

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710069124.5

[51] Int. Cl.

A61K 35/55 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

[43] 公开日 2008年12月10日

[11] 公开号 CN 101317857A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 14/485 (2006.01)

[22] 申请日 2007.6.5

[21] 申请号 200710069124.5

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

共同申请人 杭州博通胃肠病诊治技术有限公司

[72] 发明人 姒健敏 王良静 赵晓燕 袁庆丰
陈淑洁 徐立红 翁登坡

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

山羊颌下腺生物活性物质的提取方法与应用

[57] 摘要

本发明涉及一种山羊颌下腺中生物活性物质的提取方法与应用。取山羊颌下腺组织匀浆或冷冻干燥，将匀浆液或含冷冻干燥粉的溶解液离心，将上清液装入层析柱多次层析洗脱，检测出具有生物学活性的洗脱峰，浓缩干燥活性峰即得生物活性物质。山羊颌下腺生物活性物质的特征为对动物结肠炎和慢性萎缩性胃炎等模型有治疗作用，可实现其对各种消化道粘膜的保护作用。本发明具有提取方法便捷、高效，提取物生物活性强的优点。

1、一种山羊颌下腺中生物活性物质的提取方法，其特征在于包括如下步骤：

- (1)、取山羊颌下腺组织匀浆或冷冻干燥，将匀浆液或含冷冻干燥粉的溶解液离心，取上清；
- (2)、将上清液装入层析柱进行层析洗脱，并检测具有生物学活性的洗脱峰；
- (3)、合并活性峰并浓缩；
- (4)、浓缩液过层析柱，洗脱液经生物学活性检验后，浓缩干燥活性峰即得。

2、根据权利要求1所述的提取、纯化方法，其特征在于所述的层析柱为阴离子层析柱、阳离子层析柱、凝胶层析柱中的一种或几种。优选二乙基氨基乙酯 Sphacel (diethylamino ethyl cellulose, DEAE) 层析柱、凝胶葡聚糖凝胶 G50 (Sephadex) 层析柱、二乙基氨基乙酯 52 (diethylamino ethyl cellulose, DE) 层析柱、羧甲基纤维素层析柱 (Carboxymethyl cellulose, CM) 等。

3、根据权利要求1所述的提取、纯化方法，其特征在于所述的洗脱峰生物学活性检测方法为酶联免疫吸附试验、蛋白电泳试验、WESTERN 试验、MTT 法测定细胞增殖试验、测定新生小鼠睁眼时间试验中的一种或几种。

4、山羊颌下腺生物活性物质的特征为对动物结肠炎和慢性萎缩性胃炎等模型有治疗作用，可实现其对于各种消化道粘膜的保护作用。

山羊颌下腺生物活性物质的提取方法与应用

技术领域

本发明涉及生物化学医药领域，尤其涉及一种山羊颌下腺生物活性物质的提取方法与应用。

背景技术

消化道腺体，如颌下腺，十二指肠 Brunner 腺、胰腺体等器官合成并分泌表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF)，EGF 是一种强有力的细胞分裂促进因子。生理状态下，消化道中 EGF 的含量较高，对粘膜有保护作用。EGF 口服治疗胃溃疡的研究表明了其具有显著的粘膜保护作用。EGF 对胃溃疡的治疗作用的机理为：增加胃黏膜血流量，促进黏液糖蛋白合成和分泌，促进巯基化合物合成，也与抑制胃酸有一定关系。Sinha 等用 EGF 灌肠发现其对治疗炎症性结肠炎有明显效果。许多临床使用的胃黏膜保护药物，如硫糖铝等，是通过刺激内源 EGF 的分泌来起作用的。

1952 年，美国科学家 Cohen 最先从小鼠颌下腺提取了 EGF。国内外，天然与重组的 EGF 已应用于角膜、皮肤损伤和胃肠道粘膜愈合的临床试验。EGF 的研究开发有重要的应用前景和经济价值。但目前普遍存在着投资大、收益率低等缺陷。

