

云南白药抑制新生血管生成活性部位筛选

毕葳^{1,2}, 沈蕊³, 李强¹, 雷海民^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国中医科学院
中药研究所, 北京 100700; 3. 北京大学医学部, 北京 100083)

[摘要] **目的:**探讨云南白药不同提取部位对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响。**方法:**应用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型,分别以生理盐水和苏拉明为空白和阳性对照,以小血管个数为主要观察指标,比较云南白药不同提取部位抑制新生血管生成作用。**结果:**云南白药的乙酸乙酯部位和 95%、80%、60% 乙醇部位小血管个数与空白组比较有极显著差异($P < 0.01$)。**结论:**云南白药的乙酸乙酯部位、乙醇部位(95%、80%、60%)对 CAM 新生血管有抑制作用。

[关键词] 云南白药;活性部位;鸡胚绒毛尿囊膜;血管活性

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0223-03

Screening Active Fraction of Yunnan Baiyao for Inhibition of Angiogenesis

BI Wei^{1,2}, SHEN Shi³, LI Qiang¹, LEI Hai-min^{1*}

(1. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. The Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the active fraction of Yunnan Baiyao on the angiogenesis of chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM). **Method:** Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model was used to compare the different extracted parts of Yunnan Baiyao. The different extracted parts of Yunnan Baiyao were implanted on top of CAM when chick embryos developed on day 7, at the same time, normal saline and suramin were given respectively as control group and positive group. The number of newly growth vessels were counted. **Result:** The vessel number of the ethyl acetate and alcohol (95%, 80%, 60%) extracted parts were largely less than that in the normal saline control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The ethyl acetate and alcohol (95%, 80%, 60%) extracted parts had the activity of angiogenesis inhibition on CAM.

[Key words] Yunnan Baiyao; active fraction; chorioallantoic membrane; angiogenesis

云南白药自 1902 年问世以来,经过了 100 多年的临床应用和发展,疗效独特显著。其主要功效是化瘀止血、活血止痛、解毒消肿,用于跌打损伤、瘀血肿痛、吐血、咳血等出血症状^[1]。云南白药的主要药理作用有止血活血、抗炎消肿、镇痛、兴奋子宫等。

另外,有研究发现云南白药可以抑制肿瘤细胞的生长,尤其晚期癌症肿瘤伴疼痛出血者,用之最宜。云南白药甲醇提取物对 A-259(人肺癌)、MCF-7(人乳腺癌)、HT-29(人结肠癌)、A-496(人肾腺癌)、PACA-2(人胰腺癌)、PC-3(人前列腺癌)6 种人体肿瘤细胞均有抑制作用^[2]。肿瘤是目前危害人类健康的主要疾病之一,抗肿瘤药物的作用机制除直接抑制肿瘤细胞的生长与增殖、增强人体免疫力外,还可以通过抑制肿瘤血管生成实现^[3-6]。在前期的预试验中,我们发现云南白药具有抑制血管生长的活性,因此,从云南白药中筛选抑制血管生长的活性部位,

[收稿日期] 2011-06-30

[第一作者] 毕葳,助理研究员,从事中药配位化学及中药化学, Tel: 010-84033375, E-mail: liy_biw@126.com

[通讯作者] *雷海民,教授,从事中药有效物质基础及创新药物研究, Tel: 010-84738640, E-mail: leihaimin@126.com

不仅对于云南白药的功效以及作用机制的研究是个有利的补充,而且对抗肿瘤药物的开发也具有重要的意义。

1 材料

320040 型解剖显微镜(日本 Olympus 公司), JY2002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),德国罗曼鸡胚蛋,蛋重 50 ~ 60 g,明胶海绵(江苏金陵制药厂),云南白药(云南白药集团),苏拉明(批号 H31020809,北京市药品检验所)。

2 方法

2.1 阳性药苏拉明对照品溶液和云南白药不同部位的制备

2.1.1 苏拉明 精密称取苏拉明粉末 4 mg,用 60% 的乙醇超声溶解定容于 10 mL 量瓶中,冰箱冷藏保存。

2.1.2 云南白药 称取 10 g 云南白药,依次用石油醚、乙酸乙酯、95% 乙醇、80% 乙醇、60% 乙醇、水超声提取,每个梯度溶剂 300 mL,提取 3 次,每次 30 min,抽滤得上清液,水部位提取液离心取上清液,各部位上清液减压回收溶剂,用 95% 乙醇混悬定容至 25 mL 容量瓶中,备用。

