

不同加工方式绞股蓝的抗炎活性比较研究

徐书杨^{1,2,3}, 杨紫晴^{1,2,3}, 滕菲², 王汛江³, 黄琴⁴, 金德珍⁴, 李敏², 刘守金¹,
王峥涛³, 丁丽丽^{3*}, 朱晶晶^{2*}

- (1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 上海中医药大学 中药研究所, 上海市复方重点实验室, 中药标准化教育部重点实验室暨国家
中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203;
4. 平利县茶叶和绞股蓝发展中心, 陕西 安康 725500)

[摘要] 该研究旨在从体内、外探究晾晒干燥和杀青烘干 2 种不同干燥方式绞股蓝总皂苷及其差异部位对急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 小鼠炎症的改善作用。通过野生型 C57BL/6J 雄性小鼠气道喷雾脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 构建模型, 造模 24 h 后尾静脉注射给药。采用肺功能、肺组织湿重干重比 (W/D)、肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 总蛋白浓度、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 含量等指标及肺组织病理变化评价不同绞股蓝皂苷对 ALI 小鼠的改善作用。研究发现晾干绞股蓝总皂苷 (YGPs) 和 1~2 个糖基取代的绞股蓝稀有皂苷 (GPs₁₋₂) 可以改善 ALI 小鼠肺功能, BALF 中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平显著降低, 肺部炎症得到改善, 且 GPs₁₋₂ 抑制 RAW264.7 细胞中 NO 释放率作用更为显著。该研究表明, 绞股蓝采用不同干燥方式会对其抗炎活性造成影响, 未杀青晾干绞股蓝产生的稀有皂苷具有更佳的抗炎活性。

[关键词] 绞股蓝总皂苷; 加工方式; 急性肺损伤; 抗炎活性; 稀有皂苷; 糖链长度

Comparison on anti-inflammatory activity of *Gynostemma pentaphyllum* processed with different methods

XU Shu-yang^{1,2,3}, YANG Zi-qing^{1,2,3}, TENG Fei², WANG Xun-jiang³, HUANG Qin⁴, JIN De-zhen⁴,
LI Min², LIU Shou-jin¹, WANG Zheng-tao³, DING Li-li^{3*}, ZHU Jing-jing^{2*}

- (1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Compound Medicine, MOE Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicines and SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
4. Pingli Tea and *Gynostemma pentaphyllum* Development Center, Ankang 725500, China)

[Abstract] The aim of this study is to investigate the effects of *Gynostemma pentaphyllum* dried with two different methods (air drying and heating) on inflammation in acute lung injury (ALI) mice *in vivo* and *in vitro*. Lipopolysaccharide (LPS) was sprayed into the airway of wild type C57BL/6J male mice to establish the model, and the drug was injected into the tail vein 24 h after modeling. Lung function, lung tissue wet/dry weight (W/D) ratio, the total protein concentration, interleukin 6 (IL-6), IL-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and pathological changes of the lung tissue were used to evaluate the effects of different gypenosides on ALI mice. The results showed that total gypenosides (YGPs) and the gypenosides

[收稿日期] 2023-05-06

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04408); 国家自然科学基金项目 (82122074, 82274165, 81920108033, 82130115)

[通信作者] * 朱晶晶, 研究员, E-mail: zhujj15@163.com; * 丁丽丽, 研究员, E-mail: nail8219@hotmail.com

[作者简介] 徐书杨, 硕士研究生, E-mail: xsy980326@163.com

substituted with one or two glycosyl ($GP_{s_{1-2}}$) in the air-dried sample improved the lung function, significantly lowered the levels of IL- 1β and TNF- α in BALF, and alleviated the lung inflammation of ALI mice. Moreover, $GP_{s_{1-2}}$ had a more significant effect on inhibiting NO release in RAW264.7 cells. This study showed that different drying methods affected the anti-inflammatory activity of *G. pentaphyllum*, and the rare saponins in the air-dried sample without heating had better anti-inflammatory activity.

[Key words] gypenosides; processing method; acute lung injury; anti-inflammatory activity; rare saponins; sugar chain length

DOI:10.19540/j.cnki.cjmm.20230711.303

《素问·五脏生成论》曰:“诸气者,皆属于肺”。肺作为哺乳动物体内气体交换的主要器官,同时也是一种重要的免疫器官^[1]。当今世界,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)及最终重症阶段急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)日趋严重,其中 ALI 的病死率为 40%~60%, ARDS 的病死率为 50%,老年人的病死率更是高达 87.5%^[2],严重影响人民生命健康。ALI 的特征是多种肺损伤引起的病理性改变,包括肺毛细血管通透性增加、炎症细胞浸润增强及弥漫性肺泡和间质水肿^[3]。肺内浸润的多种炎症细胞释放炎症介质加重肺损伤,因此,抑制炎症反应的发生是治疗 ALI 的重要策略^[4-5]。

