

桑菊饮抗炎活性成分筛选与单体验证

潘梓焯¹, 常念伟¹, 周梦鸽², 段茜茜², 李延美², 姜民^{1*}, 白钢¹

1. 天津中医药大学, 天津 300073

2. 南开大学药学院, 天津市分子药物研究重点实验室, 天津 300071

摘要: **目的** 探究桑菊饮的抗炎活性, 明确其抗炎活性物质基础; 为进一步阐明桑菊饮抗炎作用机制, 建立其质量标准提供依据。 **方法** 采用 UPLC-Q/TOF 技术结合核因子- κ B (NF- κ B) 荧光素酶报告基因检测系统筛选桑菊饮中具有抗炎活性的药效成分, 并选取人支气管上皮细胞 (BEAS-2B), 建立炎症损伤模型, 对咖啡酸、绿原酸、甘草酸、马钱子苷和胡萝卜酸等成分的抗炎活性进行验证。 **结果** 筛选出 16 种具有抑制 NF- κ B 活性的成分, 其中胡萝卜酸、22 β -乙酰基-甘草酸、甘草皂苷 G2 抑制 NF- κ B 活性为首次报道。 **结论** 桑菊饮可以通过抑制 NF- κ B 的表达发挥抗炎作用, 其抗炎活性主要与 16 种单体物质相关。

关键词: 桑菊饮; 抗炎; UPLC-Q/TOF; 核因子- κ B (NF- κ B); 药效物质基础

中图分类号: R284; R284.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)08-1289-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.007

Screening of activity components with anti-inflammation in Sang Ju Yin and verification of monomer

PAN Zi-ye¹, CHANG Nian-wei¹, ZHOU Meng-ge², DUAN Xi-xi², LI Yan-mei², JIANG Min¹, BAI Gang¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300073, China

2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Drug Research, College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Objective To investigate the anti-inflammatory activity of Sang Ju Yin (Mulberry Leaf and Chrysanthemum Decoction), and elucidate its bioactive components on nuclear factor- κ B (NF- κ B) inhibition, and to further clarify the anti-inflammatory mechanism of Sang Ju Yin, so as to provide the basis for establishing its quality standard. **Methods** UPLC-Q/TOF MS coupled with NF- κ B activity luciferase reporter assay system was applied to determine the potential anti-inflammatory components in Sang Ju Yin. And the human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were selected to set up the inflammatory injury model, caffeic acid, chlorogenic acid, glycyrrhizic acid, loganin, and malonic acid in Sang Ju Yin were investigated for their anti-inflammation. **Results** Sixteen components were screened to have the NF- κ B inhibitory effects. Among them, malonic acid, 22 β -acetoxyglycyrrhizic acid, and licorice saponin G2 were first reported to have the NF- κ B inhibitory activity. **Conclusion** Sang Ju Yin contains the potential NF- κ B inhibitors. Sixteen potentially active ingredients are found to have the anti-inflammatory effects as NF- κ B inhibitors.

Key words: Sang Ju Yin; anti-inflammation; UPLC-Q/TOF; NF- κ B; pharmacodynamic material basis

桑菊饮为吴鞠通所创, 首载于《温病条辨》, 由桑叶、菊花、杏仁、连翘、薄荷、苦桔梗、生甘草、芦根 8 味中药组成, 具有辛凉解表、疏风清热、宣肺止咳之功效。传统用于风温初起所致的咳嗽、口微渴、身热不甚、脉浮数等表热轻证^[1], 西医学急性上呼吸道感染、急性支气管炎等疾病均属本方应

用范畴^[2]。本方在现代临床呼吸系统等疾病中应用广泛, 诸多方剂均由本方加减而成。现代药理研究表明, 桑菊饮对免疫系统有较好的调节作用, 具有抗炎、止咳、祛痰、平喘、抑菌等诸多药理活性^[3]。

炎症在急性上呼吸道感染、急性支气管炎中起着关键性的作用。发病过程中炎症因子肿瘤坏死因

收稿日期: 2015-11-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473403)

作者简介: 潘梓焯 (1989—), 女, 硕士在读, 研究方向为复方药物与系统生物学。Tel: (022)23504933 E-mail: nihaopanpan123@163.com

*通信作者 姜民, 男, 博士, 副研究员, 主要从事复方药物与系统生物学研究。Tel: (022)23506930 E-mail: minjiang@nankai.edu.cn

子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-6 (IL-6) 及白细胞介素-8 (IL-8) 均在患者体内显著性升高^[4-5]。核因子- κ B (NF- κ B) 作为多种炎症介质表达所必需的转录调节因子, 在调节免疫、炎症反应具有非常关键的作用^[6-8]。NF- κ B 转录因子调节着大量基因的表达, 例如 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-8 等细胞因子的表达均受其调节^[9]。

