文章编号:1000-5404(2012)20-2097-04

论著

白鲜皮生物碱抗内毒素活性的研究

杨 东[1],张 瑛[2],郑新川[3],刘 鑫[3],鲁永玲[3],郑 江[3] (410003 长沙,解放军第163医院:检验科[1],急诊科[2];400038 重庆,第三军医大学西南医院综合实验研究中心[3])

[摘要] **目的** 从中药白鲜皮中分离抗内毒素/脂多糖(endotoxin/lipopolysaccharide, LPS)的有效成分,对分离得到的成分进行定性鉴别和体内外抗LPS活性的研究。**方法** 采用大孔吸附树脂、离子交换、聚酰胺和硅胶柱层析等方法从白鲜皮水煎液中分离有效成分,并以试管法进行定性鉴别;在体外,以动态浊度法检测该成分对LPS的中和作用;ELISA法检测其对LPS刺激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;在体内,观察该成分对热灭活大肠埃希菌攻击小鼠的保护实验。**结果** 从白鲜皮中分离得到具有抗LPS作用的生物碱类成分BXP-A。体外实验结果显示,BXP-A(0.5~1.0 mg/L)可抑制LPS(0.2 μg/L)介导的鲎试剂的凝结反应($P<0.05$);BXP-A(100~200 mg/L)可显著抑制LPS(100 μg/L)诱导RAW264.7细胞释放TNF-α及IL-6($P<0.05$, $P<0.01$);BXP-A(40 mg/kg)可提高注射热灭活大肠埃希菌(1.3×10^{11} CFU/kg)攻击小鼠存活率约40%。**结论** BXP-A在体外能较好地中和LPS并抑制其诱导的炎症细胞因子释放,对热灭活大肠埃希菌攻击所致脓毒症模型小鼠具有保护作用。

[关键词] 白鲜皮;内毒素;细胞因子;脓毒症
[中图法分类号] R282.71;R392.11;R996 [文献标志码] A

Anti-lipopolysaccharide activity of alkaloid components from *Densefruit pittany root-bark*

Yang Dong[1], Zhang Ying[2], Zheng Xinchuan[3], Liu Xin[3], Lu Yongling[3], Zheng Jiang[3] ([1]Department of Clinical Laboratory, [2]Department of Emergency, No. 163 Hospital of PLA, Changsha, Hunan Province, 410003; [3]General Experimental Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To isolate and identify the anti-lipopolysaccharide (LPS) components from *Densefruit pittany root-bark* and investigate its potential anti-LPS activities *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The components were isolated by macroporous adsorptive resins, ion exchange, polyamide and silica gel column chromatography from the aqueous extract of *Densefruit pittany root-bark*, and identified by tube test. The neutralization of LPS was assayed by Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test. The inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) release from RAW264.7 cells induced by LPS was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protective effect was observed in mice challenged by lethal dose of heat-killed *Escherichia coli*. **Results** The alkaloids components with anti-LPS activity, BXP-A, were isolated and identified from *Densefruit pittany root-bark*. *In vitro*, BXP-A (0.5 to 1.0 mg/L) inhibited the coagulation of LAL induced by LPS (0.2 μg/L) ($P<0.05$), and it (100 to 200 mg/L) significantly suppressed the release of TNF-α and IL-6 induced by LPS (100 μg/L) in RAW264.7 cells ($P<0.05$ or 0.01). *In vivo*, BXP-A (40 mg/kg) improved the survival rate of mice challenged by lethal dose of heat-killed *Escherichia coli* (1.3×10^{11} CFU/kg). **Conclusion** BXP-A neutralizes LPS and inhibits the overproduction of cytokines in cells, and has protective effect against sepsis in a heat-killed *Escherichia coli*-induced mouse model of sepsis.

