UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS结合TRIF/p-IκBα/NF-κB/NLRP3信号通路的蛤蚧定喘丸抗炎机制与活性成分探讨

马 迅，周 煜，王 涛，谭梦茹，申兰慧，陈国清*
无锡市药品安全检验检测中心，江苏 无锡 214028

摘 要：目的 探讨蛤蚧定喘丸的抗炎机制，推测蛤蚧定喘丸发挥抗炎功效的关键活性成分。**方法** 依次采用石油醚、无水乙醇、超纯水对蛤蚧定喘丸不同极性的化学成分进行提取；利用2、4、8、16、32、64、128 μg·mL^{-1}的醚提物、醇提物、水提物处理RAW264.7细胞，分别通过CellTiter-Lumi（CTL）发光法和钙黄绿素/碘化丙啶（Calcein/PI）染色法检测细胞活力，确定提取物的安全浓度；利用各提取物处理脂多糖（LPS）诱导的RAW264.7细胞炎症模型，通过格里斯试剂（Griess）测定一氧化氮（NO）释放量，通过酶联免疫吸附（ELISA）法检测白细胞介素-1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）分泌，筛选具有抗炎活性的提取物。利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术（UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS）对有抗炎活性的提取物进行物质分析，推测抗炎活性物质及作用机制，并利用蛋白免疫印迹法（Western blotting）进一步验证其对硫氧还蛋白互作蛋白（TXNIP）/p-核因子κB抑制蛋白α（p-IκBα）/核因子-κB（NF-κB）/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3（NLRP3）信号通路相关蛋白表达的影响。**结果** 醚提物、醇提物、水提物在质量浓度低于64 μg·mL^{-1}时均未影响细胞活力。与模型组相比，醇提物在质量浓度大于8 μg·mL^{-1}时显著降低NO释放量（$P<0.05$），醚提物和醇提物在质量浓度高达64 μg·mL^{-1}时仍未产生抗炎效果；醇提物显著降低了TNF-α、IL-1β的释放量（$P<0.05$）。醇提物中共分析出36种主要化学成分。经Western blotting实验验证，与模型组比较，蛤蚧定喘丸醇提物对RAW264.7细胞炎症模型内NLRP3炎症小体、β干扰素TIR结构域衔接蛋白（TRIF）、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）、单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1）、p-IκBα的表达均有显著降低作用（$P<0.05$），而对TXNIP、Toll样受体4（TLR4）、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路蛋白的影响并不显著。**结论** 蛤蚧定喘丸通过抑制TRIF/p-IκBα/NF-κB/NLRP3信号通路以及iNOS、MCP-1的合成发挥抗炎功效，推测巴马汀、麻黄碱、伪麻黄碱、小檗碱、甘草素、药根碱、小檗红碱为其抗炎活性成分。

关键词： 蛤蚧定喘丸；β干扰素TIR结构域衔接蛋白（TRIF）；磷酸化核因子κB抑制蛋白α（p-IκBα）；核因子κB（NF-κB）；NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3（NLRP3）；抗炎机制；活性成分；巴马汀、麻黄碱、伪麻黄碱、小檗碱、甘草素、药根碱、小檗红碱

中图分类号： R285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2023）09-1908-11

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.09.010

Study on anti-inflammatory mechanism and active ingredient of Gejie Dingchuan Pill based on UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS technology and TRIF/p-IκBα/NF-κB/NLRP3 signaling pathway

MA Xun, ZHOU Yu, WANG Tao, TAN Mengru, SHEN Lanhui, CHEN Guoqing
Wuxi Institute for Drug Control, Wuxi 214028, China

Abstract: Objective To explore the mechanism and key active substances of Gejie Dingchuan Pill for its anti-inflammatory effect. **Methods** The chemical components with different polarity in Gejie Dingchuan Pill were extracted by petroleum ether, absolute ethanol and ultrapure water in turn. RAW264.7 cells were treated with 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg·mL^{-1} ether extract, alcohol extract and water extract, then the cell viability was detected by CellTiter Lumi (CTL) luminescence and Calcein/PI staining to determine the safe concentration of different extracts; Different extracts were used to treat LPS-induced RAW264.7 cells, then the release of nitric oxide (NO) was measured by Griess reagent, the release of interleukin (IL)-1β and tumor necrosis factor (TNF)-α was detected

收稿日期： 2023-02-21
基金项目： 江苏省市场监管局科技计划项目（KJ2023044）。
第一作者： 马 迅，博士，研究方向为药品活性物质筛查及检验标准提高。E-mail：nuxam@163.com
***通信作者：** 陈国清，主任药师，研究方向为药品、化妆品质量监管。E-mail：1003392530@qq.com

by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to hunt the extracts with anti-inflammatory activity. The extracts with anti-inflammatory activity were analyzed by ultrahigh performance liquid chromatography quadrupole/electrostatic field orbitaltrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS), Western blotting was performed further verified the effect of thioredoxin interacting protein (TXNIP)/p-nuclear factor κB inhibitory protein α (p-IκBα)/nuclear factor κB (NF-κB)/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) signaling pathway. **Results** The safe concentration of extracts was below 64 μg·mL^{-1}. Compared with the model group, at the ethanol extract had a mass concentration greater than 8 μg·mL^{-1}, there were a significant decrease in NO release ($P < 0.05$). No anti-inflammatory effect was observed at with ether and alcohol extracts reaching a mass concentration of up to 64 μg·mL^{-1}. Ethanol extract significantly reduced the release amount of TNF-α and IL-1β ($P < 0.05$). A total of 36 main chemical components were identified in the ethanol extract. The Western blotting experiment verified that the ethanol extract of Gejie Dingchuan Pill could inhibit the expression of NLRP3 inflammatory bodies, TRIF, iNOS, MCP-1 and p-IκBα in LPS-induced RAW264.7 cells ($P < 0.05$), but not affect the expression of TXNIP, TLR4 and MAPK signaling pathway proteins. **Conclusion** Gejie Dingchuan Pill could play an anti-inflammatory role by inhbiting TRIF/p-IκBα/NF-κB/NLRP3 pathway and the synthesis of iNOS and MCP-1. It is speculated that palmatine, pseudo ephedrine, berberine, liquiritigenin, jatrorrhizine and berberrubine are the key substances for Gejie Dingchuan Pill to exert anti-inflammatory activity.

