

基于代谢组学及分子生物学研究京制牛黄解毒片治疗口腔黏膜炎的作用机制

范春兰^{1,2}, 马全涛^{1,2}, 吴笑如¹, 裴海鸾¹, 邝计霞¹, 张瀚涛¹, 李晋生^{1,2}, 黄日康³, 王志斌^{1,2*}

1. 北京同仁堂科技发展股份有限公司, 北京 100079

2. 北京同仁堂股份有限公司科学研究所, 北京 100079

3. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102400

摘要: **目的** 研究京制牛黄解毒片对口腔黏膜炎大鼠的治疗作用及对血清代谢物的影响, 探讨代谢途径和可能的机制。 **方法** 建立大鼠口腔黏膜炎模型, 通过口腔黏膜炎面积和病理组织学评估京制牛黄解毒片对口腔黏膜炎大鼠的治疗作用; 采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用 (UHPLC-QTOF/MS) 技术对血清进行代谢组学研究, 筛选潜在生物标志物并富集代谢通路; 采用脂多糖诱导的小鼠骨髓巨噬细胞炎症模型进行验证。 **结果** 京制牛黄解毒片可明显降低大鼠口腔黏膜炎面积, 改善口腔黏膜炎大鼠黏膜组织病理变化。代谢组学分析共筛选到 41 个与口腔黏膜炎风险相关的生物标志物。将潜在生物标志物进行通路预测分析, 影响较强的有脂类代谢通路和鞘脂信号通路。进一步采用脂多糖诱导的小鼠骨髓巨噬细胞进行验证, 京制牛黄解毒片可以显著抑制细胞上清中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 的分泌, 减少 TNF- α 表达, 减少细胞活性氧 (ROS) 的生成, 抑制细胞核因子- κ B (NF- κ B) 核转位 ($P < 0.05, 0.01$)。京制牛黄解毒片可显著增加 p-蛋白激酶 B1 (Akt) /Akt 蛋白表达, 抑制鞘氨醇-1-磷酸受体 (S1PR3) 蛋白的表达 ($P < 0.05, 0.01$)。 **结论** 京制牛黄解毒片能够有效改善口腔黏膜炎模型大鼠的黏膜损伤, 其作用机制可能通过影响鞘脂代谢和炎症信号等相关通路发挥作用。

关键词: 京制牛黄解毒片; 口腔黏膜炎; 代谢组学; 鞘氨醇-1-磷酸受体; 蛋白激酶 B1

中图分类号: R287.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2026)06-1583-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.06.007

Mechanism of Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets on oral mucositis based on metabolomics and molecular biology

FAN Chunlan^{1,2}, MA Quantao^{1,2}, WU Xiaoru¹, PEI Hailuan¹, KUANG Jixia¹, ZHANG Hantao¹, LI Jinsheng^{1,2}, HUANG Rikang³, WANG Zhibin^{1,2}

1. Beijing Tongrentang Science and Technology Development Co., Ltd., Beijing 100079, China

2. Beijing Tongrentang Co., Ltd. Scientific Research Institute, Beijing 100079, China

3. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect of Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets on oral mucositis injury and its mechanism.

Methods Establish a rat model of oral mucositis, and evaluate the therapeutic effect of Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets on rats with oral mucositis through assessment of the area of oral mucositis and pathological histology, conduct metabolomics research on serum using ultra-high performance liquid chromatography - quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOF/MS) technology to screen potential biomarkers and enrich metabolic pathways, verify the results using a mouse model of bone marrow macrophage inflammation induced by lipopolysaccharide. **Results** Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets can significantly reduce the area of oral mucosal inflammation in rats and improve the pathological changes of the mucosal tissues in rats with oral mucosal inflammation. Metabolomics analysis identified 41 biomarkers related to the risk of oral mucosal inflammation. The potential biomarkers were subjected to pathway prediction analysis, and the pathways with stronger effects were lipid metabolism pathway and sphingolipid signaling pathway. Further verification was conducted using mouse bone marrow macrophages induced by LPS. The Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets group could significantly inhibit the secretion of inflammatory factors such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the cell

收稿日期: 2025-11-14

基金项目: 北京市科技计划项目 (Z241100009024041)

作者简介: 范春兰, 女, 博士, 研究方向为中药药理毒理。E-mail: fanchunlan77@163.com

*通信作者: 王志斌 E-mail: wangzhibin4804@126.com

supernatant, reduce the expression of TNF- α , reduce the generation of ROS in cells, and inhibit the nuclear translocation of NF- κ B ($P < 0.05, 0.01$). Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets group could significantly increase the expression of p-Akt/Akt protein and inhibit the expression of S1PR3 protein ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets can effectively improve mucosal damage and may exert its effects by regulating sphingolipid metabolism and inflammatory signaling pathways.

Key words: Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets; oral mucositis; metabolome; S1PR3; Akt

口腔黏膜炎主要表现为口腔组织出现红斑、变薄,随着组织继续变薄,最终会发生溃疡^[1-2]。口腔黏膜炎引发的疼痛、吞咽困难及食欲减退等,严重影响患者生活质量^[3]。目前,对口腔黏膜炎的防治措施主要有冷冻疗法、激光疗法、抗菌消炎疗法及细胞因子疗法等,虽然防治方式多样,但临床上还未有公认的疗效确切的防治方法^[4-6]。因此,有必要开发针对口腔黏膜炎的有效干预措施,以提高患者的生活质量。京制牛黄解毒片处方来源于明代王肯堂《证治准绳·类方》第七册菊花通圣散方加减。处方组成为黄芩、黄连、黄柏、人工牛黄、石膏、栀子、大黄、金银花、连翘、川芎、菊花、薄荷、荆芥穗、防风、白芷、蔓荆子、旋覆花、桔梗、蚕砂、冰片、甘草,在临床上主要适用于口舌生疮、牙龈肿痛、咽喉肿痛以及便秘等症状的治疗^[7-8]。京制牛黄解毒片对大鼠实验性口腔黏膜炎具有治疗作用,可减少黏膜溃疡面积,明显改善口腔黏膜的病理变化,显著降低血清促炎因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、 γ 干扰素(IFN- γ)水平,升高抗炎因子IL-4水平;同时能显著降低口腔黏膜溃疡组织血管内皮生长因子(VEGF)蛋白水平^[9]。本研究基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用仪(UPLCQ-TOF-MS)的代谢组学方法考察京制牛黄解毒片对口腔黏膜炎大鼠血清内源性代谢产物的变化,并通过分子生物学手段进行验证,明确其发挥药效的代谢调控通路。

1 材料与方法

1.1 动物

无特定病原体级 SD 雄性大鼠,体质量(180 \pm 20)g,由维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SYXK(京)2018-0008。饲养于 SPF 级动物房。动物室温度 2~25 $^{\circ}$ C,相对湿度 55%~70%。

1.2 药物及试剂

LC-MS 级甲醇、乙腈、甲酸购自 Technologies Fisher Chemical 公司;京制牛黄解毒片(规格 0.6 g/片,批号 20121671)购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂;氢氧化钠(NaOH,批号 050222)

