文章编号:1000-5404(2005)23-2345-03

论著

诃子抗内毒素活性组分的分离及活性评价

姚 婕,郑 江,蒋栋能,鲁永玲,魏利召 (第三军医大学西南医院综合实验研究中心,重庆 400038)

提 要: 目的 从诃子中分离制备具有拮抗内毒素作用的活性组分。**方法** 应用离子色谱技术等方法,从诃子水提物中分离制备具有拮抗内毒素活性的组分;并应用生物传感器技术,对所得到的组分进行与Lipid A结合活性的筛选;利用鲎试剂动态浊度法,对筛选出的活性组分在体外进行中和内毒素活性的测定;观察其对LPS刺激的小鼠RAW 264.7细胞释放炎症介质的抑制作用;观察其对致死剂量(20 mg/kg)内毒素攻击小鼠的保护作用。**结果** 应用离子色谱技术从诃子中分离出4个组分,其中有3个组分具有一定的结合Lipid A的活性,以3#组分结合活性最强;在体外实验中3#组分对内毒素具有直接的中和作用($P<0.01$);对LPS刺激的小鼠RAW 264.7细胞释放TNF-α具有显著的抑制作用($P<0.01$);并对致死剂量内毒素攻击的小鼠具有明显的保护作用($P<0.01$)。**结论** 从诃子中分离出的3#组分具有显著的拮抗内毒素活性。

关键词: 诃子; 抗内毒素; 活性成分
中图法分类号: R282.71; R284.2; R996 **文献标识码**: A

Extraction and activity evaluation of anti-endotoxin components from *Terminaliachebula Retz*

YAO Jie, ZHENG Jiang, JIANG Dong-neng, LU Yong-ling, WEI Li-zhao (Medical Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To prepare the components with anti-endotoxin activities from *Terminaliachebula Retz*. **Methods** Ion-exchange HPLC was employed to extract different fractions from the herb after water extraction. Their binding activities to Lipid A were selected through sensor technology. Kinetic turbidimetric assay was used to determine their neutralization abilities to LPS *in vitro*. Their inhibiting activity to the release of TNF-α from RAW 264.7 was determined. Their protective effect on the LPS-challenged (20 mg/kg) mice was investigated. **Results** Four anti-endotoxin fractions were extracted from *Terminaliachebula Retz*. Among them, the 3rd fraction was proved to be outstanding in binding activity to Lipid A, LPS neutralization *in vitro* ($P<0.01$), inhibition of TNF-α release from RAW 264.7 ($P<0.01$), and protection of mice with LPS attack. **Conclusion** The 3rd fraction out of 4 fractions extracted from *Terminaliachebula Retz* has marked anti-endotoxin activity.

Key words: *Terminaliachebula Retz*; anti-endotoxin; active fraction

内毒素(lipopolysaccharide, LPS)是介导脓毒症最主要的病原分子,因此直接拮抗LPS是治疗脓毒症的有效途径之一[1]。诃子(*Terminaliachebula Retz*)是我国蒙医常用的中药之一,有止泻、消肿、抗菌、消炎等作用。本研究采用水提、离子交换-高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)等分离技术,从诃子中分离出3个具有拮抗内毒素的活性组分,在体外通过观察其对内毒素的中和作用及对内毒素血症模型小鼠的保护作用,以评价诃子提取组分对内毒素的拮抗作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器设备

鲎试剂:湛江安度斯生物有限公司产品;LPS (O111:B4):Sigma公司,EDS-98型细菌内毒素测定仪:北京金山川科技发展有限公司生产;高效液相色谱仪: AKTA Explore-100型高效液相色谱仪,色谱柱:Hiprep SP FF强阳离子交换柱;均为瑞典安莫西亚(Amersham)公司生产; BUCHI R-205旋转蒸发仪:德

作者简介:姚 婕(1976-),女,四川省安岳县人,硕士研究生,助理实验师,主要从事抗炎中药研发方面的研究。电话:(023)68754435
通讯作者:郑 江,电话:(023)68754435, E-mail: zhengj@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-08-30;修回日期:2005-09-08

