

苦参碱、水苏碱和防己诺林碱 抗细菌内毒素的作用研究

胡屹屹, 何孔旺, 倪艳秀

(江苏省农业科学院 兽医研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 拟探讨 3 种中药生物碱苦参碱、水苏碱和防己诺林碱对细菌内毒素(LPS)的治疗作用。ICR 小鼠腹腔注射 6 mg/kg 的内毒素 3 h 后, 根据分组情况分别腹腔注射高(10 mg/kg)、中(5 mg/kg)、低(1 mg/kg) 3 个剂量的苦参碱、水苏碱和防己诺林碱。同时设立 LPS 对照组、空白对照组和药物对照组。记录 LPS 攻毒后 48 h 内各组小鼠临床表现, 测定体温、体重及器官指数, 检测血清中 LPS 和炎症因子的含量。结果显示, 苦参碱、水苏碱和防己诺林碱能显著改善体温升高、体重减轻、血清中 LPS 和炎症因子含量升高、内脏肿大等病变。表明以上 3 种中药生物碱具有明显的抗细菌内毒素作用, 为其在兽医临床治疗细菌内毒素疾病提供理论依据。

关键词: 苦参碱; 水苏碱; 防己诺林碱; 内毒素

中图分类号: S853.74 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)01-0129-05

Study on the Antiendotoxin Action of Oxymartrine , Stachydrine and Fangchinoline

HU Yi-yi , HE Kong-wang , NI Yan-xiu

(Institute of Veterinary Medicine , Jiangsu Academy of Agricultural Sciences , Nanjing 210014 , China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the antiendotoxin action of Oxymartrine , Stachydrine and Fangchinoline. The mice in the treatment groups were challenged with 6 mg/kg LPS by peritoneal injection , then treated with Oxymartrine , Stachydrine and Fangchinoline at three concentrations (1 , 5 and 10 mg/kg) . The mice in the LPS group were challenged with 6 mg/kg LPS by peritoneal injection. The mice in the drug groups were treated with 10 mg/kg Oxymartrine , Stachydrine and Fangchinoline by peritoneal injection. The mice in the blank group were treated with physiological saline. The determined items and results were as follow: compared with the LPS control group , the body temperature decreased significantly in the middle and high-dose groups of Oxymartrine; the body weight increased significantly in the high-dose group of Stachydrine; the LPS contents decreased significantly in the middle-dose group of Fangchinoline; the TNF- α contents decreased significantly in the middle-and high - dose groups of Oxymartrine; the IL-1 β contents decreased significantly in the high-dose group of Oxymartrine; the index of liver and intestinal decreased significantly in the high - dose group of Stachydrine. It suggested that Oxymartrine , Stachydrine and Fangchinoline had significant antiendotoxin effect , thus providing a theoretical basis for clinical application of alkaloid in controlling the diseases caused by LPS.

Key words: oxymartrine; stachydrine; fangchinoline; LPS

收稿日期: 2011-10-28 修回日期: 2011-11-15

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金(cx(10) 425)

作者简介: 胡屹屹(1981—) 男 助理研究员 博士 主要从事中兽医学和动物药理学研究 E-mail: huyiyi6073@sina.com。

内毒素(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性杆菌生长或死亡时裂解出来的细胞壁脂多糖成分,经肠道吸收进入血液循环后,导致炎症级联瀑布反应,引发多器官功能衰竭甚至机体死亡^[1]。生物碱是一大类碱性含氮化合物,是许多药用植物的有效成分^[2]。苦参碱是一种较强的免疫抑制剂,可以抑制多种炎症因子的释放,有明确的抗炎、抗病毒和免疫调节作用^[3]。水苏碱具有降低血管阻力、改善微循环状态、减缓血小板凝聚等作用,有望成为良好的心血管系统疾病的治疗药物^[4]。防己诺林碱的生物活性包括抗炎、镇痛作用,降压作用,抗肿瘤作用和抗血小板聚集作用^[5]。本研究观察3种中药生物碱对LPS攻毒小鼠的体征和多项临床病理指标变化的影响,探讨生物碱抗内毒素的药理机制,旨在为兽医临床应用生物碱防治细菌性疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药品与试剂 苦参碱、水苏碱和防己诺林碱,购自中国药品生物制品鉴定所,批号:111780,111712,110793。LPS(O₅₅:B₅)购自Sigma公司,批号:L-2880。临用前根据所需浓度用生理盐水溶解稀释。内毒素显色基质鲎试剂盒,购自厦门市鲎试剂实验厂有限公司,批号:090226。小鼠TNF- α 和IL-1 β 检测试剂盒,购自武汉博士德生物技术有限公司,批号:EK0527, EK0394。

