论著

文章编号:1000-5404(2008)03-0382-04

黄芩抗内毒素活性物质的分离提取与活性研究

伏建峰,曹红卫,王 宁,刘 鑫,杨 东,郑新川,鲁永玲,郑 江 (第三军医大学西南医院综合实验研究中心,重庆 400038)

摘 要:目的 从黄芩中提取具有拮抗内毒素(LPS)活性的物质。方法 采用大孔吸附树脂和高效液相色谱(HPLC)等技术将黄芩水提物分离成若干组分,应用生物传感器技术检测各组分与LPS的活性中心Lipid A的结合活性,动态比浊法鲎试验检测各组分(2.0 mg/L)对LPS(0.2 μg/L)的中和作用,籍此筛选出活性组分 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测所筛组分对LPS诱导的RAW264.7细胞的Toll样受体4(TLR4)mRNA表达的影响,ELISA法检测所筛组分对LPS(100 μg/L)刺激的RAW264.7细胞释放肿瘤坏死因子α(TNF-α)的影响。结果 获得5种HPLC产物S3K1~5,其中S3K1与Lipid A结合活性最高,S3K1(2.0 mg/L)可显著抑制LPS(0.2 μg/L)介导的鲎试剂的凝结反应($P<0.05$);以LPS(100 μg/L)刺激RAW264.7细胞,其TLR4 mRNA表达增强,给予40、80、160 mg/L的S3K1预处理后能减弱LPS诱导RAW264.7细胞的TLR4 mRNA表达($P<0.05$) 单纯LPS刺激RAW264.7细胞释放的TNF-α为(1 757.61±207.25) ng/L(对照组),给予40、80、160 mg/L的S3K1预处理后TNF-α浓度依次为(1 324.53±149.73)、(893.87±140.77)、(799.97±124.21) ng/L,随S3K1剂量递增而减低,均显著低于对照组($P<0.05$)。结论 从黄芩中提取到具有拮抗LPS活性的组分S3K1,S3K1在体外对LPS具有一定的中和作用,可抑制LPS诱导的RAW264.7细胞的TLR4 mRNA表达,进而抑制LPS诱导的RAW264.7细胞活化。

关键词:黄芩;内毒素;生物传感器;大孔吸附树脂
中图法分类号:R282.71;R284.2;R285.5 文献标识码:A

Extraction and biologic activities of active anti-lipopolysaccharide compound from *Scutellaria baicalensis Georgi*

FU Jian-feng, CAO Hong-wei, WANG Ning, LIU Xin, YANG Dong, ZHENG Xin-chuan, LU Yong-ling, ZHENG Jiang (Medical Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038 China)

Abstract: Objective To isolate and extract the anti-lipopolysaccharide (LPS) active compounds from *Scutellaria baicalensis Georgi*. Methods A series of fractions was prepared by macroporous adsorptive resins and HPLC from the aqueous extract of the herb. Their binding activity to lipid A and the neutralization to LPS were detected by the biosensor technology and kinetic turbidimetric limulus test. The active compounds against LPS were screened. RT-PCR and ELISA was used respectively to detect the expression of TLR4 mRNA and measure the release of TNF-α in RAW264.7 cells exposure to LPS (100 μg/L) with or without the screened compound pretreatment. Results Five HPLC products were isolated from the herb and named from S3K1 to 5. Among them, S3K1 had the highest bind activity to lipid A and significantly inhibited the coagulation reaction induced by LPS (0.2 μg/L) at the dose of 2.0 mg/L. The expression of TLR4 mRNA was increased after the cells exposure to LPS, however, this effect was attenuated by the pretreatment with S3K1 in doses of 40, 80, 160 mg/L. The supernatant TNF-α level was significant decreased in a negatively dose-dependent manner when S3K1 was used to treat the cells before LPS stimulation. Conclusion An active anti-LPS compound, S3K1 is attained from *Scutellaria baicalensis Georgi*, which neutralizes LPS, inhibits the expression of TLR4 mRNA and suppresses the activity of RAW264.7 cells after exposure to LPS.

