

密生波罗花中神经酰胺类成分的抗炎作用

宋超¹, 管雪婷^{1,2}, 袁巧云^{1*}, 何洋^{1,2*}, 张迹^{1,2}, 胡卫成¹

(1. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

(2. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要: 该研究运用硅胶柱层析法, 结合超高效液相色谱-高分辨串联质谱联用技术以及核磁共振氢谱/碳谱等鉴定方法, 从密生波罗花中分离鉴定了一组以神经酰胺为主的混合物, 其中, 神经酰胺类成分含量为 81.53%, 并对其抗炎作用进行了初步评价。噻唑蓝 (MTT) 检测结果显示低浓度的密生波罗花神经酰胺 (6.25~50 $\mu\text{g/mL}$) 对 RAW264.7 的细胞活性没有显著影响。密生波罗花神经酰胺能显著减少脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞一氧化氮 (NO) 的释放量, 且当浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 NO 释放的抑制率最高, 为 91.07% \pm 0.11%。密生波罗花神经酰胺能高效抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 (TNF- α) 及一氧化氮合酶 (iNOS) 等炎症因子的 mRNA 表达水平, 显著降低 LPS 诱导 RAW264.7 细胞中核因子 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、丙酮酸脱氢酶激酶 1 (PDK1) 及 AKT 蛋白的表达及磷酸化水平。结果表明密生波罗花神经酰胺具有显著的抗炎活性, 并可通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信号通路发挥其抗炎作用, 可为相关保健食品开发和该植物资源的合理利用提供一定的科学依据和数据支撑。

关键词: 密生波罗花; 神经酰胺; 细胞因子; 抗炎; PI3K/AKT 信号通路

文章编号: 1673-9078(2022)11-46-54

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.1416

Anti-inflammatory Effects of Ceramides from *Incarvillea compacta*

SONG Chao¹, GUAN Xueting^{1,2}, YUAN Qiaoyun^{1*}, HE Yang^{1,2*}, ZHANG Ji^{1,2}, HU Weicheng¹

(1. School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China)

(2. College of Food Science and Pharmacology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: In this study, a ceramides-dominant mixture was isolated from *Incarvillea compacta* by silica gel column chromatography and identified by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry along with identification methods such as H/C nuclear magnetic resonance spectroscopy. The ceramides-dominant mixture had a total ceramide content of 81.53%, and its anti-inflammatory effect was preliminarily evaluated. Besides, the anti-inflammatory effect of the total ceramides from *I. compacta* on (LPS)-stimulated RAW264.7 cells were also investigated. The results of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay showed that the ceramides-dominant mixture from *I. compacta* (the ceramide preparation) at low concentrations (6.25~50 $\mu\text{g/mL}$) had no significant effect on the cell viability of RAW264.7 cells. The ceramide preparation significantly inhibited the lipopolysaccharide (LPS)-induced production of nitric oxide (NO), with the highest inhibition rate being 91.07% \pm 0.11% when the concentration of the ceramide preparation was 100 $\mu\text{g/mL}$. The ceramide preparation effectively suppressed the mRNA expressions of interleukin-1 β (IL-1 β), tumour necrosis factor- α (TNF- α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), as well as the protein expressions and phosphorylation of inhibitor- α of NF- κ B (I κ B α), pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), protein kinase B (AKT) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The results of this study showed that the ceramide preparation has significant anti-inflammatory activity, and can exert its anti-inflammatory effect through phosphatidylinositol 3-kinase / protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway. The experimental results

引文格式:

宋超,管雪婷,袁巧云,等.密生波罗花中神经酰胺类成分的抗炎作用[J].现代食品科技,2022,38(11):46-54

SONG Chao, GUAN Xueting, YUAN Qiaoyun, et al. Anti-inflammatory effects of ceramides from *Incarvillea compacta* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 46-54

收稿日期: 2021-12-16

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20171269); 江苏省高校自然科学基金重大项目 (18KJA550001)

作者简介: 宋超 (1991-), 男, 硕士, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: 1185710183@qq.com

通讯作者: 袁巧云 (1981-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: qiaoyunyan@163.com; 共同通讯作者: 何洋 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 药理学, E-mail: heyang2166@163.com

of this work can provide certain scientific and data support for the development of related health foods and rational utilization of plant resources.

Key words: *Incarvillea compacta*; ceramides; cytokine; anti-inflammation; PI3K/AKT signaling pathway

主产于西藏、云南、四川、甘肃等省的密生波罗花 (*Incarvillea compacta* Maxim.), 是我国特有植物, 为紫葳科 (*Bignoniaceae*) 角蒿属 (*Incarvillea* A. Juss) 多年生草本植物, 生长于海拔 3 300~4 900 m 的草坡^[1], 是常用藏药, 全草入药。据《中华本草: 藏药卷》和《藏药志》记载, 密生波罗花具有清热、解毒、燥湿、消食之功效^[2,3], 主要用于治疗肺炎、发热、黄疸、中耳炎、高血压、胃痛等病症^[4], 其中, 以其抗炎作用最为引人注目。然而, 目前关于密生波罗花药理作用的机理和生物活性成分的研究仍仅有很少的文献报道。吴海峰等^[5]从密生波罗花根中分离了 Z-3"-异甲氧基圆齿列当苷、3"-甲氧基圆齿列当苷、圆齿列当苷和异角胡麻苷等 4 个苯乙醇苷类化合物。Zhao 等^[6]分析了密生波罗花的化学组成, 鉴定了 23 种化合物, 包括苯丙素苷类、黄酮类、环烯醚萜苷类、三萜类、类固醇等化合物。王明明等^[7]从密生波罗花醇提取物中分离鉴定了亚麻酸甲酯、苜蓿素、鼠李素等 10 种化合物。近年来, 郭佳佳等^[8]从密生波罗花的不同萃取物中鉴定出 25 种化合物, 并初步证实了密生波罗花水提物具有显著的抗氧化作用和镇痛作用。本实验室在之前的研究中也从密生波罗的根部分离了多种苯乙醇苷类化合物, 证明其具有显著的抗氧化活性和肝保护作用^[9,10]。