国 BUCHI 公司生产；MODULYO 低温冷冻干燥机：美国 SAVANT 公司生产。

1.2 药物及分离方法

诃子：云南产诃子，经本院中药房鉴定为使君子科落叶乔木植物诃子（诃黎勒）*Terminaliachebula Retz* 的成熟果实。诃子粗提物制备：诃子粉碎成粉末，100 ℃蒸馏水回流法提取 1 h，过滤取上清，旋转蒸发仪浓缩，离子交换树脂分离：以苯乙烯系强酸性阳离子交换树脂（上海国药集团）分离得到诃子阳离子组分。高效液相色谱分离：流动相 A：蒸馏水；流动相 B：盐酸水溶液（pH=3），1 mol/L NaCl，0.1 mol/L 盐酸水溶液。流速：5 ml/min；检测波长：240 nm。预先用（pH=3）盐酸水溶液平衡 20 柱床体积（column volume，CV）；样品稀释成 10 g/L，上样 2 ml；0% ~100% B（1 mol/L NaCl）液梯度洗脱（200 min）；分部收集每一峰；0.1 mol/L 盐酸水溶液洗脱；洗脱完毕后，盐酸水溶液（pH=3）平衡 20 CV，再进入下一循环分离。

1.3 观察指标

1.3.1 生物传感器结合实验 以（pH 6.0、20 mmol/L）PBS 平衡机器 30 min 基线走平后，将诃子经 HPLC 后分部收集的组分诃子 1、2-1、2-2、3，分别取 5 μl 加入样品池检测其与 Lipid A 的结合活性。对与 Lipid A 有结合活性的组分进行分子筛凝胶分析。

1.3.2 体外中和 LPS 试验 分别取诃子 3# 稀释为 10、20、40、80 μg/ml 100 μl 于反应试管中，加入 5 μl 20 μg/ml LPS 为阳性对照，检测用水为阴性对照；诃子 3# 80 μg/ ml 100 μl 作为药物空白对照；5 μl 20 μg/ ml PMB 作为阳性药物对照。37 ℃孵育 20 min；加入 0.1 ml 鲎试剂，测定临界时间，参照标准曲线计算中和后的 LPS 活性，与 LPS 对照比较，计算相应的中和率。

1.3.3 LPS 刺激小鼠 RAW 264.7 细胞释放炎症介质抑制实验 LPS（100 ng/ml）组、设细胞空白组、诃子 3#（80 μg/ml）组、LPS + PMB（1 μg/ml）组及 LPS + 诃子 3# 组（80、40、20 μg/ml 3 个剂量），每组设 3 个复孔。观察诃子 3# 组分对内毒素诱导 RAW264.7 细胞表达细胞因子的抑制作用及量效关系。

1.3.4 对 LPS 攻击小鼠的保护实验 清洁级昆明种小鼠，体质量 18 ~22 g 雌雄各半（重庆医科大学实验动物中心），设 LPS 组、诃子 3# 组、LPS + PMB 组、LPS + 诃子 3# 组；每组 20 只小鼠；雌雄各半。注射剂量：LPS 为 20 mg/kg；诃子为 40 mg/kg；PMB 为 2 mg/kg。注射方式：尾静脉注射，注射体积为 200 μl/20 g。记录 72 h 内小鼠的精神状态；腹泻、眼眶充血、出血等临床症状并观察其死亡情况。

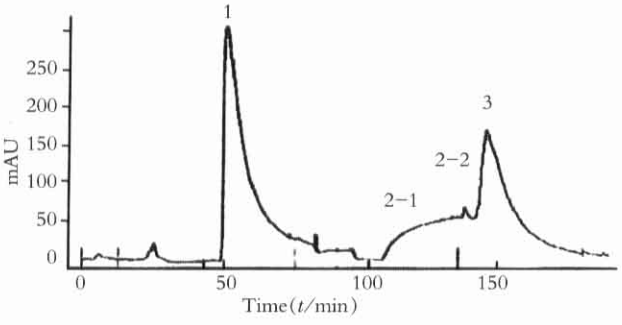
1.4 统计学分析

采用 SPSS 8.0 统计软件进行 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 离子交换-HPLC 分离