[**Key words**] *Densefruit pittany root-bark*; lipopolysaccharide; cytokines; sepsis

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2005CB522600). Corresponding author: Zheng Jiang, Tel: 86-23-68754435, E-mail: zhengj99219@gmail.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2005CB522600)
[通信作者] 郑 江,电话:(023)68754435,E-mail: zhengj99219@gmail.com

脓毒症是由感染因素所导致的全身性炎性反应综合征,是临床创伤、烧伤和感染性疾病患者的常见并发症,进一步发展可导致脓毒症性休克和多器官功能障碍综合征,病死率高达50%~60%[1]。内毒素/脂多糖(endotoxin/lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌细胞外膜的主要成分,其被LPS结合蛋白(LPS-binding protein, LBP)结合并捕获,活化单核-吞噬细胞系统,引起TNF-α等炎症介质释放,介导全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),即脓毒症等疾病的发生。LPS是脓毒症最主要的致病因子[2],故寻求能拮抗LPS的物质对脓毒症的防治具有重要意义。

本课题组在前期工作中运用生物传感器技术,以LPS的活性中心lipidA为靶点,从114种传统中草药中筛选出大黄、地骨皮、栀子、白鲜皮等多种与lipidA具有较高亲和力的中药[2-4]。本研究采用大孔吸附树脂、离子交换、聚酰胺和硅胶柱层析等分离方法从白鲜皮水煎液中分离出能较好拮抗LPS活性的组分,分析其活性,并为下一步阐明白鲜皮抗LPS作用的物质基础奠定实验基础。

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;LPS(O111:B4,美国Sigma公司,批号:024K4077);MTT(美国Sigma公司,批号:N2128);细胞培养基(Gibco® DMEM,美国Invitrogen公司,批号:129007);小鼠TNF-α和IL-6检测试剂盒购自深圳晶美公司(R&D公司),灵敏度分别为15、60 pg/ml;AB-8大孔吸附树脂(净品级)、D001离子交换树脂、聚酰胺树脂和硅胶树脂均为天津海光化工有限公司产品;清洁级昆明系小白鼠20只,体质量18~22 g,雌雄各半,由第三军医大学实验动物中心提供;中药材白鲜皮饮片采购自重庆市渝中区药材批发市场(产地:四川),由重庆工学院天然药物研究院傅善权主任技师鉴定为芸香科白鲜属植物白鲜(*dictamnus dasycarps turcz*)的根皮。

SDS-99细菌LPS测定系统为湛江正杰科学仪器有限公司生产;生物传感器及其疏水样品池为美国Thermo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;CO_2培养箱为美国Thermo公司产品;Model550酶联分析仪为美国Bio-Rad公司产品。

1.2 提取与分离

取白鲜皮4 kg,用8 L蒸馏水浸泡1 h,90~100 ℃煎40 min,8 000 r/min离心30min取上清,上AB-8大孔吸附树脂,上样后,依次用蒸馏水、20%、30%和50%乙醇洗脱。将各洗脱相进行生物传感器检测。取亲和力最高的洗脱相上D001离子交换树脂,依次用水和20%乙醇洗脱;取亲和力最高的洗脱相上聚酰胺层析柱,依次用水和50%乙醇进行洗脱;取亲和力最高的洗脱相干法上样进行硅胶柱层析分离,以乙酸乙酯、甲醇:乙酸乙酯(1:1~9:1)、丙酮:水(4:5)依次洗脱。收集亲和力最高的洗脱相,并用试管法(茚三酮、α-萘酚、乙酸酐-浓硫酸、盐酸-镁粉、三氯化铁、碘化铋钾、碘-碘化钾法、试管薄层显色等)进行定性鉴别。

1.3 白鲜皮活性组分BXP-A对LPS中和能力的检测

BXP-A以无热源检查用水溶解成0.5、1.0 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BXP-A对LPS的中和能力,每个浓度作3复管,结果以EU/ml表示。

1.4 白鲜皮活性组分BXP-A对LPS诱导的小鼠RAW264.7细胞释放TNF-α和IL-6的影响

新分离细胞数为1×10^6/ml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BXP-A组分,继续培养1 h,加入LPS(终浓度为100 μg/L),其中设只加LPS不加BXP-A为阳性对照组,同时设不加BXP-A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和IL-6。

1.5 白鲜皮活性组分BXP-A对RAW264.7细胞活力的影响

将培养的RAW264.7细胞分为对照组和BXP-A处理组,每组设4复孔,对照组未加药物,BXP-A处理组加入不同浓度的BXP-A(终浓度分别为50、100、200、400 mg/L),37 ℃、5% CO_2环境下培养24 h。1 000 r/min离心10 min,吸弃细胞培养上清,每孔加180 μl细胞培养液和MTT 20 μl(5 mg/ml),37 ℃、5% CO_2环境下培养4 h。1 000 r/min再次离心10 min,吸弃细胞培养上清,每孔加150 μl二甲基亚砜(DMSO),振荡10 min促使结晶充分溶解,490 nm波长检测各孔的光密度值[$D(490)$]。

