

不同干燥与提取方式处理的人源胎盘防治贫血活性差异研究

任季禹¹, 杨凯², 靳梦^{3, 4}, 张姗姗^{3, 4}, 于妙慧^{3, 4}, 辛秀秀¹, 李晓彬^{3, 4}, 刘可春^{3, 4}, 张云^{3, 4}, 臧传宝^{1*}, 盛文龙^{3, 4*}

1. 银丰低温医学科技有限公司, 山东 济南 250000

2. 聊城市食品药品检验检测中心, 山东 聊城 252001

3. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

4. 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

摘要: 目的 评价经不同干燥与提取方式处理后的人源胎盘样品对斑马鱼贫血模型的影响。方法 取健康产妇新鲜胎盘, 经-40℃冷却后于真空冷冻干燥机中冷冻干燥, 研磨成粉, 制成胎盘冻干粉; 取健康产妇的新鲜胎盘, 于90℃热风循环烘箱中烘干, 研磨成粉, 制成胎盘烘干粉。胎盘冻干粉或烘干粉分别经胰蛋白酶酶解提取、梯度溶剂(依次为水、50%乙醇水、无水乙醇、二氯甲烷)提取。发育至56 h(56 hpf)的健康野生型AB系斑马鱼分为对照组、模型组、给药组, 对照组给予斑马鱼养殖水, 模型组给予0.1 μg·mL⁻¹苯酚溶液制备贫血模型, 给药组给予苯酚与胎盘冻干粉或烘干粉各提取样品, 样品质量浓度分别为10、20、50、100 μg·mL⁻¹, 培养至3 dpf, 采用O-dianisidine染色法对斑马鱼进行红细胞染色。结果 与对照组比较, 模型组红细胞染色积分吸光度显著下降($P < 0.001$)。与模型组比较, 胎盘冻干粉酶解样品100 μg·mL⁻¹组, 水提样品10、20、50、100 μg·mL⁻¹组, 醇提样品20、100 μg·mL⁻¹组, 50%醇提样品10、20 μg·mL⁻¹组, 二氯甲烷提取样品10、20、50、100 μg·mL⁻¹组红细胞染色积分吸光度显著增加($P < 0.05, 0.001$); 胎盘冻干粉酶解样品20 μg·mL⁻¹组, 水提样品10、20 μg·mL⁻¹组, 醇提样品20、50、100 μg·mL⁻¹组, 二氯甲烷提取样品50、100 μg·mL⁻¹组红细胞染色积分吸光度显著增加($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。经酶解、水提取及二氯甲烷提取的胎盘冻干粉样品和经水提取、醇提取及二氯甲烷提取的胎盘烘干粉样品作用呈浓度相关性, 其中冻干粉水提取样品100 μg·mL⁻¹效果最佳, 染色后的红细胞积分吸光度达到对照组的94.77%。结论 人源胎盘样品处理方式可优先选择冻干技术结合水提取方式。

关键词: 人源胎盘; 贫血; 斑马鱼; 冻干; 烘干; 水提取

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)08-1592-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.017

Anti-anemia activity of human placenta from different drying and extraction methods

REN Jiyu¹, YANG Kai², JIN Meng^{3, 4}, ZHANG Shanshan^{3, 4}, YU Miaohui^{3, 4}, XIN Xiuxiu¹, LI Xiaobin^{3, 4}, LIU Kechun^{3, 4}, ZHANG Yun^{3, 4}, ZANG Chuanbao¹, SHENG Wenlong^{3, 4}

1. Yinfeng Cryogenic Medical Technology Co., Ltd., Jinan 250000, China

2. Liaocheng Food and Drug Testing Center, Liaocheng 252001, China

3. Institute of Biology, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

4. Shandong Engineering Research Center of Human Disease Zebrafish Model and Drug Screening, Jinan 250103, China

Abstract: Objective To explore the anti-anemia activity of human placenta from different drying and extraction methods. **Methods** Fresh placentas from healthy mothers were taken, cooled at -40 °C, freeze-dried in a vacuum freeze-dryer, ground into powder, and made into placenta freeze-dried powder. The fresh placenta of healthy puerpera was dried in a hot air circulation oven at 90 °C and ground into powder to make placenta baking powder. Placenta freeze-dried powder or baking powder were extracted by trypsin enzymolysis and gradient solvent (water, 50% ethanol water, anhydrous ethanol, dichloromethane). The healthy wild type AB

