

茵陈粗多肽的提取分离及小鼠肝保护作用

南京大学生物系(210039) 胡一桥* 谭仁祥
中国药科大学 褚明艳 欧文星

摘要 茵陈为菊科植物茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thumb. 的地上部分。具有清湿热,退黄疸等多种药理作用。本文的目的为:提取及初步分离茵陈中的水溶性多肽,并对其部分肝脏生理活性进行研究。文中测定了小鼠注射茵陈多肽后对药物肝损伤的保护作用,参与鼠巨噬细胞对刚果红的吞噬作用。结果表明:茵陈多肽在小鼠具有显著的肝保护作用,并可以显著增强小鼠巨噬细胞的吞噬能力。

关键词 茵陈蒿 多肽 肝保护作用

茵陈为菊科植物茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thumb. 的地上部分。具有清湿热,退黄疸等多种药理作用^[1]。近年来对茵陈的化学成分及药理方面的研究很多,茵陈的一些新的药理作用也不断被证实,如具有促进白细胞分裂,增加白细胞数目,提高T细胞的免疫活性,参与机体免疫调节和诱导干扰素等作用,还具有抗肿瘤以及降压作用^[2~4]。但大多数的研究集中在脂溶性小分子方面。仅1985年日本 Kitasato 研究所报道茵陈蒿多肽有干扰素诱导功能^[5]。因此,本文对茵陈的水溶性多肽进行了初步分离、提取,并对其肝保护作用,以及增强巨噬细胞吞噬作用进行了初步研究。

1 材料

1.1 动物:小鼠(昆明种)。

1.2 药品:丙酮酸标准液、SGPT 底物溶液、2,4-二硝基苯肼由铁医生生化教研室提供。肝素由山东枣庄生化厂提供。Sephadex G-50、G-75、DEAE-Sephacel 购于中国科学院上海脑研究所。其余试剂为市售分析纯。

1.3 仪器:H66005 超声机(无锡超声电子设备厂);冷冻高速离心机(Sigma 公司);稳流稳压电泳仪(江苏省丹阳市无线电一厂);7550UV-VIS 紫外分光光度仪(上海分析仪

器厂)。

2 方法

2.1 茵陈粗多肽的提取与分离:

提取:取新鲜茵陈(采自江苏句容,南京大学生物系教授鉴定)地上部分;4℃条件下用水浸泡提取12h,去渣取汁。15℃4000 r/min 离心15 min,分离出沉淀,留取上清液。将上述上清液用硫酸铵沉淀,静置5h,3000 r/min 离心15 min,去上清液,取沉淀,室温减压干燥,称重。

分离:离子交换树脂脱色:称取 DEAE-Sephacel 若干克,先用蒸馏水浸泡,待充分膨胀后进行酸碱处理,用系列浓度 Na⁺ 的洗脱液进行洗脱,收集样品。将上述粗品用 pH 4.5 的缓冲液溶解,用截留分子量3000 的中空纤维超滤,截去分子量小于3000 的小分子,所得的浓缩液冷冻干燥得到多肽粗品。

2.2 高效液相色谱法测定茵陈多肽分子量^[6]:色谱柱: BIO-RAD 凝胶柱(300 mm × 7.8 mm), 流动相: 0.05 mol/L NaH₂PO₄, 0.5 mol/L Na₂HPO₄, 15 mol/L NaCl, 0.1 mol/L pH 6.8; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 室温。取标准品(BIO-RAD 公司随柱标准品)进样,确定标准品的保留时间。分子量的对数值对保

* Address: Hu Yiqiao, Department of Biology, Nanjing University, Nanjing

留时间作图,得到标准曲线。样品进样,由保留时间在标准曲线上查得分子量。结果表明:主要为两个色带,其分子量为:6 000,9 000。

2.3 小鼠肝保护作用^[7,8]:取 18~22 g 雄性小鼠,随机分成 4 组,每组 10 只。分别为生理盐水组,茵陈多肽组(4 mg/mL),茵陈蒿汤组^[9](茵陈醇提取物 6 mg/mL,栀子醇提取物 3 mg/mL,大黄醇提取物 2 mg/mL),正常对照组。第一天上午,下午;次日上午除正常组外,各组给药 1 次(10 mg/kg 体重,im),末次给药后 0.5 h,各鼠均 ip 扑热息痛 200 mg/kg,24 h 后取血清,根据标准曲线测定血清谷氨酸-丙酮酸转氨酶。同时剖取肝脏作病理检查,根据病理切片观察组织学变化。