1.6 白鲜皮活性组分BXP-A对热灭活大肠埃希菌ATCC35218注射小鼠的保护作用

取清洁级昆明小白鼠20只,采用配对比较法随机分为热灭活大肠埃希菌对照组、白鲜皮活性组分BXP-A组,每组动物10只。动物称量后,热灭活大肠埃希菌对照组尾静脉注射热灭活大肠埃希菌(1.3×10^{11} CFU/kg)及生理盐水(10 ml/kg);白鲜皮活性组分BXP-A组于热灭活大肠埃希菌注射5 min后尾静脉注射BXP-A,剂量为40 mg/kg。注射完毕,各组小鼠分笼饲养,给等量、充足的饲料和水。观察各组小鼠在注射后168 h内的一般情况(精神状态、食欲、活动度和对刺激的反应)、死亡率及具体死亡时间。

1.7 统计学分析

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 白鲜皮活性组分BXP-A与LPS亲和力的测定及定性鉴别结果

在分离过程中,将所得各组分干燥后以PBS配成2 g/L,在生物传感觉器上测定与LPS的亲和力,结果显示大孔吸附树脂50%乙醇洗脱相亲和力最高,选择作为继续分离研究的对象。该部位经D001离子交换树脂分离后检测,20%乙醇洗脱相亲

和力高,故以该洗脱相继续分离。经聚酰胺层析柱分离后检测,50% 乙醇洗脱相亲和力最高,故将该部位上硅胶柱层析进行分离,分离得到的各成分中以丙酮:水(4:5)洗脱相(BXP-A)亲和力最高。定性鉴别显示该成分茚三酮反应(氨基酸、多肽、蛋白质)阴性,α-萘酚反应(多糖)阴性,乙酸酐-浓硫酸反应(皂苷)阴性,盐酸-镁粉反应(黄酮)阴性,三氯化铁反应(酚类)阴性,碘化铋钾反应阳性,碘-碘化钾试管反应阳性、薄层显色鉴别阳性(硅胶薄层板,正丁醇:冰醋酸:水=4:1:5为展开剂,喷以改良碘化铋钾显橘红色斑点),这3种生物碱鉴别方法均示阳性,故确定分离得到的BXP-A为生物碱成分。

2.2 白鲜皮活性组分BXP-A对LPS中和能力的检测结果

BXP-A在0.5~1.0 mg/L范围内,对LPS(0.2 μg/L)介导的鲎试剂的凝结反应具有抑制作用,其中用药浓度为1.0 mg/L时,加LPS的BXP-A处理组与阳性对照组有差异显著($P<0.05$,表1)。

表1 BXP-A对LPS介导鲎试剂凝结反应的抑制作用($\bar{x}\pm s$)

组别	LPS检测值(EU/ml)	LPS检出率(%)
阳性对照组	0.534 6±0.026 4	100.0±4.9
BXP-A处理组		
0.5 mg/L	0.430 2±0.074 7	81.1±13.8
1.0 mg/L	0.381 9±0.030 7	71.4±5.7[a]

a:$P<0.05$,与阳性对照组比较

2.3 白鲜皮活性组分BXP-A对LPS介导RAW264.7细胞释放TNF-α和IL-6的影响

BXP-A在100~200 mg/L范围内,对LPS介导的RAW264.7细胞释放TNF-α和IL-6均呈抑制作用,加LPS的BXP-A处理组与阳性对照组有显著性差异,并呈一定的量效关应($P<0.05$,$P<0.01$,表2)。

表2 BXP-A对LPS介导的RAW264.7细胞释放TNF-α和IL-6的抑制作用(pg/ml,$\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α	IL-6
空白对照组	171.39±14.57	150.69±14.93
阳性对照组	3 589.28±123.24	2 458.67±66.91
BXP-A处理组		
50 mg/L	3 662.99±205.56	2 450.27±100.71
100 mg/L	3 444.02±298.08[a]	2 161.96±140.03[b]
200 mg/L	2 725.32±246.88[b]	1 717.36±170.79[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与阳性对照组比较

