

胞的功能表达,有利于体外软骨组织重建。在组织工程与生物材料研究领域有着很好的应用前景。

#### References:

- [1] Reddi A H. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials [J]. *Tissue Eng*, 2000, 6(4): 351-359.
- [2] Cui Y L, Qi A D, Liu W G, et al. Biomimetic surface modification of poly (L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes *in vitro* [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(21): 3859-3868.
- [3] Maghni K, Nicolescu O M, Martin J G. Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 223(2): 185-194.
- [4] Marques A P, Reis R L, Hunt J A. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites; *in vitro* studies [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(6): 1471-1478.
- [5] Farndale R W, Buttle D J, Barrett A J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosamino-

glycans by use of dimethylmethylene blue [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 883(2): 173-177.

- [6] Wyre R M, Downes S. An *in vitro* investigation of the PEMA/THFMA polymer system as a biomaterial for cartilage repair [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(4): 335-343.
- [7] Boyan B D, Schwartz Z, Swain L D, et al. Initial effects of partially purified bone morphogenetic protein on the expression of glycosaminoglycan, collagen, and alkaline phosphatase in nonunion cell cultures [J]. *Clin Orthop*, 1992 (278): 286-304.
- [8] Frahm S O, Rudolph P, Dworeck C, et al. Immunoenzymatic detection of the new proliferation associated protein p100 by means of a cellular ELISA: specific detection of cells in cell cycle phases S, G2 and M [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 223(2): 147-153.
- [9] Fuhrmann S, Kirsch M, Wewetzer K, et al. Use of cell ELISA for the screening of neurotrophic activities on minor cell populations in retinal monolayer cultures [J]. *J Neurosci Methods*, 1997, 75(2): 199-205.

## 蜂胶提取物对流动血液中血小板与纤维蛋白原聚合作用的影响

张云香<sup>1,2</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 潘艳华<sup>3</sup>, 韩纪举<sup>1</sup>, 任道玲<sup>1</sup>, 吴亚平<sup>4</sup>, 王家富<sup>1\*</sup>

(1. 泰山医学院, 山东 泰安 271000; 2. 潍坊市人民医院, 山东 潍坊 261041;

3. 泰安市中心医院, 山东 泰安 271000; 4. 乌特勒兹大学, 荷兰)

在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的发生、发展过程中, 脂质代谢紊乱、血管内皮损伤、炎症反应和血栓形成等因素起关键性作用。血栓的形成常与血小板、血管、凝血因子、纤溶系统、抗凝系统、红细胞、白细胞、血黏度和血液流变性等因素有关。其中血小板数量增多, 黏附、聚集性增高、血液凝固性增强和纤溶活性减弱等尤为重要。在高切变率条件下, 血小板黏附聚集是依赖于 von Willebrand factor (vWF) 与血小板糖蛋白 (glycoprotein, GP) I b 的交互作用, 导致血小板活化和血小板整合素  $\alpha_{11b}\beta_3$  的构象改变, 使整合素上的纤维蛋白原 (fibrinogen, Fg) 与血小板之间形成的稳定的聚集物网络群<sup>[1]</sup>, 造成附壁血栓的形成, 促进了 AS 的发生、发展。因此, 抗血小板黏附和聚集在 AS 的防治中具有重要作用。

蜂胶是蜜蜂采集松树和杨树等植物的芽孢分泌物和树脂等, 并混入蜂蜡及其上颚腺分泌物混合而

成的一种具有芳香味的胶状物。其抗炎、抗肿瘤、免疫调节等作用已研究甚多<sup>[2~4]</sup>, 但改善血小板活性的形态学研究尚未报道, 本实验运用体外灌注的方法, 研究了蜂胶提取物对血小板与纤维蛋白原聚合作用的影响。

