

基于NLRP3炎症小体活化探讨“三色散”挥发油减轻膝骨关节炎滑膜炎的机制[△]

廖太阳*,张力,张皞晟,李晓辰,吴鹏,王培民[#](南京中医药大学附属医院/江苏省中医院骨伤科,南京210029)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)19-2335-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.19.05



摘要 目的:基于NOD样受体家族3(NLRP3)炎症小体的活化探讨“三色散”挥发油减轻膝骨关节炎(KOA)滑膜炎的机制。方法:采取水蒸气蒸馏法提取“三色散”挥发油,采用气质联用(GC-MS)技术分析其组成。提取雄性SD大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞(FLS),采用CCK-8法检测10、25、50、100、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ “三色散”挥发油对FLS存活率的影响;以脂多糖诱导12 h建立KOA炎症细胞模型,检测10、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ “三色散”挥发油对炎症模型细胞中NLRP3、胱天蛋白酶1(caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的蛋白及其mRNA相对表达量的影响,检测炎症模型细胞上清液中白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-18水平。结果:提取得到黄色澄清且有独特芳香气味的“三色散”挥发油0.51~0.61 g,提取率为0.33%~0.41%($n=9$)。从该挥发油中共分离得到化学成分41种,鉴定了其中的30种,其峰面积之和占总峰面积的90.073 6%;相对含量较高的成分依次为芳姜黄酮(17.573 9%)、 δ -杜松烯(15.434 5%)、姜黄酮(11.509 5%)等。当“三色散”挥发油质量浓度为10~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其对FLS存活率均无显著影响($P>0.05$)。与空白组比较,模型组细胞中NLRP3、caspase-1、ASC的蛋白及其mRNA相对表达量以及细胞上清液中IL-1 β 、IL-18水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,“三色散”挥发油10、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞及上清液中上述指标的相对表达量或水平均显著降低($P<0.05$)。结论:“三色散”挥发油可能通过抑制FLS中NLRP3炎症小体的活化而减少下游炎症级联反应,从而发挥其改善KOA滑膜炎的作用。

关键词 膝骨关节炎;滑膜炎;NOD样受体家族3炎症小体;三色散;挥发油;成纤维样滑膜细胞

Discussion on the Mechanism of Synovitis of KOA Relieved by “Sanse Powder” Volatile Oil Based on the Activation of NLRP3 Inflammasome

LIAO Taiyang, ZHANG Li, ZHANG Haosheng, LI Xiaochen, WU Peng, WANG Peimin (Dept. of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To discuss the mechanism of synovitis of knee osteoarthritis (KOA) relieved by “Sanse powder” volatile oil based on the activation of Nod-like receptor family 3 (NLRP3) inflammasome. METHODS: “Sanse powder” volatile oil was extracted by distillation-condensation process and the components of it were analyzed by GC-MS. Fibroblast-like synovial cells (FLS) were extracted from the knee joint of male SD rats. The effects of 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ “Sanse

- 究[J].中国药房,2020,31(5):595-600.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:6-7,132-137,145-147,480-483.
- [13] 王科,叶花,王鹏飞,等.参草宁心颗粒干法制粒处方筛选及工艺参数优化[J].中国中医药信息杂志,2019,26(11):74-78.
- [14] 温慧敏,尹小娟,杨沙,等.小儿伤科泡腾颗粒剂的制备及
[△]基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81774334);江苏省中医药领军人才培养项目(No.SLJ0207)
* 硕士研究生.研究方向:膝骨关节炎的基础与临床. E-mail: drtaiyang@126.com
[#] 通信作者:主任中医师,教授,博士生导师,博士.研究方向:膝骨关节炎的基础与临床.电话:025-86617141. E-mail: drwpm@163.com
- 处方优化[J].中国医院用药评价与分析,2019,19(11):1303-1305.
- [15] 余巧,李大炜,徐英辉,等.香连胃漂浮片的制备及体外释放研究[J].湖南中医药大学学报,2020,40(5):561-565.
- [16] ZHANG C, GAO F, GAN S, et al. Chemical characterization and gastroprotective effect of an isolated polysaccharide fraction from *Bletilla striata* against ethanol-induced acute gastric ulcer[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 131: 110539.
- [17] 张定堃,傅超美,林俊芝,等.中药制剂的“药辅合一”及其应用价值[J].中草药,2017,48(10):1921-1929.
(收稿日期:2021-04-07 修回日期:2021-08-15)
(编辑:林静)

powder" volatile oil on the viability of FLS were examined by CCK-8 assay. KOA inflammatory cell model was induced by lipopolysaccharide for 12 h. The effects of 10, 250 $\mu\text{g/mL}$ "Sanse powder" volatile oil on the protein and mRNA expression of NLRP3, caspase-1 and apoptosis-associated speck-like protein (ASC) were detected. The levels of IL-1 β and IL-18 in supernatants of FLS were determined. RESULTS: Totally 0.51-0.61 g volatile oil with yellow clear and unique aromatic odor were extracted from "Sanse powder", and the extraction rate was 0.33%-0.41% ($n=9$). A total of 41 chemical components were isolated, and 30 of them were identified and their peak area accounted for 90.073 6% of the total peak area. The components with high relative content were gingerol flavonoids (17.573 9%), δ -junione (15.434 5%), gingerol (11.509 5%), etc. When the concentration of volatile oil was 10-250 $\mu\text{g/mL}$, there was no significant effect on survival rate of FLS ($P>0.05$). Compared with blank group, the relative protein and mRNA expression of NLRP3, caspase-1 and ASC and the levels of IL-1 β and IL-18 in supernatant were significantly increased in model group ($P<0.05$). Compared with model group, relative expression or levels of above indexes were all decreased significantly in FLS and supernatant of "Sanse powder" volatile oil 10 and 250 $\mu\text{g/mL}$ groups ($P<0.05$). CONCLUSIONS: "Sanse powder" volatile oil can inhibit NLRP3 inflammasome activation in FLS and reduce the downstream inflammatory cascade response, thus exerting its efficacy in ameliorating synovial inflammation of KOA.

