论著

文章编号:1000-5404(2008)08-0706-03

栀子抗内毒素组分的制备及活性初步分析

杨 东,曹红卫,伏建峰,王 宁,刘 鑫,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 从中药栀子中提取抗内毒素(lipopolysaccharide,LPS)的有效成分并进行活性初步分析。**方法** 运用大孔树脂AB-8、聚酰胺树脂、萃取技术及高效液相色谱分离技术对栀子水提物进行分离;通过测定他与lipid A的结合强弱对分离过程进行跟踪,获得粗组分D,经过HPLC技术进一步获得与lipid A有较强结合活性的组分CJ-1;动态比浊法鲎试验检测组分CJ-1在不同浓度(0.5、1、2 mg/L)对LPS(0.2 μg/L)的中和作用;ELISA法检测CJ-1组分对LPS(100 μg/L)刺激RAW264.7细胞释放肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的影响。**结果** 从中药栀子中逐步分离出与lipid A结合活性较高的组分CJ-1,当CJ-1浓度为0.2 g/L时,RU值为112 arc/s;CJ-1浓度为0.5~2.0 mg/L时,对0.2 μg/L LPS介导的鲎试剂的凝结反应具有显著的抑制作用($P<0.01$,$P<0.05$),并呈剂量效应关系;CJ-1浓度为50~200 mg/L时,对100 μg/L的LPS介导的RAW264.7细胞释放TNF-α具有显著的抑制作用($P<0.01$,$P<0.05$),并呈剂量效应关系。**结论** 依靠lipid A为靶点指导中药栀子水煎液分离,从中分离提取出与lipid A的结合作用较强的组分CJ-1,CJ-1在体外对LPS具有一定的中和作用。

关键词:栀子;生物传感器;内毒素类;鲎试验;TNF-α

中图法分类号:R282.71;R284.2;R285.5 **文献标识码**:A

Isolation and activities of anti-LPS components from the traditional Chinese herb cape jasmine fruit

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

Abstract: Objective To isolate a bio-effective fraction from a traditional Chinese medicine cape jasmine fruit and evaluate its anti-LPS bioactivity. Methods The fraction, named D and targeting on lipid A (the bioactive component of LPS), was isolated from the water extracts of cape jasmine fruit by using the techniques, such as macroporous adsorptive resins, solvent extraction, polyamide laminar analysis under the screen of an affinity biosensor. Purer components CJ-1 were obtained after high performance liquid chromatography (HPLC). The neutralizing activity to LPS (0.2 μg/L) of CJ-1 at different concentrations (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) were further examined by kinetics turbid metric limulus. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was also used to detect CJ-1's effect on LPS-induced release of tumor necrosis factor-α (TNF-α) from RAW 264.7 cells. Results The isolated components CJ-1 have high binding ability to lipid A (RU value: 112 arc/s). CJ-1 (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) inhibit 0.2 μg/L LPS-induced coagulation of limulus reagents significantly and 100 μg/L LPS-induced TNF-α secretion both in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Conclusion Biosensor technique is effective in guiding the isolation of CJ-1 from water extracts of cape jasmine fruit. CJ-1 has high affinity to lipid A and is able to neutralize LPS *in vitro*.

Key words: cape jasmine fruit; biosensor; endotoxin; limulus test; tumor necrosis factor-α

脓毒症是由感染因素引起的全身性炎症反应综合征,是严重创伤、休克和外科大手术后的常见并发症,进一步发展可导致脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),是目前ICU病房患者的主要死亡原因[1]。尽管对脓毒症的研究较为深入,但目前尚无有效的药物应用于临床。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522600) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973 Projects", 2005CB522600)

作者简介:杨 东,男,四川省仁寿县人,硕士研究生,技师,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: yd1977.com@126.com

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

收稿日期:2007-11-04;**修回日期**:2007-12-21

内毒素(lipopolysaccharide, LPS)是 G^- 菌外膜的主要成分,是介导脓毒症的主要病原分子[2],故寻求能拮抗 LPS 的物质对脓毒症的防治具有重要意义。

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,多种中草药都具有较好的拮抗 LPS 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。本课题组前期基于以 LPS 的活性中心 lipid A 为靶点,从具有抗炎、解毒等功效的中草药中筛选出一类与 lipid A 有较高结合活性的药物[3]。本研究进一步采用大孔吸附树脂、聚酰胺层析和高效液相色谱等技术从中药栀子中分离出活性物质 CJ-1,对其拮抗 LPS 生物学活性进行了初步分析,为下一步可能的抗 LPS 单体化合物的获取奠定实验基础。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

生药栀子(产地:四川) 购于重庆市渝中区药材批发市场,经重庆工学院天然药物研究院傅善权主任技师鉴定为茜草科植物栀子(*Gardenia jasminoides Ellis*)的果实;大孔吸附树脂 AB-8(净品级)购于天津海光化工有限公司; LPS O111:B4 为 Sigma 公司产品;鲎试剂购于广东湛江安度斯生物工程公司;酶联法测定小鼠细胞 TNF-α 试剂购于深圳晶美生物工程有限公司。