2.4 小鼠刚果红吞噬作用^[10]:小鼠 30 只,雌雄兼用,随机分成 3 组,分别 im 生理盐水组,茵陈多肽组(4 mg/mL),茵陈蒿汤组^[9](茵陈醇提取物 6 mg/mL,栀子醇提取物 3 mg/mL,大黄醇提取物 2 mg/mL)。连续给药 5 d(10 mg/kg 体重),每天 1 次。于末次给药后 1 h 分别用经肝素处理过的毛细管从眼后静脉丛取血 50 μ L,立即放入 5 mL 蒸馏水中,使之完全溶血,作为对照管。随即从尾静脉定量注入 10 mg/mL 刚果红生理盐水溶液 10 mL/kg 体重。注射后 2 min,同法取血 50 μ L,放入 5 mL 蒸馏水中溶血,作为试验管,在 510 nm 波长下比色。

3 结果

3.1 小鼠肝保护作用:茵陈多肽对小鼠肝血清谷氨酸-丙酮酸转氨酶的作用,以及用生理盐水为对照组的统计结果见表 1(采用 SigmaPlot 统计软件)。

茵陈多肽与茵陈蒿汤两组进行 *t*-test 统计,结果表明 $P < 0.05$,说明茵陈多肽的保肝作用优于茵陈蒿汤组。

小鼠肝脏切片结果表明:正常组包膜完整,无渗出,肝细胞排列整齐,无明显瘀血及变性坏死现象。生理盐水组有大量肝细胞浆疏松化,范围超过肝小叶范围的 1/2,肝脏瘀血明显。茵陈多肽组包膜完整,无渗出,肝细

胞弥漫性胞浆疏松化广泛,个别细胞气球样变,无明显瘀血、坏死现象。茵陈蒿汤组:包膜完整,无渗出,肝细胞浆疏松广泛,个别细胞出现脂肪性变,无明显瘀血、坏死现象。

表 1 茵陈多肽对小鼠肝血清谷氨酰转氨酶(SGPT)的作用($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量(mg/kg)	SGPT(U/mL)	P 值	F 值
正常组	10	10	61.12 \pm 16.11		
生理盐水	10	10	128.50 \pm 47.33		
茵陈多肽	10	10	42.56 \pm 13.56	<0.001	18
茵陈蒿汤	10	10	58.19 \pm 18.82	<0.001	18

3.2 小鼠刚果红吞噬作用:各组小鼠定量注射刚果红后,30 s 时每毫升血中刚果红浓度,以及与生理盐水对照组的统计结果见表 2(采用 SigmaPlot 统计软件)。

表 2 茵陈多肽对小鼠刚果红吞噬作用($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量(mg/kg)	刚果红水平(μ g/mL)	P 值	F 值
生理盐水	10	10	7.04 \pm 1.27		
茵陈多肽	10	10	3.73 \pm 1.95	<0.001	18
茵陈蒿汤	10	10	4.00 \pm 1.37	<0.001	18

茵陈多肽与茵陈蒿汤两组间进行 *t*-test 统计,结果表明 $P > 0.05$,说明茵陈多肽与茵陈蒿汤两组间,增强巨噬细胞吞噬作用无显著性差异。

4 讨论

扑热息痛致小鼠肝损伤的中毒剂量和观察指标较明确,且其代谢途径又与四氯化碳、乙硫氨酸、*D*-半乳糖等有所不同,是一种常用的研究药物代谢、药物相互作用和筛选抗肝炎药的急性肝损伤模型。小鼠肝保护实验统计学分析表明:与生理盐水对照组相比,茵陈多肽组和茵陈蒿汤组均有显著的抗药物肝损伤作用($P < 0.001$),而且茵陈多肽比茵陈蒿汤具有更强的抗肝损伤作用($P < 0.001$)。以往的文献报道抗肝损伤的主要成分为一些小分子物质如氟原酸等^[1],但通过实验我们发现茵陈中的大分子同样对肝损伤有保护作用,甚至更强。