KEYWORDS Knee osteoarthritis; Synovial inflammation; Nod-like receptor family 3 inflammasome; Sanse powder; Volatile oil; Fibroblast-like synovial cells

膝关节炎(KOA)是骨科最常见的退行性疾病,滑膜炎症是其主要病理特征之一。该病的发病率和致残率逐年升高且有年轻化的趋势。据统计,我国45岁以上人群症状性KOA的发病率就高达8.1%^[1]。滑膜炎症作为KOA发病的始动因素,很可能在软骨变性之前就已经发生,并贯穿于KOA的整个病程^[2]。目前,针对KOA的治疗大多围绕在抗炎镇痛方面,手段以口服非甾体抗炎药和关节腔注射药物为主。然而,口服抗炎药可能引发胃出血、心血管疾病等不良反应,关节腔注射药物则大大增加了患者的感染风险,使得两者的临床应用均受限。祖国医学的传统贴敷疗法因经皮吸收,所以无明显的肝肾毒性,其引发胃肠道不良反应和心血管疾病的风险较低,其中“易层”贴敷就是该疗法的优秀代表之一^[3]。

“易层”贴敷片由“三色散”和“三黄油膏”组方而成,是南京中医药大学附属医院骨伤科的院内制剂,已获得国家实用新型专利(专利号ZL200820185241.8)。本研究团队在长期的临床实践中发现,临床可根据KOA患者的证型变化加减贴敷片层次,以随证易层、对证下药,治疗效果较好^[4];同时,经近10年的临床研究证实,“易层”贴敷技术是值得传承和推广的中医适宜外治技术^[5],现已成为江苏省省级KOA非手术中医康复方案之一。“三色散”为“易层”贴敷片的核心组成,是温经活血外治法的代表方之一,由片姜黄、白芷、羌活、独活、川芎、当归、连翘、炒蔓荆子、丹参、川牛膝、防风、制马钱子、秦艽、紫荆皮、木瓜、赤芍、天花粉、威灵仙、防己、甘草等20味中药材按质量比0.25:0.25:0.25:0.25:0.12:0.25:0.12:1.00:0.25:0.25:0.25:0.25:0.12:1.00:0.25:0.25:0.25:0.25:0.06组成^[6]。本研究团队率先通过体内外实验证实了KOA的发生与NOD样受体家族3(NLRP3)炎症小体为代表的焦亡途径高度相关^[7];通过进一步的研究发现,“易层”贴敷片可通过高迁移率族蛋白B1(HMGB1)途径来改善KOA模型大鼠的滑膜纤维化^[8];

脂质组学研究结果显示,其核心组成“三色散”在改善KOA模型大鼠脂质代谢紊乱方面具有积极作用^[9]。与此同时,笔者通过文献调研发现,作为中药重要活性成分之一的挥发油具有抗炎、抗菌、镇痛等多种药理活性^[10-11]。“三色散”作为一种外敷方,挥发性成分(主要是挥发油)是其外治有效的重要物质基础,具有重要的药用价值^[5,8]。有研究指出,在KOA滑膜炎症的相关研究中,成纤维样滑膜细胞(FLS)是滑膜中最常见的细胞,也是滑膜炎症的主要效应细胞^[2],因此在细胞层面研究药物的抗炎机制具有积极的指导意义。基于此,本研究拟利用气质联用(GC-MS)技术对“三色散”挥发油成分进行分析;并以大鼠FLS为对象,基于NLRP3炎症小体活化探讨“三色散”挥发油减轻KOA滑膜炎症的可能机制,旨在为其相关新剂型的开发奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括7890A-5975C型GC-MS仪、NIST11标准质谱检索库(美国Agilent公司),AB7500型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)系统(美国Applied Biosystems公司),ThermoMixer C型舒适型恒温混匀仪、BioPhotometer型核酸蛋白检测仪(德国Eppendorf公司),GG17-5000mL型挥发油提取器装置(南京南奥科技有限公司),PTHW型可调温电热套(南通市申通电热厂),170-3930型蛋白电泳仪及转膜仪系统(美国Bio-Rad公司),LAS4000型超灵敏化学发光成像系统(美国GE公司),EL800型酶标仪(美国Enspire公司),ACB-4A1型超净工作台(新加坡Esco公司),HREAccl 150i型CO₂细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)等。