EGF 的分离纯化方法有：1972 年 Savage 采用酸抽提、BIO-纤维柱和 DEAE-纤维柱分离、纯化 EGF。1975 年 Cohen 等从预处理的浓缩尿液中分离 EGF：使用 Bio-Rex 70 柱吸附、Bio-Ge1 P10 柱过滤、SephadexG-75 柱过滤、DE-52、CM-52 柱层析分离、纯化。EGF 的在组织中的浓度比较低，需要经过较长时间的分离和纯化，才能得到比较纯的 EGF。已有的工艺比较复杂，纯化成本高。

与小鼠相比，山羊颌下腺来源丰富，且不必为了提取 EGF 而大量饲养小鼠，造成巨大浪费。每只山羊的颌下腺重约 6-10g，在和小鼠颌下腺 EGF 含量大致相同情况下，分离纯化后得到的产物远远高于小鼠颌下腺。本发明的制作成本低、得率高更适应治疗需求。

因此，开发山羊颌下腺中的生物活性作用的 EGF 类产品，具有广泛的应用前景。

发明内容

本发明的目的在于提供一种山羊颌下腺中生物活性物质的提取方法。

本发明的另一目的在于提供一种山羊颌下腺中生物活性物质的应用方法。

一种山羊颌下腺中生物活性物质的提取方法包括：取山羊颌下腺组织匀浆或冷冻干燥，将匀浆液或含冷冻干燥粉的溶解液离心，将上清液装入层析柱多次层析洗脱，检测出具有生物学活性的洗脱峰，浓缩干燥活性峰即得生物活性物质。

作为优选，所述的层析柱为阴离子层析柱、阳离子层析柱、凝胶层析柱中的一种或几种。优选二乙基氨基乙酯 Sphacel (diethylamino ethyl cellulose, DEAE) 层析柱、凝胶葡聚糖凝胶 G50 (Sephadex) 层析柱、二乙基氨基乙酯 52 (diethylamino ethyl cellulose, DE) 层析柱、羧甲基纤维素层析柱 (Carboxymethyl cellulose, CM) 等。

作为优选，所述的洗脱峰生物学活性检测方法为酶联免疫吸附试验、蛋白电泳试验、WESTERN 试验、MTT 法测定细胞增殖试验、测定新生小鼠睁眼时间试验中的一种或几种。

山羊颌下腺生物活性物质的特征为对动物结肠炎和慢性萎缩性胃炎等模型有治疗作用，可实现其对各

种消化道粘膜的保护作用。本发明具有提取方法便捷、高效，提取物生物活性强的优点。

具体实施方式

一、山羊颌下腺生物活性物质的提取以及活性检测

1、组织样品的准备

从-80℃低温冰箱内取新鲜成年浙江白山羊或改良浙江白山羊（1-2 周岁）颌下腺 4 只，分离附着的组织成分，用眼科剪剪碎，仔细剔除腺体内的血管、神经、结缔组织等，加 20 ml 0.05 M 醋酸，置于碾钵内碾碎，再用匀浆器匀浆数次，以上步骤均在 4℃冰上操作。匀浆均匀后将匀浆置于离心管中，低温离心机 50 000×g，30 min，弃去沉淀，抽取上清液（约 10 ml）备用。

2、DEAE Sphacel 胶梯度洗脱

将购置的 DEAE Sphacel 胶在 20%乙醇中搅拌后，静置，倒出上层的乙醇。加入 0.02 M 醋酸铵，搅拌均匀，静置。将制备好的胶上柱。达到平衡后，开始上样。本次实验平衡时泵速为 1.4 ml/min。

建立洗脱程序，梯度从 100%A 液（0.02 M 醋酸铵）到 100%B 液（0.2 M 醋酸铵），时间为 1080 min，流速为 0.4 ml/min，收集器设置为 9 min 1 管。UV-280 nm 检测图分析，见数个大峰，前面可能是杂蛋白，故从最大峰后开始共选出相应的 94 管做 ELISA。

3、ELISA 法测定山羊颌下腺生物活性物质峰

洗脱峰收集的 94 管做 ELISA 检测，以 0.2 M 醋酸铵做阴性对照、购买的 rhEGF 标准品做为阳性对照。抗原包被后，封闭非特异结合位点。抗体结合最后测定吸光度，酶标仪 450 nm 处测定黄色吸光度。