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 为葫芦科绞股蓝属植物,性甘寒,微苦,主要含有皂苷、多糖、黄酮类等多种成分。现代药理学研究表明,绞股蓝具有清热解毒、消炎镇痛、止咳清肺祛痰、养心安神、补气生精之功效,用于降血压、降血脂、护肝、促进睡眠以及肠胃炎、气管炎、咽喉炎的治疗^[6]。药材采收后进行的初步处理和干燥等称之为产地初加工,基于传统经验形成的药材产地加工方法蕴涵着丰富的科学道理,赋予了中药材性状、规格、品质、药性等诸多内涵。然而为适应规模化生产需求,目前药材产地加工存在以下共性问题:药材传统加工工艺正逐渐被现代化的加工手段取代,但是,现代产地加工方法是否科学,缺乏系统评估。皂苷作为绞股蓝的主要活性成分,前期研究已发现,不同加工方式对绞股蓝皂苷成分组成有影响,采用现代杀青烘干和传统晾晒 2 种不同干燥方式的绞股蓝样品,皂苷类成分差异显著^[7]。杀青干燥的绞股蓝样品主含 3~4 个糖基取代的皂苷,传统晾晒的绞股蓝样品,在葡萄糖苷酶的作用下原型皂苷脱糖而产生大量 1~2 个糖基取代的绞股蓝稀有皂苷,结构类似于人参稀有皂苷。本研究选取滚筒杀青干燥绞股蓝总皂苷(GTGP_s)和晾晒干燥绞股蓝总皂苷(YG-

GP_s),以及 1~2 个糖基取代的绞股蓝稀有皂苷($GP_{s_{1-2}}$)和 3~4 个糖基取代的绞股蓝皂苷($GP_{s_{3-4}}$) 2 个部位^[8],采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导炎症细胞及动物模型,从体内、体外 2 个方面探究其抗炎活性,为绞股蓝产地加工提供科学依据。

1 材料

CCL-1708-8 细胞培养箱、ACZ-6S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司);CKX53SF 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);G1-802B 蠕动泵(保定雷弗流体科技有限公司);SQP 分析天平(上海菁海仪器有限公司);F2AB08454 超纯水系统(美国 Millipore 公司);ULTS1490 -80 °C 超低温冰箱(美国 Thermo 公司);MIX-25 涡旋振荡仪、BM106-4A 微孔板恒温振荡器(杭州奥盛仪器有限公司);Spark 10M 多功能酶标仪(美国 EnVision 公司);ZR-06 小鼠尾静脉注射显像仪(原阳县振华教学仪器有限公司);WBP-8M 全身体积描记系统、DP-M 喷雾针(上海塔望智能科技有限公司);MP3002J 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);CT15RE;冷冻离心机(日本 Hitachi 公司);SK-SI 高通量组织研磨仪(上海必横生物科技有限公司);SIM-F140AY65-PC 制冰机(日本 SANYO 公司);20005445 液氮容器(上海隆拓仪器设备有限公司)。

滚筒杀青干燥绞股蓝总皂苷(GTGP_s)、晾晒干燥绞股蓝总皂苷(YGGP_s)、1~2 个糖基取代的绞股蓝稀有皂苷($GP_{s_{1-2}}$)、3~4 个糖基取代的绞股蓝皂苷($GP_{s_{3-4}}$)(实验室自制,纯度 $\geq 80\%$);1×DPBS 缓冲液、P/S、Trypsin、胎牛血清、(美国 Gibco 公司,批号分别为 2118883、149940、2537166、1739463);LPS(美国 Sigma 公司,批号 0000110441);CCK-8 试剂盒、1×PBS 缓冲液、DMEM 培养基、RPMI1640 培养基(大连美仑生物技术有限公司,货号分别为 MA0218-3-Mar-05G、MA0015-Mar-17L、MA0212-Mar-15L、MA0215-Nov-22H);磷酸、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 20130118、20220112);白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)酶联

免疫试剂盒、白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β) 酶联免疫试剂盒、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 酶联免疫试剂盒(美国 Novus 公司,批号分别为 600304G、601101、601009);BCA 蛋白测定试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号 B8216930);通用型组织固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号 CR2112157)。

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7,购于中国科学院细胞库。

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只,5 周龄,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXK(沪)2017-0005,饲养于上海中医药大学实验动物中心,室温 22℃,湿度 60%~70%,12 h 昼夜交替,自由摄食饮水。实验方案已通过上海中医药大学实验动物伦理委员会批准,伦理编号 PZSHUTCM2212180003。

2 方法

2.1 药物制备

GTGPs、GPs₃₋₄:取福建省南靖县和溪镇迎富村杀青干燥绞股蓝药材,打粉后用 70% 乙醇料液比 1:25 加热回流 2 次,每次 2 h。提取液减压浓缩至无醇味,过 D101 大孔树脂,吸附 24 h,分别用水、30% 乙醇洗脱除杂,70% 乙醇洗脱液按柱体积依次收集,合并。

YGGPs、GPs₁₋₂:取福建省南靖县和溪镇迎富村晾干绞股蓝药材,打粉后用 70% 乙醇料液比 1:25 加热回流 2 次,每次 2 h。提取液减压浓缩至无醇味,过 D101 大孔树脂,吸附 24 h,分别用水、30% 乙醇洗脱除杂,60% 乙醇洗脱大部分含 3~4 个糖皂苷,70% 乙醇洗脱液按柱体积依次收集,合并。

2.2 细胞实验

细胞培养:使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基,在含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱进行常规培养。每 2 d 换液 1 次,当细胞密度达到 80%~90% 时传代,选择对数生长期的细胞进行实验,实验操作均在生物安全柜中进行。