1.2 主要药品与试剂

“三色散”粉剂(批号Z04000566,规格2.5 kg/包)由南京中医药大学附属医院药剂科提供;RNA快速提取试

剂盒(批号RN001)购自上海奕杉生物科技有限公司;逆转录试剂盒、PCR试剂盒、ECL化学发光液(批号分别为R222-01、Q331-02、E412-01)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;大鼠白细胞介素 1β (IL- 1β)、IL-18酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为JEB-13503、JEB-13733)均购自南京金益柏生物科技股份有限公司;兔NLRP3多克隆抗体、兔胱天蛋白酶1(caspase-1)多克隆抗体、兔凋亡相关斑点样蛋白(ASC)多克隆抗体(批号分别为ab214185、ab179515、ab127537)均购自英国Abcam公司;大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(批号60004-1-Ig)购自美国Proteintech公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(H+L)二抗(批号S0001)购自美国Affinity公司;CCK-8试剂(批号K1018)购自美国APEX BIO公司;胎牛血清、I型胶原酶、蛋白Marker(批号分别为10099141C、17100-017、26616)均购自美国Gibco公司;牛血清白蛋白(BSA,批号4240GR025)购自广州赛国生物科技股份有限公司;青霉素-链霉素双抗溶液、胰酶(批号分别为BL505A、BL512A)均购自南京顺捷生物科技股份有限公司;BCA蛋白检测试剂盒、RIPA强裂解液、 $5\times$ 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(批号分别为P0012、P0013B、P0015)均购自上海碧云天生物技术有限公司;DMEM培养基(批号10-013-CV)购自美国Corning公司;脂多糖(LPS,批号L2630)购自美国Sigma公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 动物

本研究所用实验动物为SPF级SD雄性大鼠,体重180~200 g,2月龄,由浙江省医学科学院提供,动物生产许可证号为SCXK(浙)2019-0002。所有大鼠均分笼饲养于室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(60 ± 5)%、每天照明12 h的动物房内,并自由摄食、饮水。

2 方法

2.1 “三色散”挥发油的提取

采取水蒸气蒸馏法提取。称取“三色散”粉剂150 g,置于5 L圆底烧瓶中,加水3 L和沸石5~8粒,混匀,静置5 min。将圆底烧瓶置于可调温电热套中,连接挥发油提取器、冷凝管,于 50°C 加热约5 h(注意避光操作),用棕色小瓶接收挥发油,加入一定量的无水硫酸钠进行脱水处理并计算提取率:提取率(%)=“三色散”挥发油质量/“三色散”粉剂质量 $\times 100\%$ 。上述提取过程平行9份操作。

2.2 “三色散”挥发油样品的处理

称取经无水硫酸钠干燥后的“三色散”挥发油约0.1 g,溶于乙酸乙酯1 mL中,混匀,以12 000 r/min离心10 min,取上清液200 μL 进行GC-MS法分析(每份挥发油

均进行检测,结果以其中1份样品进行展示)。

称取余下的“三色散”挥发油(将上述测定后的挥发油样品混合而得)1 g,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成1 g/mL(以挥发油质量计)的溶液,经0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌,于 4°C 下避光保存,作为体外细胞实验的贮备液。

2.3 “三色散”挥发油样品的GC-MS分析条件

2.3.1 GC条件 以HP-5 MS苯甲基聚硅氧烷石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm,0.25 μm)为色谱柱,采用程序升温模式(初始温度 45°C ,保持2 min;以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 100°C ,保持5 min;以 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 200°C ,保持5 min),进样口温度为 250°C ,载气为高纯氦气,载气流速为1 mL/min(恒流模式),进样量为1 μL ,分流比为20:1。

2.3.2 MS条件 电离源为电子轰击(EI)电离源,轰击能量为70 eV,离子源温度为 230°C ;扫描方式为全谱图扫描(full scan),扫描速度为正常速度,扫描范围为 m/z 30~500,溶剂延迟时间为3 min。

2.4 “三色散”挥发油成分相对含量的计算

采用Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.06.00软件系统对所得数据进行处理。各色谱峰对应化学成分的鉴定借助NIST 11标准质谱图库和PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),结合各色谱峰的保留时间,保留并展示匹配度 $>80\%$ 的结果。同时,采用面积归一化法计算各成分的相对含量。

2.5 FLS的提取与培养

脱颈处死5只雄性SD大鼠,消毒后切开其膝关节,取出滑膜组织并置于无菌磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)中,反复冲洗3次。用剪刀将上述组织剪成大小约1 mm \times 1 mm的小块,用0.2%的I型胶原酶于 37°C 下消化2 h;经70 μm 筛网滤过后,以1 000 r/min离心5 min,沉淀用含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的DMEM培养基(以下简称“完全培养基”)重悬于细胞培养皿中,在 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养(培养条件下同)过夜,24 h后换液,随后每2天换液1次。待细胞融合至80%~90%时,用0.25%胰酶消化传代。使用第3~6代的细胞进行实验,以确保其活性及生物特性。

2.6 “三色散”挥发油对FLS存活率的影响检测

采用CCK-8法进行检测。取“2.5”项下对数生长期的细胞,以 8×10^3 mL^{-1} 的密度按每孔100 μL 接种至6孔板中,培养24 h。将细胞随机分为正常对照组和不同质量浓度“三色散”挥发油组(10、25、50、100、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,质量浓度参考前期预实验结果设置),同时设置不含细胞和药物的空白对照组,每组设置3个复孔。吸弃培养基,空白对照组和正常对照组加入完全培养基100 μL ,各给药组加入含相应药物的完全培养基100 μL 。培养24 h后,各孔加入CCK-8试剂10 μL 继续

培养 2 h, 然后于室温下振摇 15 min 后, 使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的光密度(OD)值。以空白对照组为参照, 计算各组的细胞存活率: 细胞存活率(%) = (实验组平均 OD 值 - 空白对照组平均 OD 值) / (正常对照组平均 OD 值 - 空白对照组平均 OD 值) × 100%。