Key words: Gejie Dingchuan Pill; tir-domain containing adaptor inducing interferon-β (TRIF); phospho-inhibitory subunit of nuclear factor kappa-B alpha (p-IκBα); nuclear factor kappa-B (NF-κB); NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3); anti-inflammatory mechanism; active ingredient; palmatine; ephedrine; pseudo ephedrine; berberine; glycyrrhizin; jatrorrhizine; berberine

蛤蚧定喘丸出自《全国中药成药处方集》（天津方），属于国家基本药物品种，是临床常用治疗慢性支气管炎、支气管哮喘的药物。其由蛤蚧、紫菀、麻黄、黄芩、甘草等14味药材组成，各药材相辅相成，达到滋阴清肺、止咳平喘之功效。但目前关于蛤蚧定喘丸的现代药理学研究较少，难以适应现代用药的需要[1-2]。已有研究表明蛤蚧定喘丸可能通过麻黄碱（来自于臣药麻黄）、甘草酸（来自于使药甘草）发挥抗炎功效[3]，但其抗炎作用的物质基础与作用机制尚未完全阐明。另外，中药材的人工种植、异地种植已经越来越普遍，直接影响着药材品质与中药疗效[4]，而关键活性物质的监测对中药质量控制起重要作用[5]。

本实验以脂多糖（LPS）诱导的RAW264.7细胞炎症模型为研究对象，结合超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用仪（UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS）探索蛤蚧定喘丸发挥抗炎作用的物质基础，逐步缩小抗炎活性物质与抗炎机制的筛选范围；最后利用Western blotting实验对蛤蚧定喘丸抗炎机制进行验证，同时反推其抗炎活性物质，不仅探索了蛤蚧定喘丸的抗炎机制，也为中药活性物质的筛选提供了新的探索途径。

1 材料

1.1 细胞

RAW264.7细胞株来自于中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所。

1.2 药品和主要试剂

蛤蚧定喘丸（规格6 g×7袋/盒，批号20210709、20211207；规格6 g×6袋/盒，批号20211002；长春人民药业集团有限公司）；DMEM高糖培养基（货号SH30243.01）、胎牛血清（货号FA35213），HyClone公司；青霉素-链霉素溶液（货号C0222）、HBSS缓冲液（货号C0218）、一氧化氮检测试剂盒（货号S0021S）、CellTiter-Lumi（CTL）Steady发光法细胞活力检测试剂盒（货号C0065M）、钙黄绿素/碘化丙啶（Calcein/PI）细胞活性与细胞毒性检测试剂盒（货号C2015M）、RIPA裂解液（货号P0013B）、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物（货号P1046）、BCA试剂盒（货号P0012）、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒（货号P0012A）、Western溶液套装（货号P0023），碧云天生物公司；鼠源白细胞介素-1β（IL-1β）ELISA试剂盒（货号EMC001b.48）、鼠源肿瘤坏死因子-α（TNF-α）ELISA试剂盒（货号EMC102a.48），欣博盛生物科技有限公司；脂多糖（Sigma公司，货号L2880）；ECL化学发光底物试剂盒（Thermo公司，货号WP20005）；兔源GAPDH抗体（货号ab9485）、兔源caspase-1抗体（货号ab138483）、兔源NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3（NLRP3）抗体（货号ab270449）、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG（货号ab97051）、兔源β干扰素TIR结构域衔接蛋白（TRIF）抗体（货号ab13810），Abcam公司；兔源p-核因子κB抑制蛋白α（IκBα）抗体（货号2859T）、兔源诱导型一氧化氮合成酶（iNOS）抗体（货号13120S）、兔源硫氧还蛋白互作蛋白（TXNIP）抗体（货号14715S）、兔源单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1）抗体（货号2029S）、兔源Toll

样受体4（TLR4）抗体（货号14358S）、兔源P38抗体（货号9212S）、兔源p-P38抗体（货号9211S）、兔源细胞外调节蛋白激酶（Erk1/2）抗体（货号4695T）、兔源p-Erk1/2抗体（货号4377T）、兔源JNK抗体（货号9252S）、兔源p-JNK抗体（货号9251S），Cell Signaling Technology公司。

1.3 主要仪器

Victor Nivo多功能酶标仪（美国Perkin-Elmer公司）；SpectraMax L化学发光酶标仪（美国Molecular Devices公司）；CKX53倒置荧光显微镜（日本OLYMPUS公司）；GR60DP立式压力蒸汽灭菌锅（中国致微仪器有限公司）；SORVALL ST16高速离心机、Vanquish超高效液相色谱系统、Q Exactive高分辨质谱仪（美国Thermo Scientific公司）；Mini-PROTEAN垂直电泳仪（美国Bio-Rad公司）；Elmasonic S100H超声清洗机（德国Elma公司）；Advantage ML旋转蒸发仪（德国Heidolph公司）；XS205电子天平（瑞士梅特勒公司）；Milli-Q超纯水系统（美国Millipore公司）；ChemiDocMP凝胶成像仪（美国Bio-Rad公司）。

2 方法

2.1 细胞培养

RAW264.7细胞培养于含100 U·mL^{-1}青霉素、0.1 mg·mL^{-1}链霉素及10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中，于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养，隔日传代。

2.2 供试品溶液的制备

参照文献报道方法[6]，蛤蚧定喘丸研细后取20 g，加入200 mL石油醚，室温超声30 min后，4 000 r·min^{-1}离心30 min，取上清液作为醚提原液；剩余残渣置于200 mL无水乙醇中，室温超声30 min后，4 000 r·min^{-1}离心30 min，取上清液作为醇提原液；剩余残渣置于200 mL超纯水中，室温超声30 min后，4 000 r·min^{-1}离心30 min，取上清液作为水提原液。将醚提原液旋转蒸干后得醚提物，提取率约6.0%；将醇提原液旋转蒸干后得醇提物，提取率约11.0%；将水提原液旋转蒸干后得水提物，提取率约36.5%。将醚提物、醇提物、水提物分别溶解于DMSO、DMSO、水中，用孔径0.22 μm的微孔滤膜滤过后得到醚提液、醇提液、水提液。

2.3 CTL发光法测定不同提取物对RAW264.7细胞活力的影响

取对数生长期的RAW264.7细胞，制备成密度为5×10^5·mL^{-1}的细胞混悬液，96孔板每孔接种100 μL，培养24 h后加入2、4、8、16、32、64、128 μg·mL^{-1}的各提取物，继续培养24 h后，按试剂盒说明书每孔加入与细胞培养液等体积的检测试剂，10 min后利用化学发光酶标仪检测相对光强度（RLU），RLU值越大，代表细胞活力越强。每个样品设置复孔4个，实验另外设置对照组（不加入提取液，加入同体积的溶剂）。

2.4 Calcein/PI染色法测定不同提取物对RAW 264.7细胞存活率的影响

取对数生长期的RAW264.7细胞，制备成密度为5×10^5·mL^{-1}的细胞混悬液，96孔板每孔接种100 μL，培养24 h后加入64 μg·mL^{-1}的各提取物，继续培养24 h后，按试剂盒说明书，吸弃细胞培养液，HBSS缓冲液洗涤2次后，每孔加入用无血清DMEM培养液1 000倍稀释后的Calein-AM/PI检测试剂，避光孵育30 min，利用荧光显微镜观察细胞死活，其中Calcein AM（绿色荧光）染色活细胞，而PI（红色荧光）染色死细胞，每个样品随机选取9个区域进行拍照。

细胞存活率＝绿色细胞数目/绿色与红色细胞数目之和

2.5 Griess法测定不同提取物对RAW264.7细胞炎症模型NO释放的影响

炎症模型的制备：取对数生长期的RAW264.7细胞，制备成密度为5×10^5·mL^{-1}的细胞混悬液，96孔板每孔接种100 μL，培养6 h后完全贴壁，吸弃培养液，加入同体积含1 μg·mL^{-1} LPS的培养液进行培养，培养18 h后通过NO释放量验证炎症模型，NO释放量与未加入LPS的对照组相比显著升高，表明炎症模型构建成功。