根据文献记载, 桑菊饮中 8 味中药均具有较好的抗炎活性。Han 等^[10]通过建立小鼠肺部急性感染模型, 表明菊花给药后能显著降低 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 等炎症因子的表达。目前临床报道芦根可以用来治疗感冒、急慢性支气管炎等呼吸系统疾病。毛伟松^[11]采用芦根贝母汤加减治疗急性支气管炎, 取得较好的治疗效果; 陈福君等^[12]通过巴豆油所致小鼠耳廓肿胀实验, 表明桑叶具有较强的抗炎作用; 周幼龙^[13]采用薄荷大黄汤治疗急性扁桃体炎有较好的疗效; 杏仁具有驱风的功效, 传统上用于治疗胃炎、皮炎等疾病^[14]; 甘草中的成分甘草酸, 桔梗中的成分桔梗皂苷 D^[15], 连翘中的连翘酯苷 A^[16]可以通过抑制 NF- κ B 的表达调控炎症因子的分泌。诸药合用组成的桑菊饮也具有较好的抗炎活性^[3], 但其作为复方联合应用的抗炎物质基础研究未见报道。如能明确其物质基础, 对于科学阐释中药配伍理论, 进一步探讨中医治法均有重要意义。

为了快速准确地筛选出桑菊饮中抗炎活性成分, 本实验使用超高效液相色谱-四级杆/飞行时间质谱 (UPLC-Q/TOF) 结合荧光素酶报告基因检测系统筛选抑制 NF- κ B 活性成分的方法, 从抗炎角度明确桑菊饮药效物质基础, 筛选出 16 种具有 NF- κ B 抑制活性的成分, 其中胡萝卜酸、22 β -乙酰基-甘草酸、甘草皂苷 G2 抑制 NF- κ B 活性为首次报道。

1 材料

1.1 试药

桑叶、菊花、杏仁、连翘、薄荷、桔梗、甘草、芦根购自河北安国中药材批发市场, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为桑 *Morus alba* L. 的干燥叶、菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序、杏仁 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子、连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实、薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq 的干燥地上部分、桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根、芦

苇 *Phragmites communis* Trin. 的干燥根茎。

桑菊饮提取物的制备: 根据《温病条辨》记载, 将桑叶 (7.5 g)、菊花 (3 g)、杏仁 (6 g)、连翘 (5 g)、薄荷 (2.5 g)、桔梗 (6 g)、甘草 (2.5 g)、芦根 (6 g), 加水 2 L, 煮取 1.3 L, 真空泵滤过, 浓缩, 旋蒸得浸膏, 称得浸膏质量为 8.372 7 g, 至于 4 °C 冰箱中保存。

1.2 主要试剂

胰蛋白酶 (Gibco, 美国); TNF- α (Peprotech, 美国); 地塞米松 (Dex, Sigma, 美国); PGL4.32 质粒和内参质粒 Pri-TK (Promega, 美国); 细胞裂解液 (Promega, 美国); 双荧光酶报告基因试剂盒 (Promega, 美国); 脂质体 2000 转染试剂 (PEI, Invitrogen, 美国); 酶联免疫 ELISA 试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司)。

色谱纯甲醇、乙腈 (Fisher, 美国); 色谱纯甲酸 (Acros, 比利时); 亮氨酸-脑啡肽醋酸盐 (Sigma-Aldrich, 美国); 超纯水由 Milli-Q 制备 (Millipore Laboratory, Bedford, 美国)。

对照品咖啡酸 (批号 ABO97C, 质量分数 99.5%)、绿原酸 (批号 AZ001C, 质量分数 98.46%)、甘草酸 (批号 AB291G, 质量分数 98%)、马钱子苷 (批号 200604, 质量分数 98%) 购于天津一方科技公司, 胡萝卜酸 (批号 M813040, 质量分数 99.5%) 购于上海麦格林公司 (中国)。

1.3 实验细胞

人胚肾上皮细胞 293 (HEK 293)、人支气管上皮细胞 (BEAS-2B) 购于美国 Type Culture Collection, Rockville, MD 公司。HEK 293 培养于 DMEM 高糖培养基 (HyClone, 美国), 包含 10% 牛血清白蛋白 (FBS, Gibco, 美国) 和 1% 双抗 (100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素, Gibco, 美国); BEAS-2B 培养于 10% FBS 和 1% 双抗的 RPMI 1640 完全培养基, 均在 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。

1.4 主要仪器

Waters Acquity UPLC-Q/TOF Premier: 配置自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Masslynx 4.1 工作站 (Waters, 美国); 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); Velocity 14R 高速冷冻离心机 (Dynamic, 澳大利亚); Milli-Q 超纯水仪 (MILLIPORE, 美国); DZF-6020 真空干燥箱 (河南予化仪器有限公司); HF151UV CO₂ 细胞培养箱 (上海 Heal Force 公司); XD-101 倒置显微镜 (南京东海光电子股份有限公司); 酶标仪 (美国

Bio-Rad 公司); AB104-N 电子天平 (Mettler Toledo 公司); BIOELLEA Reader ELX800 (Bio-Tek, 美国); Modulus 荧光检测仪 (美国 Turner Designs 公司); 超净工作台 (苏州净化设备有限公司)。

