

龙胆叶抗炎活性部位化学成分及其抗脓毒症急性肺损伤的作用机制研究

代良敏¹, 代良萍¹, 陈永钧¹, 杜林楠², 赵丽荣², 黄群莲^{1*}, 祝东荣^{2,3*}

(1. 西南医科大学附属医院, 四川泸州 646000; 2. 天津理工大学化学化工学院, 天津 300384; 3. 天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所分子药理学研究室, 天津 300060)

摘要: 目的 筛选龙胆叶抗炎活性部位并阐明其抗脓毒症急性肺损伤(ALI) 的作用机制。方法 制备龙胆叶乙醇提取物的不同极性部位, 采用 RAW264.7 模型评价其抗炎活性, UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 法进行成分分析。建立 RAW264.7 细胞炎症和小鼠 ALI 模型, ELISA 法检测 IL-6、TNF- α 水平, Western blot 法检测炎症相关通路蛋白表达, HE 染色观察肺组织病理学形态, 测定肺湿/干重比及肺泡灌洗液(BALF) 总细胞计数。结果 乙酸乙酯部位抗炎活性最强, 主要化学成分为有机酸、黄酮类等。细胞实验显示, 乙酸乙酯萃取物各剂量组 NO、TNF- α 、IL-6 水平降低 ($P<0.01$), p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), HMOX1、NQO1 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。动物实验显示, 乙酸乙酯萃取物各剂量组小鼠肺组织病理形态改善; 肺湿/干重比及 BALF 总细胞计数、TNF- α 、IL-6 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 血清 NO 水平降低 ($P<0.01$); 肺组织 iNOS、COX-2、p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65 蛋白表达降低 ($P<0.01$), Nrf2、HMOX1、NQO1 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 龙胆叶乙酸乙酯部位通过抑制 NF- κ B 和激活 Nrf2 信号通路发挥抗 ALI 作用, 其活性成分可能为有机酸和黄酮类化合物。

关键词: 龙胆叶; 脓毒症急性肺损伤; 化学成分; 抗氧化性; NF- κ B 信号通路; Nrf2 信号通路

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)11-3758-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.034

急性肺损伤(ALI) 是由多种直接或间接因素引起的肺泡上皮细胞和血管内皮细胞广泛损伤, 其特征为肺水肿、中性粒细胞聚集增加和血管通透性增强^[1]。早期, 促炎因子(如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 释放增加, 加剧肺损伤^[2]。此外, ALI 还伴随氧化还原平衡紊乱, 导致脂质、蛋白质和核酸等氧化损伤^[3]。因此, 抑制炎症和氧化应激是重要治疗策略。

龙胆叶 *Sauvopspatalifolius* Beille 为大戟科守宫木属常绿小灌木, 是岭南特色药食两用植物, 具有清热止咳、润肺化痰功效, 用于治疗支气管哮喘和上呼吸道炎症^[4]。《岭南采药录》《家庭食疗中药》记载, 龙胆叶常与猪肉、猪肺、马蹄、百合、甘蔗等食材煮汤, 用于治疗痰火咳嗽、燥热伤肺、消渴症等^[5-6]。研究表明, 植物根、叶多含黄酮类、生物碱、萜类、糖类及衍生物、苯丙素、甾体、脂肪酸等成分, 其水提物具有抗炎、抑菌等活性^[7-11]。然而, 其抗炎活性成分及作用机制尚不清楚, 本研究旨在通过对龙胆叶乙醇提取物进行不同极性溶剂萃取, 筛选其抗炎活性部位, 并探讨其抗炎作用机制, 以期为龙胆叶的开发和

临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 龙胆叶(批号 22050571) 购自康美药业股份有限公司, 经天津理工大学刘玉明教授鉴定为正品。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司, 批号 P0010); TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒(南京福麦斯生物技术有限公司, 货号 FMS-ELM006、FMS-ELH002); 一抗 iNOS、COX-2、p65、p-p65、HMOX1、NQO1、Nrf2、I κ B α 、p-I κ B α 抗体、二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L)(武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 22226-1-AP、27308-1-AP、10745-1-AP、82335-1-RR、10701-1-AP、11451-1-AP、16396-1-AP、10268-1-AP、68999-1-Ig、SA00001-2); 二甲基亚砜(DMSO)[福晨(天津)化学试剂有限公司, 批号 20240416]; 脂多糖(LPS)(美国 Sigma 公司, 批号 101164401); 乙醇、乙酸乙酯、石油醚(天津市江天化学科技有限公司, 纯度≥98%)。

1.2 细胞 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞, 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

收稿日期: 2025-07-17

基金项目: 国家自然科学基金(82304822); 天津市自然科学基金联合基金(25JCLMJ00040); 天津理工大学青年教师学科交叉研究支持计划(JCCK2504); 泸州地区龙眼的道地性及其药效研究重点研发(社发)(2022-SYF-83)