2.4 白鲜皮活性组分BXP-A对RAW264.7细胞活力的影响

BXP-A在浓度≤400 mg/L时,对RAW264.7细胞活力无明显影响($P>0.05$),即在药效剂量(100~200 mg/L)下BXP-A不影响细胞活力(表3)。

2.5 白鲜皮活性组分BXP-A对注射热灭活大肠埃希菌ATCC35218小鼠的保护作用

注射热灭活大肠埃希菌(1.3×10^{10} CFU/ml)的小鼠在24 h内全部死亡,而给予40 mg/kg的BXP-A,168 h内存活率提高至40%,显示较热灭活大肠埃希菌对照组存活率明显提高,存在较好的保护作用(图1)。

表3 BXP-A对RAW264.7细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	D(490)
对照组	1.192 7±0.089 7
BXP-A处理组	
50 mg/L	1.202 0±0.055 0
100 mg/L	1.217 0±0.036 7
200 mg/L	1.160 8±0.045 8
400 mg/L	1.180 5±0.019 5

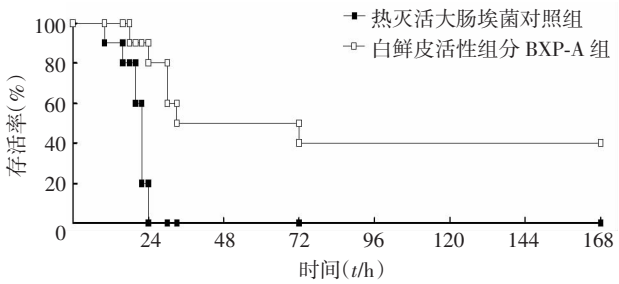


图1 白鲜皮活性组分BXP-A对注射热灭活大肠埃希菌ATCC35218小鼠的保护作用

3 讨论

细菌的多个病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)都可参与脓毒症的发生,目前已知的PAMPs主要有LPS、肽聚糖(PGN)、细菌基因组DNA(CpG DNA)、磷壁酸(LTA)、鞭毛蛋白、脂蛋白、酵母多糖以及病毒DNA和RNA等,其中LPS是介导脓毒症的主要病原分子[5-7]。LPS作为细菌重要的PAMPs,被LBP捕获后传递给巨噬细胞和单核细胞膜表面的膜受体CD14,并以LPS-CD14复合物形式与免疫细胞上的跨膜受体TLR4结合,从而将胞外刺激信号导入胞内,通过启动一系列信号转导级联事件激活细胞质中的核转录因子(NF-κB),活化的NF-κB从细胞质移入细胞核结合于转录起始位点,诱生TNF-α、IL-1β和IL-6等多种细胞因子,引发后续的生物学效应,引发脓毒症。由于LPS的胞内信号转导极为复杂,LPS诱发的细胞活化及细胞因子级联效应一旦启动将不易控制。因此,寻求能拮抗LPS,阻断LPS的活性中心lipid A与其受体的结合是防治脓毒症的关键。

目前脓毒症的防治研究主要涉及糖皮质激素、丙酮酸乙酯[8]、他汀类药物[9]等,但都有副作用大或作用不明显、应用受限等缺点。各种细胞因子的抗体及其受体拮抗剂,如TNF-α抗体、IL-1抗体、IL-6抗体以及NO拮抗剂,在动物实验研究中对脓毒症所致的脏器损伤都有一定的保护作用。重组人活化蛋白C

（rhAPC）是唯一由美国FDA批准，并以商品名“Xigris”投入市场作为重度脓毒症治疗的辅助药物，作用机理主要为通过负反馈抑制凝血酶原转变为凝血酶来调控凝血过程，但由于Xigris有严重的副作用，其治疗效果一直备受争议，并最终于2011年10月，由于在PROWESS-SHOCK实验中并没有显示出Xigris与安慰剂组相比显著提高患者生存率，礼来公司决定终止Xigris后期所有临床试验，并在全球范围内退市[10]。因此，寻求能够治疗脓毒症的新药变得十分迫切。