1.1.2 主要仪器 酶标检测仪、温度传感器、低温高速离心机、电子天平、数显恒温水浴锅和微型漩涡混合仪等。

1.1.3 动物分组 健康普通级ICR小鼠56只,体质量18~22g,雌雄各半,购自扬州大学比较医学中心。适应环境3d后,随机分为14组,每组4只。LPS对照组和药物治疗组按6mg/kg腹腔注射LPS,3h后药物治疗组分别腹腔注射高(10mg/kg)、中(5mg/kg)、低(1mg/kg)3个剂量的苦参碱、水苏碱和防己诺林碱,药物对照组腹腔注射10mg/kg的苦参碱、水苏碱和防己诺林碱,空白对照组给予等体积的生理盐水。

1.2 测定指标

1.2.1 体温和体质量的测定 观察并记录各组小鼠实验后的临床表现。于攻毒后12h用温度传感器检测各组小鼠的直肠温度。于攻毒后48h用电子天平称量各组小鼠的体质量。

1.2.2 LPS和炎症因子含量的检测 攻毒后48h小鼠眼眶采血0.5mL,3000r/min,10min离心取血清上清液。按照试剂盒说明书,显色基质法检测LPS含量,ELISA法检测TNF- α 和IL-1 β 含量。

1.2.3 器官指数的测定 取攻毒后48h治疗高剂量组、LPS对照组和空白对照组的小鼠进行病理解剖,分离心、肝、脾、肺、肾和肠,观察各器官病变情况,并用电子天平称量,计算器官指数。

1.3 数据分析

各项检测指标结果采用平均数 \pm 方差(Mean \pm SD)的形式表示,应用统计软件SPSS 17.0中的ANOVA(one way analysis of variance)法进行方差分析,比较各组之间的差异显著性。

2 结果分析

2.1 体温和体质量的测定

LPS对照组小鼠攻毒后呼吸急促、浑身震颤、精神沉郁。LPS对照组小鼠的体温为(38.48 \pm 0.51) $^{\circ}$ C,空白对照组体温为(37.30 \pm 0.51) $^{\circ}$ C,两者差异极显著($P < 0.01$)。各组小鼠体温的变化情况见表1,其中苦参碱高剂量组极显著低于LPS对照组($P < 0.01$);苦参碱中剂量组显著低于LPS对照组($P < 0.05$)。

LPS对照组小鼠攻毒后采食减少、腹泻脱水、形体消瘦。LPS对照组小鼠的体质量为(24.90 \pm 0.93)g,空白对照组体质量为(26.33 \pm 0.65)g,两者差异显著($P < 0.05$)。各组小鼠体重的变化情况见表2,其中水苏碱高剂量组显著高于LPS对照组($P < 0.05$)。

2.2 LPS和炎症因子含量的检测

LPS对照组小鼠血清中LPS的含量为(0.920 \pm 0.074)EU/mL,空白对照组LPS的含量为(0.469 \pm 0.079)EU/mL,两者差异极显著($P < 0.01$)。各组小鼠血清中LPS含量的变化情况见表3,其中防己诺林碱中剂量组显著低于LPS对照组($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠的体温变化

Tab. 1 The changes of body temperature in every group

℃

组别 Groups	低剂量 (1 mg/kg) Low-dose	中剂量 (5 mg/kg) Middle-dose	高剂量 (10 mg/kg) High-dose	药物对照 (10 mg/kg) Drug control
苦参碱 Oxymartrine	37.95 ± 0.72	37.65 ± 0.85*	37.33 ± 0.31**	37.15 ± 0.48
水苏碱 Stachydrine	38.10 ± 0.65	37.93 ± 0.46	37.90 ± 0.50	37.28 ± 0.67
防己诺林碱 Fangchinoline	38.20 ± 0.29	38.03 ± 0.53	38.13 ± 0.51	37.35 ± 0.60
LPS 对照组 LPS		38.48 ± 0.51		
空白对照组 Blank		37.30 ± 0.51**		

与 LPS 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. LPS control group.