作者简介: 代良敏(1990—), 女, 硕士生, 从事中药新制剂、新剂型和新技术研究。E-mail: 1542227478@qq.com

*通信作者: 黄群莲(1972—), 女, 主任中药师, 从事药学和临床中药学研究。E-mail: n8hiezrrz@sina.com

祝东荣(1992—), 女, 博士, 讲师, 硕士生导师, 从事中药活性成分药理作用机制研究。E-mail: zhudr93@163.com

1.3 动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 18~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK(京)2021-0006], 饲养于天津医科大学肿瘤医院 [实验动物使用许可证号 SYXK(津)2023-0001]。该动物实验符号伦理学标准, 经天津医科大学肿瘤医院动物伦理委员会批准 (伦理号 NSFC-AE-2023142)。

1.4 仪器 MCO-15AC CO₂ 细胞培养箱 (日本三洋公司); FLx-800 酶标仪 (美国 BioTek 公司); ChemiDoc™ 化学发光成像系统、TC20™ 自动细胞计数仪 (美国 Bio-rad 公司); RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); WIX-miniPRO4 迷你垂直电泳仪、WIX-miniBLOT 迷你垂直转印槽、WIX-EP300 基础电泳仪电源 [韦克斯科技 (北京) 有限公司]; NMSP-600 水平旋转振荡仪 (泰州诺米医疗科技有限公司); BCD-78S168 冷藏冷冻箱 (宁波泓凌电器有限公司); PR224ZH/E 电子天平 [奥豪斯仪器 (常州) 有限公司]; MIKOR 低速冷冻离心机、MIKOR 高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司); C13210-01 数字病理切片扫描仪 (日本 Hamamatsu 公司)。

2 方法

2.1 龙胆叶乙醇提取物活性部位筛选

2.1.1 不同极性萃取物制备 取晾干的龙胆叶 1.5 kg, 剪碎, 75% 乙醇浸泡 24 h, 加热回流提取 3 次, 每次 3 h, 趁热过滤, 合并提取液, 减压浓缩回收溶剂, 得到粗浸膏 574.0 g。粗浸膏以蒸馏水分散后, 依次以石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 回收溶剂并水浴蒸干, 得到石油醚萃取物 207.0 g、乙酸乙酯萃取物 13.0 g、正丁醇萃取物 89.0 g。取各萃取物适量, 加入 DMSO, 配制成 100 mg/mL 的母液备用。

2.1.2 细胞培养 从液氮中取出冻存的 RAW264.7 细胞, 在 37 ℃ 水浴锅中加热解冻, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 1 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 用移液枪吹打均匀后接种于细胞培养皿中, 在 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下过夜培养, 更换新鲜培养基, 细胞生长至融合度达到 80~90% 左右时, 进行传代培养。

2.1.3 MTT 法检测细胞活性 将 RAW264.7 细胞以 5×10³/孔的密度接种于 96 孔板中, 过夜培养, 将细胞随机分为对照组和实验组, 每组设置 3 个复孔。对照组更换为新鲜培养基, 实验组更换为含不同质量浓度 (12.5、25、50、100 μg/mL) 供试品的新鲜培养基, 继续培养 16 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 37 ℃ 孵育 4 h。弃去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡混匀以充分溶解甲臜结晶。于 570 nm 波长处测定光密度 (OD) 值, 并计算细胞存活率, 公式为细胞存活率 = [(给药组 OD 值 - 空白 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白 OD 值)] × 100%。

2.1.4 细胞上清液 NO 水平检测 将 RAW264.7 细胞以 6×10⁴/孔的密度接种于 96 孔板上, 过夜培养。将细胞随机分为对照组、模型组和龙胆叶各萃取物组, 分别设置 3 个复孔。对照组更换为新鲜培养基, 模型组更换为含 LPS

(1 μg/mL) 的新鲜培养基, 各萃取物组则更换为含不同质量浓度 (12.5、25、50、100 μg/mL) 龙胆叶萃取物和 LPS (1 μg/mL) 的新鲜培养基。继续培养 16 h 后, 收集上清液, 使用 Griess 试剂盒检测 NO 水平。

2.2 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯部位成分分析

2.2.1 供试品溶液制备 精密称取 “2.1.1” 项下龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物 2 mg, 加入 4 mL 甲醇, 超声混匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2.2 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈 (A) - 水 (含 0.01% 甲酸) (B), 梯度洗脱 (0~14 min, 50% A; 14~15 min, 50%~100% A; 15~45 min, 100% A); 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 2 μL。

2.2.3 质谱条件 加热电喷雾离子源 (HESI); 正、负离子模式扫描; 喷雾电压 3 500、-2 500 V; 离子源温度 350 ℃; 毛细管温度 325 ℃; 鞘气、辅助气、反吹气体积流量分别为 50、10、1 arb; 扫描范围 m/z 50~1 500。

2.3 细胞实验

2.3.1 细胞分组与给药 将 RAW264.7 细胞接种于细胞培养皿中, 设置对照组、模型组 (1 μg/mL LPS) 及乙酸乙酯萃取物低、中、高剂量组 (25、50、100 μg/mL)。待细胞长到合适密度时, 各组更换含有相应药物的新鲜培养基, 继续培养 16 h, 用于后续实验。

