

# 草麻黄抗补体组份对血小板变形及内皮细胞损伤作用

陈健文<sup>1</sup>, 张文平<sup>2</sup>, 周长华<sup>1</sup>, 黄守坚<sup>1</sup>, 陈少锐<sup>1</sup>

(1. 中山大学药学院药理与毒理学实验室, 广东 广州 510006; 2. 赣南医学院病原生物学教研室)

**摘要:** **目的** 从草麻黄中分离抗补体组份并观察其抗补体依赖性的损伤作用。 **方法** 采用柱层析结合紫外吸收观察的方法分离抗补体组份; 采用比浊法观察组份对眼镜蛇毒因子引起的血小板变形的影响; 采用 MTT 法观察组份对异种血清对内皮细胞损伤的影响。 **结果** 紫外吸收为 196 nm 的组份具有抗补体作用, 麻黄组份能有效抑制眼镜蛇毒因子引起的血小板变形, 高、中、低剂量对血小板变形的抑制率分别为  $49.8\% \pm 10.7\%$ 、 $32.8\% \pm 4.2\%$ 、 $22.5\% \pm 6.2\%$ ; 麻黄组份能有效减轻异种血清对内皮细胞的损伤, 高、中、低剂量对补体致内皮细胞损伤抑制率分别为  $88.1\% \pm 7.1\%$ 、 $79.8\% \pm 3.3\%$ 、 $65.0\% \pm 4.5\%$ 。 **结论** 麻黄抗补体组份对补体依赖性损伤有保护作用。

**关键词:** 草麻黄; 补体; 攻膜复合物; 补体依赖性损伤

中图分类号: R967 文献标识码: A

## Isolation of Anti-complement Components from Ephedra Sinica and its Protective Effect on Complement-dependent Injury

CHEN Jianwen, ZHANG Wenpin, ZHOU Changhua, et al

(Laboratory of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

**Abstract:** **Objective** To isolate the anti-complement components from ephedra sinica and investigate its protective effect on complement-dependent injury. **Methods** Anti-complement components were separated by using column chromatography; turbidimetric assay was used to investigate the effect of anti-complement component on C5b6789<sub>n</sub>-induced platelet metamorphose; MTT method was used to investigate the effect of anti-complement components on endothelial cells injury caused by rabbit serum. **Results** Anti-complement components effectively reduced C5b6789<sub>n</sub>-induced platelet metamorphose and attenuated the endothelial cells injury caused by rabbit serum. **Conclusion** Anti-complement components may have protective effect on complement-dependent injury.

**Key words:** ephedra sinica; complement; member attack complex; complement-dependent injury

补体系统 (complement system) 是由 30 多种蛋白组成的复杂系统, 它由补体固有蛋白、补体调节蛋白、补体受体组成, 补体系统有多种生物学功能<sup>[1]</sup>。通常补体系统受到补体调节蛋白的精确调控不会引起同源组织损伤, 如果补体系统在病理条件下过度激活, 就会引起依赖补体的组织损伤, 引起包括自身免疫性疾病、成人呼吸窘迫综合症、非典型性肺炎、

移植中的超急性排斥反应等<sup>[2-3]</sup>。补体激活产生的攻膜复合物 C5b6789<sub>n</sub> (Member Attack Complex, MAC) 能引起血小板活化和血管内皮的损伤<sup>[4-5]</sup>, 该作用构成了补体依赖性损伤的血管内凝血机制。抑制补体的激活可以有效地防止一些免疫性损伤。草麻黄 (ephedra sinica) 为中国的传统中药, 具有广泛的药理作用。多个治疗免疫性疾病的方剂中含有麻黄成分<sup>[6-7]</sup>, 研究发现麻黄的水提物能抑制补体的激活<sup>[8]</sup>, 麻黄的抗补体成分可能参与了免疫性疾病的治疗。本研究从麻黄中分离出抗补体组份, 研究其抗补体活性, 并针对依赖补体损伤的基本病理过程 (血管内凝血机制), 观察麻黄组份的保护作用。

