DOI:10.19789/j.1004-9398.2015.02.013

油橄榄叶提取物和美沙酮对海洛因依赖大鼠血浆性激素及卵巢血管内皮生长因子表达的影响*

王 昱

(陇南师范高等专科学校生化系,成县 742500)

摘 要

目的:探讨油橄榄叶提取物(olive leaf extract,OLE)和美沙酮联合应用对海洛因依赖大鼠血浆性激素及卵巢血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响.方法:将40只健康大鼠随机分成模型(A)组、OLE治疗(B)组、美沙酮治疗(C)组、OLE+美沙酮治疗(D)组.按递增法采用皮下注射海洛因建立海洛因依赖大鼠模型,造模后药物处理30 d,然后分别用药物进行治疗.采用放射免疫分析法检测血浆催乳素(PRL)、雌二醇(E2)、孕酮(P)、促卵泡生成激素(FSH)和促黄体生成激素(LH).用免疫组织化学法检测卵巢VEGF的表达情况.结果:与A组比较,D组、B组和C组血浆中E2、FSH、P含量显著降低,PRL、LH含量显著升高,卵巢VEGF阳性表达的细胞数量显著下降.其中D组作用显著优于单独治疗组.结论:OLE联合美沙酮对海洛因损害大鼠生殖内分泌后的功能恢复作用优于单独治疗组.

关键词:油橄榄叶提取物,海洛因,性激素,血管内皮生长因子,大鼠.
中图分类号:R965.1

目前已知阿片类依赖戒断症状涉及较多,其治疗方法已越来越多.但许多实验证明单一的治疗方法虽有助于减轻戒断症状和功能恢复,但效果并不理想,只有通过联合治疗才能克服单一用药的缺点,提高治疗效果[1].因此,大量研究表明最有效的缓解阿片依赖戒断症状的方法是以下方法的联合使用:(1)提高免疫力[2];(2)疏通经络、安神疼痛[3];(3)阻断脑内多巴胺受体,增加脑啡肽和内啡肽的释放[4];(4)阻断胆碱能受体,改善脑微循环[5];(6)调节下丘脑-垂体-肾上腺系统[7];(7)促进中枢神经系统释放内源性的阿片肽[8];(8)提高β-氨基丁酸的活性,大量开放氯离子通道,抑制中枢作用[9];(9)影响机体多种酶活性,提高抗氧化能力,抑制细胞凋亡[10].油橄榄叶提取物(olive leaf extract,OLE)是从油橄榄叶中提取的组分,主要成分为黄酮类和萜类内酯化合物[11-17].基于上述理论我们设计了该实验,即以海洛因依赖大鼠为模型,利用放射免疫分析法和免疫组织化学法等技术观察比较OLE和美沙酮对海洛因造成的生殖功能损害的治疗作用,为阿片类依赖戒断症状的治疗提供新的思路.

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

盐酸海洛因(纯度≥98%,成县公安局提供),油橄榄叶提取物由陇南田园油橄榄科技开发有限公司提供,催乳素(PRL)、雌二醇(E2)、孕酮(P)、促卵泡生成激素(FSH)和促黄体生成激素(LH)放射免疫分析试剂盒均购深圳拉尔文生物工程技术有限公司,全部抗体、免疫组织化学试剂盒和DAB均购于北京中杉金桥生物技术有限公司,SN-695B型智能放免γ测量仪(上海).

1.2 实验动物与给药

健康♀性SD大鼠40只[兰州大学实验动物中心,许可证号:SCXK(甘)2005-0007],体重200~250 g,同条件饲养,喂食普通固体饲料,自由饮水.随机分为模型(A)组、OLE治疗(B)组、美沙酮治疗(C)组、OLE+美沙酮治疗(D)组,每组10只.所有大鼠按体重第1天剂量1 mg/kg海洛因皮下注射,一天总剂量平分两次注射(下同).第2天之后,每

收稿日期:2014-04-03
* 甘肃省自然科学基金项目(No. 1107RJZK243);甘肃省高等学校科研资助项目(No. 2014B-133).