2.3.2 ELISA 法检测上清液 IL-6、TNF-α 水平 收集各组细胞上清液, 按相应 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测 IL-6、TNF-α 水平。

2.3.3 Western blot 法检测炎症相关通路蛋白表达 取各组 RAW264.7 细胞, 提取总蛋白, 采用 BCA 总蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, SDS-PAGE 试剂盒进行凝胶电泳, 再将目的蛋白转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h, TBST 溶液洗涤 2 次, 加入一抗 iNOS、COX-2、p65、p-p65、HMOX1、NQO1、Nrf2、IkBα、p-IkBα (1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜。次日, 加入二抗 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) (1:5 000) 孵育 2 h 后, 采用 ECL 化学发光法显色, 在化学发光成像仪上成像, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白相对表达量。

2.4 动物实验

2.4.1 造模、分组与给药 将 C57BL/6 小鼠按照体质量随机分为空白组、模型组、地塞米松组 (1 mg/kg) 和乙酸乙酯提取物高、低剂量组 (200、100 mg/kg), 每组 8 只。空白组腹腔注射 0.5% CMC-Na (溶解于 PBS 中), 其余各组腹腔注射给予相应剂量药物 (药物溶解于 0.5% CMC-Na 中)。给药 1 h 后, 麻醉小鼠, 通过气管滴注的方法注入 LPS (10 mg/kg, 溶解于 PBS 中) 进行造模, 空白组滴入等体积 PBS。造模 16 h 后, 摘眼球取血, 并收集肺泡灌洗液 (BALF), 其中 3 只小鼠取全肺, 组织固定液中固定后, 用于 HE 染色, 其余 5 只小鼠的肺组织用于测定肺湿/干重

比和 Western blot 实验。

2.4.2 HE 染色观察肺组织病理学形态 将肺组织从固定液中取出, 用生理盐水冲洗干净, 进行组织脱水、浸蜡和包埋。将包埋后的肺组织进行切片, 厚度为 5 μm, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察小鼠肺组织的病理损伤和炎性细胞浸润情况。

2.4.3 肺湿/干重比分析 收集各组小鼠肺组织, 置于 1.5 mL 离心管中, 在电子天平上称定湿重, 随后放入 37 °C 烘箱中烘干, 再称干重, 计算肺组织的湿/干重比。

2.4.4 BALF 中 IL-6、TNF-α 水平检测及总细胞计数 取各组小鼠 BALF, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、TNF-α 水平。下层残留的细胞用适量的 PBS 吹散, 用于 BALF 总细胞计数。

2.4.5 血清 NO 水平检测 小鼠全血在室温下静置 2 h 后, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 收集血清, 按照试剂盒说明书检测 NO 水平。

2.4.6 Western blot 法检测肺组织炎症相关通路蛋白表达 取小鼠肺组织适量, 提取总蛋白, 按“2.3.3”项下方法检测蛋白表达。

2.5 统计学分析 使用 GraphPad Prism 9 软件分析实验数据, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析或双向方差分析。P 值 <0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 龙胆叶乙醇提取物不同极性萃取物对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO 水平的影响 由图 1A 可知, 与对照组比较, 龙胆叶乙醇提取物不同极性萃取物在 12.5~100 mg/L

范围内对 RAW264.7 细胞存活率无明显影响。由图 1B 可知, 石油醚、乙酸乙酯及正丁醇部位均具有抗炎活性, 其 IC₅₀ 值分别为 (57.53±1.76)、(41.11±1.61)、(47.67±1.68) mg/L, 其中乙酸乙酯萃取物干预后 NO 水平最低。

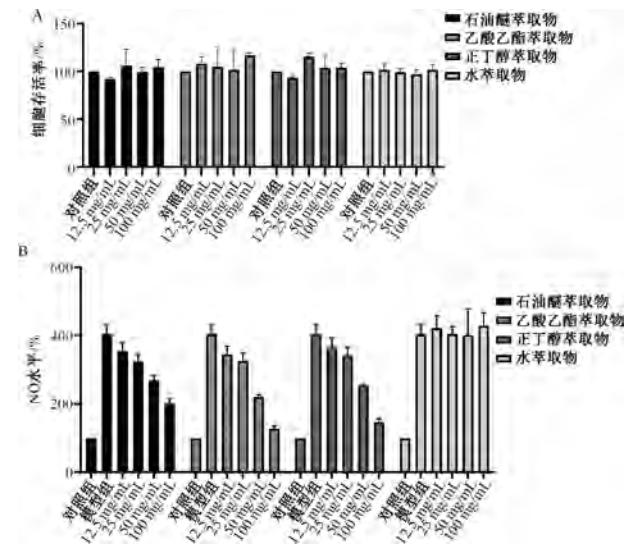


图 1 龙胆叶乙醇提取物不同极性萃取物对 RAW264.7 细胞存活率和上清液 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

3.2 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物化学成分 共鉴定出 23 种化学成分, 包括 13 种有机酸类、4 种酯类、2 个萜类、2 个黄酮类、1 个芳香烷烃类、1 个生物碱类, 见表 1, 总离子流图见图 2。