收稿日期: 2014-03-18

作者简介: 陈健文, 本科, 主管技师, 研究方向: 药物药效学, E-mail: cjlw1975@263.net. 通讯作者陈少锐, 博士, 讲师, 研究方向: 心血管药理学, E-mail: chshaor@mail.sysu.edu.cn.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

眼镜蛇毒因子 (Cobra Venom Factor, CVF): 实验室制备, 采自华南眼镜蛇 (*Naja naja atra*); 大鼠、豚鼠、新西兰白兔由中山大学实验动物中心提供; 新生小牛来源于广州奶牛研究所; 草麻黄由广州奇星药厂生药部提供; 绵羊血由广州儒林畜牧场提供; Sephadex G-100 购于 Pharmacia; 500 型 Chrono-Log 血小板聚集仪购于 Chrono-Log, USA; 810 型 Aggro/Link 电脑接口购于 Chrono-Log, USA。

### 1.2 麻黄组份的粗制品的分离

参照文献 [8] 的方法加以改进: 100 g 麻黄用 1 200 mL 蒸馏水浸泡 24 h, 煮沸 1 h, 趁热用四层纱布过滤得棕黄色液体。待液体降至室温后, 用 1 mol/L 的氢氧化钠调液体的 pH 为 9.0 出现大量沉淀, 搅拌 1 h 后 2 000 g 离心 30 min, 取沉淀用无水乙醇洗涤, 2 000 g 离心 30 min 取沉淀。沉淀用 50 mL 蒸馏水重悬后, 用 1 mol/L 的盐酸调液体的 pH 为 4.0, 搅拌 12 h 后用冷凝回流烧瓶煮沸 1 h (保持液体体积不变), 冷却至室温后, 1 000 g 离心 15 min, 取上清液。重复碱沉淀, 酸溶解的步骤 2 次, 取上清液, 即得粗制品溶液。

### 1.3 粗制品溶液的层析分离

取 Sephadex G-100 装柱, 柱高 55 cm, 内径 1.8 cm, 凝胶体积 140 mL。取 5 mL 粗制品上柱进行层析, 洗脱液为 pH 4.0 的水, 操作压 15 cm 水柱, 每 15 min 收集 1 管, 每管 4.5 mL。以 196 nm 为监测波长测定吸光度, 并定性测定各管的抗补体活性, 收集有抗补体活性的各管, 低温真空干燥保存。

### 1.4 抗补体活性测定方法

参照文献 [9], 设置倍比稀释的麻黄组分管及对照管, 全溶管, 测定各管在 541 nm 波长的吸光度。根据溶血率  $Y = \text{样本管 } 541 / \text{全溶管 } 541$ , 以  $\lg[Y/(1-Y)]$  为轴, 以麻黄组份剂量的常用对数为 X 轴, 推算回归方程。当  $Y/(1-Y) = 1$  时即 50% 溶血时, 所对应的剂量即为抑制 50% 溶血的剂量。

### 1.5 比浊法测血小板变形聚集

比浊法测血小板变形聚集, 按文献方法制备血小板血浆并计数<sup>[10-11]</sup>, 调整血浆血小板数为  $(6 \sim 7) \times 10^{11}/L$ 。加样器取 250  $\mu L$  贫血小板血浆 (PPP) 和 PRP 富血小板血浆置于已硅化的玻璃管, PPP 为空白对照, PRP 置于 Chrono-Log 血小板聚集仪测定孔并放入硅化搅拌磁棒搅拌 (1 000 转/分),

37° 预热 3 min。起动程序, 设定基线并描记 30 s PRP 基线后加入 CVF 5  $\mu L$  描记 15 min 血小板变形, 聚集曲线。实验组同上描记 30 s 基线后加入体积为 25  $\mu L$  的倍比稀释的麻黄组份 (低剂量组: 0.24 g/L、中剂量组: 0.36 g/L、高剂量组: 0.54 g/L) 搅拌 3 min 后加入 CVF 5  $\mu L$ , 描记曲线观察麻黄组份对血小板变形聚集的影响。以 25  $\mu L$  的生理盐水代替麻黄组份作为空白对照重复步骤。