神经酰胺 (Ceramides) 作为一种鞘脂类物质, 是近年来新兴的功能食品、药品和化妆品中的活性成分, 对皮肤角质层形成、维持皮肤屏障、保湿、抗衰老等生理功能具有重要作用^[11]。此外, 神经酰胺还具有调控细胞凋亡、调节应激反应、促进细胞内钙平衡等多种生理作用^[12]。纪漫等^[13]从龙眼核中分离了富含神经酰胺的活性脂质组分, 并发现其对皮肤成纤维细胞和人永生角质形成细胞的增殖活性具有明显的促进作用。赵超等^[14]采用反复硅胶柱色谱法等分离纯化方法, 并通过质谱、核磁共振等波谱分析方法从黑骨藤中分离鉴定了 2 个神经酰胺类化合物。李海池等^[15]则采用超临界 CO₂ 萃取-分子蒸馏法提取了魔芋神经酰胺。目前, 从食用或药用植物资源中分离神经酰胺类物质及生理活性应用研究仍显不足。此外, 神经酰胺在动植物中的含量普遍较少, 因此选取富含神经酰胺的动植物资源, 开发功能食品、药品和化妆品已成为神经酰胺开发利用的研究热点。

炎症是动物机体在受到损伤或感染后, 在各种致炎因子作用下所发生的一系列由多种细胞、多种因子参与的复杂保护性应激反应, 通常在原发的具有血管

系统的组织附近首先出现^[16,17]。适度炎症会通过激活免疫系统来清除病原体, 并促进受损伤组织的愈合, 如吞噬搬运坏死组织, 消除致病因子等, 但是过量的细胞因子、趋化因子等炎症介质会产生级联放大效应, 将进一步加剧炎症损伤^[18], 从而增加包括癌症在内的多种疾病的发病率和死亡率^[19,20]。引起炎症的因素很多, 主要有细菌、病毒、支原体等病原微生物感染, 菌体成分如存在于革兰阴性细菌外膜的脂多糖毒素 (LPS) 等是细菌感染导致的急性炎症反应中的关键介质, LPS 介导的信号传导途径可引起炎症信号的级联传导或瀑布反应, 刺激免疫细胞过量分泌肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-17 (IL-17) 及白细胞介素-1 β (IL-1 β) 等促炎细胞因子, 可引起多个器官衰竭, 甚至出现中毒性休克乃至患者死亡^[21,22]。因此, 抑制前炎症分子的产生成为预防和治疗各种疾病的重要靶点^[23]。本研究通过构建密生波罗花神经酰胺类成分对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞体外细胞炎症模型来探讨密生波罗花神经酰胺类成分的抗炎功效, 为保护和合理开发利用我国这一民族药用植物资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

密生波罗花: 购于青海省西宁市药材市场, 由中国医学科学院药用植物研究所吴海峰研究员鉴定, 样品保存在淮阴师范学院生命科学学院。四甲基乙二胺 (TEMED), 上海碧云天生物技术有限公司; 亚硝酸钠、噻唑蓝 (MTT)、台盼蓝、脂多糖 (LPS)、胎牛血清 (FBS), 美国 Sigma 公司; 1640 培养基、抗生素, 美国 Gibco 公司; 蛋白质 Marker, 美国 NEB 公司; 微量 BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、30% 丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液, 北京康为世纪生物科技有限公司; 过硫酸铵, 国药集团化学试剂有限公司; Trizol, 美国 Invitrogen 公司; 抗体 TNF- α 、COS-2、iNOS、 β -actin, 美国 Cell Signaling 公司。

1.2 仪器与设备

Bruker Avance III 400 M 核磁共振波谱仪 (氘代吡啶)、Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪, 美国 Dionex 公司; 串联 Thermo Q Exactive Plus 型高分辨质谱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 化合物分析鉴定软件,

美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PCR 扩增仪, ABI 公司; 电泳槽、Gel XP System 伯乐凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 数码凝胶图像处理系统, 上海天能科技有限公司; 分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; Tecan Infinite M200PRO 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; 二氧化碳培养箱, 日本 SANYO 公司; 台式高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; KQ-500B 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 密生波罗花神经酰胺的提取与分离

取 2.0 kg 干燥的密生波罗花全草粉碎, 在 60 °C 条件下, 用 10 L 体积分数 95%乙醇提取 10 h, 重复提取 3 次后合并提取液, 减压浓缩得提取物 382.4 g。将 350 g 提取物悬浮于 3 L 纯水中, 用 3 L 乙酸乙酯萃取, 重复萃取 3 次后合并萃取液, 60 °C 减压浓缩, 得到乙酸乙酯萃取物 86.6 g。取 80.0 g 乙酸乙酯萃取物溶于 300 mL 甲醇中, 然后吸附于柱层析硅胶上 (200 g, 100~200 目), 进行硅胶柱层析 (800 g, 100~200 目)。先以石油醚-乙酸乙酯 (V/V=1:1) 的混合溶剂充分洗脱除去其中的中性化合物, 然后以二氯甲烷-甲醇-三乙胺 (V/V/V=80:20:1) 的混合溶剂洗脱, 通过薄层色谱 (TLC) 合并含有生物碱的洗脱液并减压浓缩得密生波罗花神经酰胺 (762.3 mg)。