2.7 “三色散”挥发油对 FLS 中 NLRP3、caspase-1、ASC 蛋白表达的影响检测

采用 Western blot 法进行检测。取对数生长期的细胞, 以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度按每孔 2 mL 接种至 6 孔板中, 培养 24 h。吸弃培养基, 将细胞随机分为空白组、模型组和“三色散”挥发油不同浓度组(10、250 $\mu\text{g/mL}$, 质量浓度参考“2.6”项下结果设置), 每组设置 3 个复孔。取 LPS 10 mg, 置于 PBS 10 mL 中, 混匀, 得 1 mg/mL 的 LPS 母液; 然后, 取 BSA 0.1 g, 置于 DMEM 培养基 50 mL 中, 混匀, 得 0.2% BSA 溶液; 取 LPS 母液 10 mL, 加至 0.2% BSA 溶液 2 mL 中, 混匀, 得 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 工作液。模型组和各给药组加入 LPS 工作液 2 mL, 空白组加入含 PBS(10 μL) 的 0.2% BSA 溶液 2 mL, 孵育 12 h; 吸弃上清液, 空白组加入完全培养基 2 mL, 各药物组加入含相应药物的完全培养基 2 mL, 培养 24 h。吸弃培养基, 各组细胞用 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 清洗 3 次, 加入 RIPA 强裂解液 100 μL , 于冰上裂解 30 min 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度后, 经 5× SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液稀释, 于 99 $^{\circ}\text{C}$ 下变性处理 10 min。取变性蛋白 20 μg , 进行 SDS-PAGE 分离后, 转移至 PDVF 膜上, 以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 加入 GAPDH、NLRP3、caspase-1、ASC 一抗(稀释度分别为 1:50 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 用 TBST 溶液清洗 10 min×3 次, 加入 HRP 标记的 IgG 二抗(稀释度为 1:5 000), 室温孵育 1 h; 用 TBST 溶液清洗 10 min×3 次, 经 ECL 化学发光液显色后, 使用超灵敏化学发光成像系统曝光成像。采用 Image J Version 1.53f 软件分析, 以目标蛋白与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。上述实验重复 3 次。

2.8 “三色散”挥发油对 FLS 中 NLRP3、caspase-1、ASC mRNA 表达的影响检测

采用实时聚合酶链反应法(real-time PCR)进行检测。取对数生长期的细胞, 以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度按每孔 2 mL 接种至 6 孔板中, 培养 24 h。吸弃培养基, 将细胞按“2.7”项下方法分组、造模、给药。各组细胞培养 24 h 后, 吸弃培养基, 采用 RNA 快速提取试剂盒提取细胞总 RNA。将总 RNA 用焦碳酸二乙酯(DEPC)水 20 μL 复溶后取 1 μL , 再用 DEPC 水 49 μL 进行稀释, 使用核酸蛋白检测仪分别于 260、280 nm 波长处检测各孔的 OD 值, 以

OD_{260 nm} 与 OD_{280 nm} 比值 1.8~2.0 为标准筛选合格样品。取上述总 RNA 的合格样品, 参照逆转录试剂盒说明书方法将其逆转录为 cDNA。以上述 cDNA 为模板, 参照 PCR 试剂盒说明书进行扩增。反应体系(共 20 μL)包括: cDNA 模板 1 μL , SYBR Green Mix 10 μL , 上、下游引物(表 1)各 0.4 μL , ddH₂O 8.2 μL 。反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法以 ABI 7500 v2.0.5 软件计算各目标基因 mRNA 的相对表达量(Ct 表示每个反应管内荧光信号强度达到设定阈值时所经历的循环数), 结果均以空白组为标准进行归一化处理。上述实验重复 3 次。

表 1 PCR 引物序列和产物长度

| 目标基因 | 引物序列(5'→3') | 产物长度, bp |
|-----------|-------------------------|----------|
| NLRP3 | 上游: ACCCAAACCCACCAGTC | 141 |
| | 下游: CTCCCCTCACAGCCTTC | |
| caspase-1 | 上游: CAGATGCCAACCACTGAA | 107 |
| | 下游: CATGATCCCAACACAGGT | |
| ASC | 上游: CCAACAGGCAAGCAC | 113 |
| | 下游: TGGTCTCTGCACGAACCTG | |
| GAPDH | 上游: GTTGTGGCTCTGACATGCT | 111 |
| | 下游: CCCAGGATGCCCTTTAGT | |

2.9 “三色散”挥发油对 FLS 上清液中炎症因子水平的影响检测

采用 ELISA 法进行检测。取对数生长期的细胞, 以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度按每孔 2 mL 接种至 48 孔板中, 培养 24 h。吸弃培养基, 将细胞按“2.7”项下方法分组、造模、给药。各组细胞培养 24 h 后, 收集上清液, 严格按相应试剂盒说明书操作, 以酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔 OD 值并根据标准曲线计算 IL-1 β 、IL-18 水平。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析, 使用 Graphpad 7.04 软件绘图。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验(方差齐)或 Dunnett's T3 检验(方差不齐)。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 “三色散”挥发油的提取率及 GC-MS 分析结果

共提取得到黄色澄清且有独特芳香气味的“三色散”挥发油 0.51~0.61 g, 提取率为 0.33%~0.41% ($n = 9$)。对挥发油进行 GC-MS 分析, 其总离子流图见图 1。

本研究共分离得挥发油成分 41 种, 鉴定了其中的 30 种成分, 其峰面积占总峰面积的 90.073 6%; 相对含量较高的成分依次为芳姜黄酮、 δ -杜松烯、姜黄酮、姜黄新酮、 τ -杜松醇, 分别占 17.573 9%、15.434 5%、11.509 5%、7.928 4%、7.914 4%, 详见表 2。