### 1.6 MTT 法观察麻黄组份对兔血清对牛内皮细胞的损伤

按文献方法取材和原代培养内皮细胞<sup>[12]</sup>。培养的细胞经第八因子 (VIII 因子) 相关抗原抗体酶联免疫法 (ABC 法染色), 鉴定为内皮细胞。继续培养并传代, 实验用 2 ~ 5 代细胞。将细胞悬液配制成  $1 \times 10^8/L$ , 接种于 24 孔板, 每孔 0.8 mL, 待细胞基本融合进行处理。分对照组、模型组及高、中、低剂量的麻黄组份组 (5、2.5、1.25 g/L, 每 4 个孔为一个处理组)。对照组: 56 °C 加热 30 min 热灭活的新鲜兔血清用 VBS 缓冲液 1:4 稀释 + PBS 缓冲液; 模型组: 用 VBS 缓冲液 1:4 稀释新鲜兔血清 + PBS 缓冲液; 高、中、低剂量的麻黄组份组: 用 VBS 缓冲液 1:4 稀释新鲜兔血清 + 倍比稀释的麻黄多糖 (溶于 PBS 缓冲液)。在各组中缓冲液或麻黄组份溶液预先与血清混合, 在 37° 温箱孵育 10 min 后加入 24 孔板中摇匀, 置于培养箱中 4 h, 中途再摇匀一次。处理 4 h 后, 采用 MTT 法测定细胞生存率。在酶标仪上测定光密度值 (OD 值), 测定波长为 570 nm, 参考波长为 630 nm。以细胞生存率 = 处理组 OD / 对照组 OD  $\times 100\%$ 。

### 1.7 统计学方法

应用 SPSS10.0 软件, 各组数值以均数  $\pm$  标准差表示, 单因素方差分析后 LSD 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 草麻黄抗补体组份的提取与分离

生药麻黄经水煮后, 对水溶液进行乙醇的洗涤, 二次的煮沸, 以及三次的碱溶液的沉淀、酸溶液的溶解过程得粗制品溶液。将粗制品经 Sephadex G-100 分子筛层析柱分离, 取在 196 nm 波长的紫外光有高吸收峰的组分, 并用致敏绵羊红细胞进行抗补体活性测定。麻黄 100 g 获得有 196 nm 波长吸收特征的抗补体组份 30.2 mg, 回收率为 0.3%。

## 2.2 抗补体活性测定结果

富含补体的豚鼠血清能使敏化的绵羊红细胞溶解。预先将豚鼠血清与麻黄多糖孵育,能抑制其溶血作用。以系列剂量确定组份的抗补体活性单位,根据相对溶血率和抗补体组份剂量,计算出组份对豚鼠血清的  $IC_{50}$  为 44.8 mg/L。

## 2.3 麻黄抗补体组份对眼镜蛇毒因子致大鼠血小板变形抑制率

眼镜蛇毒因子引起大鼠血小板显著变形,预先加入麻黄组份能有效抑制 3 min 后加入 CVF 引起的血小板变形。变形抑制率随着麻黄组份剂量的增加而增加,呈现量效关系,见表 1。

表 1 麻黄组份对 CVF 引起的小血小板变形抑制率 ( $n=5$ )

组别	变形抑制率 (%)
生理盐水对照组	9.3 ± 3.2
麻黄组份低剂量组 (0.24 g/L)	22.5 ± 6.2
麻黄组份中剂量组 (0.36 g/L)	32.8 ± 4.2 <sup>a</sup>
麻黄组份高剂量组 (0.54 g/L)	49.8 ± 10.7 <sup>b</sup>

与对照组比较, a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$

## 2.4 麻黄抗补体组份对兔血清对牛内皮细胞损伤的影响

培养的细胞经 VIII 因子相关抗原抗体酶联免疫法 ABC 法染色,鉴定是内皮细胞。新鲜兔血清能损伤内皮细胞,细胞生存率降低。麻黄组份预先与兔血清 37 °C 孵育 10 min 后,能减轻兔血清对培养的牛内皮细胞的损伤,呈现出剂量关系,见图 1。