1.3.2 色谱和质谱条件

色谱柱: Waters BEH Amide Column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 柱温: 45 °C, 进样体积: 5 μL, 流速: 0.25 mL/min, 流动相: A (乙腈-水-10 mmol 乙酸铵-0.1%甲酸); B (异丙醇-乙腈-10 mmol 乙酸铵-0.1%甲酸)。梯度洗脱: 0~5 min, 15% B~30% B; 5~10 min, 30%~50% B; 10~15 min, 50% B~54% B; 15~20 min, 54% B~70% B; 20~35 min, 70% B~99% B; 35~45 min, 99% B; 45~50 min, 99% B~15% B; 50~60 min, 15% B。

离子源: 加热电喷雾离子化源 (HESI); 鞘气流量 40 arb, 辅助气体流量 15 arb, 毛细管温度 320 °C, 辅助气体加热器温度 350 °C, 正喷雾电压 3.2 kV, 负喷雾电压 3.0 kV。MS 的分辨率为 70 000, MS/MS 的分辨率为 17 500, 扫描方式为全扫模式, 正离子模式检测, 质谱扫描范围 m/z : 100~1 500。未知化合物的鉴定采用 Compound discover 3.2、mzcloud 和 mzVault 数据库。

1.3.3 细胞培养

RAW264.7 细胞培养在温度为 37 °C, CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中进行, 培养基为含有链霉素 (100 μg/mL)、青霉素 (100 U/mL) 及胎牛血清 (10wt%)

的 RPMI 1640 培养基, 24~48 h 更换一次培养基, 当细胞融合率达 80% 时, 进行继代培养。

1.3.4 密生波罗花神经酰胺对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响

MTT 工作液配制: 取 1 g 噻唑蓝试剂溶于 200 mL PBS 中, 避光条件下用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 放 4 °C 冰箱保存, 保存容器需包裹锡箔纸用以避光^[24]。MTT 终止液配制: 称取 5.00 g SDS 试剂溶于 0.01 mol/L HCl 溶液并定容至 50 mL。

用细胞刮刮取对数生长期的 RAW264.7 细胞加入 RPMI 1640 培养基中, 将细胞密度调整为每毫升 1×10^6 个后接种于 96 孔培养板 (每孔 100 μL), 培养 16 h。向培养板中加入不同浓度密生波罗花神经酰胺, 每个浓度梯度重复 3 次, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 吸弃孔内培养液并加入 MTT 工作液 (每孔 100 μL), 继续培养 4 h 后加入 MTT 终止液 (每孔 100 μL), 用酶标仪测其 550 nm 处 A 值。实验同时设置空白组和样本处理组。

$$C = \frac{A_2 - A_0}{A_1 - A_0} \times 100\%$$

式中:

C——相对细胞存活率, %;

A₀——空白组孔 A 值;

A₁——样本处理组孔 A 值;

A₂——实验组孔 A 值。

1.3.5 密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

取细胞密度为每毫升 1×10^6 个的对数生长期 RAW264.7 细胞, 接种于 96 孔培养板 (每孔 100 μL), 培养 16 h。加入 50 μL 的 LPS (最终质量浓度 1 μg/mL) 刺激 30 min 后, 加入不同浓度密生波罗花神经酰胺, 实验设置 LPS 组、实验组和空白对照组, 每组重复 3 次。用 Griess 法检测细胞上清液中 NO 含量^[25]。

1.3.6 密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 并用 RPMI 1640 培养基将细胞浓度调整为每毫升 5×10^6 个。取 5×10^6 个 RAW264.7 细胞, 接种于 4 mL 培养皿中, 培养 16 h 后加入 LPS (1 μg/mL) 刺激 30 min, 再分别加入质量浓度 50 μg/mL、100 μg/mL 的密生波罗花神经酰胺处理细胞 6 h, 实验设置空白对照组, LPS 组和实验组。用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 取 2 μL RNA 逆转录为 cDNA 用于 PCR 扩增。半定量 PCR 检测 IL-1β、TNF-α 及 iNOS 等炎症因子 mRNA 的表达量, PCR 反应体系为: 10 μL 2×Taq MasterMix、上下游引物各 1 μL、cDNA 2 μL、

无菌超纯水 6 μL 。GAPDH、IL-1 β 、TNF- α 及 iNOS 的 PCR 扩增条件为: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 退火 (GAPDH、56 $^{\circ}\text{C}$, COX-2、60 $^{\circ}\text{C}$, TNF- α 、55 $^{\circ}\text{C}$)、30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s, PCR 扩增 30 个循环, 终延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。PCR 扩增所用引物由上海生工合成, 具体序列见表 1。

1.3.7 密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白表达和活化的影响

在 4 mL 培养皿中接种对数生长期 RAW264.7 细胞 5×10^6 个, 培养 16 h。加入 LPS (终浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 30 min 后, 分别加入质量浓度为 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的密生波罗花神经酰胺处理 6 h。吸除培养基并用 PBS 冲洗细胞, 离心 15 min 后 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min), 加入

200 μL 蛋白酶裂解液及一匀玻璃珠充分振荡后再离心 10 min (4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min), 上清液即为细胞总蛋白。运用 BCA 试剂盒法制作标准曲线测定细胞总蛋白的浓度, 通过 Western Blot 检测 p-I κ B α /I κ B α 、p-PDK1/PDK1 及 p-AKT/AKT 蛋白表达。将样品蛋白在 94 $^{\circ}\text{C}$ 温度下变性 5 min 后, SDS-PAGE 电泳分离蛋白并转膜。将蛋白转膜移至封闭液中, 室温摇床脱色, 分别加入一抗、二抗并室温孵育洗涤, 加入显色剂采集图像。实验同时设置空白对照组, LPS 组和药物处理组。