炎症细胞模型构建完成后，吸弃原培养液，加入含2、4、8、16、32、64 μg·mL^{-1}各提取物的DMEM细胞培养液，培养24 h后，每孔取50 μL上清液至新的96孔板中，再依次加入50 μL室温Griess Reagent I与室温Griess Reagent II，利用多功能酶标仪540 nm下测定吸光度（*A*）值，每组4个复孔。同时按照试剂盒说明书以系列浓度$NaNO_2$标准溶液制作标准曲线，计算各孔NO释放量。实验另外设置对照组（正常细胞，不加入提取物及LPS）、模型组（炎症细胞模型，不加入提取物）。

2.6 ELISA法检测不同提取物对RAW264.7细胞炎症模型炎症因子释放的影响

炎症细胞模型按“2.5”项方法构建完成后，吸弃原培养液，加入含64 μg·mL^{-1}的各提取物的细胞培养液，培养24 h后，按照ELISA试剂盒说明书操作，

每个样品设置4个复孔，实验另外设置对照组（正常细胞，不加入提取物及LPS）、模型组（炎症细胞模型，不加入提取物）。

2.7 提取物成分分析

利用UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS对提取物成分组成进行分析。

2.7.1 色谱条件 采用Poroshell 120 EC-C_{18}色谱柱（100 mm×4.6 mm，2.7 μm）；柱温为35 ℃，体积流量为0.3 mL·min^{-1}，进样量为5 μL，进样温度为5 ℃；流动相A为0.1%甲酸溶液，流动相B为甲醇，梯度洗脱，具体洗脱条件见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions of mobile phase

t/min	A/%	B/%
0	80	20
21	50	50
40	5	95
60	5	95

2.7.2 质谱条件 采用电喷雾离子源（ESI），正离子模式检测，喷雾电压3.9 kV，离子源温度320 ℃，鞘气压力40 kPa；MS与MS^2分辨率均设为70 000，诱导碰撞解离能量10、40 eV，扫描范围*m/z* 100～1 500。

2.7.3 化合物的鉴定 参照文献报道方法[7]，将UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS采集所得数据（空白溶剂的质谱数据作为Blank组，3批次样品的提取物质谱数据作为Sample组）导入Compound Discoverer 3.1软件，工作流程包括ChemSpider和mzCloud搜索。结果列表中的所有特征以及记录的二级质谱碎片使用MetFrag做进一步处理，MetFrag结合了小分子的数据库搜索和碎片预测，最终在3批样品中得分均大于60分的化学物质为有效鉴定结果。

2.8 Western blotting法检测炎症信号通路中相关蛋白的表达

炎症模型的制备：取对数生长期的RAW264.7细胞，制备成密度为5×10^5·mL^{-1}的细胞混悬液，6孔板每孔接种2 mL，培养6 h后完全贴壁，制备炎症模型，方法同“2.5”项。

炎症细胞模型构建完成后，吸弃原培养液，加入含64 μg·mL^{-1}醇提物的DMEM细胞培养液，培养24 h，参照文献报道[9]，吸弃培养液，HBSS缓冲液洗涤2次，用RIPA裂解液（含蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物）提取蛋白，BCA试剂盒测定蛋白浓度，SDS-PAGE凝胶电泳，转印到PVDF膜封闭液封闭，4 ℃过夜孵育一抗，室温孵育二抗1 h，最后用ECL显色液在成像系统下观察蛋白表达水平。涉及磷酸化蛋白时，磷酸化蛋白检测完成后，洗去磷酸化抗体及二抗，检测总蛋白，再洗脱1次，检测内标蛋白。利用Image J 1.8.0.172进行灰度分析。

2.9 统计学分析

应用GraphPad Prism 5软件进行数据处理，所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）。

3 结果

3.1 各提取物对RAW264.7细胞活性的影响

与对照组相比，醚提物、醇提物、水提物质量浓度在低于64 μg·mL^{-1}时均未显著影响细胞活力，但醇提物和水提物在质量浓度达到128 μg·mL^{-1}时导致细胞活力显著下降（$P<0.05$）。进一步利用Calcein/PI染色法测定各提取物在64 μg·mL^{-1}对RAW264.7细胞存活率的影响，与对照组相比，醚提物、醇提物、水提物质量浓度达64 μg·mL^{-1}时均未显著影响细胞存活率，这表明64 μg·mL^{-1}可作为安全质量浓度用于后续实验。结果见图1。

3.2 各提取物的抗炎活性研究

与对照组相比，模型组NO释放量显著升高（$P<0.05$）；但与模型组相比，只有醇提物在质量浓度≥8 μg·mL^{-1}时会显著降低NO释放量（$P<0.05$），醚提物和醇提物在质量浓度达64 μg·mL^{-1}时仍未产生抗炎效果。进一步利用ELISA法检测不同提取物在64 μg·mL^{-1}下对炎症因子释放的影响，与模型组相比，只有醇提物显著降低了TNF-α、IL-1β的释放量（$P<0.05$）。结果见图2。

3.3 醇提物的化学成分鉴定

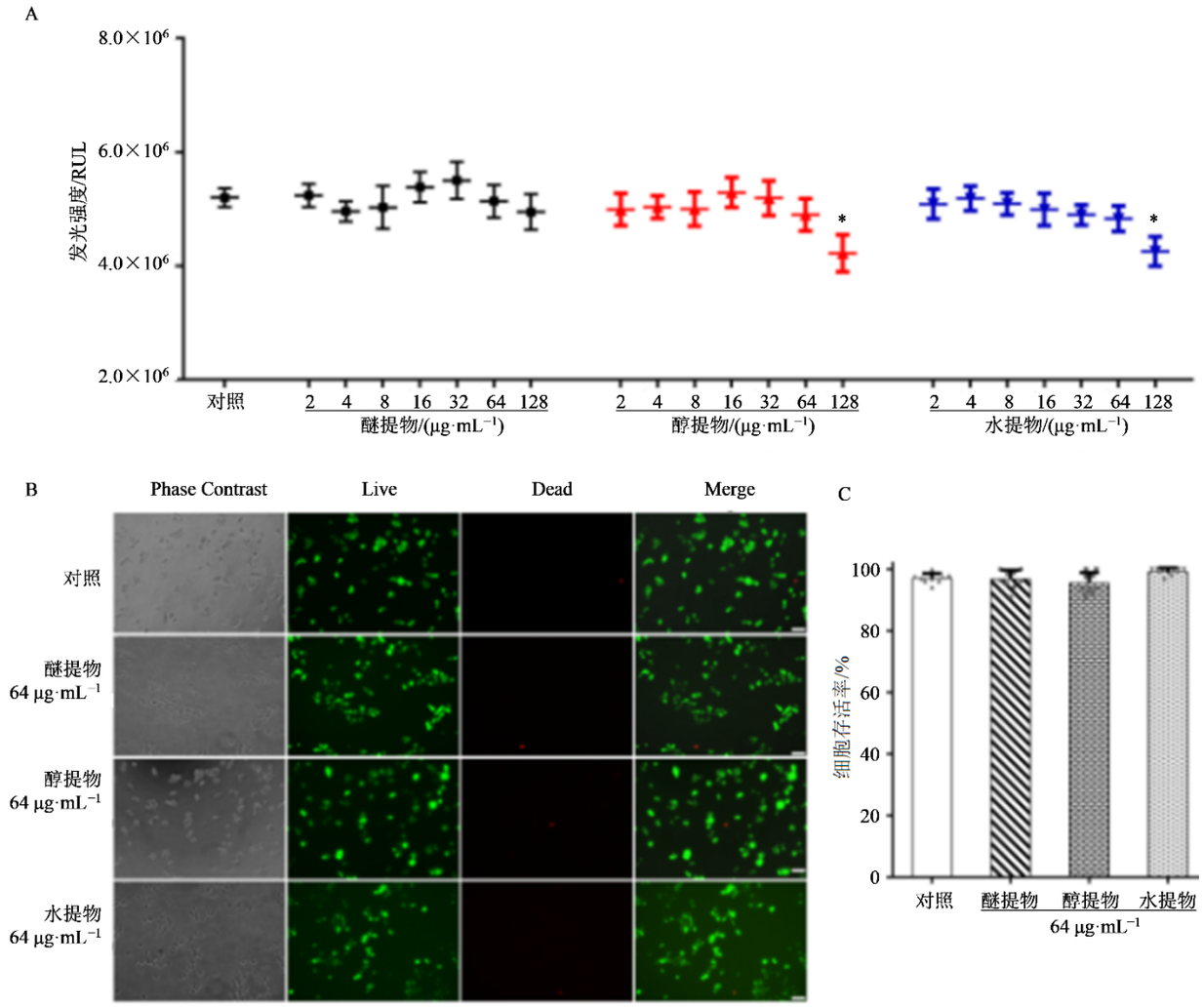
抗炎活性测定结果表明，蛤蚧定喘丸的抗炎活性物质主要存在于醇提物中，对醇提物进行化学成分鉴定有助于了解蛤蚧定喘丸的抗炎物质基础与抗炎机制。进一步采用UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS技术对蛤蚧定喘丸醇提物进行物质分析，典型图谱见图3。

