

大青叶抗内毒素活性部位筛选

方建国, 施春阳, 汤 杰, 王文清, 刘云海*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 药学部, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 评价和比较大青叶 5 个化学部位的抗内毒素作用。方法 采用动态浊度法测定细菌内毒素浓度, 观察大青叶不同化学部位对放线菌素 D 敏化小鼠内毒素致死攻击的保护作用。并以内毒素制备家兔发热模型, 测定其肛温变化。结果 大青叶 IV 部位能直接中和降解内毒素, 显著降低内毒素的致热性和致死性。结论 大青叶 IV 部位具有显著的体内外抗内毒素活性。

关键词: 大青叶; 抗内毒素; 活性部位

中图分类号: R 282. 71; R 285. 5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0060-03

Screening of active fraction of antiendotoxin from *Folium Isatidis*

FANG Jian-guo, SHI Chun-yang, TANG Jie, WANG Wen-qing, LIU Yun-hai

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

Abstract: **Object** To evaluate and compare the antiendotoxin activity of five different fractions isolated from *Folium Isatidis*. **Methods** With kinetic turbidimetric assay, the bacterial endotoxin content of the testing samples was determined. The protection for the mice sensitized by actinomycin D from endotoxin-induced lethality was investigated. Changes of the rectal temperature were observed in febrile rabbits induced by endotoxin. **Results** The fraction IV from *Folium Isatidis* can neutralise endotoxin directly, and inhibit pyrogenicity and lethality induced by endotoxin. **Conclusion** The fraction IV from *Folium Isatidis* shows to have remarkable antiendotoxin activity *in vitro* and *in vivo*.

Key words: *Folium Isatidis*; antiendotoxin; active fraction

大青叶 *Folium Isatidis* 系十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶, 是常用的清热解毒类中药, 临床上被广泛用于治疗流感、腮腺炎、肝炎等。现代医学关于清热解毒功效的阐释目前主要集中于以下两点: 一是抗细菌内毒素作用, 二是抗病原微生物作用, 尤其是抗内毒素活性为该类中药的重要属性^[1]。本实验采用体外细菌内毒素定量检查法和小鼠体内抗内毒素致死攻击保护实验, 综合比较大青叶各化学部位抗内毒素作用强度, 从而筛选其活性部位; 在此基础上, 结合内毒素致家兔发热效应进一步验证、评价活性部位的抗内毒素作用。

1 材料

1.1 药材及其化学部位制备: 大青叶采自安徽亳州, 经本院中药研究室方建国副主任药师鉴定为十字花科植物菘蓝 *I. indigotica* Fort. 的干燥叶。药材粉碎成粗粉, 95% 乙醇渗漉法提取, 减压浓缩至

无醇味, 拌以硅藻土采用系统溶剂分离法, 依次以石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇、水加热回流提取, 回收溶剂得到 5 个不同极性的化学部位浸膏 (按原生药量计, 得率分别为 1.5%, 1.1%, 0.7%, 1.7%, 1.0%, 编以代码简称大青叶 I, II, III, IV, V 部位)。

1.2 动物: 昆明种小鼠, 雄性, 体重 18~22 g; 日本大耳白兔, 雌雄不拘, 体重 2.0~2.5 kg, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.3 试剂: 细菌内毒素工作标准品 (20 EU/支, 010203), 动态比浊法鲎试剂 (KTA 鲎试剂, 灵敏度 0.06 EU/mL, 001123), 细菌内毒素检查用水 (BET 水, 5 mL/支, 001222), 稀释液 (II) (4 mL/支, 010430), 以上均购于湛江安度斯生物有限公司; 放线菌素 D (ACTD, 0.2 mg/支, 上海新亚药业有限公司, 000402); 脂多糖 (LPS, 5 mg/支, Sigma 公司, 69H4022); 地塞米松片 (0.75 mg/片), 天津柏海药

* 收稿日期: 2003-06-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39800193)

作者简介: 方建国 (1965—), 男, 河南信阳人, 副主任药师, 博士, 主要从事中药药效的物质基础与标准化研究; 曾主持参加国家自然科学基金资助项目和省部级课题 8 项, 发表学术论文 20 余篇, 编写学术著作 2 部。

Tel: (027) 83624090, 83649095 E-mail: fjj3560@sina.com

业有限公司, 011022); 其余试剂均为分析纯。

1.4 仪器: EDS—98 细菌内毒素测定仪 (北京金山川科技发展有限公司); RE—10E—100 型旋转蒸发器 (日本 SIBATA 公司); XW—80A 型旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 动态浊度法测定大青叶不同化学部位的体外抗内毒素作用

2.1.1 动态浊度法原理: 微量细菌内毒素可以激活鲎试剂中的凝固酶原成为凝固酶, 进而切断凝固蛋白原中特定位置的精氨酸肽键, 形成凝固蛋白产生凝胶, 造成浊度 (吸光度) 的变化。这一反应中存在 3 个变量: 吸光度 (浊度)、反应时间、内毒素浓度, 当固定吸光度的变化率为某一数值 (即临界值) 时, 达到此临界值所需时间 (T_a , 临界时间) 的对数与内毒素浓度 (C) 的对数呈线性关系, 从而可以进行定量测定。