### 1 材料

1.1 药物与试剂: 7 mg/mL 纤维蛋白原 (荷兰乌特勒兹大学吴亚平博士赠送); 阿魏酸 (批号 20031118, 国药集团化学试剂有限公司); 蜂胶 24% 乙醇提取 (EEP, 源自新鲜的泰山松柏蜂胶); 肝素钠 (天津市生物化学制药厂); 牛血清白蛋白 (BSA, 上海伯奥生物科技有限公司); 乙醇和甲醇均为分析纯; 三蒸水。阿魏酸和蜂胶提取液均用 24% 乙醇配制成 2.0 mg/mL 溶液用于灌注实验<sup>[5]</sup>。

1.2 设备: 体外灌注设备—灌注池 (荷兰乌特勒兹大学血栓与凝血实验室提供) 见图 1, 恒温水箱 (宁波新芝生物科技股份有限公司); micromfusion

收稿日期: 2006-03-10

基金项目: 山东省教育厅基金资助项目 (J00K62)

作者简介: 张云香 (1971—), 女, 山东省潍坊市人, 主治医师, 硕士, 2006 年上半年在荷兰乌特勒兹大学从事血栓与凝血研究, 现于潍坊市人民医院病理科工作, 研究方向为 AS 的发病机制。E-mail: dewdrop720@163.com

\* 通讯作者 王家富 Tel: (0538) 6229902 E-mail: jfwang@tsmc.edu.cn.

pump WZ—50G (浙江大学医疗器械厂); 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司 SHB—Ⅲ); K 51 倒置式基础型显微镜 (OLYMPUS B×51) 及 Image-Pro® Plus-Version 4.0 for windows™ 图像处理系统; 喷雾器 (Badger model 100; gadger brush, Franklin park, IL)。

## 2 方法

2.1 蜂胶提取: 采集新鲜的泰山松柏蜂胶, 用 24% 乙醇作溶剂, 参照文献方法<sup>[6]</sup>略加改进提取蜂胶。蜂胶提取液中蜂胶提取率为 21.6%, 总黄酮提取率为 7.28%, 含铅  $1.65 \times 10^{-7}$ 。将提取液置棕色瓶中 4℃ 保存备用。蜂胶质量浓度选择根据文献方法<sup>[7]</sup>并用单个血小板消融实验 (荷兰乌特勒兹大学血栓与凝血实验室提供的方法), 排除了药物质量浓度对血液内血小板自身聚集的影响。

2.2 防凝血制备: 分别抽取 10 d 内未服用任何药物的 3 例健康工作人员静脉血 20 mL, 注入预先加有肝素的试管中立即充分混匀。使肝素在血液中的浓度为 5 U/mL。

2.3 纤维蛋白原膜的制备: 用 PBS 缓冲液稀释纤维蛋白原储存液使其体积分数为 50%, 用喷雾器将其均匀喷洒在洁净的 20 mm×20 mm 的盖玻片上, 大约  $50 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ , 晾干, 1 h 后用 1% BSA/HEPES 封闭, 10 min 后备用。

2.4 血液灌注实验<sup>[8]</sup>: 盖玻片用纤维蛋白原包被之后, 将纤维蛋白原表面向下, 覆盖在灌注池上面, 灌注池上有一个高 0.1 mm、宽 0.2 cm 小槽子, 与上方的盖玻片围成一个管腔。调试灌注装置使切变力为 1000/s, 血液体积流量为 10 mL/h。实验用的防凝血液标本置于 37℃ 预温 5 min 后, 由外接管道单向注入灌注池。灌注时间 5 min。灌注完毕, 取下盖玻片用 HEPES 冲洗残留液体后, 即刻用 1.25% 戊二醛固定, 室温 10 min, 或 4℃ 过夜, 甲醇脱水, 晾干, May-Grü nwald-Giemsa 染色。每组实验至少重复 3 次, 即灌注后的盖玻片每组至少有 3 片是良好的。用 K 51 倒置式基础型显微镜观察血小板在盖玻片纤维蛋白原膜表面的附着情况, 高倍镜下采图, 每张盖玻片连续采图至少 20 幅传输于计算机, 3 张盖玻片累计采图数做为一个实验组数据。用 Image-Pro® Plus-Version 4.0 for windows™ 图像处理系统测量血小板的覆盖面积所占百分比, 以评价血小板黏附功能。

