

5种马鞭草科药用植物的抗补体活性

焦 杨¹, 邹录惠¹, 邱 莉^{1,2*}, 谢云峰¹, 罗 艳¹, 谢集照¹

(¹广西医科大学药学院, 南宁 530021; ²广西高校生物分子医学研究重点实验室, 南宁 530021)

摘要 采用细胞溶血法考察了千解草(*Pygmaeopremna herbacea*)、白花灯笼(*Clerodendrum fortunatum* L.)、尖尾枫[*Callicarpa longissima*(Hemsl.) Merr.]、桢桐[*Clerodendrum japonicum*(Thunb.) Sweet]及臭茉莉(*Clerodendrum philippinum* Schauer var. *simplex* Moldenke)等5种马鞭草科药用植物提取物经典途径和旁路途径的抗补体活性。结果表明:千解草水提取物、白花灯笼水提取物和醇提取物、尖尾枫水提取物和醇提取物、桢桐醇提取物及臭茉莉醇提取物有较强的经典途径抗补体活性,对经典途径的抗补体活性(CH_{50})分别为 0.092 ± 0.008 , 0.074 ± 0.008 , 0.088 ± 0.006 , 0.134 ± 0.017 , 0.123 ± 0.010 , 0.380 ± 0.080 及 0.200 ± 0.015 g/L;仅千解草和尖尾枫水提取物及白花灯笼醇提取物具有旁路途径抗补体活性,对旁路途径的抗补体活性(AP_{50})分别为 0.533 ± 0.033 , 0.758 ± 0.031 和 0.362 ± 0.029 g/L。因此,5种植物均具有不同程度的抗补体活性,其中白花灯笼醇提取物抗补体活性最强。

关键词 马鞭草科; 白花灯笼; 桢桐; 臭茉莉; 尖尾枫; 千解草; 抗补体活性

中图分类号 R284 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2016)04–0469–05

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20160413

引用本文 焦杨, 邹录惠, 邱莉, 等. 5种马鞭草科药用植物的抗补体活性[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(4):469–473.

Cite this article as: JIAO Yang, ZOU Luhui, QIU Li, et al. Anticomplementary effects of the extracts of five Verbenaceae herbs *in vitro*[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(4):469–473.

Anticomplementary effects of the extracts of five Verbenaceae herbs *in vitro*

JIAO Yang¹, ZOU Luhui¹, QIU Li^{1,2*}, XIE Yunfeng¹, LUO Yan¹, XIE Jizhao¹

¹Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021; ²Key Laboratory of Biological Molecular Medicine Research of Guangxi High Education, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract The inhibition effects of the extracts of five Verbenaceae herbs, *Clerodendrum fortunatum* L., *Clerodendrum japonicum* (Thunb.) Sweet, *Clerodendrum philippinum* Schauer var. *simplex* Moldenke, *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr. and *Pygmaeopremna herbacea*, were investigated by cell hemolysis model *in vitro* on classical and alternative complement activation pathways. The water extracts of *Pygmaeopremna herbacea*, the water extract and the ethanol extract of *Clerodendrum fortunatum* L., the water extract and the ethanol extract of *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr., the ethanol extracts of *Clerodendrum japonicum* (Thunb.) Sweet and *Clerodendrum philippinum* Schauer var. *simplex* Moldenke showed inhibition cell hemolysis effects on the classical pathway. Their CH_{50} values were 0.092 ± 0.008 , 0.074 ± 0.008 , 0.088 ± 0.006 , 0.134 ± 0.017 , 0.123 ± 0.010 , 0.380 ± 0.080 , and 0.200 ± 0.015 g/L, respectively. The water extracts of *Pygmaeopremna herbacea* and *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr. and the ethanol extract of *Clerodendrum fortunatum* L. showed inhibition cell hemolysis effects on alternative pathway. Their AP_{50} values were 0.533 ± 0.033 , 0.758 ± 0.031 , and 0.362 ± 0.029 g/L, respectively. Five Verbenaceae herbs appear good anticomplementary effects *in vitro*. The ethanol extract of *Clerodendrum fortunatum* L. showed the best inhibitory activity.