表 DEAE 柱层析后活性峰 ELISA 测定 OD 值

组别	孔数	OD 值
对照（0.2 M 醋酸铵）	5	0.1316±0.02532
对照（EGF 标准品）	5	1.1812±0.13485*
活性峰浓缩液	5	0.8116±0.10927*△

* 与对照组（0.2 M 醋酸铵）比较 $P < 0.01$, △ 与 EGF 标准品组比较 $P < 0.01$

活性峰浓缩液的活性接近 EGF 标准品。

4、透析浓缩

ELISA 结果显示，层析图中，峰 2 与峰 3 之间有 10 余管的读数较高，显示这几处可能有 EGF 活性组份（读数高、和 EGF 标准品读数接近为有 EGF 活性组份的可能）。将与标准品 EGF 吸光度值接近的这些组份收集在一起，将这些组份合并后进行透析（透析袋分子量为 3500），透析过夜，透析过程在 4℃冰箱中进行。脱去盐分，将透析好的组分分别用甘油（丙三醇）或聚乙二醇（分子量 20 000）进行浓缩，除去水分。将合并后的组份浓缩到 10 ml 左右。将透析浓缩后的组份再次进行 ELISA 实验，过程同上所述，只是分别取透析浓缩后的组份及 0.2 M 醋酸铵和 rhEGF 标准品共五孔进行实验。

ELISA 实验结果表明，透析浓缩后组份的 OD 值与 EGF 标准品的 OD 值相近。

5、Sephadex G50 胶洗脱

6 g Sephadex G50 干胶，加入 100 ml 超纯水，溶胀 2-5 小时。平衡后，静置。上柱，平衡流速，然后将过 DEAE Sphacel 柱并且透析、浓缩、经 ELISA 检验有活性的组份用滴管慢慢地加入层析柱上样。建

立洗脱程序, 时间为 1080 min, 流速 0.8 ml/min, 收集器每 9 分钟收集 1 管, 共 120 管。洗脱液为超纯水。在洗脱的同时开启记录软件记录 280 nm OD 值及电导。

洗脱峰收集的各管组份做 ELISA 检测, 以高纯水做阴性对照、购买的 rhEGF 标准品做为阳性对照。步骤同上, 简述如下: 抗原包被→2%脱脂奶粉封闭→结合一抗→结合二抗→与底物作用→酶标仪在 652 nm 处 OD 值。加 1.5 M 硫酸中止液后其在 450 nm 的 OD 值。16, 17, 18, 19, 20 号管与层析图中的一个洗脱峰正好相对应, 因此该峰即为活性峰。

表 羊颌下腺 EGF 活性洗脱峰的 OD 值

组别	培养孔	OD 值
对照 (高纯水)	5	0.086±0.012
对照 (EGF 标准品)	5	1.201±0.151*
活性峰浓缩液	5	1.045±0.094*△

* 与对照组 (高纯水) 比较 $P < 0.01$, △ 与 EGF 标准品组比较 $P < 0.05$

活性峰浓缩液的活性与 EGF 标准品相近。

6、山羊颌下腺生物活性物质 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 是对蛋白质进行量化, 比较及特性鉴定的一种经济、快速、而且可重复的方法。该法主要依据蛋白质的分子量对其进行分离。

取纯化好的山羊颌下腺山羊颌下腺生物活性物质原液 30 μ l, 加入 5×SDS 蛋白上样缓冲液 6 ml (比例 5:1) 置于一个 Eppendorf 管中混合震荡混匀, 100℃加热 3—5 分钟, 使蛋白变性。加样, 第一泳道为蛋白 Marker, 4、5 泳道分别为两次 DEAE Sphace 柱阴离子层析并经活性检测的组份, 第 6 泳道为 Sephadex G50 过滤柱层析并经活性检测的组份。电泳后, 考马斯亮蓝染色。

结果显示, DEAE Sphace1 柱阴离子层析, 并经 ELISA 法检测后得到的组份, 在 6.5、10、15、18kD 处有蛋白条带。Sephadex G50 过滤柱层析, 并经 ELISA 法检测后得到的组份, 在 6.5、10、15 处有蛋白条带。