收稿日期: 2022-03-08

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2021MC055); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合试点工程项目(2022PX022); 山东省自然科学基金优秀项目(ZR2020YQ60); 国家自然科学基金青年项目(42006090); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-ZD08)

第一作者: 任季禹(1985—), 男, 中级工程师, 主要从事冻干技术产品和服务的开发及应用。E-mail: renjiyu@yinfeng.com.cn

***共同通信作者:** 盛文龙(1988—), 男, 助理研究员, 博士, 主要从事药物活性筛选和早期安全性评价等。E-mail: shengwenlong1121@163.com

臧传宝(1984—), 男, 高级工程师, 硕士, 主要从事组织工程材料的开发和干细胞研究。E-mail: chuanbaozang@163.com

zebrafish of 56 h post fertilization (56 hpf) were divided into control group, model group and administration group. The control group was given zebrafish culture water, the model group was given $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ phenylhydrazine solution to prepare anemia model, and the administration group was given phenylhydrazine and placenta freeze-dried powder or baking powder extract samples. The sample concentrations were 10, 20, 50 and $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively, and cultured to 3 dpf. *O*-dianisidine staining was used to stain zebrafish red blood cells. **Results** Compared with control group, the optical density of erythrocyte staining integral in model group decreased significantly ($P < 0.001$). Compared with model group, the optical density of erythrocyte staining integral of placenta freeze-dried powder enzymolysis sample $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, water extraction 10, 20, 50, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, alcohol extraction 20, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, 50% alcohol extraction 10, $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group and dichloromethane extraction 10, 20, 50 and $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group were significantly increased ($P < 0.05, 0.001$). Compared with model group, the optical density of erythrocyte staining integral of placenta baking powder enzymolysis sample $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, water extraction 10, $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, alcohol extraction 20, 50, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, and dichloromethane extraction 10, 20, 50 and $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The effect of enzymolysis, water extraction and dichloromethane extraction of placenta freeze-dried powder, and water extraction, alcohol extraction and dichloromethane extraction of baking powder was correlated with dose. The effect of water extraction of placenta freeze-dried powder $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group was the best, and the integrated optical density of red blood cells after staining reached 94.77% of control group. **Conclusion** Freeze-drying followed by water extraction process was the preferred recommended production process to obtain better anti-anemia activity.

Key words: human placenta; anemia; zebrafish; freeze-drying; baking; aqueous extraction

伴随国内外学者对动物胎盘药效的深入研究,尤其是针对人源胎盘的生物活性评价,胎盘的多种功效不断显现,以补血、抗衰老、抗氧化、提高免疫力等生物活性为主^[1-2]。人源胎盘作为哺乳动物胎盘的主要研究对象,其入药历史久远。《本草纲目》称其具有“安神养血、补气、益精、解毒、改善造血”的作用,对“疲劳、消瘦、衰弱者”有奇效,“久服者,耳聪目明,须发黑,延年益寿,有夺造化之功”,可通过单独或配伍入药等方式,达到最佳疾病预防或治疗效果^[3]。传统中医理论与实践均指出由人源胎盘制备得到的紫河车,在防治贫血领域具有显著疗效。紫河车发挥该功效可能与其含有丰富的细胞因子、微量元素、激素、酶、免疫因子等活性物质有关,已被广泛应用。

传统制药中,胎盘处理方式以烘干和炮制技术为主,然而,高温易导致其营养元素流失严重,影响药效。比较烘干技术,冻干技术是在低温真空环境下使产品脱水冻干,较少破坏组织内生物分子的分子结构与活性,很好地保留了产品原有的功效^[4-5]。此外,不同提取方式如酶解、水提、醇提等,对药品药效也具有一定的影响^[6-8]。

本研究对经过不同干燥技术(冻干技术、烘干技术)与提取方式(水提取、50%乙醇水提取、醇提取、二氯甲烷提取、酶解后提取)得到的人源胎盘样品,开展防治贫血活性评价,旨在优化与筛选出具有更好贫血活性功能的胎盘干燥技术与提取方式。

1 材料

1.1 实验动物

6月龄成年野生AB型斑马鱼,由山东省科学院

生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供,雌雄斑马鱼在照明14 h/黑暗10 h的恒温(28 ± 0.5)℃环境下分开饲养;在斑马鱼使用过程中,严格遵照齐鲁工业大学(山东省科学院)动物保护和使用委员会的规定,符合齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所实验动物福利伦理委员会(实验动物伦理批号3701027331728)要求。

