

# 半枝莲多糖抗补体活性研究

吴彦\*, 吴甘霖

(安庆师范学院生命科学系, 安徽 安庆 246011)

[摘要] 目的: 研究半枝莲多糖的抗补体活性。方法: 采用细胞溶血法。结果: 半枝莲多糖抑制补体活性的经典途径和旁路途径的  $CH_{50}$  为  $(1.2 \pm 0.1) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $AP_{50}$  为  $(4.9 \pm 0.2) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论: 半枝莲多糖有较好的抗补体活性。

[关键词] 半枝莲; 多糖; 抗补体

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)05-0049-04

## Studies on Anti-complementary Activity of the Polysacchride from *Herba Scutellariae Barbatae*

WU Yan\*, WU Gan-ling

(The Life Science Dept. of Anqing Normal College, Anqing 246011, China)

[Abstract] **Objective:** To study anti-complementary effects of the polysacchride obtained from *Herba Scutellariae Barbatae*. **Methods:** The polysacchride was extracted and analyzed with the hemolysis assay. **Results:** The polysaccharide inhibited complement activation on both the classic and alternative pathways with  $CH_{50}$  value of  $(1.2 \pm 0.1) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $AP_{50}$  value of  $(4.9 \pm 0.2) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . **Conclusions:** The polysacchride obtained from *Herba Scutellariae Barbatae* shows significant inhibitory effect on complement activation.

[Key words] *Herba Scutellariae Barbatae*; polysacchride; anti-complement

半枝莲为唇形科植物半枝莲(*Scutellaria barbata* D. Don)的干燥全草<sup>[1]</sup>, 主要含有生物碱、黄酮甙、酚类、多糖等有效活性成分, 具有清热解毒、化痰利尿、止血定痛等功效。用于治疗癌症、肝炎、咽喉肿痛等疾病。

补体系统是人体重要的免疫防御系统之一, 在消灭外来微生物、维持机体的平衡等生理过程中起着重要作用。然而该系统的过度激活会引发类风湿性关节炎、老年性痴呆、急性呼吸窘迫综合征以及系

统性红斑狼疮等多种疾病。目前对此类疾病尚无理想的治疗药物。

半枝莲多糖具有很强的抗病原微生物、免疫增强和解热的活性<sup>[2]</sup>。本文对半枝莲的活性多糖成分进行了抗补体研究, 为找到较好的抗补体天然药物打下良好基础。

### 1 实验材料

**1.1 药物** 半枝莲 1 kg 购自上海汇丰大药房, 经安庆师范学院吴甘霖副教授鉴定。半枝莲粉碎后以乙醇渗漉提取, 药渣晾干后沸水煮 3 次, 将每次母液合并浓缩, 三氯醋酸在 4 °C 下脱蛋白; 离心, 上清液 NaOH 中和, 流水透析 2 d; 再浓缩, 乙醇沉淀; 沉淀冷冻干燥得粗多糖<sup>[3]</sup>。将制得的粗多糖溶于水, 利用苯酚-硫酸法测定多糖含量为 3.7%<sup>[4]</sup>。

**1.2 试剂** 95% 乙醇、NaOH、丙酮、乙醚、苯酚、硫酸、 $\alpha$ -萘酚、三氯醋酸、巴比妥钠、巴比妥、NaCl、

[收稿日期] 2008-10-13

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学重点研究项目(KJ2007A123ZC); 安徽省高等学校青年教师科研资助项目(2005jq1115)

[通讯作者] \* 吴彦, Tel: (0556) 5501251; E-mail: sportman821@sina.com

MgCl<sub>2</sub> · CaCl<sub>2</sub> EGTA, 枸橼酸钠等均为分析纯。

**1.3 设备** EYELA-RE-2000A 型旋转蒸发器(东京理化 EYELA 公司, 日本); Jouan MR22i 型低温高速离心机(JOUAN 公司, 法国); Well scan MK3 型酶标仪(Thermo LabSystems 公司, 芬兰); WMZK 8002 型恒温振荡器(上海医用仪器厂); Freezedryer18 型冷冻干燥器(Labconco 公司, 美国)。

