

## 蕲艾治疗溃疡性结肠炎的活性筛选与作用评价

朱芸芸<sup>1</sup>, 陈 乐<sup>1</sup>, 魏晓晴<sup>1</sup>, 王梓灵<sup>1</sup>, 刘洪涛<sup>2</sup>, 杜鸿志<sup>1,3\*</sup>, 刘大会<sup>1\*</sup>

1. 湖北中医药大学 中药资源中心, 湖北 武汉 430065

2. 湖北中医药大学基础医学院, 湖北 武汉 430065

3. 中国中医科学院 中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

**摘要:** 目的 评价蕲艾 *Artemisia argyi* 的抗炎活性, 筛选其最佳抗炎活性部位, 确证其对溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的治疗作用。方法 采用脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 建立体外炎性细胞模型, 给予蕲艾水部位、正丁醇部位、醋酸乙酯部位、石油醚部位进行干预, 观察各组细胞形态; 采用 Griess 法测定各组细胞上清液中一氧化氮 (nitrite oxide, NO) 水平; 采用 ELISA 法检测各组细胞上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 $\beta$  水平; 采用 qRT-PCR 法检测各组细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) mRNA 表达情况。利用超高效液相色谱 (UPLC) 法对最佳抗炎活性部位的主要化学成分进行定量分析。建立 2.5% 葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的小鼠 UC 模型, 给予蕲艾醋酸乙酯部位和异泽兰黄酮, 记录各组小鼠体质量、摄食量和饮水量变化, 并进行疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分; 测量结肠组织长度, 并采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察各组小鼠结肠组织病理变化; 采用免疫组化法检测各组小鼠结肠组织紧密连接蛋白-1 (zonula occluden-1, ZO-1) 表达情况。结果 与模型组比较, 10  $\mu$ g/mL 蕲艾醋酸乙酯部位能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的分化程度, 显著降低上清液中 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平 ( $P < 0.01$ ), 下调 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、COX-2、iNOS 和 NLRP3 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ 、0.01)。异泽兰黄酮在蕲艾醋酸乙酯部位中具有最高的质量分数, 为该部位中的主要成分。与对照组比较, 模型组小鼠体质量明显降低 ( $P < 0.01$ ), DAI 评分升高 ( $P < 0.01$ ), 结肠长度缩短 ( $P < 0.01$ ), 结肠组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 COX-2 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), ZO-1 表达减少; 给予蕲艾醋酸乙酯部位和异泽兰黄酮后, 上述指标均得到显著改善 ( $P < 0.05$ 、0.01)。结论 蕲艾醋酸乙酯部位具有最佳的体外抗炎活性, 醋酸乙酯部位及其主要成分异泽兰黄酮对 UC 小鼠有较好的治疗作用。

**关键词:** 蕲艾; RAW264.7 细胞; 抗炎活性; 溃疡性结肠炎; 异泽兰黄酮

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-4882-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.013

## Activity screening and evaluation of *Artemisia argyi* in treatment of ulcerative colitis

ZHU Yun-yun<sup>1</sup>, CHEN Le<sup>1</sup>, WEI Xiao-qing<sup>1</sup>, WANG Zi-ling<sup>1</sup>, LIU Hong-tao<sup>2</sup>, DU Hong-zhi<sup>1,3</sup>, LIU Da-hui<sup>1</sup>

1. Resource Center of Chinese Material Science, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. School of Basic Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

3. National Resource Center for Chinese Material Medica, State Key Laboratory of Dao-di Herbs Breeding Base, China Academy of Chinese Material Science, Beijing 100700, China

**Abstract: Objective** To evaluate the anti-inflammatory activity of Qiai (*Artemisia argyi*), screen its best anti-inflammatory activity site and confirm its therapeutic effect on ulcerative colitis (UC). **Methods** Lipopolysaccharides (LPS) was used to induce mouse

收稿日期: 2021-05-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1700704); 中央本级重大增减支项目(2060302); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-21); 湖北省现代农业产业技术体系项目(HBHZD-ZB-2020-005)

作者简介: 朱芸芸, 硕士研究生, 从事中药资源与中药质量评价研究。E-mail: 2677007603@qq.com

\*通信作者: 杜鸿志, 副教授, 硕士生导师。E-mail: dhz3163@hbtcm.edu.cn

刘大会, 教授, 博士生导师。E-mail: liudahui@hbtcm.edu.cn

mononuclear macrophages RAW264.7 to establish an *in vitro* inflammatory cell model. The water part, *n*-butanol part, ethyl acetate part and petroleum ether part from *A. argyi* were intervened, cell morphology of each group were observed; Griess method was used to determine the level of nitric oxide (NO) in supernatant of each group; ELISA method was used to detect levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 $\beta$  in supernatant of each group; qRT-PCR method was used to detect mRNA expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) in each group. UPLC method was used to quantitatively analyze the main chemical components of the best anti-inflammatory active sites. UC mice model was established by 2.5% dextran sodium sulfate (DSS), ethyl acetate part from *A. argyi* and eupatilin were given to intervention, the changes of body weight, food intake and water intake of mice in each group were recorded, disease activity index (DAI) score was performed; Length of colon tissue was measured, and pathological changes of colon tissue of mice in each group were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining method; Immunohistochemical method was used to detect zonula occluden-1 (ZO-1) expression in colon tissue of mice. **Results** Compared with model group, 10  $\mu$ g/mL *A. argyi* ethyl acetate part inhibited the differentiation of RAW264.7 cells induced by LPS, significantly reduced the levels of NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in the supernatant ( $P < 0.01$ ), down-regulated the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS and NLRP3 mRNA ( $P < 0.05, 0.01$ ). Eupatilin had the highest mass fraction in ethyl acetate part from *A. argyi*, and was the main component in this part. Compared with control group, the body weight of mice in model group was significantly reduced ( $P < 0.01$ ), DAI score was increased ( $P < 0.01$ ), the length of colon was shortened ( $P < 0.01$ ), expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and COX-2 mRNA in colon tissue were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and ZO-1 expression was decreased; After given the ethyl acetate part from *A. argyi* and eupatilin, the above indicators were significantly improved ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** The ethyl acetate part from *A. argyi* has the best anti-inflammatory activity *in vitro*, ethyl acetate part from *A. argyi* and its main component eupatilin have a good therapeutic effect on UC mice.