生物传感器及其生物素样品池为美国 Thermo 公司产品;EDS-99 细菌 LPS 测定系统为湛江正杰科技技术开发公司产品;R205 型旋转蒸发仪为瑞士 BUCHI 公司产品;MODULYO 低温冷冻干燥机为美国 SAVANT 公司产品;1100、1200 型高效液相色谱仪为美国 Agilent 公司产品。

1.2　栀子水煎液的分离及其与 lipid A 的结合活性检测

栀子 2 kg,用清水和蒸馏水清洗后,加入 6 L 三蒸水,浸泡 2 h,90 ~ 100 ℃煎 45 min,6 500 r/min 离心 30 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,水溶液依次经等体积乙酸乙脂萃取 1 次,水相再经正丁醇萃取 1 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乙醇洗脱,依次收集淋洗液,减压浓缩后负压抽干;分别得到 A、B、C、D、E 5 个组分,分别以 0.02 mol/L PBS 溶解成 0.2 g/L,取 5 μl 上样,检测与 lipid A 的结合作用[4]。

1.3　组分 D 的 HPLC 分析及组分 CJ-1 的制备

1.3.1　组分 D 的 HPLC 分析　　色谱柱:ODS/C18(150 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇:水 = 25:75;检测波长:254 nm;柱温:室温;流速:1 ml/min,组分 D 用流动相溶解,浓度为 0.5 mg/ml,10 μl 进样,进行色谱分析。

1.3.2　组分 CJ-1 的 HPLC 制备　　根据色谱分析条件进行制备,色谱柱:KF-C18(200mm × 20 mm,10 μm);流动相:甲醇:水 = 25:75;检测波长:254 nm;流速:20 ml/min;进样浓度:5 mg/ml;进样体积:10 ml;出峰收集,减压浓缩后负压抽干。

1.4　CJ-1 对 LPS 中和能力的检测

CJ-1 以无热源检查用水溶解成 0.5、1.0、2.0 mg/L,分别取 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,观察 CJ-1 对 LPS (0.2 μg/L)的中和能力,每个浓度作 3 复管,结果以 EU/ml 表示。

1.5　CJ-1 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的影响

新分离细胞数为 1×10^6 ml^{-1} 的 RAW264.7 细胞悬液,按 0.25 ml/孔加入 96 孔板,置 37 ℃、5% CO_2 培养 2 h 贴壁;每孔加入终浓度分别为 50、100、200 mg/L 的 CJ-1 组分,继续培养 1 h,加入 LPS(终度为 100 μg/L),其中设只加 LPS 不加 CJ-1 的为阳性对照组,同时设不加 CJ-1 和 LPS 为空白对照组,每组为 3 复孔,继续培养 4 h,取上清用 ELISA 法检测 TNF-α。

1.6　统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行分析,对 CJ-1 对 LPS 中和能力的检测和 CJ-1 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的影响两实验所得数据行单因素方差分析。

2　结果

2.1　分离组分与 lipid A 的结合活性检测

栀子水煎液经聚酰胺层析柱分离后得到 A、B、C、D、E 5 个组分,配成相同浓度(0.2 g/L),其中 D 组分与 lipid A 的结合活性最高,RU 值为 68 arc/s(图 1)。

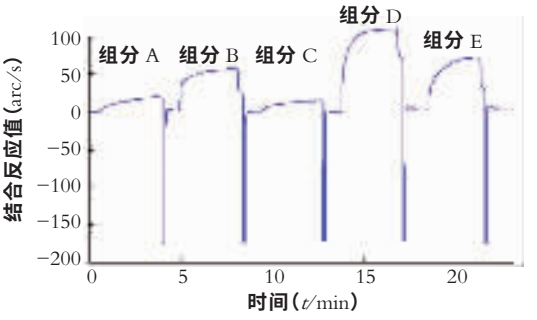


图 1　各组分与 lipid A 的结合活性测定

2.2　栀子组分 D 的 HPLC 分析

栀子组分 D 经 HPLC 分析主要获得 2 种物质 CJ-1(组分 CJ-1 在组分 D 中的含量约为 12.6%)、CJ-2,出峰时间分别为 8.598、20.853 min(图 2)。CJ-1、CJ-2(0.2 g/L)的 RU 值分别为 112、45 arc/s,因此,根据组分 D 的 HPLC 分析条件制备组分 CJ-1,并且在后续的实验中主要对其进行活性研究。

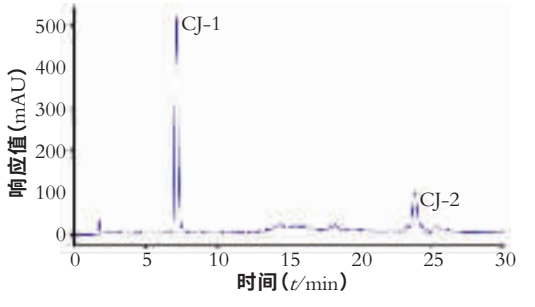


图 2　栀子 D 组分的高效液相色谱分析图

2.3　CJ-1 对 LPS 中和能力的检测

CJ-1 浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L 时,对 LPS(0.2 μg/L)介导

的鲎试剂的凝结反应具有显著的抑制作用($P<0.01$,$P<0.05$),依其浓度递增而抑制作用增强,呈剂量效应关系(表1)。

表1 CJ-1 对 LPS 中和能力的检测($\bar{x}\pm s$)

