):4217-4222,4250.
[11] 马钦海,陈瑞晗,雷标,等. 基于NF-κB通路探讨六神胶囊对脂多糖诱导巨噬细胞RAW264.7炎症反应的影响[J]. 中医杂志,2022,63(4):362-369.
[12] 王小倩,纪桂元,蒋卓勤. 染料木黄酮对脂多糖诱导的RAW264.7细胞炎症因子、腺苷酸激活蛋白激酶磷酸化的影响[J]. 营养学报,2012,34(2):177-180.
[13] 阮洪生,牟晋珠. 表儿茶素对脂多糖诱导RAW264.7细胞分泌炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(4):159-163.
[14] 李思媛,崔玉顺,李新星,等. 黄精皂苷对脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症模型的抗炎作用及其机制[J]. 中成药,2021,43(10):2659-2665.
[15] 任晓璠,孙宪昌,王宇鑫,等. Rg_1和GR阻断剂对脂多糖诱导的BV2小胶质细胞iNOS及COX2蛋白表达影响[J]. 青岛大学医学院学报,2016,52(2):148-149,152.
[16] VALLABHAPURAPU S,KARIN M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system[J]. Annu Rev Immunol,2009,27:693-733.
[17] 朱海泉,刘子敏,孟祥圣,等. 川芎嗪抑制NF-κB p65磷酸化对LPS诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡和炎症反应的调节作用[J]. 中国免疫学杂志,2019,35(2):181-185.
[18] 胡科,李晓蕾,麻瑞娟. 藏红花素减轻皮质神经元缺氧复氧损伤与抑制TLR4/NF-κB信号通路有关[J/OL]. 中国动脉硬化杂志,2023:1-15[2023-02-01]. https://kns.cnki.net/kns8/defaultresult/index.
[19] SUN S C. The non-canonical NF-κB pathway in immunity and inflammation[J]. Nat Rev Immunol,2017,17(9):545-558.
[20] 李颖妃,黄雁超,金刚,等. 益气凉血生肌方基于TLR4/NF-κB通路减轻内皮细胞炎症损伤的研究[J]. 现代中西医结合杂志,2022,31(7):882-887.

(收稿日期:2022-09-18 修回日期:2023-02-03)
(编辑:唐晓莲)

(上接第547页)

大孔吸附树脂是一类人工合成的具有大孔结构的有机高分子共聚体,因其物理化学稳定性高、吸附容量大、选择性好、使用周期长等优点而被广泛应用于天然产物的富集分离[7-9]。采用大孔吸附树脂柱层析工艺富集中药有效成分的关键环节包括树脂类型的筛选、饱和吸附量的确定、杂质洗脱剂考察及其洗脱体积的确定、目标成分洗脱剂考察及洗脱体积确定。前期研究中,笔者通过静态吸附和动态洗脱实验,优选了D101型大孔吸附树脂作为富集长梗金腰中CA和CI的树脂类型。在此基础上,本研究优化得CA和CI的最优富集工艺:将上柱溶液加入D101型大孔吸附树脂柱,静置1 h;用4 BV 20%乙醇洗脱杂质,再用4 BV 50%乙醇洗脱CA和CI。进一步验证,该富集工艺所得CA和CI的总含量为322.7 mg/g,树脂富集倍数为11.61倍。

综上所述,本研究成功优化了长梗金腰中CA和CI的提取富集工艺,可为CA和CI的药物开发利用提供参考。

参考文献

[1] 杨竞生. 中国藏药植物资源考订:下卷[M]. 昆明:云南科技出版社,2017:238-241.
[2] 罗达尚. 新修晶珠本草[M]. 成都:四川科学技术出版社,2004:352-353.
[3] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:329-330.
[4] CAI Z Y,LI W Y,JIANG W,et al. Protective effect of the ethyl acetate fraction of Qinghai-Tibet Plateau medicinal plant *Chrysosplenium axillare* Maxim. against ANIT-induced cholestatic liver injury in mice[J]. Phytomedicine Plus,2021,1(3):100076.
[5] 张颖,王晴,钱玉梅,等. 黄酮类化合物的提取及生物活性研究综述[J]. 山东化工,2020,49(9):96-97,99.
[6] 方芳,王凤忠. 植物黄酮醇提取方法研究进展[J]. 食品工业科技,2018,39(7):323-328,334.
[7] 董双双,袁悦,杨志伟. 大孔吸附树脂在黄酮类化合物分离纯化中的应用[J]. 精细与专用化学品,2016,24(11):29-32.
[8] 刘丹,吴叶红,李玮桓,等. 大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用[J]. 中草药,2016,47(15):2764-2770.
[9] 邹榕,颜雪明. 大孔径吸附树脂分离纯化中药中黄酮及皂苷类化合物的应用进展[J]. 首都师范大学学报(自然科学版),2020,41(3):69-75.

(收稿日期:2022-08-03 修回日期:2023-01-15)
(编辑:唐晓莲)