论著

文章编号:1000-5404(2006)13-1378-02

赤芍拮抗内毒素组分的提取分离研究

冯文曦,郑 江,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 提取分离赤芍中拮抗内毒素(lipopolysaccharide, LPS)的有效组分。**方法** 采用生物传感技术结合传统的中药分离技术,分离提取中药赤芍,应用鲎试验和ELISA法检测赤芍各组分对LPS的中和作用。**结果** 从赤芍中分离提取6个组分,其中1、4号组分对LPS具有显著的中和作用($P<0.05$),在体外能够显著抑制由LPS介导小鼠RAW264.7细胞释放TNF-α($P<0.01$)。**结论** 我们以LPS为靶点,应用生物传感器技术,快速、有效地提取分离并证明赤芍中具有较强的中和LPS活性的有效组分。

关键词:赤芍;内毒素;提取;分离
中图法分类号:R282.71;R284.2 **文献标识码**:A

Extraction and isolation of antiendotoxin constituent from *Radix Paeoniae Rubra*

FENG Wen-xi, ZHENG Jiang, WEI Li-zhao (Medical Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To isolate and extract effective antiendotoxin materials from *Radix Paeoniae Rubra*. **Methods** By the biosensor technology, effective antiendotoxin materials were isolated and extracted with general separation technology for Chinese traditional medicine. By ELISA mensuration for LPS and inhibition of TNF-α release from endotoxin-stimulated cells *in vitro*, the antiendotoxin activity of *Radix Paeoniae Rubra* was elucidated. **Results** The materials extracted had high binding capability to LPS and inhibitory effect on TNF-α release from endotoxin-stimulated cells *in vitro*. **Conclusion** Isolated and extracted effective antiendotoxin materials targeting LPS by the biosensor technology were valuable in searching antiendotoxin agents from Radix Paeoniae Rubra. The ability of *Radix Paeoniae Rubra* to neutralize LPS was assayed and proved very high.

Key words: *Radix Paeoniae Rubra*; endotoxin; extraction; isolation

赤芍具有很高的抗内毒素(lipopolysaccharide, LPS)作用,对大肠杆菌LPS具有直接的破坏作用[1],但是对其作用的物质基础目前并不清楚,为了寻找其拮抗LPS的有效部位,我们首先对中药赤芍用传统的提取方法,以LPS为靶点,应用生物传感器技术,进行了LPS结合试验,以初步确定提取方法,然后在生物传感器技术指导下,利用高效液相色谱技术(HPLC)将中药赤芍分离出几种组分,并对其进行ELISA法检测该有效组分对LPS的中和作用。

1 材料与方法

1.1 药品和主要试剂

赤芍(产址:四川),购于重庆市渝中区药材批发市场,经鉴定为毛茛科植物川赤芍的根;LPS O111:B4(批号:69H4157,酸抽提法),美国Sigma公司;乙腈,HPLC级,美国Fisher公司;多粘菌素B(PMB,批号41k15415)为Sigma公司产品;其他试剂均为分析纯,重庆市化学试剂厂生产。

1.2 赤芍的初步分离[2]

取赤芍饮片500 g,清洗晾干,加2 000 ml蒸馏水于回流瓶中,在电炉上水煎30 min,过滤,得到赤芍水煎液(0.25 g/ml,pH 4.4)1 800 ml,然后用1 mol/L的氢氧化钠溶液滴定至pH 8后,放置2 h,4 000 r/min离心20 min,将沉淀加入与上清等体积的蒸馏水,用1 mol/L的盐酸溶液滴定至原来的pH 4.4,4 000 r/min离心20 min,取沉淀复溶液旋转蒸发浓缩,浓缩液体再加入200 ml无水乙醇脱多糖,再蒸发去除乙醇,此过程重复2~3次,得到浓缩赤芍分离液100 ml,最后将浓缩液体低温冷冻抽干。

1.3 赤芍提取物的高效液相色谱层析

在进行色谱制备前,首先对色谱的流动相进行摸索,最终选择了18%的乙腈浓度。赤芍提取物组分经过色谱分离,以乙腈为流动相在18%的条件下,分离的效果较好。

色谱分离:将冷冻抽干的赤芍提取物组分用18%的乙腈配制成0.5 mg/ml浓度,用0.22 μm微孔滤膜过滤,然后取10 μl进样,检测波长275 nm,色谱柱:岛津C18(150 mm×4.6 mm),柱温:25 ℃,流速1 ml/min,进行色谱分离。

色谱制备:根据色谱分离条件进行制备,检测波长275 nm,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371767)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371767)
作者简介:冯文曦(1972-),男,重庆市人,主管技师,主要从事抗感染免疫方面的研究。电话:(023)68765466,E-mail: fwenxi2000@yahoo.com
通讯作者:郑 江,电话:(023)68754435,E-mail:zhengj@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-03-01;修回日期:2005-09-05

色谱柱：迪马 C18 柱（200 mm × 50 mm），柱温 25 ℃，流速 15 ml/min，进样浓度：200 mg/ml，进样体积：200 μl，根据流出峰进行收集，共收集了 6 个组分的样本，将收集的液体样本低温冷冻抽干。

1.4　LPS 定量测定

赤芍各组分（终浓度 80 μg/ml）取 100 μl 与 100 μl（终浓度 0.25 EU/ml）LPS 标准品混合，37 ℃水浴 10 min 后，进行 LPS 鲎试剂检测，按照 EDS-99 细菌 LPS 动态浊度法系统测定说明操作。

