

蜈蚣提取液对局灶性脑缺血再灌注大鼠血浆 vWF 和 TPO 的影响

王丽娜, 何玲, 程卉, 管威, 王键, 胡建鹏*

(安徽中医学院省部共建新安医学教育部重点实验室, 合肥 230038)

[摘要] **目的:**研究蜈蚣提取液对局灶性脑缺血再灌注大鼠血浆血管假血友病因子(vWF)和血小板生成素(TPO)的影响。**方法:**将雄性SD大鼠采用线栓法建立大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注大鼠模型,随机分为假手术组、模型组、蜈蚣提取液高、中、低剂量组(0.7, 0.35, 0.175 g·kg⁻¹)和益气活血方组(8.54 g·kg⁻¹),造模后连续ig给药14 d,采用ELISA法测定大鼠血浆vWF和TPO含量。**结果:**模型组大鼠血浆vWF和TPO含量明显高于假手术组,蜈蚣提取液高剂量组大鼠血浆vWF和TPO含量较模型组明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),益气活血方组大鼠血浆TPO含量较模型组明显降低($P < 0.01$),益气活血方组大鼠血浆vWF较模型组降低但无显著性差异,蜈蚣提取液中、低剂量组大鼠血浆vWF和TPO含量较模型组降低,无显著性差异。**结论:**蜈蚣提取液能通过降低局灶性脑缺血再灌注大鼠血浆vWF和TPO的含量,改善脑缺血再灌注造成的损伤。

[关键词] 蜈蚣提取液; 局灶性脑缺血再灌注; 血管假血友病因子; 血小板生成素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0192-04

Effects of Centipede Extraction on vWF and TPO Expression in Blood Plasm after Focal Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

WANG Li-na, HE Ling, CHENG Hui, JIAN Wei, WANG Jian, HU Jian-peng*

(Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of centipede extraction on von willebrand disease factor (vWF) and thrombopoietin (TPO) expression after focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Method:** Intraluminal thread occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) was applied to establish the focal cerebral reperfusion model. The rats were randomly divided into six groups: sham-operative group, model group, high dose of centipede extraction group, middle dose of centipede extraction group, low dose of centipede extraction group and Yiqi Huoxue Recipe (YHR) group. The rats were reperfused again after occlusion of 2 hours. After intragastric administration of different drugs for 14 days, the blood plasma vWF and TPO were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** The vWF and TPO levels were significantly up-regulated in rats after ischemia-reperfusion injury compared with sham-operative group. Compared with the model group, high dose of centipede extraction significantly ameliorated the vWF and TPO expression ($P < 0.05$). Yiqi Huoxue Recipe administration could just decrease TPO level ($P < 0.05$). The middle dose and low dose of centipede extraction reduced vWF and TPO levels without significant difference compared with model group. **Conclusion:** Centipede extraction could ameliorate cerebral ischemia-reperfusion symptoms via down-regulating the vWF and TPO levels.

[收稿日期] 20110923(004)

[基金项目] 安徽省高等学校省级自然科学研究项目(KJ2009B198Z);安徽省优秀青年基金项目(8040106816)

[第一作者] 王丽娜, 硕士, 助理研究员, 从事心脑血管疾病及复方配伍研究, Tel: 0551-5169051, E-mail: nanazili@tom.com

[通讯作者] * 胡建鹏, 博士, 教授, 从事病理生理学、实验中医、中医临床与科研工作, Tel: 0551-5169355, E-mail: hujianpeng351@126.com

[Key words] Centipede extraction; focal cerebral ischemia-reperfusion; von willebrand disease factor; thrombopoietin

蜈蚣为大蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣 *Scolopendrasu bspinipesmutilans* L. Koch 或其近缘动物的干燥全虫,具有熄风止痉,解毒散结,通络止痛之功效^[1]。中医学认为“其走窜之力最速,内而脏腑外而经络,凡气血凝聚之处皆能开之。《本草纲目》记载其能:“治小儿惊痫,风搐,脐风,口噤,丹毒,秃疮,瘰疬,便毒……”有学者用于复方制剂中治疗脑卒中,有良好疗效^[2]。有实验研究表明蜈蚣提取液对大鼠心脏血流动力学有明显改善作用^[3]。本实验采用线栓法大脑中动脉制作局灶性脑缺血再灌注大鼠模型,观察蜈蚣提取液对局灶性脑缺血再灌注大鼠血浆血管假血友病因子(von Willebrand disease factor, vWF)和血小板生成素(thrombopoietin, TPO)的影响,探讨其改善脑缺血的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 60 只,月龄 4 个月,体重 250 ~ 300 g,由江苏省南京医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(苏)2002-0031。