7、山羊颌下腺生物活性物质的浓度测定

将经 DEAE Sphace 柱阴离子层析和 Sephadex G50 过滤柱层析, 并且透析、浓缩的组份命名为 Sample 进行蛋白含量测定。测定方法采用 Folin 酚法。采用 96 孔酶标板, 制作标准曲线, 测定样品蛋白含量。

8、山羊颌下腺生物活性物质对人胚胎羊膜细胞增殖的影响

对细胞形态学的影响: 光学显微镜下观察山羊颌下腺生物活性物质刺激组和对照组细胞生长形态学变化。

MTT 法测定细胞增殖率。细胞增殖率=(实验组 A 值-对照组 A 值)/对照组 A 值×100%。重复实验 3 次。

表 山羊颌下腺生物活性物质促人胚胎羊膜细胞增殖的作用($\bar{x} \pm S$)

组别	稀释倍数	孔数	吸光度 A 值	促增殖率
对照组		5	0.9876±0.034	
颌下腺生物活性物质组	1:10	5	1.010±0.035	2.27 %
	1:100	5	1.194±0.073*	20.9 %

	1 : 500	5	1.377±0.146*△#	39.4 %
	1 : 1000	5	1.234±0.087*	24.9 %
rhEGF 组	10 µg/L	5	1.389±0.179*	40.6 %

* 与对照组比较 $P < 0.01$, Δ 与 (1 : 100) 组比较 $P < 0.01$, # 与 (1 : 1000) 组比较 $P < 0.05$

活性物质 1 : 500 稀释度组的促人胚胎羊膜细胞增殖的作用与 EGF 标准品相近。

9、山羊颌下腺生物活性物质对细胞增殖过程中 DNA 含量、细胞周期变化的影响

利用流式细胞仪可以对处于快速、直线、流动状态中的单细胞进行多参数、快速定量分析以及能同时对特定群体加以分选的特点, 主要测定山羊颌下腺生物活性物质在细胞增殖过程中对 DNA 含量与细胞周期变化的影响。人胚胎羊膜细胞以含 10% 新生牛血清的 MEM 培养基在 37°C 及 5% CO₂ 的湿化培养箱中进行培养, 隔天传代加入山羊颌下腺生物活性物质和重组人 EGF (10 µg/L)。细胞处理, 上机检测, 专用软件分析处理。

表 山羊颌下腺生物活性物质对人胚胎羊膜细胞周期时相的影响

组别	G0/G1	S	G2/M
对照	71.1±1.9	18.8±1.4	10.1±1.3
颌下腺生物活性物质组	60.3±2.2*	25.8±1.1*	13.9±1.8*
rhEGF	57.8±2.1*	26.4±1.9*	15.8±1.7*

* 与对照组比较 $P < 0.01$

山羊颌下腺生物活性物质对人胚胎羊膜细胞周期时相的影响与 rhEGF 相似。

二、山羊颌下腺生物活性物质对消化道粘膜保护作用的验证

大鼠结肠炎模型

1、建模

健康、性成熟、清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体重 (250±28) g, 由浙江大学医学院动物实验中心提供。架式笼养, 自由食用全价营养饲料, 每日晨 8 时清笼, 饲养温度为 20±1°C, 湿度 50~60 %, 光照每 12 小时明暗交替, 通风 8~15 次 / 小时。大鼠适应性喂养一周后, 随机分为 3 组, 即单纯造模组、生理盐水治疗对照组及山羊颌下腺生物活性物质治疗组。每组 10 只。大鼠禁食 24 小时后用 7% 乙酸 2ml 经自制聚乙烯灌肠器 (直径约 2mm) 灌肠, 灌肠器插入深度为距肛缘 8cm, 倒提大鼠准确定时 15 秒后, 再在同一深度经灌肠器用生理盐水 5ml 冲洗一次, 24 小时后即成模。

2、给药

山羊颌下腺生物活性物质治疗组, 在模型建立后每日晨起空腹用山羊颌下腺生物活性物质 270 µg / 次 / 只, 用生理盐水 2ml 溶化后灌肠, 疗程 7 天。

