

度和愈合情况, 本实验选用局部病理组织作为客观指标, 可较好判断栀子细粉醋糊外敷对大鼠外伤血瘀的疗效。

本实验结果显示, 高、低剂量栀子细粉醋糊组均显著减小受伤右后肢周长, 明显减轻外伤血瘀症状, 显著减轻外伤血瘀病变, 明显改善血液流变学指标。本实验中醋淀粉糊组各项指标与模型组相差不大, 对外伤血瘀的改善提示不是醋本身的作用, 但醋味酸、甘, 能散瘀血, 收敛止痛, 有利于药物作用的发挥。现代临床采用栀子药粉拌以醋调糊治疗急性扭挫伤, 收到明显效果<sup>[7]</sup>。栀子主要成分是京尼平苷, 具有显著的抗炎和治疗软组织损伤作用, 有利于栀子对外伤血瘀损伤的治疗<sup>[8]</sup>。本实验为栀子的消肿止痛外用功能提供了实验依据。有报道现代临床外用栀子用于血栓性浅静脉炎、1度烧伤、肛门旁皮下脓肿、结节性红斑、小儿发热<sup>[9]</sup>、急性踝关节扭伤<sup>[10]</sup>等的治疗, 疗效较好; 栀子消肿止痛的外用功能与其外用临床疗效一致。本实验也为栀子的临床外用提供了理论支持, 为临床局部外伤血瘀损伤提供了一种简易有效的救治方法。

## REFERENCES

- [1] WU H, WEI W, SONG L H. Anti-inflammatory and analgesic effects of total glucosides of *Cape jasmine* [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2006, 13(8): 31-33.

- [2] YANG Q J, FAN M S, SUN Z L, et al. Research progress of the chemical constituents, pharmacological effects and the body process of the *Gardenia* [J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2010, 12(9): 7-12.
- [3] NA S, GUO G T, WANG Z D, et al. Pharmacological research progress of *Gardenia* and its effective components [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2005, 12(1): 90-92.
- [4] WEN R X, LI Y, LI W, et al. Comparative study of hemorheology between traumatic blood stasis and Yangxu blood stasis animal models [J]. *China J Basic Med Tradit Chin Med*(中国中医基础医学杂志), 2005, 11(11): 833-834.
- [5] QIN X Y. Development of blood stasis animal model and its use of recent developments [J]. *New J Tradit Chin Med*(新中医), 2002, 34(5): 68-70.
- [6] CHEN L M, MA M, QU Y, et al. Research progress of diabetes blood stasis [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2005, 20(2): 114-116.
- [7] LIU J Q, YU G X, YANG H, et al. External Application of Traditional Chinese Medicine Treatment All Diseases(外敷中药治百病) [M]. Vol 2. Beijing: Huaxia Publishing House, 2006: 373.
- [8] LIU G M, GUO S H, CHENG W M. The new research progress of the pharmacological effects of the *Gardenia* and its mechanism [J]. *Strait Pharm J*(海峡药理学), 2008, 20(11): 8-10.
- [9] SHEN A Z, LIU S, TANG Y Q. The research progress of *Gardenia* pharmacological effects and clinical applications [J]. *Primary J Chin Mater Med*(基层中药杂志), 1997, 11(2): 49-52.
- [10] QI S F. Observation the clinical treatment acute ankle sprain by *Gardenia* injuries cream [J]. *J Tradit Chin Orthop Traumatol*(中医正骨), 2009, 21(7): 44-46.

收稿日期: 2011-10-10

## 栀子苷拮抗内毒素的实验研究

伏建峰<sup>a</sup>, 赵华<sup>b</sup>, 史清海<sup>a</sup>, 周郁<sup>a</sup>, 刘正祥<sup>a</sup>, 冉继华<sup>a</sup>, 葛迪<sup>a</sup>, 李晓玲<sup>a</sup>, 何雁<sup>a</sup>, 张红明<sup>a</sup>, 余元伦<sup>a</sup>  
(兰州军区乌鲁木齐总医院, a.全军临床检验诊断中心, b.耳鼻咽喉头颈外科, 乌鲁木齐 830000)

