

文章编号: 1000-5862(2012)06-0554-04

抗过敏中草药活性成分的药效评价

孙启中, 陶欣芝, 周 勳, 任宇红*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要:肥大细胞受到抗原刺激后释放组胺是过敏反应的重要过程, 对组胺释放的抑制能力是评价抗过敏药物的重要因素. 选取多种传统中医记载具有抗过敏作用的中草药, 检测了其在体外对肥大细胞脱颗粒并释放组胺的抑制效果. 在具有明显效果的中草药中, 土茯苓与芍药对于抑制肥大细胞脱颗粒最为突出, IC_{50} 分别为 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 113.8 $\mu\text{g/mL}$. 土茯苓的突出药效(药物浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率达到 95.63%)未曾被报道, 具有研究与开发价值. 对其机理的初步研究表明蛋白激酶 A 可能是土茯苓抑制肥大细胞脱颗粒的重要靶点.

关键词: 中草药; 肥大细胞; 脱颗粒; 组胺; 抑制

中图分类号: Q 58

文献标志码: A

0 引言

皮肤过敏是一种常见的皮肤疾病, 其产生机制比较复杂, 病因尚不明. 一般认为在过敏反应中, 肥大细胞是速发型变态反应的初级效应细胞, 其细胞内含有组胺、肝素、5-羟色胺等, 通常情况下以颗粒形式存在于胞内, 受到刺激后发生脱颗粒现象, 由胞吐作用释放到细胞外, 从而引起过敏和炎症反应^[1-4], 因此, 常以组胺作为肥大细胞脱颗粒的标志物^[5].

目前临床上治疗皮肤过敏主要以激素类和免疫抑制剂药物为主, 多伴有不同程度的副作用. 我国传统中医发现有很多中草药对过敏反应有治疗效果, 如雷公藤、麻黄、丹参、木兰、芍药、甘草、地肤子、苍耳子和蛇床子等^[6-7]. 本文通过建立体外组胺释放抑制模型, 选取对肥大细胞脱颗粒后组胺释放有较强抑制效果的中草药, 对其进行量-效关系和有效成分药效学分析研究, 并对其作用机制进行了初步探讨, 为临床使用中药抗过敏消炎制剂提供理论依据.

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠, 每只质量约 200 g, 购买于上海西普尔-必凯实验动物有限公司.

1.2 试剂与仪器

UV2300 紫外分光光度计、超高速离心机、HZ-9612 二氧化碳培养箱、RPMI1640 培养基(购于 GIBCO 公司)、新生牛血清(购于四季青生物材料有限公司)、Compound 48/80(购于 sigma 公司)、TPA(购于 sigma 公司)、cAMP 试剂盒(购于上海朗顿生物科技有限公司)等, 其它试剂均为分析纯.

1.3 中药药材

苦参、甘草、芍药、金银花、黄芩、白藓皮、地肤子、花椒、土茯苓、艾叶、细辛、白芷、苍耳子、连翘, 均购自上海雷允上药房.

2 方法

2.1 药材处理及施用浓度

将中药原药材捣碎后, 置于体积浓度为 85% 的乙醇中, 浸泡 1 h 后回流浸提 2 h. 将回流液滤出后添加新溶剂再次回流, 合并 2 次回流液, 蒸馏回收溶剂, 得到各药物粗提液. 提取物母液浓度为 20 mg/mL, 检测浓度设定低浓度组(500 $\mu\text{g/mL}$)和高浓度组(2 mg/mL). 阳性对照物为丹皮酚标准品, 浓度设定为 10 $\mu\text{g/mL}$. 对部分药材(土茯苓、芍药)进行不同母液不同溶剂提取(水、乙醇或乙醇水溶液), 并用不同浓度的溶剂进行洗脱, 收集洗脱液并稀释至 2 mg/mL, 分别进行组胺释放抑制测定, 以确定其有效成分滞留部位及其量-效关系.

收稿日期: 2012-06-11

基金项目: 国家自然科学基金(21076079)资助项目.