2 方法

2.1 桑菊饮抗炎活性评价

2.1.1 双荧光素酶报告基因质粒瞬时共转染 HEK293 细胞 HEK293 细胞于 96 孔板中培养, 待细胞汇合度在 50%~70% 时与 NF- κ B 荧光素酶报告 PGL4.32 (100 ng/孔) 及内参质粒 Renilla (9.6 ng/孔) 共转染, 转染时使用脂质体 2000 作为辅助转染试剂。将适当比例的质粒和转染试剂置于无 FBS 的培养基中, 混匀后静置 15 min, 以确保质粒与转染试剂充分结合。最后将转染液加入预培养的细胞 96 孔板中, 于 CO₂ 培养箱中共孵育 24 h 以上。

2.1.2 细胞实验分组及给药 细胞实验分为 6 组, 分别为空白组, 模型组, 阳性药地塞米松组, 桑菊饮高、中、低剂量 (1、0.1、0.01 mg/mL) 组。细胞各组预给药 6 h, 阳性药组给予 1×10^{-5} mol/L 的地塞米松; 空白组、模型组给予新鲜培养基, 加入 TNF- α (终质量浓度为 10 ng/mL) 造模 6 h, 收集的裂解液用于 NF- κ B 荧光检验。

2.1.3 NF- κ B 双荧光素酶报告基因活性检测 给药完成后, 弃去细胞培养液, 用 PBS (100 μ L/孔) 洗涤细胞 2 次, 弃去 PBS 液, 加入配制好的细胞裂解液 (20 μ L/孔), 室温振荡 30 min 后, 每孔吸出 15 μ L 细胞裂解液用于 NF- κ B 双荧光素酶报告基因活性检测。

向 15 μ L 细胞裂解液中加入 20 μ L NF- κ B 荧光素酶报告基因质粒 pGL4.32 (100 ng/孔) 检测试剂, 轻轻混匀后, 检测 NF- κ B 荧光值 (Modulus 荧光检测仪), 再加入 20 μ L 内参荧光素酶检测试剂, 轻轻混匀后, 检测 Renilla 荧光值。按公式计算 NF- κ B 荧光素酶活性, 以相对荧光比率表示 NF- κ B 抑制率。

相对荧光比率 = NF- κ B 荧光值 / Renilla 荧光值

2.2 桑菊饮抗炎活性成分的筛选

2.2.1 UPLC 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.4 mL/min; PDA 检测 190~400 nm 扫描; 进样量 2.0 μ L; 流动相: 乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B); 二元梯度洗脱条件: 0~2 min, 2% A; 2~20 min, 2%~20% A; 20~40 min, 20%~40% A; 40~44 min, 40%~85% A; 44~45 min, 85%~2% A。

2.2.2 Q-TOF 质谱条件 使用正、负离子 2 种模式

扫描测定, 仪器参数如下: 电喷雾离子源 (ESI); V 模式; 毛细管电压 3.0 kV (正模式), 2.5 kV (负模式); 锥孔电压 30 V; 离子源温度 100 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气温度 350 $^{\circ}$ C; 脱溶剂氮气流量 600 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; 检测器电压 1 900 V; 采样频率 0.1 s; 间隔 0.02 s; 质量数扫描范围 100~1 500; 内参校正液 Lockmass 采用亮氨酸脑啡肽盐 LEA ([M+H]⁺ = 555.293 1; [M-H]⁻ = 553.277 5)。数据采集工作站为 Masslynx 4.1。

2.2.3 UPLC 分段样品的制备 精密称取桑菊饮浸膏 10 mg, 加入 1 mL 纯净水, 配制成 10 mg/mL 水溶液于 1.5 mL EP 管中, 12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液, 用于 UPLC 的馏份收集实验。样品经 UPLC 分离后, 将流出液按每 1 分钟一段收集于 96 深孔板 (规格: 2.2 mL/孔) 中, 50 $^{\circ}$ C 真空干燥, 挥去溶剂, 再向每孔加入 100 μ L 细胞培养基复溶, 放于振荡器中振荡 20 min, 待物质完全溶解后, 加入到预先转染好的细胞中分析每段馏份对 NF- κ B 表达的影响。

2.2.4 抗炎活性物质结构鉴定方法 通过分析 Q-TOF 提供的一级、二级质谱信息并结合文献的方法鉴定具有抗炎活性的化合物。经正、负模式下的一级质谱分析, 得到化合物的准分子离子峰信息。通过精确质量数推断化合物的相对分子质量和元素组成。通过二级碎片信息, 推断化合物的裂解规律, 通过查阅大量文献以及数据库搜索, 如 chemspider, 将裂解信息与文献或数据库中数据库进行比对, 再参考化合物的紫外吸收和相对保留时间等信息, 确定相关活性化合物的结构信息。

2.2.5 数据标准化处理方法 采用 SPSS13.0 软件进行数据统计, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

2.3 单体验证

2.3.1 双荧光素酶报告系统验证 NF- κ B 抑制活性 将咖啡酸、绿原酸、甘草酸、马钱子苷对照品用 HEK293 细胞培养基稀释成 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} mol/L 进行细胞验证。操作方法同“2.1”项。