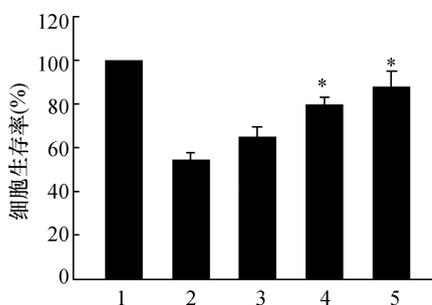


图 1 麻黄抗补体组份对兔血清对牛内皮细胞损伤的影响

1: 对照组; 2: 模型组; 3: 低剂量组; 4: 中剂量组; 5: 高剂量组。与模型组比较, \*:  $P < 0.05$

## 3 讨论

本文根据该组分在酸性液中溶解、在碱性液中

析出的特点,对煮沸后的麻黄水溶液进行多步处理。在实验过程中,曾对丢弃的沉淀物及上清液进行测定,发现它们不同程度地具有抑制补体对致敏绵羊红细胞的溶解作用,即有抗补体活性。推测麻黄煮沸水解后产生多种产物,具有不同的化学性质,相当多的物质由于具有某些活性基团而表现出抗补体活性,本文作者采用的方法分离的只是其中的一部分。应用分子筛以及活性测定法来对活性组分进行分离,发现在 196、202 nm 有吸收峰组分表现出较高效价的抗补体活性,其中峰值为 196 nm 的含量最高。文献采用的薄板层析分离的方法<sup>[8]</sup>,需反复制备薄板,一次上样量小的缺点,采用分子筛柱层析配合 196 nm 紫外吸收测定的方法对抗补体成分进行分离,简便实用,上样量大,重复性好,得率较高,能满足实验室的需要。

本实验组利用来源于华南地区中华眼镜蛇 (*naja naja atra*) 的眼镜蛇毒因子 (cobra venom factor, CVF) 建立起激活补体旁路引起血小板变形聚集的模型。该蛇毒因子同时具有激活  $C_3$ 、 $C_5$  的作用且除激活补体作用外尚未发现其他直接的生物活性。旁路激活补体作用于大鼠血小板发生明显的变形和缓慢的血小板聚集,参与生理性止血或病理性血栓形成。该作用依赖于补体,因为 56 °C, 30 min 处理血浆后(热灭活补体)变形聚集作用消失<sup>[13-14]</sup>。麻黄抗补体组份能有效减轻血小板的变形作用,表明该组份对旁路激活途径有抑制作用,提示有防治血管内凝血的作用。

补体活化能通过多种机制促进血管内凝血的发生,  $C5b6789_n$  (攻膜复合物) 能溶解内皮细胞,破坏细胞间连接,暴露并激活内皮下基质,基质粘附并激活血小板及凝血酶引起凝血反应<sup>[15]</sup>。补体活化产生的过敏毒素  $C3a$ 、 $C5a$  可结合并激活炎症细胞(如中性粒细胞和巨噬细胞)产生氧自由基及弹性蛋白酶影响内皮细胞功能并使硫酸化肝素脱落加强了凝血倾向<sup>[16-17]</sup>。

异种血清与培养的内皮细胞共同孵育,建立起超急性排斥的模型已被广泛应用于实验研究当中。大多数实验研究认为经典激活途径是超急性排斥反应发生的主要原因<sup>[18-20]</sup>。由于天然抗体的存在,补体的激活过程很快,所以补体的细胞毒作用也很迅速,如  $C5a$  促进黄嘌呤脱氢酶在 5 ~ 10 min 内转化为黄嘌呤氧化酶,促进氧自由基的生成<sup>[21]</sup>。在 30 ~ 60 min 被激活的内皮细胞丢失超过 50% 的细胞表

面的硫酸化肝素<sup>[22]</sup>。MAC 在 5 min 内可在细胞连接上形成 5 μm 直径的小洞<sup>[23]</sup>。本次实验将新鲜兔血清与新生小牛胸主动脉内皮细胞孵育 4 h 能使超急性排斥反应充分发生。麻黄组份预先与血清温育 10 min 后,观察到其减弱了新鲜血清对内皮细胞的损伤作用。可能是由于存在麻黄组份抑制补体活化,减轻了补体依赖性损伤。本文中发现麻黄组份能有效地抑制补体引起的血小板激活以及抑制补体损伤内皮细胞,表明该组份可能防止补体依赖性的血管内凝血反应,为麻黄治疗免疫性疾病提供了理论依据,也为进一步研究和开发麻黄做出了初步探索。

