

僵蚕单体化合物抗惊厥活性

郭晓恒^{1*}, 严铸云², 刘涛¹, 宋登敏¹, 李晓华²

(1. 成都大学医护学院, 成都 610106; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 610075)

[摘要] 目的: 对僵蚕抗惊厥活性部位分离鉴定的 β -谷甾醇、麦角甾-6,22-二烯-3 β ,5 α ,8 α -三醇及白僵菌素 3 个单体活性成分的抗惊厥活性筛选, 为僵蚕质量标准提供体现中医药特色的内在指标成分。方法: 根据僵蚕祛风定惊的功效, 以苯巴比妥药物为阳性对照, 5%吐温-80 为空白对照, 对分离得到的 3 个单体成分, 以高剂量(250 mg·kg⁻¹)和低剂量(125 mg·kg⁻¹)连续 3 d sc 给药, 于最后 1 次给药 30 min 后 sc 尼可刹米(750 mg·kg⁻¹)及异烟肼(300 mg·kg⁻¹)2 种药物所致的动物惊厥进行抗惊厥活性筛选。结果: 晶 I (β -谷甾醇)对 2 种惊厥模型惊厥潜伏期无明显作用; 晶 II (麦角甾-6,22-二烯-3 β ,5 α ,8 α -三醇)250 mg·kg⁻¹对尼可刹米所致小鼠惊厥的出现时间均有延长作用, 而其低剂量组对异烟肼所致小鼠死亡时间有加速作用; 晶 III (白僵菌素)125 mg·kg⁻¹组对尼可刹米所致小鼠惊厥的出现时间均有延长作用, 而 250 mg·kg⁻¹组对异烟肼所致小鼠死亡时间有延长作用。结论: 晶 III (白僵菌素)具有抗惊厥活性可作为僵蚕质量控制的指标性成分。

[关键词] 僵蚕; 抗惊厥; 白僵菌素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0248-03

[doi] 10.11653/syfy2013170248

Anticonvulsive Activity of Three Compounds Isolated from *Beauveria bassiana*

GUO Xiao-heng^{1*}, YAN Zhu-yun², LIU Tao¹, SONG Deng-min¹, LI Xiao-hua²

(1. Medical and Nursing School of Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. Pharmacy College of Traditional Chinese Medicine of Chengdu University, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To screen anticonvulsive activity of compounds isolated from *Beauveria bassiana*. **Method:** Two anticonvulsive models induced by nikethamide (750 mg·kg⁻¹, sc) and isoniazid (300 mg·kg⁻¹, sc) were used to test the three compounds (β -sitosterol; ergosta-6, 22-diene-3 β , 5 α , 8 α -triol; beauvericin) isolated from *B. bassiana*. After 3 days of subcutaneous injection of the three compounds, nikethamide (750 mg·kg⁻¹, sc) and isoniazid (300 mg·kg⁻¹, sc) were injected after 30 minutes of the end administration. **Result:** Compound I (β -sitosterol), had no significantly effect on the two models; high-dose of compound II (ergosta-6, 22-diene-3 β , 5 α , 8 α -triol, 250 mg·kg⁻¹) prolonged the latent time of convulsions induced by nikethamide while low-level (beauvericin 125 mg·kg⁻¹) increased the death time induced by isoniazid; low-level of compound III (beauvericin, 125 mg·kg⁻¹) prolonged the latent time of convulsions induced by nikethamide and high-level (250 mg·kg⁻¹) prolonged the death time induced by isoniazid. **Conclusion:** Compound III (beauvericin) has anticonvulsant activity, can be as a quality control index component of *B. bassiana*.

[Key words] *Beauveria bassiana*; anticonvulsive; beauvericin

僵蚕来源于蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染(或人工接种)白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥

体。具有祛风定惊,化痰散结的功效。在前期对僵蚕抗惊厥活性的研究中分离得到 5 种单体成分,为了进一步追踪其抗惊厥活性成分,便于后继僵蚕药

[收稿日期] 20130223(004)

[基金项目] 四川省中医药管理局重点资助项目(2003A07)

[通讯作者] * 郭晓恒, 讲师, 中药学博士, 从事中药品质研究, Tel.: 028-84814359, E-mail: guohengcd@163.com

材的开发利用以及质量控制,本文对氯仿活性部位分离得到的3个主要单体化学成分进行了抗惊厥活性的研究,为建立体现中医药特点的僵蚕内在质量评价标准提供基础。

1 材料

1.1 试剂与试药 聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(吐温-80),苯巴比妥钠(南通制药总厂,批号010513-1),尼可刹米注射液(西南药业股份有限公司,批号020901),异烟肼注射液(西南药业股份有限公司,批号66040004)。