表 2 各组小鼠的体重变化

Tab. 2 The changes of body weight in every group

g

组别 Groups	低剂量 (1 mg/kg) Low-dose	中剂量 (5 mg/kg) Middle-dose	高剂量 (10 mg/kg) High-dose	药物对照 (10 mg/kg) Drug control
苦参碱 Oxymartrine	25.38 ± 1.22	25.23 ± 0.88	25.60 ± 1.22	26.32 ± 0.41
水苏碱 Stachydrine	25.54 ± 1.17	25.91 ± 0.64	26.30 ± 0.92*	26.43 ± 0.85
防己诺林碱 Fangchinoline	26.03 ± 0.39	25.43 ± 0.99	25.90 ± 0.58	26.29 ± 0.47
LPS 对照组 LPS		24.90 ± 0.93		
空白对照组 Blank		26.33 ± 0.65*		

与 LPS 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. LPS control group.

LPS 对照组小鼠血清中 TNF- α 的含量为 (43.41 ± 3.29) pg/mL, 空白对照组 TNF- α 的含量为 (27.79 ± 2.23) pg/mL, 两者差异极显著 ($P < 0.01$)。各组小鼠血清中 TNF- α 含量的变化情况见表 4, 其中苦参碱高剂量组极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$); 苦参碱中剂量组显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.05$)。

LPS 对照组小鼠血清中 IL-1 β 的含量为 (66.56 ± 5.05) pg/mL, 空白对照组 IL-1 β 的含量为 (46.77 ± 3.79) pg/mL, 两者差异极显著 ($P < 0.01$)。各组小鼠血清中 IL-1 β 含量的变化情况见表 5, 其中苦参碱高剂量组极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$)。

2.3 器官指数的测定

LPS 对照组的小鼠攻毒 48 h 后进行病理剖解, 肉眼可见肠壁扩张变薄, 肠管充血水肿, 肠内充满大

表 3 各组小鼠血清中 LPS 的水平

Tab. 3 The contents of serum LPS in every group

EU/mL

组别 Groups	低剂量 (1 mg/kg) Low-dose	中剂量 (5 mg/kg) Middle-dose	高剂量 (10 mg/kg) High-dose	药物对照 (10 mg/kg) Drug control
苦参碱 Oxymartrine	0.874 ± 0.128	0.889 ± 0.084	0.871 ± 0.099	0.480 ± 0.073
水苏碱 Stachydrine	0.912 ± 0.062	0.869 ± 0.078	0.856 ± 0.107	0.497 ± 0.053
防己诺林碱 Fangchinoline	0.889 ± 0.080	0.806 ± 0.054*	0.851 ± 0.054	0.504 ± 0.056
LPS 对照组 LPS		0.920 ± 0.074		
空白对照组 Blank		0.469 ± 0.079**		

与 LPS 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. LPS control group.

量水样渗出液, 肝脏肿胀变黑, 脾脏有出血点。肝脏、脾脏和肾脏指数均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。肠管指数极显著高于空白对照组 ($P < 0.01$)。各组小鼠的器官指数见表6, 其中苦参碱高剂量组和水苏碱高剂量组的肝脏指数显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.05$), 水苏碱高剂量组的肠管指数极显著低于 LPS 对照组 ($P < 0.01$)。

表4 各组小鼠血清中 TNF- α 的水平
Tab.4 The contents of serum TNF- α in every group pg/mL

组别 Groups	低剂量 (1 mg/kg) Low-dose	中剂量 (5 mg/kg) Middle-dose	高剂量 (10 mg/kg) High-dose	药物对照 (10 mg/kg) Drug control
苦参碱 Oxymartrine	40.29 \pm 3.48	38.32 \pm 3.44*	36.98 \pm 2.63**	26.45 \pm 3.33
水苏碱 Stachydrine	42.34 \pm 3.90	40.55 \pm 3.20	39.75 \pm 2.81	28.32 \pm 2.81
防己诺林碱 Fangchinoline	44.30 \pm 1.98	42.70 \pm 4.32	40.02 \pm 4.25	28.14 \pm 2.70
LPS 对照组 LPS	43.41 \pm 3.29			
空白对照组 Blank	27.79 \pm 2.23**			

与 LPS 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. LPS control group.