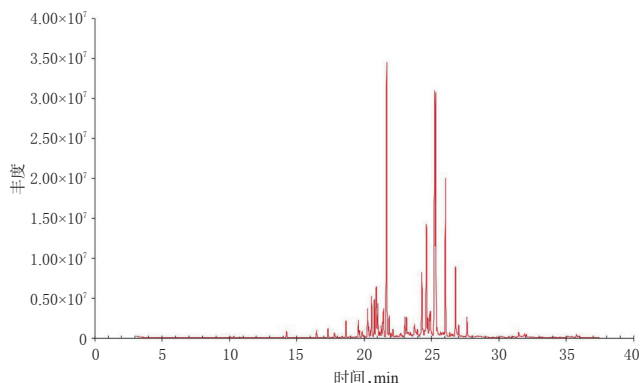


图1 “三色散”挥发油的GC-MS总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of “Sanse powder” volatile oil by GC-MS

表2 “三色散”挥发油的GC-MS分析结果

Tab 2 GC-MS analysis results of “Sanse powder” volatile oil

| 编号 | 保留时间, min | 中文名称 | 英文名称 | 相对含量, % | 分子式 | CAS编号 |
|----|-----------|---------------|---------------------------|----------|--|--------------|
| 1 | 25.256 6 | 芳姜黄酮 | Ar-turmerone | 17.573 9 | C ₁₅ H ₂₀ O | 1000292-71-0 |
| 2 | 21.680 5 | δ-杜松烯 | delta-amorphene | 15.434 5 | C ₁₅ H ₂₄ | 000483-76-1 |
| 3 | 25.332 3 | 姜黄酮 | turmerone | 11.509 5 | C ₁₅ H ₂₂ O | 180315-67-7 |
| 4 | 26.050 7 | 姜黄新酮 | curlone | 7.928 4 | C ₁₅ H ₂₂ O | 087440-60-6 |
| 5 | 24.635 4 | τ-杜松醇 | tau-cadinol | 7.914 4 | C ₁₅ H ₂₆ O | 005937-11-1 |
| 6 | 26.790 8 | 蒿本内酯 | trans-ligustilide | 3.935 2 | C ₁₂ H ₁₄ O ₂ | 1000365-98-8 |
| 7 | 20.908 0 | (-)-姜黄烯 | (-)-zingiberene | 3.893 8 | C ₁₅ H ₂₄ | 000495-60-3 |
| 8 | 20.762 2 | 双环倍半萜烯 | bicyclosesquiphellandrene | 3.312 9 | C ₁₅ H ₂₄ | 054274-73-6 |
| 9 | 20.562 3 | α-姜黄烯 | alpha-curcumene | 2.297 7 | C ₁₅ H ₂₂ | 000644-30-4 |
| 10 | 21.026 9 | α-依兰油烯 | alpha-murolene | 1.935 9 | C ₁₅ H ₂₄ | 031983-22-9 |
| 11 | 21.442 9 | β-姜黄酮 | beta-turmerone | 1.652 1 | C ₁₅ H ₂₀ O | 1000374-15-9 |
| 12 | 24.927 1 | α-杜松醇 | alpha-cadinol | 1.546 4 | C ₁₅ H ₂₆ O | 000481-34-5 |
| 13 | 23.749 5 | 4-(2-丁基)甲苯 | 4-(2-butyl)toluene | 1.179 4 | C ₁₁ H ₁₆ | 001595-16-0 |
| 14 | 21.869 6 | 1,4-卡丁二烯 | 1,4-cadinadiene | 1.148 4 | C ₁₅ H ₂₄ | 016728-99-7 |
| 15 | 24.732 7 | 香桉醇 | torreyol | 1.045 3 | C ₁₅ H ₂₆ O | 133645-25-7 |
| 16 | 23.036 4 | 桉油烯醇 | spathulenol | 1.042 0 | C ₁₅ H ₂₆ O | 006750-60-3 |
| 17 | 18.660 8 | 石竹烯 | caryophyllene | 0.824 4 | C ₁₅ H ₂₄ | 000087-44-5 |
| 18 | 19.584 6 | 顺式-依兰油-3,5-二烯 | cis-muuroloa-3,5-diene | 0.819 1 | C ₁₅ H ₂₄ | 1000365-95-4 |
| 19 | 21.383 4 | α-紫德槐烯 | alpha-amorphene | 0.683 9 | C ₁₅ H ₂₄ | 000483-75-0 |
| 20 | 21.270 0 | β-异丁烯二烯 | beta-bisabolene | 0.624 2 | C ₁₅ H ₂₄ | 000495-61-4 |
| 21 | 20.340 9 | γ-依兰油烯 | gamma-murolene | 0.583 1 | C ₁₅ H ₂₄ | 030021-74-0 |
| 22 | 17.321 1 | 胡椒烯 | copaene | 0.462 5 | C ₁₅ H ₂₄ | 003856-25-5 |
| 23 | 31.485 1 | 正十六烷酸 | n-hexadecanoic acid | 0.399 7 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 000057-10-3 |
| 24 | 16.478 4 | α-荜澄茄油烯 | alpha-cubebene | 0.396 1 | C ₁₅ H ₂₄ | 017699-14-8 |
| 25 | 25.678 0 | α-没药醇 | alpha-bisabolol | 0.391 4 | C ₁₅ H ₂₆ O | 000515-69-5 |
| 26 | 22.145 1 | α-二氢菖蒲烯 | alpha-calacorene | 0.383 2 | C ₁₅ H ₂₆ | 021391-99-1 |
| 27 | 14.247 4 | 乙酸龙脑酯 | bornyl acetate | 0.382 3 | C ₁₅ H ₂₆ O ₂ | 000076-49-3 |
| 28 | 19.665 6 | 律草烯 | humulene | 0.323 6 | C ₁₅ H ₂₄ | 006753-98-6 |
| 29 | 19.870 9 | 别香橙烯 | alloaromadendrene | 0.307 6 | C ₁₅ H ₂₄ | 025246-27-9 |
| 30 | 17.791 1 | β-荜澄茄油烯 | beta-cubebene | 0.142 7 | C ₁₅ H ₂₄ | 013744-15-5 |