表 1 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物化学成分鉴定结果

| 序号 | t_R /min | 分子式 | 离子模式 | 分子离子峰 | | MS/MS 碎片离子 | 鉴定 | 类别 | 参考文献 |
|----|------------|---|---------------------|-----------|-----------|------------|---------------------------------|------|------|
| | | | | 理论值 | 实测值 | | | | |
| 1 | 1.02 | C ₉ H ₈ O ₄ | [M-H] ⁻ | 179.033 8 | 179.036 5 | 135.046 1 | 咖啡酸 | 有机酸 | [12] |
| 2 | 1.12 | C ₇ H ₆ O ₄ | [M-H] ⁻ | 153.018 2 | 153.020 4 | 109.030 3 | 原儿茶酸 | 黄酮类 | [13] |
| 3 | 1.29 | C ₁₈ H ₃₂ O ₆ | [M-H] ⁻ | 343.211 5 | 343.214 5 | 325.203 0 | 10,11-二羟基-9,12-二氧代十八酸 | 有机酸 | [12] |
| | | | | | | 171.103 7 | | | |
| 4 | 1.37 | C ₁₄ H ₂₄ O ₆ | [M-H] ⁻ | 287.148 9 | 287.151 7 | 243.125 3 | 1-(5-羧基-2-乙基戊基)己二酸酯 | 酯类 | [12] |
| 5 | 1.39 | C ₉ H ₈ O ₃ | [M-H] ⁻ | 163.038 9 | 163.041 2 | 119.051 1 | 对羟基肉桂酸 | 有机酸 | [13] |
| 6 | 1.47 | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | [M-H] ⁻ | 193.049 5 | 193.051 8 | 133.030 2 | 阿魏酸 | 有机酸 | [12] |
| 7 | 1.51 | C ₁₄ H ₂₂ O ₅ | [M-H] ⁻ | 269.138 3 | 269.141 2 | 251.057 7 | 1-(苯氧基)-3-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]-2-丙醇 | 芳香烷烃 | [12] |
| 8 | 1.53 | C ₉ H ₁₆ O ₄ | [M-H] ⁻ | 187.096 4 | 187.098 8 | 125.098 0 | 杜鹃花酸 | 有机酸 | [13] |
| 9 | 1.63 | C ₁₈ H ₃₂ O ₅ | [M-H] ⁻ | 327.216 6 | 327.219 6 | 271.156 8 | 14,16-二羟基-12-氧代油酸 | 有机酸 | [12] |
| 10 | 1.75 | C ₇ H ₁₂ O ₆ | [M-H] ⁻ | 191.055 0 | 191.057 6 | 85.030 1 | 奎尼酸 | 有机酸 | [13] |
| 11 | 1.83 | C ₁₁ H ₁₂ O ₄ | [M-H] ⁻ | 207.065 1 | 207.067 6 | 179.036 2 | 咖啡酸乙酯 | 酯类 | [14] |
| 12 | 2.03 | C ₁₈ H ₂₆ O ₂ | [M+H] ⁺ | 275.200 5 | 275.202 9 | 257.192 0 | sauspatulifol F | 萜类 | [9] |
| | | | | | | 133.102 2 | | | |
| | | | | | | 105.070 7 | | | |
| 13 | 2.17 | C ₁₈ H ₃₄ O ₅ | [M-H] ⁻ | 329.232 2 | 329.235 7 | 311.189 0 | 3-羟基-1-(羧甲基)己基癸酸酯 | 酯类 | [12] |
| 14 | 2.23 | C ₁₈ H ₂₈ O ₃ | [M+Cl] ⁻ | 327.217 4 | 327.219 7 | 239.135 0 | sauspatulifol K | 萜类 | [9] |
| 15 | 2.48 | C ₁₈ H ₂₈ O ₄ | [M-H] ⁻ | 307.190 3 | 307.193 6 | 265.148 5 | 4-甲基戊基-4-(2-乙氧基苯氧基)丁酸 | 酯类 | [12] |
| | | | | | | 174.957 2 | | | |
| 16 | 4.03 | C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₂ | [M+H] ⁺ | 273.159 7 | 273.162 1 | — | 1,4-双(2-乙酰基-1H-吡咯-1-基)丁烷 | 生物碱 | [7] |
| | | | [M+Na] ⁺ | 295.141 6 | 295.144 0 | | | | |
| 17 | 4.06 | C ₁₆ H ₂₆ O ₂ | [M+Na] ⁺ | 273.160 5 | 273.162 1 | 231.151 1 | 亚麻脂酸 | 有机酸 | [15] |
| 18 | 8.51 | C ₁₈ H ₃₀ O ₃ | [M-H] ⁻ | 293.211 1 | 293.214 2 | 275.203 6 | 12-氧代亚油酸 | 有机酸 | [12] |

续表1

| 序号 | t_R/min | 分子式 | 离子模式 | 分子离子峰 | | MS/MS 碎片离子 | 鉴定 | 类别 | 参考文献 |
|----|------------------|----------------------|--------------------|----------|----------|------------|-------------------|-----|------|
| | | | | 理论值 | 实测值 | | | | |
| 19 | 14.24 | $C_{18}H_{32}O_3$ | [M-H] ⁻ | 295.2267 | 295.2298 | 277.2192 | 羟基亚油酸 | 有机酸 | [12] |
| 20 | 18.03 | $C_{27}H_{30}O_{16}$ | [M-H] ⁻ | 609.1450 | 609.2756 | — | 山柰酚-3-O-β-D-龙胆二糖苷 | 黄酮类 | [12] |
| | | | [M+H] ⁺ | 611.1606 | 611.2915 | 593.2800 | | | [14] |
| 21 | 19.36 | $C_{18}H_{32}O_2$ | [M-H] ⁻ | 279.2318 | 279.2349 | 261.2243 | 亚油酸 | 有机酸 | [14] |
| 22 | 19.73 | $C_{16}H_{30}O_2$ | [M-H] ⁻ | 253.2162 | 253.2192 | — | 棕榈油酸 | 有机酸 | [14] |
| 23 | 20.30 | $C_{16}H_{32}O_2$ | [M-H] ⁻ | 255.2318 | 255.2347 | — | 棕榈酸 | 有机酸 | [14] |