表5 各组小鼠血清中 IL-1 β 的水平
Tab.5 The contents of serum IL-1 β in every group pg/mL

组别 Groups	低剂量 (1 mg/kg) Low-dose	中剂量 (5 mg/kg) Middle-dos	高剂量 (10 mg/kg) High-dose	药物对照 (10 mg/kg) Drug control
苦参碱 Oxymartrine	64.48 \pm 3.30	61.15 \pm 5.07	59.74 \pm 3.61**	44.79 \pm 4.10
水苏碱 Stachydrine	63.18 \pm 3.90	64.48 \pm 2.99	61.41 \pm 4.10	48.13 \pm 3.58
防己诺林碱 Fangchinoline	64.38 \pm 6.78	63.18 \pm 3.82	66.67 \pm 3.00	48.54 \pm 2.99
LPS 对照组 LPS	66.56 \pm 5.05			
空白对照组 Blank	46.77 \pm 3.79**			

与 LPS 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. LPS control group.

表6 各组小鼠的器官指数
Tab.6 The changes of organ index in every group %

组别 Groups	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	肠 Intestinal
LPS 对照组 LPS	0.674 \pm 0.106	6.47 \pm 0.27	0.567 \pm 0.033	0.710 \pm 0.064	1.593 \pm 0.054	10.11 \pm 0.58
苦参碱 Oxymartrine	0.647 \pm 0.088	5.56 \pm 0.47*	0.531 \pm 0.048	0.672 \pm 0.055	1.510 \pm 0.145	9.92 \pm 0.54
水苏碱 Stachydrine	0.584 \pm 0.068	5.49 \pm 0.74*	0.560 \pm 0.068	0.684 \pm 0.079	1.535 \pm 0.055	8.71 \pm 0.74**
防己诺林碱 Fangchinoline	0.614 \pm 0.124	5.80 \pm 0.64	0.495 \pm 0.096	0.665 \pm 0.086	1.460 \pm 0.131	9.49 \pm 0.64
空白对照组 Blank	0.594 \pm 0.076	5.44 \pm 0.50*	0.451 \pm 0.057*	0.620 \pm 0.044	1.444 \pm 0.068*	8.44 \pm 0.36**

与 LPS 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. LPS control group.

3 讨论

LPS 是机体发热、腹泻、炎症、水肿、凝血、休克等综合征发生的病理基础^[6]。至今,人们对 LPS 血症的治疗仍无特效措施, 抗生素的应用虽然能够有效控制细菌感染, 但有增加 LPS 血症的危险。LPS 抗体曾被寄予厚望, 但临床效果欠佳。其它措施包括抑制类脂 A 合成、阻断 LPS 信号转导等, 都还需要经过较长时间的实践证实^[7]。寻找有效的多靶点药物防治 LPS 引发的病理综合症是当今兽医临床面临的棘手课题。中药及其成分对 LPS 损伤的保护作用主要表现在: 直接清除 LPS 的中和作用, 对抗炎症因子分泌失调的拮抗作用和改善微循环血流性质的调节作用^[8]。综合本试验结果发现, 3 种中药生物碱均具有一定的抗 LPS 药理作用, 又以苦参碱效果最佳。

腹腔注射 LPS 6.0 mg/kg,即可致小鼠全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征,9.0 mg/kg 为小鼠半数致死量,24.0 mg/kg 的 LPS 可导致小鼠全部死亡^[9]。因此本试验将 LPS 攻毒剂量定为 6.0 mg/kg。本研究证明苦参碱具有显著的解热降温作用,并且呈现明显的量效关系。试验中小鼠在攻毒后出现呼吸急促、浑身震颤、采食减少、腹泻脱水等临床症状,是因为 LPS 刺激儿茶酚胺的释放,引起机体高糖和高脂血症^[10]。小鼠代谢亢进,能量大量消耗,形体消瘦孱弱,与空白对照组相比体质量差异显著。LPS 对照组体质量减轻的另一方面原因来自于腹泻脱水,机理与 LPS 刺激机体产生大量神经递质 NO 有关,从而改变了小肠的蠕动性和肠液的电解质平衡^[11]。本试验提示,水苏碱还能提高动物的生产性能和经济价值。