2.1.2 实验准备: 参照细菌内毒素检查法^[2], 实验所用器皿 (反应试管、毛细吸管等) 经高温严格处理以除去可能存在的外源性内毒素。

2.1.3 供试药液的制备: 取大青叶各化学部位浸膏适量, 加入 1% 聚山梨酯 80 增溶, 以无热原水定容至 100 mL, 使含生药量为 0.4 g/mL, 用安瓿分装、封口, 流通蒸汽灭菌 30 min 备用。

2.1.4 标准曲线的绘制: 取细菌内毒素工作标准品一支 (20 EU), 精密加入 1 mL BET 水, 混旋 15 min, 使浓度为 20.0 EU/mL; 并依次稀释成 5.0, 1.0, 0.2 EU/mL 的内毒素标准溶液。分别吸取 0.1 mL 于反应试管中, 加入 0.1 mL KTA 鲎试剂, 混合均匀, 迅速插入内毒素仪检测孔内测定临界时间。每一浓度平行作 3 管, 同时以 BET 水作阴性对照。当阴性对照结果不超过 λ_1 (标准曲线最低浓度) 时, 将实验数据进行线性回归分析, 得标准曲线为: $\log T_a = 2.71114 - 0.30149 \log C$, $r = -0.9917$ 。结果表明, 内毒素浓度在 0.1~10.0 EU/mL 与临界时间之间呈线性关系。

2.1.5 大青叶各化学部位体外抗内毒素活性的测定: 分别取 2.1.3 项制备药液各 0.1 mL, 并以 1% 聚山梨酯 80 无菌水溶液为空白对照, 均采用稀释液 (II) 作 40 倍稀释; 取稀释后各组溶液 0.4 mL, 加入 0.1 mL 内毒素标准溶液 (20 EU/mL) 于 37℃ 下孵育 1 h, 使药液与内毒素充分作用, 吸取孵育后的混合液 0.1 mL 于反应试管中, 加入 0.1 mL KTA 鲎试剂, 迅速插入内毒素仪检测孔内测定临

界时间, 每组供试品平行作 6 管, 各药物组测定结果与空白对照组作 t 检验比较, 并以临界时间均值参照标准曲线计算内毒素经作用后的浓度及相应的降解率, 结果见表 1。

内毒素降解率 = (空白对照组内毒素浓度 - 药物组内毒素浓度) / 空白对照组内毒素浓度 $\times 100\%$

表 1 大青叶 5 个不同化学部位体外抗内毒素作用 ($n=6$)

Table 1 Antiendotoxin effect of five different fractions from *Folium Isatidis* in vitro ($n=6$)

组别	临界时间 均值/s	孵育后内毒素浓 度/(EU·mL ⁻¹)	内毒素降解 率/%
空白对照	427±59	1.86	—
I 部位	450±46	1.56	16
II 部位	535±78*	0.88	53
III 部位	592±65**	0.63	66
IV 部位	649±48**	0.46	75
V 部位	504±45*	1.07	42
乙醇总提取物	483±34	1.24	33

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank control group

由表 1 可见, 与空白对照组比较, 内毒素经各组药液 (终浓度为 8 mg/mL) 孵育作用后发生了不同程度地中和降解, 其中大青叶 IV 部位对于内毒素的降解率最大, 显示其体外抗内毒素活性最强; II 部位、III 部位活性次之。

2.2 对 ACTD 敏化小鼠内毒素致死攻击的影响: 昆明种小鼠 96 只, 按表 2 随机分成 8 组, 每组 12 只。药物组按 50 g/kg 剂量 ig 给药, 2 h 后重复 1 次; 阴性对照组给予相同体积生理盐水; 阳性对照组按 10 mg/kg ig 给予地塞米松; 各组给药 1 h 后按 2 mg/kg 剂量 ip ACTD 致敏; 2 h 后按 1 mg/kg 剂量尾 iv LPS, 3 d 内观察动物死亡情况, 计算动物死亡率, 并与阴性对照组比较, 作 χ^2 检验。结果见表 2。

表 2 大青叶不同化学部位对 ACTD 敏化小鼠内毒素致死攻击的影响

Table 2 Effect of different fractions from *Folium Isatidis* on endotoxin-induced lethality in mice sensitized by ACTD

组别	动物/只	死亡数/只	死亡率/%
对照	12	11	92
I 部位	12	11	92
II 部位	12	10	83
III 部位	12	7	58
IV 部位	12	4	33*
V 部位	12	6	50
乙醇总提取物	12	8	67
地塞米松	12	4	33*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