1.2 药物 益气活血方(脑络欣通)主要由黄芪 30 g,三七 10 g,川芎 10 g,蜈蚣 2 条等组成,由安徽中医学院中药制剂室制备,相当于生药 6.0 kg·L⁻¹。少棘巨蜈蚣购自百姓缘大药房,蜈蚣提取液由安徽中医学院科研实验中心制备:先将蜈蚣研成粗粉,称取质量,放入 40 倍 60% 乙醇分 2 次提取,第 1 次 1.5 h,第 2 次 1 h,合并 2 次提取液,蒸发乙醇进行浓缩,将蜈蚣残渣用水煎煮,与醇提浓缩液合并,浓缩成所需中剂量组药量,相当于原生药 35 g·L⁻¹。再通过浓缩和稀释得到高、低剂量组,分别相当于原生药 70,17.5 g·L⁻¹。

1.3 试剂 vWF 和 TPO 酶联免疫检测试剂盒(美国 ASSAYPRO 公司,批号分别为 10723R,0143B)。

1.4 仪器 MDF-382E 型超低温冰箱(日本三洋),Allegra64R 型高速冷冻离心机(美国 Beckman),ELX800UV 型酶标仪(美国 BioTek 公司)。

2 方法

2.1 局灶性脑缺血再灌注模型复制 方法参照文献^[4]。

2.2 分组与给药 大鼠随机分为假手术对照组、模型对照组、蜈蚣提取液高、中、低剂量组和益气活血方组,每组 10 只。益气活血方相当于原生药 6.0 kg·L⁻¹,按 8.54 g·kg⁻¹ig。蜈蚣提取液高、中、低剂

组分别含生药 70,35,17.5 g·L⁻¹,按照 0.7,0.35,0.175 g·kg⁻¹ig。药物组分别在复制局灶性脑缺血模型后第 2 天开始 ig,连续 14 d。假手术组、模型组按同样方法予以等量生理盐水 ig。

2.3 取材 连续给药 14 d 后,10% 水合氯醛麻醉(3.6 mL·kg⁻¹ip)大鼠,打开胸腔,腹主动脉取血,用 EDTA 抗凝,摇匀放入冰浴中,1 h 内离心(2 000 r·min⁻¹)10 min,取出血浆置 -15 ~ -20 °C 保存。

2.4 指标检测 vWF 和 TPO 酶联免疫检测试剂盒由美国 ASSAYPRO 公司提供,严格按说明书进行操作。①建立标准曲线:设标准孔,加稀释好的标准品,做对照孔。②加样:在酶标板待测样品孔中加样品稀释液,待测样品,37 °C 温育。③洗板:用洗涤液将反应板充分洗涤,滤纸上印干。④每孔加酶标试剂,空白孔除外,37 °C 温育,洗板。⑤每孔加入显色剂 A,再加显色剂 B,37 °C 避光显色。⑥取出酶标板,终止反应(蓝色立转黄色)。⑦测定:以空白孔调零,在规定波长下测量各孔吸光度(A)。⑧应用 CurveExpert 软件,计算出标准曲线直线回归方程,再根据样品 A 在回归方程上计算出相应样品浓度。vWF 和 TPO 标准曲线见图 1,图 2。

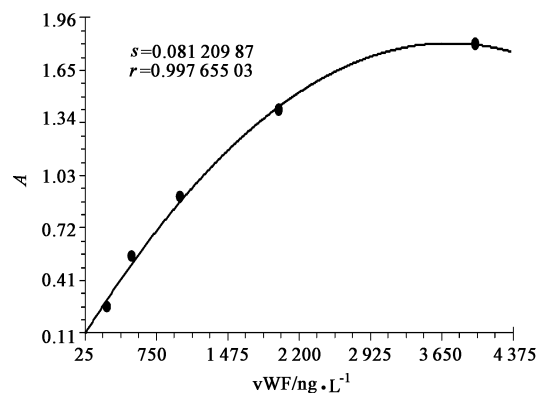


图 1 局灶性脑缺血再灌注模型大鼠血浆 vWF 标准曲线

2.5 数据处理与统计学处理 应用 SPSS 12.0 软件系统进行统计学处理,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行组间均数比较,两组之间均数比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 蜈蚣提取液对脑缺血再灌注模型大鼠血浆 vWF 含量的影响 模型组大鼠血浆 vWF 含量明显