1.3.8 数据分析

本研究细胞实验设立 3 个复孔, 结果以 Mean \pm SD 表示, 数据分析在 SPASS 20.0 统计分析软件中完成, Sigma Plot 绘图, 电泳条带的灰度值采用 Image J 软件检测。

表 1 本文所用相关引物

Table 1 Primers used in this work

引物名称	上游引物序列 5'-3'	下游引物序列 5'-3'
GAPDH	CACTCACGGCAAATCAACGGCAC	GACTCCACGACATACTCAGCAC
IL-1 β	ATCAACCAACAAGACTACTCTCC	TTCTTGTGACCCTGAGCGAC
TNF- α	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GAGGCCATTTGGGAAGCTTCT
iNOS	CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAG	GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTG

表 2 密生波罗花神经酰胺中代表性成分结构信息

Table 2 Structural information of some representative compounds in the total ceramides from *I. compacta*

NO.	保留时间/min	化合物	参比离子	质荷比 (m/z)	计算分子量	误差 /($\times 10^{-6}$)	分子式	峰面积
1	1.02	滨蒿内酯	[M+H] ⁺	207.064 99	206.057 71	-0.96	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	611 873 699
2	1.25	Verrucarol	[M+H] ⁺	267.158 69	266.151 41	-1.48	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	294 859 085
3	1.36	Isoxsuprine	[M+H] ⁺	302.174 74	301.167 47	-1.08	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	73 441 932
4	1.37	乌苏酸	[M+H] ⁺	457.368 16	456.360 89	1.19	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	40 155 513
5	1.42	皮诺敛酸	[M+H] ⁺	279.231 45	278.224 17	-1.46	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	62 318 486
6	1.42	α -Linolenoyl ethanolamide	[M+H] ⁺	322.274 02	321.266 74	-0.12	C ₂₀ H ₃₅ NO ₂	36 631 960
7	1.43	Mexedrone	[M+H] ⁺	208.133 04	207.125 76	-0.79	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	165 880 266
8	21.73	Cer 18:2	[M+H] ⁺	520.471 5	519.464 22	-1.78	C ₃₃ H ₆₁ NO ₃	2 356 452 867
9	21.92	HexCer 18:1	[M+H] ⁺	732.560 79	731.553 51	-1.69	C ₄₀ H ₇₇ NO ₁₀	5 725 851 974
10	22.94	HexCer 18:2	[M+H] ⁺	714.550 17	713.542 93	-1.75	C ₄₀ H ₇₅ NO ₉	3 363 812 939
11	24.73	HexCer 18:3	[M+H] ⁺	812.623 41	811.616 14	-1.49	C ₄₆ H ₈₅ NO ₁₀	226 667 703
12	25.69	HexCer 18:2	[M+H] ⁺	828.654 42	827.647 14	-1.82	C ₄₇ H ₈₉ NO ₁₀	347 053 274
13	26.74	HexCer 18:2	[M+H] ⁺	842.669 68	841.662 4	-2.25	C ₄₈ H ₉₁ NO ₁₀	1 698 317 686
14	28.54	HexCer 18:1	[M+H] ⁺	816.654 48	815.647 2	-1.77	C ₄₆ H ₈₉ NO ₁₀	3 278 061 700
15	29.47	Cer 18:1	[M+H] ⁺	654.602 42	653.595 11	-1.09	C ₄₀ H ₇₉ NO ₅	1 149 971 917
16	30.19	HexCer 18:1	[M+H] ⁺	844.685 73	843.678 41	-1.83	C ₄₈ H ₉₃ NO ₁₀	2 464 103 665
17	30.46	Cer 18:1	[M+H] ⁺	668.617 8	667.610 52	-1.43	C ₄₁ H ₈₁ NO ₅	1 390 603 712
18	31.31	Cer 18:1	[M+H] ⁺	682.633 36	681.626 09	-1.52	C ₄₂ H ₈₃ NO ₅	3 002 457 135
19	32.19	Cer 18:1	[M+H] ⁺	696.649 11	695.641 8	-1.39	C ₄₃ H ₈₅ NO ₅	974 861 038

2 结果与讨论

2.1 密生波罗花神经酰胺的定量和定性

神经酰胺类生物碱一般含有一个氮原子,在正离子模式下易形成 $[M+H]^+$, m/z 值显示为偶数。图 1 为密生波罗花神经酰胺在正离子模式下超高效液相-高分辨质谱总离子流图,依据 compound discover 3.2 软件及 mzcloud 和 mzVault 数据库从中鉴定了 138 个化合物,其中 113 个化合物为神经酰胺类成分,根据面积归一化法,这 113 个化合物的峰面积总和占全部 138 个化合物峰面积总和的 81.53%。从表 2 可看出密生波罗花神经酰胺中非生物碱成分主要为滨蒿内酯、verrucarol、乌苏酸和皮诺敛酸,明确化学结构的生物碱有 α -linolenoyl ethanolamide 和 mexedrone,但含量最高的为各种神经酰胺 (Cer) 和己糖基神经酰胺 (Hexcer)。