Key words Verbenaceae; *Clerodendrum fortunatum* L.; *Clerodendrum japonicum* (Thunb.) Sweet; *Clerodendrum philippinum* Schauer var. *simplex* Moldenke; *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr.; *Pygmaeopremna*

herbacea; anticomplementary effect

This study was supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Province (No. 2013GXNSFBB053001); and the Research Foundation of Guangxi Department of Education (No. 200911MS26)

全世界有3 000余种马鞭草科(*Verbenaceae*)植物,主要分布于热带和亚热带地区,少数延至温带^[1],我国有175种31变种10变型。马鞭草科植物具有清热解毒等功效,为滇、桂、黔等少数民族地区的习用药材^[2-3],其药效及其物质基础研究甚少,有待深入开展。清热解毒是大部分马鞭草科药用植物所共有的功效,通常认为,清热解毒类中药有抗炎作用,能够改善炎症早期的毛细管通透性增加、渗出、水肿等情况,而补体系统是体内非特异性免疫系统的重要组成部分,其过度激活会引起严重的炎症反应^[4]。本研究采用细胞溶血法,考察桢桐、臭茉莉、白花灯笼、尖尾枫及千解草等5种常用的广西地产马鞭草科药用植物的抗补体活性。

1 材料

1.1 药品与试剂

Alsever液保存的绵羊红细胞、新西兰兔红细胞、豚鼠补体血清冻干粉、兔抗羊红细胞抗体(溶血素)(郑州百基生物技术有限公司);巴比妥钠、巴比妥(美国 Armsco 公司);乙二醇-双(α-氨基乙基醚)-四乙酸(EGTA)(国药集团化学试剂有限公司);肝素钠注射液(上海第一生化药业有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 试药

桢桐、臭茉莉、白花灯笼、尖尾枫及千解草等5种药材均于2014年9月采自广西壮族自治区来宾市金秀县,经广西壮族自治区食品药品检验所韦家福中药师鉴定为桢桐 *Clerodendrum japonicum* (Thunb.) Sweet、臭茉莉 *Clerodendrum philippinum* Schauer var. *simplex* Moldenke、白花灯笼 *Clerodendrum fortunatum* L.、尖尾枫 *Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr. 及千解草 *Pygmaeopremna herbacea*。

分别取各药材粗粉约50 g,加入10倍量85%乙醇回流提取3次,每次2 h,合并提取液,45 ℃旋转蒸发仪真空浓缩到少量体积后,冷冻干燥,得到桢桐醇提取物5.4 g、臭茉莉醇提取物5.8 g、白花灯笼醇提取物4.2 g、尖尾枫醇提取物4.8 g、千解草醇提取物5.1 g。

分别取各药材粗粉约50 g,加入10倍量蒸馏水回流提取3次,每次2 h,合并提取液,50 ℃旋转蒸发仪真空浓缩到少量体积后,冷冻干燥,得到桢桐水提取物6.2 g、臭茉莉水提取物7.4 g、白花灯笼水提取物6.5 g、尖尾枫水提取物7.1 g、千解草水提取物5.8 g。

1.3 仪器

FD-1A-50型冷冻干燥器(北京博医康实验仪器有限公司);Jouan MR22i型低温高速离心机(法国 Jouan 公司);Spectra Max Plus 384型连续光谱扫描式酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

2 方法

2.1 溶液的配制

巴比妥缓冲液(BBS):将巴比妥钠0.58 g溶于热水250 mL中,加入NaCl 18.5 g, MgCl₂·6H₂O 0.17 g, CaCl₂ 0.03 g 和巴比妥0.2 g,超声振荡以加速溶解,补三蒸水至1 000 mL。常温避光保存。

AP缓冲液:取0.1 mol/L EGTA溶液(分别称取EGTA 3.8 g 和 NaOH 0.7 g,溶于三蒸水100 mL中)40 mL,加入BBS 450 mL、MgCl₂·6H₂O 0.2 g,加三蒸水补足至500 mL。以1 mol/L NaOH溶液调节pH至7.5,避光保存。

2%绵羊红细胞(sheep red blood cell, SRBC):取Alsever液保存的SRBC适量,加BBS混匀,3 000 r/min离心5 min,弃上清液。洗涤至上层液清澈,沉淀即为100%的压积红细胞;取之,以BBS配制成为2% SRBC悬液,4 ℃保存。

