

量,并且可以提高患者生存和生活质量,尤其是对于<5个脑转移病灶,被认为是一种治疗脑转移瘤的有效选择。Lal等研究对于1~3个脑转移瘤患者的研究显示,1~3个脑转移瘤采用单纯SRS和WBRT+SRS无生存差异,且WBRT+SRS组的不良反应高于单纯SRS组,因此建议对于单发以及少发脑转移瘤初始治疗可选用SRS。但是有些医疗机构因为条件所限没有SRS治疗设备,被迫选用普通外照射进行WBRT也是当前存在的现实情况从而导致部分脑转移瘤患者全脑放疗后颅内失败。本研究可能提示单发或者少发的脑转移瘤初始治疗选用SRS比失败后采用SRS补救治疗效果更好。

本研究结果显示出与国内外研究相似疗效,SRS挽救治疗WBRT失败的脑转移瘤患者表现出较长的颅内无进展生存时间以及总生存时间,且不良反应可以接受,这表明SRS是治疗脑转移瘤的一种安全有效的治疗手段。对于远期疗效以及不良反应,尚需进行深入的研究。

参考文献

- 1 Sneed PK, Suh JH, Goetsch SJ, *et al.* A multi-institutional review of radiosurgery alone vs. radiosurgery with whole brain radiotherapy as the initial management of brain metastases[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002, 53(3): 519-526
- 2 于兰,张小涛,张真,等.立体定向放疗联合全脑放疗和福莫司汀治疗脑转移瘤的临床观察[J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(10): 718-721
- 3 Gaspar LE, Scott C, Murray K, *et al.* Validation of the RTOG recursive partitioning analysis (RPA) classification for brain metastases[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 47(4): 1001-1006
- 4 Kelly PJ, Lin NU, Claus EB, *et al.* Salvage stereotactic radiosurgery

- for breast cancer[J]. *Brain Metastases Cancer*, 2012, 118(8): 2014-2020
- 5 Wong WW, Schild SE, Sawyer TE, *et al.* Analysis of outcome in patients reirradiated for brain metastases[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996, 34(3): 585-590
- 6 Kwon KY, Kong DS, Lee JI, *et al.* Outcome of repeated radiosurgery for recurrent metastatic brain tumors[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2007, 109(2): 132-137
- 7 van den Bent MJ. The role of chemotherapy in brain metastases[J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39(15): 2114-2120
- 8 Maranzani E, Trippa F, Pacchiarini D, *et al.* Reirradiation of brain metastases and metastatic spinal cord compression: clinical practice suggestions[J]. *Tumori*, 2005, 91(4): 325-330
- 9 Son CH, Jimenez R, Niemierko A, *et al.* Outcomes after whole brain reirradiation in patients with brain metastases[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 82(2): e167-e172
- 10 Hazuka MB, Kinzie JJ. Brain metastases: results and effects of re-irradiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 15(2): 433-437
- 11 Hanssens P, Karlsson B, Vashu R, *et al.* Salvage treatment of distant recurrent brain metastases with Gamma knife surgery[J]. *Acta Neurochir*, 2012, 154(2): 285-290
- 12 Chao TS, Barnett GH, Vogelbaum MA, *et al.* Salvage stereotactic radiosurgery effectively treats recurrences from whole-brain radiation therapy[J]. *Cancer*, 2008, 113(8): 2198-2204
- 13 Yomo S, Hayashi M. The efficacy and limitations of stereotactic radiosurgery as a salvage treatment after failed whole brain radiotherapy for brain metastases[J]. *J Neuro Oncol*, 2013, 113(3): 459-465
- 14 James LF, Sachin B, Sumit K, *et al.* Stereotactic radiosurgery in the management of brain metastases: an institutional retrospective analysis of survival[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 76(5): 1486-1492

(收稿日期:2013-11-26)

(修回日期:2013-12-02)

广东菲牛蛭中有效抗凝物质的分离纯化

卢舒凡 李庆国 许淑芹

摘要 目的 从广东菲牛蛭鲜体中分离纯化有效抗凝物质,并对其生化性质进行测定。方法 用水提醇沉、离子交换、反相层析法等分离纯化广东菲牛蛭中的抗凝物质,用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其蛋白的分子质量,并运用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS/MS)进行分析。结果 从广东菲牛蛭中分离出得到一种电泳纯的活性多肽,其相对分子质量为19.2kDa。所得菲牛蛭抗凝活性多肽每克蛋白所含单位抗凝活性 ≥ 2548000 ATU,活性回收率约为53%。结论 从广东菲牛蛭鲜体中分离出的活性抗凝多肽对凝血酶具有极强的抑制作用,开发应用前景广阔。