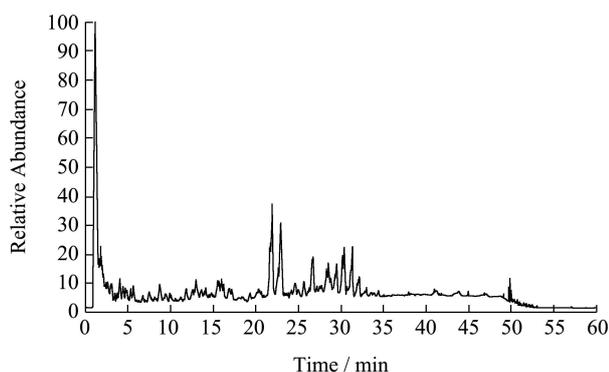


图 1 密生波罗花神经酰胺在正离子模式下超高效液相-高分辨质谱总离子流图

Fig.1 UPLC-HR-MS spectrum of the total ceramides from *I. compacta* in positive ion mode

神经酰胺类化合物的主要结构特点是其含有的 2 条长脂肪链通过酰胺键相连接,脂肪链大部分以饱和碳原子的形式存在,存在少数双键,少数饱和碳原子连接羟基或通过醚键成环。图 2 为密生波罗花神经酰胺的核磁共振氢谱图,对比同属植物两头毛中神经酰胺的核磁数据^[26],发现两个植物中神经酰胺结构极为类似。 δ 5.36~5.73 为双键上的烯氢信号, δ 3.70~4.92 为连氧次甲基信号, δ 1.24~2.37 为脂肪链中的亚甲基信号, δ 0.86 为脂肪链的末端甲基信号。由于测试样品为一组混合物,结构差异较小,核磁信号重叠严重,导致各组信号的裂分不是很明显。

图 3 为密生波罗花神经酰胺的核磁共振碳谱图,与两头毛中神经酰胺的核磁数据对比^[26], δ 14.1 为末端甲基碳信号, δ 22.7 为末端甲基旁边的亚甲基碳信号, δ 29.2~29.8 为脂肪链中间系列亚甲基碳信号, δ 31.9~37.0 为双键、酰胺键或连氧碳原子旁边的亚甲

基碳信号, δ 55.0~79.0 为各种连氧次甲基碳信号, δ 128.0~130.7 为双键碳信号, δ 173.0~175.5 为酰胺键碳信号。

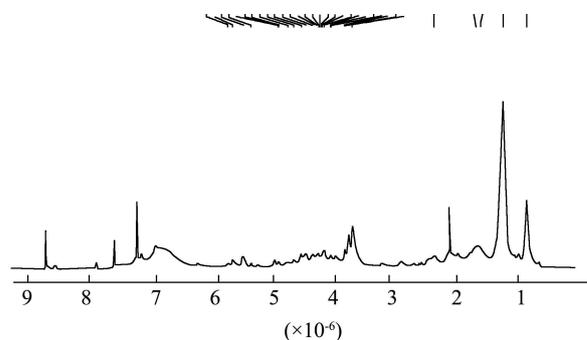


图 2 密生波罗花神经酰胺的核磁共振氢谱

Fig.2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the total ceramides from *I. compacta*

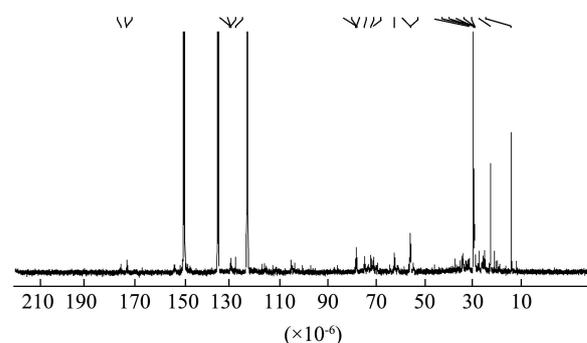


图 3 密生波罗花神经酰胺的核磁共振碳谱

Fig.3 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of the total ceramides from *I. compacta*

综合 UPLC-HR-MS/MS、核磁共振氢谱和核磁共振碳谱数据,并结合文献^[26]报道的数据,确定密生波罗花提取物中的主要成分为神经酰胺类化合物。

2.2 密生波罗花神经酰胺对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响

如图 4 所示,与正常对照组相比 LPS 对细胞无明显毒性,可排除实验中 LPS 的影响。浓度为 6.25~50 $\mu\text{g/mL}$ 的密生波罗花神经酰胺可促进 RAW264.7 细胞增殖,且细胞相对存活率分别为 105.16%、110.86%、111.36%、107.53%。当浓度达 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,密生波罗花神经酰胺对 RAW264.7 细胞有毒性作用 ($p < 0.01$),降低了 RAW264.7 细胞的增殖活性,细胞相对存活率为 88.12%。有学者研究显示,乙酰氨基酚^[27]、吲哚美辛^[28]等常用抗炎药物的有效成分都具有不同程度的细胞毒性,对细胞的增殖活性具有负影响,甚至有研究指出,临床常用的抗炎药物布洛芬可致患者出现中毒性表皮坏死松解症^[29],表现出较强的细胞毒性。与上述抗炎药物相比,密生波罗花神经酰胺具有毒副作用小,安

全性高的特点。

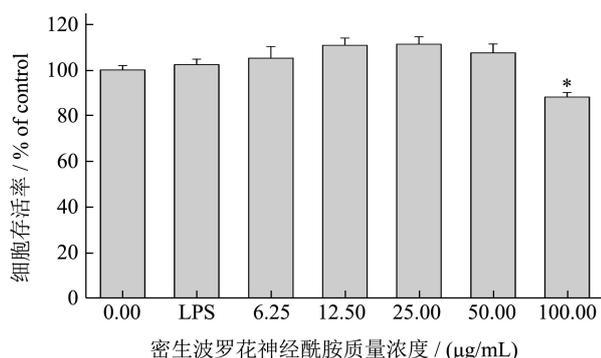


图4 密生波罗花神经酰胺对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响

Fig.4 Effects of the total ceramides from *I. compacta* on RAW264.7 cell proliferative viability