组别	LPS 检测值(EU/ml)	LPS 检出率(%)
LPS 组	0.462 6 ±0.033 8	100.0 ±7.3
CJ-1 处理组		
0.5 mg/L	0.375 1 ±0.029 7	81.1 ±6.4[a]
1.0 mg/L	0.318 1 ±0.040 7	68.8 ±8.8[b]
2.0 mg/L	0.203 0 ±0.017 1	43.9 ±3.7[b]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 LPS 组比较

2.4 CJ-1 对 LPS 介导 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的影响

组分 CJ-1,在用药剂量终浓度为 50 ~ 200 mg/L 时,与 LPS 对照组有显著性差异($P<0.01$,$P<0.05$),对 LPS 介导的 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 呈抑制作用,并呈一定的量效关应(表2)。

表2 CJ-1 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 TNF-α 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α 测定值(pg/ml)
空白对照组	25.34 ±2.45
LPS 组	1 684.67 ±136.07
CJ-1 处理组	
50 mg/L	1 148.33 ±64.51[a]
100 mg/L	939.33 ±58.82[a]
200 mg/L	829.33 ±129.06[b]

a:$P<0.01$,b: $P<0.05$,与 LPS 组比较

3 讨论

LPS 在脓毒症的发生、发展过程中起重要作用,机体在严重应激状态下,由于外源性或肠源性的细菌及 LPS 移位入血,导致内毒素血症发生。LPS 通过 lipid A 与受体 CD14 结合形成 LPS-CD14 复合物后再与跨膜受体 TLR4 结合,将外源信号转入胞内,导致单核/巨噬细胞的活化,释放 TNF-α、IL-6 等细胞因子,介导脓毒症的发生[5]。在拮抗 LPS 的药物开发研制中,中药以毒副作用小而受到关注,现已发现多种中草药具有灭活或降低 LPS 活性的作用,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。

本实验室在前期工作中,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[6]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、栀子等 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[6]。在此基础上,选择本实验室尚未进行研究的栀子为进一步的研究对象。

本研究中采用的生药栀子是茜草科植物栀子的干燥成熟果实,临床上广泛运用于复方栀子注射液,黄连解毒汤等中药方剂中。文献[7,8]表述,栀子具有利胆、保肝、镇静、抗炎、抗微生物等功效。在栀子抗 LPS 活性组分的筛选实验中,采用生物传感器技术[9]进行活性跟踪,结合大孔吸附树脂、液-液萃取及聚酰胺层析技术从栀子水煎液中分离提取到 A、B、C、D、E 5 个组分,D 组分与 lipid A 的结合活性最高,RU 值为 68 arc/s。进而采用 HPLC 技术对 D 组分进行分离纯化,最终获得活性物质 CJ-1。对 CJ-1 抗 LPS 的活性进行了初步分析,结果显示:浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L 的 CJ-1 可显著地抑制 LPS(0.2 μg /L)介导的鲎试剂的凝结反应,并呈剂量效应关系,CJ-1 在浓度为 50 ~ 200 mg/L 时可显著地抑制 100 μg/L 的 LPS 介导的 RAW264.7 细胞释放 TNF-α,并呈剂量效应关系,表明 CJ-1 在体外对 LPS 具有一定的中和能力,其中和 LPS 的作用可能是通过与 lipid A 结合实现。

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、聚酰胺层析技术和高效液相色谱技术的联用,从中药栀子中获得具有抗 LPS 作用的活性物质 CJ-1,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] Aneja R, Fink M P. Promising therapeutic agents for sepsis [J]. Trends Microbiol, 2007, 15(1): 31 -37.

[2] Angus D C, Linde-Zwirble W T, Lidicker J, *et al*. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. Crit Care Med , 2001, 29(7): 1303 -1310.

[3] 郭毅斌, 曹红卫, 范 莉, 等. 白鲜皮抗内毒素活性物质的分离提取与活性研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29 (17): 1654 -1656 .

[4] 陈益国, 姚 婕, 张向武, 等. 以 Lipid A 为靶点拮抗内毒素中药的筛选[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10 (12): 1349 -1353 .

[5] Van-Amersfoort E S, Van-Berkel T J, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock [J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(3): 379 -414 .

[6] 吕根法, 王 宁, 卫 国, 等. 以细菌内毒素为靶点应用生物传感器技术筛选拮抗内毒素中草药[J]. 四川生理科学杂志, 2003, 25 (3): 134.

[7] 吴 虹, 魏 伟, 宋礼华. 栀子总苷的抗炎镇痛作用研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(7): 31 -33.

[8] 倪慧艳, 张朝晖, 傅海珍. 中药栀子的研究与开发概述[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 538 -541 .

[9] Bertucci C, Cimitan S. Rapid screening of small ligand affinity to human serum albumin by an optical biosensor[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 32(4-5): 707 -714 .

(编辑 陈聪连)