TNF- α 在炎症和细胞凋亡过程中起至关重要的作用,还可以引起发热、低血压、乳酸酸中毒和不可逆性休克^[12]。诱导 TNF- α 产生的最有效物质为 LPS,一般认为其水平高低与病情的发展正相关。研究表明,苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱和槐定碱对多种炎症的对抗作用与直接抑制 TNF- α 的分泌有关^[13]。本研究结果与报道基本一致。IL-1 β 参与机体的炎症反应和免疫防御、造血功能调节及包括几乎所有器官系统在内的自体平衡机制^[14]。IL-1 β 是内源性致热原,作用于下丘脑体温调节中枢,引起体温升高。本实验证明,苦参碱能显著降低 LPS 诱导的 IL-1 β 高水平,推测苦参碱是通过直接抑制 TNF- α 和 IL-1 β 的强势表达来间接减轻 LPS 引发的炎症反应。

病理剖解显示,小鼠注射 LPS 后,肝脏、脾脏、肾脏体积和质量均有增加,尤以肠管最为明显。病理变化主要表现为充血、出血、水肿、渗出、炎性细胞浸润,甚至细胞坏死,这就可以解释内脏器官肿大的原因^[15]。水苏碱的药理作用不仅表现在改善体质量减轻,还能抑制内脏肿大病变,而防己诺林碱则可以直接降低血液中 LPS 的含量。综上,本试验证明,苦参碱、水苏碱和防己诺林碱能够全方位多角度地拮抗 LPS 所致的病理损伤,保护机体恢复正常的生理状态,为兽医临床细菌性疾病的防治尤其是大肠杆菌病和肠炎,提供高效安全的药物。同时对生物碱制剂的系列开发,以及中药有效成分的筛选也具有重要的指导与借鉴意义。

参考文献:

- [1] 林爱华,刘云海,林建国. 抗内毒素药物的研究进展[J]. 国外医学: 药学分册, 2001, 28(1): 23.
- [2] 韩进,郭莹,万海同. 中药生物碱类的药理作用及药代动力学研究[J]. 中华中医药学刊, 2006, 24(12): 2326-2328.
- [3] 王晓燕,李伟忠,梁磊,等. 苦参碱对小鼠免疫器官的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2545-2546.
- [4] 李林. 水苏碱的研究概况[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(3): 930-931.
- [5] Kim H S, Zhang Y H, Yun Y P. Effects of tetrandrine and fangchinoline on experimental thrombosis in mice and human platelet aggregation[J]. *Planta Med*, 1999, 65(2): 135-138.
- [6] Tsujikawa A, Kiryu J, Yamashiro K, et al. Interactions between blood cells and retinal endothelium in endotoxic spsis[J]. *Hypertension*, 2000, 36: 250-258.
- [7] 王东宁,张惟杰,吴祥甫. 抗内毒素治疗的新策略[J]. 生物工程学报, 2001, 17(3): 241.
- [8] 张艺平,韩鹏. 中药抗内毒素研究新进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(2): 122.
- [9] 魏育林,李亚俊,罗乃丹,等. 脂多糖致小鼠 SIRS 和 MODS 的研究[J]. 急诊医学, 2000, 9(6): 370-373.
- [10] 崔颖,王金兰,刘庆增. 内毒素的致病特性[J]. 天津药学, 2002, 14(5): 29.
- [11] Izzo AA, Mascolo N, Capasso F. Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 1998, 43: 5-20.
- [12] Hara T, Ando K, Tsurumi H, et al. Excessive production of tumor necrosis factor - alpha by bone marrow T lymphocytes is essential in causing bone marrow failure in patients with aplastic anemia[J]. *Eur J Haematol*, 2004, 73(1): 10-16.
- [13] 黄秀梅,李波,沈连忠,等. 四种苦豆子生物碱对巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 α 的影响[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(3): 12-14.
- [14] Dinarello C A, Cannon J G, Mier J W, et al. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1[J]. *J Clin Invest*, 1986, 77(6): 1734-1739.
- [15] 蒋建新. 细菌内毒素基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 2004: 8.