绣球藤提取物的抗炎活性及机制Δ

李海山[1*]，杨和金[2]，郑永仁[3#]（1.云南省食品药品审核查验中心，昆明 650106；2.云南省药物研究所药理室，昆明 650111；3.云南中医药大学动物实验中心，昆明 650500）

中图分类号 R965；R285 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）04-0453-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.04.13

摘 要 目的 探讨绣球藤提取物的抗炎活性及潜在机制。**方法** 使用二甲苯致耳廓肿胀建立急性炎症小鼠模型，以阿司匹林（0.25 g/kg）为阳性对照，1.25、2.5、5 g/kg绣球藤提取物对小鼠耳肿胀度的影响。以植入棉球的方法建立慢性炎症大鼠模型，以阿司匹林（0.17 g/kg）为阳性对照，0.88、1.75、3.5 g/kg绣球藤提取物对大鼠肉芽净重的影响。以脂多糖诱导RAW264.7细胞建立炎症损伤细胞模型，考察12.5、25、50 μg/mL绣球藤提取物对细胞上清液中一氧化氮（NO）、前列腺素E_2（PGE_2）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素6（IL-6）、单核细胞趋化蛋白1（MCP-1）含量，细胞中诱导型一氧化氮合酶（iNOS）、环氧合酶2（COX-2）、p65、磷酸化p65（p-p65）蛋白表达水平，以及p65蛋白核转移的影响。**结果** 5 g/kg的绣球藤提取物可显著降低小鼠的耳肿胀度，1.75、3.5 g/kg的绣球藤提取物可显著降低大鼠的肉芽净重（$P<0.05$）。12.5、25、50 μg/mL绣球藤提取物可显著降低细胞上清液中NO（12.5 μg/mL绣球藤提取物除外）、PGE_2、TNF-α、IL-6、MCP-1含量，以及细胞中iNOS、COX-2蛋白的相对表达量和p-p65、p65蛋白的相对表达量比值（$P<0.05$或$P<0.01$）；25、50 μg/mL绣球藤提取物可阻断p65蛋白的核转移。**结论** 绣球藤提取物具有良好的抗炎活性，其作用机制可能与抑制核因子κB信号通路激活、下调COX-2和iNOS蛋白的表达、减少炎症因子的释放有关。

关键词 绣球藤提取物；抗炎活性；巨噬细胞；核因子κB信号通路

Anti-inflammatory activity and mechanism of *Clematis ranunculoides* extract

LI Haishan[1], YANG Hejin[2], ZHENG Yongren[3]（1. Center for Food and Drug Inspection of Yunnan Province, Kunming 650106, China; 2. Dept. of Pharmacology, Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 3. Animal Experiment Center, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China）

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the anti-inflammatory activity and potential mechanism of *Clematis ranunculoides* extract. **METHODS** The ear swelling was induced by xylene to establish an acute inflammation model of mice; using aspirin (0.25 g/kg) as a positive control, the effects of 1.25, 2.5, 5 g/kg *C. ranunculoides* extract on the degree of ear swelling were investigated. The chronic inflammation model of rats was also established by implanting cotton balls; using aspirin (0.17 g/kg) as a positive control, the effects of 0.88, 1.75, 3.5 g/kg *C. ranunculoides* extract on the net weight of granulomas were investigated. Furthermore, RAW264.7 cells were induced by lipopolysaccharide to establish an inflammatory injury model; the effects of 12.5, 25, 50 μg/mL *C. ranunculoides* extract on the contents of nitric oxide (NO), prostaglandin E_2 (PGE_2), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the cell supernatant, the protein expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), p65 and phosphorylated p65 (p-p65) in cells as well as nuclear translocation of p65 protein were assessed. **RESULTS** *C. ranunculoides* extract with 5 g/kg significantly relieved ear swelling in mice, and *C. ranunculoides* extract with 1.75, 3.5 g/kg significantly decreased the net weight of granulomas in rats ($P<0.05$). *C. ranunculoides* extract with 12.5, 25, 50 μg/mL significantly reduced the contents of NO (except for 12.5 μg/mL *C. ranunculoides* extract), PGE_2, TNF-α, IL-6 and MCP-1 in the cell supernatant, as well as the relative expressions of iNOS and COX-2 protein, and relative expression ratio of p-p65 and p65 protein ($P<0.05$ or $P<0.01$); *C. ranunculoides* extract with 25, 50 μg/mL inhibited the translocation of p65 protein to the cell nucleus. **CONCLUSIONS** *C. ranunculoides* extract exhibits significant anti-inflammatory activity, the mechanism of which may be attributed to the inhibition of the activation of nuclear factor-κB signaling pathway, down-regulation of COX-2 and iNOS protein expression, and the reduction of inflammatory cytokines release.