**摘要:** 目的 研究栀子苷的抗内毒素生物学活性。方法 应用生物传感器技术检测栀子苷与内毒素(LPS)活性中心 Lipid A 的结合活性、动态比浊法试验检测栀子苷(0, 2.5, 5.0, 10.0 mg·L<sup>-1</sup>)对 LPS(0.1 μg·L<sup>-1</sup>)的中和活性、ELISA 法检测栀子苷(0, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>)对 LPS(100 μg·L<sup>-1</sup>)刺激 RAW264.7 细胞释放细胞因子的影响, 进而观察栀子苷(10, 20, 40 mg·kg<sup>-1</sup>)对致死剂量 LPS 攻击模型小鼠的保护作用。结果 栀子苷与 Lipid A 具有结合活性, 量效关系明显; 栀子苷(2.5, 5.0, 10.0 mg·L<sup>-1</sup>)在体外对 LPS(0.1 μg·L<sup>-1</sup>)具有显著的直接中和作用( $P < 0.01$ ); 栀子苷在 50~100 mg·L<sup>-1</sup>能够显著抑制 LPS(100 μg·L<sup>-1</sup>)刺激 RAW264.7 细胞释放 TNF-α( $P < 0.01$ ); 40 mg·kg<sup>-1</sup>的栀子苷对脓毒症模型小鼠具有显著的保护作用( $P < 0.01$ )。结论 栀子苷可能通过与 Lipid A 结合中和 LPS 的活性, 抑制 LPS 介导的细胞活化, 减少细胞因子释放, 进而保护脓毒症模型小鼠。

**关键词:** 栀子苷; 内毒素; 脓毒症

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)04-0352-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81071535)

作者简介: 伏建峰, 男, 博士, 副主任技师 Tel: (0991)4992822 E-mail: dxpjf@163.com

## Anti-lipopolysaccharide Activity Study of Jasminoidin

FU Jianfeng<sup>a</sup>, ZHAO Hua<sup>b</sup>, SHI Qinghai<sup>a</sup>, ZHOU Yu<sup>a</sup>, LIU Zhengxiang<sup>a</sup>, RAN Jihua<sup>a</sup>, GE Di<sup>a</sup>, LI Xiaoling<sup>a</sup>, HE Yan<sup>a</sup>, ZHANG Hongming<sup>a</sup>, YU Yuanlun<sup>a</sup>(Urumqi General Hospital, Lanzhou Military, a.Clinical Laboratory Diagnostic Center, b.Department of Otolaryngology, Urumqi 830000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the anti-lipopolysaccharide(LPS) activity of jasminoidin *in vitro* and *in vivo*. **METHODS** The binding activity of jasminoidin to Lipid A and the neutralization on LPS were detected by the biosensor technology and kinetic turbidimetric limulus test. Meanwhile, ELISA was used to measure the release of cytokine from RAW264.7 cells exposure to LPS with or without pretreatment of jasminoidin. Furthermore, the protective effect on mice subjected to lethal dose of LPS challenge with or without treatment of jasminoidin was observed. **RESULTS** Jasminoidin had binding activity to Lipid A and significantly neutralized LPS( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in dose of 2.5, 5.0, 10.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $P<0.01$ ). Subsequently, the release of TNF- $\alpha$  from RAW264.7 cells exposure to LPS( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was significant attenuated by pretreatment with jasminoidin in the dose of 50, 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $P<0.01$ ). *In vivo* experiment, jasminoidin could significant protect mice against a lethal challenge with LPS at the dose of 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $P<0.01$ ). **CONCLUSION** Jasminoidin can neutralize LPS and suppress the activating of RAW264.7 cells induced by LPS. *In vivo*, jasminoidin can significantly protect mice against a lethal challenge with LPS. Jasminoidin has anti-lipopolysaccharide activity.

**KEY WORDS:** jasminoidin; lipopolysaccharide; sepsis

机体在严重应激状态下如创伤、大手术和感染, 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<sup>[1]</sup>。临床上由 G<sup>-</sup>菌、G<sup>+</sup>菌介导的脓毒症占 95%以上, 内毒素(endotoxin/lipopolysaccharide, LPS)是 G<sup>-</sup>菌介导脓毒症的主要病原分子<sup>[2-3]</sup>。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。本课题组通过生物传感技术与大孔吸附树脂、膜分离和高效液相色谱等现代生物技术相结合的方法, 从中药栀子中分离出活性单体化合物栀子苷, 观察其体内外拮抗 LPS 的作用, 为临床研究提供实验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂、仪器和动物