根据二级质谱碎片结构、相对分子质量和mzCloud数据库，共鉴别出36种主要物质，见表2。

3.4 蛤蚧定喘丸抗炎机制的探索

表2中鉴定得出的36种化学物质中，已报道具有抗炎功效的化学物质有9种，见表3。

针对表3所列抗炎活性物质与抗炎机制，利用Western blotting验证这些物质发挥抗炎功效时所涉



A-醚提物、醇提物、水提物对RAW264.7细胞活力的影响，与对照组比较：$^{*}P<0.05$；B-64 μg·mL^{-1}的醚提物、醇提物、水提物对细胞活性的影响（Calcein/PI，×200），图中标尺为50 μm；C-Calcein/PI染色中活细胞率统计

A-effects of ether extract, alcohol extract, and water extract on RAW264.7 cell viability, $^{*}P < 0.05$ *vs* control group; B-effects of 64 μg·mL^{-1} ether extract, alcohol extract, and water extract on cell viability (Calcein/PI, ×200), scale in the figure was 50 μm; C-statistics of live cell rate in Calcein/PI staining

图1　各提取物对RAW264.7细胞活性的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig. 1　Effect of different extracts on RAW264.7 cell activity ($\bar{x}\pm s$, n=4)

及的通路蛋白是否发生了变化，从而推测蛤蚧定喘丸的抗炎机制与抗炎活性物质。

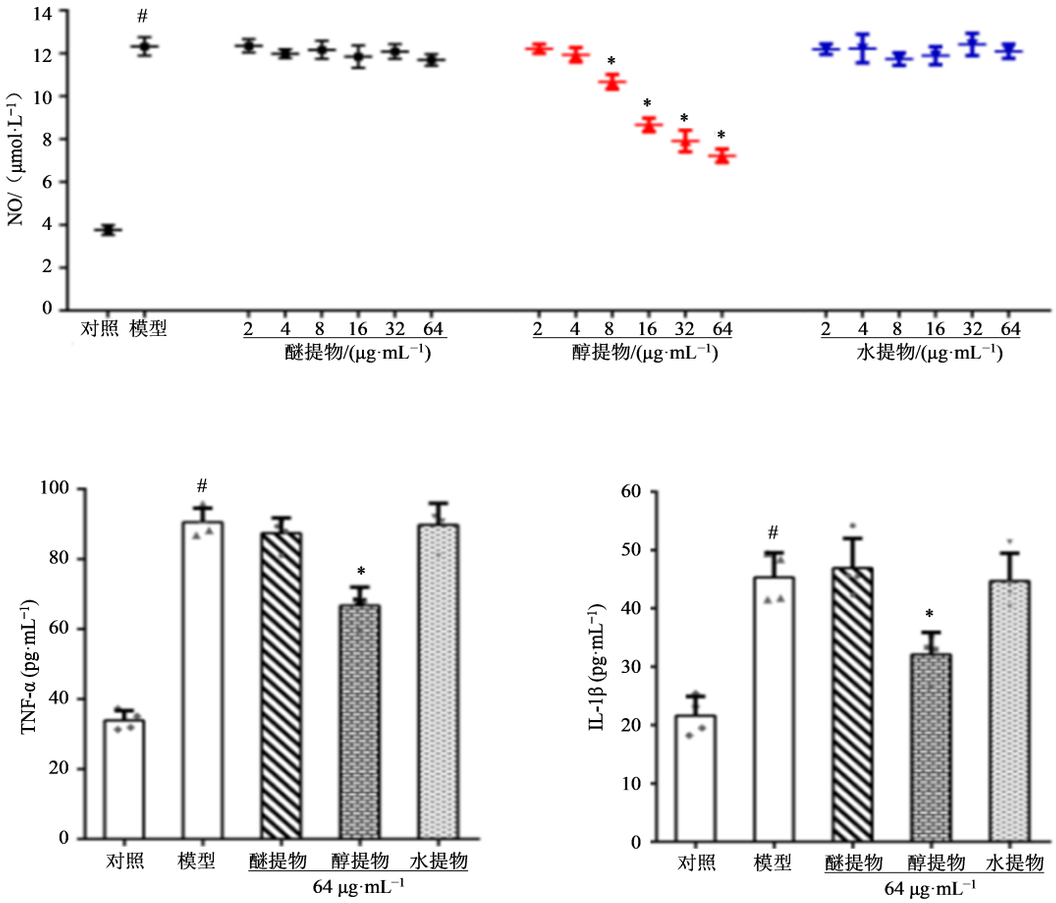
3.4.1　蛤蚧定喘丸醇提物对NF-κB通路蛋白磷酸化的影响　与对照组比较，模型组的TLR4、TRIF、p-IκBα蛋白表达量均明显增加（$P<0.05$）；而与模型组相比，蛤蚧定喘丸醇提物的加入导致TRIF、p-IκBα蛋白表达量明显下降（$P<0.05$），但未对TLR4蛋白表达量产生显著影响。见图4。

3.4.2　蛤蚧定喘丸醇提物对NLRP3炎症小体活化的影响　与对照组比较，模型组的NLRP3、Caspase-1蛋白表达量明显增加（$P<0.05$），TXNIP蛋白表达量未发生明显变化；而与模型组相比，蛤蚧定喘丸醇提物的加入导致NLRP3、Caspase-1蛋白表达量明显下降（$P<0.05$），同时未对TXNIP蛋白表达量产生显著影响。见图5。