**Key words:** *Artemisia argyi* Levl. et Vant.; RAW264.7 cells; anti-inflammatory activity; ulcerative colitis; eupatilin

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是世界范围内一种高发的疾病, 主要包括克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) [1]。近年来, 随着城市化的发展, UC 的发病率在全球范围内呈上升趋势[2], 其致病因素复杂, 主要病理特征为结肠黏膜和黏膜下层的炎症反应和溃疡性病变, 发病时临床表现为体质量减轻、腹泻、腹痛和直肠出血等, 严重时可能会导致结肠癌[3]。目前临床主要以氨基水杨酸盐、糖皮质激素、免疫抑制剂和生物制剂等缓解 UC, 可能会引起恶心、呕吐、头痛、腹泻、血液紊乱、肾毒性、低钾血症以及带状疱疹、上呼吸道和尿路感染等严重的不良反应[4], 因此抗 IBD 药物的开发为当前国内外研究的热点。

艾叶为菊科蒿属植物艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 的干燥叶片, 在我国各地均有分布, 主产于湖北、河南、河北等地, 其中湖北蕲艾为著名道地药材, 被誉为“四大名艾”之一。艾叶的功能主治最早记载于《名医别录》[5], 载其“……可作煎, 止下痢, 吐血……”, 在随后的历代本草中记载的功能亦多有“止痛”“止血”“脐痛”“止痢”“止泄”等, 临床研究显示艾叶对消化系统疾病的疗效显著, 常用于治疗心腹冷痛、泄泻、久痢、下血等症。现代

药理学研究表明, 艾叶富含挥发油、黄酮、酚酸等活性成分, 具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤、降血糖等药理作用[6]; 艾叶提取物和艾叶中多种化合物具有抗炎活性[7-8], 艾灸对 UC 具有一定的治疗作用[9], 但艾叶治疗 UC 的活性部位及活性成分尚未确证。

巨噬细胞是启动、维持和抑制炎症反应的主要免疫细胞[10]。由脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 激活的巨噬细胞诱导先天免疫反应, 并产生导致炎症反应的促炎介质[11]。本研究采用 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 建立体外炎症细胞模型, 筛选蕲艾抗炎活性的有效部位, 并利用超高效液相色谱 (UPLC) 法测定最佳抗炎部位的主要成分; 进一步考察最佳活性部位及主要成分对葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的 UC 小鼠的治疗作用, 以期对蕲艾治疗 UC 提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 48 只, 6~8 周龄, 体质量 19~21 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。动物于湖北中医药大学动物房适应性饲养 7 d, 动物饲养使用的标准鼠饲料和水以及所有动物实验均按照湖北中医药大学动物伦理相关规定进行, 伦理批准号

SYXK2017-0067-2020-15。

## 1.2 细胞

RAW264.7 细胞由华中科技大学同济医学院免疫学教研室馈赠，冷藏于液氮罐中。

## 1.3 药材

蕲艾采自湖北中医药大学药用植物园，经湖北中医药大学刘大会教授鉴定为蕲艾 *A. argyi* Levl. et Vant. cv. Qiai。

## 1.4 药品与试剂

对照品异泽兰黄素(批号 PS020254, 质量分数≥98%)和棕矢车菊素(批号 PS001167, 质量分数≥98%)购自成都普思生物科技股份有限公司; DMEM 培养基购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清(批号 A11H00K)购自美国 Gemini 公司; LPS、DSS 购自大连美仑生物技术有限公司; 罗丹明标记鬼笔环肽(批号 40734ES75)购自上海翊圣生物科技有限公司; 一氧化氮(nitrite oxide, NO)试剂盒(批号 S0021)购自上海碧云天生物技术有限公司; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒(批号 20210113)购自南京建成生物工程研究所; 紧密连接蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; HRP 标记的羊抗兔抗体购自英国 Abcam 公司; 乙醇、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 购自德国 Merck 公司; TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 引物由上海生物工程股份有限公司合成。

## 1.5 仪器

1260 型 UPLC 色谱仪(美国 Agilent 公司); QFN-DGJ-N 型冷冻干燥机(上海乔枫实业有限公司); Bio-Tek Synergy 2 型酶标仪(美国 Gene 公司); 311 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); IX-73P1F 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司); LC480 型 qRT-PCR 仪(罗氏诊断产品有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 蕲艾不同萃取部位样品的制备

精确称取经粉碎后的蕲艾粉末 200 g, 分别用 8、

6、6 倍量的 60%乙醇超声提取 3 次, 60 min/次, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩至浸膏状。浸膏以适量蒸馏水分散, 依次用等体积的石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取 3 次, 减压浓缩后得到石油醚部位 1.28 g、醋酸乙酯部位 6.57 g、正丁醇部位 2.48 g、水部位 5.55 g。将上述样品用二甲基亚砜(DMSO)分别配制成质量浓度为 100 mg/mL 的储存液, 备用。

### 2.2 蕲艾不同萃取部位抗炎活性的筛选

**2.2.1 细胞培养** RAW264.7 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。取处于对数生长期的细胞进行传代, 传代比例为 1:4, 收集细胞悬液, 2000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 加入 1 mL 培养基重悬, 于培养箱中培养。