由表 2 可见, 相对于对照组, 大青叶 IV 部位能够

显著降低 ACTD 敏化小鼠的死亡率, 有效地保护小鼠免受内毒素的致死攻击, 结果表明IV部位在动物体内也具有拮抗内毒素毒害生物效应的活性。

2.3 对内毒素诱导家兔发热的拮抗作用: 选择健康家兔, 每日测肛温 2 次, 连续 3 d, 使之逐步适应; 体温应在 38.0℃~39.6℃, 且体温波动不超过 0.3℃。取体温合格家兔 18 只, 随机分成 3 组, 每组 6 只。药物组以 10 g/kg ig 大青叶IV部位, 阴性对照组 ig 生理盐水, 阳性对照组以 200 mg/kg ig 阿司匹林。除阳性对照组外, 其余各组每日给药 2 次, 连续 2 d。第 3 天所有组间隔 3 h 连续给药两次, 末次给药后 1 h, 测定家兔基础体温, 共 3 次, 取其均值。2 h 后, 耳缘静脉 iv LPS 200 ng/kg, 于内毒素攻击后 0.5, 1, 2, 3, 4 h 测定家兔体温, 观察其变化情况, 并与基础体温相比较, 计算出最大温差 (ΔT) 及发热抑制百分率。结果见表 3。

发热抑制百分率= (阴性对照组平均最大体温- 药物组平均最大体温) / 阴性对照组平均最大体温 $\times$ 100%

表 3 大青叶IV部位对内毒素所致家兔发热的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Inhibition of fraction IV from <i>Folium Isatidis</i> on endotoxin-induced pyrogen in rabbits ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)		
组 别	$\Delta T / ^\circ\text{C}$	发热抑制百分率/ %
对照	1.18 $\pm$ 0.23	-
IV部位	0.68 $\pm$ 0.19**	42.4
阿司匹林	0.78 $\pm$ 0.22*	33.9

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

结果表明大青叶IV部位对内毒素引起的发热效应应具有明显的拮抗作用, 其效果与阿司匹林 (200 mg/kg) 比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

内毒素具有十分广泛的生物活性, 临床上许多疾病都与内毒素直接相关, 如休克、毒血症、成人呼吸窘迫综合症、多器官功能衰竭等, 因而抗内毒素药物的开发研制逐渐成为人们关注的热点。现在, 众多的实验方法被用于研究药物的抗内毒素作用——体外研究以细菌内毒素检查法 (鲎试验法) 最为常用, EDS—98 细菌内毒素测定系统能够通过多种方

法 (动态浊度法、动态比色法) 定量测定供试品中内毒素的含量, 灵敏简便, 能够客观评价和比较中药的体外抗内毒素作用强度, 为中药相关领域的研究提供了新的工具。基于细菌内毒素与鲎试剂的反应是由于一系列酶促放大作用而产生的, 其干扰因素众多, 主要包括供试品的酸碱度、金属离子浓度、非特异性鲎试剂激活物、对仪器检测光源 (405 nm) 的吸收干扰等^[3]。因此本实验采用动态浊度法消除供试品颜色的干扰, 并采用稀释液 (II) 稀释供试品以调节其 pH 值在规定范围内 (pH6~8); 同时严格的操作程序和技巧也是必要的^[3,4]。

体内动物保护试验观察药物对内毒素所致动物休克死亡的影响, 业已成为检测药物拮抗内毒素致死效应的可靠方法。实验中采用 ACTD 损伤机体免疫机制及清除内毒素的主要场所——肝脏, 导致内毒素灭活减少, 因而能显著增强小鼠对内毒素攻击的敏感性^[4]。同时, 以内毒素诱导家兔发热, 能够有效地观察药物对内毒素致热性的抑制作用。显然, 结合体内外实验筛选大青叶中的抗内毒素活性部位, 其结论相互印证, 互为补充, 值得信赖。

本实验结果表明大青叶IV部位具有显著的体内外抗内毒素活性, 可以确认为大青叶主要的抗内毒素活性部位。其药理活性强度与之所含的有机酸类、氨基酸类等化学成分密切相关^[5]。这些活性成分通过直接灭活细菌内毒素、抑制其毒性生物效应或者增强机体免疫功能抵御毒素侵袭从而发挥持久且有益的抗内毒素作用, 但其具体分子作用机制有待进一步研究。

References:

[1] Shen Y J. *Pharmacology of Chinese Materia Medica* (中药药理学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
[2] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol II.
[3] Lao H Y, Luo Y F, Lin Q X. Application of the kinetic turbidimetric limulus test in the endotoxin assay of Shengmai Injection [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2002, 18(1): 21-23.
[4] Deng W L, Xu J H, Wang W L, *et al.* Studies on antiendotoxin effect of Reduping: A novel endotoxin antagonist [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1995, 11(2): 16-19.
[5] Wu X Y, Liu Y H, Sheng W Y, *et al.* Chemical constituents of *Isatis indigotica* [J]. *Planta Med*, 1997, 63: 55-57.