

表 3 泽兰 L. F04对大鼠体内血栓形成的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of L. F04 on thrombosis

in rats *in vivo* ($\bar{x}\pm s$)

组 别	动物 /只	剂量 /(g·kg ⁻¹)	血栓湿重 /g	血栓形成抑 制率 %
正常对照	11	—	35.82± 10.88	—
L. F04	10	0.204	26.10± 9.97	27.14
	10	0.408	26.10± 7.16	27.41
复方丹参片	10	1.175	24.40± 9.90	31.88

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal control group

形成血栓的主要因素。观察泽兰 L. F04对血小板聚集和血栓形成的影响,是研究其活血化瘀作用机制的一个重要组成部分。本实验结果表明,泽兰 L. F04高、低剂量 ig 给药对血瘀证大鼠 ADP诱导的血小板聚集皆有显著的抑制作用,且呈剂量依赖关系,与预期结果相一致,并为确定 L. F04为泽兰活血化瘀作用的主要有效部分提供了进一步的证据

本实验结果还表明,泽兰 L. F04 0.408, 0.204 g/kg 均能有效地减轻血瘀大鼠体外血栓湿、干质量及抑制大鼠体内血栓形成,其中高剂量组的抗血栓作用尤为显著。研究证实泽兰 L. F04不仅可以抑制血小板聚集,还通过阻抑凝血系统功能,减少血浆纤

维蛋白原含量来抑制血栓形成。同时 L. F04具有较强的改善红细胞变形能力、抑制红细胞聚集、降低血液黏度等特点^[5],说明 L. F04从多种途径、多种作用环节干预血栓形成过程。其中抑制血小板聚集起关键性作用。

References

[1] Liu X M, Gao N N, Yu S R, *et al.* Improving effects of Shing Bugleweed (*Lycopus lucidus*) on blood stasis syndrome of rabbit induced by simulating weightlessness [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1991, 22(11): 501-503.

[2] Hu H J, Qi G R, Chen Y X, *et al.* Anticoagulation of herb *Lycopus lucydis* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1995, 11(6): 28-31.

[3] Zhang Y J, Kang B, Geng X F, *et al.* Study on effect depressing blood-lipid of *Herba Lycopy* [J]. *J Weifang Med Coll* (潍坊医学院学报), 1993, 15(1): 16-17.

[4] Gao N N, Tian Z, Li L L, *et al.* Studies on the blood-activating and stasis-resolving pharmacology of shing bugleweed (*Lycopus lucidus*) I. Effects of four extract fractions of shing bugleweed on the hemorrheology of rat [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(6): 352-355.

[5] Shi H Z, Gao N N, Li Y Z, *et al.* Effects of active fractions from *Lycopus lucidus* L. F04 on erythrocyterheology [J]. *Space Med Med Eng* (航天医学与医学工程), 2002, 15(5): 331-334.

[6] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.

[7] Xu L N, Ou Y R. Antithrombotic effects of sodium ferulate in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1981, 2(1): 35-37.

板蓝根中丁香酸的抗内毒素作用

刘云海,方建国,贡雪芹,谢 委*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院,湖北 武汉 430030)

摘 要:目的 研究从板蓝根中分离出的丁香酸的抗内毒素作用。方法 将丁香酸配成 1% 水溶液,鲎试验法做抗内毒素定量测定;用内毒素致兔发热实验检测丁香酸体内抗内毒素作用;内毒素致小鼠死亡实验测定丁香酸保护作用。结果 0.334 mg/mL丁香酸可使 4 EU内毒素降为 0.777 EU,破坏率为 83.16%;1% 丁香酸溶液可使内毒素引起的兔热显著降低;使同等剂量脂多糖引起的小鼠死亡率由 68% 降为 20%。结论 丁香酸有抗内毒素作用。