购自北京化学试剂公司;异氟烷(批号 21041001)购自深州市瑞沃德生命科技公司;5-氟尿嘧啶注射液(5-FU,批号 2011091)购自天津金耀药业有限公司;曲安奈德口腔软膏[香港澳美制药,规格 0.1% (w/w),批号 6200478];脂多糖来源于大肠杆菌(0111:B4,货号 L2630)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号 CL488-28058)、TNF- α 抗体(货号 CL488-6021)、CoraLite[®] Plus 488-conjugated CD68 抗体(货号 98236-1-RR)、F4/80 抗体(货号 81668-1-RR)、CoraLite[®]594-conjugated NF- κ B p65 Monoclonal antibody(货号 CL594-66535)、鞘氨醇-1-磷酸受体(S1PR3)抗体(货号 84697-1-RR)均购自武汉三鹰生物技术有限公司; β -tubulin 抗体(货号 2128)、磷酸化蛋白激酶 B1(p-Akt)抗体(货号 4060)、Akt 抗体(货号 9272)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 647,货号 ab150115)、DCFDA/H2DCFDA-Cellular ROS Assay 试剂盒(ab113851)均购自美国 Abcam 公司;巨噬细胞培养体系(货号 1921)购自美国 ScienCell 公司;IRDye 800CW Goat anti-Rabbit 荧光 WB 二抗(货号 926-32211)购自美国 LI-COR 公司。

1.3 主要仪器

NewClassic MS 电子天(瑞士 Mettler-Toledo 公司);冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);氮气吹扫仪(上海净信实业发展有限公司);UHPLC 液相色谱系统(美国 Thermo Scientific 公司);Q Exactive HF-X 质谱仪(美国 Thermo Scientific 赛默飞公司);311 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);Epoch2 型酶标仪(美国 BioTek 公司);垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);LI-COR 双色荧光与发光成像仪(美国 LI-COR 公司);Operetta CLS 高内涵细胞成像系统(美国 PerkinElmer 公司)。

1.4 口腔黏膜炎模型的建立及分组给药

适应性喂养后,将大鼠分为对照组、模型组、曲安奈德口腔软膏组、京制牛黄解毒片(0.124、

0.248、0.496 g/kg) 组, 每组 10 只。京制牛黄解毒片粉碎后采用去离子水溶解, 给药前充分振摇和涡旋。除对照组外, 各组动物第 1 天予以 ip 5-FU 注射液 50 mg/kg, 于第 3 天叠加 NaOH 灼伤造成口腔溃疡。大鼠异氟烷麻醉后固定于操作台上, 取 1 mL 注射器针管 (下端截开, 内径为 5 mm), 针管内填充固定量的 NaOH 粉末, 放置于大鼠舌下黏膜处维持 30 s, 取开后立即用大量生理盐水冲洗。第 3 天 NaOH 造模同时开始给药, 京制牛黄解毒片各剂量组大鼠 ig 给药, 曲安奈德软膏组大鼠予以黏膜外用治疗^[9-10]。对照组和模型组大鼠给予相应剂量的去离子水。结合前期研究结果, NaOH 造模 6 h 即可形成口腔黏膜溃疡, 该模型最佳观测时间为第 4~8 天。

1.5 黏膜炎溃疡面积测量

用游标卡尺测量并计算大鼠给药后第 4、6、8 天口腔黏膜炎溃疡面积, 记录黏膜溃疡直径 (d)。溃疡多呈圆形, 计算黏膜溃疡面积。

$$\text{溃疡面积} = \pi \times (d/2)^2$$

1.6 口腔黏膜炎组织 HE 染色

第 8 天测量完大鼠口腔黏膜溃疡面积, 拍照后取溃疡组织进行病理检查。使用 4% 多聚甲醛固定溃疡组织, 依次进行梯度酒精脱水, 将浸好蜡的组织包埋, 冷却, 再用石蜡切片机切片, 切片漂浮于展片机 40 °C 温水上, 60 °C 烘箱内烤片, 常温保存备用。本研究沿用参考文献^[11]中的评分标准, 光镜下对大鼠口腔黏膜炎的病理组织学改变进行观察与评定。

1.7 代谢组学检测

1.7.1 血清样本制备 取 -80 °C 保存的血清样本, 4 °C 解冻。取 100 μ L 血样置于 1.5 mL EP 管中, 加入 300 μ L 提取液甲醇 - 乙腈 (1:1), 涡旋振荡, 低温超声提取 30 min, 4 °C、15 000 $\times g$ 离心 15 min; 取上清液, 氮气吹干, 加入 100 μ L 复溶液乙腈 - 水 (1:1) 复溶, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 待测。

1.7.2 质谱条件 LC-MS 分析的仪器平台为赛默飞公司的超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱 UHPLC-Q Exactive HF-X 系统。Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), 流动相流动相 A 为 5% 乙腈 - 水 (含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为 47.5% 乙腈 - 47.5% 异丙醇 - 5% 水 (含 0.1% 甲酸), 进样量为 3 μ L, 柱温为 40 °C。样品经

电喷雾电离, 分别采用正、负离子扫描模式采集质谱信号。电离源电压正离子模式下 3 500 V, 负离子模式下 -3 500 V; 鞘气流速 50 L/h; 辅助气流速 13 L/h; 电喷雾毛细管电压 3.5 kV; 气体温度为 320 °C。扫描范围 m/z 设定为 70~1 050, 一级质谱检测分辨率 60 000, 二级检测采用数据依赖性扫描 (DDS) 选择前五强的离子进行二级碎裂, 碰撞气为高纯氮气, 二级质谱碰撞类型为高能碰撞裂解, 归一化碰撞能量为 20%、40%、60%, 二级质谱检测分辨率 15 000。

1.8 原代小鼠骨髓巨噬细胞 (BMDM) 培养及鉴定

据文献报道方法^[12]略作改进, 以颈椎脱臼法处死小鼠, 经 75% 乙醇浸泡消毒 3~5 min, 在超净台内取出股骨及胫骨, 去除肌肉及结缔组织, 浸泡于冷的 DPBS 缓冲液中, 剪掉骨两端, 用 1 mL 注射器吸取冷的 DPBS 缓冲液冲出骨髓, 直至骨发白, 轻轻吹散细胞, 以 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 将细胞重悬于 1 mL 红细胞裂解液中室温静置 1 min, 立即加入 10 mL 冷的 DPBS 缓冲液, 充分混匀, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用 Scien Cell 的巨噬细胞培养基重悬细胞接种至培养瓶, 常规培养 2 h 后收集悬浮细胞。用 1 mL 巨噬细胞完全培养基 (含 1% 双抗、5% FBS) 重悬细胞, 计数。调整细胞数量接种于培养瓶中, 之后用巨噬细胞完全培养基培养 7 d, 隔天半量换液 1 次。

细胞鉴定: 细胞经 4% 多聚甲醛固定 15 min, 山羊血清封闭 1 h 后, 一抗 CD68 和 F4/80 (1:200 稀释) 4 °C 孵育 24 h。用 PBS 洗 3 遍后, 二抗山羊抗小鼠 IgG H&L (1:500 稀释) 在室温下避光孵育 60 min 后, 采用高内涵细胞成像系统拍照。