Key words: *Scutellaria baicalensis Georgi*; lipopolysaccharide; biosensor; macroporous adsorptive resins

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522600);重庆市自然科学基金(2005BB5290)
Supported by the National Key Basic Research Development Plan of China ("973" Project, 2005CB522600) and the Natural Science Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2005BB5290)

作者简介:伏建峰,男,云南省昆明市人,博士研究生,副主任技师,主要从事脓毒症机制及拮抗策略方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68765474,E-mail:dxpfjf@sina.com
通信作者:郑 江,电话:(023)68754435,E-mail:Zhengj@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2007-10-09;修回日期:2007-12-15

机体在严重应激状态(如创伤、大手术和感染等)下,由于外源性的细菌侵入或肠源性的细菌移位,均可诱发和(或)加重脓毒症(sepsis)[1]。临床上由 G^- 菌、G^+ 菌介导的脓毒症占 95% 以上[2]。内毒素(endotoxin/lipopolysaccharide, LPS)是 G^- 菌介导脓毒症的主要病原分子。尽管对 LPS 介导脓毒症的发病机制、寻找 LPS 拮抗措施的研究较为深入,但至今临床上对脓毒症的治疗仍无特殊有效的措施。传统中草药应用于脓毒症的治疗具有悠久的历史,研究证实,多种中草药具有较好的拮抗内毒素作用,但由于作用靶点不明确并缺乏有效的分离检测手段,限制了中草药在脓毒症防治中的应用与发展。本研究基于以 LPS 为靶点的筛选抗内毒素中草药技术平台,采用大孔吸附树脂、高效液相色谱等技术从中药黄芩中分离出活性物质 S3K1,观察其体外拮抗 LPS 的作用,为下一步可能的临床研究提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自美国 ATCC 公司;大孔吸附树脂 AB-8(净品级)购于天津海光化工有限公司;四氮噻唑蓝(批号 M2128)、LPS O111:B4(批号 043K4112)为 Sigma 公司产品;小鼠 TNF-α ELISA 试剂盒购于深圳晶美生物有限公司;RT 试剂盒(ReverTra Ace-α-™)为上海东洋纺生物科技有限公司产品;PCR 试剂盒(2 × *Taq* PCR MasterMix)为北京天根生化科技有限公司产品;蛋试剂购于湛江安度斯生物工程公司。生物传感器及其生物素样品池、CO_2 培养箱为美国 Thermo 公司产品;Icycler-™ Thermal cycler 梯度 PCR 扩增仪、Model 550 酶联分析仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2　黄芩组分的分离制备

1.2.1　**粗品制备**　大孔吸附树脂(AB-8)约 400 g 用无水乙醇(分析纯)浸泡 24 h,充分溶胀后装柱,用蒸馏水洗至无醇味;黄芩 500 g,用自来水反复冲洗后,5.0 L 蒸馏水浸泡 24 h,100 ℃煎 1 h,9 000 r/min 离心 35 min,收集上清液粗滤纸滤过;收集滤液减压浓缩至约 1.0 L,然后,上样于大孔吸附树脂 AB-8,分别以水及梯度乙醇淋洗,收集第 4 梯度乙醇淋洗液蒸发去乙醇,水溶液加入等量正丁醇萃取 3 次,取萃取正丁醇相旋转蒸发去正丁醇,低温冷冻抽干,备用。

1.2.2　**高效液相色谱分离**　粗品用流动相(25% 甲醇)配制成 0.5 mg/ml 浓度,10 μl 进样,检测波长 275 nm;色谱柱:ODS/C18(150 × 4.6 mm,5 μm);柱温:25 ℃;流速:1 ml/min,进行色谱分离。

1.2.3　**高效液相色谱制备**　根据色谱分离条件进行制备,检测波长 275 nm;色谱柱:KF-C18;柱温:25 ℃;流速:15 ml/min;进样浓度:200 mg/ml;进样体积:20 ml,出峰收集,负压抽干。

1.3　黄芩组分与 Lipid A 的结合活性检测

采用本室已建立的生物传感器技术[3]测定黄芩各组分与 Lipid A 的结合活性。按照本室已建立的方法包被 Lipid A,黄芩各组分以 PBS 溶解成 0.2 g/L,取 5 μl 上样,检测其与 Lipid A 的结合活性。

1.4　黄芩组分对 LPS 中和能力的检测

黄芩各组分以无热源检查用水溶解成 2.0 mg/L,取 100 μl 与 LPS(0.2 μg/L)100 μl 混合;LPS 对照组取无热源检查用水 100 μl 与 LPS(0.2 μg/L)100 μl 混合。37℃ 孵育 30 min 后,采用动态浊度法鲎试验检测孵育后的 LPS 值,结果以 EU/ml 表示。