KEYWORDS *Clematis ranunculoides* extract; anti-inflammatory activity; macrophages; nuclear factor-κB signaling pathway

Δ **基金项目** 云南省创新引导与科技型企业培育计划项目（No.202004AR040008）

＊**第一作者** 副主任药师。研究方向：药理学、药品审核查验。E-mail：840792727@qq.com

通信作者 高级实验师。研究方向：实验动物和药效机制。E-mail：4047135765@qq.com

绣球藤是毛茛科Ranunculaceae铁线莲属*Clematis*植物毛茛状铁线莲*Clematis ranunculoides* Franch.的干燥全草，主要分布于我国云南西北部、四川西南部、广西西北部、贵州西南部和西藏喜马拉雅地区，具有良好的药用价值和观赏价值[1]。该药始载于《滇南本草》，以全草或根入药，味苦、淡、微辛，性微寒，具有清热解毒、利尿、祛瘀通络的功效。然而，目前关于绣球藤的研究有限，其药用价值并未得到充分发掘。

铁线莲属植物分布广泛，我国约有150种，包括威灵仙、东北铁线莲、小木通等。该属植物的主要化学成分包括皂苷类、黄酮类、木脂素类、香豆素类和生物碱类等，其中皂苷类成分以齐墩果烷型五环三萜为主，黄酮类成分以黄酮糖苷为主[2]。目前，同属植物威灵仙的相关研究较为多，其抗炎活性明确[3]。作为铁线莲属植物的一员，本课题组推测绣球藤的药理活性亦有相似之处。基于此，本研究从抗炎角度出发，通过二甲苯致小鼠耳肿胀实验和大鼠棉球肉芽肿实验评价绣球藤对急、慢性炎症的抑制活性，并探讨绣球藤对脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的小鼠巨噬细胞RAW264.7炎症反应的改善作用及可能机制，挖掘其药用价值，为绣球藤的进一步开发提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有CCL-170A-8型CO_2恒温培养箱（新加坡ESCO公司），LSM900型激光共聚焦显微镜、Axio Observer 3型荧光显微镜（德国Carl Zeiss公司），Multiskan GO型全波长酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），Mini-Protean小型垂直电泳槽、Mini Trans-Blot®转印系统（美国Bio-Rad公司），WD-9423B型化学发光分析仪（北京六一生物科技有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

绣球藤药材采自云南省大理、丽江等地，经云南中医药大学中药学院张洁教授鉴定为毛茛科铁线莲属植物毛茛状铁线莲*C. ranunculoides* Franch.的全草。

