

大青叶抗内毒素的实验研究

★ 黄继全 (广东省广州市白云区人民医院 广州 510500)

摘要:目的:观察大青叶抗大肠杆菌 O₁₁₁B₄ 内毒素作用。方法:体外实验按细菌内毒素检查法进行,体内实验按热原检查法进行。结果:体外试验发现大青叶氯仿提取物的 1% 溶液稀释 64 倍后仍有破坏内毒素作用,体内试验发现经药物作用后的内毒素按家兔每公斤体重注入 40EU 剂量,不能产生典型的致热反应。结论:大青叶氯仿提取物有抗大肠杆菌 O₁₁₁B₄ 内毒素作用。

关键词:大青叶氯仿提取物;内毒素;鲎试剂;热原检查法

中图分类号:R 285 **文献标识码:**A

临床在应用抗生素等抗菌药物后,被杀灭的革兰氏阴性菌裂解释放出内毒素,严重时形成内毒素血症,引起机体多器官功能衰竭、弥漫性血管内凝血、呼吸窘迫综合征、中毒性休克综合征、脓毒性休克等疾患。由于至今尚无有效的抗内毒素药物,致使革兰氏阴性菌感染休克者死亡率仍在 60% 左右。

经本人实验证实,大青叶氯仿提取物有抗大肠杆菌 O₁₁₁B₄ 内毒素作用,且体内、体外实验结果一

致。现报告如下。

1 实验材料

药材:大青叶(*Folium Isatidis*),购自广州药材公司,经广州市药检所鉴定为十字花科二年生草本植物菘蓝(*Istatis indigotica* Fort)的干燥叶片。

动物:日本大耳白兔,体重(2.3±0.23)kg,雌雄兼用,雌兔无孕。购自广州中医药大学动物实验中心。

3.5 对去势雄性小鼠附性器官重量的影响 见表 5。

表 5 对去势雄性小鼠附性器官重量的影响(n=10)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	附性器官脏器系数/mg·(10 g) ⁻¹	
		精液囊	包皮腺
正常对照	—	26.4±11.3	15.8±5.46
模型对照	—	11.7±2.553	6.971±0.968
韭菜子醇提物	40	13.93±1.383	9.006±0.959**
韭菜子醇提物	20	8.836±1.207	6.889±1.587
韭菜子醇提物	10	9.937±0.939*	6.952±0.923
丙酸睾酮素	10	15.72±4.919**	14.04±0.003**

注:与模型对照比较:*P<0.05,**P<0.01。

4 讨论

肾阳虚证是肾阳气衰的表现,是临床上阳痿证的重要原因。韭菜子为一种常用的补肝肾中药,具有温肾壮阳作用。本实验采用三个实验模型初步探讨韭菜子醇提物的温肾助阳作用。实验模型通过肌注氢化可的松造成小鼠肾上腺、免疫器官重量较正常组低。灌胃给药韭菜子醇提物 15 天实验结果显示中剂量组可显著增加胸腺的重量,韭菜子醇提物高、低剂量组均可显著增加脾脏的重量,与模型对照组比较有显著性差异 P<0.05。韭菜子醇提物高剂量组可明显增加氢化可的松所致肾阳虚小鼠的体

重,升高氢化可的松所致肾阳虚小鼠的体温,与模型对照组比较,P<0.05。对自主活动次数和游泳时间有增加的趋势。韭菜子醇提物高剂量组可明显增加幼年雄性小鼠体重,与模型对照组比较有显著性差异 P<0.05。韭菜子醇提物高、中、低剂量组可显著性增加幼年雄性小鼠睾丸、附睾、精囊腺、包皮腺的重量,与正常组比较有显著性差异 P<0.05 或非常显著性差异 P<0.01。韭菜子醇提物高剂量组可增加去势雄性小鼠包皮腺的重量,低剂量组可增加去势雄性小鼠精液囊的重量,丙酸睾酮素对精液囊、包皮腺均有增重作用,与模型对照组比较有显著性差异。综上实验结果,韭菜子有一定的补肾壮阳作用。

参考文献

- [1]王成水,时军,桂双英,等.韭菜子醇提物的温肾助阳作用研究[J].中国中药杂志,2005,30(13):1 017
- [2]朱传义,佩天任,徐宝林.肾虚动物模型初报[J].中药药理与临床,1987,3(3):51
- [3]江苏新医学院.中药大辞典[M].下册.上海:上海科学技术出版社,1977.1 646

(收稿日期:2006-10-31)

试剂:精制冻干大肠杆菌 $O_{111}B_4$ 内毒素,卫生部上海生物制品研究所,1000EU/支,批号 021103。

鲎试剂:福建省福州东方鲎试剂厂,0.1 mL/支,灵敏度 0.25EU/mL,批号 041012;0.9%氯化钠注射液(NS,灭菌无热原),连云港东风制药厂,批号 051018。

仪器:XNC 型细菌内毒素测定仪,江苏省洛社实验电器厂。

注射器、试管、吸管等玻璃仪器均按《中国药典》热原检查法项下规定处理。

2 方法与结果

2.1 1%氯仿提取物溶液配制 取大青叶 1.5 kg,沸水煎煮 2 次,每次 30 分钟,合并提取液,浓缩至约 500 mL,加 95%乙醇使醇浓度至 70%,充分搅拌,静置 24 小时,使沉淀完全。取上清液,回收乙醇,并浓缩至无醇味。用石油醚萃取完全,母液继续用氯仿提取数次,合并氯仿萃取液,回收除尽氯仿,得稠膏状氯仿提取物。称取氯仿提取物 1 g,加适量助溶剂,加蒸馏水至 100 mL,调 pH7.0~7.5,密封,消毒,即得 1%氯仿提取物溶液。