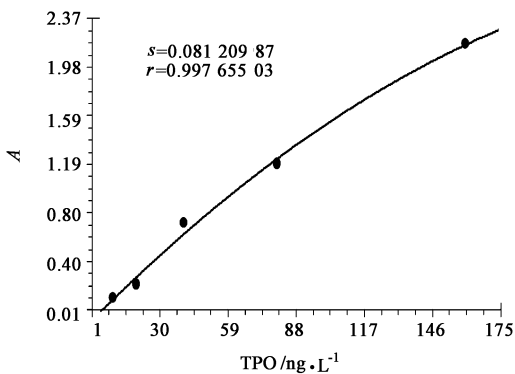


图 2 局灶性脑缺血再灌注模型大鼠血浆 TPO 标准曲线

高于假手术对照组 ($P < 0.05$), 蜈蚣提取液高剂量组大鼠血浆 vWF 含量较模型组明显降低 ($P < 0.01$), 益气活血方组, 蜈蚣提取液中、低剂量组大鼠血浆 vWF 含量较模型组降低, 无显著性差异。见表 1。

3.2 蜈蚣提取液对脑缺血再灌注模型大鼠血浆 TPO 含量的影响 模型组大鼠血浆 TPO 含量明显高于假手术组 ($P < 0.01$), 蜈蚣提取液高剂量组和益气活血方组大鼠血浆 TPO 含量较模型组明显降低 ($P < 0.01$), 蜈蚣提取液中、低剂量组大鼠血浆 TPO 含量较模型组降低, 无显著性差异。见表 1。

表 1 各组大鼠脑缺血后再灌注给药 14 d 血浆 vWF 和 TPO 含量测定结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	vWF	TPO
假手术	-	138.71 \pm 5.52	10.58 \pm 1.09
模型	-	162.50 \pm 22.65 ¹⁾	14.84 \pm 1.94 ²⁾
蜈蚣提取液	0.70	127.40 \pm 23.19 ⁴⁾	10.88 \pm 3.63 ⁴⁾
	0.35	137.71 \pm 32.58	12.59 \pm 1.01
	0.175	156.21 \pm 21.41	12.39 \pm 1.44
益气活血	8.54	156.19 \pm 17.81	11.68 \pm 1.28 ⁴⁾

注:与假手术对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

缺血性脑卒中是由于脑血流受阻而导致的神经损伤和凋亡,表现为神经功能障碍甚至死亡,具有发病率高、死亡率高、致残率高的特点^[5]。脑缺血再灌注损伤是指脑缺血恢复血液灌注后,脑细胞损伤反而进行性加重的过程^[6]。近年来随着溶栓疗法的运用和推广,血循环重建后的再灌注损伤日益受到重视^[7],选择合适的检测指标有助于临床诊断、风险评估和疾病预警。

vWF 是一种重要的内皮下黏附蛋白,由血管内皮细胞合成和巨噬细胞合成的多聚体系列,仅存在

于成熟的内皮细胞上,它可以反映内皮细胞的功能状态,在血小板与血管壁的结合中起重要的桥梁作用。vWF 在内皮细胞受到刺激时释放至血浆,故血浆 vWF 水平升高可作为内皮细胞受损的标志。有研究表明,vWF 在脑血管疾病的急性期有显著增加,在慢性期逐渐减少但仍高于正常组,无论是脑梗死还是脑出血均相同^[8]。TPO 又称为血小板生成刺激因子 (thrombocytopoiesis factor, TSF)。早在 1958 年 Kelemen^[9] 等就提出血液中存在一种调节血小板生成的激素样物质,将其命名为 TPO。TPO 是调控血小板生成的首要、特异性因子,主要表达在骨髓、脾脏、肝脏等造血组织,一些非造血组织如胎盘、脑也表达 TPO 受体,主要功能是维持外周血小板数量。血液内血小板的高聚性是脑缺血的主要致病机制之一^[10]。脑梗死早期即存在内皮细胞受损,血小板活化而导致血黏滞度增高,进一步加重缺血性脑卒中^[11]。

本研究发现模型组大鼠血浆 vWF 和 TPO 含量明显高于假手术对照组,蜈蚣提取液高剂量组大鼠血浆 vWF 和 TPO 含量较模型组明显降低,益气活血方组大鼠血浆 TPO 含量较模型组明显降低。因此,蜈蚣提取液能降低局灶性脑缺血再灌注大鼠血浆 vWF 和 TPO 的含量及生物活性,改善内皮细胞损伤和血小板功能,有效抑制血小板黏附和聚集,防止血栓形成,从而减轻脑缺血再灌注造成的损伤,可作为防治心脑血管疾病的途径。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:2473.

[2] 王键,许冠荪,李玉梅,等. 脑络通对脑缺血损伤防治作用的实验观察[J]. 中国中医基础医学杂志,2001,7(2):26.