#### 参考文献:

- [1] Dragon-Durey MA, Blanc C, Marinozzi MC, et al. Autoantibodies against complement components and functional consequences[J]. *Mol Immunol*, 2013, 56(3):213-221.
- [2] Ricklin D, Lambris JD. Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions[J]. *J Immunol*, 2013, 190(8):3839-3847.
- [3] Zhang T, Chen D. Anticomplementary principles of a Chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2):351-361.
- [4] Farrar CA, Sacks SH. Mechanisms of rejection: role of complement[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2014, 19(1):8-13.
- [5] Martel C, Cointe S, Maurice P, et al. Requirements for membrane attack complex formation and anaphylatoxins binding to collagen-activated platelets[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18812.
- [6] 黄晓洁, 魏刚, 张龙, 等. 麻杏石甘汤的药理作用和临床应用研究进展[J]. *广东药学院学报*, 2014, 30(1):1-4.
- [7] 李万鹏. 麻黄附子细辛汤治疗类风湿关节炎疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(26):3308-3309.
- [8] Ling M, Piddlesden SJ, Morgan BP. A component of the medicinal herb ephedra blocks activation in the classical and alternative pathways of complement[J]. *Clin Exp Immunol*, 1995, 102(3):582-588.
- [9] Takahashi H, Hayashi K. Purification and characterization of anticomplement factor (cobra venom factor) from the *Naja naja atra* venom[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 701(1):102-110.
- [10] 杜保生, 颜天华, 马莹, 等. 红景天苷对大鼠和小鼠血液系统的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(2):51-54.
- [11] 杨良. 血涂片血小板计数方法的意义[J]. *检验医学与临床*, 2009, 6(1):17-18.
- [12] 刘伟栋, 范平, 陈家伟. 胎牛主动脉内皮细胞的培养[J]. *南京医科大学学报*, 2000, 20(3):173-175.
- [13] Ding ZR, Huang SJ, Sun JJ. Induction of platelet activation by cobra venom factor from *Naja naja atra* in rat[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(7):649-654.
- [14] Ding ZR, Huang SJ, Sun JJ. Effect of complement activation on platelet aggregation[J]. *J Chin Pharmaceu Sci*, 1998, 7(1):18-24.
- [15] Cowan PJ, Apice AJ. Complement activation and coagulation in xenotransplantation[J]. *Immunol Cell Biol*, 2009, 87(3):203-208.
- [16] Bosmann M, Ward PA. Role of C3, C5 and anaphylatoxin receptors in acute lung injury and in sepsis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 946:147-159.
- [17] Jagels MA, Daffern PJ, Hugli TE. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion[J]. *Immunopharmacology*, 2000, 46(3):209-222.
- [18] Pierson RN. Antibody-mediated xenograft injury: mechanisms and protective strategies[J]. *Transpl Immunol*, 2009, 21(2):65-69.
- [19] Kerr SR, Dalmaso AP, Apasova EV, et al. Mouse-to-rabbit xenotransplantation: a new small animal model of hyperacute rejection mediated by the classical complement pathway[J]. *Transplantation*, 1999, 67(3):360-365.
- [20] Lin X, Qi JZ, Chen MH, et al. A novel recombinant fibrinogenase of *Agkistrodon acutus* venom protects against hyperacute rejection via degradation of complements[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(6):772-779.
- [21] Friedl HP, Till GO, Ryan US, et al. Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells[J]. *FASEB J*, 1989, 3(13):2512-2518.
- [22] Platt JL, Vercellotti GM, Lindman BJ, et al. Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection[J]. *J Exp Med*, 1990, 171(4):1363-1368.
- [23] Saadi S, Platt JL. Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement[J]. *J Exp Med*, 1995, 181(1):21-31.