1.2 药物及主要试剂

所有胎盘均来自山东省妇幼保健院产妇捐献,捐献及后续组织处理均已获当事人知情同意。在人源胎盘使用过程中,严格遵照《卫生部关于产妇产后胎盘处理问题的批复》(卫政法发(2005)123号)相关规定,规范使用人源胎盘。苯肼、*O*-dianisidine染色试剂盒等购自Sigma公司,脱模剂、甲基纤维素、培养板、玻璃片等均购自鼎国昌盛生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

SZX16型荧光显微镜及DP2-BSW图像采集系统(日本Olympus公司);Forma 3111型水套式恒温培养箱(美国Forma公司);斑马鱼养殖饲养设备(北京爱生科技公司);GZL-3型真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 冻干粉、烘干粉制备

2.1.1 胎盘冻干粉制备 取健康产妇新鲜胎盘,经低温冷链运输至实验室。去除胎盘羊膜及周边组织,以生理盐水反复清洗数次,并搅碎后置于托盘。经 -40°C 冷却后,于真空冷冻干燥机中冷冻干燥。

将干燥后的胎盘组织研磨成粉,制成胎盘冻干粉,备用。

2.1.2 胎盘烘干粉制备 取健康产妇的新鲜胎盘,经低温冷链运输至实验室。去除胎盘羊膜及周边组织,以生理盐水反复清洗数次,并搅碎后置于托盘。胎盘组织于90℃热风循环烘箱中烘干。将干燥后的胎盘组织研磨成粉,制成胎盘烘干粉,备用。

2.2 提取方法

2.2.1 酶解提取样品 称取胎盘冻干粉或烘干粉各20g,按10 000 U·g⁻¹酶底比加入胰蛋白酶80mg(酶活力为2 500 U·kg⁻¹),加入500 mL水。采用1 mol·L⁻¹ NaOH溶液调节溶液pH值至7.5,于45℃超声酶解5 h。以100℃水浴终止反应,离心取上清,减压浓缩即得。冻干粉与烘干粉的提取率(提取物干物质质量/原料投样量)分别为68.54%、59.48%。

2.2.2 梯度溶剂提取样品 ①水提样品:称取胎盘冻干粉或烘干粉各20g,加入20倍量蒸馏水,于室温条件下静置12 h。离心后,上清液减压浓缩即得,滤渣备用。冻干粉与烘干粉的提取率分别为28.54%、18.43%。

②50%醇提样品:取经水提取后的胎盘冻干粉或烘干粉滤渣,加入15倍量50%乙醇水,于45℃超声提取2次,每次2 h。离心后,上清液合并,减压浓缩即得,滤渣备用。冻干粉与烘干粉的提取率分别为4.68%、3.66%。

③醇提样品:取经50%乙醇水提取的胎盘冻干粉或烘干粉滤渣,加入15倍量无水乙醇,于45℃超声提取2次,每次2 h。滤过,滤液减压浓缩即得,滤渣备用。冻干粉与烘干粉的提取率为4.25%、3.35%。

④二氯甲烷提取样品:取上述所得的胎盘冻干粉或烘干粉样品滤渣,加入15倍量二氯甲烷,于45℃超声提取2次,每次2 h。滤过,滤液减压浓缩即得。冻干粉与烘干粉的提取率为0.81%、0.87%。

2.3 活性评价方法

斑马鱼养殖方式按本实验室规范方法^[9-11]。选取发育至56 h(56 hour post fertilization, 56 hpf)的健康野生型AB系斑马鱼,脱膜后转移至24孔板,分为对照组、模型组、给药组。对照组给予斑马鱼养殖水,模型组给予0.1 μg·mL⁻¹苯肼溶液^[12-14],给药组给予0.1 μg·mL⁻¹苯肼与胎盘冻干粉或烘干粉各提取样品,提取样品质量浓度分别为10、20、50、100 μg·mL⁻¹,每组12条。置于27.0~28.5℃的恒温培养箱中培养至3 dpf。以斑马鱼养殖水清洗斑马鱼3次,采用O-dianisidine染色法对斑马鱼进行红细胞染色^[15],染色15 min。染色结束后于显微镜下观察、拍照,以Image J软件测量红细胞染色积分吸光度,利用