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

天递增 1 mg/kg,直至每天剂量达到 20 mg/kg,持续维持该剂量 10 d,共计处理 30 d[18]. 建模后根据替代递减原则,C、D 组大鼠 1 ~ 10 d、11 ~ 20 d、21 ~ 30 d美沙酮灌胃剂量依次为: 10, 5, 2.5 mg/kg, D 组同时灌胃 1 000 mg/kg OLE[19]. B 组灌胃 1 000 mg/kg OLE,A 组每天给予等量生理盐水.

1.3 血浆性激素测定

各组实验动物均乙醚麻醉,心脏采血按照各个放射免疫试剂盒说明书操作,在 γ 计数仪上测 cpm 值.

1.4 免疫组织化学

免疫组化 SP 法(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法). 将卵巢石蜡切片脱蜡至水,微波处理进行抗原修复,用 3% H_2O_2 室温孵育 10 min,正常兔血清室温封闭 30 min,然后用兔抗人 VEGF 单克隆抗体(均为 1∶100),4℃孵育过夜; 次日取出切片以 PBS 冲洗后,再依次滴加生物素化羊抗兔 IgG 孵育 30 min,SABC 工作液孵育 30min,最后 DAB 显色,苏木素复染,空白对照以 PBS 代替一抗. 常规乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,在显微镜下观察并拍照.

1.5 图像分析

用美国 Image-proplus 5.0 专业图像分析软件进行图像分析. 从 VEGF 阳性反应的切片中各选3 张,检测活性物质在卵巢中表达的强度. 测量时保证光源的稳定,并且取图之前预热 20 min 以上,采图时各项设置包括光源、光圈大小、白平衡、曝光强度、敏感度、对比度等均改为手动调节且固定,以保证每次取图系统的设置值一样. 取平均光密度和积分光密度两个指标,测量值的平均值为最终灰度值.

1.6 数据处理

用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验,$P < 0.05$ 表示具有有显著差异,$P < 0.01$ 为差异极显著.

2 结 果

2.1 各组大鼠血浆 PRL、E2、P、FSH 和 LH 含量的比较

与 A 组相比,B、C、D 组大鼠血浆 E2、P 和 FSH 的含量显著降低,PRL、LH 含量显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中 D 组血浆性激素的改善明显强于B 组和 C 组,差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$,表 1).

表 1 海洛因依赖大鼠血浆 PRL、E2、P、FSH 和 LH 含量的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	P (ng/mL)	E2 (pg/mL)	FSH (mIU/mL)	PRL (mIU/mL)	LH (mIU/mL)
A 组	0.97 ± 0.49	36.51 ± 7.64	5.96 ± 1.05	130.16 ± 71.01	0.63 ± 0.12
B 组	0.63 ± 0.25*	29.47 ± 5.21*	4.56 ± 1.34**	148.22 ± 39.33*	1.26 ± 0.30**
C 组	0.50 ± 0.15*	27.05 ± 3.99**	4.37 ± 1.51*	162.91 ± 42.28**	1.74 ± 0.27**
D 组	0.33 ± 0.03**▲▲	19.50 ± 2.42*▲▲	3.19 ± 1.03*▲	206.29 ± 61.07**▲▲	3.67 ± 0.31**▲▲

注: 与 A 组比较 $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 B 组、C 组比较 $^{▲}P < 0.05$, $^{▲▲}P < 0.01$.

2.2 各组大鼠卵巢 VEGF 阳性表达的比较

免疫组织化学法显示,阳性表达部位被染成棕黄色. A 组大鼠卵巢 VEGF 呈强阳性表达(图 1). B、C、D 组大鼠卵巢 VEGF 阳性表达弱于 A 组(图 2 ~ 4). 与 B、C 组相比,D 组卵巢 VEGF 阳性表达的细胞数量明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$,表 2). 阴性对照组无 VEGF 阳性表达(图 5).

表 2 VEGF 在卵巢表达的平均光密度和积分光密度($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

项目 Item	A 组	B 组	C 组	D 组
平均光密度	0.062 5 ± 0.002 1	0.041 6 ± 0.001 7**	0.039 9 ± 0.002 4**	0.030 2 ± 0.001 3**▲
积分光密度	588.360 ± 61.404	452.111 ± 47.333**	437.321 ± 58.418**	360.608 ± 70.253*▲

注: 与 A 组比较 $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 B 组、C 组比较 $^{▲}P < 0.05$, $^{▲▲}P < 0.01$.