生理盐水治疗对照组: 模型建立后, 每日早晨进食前, 予生理盐水 2ml 灌肠。

模型组, 造模后不灌肠饲养 7 天。

3、指标观察

3.1 大鼠一般情况

在饲养过程中大鼠的精神状态，活动情况，毛发光泽度，食欲，大便情况（血便、腹泻、大便次数增多等），体重等。

3.2 山羊颌下腺生物活性物质对结肠炎大鼠肠组织粘膜损伤的影响

所有实验动物给药灌肠 7 天后，禁食不禁水 24 小时，乙醚麻醉处死，剖腹暴露全肠，在距肛门 8cm 处离断，取出肠段，沿肠系膜剪开并用生理盐水冲洗干净后，将肠粘膜平铺于泡沫板上，用大头针固定，肉眼观察肠粘膜的病理改变，计算粘膜损伤指数，并用数码相机摄片。

大鼠结肠粘膜肉眼评分标准：

分数	肉眼观察
0 分	无损伤，无充血水肿，表面光滑，无糜烂或溃疡
1 分	粘膜充血、水肿，表面光滑，无糜烂或溃疡
2 分	粘膜充血、水肿，粘膜粗糙，呈颗粒样，轻度糜烂，无溃疡
3 分	粘膜充血、水肿，中度糜烂有单个溃疡
4 分	粘膜充血、水肿，高度糜烂，有多处溃疡
5 分	粘膜充血、水肿，重度糜烂，有 >1 cm 溃疡

3.3 山羊颌下腺生物活性物质对结肠炎大鼠肠组织粘膜组织病理损伤的影响

计算粘膜损伤并摄片后的肠组织立即用 10% 的中性甲醛溶液固定，石蜡包埋，每份蜡块切成厚度为 5 μ m 的切片 HE 染色，镜下评价粘膜损伤指数。

大鼠结肠炎的判定标准：低倍镜下取 10 个视野，按炎症细胞浸润的程度分成 0、1、2、3 四个级别。大鼠结肠组织病理评分标准分为：

上皮及腺体的破坏

0 分	正常
1 分	上皮局部破坏
2 分	上皮带状破坏或带状隐窝消失
3 分	弥散和 / 或粘膜溃疡累及粘膜下和 / 或隐窝缺失

腺隐窝扩张

0 分	正常
1 分	局灶
2 分	条状
3 分	弥散

杯状细胞耗竭及缺失

0 分	无
1 分	轻度耗竭
2 分	条状或中度耗竭
3 分	弥散或完全耗竭

炎性细胞浸润

0分	无
1分	局限于上皮下, 固有层或隐窝基层
2分	浸润粘膜基层
3分	严重广泛浸润达粘膜下和 / 或累及固有基层
水肿	
0分	无
1分	局灶
2分	带状或 / 和中度弥散
3分	广泛及严重
血管充血	
0分	无
1分	局灶
2分	条状
3分	弥散
隐窝脓肿	
0分	无
1分	局灶
2分	条状
3分	弥散
萎缩	
0分	无
1分	局灶
2分	条状
3分	弥散

3.4 山羊颌下腺生物活性物质对结肠炎大鼠肠组织中髓过氧化物酶 (Myeloperoxidase, MPO) 的影响

取大鼠肠组织 300mg 称重, 于小烧杯中加磷酸缓冲溶液 2.0 ml, 剪刀剪碎, 转移至试管中, 于组织匀浆仪上匀浆 10 秒, 4℃, 4000rpm 离心 15min, 弃上清液, 按 50mg (组织) /1ml 比例加入十六烷基三甲基溴化胺 (Hexadecyltrimethylammonium Bromide, HTAB) 溶液, 匀浆 30 秒, 超声匀浆 10 秒, 4℃, 4000rpm 离心 15min。取上清液 0.1 ml 加 O-dianisidine 溶液 (含 0.0005 % H₂O₂) 2.9ml, 在 460nm 处测定 3min, 计算每分钟吸光度的变化 ($\Delta A_{460nm} \cdot \text{min}^{-1}$)。MPO 活性单位 (U) 定义为 25℃ 时每分钟分解 1 μmol 过氧化物的量。1 μmol 过氧化物 H₂O₂ 的吸光度改变为 $0.13 \times 10^{-2} / \text{min}$, 0.1 ml 样品单位组织的酶活性为: $\text{MPO} (\times 10^3 \text{ U}) \cdot \text{ng}^{-1} \text{ 组织} = \Delta A_{460nm} \cdot \text{min}^{-1} / 1.13 \times 10^{-2} / 5$ 。