**2.2.2 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞存活率的影响** 取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以  $1 \times 10^5$ /mL 接种于 96 孔板, 100  $\mu$ L/孔, 培养 24 h。设置对照组和蕲艾不同萃取部位(5、10、20、50、100、200  $\mu$ g/mL)组, 小心吸去上清液, 各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的 DMEM 培养基, 培养 24 h; 每孔加入 15  $\mu$ L MTT 溶液, 避光孵育 4 h, 小心吸去上清, 每孔加入 100  $\mu$ L DMSO, 避光振荡, 待紫色结晶完全溶解后, 采用酶标仪检测 490 nm 处吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

**2.2.3 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞形态的影响** 取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以  $1 \times 10^5$ /mL 接种于已放置玻璃圆片的 12 孔板, 1 mL/孔, 培养 24 h。设置对照组、模型组、石油醚部位(10  $\mu$ g/mL)组、醋酸乙酯部位(10  $\mu$ g/mL)组、正丁醇部位(10  $\mu$ g/mL)组和水部位(10  $\mu$ g/mL)组, 模型组和各给药组加入 LPS (1  $\mu$ g/mL), 各给药组再加入相应药物, 对照组加入不含药物的 DMEM 培养基, 培养 24 h; 吸去上清, 将玻璃圆片取出, 进行罗丹明标记鬼笔环肽染色, 于荧光倒置显微镜下观察细胞形态。

**2.2.4 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞上清液中 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平的影响** 取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以  $2 \times 10^5$ /mL 接种于 24 孔板, 1 mL/孔, 培养 24 h。按“2.2.3”项下方法进行分组和处理, 吸取上清, 5000 r/min 离心 3 min, 采用 Griess 法测定细胞上清液中 NO 水平, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平。

**2.2.5 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞  $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $COX-2$ 、 $iNOS$  和  $NLRP3$  mRNA 表达的影响** 取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞,以  $2.5 \times 10^5/mL$  接种于 6 孔板,2 mL/孔,培养 24 h。按“2.2.3”项下方法进行分组和处理,弃上清,按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 引物             | 引物序列 (5'-3')                                           |
|----------------|--------------------------------------------------------|
| $\beta$ -actin | F: GCTGACAGGATGCAGAAGG<br>R: TGGAAGGTGGACAGTGAGG       |
| $TNF-\alpha$   | F: GGCATGGATCTCAAAGACA<br>R: GTGAGGAGCACGTAGTCGG       |
| $IL-6$         | F: CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT<br>R: GAAGTAGGGAAGGCCGTGG   |
| $IL-1\beta$    | F: CAACTGCACTACAGGCTCCG<br>R: GTGGGTGTGCCGTCTTTCAT     |
| $iNOS$         | F: ACCATGAGGCTGAAATCCCA<br>R: TCCACAACCTCGCTCCAAGAT    |
| $COX-2$        | F: ATTCCAAACCAGCAGACTCATA<br>R: CTTGAGTTTGAAGTGGTAACCG |
| $NLRP3$        | F: GTGGTGACCCCTCTGTGAGGT<br>R: TCTTCTGGAGCGCTTCTAA     |

## 2.3 蕲艾醋酸乙酯部位成分分析

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密称取异泽兰黄素和棕矢车菊素对照品适量,以甲醇溶解并定容,制得含异泽兰黄素 171.50 mg/L、棕矢车菊素 95.06 mg/L 的混合对照品溶液。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 精密称取蕲艾醋酸乙酯部位干燥粉末 20 mg,以 20 mL 甲醇超声溶解并定容,经 0.22  $\mu m$  微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

**2.3.3 色谱条件** 参照罗丹丹等<sup>[12]</sup>的 UPLC 方法测定蕲艾醋酸乙酯部位中的主要成分。Zorbaxr RHD Eclipse Plus 95A C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu m$ ), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) -0.1% 甲酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~0.3 min, 2%~5% B; 0.3~1.0 min, 5% B; 1.0~7.0 min, 5%~20% B; 7.0~9.0 min, 20% B; 9.0~9.5 min, 20%~25% B; 9.5~12.5 min, 25%~28% B; 12.5~18.0 min, 28%~40% B; 18.0~18.3 min, 40%~80% B; 18.3~21.0 min, 80%~98% B; 21.0~24.0 min, 98% B; 体积流量为 0.5 mL/min; 柱温为 40  $^{\circ}C$ ; 进样量为 1  $\mu L$ 。对该法进行方法学考察,精密度、重复性、稳定性及加样回收率均符合含量测定要求。

## 2.4 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠的治疗作用

**2.4.1 造模、分组与给药** BALB/c 小鼠随机分为

对照组、模型组、醋酸乙酯部位 (1 g/kg) 组和异泽兰黄素 (80 mg/kg) 组,每组 12 只。对照组和模型组 ig 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液,各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 1 次/d, 连续 14 d。自给药第 8 天,将模型组和各给药组饮水换为 2.5% DSS 溶液,每天记录小鼠体质量、饮食和饮水量。

**2.4.2 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分的影响** 每天观察并记录各组小鼠的一般情况,进行 DAI 评分<sup>[13]</sup>,评分标准见表 2。

$$DAI = (\text{体质量下降} + \text{粪便性状} + \text{便血情况})/3$$

表 2 DAI 评分标准

Table 2 DAI scoring criteria

| 评分 | 体质量下降率/% | 粪便状态 | 便血情况 |
|----|----------|------|------|
| 0  | —        | 正常   | 正常   |
| 1  | 1~5      | 稀便   | 出血痕迹 |
| 2  | 6~10     | 稀便   | 轻度出血 |
| 3  | 11~20    | 稀便   | 明显出血 |
| 4  | >20      | 腹泻   | 大出血  |

**2.4.3 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响** 给药结束后,小鼠吸入乙醚麻醉处死,迅速剖取结肠,测量结肠长度并拍照,剪取结肠端 1~2 cm,于 4% 多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋切片后,进行苏木素-伊红 (HE) 染色,于显微镜下观察结肠组织病理变化。