2.3.2 BEAS-2B 细胞炎症因子 IL-6 和 IL-8 水平测定 将 BEAS-2B 细胞培养于 96 孔板中 24 h, 完全贴壁后, 细胞各组 (将咖啡酸、绿原酸、甘草酸、马钱子苷和胡萝卜酸对照品用细胞培养基稀释成 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} mol/L 进行细胞验证) 预给药 6 h 后, 用 TNF- α (终质量浓度为 10 ng/mL) 刺激 6 h 后收集上清, 测定 IL-6、IL-8 水平。

3 结果

3.1 桑菊饮在细胞水平的抗炎活性评价

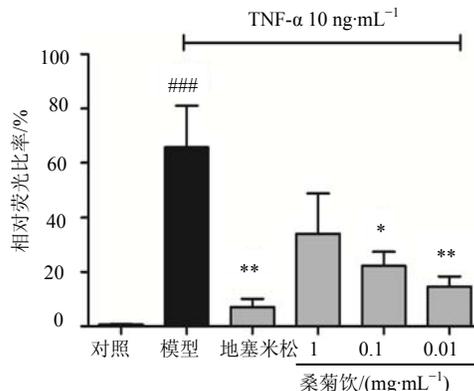
由图 1 可见, TNF- α 刺激后, 模型组 NF- κ B 的表达与对照组比较显著升高 ($P < 0.001$), 而与模型组相比, 阳性药组 NF- κ B 的表达明显降低 ($P < 0.01$)。桑菊饮各剂量组均可降低 NF- κ B 表达, 且具有剂量依赖性。

3.2 桑菊饮抗炎活性成分的筛选

3.2.1 桑菊饮分段样品对 NF- κ B 表达的影响 本实验通过 UPLC/Q-TOF-MS 的方法得到了桑菊饮的离子流图, 紫外图及正、负离子流图分别见图 2-A~C。对桑菊饮 45 段馏份进行细胞活性筛选分析, 发现其中 16 种样品 (其中 9 号峰由 2 个化合物组成) 具有抑制 NF- κ B 活性 (图 2-D)。

3.2.2 桑菊饮抗炎活性成分鉴定 按照“2.2.4”项方法对细胞实验筛选出的 16 种样品中包含的对

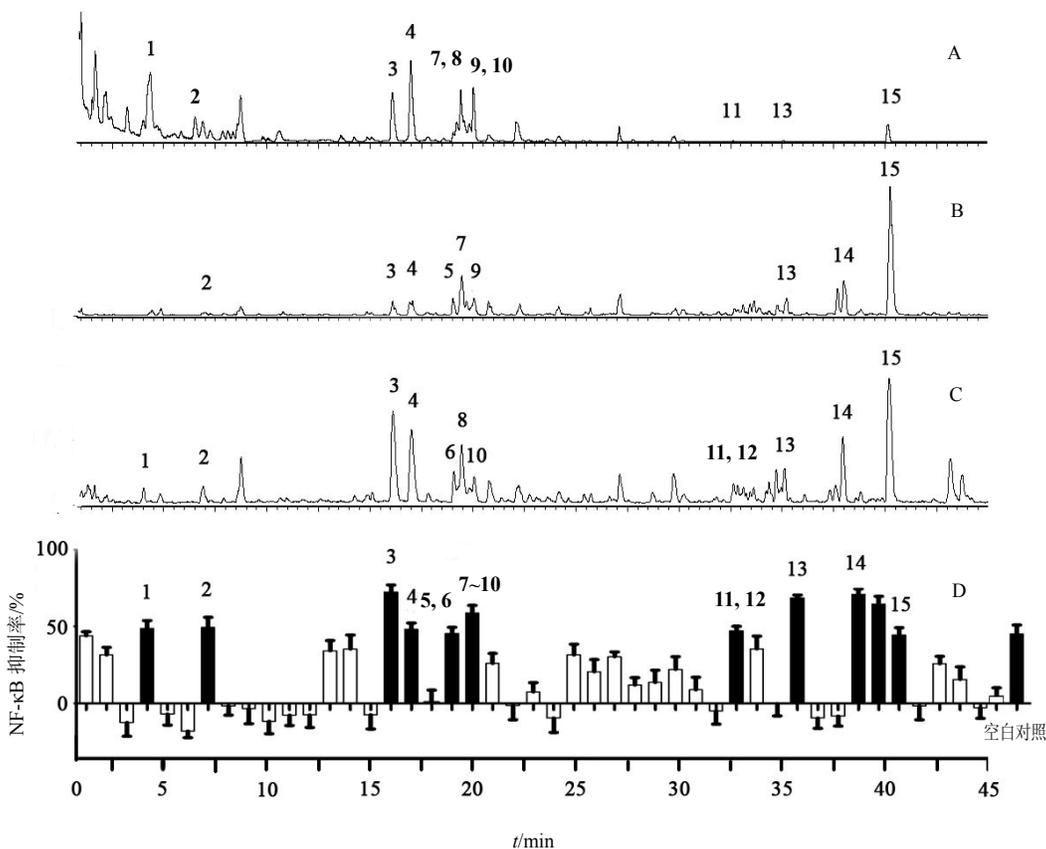
NF- κ B 具有显著抑制活性成分进行结构鉴定。鉴定结果见表 1, 结构见图 3。经质谱信息分析, 文献检