3.2 “三色散”挥发油对FLS存活率的影响

与正常对照组比较,当“三色散”挥发油质量浓度为10~250 μg/mL时,其对FLS存活率均无显著影响($P > 0.05$);而当挥发油质量浓度为500~1 000 μg/mL时,FLS存活率均显著降低($P < 0.05$),详见表3。基于此,本研究选择10、250 μg/mL作为后续研究中“三色散”挥

发油的给药质量浓度。

表3 “三色散”挥发油对FLS存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 3 Effects of “Sanse powder” volatile oil on FLS viability($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

| 组别 | 细胞存活率 | 组别 | 细胞存活率 |
|--------------|---------------|-----------------|---------------|
| 正常对照组 | 100 | 挥发油100 μg/mL组 | 109.59 ± 0.07 |
| 挥发油10 μg/mL组 | 107.26 ± 0.96 | 挥发油250 μg/mL组 | 94.91 ± 0.06 |
| 挥发油25 μg/mL组 | 105.81 ± 0.03 | 挥发油500 μg/mL组 | 24.41 ± 0.04* |
| 挥发油50 μg/mL组 | 109.67 ± 0.06 | 挥发油1 000 μg/mL组 | 4.56 ± 0.01* |

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$

3.3 “三色散”挥发油对FLS中NLRP3、caspase-1、ASC蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组细胞中NLRP3、caspase-1、ASC蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,“三色散”挥发油10、250 μg/mL组细胞中上述蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$),详见图2、表4。

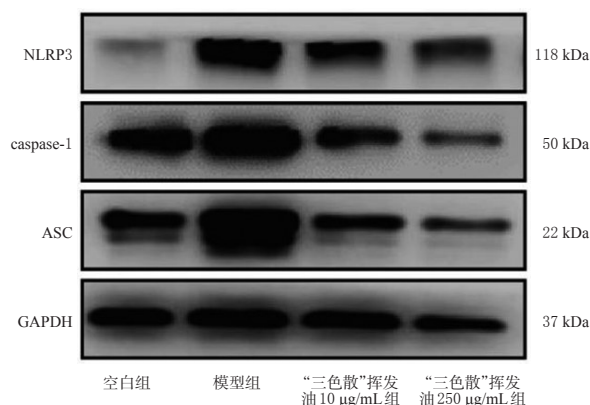


图2 “三色散”挥发油对FLS中NLRP3、caspase-1、ASC蛋白表达影响的电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of the effects of “Sanse powder” volatile oil on protein expression of NLRP3, caspase-1 and ASC in FLS

表4 “三色散”挥发油对FLS中NLRP3、caspase-1、ASC蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Effects of “Sanse powder” volatile oil on the relative protein expression of NLRP3, caspase-1 and ASC in FLS($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | NLRP3/GAPDH | caspase-1/GAPDH | ASC/GAPDH |
|--------------------|--------------|-----------------|--------------|
| 空白组 | 0.97 ± 0.54 | 1.15 ± 0.11 | 1.16 ± 0.15 |
| 模型组 | 2.16 ± 0.22* | 2.31 ± 0.16* | 2.92 ± 0.13* |
| “三色散”挥发油10 μg/mL组 | 1.68 ± 0.22* | 1.63 ± 0.12* | 1.82 ± 0.19* |
| “三色散”挥发油250 μg/mL组 | 1.39 ± 0.06* | 1.14 ± 0.16* | 1.31 ± 0.15* |

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. blank group, * $P < 0.05$; vs. model group, * $P < 0.05$

3.4 “三色散”挥发油对FLS中NLRP3、caspase-1、ASC mRNA表达的影响

与空白组比较,模型组细胞中NLRP3、caspase-1、

ASC mRNA 的相对表达量均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,“三色散”挥发油 10、250 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞中上述 mRNA 的相对表达量均显著降低($P<0.05$),详见表 5。

表 5 “三色散”挥发油对 FLS 中 NLRP3、caspase-1、ASC mRNA 相对表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 5 Effects of “Sanse powder” volatile oil on the relative mRNA expression of NLRP3, caspase-1 and ASC in FLS($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | NLRP3/GAPDH | caspase-1/GAPDH | ASC/GAPDH |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| 空白组 | 1 | 1 | 1 |
| 模型组 | 2.16 \pm 0.03* | 2.17 \pm 0.13* | 3.04 \pm 0.17* |
| “三色散”挥发油 10 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 1.65 \pm 0.11* | 1.27 \pm 0.16* | 1.51 \pm 0.28* |
| “三色散”挥发油 250 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 1.16 \pm 0.09* | 1.20 \pm 0.13* | 1.01 \pm 0.37* |