现有研究报道，白鲜皮主要含有生物碱类、柠檬苦素类、香豆素和黄酮类、甾体类、倍半萜和倍半萜甙类及多糖化合物等成分，具有抗炎、抗肿瘤、提高免疫力、解热等药理作用[11]，但尚少有报道其生物碱类具有抗LPS的活性。本研究发现，从白鲜皮中提取的生物碱类成分具有结合并中和LPS、抑制其诱导的炎症细胞因子释放的作用，并且在热灭活大肠埃希菌攻击所致脓毒症模型小鼠上初步证实其具有保护效应，经鉴别定性为生物碱类成分，但BXP-A非单一成分，可能是一类生物碱的混合物，拟下一步将对其进行进一步分离，纯化出单体，为深入研究白鲜皮的药理活性，阐明其药效作用物质基础，特别是以此为基础开发能够拮抗LPS、治疗脓毒症的药物奠定实验基础。

参考文献：

[1] Vincent J L, Sakr Y, Sprung C L, *et al*. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study[J]. Crit Care Med, 2006, 34(2): 344-353.

[2] Zheng X, Yang D, Liu X, *et al*. Identification of a new anti-LPS agent, geniposide, from Gardenia jasminoides Ellis, and its ability of direct binding and neutralization of lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(10): 1209-1219.

[3] 杨东，曹红卫，伏建峰，等. 栀子抗内毒素组分的制备及活性初步分析[J]. 第三军医大学学报，2008，30(8)：706-708.

[4] 龙字鹏，郑江. 以lipid A为靶点应用生物传感器技术筛选抗炎中药[J]. 中国药房，2008，17(7)：4-6.

[5] 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.

[6] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response[J]. Nature, 2007, 449(7164): 819-826.

[7] Rittirsch D, Flierl M A, Ward P A. Harmful molecular mechanisms in sepsis[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(10): 776-787.

[8] 陈敏英，江智毅，吴荣耀，等. 丙酮酸乙酯对脓毒症大鼠肝细胞线粒体的保护作用[J]. 中华普通外科学文献：电子版，2012，6(1)：41-44.

[9] 顾金萍，于健，王俊松，等. 阿托伐他汀对脓毒症大鼠血浆IL-1β的影响[J]. 大连医科大学学报，2012，34(2)：124-128，133.

[10] Marti-Carvajal A J, Sola I, Lathyris D, *et al*. Human recombinant activated protein C for severe sepsis[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, (3): CD004388.

[11] 武海燕. 药用植物白鲜皮的化学成分及药理作用综述[J]. 内蒙古石油化工，2007，33(3)：50-51.

（收稿：2012-07-19；修回：2012-08-11）

（编辑 张 维）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2012)20-2100-01

2例针灸重度晕针的救治体会

吴杰凤 （400038 重庆，第三军医大学西南医院康复理疗科）

[关键词] 针灸；晕针；人中

[中图法分类号] R246 [文献标志码] B

晕针是针灸临床治疗的常见不良反应，晕针处理不当造成患者致残或死亡的报道不少。晕针的防治尤为重要，正确的预防，迅速、有效处治，可大大减少对患者的伤害[1]。晕针症状分轻度、重度。轻度：患者面色苍白、头晕、心慌、耳鸣、出冷汗、恶心、精神疲倦；重度：除以上症状外，患者还出现脉细弱、血压下降、四肢厥冷、意识丧失、惊厥昏迷、大小便失禁、唇甲青紫、脉微欲绝、呼吸心跳停止。本人从事针灸治疗工作26年，治疗病患几十万人次，所见轻度晕针48例，重度晕针只有2例，处理及时、正确，未对患者造成任何伤害，特将2例重度晕针的救治体会报告如下。

[通信作者] 吴杰凤，电话：(023)68765864

1 临床资料

例1：杨某，男性，56岁，右侧脑梗死后遗左侧肢体偏瘫痪，左侧中枢性面瘫1个月余，查体：神志清楚、语言清晰、上肢肌力Ⅰ级、下肢肌力Ⅲ级，患者坐位，取头皮针：顶颞前斜线上、中、下部，共打4针并接D6850-A电针仪，留针30 min，治疗4次，患者感觉一切正常，症状有所改善。第5次治疗，打上头皮针后由进修医师接电针仪，由于其对机器性能了解不够，电流突然变大，患者立感不适，出冷汗、面色苍白、坐立不稳，随后立即拔针，让患者就地平卧，患者已人事不省、大小便失禁、血压下降、脉细弱，立即指掐人中、合谷、内关，30 s后患者逐渐清醒，2 min后一切恢复正常。

（下转2114页）