细胞传代:细胞在培养皿中覆盖率达到 80%~90% 时,弃去旧培养基,用细胞刮刀刮取细胞,待大部分细胞从壁上脱落,计数,以 $2.5 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个/mL 的细胞密度加入新的培养皿中培养。

2.3 细胞活力检测

取细胞悬液,按 2×10^5 个/mL 的细胞密度进行

铺板,待细胞完全贴壁后给药。给药 24 h 后,加入 10% CCK-8 试剂溶液,于 37℃ 细胞培养箱中继续孵育 30 min。孵育结束后,使用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度。

2.4 一氧化氮释放检测

实验分成空白组、模型组和化合物干预组,每组 6 复孔。将 RAW264.7 细胞按照 2×10^5 个/mL 的细胞密度铺于 96 孔板中,并在 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养 24 h,待细胞完全贴壁,弃去旧培养基,干预组加入不同浓度的含化合物培养基,空白组和模型组加入新的不含化合物的培养基,培养 30 min 后,干预组和模型组加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 溶液 $1 \mu\text{L}$,培养 24 h 后取上清液与 Griess 试剂各 50 mL 混合均匀,使用酶标仪在 540 nm 下检测每孔的吸光度并计算各组 NO 释放率。

2.5 动物分组、造模及给药方法

8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周,随机分为 6 组,每组 5 只,包括空白对照组(CTRL)、模型组(LPS)、阳性药地塞米松组(DEX, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、晾晒干燥绞股蓝总皂苷低剂量组(YGGPs-L, $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中剂量组(YGGPs-M, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量组(YGGPs-H, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。分组后适应性喂养 2 d,气管雾化 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS 造模,悬挂 2 min 后放回饲养笼,对照组给予等量 PBS 缓冲液。造模 24 h 后尾静脉注射药物,对照组和模型组给予等量生理盐水,给药 24 h 后取材。

8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠适应性饲养待小鼠平均体质量达到 28 g 后,随机分为 6 组,每组 5 只,包括空白对照组(CTRL)、模型组(LPS)、阳性药地塞米松组(DEX, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、滚筒杀青干燥绞股蓝总皂苷组(GTGPs, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、晾晒干燥绞股蓝总皂苷组(YGGPs, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、1~2 个糖基取代的绞股蓝稀有皂苷组(GPs₁₋₂, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、3~4 个糖基取代的绞股蓝皂苷组(GPs₃₋₄, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。分组后适应性喂养 2 d,气道雾化 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS 造模,悬挂 2 min 后放回饲养笼,对照组给予等量 PBS 缓冲液。造模 24 h 后尾静脉注射药物,对照组和模型组给予等量生理盐水,给药后 24 h 取材。

2.6 肺功能测量

给药 24 h 后,将小鼠放入全身体积描记系统的检测器中,平衡后开始记录 6 min 内各项指标的数据,取各项检测指标的平均值作为评价肺功能情况

的依据。肺功能指标包括吸气时间 (inspiratory time, T_i)、呼气时间 (expiratory time, T_e)、增强呼吸间歇 (enhanced pause, $Penh$)、呼吸频率 (frequency, F)、潮气量 (tidal volume, TV)、呼出 50% 气量呼吸流速 (expiratory flow 50, $EF50$)、最大吸气流速 (peak inspiratory flow, PIF)、最大呼气流速 (peak expiratory flow, PEF) 和吸气时间/呼气时间 (volbal)。

2.7 肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 指标检测

将小鼠用异氟烷麻醉后脱颈处死, 剪开胸腔, 结扎左肺叶, 将注射器的针头插入支气管, 灌入 1 mL PBS 缓冲液反复抽吸 3 次, 4 °C 条件下 $1\ 500\ r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min 取上清, 得到肺泡灌洗液。按照 BCA 试剂盒使用说明, 测定肺泡灌洗液中蛋白浓度。按照 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 试剂盒使用说明, 测定肺泡灌洗液中炎症因子的浓度。

2.8 肺组织湿重干重比 (W/D) 检测

称取小鼠左肺叶质量计为肺组织湿重 (W), 随后放入 60 °C 烘箱烘 48 h 直至完全干燥, 称取此时小鼠左肺叶质量记为干重 (D), 计算 W/D 。

2.9 肺组织 HE 染色

切取肺左叶相同部位, 于通用型组织固定液中固定, 常规石蜡包埋后切片, 置于载玻片上。经脱蜡后, 苏木素染色约 3 min, 流水冲洗 1 min。伊红溶液中浸泡 30 s, 流水冲洗 1 min。乙醇脱水后烤干, 用

50% 中性树胶二甲苯溶液封片, 晾干。显微镜下观察肺组织的形态变化。

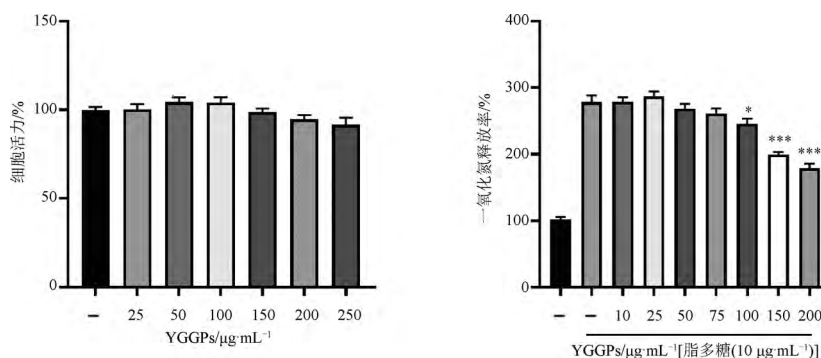
2.10 统计学处理

应用 GraphPad Prism 9.4.1 软件进行分析, 实验结果均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 2 组数据比较采用 t 检验 (student's t test)。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 YGGPs 的体外抗炎活性评价