**2.4.4 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠组织  $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$  和  $COX-2$  mRNA 表达的影响** 按照试剂盒说明书提取各组小鼠结肠组织总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。

**2.4.5 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠组织 ZO-1 表达的影响** 取各组小鼠结肠组织,于 4% 多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋切片,脱蜡至水,经抗原修复、画圈自发荧光淬灭、血清封闭等操作后,加入 ZO-1 抗体 (1:2000), 4  $^{\circ}C$  孵育 12 h; 将玻片置于 PBS (pH 7.4) 中,在脱色摇床上晃动洗涤,切片稍甩干后在圈内滴加 HRP 标记的羊抗兔抗体覆盖组织,避光室温孵育 50 min,再次洗涤后,在圈内滴加 DAPI 染液,避光室温孵育 10 min,洗涤后加抗荧光淬灭封片剂进行封片,于显微镜下观察并拍照。

## 2.5 数据统计学处理

数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计,组间比较采用单因素 ANOVA 分析,两两比较采用  $t$  检验。

### 3 结果

#### 3.1 蕲艾不同萃取部位抗炎活性的筛选

**3.1.1 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞存活率的影响** 如图 1 所示, 蕲艾水部位 (5~200  $\mu\text{g/mL}$ ) 组细胞存活率均大于 90%, 无细胞毒性; 蕲艾正丁醇部位 (100、200  $\mu\text{g/mL}$ ) 组细胞存活率小于 50%,

表明该部位安全剂量为 5~50  $\mu\text{g/mL}$ ; 蕲艾醋酸乙酯部位 ( $\geq 20$   $\mu\text{g/mL}$ ) 组和蕲艾石油醚部位 ( $\geq 20$   $\mu\text{g/mL}$ ) 组细胞存活率均小于 50%, 表明该部位安全剂量为 5~10  $\mu\text{g/mL}$ 。因此, 选取不同萃取部位对细胞存活率均无明显影响的质量浓度 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 开展后续实验。

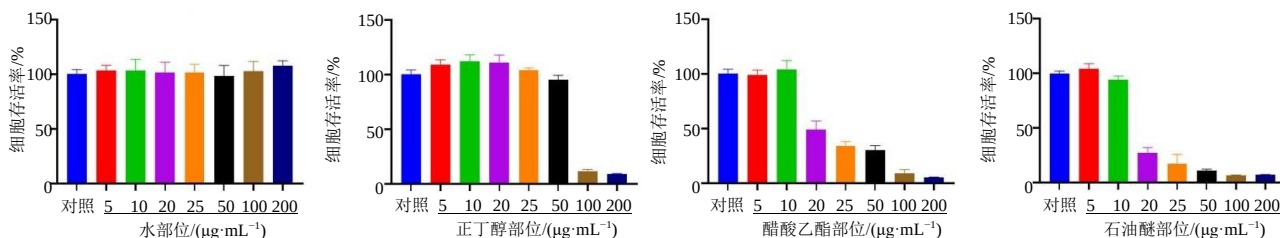


图 1 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 1 Effect of different extraction parts of *A. argyi* on survival rate of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

**3.1.2 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞形态的影响** 如图 2 所示, 对照组细胞呈圆形, 成群, 类似“葡萄串”; 模型组细胞呈现除多边形、梭形等不规则形状, 生出伪足, 分化情况严重; 各给药组细胞形态趋向正常, 表明蕲艾不同萃取部位对 LPS 诱

导的炎症反应具有一定的抑制作用。

**3.1.3 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞上清液中 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平的影响** 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 提

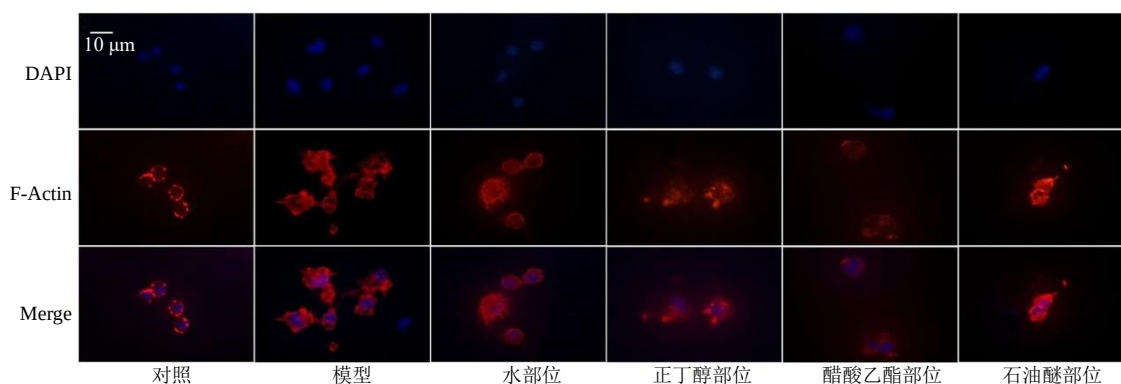
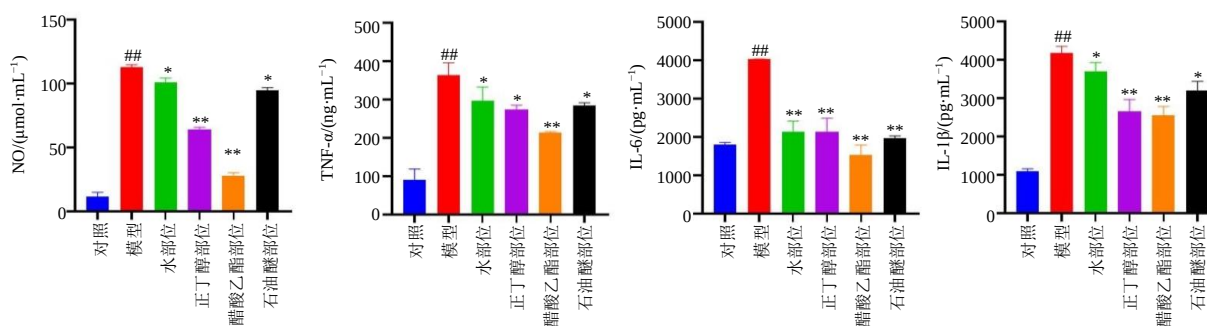