3.4.3　蛤蚧定喘丸醇提物对MCP-1与iNOS蛋白表达的影响　与对照组相比，模型组的MCP-1与iNOS蛋白表达显著提高（$P<0.05$）；而与模型组相比，蛤蚧定喘丸醇提物的加入可显著降低MCP-1与iNOS蛋白表达量（$P<0.05$）。见图6。

3.4.4　蛤蚧定喘丸醇提物对MAPK通路蛋白磷酸化的影响　与对照组比较，模型组的P38、ERK、JNK蛋白磷酸化均有明显提高（$P<0.05$）；但与模型组相比，蛤蚧定喘丸醇提物的加入并未对P38、ERK、JNK蛋白的磷酸化产生显著影响。见图7。

3.4.5　蛤蚧定喘丸抗炎机制与抗炎活性物质的推



与对照组比较：#P<0.05；与模型组比较：*P<0.05

#P < 0.05 *vs* control group; *P < 0.05 *vs* model group

图2 各提取物的抗炎活性（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig. 2 Anti-inflammatory activity of different extracts ($\bar{x}\pm s$, n=4)

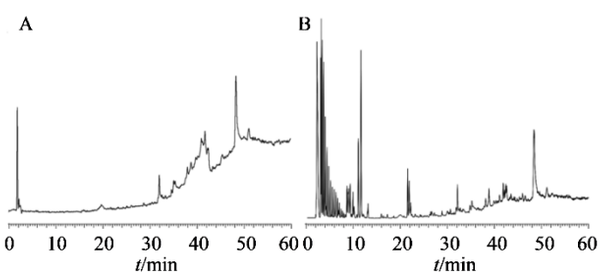


图3 空白溶剂（A）、蛤蚧定喘丸醇提物（B）总离子流图

Fig. 3 Total ion current diagram of blank solvent (A) and alcohol extract from Gejie Dingchuan Pill (B)

理 对表3和图4～7的结果进行汇总，汇集蛤蚧定喘丸抗炎涉及的信号通路与活性物质，见图8。

4 讨论

蛤蚧定喘丸由14味药材组成，化学成分复杂，单独利用某一溶剂进行提取，提取物成分过多导致难以进行有效分离和鉴别。因此本研究依次采用石油醚、无水乙醇、纯水对蛤蚧定喘丸的不同极性成分进行分离提取，通过比较不同提取物对RAW264.7细胞炎症模型的抗炎作用，发现只有醇提物拥有较好的抗炎效果，因此对醇提物进行化学成分分析，探索蛤蚧定喘丸抗炎活性的物质基础。

色谱-质谱联用技术可实现复杂体系中不同化合物的分离与鉴定[19]，本研究利用UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS对蛤蚧定喘丸醇提物化学成分进行表征，发现正离子模式下鉴别出的化合物种类多于负离子模式，而且正离子模式下主要活性物质生物碱类化学成分的响应大于负离子模式，这与其他研究者的结果相吻合[20]，因此本研究主要对正离子模式下采集的数据进行了分析。分析结果表明醇提物中具有抗炎功效的主要化合物有9种，作用机制分别涉及NLRP3炎症小体、TRIF、iNOS、p-IκBα、TXNIP、MCP-1、TLR4及MAPK信号通路蛋白。经Western blotting实验对上述蛋白的表达量进行对比，发现蛤蚧定喘丸醇提物对RAW264.7细胞炎症模型内NLRP3炎症小体、TRIF、iNOS、MCP-1及p-IκBα均有显著性影响，而对TXNIP、TLR4及MAPK

表2 蛤蚧定喘丸醇提物的化学成分鉴定

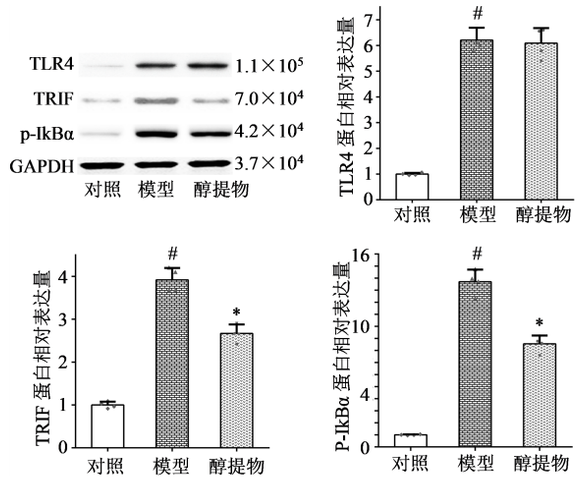
Table 2 Chemical components of ethanol extract from Gejie Dingchuan Pill

编号	化合物名称	分子式	*m/z*	编号	化合物名称	分子式	*m/z*
1	小檗碱	$C_{20}H_{17}NO_4$	335.115 8	26	5,7-dihydroxy-2-phenyl-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-8-(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)-4*H*-chromen-4-one	$C_{26}H_{28}O_{13}$	548.153 5
2	巴马汀	$C_{21}H_{21}NO_4$	351.147 2				
3	*L*-缬氨酸	$C_5H_{11}NO_2$	117.078 9				
4	药根碱	$C_{20}H_{19}NO_4$	337.131 3				
5	伪麻黄碱	$C_{10}H_{15}NO$	165.115 4				
6	麻黄碱	$C_{10}H_{15}NO$	165.115 4	27	苦杏仁苷	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	474.185 4
7	德卡林碱	$C_{19}H_{13}NO_4$	319.084 5	28	7-hydroxy-2-(4-{[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}phenyl)-3,4-dihydro-2*H*-1-benzopyran-4-one	$C_{21}H_{22}O_9$	418.126 4
8	芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷	$C_{21}H_{18}O_{11}$	446.084 7				
9	汉黄芩苷	$C_{22}H_{20}O_{11}$	460.100 7				
10	木兰花碱	$C_{20}H_{23}NO_4$	341.162 9				
11	小檗红碱	$C_{19}H_{15}NO_4$	321.100 2				
12	*N*-甲基麻黄碱	$C_{11}H_{17}NO$	179.131 0	29	5,7-dihydroxy-2-phenyl-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-8-(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)-4*H*-chromen-4-one	$C_{26}H_{28}O_{13}$	548.153 5
13	染料木素	$C_{15}H_{10}O_5$	270.052 9				
14	*L*-脯氨酸	$C_5H_9NO_2$	115.063 5				
15	石黄酮	$C_{16}H_{12}O_5$	284.068 6				
16	甘草素	$C_{15}H_{12}O_4$	256.073 5				
17	龙胆酸-5-*O*-葡萄糖苷	$C_{13}H_{16}O_9$	333.100 2	30	甘草查尔酮	$C_{21}H_{22}O_4$	338.152 1
18	甘草西定	$C_{26}H_{32}O_5$	424.224 8	31	*N*-甲基麻黄碱	$C_{11}H_{17}NO$	179.131 0
19	5-羟甲基糠醛	$C_6H_6O_3$	126.031 7	32	9-羟基-10,12-十八碳二烯酸	$C_{18}H_{32}O_3$	278.224 7
20	*N*-甲基麻黄碱	$C_{11}H_{17}NO$	179.131 0	33	芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷	$C_{21}H_{18}O_{11}$	446.085 0
21	13-羟基十八碳二烯酸	$C_{18}H_{32}O_3$	278.224 8	34	苦参黄酮	$C_{20}H_{16}O_6$	352.095 0
22	紫花牡荆素	$C_{19}H_{18}O_8$	374.100 4	35	黄芩素	$C_{15}H_{10}O_6$	286.047 6
23	甘草香豆素	$C_{21}H_{20}O_6$	368.126 3	36	(2*Z*)-6-hydroxy-2-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-one	$C_{16}H_{12}O_5$	284.068 6
24	氧海罂粟碱	$C_{20}H_{17}NO_5$	351.111 1				
25	2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,8-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-4*H*-chromen-4-one	$C_{25}H_{26}O_6$	422.173 3				

