

# 当归、黄芪注射液对鸡胚绒毛尿囊膜模型的毒性研究

杨丽霞<sup>1</sup>, 豆伍应<sup>2</sup>, 颜春鲁<sup>3</sup>, 刘铜华<sup>1\*</sup>, 魏道武<sup>3</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 兰州市榆中县第一人民医院, 兰州 榆中 730100;  
3. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的: 通过观察当归、黄芪注射液对鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型的毒性, 探讨当归、黄芪注射液利用 CAM 模型研究血管生成的可行性。方法: 制备 CAM 模型, 观察应用当归、黄芪注射液及不同配比后 CAM 模型的存活情况。结果: 当归、黄芪注射液及不同配比对 CAM 模型的存活无毒性, 与生理盐水对照组相比无显著性差异( $P > 0.05$ )。结论: 可以利用 CAM 模型研究当归、黄芪注射液的促血管生成作用。

[关键词] 当归注射液; 黄芪注射液; 绒毛尿囊膜; 毒性

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)05-0046-03

## Study on Toxicity of Angelica Sinensis Injection and Astragalus Membranaceus Injection in Chorioallantoic Membrane Model

YANG Li-xia<sup>1</sup>, DOU Wu-ying<sup>2</sup>, YAN Chun-lu<sup>3</sup>, LIU Tong-hua<sup>1\*</sup>, WEI Dao-wu<sup>3</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. The First People's Hospital of Yuzhong County of Lanzhou City, Yuzhong, Lanzhou 730100, China;

3. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the toxicity of Angelica sinensis injection (ASI) and Astragalus membranaceus injection (AMI) in the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model. **Methods:** Fertilized eggs were incubated for 7 days at 37.8 °C, and randomly divided into 6 groups, and then were respectively treated with NS (negative control), ASI, AMI, and different ratio of ASI and AMI. After another 3 days of incubation, the number of living chick embryos were counted. **Results:** The survival of chick embryos could not be inhibited by ASI and AMI, and our assay showed that no difference between therapy groups and negative control ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** ASI and AMI could be used to study angiogenesis by CAM.

[Key words] ASI-angelica sinensis injection; AMI-astragalus membranaceus injection; CAM-chorioallantoic membrane assay; toxicity

血管生成(angiogenesis)是指从已存在的血管中长出新的毛细血管的过程。体内大部分血管在发育完全后保持高度的稳定性,其血管生成缓慢且难以觉察。但是,在创伤修复、周期子宫内膜以及牛皮

癣、肿瘤、风湿病、视网膜眼底病等病变状态下,存在着活跃的血管生成,血管生成失控是这些疾病发生发展的重要环节。而在缺血性脑栓塞、冠心病等疾病中,血管再生障碍则是困扰临床医生的一大难题,因此,研究促进血管生成在以上疾病的预防、治疗和恢复中具有重要意义。

研究血管生成的模型,主要有动物角膜囊(眼前房)<sup>[1]</sup>、动物颊囊<sup>[2]</sup>和鸡胚绒毛尿囊膜<sup>[3]</sup>(chorioallantoic membrane, CAM)3种。其中 CAM 模型

[收稿日期] 2008-12-01

[基金项目] 高等学校学科创新引智计划资助(B07007)

[通讯作者] \* 刘铜华, Tel: (010) 64286642; E-mail: thliu@tom.com

具有实验材料易得、操作简便、实验周期短、不需要特殊设备、可进行大批量研究等优点而被广泛应用。探讨血管生成的发生机理和研制促进或抑制血管生成病变的药物是近年来医学研究的热点课题。本研究以当归注射液(*Angelica sinensis* injection, ASI)和黄芪注射液(*Astragalus membranaceus* injection, AMI)为研究对象,通过观察其对鸡胚 CAM 模型存活状况的影响,探讨当归、黄芪注射液利用 CAM 模型研究血管生成的可行性,为进一步研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 药品** 当归注射液( $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),由武汉大学中南医院生产,批号:050408;黄芪注射液( $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),由上海禾丰制药有限公司生产,批号:4K01655。

**1.2 试剂与仪器** 生理盐水,由天津市化学试剂研究所生产;混合纤维素酯微孔滤膜( $0.45 \mu\text{m}$ ),由上海兴亚净化材料厂生产;微量进样器,由热电(上海)公司生产;电热培养箱:PYX-DXS 型,金坛市恒丰仪器厂生产。