阿司匹林肠溶片（批号BJ71068，规格100 mg）购自意大利Bayer S.p.A.；LPS、二甲基亚砜（DMSO）、MTT试剂（批号分别为059M4031V、WXBB8079V、2031162）均购自美国Sigma公司；二甲苯（批号220111）购自四川西陇科学有限公司；磷酸盐缓冲液（PBS）、DMEM培养基、胎牛血清（批号分别为2436350、2522571、1997802c）均购自美国Gibco公司；RIPA裂解液、特超敏ECL化学发光试剂盒（批号分别为072021211125、P0018AM）均购自上海碧云天生物技术股份有限公司；肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、单核细胞趋化蛋白1（monocyte chemotactic protein-1，MCP-1）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号均为2210-1）均购自深圳市达科为生物技术股份有限公司；前列腺素E_2（prostaglandin E_2，PGE_2）ELISA试剂盒（批号J17011754）购自武汉华美生物工程有限公司；一氧化氮（nitric oxide，NO）试剂盒（批号20221121）购自南京建成生物工程研究所；BCA蛋白浓度测定试剂盒（批号22343569）购自北京兰杰柯科技有限公司；兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）、β-肌动蛋白（β-actin）、诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、p65、磷酸化p65（phosphorylated p65，p-p65）单克隆抗体（批号分别为5174S、4970S、13120S、8242T、3033T）均购自美国CST公司；兔源环氧合酶2（cyclooxygenase-2，COX-2）单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（批号分别为100022L-13、GR3366929-3）均购自英国Abcam公司；异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记的山羊抗兔IgG二抗（批号BJ07284902）购自北京博奥森生物技术有限公司；4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）试剂（批号20210830）购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性昆明小鼠（体重18～20 g，共60只）和SPF级雄性SD大鼠（体重180～220 g，共50只）均购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物生产许可证号均为SCXK（京）2019-0010。上述动物均在SPF级环境（温度20～26 ℃，相对湿度40%～70%，每12 h明暗交替）下饲养，自由饮水、进食。本研究所涉及的实验操作均符合云南中医药大学实验动物伦理规定，并经过该校动物实验伦理审查委员会批准（编号R-062023071）。

1.4 细胞株

小鼠巨噬细胞RAW264.7购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 绣球藤提取物的制备

取绣球藤药材适量，粉碎，加10倍量水，提取1.5 h×2次，合并提取液，抽滤，减压浓缩后，冷冻干燥，得绣球藤提取物粉末（得率15.8%）。经紫外分光光度法测定（平行3次），其中含总皂苷（24.57±0.70）%、总黄酮（1.53±0.10）%。

2.2 绣球藤提取物对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响检测

取昆明小鼠，按体重随机分为对照组、阿司匹林组（阳性对照，0.25 g/kg，以0.5%羧甲基纤维素纳为溶剂）

和绣球藤提取物低、中、高剂量组（1.25、2.5、5 g/kg，以水为溶剂），每组12只。其中，绣球藤提取物中剂量相当于其半数致死剂量（median lethal dose，LD_{50}）的1/10，阿司匹林剂量相当于临床等效剂量。各药物组小鼠灌胃相应药液，空白对照组小鼠灌胃水，灌胃体积均为20 mL/kg，连续7 d，每天1次。于末次给药后1 h，除对照组外，其余各组小鼠均将致炎剂二甲苯均匀涂布于其右耳廓（50 μL/只）；致炎1 h后，各组小鼠脱颈椎处死，剪下双耳，用9 mm直径打孔器分别在同一部位打孔，称定耳片质量并按下式计算耳肿胀度：耳肿胀度（mg）＝造模致炎耳（右耳）耳片质量－自身对照耳（左耳）耳片质量。

2.3 绣球藤提取物对大鼠棉球肉芽肿的影响检测

取SD大鼠，按体重随机分为对照组、阿司匹林组（药性对照，0.17 g/kg，以0.5%羧甲基纤维素纳为溶剂）和绣球藤提取物低、中、高剂量组（0.88、1.75、3.5 g/kg，以水为溶剂），每组10只。其中，绣球藤提取物中剂量相当于其LD_{50}的1/10，阿司匹林剂量相当于临床等效剂量。各组大鼠经麻醉后，去除背部毛发，消毒后切口，将经灭菌处理的2个棉球（每个棉球加入1 mg/mL的青霉素钠溶液0.1 mL，于60 ℃下烤干，烘干后重约75 mg）分别植入其两侧腋窝皮下。随后，各药物组大鼠灌胃相应药液，对照组大鼠灌胃水，灌胃体积均为10 mL/kg，连续7 d，每天1次。末次给药后1 h，各组大鼠脱颈椎处死，取出棉球，于60 ℃下烘干6 h后称重并按下式计算肉芽净重：肉芽净重（mg）＝末次给药后的棉球质量－原棉球质量。