**1.4 动物** 豚鼠(200~ 250 g), 新西兰兔(2.5~ 3.0 kg), 雌雄不限, 复旦大学实验动物部提供, 合格证编号分别为 SCXK 沪 2007-1039 和 SCXK 沪 2007-2057。

## 2 实验方法

### 2.1 补体经典途径的溶血活性(CH<sub>50</sub>)测定<sup>[5]</sup>

**2.1.1 溶液配制** 先配制出 5 倍浓缩巴比妥缓冲液(5 × BBS)。使用时稀释成巴比妥缓冲液(BBS)。2% 羊红细胞(SRBC): 取绵羊血 2 mL, 用 BBS 洗涤, 800 r·min<sup>-1</sup>, 离心 3 min, 重复 3 次后, 再 3000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 压积, 然后用 BBS 配成 2% SRBC。1: 1 000 溶血素: 用 BBS 配制成 1: 1 000 溶血素溶液。半枝莲溶液: 称取半枝莲粗多糖 4 mg, 用 BBS 超声溶解成 1: 1 溶液(5 mg·mL<sup>-1</sup>), 加 BBS 对倍稀释配成 1: 2 : 1: 4 : 1: 8 : 1: 16 : 1: 32 : 1: 64 : 1: 128 共 8 个浓度的供试品溶液。

**2.1.2 补体制备及效价测定** 豚鼠股动脉取血约 10 mL, 4 °C 放置 1 h 凝固后, 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取血清, 加入以 BBS 洗涤后的 2% SRBC 约 2 mL, 混匀后, 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清作为补体分装, - 70 °C 冷冻保存备用。

补体经典溶血系统的建立: 取补体(豚鼠血清) 0.1 mL, 加入 BBS 配制成 1: 10 溶液, 用 BBS 对倍稀释成 1: 20 : 1: 40 : 1: 80 : 1: 160 : 1: 320 : 1: 640 和 1: 1 280 溶液。取 1: 1 000 溶血素、各浓度补体及 2% SRBC 各 0.1 mL 溶于 0.3 mL BBS 中, 混匀, 37 °C 水浴 30 min 后, 在 5 000 r·min<sup>-1</sup> 4 °C 条件下离心 10 min。分别取上清 0.2 mL, 在 405 nm 测定吸光度。实验同时设置全溶血组(0.1 mL 2% SRBC 溶于 0.5 mL 三蒸水中)。以三蒸水溶血管的吸光度作为全溶血标准, 计算溶血率。以补体稀释度为 X 轴, 溶血百分率为 Y 轴作图。选择达到高溶血率的最低补体浓度作为确保体系能正常溶血所需的临界补体浓度。

**2.1.3 药物经典途径抗补体活性测定** 取确定的临界浓度的补体与供试品混匀, 按照表 1 加入适量 BBS、溶血素和 2% SRBC。37 °C 水浴 30 min 后,

5 000 r·min<sup>-1</sup> 4 °C 条件下离心 10 min 后分别取每管上清 0.2 mL, 用酶标仪在 405 nm 下测定吸光度。实验同时设置多糖对照组、补体组和全溶血组。以供试品浓度作为 X 轴, 溶血抑制率作为 Y 轴作图, 计算 CH<sub>50</sub> 值。

表 1 补体经典途径溶血实验中所加各成分的体积(mL)

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

分组	BBS	三蒸水	补体	半枝莲多糖	溶血素	2% SRBC
多糖测定组	0.2	—	0.1	0.1	0.1	0.1
多糖对照组	0.5	—	—	0.1	—	—
补体组	0.3	—	0.1	—	0.1	0.1
全溶血组	—	0.5	—	—	—	0.1

### 2.2 补体旁路途径的溶血活性(AP<sub>50</sub>)测定<sup>[6]</sup>

**2.2.1 溶液配制** 0.1 mol·L<sup>-1</sup> EGTA: NaOH 3.5 g 溶于 85 mL 蒸馏水中, 加入 EGTA 19 g, 补足蒸馏水至 500 mL。AP 稀释液: 0.1 mol·L<sup>-1</sup> EGTA 80 mL, BBS 180 mL, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.41 g, 加蒸馏水补足至 1000 mL。以 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调 pH 至 7.5。0.5% 兔红细胞(RE): 新西兰兔麻醉, 颈总动脉插管放血, 取兔血 2 mL, 用 AP 稀释液洗涤, 800 r·min<sup>-1</sup>, 离心 3 min。重复 3 次, 再加入 AP 稀释液至 10 mL, 混匀, 离心压积后用 AP 稀释液配制成 0.5% RE 悬液。半枝莲溶液: 称取半枝莲粗多糖 5 mg, 用 AP 稀释液超声溶解为 1: 1 溶液(6.25 mg·mL<sup>-1</sup>), 加 AP 稀释液对倍稀释配成 1: 2 : 1: 4 : 1: 8 : 1: 16 : 1: 32 : 1: 64 : 1: 128 共 8 个浓度的供试品溶液。