小鼠巨噬细胞 RAW264.7(美国 ATCC 公司); 四氮嘧啶蓝(批号 M2128)、LPS O111: B4(Sigma 公司产品, 批号 043K4112); 小鼠 TNF- $\alpha$ ELISA 试剂盒(深圳晶美生物有限公司); 鲎试剂(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<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司产品); Model 550 酶联分析仪(美国 BIO-RAD 公司); EDS-99 内毒素定量测定系统(湛江正杰科学仪器有限公司); BALB/c 小鼠(清洁级)(第三军医大学实验动物中

心), 实验动物合格证号: SCXK(渝)2012-0003。

#### 1.2 栀子苷与 Lipid A 的结合活性测定

取本课题组所提栀子苷(以 HPLC 峰面积归一化法检测, 纯度: 99.543%), 用 pH 7.4 的磷酸盐吐温缓冲液(PBST, 吐温含量: 0.05%)制备成 0.03~0.50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  系列浓度溶液, 取 5  $\mu\text{L}$  上样, 结果以特异性结合值(RU)表示, 具体操作参照文献[4], 检测其与 Lipid A(Sigma, 批号: 31K4053)的结合活性, 数据分析采用 FASTplot 软件。

#### 1.3 栀子苷对 LPS 中和能力的检测

不同浓度的栀子苷(0, 2.5, 5.0, 10.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )分别与 LPS( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )在 37 °C 共同孵育 30 min 后, 采用定量鲎实验测定游离的 LPS 值, 结果以 EU $\cdot\text{mL}^{-1}$  表示。

#### 1.4 栀子苷对 LPS 诱导巨噬细胞活化的影响

采用 DMEM 培养液将 RAW264.7 细胞稀释至  $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$ , 加入 96 孔板( $200 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ ), 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4 h; 实验分别设对照组和药物处理组, 对照组不加任何试剂, 药物处理组每孔加入栀子苷(终浓度为 0, 25, 50, 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )继续培养 0.5 h; 药物处理组加入 LPS( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 4 h, 取上清, 采用 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$  浓度。

#### 1.5 栀子苷对脓毒症模型小鼠的保护作用观察

清洁级 BALB/c 小鼠 100 只, 体质量 18~20 g, ♀ ♂ 各半, 随机分为 LPS 对照组, 栀子苷 10, 20,

40 mg·kg<sup>-1</sup> 处理组和单纯栀子苷组, 每组 20 只; 动物称重后, LPS 对照组注入 LPS(18 mg·kg<sup>-1</sup>)和生理盐水; 栀子苷处理组于 LPS(18 mg·kg<sup>-1</sup>)注入 5 min 后分别注射 10, 20, 40 mg·kg<sup>-1</sup> 的栀子苷; 单纯栀子苷组注入栀子苷 100 mg·kg<sup>-1</sup> 和生理盐水。每只动物液体注入总量为 20 μL·g<sup>-1</sup>, 均采用尾静脉注射, 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 7 d 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。

### 1.6 栀子苷对 RAW264.7 细胞活力的影响

采用四氮嘧啶蓝(MTT)法<sup>[1]</sup>。取 0.2 mL 的 RAW264.7 细胞悬液(浓度 1×10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>)于 96 孔板内, 置 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 2 h 后, 加入不同浓度的栀子苷(0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 mg·L<sup>-1</sup>), 每组均设 6 复孔; 继续培养 24 h, 弃上清, 每孔加入 180 μL 细胞培养液和 20 μL MTT 溶液(5 g·L<sup>-1</sup>), 继续培养 4 h, 吸弃细胞培养上清, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 振荡 10 min 使结晶充分溶解, 490 nm 处测量各孔的吸光(OD)值。

### 1.7 统计学处理

所有数据应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组均数间的比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义; 小鼠存活率分析采用 Kaplan-Meyer 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 栀子苷与 Lipid A 的结合活性测定

栀子苷(0.03~0.50 g·L<sup>-1</sup>)与 Lipid A 具有结合活性, RU 值在 13~52 arc seconds 之间, 随浓度升高结合活性增强, 量效关系明显, 结果见图 1。

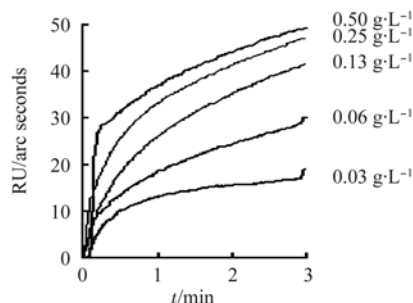


图 1 栀子苷与 Lipid A 的结合活性测定

Fig 1 Determination of binding activity of jasminoidin to Lipid A

### 2.2 栀子苷对 LPS 的中和作用

栀子苷(2.5, 5.0, 10.0 mg·L<sup>-1</sup>)可显著中和 LPS(0.1 μg·L<sup>-1</sup>)的活性, 抑制其介导的鲎试剂的凝集反应( $P < 0.01$ ), 结果见图 2。