关键词:丁香酸;抗内毒素;板蓝根

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2003) 10- 0926- 03

Anti-endotoxic effects of syringic acid in *Radix Isatidis*

LIU Yun-hai, FANG Jang-guo, GONG Xue-peng, XIE Wei

(Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract **Object** To study the anti-endotoxic effect of syringic acid (SA) which was isolated from *Radix Isatidis* (Banlangen in Chinese, BLG). **Methods** SA was extracted and isolated from BLG and made to 1% solution. The content of SA-pretreated ET was quantitatively determined using Limulus Test. Then the ability of fever induction of endotoxin (ET) pretreated with SA was measured using endo-

* 收稿日期: 2002-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870872); 卫生部科学研究基金资助项目 (98-2-110)

作者简介: 刘云海(1942-),男,江苏如东人,主任药师,主要从事医院药学研究。Tel (027) 83649095 83624090

E-mail liuyunhaitong@yahoo.com.cn

toxin-induced fever test in rabbits. At last, the lipopolysaccharide (LPS)-induced death in mice pretreated with and without SA was compared. **Results** Being pretreated with SA, 83.16% ET was destroyed, the ET-induced fever in rabbits relieved markedly and the LPS-induced death rate in mice dropped from 68% to 20%. **Conclusion** SA isolated from BLG has anti-endotoxic effects.

Key words syringic acid (SA); anti-endotoxin; *Radix Isatidis* (BLG)

中药清热解毒作用的药理基础是其活性成分的抗菌、抗内毒素作用。板蓝根抗大肠杆菌 O₁₁₁B₄内毒素作用已有报道^[1~3],本实验在对板蓝根提取部位抗内毒素作用大量研究基础上,对其化学成分丁香酸的抗内毒素作用进行了研究。

1 材料

1.1 丁香酸提取和分离:板蓝根产于河北邢台,经华中科技大学同济医学院药学院张长弓教授鉴定为十字花科菘蓝 *Isatis indigotica* L. 的干燥根。将其粉碎成细粉,用 95% 乙醇浸泡 72 h,继用乙醇渗漉,回收乙醇至无醇味并浓缩至浸膏状,用石油醚反复萃取,除尽石油醚部位,继用氯仿反复萃取得氯仿部位(得率 0.8%);采用硅胶柱色谱,用不同比例氯仿-甲醇液作梯度洗脱,并用体内外多种抗内毒素活性实验筛选^[4,5],最终得抗内毒素活性最强成分,经中国科学院上海药物研究所鉴定为丁香酸(syringic acid, SA)。

1.2 丁香酸溶液配制:取丁香酸 1 g,加适当助溶剂,加热熔化,加水稀释到 100 mL,用 NaOH 液调 pH 6~7,灭菌消毒备用。

1.3 试剂:脂多糖(E. Coli O₂₆B₈,每支 5 mg,批号 11K4040)购自 Sigma 公司;内毒素工作标准品(E. Coli O₁₁₁B₄,每支 120 EU,批号 2000-4)购自中国药品生物制品检定所;鲎试剂(TAL, 0.1 mL/支,灵敏度 0.05 EU/mL,批号 0008152)和细菌内毒素溶解水(BET,内毒素限量 0.015 EU/mL,批号 000308)均购自湛江安度斯生物制品有限公司;卡介苗(BCG, 50 mg/皮,批号 990901)购自上海生物制品研究所。

1.4 动物:日本大耳白兔,体重 2.0~2.5 kg,雌雄兼用;昆明种小鼠,体重 16~18 g,雌性,均由华中科技大学同济医学院医学动物实验中心提供。

1.5 仪器:EDS98型细菌内毒素检测仪,购自北京金山川科技发展有限公司;XW 型旋涡混合器由上海医科大学研究所提供。

2 实验方法

2.1 丁香酸破坏内毒素定量测定

2.1.1 内毒素液配制:取内毒素工作标准品(120

EU/皮)加入 1 mL 细菌内毒素溶解水,于旋涡混合器振荡 30 s,即成 120 EU/mL 内毒素液。

2.1.2 标准曲线制备:分别取内毒素液适量,用细菌内毒素溶解水稀释成 5.0, 2.5, 1.0, 0.5, 0.25 和 0.1 EU/mL 系列内毒素浓度(C),各取 0.2 mL 加入鲎试剂中(双管法),旋涡混合器振荡后迅速插入内毒素定量测定仪,记录凝胶形成时间(T_g),用 $\log T_g$ 对 $\log C$ 作图,得标准曲线 $\log T_g = 2.80049 - 0.23326 \log C$, $r = 0.9905$,内毒素在 0.1~5.0 EU/mL 浓度与凝胶形成时间呈线性关系,最低检出限为 0.05 EU/mL。