表3 蛤蚧定喘丸醇提物中抗炎活性物质汇总

Table 3 Summary of anti-inflammatory active substances in ethanol extract from Gejie Dingchuan Pill

编号	化合物名称	抗炎机制
1	小檗碱	与丝氨酸/苏氨酸激酶NEK7结合，抑制NLRP3炎性小体的组装[9]
2	巴马汀	下调TRIF表达，进而抑制NF-κB炎症通路的活化[10]
3	药根碱	抑制iNOS的合成，抑制炎症反应[11]
4	麻黄碱、伪麻黄碱	抑制IκBα磷酸化，保持胞质中IκBα持续抑制NF-κB进入胞核，进而抑制NF-κB炎症通路的活化[12]
5	汉黄芩苷	抑制TXNIP的表达，抑制炎症反应[13]
6	小檗红碱	抑制MCP-1的表达，进而抑制炎症反应[14]
7	木兰花碱	抑制TLR4的表达，进而抑制NF-κB炎症通路的活化；抑制p-JNK、p-ERK、p-P38等MAPK信号通路蛋白表达，抑制炎症反应[15]
8	染料木素	抑制NF-κB炎症通路的活化，同时抑制MAPK信号通路，从而抑制炎症反应[16-17]
9	甘草素	降低炎症小体NLRP3蛋白表达，进而抑制炎症反应[18]

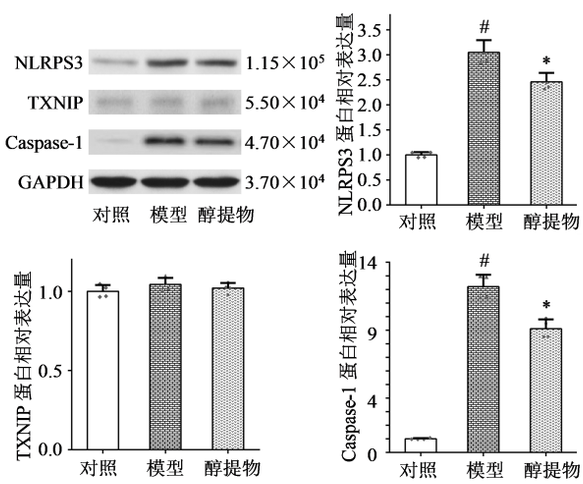


与对照组比较：#P<0.05；与LPS组比较：*P<0.05

#P < 0.05 *vs* control group; *P < 0.05 *vs* LPS group

图4 蛤蚧定喘丸醇提物对NF-κB通路蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig. 4 Effect of ethanol extract from Gejie Dingchuan Pill on expression of NF-κB pathway protein ($\bar{x}\pm s$, n=4)



与对照组比较：#P<0.05；与LPS组比较：*P<0.05

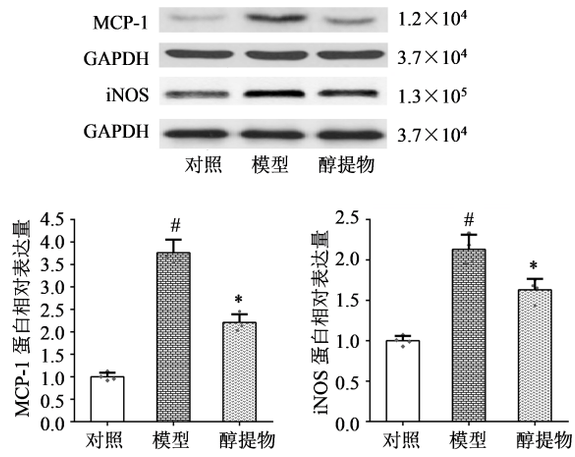
#P < 0.05 *vs* control group; *P < 0.05 *vs* LPS group

图5 蛤蚧定喘丸醇提物对NLRP3通路蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig. 5 Effect of ethanol extract from Gejie Dingchuan Pill on expression of NLRP3 pathway protein ($\bar{x}\pm s$, n=4)

信号通路蛋白的影响并不显著，由此推测蛤蚧定喘丸发挥抗炎功效的作用机制是一个复杂的多通路协同机制。

TLR4/NF-κB信号通路在炎症反应中发挥着重要作用，而TRIF蛋白在TLR4/NF-κB信号通路中担任信使作用，LPS活化TLR4后，TLR4需要募集接头蛋白TRIF方能活化NF-κB[21]；同时，NF-κB蛋白在活化前以二聚体的形态与IκBα蛋白相结合，活化时也需要IκBα蛋白磷酸化为p-IκBα并被降解，NF-

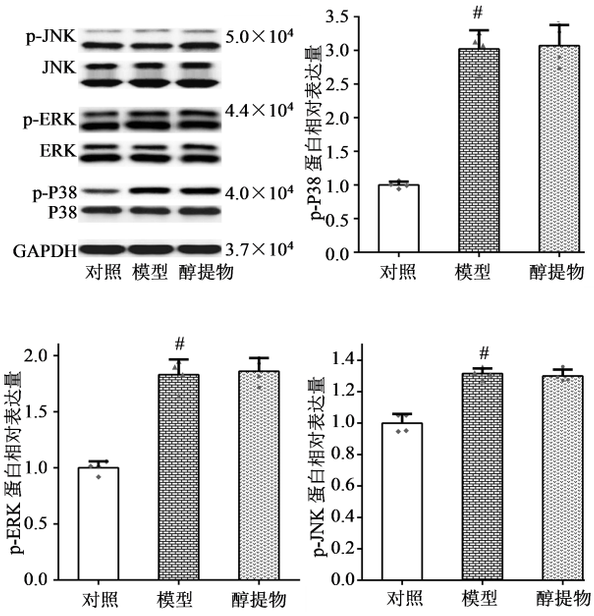


与对照组比较：#P<0.05；与LPS组比较：*P<0.05

#P < 0.05 *vs* control group; *P < 0.05 *vs* LPS group

图6 蛤蚧定喘丸醇提物对MCP-1与iNOS蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig. 6 Effect of ethanol extract from Gejie Dingchuan Pill on expression of MCP-1 and iNOS protein ($\bar{x}\pm s$, n=4)



与对照组比较：#P<0.05；与LPS组比较：*P<0.05

#P < 0.05 *vs* control group; *P < 0.05 *vs* LPS group

图7 醇提物对MAPK通路蛋白磷酸化的影响（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig. 7 Effect of ethanol extract on MAPK pathway protein phosphorylation ($\bar{x}\pm s$, n=4)