基金项目:广东省科技计划项目(2010A030100010);广州中医药大学校级科研基金资助项目

作者单位:510006 广州中医药大学中药学院

通讯作者:李庆国,副教授、硕士生导师,电子信箱:lqg8512@gzhtcm.edu.cn

关键词 菲牛蛭 抗凝物质 分离纯化

[中图分类号] R2 [文献标识码] A

Purification of Anticoagulation Protein from the Guangdong *Hirudinaria Manillensis*. Lu Shufan, Li Qingguo, Xu Shuqin. College of Chinese Pharmacy, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510006, China

Abstract Objective To purify anticoagulation protein from the Guangdong *Hirudinaria manillensis* and to determine the characterization. **Methods** The anticoagulation protein was purified by water extract and alcohol precipitate and column chromatography on DEAE - Sepharose F. F. and Reverse - phase chromatography. The molecular weight was calculated Using SDS - PAGE and analysis was taken by the MALDI - TOF - MS/MS. **Results** The purified protein showed a single band by SDS - PAGE with a molecular weight of 19.2kDa. The specific activity of per gram purified protein from the Guangdong *Hirudinaria manillensis* was 2548000ATU, yield 53%. **Conclusion** The anticoagulation protein was purified from the Guangdong *Hirudinaria manillensis* and showed the strong thrombin inhibitor.

Key words *Hirudinaria manillensis*; Anticoagulation protein; Purify

水蛭是我国传统中药,早在《神农本草经》中就有记载。同时,水蛭也是一味世界性的动物药,许多国家如埃及、欧洲都有外用活水蛭治病的传统。直到 1884 年,才由 Haycraft 发现医蛭提取物具有抗凝活性,拉开了水蛭素应用研究的序幕^[1]。目前,我国对水蛭的研究主要侧重水蛭的各种疗效和药理作用,而对有效成分的研究远远滞后于国外,除氨基酸和抗凝活性成分测定外,国内大部分蛭类均未见有效成分的报道。在水蛭研究方面,目前存在的两大问题是物种来源混乱、有效成分不清晰。本研究以广东菲牛蛭(俗称“金边蚂蟥”)为材料,分离纯化其有效抗凝物质,为后续的结构分析、药理药效研究、剂型研制及应用打下基础。

材料与方 法

1. 仪器:JJ-2 组织匀浆捣碎机(江苏金坛环宇科学仪器厂生产),SHZ-82 恒温振荡器(江苏金坛富华仪器有限公司生产),TGL-16B 高速台式离心机(上海安亭科技仪器厂生产),中低压层析柱(上海楚定生产),MSC050 杯式超滤器(上海摩速有限公司生产),电泳仪(北京伯乐科学公司生产)。

2. 试验药品:广东菲牛蛭(广州水蛭生物科技有限公司生产),DEAE-Sephrose F. F. (Amersham 公司),SP-120-40/60-ODS-BP(Daiso 公司),凝血酶,纤维蛋白原,蛋白标准 marker(均为 Sigma 公司生产),BCA 试剂盒(广州美津生物技术公司生产)。

3. 凝血酶滴定法^[2]:在 $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下,吸取样品 20 μl ,置反应板孔中,加入含 0.5% 牛纤维蛋白原的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液 200 μl ,混合均匀,恒温 5min,滴加每 1ml 中 50 单位的凝血酶溶液(每分钟滴加 1 次,每次 5 μl ,边滴加边搅匀)至凝固,记录消耗凝血酶溶液体积,结果按下式计算: $C_2 = (C_1 \cdot V_1) / V_2$,式中 C_1 :凝血酶的单位浓度(单位 NIH/ml), V_1 :消耗凝血酶体积(单位 μl), C_2 :样品的单位抗凝活性(单位 ATU/ml), V_2 :样品加入量(单位 μl)。