采用 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型评价绞股蓝皂苷体外抗炎活性。利用 CCK-8 检测不同浓度 YGGPs (25、50、100、150、200、250 $\mu g \cdot mL^{-1}$) 对 RAW264.7 细胞的生存率的影响。YGGPs 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 以下质量浓度作用于 RAW264.7 细胞, 细胞存活率均在 90% 以上, 与对照组相比无显著性差异, 证明 YGGPs 质量浓度在 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 以下对 RAW264.7 细胞无细胞毒性。给予不同质量浓度的 YGGPs (10、25、50、100、150、200 $\mu g \cdot mL^{-1}$) 预处理后, 采用 LPS 对 RAW264.7 细胞进行诱导, YGGPs (100、150、200 $\mu g \cdot mL^{-1}$) 处理组与模型组相比显著抑制 NO 释放水平。其中 YGGPs 在 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时抑制率为 35.97%, 效果最佳, 见图 1。以上结果表明, YGGPs 在体外具有一定的抗炎作用。



YGGPs. 晾晒干燥绞股蓝总皂苷; 与 LPS 组比较 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 YGGPs 体外抗炎活性评价 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Anti-inflammatory activity of YGGPs *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

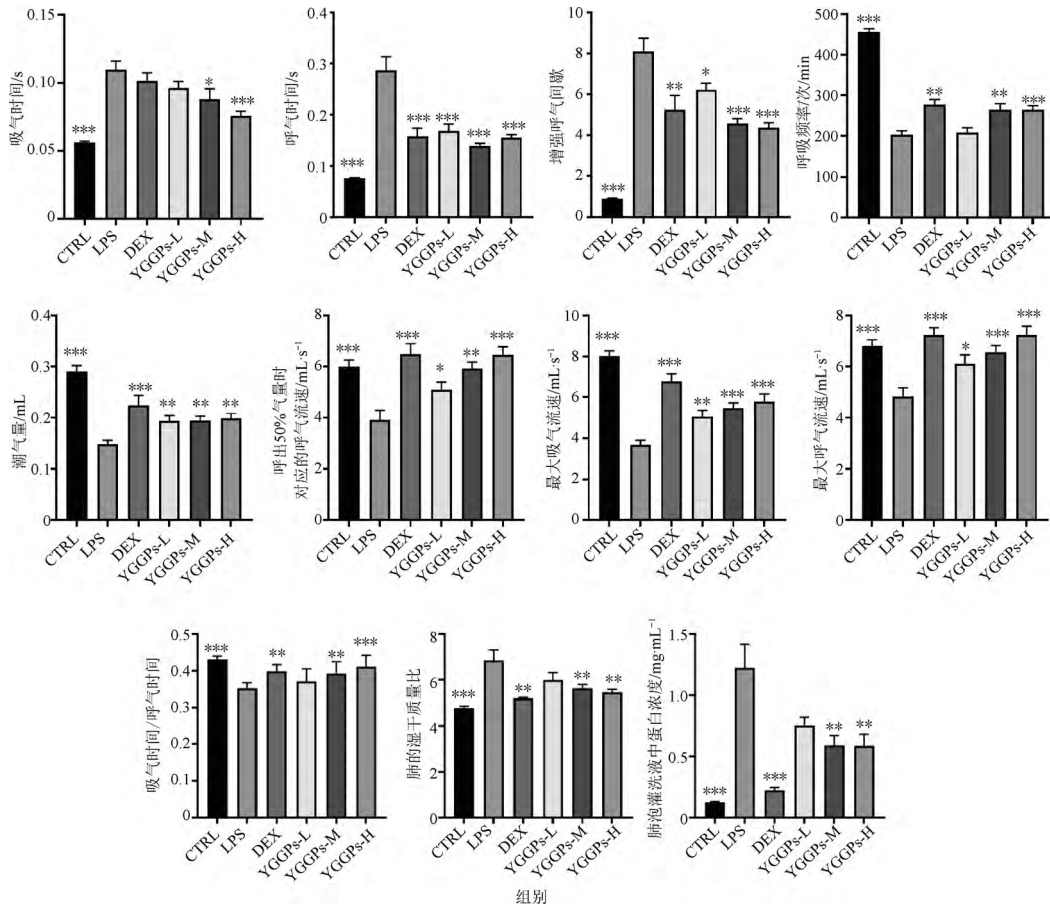
3.2 YGGPs 剂量依赖性改善 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠的药效评价

3.2.1 不同剂量 YGGPs 对 ALI 小鼠肺功能的影响与 CTRL 组小鼠相比 LPS 组小鼠的肺功能严重

受损, T_i 、 T_e 、 $Penh$ 显著增加 ($P < 0.05$), F 、 TV 、 $EF50$ 、 PIF 、 PEF 和 volbal 显著减少 ($P < 0.05$)。与 LPS 组比较, 给予不同剂量 YGGPs 干预后小鼠 T_i 、 T_e 、 $Penh$ 显著减少 ($P < 0.05$), F 、 TV 、 $EF50$ 、 PIF 、