1.9 CCK8 法检测细胞的增殖活力

1.9.1 对细胞增殖活力的影响 取对数生长期的 BMDM 细胞, 按每孔 6×10^3 个的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L。培养 24 h 待细胞贴壁后, 吸弃培养液。对照组加入完全培养基, 京制牛黄解毒片采用 DMSO 制备母液, 通过培养基稀释到相应浓度, 并设立 DMSO 溶剂对照。分组加入含终质量浓度为 6.25、12.50、25.00、50.00、200.00、400.00、800.00、1 600.00 μ g/mL 的京制牛黄解毒片完全培养基, 设 5 个复孔, 观察药物浓度梯度对 BMDM 细胞的毒性作用。

1.9.2 分组及给药 参考文献报道^[13]中 LPS 对 BMDM 细胞的刺激剂量。取 96 孔板, 接种细胞密

度为 6×10^3 个/孔, 模型组加入含 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 的培养液, 京制牛黄解毒片组分别加入含终质量浓度为 6.25、12.50、25.00 $\mu\text{g/mL}$ 的京制牛黄解毒片和 $1 \mu\text{g/mL}$ LPS 培养液, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 设 5 个复孔。药物作用 24 h 后, 吸弃培养液; 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK8 溶液, 37°C 避光孵育 1 h, 并置于酶标仪中于 490 nm 波长下测定各组吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞活性} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{溶剂对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{溶剂对照}})$$

1.10 BMDM 细胞上清炎症因子含量测定

将 BMDM 细胞接种于 24 孔板中, 细胞密度约为每孔 6×10^4 个, 每孔 1 mL , 培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液, 分组及给药同 1.9.2 项下。给药干预后, 收集细胞上清液, 3000 r/min 离心 10 min 去除沉淀物。按照 ELISA 试剂盒说明书要求操作, 检测细胞上清液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量。

1.11 荧光探针法检测细胞 ROS 含量

BMDM 细胞以 6×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板内, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液, 细胞分组及给药同 1.9.2 项下。每个孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 稀释后的 DCFDA 溶液对细胞进行染色, 37°C 细胞培养箱内孵育 45 min, PBS 洗 3 遍, 充分洗去 DCFDA 探针, 采用高内涵细胞成像系统观察, Harmony 4.9 软件分析荧光强度值。

1.12 免疫荧光法检测细胞 TNF- α 蛋白表达

将 BMDM 细胞以 6×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板内, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液, 细胞分组及给药同 1.9.2 项下。给药干预后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 清洗细胞 3 次; 10%山羊血清封闭 1 h 之后孵育带荧光标记的 TNF- α 抗体, 4°C 过夜; 次日 PBS 洗涤 3 次, DAPI 进行细胞核染色, 采用高内涵细胞成像系统进行观察, Harmony 4.9 软件分析细胞的荧光强度值。

1.13 免疫荧光法检测核因子- κB (NF- κB) 核转位

BMDM 细胞以 6×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板内, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 培养 24 h 待细胞贴壁后轻轻吸弃培养液, 细胞分组及给药同 1.9.2 项下。给药干预后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 清洗细胞 3 次; 10%山羊血清封闭 1 h 之后孵育带荧光标记的 NF- κB 抗体, 4°C 过夜; 次日 PBS 洗涤 3 次, DAPI 进行细胞核染色, 采用高内涵细胞成像系统进行观察, Harmony 4.9 软件分析细胞的荧光强度值。

1.14 Western blotting 法检测 BMDM 细胞鞘氨醇-1-磷酸受体 (S1PR3)、p-Akt、Akt、IL-18 蛋白的表达

将 BMDM 细胞以 3×10^5 个的密度接种于 60 mm 培养皿中, 培养 24 h 待细胞贴壁后吸弃培养液, 细胞分组及给药同 1.9.2 项下。给药干预后, 收集细胞。加入 RIPA 裂解液, 冰浴裂解 20 min, 12000 r/min , 离心半径 9.5 cm , 离心 10 min, 上清液即为细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度, 98°C 变性, 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、冰浴电转, 5% BSA 封闭液室温孵育 1 h, 加入相应的一抗, 4°C 孵育过夜, 洗涤 3 次。二抗孵育 1 h, 洗涤 3 次。蛋白条带图像用 LI-COR 图像软件进行灰度和荧光强度分析, 并除以内参蛋白 GAPDH 灰度值, 得到待测蛋白的相对表达水平。

1.15 统计学处理方法

代谢组学结果首先采用 ProgenesisQI 软件对质谱数据以总峰面积为对照, 进行降噪、峰提取、峰识别、归一化等处理, 然后导入 SimcaP 14.0 软件中进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 根据变量权重投影值 (VIP) > 1.0 、组间变化倍数 (FC) < 0.8 或 > 1.2 且 $P < 0.05$ 筛选差异性代谢物, 根据 HMDB 数据库鉴定差异代谢物, 将差异代谢物导入 MetaboAnalyst 5.0 在线网址 (<https://genap.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>) 中进行代谢通路富集分析。采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。研究数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据若满足方差齐性, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验; 若方差不齐, 多组间比较及两两比较均采用 Kruskal-Wallis 检验。

2 结果

2.1 京制牛黄解毒片对大鼠口腔黏膜炎溃疡面积的影响

实验第 4 天进行口腔黏膜溃疡面积拍照及测量。观察及测量可见, 对照组大鼠舌黏膜组织无溃疡, 呈粉红色, 无水肿, 无假膜形成。其余各组大鼠舌下黏膜处出现明显损伤, 溃疡呈类圆形, 表面呈凹陷性缺损, 溃疡面呈灰黑色或覆有白黄色假膜, 周围黏膜明显充血水肿。从第 6 天开始, 与模型组大鼠比较, 京制牛黄解毒片组大鼠的黏膜炎面积有减小趋势; 第 8 天观察, 京制牛黄解毒片 0.124 g/kg 组溃疡面积显著减小, 周围黏膜充血水肿明显减轻 ($P < 0.01$), 见图 1A、B。