2.3 密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导 RAW264.7

细胞释放 NO 的影响

NO 作为毒性很强的气体自由基,过量会对细胞产生毒性作用,促使细胞变性、组织黏连,产生组织损伤,加剧炎症反应^[30],且 iNOS 是 NO 合成所必需的限速酶, iNOS 的表达量与 NO 合成量呈正相关。因此,抑制 NO 的释放或 iNOS 表达可能成为治疗炎症反应的重要靶点^[31]。本研究运用 Griess 法检测细胞释放的 NO 量,得到的 NO 反应标准曲线为: $y=0.0074x+0.0026$ ($R^2=0.9998$)。其中, x 为样品浓度, y 为 A 值。

如图 5 所示, LPS 可刺激 RAW264.7 细胞释放远高于正常状态下的 NO,且对照组比较差异性显著 ($p<0.05$)。加入密生波罗花神经酰胺后, RAW264.7 细胞 NO 释放量明显降低 ($p<0.01$),且 NO 释放量与加入的密生波罗花神经酰胺浓度呈现出负相关关系,

加入 6.25、12.5、25、50、100 µg/mL 的密生波罗花神经酰胺后, RAW264.7 细胞 NO 释放量分别为 45.13、38.85、28.79、12.27、4.61 µmol/L,抑制率分别为 12.53%、24.71%、44.19%、76.23%、91.07%。因此, LPS 能诱导 RAW264.7 细胞释放 NO,而密生波罗花神经酰胺能够不同程度抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 NO 呈浓度依赖性。

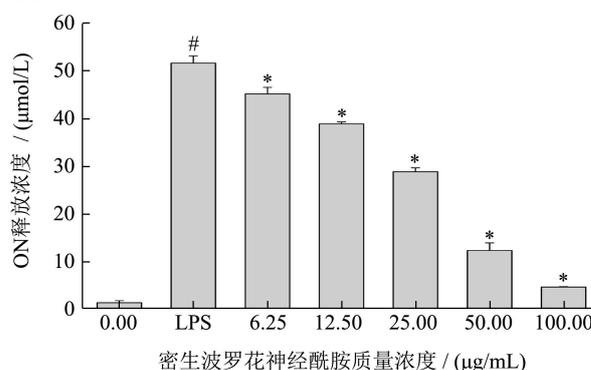


图5 密生波罗花神经酰胺对 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响

Fig.5 Effects of the total ceramides from *I. compacta* on RAW264.7 production of NO

有学者研究表明,浓度为 0.625 mg/mL 的常用抗炎药物安儿宁颗粒,对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 的抑制率为 43.64%^[32],100 µg/mL 的柴桂口服液对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 的抑制率为 70.85%^[33],低于本研究中相近浓度密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 的抑制率。

2.4 密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导 RAW264.7

细胞转录 IL-1β、TNF-α及 iNOS mRNA 的影响

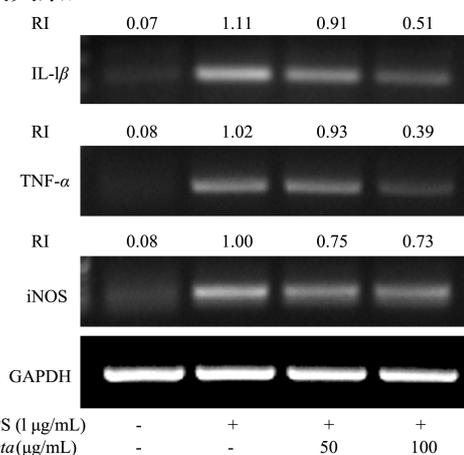


图6 密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 IL-1β、TNF-α及 iNOS mRNA 表达的影响

Fig.6 Effects of the total ceramides from *I. compacta* on IL-1β and TNF-α and iNOS mRNA expression in RAW264.7 cells in response to LPS stimulation

细菌脂多糖 (LPS) 为革兰氏阴性细菌细胞壁外膜主要成分, 也是重要的致炎因子, 可诱导小鼠单核巨噬细胞表达、释放多种炎症介质^[21,34], 如 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 及 NO 等, 从而引发和加重炎症并产生组织损伤^[35]。其中 TNF- α 是炎症反应初期最早产生的重要炎症介质, 可刺激其他致炎因子的表达、释放^[36], 并促使炎症介质聚集^[37], 诱发并扩大炎症反应。IL-1 β 是炎症反应中的重要介质, 且在组织损伤后会在浓度升高, 能够维持、促进炎症反应, 导致疼痛产生^[38]。

如图 6 所示, 由半定量 PCR 结果可知, LPS 可促使 RAW264.7 细胞内 IL-1 β 、TNF- α 及 iNOS 相关炎症因子的 mRNA 表达水平显著升高。密生波罗花神经酰胺对 IL-1 β 、TNF- α 及 iNOS 的 mRNA 表达均有一定的抑制作用, 电泳条带灰度值分析结果显示, 密生波罗花神经酰胺对 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达的抑制作用更为明显, 且浓度越高, 抑制效果越好。