2.5 实验分组: 对照组为 24% 乙醇, 药物组为蜂胶乙醇提取物 (EEP), 阳性对照组为阿魏酸乙醇溶

液。分别取 3 种溶液加入防凝血中混匀, 使血液中的终质量浓度均为 1.0 mg/mL。置 37℃ 水浴备灌注用。

2.6 统计学处理: 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 应用 Graphpad Prism 4.0 和 Graphpad Instat v3.0 统计软件处理。

## 3 结果

当血液流经纤维蛋白原膜后, 可观察到血小板黏附于纤维蛋白原膜表面。对照组血小板分布密度较大, 而实验组血小板分布密度较均匀。蜂胶提取物组与对照组比较, 血小板黏附面积明显减少 ( $P < 0.001$ ); 阿魏酸组与对照组比较, 血小板黏附面积也明显减少 ( $P < 0.001$ ); 蜂胶组较阿魏酸组血小板黏附面积略少, 但差异不明显 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 血小板黏附面积结果

Table 1 Result of platelet adhesion area

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	n	血小板面积 ( $\bar{x} \pm s$ )/%
对照	—	60	28.03±7.880
阿魏酸	1.0	56	8.58±3.076
蜂胶提取物	1.0	60	7.01±3.069

## 4 讨论

本实验首先用人的纤维蛋白原创造了一个良好的黏附平面, 整个黏附实验过程都是在切应力为 1 000/s 的血液流动状态下完成的, 这个切应力相当于微小动脉的生理切应力<sup>[9]</sup>, 这就允许血小板经过多步骤、多程序与纤维蛋白原作用。本实验模拟了人体血液循环系统, 整个灌注过程都是在 37℃ 恒温下进行的, 密闭的灌注小室犹如一根血管, 覆盖在灌注槽上面用纤维蛋白原包被过的盖玻片, 相当于损伤的血管内膜。当控制血液在 5 min 内单向匀速流过纤维蛋白原膜表面后, 测量血小板在纤维蛋白原膜表面的覆盖面积百分比, 即统一时间点测量的血小板覆盖率, 能直接反映出血小板与纤维蛋白原作用后其黏附和聚集活性的变化。光镜下发现, 对照组经灌注后血小板在纤维蛋白原表面覆盖较密集, 而蜂胶提取物组和阿魏酸组血小板黏附密度明显降低, 呈散在分布, 可见血小板形态肿胀和伪足形成等不同程度的变化, 这表明终质量浓度为 1.0 mg/mL 的蜂胶提取物对血小板与纤维蛋白原的黏附聚集活性有显著的抑制作用。

蜂胶是一种成分非常复杂的化合物, 所含黄酮的量最为丰富。有研究证实<sup>[10]</sup>, 芹菜中黄酮类化合物能竞争性结合血小板表面的血栓烷 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 受体, 从而阻断了胶原和花生四烯酸诱导的血小板聚集和释放等活化功能。本实验用蜂胶提取物中黄

酮提取率为 7.28%，说明蜂胶的抗血小板聚集功能与其黄酮类化合物有密切关系。

本实验揭示出蜂胶提取物能明显抑制血小板与纤维蛋白原黏附和聚集作用，这为 AS 防治研究提供了一条新的思路，但血小板与纤维蛋白原作用后的活化途径有多种，荷兰乌特勒兹大学血栓与凝血实验室已经证实血小板与人纤维蛋白原的黏附水平依赖于血浆中的 vWF 水平和血小板表面的  $\alpha_2\beta_1$  受体的高表达<sup>[8,9]</sup>。蜂胶究竟是通过哪一条途径抑制血小板与纤维蛋白原作用后的活性表达，有待于进一步研究。