**1.3 载体的选择** 选择混合纤维素酯微孔滤膜为载体,用打孔器制成直径为  $0.5 \text{ cm}$  的小碟片,湿热高压消毒,无菌水浸洗 2 次备用<sup>[4]</sup>。

**1.4 药品配制** 当归注射液,  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 黄芪注射液( $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),用前配制成  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液;并将当归注射液与黄芪注射液按体积比配成 1:1、1:2、1:5 的混合液,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。

**1.5 模型制备<sup>[5]</sup>** 选择三黄肉鸡种蛋 180 枚,购自兰州市西固区华陇肉鸡种蛋场,批号:PS 200504,每枚重 50~65 g,表面光洁,蛋壳均质,蛋形规范,无皱痕裂纹,产后 2 d 内用作实验。种蛋用 1% 新洁尔灭液擦去污渍,75% 酒精消毒后,孵育于电热培养箱中,温度  $37.8 \text{ }^\circ\text{C}$ ,培养箱中放一水盘以保持相对湿度在 40%~70%,并留一通气孔,保证氧气的供应。孵育前培养箱内及室内地面用 84 消毒液消毒 60~120 min。种蛋钝端(大头端)朝上,呈  $45^\circ$  倾斜,每天转蛋至少 2~4 次,可促进羊膜运动,防止胚胎发生黏连。将孵育 7 d 的鸡胚随机分为 6 组,每组 30 枚,分别为 ASI、AMI、ASI:AMI=1:1、ASI:AMI=1:2、ASI:AMI=1:5 及 NS 对照组。酒精消毒蛋气室(大头端)表面( $2 \times 3 \text{ cm}$ )区域,用牙科砂轮在蛋壳表面刻划出凹痕,用眼科弯镊小心揭去蛋壳,开一( $1.5 \times 1.5 \text{ cm}$ )的小窗。然后用一次性注射器在 CAM 上滴

1 滴生理盐水,用注射器针头透过盐水滴在气室膜上轻轻点刺 1 下,然后用针头小心推开气室膜并及时用眼科弯镊夹住,在注射针头协助下,轻轻揭去气室膜,使 CAM 完全暴露,取直径  $0.5 \text{ cm}$  的混合纤维素酯微孔滤膜片(预先高压灭菌)作为载体置于 CAM 中央血管稀少区。用透明胶带纸封贴假气室,形成透明观察窗,继续孵化。

**1.6 加药 造模** 1 d 后,各组分别滴加待测药液( $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 10  $\mu\text{L}$ ,对照组加 NS 10  $\mu\text{L}$ ,密封后继续孵育,观察鸡胚的存活情况,孵育 3 d 后,计数鸡胚的存活个数。所加药量以不溢出载体为宜,观察发现 10  $\mu\text{L}$  为载体所能承载的最大容量。

**1.7 统计分析** 应用 SPSS 10.0 统计软件,对鸡胚存活率进行  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

鸡胚在温度  $37.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度(40%~70%)条件下正常发育。照卵灯连续观察胚膜发育情况,依次见到:樱桃珠(2 日胚)、蚊虫珠(3 日胚)、蜘蛛胚(4 日胚)等特征,绒毛尿囊膜生长情况与孵育时间相吻合<sup>[6]</sup>。

**2.1 鸡胚观察标准** 存活鸡胚:胚体活动活跃,动脉血管搏动有力,CAM 透明,血管丰富,网络清晰(图 1)。死亡鸡胚:CAM 血管颜色浅淡,网络消失,胚胎颜色发白,活动停止(图 2)。导致死亡的主要原因是造模失败,表现为:(1)出血:CAM 上有散在出血点,出血不易停止,发展为大的淤血斑,鸡胚很快死亡(图 3)。(2)污染:部分 CAM 上有青霉菌落,胚胎黏连(图 4)。因此,除药物作用外,鸡胚的自身发育状况,以及模型制备时的出血和消毒不彻底,均可能影响鸡胚的存活。