PEF 和 volbal 显著增加 ($P<0.05$), 且呈现出剂量依赖性关系, 肺功能得到改善, 见图 2。LPS 组肺组织的 W/D 和 BALF 的总蛋白浓度较 CTRL 组显著升高 ($P<0.05$), 给药组较 LPS 组则显著降低,

且具有剂量依赖关系, 见图 2。以上结果表明, 尾静脉给予 YGGPs 可以改善 ALI 小鼠的肺功能及肺组织水肿和蛋白渗漏的情况, 且呈剂量依赖性关系。



CTRL. 空白对照组; LPS. 模型组; DEX. 阳性药地塞米松组; YGGPs-L. 晾晒干燥绞股蓝总皂苷低剂量组; YGGPs-M. 晾晒干燥绞股蓝总皂苷中剂量组; YGGPs-H. 晾晒干燥绞股蓝总皂苷高剂量组; 与 LPS 组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ (图 3、5、6 同)。

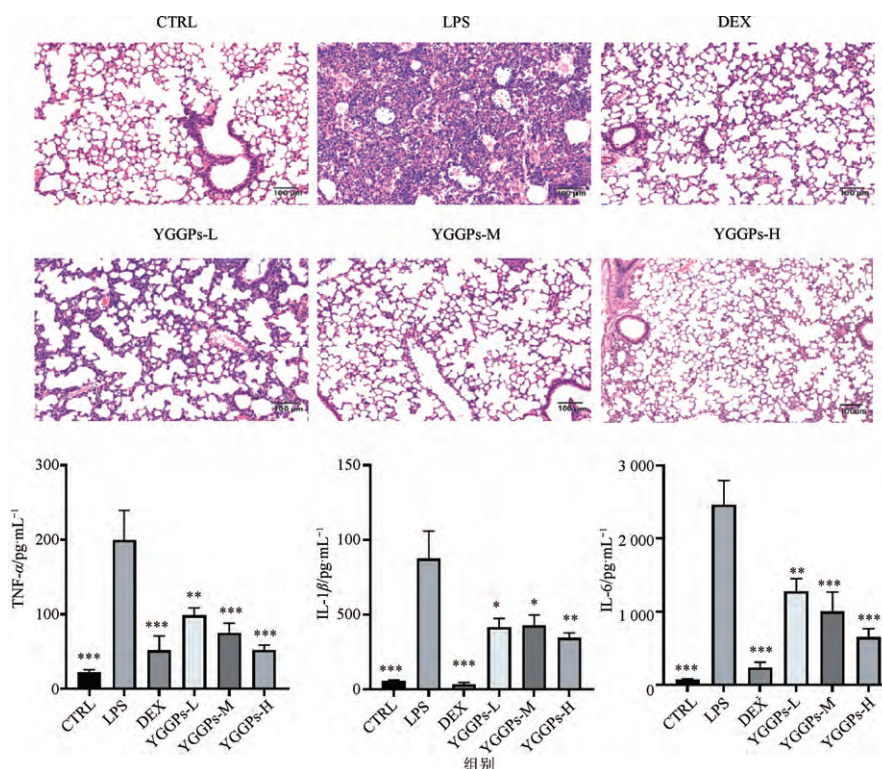
图 2 不同剂量 YGGPs 对急性肺损伤小鼠肺功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Effects of different doses of YGGPs on the lung function in the mouse model of acute lung injury (ALI) ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.2.2 不同剂量的 YGGPs 对 ALI 小鼠肺部炎症反应的影响 各组小鼠肺组织病理学结果表明, 给药 (YGGPs-M、YGGPs-H) 组可以显著减少 ALI 鼠肺泡中的炎症细胞浸润, 维持肺泡形态, 见图 3。与 LPS 组相比, YGGPs 25、50、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 BALF 中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的蛋白水平显著降低 ($P<0.05$), 见图 3。以上结果表明, YGGPs 可以减少 ALI 小鼠肺组织炎性细胞的浸润, 降低肺炎炎症因子的浓度, 缓解肺部剧烈的炎症反应。

3.3 不同加工方式绞股蓝总皂苷体外体内抗炎活性研究

3.3.1 不同加工方式绞股蓝总皂苷体外抗炎活性比较 质量浓度在 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下的 GTGPs、GPs₃₋₄、GPs₁₋₂ 作用于 RAW264.7 细胞, 细胞存活率与正常对照组比均无显著性差异, 证明质量浓度在 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下的 GTGPs、GPs₃₋₄、GPs₁₋₂ 对 RAW264.7 细胞无毒性, 见图 4。当使用不同质量浓度的 GTGPs、GPs₃₋₄、GPs₁₋₂ (10、25、50、75、100、

图3 不同剂量的YGGPs对ALI小鼠肺部炎症反应的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 3 Effects of different doses of YGGPs on the pulmonary inflammation of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

150、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 预处理后, 采用 LPS 对 RAW264.7 细胞进行诱导 24 h, 测定 NO 释放率, 结果证实 GTGPs 在 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度以上对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放有显著的抑制作用, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时抑制率为 13.83%, 见图 4; GPs₃₋₄ 在 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度以上对 NO 释放有显著的抑制作用, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时抑制率为 19.95%, 见图 4; GPs₁₋₂ 在 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度以上对 NO 释放有显著的抑制作用, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时抑制率为 63.06%, 值得注意的是, GPs₁₋₂ 在 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放率与空白组几乎相当, 见图 4。