图 2 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞形态的影响 ( $\times 400$ )

Fig. 2 Effect of different extraction parts of *A. argyi* on morphology of RAW264.7 cells ( $\times 400$ )



与对照组比较:  $^{##}P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $^{*}P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$ , 下同

$^{##}P < 0.01$  vs control group;  $^{*}P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$  vs model group, same as belows

图 3 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞上清液中 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 3 Effect of different extraction parts of *A. argyi* on levels of NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in supernatant of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

示炎症细胞模型构建成功。与模型组比较, 蕲艾不同萃取部位组细胞上清液中 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平均显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 其中以醋酸乙酯部位抑制作用最为显著, 表明蕲艾醋酸乙酯部位具有最佳的体外抗炎活性。

**3.1.4 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、COX-2、iNOS 和 NLRP3 mRNA 表达的影响** 如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组

细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、COX-2、iNOS 和 NLRP3 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 蕲艾不同萃取部位组细胞 COX-2、iNOS 和 NLRP3 mRNA 表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 蕲艾醋酸乙酯部位、正丁醇部位和石油醚部位组细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 其中以醋酸乙酯部位的抑制作用最为显著, 进一步明确蕲艾醋酸乙酯部

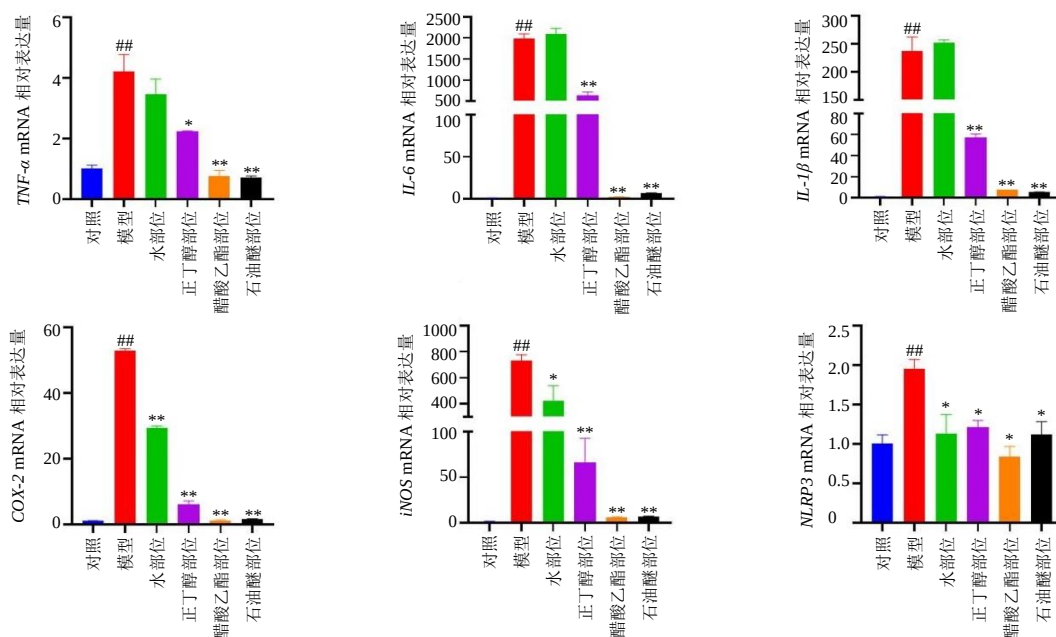


图 4 蕲艾不同萃取部位对 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、COX-2、iNOS 和 NLRP3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 4 Effect of different extraction parts of *A. argyi* on mRNA expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , COX-2, iNOS and NLRP3 in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

位为最强的抗炎活性部位。

### 3.2 蕲艾醋酸乙酯部位的成分分析

如图 5 所示, 蕲艾醋酸乙酯部位主要含黄酮类成分异泽兰黄素、棕矢车菊素, 质量分数分别为 1.81%、0.84%, 其中以异泽兰黄素最为丰富, 与文献报道一致<sup>[14]</sup>, 表明异泽兰黄素可能为蕲艾醋酸乙酯部位发挥抗炎作用的重要活性成分。

### 3.3 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠的治疗作用

**3.3.1 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠体质量、摄食量和饮水量的影响** 如图 6 所示, 对照组小鼠体质量呈现平稳趋势; 模型组小鼠造模 6 d 后, 活动能力、体质量开始下降, 毛色无光泽, 造模第 7 天体质量显著降低 ( $P<0.05$ ); 各给药组小鼠体质量下降趋势稍缓。各组小鼠摄食量、饮水无明显差异。