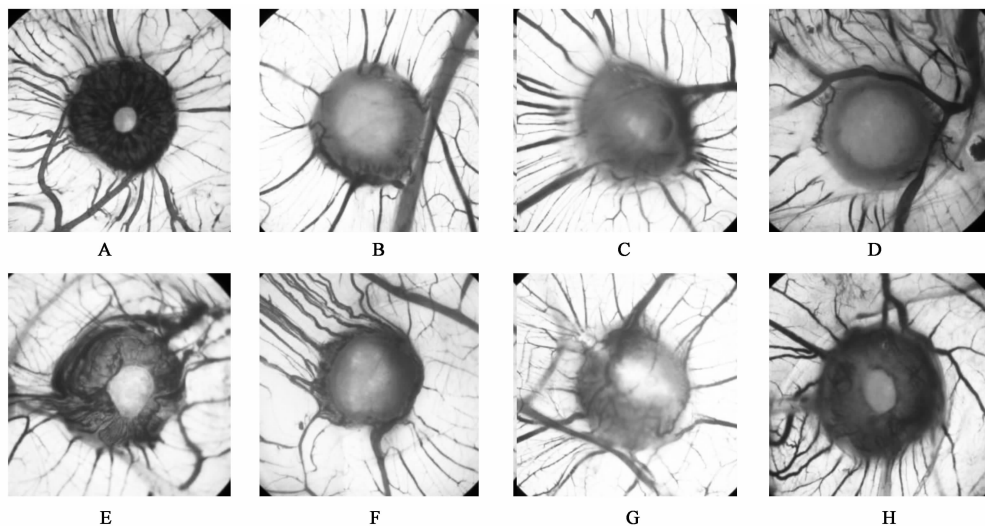
2.2 对鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)新生血管生成的影响试验 在无菌操作台上,用消毒过的打孔器将压扁的明胶海绵打成直径 2 mm 的小圆片,用移液枪将药液加在明胶海绵上,每组加药量 5 μ L,在无菌台上消毒、吹干,备用。种蛋随机分成 10 组,每组 12

只,消毒后放入孵化箱,温度(37.6 \pm 0.2) $^{\circ}$ C、相对湿度 60%,气室向上,长轴与蛋托呈 45 $^{\circ}$,每天转蛋不少于 2 次,转蛋角度以水平位置前俯后仰各 45 $^{\circ}$ 为宜,孵化 7 d。在超净台上将鸡胚用乙醇棉消毒后,用眼科手术剪在气室顶部开小孔,然后用镊子去掉周围的蛋壳和壳膜,开口面积约 3 mm²,在气室白膜上注射 1 滴无菌生理盐水,分离气室膜与 CAM,用镊子撕去气室白膜,暴露下层的 CAM 膜,将载药明胶海绵膜置于 CAM 和卵黄囊膜处血管较少的部位,然后用灭菌透明胶封口,继续孵育 72 h 后,去除鸡胚气室上端封口的透明胶,沿药膜周围轻轻加入甲醇/丙酮等体积混合液 1 ~ 2 mL,室温固定 10 min,从气室端揭去周围的蛋壳,以药膜为中心剪下 CAM 膜,置于盛有蒸馏水的培养皿中展开,然后平铺至载玻片上,在解剖显微镜下照相。

2.3 数据处理 应用图像处理软件(Image Professional Plus 5.0)对鸡胚照片进行数据采集,以药膜为中心计数新生血管的内径,按血管内径将血管分为小血管(< 50 μ m)、中血管(50 ~ 100 μ m)和大血管(100 ~ 200 μ m),计数血管个数($\bar{x} \pm s$),应用医学统计软件 SPSS 11.5 版统计,采用组间单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

云南白药不同提取部位对 CAM 血管生长的影响,见图 1,表 1。



A. 空白组;B. 苏拉明组;C. 石油醚部位;D. 乙酸乙酯部位;E. 95% 乙醇部位;F. 80% 乙醇部位;G. 60% 乙醇部位;H. 超声提取水部位

图 1 云南白药不同提取部位对 CAM 血管的影响

表 1 云南白药不同提取部位对 CAM 血管数的影响($\bar{x} \pm s$)