作者简介: 任宇红(1967-), 男, 江西上饶人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事生物化工、天然产物活性评价研究.

2.2 大鼠腹腔肥大细胞(Rat peritoneal mast cells, RPMC)的分离纯化及药物处理

将正常大鼠断颈椎处死, 腹腔注射预冷的 PBS 缓冲液(含 1% 新生牛血清)15 mL 漂洗腹腔, 吸取漂洗液于 1 000 rpm 离心弃上清, 得到肥大细胞。将肥大细胞用适量 1640 培养基(含 15%新生牛血清)吹散后, 每样本取 200 μL , 分别加入 25 μL 各中草药提取物, 混匀, 置入 5% CO_2 孵箱孵育 10 min。取出样本, 各加入 25 μL Compound 48/80(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 5 μL CaCl_2 (60 mmol/L)溶液, 再次置入 5% CO_2 孵箱孵育 30 min 后取出, 将样本置入冰盒冷却终止反应。空白对照为不添加中草药提取物和诱导剂; 阴性对照为添加诱导剂, 但不添加中草药提取物。反应终止后取各样本测定上清中组胺含量。

2.3 组胺测定

采用荧光测定法^[5, 8]测定组胺释放量。

2.4 土茯苓提取物抑制肥大细胞脱颗粒的药效机制研究方法

2.4.1 土茯苓提取物作用于蛋白激酶 C 通路 通过直接激活蛋白激酶 C 致敏肥大细胞, 诱导脱颗粒反应的发生^[9-10]。以 TPA(12-*O*-十四烷酰佛波酯-13)代替 Compound 48/80 与 Ca^{2+} 配伍诱导肥大细胞脱颗粒, 再添加土茯苓提取物于样本中, 检测土茯苓提取物是否对直接由激活蛋白激酶 C 诱发的肥大细胞脱颗粒现象有抑制作用(具体步骤见本文 2.2 和 2.3 节)。

2.4.2 土茯苓提取物作用于蛋白激酶 A 蛋白激酶 A 的活性与环磷腺苷(cAMP)的活性呈正相关性^[11-12]。使用大鼠 cAMP ELISA 试剂盒检测添加了最有效浓度土茯苓水提母液和土茯苓醇提母液样本的肥大细胞的组胺释放率和胞内 cAMP 的活性, 以代表土茯苓提取物在抑制肥大细胞脱颗粒过程中对肥大细胞内蛋白激酶 A 活性的影响。破碎各药物作用的大鼠肥大细胞取上清为待测样本, 用抗大鼠 cAMP 单抗包被于酶标板上, 标准品和待测样本中的 cAMP 与单抗结合, 加入生物素化的抗大鼠 cAMP, 形成免疫复合物连接在板上, 用辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合, 加入底物工作液显蓝色, 最后加入硫酸终止反应, 于 450 nm 下测定 OD 值, cAMP 浓度与 OD 值成正比。设置 cAMP 标准品阳性对照组, 浓度设定为 1×10^{-4} mol/mL。

3 结果

3.1 抑制肥大细胞脱颗粒中药的筛选及量效关系研究

3.1.1 抑制肥大细胞脱颗粒中药的筛选 各提取物

对肥大细胞释放组胺的抑制效果见表 1。实验结果显示, 浓度为 2 mg/mL 的芍药、金银花、黄芩、花椒、土茯苓、艾叶、连翘提取物能较强地抑制样本中肥大细胞的脱颗粒反应, 其中土茯苓、芍药提取物的抑制效果最优, 接近丹皮酚标准品。