2.4 绣球藤提取物对LPS诱导RAW264.7细胞炎症损伤的改善作用及机制考察

2.4.1 细胞毒性检测

取RAW264.7细胞，接种于含10%胎牛血清的DMEM培养基中，常规复苏、传代后，于37 ℃、5%CO_2条件下贴壁培养。取对数生长期细胞，以2×10^5个/mL、每孔0.1 mL接种于96孔板中，待细胞贴壁融合后，弃去上清液；将细胞分为正常对照组和绣球藤提取物不同质量浓度组（12.5、25、50、100、200 μg/mL，根据本课题预实验结果设置），每组设10个复孔。正常对照组细胞加入无血清DMEM培养基，各药物组细胞加入含相应质量浓度药物的无血清DMEM培养基。培养24 h后，每孔加入5 mg/mL的MTT溶液10 μL；孵育4 h后，弃去上清液，每孔加入DMSO 150 μL；振荡10 min后，使用酶标仪于490 nm波长处检测各孔的光密度（OD）值，用以反映绣球藤提取物的细胞毒性。

2.4.2 细胞上清液中的NO、PGE_2、TNF-α、IL-6、MCP-1含量检测

取对数生长期细胞，以2×10^5个/mL、每孔2 mL接种于6孔板中，待细胞贴壁融合后，弃去上清液；将细胞分为正常对照组、LPS组（200 ng/mL）和绣球藤提取物不同质量浓度组（12.5、25、50 μg/mL，根据“2.4.1”项下结果设置），每组设3个复孔。正常对照组细胞加入无血清DMEM培养基，LPS组加入含200 ng/mL LPS的无血清DMEM培养基，各药物组加入含相应质量浓度药物和200 ng/mL LPS的无血清DMEM培养基。培养24 h后，收集细胞上清液，根据相应试剂盒说明书方法操作，使用酶标仪检测各组细胞上清液中的NO、PGE_2、TNF-α、IL-6、MCP-1含量。

2.4.3 细胞中iNOS、COX-2、p65、p-p65蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取对数生长期细胞，以2×10^5个/mL、每孔2 mL接种于6孔板中，iNOS和COX-2的检测按照“2.4.2”项下方法分组、处理；p65和p-p65的检测按照“2.4.2”项下方法分组，正常对照组细胞加入无血清DMEM培养基干预7 h，LPS组细胞先用无血清DMEM培养基干预6 h后再加入200 ng/mL LPS继续干预1 h，各药物组细胞先用含相应质量浓度药物的无血清DMEM培养基干预6 h后再加入200 ng/mL LPS继续干预1 h。收集各组细胞，以RIPA裂解液于冰上裂解，于4 ℃下以14 000×g离心6 min，取上清液，采用BCA法测定蛋白含量，并加入适量蛋白上样缓冲液，于95 ℃金属浴中变性。取变性蛋白适量，经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上，以5%脱脂奶粉封闭1 h；以TBST漂洗液洗膜，加入iNOS、COX-2、GAPDH和p65、p-p65、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃下孵育过夜；以TBST漂洗液洗膜，加入辣根过氧化物酶标记的IgG二抗（稀释比例为1∶3 000），室温下孵育1 h；以TBST漂洗液洗膜，以特超敏ECL化学发光试剂显影后置于化学发光分析仪下曝光拍照。使用Image J软件，对各目的蛋白的条带灰度值进行分析：以GAPDH为内参，计算iNOS、COX-2蛋白的相对表达量；以β-actin为内参，计算p65、p-p65的相对表达量，并记录两者比值（p-p65/p65）。

2.4.4 细胞内p65蛋白核转移检测

采用免疫荧光法检测。取对数生长期细胞，以1×10^5个/mL、每皿2 mL接种于共聚焦小皿中。待细胞贴壁融合后，去除上清液，将其分为正常对照组、LPS组（200 ng/mL）和绣球藤提取物25、50 μg/mL组，每组设3个平行皿。正常对照组细胞加入无血清DMEM培养基