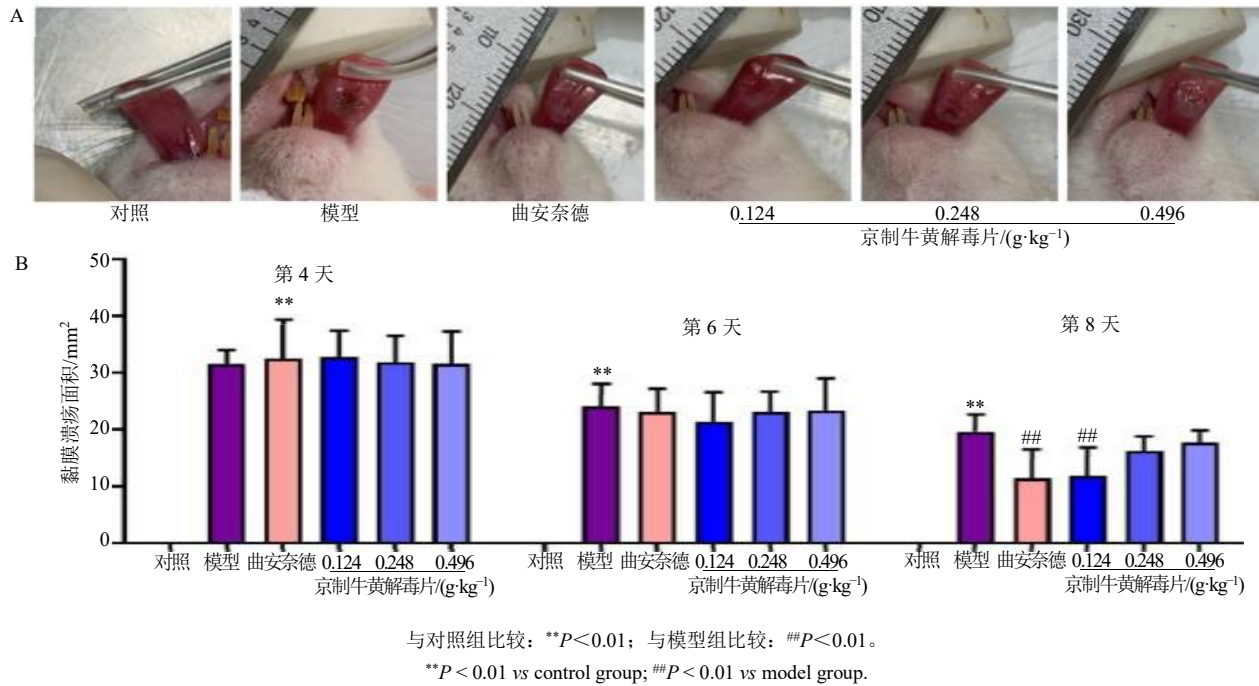


图 1 各组口腔黏膜溃疡情况 (A) 及溃疡面积 (B)

Fig. 1 Status (A) and area (B) of oral mucosal ulcers in each group

2.2 京制牛黄解毒片对大鼠口腔黏膜炎病理改变的影响

HE 染色结果如图 2 所示, 对照组大鼠舌组织结构完整, 无溃疡, 无组织坏死、细胞水肿和炎性细胞浸润; 模型组舌黏膜组织可见局部黏膜脱落, 伴见炎细胞浸润, 可见水肿液和红细胞渗出, 溃疡灶局部组织坏死。京制牛黄解毒片各剂量组大鼠舌黏膜病理改变明显减轻, 炎细胞浸润程度较低, 红细胞渗出减少, 组织水肿程度降低, 组织坏死程度

减少。与模型组对比, 京制牛黄解毒片 0.124 g/kg 组大鼠病理评分显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 代谢组学分析

2.3.1 PCA 和 OPLS-DA 分析 首先应用 PCA 散点图过滤异常值, 然后采用 OPLS-DA 对数据进行分析以突出组间差异, 便于后续寻找潜在差异生物标志物。PCA 结果显示 (图 3A), QC 样本相对集中, 表明了实验条件和仪器设备的稳定性。各组样本之间存在一定的交叉, 但对照组与模型组样本可

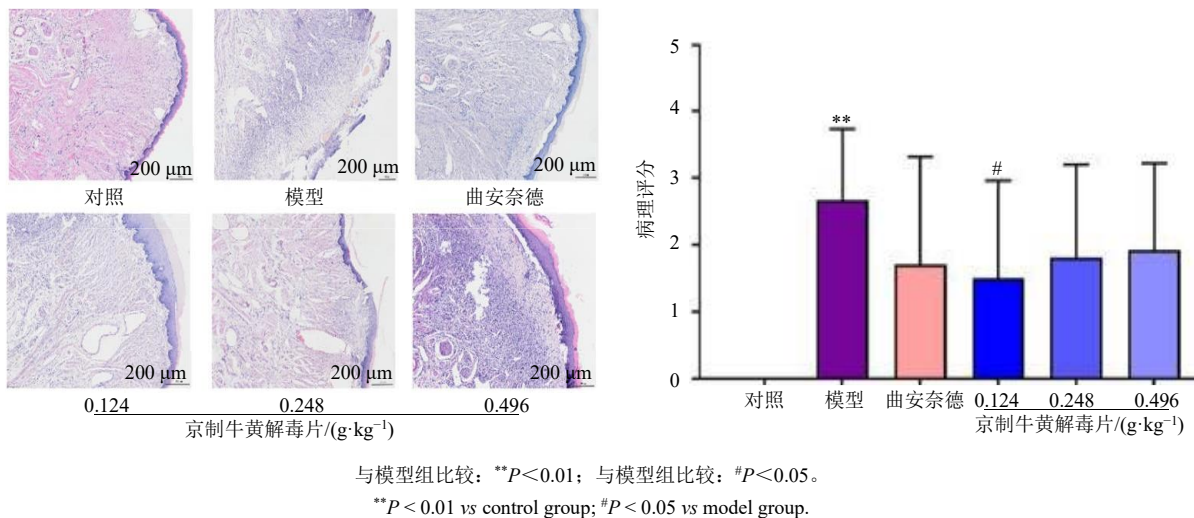
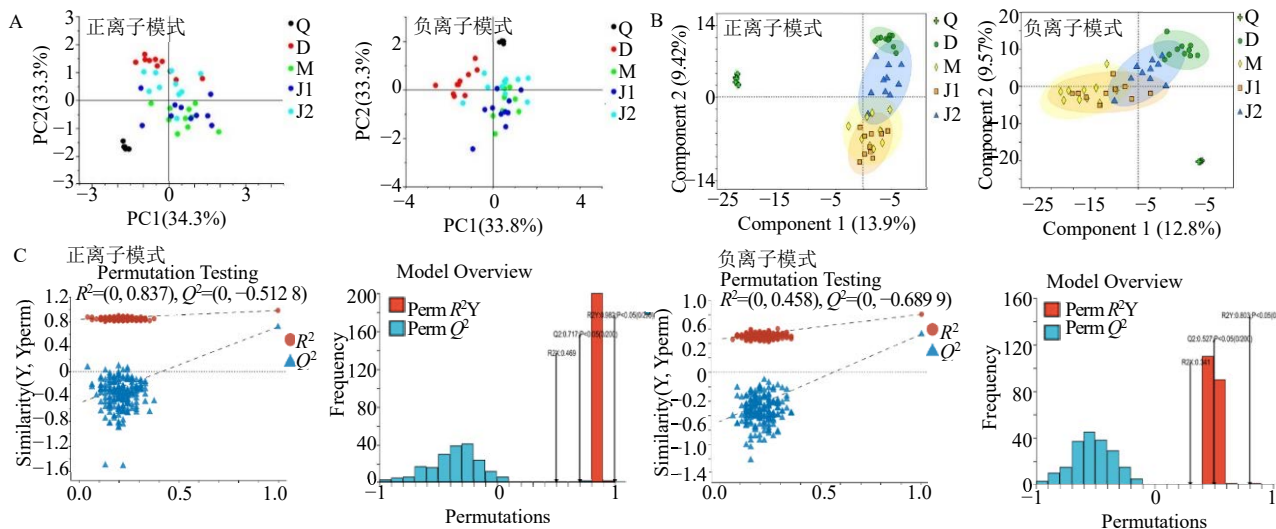


图 2 溃疡面积和病理 HE 染色结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Ulcer area measurement and HE staining ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



A-正、负离子模式下的 PCA 得分图, B-正、负离子模式下的 OPLS-DA 得分图, C-正、负离子模式下的 OPLS-DA 置换验证结果; Q-QC 样本, D-对照, M-模型, J1-京制牛黄解毒片 0.248 g·kg⁻¹, J2-京制牛黄解毒片 0.124 g·kg⁻¹。

A-PCA score plot in positive and negative ion mode, B-OPLS-DA score plot in positive and negative ion mode, C-OPLS-DA replacement verification results in positive and negative ion mode; Q-QC sample, D-control, M-model, J1 - Jingzhai Niu Huang Jiedu Tablets 0.248 g·kg⁻¹, J2 - Jingzhai Niu Huang Jiedu Tablets 0.124 g·kg⁻¹.