诃子初提物经离子交换色谱制备得到 1#、2-1#、2-2# 和 3# 共 4 个组分，其出峰时间分别为 50、100、150、170 min 时出峰。从图中可见诃子 3# 组分保留时间最长，见图 1。



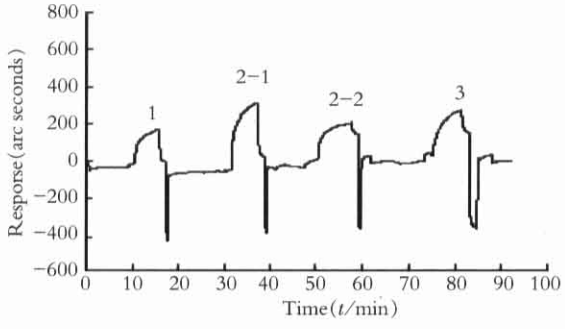
1：The first component；2-1 and 2-2：The second；3：The third

图 1 诃子提取物的 HPLC 分离

Fig 1 Extraction of *Terminaliachebula Retz* through HPLC

2.2 生物传感器结合实验

将收集的 4 个组分分别取 5 μl 于生物传感器上与固相的 Lipid A 进行结合反应，见图 2，其中以 3# 组分与 Lipid A 的结合活性最高，其 RU 值为 198 arc second，被选为进一步的主要研究对象。



1：The first component separated through HPLC；2-1，2-2：The second；3：The third

图 2 诃子分离物的生物传感器结合实验

Fig 2 Binding activities of extractions of Terminaliachebula Retz to Lipid A through sensor technology

2.3 分子筛凝胶分析

将诃子 3# 组分过凝胶分子筛以了解其物质组成情况，经凝胶分子筛柱层析，3# 组分仅出现 3 个独立的单峰，提示其纯度较高。可进行进一步的拮抗内毒素活性评价。

2.4 体外中和 LPS 实验

不同剂量的诃子 3# 组分与 LPS 共同孵育后，对 LPS 介导的鲎试剂反应均具有一定的抑制作用。10、20、40、80 μg/ml 的诃子 3 中和率分别为 30%、41%、82%、94%，均显著抑制了 LPS（$P<0.01$）。

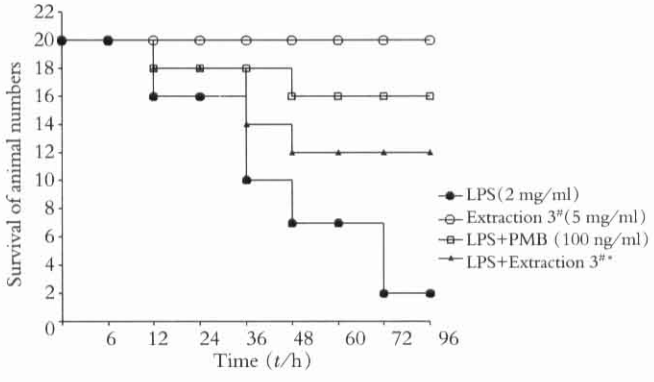
2.5 LPS 刺激小鼠 RAW 264.7 细胞释放炎症介质抑制实验

与 LPS 组比较，LPS + 诃子 3（80、40 μg/ml）抑制组对细胞 TNF-α 的分泌有显著的抑制作用（$P<0.05$），LPS + PMB 组对

细胞 TNF-α 分泌也有非常显著的抑制作用（$P<0.01$），剂量组有明显量效关系。

2.6　对 LPS 攻击小鼠的保护实验

LPS 攻击小鼠后，各组动物均出现精神萎靡，LPS 组动物在 4～8 h 即出现出现腹泻、眼眶充血、出血等临床症状，并在 72 h 内死亡 90%。诃子 3 治疗组小鼠也出现精神萎靡、腹泻、眼眶充血、出血等症状，但与 LPS 组相比症状较轻；在 24～48 h 后精神、活动、食欲明显恢复，且对外界刺激的反应性良好，72 h 内的死亡率 40%，见图 3。



*：$P<0.01$，*vs* LPS

图 3　诃子 3 对 LPS 攻击小鼠的保护实验

Fig 3　Protective effect of 3rd extraction of *Terminaliachebula Retz* to the LPS-challenged mice