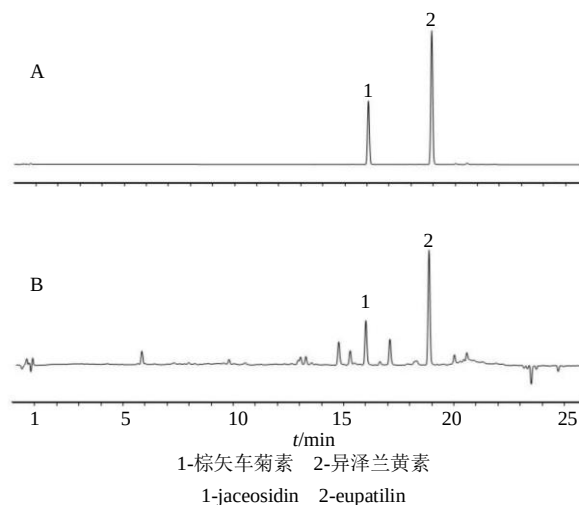


图 5 对照品溶液 (A) 和蕲艾醋酸乙酯部位样品 (B) 的 UPLC 图

Fig. 5 UPLC diagram of reference solution (A) and ethyl acetate fraction sample of *A. argyi* (B)



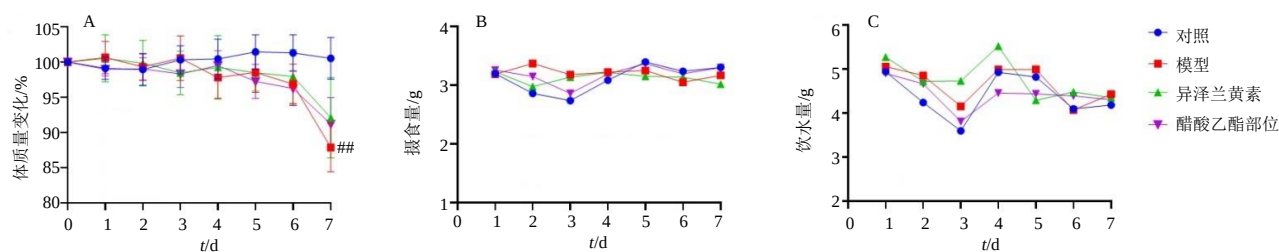


图 6 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠体重 (A)、摄食量 (B) 和饮水量 (C) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 6 Effect of ethyl acetate fraction of *A. argyi* and eupatilin on body weight (A), dietary (B) and drinking water (C) of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

**3.3.2 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠 DAI 评分的影响** 模型组小鼠造模第 4 天出现排便次数增加、稀便、水样便等情况，第 6 天出现大便隐血、血便情况。如图 7 所示，与对照组比较，造模第 7 天模型组小鼠 DAI 评分显著升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，各给药组小鼠活动增加，毛发色泽改善，且大便性状也有所改善，DAI 评分显著降低 ( $P < 0.05$ )，表明异泽兰黄素及蕲艾醋酸乙酯部位对 UC 小鼠有一定的缓解作用。

**3.3.3 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠长度和形态的影响** 如图 8 所示，与对照组比较，模型组小鼠结肠长度显著减小 ( $P < 0.01$ )；与

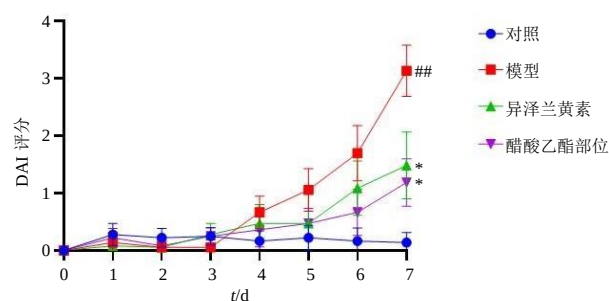


图 7 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠 DAI 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 7 Effect of ethyl acetate fraction of *A. argyi* and eupatilin on DAI score of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )



图 8 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠长度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 8 Effect of ethyl acetate fraction of *A. argyi* and eupatilin on colonic length of UC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

模型组比较，各给药组小鼠结肠长度显著增大 ( $P < 0.05$ )。对照组小鼠结肠形态完整，无充血、水肿、溃疡等，模型组小鼠结肠充血、水肿，溃疡情况严重；蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素小鼠结肠黏膜有一定程度的水肿，溃疡程度较模型组减少。

**3.3.4 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响** 如图 9 所示，模型组结肠组织可见黏膜溃疡、上皮破裂、大量炎性细胞浸润，肠腺及隐窝大部分结构被破坏；各给药组结肠组织病理损伤减轻，表明蕲艾醋酸乙酯部位及异泽

兰黄素能够减轻 UC 小鼠结肠组织的损伤。

**3.3.5 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠组织  $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$  和  $COX-2$  mRNA 表达的影响** 如图 10 所示，与对照组比较，模型组小鼠结肠组织  $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$  和  $COX-2$  mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，各给药组小鼠结肠组织  $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$  和  $COX-2$  mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，表明蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素能够抑制 UC 小鼠结肠组织中炎性因子表达。

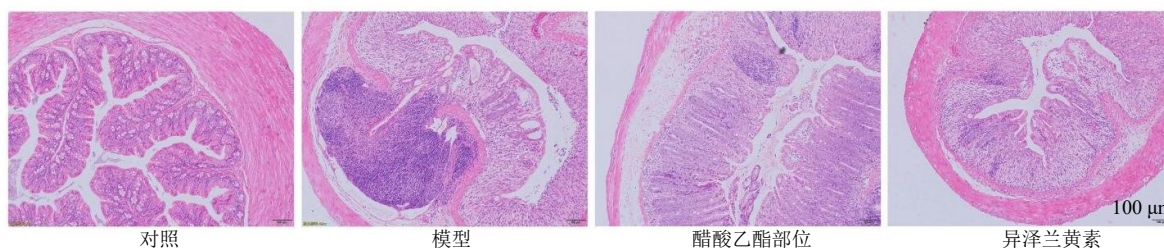


图 9 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠组织病理变化的影响 (HE,  $\times 100$ )

Fig. 9 Effect of ethyl acetate fraction of *A. argyi* and eupatilin on colonic pathological changes of UC mice (HE,  $\times 100$ )

