论著

文章编号:1000-5404(2007)17-1654-03

白鲜皮抗内毒素活性物质的分离提取与活性研究

郭毅斌[1],曹红卫[1],范 莉[2],杨大成[2],鲁永玲[1],吕根法[1],郑 江[1],肖光夏[3] (第三军医大学西南医院:[1]中心实验室,[3]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]西南大学化学化工学院,重庆 400715)

提 要:目的 筛选与类脂A(lipid A)具有较高结合活性的中药,从中提取具有拮抗内毒素(lipopolysaccharide, LPS)活性的物质。**方法** 采用生物传感技术,以lipid A为靶点,检测42种中药的水提物与lipid A的结合活性;以白鲜皮为研究对象,通过大孔吸附树脂、溶剂萃取、聚酰胺柱层析和高效液相色谱(HPLC)法,分离提取与lipid A结合活性较高的组分;动态比浊法鲎试验检测HPLC产物DPR-1~3对LPS(0.1 ng/ml)的中和作用;ELISA法检测DPR-2对LPS(100 ng/ml)刺激的RAW264.7细胞释放肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及白细胞介素-6(IL-6)的影响。**结果** 8种中药水提物与lipid A具有较高的结合活性(RU>100 arc/s);从白鲜皮中逐步分离出与lipid A结合活性较高的组分,经HPLC法获得3种物质DPR-1~3;DPR-2对LPS具有一定的中和作用,在8 μg/ml浓度以上可显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞释放TNF-α和IL-6($P<0.05$),并具有剂量效应关系。**结论** 从42种中药中筛选出与lipid A具有较高结合活性的中药白鲜皮,并从中分离提取出抗LPS活性物质DPR-2,其抗LPS活性可能与DPR-2对LPS的中和活性有关。

关键词: 白鲜皮;内毒素;生物传感器;高效液相色谱

中图法分类号: R284.2;R285.5 **文献标识码:** A

Extraction and activity of anti-lipopolysaccharide component from densefruit pittany root-bark

GUO Yi-bin[1], CAO Hong-wei[1], FAN Li[2], YANG Da-cheng[2], LU Yong-ling[1], LU Gen-fa[1], ZHENG Jiang[1], XIAO Guang-xia[3] ([1]Medical Research Center, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]School of Chemistry & Chemical Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Objective To screen the Chinese herbs with high affinity for lipid A and extract the anti-lipopolysaccharide (LPS) compound from densefruit pittany root-bark (DPR). **Methods** Forty-two kinds of aqueous extracts of traditional Chinese medicine were screened to determine their binding to lipid A by the biosensor technology. The chemical components with high affinity for lipid A were gotten by macroporous adsorptive resins, solvent extraction, polyamide laminar analysis and high performance liquid chromatogram (HPLC) from DPR. The neutralization of HPLC products DPR1-3 for LPS (0.1 ng/ml) was detected by kinetic turbidimetric limulus test. The release of TNF-α and IL-6 in RAW264.7 cells after exposure to LPS (100 ng/ml) were detected by ELISA. **Results** Eight kinds of aqueous extracts including DPR displayed high affinity for lipid A (RU>100 arc/s). Three chemical components DPR1-3 with high affinity for lipid A were gotten. DPR-2 neutralized LPS and inhibited the release of TNF-α and IL-6 in LPS-induced RAW264.7 cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** Eight herbs possess the components with high affinity for lipid A. DPR-2, extracted from DPR, shows anti-LPS activity probably by binding lipid A and neutralizing LPS.

Key words: densefruit pittany root-bark; lipopolysaccharide; biosensor; high performance liquid chromatogram

内毒素(lipopolysaccharide, LPS)是G⁻菌细胞外膜的重要组成部分,已证实它是介导脓毒症和多器官功能障碍的主要病原分子[1]。对LPS及其拮抗策略的研究一直是国内外医学研究的重点和难点。但迄今还未有一种有效的抗LPS药物应用于临床。资料表明多种中药具有抗LPS的作用,其抗LPS的机制涉及多个方面,如灭活、降低LPS毒性或促进其代谢等[2]。本研究采用生物传感器技术平台,以LPS的生物学活