吞噬作用是巨噬细胞的主要生物学特征,它在机体的非特异性和特殊性免疫反应

中,在第Ⅳ类变态反应的炎症过程中,以及在肿瘤免疫中都具有重要的作用,因而日益受到人们的重视。根据实验及统计结果可以看出,茵陈多肽,茵陈蒿汤都可以显著增强巨噬细胞的吞噬能力,提高机体免疫力。作用与对照组相比在统计学上有显著差异。茵陈多肽与茵陈蒿汤的作用在统计学上无显著差异。

参考文献

- 1 阴健,等. 中药现代研究与临床应用. 北京:中医古籍出版社,1995:484
- 2 褚明艳,等. 中草药,1998 29:516

- 3 洪振丰,等. 福建中医药,1991,22(2):50
- 4 Wu T S, et al. Phytochemistry, 1998,47(8):1645
- 5 Kitasato Institute, Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 82 18,622
- 6 师治贤,等. 生物大分子的液相色谱分离和制备. 北京:科学出版社,1996:262
- 7 徐秀兰,等. 生物化学实验指导. 北京:中国医药科技出版社,1994:24
- 8 陈重阳,等. 中国药理学通报,1988,4(2):124
- 9 赵新先. 中药注射剂. 北京:人民卫生出版社,1998:365
- 10 严宜左,等. 北京中医学院学报,1980,(1):40
- 11 胡润生,等. 药学报,1965,12(5):289

(1999-07-20 收稿)

竹叶胡椒挥发油成分研究

南京军区福州总院分院(350003) 李金兰*
福州医学高等专科学校 范尚坦
浙江桐庐县人民医院 陈彩珍

竹叶胡椒 *Piper bambasaeifolium* Tseng 主要分布在四川、江西、湖北等地,模式产地四川城口。作者在进行海风藤原植物考察中发现浙江西部亦有大量竹叶胡椒分布。民间广泛用于风湿腰腿痛。国内外尚未见竹叶胡椒挥发油成分的研究报道。我们以 GC-MS 对其挥发油进行了研究,共分离出 60 个色谱峰,鉴定出其中 34 个成分。

1 材料和样品制备

实验材料采自浙江省建德童家乡,标本与江苏植物研究所馆藏标本核对符合。腊叶标本存于福州医学高等专科学校标本室。

粗粉 100 g,经水蒸气蒸馏获 0.2 mL 桔黄色挥发油。

2 仪器和条件

JMS-D 300 色-质联用仪,SE-52 玻璃毛细管色谱柱 18 m×0.25 mm,载气 He,起始柱温 60℃,3 min 给以 6℃/min,升至 180℃,直到分析结束。柱前压为 1.18×10^5 Pa,进样口温度为 230℃,尾吹压 6.8×10^4 Pa,电子能量 70 eV,离化电流 300 μ A,离

子源温度 200℃,电离方式 EI,倍增电压 1.3 kV。

3 方法与结果

共分离出 60 个色谱峰,将 EI 质谱图与标准图对照检索,初步鉴定出其中 34 个成分,主要是萜烯及其含氧化合物,具体成分如下: α -侧柏烯, α -蒎烯,莰烯, β -蒎烯,月桂烯, α -水芹烯, α -蒎品烯,甲基异丙基, β -水芹烯, γ -蒎品烯,水化香桉烯, α -蒎品油,芳樟醇,蒎品烯醇-4, α -蒎品醇,香桃木烯醇,马鞭草烯酮,乙酸冰片酯,2-十一烷酮, β -愈创木烯,珞珈烯, β -榄香烯,顺式石竹烯,反式石竹烯, α -佛手烯,苜蓿基醚,顺式- β -麝子油烯, α -榄香烯, α -姜黄烯, β -甜药烯,榄香醇,反式- β -麝子油烯, β -马阿里烯,4(14)-桉叶烯醇-11。

参考文献

- 1 范尚坦,等. 中药材,1987,(4):40
- 2 Stenhagen E, et al. Registry of Mass Spectral Data. New York: John Wiley and Sons, 1974
- 3 Heller SR, et al. EPA/NIH Mass Spectral Data Base. Washington: U.S. Government Printing office, 1978

(1999-01-21 收稿)

* 李金兰 女,1980年毕业于上海医科大学药学院,现任南京军区福州总院分院医技科主任,主要从事医院药学工作。