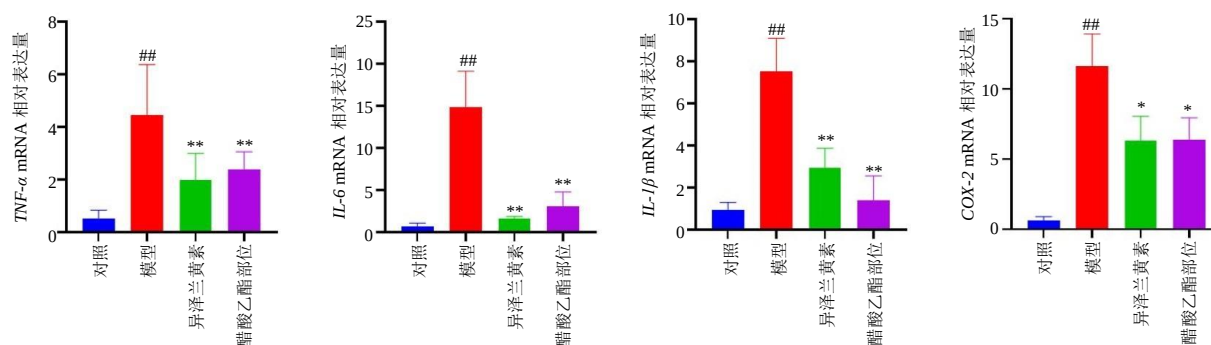


图 10 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠组织 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-1β* 和 *COX-2* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 10 Effect of ethyl acetate fraction of *A. argyi* and eupatilin on mRNA expressions of *TNF-α*, *IL-6*, *IL-1β* and *COX-2* in UC mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

**3.3.6 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠组织 ZO-1 蛋白表达的影响** 如图 11 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠结肠组织中 ZO-1 蛋白表达较对照组降低; 与模型组相比, 各给药组小鼠结肠组织中 ZO-1 蛋白表达升高, 表明蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素可以有效保护 UC 小鼠肠道黏膜。

#### 4 讨论

炎症反应是机体的一种自我保护反应, 当受到外界刺激时, 机体通过多种细胞及因子来进行调控, 而过度的炎症反应会造成免疫调控失衡, 进而对机体造成严重伤害。巨噬细胞是人体固有免疫系统的重要组成部分, 经 LPS 刺激后, 细胞形态发生改

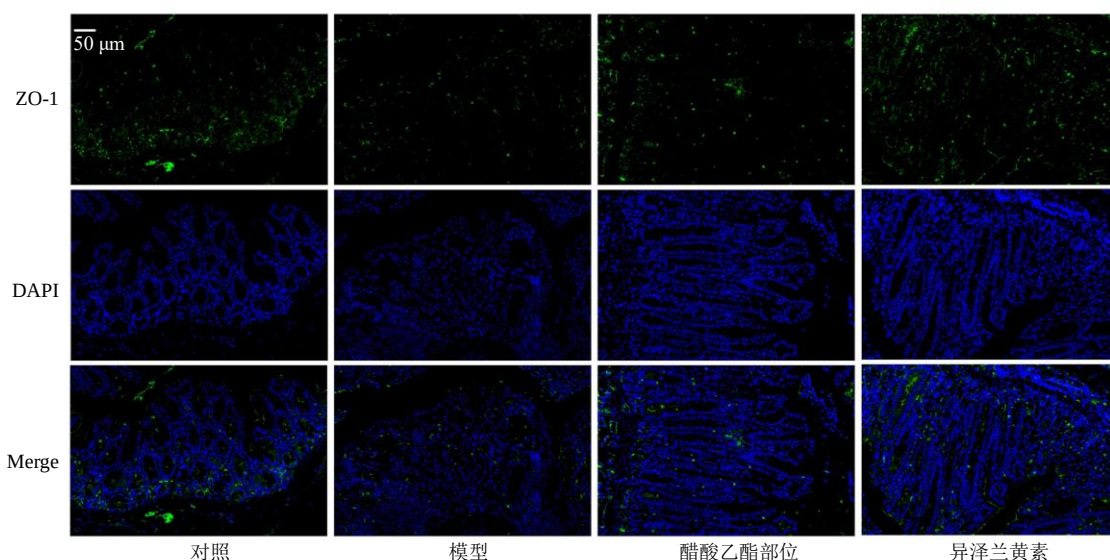


图 11 蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 小鼠结肠组织 ZO-1 蛋白表达的影响 ( $\times 200$ )

Fig. 11 Effect of ethyl acetate fraction of *A. argyi* and eupatilin on ZO-1 protein in colon tissue of UC mice ( $\times 200$ )



变,同时分泌产生 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、iNOS、COX-2 等多种细胞因子<sup>[15]</sup>,其中过表达的 iNOS 可以通过 L-精氨酸途径合成大量 NO。NLRP3 是 NLR 家族最重要的炎症小体,巨噬细胞表面的 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR-4) 受到 LPS 刺激后,上调核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 介导的 pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-1 $\beta$  经剪切后形成成熟的 IL-1 $\beta$  并被释放到细胞外<sup>[16]</sup>。本研究发现,10  $\mu$ g/mL 蕲艾不同部位萃取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分化均有不同程度的恢复作用,并能够显著抑制 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等炎症因子的分泌;除水部位外,正丁醇、醋酸乙酯、石油醚部位均能够显著下调 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等炎症因子 mRNA 表达水平,4 个极性部位萃取物对 COX-2、iNOS、NLRP3 等促炎介质的 mRNA 表达水平均有显著抑制作用,其中蕲艾醋酸乙酯部位表现出最佳的抗炎活性。