干预9 h，LPS组细胞先用无血清DMEM培养基干预6 h后再加入200 ng/mL LPS继续干预3 h，各药物组先用含相应质量浓度药物的无血清DMEM培养基干预6 h后再加入200 ng/mL LPS继续干预3 h。收集各组细胞，以PBS漂洗，于室温下在4%多聚甲醛中固定10 min；再用PBS漂洗后，以山羊血清于37 ℃下封闭1 h；吸干，滴加p65一抗（稀释比例为1∶400），4 ℃下避光孵育过夜；用PBS漂洗后，加入FITC标记的IgG二抗（稀释比例为1∶50），37 ℃下避光孵育1 h；以PBS漂洗，加入DAPI试剂避光孵育2 min；再用PBS漂洗后，滴加防荧光淬灭剂，使用激光共聚焦显微镜观察p65蛋白的核转移情况（p65蛋白呈绿色荧光，细胞核呈蓝色荧光）。

2.5 统计学方法

采用SPSS 22软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较应用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验（方差齐）或Dunnett's $T3$检验（方差不齐）。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 绣球藤提取物对小鼠耳廓肿胀的影响

与对照组比较，阿司匹林组和绣球藤提取物高剂量组小鼠的耳肿胀度均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表1。

表1 绣球藤提取物对小鼠耳廓肿胀和大鼠肉芽肿的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	小鼠耳廓肿胀度（n=12）/mg	大鼠肉芽净重（n=10）/mg
对照组	17.4±4.4	28.0±8.6
阿司匹林组	11.3±4.5[a]	17.2±6.9[a]
绣球藤提取物低剂量组	18.8±5.2	24.9±5.2
绣球藤提取物中剂量组	14.0±4.6	20.4±5.4[b]
绣球藤提取物高剂量组	13.1±4.2[b]	21.7±2.8[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与对照组比较，$P<0.05$。

3.2 绣球藤提取物对大鼠肉芽肿的影响

与对照组比较，阿司匹林组和绣球藤提取物中、高剂量组大鼠的肉芽净重均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表1。

3.3 绣球藤提取物对LPS诱导RAW264.7细胞炎症损伤的影响

3.3.1 绣球藤提取物的细胞毒性

绣球藤提取物12.5、25、50 μg/mL组细胞的OD值（2.79±0.12、2.74±0.11、2.76±0.10）与正常对照组（2.78±0.11）比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$，n=10），而绣球藤提取物100、200 μg/mL组细胞的OD值（2.32±0.12、1.80±0.14）均较正常对照组显著降低（$P<0.01$，n=10）。因此，本研究后续实验采用12.5、25、50 μg/mL作为绣球藤提取物的干预浓度。

3.3.2 绣球藤提取物对细胞上清液中NO、PGE_2、TNF-α、IL-6、MCP-1含量的影响

与正常对照组比较，LPS组细胞上清液中NO、PGE_2、TNF-α、IL-6、MCP-1含量均显著升高（$P<0.01$）；与LPS组比较，绣球藤提取物25、50 μg/mL组细胞上清液中NO含量和绣球藤提取物各质量浓度组细胞上清液中PGE_2、TNF-α、IL-6、MCP-1含量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），且有一定的浓度依赖趋势。结果见表2。

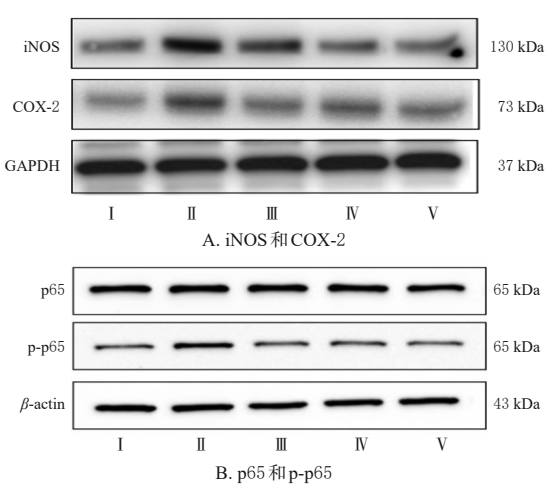
表2 绣球藤提取物对细胞上清液中NO、PGE_2、TNF-α、IL-6、MCP-1含量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	NO/（μmol/L）	PGE_2/（pg/mL）	TNF-α/（pg/mL）	IL-6/（pg/mL）	MCP-1/（pg/mL）
正常对照组	1.64±0.68	128.79±8.97	382.03±9.32	23.35±2.12	784.44±85.61
LPS组	15.25±1.13[a]	633.52±30.18[a]	3 041.56±184.24[a]	209.45±7.14[a]	1 639.15±121.34[a]
绣球藤提取物12.5 μg/mL组	15.17±1.31	501.85±32.54[b]	2 140.96±262.14[b]	162.54±2.93[b]	1 451.14±77.09[c]
绣球藤提取物25 μg/mL组	11.91±0.79[b]	368.71±34.99[b]	1 640.46±64.23[b]	124.07±5.44[b]	1 098.95±37.66[b]
绣球藤提取物50 μg/mL组	6.27±0.79[b]	260.60±54.96[b]	1 148.61±86.81[b]	102.88±11.96[b]	961.18±56.76[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与LPS组比较，$P<0.01$；c：与LPS组比较，$P<0.05$。