κB二聚体才能释放并发挥功效[22]。蛤蚧定喘丸醇提物可显著降低RAW264.7细胞炎症模型内TRIF蛋白、p-IκBα蛋白的表达，这说明蛤蚧定喘丸在发挥抗炎功效时涉及到下调NF-κB通路。对比蛤蚧定喘丸醇提物中9种抗炎活性物质（表3），下调TRIF蛋白表达是巴马汀的抗炎机制，抑制IκBα磷酸化是麻黄碱、伪麻黄碱的抗炎机制，由此推测蛤蚧定喘丸中的巴马汀与麻黄碱、伪麻黄碱是蛤蚧定

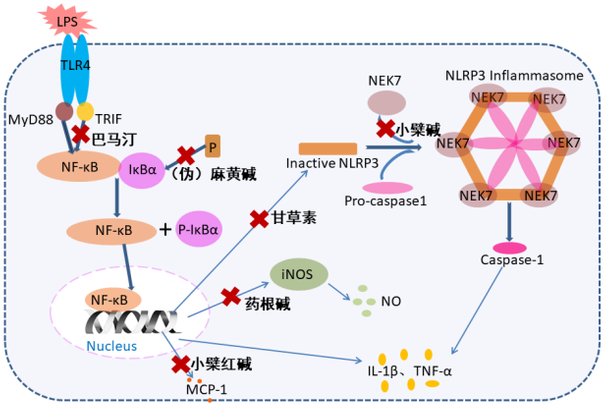


图8　蛤蚧定喘丸抗炎机制推测

Fig. 8　Presumption on anti-inflammatory mechanism of Gejie Dingchuan Pill

喘丸发挥抗炎功效的重要活性物质。另外，蛤蚧定喘丸醇提物并未影响RAW264.7细胞炎症模型内TLR4蛋白的表达，而木兰花碱发挥抗炎功效时是通过抑制TLR4蛋白表达发挥作用，这说明木兰花碱虽然是蛤蚧定喘丸内含有的一种抗炎物质，但在蛤蚧定喘丸抗炎功效中可能并未发挥关键作用。

NLRP3炎症小体同样在炎症反应中发挥着关键的调控作用，NLRP3炎症小体活化时需经过初始化和激活组装两个步骤，其中初始化步骤是通过NF-κB通路或者TXNIP等蛋白激活，激活组装步骤是通过NLRP3蛋白与NEK等蛋白聚集并招募Pro-caspase1，最终形成活化的Caspase-1，促使IL-1β等炎症因子的活化[23]。而蛤蚧定喘丸醇提物可显著降低RAW264.7细胞炎症模型内NLRP3蛋白与Caspase-1的表达，这说明蛤蚧定喘丸在发挥抗炎功效时涉及抑制NLRP3炎症小体的活化。结合蛤蚧定喘丸醇提物中抗炎活性物质（表3），下调NLRP3蛋白表达是甘草素的抗炎机制，抑制NLRP3炎症小体的组装是小檗碱的抗炎机制，推测蛤蚧定喘丸中的甘草素与小檗碱是蛤蚧定喘丸发挥抗炎功效的重要活性物质。另外，虽然蛤蚧定喘丸醇提物中含有汉黄芩苷，汉黄芩苷也是一种可通过抑制TXNIP蛋白表达发挥抗炎功效的活性物质，但RAW264.7细胞炎症模型内TXNIP蛋白的表达并未受影响，这说明汉黄芩苷在蛤蚧定喘丸抗炎功效中可能未发生关键作用。

iNOS在炎症过程中可诱导产生过量的NO并引发炎症级联反应[24]，MCP-1是一种可介导炎性反应的炎性因子[25]，两者都可导致炎症反应的放大。而蛤蚧定喘丸醇提物可显著降低RAW264.7巨噬细胞炎症模型内iNOS与MCP-1的表达，这说明蛤蚧定喘丸在发挥抗炎功效时涉及抑制iNOS和MCP-1的合成。结合蛤蚧定喘丸醇提物中抗炎活性物质（表3），抑制iNOS合成是药根碱的抗炎机制，抑制MCP-1合成是小檗红碱的抗炎机制，推测蛤蚧定喘丸中的药根碱与小檗红碱也是蛤蚧定喘丸发挥抗炎功效的重要活性物质。

MAPK信号通路是一个级联磷酸化的过程，可介导炎症反应和细胞因子的生成，在LPS诱导的炎症反应中，MAPK家族的JNK、ERK、P38 3个亚族均可被活化（磷酸化），磷酸化水平可反应MAPK信号通路的活化强度[26]。然而，RAW264.7细胞炎症模型内JNK、ERK、P38 3种蛋白的磷酸化均未受到蛤蚧定喘丸提取物的影响，这说明蛤蚧定喘丸并未通过MAPK通路发挥抗炎功效，但木兰花碱、染料木素在发挥抗炎功效时是通过抑制MAPK通路蛋白磷酸化发挥抗炎功效（见表3），这说明木兰花碱、染料木素在蛤蚧定喘丸发挥抗炎功效的过程中可能未发挥关键作用。

然而，中药成分复杂，所涉及的各信号通路蛋白之间也存在着相互影响，例如NF-κB通路被抑制也会导致NLRP3炎症小体的初始化受阻，通过NLRP3蛋白和Caspase-1表达被抑制推测甘草素与小檗碱在直接发挥功效并不准确，也可能是巴马汀与麻黄碱、伪麻黄碱通过抑制NF-κB通路间接发挥功效。同理，iNOS和MCP-1的合成被抑制也不一定是药根碱与小檗红碱的功效，可能是其他物质通过影响NF-κB和NLRP3炎症小体发挥的间接作用。但是，可以利用排除法，将确定未发挥作用的物质排除，在剩余物质中筛选抗炎机制与本实验中蛋白表达结果相吻合的物质，推测为关键活性物质。

本研究利用蛤蚧定喘丸的不同极性提取物刺激细胞炎症模型，只有醇提物有明显的抗炎活性，将醚提物和水提物中所含有的物质排除在抗炎关键活性物质之外；利用UHPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS技术对醇提物进行鉴定，36种化学成分中只有9种被报道过拥有抗炎活性，将其余27种物质排除在抗炎关键活性物质之外；在这9种物质中，由于细胞炎症模型中的TXNIP、TLR4蛋白表达和MAPK通路蛋白磷酸化均未受到影响，可将汉黄芩苷、木兰花碱与染料木素排除在抗炎关键活性物质之外；剩余的巴马汀、麻黄碱、伪麻黄碱、小檗碱、甘草素、药根碱、小檗红碱均可能是蛤蚧定喘丸发挥抗炎活性的关键活性物质，分别通过抑制NF-κB炎症通路的活化、抑制NLRP3炎性小体的激活、抑制iNOS和

MCP-1的合成发挥功效。

蛤蚧定喘丸表现出了明显的抗炎功效，该作用主要通过抑制TRIF/p-IκBα/NF-κB/NLRP3信号通路以及iNOS、MCP-1的合成来介导，推测抗炎关键活性物质为巴马汀、麻黄碱、伪麻黄碱、小檗碱、甘草素、药根碱及小檗红碱。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张丹参. 中药有效成分的作用机制和物质基础 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 656-656.
Zhang D S. The mechanism of action and material basis of effective components of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2019, 33(9): 656-656.