3　讨论

脓毒症是严重创伤、烧伤、休克及感染性疾病的常见并发症，极易发展为脓毒性休克和多脏器功能衰竭，是危重患者死亡的重要原因。LPS 是 G^- 菌外膜的主要成分，是介导脓毒症最主要的病原分子[2]。LPS 通过与单核/巨噬细胞膜上的受体 CD14 结合，进而与 TLR4 结合，导致细胞活化，释放各种细胞因子（TNF-α、IL-1、IL-6 等）和炎症介质，产生脓毒症的生物学效应[3]。因此，直接中和 LPS 是拮抗脓毒症的一种有效手段。

LPS 分子是由类脂 A（Lipid A）、核心多糖和 O-特异多糖 3 部分共价连接而成，其中 Lipid A 是内毒素的活性中心，它含有多个磷酸基团而带负电荷，许多抗 LPS 药物分子结构中富含正电荷，可与 Lipid A 所带负电荷结合，影响了 LPS 的空间构象，使 LPS 丧失了与受体结合的能力，抑制了对巨噬细胞的活化，从而拮抗脓毒症[4]。因此，采用离子交换-HPLC 技术分离阳离组分，有可能成为筛选拮抗脓毒症药物的一种有效方法。

诃子系使君子科落叶乔木植物，是我国蒙药中应用比例最大，而且功能最广泛。有治疗咽喉肿痛、慢性腹泻、解毒、抗菌、消炎等作用，因此被誉为“蒙药之王”。既往的研究表明：诃子含有氨基酸、三萜类、鞣酸酶、多酚氧化酶、过氧化物酶、抗坏血酸氧化酶等。有实验证明：诃子的某些成分对金葡菌、大肠杆菌、绿脓杆菌等有明显抑菌作用[5]。研究表明：诃子有解毒作用，可抗脂质、抗氧化保护肝细胞膜[6]。有可能通过保护肝脏而使机体对内毒素解毒能力提高。因此在拮抗脓毒症方面有广泛应用前景。

本研究通过萃取、离子交换-HPLC 等技术，从诃子中分离出多种组分，其中 3# 组分对 LPS 攻击所致的脓毒症模型小鼠具有显著的保护作用。通过体外活性检测，该富含正电荷的 3# 组分与 Lipid A 具有很高的亲和力，对 LPS 具有直接中和作用，同时该组分对 LPS 刺激的小鼠 RAW 264.7 细胞 TNF-α 的释放具有明显抑制作用，这提示 3# 组分可能通过中和 LPS 抑制了单核/巨噬细胞的活化，从而阻断炎症的级联反应，减轻 TNF-α 等炎性介质生成过多时对组织器官所所造成的损伤。由于 TNF-α、IL-6 在脓毒症的病理生理过程具有重要的作用，诃子 3# 组分对单核/巨噬细胞活化的抑制可能是其保护脓毒症模型小鼠的主要机制。

因此，诃子 3# 组分在拮抗脓毒症的研究方面可能具有较好的前景。目前，诃子 3# 组分正在进行进一步的分离，以得到具有生物活性单体物质。

参考文献：

[1] 吕根法，卫　国，郭毅斌，等. 生物传感器技术在筛选赤芍中抗内毒素有效成分的应用研究[J]. 中国药房，2004，15(9)：531－533.

[2] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. Nature，2002，420(6917)：885－891.

[3] Hoshino K，Takeuchi O，Kawai T，*et al*. Cutting edge：Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide：evidence for TLR4 as the Lps gene product[J]. J Immunol，1999，162(7)：3749－3752.

[4] 文加才，秦永忠，宋爱刚. 阳离子抗菌肽的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册，2002，23(6)：267－271.

[5] 李仲兴，王秀华，岳云升，等. 诃子对 335 株临床菌株的体外抑菌活性的研究[J]. 中国中医药科技，2000，7(6)：393－394.

[6] 张述禹，白喜翠，李春汇，等. 诃子醇提取物对实验动物肝功的影响[J]. 中国民族医药杂志，1997，3(4)：41－42.

（编辑　栾　嘉）