表 1 不同样本组胺释放率的比较

组别	n	组胺释放率/%($\bar{x} \pm s$)	
		芍药	土茯苓
Control	5	0 \pm 0.53	0 \pm 0.21
Model	5	100.00 \pm 9.93	100.00 \pm 5.25
水提母液	5	2.33 \pm 0.62	6.09 \pm 1.19
水洗液	5	73.54 \pm 6.89	68.54 \pm 10.88
25%醇洗液	5	34.63 \pm 3.57	28.30 \pm 6.66
50%醇洗液	5	11.19 \pm 0.95	16.11 \pm 1.69
90%醇洗液	5	69.32 \pm 5.06	40.59 \pm 8.22
醇提母液	5	1.38 \pm 0.59	9.78 \pm 2.55
水洗液	5	34.81 \pm 3.06	31.30 \pm 6.88
25%醇洗液	5	69.91 \pm 6.37	54.26 \pm 9.88
50%醇洗液	5	7.75 \pm 0.66	3.66 \pm 0.74
90%醇洗液	5	19.57 \pm 1.09	12.54 \pm 1.89

3.1.2 土茯苓、芍药提取物的量-效关系及有效成分提取方式的研究 对土茯苓和芍药的提取物进行量-效关系研究, 将不同量的提取物母液(20 mg/mL)添加到各样本中, 随着样本中提取物浓度的降低, 2 种药物对肥大细胞脱颗粒的抑制效果均逐渐减弱。土茯苓提取物在高于 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的情况下都具有较好的抑制效果, 芍药提取物浓度在高于 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 和低于 6.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时抑制效果受浓度影响较弱(见图 1)。土茯苓和芍药提取物的 IC_{50} 分别为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 113.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

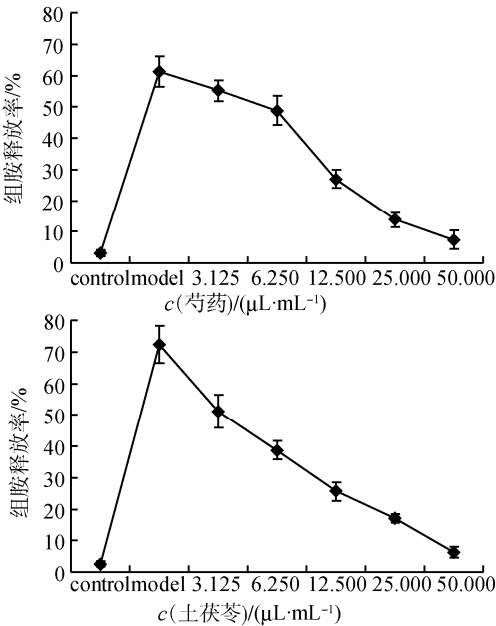


图 1 土茯苓与芍药提取物抑制肥大细胞脱颗粒的量-效关系曲线

对土茯苓和芍药提取液进行细分实验, 分别得到其水提母液、水提母液水洗液、水提母液 25%醇洗液、水提母液 50%醇洗液、水提母液 90%醇洗液、醇提母液、醇提母液水洗液、醇提母液 25%醇洗液、醇提母液 50%醇洗液、醇提母液 90%醇洗液并统一浓度为 2 mg/mL, 对所有提取成分进行抑制肥大细胞脱颗粒的药效学研究和比较, 寻找其有效成分的滞留部位. 实验结果如表 2 所示, 结果显示 2 种中药水提母液与醇提母液都对肥大细胞脱颗粒有很强的抑制作用. 细分后不同部位的提取成分对肥大细胞脱颗粒的抑制作用差别较大. 在该浓度下, 2 种药物的水提和醇提母液, 其 50%的醇洗液作用效果最明显, 其中土茯苓醇提母液的 50%醇洗液在细分后的所有提取成分中抑制效果最佳, 甚至比其母液的作用效果更强, 说明土茯苓抑制组胺释放率的有效成分集中在其醇提液的 50%醇洗液中. 实验结果还显示, 2 种药物水提母液的 25%醇洗液和 50%醇洗液, 以及醇提母液的 50%醇洗液和 90%醇洗液都对肥大细胞脱颗粒有较好的抑制效果.