3.3.2 GTGPs、YGGPs、GPs₁₋₂ 体内抗炎活性研究
实验发现 YGGPs 对小鼠 ALI 的改善作用随给药剂量的增加, 改善效果逐渐增强, 50、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的各项检测指标均有明显改善, 其中 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药剂量低且改善作用与 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药剂量改善作用相当, 因此选取 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量进行下一步研究。

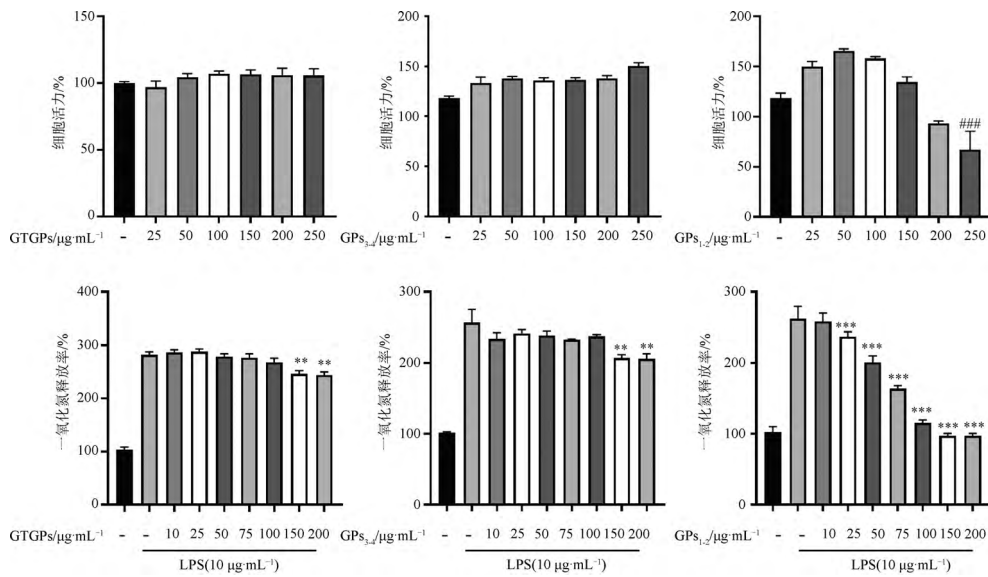
与 LPS 组小鼠相比, 给药组小鼠的肺功能得到一定改善, 小鼠 Ti、Te、Penh 显著减少 ($P < 0.05$), F、

TV、EF50、PIF、PEF 和 volbal 显著增加 ($P < 0.05$), 见图 5。给药组肺组织的 W/D 和 BALF 的总蛋白浓度较 LPS 组显著降低 ($P < 0.05$), 见图 5。

各组小鼠肺组织病理学结果表明, 给药组可以显著减少 ALI 小鼠肺泡中的炎症细胞浸润, 维持肺泡形态, 见图 6。给药组小鼠 BALF 中 IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 6。同剂量下 YGGPs 的改善效果优于 GTGPs, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 YGGPs 与 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 GPs₁₋₂ 效果相当。

4 讨论

达玛烷型四环三萜皂苷广泛存在于绞股蓝、人参、三七等植物中, 并作为主要的活性成分。苷元的结构、糖的连接位置、糖的种类、糖连接方式以及边链的变化均构成达玛烷型三萜皂苷结构的多样性。有文献报道, 不同加工方式会对达玛烷型皂苷的结构和药效产生不同的影响。例如, 人参经高温持续蒸制等热处理后, 会引起皂苷水解、C-20 构型转化等多种化学反应, 产生构型多样的稀有人参皂苷, 且热处理时间长短不同会导致稀有皂苷发生转化, 人参皂苷 Rb₁ 部分转化为人参皂苷 Rd, 随着蒸制时间



GTGPs. 滚筒杀青干燥绞股蓝总皂苷组; $GP_{s_{3.4}}$. 3~4个糖基取代绞股蓝皂苷组; $GP_{s_{1.2}}$. 1~2个糖基取代绞股蓝稀有皂苷组(图5、6同)。与正常对照组比较^{###} $P<0.001$;与LPS组比较^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ 。

图4 GTGPs、 $GP_{s_{3.4}}$ 和 $GP_{s_{1.2}}$ 体外抗炎活性评价($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 4 Anti-inflammatory activities of GTGPs, $GP_{s_{3.4}}$, and $GP_{s_{1.2}}$ *in vitro* ($\bar{x}\pm s, n=6$)