1.5　S3K1 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TLR4 mRNA 表达的影响

小鼠 RAW264.7 细胞置于 6 孔细胞培养板中,每孔 3×10^6 个细胞,加入不同浓度的 S3K1(0、20、40、80、160 mg/L)孵育 0.5 h 后,加入 LPS(终浓度 100 μg/L),同时设不加任何药物的空白对照组(medium),继续孵育 4 h 后,用 TriPure 分离试剂抽提总 RNA,逆转录合成 cDNA 用于 PCR 扩增。PCR 引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件,引物系列和扩增片段的长度:β-actin(456 bp),正义:5′-CCCTGTATGCCTCTGGTC-3′,反义:5′-GTCTTTACGGATGTCAACG-3′;TLR4(285 bp),正义:5′-TTTAT-TCAGAGCCGTTGG-3′,反义:5′-AGTTGCCGTTTCTTGTTC-3′,交上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 扩增反应总体系 25 μl,循环参数为:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,51 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 60 s,共循环 30 次;72 ℃延伸 5 min。取 PCR 反应产物 6 μl 经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳(GoldView 染色)后,于凝胶成像仪紫外灯观察结果并照相,结果以灰度比值(TLR4 mRNA/β-actin mRNA)表示。

1.6　S3K1 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的影响

采用 DMEM 培养液将 RAW264.7 细胞稀释至 1×10^6 ml^{-1},加入 96 孔板(200 μl/孔),在 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO_2 条件下孵育 4 h 后;更换细胞上清为 200 μl 无血清的 DMEM 培养液,加入终浓度为 0、10、20、40、80、160 mg/L 的 S3K1,继续孵育 0.5 h;然后加入 LPS(终浓度 100 μg/L),同时设不加任何药物的空白对照组(medium),继续孵育 4 h;取上清按照 ELISA 试剂盒操作说明进行操作,检测 TNF-α 浓度,结果以均值表示。

1.7　S3K1 对 RAW264.7 细胞活力的影响

采用四氮噻唑蓝(MTT)[4]法观察不同浓度的 S3K1(0、10、20、40、80、160、320 mg/L)对 RAW264.7 细胞活力的影响,每个浓度设 5 复孔,490 nm 波长检测各孔的吸光度值[D(490)]。

1.8　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　黄芩组分的分离制备

经 HPLC 分离纯化后得到 S3K1(4.125 min)、S3K2(12.945 min)、S3K3(17.840 min)、S3K4(31.136 min)、S3K5(38.495 ~ 42.513 min)5 种黄芩组分(图 1)。

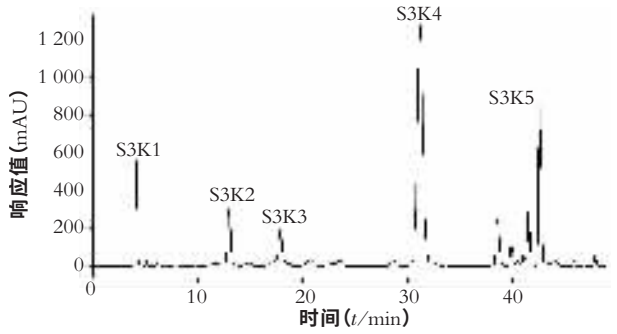


图1 黄芩组分的高效液相色谱分析图

2.2 黄芩组分与 Lipid A 的结合活性检测

黄芩各组分与 Lipid A 均有一定结合活性，其中 S3K1 与 Lipid A 的结合活性最强(图2)。

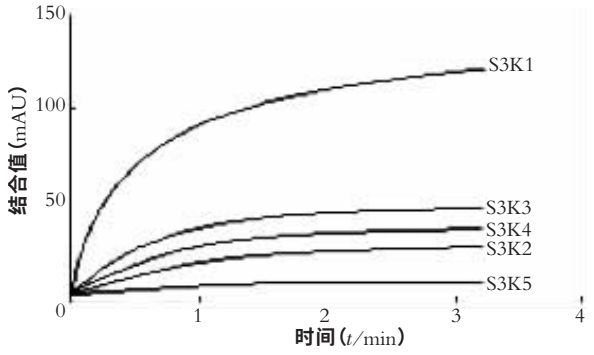
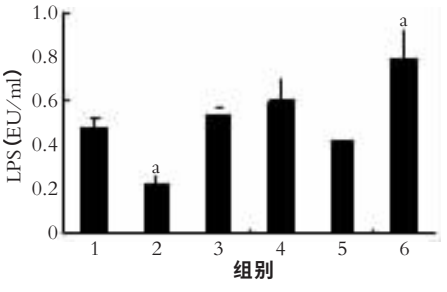