0.5%兔红细胞(rabbit red blood cell, RRBC):取适量Alsever液保存的兔红细胞,AP缓冲液混匀后,3 000 r/min,离心10 min,洗涤至上清液无色,弃上清液,沉淀即为100%的压积红细胞,取之,以AP缓冲液配制0.5% RRBC悬液,4 ℃保存。

兔抗羊红细胞抗体(溶血素):取溶血素适量,加入BBS配制成为1:2 000溶液,4 ℃保存。

2.2 补体制备

取豚鼠血清冻干粉1支,加入BBS 1.0 mL复溶后,加入2% SRBC约0.1 mL,轻轻吹打混匀后,

3 000 r/min 离心 5 min, 用以除去豚鼠血清中可能存在的抗羊红细胞抗体, 避免实验误差^[5]。取上清液作为经典途径补体备用。

取健康成年男性志愿者(20~22岁)静脉血10 mL, 4℃放置1 h, 凝固后3 000 r/min离心5 min, 取上清液, 加入以AP稀释液洗涤后的0.5%兔红细胞约2 mL, 吹打混匀后, 3 000 r/min离心10 min, 取上清液作为旁路途径补体来源, -20℃冰冻保存备用。

2.3 供试品溶液的制备

分别称取水提取物约3 mg, BBS或AP缓冲液800 μL溶解, 作为1:1溶液(质量浓度约为3.75 g/L, 50℃水浴助溶), 加BBS或AP稀释液倍比稀释为1.875, 0.937 5, 0.468 8, 0.234 4, 0.117 2, 0.058 6, 0.029 3 g/L的水提取物溶液。

分别称取醇提取物约3 mg, 先加入DMSO 20 μL超声溶解, 再加入BBS或AP缓冲液780 μL溶解, 作为1:1溶液(质量浓度约为3.75 g/L, 50℃水浴助溶), 加BBS或AP稀释液倍比稀释为1.875, 0.937 5, 0.468 8, 0.234 4, 0.117 2, 0.058 6, 0.029 3 g/L的醇提取物溶液。

2.4 补体临界浓度测定^[6-7]

取补体(豚鼠血清)0.1 mL, 加入等量BBS稀释为1:1溶液, 并进一步稀释成1:6, 1:12, 1:20, 1:25, 1:30, 1:36, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320溶液。分别取1:2 000溶血素、2%, SRBC及各浓度补体0.1 mL溶于BBS 0.3 mL中, 混匀, 37℃水浴30 min, 4℃、5 000 r/min离心10 min。同时制备空白溶液(2% SRBC 0.1 mL溶于BBS 0.5 mL)和全溶血溶液(2% SRBC 0.1 mL溶于三蒸水0.5 mL)。每管分别取上清液0.2 mL于405 nm处测吸收度, 计算每管溶血率。以补体稀释度为X轴, 各稀释浓度补体造成的溶血百分率为Y轴作图。选择达到相似高的溶血率的最低补体浓度为经典途径临界补体浓度。

取人血清补体0.1 mL, 加入AP缓冲液配制成1:2溶液, 进一步稀释成1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256溶液。分别取0.5% RRBC 0.2 mL及各浓度补体0.15 mL溶于AP稀释液0.15 mL中, 混匀, 37℃水浴30 min, 4℃下5 000 r/min离心10 min。同时制备空白和全溶血溶液。分别取每管上清液0.2 mL于405 nm处测

吸收度, 计算溶血率。以补体稀释度为X轴, 各稀释浓度补体造成的溶血百分率为Y轴作图。选择达到相似高的溶血率的最低补体浓度为旁路途径临界补体浓度。

2.5 抗补体活性测定^[8]

取临界浓度的补体与供试品混匀, 于37℃预水浴10 min后, 按照表1加入适量BBS、溶血素和2% SRBC, 混匀, 37℃水浴30 min后, 5 000 r/min、4℃条件下离心10 min, 每管分别取上清液0.2 mL于96孔板, 405 nm处测定吸收度。由于中药提取物本身具有颜色, 且无法在实验中除去, 造成最终体系的吸收度实际是由溶血吸收度和中药提取物吸收度两部分构成。为了消除这一影响, 将不同稀释度的中药提取物与缓冲液混合, 同样水浴离心测吸收度作对照。实验同时设置补体组和全溶血组(表1)。将中药提取物组吸收度值扣除相应中药提取物对照组吸收度值后计算溶血率。以中药浓度对数值为横坐标, 溶血率作为纵坐标。计算对经典途径的抗补体活性(CH_{50})。