1.2 动物 昆明种小鼠,体重18~22 g,雌雄各半,均由四川省医学科学院实验动物中心提供。许可证号SCXK(川)2012-15。

1.3 供试药液的制备 将分得的单体化合物分别为 β -谷甾醇(晶I),麦角甾-6,22-二烯-3 β ,5 α ,8 α -三醇(晶II),白僵菌素(晶III),纯度均在98%以上,均为本实验室分离。各加5%吐温-80增溶,分别制成2种不同浓度的注射液,质量浓度分别为10,5 g·L⁻¹。

2 方法

2.1 模型建立^[1-3] 分别取健康昆明种小鼠相应的数量,各随机分成8组,雌雄各半。分别为空白对照组,阳性对照组,晶I低、高剂量组,晶II低、高剂量组,晶III低、高剂量组。

2.1.1 尼可刹米致惊厥模型:各组给药连续3 d sc给药,于最后1次给药30 min后,各组小鼠分别sc

尼可刹米750 mg·kg⁻¹,以动物出现阵挛性惊厥为指标,观察小鼠惊厥出现的潜伏时间,记录小鼠惊厥出现的潜伏时间,各组发生惊厥的动物数及死亡数。

2.1.2 异烟肼致惊厥模型 各给药组连续3 d sc给药,于最后1次给药60 min后,皮下注射异烟肼300 mg·kg⁻¹,以动物出现紧张性伸肌惊厥为指标,记录给药后120 min内,小鼠阵挛性和强直性惊厥的发作时间,发作次数,小鼠死亡时间及死亡数。

2.2 给药方法 各低剂量组分别sc质量浓度为5 g·L⁻¹的对应供试药液25 mL·kg⁻¹,相当于125 mg·kg⁻¹单体化合物;各高剂量组分别以10 g·L⁻¹的对应供试药液25 mL·kg⁻¹sc,相当于250 mg·kg⁻¹单体化合物;阳性对照组苯巴比妥钠200 mg·kg⁻¹sc,空白对照组等体积5%吐温-80溶液sc。

2.3 统计学处理 所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用SPSS 11.0统计软件中ANOVA方法进行统计。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对尼可刹米诱发小鼠惊厥的影响 惊厥发作时小鼠表现焦躁,具有攻击性或者反应迟钝,不规则呼吸等。与模型组比较晶II高剂量组和晶III低剂量组对尼可刹米诱发惊厥的出现时间有延长作用($P < 0.05$)。化合物I与对照组比较没有统计学差异。见表1。

表1 皮下注射3种化合物对尼可刹米致小鼠惊厥的影响($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	惊厥潜伏期/min	惊厥数/只	死亡数/只
模型	-	5.11 ± 2.02	16	16
苯巴比妥钠	200	30.00 ± 0.00 ²⁾	0	0
β -谷甾醇	125	6.13 ± 0.99	16	16
	250	6.61 ± 2.90	16	16
麦角甾-6,22-二烯-3 β ,5 α ,8 α -三醇	125	5.50 ± 2.25	16	16
	250	7.96 ± 3.65 ¹⁾	16	16
白僵菌素	125	7.15 ± 2.62 ¹⁾	16	16
	250	6.03 ± 2.19	16	16

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.2 对异烟肼诱发小鼠惊厥的影响 与模型组比较晶III高剂量组、对异烟肼所致小鼠惊厥的死亡有延长作用。对于小鼠死亡时间,晶II低剂量组与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$);晶III高剂量组与模型组比较有极显著性差异($P < 0.01$)。晶I与模型组比较没有统计学差异。见表2。

3.3 3种晶体2个剂量水平间表现有差异性晶II和晶III低剂量组和高剂量组在尼可刹米诱导惊厥模型上表现各异。晶II高剂量有显著作用,而低剂量则无效;晶III则反应刚好相反。对异烟肼诱导的惊厥模型中,晶II低剂量较高剂量组在死亡潜伏期有统计意义,晶III高剂量较低剂量组在惊厥潜伏期及

表 2 皮下注射 3 种单体化合物对异烟肼致小鼠惊厥的影响($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	惊厥潜伏期/min	死亡潜伏期/min	死亡数/只
5% 吐温-80	-	38.37 ± 8.28	69.48 ± 24.61	13
苯巴比妥钠	200	88.62 ± 22.05 ²⁾	-	0
β-谷甾醇	125	40.16 ± 7.97	57.51 ± 18.43	16
	250	42.19 ± 17.02	61.14 ± 21.52	16
麦角甾-6,22-二烯-3β,5α,8α-三醇	125	38.35 ± 6.53	51.52 ± 18.42 ¹⁾	16
	250	38.73 ± 8.59	60.91 ± 15.50	16
白僵菌素	125	36.00 ± 6.00	69.55 ± 26.90	12
	250	45.05 ± 8.93 ¹⁾	97.95 ± 24.65 ²⁾	8