图 3 各组大鼠血清 PCA 和 OPLS-DA 分析

Fig. 3 PCA and OPLS-DA score plots and corresponding model validation plot of samples in serum of rats in each group

较明显地分开,表明各组大鼠血清中的代谢物发生了明显的变化。在正、负离子模式下,各组别均可进行聚类,其中对照组和模型组可较好地分离,表明模型的成功构建。京制牛黄解毒片 0.124 g/kg 组与对照组靠近,与模型组较远,表明其对口腔黏膜炎具有治疗作用。

如图 3B 所示,对照组和模型组、模型组和京制牛黄解毒片 0.124 g/kg 组在不同的象限中表现出显著的聚类特征,说明代谢产物存在着差异,有较好的分离,且有明显的代谢特征。如图 3C 所示,在正、负离子模式下,模型组和京制牛黄解毒片 0.124 g/kg 组间所建立的模型解释能力参数 R^2Y 和预测能力参数 Q^2 分别为 (0.982, 0.717)、(0.803, 0.527),充分表明该模型具有良好的解释能力和预测能力。

2.3.2 血清潜在生物标志物筛选 采用 OPLS-DA 模型第一主成分的 $VIP > 1$,并结合 t 检验的 $P < 0.05$ 来寻找差异代谢物,以火山图的形式进行可视化。进一步将各组差异代谢物按照定量值计算欧式距离矩阵,分别进行组间层次聚类分析,筛选显著差异代谢物,以热图进行可视化。如图 4A 所示,最终得到血清中有 41 个与口腔黏膜炎风险相关的生物标志物。

为进一步明确京制牛黄解毒片调节口腔黏膜炎代谢通路的影响,将潜在生物标志物进行通路预测分析,影响较强的为鞘脂信号通路、脂类代谢通路和 $Fc\gamma R$ 介导的吞噬作用等,见图 4B。

2.4 小鼠 BMDM 细胞的培养及鉴定

倒置显微镜下观察可见,细胞形态为圆形或卵圆形,贴壁纯化培养 7 d,细胞伸出伪足黏附在培养皿上,符合巨噬细胞形态特征(图 5A)。通过免疫荧光染色法对 BMDM 中巨噬细胞标志物的表达和定位进行分析,所用标志物为 CD68、F4/80(图 5B)。

2.5 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞活力的影响

与对照组比较,京制牛黄解毒片达到 1 600.00 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时 BMDM 细胞的存活率明显降低 ($P < 0.05$),提示因为浓度过高对细胞造成损伤;京制牛黄解毒片 800.00~6.25 $\mu\text{g/mL}$ 时对细胞无明显损伤作用。京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞活力无显著性影响,见图 6。

2.6 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞上清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量的影响

与模型组相比,京制牛黄解毒片 12.50 $\mu\text{g/mL}$ 组 TNF- α 、IL-1 β 含量均明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。京制牛黄解毒片 6.25、12.50 $\mu\text{g/mL}$ 组 BMDM 细胞中 IL-6 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01),见图 7。

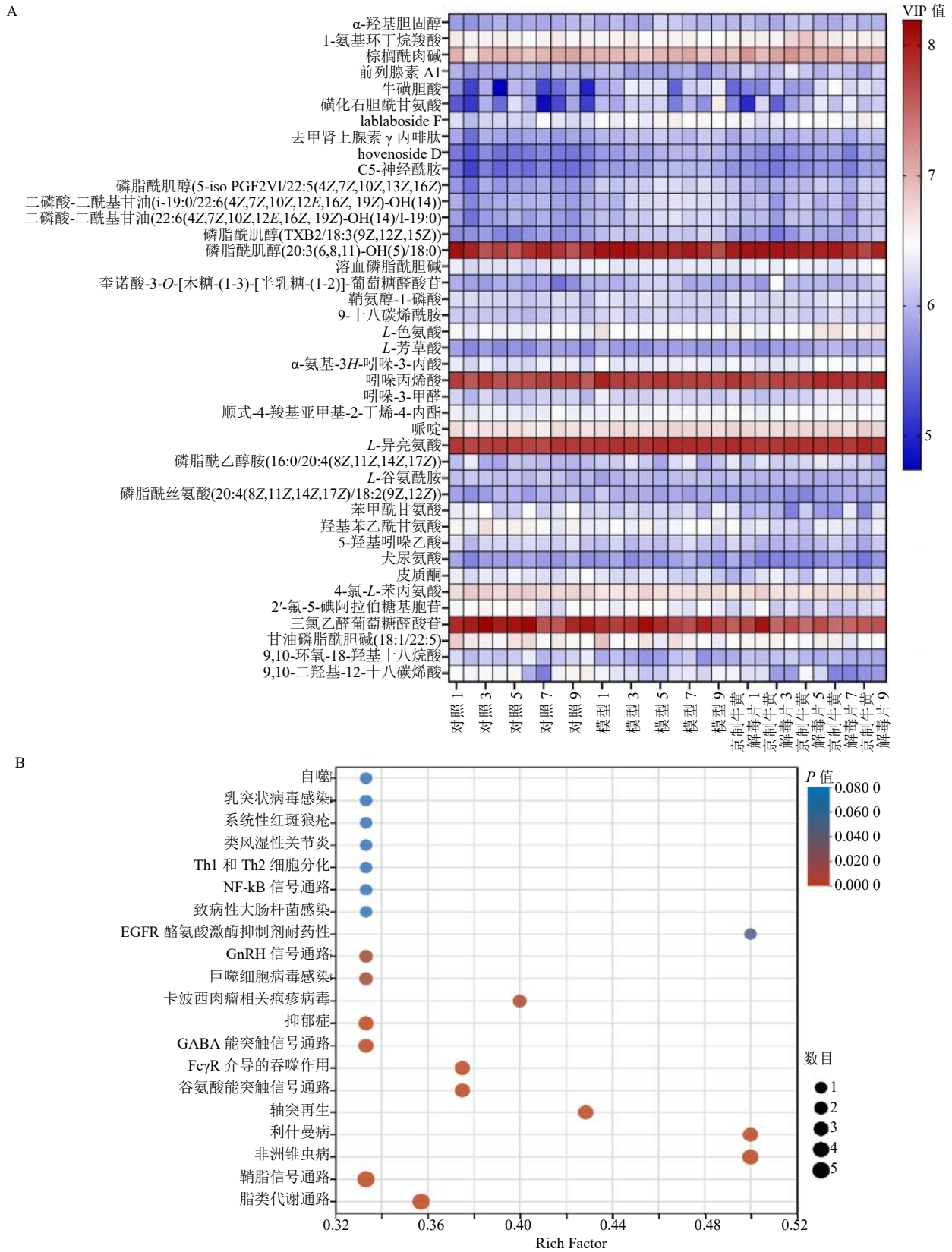


图 4 差异代谢物热图 (A) 和代谢通路富集 (B)