4. 广东菲牛蛭中抗凝物质的分离纯化^[3,4]:(1)粗提:取

广东菲牛蛭冷冻鲜体 100g,与 5 倍量蒸馏水混合,置匀浆搅拌机中,10000r/min 破碎完全,4000r/min 冷冻离心 20min,收集上清液 I。上清液 I 加入冷乙醇,调整乙醇浓度为 20%,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 4h,8000r/min 冷冻离心 10min,收集上清液 II。上清液 II 继续滴加冷乙醇,调整乙醇浓度为 80%,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜,8000r/min 冷冻离心 20min,收集沉淀物,得菲牛蛭活性粗提物。(2)柱层析提纯:取菲牛蛭活性粗提物与 2 倍量 pH 6.5 PB 缓冲液混合,超声提取 10min,4000r/min 离心 10min,取上清液上柱。DEAE-Sephrose F. F. 阴离子层析柱(2.5cm $\times$ 20.0cm),以 pH 7.0 的 0.02mol/ml PB 为平衡缓冲液,0.10mol/L,0.25mol/L 和 0.8mol/L 氯化钠溶液进行等度洗脱,流速 1.2ml/min,以每管 8ml 收集蛋白质峰,254nm 紫外线在线监测,按凝血酶滴定法测定各管蛋白质峰的抗凝活性。收集具有抗凝活性的蛋白峰,浓缩除盐,得菲牛蛭抗凝活性组分。(3)反相柱纯化:取菲牛蛭活性组分上柱,ODS 反相柱(1.5cm $\times$ 40.0cm);洗脱体系 A:25% EtOH-0.05% TFA-0.03% NaH_2PO_4 ;B:30% EtOH-0.05% TFA-0.03% NaH_2PO_4 ;阶段洗脱,流速 1ml/min,6ml/管;254nm 紫外在线监测,按“凝血酶滴定法”测定各管蛋白质峰的抗凝活性,结果见图 2。收集具有抗凝活性的蛋白峰,冷冻干燥,得到菲牛蛭抗凝活性多肽。

5. 菲牛蛭活性多肽的生化性质:(1)纯度鉴定^[5]:采用三羟甲基氨基甘氨酸-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(tricine-SDS-PAGE)分析,4% 浓缩胶,15% 分离胶,凝胶厚度为 1mm。样品 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3min 使变性。(2)蛋白质含量测定:采用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测定蛋白浓度。以牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)作为标准蛋白,562nm 下测定其吸光度。(3)MALDI-TOF-MS/MS 鉴定:将电泳凝胶条带切下,进行 MALDI-TOF-MS/MS 分析。

结 果

1. 柱色谱提纯结果:取菲牛蛭活性粗提物过 DEAE-Sephrose F. F. 阴离子层析柱(2.5cm $\times$ 20.0cm)提纯,其紫外在线监测及各管抗凝活性结果见图 1。

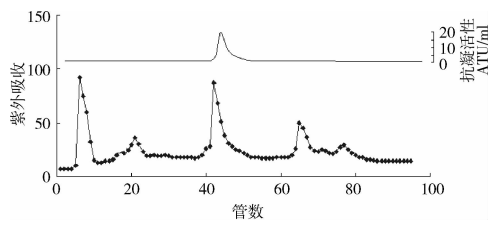


图1 DEAE-Sephrose F.F.层析图

0~15管. PS缓冲液梳洗;16~30管. 0.10mol/L NaCl洗脱;
31~60管. 0.25mol/L NaCl洗脱; 61~100管. 0.80mol/L
NaCl洗脱

2. 反相柱纯化结果:取浓缩除盐后得到的菲牛蛭活性组分上 ODS 反相柱,其紫外在线监测及各管抗凝活性结果见图 2。

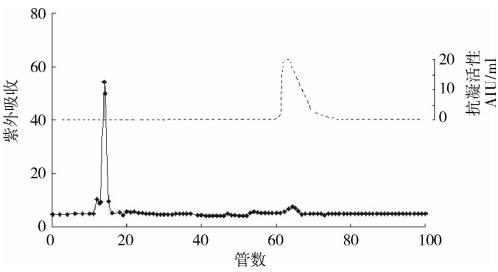


图2 ODS反相柱色谱峰

3. 纯度鉴定结果:菲牛蛭活性多肽在电泳结果显示为单一条带(图 3),这说明分离出的活性多肽是电泳纯的单链蛋白。以 x 代表迁移率 R_f , y 代表相对分子质量 MW 的对数,绘制标准曲线。 y 与 x 之间的直线回归方程为: $y = -1.5606x + 4.8616$, $r = 0.995$ 。菲牛蛭活性多肽的 R_f 值为 0.37。由回归方程计算出相对分子质量约为 19.2kDa。