Table 1 Volume of components for hemolysis assay on the classical pathway (mL)

Group	BBS	dH ₂ O	Complement	Sample	Hemolysin	2% SRBC
Tested	-	-	0.2	0.2	0.1	0.1
Control	0.4	-	-	0.2	-	-
Complement	0.2	-	0.2	-	0.1	0.1
Hemolysis	-	0.5	-	-	-	0.1

SRBC: Sheep red blood cell

取临界浓度的补体与供试品混匀, 于37℃混匀预水浴10 min后, 加入0.5% RRBC。将每管置于37℃水浴30 min后5 000 r/min、4℃条件下离心10 min, 分别取每管上清液0.2 mL于96孔板, 405 nm处测定吸收度。将中药提取物组吸收度值扣除相应中药提取物对照组吸收度值后计算溶血率。以中药浓度对数值作为横坐标, 溶血率作为纵坐标作图。计算对旁路途径的抗补体活性(AP_{50})。

Table 2 Volume of components for hemolysis assay on the alternative pathway (mL)

Group	APS	dH ₂ O	Complement	Sample	RRBC
Tested	-	-	0.15	0.15	0.20
Control	0.35	-	-	0.15	-
Complement	0.15	-	0.15	-	0.20
Hemolysis	-	0.30	-	-	0.20

RRBC: Rabbit red blood cell

3 結果

3.1 补体临界浓度的确定

在经典途径补体稀释浓度为 1:3 ~ 1:25 时, 溶血率接近 100%, 体系基本达到溶血(图 1)。为确保体系能够全部溶血和提高药物筛选时方法的灵敏度, 所以选择 1:25 稀释的豚鼠血清作为如下经典途径筛选实验中所使用的补体浓度。

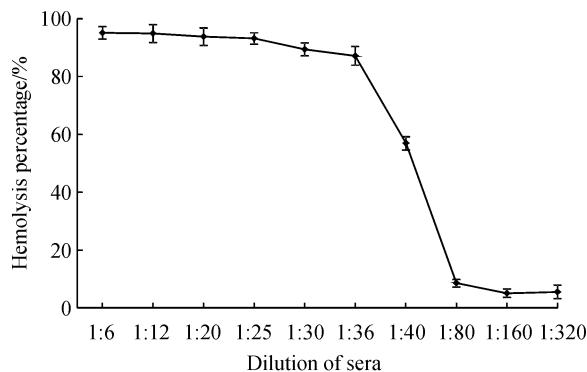


Figure 1 Hemolysis capacities of the different dilutions of sera of guinea pig on the classical pathway ($\bar{x} \pm s, n=3$)

在旁路途径补体稀释浓度为 1:2 ~ 1:8 时, 溶血率接近 100%, 体系基本达到溶血(图 2)。为确保体系能够全部溶血和提高药物筛选时方法的灵敏度, 所以选择 1:8 稀释的人体彩清作为以下旁路途径筛选实验中所使用的补体浓度。

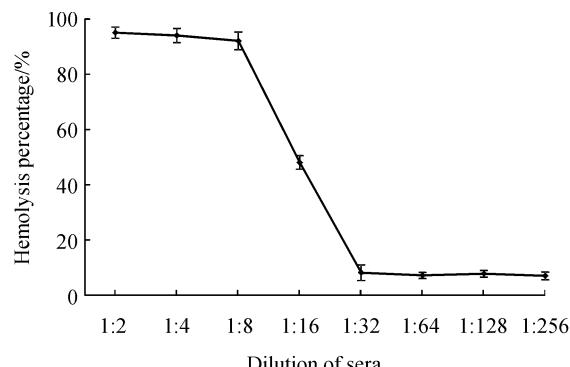


Figure 2 Hemolysis capacities of the different dilutions of sera of human on the alternative pathway ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 抗补体活性测试结果

如图 3、4 所示, 5 种马鞭草科植物及不同提取方式抗补体活性均有较大差异。大部分提取物在经典途径均有较强的抑制溶血作用; 但只有千解草和尖尾枫水提取物及白花灯笼醇提取物在旁路途