[2] 杜冠华. 继承发展 融汇贯通 科学创新 服务人民 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(5): 659-661.
Du G H. Inherit, develop, integrate, connect, innovate and serve the people [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2015, 29(5): 659-661.

[3] 杨波, 何文跃, 杨幸巧. 蛤蚧定喘丸抗炎作用的物质基础研究 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(10): 2479-2481, I0025.
Yang B, He W Y, Yang X Q. Research on substantial foundation of Gejie Dingchuan Wan anti inflammation function [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2015, 33(10): 2479-2481, I0025.

[4] 蔡宏伟. 我国中药材种植存在的问题及对策 [J]. 医学与社会, 2016, 29(3): 41-44.
Cai H W. Problems and countermeasures in the cultivation of traditional Chinese medicine in China [J]. Med Soc, 2016, 29(3): 41-44.

[5] 李倩, 罗祖良, 杨小丽, 等. 中药质量控制方法研究述评 [J]. 中医学报, 2012, 27(4): 448-451.
Li Q, Luo Z L, Yang X L, et al. Review of research on quality control methods of traditional Chinese medicine [J]. J Tradit Chin Med, 2012, 27(4): 448-451.

[6] 郭虹, 蒲位凌, 周昆, 等. 中成药抑制巨噬细胞炎性细胞因子释放的体外研究 [J]. 天津中医药, 2020, 37(10): 1104-1108.
Guo H, Pu W L, Zhou K, et al. Study of the effect of marketed Chinese patent medicine on inhibiting release of inflammatory factors in macrophage models [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2020, 37(10): 1104-1108.

[7] 张静娴, 胡青, 于泓, 等. HILIC/ESI-Orbitrap HRMS法结合Compound Discoverer软件快速智能化鉴定瓜蒌皮注射液中的化学成分 [J]. 药学学报, 2018, 53(10): 1705-1712.
Zhang J X, Hu Q, Yu H, et al. Rapid and intelligentized identification of the constituents in Gualoupi injection by HILIC/ESI-Orbitrap HRMS combined with Compound Discoverer software [J]. Act Pharmac Sin, 2018, 53(10): 1705-1712.

[8] 李思媛, 崔玉顺, 李新星, 等. 黄精皂苷对脂多糖诱导RAW 264.7细胞炎症模型的抗炎作用及其机制 [J]. 中成药, 2021, 43(10): 2659-2665.
Li S Y, Cui Y S, Li X X, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of *Polygonati Rhizoma* saponins on inflammation model of LPS-induced RAW 264.7 cells [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(10): 2659-2665.

[9] Zeng Q X, Deng H B, Li Y H, et al. Berberine directly targets the NEK7 protein to block the NEK7-NLRP3 interaction and exert anti-inflammatory activity [J]. J Med Chem, 2021, 64(1): 768-781.

[10] Yan B Q, Wang D S, Dong S W, et al. Palmatine inhibits TRIF-dependent NF-κB pathway against inflammation induced by LPS in goat endometrial epithelial cells [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 45: 194-200.

[11] Cho Y J. Anti-inflammatory effect of jatrorrhizine from *Phellodendron amurense* in lipopolysaccharide-stimulated Raw264.7 cells [J]. J Appl Biol Chem, 2011, 54(2): 114-119.

[12] Wu Z P, Kong X L, Zhang T, et al. Pseudoephedrine/ephedrine shows potent anti-inflammatory activity against TNF-α-mediated acute liver failure induced by lipopolysaccharide/*D*-galactosamine [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 724: 112-121.

[13] Liu Q, Zuo R, Wang K, et al. Oroxindin inhibits macrophage NLRP3 inflammasome activation in DSS-induced ulcerative colitis in mice via suppressing TXNIP-dependent NF-κB pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(6): 771-781.

[14] Cui H S, Hayasaka S, Zhang X Y, et al. Effect of berberrubine on interleukin-8 and monocyte chemotactic protein-1 expression in human retinal pigment epithelial cell line [J]. Life Sci, 2006, 79(10): 949-956.

[15] Guo S, Jiang K F, Wu H C, et al. Magnoflorine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing NF-κB and MAPK activation [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 982.

[16] Ji G Y, Yang Q H, Hao J, et al. Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(6): 762-768.

[17] Yu J Y, Ha J Y, Kim K M, et al. Anti-Inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver [J]. Molecules, 2015, 20(7): 13041-

13054.

[18] 杜烨湘, 罗敏, 冯敏, 等. 甘草素通过抗炎发挥对阿尔茨海默病的保护作用 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(4): 327-333.
Du Y X, Luo M, Feng M, et al. The protective effect of liquiritigenin on Alzheimer's disease by inhibiting inflammation response [J]. Immunol J, 2019, 35(4): 327-333.

[19] 韦建乔, 韦波. 高效液相色谱-质谱联用技术在中药研究中的应用进展 [J]. 中国医药科学, 2016, 6(5): 44-46.
Wei J Q, Wei B. Progress in the application of high performance liquid chromatography-mass spectrometry in the study of traditional Chinese medicine [J]. Chin Med Sci, 2016, 6 (5): 44-46.

[20] 王宁宁, 魏冠华, 张智军, 等. 基于UHPLC-QTOF-MS/MS技术的骆驼蓬化学成分分析及其神经保护活性 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1688-1696.
Wang N N, Wei G H, Zhang Z J, et al. Chemical constituents in *Pegannum harmala* based on UHPLC-QTOF-MS/MS and its neuroprotective activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(6): 1688-1696.

[21] 解鸿翔. 信号分子TRIF的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(2): 217-220.
Xie H X. Research progress of signal molecule TRIF [J]. J Cel Mol Immunol, 2012, 28 (2): 217-220.

[22] 邹福兰, 骆娟, 黄蓉, 等. IκBα在NF-κB信号通路中的作用及临床意义 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (3): 138-141.
Zou F L, Luo J, Huang R, et al. Role of IκB in NF-κB signaling transduction and its clinical significance [J]. Chin J Clin Electron Ed, 2014, 8(3): 138-141.

[23] Swanson K V, Deng M, Ting J P Y. The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics [J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(8): 477-489.

[24] 章丹丹, 刘俊, Ferid M, 等. 诱导型一氧化氮合酶与疾病 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(10): 1571-1573, 1577.
Zhang D D, Liu J, Ferid M, et al. Inducible nitric oxide synthase and diseases [J]. Prog Mod Biomed, 2007, 7 (10): 1571-1573, 1577

[25] 毛志敏, 周如丹. MCP-1在炎性反应中的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(6): 964-966.
Mao Z M, Zhou R D. Research progress of MCP-1 in inflammatory reaction [J]. Med Rev, 2013, 19 (6): 964-966.

[26] 姜勇, 龚小卫. MAPK信号转导通路对炎症反应的调控 [J]. 生理学报, 2000, 52(4): 267-271.
Jiang Y, Gong X W. Regulation of inflammatory responses by MAPK sign altransduction path ways [J]. Acta Physiol Sin, 2000, 52(4): 267-271.

[责任编辑 兰新新]