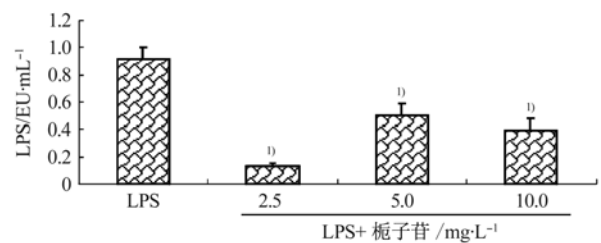


图 2 栀子苷对 LPS 的中和作用( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

与 LPS 组比较,  $^1P < 0.01$

Fig 2 Neutralization of jasminoidin to LPS *in vitro*( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Compared with LPS treatment,  $^1P < 0.01$

### 2.3 栀子苷对 LPS 诱导巨噬细胞活化的影响

RAW264.7 细胞在未给予 LPS 刺激时, 其细胞培养上清中的 TNF- $\alpha$  为(129±41)mg·L<sup>-1</sup>, 在 100 μg·L<sup>-1</sup> 的 LPS 作用 4 h 后, 其 TNF- $\alpha$  分泌均显著增加, 升至(3 150±376)mg·L<sup>-1</sup>; 在不同浓度栀子苷干预后, 细胞 TNF- $\alpha$  的分泌受到不同程度的抑制, 栀子苷在 50~100 mg·L<sup>-1</sup> 浓度水平能够显著抑制 LPS 刺激的 TNF- $\alpha$  释放( $P < 0.01$ ), 量效关系明显, 结果见图 3。

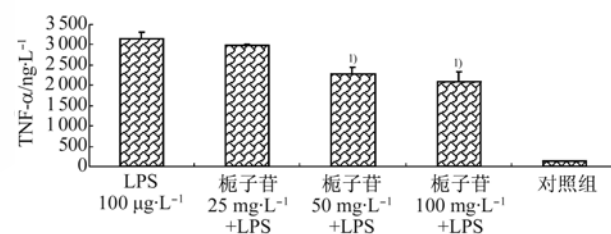


图 3 栀子苷对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 TNF- $\alpha$  的抑制作用

与 LPS 组比较,  $^1P < 0.01$

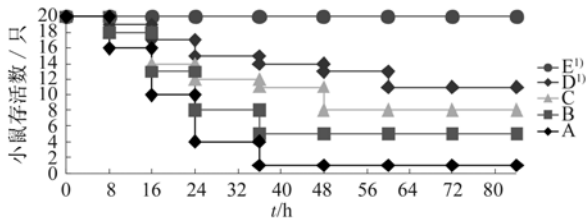
Fig 3 Effect of jasminoidin on TNF- $\alpha$  release from RAW264.7 cells induced by LPS

Compared with LPS treatment,  $^1P < 0.01$

### 2.4 栀子苷对脓毒症模型小鼠的保护作用观察

脓毒症模型组, 即 LPS 对照组, 多数小鼠在 20 h 内死亡, 36 h 后仅存活 1 只。与脓毒症模型组相比, 栀子苷干预组小鼠死亡时间有后延的趋势, 多数在 20 h 后死亡, 死亡时间不集中, 48~70 h 仍有少量小鼠死亡, 72 h 后未再出现动物死亡; 小鼠存活率随栀子苷注射剂量的增加而升高, 其

72 h 存活率在 25%~55%之间, 其中 40 mg·kg<sup>-1</sup> 的 梔子苷处理组 7 d 存活率达 55%, 显著高于脓毒症模型组( $P<0.01$ ), 表明梔子苷对脓毒症模型小鼠具有保护作用, 结果见图 4。因各组小鼠 72 h 后均未再出现死亡, 其生存曲线图以 84 h 为限制作。



**图 4** 梔子苷对脓毒症模型小鼠的保护作用  
A-LPS 对照组; B-LPS+梔子苷 10 mg·kg<sup>-1</sup> 组; C-LPS+梔子苷 20 mg·kg<sup>-1</sup> 组; D-LPS+梔子苷 40 mg·kg<sup>-1</sup> 组; E-梔子苷 100 mg·kg<sup>-1</sup> 组与 LPS 组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$