Excel、Origin Pro 8.0及Photoshop等软件进行相关图表制作与统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,统计学分析采用One-Way-ANOVA及t-test检验。

3 结果

3.1 胎盘冻干粉各提取样品防治贫血情况

与对照组比较,模型组红细胞染色积分吸光度显著下降($P<0.001$);与模型组比较,胎盘冻干粉酶解样品100 μg·mL⁻¹组,水提样品10、20、50、100 μg·mL⁻¹组,醇提样品20、100 μg·mL⁻¹组,50%醇提样品10、20 μg·mL⁻¹组,二氯甲烷提取样品10、20、50、100 μg·mL⁻¹组红细胞染色积分吸光度显著增加($P<0.05$ 、0.001)。经酶解、水提取及二氯甲烷提取的胎盘冻干粉样品防治贫血作用呈浓度相关性,其中水提取样品100 μg·mL⁻¹效果最佳,染色后的红细胞积分吸光度达到对照组的94.77%。此外,100 μg·mL⁻¹胎盘冻干粉50%醇提样品引起斑马鱼死亡。结果见图1。

3.2 胎盘烘干粉各提取样品防治贫血情况

与模型组比较,胎盘烘干粉酶解样品20 μg·mL⁻¹组,水提样品10、20 μg·mL⁻¹组,醇提样品20、50、100 μg·mL⁻¹组,二氯甲烷提取样品50、100 μg·mL⁻¹组红细胞染色积分吸光度显著增加($P<0.05$ 、0.01、0.001)。经水提取、醇提取及二氯甲烷提取的胎盘烘干粉样品作用呈浓度相关性,其中醇提样品50 μg·mL⁻¹效果最佳,斑马鱼红细胞染色积分吸光度达到对照组水平的88.43%,但仍弱于冻干技术与水提取条件下的改善效果。此外,高浓度的胎盘烘干粉酶解、水提、50%醇提样品会引起斑马鱼死亡。结果见图2。

经冻干技术与水提取方式获取的样品防治贫血效果最佳。此外,冻干技术结合二氯甲烷提取,烘干技术结合水提取、醇提取或二氯甲烷提取方式,其胎盘样品也具备一定的防治贫血功能。

4 讨论

紫河车为健康人的干燥胎盘,在中医临床应用中已有上千年的入药历史。关于紫河车防治贫血的功能,《本草拾遗》《本草纲目》等中医药著作中均有记载。为弘扬传统中医文化,优化中药提取工艺,中药材功效的深挖掘、新表征、再评价成为中药迈向规范与科学、走向现代化发展的重要一步。

本实验发现通过不同样品干燥技术与提取方式获得的胎盘冻干粉与烘干粉样品,对苯肼造成的斑马鱼贫血症状均具有显著的改善作用,即上述样品具备防治贫血功能。实验结果显示,胎盘先后经