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522600);国家自然科学基金(30371767)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 30371767) and the National Natural Science Foundation of China (2005CB522600)

作者简介:郭毅斌(1971-),男,福建省漳州市人,博士研究生,主治医师,主要从事脓毒症机制及拮抗策略方面的研究。电话:(023)68765466,E-mail:guoyibin130@163.com

通讯作者:郑 江,电话:(023)68754435,E-mail: Zhengj@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-10-12;修回日期:2006-12-11

性中心类脂 A（lipid A）为靶点，结合传统的中药分离技术和高效液相色谱（HPLC）法，通过对 42 种抗炎中药的筛选，从白鲜皮中分离提取活性物质 DPR-2，并研究其拮抗 LPS 的活性。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

鲎试剂为广州湛江安度斯生物工程公司产品；小鼠 TNF-α 和 IL-6 检测试剂盒购自深圳晶美公司，为 R&D 公司产品，灵敏度分别为 15 pg/ml 和 60 pg/ml；乙腈，色谱纯，美国 Honeywell 公司产品；SDS-99 细菌 LPS 测定系统为湛江正杰科学仪器有限公司生产；美国 Agilent 公司产 HP1100 高效液相色谱仪，反相 C18 柱 VYDAC218TP，0.46 cm×25 cm，粒度 5 μm，孔径 30 nm。生物传感器及其疏水样品池为美国 Thermo 公司产品。

1.2　42 种中药水煎液与 lipid A 亲和力的检测

取白鲜皮、赤芍等 42 种中药各 100 g，分别用清水反复冲洗后，再用 2～4 L 蒸馏水漂洗，400 ml 蒸馏水浸泡 2 h，90～100 ℃ 煎 40～60 min，冷却后 4 000 ×g 离心 30 min，收集上清液，分别取 5 μl 上样，参照文献[3]方法检测其与 lipid A 的结合反应。

1.3　白鲜皮水煎液的分离及其与 lipid A 的结合活性检测

白鲜皮 5 kg 用清水和蒸馏水清洗后，90～100 ℃ 煎 45 min，8 000 r/min 离心 40 min 取上清；大孔吸附树脂分离：上样后分别用蒸馏水和 50% 乙醇洗脱；萃取：取 50% 乙醇洗脱液蒸发去乙醇，水溶液加入等量正丁醇萃取 3 次；聚酰胺层析柱分离：取萃取水相蒸发去正丁醇，上聚酰胺层析柱，分别用蒸馏水和梯度的乙醇及乙酸洗脱。取白鲜皮分离过程中的各组分分别负压抽干，以 PBS 溶解成 0.2 mg/ml，取 5 μl 上样，同 1.2 方法检测各组分与 lipid A 的结合作用。

1.4　聚酰胺乙醇洗脱相的 HPLC 纯化

聚酰胺乙醇洗脱相去乙醇后经分析柱检测，采用乙腈∶水=7∶93 的流动相，流速 0.4 ml/min，15 min 后梯度洗脱，检测波长 230 nm。

1.5　3 种 HPLC 纯化产物 DPR-1～3 对 LPS 中和能力的初步检测

将 HPLC 分析柱分离得到的 3 个产物 DPR-1～3 分别与定量的 LPS 等体积混合，阳性对照为 LPS 组加等量生理盐水，37 ℃ 孵育 30 min 后，采用动态浊度法鲎试验检测孵育后的 LPS 值，观察 1 μg/ml 的 HPLC 产物对 0.1 ng/ml LPS 的中和能力，每种产物作 3 复管，检测结果以 EU/ml 表示。

1.6　DPR-2 对 LPS 中和能力的检测

将不同浓度的 DPR-2 与定量的 LPS 等体积混合，配成终浓度分别为 DPR-2 0、0.5、1、2、4 μg/ml 和 LPS 0.1 ng/ml，其中不加 DPR-2 的 LPS 组作为阳性对照，每个浓度作 4 复管，方法同 1.5。