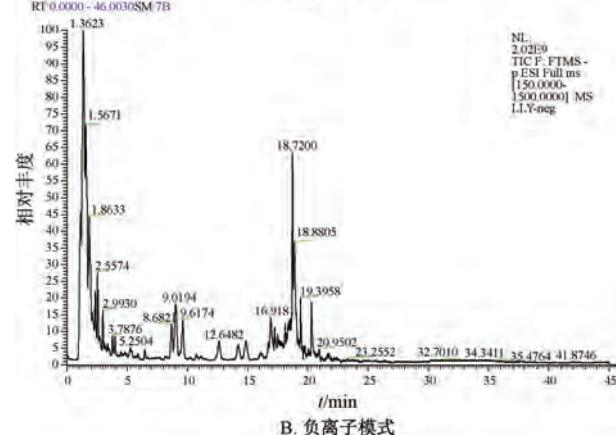
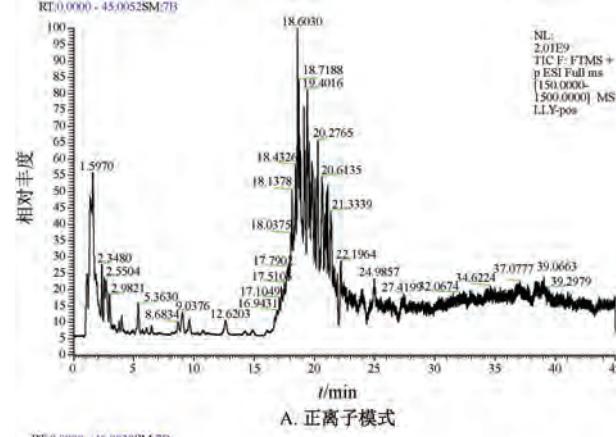
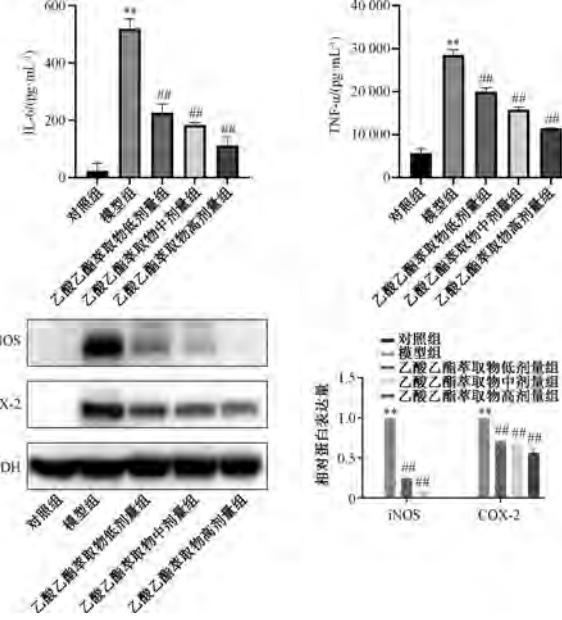


图2 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物总离子流图

3.3 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上清液 IL-6、TNF- α 水平及细胞 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响 由图 3 可知, 与对照组比较, 模型组细胞上清液 IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$), iNOS、COX-2 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物各剂量组细胞上清液 IL-6、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$), iNOS、COX-2 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。

3.4 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NF- κ B、Nrf2 信号通路相关蛋白表达的影响 由图 4 可知, 与对照组比较, 模型组 p-I κ B α 、p-p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物各剂量组 p-I κ B α 、p-p65 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), HMOX1、NQO1 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 高剂量组 Nrf2 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。