**Fig 4** Effect of jasmninoidin on the survival rate of mice challenged with a lethal dose of LPS  
A-LPS alone group; B-LPS and jasmninoidin (10 mg·kg<sup>-1</sup>) group; C-LPS and jasmninoidin (20 mg·kg<sup>-1</sup>) group; D-LPS and jasmninoidin (40 mg·kg<sup>-1</sup>) group; E-jasmninoidin (100 mg·kg<sup>-1</sup>) alone group  
Compared with LPS treatment, <sup>1)</sup> $P<0.01$

### 2.5 梔子苷对 RAW264.7 细胞活力的影响

正常细胞 MTT 检测, 其 OD<sub>490 nm</sub> 为 1.04±0.14。10~320 mg·L<sup>-1</sup> 梔子苷处理的 RAW264.7 细胞 OD<sub>490nm</sub> 依次为 1.05±0.10、1.09±0.09、1.12±0.16、1.06±0.07、1.11±0.09 和 1.02±0.13, 与正常细胞比较无显著性差异( $P>0.05$ ), 表明<320 mg·L<sup>-1</sup> 的梔子苷对 RAW264.7 细胞无明显的毒性作用。

### 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、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 病死率高达 50%~60%<sup>[5]</sup>。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, 抗生素的使用, 因大量细菌被杀灭, 加速了内毒素的释放从而加重脓毒症。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。

中医中药治疗脓毒症是一重要的研究方向, 已有资料表明多种清热解毒类药如金银花、板兰

根等具有灭活或降低 LPS 活性的作用。但是从中草药中分离到具有较好拮抗 LPS 作用的单体的报道却甚少。究其原因, 一方面可能由于中药组成分极其复杂, 分离过程繁琐; 另一方面则由于受技术手段的限制, 无法对分离得到的组分进行活性检测与跟踪。业已证实, LPS 介导的信号传导是导致免疫细胞活化, 进而介导脓毒症发生的关键环节<sup>[4]</sup>。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。

梔子(*Gardenia jasminoides* Ellis)又名山梔子、黄梔子, 属茜草科植物的果实, 其主要成分为: 梔子苷(geniposide)、羟异梔子苷(gardenoside)和山梔苷(shanzhiside)等。梔子具有泻火除烦、清热利尿和凉血解毒之功效, 临床上可用治目赤肿痛、热毒疮疡, 常与大青叶、黄芩、黄柏等同用。依托前述以 Lipid A 为靶点的筛选拮抗 LPS 药物的实验平台, 结合大孔吸附树脂、膜分离、聚酰胺层析和 HPLC 等现代生物技术, 课题组前期对梔子水提液进行多级分离纯化, 得到环烯醚萜类化合物-梔子苷。

本研究显示梔子苷(0.03~0.50 g·L<sup>-1</sup>)与 Lipid A 具有结合活性, 并且量效关系明显。Lipid A 的空间构象变化是造成 LPS 活性差异的主要因素, 一般认为物质与 Lipid A 的结合可能是其拮抗 LPS 生物学活性的重要基础<sup>[6]</sup>, 但与 Lipid A 具有结合作用的物质并非都像 PMB、BPI 一样具有中和 LPS 的作用<sup>[7]</sup>。为明确梔子苷的抗 LPS 活性, 笔者将不同浓度的梔子苷与 0.1 μg·L<sup>-1</sup> 的 LPS 共同孵育 30 min 后, 再用定量鲎实验测定游离的 LPS 值, 结果显示 2.5, 5.0, 10.0 mg·L<sup>-1</sup>(终浓度)的梔子苷可显著抑制 LPS 介导的鲎试剂的凝集反应( $P<0.01$ ), 表明梔子苷在体外对 LPS 具有直接中和作用。实验中梔子苷对 LPS 的中和作用未体现出量效关系, 主要是因为浓度较高的梔子苷对鲎试剂检测有影响。鲎试剂是 FDA 认可的 LPS 检测试剂, 也是目前最常用的细菌 LPS 检测试剂<sup>[8]</sup>。其作用机理是 LPS 通过激活鲎试剂中的 C 因子, 进而激活凝固酶原, 使其转化为活化的凝固酶而发生凝集反应。而一些非致热性物质如: 葡聚糖可