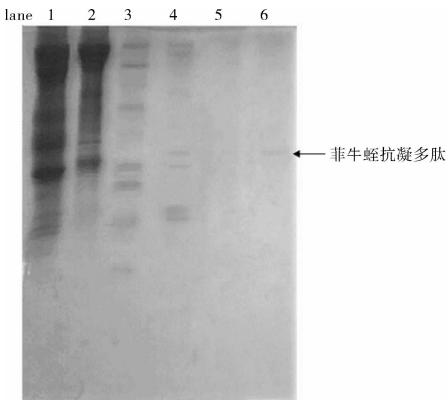


图3 菲牛蛭抗凝多肽的 Tricine-SDS-PAGE 分析

1. 菲牛蛭匀浆水清液;2. 菲牛蛭活性粗提液;3. marker;4. 菲牛蛭活性粗提液;5. 菲牛蛭抗凝多肽活性峰;6. 菲牛蛭抗凝多肽冻干品

4. 蛋白质含量测定结果:蛋白标准品浓度(x)和吸光度(y)的直线回归方程: $y = 0.8934x + 0.1007$, $r = 0.9999$ 。根据回归方程计算每分离纯化步骤所得的蛋白浓度、蛋白回收率及活性回收率,结果见表 1。所得菲牛蛭抗凝活性多肽每克蛋白所含单位抗凝活性不低于 2548000ATU。

表1 分离纯化各步骤蛋白浓度及活性收率

纯化步骤	总蛋白 (mg)	蛋白回 收率(%)	总活性 (ATU)	活性回 收率(%)
粗提	193.92	86.0	600	80
DEAE柱纯化	15.86	8.1	144000	80
ODS柱纯化	0.75	4.7	2548000	83

5. MALDI-TOF-MS/MS 鉴定结果:经质谱分析,得到菲牛蛭活性多肽电泳各条带的肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF),利用 CBNI 数据库检索发现:Band 7 和 Band 8 为细胞色素, score 100; Band 5 为嗜热蛋白, score 78;其他样品在数据库中未找到相似蛋白,提示所得菲牛蛭活性提取液中所含的抗凝物质与已发现的“水蛭素类”活性多肽结构不同,是一种新型抗凝血活性蛋白。

讨 论

目前,报道多采用生理盐水或低浓度的碱性缓冲液作为匀浆缓冲液,利用“盐溶”达到最大程度提取水蛭体内蛋白的目的。预试验过程中以匀浆上清液中溶出总活性为指标,考察生理盐水、蒸馏水和 PB 缓冲液的差异,结果表明三者对水蛭抗凝活性物质的溶出无统计学差异。考虑后续步骤采用离子柱层析分离,若采用盐溶液作为匀浆缓冲液,上柱前样品需经过脱盐处理,因此最终选用蒸馏水作为匀浆缓冲液。

蛋白质沉淀最常用的方法有盐析、有机试剂沉淀和酸沉淀 3 种。盐析沉淀蛋白质复溶性好,但含盐量高,需进一步脱盐;有机试剂沉淀与酸沉蛋白质纯化倍数高于盐析,但易引起蛋白变性;酸沉处理的样品需加入 NaOH 调节 pH 值后方可用于活性测定。实验以菲牛蛭活性物质回收率为指标,结合含盐量、活性测定、试剂毒性等因素,最终选用乙醇沉淀蛋白。

从广东菲牛蛭中分离得到的活性抗凝多肽,运用 MALDI-TOF-MS/MS 测定各蛋白条带的肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF),对 NCBI 数据库中收录的蛭类 FAST 图谱进行整理后发现其中收录的蛭类蛋白序列主要包含 3 类物质:细胞色素、