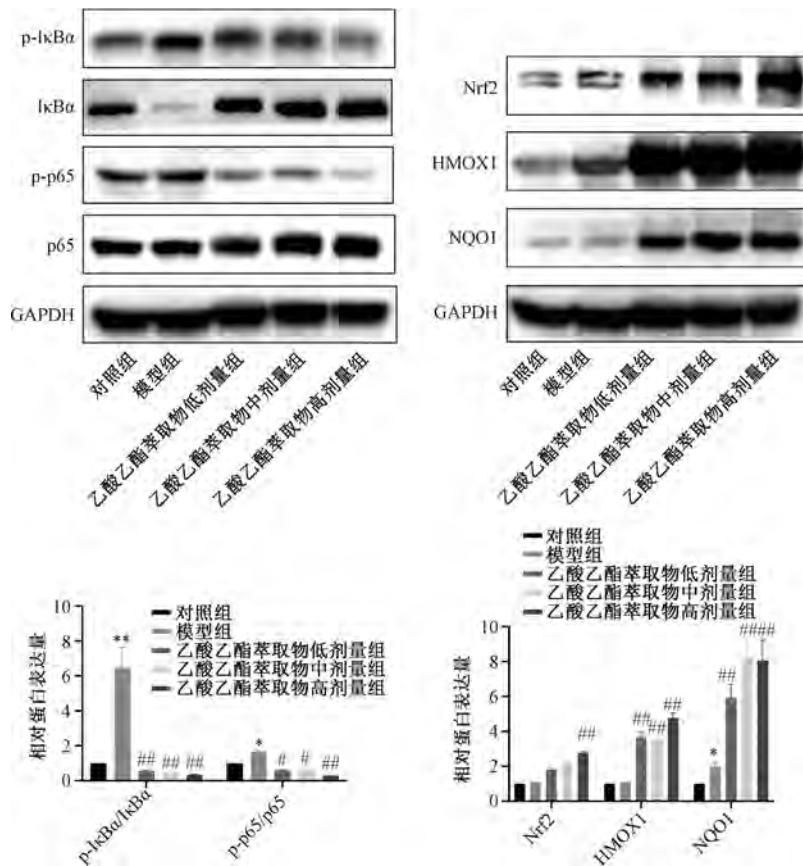
注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图3 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上清液 IL-6、TNF- α 水平及细胞 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

表明龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯部位可能通过抑制 NF- κ B 和激活 Nrf2 信号通路来发挥抗炎作用。

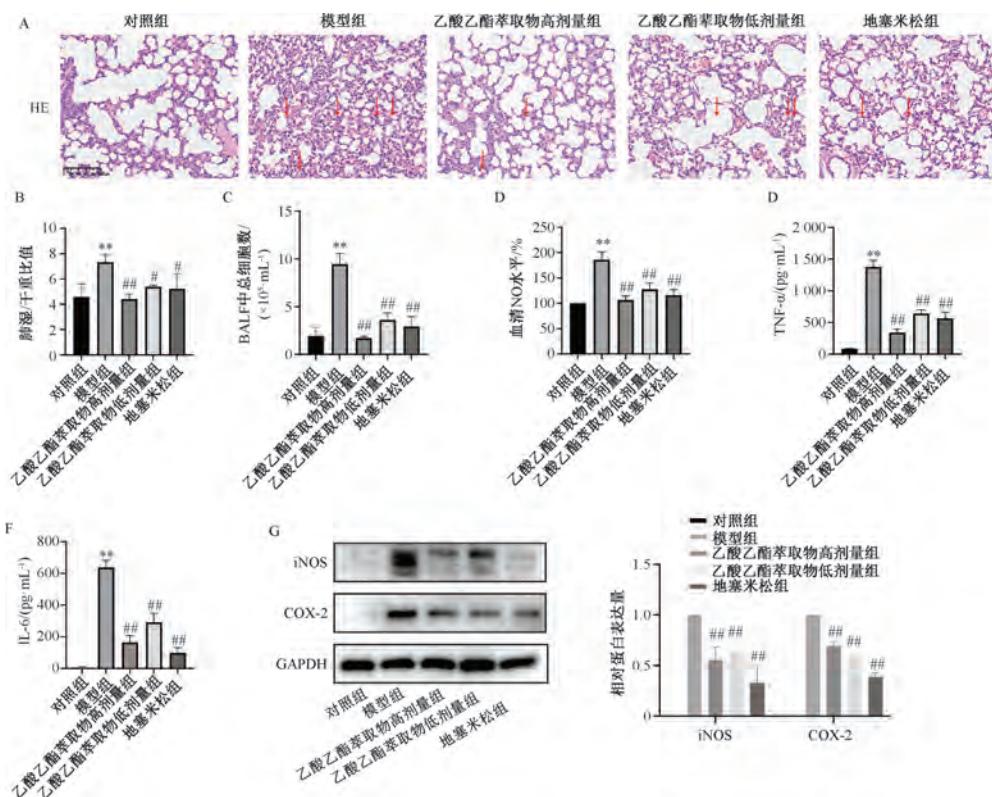
3.5 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对 ALI 小鼠肺组织病理学形态及炎症相关指标的影响 HE 染色结果显示, 对照组小鼠的肺组织结构完整、清晰, 肺泡隔薄; 模型组小鼠肺组织出现损伤、肺泡隔增厚、间质出血和大量中性粒细胞浸润; 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物各剂量组小鼠肺组织炎症和损伤减少, 肺泡隔变薄, 肺间质轻度充血和渗出, 见图 5A。与模型组比较, 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物各剂量组肺湿/干重比、BALF 中的总细胞计数降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图 5B~5C, 表明龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯部位显著抑制了 LPS 导致的肺水肿和中性粒细胞浸润。由图 5D~5F 可知, 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物各剂量组小鼠血清 NO 水平及 BALF 中 TNF- α 、IL-6 水平降低 ($P<0.01$)。由图 5G~5H 可知, 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物各剂量组小鼠肺组织 COX-2、iNOS 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。因此, 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯部位可能通过抑制炎症反应来减轻 LPS 诱导的 ALI。

3.6 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对 ALI 小鼠肺组织



注: 与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01; 与模型组比较, #P<0.05, ##P<0.01。