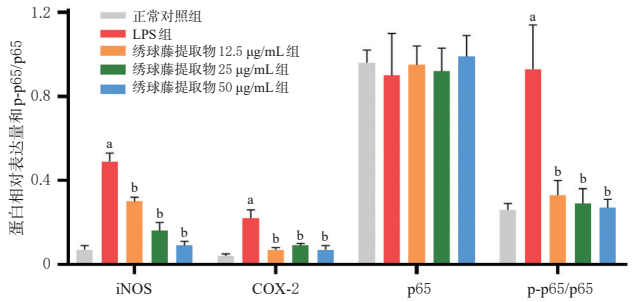
3.3.3 绣球藤提取物对细胞中iNOS、COX-2、p65、p-p65蛋白表达的影响

与正常对照组比较，LPS组细胞中iNOS、COX-2蛋白的相对表达量和p-p65/p65均显著升高（$P<0.01$）；与LPS组比较，绣球藤提取物各质量浓度组细胞中iNOS、COX-2蛋白的相对表达量和p-p65/p65均显著降低（$P<0.01$）；而p65蛋白的相对表达量组间比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图1、图2。



Ⅰ：正常对照组；Ⅱ：LPS组；Ⅲ：绣球藤提取物12.5 μg/mL组；Ⅳ：绣球藤提取物25 μg/mL组；Ⅴ：绣球藤提取物50 μg/mL组。

图1 绣球藤提取物对细胞中iNOS、COX-2、p65、p-p65蛋白表达影响的电泳图



a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与LPS组比较，$P<0.01$。

图2　绣球藤提取物对细胞中iNOS、COX-2、p65、p-p65蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3.3.4　绣球藤提取物对细胞内p65蛋白核转移的影响

正常对照组细胞中p65蛋白未与细胞核重叠；与正常对照组比较，LPS组细胞中p65蛋白与细胞核重叠；与LPS组比较，绣球藤提取物25、50 μg/mL组细胞中p65蛋白与细胞核部分重叠。结果见图3。