为了明确蕲艾醋酸乙酯部位发挥抗炎活性的药效物质基础,本研究采用 UPLC 法对醋酸乙酯部位主要成分进行定量分析,发现异泽兰黄素在醋酸乙酯部位中具有最高的质量分数,而异泽兰黄素被多次报道具有较好的抗炎活性。异泽兰黄素可以降低 BV2 小胶质细胞中亚硝酸盐、IL-6、TNF- $\alpha$  和前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 等炎症反应标志物的分泌,从而发挥抗炎作用<sup>[17]</sup>。异泽兰黄素能够减轻 LPS 引起的大鼠急性肺损伤,通过降低表面活性剂蛋白、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子表达水平,从而发挥对肺部损伤的保护作用<sup>[18]</sup>。

UC 是一种常见的肠道炎症疾病,中医认为 UC 属于“痢疾”“泄泻”“肠癖”“下利”等范畴,而艾叶在多部古籍中被记载具有治疗“痢疾”的功效<sup>[19]</sup>。本研究以 DSS 诱导的 UC 模型评价蕲艾醋酸乙酯部位及其主要成分异泽兰黄素对 UC 小鼠的治疗作用,结果显示,蕲艾醋酸乙酯部位及其主要成分异泽兰黄素均能够缓解由 DSS 引起的小鼠体质量减轻、结肠缩短,显著下调 DAI 评分,并显著抑制肠道炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 COX-2 mRNA 表达水平。结肠上皮屏障的功能主要由 Claudins、occludin 和黏附分子等跨膜蛋白控制,ZO-1 能够通过跨膜蛋白 occludin、claudins、黏附分子 A 和肌动蛋白相互作用,将胞质蛋白与细胞骨架系统稳定地连接在一起<sup>[20]</sup>。研究发现,UC 中结肠组织 ZO-1 表达降低<sup>[21]</sup>,结肠上皮屏障破坏后细菌和其他病原体侵入,进一步促进肠道炎症反应和免疫反应<sup>[22]</sup>。

本研究发现,蕲艾醋酸乙酯部位及其主要成分异泽兰黄素能够在一定程度上恢复由 DSS 导致的肠道屏障功能受损,从分子结构层面进一步证实了蕲艾醋酸乙酯部位及异泽兰黄素对 UC 的治疗作用。

综上所述,本研究发现蕲艾最佳抗炎活性部位为醋酸乙酯部位,蕲艾醋酸乙酯部位能够通过抑制炎症因子表达、保护肠道屏障功能,从而治疗 UC,黄酮类成分异泽兰黄素可能为该部位中的主要抗炎活性成分之一。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Ng S C, Shi H Y, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies [J]. *Lancet*, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [2] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [3] Neurath M F. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 45: 1-8.
- [4] Rosenberg L N, Peppercorn M A. Efficacy and safety of drugs for ulcerative colitis [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2010, 9(4): 573-592.
- [5] (梁) 陶弘景集. 名医别录 [M]. 尚志钧辑校. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 155.
- [6] 兰晓燕, 张元, 朱龙波, 等. 艾叶化学成分、药理作用及质量研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(17): 4017-4030.
- [7] Kim S M, Lee S J, Venkatarama Gowda Saralamma V, et al. Polyphenol mixture of a native Korean variety of *Artemisia argyi* H. (Seomae mugwort) and its anti-inflammatory effects [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(5): 1741-1752.
- [8] Jeong J H, Moon S J, Jhun J Y, et al. Eupatilin exerts antinociceptive and chondroprotective properties in a rat model of osteoarthritis by downregulating oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130882.
- [9] 林思睿, 张何骄子, 吴巧凤. 针灸对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中信号转导与转录活化因子 3 和低氧诱导因子-1 $\alpha$  表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2020, 45(9): 696-701.
- [10] Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation [J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 4(3): 281-286.
- [11] Na Y R, Stakenborg M, Seok S H, et al. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: A potential

- therapeutic target in IBD [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(9): 531-543.
- [12] 罗丹丹, 彭华胜, 张元, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析比较宽叶山蒿与艾的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17): 4057-4064.
- [13] Yuan Z W, Yang L H, Zhang X S, *et al.* Huang-Lian-Jie-du Decoction ameliorates acute ulcerative colitis in mice *via* regulating NF- $\kappa$ B and Nrf2 signaling pathways and enhancing intestinal barrier function [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1354.
- [14] Li S, Zhou S B, Yang W, *et al.* Gastro-protective effect of edible plant *Artemisia argyi* in ethanol-induced rats *via* normalizing inflammatory responses and oxidative stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 214: 207-217.
- [15] Kim T W, Shin J S, Chung K S, *et al.* Anti-inflammatory mechanisms of koreanaside A, a lignan isolated from the flower of *Forsythia koreana*, against LPS-induced macrophage activation and DSS-induced colitis mice: The crucial role of AP-1, NF- $\kappa$ B, and JAK/STAT signaling [J]. *Cells*, 2019, 8(10): E1163.
- [16] Burgueño J F, Abreu M T. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(5): 263-278.
- [17] Sapkota A, Gaire B P, Cho K S, *et al.* Eupatilin exerts neuroprotective effects in mice with transient focal cerebral ischemia by reducing microglial activation [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171479.
- [18] Liu H Y, Hao J D, Wu C Y, *et al.* Eupatilin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 8289-8296.
- [19] 张渊博, 李宇栋, 董庆志, 等. 基于《外科正宗》治疗疮疡思维论治溃疡性结肠炎 [J]. 中医学报, 2021, 36(3): 494-497.
- [20] Wroblewski L E, Peek R M Jr. Targeted disruption of the epithelial-barrier by *Helicobacter pylori* [J]. *Cell Commun Signal*, 2011, 9(1): 29.
- [21] Shi Y J, Gong H F, Zhao Q Q, *et al.* Critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) in dextran sulfate sodium (DSS)-induced intestinal injury and repair [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 315: 23-30.
- [22] Kucharzik T, Walsh S V, Chen J, *et al.* Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(6): 2001-2009.

[责任编辑 李亚楠]