3 讨论

阿片类物质滥用已成为当今世界严重的社会问题和医学问题,其中海洛因滥用最为突出. 海洛因依赖者的临床戒毒治疗关键是减少戒断症状的出现及减轻其严重程度. 美沙酮维持治疗是海洛因等阿片类物质依赖者治疗的重要措施之一,但单用美沙酮脱毒,其用药时间长,后期停药困难,易产生戒断症状反跳现象,且药物本身仍具有依赖性. 因此,如何更好地把戒毒药物应用于临床,更有效地控制戒断症状,已成为戒毒临床工作的一大课题.

近年来研究者发现一些天然植物产物联合美沙酮能够改善海洛因依赖者戒断症状,提高临床脱毒效果. 许继艳、徐泽民等[2,3] 发现应用附子、干姜、细

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

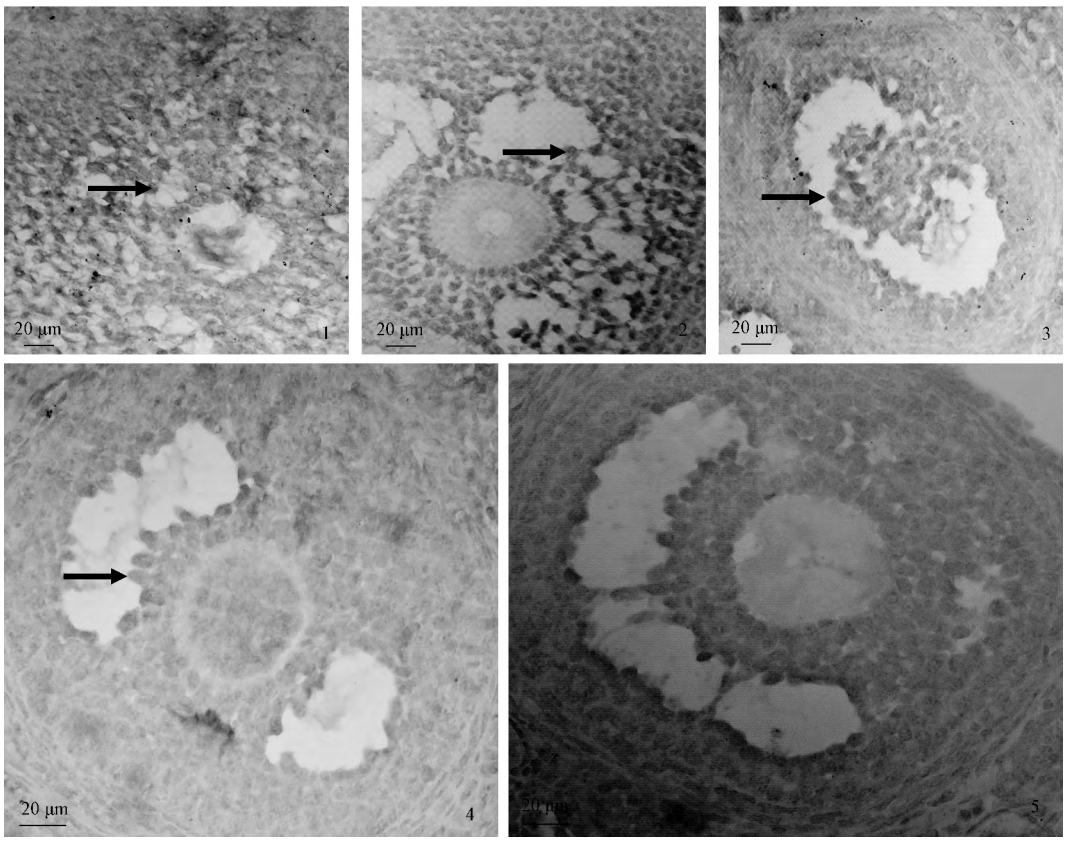


图 1　A 组卵巢中 VEGF 的表达,标出示 20 μm(下同)　图 2　B 组卵巢中 VEGF 的表达
图 3　C 组卵巢中 VEGF 的表达　图 4　D 组卵巢中 VEGF 的表达　图 5　阴性对照