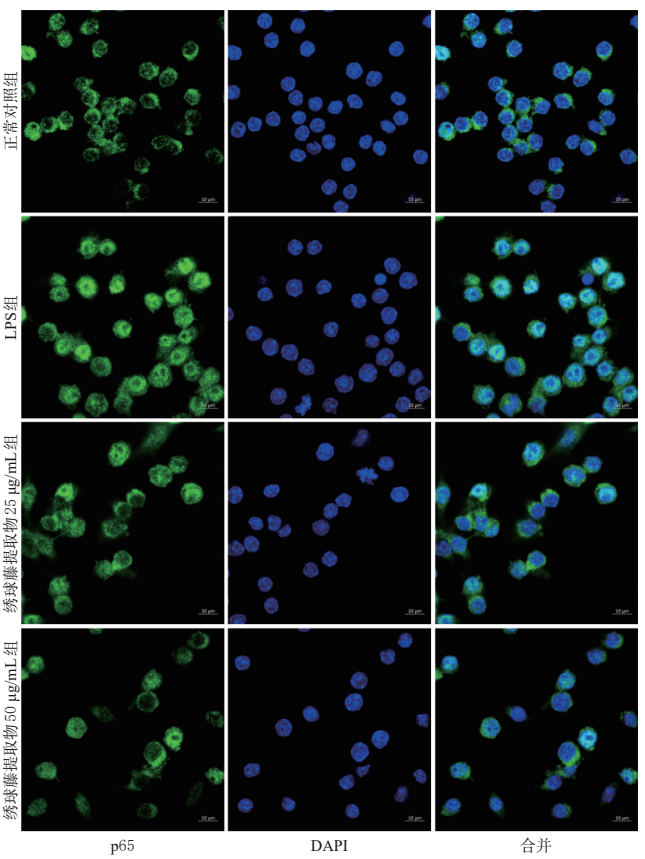


图3　绣球藤提取物对细胞内p65蛋白核转移的影响（标尺为10 μm）

4　讨论

炎症反应是机体通过不同免疫细胞（如巨噬细胞）针对有害刺激所产生的一种协调、主动性应激和防御反应，对病原体清除及组织修复至关重要，但免疫稳态失衡和炎症介质持续释放会导致慢性炎症的发生[4]。现代研究发现，炎症与疼痛、恶性肿瘤、动脉粥样硬化、代谢性疾病等多种疾病的发生、发展息息相关[5-6]。二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验和大鼠棉球肉芽肿实验是评价急性炎症和慢性炎症的经典动物模型，具有操作简单、便于观察的优点，是评价药物抗炎活性的常用动物模型。本研究结果显示，高剂量的绣球藤提取物（5 g/kg）可显著降低小鼠耳肿胀度，提示其对二甲苯所引起的急性炎症具有抑制作用；同时，中、高剂量的绣球藤提取物（1.75、3.5 g/kg）可显著降低大鼠的肉芽净重，提示其对异物刺激所导致的慢性炎症亦有抑制作用。

LPS诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7炎症损伤模型是研究抗炎作用机制的首选模型[7]。研究指出，巨噬细胞是机体炎症反应的主要参与者，而LPS作为构成革兰氏阴性菌外壁的内毒素，可促进炎症反应的发生[8]。核因子κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB）是经典的炎症信号通路[9]。一般情况下，NF-κB以p50/p65二聚体形式存在于细胞质中；当受到LPS刺激时，NF-κB信号通路被激活，其中p65蛋白亚基发生磷酸化并由细胞质转移至细胞核内[10]，激活下游相关基因的转录，进而促进炎症介质和趋化因子（包括TNF-α、IL-6、MCP-1、iNOS、COX-2）的大量产生，最终引发炎症反应[11]。其中，iNOS和COX-2属于炎症反应的关键诱导酶[12-13]，iNOS的过量表达能快速诱导NO的生成；而COX-2是合成PGE_2的限速酶，其表达增加可促进PGE_2的产生，从而进一步加速炎症级联反应[14]。本研究结果显示，绣球藤提取物可显著抑制巨噬细胞的炎症反应，包括抑制炎症因子TNF-α、IL-6的释放，抑制趋化因子MCP-1的产生；还可抑制iNOS、COX-2蛋白的表达，进而阻断NO和PGE_2的合成；同时，其对p65蛋白的表达无明显影响，但可抑制p65蛋白的磷酸化及其从细胞质向细胞核的转移，因此推测绣球藤提取物抑制巨噬细胞的炎症反应与其阻断NF-κB信号通路的激活有关。

综上所述，绣球藤提取物具有良好的抗炎活性，其作用机制可能与抑制NF-κB信号通路激活、下调COX-2和iNOS蛋白的表达、减少炎症因子的释放有关。本研究从炎症角度初步探索了绣球藤提取物的药理活性，但未就某一具体炎症性疾病展开研究，后续将结合具体模型进一步挖掘绣球藤的临床应用价值。

参考文献

[1] 周培军，李学芳，符德欢，等. 民族药绣球藤的生药学鉴别[J]. 广州中医药大学学报，2017，34(3)：432-436.
ZHOU P J，LI X F，FU D H，et al. Pharmacognosy identification of ethnomedicine *Clematis ranunculoides* Franchet [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med，2017，34(3)：

432-436.