2.1.3 回收率:按上述方法,取鲎试剂 5 支,分别精密加入浓度为 4 EU/mL 内毒素液 0.2 mL,测定凝胶形成时间,按标准曲线计算浓度为 (4.726 ± 0.243) EU/mL,回收率为 $(118.15 \pm 10.52)\%$ 。

2.1.4 样品测定:取 0.5 mL 丁香酸液(1%)与 0.1 mL 内毒素液混合,于水浴 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 温育 (60 ± 2) min,温育后取 0.1 mL 溶液加入 0.4 mL 细菌内毒素溶解水,使丁香酸和内毒素终浓度分别为 0.334 mg/mL 和 4 EU/mL,此为样品组,同时用 0.334 mg/L 丁香酸和 4 EU/mL 内毒素液分别作阴性和阳性对照组,测定内毒素浓度。丁香酸对内毒素的破坏率按下列公式计算:

$$r = [1 - (\text{样品组} - \text{阴性对照组}) / (\text{阳性对照组} - \text{阴性对照组})] \times 100\% \quad [6]$$

2.2 丁香酸对脂多糖致兔发热的影响

2.2.1 内毒素液配制:将内毒素工作标准品用氯化钠注射液 6 mL 溶解,使成 20 EU/mL 内毒素液。

2.2.2 动物实验:实验前 1 周将兔于实验室饲养;实验前 3 d,每天测肛温 2 次,使兔适应操作环境;实验前 1 d 下午开始兔禁食不禁水;实验时,隔 30 min 测肛温 1 次。选体温在正常范围内且肛温差 $\leq 0.2^\circ\text{C}$ 的兔 15 只,随机分为 3 组,每组 5 只。样品组和丁香酸液组分别按 5 mL/kg 自耳缘静脉 iv 1% 丁香酸液,内毒素模型组注入等量氯化钠注射液,10 min 后,样品组和内毒素模型组按同法注入 2 mL 内毒素液,注射后 0.5 h 开始,每隔 0.5 h 测肛温 1 次,共测 8 次^[7]。

2.3 丁香酸对脂多糖致小鼠死亡的保护作用

2.3.1 卡介苗敏化小鼠: 将卡介苗 (50 mg/皮) 加氯化钠注射液溶解成 5 mL,按文献方法^[8],小鼠 ip 200 mg/kg,按常规方法饲养,第 10天开始实验。

2.3.2 脂多糖液配制: 取脂多糖 1 支,加氯化钠注射液溶解成 5 mL。

2.3.3 动物实验: 实验前 16 h 小鼠禁食不禁水,实验时将小鼠随机分为 3 组,每组 20 只;样品组和丁香酸液组按 20 mL/kg ip 丁香酸液,脂多糖模型组按同样量注射氯化钠注射液,1.5 h 后,样品组和内毒素模型组自尾静脉 iv 2.42 mL/kg 脂多糖液,于 72 h 内观察小鼠死亡情况。

3 结果

3.1 丁香酸对内毒素的破坏作用: 样品管、阳性对照管和阴性对照管内毒素平均浓度分别为 0.777, 4.366 和 0.055 EU/mL,浓度为 0.334 mg/mL 的丁香酸液对内毒素的破坏率为 83.16%。

3.2 丁香酸对内毒素致兔发热的影响: 按每只兔给药后的最大升温数与给药前平均基础体温之差求每组兔平均最大升温 ΔT_{max} ,另按每只兔给药后 4 h 内体温随时间变化求体温反应指数 TRL_4 (4 h 内兔体温变化曲线下面积)。结果见表 1 结果显示,兔给予内毒素 (40 EU/kg) 可引起典型发热反应,而给予 1% 丁香酸溶液 (5 mL/kg) 后再给予等量内毒素液,则 TRL_4 和 ΔT_{max} 均降低,而样品组与丁香酸液组引起兔发热差异无显著性