径具有抑制溶血作用(表 3)。

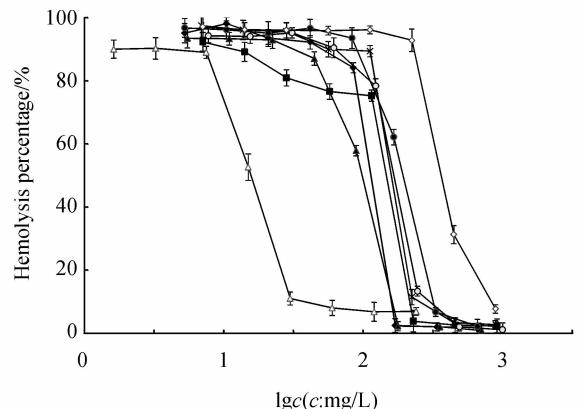


Figure 3 Anti-complementary activities on the classical pathway of five herbs and heparin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

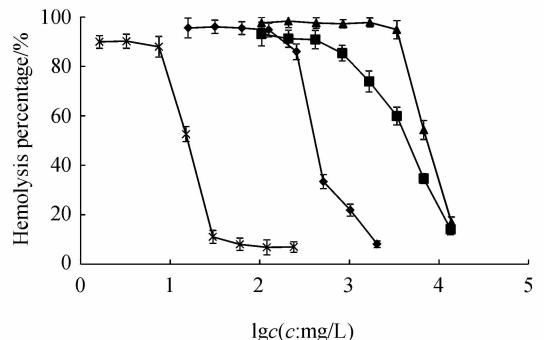


Figure 4 Anticomplementary activities on the alternative pathway of three herbs and heparin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Anticomplementary activities of the extracts from five Verbenaceae herbs *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Sample	CH_{50} / (g/L)	AP_{50} / (g/L)
Ethanol extract of <i>Pygmaeopremna herbacea</i>	>0.89	>2.02
Water extract of <i>Pygmaeopremna herbacea</i>	0.092 ± 0.008	0.533 ± 0.033
Ethanol extract of <i>Clerodendrum fortunatum</i>	0.088 ± 0.006	0.362 ± 0.029
Water extract of <i>Clerodendrum fortunatum</i>	0.074 ± 0.003	>1.35
Ethanol extract of <i>Callicarpa longissima</i>	0.123 ± 0.010	>1.45
Water extract of <i>Callicarpa longissima</i>	0.134 ± 0.017	0.758 ± 0.031
Ethanol extract of <i>Clerodendrum japonicum</i>	0.38 ± 0.08	>1.43
Water extract of <i>Clerodendrum japonicum</i>	>0.67	>1.58
Ethanol extract of <i>C. philippinum</i>	0.20 ± 0.05	>1.65
Water extract of <i>C. philippinum</i>	>0.65	>1.37
Heparin	0.019 ± 0.003	0.015 ± 0.002

4 讨 论

补体系统在机体抗感染第一线防御中起重要作用,正常激活能够消灭外来微生物,清除体内损伤或死亡的细胞和组织,对机体有保护作用;但过度激活则不仅消耗大量补体成分,使机体抗感染能力下降,而且在激活过程中产生了大量细胞活性物质,启动炎症级联放大反应,使机体发生剧烈的炎症反应甚至造成组织损伤,引起病理改变^[9]。

近年来,相关研究者利用细胞溶血法筛选了鱼腥草^[10]、半枝莲^[11]、野马追^[12]等具有清热解毒作用中药的抗补体活性,结果显示大部分清热解毒类中药具有显著的抗补体活性,其清热解毒的功效与其补体抑制活性密切相关。这一事实提示清热解毒类中药极有可能是通过免疫系统发挥其药效,深入的化学成分研究表明黄酮类、多糖类成分是清热解毒类中药的主要药效物质基础^[10-11,13-14]。