[3] 张明泉,王亚利,温瑞书,等. 蜈蚣提取液对大鼠心脏血流动力学的作用研究[J]. 河北中医,2004,26(9):716.

[4] 李净,王键. 益气活血法改善气虚血瘀证局灶性脑缺血再灌注模型鼠生物学特征的有效性评价[J]. 中国中医基础医学杂志,2003,9(4):22.

[5] 潘照斌,李秉朝,廖月娥,等. 黄芩叶总黄酮对大鼠实验性脑缺血保护作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):223.

[6] 赖真,李丽珊,程少兵,等. 黄芪加红花对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及半胱氨酸蛋白酶-3 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(2):45.

神秘果混合果粉营养成分及其抗疲劳和免疫作用

黄巨波, 刘红*, 祁海兰, 卢圣楼

(海南师范大学化学与化工学院, 海口 571127)

[摘要] 目的:评价神秘果、杨桃、木瓜和南瓜等 4 种水果组成的混合果粉(SDMFP)的营养成分和其抗疲劳、调节免疫作用。方法:运用费林试剂热滴定法测定总糖含量,直接干燥法测定水分含量,酸水解法测定粗脂肪含量,凯氏定氮法测定粗蛋白含量,原子吸收法测定微量元素含量来分析 SDMFP 的营养成分。取昆明种雄性小鼠,随机分成空白对照组(生理盐水),SDMFP 低、中、高剂量组(100,200,400 mg·kg⁻¹·d⁻¹),连续 ig 14 d,通过测定小鼠负重游泳时间、血乳酸(BLA)、血清尿素氮(BUN)和肝糖原(LG)的含量变化探索 SDMFP 对小鼠抗疲劳能力影响,测定小鼠单核巨噬细胞吞噬功能和迟发型变态反应(DTH)分析 SDMFP 对小鼠免疫作用的影响。结果:SDMFP 的营养成分为总糖 42.12% ± 1.10%,粗脂肪 1.97% ± 0.36%,粗蛋白 0.33% ± 0.08%,水分 11.31% ± 0.37%,K 5926.15 μg·g⁻¹,Mg 826.75 μg·g⁻¹,Ca 600.83 μg·g⁻¹。与空白对照组比较,SDMFP 高剂量组的小鼠负重游泳时间显著延长(P < 0.01),运动后血中 BLA 和 BUN 含量低于空白对照组,肌肉中的肝糖原含量高于空白对照组(P < 0.05),同时其巨噬细胞吞噬指数和胸腺、脾脏免疫器官质量得到明显的改善。结论:SDMFP 能显著提高小鼠抗疲劳能力,并能一定程度增强细胞免疫作用。

[关键词] 神秘果;混合果粉;抗疲劳;免疫作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0195-04

Anti-fatigue and Immune Function by Nutritional Constituents from *Synsepalum dulcificum* Mixing Fruit Power

HUANG Ju-bo, LIU Hong*, QI Hai-lan, LU Sheng-lou

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571127, China)

[Abstract] **Objective:** The anti-fatigue and immune properties by nutritional constituents from *Synsepalum dulcificum* mixing averrhoa carambola, carica papaya and pumpkin fruit powders (SDMFP) were evaluated. **Method:** The nutrition ingredients from SDMFP were analyzed as follows, the amount of total sugar using Fehling reagent hot titration, the content of moisture by directly dried, contents of crude fat and protein, were assayed by acid hydrolysis and Kjeldahl method respectively, trace elements contents were determined through the

[收稿日期] 20111230(006)

[基金项目] 海南省社会发展专项(2010SF007);海口市重点科技计划(2010-086);海南师范大学科技成果转化项目(JJCG1101)

[第一作者] 黄巨波,硕士研究生,从事食品科学研究, Tel:18789282876, E-mail:andly9726242@163.com

[通讯作者] *刘红,博士,教授,从事食品科学专业研究, E-mail:lhyd123@sohu.com

- [7] 夏新华,刘亚敏,赵光峰,等. 麝香配伍冰片对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的脑保护机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(2):42.
- [8] 翟从永,胡建鹏,王键,等. 三种中药复方对脑缺血再灌注大鼠血浆血管性血友病因子对血栓调节蛋白影响的比较研究[J]. 中国中医急症,2008,17(10):1419.
- [9] Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera [J]. Acta Haematol, 1958, 20(6):350.
- [10] 周霞,万军,黄国钧,等. 脑缺血动物模型检测指标研究进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(11):2802.
- [11] 马铁柱,万琪. 脑梗死患者血浆炎症因子、纤溶性的变化及对神经功能的影响[J]. 中国临床康复,2003,7(13):1875.
- [责任编辑 聂淑琴]