表 1 丁香酸对内毒素致兔发热影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of SA on rabbits fever induced by endotoxin ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	基础体温 /℃	TRL_4 /℃·min	ΔT_{max} /℃
样品	39.15±0.25	1.16±0.21	0.36±0.07*
丁香酸液	39.20±0.36	0.16±0.13	0.13±0.12*
内毒素模型	38.94±0.34	3.21±0.27	1.14±0.32

与内毒素模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs endotoxin model group

3.3 丁香酸对小鼠死亡的影响: 样品组 (20 只) 10 h 后死亡 4 只,死亡率 20%; 脂多糖模型组 (19 只) 5 h 内死亡 13 只,死亡率 68%; 丁香酸组 (20 只) 72 h 内全部存活。样品组与脂多糖模型组比,经 χ^2 检验存活率差异有显著性 ($P < 0.01$)

4 讨论

4.1 动态显色凝胶法操作简单,灵敏度高,测定范围广,通常内毒素浓度在 0.05~300 EU/mL 浓度

内均可作定量测定。本实验经丁香酸液 (0.334 mg/mL) 作用后,内毒素浓度由 4 EU/mL 降为 0.777 EU/mL,破坏率达 83.16%。

4.2 致热是内毒素的主要特性之一,兔对内毒素最敏感,故常被用于清热解毒药研究。关于引起兔发热的剂量,各家报道不一致,我们发现内毒素模型组给予 40 EU/kg E. Coli O111 B4 可产生典型发热反应,与只给丁香酸液相比差异显著。

4.3 不同种类实验动物对脂多糖敏感性不同。文献报道,小鼠脂多糖半数致死量为 25 mg/kg^[8],经用卡介苗增敏,2.42 mg/kg 脂多糖可致 70% 小鼠死亡,因卡介苗能刺激 T 细胞活化吞噬细胞,减少脂多糖量。我们实验发现,给脂多糖前给丁香酸,对小鼠死亡有保护作用,而在给脂多糖后给丁香酸,则效果差。可见在免疫系统激活前给与丁香酸,有助抗内毒素作用发挥。小鼠内毒素模型组因注射方法不当死亡 1 只,故用 19 只参加计算。

4.4 中药化学成分是中药药理作用的物质基础,本实验结果显示,板蓝根所含丁香酸于体内、外均有抗内毒素活性,可以作为板蓝根抗内毒素药物研究的指标成分。

References

[1] Liu Y H. Experimental studies on the anti-endotoxic effect of dyers wood root (*Isatis tinctoria*) injection [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(8): 413-414.

[2] Zhang H M, Zhang G, Qiao Z Z. Detection of indigo and indirubin in different part of *Radix Isatidis* and *Folium Isatidis* and anti-endotoxic action comparison of some ingredients (abstract) [J]. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 2000, 18(5): 347.

[3] Liu Z F, Li G S, Fu F H, *et al.* Observation on the anti-endotoxic effect of 8 kinds of Chinese tradition medicines [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(1): 58-59.

[4] Liu Y H, Ding S P, Lin A. Study on anti-endotoxin of chloroform extract from *Radix Isatidis* [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2001, 21(6): 326-328.

[5] Liu Y H, Ding S P, Lin A H. The protective effects of different polar fractions from *Radix Isatidis* on endotoxin challenged mice [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 2001, 30(3): 272-273.

[6] Gerhard V H, Vogel W H. *Guide of Pharmacological Experiments-Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assays* (药理学实验指南—新药发现和药理学评价) [M]. Beijing: Beijing Science and Technology Publishing House, 2001.

[7] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol I.

[8] Vogel S N, Moore R N, Spe J D, *et al.* BCG-induced enhancement of endotoxin sensitivity in C3H/HeJ mice [J]. *J Immunol*, 1980, 124(10): 2004.