1.5　ELISA 测定赤芍各组分中和 LPS 的效果

实验中分两组：1 组在培养的小鼠 RAW264.7 细胞株中加入终浓度为 80 μg/ml 的赤芍各组分，并同时加入终浓度为 100 ng/ml的 LPS，并以已经明确抑制 LPS 的多粘菌素 B（PMB）为阳性对照；另 1 组在培养的小鼠 RAW264.7 细胞株中只加入终浓度为 100 ng/ml 的 LPS 为空白对照。在 CO_2 培养箱中孵育 4 h后取上清，按照 ELISA 的检测试剂盒说明书操作测定TNF-α 的含量。

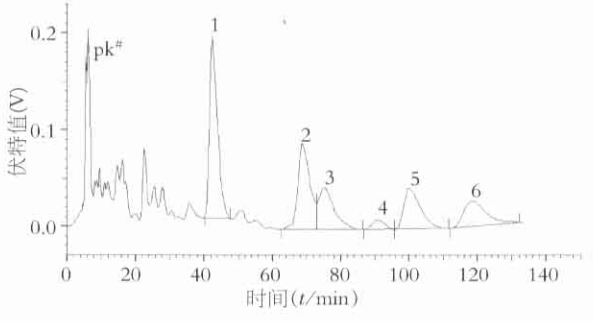
1.6　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　高效液相色谱层析结果

我们对粗提的赤芍组分经过色谱分离，以乙腈为流动相在 18% 的条件下，分离的效果较好，得到了 6 个组分，结果见图 1。



pk#：粗提组分；1－6：分离组分

图 1　赤芍分离组分色谱制备图

根据上面的制备图在计算机上积分计算得到各组分的积分，见表 1。

表 1　色谱制备组分积分表

组分	保留时间	面积	面积比(%)	高度	高度比(%)
1	42.467	30666393	31.857	188201	47.028
2	68.798	22522574	23.397	89375	22.333
3	75.263	1377.4.1	14.305	43571	10.888
4	90.867	2638906	2.741	10022	2.504
5	100.121	14561091	15.126	42378	10.589
6	118.585	12103708	12.574	26643	6.658
合计		96263073	100	400189	100

2.2　LPS 定量测定与 ELISA 测定赤芍各组分中和 LPS 的结果

将赤芍各组分与 LPS 标准品混合，进行 LPS 鲎试剂检测，以确定每个组分与 LPS 结合的效果。同时用 ELISA 的试剂盒测定赤芍各组分对 LPS 的中和作用，结果见表 2。

表 2　LPS 定量测定与 ELISA 测定结果（$\bar{x} \pm s$）

组分	LPS 实测值（$\times 10^{-3}$ EU/ml）	TNF-α 测定值(pg/ml)
LPS(0.1 EU/ml)	43.0 ± 6.3	1 934.92 ± 115.47
1	13.4 ± 5.8[a]	212.88 ± 27.34[b]
2	39.5 ± 3.4	1 166.90 ± 432.02[a]
3	42.5 ± 7.4	1 679.74 ± 265.53
4	24.2 ± 2.6[a]	510.47 ± 234.49[b]
5	37.6 ± 4.6	1 092.25 ± 122.30[a]
6	41.2 ± 6.1	1 880.04 ± 120.19
PMB 组		1 481.79 ± 198.87[a]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 LPS 组比较

3　讨论

从中草药中寻找并分离拮抗 LPS 的有效成分并进行深入研究，是近年中医药学研究的热点。本研究所使用的是以细菌 LPS 为靶点，应用生物传感技术筛选拮抗 LPS 中草药的提取方法[3,4]，具有操作简单、省时、准确等优点，适用于快速进行拮抗 LPS 的中草药的分离提取。应用常规的中药分离技术和 HPLC 技术将中药赤芍中的有效成分分离提取后，通过鲎试剂检测和 ELISA 方法来进行验证。本研究通过对赤芍提取物的研究显示赤芍中至少含有两种以上与 LPS 结合的有效成分，而且它与 LPS 具有较高的亲和力。这从鲎实验结果已经证实它对 LPS 的结合作用具有中和 LPS 的活性，这是赤芍抑制 LPS 生物学效应的主要方式。通过体外培养的小鼠 RAW264.7 细胞株研究显示，赤芍有效组分对 TNF-α 释放的抑制作用也很明显。6 种分离组分中，组分 1 和 4 能够显著地抑制由 100 ng/ml 的 LPS 介导的 TNF-α 的释放。说明了中药赤芍治疗脓毒症，亦是一种对 LPS 的中和作用并抑制由 LPS 介导的 TNF-α 的释放来降低脓毒症的危害。由于条件限制，我们还不了解这 1 和 4 的赤芍组分的结构基础，我们将对这 2 种有效成分送检进行结构分析和进一步的药理和药效学评价。

参考文献：

[1] 张艺平，韩　鹏. 中药抗内毒素研究新进展[J]. 中国中西医结合急救杂志，2001，8(2)：122－124.

[2] 马双成. 赤芍主要化学成分的提取、分离[M]//宋小妹，唐志书. 中药化学成分提取分离与制备. 北京：人民卫生出版社，2004：262－263.

[3] 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.

[4] LV G，ZHENG J，ZOHU H，*et al*. The screening and isolation of an effective anti-endotoxin monomer from Radix Paeoniae Rubra using affinity biosensor technology[J]. Int Immunopharmacol，2005，5(6)：1001－1017.

（编辑　薛国文）