通过 G 因子途径, 激活凝固酶造成假阳性<sup>[8]</sup>。实验中, 笔者发现单独栀子苷 $>2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时即可对鲎试验有促凝作用, 并且随其浓度升高促凝效应增强(数据未显示), 因此, 在应用鲎试验对中药组分、单体中和 LPS 的作用进行评估时, 尚需考虑其对鲎试验的影响。

脓毒症以多种炎症介质的诱生、释放和级联效应为特征, TNF- $\alpha$  是启动脓毒症炎性级联效应的关键细胞因子, 在脓毒症的发生发展中起重要作用<sup>[9]</sup>。为进一步明确栀子苷拮抗 LPS 的活性, 本实验观察了不同浓度栀子苷对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放 TNF- $\alpha$  的影响。RAW264.7 细胞未受任何刺激物干预时, 其细胞上清 TNF- $\alpha$  为 $(129\pm 41)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 以 LPS( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )刺激 RAW264.7 细胞, 其上清 TNF- $\alpha$  浓度升至 $(3150\pm 376)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 给予 50,  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的栀子苷预处理后, 可显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 TNF- $\alpha$ ( $P<0.01$ ), 并具有量效关系, 表明栀子苷能够拮抗 LPS 对炎症反应细胞的刺激效应。MTT 实验结果显示, 小于  $320 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的栀子苷对 RAW264.7 细胞无明显的毒性作用( $P>0.05$ ), 体外实验中所采用栀子苷浓度均 $\leq 160 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 表明栀子苷的体外拮抗 LPS 作用并非由其细胞毒性引起, 栀子苷确有抗 LPS 活性。

本研究的目的是要从抗炎中药中分离提取能够用于脓毒症防治研究的单体化合物, 因此, 观察所提组分/单体对脓毒症模型动物的保护作用是必不可少的一项活性评估指标。为了进一步明确栀子苷拮抗细菌脓毒症的体内生物学活性, 笔者采用致死剂量的 LPS 制备小鼠脓毒症模型, 观察栀子苷对脓毒症模型小鼠的保护作用。以 LPS( $18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )攻击小鼠, 多数小鼠在 20 h 内死亡, 36 h 后无一存活。用栀子苷干预后, 小鼠死亡时间有后延的趋势, 多数小鼠在 20 h 后死亡; 并且小鼠存活率随栀子苷注射剂量的增加而升高, 剂量效应关系明显; 小鼠 72 h 存活率在 25%~55%之间, 其中  $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的栀子苷处理组 7 d 存活率达 55%, 显著高于 LPS 对照组, 表明栀子苷对脓毒症模型小鼠具有保护作用。

国际上针对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, 目前尚无确切有效的药物应用临床。本研究通过生物传感器技术与大孔吸附树脂分离技术、膜分离技术及高效液相色谱技术的联用, 从中药栀子中获得具有抗 LPS 作用的单体化合物栀子苷。栀子苷对脓毒症模型动物具有显著的保护作用, 其机制可能与栀子苷结合 Lipid A, 进而中和 LPS 活性、抑制 LPS 介导的细胞活化, 减少细胞因子释放有关。此外, 体内实验显示,  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的栀子苷对小鼠无明显不良反应, 结合 MTT 实验结果, 表明栀子苷是一种毒性很低的化合物, 加之其水溶性很好, 笔者认为栀子苷成药的可能性较大, 但其应用前景如何仍需进一步深入研究。

## REFERENCES

- [1] 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.
- [2] COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 885-891.
- [3] BRYANT C E, SPRING D R, GANGLOFF M, et al. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(1): 8-14.
- [4] FU J, CAO H, WANG N, et al. An anti-sepsis monomer, 2',5,6',7-tetrahydroxyflavanonol (THF), identified from *Scutellaria baicalensis* Georgi neutralizes lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(12): 1652-1657.
- [5] LIU X, CHENG J, ZHENG X C, et al. Targeting CpG DNA to screen and isolate anti-sepsis fraction and monomers from traditional Chinese herbs using affinity biosensor technology [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(9): 1021-1031.
- [6] 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.
- [7] JIANG X J, YAO Y Y, ZHENG J. *Bacterial Endotoxin in Basic and Clinical(细菌内毒素基础与临床)* [M]. Beijing: People's Medical Press, 2004: 402-416.
- [8] OBATA T, NOMURA M, KASE Y, et al. Early detection of the limulus amoebocyte lysate reaction evoked by endotoxins [J]. *Anal Biochem*, 2008, 373(2): 281-286.
- [9] RUSSELL J A. Management of sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(16): 1699-1713.

收稿日期: 2012-10-31