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$

Note:vs. blank group,* $P<0.05$;vs. model group,* $P<0.05$

3.5 “三色散”挥发油对 FLS 上清液中 IL-1 β 、IL-18 水平的影响

与空白组比较,模型组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-18 水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,“三色散”挥发油 10、250 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞上清液中上述因子水平均显著降低($P<0.05$),详见表 6。

表 6 “三色散”挥发油对 FLS 上清液中 IL-1 β 、IL-18 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3, \text{ng/L}$)

Tab 6 Effects of “Sanse powder” volatile oil on the levels of IL-1 β and IL-18 in the supernatant of FLS($\bar{x}\pm s, n=3, \text{ng/L}$)

| 组别 | IL-1 β | IL-18 |
|---------------------------------|---------------------|-----------------------|
| 空白组 | 18.658 \pm 0.972 | 45.728 \pm 3.291 |
| 模型组 | 29.437 \pm 1.168* | 113.532 \pm 10.721* |
| “三色散”挥发油 10 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 24.368 \pm 0.863* | 93.907 \pm 4.778* |
| “三色散”挥发油 250 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 20.153 \pm 1.049* | 68.163 \pm 4.637* |

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$

Note:vs. blank group,* $P<0.05$;vs. model group,* $P<0.05$

4 讨论

挥发油又称为精油,广泛存在于植物中,是一种天然的、具有挥发性和特殊气味、与水密度不同且不相容的油状液体,具有吸收快、疗效广、不滞留等优势^[12]。已有研究表明,挥发油不仅可发挥局部作用,也可以产生与口服药物相同的全身效应,并可降低口服药物某些不良反应(比如胃肠道不良反应和心血管疾病)的发生风险^[13]。中药或多或少都含有挥发油,发挥着各种各样的治疗作用,应用十分广泛:比如薄荷油具有抗菌消炎、抗氧化和驱虫的特性,可作为漱口水、牙膏、香烟、药品和食品的调味剂^[14];肉桂油具有较强的抗炎作用^[15];生姜油具有抗炎、抗氧化、止痛等多种生物活性^[16]。与中药及其复方制剂相比,挥发油具有成分分析难度较低、药理活性较强的优点,故探究其生物活性及对不同疾病的治疗潜力或可成为药物研发的有效路径之一^[17]。本研究中的“三色散”为“易层”贴敷片的核心组成,其中的多种

药材均含有丰富的挥发油,如片姜黄、当归、白芷、川芎、羌活、独活、连翘、川牛膝等。该贴敷技术自创立以来,已在南京中医药大学附属医院应用数十年;且经临床实践证实,其对 KOA 滑膜炎的治疗效果显著,具有良好的社会及经济效益^[18]。但是,有关该贴敷片的作用靶点及具体作用过程尚未被阐明,因此本课题组对该贴敷片核心组成“三色散”的挥发油成分进行了研究,并初步探讨了该挥发油的体外抗炎作用及机制,旨在为新治疗方式的开发和完善提供参考。

本研究首先利用水蒸气蒸馏法提取了“三色散”挥发油,所得挥发油具有独特的芳香气味。随后,通过 GC-MS 法分析了“三色散”挥发油的化学组成,共分离得到 41 种化学成分,并鉴定了其中的 30 种(共占总峰面积的 90.073 6%);而其余组分由于含量太低或质谱匹配度过低而无法得以确认。同时本研究结果显示,在“三色散”挥发油成分中,来自于片姜黄的相关成分占比高达 40.961 6%。有研究指出,片姜黄同时具有食用和药用价值,主要分布于热带和亚热带地区^[19],在亚洲和非洲传统医学中被广泛用于疼痛、咳嗽、创伤、炎症性疾病等的防治^[20]。现代研究进一步表明,片姜黄的生物活性可归因于其中所含的挥发性萜类化合物^[21]。这可能意味着“三色散”治疗 KOA 可能与其中的片姜黄高度相关,为未来“三色散”加减方及新药的开发提供了一定的依据。

最近一项研究表明,NLRP3 炎症小体可能是挥发油中二萜类和其他成分发挥抗炎作用的重要靶点^[22]。在过去的 10 年中,研究者在自身免疫性和自身炎症性疾病(包括代谢紊乱)的多个领域中对 NLRP3 炎症小体进行了大量的研究,结果显示,NLRP3 炎症小体介导的信号转导对 KOA 的发生具有重要的调控作用,与 KOA 软骨破坏和滑膜炎密切相关^[7,23]。目前,学者已提出 NLRP3 炎症小体激活的可能机制:第 1 步于转录水平上启动,其中 Toll 样受体(TLRs)识别微生物物质(PAMPs)或内源物质(DAMPs)以激活核因子 κB (NF- κB)介导的信号转导,这增加了 IL-1 β 、IL-18 前体蛋白(pro-IL-1 β 、pro-IL-18)和 NLRP3 蛋白的表达量;第 2 步是激活信号,该信号启动 NLRP3 寡聚,并导致 NLRP3、ASC 和 caspase-1 前体蛋白(pro-caspase-1)聚集在一起形成炎症小体,随后 pro-caspase-1 发生自我剪切活化为 caspase-1 p10、p20 等亚型,同时被活化后的 caspase-1 能将 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 剪切成成熟的 IL-1 β 、IL-18,后者大量释放至胞外,从而导致炎症反应的级联放大^[24]。基于此,本研究利用现代分子生物学技术,提取大鼠 FLS,通过 LPS 模拟 KOA 炎症环境,从细胞层面初步探讨了 KOA 可能存在的发病机制及“三色散”挥发油抗炎作用的潜在机制。结果表明,用 LPS 诱导后,模型组细胞中 NLRP3、