2.2 体外试验 1%氯仿提取物 0.5 mL 分别置于 I、II 号试管内。于 II 号试管内加入 0.5 mL NS,摇匀,吸取 0.5 mL 于已加入 0.5 mL NS 的 III 号试管内,依次按同法作倍比稀释,得到稀释倍数为 1,2,4,8,16,32,64 和 128 倍的系列溶液,并使各管药液量均为 0.5 mL。分别于 8 支试管内加入预先配制的浓度为 10 EU/mL 内毒素液 0.5 mL,摇匀,于 $(55 \pm 2)^\circ\text{C}$ 水浴保温 30 分钟。分别取 0.2 mL 于 0.1 mL/支鲎试剂中,溶解,封口,于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 内毒素测定仪中温育 (60 ± 1) 分钟。同时作阳性、阴性对照。

结果阳性对照管和 VII 号管产生凝胶;阴性对照管和 I→VI 号无凝胶形成。说明 1%氯仿提取物溶液稀释 64 倍(VII 号管)仍有抗内毒素作用。

2.3 体内试验 实验组:将内毒素(1000 EU/支)用 2 mL NS 溶解后,取 0.8 mL(400 EU)加入已贮有 19.2 mL 已消毒 1%氯仿提取物溶液瓶中,使毒素浓度为 20 EU/mL。摇匀,于 $(55 \pm 2)^\circ\text{C}$ 温育 (30 ± 2) 分钟。

阳性对照组:另取 0.8 mL 上述已用 NS 溶解的内毒素液于 19.2 mL NS 中,使内毒素浓度为 20 EU/mL,同上法保温。

阴性对照组:已消毒 1%氯仿提取物溶液 20 mL。

实验前,按《中国药典》热原检查法项下规定作

好实验前家兔准备。选体重为 (2.33 ± 0.23) kg,正常体温 $39.40 \sim 39.60^\circ\text{C}$,且每只二次体温差在 0.2°C 以内家兔 9 只,分成 3 组,雌雄兼备,分别按每公斤体重 2 mL 自耳静脉注入 A、B、C3 种药液。于注射药液后 1,2,3 小时分别测定体温,以三次体温中升温度最高的一次减去正常体温,即为该兔的体温升温数,再求出各组平均升温数,结果见表 1。

表 1 大青叶氯仿提取物抗内毒素作用 $^\circ\text{C}$

组别	注射前 平均肛温	注射后肛温			大温差	平均升温
		1 h	2 h	3 h		
A	39.50	39.65	39.65	39.50	0.15	0.317
	39.55	39.70	39.90	39.45	0.35	
	39.30	39.70	39.70	39.75	0.45	
	39.30	39.80	40.10	39.80	0.80	
B	39.60	40.50	40.10	39.70	0.90	0.950
	39.50	40.60	40.65	39.90	1.15	
	39.40	39.45	39.65	39.40	0.25	
	39.50	39.80	39.65	39.70	0.30	
C	39.50	39.80	39.65	39.70	0.30	0.183
	39.60	39.50	39.60	39.40	0.00	

结果按“热原检查法”判断,A 和 C 组符合规定,B 组 3 只家兔体温升高均超过 0.6°C ,且总体温升高达 2.85°C ,产生典型的热原反应。详见表 1。

3 讨论

该实验中,体外抗内毒素试验按“细菌内毒素检查法”进行,体内抗内毒素试验按“热原检查法”进行。结果互为印证,说明大青叶氯仿提取物确有抗大肠杆菌 $O_{111}B_4$ 内毒素作用。

本实验中,各试管中加入内毒素浓度均为 10 EU/mL,结果 I→VII 管均未产生凝集反应。本实验中使用鲎试剂对内毒素灵敏度为 0.25 EU/mL,可见在 1%氯仿提取物溶液稀释 64 倍后仍有抗内毒素作用。

pH 是影响内毒素和鲎试剂间产生凝集反应的重要因素,最佳反应 pH 为 6.25~7.25,为此,在将 1%氯仿提取物溶液消毒前调 pH 7.0~7.5,以消除消毒引起的 pH 降低。药液与内毒素等作用的温度和时间直接影响内毒素被破坏的程度,于 $(55 \pm 2)^\circ\text{C}$ 水浴中保温 (30 ± 2) 分钟较为理想。

为证实大青叶氯仿提取物有抗内毒素作用,将同等剂量的内毒素经药物作用后再注入家兔体内,结果不能产生热原反应,而与单独注入药液反应相似(均在热原检查合格范围内),说明内毒素已被药液破坏,从而证实大青叶中含有抗内毒素活性物质。

参考文献

- [1]侯瑞兴.乳果糖治疗肠源性内毒素血症的实验研究[J].中华外科杂志,1991,29(4):248
- [2]中华人民共和国卫生部药典委员会编.中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005.附录 XⅢA,附录 66~67

(收稿日期:2006-12-26)