**2.2.2 补体制备及效价测定** 取健康成年男性静脉约 10 mL, 4 °C 放置 1 h 后, 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取血清, 加入 0.5% RA 约 2 mL, 吹打混匀后, 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清为补体, 分装, - 70 °C 冷冻保存备用。

补体旁路溶血系统的建立: 取补体(人血清) 0.2 mL, 用 AP 稀释液配制成 1: 5 稀释溶液, 并对倍稀释成 1: 10 : 1: 20 : 1: 40 : 1: 80 : 1: 160 : 1: 320 和 1: 640 溶液。取各浓度补体 0.15 mL、AP 稀释液 0.15 mL 及 0.5% RE 0.20 mL, 混匀, 37 °C 水浴 30 min 后, 在 5 000 rpm 4 °C 下离心 10 min。分别取每管上清 0.2 mL, 在 405 nm 测定吸光度。实验同时设置全溶血组(0.20 mL 0.5% RE 溶于 0.3 mL 三蒸水中)。以补体稀释度为 X 轴, 溶血百分率为 Y 轴作图。选择达到高溶血率的最低补体浓度作为临界补体浓度。

**2.2.3 药物旁路途径抗补体活性测定** 取确定的临界浓度的补体与供试品混匀,按照表 2 加入适量 0.5% RE。37℃水浴 30 min, 5 000 r·min<sup>-1</sup>, 4℃离心 10 min 后分别取每管上清 0.2 mL, 在 405 nm 下测定吸光度。实验同时设置多糖对照组、补体组和全溶血组。以被试物浓度作为 X 轴, 溶血抑制率作为 Y 轴作图, 计算 AP<sub>50</sub> 值。

表 2 补体旁路途径溶血实验中所加各成分的体积(mL)

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

分组	AP 稀释液	三蒸水	补体	半枝莲多糖	0.5% RE
多糖测定组	—	—	0.15	0.15	0.2
多糖对照组	0.35	—	—	0.15	—
补体组	0.15	—	0.15	—	0.2
全溶血组	—	0.3	—	—	0.2

### 3 实验结果

**3.1 经典途径** 5 批次不同稀释倍数豚鼠血清(补体)加入溶血体系中, 评价其效价。在补体稀释浓度为 1:10~1:80 时, 溶血率接近 100%, 体系基本达到全溶血, 所以选择 1:80 稀释的豚鼠血清作为以下经典途径筛选实验中所使用的补体, 见图 1。

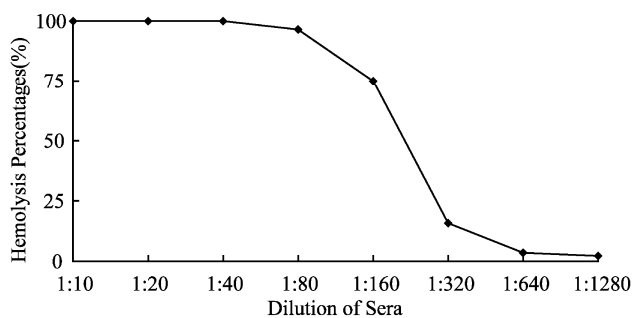


图 1 经典途径不同稀释度的豚鼠血清的效价(% , n=5)

Fig. 1 The hemolysis capacities of the different dilutions of sera of guinea pig on the classic pathway(% , n=5)

半枝莲多糖经典途径的抗补体活性 CH<sub>50</sub> 为(1.2 ±0.1) mg·mL<sup>-1</sup>, 见图 2。

**3.2 旁路途径** 5 批次不同稀释倍数人血清(补体)加入溶血体系中, 评价其效价。在补体稀释浓度为 1:5 和 1:10 时, 溶血率分别为(98.2 ±1.3)% 和(95.2 ±3.1)%, 体系基本达到全溶血。所以选择补体 1:10 稀释浓度人血清作为以下旁路途径筛选药物所使用补体, 见图 3。

半枝莲多糖旁路途径的抗补体活性 AP<sub>50</sub> 为 4.9 ±0.2 mg·mL<sup>-1</sup>, 见图 4。

### 4 讨论

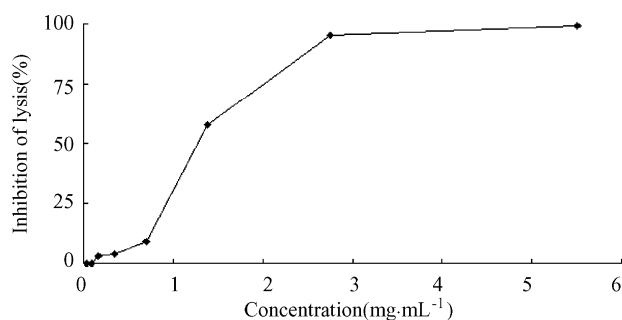


图 2 半枝莲多糖经典途径的抗补体活性

Fig. 2 Anti-complementary activity on the classic pathway of the polysaccharides from Herba Scutellariae Barbatae