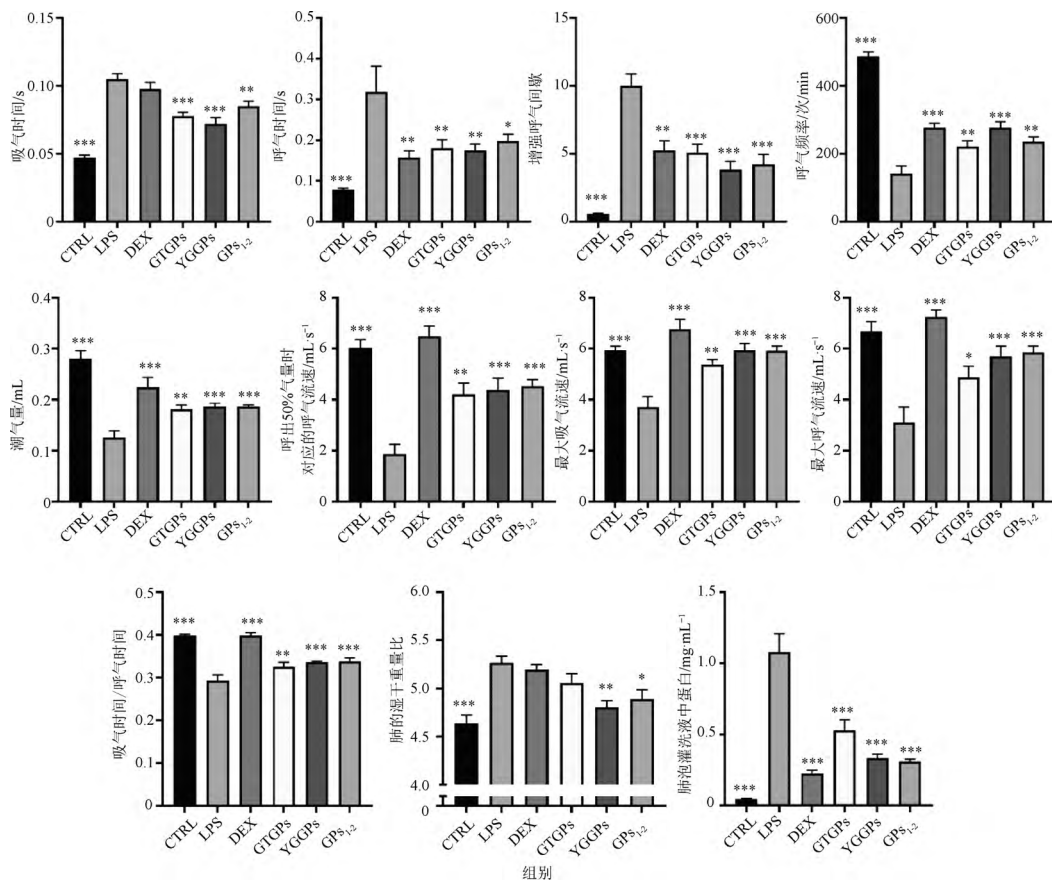


图5 GTGPs、YGGPs和 $GP_{s_{1.2}}$ 对ALI小鼠肺功能的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig. 5 Effects of GTGPs, $GP_{s_{3.4}}$, and $GP_{s_{1.2}}$ on the lung function of ALI mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

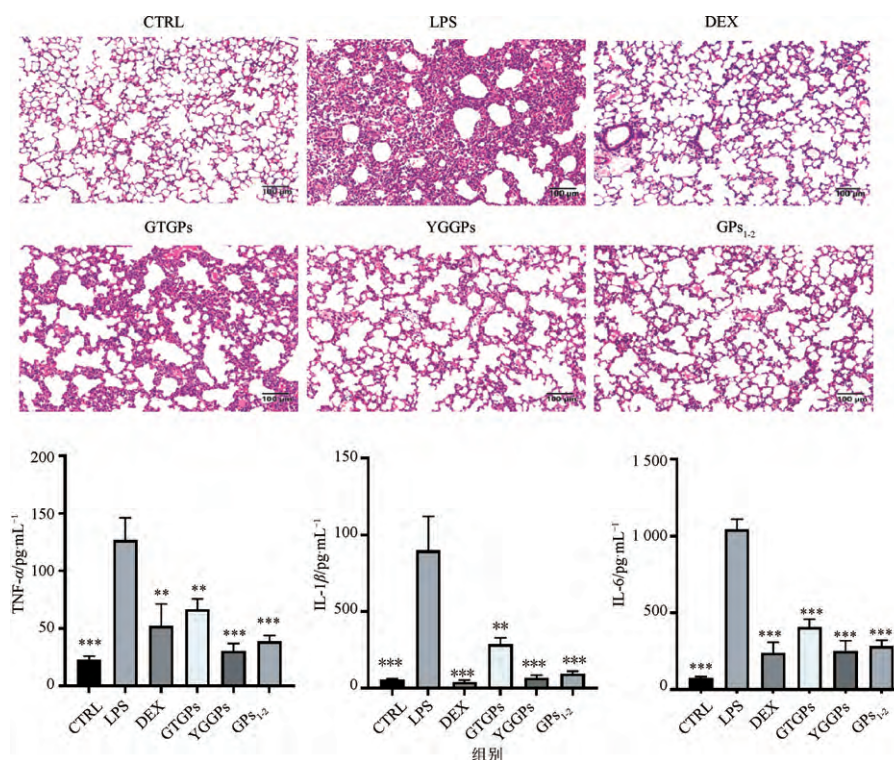


图 6 GTGPs、YGGPs 和 GPs₁₋₂ 对 ALI 小鼠肺部炎症反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 6 Effects of GTGPs, YGGPs, and GPs₁₋₂ on the pulmonary inflammation of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