2.5 不同浓度密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白表达及活化的影响

磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信

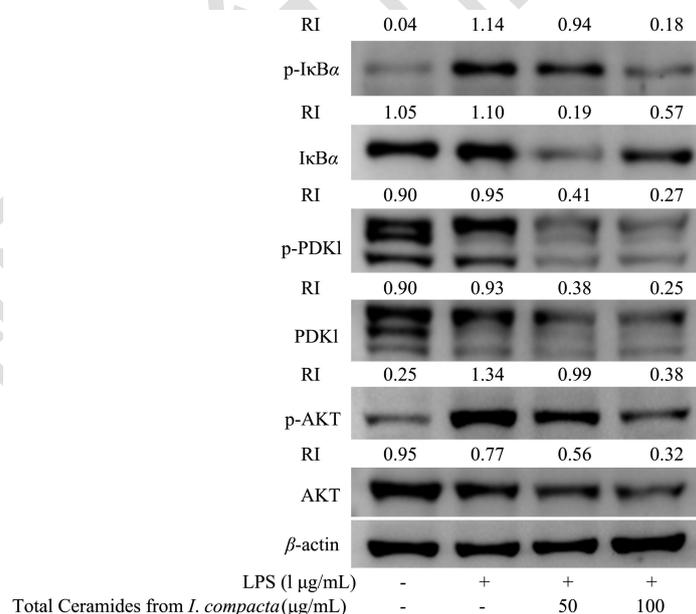


图 7 密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白表达及活化程度的影响

Fig.7 Effects of the total ceramides from *I. compacta* on I κ B α and PDK1 and AKT expression and activation in RAW264.7 cells in response to LPS stimulation

3 结论

本文从紫葳科角蒿属植物密生波罗花中提取了神经酰胺类成分, 并对其体外抗炎活性进行了初步的研

究。结果显示, 低浓度的密生波罗花神经酰胺对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞增殖活性具有促进作用, 且密生波罗花神经酰胺干预可通过抑制 iNOS mRNA 和蛋白表达, 从而有效控制 NO 的产生, 减轻炎症反应和

号通路是介导细胞炎症反应和免疫应答的重要细胞信号传导途径^[39], 在多种慢性疾病中发挥促炎作用^[40,41]。I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白是 PI3K/AKT 信号通路传导过程中的关键媒介底物, 在静息状态下, 通常以失活的状态存在于细胞质中, 当有信号激活后, I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白会磷酸化, 产生 p-I κ B α 、p-PDK1 及 p-AKT 蛋白, 从失活状态活化后转移到细胞核内, 与相应的炎症相关基因结合, 启动炎症性细胞因子转录, 诱发炎症^[42]。Western Blot 检测结果显示, 正常情况下, RAW264.7 细胞中 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白均有所表达, 但 p-I κ B α 、p-PDK1 及 p-AKT 蛋白表达水平相对较低, 即 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白活化程度较弱。在 LPS 刺激下, p-I κ B α 、p-PDK1 及 p-AKT 蛋白含量明显提升, 即 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白活化程度提高。

密生波罗花神经酰胺对 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白的表达有抑制作用, 且对其活性亦有抑制作用, 且密生波罗花神经酰胺对 PDK1 及 AKT 蛋白表达的抑制作用具有浓度依赖性 (如图 7 所示)。该结果表明在 LPS 刺激下, 即 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白活化程度提高, 但在密生波罗花神经酰胺干预后, 其可通过抑制 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白的表达及活化来调控 PI3K/AKT 信号转导通路, 从而控制炎症性细胞因子转录, 减轻炎症反应^[43]。

组织损伤。在密生波罗花神经酰胺干预后, LPS 刺激 RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达量明显降低, 且呈剂量依赖性递减, 表明密生波罗花神经酰胺对 IL-6 和 IL-1 β 的表达具有抑制作用, 有利于炎症的治疗和炎症引起的组织损伤恢复。密生波罗花神经酰胺干预还可抑制 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白的表达及活化, 从而控制炎性细胞因子转录, 减轻炎症反应。综上所述, 密生波罗花神经酰胺可以通过抑制 I κ B α 、PDK1 及 AKT 蛋白的表达及其活化, 减少 IL-1 β 、TNF- α 及 iNOS 相关炎症因子 mRNA 和蛋白质的表达和 NO 产生, 从而抑制炎症反应的过程。