#### References:

- [1] Remijn J A, Wu Y P, Ijsseldijk M J W, et al. Absence of fibrinogen in afibrinogen-emia results in large but loosely packed thrombi under flow conditions [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 85: 736-742.
- [2] Han S, Sung K H, Yim D, et al. Activation of murine macrophage cell line RAW 264.7 by Korean propolis [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(6): 895-902.
- [3] Orsolich N, Sver L, Terzic S, et al. Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: a possible mode of antitumor action [J]. *Nutr Cancer*, 2003, 47(2): 156-163.
- [4] Wang M S, Fan H F, Xu H J, et al. Influences of propolis on blood and hematopoietic system [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(11): 588-589.
- [5] De Lange D W, van Golden P H, Scholman W L, et al. Red wine and red wine polyphenolic compounds but not alcohol inhibit ADP-induced platelet aggregation [J]. *Eur J Intern Med*, 2003, 14(6): 361-366.
- [6] Jiang Y S, Zhang C X, Zhang Y M, et al. Effects of different concentration of alcohol on the extraction of lead in propolis. [J]. *Apic Tech* (养蜂科技), 2003, 30(1): 2-4.
- [7] Han S, Sung K H, Yim D, et al. Activation of murine macrophage cell line RAW 264.7 by Korean propolis [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(6): 895-902.
- [8] Wu Y P, Vink T, Schiphorst M, et al. Platelet thrombus formation on collagen at high shear rates is mediated by von willebrand factor-glycoprotein Ib interaction and inhibited by von willebrand factor-glycoprotein I b/IIa interaction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 1661.
- [9] Roest M, Sixma J, Wu Y P, et al. Platelet adhesion to collagen in healthy volunteers is influenced by variation of both  $\alpha_2\beta_1$  density and von Willebrand factor [J]. *Blood*, 2000, 96(4): 1433-1437.
- [10] Guerrero J A, Lozano M L, Castillo J, et al. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 3(2): 369-376.

## 水花生提取物对 3 种气单胞菌的抑菌作用

刘长安<sup>1,2</sup>, 钦佩<sup>2</sup>, 周文宗<sup>2</sup>, 王光<sup>2</sup>

(1. 国家海洋环境监测中心, 辽宁大连 116023; 2. 南京大学生命科学学院 盐生植物实验室, 江苏南京 210093)

水花生 *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. 为苋科莲子草属多年生水陆两栖草本植物, 俗称革命草、空心苋、喜旱莲子草、空心莲子草、螃蜞菊等, 现主要分布于我国黄河流域以南地区。水花生有清热凉血、利水解毒之功效。临床用于流感、乙型脑炎、流行性出血热、麻疹和毒蛇咬伤等症。水花生的提取及其对疾病防治方面的研究曾有过报道<sup>[1~4]</sup>。本实验研究水花生提取物对 3 种气单胞菌的抑菌作用, 为其临床使用提供理论依据。

### 1 材料与与方法

1.1 中药的来源和加工: 实验用的水花生于 2003 年 9 月采于南京市玄武湖水中, 经南京大学钦佩教授鉴定。采集全草, 用自来水洗净、晒干。使用时将其置于干燥箱中烘干, 粉碎, 过 60 目筛备用。

1.2 提取物提取工艺: 称取水花生干粉 2 g 放入

100 mL 具塞的锥形瓶中, 加入 20 mL 蒸馏水, 用微波炉加热 5 min 后, 加入 75% 乙醇 50 mL, 加入蒸馏水 50 mL, 浸提 24 h 后滤过, 反复提取 3 次, 合并提取液, 蒸馏、浓缩液定容于 100 mL 量瓶中, 得到提取液。其主要成分为总黄酮 (质量分数 0.67%)。

1.3 体外抑菌试验: 试验菌为嗜水气单胞菌、点状气单胞菌和温和气单胞菌, 购于上海水产大学动物医学院, 将供试菌用普通斜面培养基复壮 2 次后, 用无菌生理盐水制成菌悬液, 浓度为  $2 \times 10^9$ /mL。

采用平皿内挖洞法<sup>[5]</sup>, 稍加改良后进行体外抑菌试验。无菌条件下, 用 12 cm 培养皿, 分别在固定位置放入外径为 8 mm、高 6 mm 的牛津杯 2 只, 待普通培养基冷却至 45 ℃ 时倒平板 (每个 30 mL), 放出部分水气, 尽量摆平, 待其凝固后用无菌镊子将牛津杯轻轻取出, 留下 2 个大小一致的孔洞, 并在底