辛、党参、白术等联合美沙酮能够益气安神,提高海洛因依赖者的免疫力. 胡永等[4] 证明罗通定联合美沙酮能改变内源性阿片肽基因表达,增加脑啡肽和内啡肽的释放. 李少成等[5] 通过美沙酮合并东莨菪碱进行海洛因依赖临床对照研究,发现联合治疗抑制胆碱能细胞的过度兴奋,解除血管痉挛、改善微循环,促进了戒断症状的消除. 我们前期研究发现 OLE 具有很好的抗氧化、排铅等作用[19,20] . 但 OLE 联合美沙酮治疗是否同样协同促进海洛因戒断症状的康复,尚未见相关报道.

正常人体内,中枢神经系统的某些神经细胞可产生恒量的内源性阿片样物质(EOP) ,并通过阿片受体及阿片肽系统调节体内诸如去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺、胆碱能、组胺、脑垂体性腺、甲状腺、钙离子通道等一系列神经体液免疫调节系统以保持正常的体内功能的平衡. EOP 作用于下丘脑,通过抑制下丘脑促性腺激素释放激素的合成和释放来抑制 LH 和 FSH 的释放,从而影响卵巢的功能,导致雌激素和孕激素水平降低; 另一方面,EOP 对 PRL 的释放产生兴奋作用,从而引起 PRL 水平升高[21,22] . 因此,PRL、LH、E2、FSH、P 的测定是判断生殖内分泌功能的常规检测指标. VEGF 是细胞因子的一种,具有增加血管通透性、促内皮细胞分裂增殖转移、血管生成维持和细胞聚钙等作用. 正常情况下,VEGF 在周期性黄体形成、创伤愈合、组织器官修复和胚胎发育中起重要作用,但在缺氧、缺血、炎症肿瘤、氧化损伤等病理情况下,VEGF 表达显著增加[23] . 目前 VEGF 已在临床应用方面用于检测组织损伤的重要指标.

本研究发现与 A 组比较,D 组、B 组和 C 组血浆中 E2、FSH、P 含量显著降低,PRL、LH 含量显著升高,卵巢 VEGF 阳性表达的细胞数量显著下降,说明三组均能促进生殖功能的恢复. 但 OLE 联合美沙酮治疗效果明显优于单独治疗组. 联合治疗的协同作用机制可能有很多种,我们推测一方面美沙酮具有作用时间较长、不易产生耐受性、药物依赖性低,能与阿片受体相结合,从而缓解戒断症状或防止戒断症状出现. 另一方面,OLE 中含有大量的抗炎、抗氧化、抗菌等活性成分[16,17] ,通过调节内分泌活动和抑制 VEGF 的表达来促进生殖功能的恢复.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

综上所述,在采用美沙酮替代递减脱毒治疗的同时辅以 OLE 治疗,能起到相辅相成的作用,同时,通过调节血浆 PRL、LH、E2、FSH、P 的含量,降低卵巢 VEGF 的阳性表达来减轻海洛因造成的卵巢组织损伤,改善生殖功能的作用,在临床上可能有积极作用.

参 考 文 献

[1] 刁淦桓,邓桂发,陈小娜,等. 益安回生口服液联合美沙酮治疗海洛因依赖的疗效观察[J]. 中国药物依赖性杂志,2007,16(5):355-358.

[2] 许继艳. 温阳通经药对海洛因依赖大鼠戒断症状及免疫功能影响的实验研究[J]. 中医研究,2008,21(2):14-16.

[3] 徐泽民,张建兵,王清,等. 加味四君于汤联合美沙酮治疗海洛因成瘤临床观察[J]. 中国医药导报,2012,9(12):133-134.

[4] 胡永,邱扬婴,钟育年,等. 罗通定联合美沙酮治疗海洛因依赖的疗效观察[J]. 中国药物滥用防治杂志,2006,12(5):270-271.

[5] 李少成,于雪竹,曹国原. 美沙酮合并东莨菪碱治疗海洛因依赖临床对照研究[J]. 中国药物滥用防治杂志,2001,7(3):38-39.