1.7　DPR-2 对 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的影响

调整 RAW264.7 细胞悬液浓度为 1×10^6/ml，取 0.25 ml 于 96 孔板内，置 37 ℃，5% CO_2 培养箱培养 2 h；每孔加入终浓度为 0、4、8、16、32、64 μg/ml 的 DPR-2 继续培养 1 h；加入 LPS（终浓度 100 ng/ml），其中不加 DPR-2 的 LPS 组作为阳性对照，同时设不加 DPR-2 和 LPS 的空白对照组，每一浓度作 3 复孔，置 37 ℃，5% CO_2 培养箱继续，取培养 4 h 和 12 h 的上清用 ELISA 法分别检测 TNF-α 和 IL-6 浓度。

1.8　统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　42 种中药水煎液与 lipid A 的结合反应测定结果

结合反应显示，阿胶、栀子、大黄、射干、青果、赤芍、白鲜皮和金银花等 8 种中药水煎液与 lipid A 具有较高的特异性结合能力（RU＞100 arc/s）。选择本实验室未进行研究的白鲜皮为进一步的研究对象。

2.2　白鲜皮分离组分与 lipid A 的结合活性检测

通过生物传感器跟踪检测显示，白鲜皮的大孔吸附树脂乙醇洗脱相、萃取水相和聚酰胺 20% 乙醇洗脱相具有与 lipid A 相对较高的结合活性，其 RU 值分别为 68、74、96 arc/s。

2.3　白鲜皮聚酰胺 20% 乙醇洗相的 HPLC 纯化

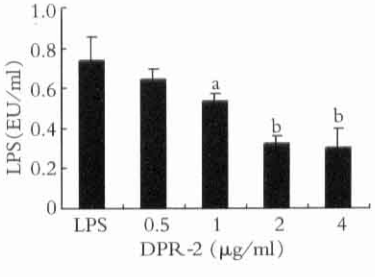
将上述聚酰胺 20% 乙醇洗脱相经 HPLC 纯化主要获得 3 种物质，其出峰时间分别为 5.844、8.982、32.12 min。

2.4　白鲜皮 HPLC 纯化产物 DPR-1～3 对 LPS 中和能力的测定

3 种白鲜皮 HPLC 纯化产物 DPR-1～3 与 LPS 混合后，LPS 的检测值分别为（0.096±0.007）、（0.057±0.005）、（0.084±0.007）EU/ml，其中 DPR-2 对 LPS 的中和作用最强（$P<0.01$）。因此，在后续的实验中，进一步研究 DPR-2 的生物学活性。

2.5　DPR-2 对 LPS 的中和作用

如图 1 所示，DPR-2 对 LPS 介导的鲎试剂的凝结反应具有抑制作用，并呈剂量效应关系。当 DPR-2 浓度为 1、2、4 μg/ml 时，对 0.1 ng/ml 的 LPS 具有显著的中和作用（$P<0.05$）。



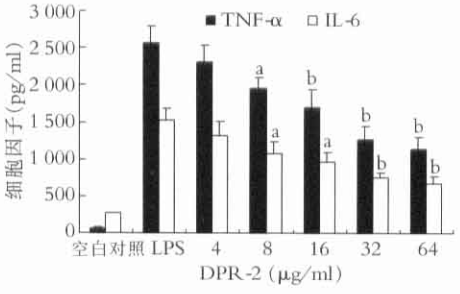
a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 LPS 组比较

图 1　DPR-2 对 LPS 的中和作用（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

2.6　DPR-2 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞活化的抑制

DPR-2 在 8 μg/ml 浓度以上对 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 具有显著的抑制作用（$P<0.05$），其抑

制作用呈显著的剂量-效应关系(图2)。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 LPS 组比较

图2 DPR-2 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞活化的抑制作用($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

中药在脓毒症的治疗中具有较好的疗效,中药的清热解毒功效可能与其抗 LPS 和抗病原微生物有关。但由于中药组成成分复杂,尤其是受方法学的限制,中药中抗 LPS 作用的有效物质基础通常难以快速有效地分离并给予阐明。