表 2 不同方式提取成分抑制肥大细胞脱颗粒的比较

组别	n	组胺释放率/%($\bar{x} \pm s$)	
		芍药	土茯苓
Control	5	0 \pm 0.53	0 \pm 0.21
Model	5	100.00 \pm 9.93	100.00 \pm 5.25
水提母液	5	2.33 \pm 0.62	6.09 \pm 1.19
水洗液	5	73.54 \pm 6.89	68.54 \pm 10.88
25%醇洗液	5	34.63 \pm 3.57	28.30 \pm 6.66
50%醇洗液	5	11.19 \pm 0.95	16.11 \pm 1.69
90%醇洗液	5	69.32 \pm 5.06	40.59 \pm 8.22
醇提母液	5	1.38 \pm 0.59	9.78 \pm 2.55
水洗液	5	34.81 \pm 3.06	31.30 \pm 6.88
25%醇洗液	5	69.91 \pm 6.37	54.26 \pm 9.88
50%醇洗液	5	7.75 \pm 0.66	3.66 \pm 0.74
90%醇洗液	5	19.57 \pm 1.09	12.54 \pm 1.89

3.2 土茯苓提取物抑制肥大细胞脱颗粒的药效机制研究

TPA(12-*O*-十四烷酰佛波酯-13), 通过直接激活蛋白激酶 C 致敏肥大细胞, 诱导脱颗粒反应的发生. 有文献报道, 肥大细胞致敏过程中, 蛋白激酶 A 的活性有所降低, 且细胞致敏的恢复过程中蛋白激酶 A 活性逐渐升高^[11-12].

提取液抑制 TPA 诱导的肥大细胞脱颗粒的研究结果如图 2 所示, 图 2 表明土茯苓醇提、水提母液对由 TPA 诱导的肥大细胞脱颗粒均无抑制作用, 说明蛋白激酶 C 并不是该药物的作用靶点.

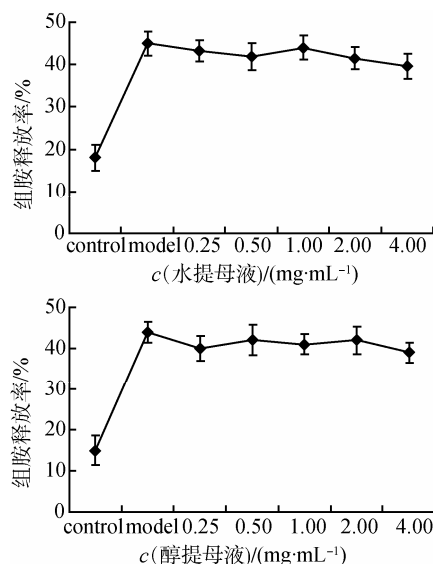


图 2 土茯苓水提、醇提母液抑制 TPA 诱导的肥大细胞脱颗粒的量-效关系曲线

提取物作用于蛋白激酶 A 的实验结果如图 3 所示, 图 3 表明土茯苓水提母液和土茯苓醇提母液在抑制肥大细胞脱颗粒的同时, 确实对蛋白激酶 A 的活性有一定程度的提高.

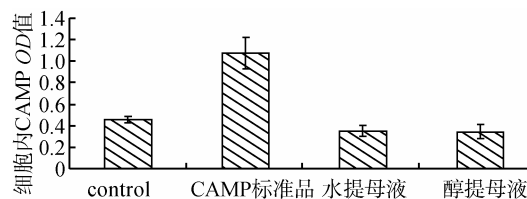


图 3 不同样本 cAMP OD 值的比较

4 讨论

本研究对用于缓解过敏、炎症症状的部分中草药进行了药效学研究和分析, 筛选出土茯苓、芍药、金银花、黄芩、花椒、艾叶、连翘、甘草、地肤子等具有有效抑制肥大细胞脱颗粒的中草药, 其中土茯苓和芍药的抑制效果较为突出, 以土茯苓为最高, 显示出极高的开发价值. 至于其作用机制, 土茯苓水提母液和醇提母液对由提高蛋白激酶 C 活性而诱导的肥大细胞脱颗粒反应无抑制作用, 但对蛋白激酶 A 的活性有一定程度的提高, 提示蛋白激酶 A 可能是土茯苓提取物实现其抑制肥大细胞脱颗粒机制的一个作用靶点. 但因肥大细胞脱颗粒的分子机制错综复杂, 其信号转导途径交织成网, 各条途径之间互相促进、互相制约, 因此, 要想系统地阐明土茯苓提取物对肥大细胞脱颗粒抑制作用的分子机制, 尚有待进一步的实验研究.