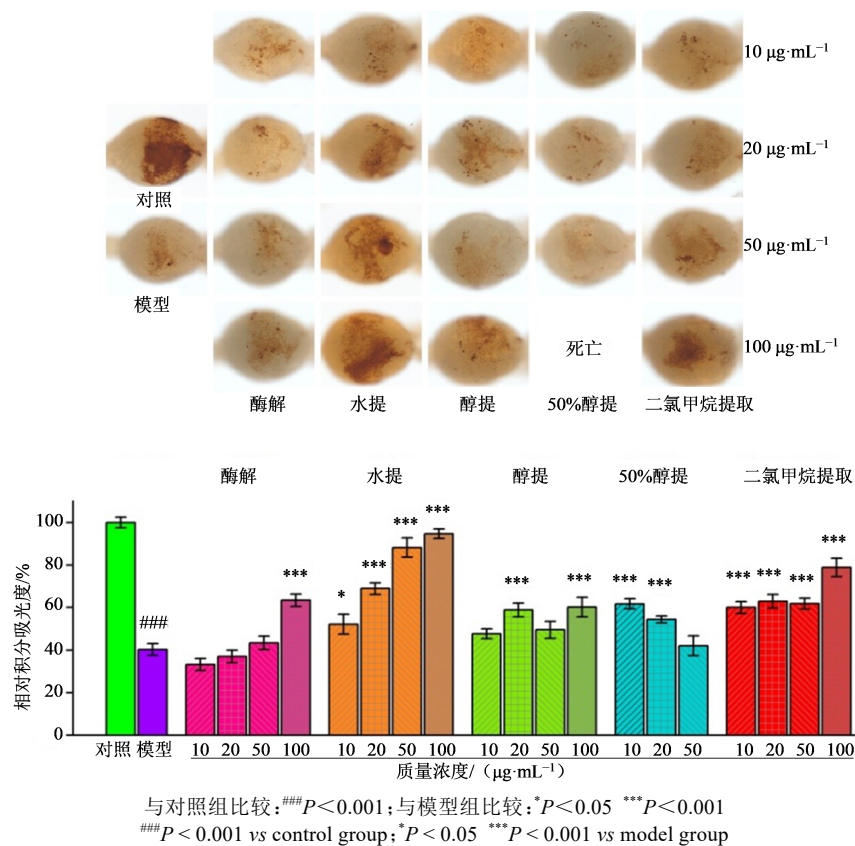


图1 胎盘冻干粉对斑马鱼红细胞染色的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig. 1 Effects of freeze-dried placenta sample on erythrocyte staining of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=12$)

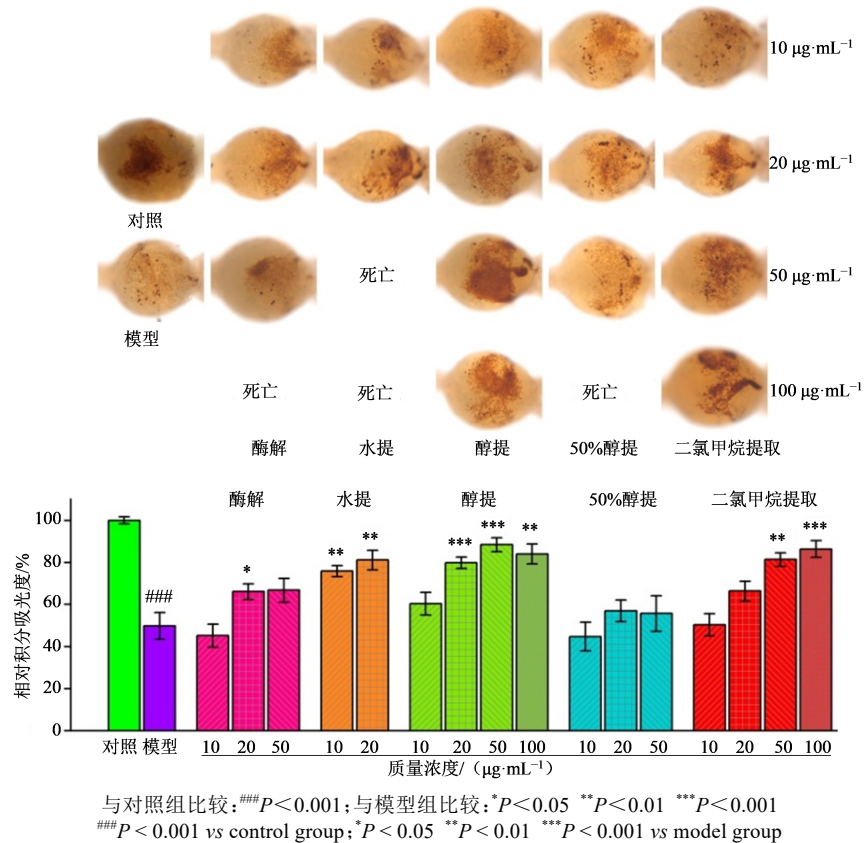


图2 胎盘烘干粉对斑马鱼红细胞染色的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig. 2 Effects of baked placenta sample on erythrocyte staining of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=12$)

冻干技术与水提取方式处理后,防治贫血效果最佳。此外,冻干技术结合二氯甲烷提取方式,烘干技术结合水提取、醇提取或二氯甲烷提取方式,胎盘样品也具备一定的防治贫血活性。