本研究以 LPS 的活性中心 lipid A 为靶点,将 lipid A 包被于生物传感器的样品池中,结合文献报道具有较好抗内毒素作用的中草药,选择了 42 种中药,检测其水提物与 lipid A 结合活性,以期发现能与 lipid A 特异性结合并能拮抗 LPS 活性的药物。结果表明赤芍、白鲜皮等 8 种中药水煎液与 lipid A 具有较高的特异性结合能力,提示此 8 种中药含有与 lipid A 结合的抗 LPS 活性物质的可能性相对较大。在此基础上,本课题组分别针对这 8 种中药进行抗 LPS 物质基础的分离提取,此前已从赤芍中获取单体物质 1,2,3,4,6-O-五没食子酰-β-D-葡萄糖(PGG),研究证实 PGG 可中和 LPS 作用并抑制 LPS 诱导的人外周血单核细胞活化[4]。由于 PGG 属鞣质类化合物,其临床应用受到限制。白鲜皮为芸香科植物,鞣质含量少[5],具有清热燥湿和祛风解毒的功效,文献[6]报道其醇和水提物均具有抗菌作用,尽管青果、大黄与 lipid A 的结合活性要高于白鲜皮,但我们推测其与 lipid A 的高亲和力可能与中药本身鞣质的高含量有关,因此选择白鲜皮作为研究重点。本研究依托生物传感器的跟踪检测功能,层级筛选获得与 lipid A 高亲和力的组分,最终获得对 LPS 中和效果较好的 DPR-2,此结果也表明生物传感器平台对目标物质的分离鉴定具有快速准确的引导作用。从 DPR-2 的分离提取原理分析,DPR-2 对 LPS 活性的中和作用机制可能是通过与 lipid A 结合后实现。由于 LPS 生物学活性与 lipid A 的空间构象密切相关[7,8],DPR-2 与 lipid A 的结合可能改变了 lipid A 的构象,影响 LPS 与细胞膜相应受体的结合,进而减轻其细胞学效应。

脓毒症是多种炎症介质的诱生、释放和级联效应为特征,其中 TNF-α 是较早释放并起核心作用的炎症介质,而 IL-6 则是机体炎症反应的重要标志之一,TNF-α 和 IL-6 的水平与病情及预后密切相关[9]。资料表明白鲜皮对炎性细胞因子及受体具有调节作用[10],本研究证实 DPR-2 可剂量依赖性地抑制 LPS 诱导的巨噬细胞活化,减少 TNF-α 和 IL-6 的释放,其机制可能与 DPR-2 对 LPS 的中和作用有关。而DPR-2 是否还通过其他途径发挥其对 LPS 诱导的炎症反应细胞活化的抑制作用,尚有待进一步的研究。

综上所述,通过生物传感技术和 HPLC 结合传统的中药分离方法,本研究快速有效地从多种中药中筛选并分离提取具有拮抗 LPS 活性的有效物质 DPR-2,为中药抗 LPS 物质基础的分离提取提供新的思路和方法。

参考文献:

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

[2] 刘庆增, 王金兰. 中药抗内毒素生物活性机理的研究[J]. 中草药, 1996, 27(2): 121-123.

[3] 郑 江, 龚小云, 吕根法, 等. 杀菌性/通透性增加蛋白模拟肽与 LPS/Lipid A 的亲合力测定[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(3): 197-199.

[4] Lv G, Zheng J, Zhou 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): 1007-1017.

[5] 杜程芳, 杨欣欣, 屠鹏飞. 白鲜皮的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1663-1666.

[6] 王 嵩. 中草药抗细菌感染的研究[J]. 北京中医杂志, 2002, 21(4): 249-251.

[7] Netea M G, van-Deuren M, Kullberg B J, *et al*. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? [J]. Trends Immunol, 2002, 23(3): 135-139.

[8] Toman R, Garidel P, Andra J, *et al*. Physicochemical characterization of the endotoxins from Coxiella burnetii strain Priscilla in relation to their bioactivities[J]. BMC Biochem, 2004, 5: 1.

[9] Carrol E D, Thomson A P, Jones A P, *et al*. A predominantly anti-inflammatory cytokine profile is associated with disease severity in meningococcal sepsis[J]. Intensive Care Med, 2005, 31(10): 1415-1419.

[10] 梁秀宇, 关洪全, 刘文力, 等. 常用清热类中药抗Ⅳ型超敏反应的实验研究[J]. 中医药学刊, 2006, 24(6): 1052-1054.

[11] 曹红卫, 郭毅斌, 王 宁, 等. 青蒿素对脓毒症大鼠的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(17): 1769-1772.

(编辑 陈聪连)