4、实验结果

4.1 大鼠一般情况

造模组大鼠在灌肠后第 15~24h 起出现腹泻, 表现为黄色或血性稀便和 / 或肛周体毛被稀便沾染, 精神萎靡, 喜拱背扎堆, 活动量少, 食欲减退, 毛发欠光泽, 体重增长较慢等。

生理盐水对照组 生理盐水灌肠后一直有稀便, 肛周体毛不洁, 精神差, 活动少, 食欲差, 类似于造模组。

山羊颌下腺生物活性物质治疗组 在山羊颌下腺生物活性物质灌肠后, 稀便于第三天开始好转, 肛周体毛逐渐变干净, 精神状况好转, 食欲好转, 毛发光泽度好转, 体重增加。

4.2 山羊颌下腺生物活性物质对结肠炎大鼠肠组织粘膜损伤的影响

造模组全部大鼠 24h 成模后均可见溃疡多而大、严重充血水肿、糜烂出血点、穿孔肠粘连等。

生理盐水对照组亦可见溃疡多而大、充血水肿、糜烂出血点、穿孔等。

山羊颌下腺生物活性物质 治疗组在第一天有 1 只大鼠肠穿孔死亡, 剩余 9 只治疗后可见有个别小溃疡、充血水肿、糜烂出血较上述两组明显好转, 未见穿孔。

表 山羊颌下腺生物活性物质对结肠炎大鼠肠组织粘膜损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	组织损伤积分
模型对照组	10	4.20±0.92
空白对照组	10	2.70±1.06
山羊颌下腺生物活性物质组	9	0.67±1.00*

*与模型组比较 $P < 0.01$, *与生理盐水对照组比较 $P < 0.05$

4.3 山羊颌下腺生物活性物质对结肠炎大鼠肠组织粘膜组织病理损伤的影响

造模组大鼠结肠粘膜可见粘膜上皮脱落、糜烂、炎症可累及肠壁全层, 主要表现为中性粒细胞浸润, 亦可见数量不等的巨噬细胞和嗜酸性细胞, 增生的纤维母细胞, 溃疡周围可见隐窝变形。腺体增生, 排列紊乱。肉芽组织增生, 杯状细胞减少。粘膜及粘膜下充血、水肿及典型溃疡病形成。

生理盐水对照组粘膜充血水肿, 可见典型溃疡, 腺体增生, 杯状细胞减少, 炎症细胞浸润, 腺隐窝扩张及隐窝脓肿。

山羊颌下腺生物活性物质组结肠粘膜可见溃疡修复迹象, 如溃疡边缘上皮修复, 肉芽组织形成。

表 山羊颌下腺生物活性物质对结肠炎大鼠肠组织粘膜组织病理损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	组织损伤积分
模型对照组	10	15.80±3.82
空白对照组	10	9.90±1.85
山羊颌下腺生物活性物质组	9	6.67±2.29*

*与模型组比较 $P < 0.01$, *与生理盐水对照组比较 $P < 0.05$

4.4 山羊颌下腺生物活性物质对结肠炎大鼠肠组织中 MPO 的影响

表 山羊颌下腺生物活性物质对结肠炎大鼠肠组织中 MPO 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	MPO ($U \cdot ng^{-1}$ 组织)
模型对照组	10	2.16±0.39
空白对照组	10	1.93±0.63

 山羊颌下腺生物活性物质组

9

0.97±0.12*

 *与模型组比较 $P < 0.01$, *与生理盐水对照组比较 $P < 0.01$

大鼠慢性萎缩性胃炎模型

1、建模

0.1%氨水作为每日饮用水自由饮用；20 mmol / L 脱氧胆酸钠每日灌胃，每次 2 ml；60%酒精每周空腹灌胃 2 次，每次 2 ml。上述处理 24 周后完成大鼠慢性萎缩性胃炎模型。