个

云南白药提取部位	n	小血管	中血管	大血管	总血管
石油醚	10	18.00 ± 4.94	16.70 ± 3.94	6.00 ± 4.52	40.80 ± 7.24
乙酸乙酯	8	6.88 ± 1.31 ¹⁾	14.50 ± 2.88	7.25 ± 3.06	28.62 ± 5.52
95% 乙醇	8	5.38 ± 1.14 ¹⁾	16.38 ± 3.81	8.25 ± 3.95	30.62 ± 6.02
80% 乙醇	10	10.20 ± 3.05 ¹⁾	21.80 ± 4.90 ¹⁾	7.50 ± 2.55	39.90 ± 7.47
60% 乙醇	10	8.80 ± 1.51 ¹⁾	16.20 ± 3.31	9.40 ± 4.67	34.70 ± 7.86
水	8	15.88 ± 6.51	16.38 ± 3.66	4.13 ± 2.59	36.50 ± 7.68
苏拉明	11	13.55 ± 2.58 ¹⁾	13.28 ± 2.90	5.73 ± 2.05	32.73 ± 4.80
空白	10	19.00 ± 4.71	15.00 ± 3.32	5.90 ± 3.00	39.90 ± 5.30

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

从形态学上可以看出,空白组与苏拉明组血管有明显的差异,空白组血管生长正常,主次血脉分明,血管丰富,新生血管多,血色鲜明,在以生理盐水为对照的载体周围血管走行正常,都围绕药膜向四周辐射,血管分布清晰,增生现象较少;苏拉明组血管分布较空白组稀疏,且颜色比较灰暗,新生细小血管较少,血管分布清晰。从血管计数统计分析,空白组新生细小血管较苏拉明组多;石油醚组血管生长与空白组相似,血管数较多且血色鲜明;乙酸乙酯和 95% 乙醇提取部位组新生小血管较空白组明显减少,当加大剂量时死亡数较其他组多,表明此部分具有一定的毒性和抑制小血管增生的作用;80% 乙醇和 60% 乙醇组的小血管数较空白组少,水提取部位组血管生长较空白组相似。

云南白药乙酸乙酯和各乙醇提取部位具有明显抑制新生小血管形成的作用。

4 讨论

CAM 在生成早期,机体的免疫系统尚未完全建立,对各种异物几乎不发生排斥反应,将含药载体置于其表面,可观察药物对血管生成的影响,该模型对抗血管生成药物敏感,目前仍是较理想的药物筛选模型^[7],CAM 模型经济实惠,操作简单,技术容易掌握。由于 CAM 上血管丰富,放药膜时要尽量避开主血管,但是膜上的血管难以全部避开,加药后血管容易生长成中、大血管,因此在血管计数时主要参考由膜周围辐射出的细小血管数考察药物对新生血管的影响。药膜种类分为微孔滤膜、羧甲基纤维素、中性

定性滤纸和快速定性滤纸、擦镜纸,实验发现明胶海绵促进血管作用较强,是研究血管生成抑制作用的良好载体,羧甲基纤维素和微孔滤膜有利于观察分析血管生成促进作用,由于本实验主要是筛选抑制血管新生活性部位,故选择明胶海绵。本试验筛选出云南白药对 CAM 抑制新生血管作用的活性部位,为进一步分离鉴定活性成分奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 卫生部药品标准. [S] 中药成方制剂第十八册. 1998: 30.
- [2] 高崇昆. 云南白药探秘—云南白药研究与应用[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2002: 24.
- [3] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? [J]. Natl Cancer Inst, 1990, 82:4.
- [4] He Z Y, Chen Z Y, Qiu C P, et al. Cloning expression and tumor suppression of human endostatin [J]. Acta Biochemica et Biophysica Sinica, 2000, 32(4):333.
- [5] 沈先荣, 贾福星, 王灵, 等. 鲨鱼软骨制剂抑制血管生成的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(2): 155.
- [6] 胡德恩. 抑制血管生成在抗癌治疗中的意义[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 1990(6): 321.
- [7] 郭青龙. 肿瘤药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 102.

[责任编辑 何伟]