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 1 桑菊饮对 NF- κ B 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibition of Sang Ju Yin on NF- κ B levels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-紫外图 B-负离子模式离子流图 C-正离子模式离子流图 D-NF- κ B 抑制率活性图, 黑色柱为有效馏份, 上面的数字所对应的化合物的信息见表 1

A-UV chromatogram B-BPI chromatogram in negative mode C-BPI chromatogram in positive mode D-bioactivity chromatogram of inhibitory rate on NF- κ B, Black columns represent active ingredients, the peak numbers are consistent with those in Table 1

图 2 UPLC-Q/TOF 结合荧光素酶报告基因检测系统筛选桑菊饮中抑制 NF- κ B 活性的单体成分 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Screening on inhibitory activity of NF- κ B in Sang Ju Yin using UPLC-Q/TOF coupled with luciferase reporter assay system ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 1 桑菊饮样品中抗炎活性成分结构信息

Table 1 Information of bioactive compounds with anti-inflammation in SangJu Yin

峰号	t_R /min	活性成分	离子模式	m/z	MS/MS	化学式	来源
1	4.02	胡萝卜素	负	204.027 0	203 [M-H] ⁻ , 185 [M-H ₂ O-H] ⁻ , 249 [M+HCOOH-H] ⁻	C ₇ H ₈ O ₇	菊花
2	6.93	绿原酸	负	354.095 1	353 [M-H] ⁻ , 191 [M-caffeoyl-H] ⁻ , 399 [M+HCOOH-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	菊花
3	16.09	甘草苷	负	418.126 4	417 [M-H] ⁻ , 255 [M-Glu-H] ⁻ , 835 [2M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	甘草
4	17.02	甘草苷元-4'-芹糖葡萄糖苷	负	550.168 6	549 [M-H] ⁻ , 595 [M+HCOOH-H] ⁻ , 1 099 [2M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	甘草
5	19.01	连翘脂苷 A	负	624.205 4	623 [M-H] ⁻ , 461 [M-Glu-H] ⁻ , 1 247 [2M-H] ⁻	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	连翘
6	19.07	甘草次酸	正	470.339 6	471 [M+H] ⁺ , 325 [M-rhamnose+ H] ⁺ , 163 [M-rhamnose-Glu+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	甘草
7	19.46	异连翘脂苷 A	负	624.205 4	623 [M-H] ⁻ , 461 [M-Glu-H] ⁻ , 124 7 [2M-H] ⁻	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	连翘
8	19.48	连翘脂苷 D	正	478.168 6	479 [M+H] ⁺ , 642 [M+rhamnose] ⁺ , 643 [M+rhamnose+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₃	连翘
9	20.04	(+)-松脂酚-4-O-β-D-葡萄糖苷+ 3,5-二咖啡酰基奎宁酸	负	520.194 5 516.126 8	519 [M-H] ⁻ , 357 [M-Glu-H] ⁻ , 565 [M+HCOOH-H] ⁻ ; 515 [M-H] ⁻ , 353 [M-caffeoyl-H] ⁻ , 191 [M-2caffeoyl-H] ⁻	C ₁₉ H ₃₅ O ₁₆ C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	连翘+ 菊花
10	20.01	L-苯基丙酸氨基断马钱子苷	正	537.221 0	538 [M+H] ⁺ , 357 [M-Glu+H ₂ O] ⁺ , 555 [M+H ₂ O] ⁺	C ₂₆ H ₃₅ NO ₁₁	菊花
11	32.63	刺槐素-7-O-6"-甲基葡萄糖苷	正	532.121 3	533 [M+H] ⁺ , 550 [M+H ₂ O] ⁺ , 285 [M+H-malonylgalactoside] ⁺	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	菊花
12	32.87	桔梗皂苷 D	正	1 224.577 5	1 225 [M+H] ⁺ , 1 242 [M+H ₂ O] ⁺ , 1 063 [M-Glu+H] ⁺	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₈	桔梗
13	35.11	22β-乙酰基-甘草酸	负	880.409 3	879 [M-H] ⁻ , 923 [M+HCOOH- 2H] ⁻ , 938 [M+CH ₃ COOH-2H] ⁻	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	甘草
14	38.00	甘草皂苷 G2	正	838.398 7	839 [M+H] ⁺ , 857 [M+H ₂ O+H] ⁺ , 469 [M-2glucuronic acid] ⁺	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	甘草
15	40.23	甘草酸	正	822.403 8	823 [M+H] ⁺ , 841 [M+H ₂ O+H] ⁺ , 453 [M-2glucuronic acid] ⁺	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	甘草