水蛭素类和重组抗凝多肽的序列或引物,而非牛蛭相关信息较少。粗提物经电泳分离后各蛋白条带的 PMF 在数据库未找到相似蛋白,一方面说明了数据库信息量的不足;另一方面也提示研究的目的蛋白与已发现的“菲牛蛭素”不同,属新型抗凝蛋白。

实验以菲牛蛭冷冻鲜体为原材料,结合超滤技术、层析技术进行分离纯化,全程以凝血酶滴定法和聚丙烯酰胺电泳分析对抗凝活性物质进行追踪,获得菲牛蛭抗凝活性多肽,经验证,此工艺路线稳定可行。后续研究将对菲牛蛭抗凝活性多肽进行氨基酸序列分析,探讨其抗凝作用机制。

参考文献

- 1 张卫,张瑞贤,李健,等. 中药水蛭品种考证及资源可持续利用发展探讨[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):914-918
- 2 刘晓帆. 龟甲、水蛭的品种与质量研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013:61-65
- 3 汪蜜,刘义梅,陈科力. 水蛭抗凝血活性物质提取工艺研究概况[J]. 亚太传统医药,2013,9(3):56-57
- 4 方富永,苗艳丽,苏舒华. 双水相萃取-凝胶色谱联用法提取菲牛蛭中的水蛭素[J]. 中国药理学杂志,2012,47(7):489-494
- 5 唐芸芸. 基于移动反应界面的聚丙烯酰胺凝胶电泳及其应用研究[D]. 上海:上海交通大学,2013:32-35

(收稿日期:2013-12-21)

(修回日期:2014-01-07)

西洛他唑通过 P38 MAPK 信号途径对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

蓝琳友 洪溪屏 蔡元晖

摘要 目的 探讨西洛他唑对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其作用机制。**方法** 将 75 只成年雄性 SD 大鼠按数字表法随机分成假手术组、模型组、西洛他唑低剂量(10mg/kg)组、西洛他唑中剂量(20mg/kg)组和西洛他唑高剂量(40mg/kg)组,每组 15 只,通过大脑中动脉阻塞法建立起脑缺血再灌注模型。按照 Longa EZ 法评估动物神经功能;Tunel 染色法检测大鼠脑神经细胞凋亡,采用 Western blot 法检测半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路相关蛋白的表达。**结果** 与假手术组相比较,模型组神经功能评分和细胞凋亡率均升高,差异有统计学意义;西洛他唑组的神经功能评分和细胞凋亡率较模型组均降低($P < 0.05$);与模型组相比较,caspase-3 和 MAPK 信号转导通路中 p-P38 的表达水平均随西洛他唑剂量的增加而逐渐降低($P < 0.05$),而西洛他唑对 MAPK 信号转导通路中其他成员 p-ERK 和 p-JNK 的表达无明显影响。**结论** 西洛他唑对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用与抑制神经细胞凋亡有关,其抗凋亡作用机制可能与抑制 P38 MAPK 信号转导途径有关。

关键词 脑缺血再灌注 凋亡 P38

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Protection Effect of Cilostazol on Cerebral Ischemia/reperfusion in Rats via P38 MAPK Pathway. Lan Linyou, Hong Xiping, Cai Yuanhui. The Fifth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To elucidate the anti-apoptotic protection and the mechanism of cilostazol on focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) in rats. **Methods** Seventy-five healthy male SD rats were divided into five groups ($n = 15$) for experiments: sham-operated group, ischemia/reperfusion (I/R) group, the low dose cilostazol (10mg/kg) group, the middle dose cilostazol (20mg/kg) group and the high dose cilostazol (40mg/kg) group. The neurofunction was measured by Longa EZ method. The Tunel test kit was used to explore the cellular apoptosis in hippocampus. The expression of caspase-3, MAPKs, p-P38, p-ERK and p-JNK were detected by western blot. **Results** As compared with the sham-operated group, the score of neurofunction and apoptotic cells in I/R group was increased statistically. The score of neurofunction and apoptosis rate in each cilostazol group was lower than that of I/R group. Compared with the I/R group, the expression of caspase-3 and p-P38 was down-regulation in cilostazol group in a dose-dependent manner. **Conclusion** Cilostazol has certain neuroprotective effect in rats after ischemia/reperfusion injury, which may be related to down-regulation of the level of P38 MAPK pathway.

Key words Cerebral ischemia reperfusion; Apoptosis; P38