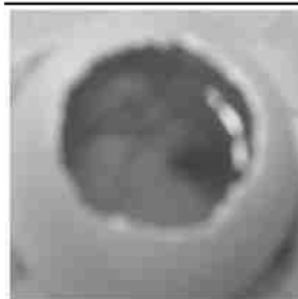


图 1 存活鸡胚

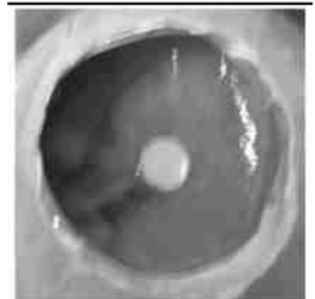


图 2 死亡鸡胚

**2.2 鸡胚存活计数** 见表 1。

结果表明,与 NS 对照组比较,当归、黄芪注射液以及所设几种两者配比均对鸡胚的存活无明显差异。

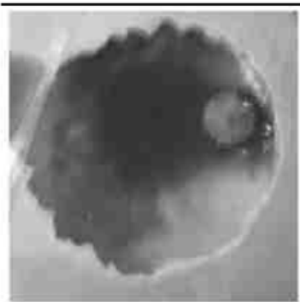


图 3 出血鸡胚

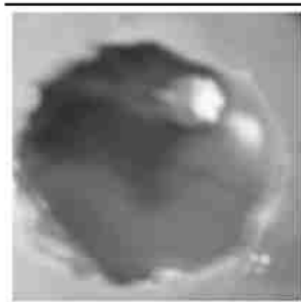


图 4 污染鸡胚

表 1 ASI、AMI 及其不同配比对鸡胚 CAM 模型存活的影响

| 组别           | 鸡胚数 | 未受精 | 造模 | 3 d 后存活 | 受精率 (%) | 存活率 (%)            |
|--------------|-----|-----|----|---------|---------|--------------------|
| NS           | 30  | 2   | 28 | 26      | 93.3    | 92.9               |
| ASI          | 30  | 3   | 27 | 24      | 90.0    | 88.9 <sup>1)</sup> |
| AMI          | 30  | 2   | 28 | 27      | 93.3    | 96.4 <sup>1)</sup> |
| ASI:AMI= 1:1 | 30  | 4   | 26 | 23      | 86.7    | 88.5 <sup>1)</sup> |
| ASI:AMI= 1:2 | 30  | 2   | 28 | 26      | 93.3    | 92.9 <sup>1)</sup> |
| ASI:AMI= 1:5 | 30  | 3   | 27 | 25      | 90.0    | 92.6 <sup>1)</sup> |

注:与 NS 对照组比较<sup>1)</sup>  $P > 0.05$ 。

### 3 讨论

现代药理学研究表明,当归注射液具有扩张外周血管、增加血流量、改善外周血液循环及抑制血小板聚集,促进上皮细胞增殖等作用<sup>[7]</sup>。黄芪注射液具有清除氧自由基,抗内皮细胞氧化损伤等作用<sup>[8]</sup>。长期临床实践表明,当归注射液和黄芪注射液在治疗血管生成障碍性疾病方面具有确切的疗效,其机理是否与血管生成有关,这是我们关心的主要问题。本实验选用 CAM 模型为研究对象,通过观察当归、黄芪注射液对 CAM 模型存活的影响,研究其对 CAM 模型的毒性作用,进一步探讨利用 CAM 模型研究当归、黄芪注射液促血管生成作用的可行性,为后续的深入研究奠定基础。实验结果表明:当归注射液和黄芪注射液对鸡胚的存活无毒性作用,但是否

具有促进血管生成活性,还需进行对血管生成促进因子样作用的研究。

目前,国内从血管生成角度来探讨中药的作用起步较晚,如果能深入阐述疾患与血管生成的关系,将会进一步促进中医药防治血管生成性疾病的研究,对于揭示中药的分子活性,促进中医药现代化,开发中药新药都具有重要的意义。

### [参考文献]

- [1] Gimbrone M, Grant RS, Folkman J, *et al.* Tumor growth neovascularization: an experimental model using rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst*. 1974, 52: 412-427.
- [2] Schreiber AB, Winkler ME, Derynck RE, *et al.* Transforming growth factor- $\alpha$ : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*, 1986, 232: 1250-1253.
- [3] Raymond L, Barnhill MD, *et al.* Biochemical modulation of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *J Invest Dermatol*, 1983, 81: 485-488.
- [4] 王蕾, 张树成, 吴志奎, 等. 鸡胚绒毛尿囊膜血管生成模型在中药研究中应用方法探讨[J]. *中药药理与临床*, 2000, 16(6): 46.
- [5] 贺国安, 罗进贤, 张添元, 等. 改进的鸡胚绒毛尿囊膜技术-无气室孵育法[J]. *中山大学学报*, 2003, 42(2): 126-127.
- [6] Auerbach R, Kubal L. A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryo. *Dev Biol*, 1974, 11: 391.
- [7] 夏泉, 张平, 李绍平, 等. 当归的药理作用研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2004, 15(3): 164-166.
- [8] 杨富国, 董果雄, 张社华, 等. 黄芪注射液对内皮细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J]. *中国微循环*, 2004, 8(3): 138.