caspase-1、ASC的蛋白及其mRNA相对表达量以及上清液中IL-1 β 、IL-18水平均较空白组显著升高;经不同质量浓度“三色散”挥发油干预后,各给药组细胞中上述蛋白及其mRNA的相对表达量以及上清液中相关炎症因子水平均较模型组显著降低,提示NLRP3炎症小体及下游的瀑布样炎症反应是KOA滑膜炎的发病机制,而“三色散”挥发油对该通路具有积极的干预作用,可在一定程度上为探明“易层”贴敷这一优秀中医外治技术的潜在作用机制提供参考。

综上所述,“三色散”挥发油可能通过抑制FLS中NLRP3炎症小体的活化而减少下游炎症级联反应,从而发挥其改善KOA滑膜炎的作用。然而本研究也存在许多不足之处,比如仅对药物的干预作用进行了初步的观察研究,并未设置阳性对照药物和反向验证实验,也未从整体动物水平观察“三色散”挥发油对KOA模型大鼠滑膜炎的影响,对抗炎机制的研究仍然不够深入,有待后续研究予以完善。

参考文献

[1] TANG X, WANG S, ZHAN S, et al. The prevalence of symptomatic knee osteoarthritis in China: results from the China health and retirement longitudinal study[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(3):648-653.

[2] MATHIESSEN A, CONAGHAN P G. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1):18.

[3] 马振源, 莫蕙. 中医贴敷治疗膝骨关节炎的研究进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(6):926-930.

[4] 吴鹏, 茆军, 邢润麟, 等. “易层”贴敷治疗膝骨关节炎大鼠的GC-MS代谢组学研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 39(5):1-15.

[5] 王培民, 黄国淳, 丁亮, 等. “易层”贴敷疗法治疗膝骨性关节炎的临床疗效观察[J]. *世界科学技术(中医药现代化)*, 2014, 16(10):2097-2101.

[6] 王培民, 严培军, 丁亮, 等. 易层贴敷治疗踝关节急性软组织损伤的临床研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(6):513-515.

[7] ZHAO L R, XING R L, WANG P M, et al. NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP-induced pyroptosis in knee osteoarthritis[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4):5463-5469.

[8] 吴鹏, 黄正泉, 邢润麟, 等. 基于HMGB1探讨“易层”贴敷对KOA大鼠滑膜纤维化的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2019, 35(5):547-551.

[9] WU P, HUANG Z, SHAN J, et al. Interventional effects of the direct application of “Sanse powder” on knee osteoarthritis in rats as determined from lipidomics via UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS[J]. *Chin Med*, 2020, 15:9.

[10] 吴凤桦, 冯晗, 文勇坤, 等. 基于阴阳药性的中药挥发油作

用特点分析及应用展望[J]. *南京中医药大学学报*, 2019, 35(1):111-115.

[11] 王梁凤, 李慧婷, 陈青垚, 等. 中药挥发油抗菌作用的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5):1026-1033.

[12] 刘媛, 臧振中, 伍振峰, 等. 中药挥发油质量控制的现状、问题与对策[J]. *中草药*, 2018, 49(24):5946-5951.

[13] 陈军, 李钰, 苏曼. 中药经皮给药脂质体的研究与展望[J]. *南京中医药大学学报*, 2019, 35(5):623-630.

[14] ANWAR F, ABBAS A, MEHMOOD T, et al. *Mentha*: a genus rich in vital nutra-pharmaceuticals: a review[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(10):2548-2570.

[15] LYU F, HONG Y L, CAI J H, et al. Antimicrobial effect and mechanism of cinnamon oil and gamma radiation on *Shewanella putrefaciens*[J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 55(9):3353-3361.

[16] ZHANG M, ZHAO R, WANG D, et al. Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and its bioactive components are potential resources for health beneficial agents[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(2):711-742.

[17] ISHFAQ P M, SHUKLA A, BERAIYA S, et al. Biochemical and pharmacological applications of essential oils in human health especially in cancer prevention[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18(13):1815-1827.

[18] 曹译文, 曹煜. “易层”贴敷疗法的临床应用及理论探讨[J]. *中医药导报*, 2017, 23(23):73-74.

[19] PRIYADARSINI K I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent[J]. *Molecules*, 2014, 19(12):20091-20112.

[20] DOSOKY N S, SETZER W N. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Curcuma* species[J]. *Nutrients*, 2018, 10(9):1196.

[21] DOSOKY N S, SATYAL P, SETZER W N. Variations in the volatile compositions of *Curcuma* species[J]. *Foods*, 2019, 8(2):52.

[22] ISLAM M T, BARDAWEEL S K, MUBARAK M S, et al. Immunomodulatory effects of diterpenes and their derivatives through NLRP3 inflammasome pathway: a review[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:572136.

[23] ZHANG L, XING R, HUANG Z, et al. Inhibition of synovial macrophage pyroptosis alleviates synovitis and fibrosis in knee osteoarthritis[J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019:2165918.

[24] HUMPHRIES F, SHMUEL-GALIA L, KETELUT-CARNEIRO N, et al. Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis[J]. *Science*, 2020, 369(6511):1633-1637.

(收稿日期:2021-04-06 修回日期:2021-08-16)

(编辑:张元媛)