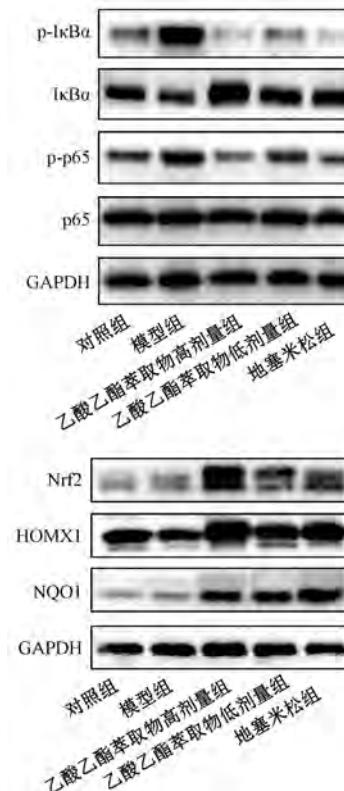
图4 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对LPS诱导RAW264.7细胞NF- κ B、Nrf2信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=3)



注: 图A中红色箭头指示病变部位。与对照组比较, **P<0.01; 与模型组比较, #P<0.05, ##P<0.01。

图5 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对ALI小鼠肺组织病理学形态及炎症相关指标的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

NF-κB、Nrf2信号通路相关蛋白表达的影响。由图6可知,与模型组比较,龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物各剂量组p-IκBα、p-p65蛋白表达降低($P < 0.01$),Nrf2、HMOX1、NQO1蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明



注:与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图6 龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取物对ALI小鼠肺组织NF-κB、Nrf2信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

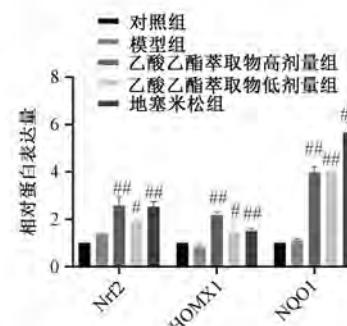
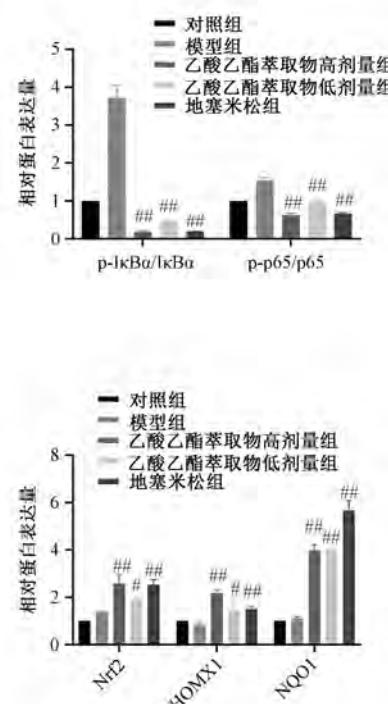
4 讨论

西医虽为治疗ALI的主要手段,但死亡率仍居高不下^[1],可能因其病理涉及炎症、免疫、凝血等多方面,单纯支持疗法效果有限^[16-17]。中医根据ALI的呼吸窘迫、低氧血症等表现,将其归于“喘证”“喘脱”等范畴^[18],多认为其病因病机与“湿热”“痰热”“热毒”等有关,治疗从“炎水共治、宣肺解毒、活血化瘀”等角度入手^[19-20]。研究证实,多种中药能多靶点、多途径减轻肺水肿和异常炎症,且不良反应少。因此,从中药中发现治疗ALI的关键化合物具有重要的临床价值。

研究显示,龙胆叶水提物、醇提物以及乙酸乙酯提取物均具有显著的抗炎活性^[21],此外,也有研究报道龙胆叶二萜具有抗菌活性^[22]。本研究对龙胆叶乙醇提取物的不同极性部位进行活性筛选,发现其乙酸乙酯部位抗炎活性最佳。UPLC-MS/MS分析显示,乙酸乙酯部位含有有机酸、酯类、萜类、黄酮、生物碱等化合物,包括咖啡酸、咖啡酸乙酯、原儿茶酸、山柰酚-3-O-β-D-龙胆二糖苷等具有抗炎或抗氧化活性成分。

在LPS诱导的RAW264.7细胞炎症模型和小鼠ALI模型中,炎症标志物COX-2、iNOS蛋白表达及细胞因子TNF-

龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯部位通过抑制NF-κB信号传导和促进Nrf2通路激活,从而发挥对LPS诱导的ALI的保护作用。



α 、IL-6水平显著升高^[16]。本研究发现,乙酸乙酯部位能有效抑制COX-2、iNOS蛋白表达,降低TNF- α 、IL-6水平。鉴于iNOS、COX-2和细胞因子是NF-κB信号激活的产物,推测其作用机制与NF-κB通路相关^[23]。体内外实验证实,龙胆叶乙醇提取物乙酸乙酯部位降低了关键蛋白IκBα和NF-κB p65亚基的磷酸化水平,表明其通过抑制NF-κB信号通路减轻炎症反应和肺损伤。