5 参考文献

- [1] Kurosawa M, Parker C W. A phosphatidylinositol kinase in rat mast cell granules [J]. *J Immunol*, 1986, 136:616-622.
- [2] Benyon R C, Church M K, Holgate S T. IgE-dependent activation of mast cells is not associated with enhanced phospholipid methylation [J]. *J Immunol*, 1986, 135:2535-2544.
- [3] Yasmin Churcher, David Allan D. Gomperts. Relationship between arachidonate generation and exocytosis in permeabilized mast cells [J]. *Biochem J*, 1990, 266:157-163.
- [4] Kennerly D A, Sullivan T J, Parker C W. Activation of phospholipid metabolism during mediator release from stimulated mast cells [J]. *J Immunol*, 1979, 122:152-159.
- [5] 蒋红玲, 向军俭. 食物过敏中肥大细胞释放组胺的研究进展 [J]. *医学理论与实践*, 2007, 20: 269-271.
- [6] 莫雅贞, 何韶衡. 天然成分对肥大细胞的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2006, 22:2070-2072.
- [7] 张承烈. 抗过敏中药研究进展 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2005, 15(4): 253-255.
- [8] 向军俭, 陈华粹. 组胺的荧光测定法的研究 [J]. *中国医学科学院学报*, 1981, 3:183-186.
- [9] Evans A T, Sharma P, Ryves W J, et al. TPA and resiniferatoxin-mediated activation of NADPH-oxidase: A possible role for Rx-kinase augmentation of PKC [J]. *FEBS Letters*, 1990, 267(2): 253-256.
- [10] Michael Gschwendt, Hanno Leibersperger, Walter Kittstein, et al. Protein kinase C ζ and η in murine epidermis TPA induces down-regulation of PKC η but not PKC ζ [J]. *FEBS Letters*, 1992, 307(2):151-155.
- [11] Claudia Martini, Maria Plaza, Maria del C Vila. PKA-dependent and independent cAMP signaling in 3T3-L1 fibroblasts differentiation [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 298(1/2): 42-47.
- [12] Kevin A W Lee. Transcriptional regulation by cAMP [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1991, 3: 953-959.

The Anti-Allergy Effects for Active Constituents Extracted from Chinese Medicinal Herbs

SUN Qi-zhong, TAO Xing-yi, ZHOU Xu, REN Yu-hong*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Mast cell is considered to be a key actor for the allergic inflammation. Upon presentation of the antigen they could release histamine. The inhibition of histamine releasing is usually used as major element to evaluate the anti-allergy activity of drugs. Diverse herbs which released allergy and inflammation symptom, were selected their depressant effect on mast cells' degranulation and the release amount of histamine in vitro were detected. Among the efficient herbs, *Glabrous Greenbrier Rhizome* and *Paeonia Veitchii* showed more rejection capability on mast cells' degranulation as the IC_{50} of these two kinds of herb were 62.5 $\mu\text{g/mL}$ and 113.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. *Glabrous Greenbrier Rhizome* is worth to be studied due to its conspicuous efficient (the inhibition ratio is 95.63% with the concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$) which has not been reported. The mechanism research suggested that protein kinase A may be one of the target point of *Glabrous Greenbrier Rhizome*'s depressant effect on mast cells' degranulation.

Key words: acnes; Chinese herb; mast cell; degranulation; histamine; mechanism.

(责任编辑: 刘显亮)