图2 黄芩组分与 Lipid A 的结合活性检测

2.3 黄芩组分对 LPS 的中和作用

黄芩组分中仅 S3K1 对 LPS 介导的鲎试剂的凝结反应具有抑制作用($P<0.05$)，而 S3K5 对 LPS 介导的鲎试剂的凝结反应反具有促凝作用($P<0.05$，图3)。



1：LPS 组；2：LPS + S3K1；3：LPS + S3K2；4：LPS + S3K3；5：LPS + S3K4；6：LPS + S3K5

a：$P<0.05$，与 LPS 组比较

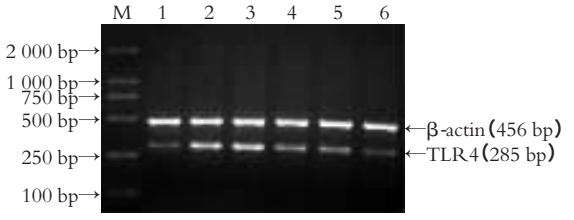
图3 黄芩组分对 LPS 的中和作用($n=3$，$\bar{x}\pm s$)

2.4 S3K1 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TLR4 mRNA 表达的影响

LPS (100 μg/L)可显著上调 RAW264.7 细胞 TLR4 mRNA 的表达，40～160 mg/L 的 S3K1 均可下调 LPS 上调的 TLR4 mRNA表达(图4，表1)。

2.5 S3K1 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的影响

LPS (100 μg/L)可诱导 RAW264.7 细胞大量释放 TNF-α，40、80、160 mg/L 的 S3K1 可显著降低 LPS 诱导的 TNF-α 释放($P<0.05$)，呈显著的量效关系(表1)。



M：DNA 标准(DL 2000)；1：空白对照；2：阳性对照(100 μg/L LPS)；3：LPS + S3K1(20 mg/L)；4：LPS + S3K1(40 mg/L)；5：LPS + S3K1(80 mg/L)；6：LPS + S3K1(160 mg/L)

图4 S3K1 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TLR4 mRNA 表达的影响

表1 S3K1 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TLR4 mRNA 表达和 TNF-α 释放的影响($n=3$，$\bar{x}\pm s$)

组别	TLR4 mRNA/β-actin mRNA	TNF-α(ng/L)
空白对照组	0.152 ± 0.044	141.82 ± 36.03
LPS 组	0.711 ± 0.027	1 757.61 ± 207.25
S3K1 处理组		
10 mg/L		1 577.99 ± 164.56
20 mg/L	0.697 ± 0.028	1 499.03 ± 96.85
40 mg/L	0.435 ± 0.078[a]	1 324.53 ± 149.73[a]
80 mg/L	0.323 ± 0.073[a]	893.87 ± 140.77[a]
160 mg/L	0.159 ± 0.031[a]	799.97 ± 124.21[a]

a：$P<0.05$，与 LPS 组比较

2.6 S3K1 对 RAW264.7 细胞活力的影响

正常细胞 MTT 检测其 D(490)为(0.489 ± 0.026)，与正常对照组比较，当 S3K1 在 10～320 mg/L 浓度时，RAW264.7 细胞活力无明显变化($P>0.05$)。

3 讨论

脓毒症是创伤和感染的常见并发症，进一步发展可导致脓毒症性休克(septic shock)、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome，MODS)，病死率高达 50%～60%[2]。G^- 菌在感染部位生长、繁殖，所释放的内毒素进入血液即造成内毒素血症，进而介导脓毒症。因此，在脓毒症的早期，合理地使用抗生素是必要的；但在脓毒症的中晚期，由于抗生素的使用，大量的细菌被杀灭，加速了内毒素的释放，从而加重脓毒症。因此如何解决抗菌与内毒素血症加重这一矛盾，一直是困扰临床医学工作者的一大难题。

业已证实，LPS 介导的信号转导是导致免疫细胞活化，进而介导脓毒症发生的关键环节[5,6]。基于削弱 LPS 信号转导的思路，本课题组将 LPS 的活性中心 Lipid A 包被于生物传感器上，建立了以 Lipid A 为靶点的筛选拮抗 LPS 药物的实验平台。

黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis Georgi*，SbG)的干草根，是临床上用于抗菌、消炎的常用中药[7]。本室前期的抗 LPS 天然药物筛选实验中，