[2] 李杨，张伟，赫雪锋，等. 铁线莲属植物的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中南药学，2018，16(3)：355-362.
LI Y，ZHANG W，HE X F，et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Clematis* plants[J]. Cent South Pharm，2018，16(3)：355-362.

[3] 郭从嘉，吴国泰，高慧琴，等. 秦艽、威灵仙组分配伍对类风湿关节炎模型大鼠血清炎症因子及踝关节NF-κB、VEGF表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(11)：53-63.
GUO C J，WU G T，GAO H Q，et al. Effect of component compatibility of Gentianae Macrophyllae Radix and Clematidis Radix et Rhizoma on serum inflammatory factors and expression of NF-κB and VEGF in ankle joint of rats with rheumatoid arthritis[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae，2023，29(11)：53-63.

[4] ISHIDA M，TAKEKUNI C，NISHI K，et al. *p*-synephrine suppresses inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated $RAW_{264.7}$ cells and alleviates systemic inflammatory response syndrome in mice[J]. Food Funct，2022，13(9)：5229-5239.

[5] ZHU X D，CHEN Z Y，SHEN W Y，et al. Inflammation，epigenetics，and metabolism converge to cell senescence and ageing：the regulation and intervention[J]. Signal Transduct Target Ther，2021，6(1)：245.

[6] ZHANG Y L，CHEN S M，YUAN M，et al. Gout and diet：a comprehensive review of mechanisms and management[J]. Nutrients，2022，14(17)：3525.

[7] ZOU T，GAO S，YU Z L，et al. Salvianolic acid B inhibits $RAW_{264.7}$ cell polarization towards the M1 phenotype by inhibiting NF-κB and Akt/mTOR pathway activation[J]. Sci Rep，2022，12(1)：13857.

[8] LIN W J，SHEN P，HUANG Y，et al. Wutou decoction attenuates the synovial inflammation of collagen-induced arthritis rats via regulating macrophage M1/M2 type polarization[J]. J Ethnopharmacol，2023，301：115802.

[9] 覃乐，陈勇，黄桂东，等. 三叶香茶菜提取物对肝星状细胞和肝细胞TLR4/NF-κB/NLRP3通路的影响[J]. 中国药房，2022，33(20)：2448-2453.
QIN L，CHEN Y，HUANG G D，et al. Effects of *Isodon ternifolius* extract on TLR4/NF-κB/NLRP3 pathway in hepatic stellate cells and hepatocytes[J]. China Pharm，2022，33(20)：2448-2453.

[10] HWANGBO H，JI S Y，KIM M Y，et al. Anti-inflammatory effect of auranofin on palmitic acid and LPS-induced inflammatory response by modulating TLR4 and NOX4-mediated NF-κB signaling pathway in $RAW_{264.7}$ macrophages[J]. Int J Mol Sci，2021，22(11)：5920.

[11] XU R Q，MA L，CHEN T，et al. Sophorolipid suppresses LPS-induced inflammation in $RAW_{264.7}$ cells through the NF-κB signaling pathway[J]. Molecules，2022，27(15)：5037.

[12] LI J F，HU X L，ZHANG H H，et al. *N*-2-(phenylamino) benzamide derivatives as dual inhibitors of COX-2 and topo Ⅰ deter gastrointestinal cancers via targeting inflammation and tumor progression[J]. J Med Chem，2022，65(15)：10481-10505.

[13] WANG X Y，DONGZHI Z M，LI Y，et al. *Ajania purpurea* extract attenuates LPS-induced inflammation in $RAW_{264.7}$ cells and peritonitis mice[J]. Biol Pharm Bull，2022，45(12)：1847-1852.

[14] TU C S，WANG Z F，XIANG E，et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote macrophage PD-L1 expression and attenuate acute lung injury in mice[J]. Curr Stem Cell Res Ther，2022，17(6)：564-575.

（收稿日期：2023-08-22　修回日期：2024-01-10）
（编辑：张元媛）