Fig. 4 Differential metabolite heatmap (A), metabolic pathway enrichment (B)

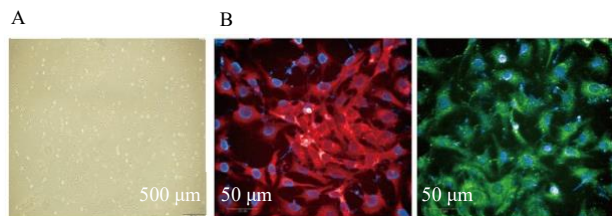


图 5 BMDM 细胞形态 (A)、鉴定 (B)

Fig. 5 BMDM cell morphology (A), identification (B)

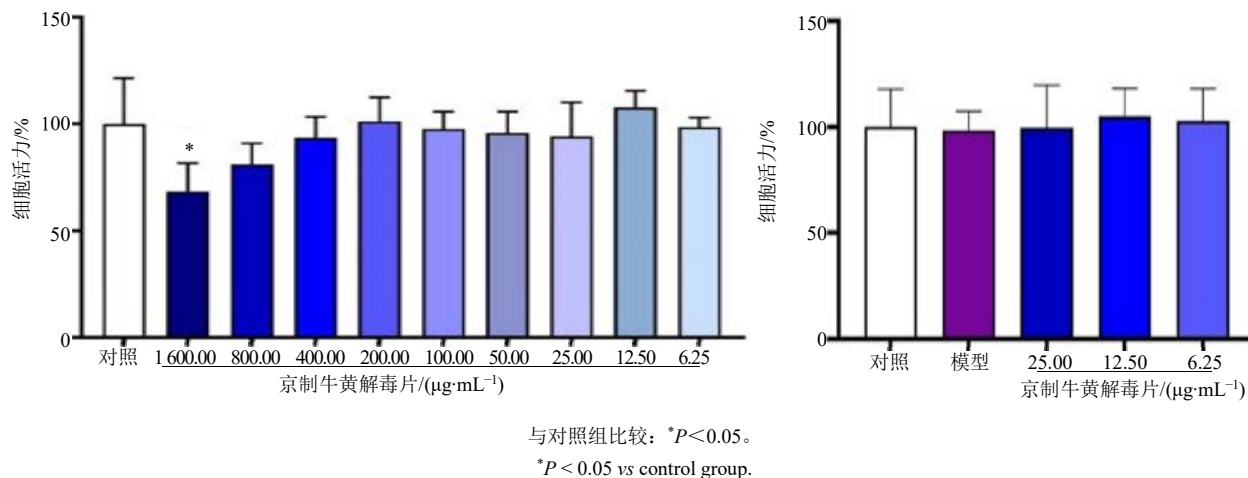


图 6 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of Jingzhi Niu Huang Jie Du Tablets on cell viability in BMDM cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

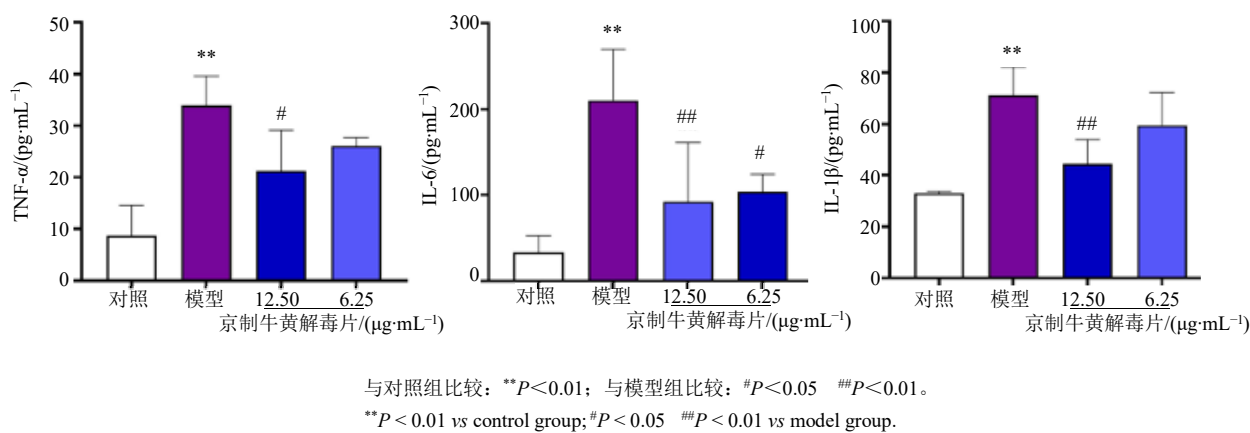


图 7 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 7 Effect of Jingzhi Niu Huang Jie Du Tablets on inflammatory factors in BMDM cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.9 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞 NF- κ B 核转位的影响

与模型组相比,京制牛黄解毒片 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组显著抑制细胞 NF- κ B 核位移($P < 0.01$),见图 10。

2.10 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞 p-Akt/Akt 和 S1PR3 蛋白表达的影响

与模型组相比,京制牛黄解毒片 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

2.7 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞 ROS 生成的影响

与模型组相比,京制牛黄解毒片 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 ROS 生成显著降低 ($P < 0.05$),见图 8。

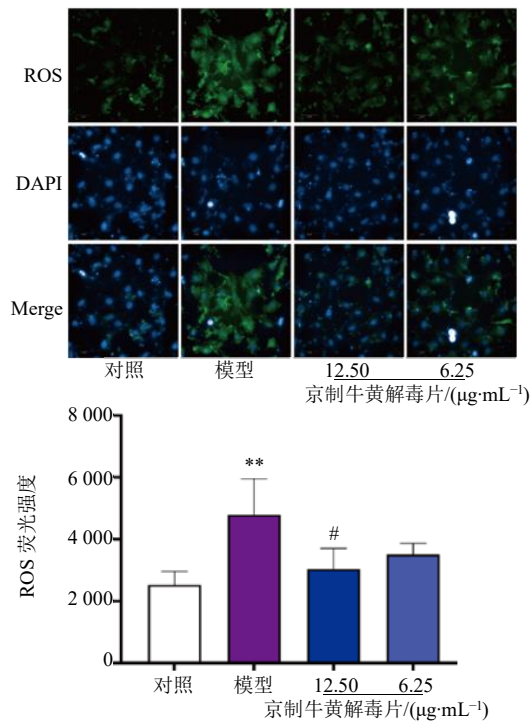
2.8 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞 TNF- α 表达的影响

与模型组相比,京制牛黄解毒片 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞 TNF- α 荧光强度显著降低 ($P < 0.01$),见图 9。

组细胞 p-Akt/Akt 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05$),S1PR3 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$),见图 11。