氧化应激与炎症在ALI中形成恶性循环^[24]。Nrf2是调节抗氧化反应的关键转录因子(调控HMOX1、NQO1等基因),并可能通过抑制NF-κB通路控制炎症^[11]。本研究结果表明,乙酸乙酯部位能增加Nrf2及其靶基因HMOX1、NQO1的表达,激活Nrf2信号通路。Nrf2激活是否作为抑制NF-κB的上游机制,尚需进一步研究。

综上所述,龙胆叶乙醇提取物的乙酸乙酯部位在体外和体内模型中均表现出显著抗炎作用,能够缓解ALI,其机制与抑制NF-κB信号通路及激活Nrf2信号通路有关。乙酸乙酯部位中含有的咖啡酸、咖啡酸乙酯、原儿茶酸、山柰酚-3-O-β-D-龙胆二糖苷等可能是其抗炎抗氧化的主要有效成分。后续需对这些单体成分进行定量分析及活性对比研究,以明确龙胆叶治疗炎症相关疾病的药理学基础。

参考文献:

- [1] He Y Q, Zhou C C, Yu L Y, et al. Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105224.
- [2] Wang Y, Wang Y C, Ma J, et al. Yupingsfengsan ameliorates LPS-induced acute lung injury and gut barrier dysfunction in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 312: 116452.
- [3] Kong L M, Deng J, Zhou X, et al. Sitagliptin activates the p62-Keap1-Nrf2 signalling pathway to alleviate oxidative stress and excessive autophagy in severe acute pancreatitis-related acute lung injury[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(10): 928.
- [4] 周有文, 黄晟鸿, 王峰, 等. 龙胆叶的化学成分、药理活性及质量分析研究进展[J]. 武汉大学学报(理学版), 2024, 70(2): 201-212.
- [5] 萧步丹. 岭南采药录[M]. 广州: 广东科技出版社, 2009.
- [6] 高汉森, 黄兆胜. 家庭食疗中药[J]. 广州: 广东科技出版社, 2003.
- [7] Li M, Cui Y D, Zhu M, et al. Isolation and characterization of secondary metabolites from the leaves of *Sauvopspatalifolius* Beille and their potential biological assays[J]. *Fitoterapia*, 2022, 156: 105100.
- [8] Wei X C, Li Y, Li M, et al. The protective effects of *Sauvopspatalifolius* on acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. *J Sci Food Agric*, 2018, 98 (12): 4420-4426.
- [9] Wu P Q, Cui Y S, Han X Y, et al. Diterpenoids from *Sauvopspatalifolius* leaves with antimicrobial activities[J]. *J Nat Prod*, 2022, 85(5): 1304-1314.
- [10] Xia X, Lu Y, Chen D F. 2-Acylpyrrole-based alkaloids from the leaves of *Sauvopspatalifolius* and their α -glucosidase inhibitory activities[J]. *Bioorg Chem*, 2025, 155: 108134.
- [11] Li W G, Khor T O, Xu C J, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF κ B-inflammatory response and elicits apoptosis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(11): 1485-1489.
- [12] 蔡梦婷, 杨亚玲, 李锡涛, 等. UHPLC-ESI-Orbitrap-MS法分析龙胆叶化学成分[J]. 中成药, 2023, 45(6): 1906-1913.
- [13] 秦威, 丘琴, 庚丽峰, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS 的龙胆叶乙酸乙酯部位化学成分的研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(12): 201-204.
- [14] 丘琴, 覃芳芳, 韦红杏, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析龙胆叶醇提物化学成分与咳嗽大鼠体内入血成分和代谢原型成分[J]. 药物评价研究, 2025, 48(1): 157-166.
- [15] 李融. 秋鼠曲草、龙胆叶和黄芩三种植物的化学成分及抗急性肺损伤活性研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2019.
- [16] Guo H Y, Li X, Sang X T, et al. Design and synthesis of forsythin derivatives as anti-inflammatory agents for acute lung injury[J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 267: 116223.
- [17] 刘雨默, 潘郭海容, 梁群. 肺毒症急性肺损伤发病机制研究进展[J]. 疑难病杂志, 2022, 21(8): 868-871; 876.
- [18] 许飞, 吴久在, 张强强, 等. 单味中药提取物防治急性肺损伤机制探究[J]. 神经药理学报, 2022, 12(3): 34-38.
- [19] 李赋, 张志明, 宋忠阳, 等. 中医药防治急性肺损伤作用机制研究进展[J]. 中医药信息, 2022, 39(10): 80-84; 89.
- [20] 孙德阳, 杨洋, 梁群. 中医药治疗肺毒症急性肺损伤的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2019(5): 1108-1110.
- [21] 李童, 黄锁义. 龙胆叶研究的新进展[J]. 微量元素与健康研究, 2022, 39(4): 42-44.
- [22] 关基敏. 壮药龙胆叶的研究进展[J]. 中南农业科技, 2023, 44(8): 235-238.
- [23] Jang S E, Hyam S R, Jeong J J, et al. Penta-O-galloyl- β -D-glucose ameliorates inflammation by inhibiting MyD88/NF- κ B and MyD88/MAPK signalling pathways[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 170(5): 1078-1091.
- [24] Meng L L, Wang M Y, Gao Y X, et al. Dopamine D1 receptor agonist alleviates acute lung injury via modulating inflammatory responses in macrophages and barrier function in airway epithelial cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 202: 2-16.