[7] 王桂华,潘贵书,郭莉,等. 针刺对海洛因成瘾戒断大鼠下丘脑-垂体-肾上腺系统的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(3)402-406.

[8] 薛敏,潘贵书. 韩式针刺对海洛因依赖大鼠学习记忆及海马 SYP 表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2007,23(4):454-455.

[9] 吴旭华. 联合应用美沙酮和氯硝西泮治疗海洛因依赖的临床对照研究[J]. 中医药指南,2013,11(11):161.

[10] 罗孝美,潘贵书,陈远寿. 外源性硫化氢对海洛因成瘾大鼠学习记忆能力的影响[J]. 遵义医学院学报,2009,32(2):108-110.

[11] Turkez H, Togar B, Polat E. Olive leaf extract modulates permethrin induced genetic and oxidative damage in rats[J]. Cytotechnology, 2012, 64(4): 459-464.

[12] Lee O H, Lee B Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Olea europaea leaf extract[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(10): 3751-3754.

[13] Kontogianni V G, Gerothanassis I P. Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts[J]. Nat Prod Res, 2012, 26(2): 186-189.

[14] Goulas V, Papoti V T, Exarchou V, et al. Contribution of falconoid to the overall radical scavenging activity of olive (olea europaea L.) leaf polar extracts[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(6): 3303-3308.

[15] 季崇敏,吴国球,沈子龙. 橄榄叶提取物对正常及糖尿病小鼠血糖和血脂水平的影响[J]. 东南大学学报(医学版),2003,22(4):236-238.

[16] Esmaeili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmaeilpour K, et al. Olive (Olea europaea L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(1): 200-205.

[17] Kaeidi A, Esmaeili-Mahani S, Sheibani V, et al. Olive (Olea europaea L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: in vitro and in vivo studies[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(1): 188-196.

[18] 韦献良,李百玮. 海洛因成瘾大鼠脑一氧化氮、丙二醛、血清超氧化物歧化酶的变化[J]. 广西医科大学学报,2011,28(4):496-498.

[19] Wang Y, Wang SQ, Cui WH, et al. Olive leaf extract inhibits lead poisoning-induced brain injury[J]. Neural regeneration research, 2013, 8(22): 2021-2029.

[20] 王昱. 油橄榄叶提取物对铅中毒小鼠心肌乳酸脱氢酶活性和抗氧化能力的影响. 首都师范大学学报,2013,34(3):41-44.

[21] 金亚菊. 海洛因对女性生殖系统损害的研究[J]. 辽宁中医学院学报,2006,8(2):22-23.

[22] 萧丹,刘梦光,张玉萍,等. 女性海洛因成瘾者性激素变化的探讨[J]. 中国实验诊断学,2004,8(3):281.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[3] 肖建武. 血管内皮生长因子的基础和临床研究进展[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4(1): 26-28.

Effects of Olive Leaf Extract and Methadone on Sexual Hormone Content in Plasma and Ovarian VEGF Expression in Heroin Dependence Rats

Wang Yu

(Department of Biology and Chemistry, Longnan Teachers College, Chengxian 742500)

Abstract

Objective: To explore protection role of olive leaf extract (OLE) and methadone on sexual hormone content in plasma and ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in heroin dependence rats. Methods: Forty rats were randomly divided into model group (A), group B with OLE, group C with methadone and group D with OLE and methadone. Each group of rats was subcutaneously given heroin with increasing dosage to establish heroin administration. After modeling, the rats were administrated with OLE and methadone for 30 d. The contents of prolactin (PRL), estradiol (E2), progesterone (P), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in plasma were tested by radioimmunoassay. Immunohistochemical analysis was used to determine VEGF expression in rat ovarian. Results: Compared with group A, groups B, C, D showed that the contents of E2, P and FSH in plasma significantly decreased, and PRL, LH contents increased, and VEGF expression significantly reduced. Moreover, the effects of group A were more powerful than those with single drug treatment. Conclusion: The effect of combined OLE and methadone on reproductive endocrine functional recovery was much better than either of the single treatment after heroin-induced injuries in rats.

Key words: olive leaf extract, heroin, sexual hormone, VEGF, rat.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net