3 讨论

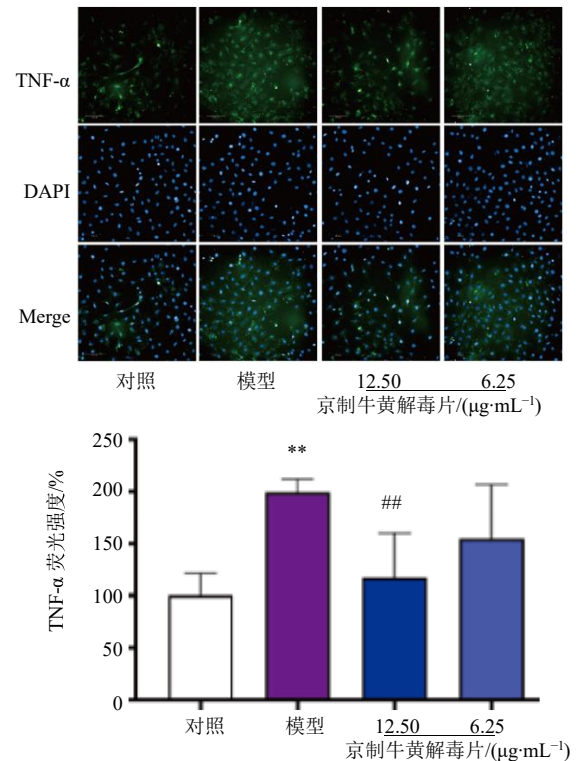
本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对大鼠血清进行代谢组学分析,筛选潜在生物标志物,并富集相关代谢通路,阐释京制牛黄解毒片作用机制。共



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 8 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞 ROS 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

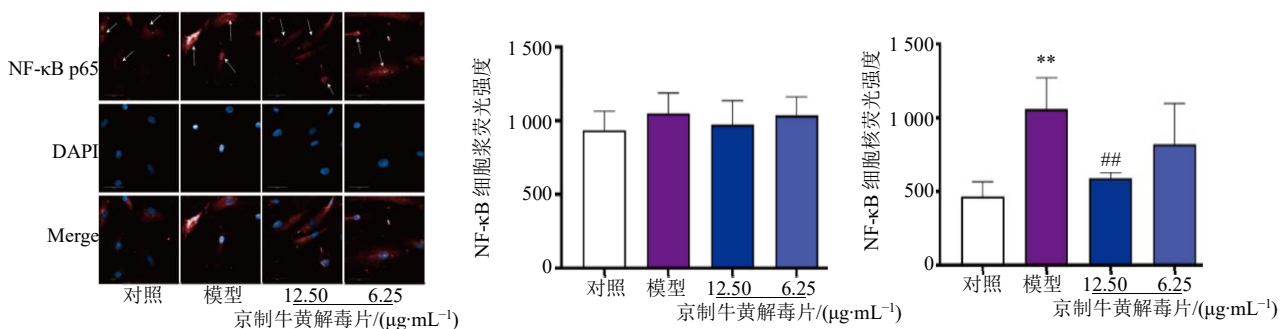
Fig. 8 Effect of Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets on the generation of ROS in BMDM cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 9 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞 TNF-α 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Effects of Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets on TNF-α expression in BMDM cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 10 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞 NF-κB p65 核转位 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 10 Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets on the nuclear translocation of NF-κB p65 in BMDM cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

筛选鉴定出 41 个差异代谢物与口腔黏膜炎密切相关, 且京制牛黄解毒片能显著回调这些潜在生物标记物。通过信号通路富集分析发现, 京制牛黄解毒片主要通过调节鞘脂信号通路、脂类代谢通路和 FcγR 介导的吞噬作用等途径发挥治疗作用, 并进一步采用分子生物学手段对关键靶点进行了验证。

在口腔黏膜炎起始阶段, 放疗导致活性氧的产生, 从而破坏生物分子并引发细胞凋亡。信号通路涉及 DNA 和非 DNA 损伤诱导的复杂机制的激活, 如 NF-κB 激活导致促炎细胞因子的释放。在扩增阶段, NF-κB 在各种细胞类型中被激活, 增加促炎细胞因子并激活下游的信号通路, 最终导致组织

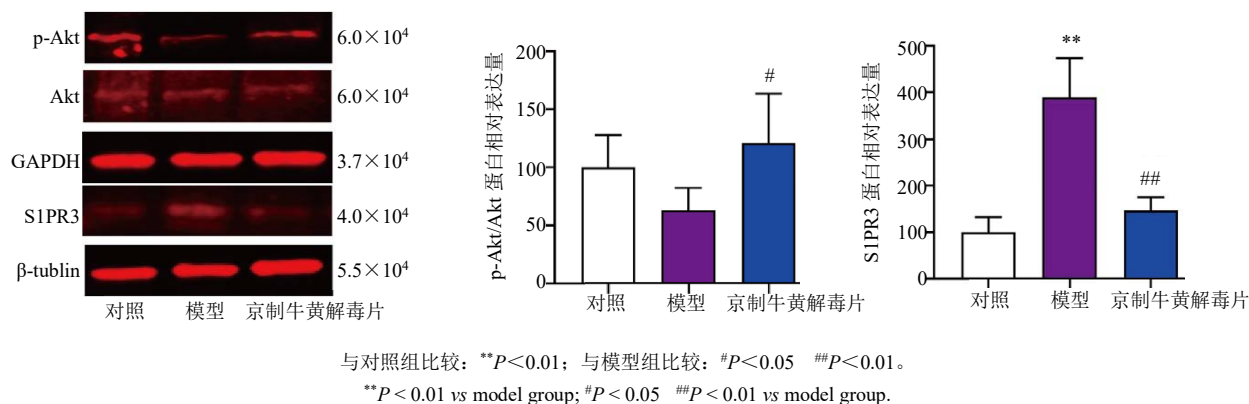


图 11 京制牛黄解毒片对 BMDM 细胞 p-Akt/Akt 和 S1PR3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 11 Effects of Jingzhi Niu Huang Jiedu Tablets on p-Akt/Akt and S1PR3 expression in BMDM cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

损伤。在溃疡阶段，细菌定植可加剧炎症。巨噬细胞和淋巴细胞分泌的细胞因子介导的级联效应是口腔黏膜炎发生和持续的关键因素，其中 IL-6、TNF- α 、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 在此过程中发挥了重要作用^[14]。巨噬细胞是一类具有高度多样性的白细胞群体，其核心功能在于通过吞噬作用有效清除体内的病原体，是人体免疫系统的关键组成部分。不同组织中的巨噬细胞会根据其所处环境的变化而发生极化，形成不同的巨噬细胞亚型，如 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞。LPS 能够促使巨噬细胞极化为 M1 表型，而 M1 型巨噬细胞促发炎症反应，并产生诸如 IL-6、IL-12 和 TNF 等促炎相关细胞因子^[15]。前期研究表明，京制牛黄解毒片能抑制口腔黏膜炎大鼠血清 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平^[9]。本研究采用 LPS 诱导小鼠骨髓巨噬细胞体外炎症模型，结果显示 LPS 刺激 BMDM 细胞后，细胞 ROS 水平显著性增加，细胞上清炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平明显升高，细胞 TNF- α 蛋白表达也同时升高，且在 LPS 刺激下，细胞核 NF- κ B 荧光强度明显升高。京制牛黄解毒片能显著抑制 BMDM 细胞上清炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌，抑制细胞 ROS 的生成，减少细胞 TNF- α 蛋白表达，并且抑制了细胞 NF- κ B 的核转位。说明京制牛黄解毒片可能通过调节细胞氧化应激水平和 NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用。