索及相关书籍《中药原植物化学成分集》等的查阅, 得到这 16 种化合物, 6 个来源于甘草, 4 个来源于连翘, 5 个来源于菊花, 1 个来源于桔梗。

3.3 抗炎活性单体验证

选取咖啡酸、绿原酸、甘草酸、马钱子苷、胡萝卜素按“2.3.1”项方法进行细胞验证。咖啡酸、绿原酸、甘草酸、马钱子苷等成分在浓度 1×10^{-5}

mol/L 时抗炎活性较好已有报道^[17], 实验设计中把 1×10^{-5} mol/L 作为阳性验证的浓度, 来说明双荧光素酶报告系统可以成功地进行植物提取液 NF-κB 的筛选。并且由于活性成分 22β-乙酰基-甘草酸、甘草皂苷 G2、胡萝卜素为首次报道, 故在实验中做了胡萝卜素的梯度验证, 发现胡萝卜素 (1×10^{-5} mol/L) 能够抑制 NF-κB 的表达。由图 4 可见, 5 个化合物

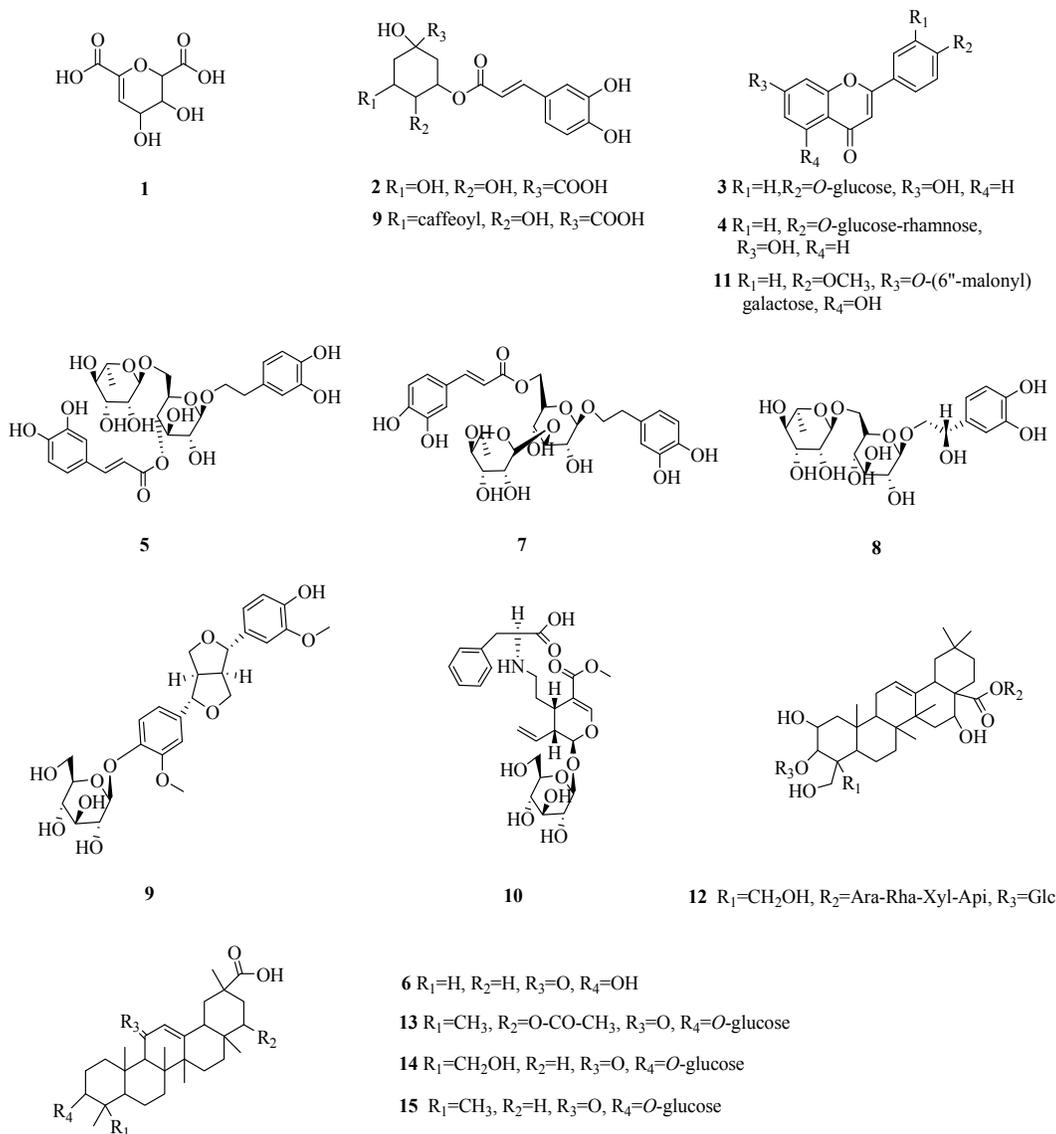


图 3 桑菊饮中活性单体的化学结构

Fig. 3 Chemical structures of active monomers in Sang Ju Yin

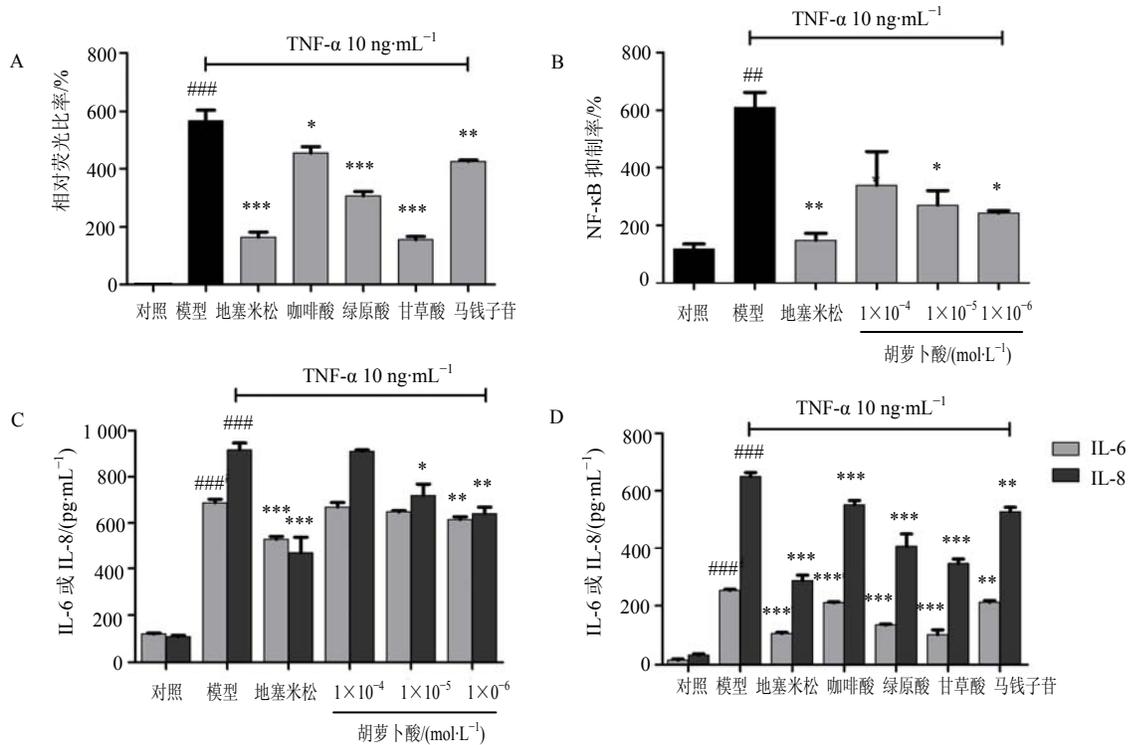
咖啡酸、绿原酸、甘草酸、马钱子苷、胡萝卜酸也可以降低细胞炎症因子 IL-6 和 IL-8 的表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

4 讨论

因为具有低毒、高效的特点，传统中药越来越受到人们的重视，而复方制剂因为多种成分的配伍使用，常常发挥比单味饮片更佳的治疗效果，如文献中记载复方黄连解毒汤，其主要成分包括黄酮和生物碱等，这些主、次成分彼此协同，从而达到比较好的抗炎效果^[18]。但同时中药具有成分复杂，质量可控性差等缺点。简单选取几种药效成分并不能对中药进行有效质量控制。如《中国药典》在菊花的质量控制中，只选取绿原酸，木犀草苷和异绿原酸 A 为指标成

分，但这并不能满足菊花药材质量控制需求^[10]。另一方面阐明桑菊饮的抗炎物质基础，不但能为其建立可靠质量标准提供依据，还有助于下一步了解桑菊饮的抗炎机制，明确药物作用的靶点，而为后续精简复方，去除有害成分，找到具有较少的副作用，更好疗效的抗炎药物做准备。