补体的活化过程表现为一系列丝氨酸蛋白酶的级联酶解反应。由抗原-抗体复合物结合C1q启动补体激活的途径称为经典途径。由病原微生物(包括真菌、细菌、病毒感染细胞等)提供接触表面直接激活C3,在B、D和P因子参与下,形成C5~C9膜攻击复合体的活化过程为旁路途径,不需要抗体及可被激活。正常激活的补体系统具有免疫调节作用,但是在病理状态下,补体被过度激活,可引起补体功能紊乱,从而导致机体产生自身免疫疾病,包括类风湿性关节炎、哮喘、红斑狼疮等^[15-16]。因此此类疾病常以补体活性的变化作为一项重要的指标。

在本研究工作中,5种马鞭草科植物提取物在经典途径和旁路途径均表现出不同程度的抗补体活性。千解草水提取物、白花灯笼水提取物和醇提取物、尖尾枫水提取物和醇提取物、桢桐醇提取物及臭茉莉醇提取物有较强的经典途径抗补体活性,但仅千解草和尖尾枫水提取物及白花灯笼醇提取物具有旁路途径抗补体活性,由此推测千解草和尖尾枫的水提取物及白花灯笼醇的提取物不仅可以有效抑制由抗原(antigen)-抗体(IgG, IgM)复合物激活导致的补体系统紊乱,也可在抗体产生之前的感染早期或初次感染即可发挥作用。研究结果提示,上述5种马鞭草科药用植物的化学成分值得进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] China Flora editors' committee of CAS. *Flora Republicae Popularis Sinicae*(中国植物志)[M]. Beijing: Science Press, 1982, 65(1):1.
- [2] Jia MR, Li XW. *Chinese Folk Medicine*(中国民族药志要)[M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Publishing House, 2005.
- [3] Dai B. *Modern Chinese Yao Medicine*(中国现代瑶药)[M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 2008.
- [4] Wei W, Li XH, Zhang HQ, et al. *Inflammatory Immune Pharmacology*(抗炎免疫药理学)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005:21.
- [5] Cao LY, Liang RY, Pan XH, et al. Methods of avoiding hemolysis in preparing serum complements of guinea pigs[J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*(广州中医药大学学报), 2005, 22(4): 327~328.
- [6] Zhu HW. Anti-complementary constituents of *Eucommia ulmoides* and *Arnebia euchroma*(杜仲和新疆紫草的抗补体活性研究成分)[D]. Shanghai: Fudan University, 2008.
- [7] Ni FY. Studies on anti-complement activity constituents of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor(高山红景天抗补体活性研究)[D]. Suzhou: Soochow University, 2013.
- [8] Guo L. Effect of *Bupleurum smithii* on complement and rat acute lung injury(柴胡对补体和大鼠急性肺损伤的作用)[D]. Shanghai: Fudan University, 2008.
- [9] Morgan BP. *Measurement of Complement Hemolytic Activity, Generation of Complement Depleted sera, and Production of Hemolytic Intermediates. Complement Methods and Protocols*[M]. Canada: Humana Press Inc, 2000:61~72.
- [10] Jiang Y, Lu Y, Zhang YY, et al. The anti-complementing ingredient and pharmacological effects of *Houttuynia* [C]. //The 10th national conference on medicinal plants and phytomedicines(第十届全国药用植物及植物药学术研讨会), 2011.
- [11] Wu Y, Wei HP, Wang JP. Anti-complement activity of polysaccharide B3-PS2 purified from *Herba Scutellariae Barbatae* [J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2009, 44(6): 615~619.
- [12] Zhu CJ. Study on the protective effect of *Rabdosia japonica* var. *glauccocalyx* (Maxim.) Hara and *Eupatorium lindleyanum* DC. On lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice(蓝萼香茶菜和野马追对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用)[D]. Suzhou: Soochow University, 2014.
- [13] Wu SQ. Studies on the constituents from *Eupatorium lindleyanum* DC. (野马追的化学成分研究)[D]. Suzhou: Soochow University, 2012.
- [14] Chai XY, Wang L, Song Y, et al. Study on the flavonoids from *Lonicera confusa* DC. [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2004, 34(4): 299~304.
- [15] Lustep HL, Clark WM. Current status of neuroprotective agents in the treatment of acute ischemic stroke[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2001, 1:13~18.
- [16] Rabinovici R, Yeh CG, Hillegass LM, et al. Role of complement in endotoxin/platelet-activating factor-induced lung injury[J]. *J Immunol*, 1992, 149: 1744~1750.