延长,人参皂苷 Rd 转化为 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rk₅ 等次生人参皂苷^[9-10],在改善代谢类疾病^[11]、诱导内皮依赖性舒张清除自由基^[12]和抗衰老增加皮肤健康^[13]等方面显示更强的活性;三七通过蒸制、发酵等可以增加人参皂苷 Rh₁、Rh₂、20(S/R)-Rg₂、Rg₃、Rk₁ 及 Rg₅ 的含量,在人结肠癌细胞 SW-480 上展现了更强的抗增殖活性^[14]。绞股蓝中已明确结构的皂苷约 1/4 为人参皂苷的异构体,绞股蓝皂苷长时间热处理后转化生成绞股蓝 2 糖苷,可显著提高体外对肺癌 A549 细胞的抑制作用^[15]。

ALI 发病率高,致死率高,现行治疗方法一般通过改善通气、暂时缓解相关症状^[16],缺乏治疗效果可靠的药物,越来越多的研究者将目光转移至具有抗炎作用的中药上,希望从中寻找到安全有效的治疗 ALI 的潜在药物。本研究从体内外探讨不同加工方式对绞股蓝总皂苷抗炎活性的影响。从体内角度,YGGPs 和 GPs₁₋₂ 可以显著减少 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中 NO 释放率,有效的最低质量浓度为 25、100 μg·mL⁻¹。同等给药浓度下,GPs₁₋₂ 对 NO 释放的抑制率效果最佳。从体外角度,主要探

究了 GTGPs、YGGPs 和 GPs₁₋₂ 对 ALI 的改善效果。选择肺功能、BALF 中炎症因子的蛋白浓度、肺组织病理切片、肺组织湿干比作为评价指标,结果显示给予药物治疗后,肺功能检测各项指标均得到不同程度的改善,肺部炎症得到改善,肺损伤减轻。可能是不同加工方式改变了皂苷糖基取代数量、溶解度和膜透性等,影响吸收代谢和作用靶点的结合力,进而影响药效^[17-18]。

综上所述,本研究证实了不同加工方式绞股蓝皂苷、3~4 个糖基取代的绞股蓝皂苷和 1~2 个糖基取代的绞股蓝稀有皂苷,对抗炎活性产生不同的影响,晾干绞股蓝中形成的稀有皂苷具有更强的抗炎活性,研究结果为绞股蓝药材的科学合理加工提供指导,并为绞股蓝总皂苷治疗 ALI 提供数据支持。

[参考文献]

- [1] VIJAY K. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury[J]. Front Immunol, 2020, 2020:11.
- [2] LI W L, LI D, CHEN Y S, et al. Classic signaling pathways in alveolar injury and repair involved in sepsis-induced ALI/ARDS: new research progress and prospect[J]. Dis Markers, 2022,

- 2022; 6362344.
- [3] YASMEEN B, ANNA K, CRAIG T A. Acute lung injury: a clinical and molecular review[J]. Arch Pathol Lab Med, 2016, 140: 345.
- [4] DIAO Y R, DING Q, XU G H, et al. Qingfei Litan Decoction against acute lung injury/acute respiratory distress syndrome; the potential roles of anti-inflammatory and anti-oxidative effects[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 857502.
- [5] MOWERY N T, TERZIAN W T H, NELSON A C. Acute lung injury[J]. Curr Prob Surg, 2020, 57: 100777.
- [6] 范冬冬, 匡艳辉, 向世颢, 等. 绞股蓝化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(5): 342.
- [7] 董利华, 匡艳辉, 范冬冬, 等. 不同加工方式绞股蓝皂苷类成分比较研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 502.
- [8] 范冬冬, 匡艳辉, 董利华, 等. 基于“伴随标志物”在线控制技术的绞股蓝总皂苷纯化工艺及成分鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1331.
- [9] YING A, YU Q T, GUO L, et al. Structural-activity relationship of ginsenosides from steamed ginseng in the treatment of erectile dysfunction[J]. Am J Chinese Med, 2018, 46(1): 137.
- [10] KIM W Y, KIM J M, HAN S B, et al. Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity[J]. J Nat Prod, 2000, 63(12): 1702.
- [11] LEE H, KONG G, TRAN Q D, et al. Relationship between ginsenoside Rg₃ and metabolic syndrome. [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 130.
- [12] KIM E, KIM D, YOO S, et al. The skin protective effects of compound K, a metabolite of ginsenoside Rb₁ from panax ginseng [J]. J Ginseng Res, 2018, 42(2): 218.
- [13] JOHNSON E R, MATTHAY M A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment [J]. J Aerosol Med Pulm D, 2010, 23: 243.
- [14] SUN S, WANG C Z, TONG R, et al. Effects of steaming the root of panax notoginseng on chemical composition and anticancer activities[J]. Food Chem, 2010, 118(2): 307.
- [15] 朴香兰, 杨静, 吴倩, 等. 绞股蓝热处理产物中活性成分的纯化与鉴定及其对 A549 细胞的抑制活性 [J]. 食品科学, 2012, 33(23): 23.
- [16] 薛磊. 急性肺损伤治疗策略的现状与未来 [J]. 上海医学, 2021, 44(8): 571.
- [17] ORPHANIDES A, GOULAS V, GEKAS V. Drying technologies: vehicle to high-quality herbs[J]. Food Eng Rev, 2015, 8: 164.
- [18] 李伟娜, 蒋云云, 刘彦楠, 等. 人参皂苷单体定向转化的生物催化及应用进展 [J]. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1590.

[责任编辑 孔晶晶]