本实验采用 UPLC/Q-TOF 结合 NF- κ B 双荧光素酶报告基因系统，筛选出桑菊饮中 15 段共 16 种活性成分。其中 5 个活性成分来源于菊花，6 个来源于甘草，4 个来源于连翘，1 个来源于桔梗。绿原酸、甘草酸、桔梗皂苷 D、咖啡酸、马钱子苷、连翘脂苷 A、甘草苷等成分抗炎活性已有报道^[19-21]，胡萝卜酸、22 β -乙酰基-甘草酸、甘草皂苷 G2 等调



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 4 桑菊饮整方及活性成分单体验证 (A 和 B: 双荧光素酶报告系统验证活性单体 NF-κB 的抑制量; C 和 D: 活性单体及桑菊饮整方降低细胞炎症因子 IL-6 和 IL-8 的表达量, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Confirmation of bioactive compounds from holistic Sang Ju Yin and active monomers (A and B: inhibition of NF-κB verified by luciferase reporter assay; C and D: IL-6 and IL-8 expression in TNF-α reduced by holistic Sang Ju Yin, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

控 NF-κB 活性为首次报道。

上皮细胞是气道与外界的屏障,是细菌感染的直接接触部位,更是炎症反应和药物作用的主要位点,在细胞因子及各种免疫调节介质的产生过程中起着十分重要的作用。在本研究中,首先选用人支气管上皮细胞建立炎症模型,在体外细胞水平上评价筛选出的 5 个单体,即咖啡酸、绿原酸、甘草酸、马钱子苷和胡萝卜酸,实验结果显示这 5 个化合物都能够明显抑制 NF-κB 的表达,也可以降低细胞炎症因子 IL-6 和 IL-8 的表达水平,与筛选结果相一致。