发现黄芩水煎液与 Lipid A 具有较高的特异性结合能力，提示黄芩含有拮抗 LPS 活性物质的可能性相对较大，因此选择黄芩水提物作为研究对象。本研究采用大孔吸附树脂、液-液萃取及 HPLC 技术从黄芩中共分离到 5 种组分 S3K1 ~ S3K5，应用以 LPS 为靶点的生物传感器技术检测各组分与 Lipid A 的结合活性，动态比浊法鲎试验检测各组分（2.0 mg/L）对 LPS（0.2 μg/L）的中和作用，结果显示：5 种 HPLC 纯化产物中，S3K1 与 Lipid A 结合活性最高，对 LPS 中和能力最强。

本室前期的研究表明：以 LPS 为靶点的生物传感器技术平台对目标物质的分离鉴定具有快速准确的引导作用[3]，通过检测目标物质与 Lipid A 的亲和力，进而评估其抗 LPS 活性。然而，由于 S3K1 相对分子质量未知，无法检测其与 Lipid A 的亲和力。鲎试剂（*Limulus Amebocyte Lysate*，LAL）是目前细菌 LPS 检查的常用试剂，常用来检测药物对 LPS 的中和能力，但是由于天然药物成分复杂，存在多种能激活 G 因子途径进而激活凝固酶而造成假阳性的物质[3]。如图 3 所示，S3K5 非但不能中和 LPS，反而对鲎试剂有促凝作用，可能就是 S3K5 含有能激活 G 因子途径的物质所致。因此，上述 2 种实验用于中药组分的活性评估可能欠妥，用于抗 LPS 活性物质的筛选可能更适宜。

为进一步明确 S3K1 的抗 LPS 活性及其对 LPS 介导的信号转导的影响，本实验观察了不同浓度 S3K1 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 及其对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TLR4 mRNA 表达的影响。单纯 LPS 刺激 RAW264.7 细胞，其上清 TNF-α 浓度显著升高，给予 40、80、160 mg/L 的 S3K1 预处理后，可显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α，并具有量效关系；以 LPS（100 μg/L）刺激 RAW264.7 细胞，其 TLR4 mRNA 表达增强，给予 40、80、160 mg/L 的 S3K1 预处理后能下调 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 TLR4 mRNA 表达。结合 MTT 实验结果，表明 S3K1 抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞活化的作用及其下调 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 TLR4 mRNA 表达并非由于药物的细胞毒性所致，表明 S3K1 确有抗 LPS 活性。

国际上针对 SIRS 和脓毒症的防治性研究一直是临床医学关注的焦点和热点，虽然有关脓毒症拮抗措施的研究较多，但均未取得突破性进展，至今尚无满意有效的治疗手段。本研究基于从源头阻断或减少 LPS 对效应细胞刺激的思路，通过生物传感器技术与大孔吸附树脂分离技术、高效液相色谱技术的联用，从中药黄芩中获得具有抗 LPS 作用的活性物质 S3K1，为从天然药物中分离提取具有拮抗 LPS 活性的组分/单体提供了新的思路和方法。

参考文献：

[1] Lin W J, Yeh W C. Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock[J]. Shock, 2005, 24(3): 206 – 209.

[2] Martin G S, Mannino D M, Eaton S, *et al*. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000[J]. N Engl J Med, 2003, 348(16): 1546 – 1554.

[3] Genfa L, Jiang Z, Hong Z, *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.

[4] Yibin G, Jiang Z, Hong Z, *et al*. A synthesized cationic tetradecapeptide from hornet venom kills bacteria and neutralizes lipopolysaccharide *in vivo* and *in vitro*[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(2): 209 – 219.

[5] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499 – 511.

[6] Nakamura M, Shimizu Y, Sato Y, *et al*. Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, M62812, suppresses endothelial cell and leukocyte activation and prevents lethal septic shock in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 569(3): 237 – 243.

[7] 王　玲，屈凌波，杨　冉，等. 黄芩苷与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 郑州大学学报·医学版，2007，42(1)：35 – 37.

（编辑　王　红）

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价，确定文献的检索范围，提高检索结果的适用性，每篇文章或资料应标识 1 个文献标识码。一般设置以下 5 种标准。

A：理论与应用研究学术论文（包括综述报告）

B：实用性技术成果报告（科技）、理论学习与社会实践总结（社科）

C：业务指导与技术管理性文章（包括领导讲话、特约评论等）

D：一般动态性信息（通讯、报道、会议活动、专访等）

E：文件、资料（包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等）

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部