参考文献

- [1] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏植物志(第四卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1985
- [2] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草藏药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002
- [4] 陈梦, 戴海明. 细胞程序性死亡与炎症发生[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(12): 2205-2214
- [5] 吴海峰, 黄园园, 张丽静, 等. 藏药密生波罗花中 1 个新的苯乙醇苷化学成分[J]. 中草药, 2015, 46(4): 476-480
- [6] ZHAO Jianqiang, WANG Yanming, DANG Jun, et al. Chemical constituents of *Incarvillea compacta* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2017, 53: 548-550
- [7] 王明明, 曹芳, 李海涛. 密花角蒿化学成分的研究[J]. 中成药, 2019, 41(1): 110-113
- [8] Guo Jiajia, Zhang Dan, Yu Chao, et al. Phytochemical analysis, antioxidant and analgesic activities of *Incarvillea compacta* maxim from the Tibetan plateau [J]. Molecules, 2019, 24(9): 1692
- [9] SHEN Ting, LI Xueqin, HU Weicheng, et al. Hepatoprotective effect of phenylethanoid glycosides from *Incarvillea compacta* against CCl₄-induced cytotoxicity in HepG2 cells [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2015, 58: 617-625
- [10] WU Haifeng, ZHU Yindi, ZHANG Lijing, et al. A new phenylethanoid glycoside from *Incarvillea compacta* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2015, 18: 596-602
- [11] 王贺聪, 何聪芬. 皮肤中神经酰胺的研究及应用现状[J]. 日用化学工业, 2019, 1: 51-57
- [12] 石伊宁, 刘嘉林, 刘芳芳, 等. C₂-神经酰胺在 A549/PC9 细胞凋亡中的作用及影响[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 1: 31-35
- [13] 纪漫, 孙培冬. 龙眼核活性脂质的分析及其细胞增殖活性研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(8): 87-91, 108
- [14] 赵超, 甘秀海, 龚小见, 等. 黑骨藤中神经酰胺类化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 83-85
- [15] 李海池, 马晋芳, 史庆龙, 等. 超临界 CO₂ 萃取-分子蒸馏提取分离魔芋神经酰胺[J]. 中药材, 2017, 40(10): 2401-2405
- [16] Greten Florian, Grivennikov Sergei. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences [J]. Immunity, 2019, 51(1): 27-41
- [17] Netea Mihaig, Balkwill Frances, Chonchol Michel, et al. A guiding map for inflammation [J]. Nature Immunology, 2017, 18(8): 826-831
- [18] 王金磊, 李承德, 孙宏伟, 等. 黄芪多糖抑制 NF- κ B/MAPK 信号通路和改善哮喘大鼠气道炎症的作用[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 489-493
- [19] 闫曙光, 许小凡, 李倩, 等. 基于 Notch/NF- κ B/NLRP3 信号通路的巨噬细胞活化与溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(10): 1174-1178
- [20] GU Jinjing, LIU Yi, XIE Bin, et al. Roles of toll-like receptors: from inflammation to lung cancer progression [J]. Biomedical Reports, 2018, 8(2): 126-132
- [21] Kwon Sunyoung, Ro Myungja, Kim Jaehong. Mediator roles of leukotriene B₄ receptors in LPS-induced endotoxic shock [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 5936
- [22] Kesavardhana Sannula, Malireddi Rksubarao, Kanneganti Thirumaladevi. Caspases in cell death, inflammation, and gasdermin-induced pyroptosis [J]. Annual Review of Immunology, 2020, 38(1): 567-595
- [23] 张治国, 王君虹, 陈新峰, 等. 枇杷籽提取物抗氧化及环氧合酶抑制活性研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 35-41
- [24] 罗海青, 吴磊, 强倩, 等. 黑蒜提取物对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞炎症因子的影响[J]. 食品科技, 2017, 42(8): 199-205
- [25] 朱翠玲, 陈铭, 汪孟涵, 等. 桑葚提取物体外抗炎作用及机制的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4): 61-66
- [26] LUO Yinggang, YI Jinhai, LI Bogang, et al. Novel ceramides and a new glucosylceramide from the roots of *Incarvillea arguta* [J]. Lipids, 2004, 39(9): 907-913
- [27] 李曼, 吴纯启, 许赫雷, 等. 对乙酰氨基酚对大鼠原代肝细胞及 BRL-3A 细胞的毒性作用比较[J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 349-356
- [28] 刘怡. 三种 PPCPs 类药物对 293T 细胞及斑马鱼的毒理效应研究[D]. 重庆: 中国科学院大学(中国科学院重庆绿色智能技术研究院), 2018
- [29] 杜玉娟, 赵慧慧, 杨宏昕. 布洛芬致儿童中毒性表皮坏死松解症 1 例[J]. 药物流行病学杂志, 2021, 30(8): 569-571
- [30] 韩彩静, 王文亮, 陈相艳, 等. 蓝莓多酚对小鼠巨噬细胞中 NO、

- iNOS 及 COX-2 分泌量的影响[J].中国食品学报,2015,15(2): 15-20
- [31] Otani Hajime. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11(8): 1913-1928
- [32] 刘帆,张颖颖,侯林. 安儿宁颗粒的体外抗菌、抗炎和免疫增强活性研究[J].中国药房,2019,30(16):2221-2225
- [33] 周淑棉,刘梦倩,樊丹阳,等. 柴桂口服液体外抗炎作用的研究[J].动物医学进展,2021,42(5):80-84
- [34] Bektas Arsun, Schurman Shepherdh, Sen Ranjan, et al. Aging, inflammation and the environment [J]. *Experimental Gerontology*, 2017, 105: 10-18
- [35] Wolf Dennis, Ley Klaus. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Circulation Research*, 2019, 124(2): 315-327
- [36] 刘永利,邵先舫,李前,等. 治伤巴布剂对急性软组织损伤患者血清 TNF- α 、IL-6 水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2020, 40(3):377-380
- [37] Moshiri Mohammad, Moallem Seyedadel, Armin Attaranzadeh, et al. Injury to skeletal muscle of mice following acute and sub-acute pregabalin exposure [J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2017, 20(3): 256-259
- [38] Mao Liming, Kitani Atsushi, Strober Warren, et al. The role of NLRP3 and IL-1 β in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2566
- [39] Sun K, Luo J, Guo J, et al. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(4): 400-409
- [40] Sun X, Chen L, He Z. PI3K/Akt-Nrf2 and anti-inflammation effect of macrolides in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20(4): 301-304
- [41] Du C, Zhang T, Xiao X, et al. Protease-activated receptor-2 promotes kidney tubular epithelial inflammation by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway [J]. *Biochem J*, 2017, 474(16): 2733-2747
- [42] LUO Man, YAN Dongsheng, SUN Qingsong, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2020, 121(4): 2994-3004
- [43] PANG Ying, LIANG Mingting, GONG Ying, et al. HGF reduces disease severity and inflammation by attenuating the NF- κ B signaling in a rat model of pulmonary artery hypertension [J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 924-931