冻干技术过程中,首先将含水物质冻结成固态,然后在低温下使其中的水分以固态升华到气态,达到干燥和后续保存的目的。该工艺将保持物体体积与形状,尤其是能保持小分子物质的活性,具备高温烘烤工艺不具有的保持物质活性特点。水提取技术具有环保、经济、安全等特点,适合提取极性大的化合物,如苷类、多肽类、多糖、有机酸盐类、生物碱盐等。上述水溶性化合物被摄入体内后,易被吸收,进而发挥生物活性。本研究中,冻干技术与水提取方式工艺下的胎盘制品具有最佳的补血效果,在生产工艺选取上为类似的研究与应用提供了指导性建议。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王亚琼, 祝庆华, 唐明文, 等. 紫河车临床应用研究概况 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(7): 189-192.
Wang Y Q, Zhu Q H, Tang M W, et al. Research on the clinical application of placenta hominis [J]. Asia Pac Tradit Med, 2020, 16(7): 189-192.
- [2] Burton G J, Jauniaux E. What is the placenta? [J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 213(4): S6.e1-S6.e4.
- [3] 刘学龙, 李杨帆, 章从恩. 同仁乌鸡白凤丸联合紫河车对慢性病毒性肝炎患者临床效果观察 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(5): 133-136.
Liu X L, Li Y F, Zhang C E. Effect of Tongren Wuji Baifeng Pill combined with placenta hominis on patients with chronic viral hepatitis and the influence of serum TNF- α content [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2019, 21(5): 133-136.
- [4] Nicy A B, Velayutham P, Ganesan P, et al. Functional and structural characteristics of chocolate flavoured cake incorporated with surimi powder from *Nemipterus* species [J]. J Food Sci Technol, 2021, 58(11): 4344-4348.
- [5] 张婷, 何强. 真空冷冻干燥技术在黄秋葵加工中的应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(13): 4290-4294.
Zhang T, He Q. Application of vacuum freeze-drying in the processing of okra [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(13): 4290-4294.
- [6] 陈燕瑞, 曾以旺, 王少平, 等. 黄芪中免疫活性成分的不同提取方式比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 42-44.
Chen Y R, Zeng Y W, Wang S P, et al. Comparison of different extraction methods for immunologically active components in *Astragali Radix* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2014, 20(16): 42-44.
- [7] 张洪利, 莫小路, 汪小根. 溪黄草不同提取方法抗菌活性比较研究 [J]. 中医药导报, 2014, 20(5): 78-79, 85.
Zhang H L, Mo X L, Wang X G. Comparative antibacterial activity of *Rabdosia serra* (maxim) hara extracted by conventional and supercritical methods [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 20(5): 78-79, 85.
- [8] 梁瑞峰, 李兵杰, 葛文静, 等. 防风不同提取部位的燥性差异及其对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜水通道蛋白的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3312-3320.
Liang R F, Li B J, Ge W J, et al. Dryness difference of different extracts of *Saposhnikovia divaricata* and their effects on synovial aquaporin in collagen-induced arthritis rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(11): 3312-3320.
- [9] Sheng W L, Wang K, Gao N, et al. A novel *p*-dimethylaminophenylether-based fluorescent probe for the detection of native ONOO⁻ in cells and zebrafish [J]. Analyst, 2021, 146(17): 5264-5270.
- [10] 盛文龙, 刘可春, 武云, 等. 黑蒜促进血管生成作用 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(14): 301-305.
Sheng W L, Liu K C, Wu Y, et al. Growth-promoting of black garlic on angiogenesis [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(14): 301-305.
- [11] Lumley A I, Zhang L, Ernens I, et al. The long noncoding RNA landscape of cardiac regeneration in zebrafish [J]. Canadian J Cardiol, 2020 (37), 484-492.
- [12] 朱成悦, 张姗姗, 杨飞, 等. 基于斑马鱼模型的蟾酥甲醇提取物抑制血管生成和抗炎活性研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(7): 1392-1397.
Zhu C Y, Zhang S S, Yang F, et al. Antiangiogenic and anti-inflammatory activities of methanol extract of *Bufo venenum* based on zebrafish model [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(7): 1392-1397.
- [13] Gardner P J, Liyanage S E, Cristante E, et al. Hypoxia inducible factors are dispensable for myeloid cell migration into the inflamed mouse eye [J]. Sci Rep, 2017, 7: 40830.
- [14] Shafizadeh E, Peterson R T, Lin S. Induction of reversible hemolytic anemia in living zebrafish using a novel small molecule [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2004, 138(3): 245-249.
- [15] Han L W, Kong H T, Liu F S, et al. Protective effect and mechanisms of new gelatin on chemotherapy-induced hematopoietic injury zebrafish model [J]. Evid-Based Compl Alt Med, 2019, 2019(5): 1-11.

[责任编辑 兰新新]