Akt 是细胞内关键信号分子之一，在细胞增殖、迁移、分化、凋亡和物质代谢等一系列生理和病理进程中发挥重要调节作用。Akt Ser473 位点磷酸化后被活化，可使相应底物蛋白如内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、糖原合酶激酶-3 (GSK-3) 等特定部位

的丝/苏氨酸发生磷酸化，从而激活或抑制其下游靶蛋白功能。激活或过表达 Akt 激酶降低 LPS 对巨噬细胞的激活作用；非特异性抑制 Akt 信号会促进 NF- κ B 激活，诱导 NO 合成酶表达，促进 M1 型巨噬细胞炎症反应^[16-17]。鞘氨醇 1-磷酸盐 (S1P) 是磷酸鞘氨醇激酶 (SPHK) 产生的一种多能溶血磷脂中间体^[18]，通过与细胞表面的 G 蛋白偶联鞘氨醇-1-磷酸受体 (S1PRs) 结合，在不同细胞中发挥生物学效应，成为自体免疫系统疾病、心血管疾病、神经系统疾病、炎症、肿瘤等多种疾病研究的热点之一。不同的 S1P 受体与不同的 G 蛋白偶联从而调节特定的信号通路，包括 MAPK, PI3K/Akt 和磷脂酶 C 介导的信号通路等。这些途径参与了多种生理过程，例如细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化、细胞迁移、炎症反应以及免疫应答等^[19]。据报道，S1PR2 介导巨噬细胞 NF- κ B 的激活、迁移以及向 M1 表型极化^[20]；脂多糖刺激可诱导 BMDM 细胞和人单核细胞中 S1PR3 的表达，并且在 BMDM 细胞中抑制 S1PR3 比抑制 S1PR2 更有效地减弱 NLRP3 炎性小体的激活，炎症条件下的巨噬细胞中，S1PR3 在诱导的 NLRP3 激活中起主要作用^[21]。因此，本研究采用 Western blotting 检测了小鼠骨髓巨噬细胞中 p-Akt/Akt 和 S1PR3 蛋白表达。研究结果显示，LPS 刺激后，BMDM 细胞的 p-Akt/Akt 蛋白表达下降，S1PR3 蛋白表达升高；京制牛黄解毒片干预后，细胞 p-Akt/Akt 蛋白表达显著升高，S1PR3 蛋白表达显著降低。该部分研究验证了代谢组学的内容，京制牛黄解毒片可能通过调节 S1PR3/Akt 轴，从而影响了鞘脂信号通路对口腔黏膜炎具有防治作用。

综上所述，本研究发现京制牛黄解毒片可以治

疗口腔黏膜炎,可能是通过调节氧化应激、炎症反应、氨基酸代谢和鞘脂类信号通路等途径发挥其治疗作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Prats P M, Garcia F G, Diaz F M, *et al.* The therapeutic effects of apigenin and dexamethasone on 5-fluorouracil-induced oral mucositis - a pilot study using a Syrian hamster model [J]. *J Oral Pathol Med*, 2017, 46(2): 142-147.
- [2] Chiang C P, Chang Y F J, Wang Y P, *et al.* Recurrent aphthous stomatitis - Etiology, serum autoantibodies, anemia, hematinic deficiencies, and management [J]. *J Formos Med Assoc*, 2019, 118(9): 1279-1289.
- [3] Villa A, Sonis S T. Pharmacotherapy for the management of cancer regimen-related oral mucositis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2016, 17(13): 1801-1807.
- [4] Daugėlaitė G, Užkuraitytė K, Jagelavičienė E, *et al.* Prevention and treatment of chemotherapy and radiotherapy induced oral mucositis [J]. *Medicina*, 2019, 55(2): 25.
- [5] Yuan H, Su J J, Tan J Y, *et al.* Efficacy of kangfuxin liquid on radiotherapy-induced oral mucositis for patients with head and neck squamous cell carcinoma and its effect on salivary glands and immune function [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(9): 6792-6804.
- [6] Stan D J, Sârbu M I, Fotea S, *et al.* Oral mucositis induced by chemoradiotherapy in head and neck cancer-A short review about the therapeutic management and the benefits of bee honey [J]. *Medicina*, 2022, 58(6): 751.
- [7] 陈德荣. 京制牛黄解毒片治疗火热内盛证的临床观察 [J]. *时珍国医国药*, 2007(3): 671.
- [8] 陈灵光, 李健波, 陈伟道. 含服京制牛黄解毒片对急性喉炎完全失声的治疗效果观察 [J]. *国际医药卫生导报*, 2005(24): 76-77.
- [9] 范春兰, 张思玉, 左泽平, 等. 基于网络药理学探讨京制牛黄解毒片治疗口腔溃疡的作用机制及实验验证 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2023, 25(1): 94-106.
- [10] Takeuchi I, Kawamata R, Makino K. A rat model of oral mucositis induced by cancer chemotherapy for quantitative experiments [J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(5): 2701-2706.
- [11] Karavana Hizarcioğlu S Y, Sezer B, Güneri P, *et al.* Efficacy of topical benzydamine hydrochloride gel on oral mucosal ulcers: An *in vivo* animal study [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2011, 40: 973-978.
- [12] Mendoza R, Banerjee I, Manna D, *et al.* Mouse bone marrow cell isolation and macrophage differentiation [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2455: 85-91.
- [13] 黄镛静, 罗扬淦, 卢姿含, 等. 小鼠骨髓和腹膜腔来源巨噬细胞的功能差异 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2024, 40(3): 215-221.
- [14] Liu C, Liu X R, Liu J B, *et al.* Huoshan Dendrobium Zengye Jiedu Formula mitigates radiation-induced oral mucositis and improves oral immune microenvironment by targeting the EGFR/PI3K/AKT pathway: Evidence from network pharmacology, molecular docking, and experimental validation [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1559400.
- [15] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [16] 马玉玮, 李占涛, 贾孟辉, 等. 麻黄-苦杏仁药对通过调控巨噬细胞极化和PI3K/Akt/mTOR通路缓解急性肺损伤 [J]. *中草药*, 2025, 56(20): 7407-7421.
- [17] Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, *et al.* Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization [J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1006-1014.
- [18] Zeng M N, Feng A Z, Wang L, *et al.* Aralia saponin A isolated from *Achyranthes bidentata* Bl. ameliorates LPS/D-GalN induced acute liver injury via SPHK1/S1P/S1PR1 pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt A): 110912.
- [19] Galicia-Rosas G, Pikor N, Schwartz J A, *et al.* A sphingosine-1-phosphate receptor 1-directed agonist reduces central nervous system inflammation in a plasmacytoid dendritic cell-dependent manner [J]. *J Immunol*, 2012, 189(7): 3700-3706.
- [20] Yang J, Tang X J, Li B Q, *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor 2 mediated early stages of pancreatic and systemic inflammatory responses via NF-kappa B activation in acute pancreatitis [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 157.
- [21] Wang Y Q, Wang C, He Q L, *et al.* Inhibition of sphingosine-1-phosphate receptor 3 suppresses ATP-induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages via TWIK2-mediated potassium efflux [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1090202

【责任编辑 高源】