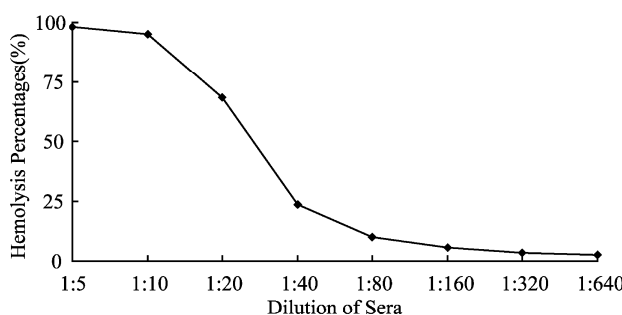


图 3 旁路途径不同稀释度的人血清的效价(% , n=5)

Fig. 3 The hemolysis capacities of the different dilutions of human sera on the alternative pathway(% , n=5)

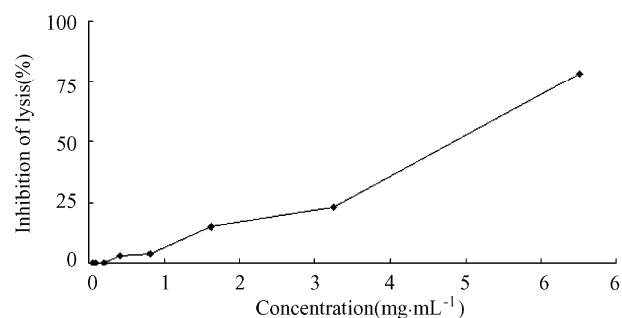


图 4 半枝莲多糖旁路途径的抗补体活性

Fig. 4 Anti-complementary activity on the alternative pathway of the polysaccharides from Herba Scutellariae Barbatae

细胞溶血法测总补体的水平在经典途径主要反映的是补体 C1~C9 的水平。而在旁路途径主要反映的是 C3、C5~C9、P 因子、D 因子、B 因子等成分的水平。该法简便快速, 但因补体(血清)浓度的不同, 会导致同一样品出现不同的 CH<sub>50</sub> 和 AP<sub>50</sub> 值。虽然此方法存在缺陷, 但仍能提供重要的信息, 而且也是目前临床和实验室常用的、唯一的、简便有效的测定总补体活性的方法<sup>[7]</sup>。

麻黄的抗补体作用已得到国内外学者的认可<sup>[8]</sup>, 但麻黄因有损害人体心脏、血管和肝脏等器官的副作用而遭到美国等西方国家对含有麻黄的药品的全面禁售。本次实验设置平行组, 以麻黄为对照。

麻黄  $CH_{50}$  和  $AP_{50}$  值分别为  $0.9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。可以看出,虽然半枝莲多糖的旁路途径抗补体活性较差,但经典途径的  $CH_{50}$  值略大于麻黄,活性较好。半枝莲作为一种常见中药,本文的结果为进一步研究半枝莲抗补体作用打下基础。

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 77-78.
- [ 2 ] 邹箴蕾, 吴启南. 半枝莲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 149-150.
- [ 3 ] 崔亦华, 崔英德, 易国斌. 应用广泛的天然多糖及其提取方法[J]. 广州化工, 2002, 30(3): 7-9.
- [ 4 ] 钱 和, 张 添, 刘长虹. 改进苯酚-硫酸法测定芦荟多糖含量[J]. 江苏食品与发酵, 2002(2): 3-6.
- [ 5 ] Han Xu, Yunyi Zhang, Jianwen Zhang, *et al.* Isolation and

characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii* [ J ]. International Immunopharmacology, 2007, 7(2): 175-182.

- [ 6 ] Klerx JP, Beukelman CJ, Van DH, *et al.* Microassay for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum[ J ]. J Immunol Methods, 1983, 63(2): 215-220.
- [ 7 ] Morgan BP, Measurement of complement hemolytic activity, generation of complement-depleted sera, and production of hemolytic intermediates. Morgen BP, editor. Complement methods and protocols[ M ]. Canada: Humana Press Inc, 2000: 61-72.
- [ 8 ] Ling M, Piddlesden ST, Morgan BP, *et al.* A component of the medicinal herb ephedra blocks activation in the classical and alternative pathways of complement [ J ]. Clin Exp Immunol, 1995, 102: 582-588.