2、给药

将体重相近的大鼠随机分为 3 组，每组 10 只。每天皮下注射 rhEGF 或山羊颌下腺生物活性物质，浓度为 10 μ g / kg，对照组以相同容积的生理盐水皮下注射，共 12 周。

另有 10 只大鼠不建立慢性萎缩性胃炎模型，给予正常食物和水。

3、指标观察

大鼠标本制备及病理组织学检查：给药12周后处死大鼠，距贲门和幽门1.5 cm处离断胃组织，沿大弯切开，观察胃黏膜的色泽、弹性、皱襞情况。以10%的中性甲醛固定，分别沿小弯侧和大弯侧条状取材，作病理切片，行HE染色作组织学检查。采用免疫组织化学染色法 胃黏膜腺体增殖细胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA)表达测定，以PBS置换一抗为阴性对照。PCNA 以细胞核内出现明显的棕褐色颗粒为阳性。观察每一标本的胃窦5个完整腺体，应用测微器测定每个腺体PCNA 阳性表达的宽度(单位：m)，取其平均值。每张切片同时观察有无肠上皮化生、假性幽门腺化生、不典型增生、腺瘤、类癌、腺癌发生情况。

4、实验结果

山羊颌下腺生物活性物质对慢性萎缩性胃炎大鼠组织大体观的影响

对照组大鼠的胃壁弹性减弱，黏膜层变薄，皱襞变平，可见不同程度的陈旧性出血点；山羊颌下腺生物活性物质治疗组大鼠胃黏膜有光泽，黏液较多，胃壁弹性较好，但和正常大鼠胃黏膜比较有不同程度的胃壁弹性降低，黏膜层变薄。

山羊颌下腺生物活性物质对慢性萎缩性胃炎大鼠组织病理的影响

山羊颌下腺生物活性物质治疗组大鼠的胃窦腺体排列整齐规则，极少见到炎性细胞，无出血、肠化等现象，接近正常大鼠的表现；而对照组大鼠的胃窦腺体有不同程度的排列紊乱、稀疏，伴有腺体囊样扩张，黏膜肌层增厚，部分可见炎性细胞聚集灶。

山羊颌下腺生物活性物质对慢性萎缩性胃炎大鼠胃窦黏膜 PCNA 表达的影响

rhEGF 组、山羊颌下腺生物活性物质组的 PCNA 阳性表达分别为(77.70±4.16) μ m 和(75.60±2.92) μ m，较对照组(54.40±4.54) μ m 明显增加($P < 0.01$)；而两治疗组间差异无统计学意义。

专利名称(译)	山羊颌下腺生物活性物质的提取方法与应用		
公开(公告)号	CN101317857A	公开(公告)日	2008-12-10
申请号	CN200710069124.5	申请日	2007-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	姒健敏 王良静 赵晓燕 袁庆丰 陈淑洁 徐立红 翁登坡		
发明人	姒健敏 王良静 赵晓燕 袁庆丰 陈淑洁 徐立红 翁登坡		
IPC分类号	A61K35/55 A61P1/00 A61P1/04 G01N33/535 G01N33/68 G01N27/447 C07K14/485		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种山羊颌下腺中生物活性物质的提取方法与应用。取山羊颌下腺组织匀浆或冷冻干燥，将匀浆液或含冷冻干燥粉的溶解液离心，将上清液装入层析柱多次层析洗脱，检测出具有生物学活性的洗脱峰，浓缩干燥活性峰即得生物活性物质。山羊颌下腺生物活性物质的特征为对动物结肠炎和慢性萎缩性胃炎等模型有治疗作用，可实现其对各种消化道粘膜的保护作用。本发明具有提取方法便捷、高效，提取物生物活性强的优点。

组别	孔数	OD 值
对照 (0.2M 醋酸铵)	5	0.1316±0.02532
对照 (EGF 标准品)	5	1.1812±0.13485*
活性峰浓缩液	5	0.8116±0.10927*△