通过本实验筛选出桑菊饮中比较好的抗炎活性成分,初步明确了其抗炎物质基础,为进一步阐明其抗炎作用机制提供了条件,也为以后建立其质量标准提供依据。但由于桑菊饮中化学成分复杂,本实验筛选出的一些比较好的活性峰并不是单一成分,如图 2-D 中第 5 个活性柱,经鉴定有效成分有 5、6;第 6 个活性柱,有效成分有 7、8、9、10;第 7 个活性柱,有效成分有 11、12。并且对于复方

中的主、次成分是否存在协同抗炎及这些成分与桑菊饮其他药理活性,比如抗菌、解热、发汗、抑制肠蠕动亢进和增强免疫是否存在联系也需要进一步的研究^[3]。

参考文献

- [1] 苏 扬. 桑菊饮加减治疗支气管炎临床效果评价 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(11): 138-139.
- [2] 曲敬来, 高 雪, 韩 钺, 等. 止嗽散加减治疗甲型季节性流感病毒性支气管炎的临床研究 86 例 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(17): 191-193.
- [3] 张保国, 梁晓夏, 刘庆芳, 等. 桑菊饮药效学研究及其现代临床应用 [J]. 中成药, 2007, 29(12): 1813-1816.
- [4] Guabiraba R, Besnard A G, Marques R E, et al. IL-22 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental dengue infection [J]. Eur J Immunol, 2013, 43(6): 1529-1544.
- [5] Zarpelon A C, Cunha T M, Aives J C, et al. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin induced innate inflammation and inflammatory panic: role of cytokines,

- endothelin-1 and prostaglandin E-2 [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169(1): 90-101.
- [6] Karin M, Chen L W, Greten F, *et al.* Signaling inflammation through IKK and the NF-kappa B transcription factors [J]. *Shock*, 2004, 21(3): 112-121.
- [7] Kang S C, Lim S Y, Song Y J. Lupeol is one of active components in the extract of *Chrysanthemum indicum* Linn. that inhibits LMP1-induced NF- κ B activation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): 826-888.
- [8] Liu X H, Bauman W A, Cardozo C. ANKRD1 modulates inflammatory responses in C2C12 myoblasts through feedback inhibition of NF- κ B signaling activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(1): 208-213.
- [9] Zhou M G, Jiang M, Bai G, *et al.* Identification and comparison of anti-inflammatory ingredients from different organs of lotus nelumbo by UPLC/Q-TOF and PCA coupled with a NF- κ B reporter gene assay [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81971.
- [10] Han Y Q, Zhou M G, Wang L Q, *et al.* Comparative evaluation of different cultivars of *Flos Chrysanthemi* by an anti-inflammatory-based NF- κ B reporter gene assay coupled to UPLC-Q/TOF MS with PCA and ANN [J]. *J Ethnopharmacology*, 2015, 174: 387-395.
- [11] 毛伟松. 芦根贝母汤治疗小儿急性支气管炎 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 13(11): 1442..
- [12] 陈福君, 林一星, 许春泉, 等. 桑的药理研究(II)——桑叶、桑枝、桑白皮抗炎药理作用的初步比较研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 1995, 12(3): 222-224.
- [13] 周幼龙. 大黄薄荷汤治疗急性扁桃体炎 69 例[J]. 浙江中医杂志, 2002, 37(8): 340.
- [14] 王富花, 张占军. 杏仁研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(29): 16239-16240.
- [15] 赵秀玲. 桔梗的化学成分、药理作用及资源开发的研究进展 [J]. 中国调味品, 2012(2): 5-8.
- [16] Jiang W L, Fu F H, Xu B M, *et al.* Cardioprotection with forsythoside B in rat myocardial ischemia-reperfusion injury: relation to inflammation response [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(8/9): 635-639.
- [17] Cui Q X, Fu M, Zhou M G, *et al.* Bioactivity-based ultra-performance liquid chromatography-coupled quadrupole time-of-flight mass spectrometry for NF- κ B inhibitors identification in Chinese medicinal preparation Bufeil Granule [J]. *Biomedical Chromatography*, 2015, doi: 10.1002/bmc.3664.
- [18] Wang Q, Kuang H X, Su Y, *et al.* Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(1): 9-39.
- [19] Cheng B F, Hou Y Y, Wang L Q. Dual-bioactivity based liquid chromatography coupled quadrupole time of flight mass spectrometry for NF- κ B inhibitors and β 2AR agonists identification in Chinese medicinal preparation Qingfei Xiaoyan Wan [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404(8): 2445-2452.
- [20] Jiang M, Han Y Q, Zhou M G. The screening research of anti-inflammatory bioactive markers from different flowering phases of *Flos Lonicerae Japonicae* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96214.
- [21] Kim Y P, Kim S Y, Li D, *et al.* Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* [J]. *Planta Med*, 2001, 67(4): 37-39.