死亡潜伏期表现各异。

4 讨论

有研究者认为僵蚕及僵蛹中草酸铵是其抗惊厥作用的主要成分,对癫痫大发作有效,除去草酸铵则抗惊厥作用消失^[4]。但由于草酸铵的专属性不强,不易作为对僵蚕质量评价指标。在晶体抗惊厥试验中,课题组对分离得到 5 个晶体成分中的 3 个晶体做了抗惊厥实验,考虑僵蚕成分的多样性,应当设立活性部位的药效比较和混合晶体成分的药效学比较,由于各晶体成分在混合物中的比例难以确定,需在后继的研究中摸索探讨。

晶体 I (β-谷甾醇)对两种惊厥模型无明显作用。也是植物中特别是禾本植物中广泛存在的一类化合物,抗惊厥作用不明显,在鉴定药材中专属性不强。晶 II (麦角甾-6,22-二烯-3β,5α,8α-三醇)高剂量组对尼可刹米所致小鼠惊厥的出现时间均有延长作用而其低剂量组对异烟肼所致小鼠死亡时间有加速作用。麦角甾醇在灵芝^[5]、茯苓^[6]、桦黄^[7]、竹黄^[8]等菌物药及冬虫夏草^[9]中都有存在,并具有抑制肝癌细胞 HepG2 增殖及 p21 表达^[10],能够提高家蚕的生存率及耐饥饿能力^[11]。对抗惊厥作用的研究还不曾报道,与本试验结果基本吻合,高剂量能延长抗惊厥时间而低剂量则导致副作用。在晶 II 和晶 III 对 2 个不同药物诱导的惊厥模型,不同剂量间表现各异。建议在僵蚕资源开发中深入研究^[12]。

晶 III (白僵菌素)低剂量组对尼可刹米所致小鼠惊厥的出现时间均有延长作用而其高剂量组对异烟肼所致小鼠死亡时间有延长作用。表明晶 III 为僵蚕抗惊厥有效成分;白僵菌素为环萜肽类,文献报道^[12]具有抑菌活性,结合僵蚕的其他功效我们选择白僵菌素为其质量控制的指标性成分。

[参考文献]

[1] 张信岳,王国康,郑高利,等. 克比奇胶囊解热、镇静和抗惊厥作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2003,10(3):144.

[2] H G 沃格尔, W H 沃格尔, 著. 杜冠华, 李学军, 译. 药理学实验指南——新药发现和药理学评价[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 300, 302.

[3] 杨果美, 张香蓉. 利多卡因对四种惊厥的影响[J]. 南昌大学学报: 理科版, 1995, 19(3): 210.

[4] 李国均. 中国药材学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 1997.

[5] 陈路林, 李吉来, 宁德山, 等. 灵芝孢子油中麦角甾醇含量测定方法研究[J]. 中药材, 2008, 31(12): 1843.

[6] 王帅, 姜艳艳, 朱乃亮, 等. 茯苓化学成分分离与结构鉴定[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(12): 841.

[7] 张国跃, 乔蓉霞, 郭耀武, 等. 反相 HPLC 法测定陕西民间习用药材桦黄中麦角甾醇的含量[J]. 安徽医药, 2011, 15(11): 1360.

[8] 刘雅峰, 潘勤. 真菌竹黄中的过氧麦角甾醇的分离[J]. 天津中医学院学报, 2004, 23(1): 15.

[9] 石岩, 肖新月, 程显隆, 等. 冬虫夏草中游离麦角甾醇的研究[J]. 中药研究与信息, 2012(7): 15.

[10] 张娴, 黄羽, 曾星. 麦角甾醇对肝癌细胞 HepG2 增殖及 p21 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2011(5): 26.

[11] 李寒冰, 孙静雅, 马永洁, 等. 火麻仁油及甾醇对家蚕寿命影响的观察[J]. 中医学报, 2012, 27(9): 1145.

[12] 赫英伟. 白僵菌的研究概况[J]. 黑龙江农业科学, 2010(4): 145.

[13] 殷志琦, 叶文才, 赵守训. 僵蚕的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(1): 52.

[责任编辑 聂淑琴]