

当归注射液、黄芪注射液不同配比促鸡胚绒毛尿囊膜模型血管生成的实验研究

杨丽霞¹, 卢雯玲¹, 牛洁¹, 王志程¹, 刘铜华^{1*}, 魏道武²

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的: 探讨当归、黄芪注射液不同配比对鸡胚绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)血管生成的影响。方法: 种蛋在37.8℃孵育7d后制备CAM模型, 当归、黄芪注射液不同配比滴加于CAM表面的载体上, 继续孵育3d, 观察鸡胚存活状况, 然后制备鸡胚CAM标本, 解剖显微镜下计数新生毛细血管数目。结果: 当归、黄芪注射液不同配比均具有促进鸡胚CAM血管生成作用, 与生理盐水对照组相比有显著性差异($P < 0.05$), 除当归黄芪1:5, 其他各组药效低于表皮生长因子(EGF) ($P < 0.05$)。结论: 当归、黄芪注射液不同配比具有显著促进鸡胚CAM血管生成作用, 其可能的机制是血管内皮细胞的增殖与迁移。

[关键词] 血管生成; 鸡胚绒毛尿囊膜; 当归补血汤; 当归注射液; 黄芪注射液

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)08-0051-04

Study of the Different Ratio of *Angelica sinensis* and *Astragalus membranaceus* injection on Angiogenesis of Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Model

YANG Li-xia¹, LU Wen-ling¹, NIU Jie¹, WANG Zhi-cheng¹, LIU Tong-hua^{1*}, WEI Dao-wu²

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

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of the different ratio of *Angelica sinensis* Injection (ASI) and *Astragalus membranaceus* Injection (AMI) on angiogenesis of the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). **Methods:** After fertilized eggs were incubated for 7 days at 37.8℃, the chorioallantoic membrane (CAM) models were made, and were respectively treated with NS (negative control), different ratio of ASI and AMI, and EGF (positive control). After incubated for another 3 days, the CAM samples were made, then counted the number of the first grade and second grade blood vessels (capillaries). **Result:** The proliferation of capillaries in the therapy groups was obviously increased compared with NS control ($P < 0.05$), but the effect is lower than EGF control ($P < 0.05$) excluding the group of ASI:AMI=1:5. **Conclusion:** The result showed that the combination of different ratio of ASI and AMI can obviously stimulate angiogenesis of the chick embryo CAM. And proliferation and migration of vascular endothelial cells can be the mechanism of angiogenesis.

[Key words] angiogenesis; chick embryo chorioallantoic membrane; Danggui Buxue Decoction; *Angelica sinensis* injection; *Astragalus membranaceus* Injection

[收稿日期] 2007-11-06

[通讯作者] * 刘铜华, Tel: (010) 64286642; E-mail: thliu16@

163.com

血管生成 (angiogenesis) 是指从原血管床中长出新的毛细血管的过程, 它在胚胎发育、创伤愈合、组织再生和修复、侧支循环建立、糖尿病视网膜膜病变以及肿瘤组织等生理和病理过程中起重要作用^[1]。探

讨血管新生的发生机理和研制促进或抑制血管新生病变的治疗方法和药物是近年来医学领域研究的热点课题。利用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型进行研究,国内主要集中于抑制血管新生方面,如肿瘤等,在促进血管新生研究方面还处于起步阶段。本研究选用当归注射液(*angelica sinensis* injection, ASI)和黄芪注射液(*astragalus membranaceus* injection, AMI)为研究对象,从血管新生的角度入手,通过观察其不同配比对鸡胚 CAM 血管生成的影响,探讨“当归补血汤”中“益气药”与“养血药”的配伍规律。

目前,研究血管新生主要有动物角膜囊(眼前房)^[2]、动物颊囊^[3]和鸡胚绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)^[4]3种模型。前两种模型,是在动物体上进行观察,无法同时进行大样本实验,操作技术要求高,而 CAM 模型是一种简便、快速、有效并可同时进行大样本的实验方法,并可与其他技术方法相结合。

1 材料

1.1 实验动物 三黄肉鸡种蛋 70 枚,购自兰州市西固区华陇肉鸡种蛋场,合格号:PS200504,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 内用于实验。

1.2 实验药品 当归注射液:由武汉大学中南医院生产(生药 0.1 g·mL⁻¹),批号:050408;黄芪注射液:由上海禾丰制药有限公司生产(生药 2 g·mL⁻¹),批号:4K01655;表皮生长因子(EGF):由 Sigma 公司生产,规格:10 μg,产品号:EGF 2003。

1.3 材料与仪器 混合纤维素酯微孔滤膜(孔径 0.45 μm):上海兴亚净化器材厂生产。电热培养箱:金坛市恒丰仪器厂生产。数码相机:日本 NIKON 公司生产。

2 方法

2.1 载体制备 选择混合纤维素酯微孔滤膜(孔径 0.45 μm)为载体,用打孔器制成直径为 0.5 cm 的小碟片,湿热高压消毒,无菌水浸洗 2 次备用^[5]。

2.2 鸡胚分组 采用完全随机实验设计方法,将 50 枚种蛋随机分为:生理盐水对照组、当归注射液与黄芪注射液 1:1 组、当归注射液与黄芪注射液 1:2 组、当归注射液与黄芪注射液 1:5 组、表皮生长因子(EGF)阳性对照组,每组 10 枚。

2.3 药品配制 当归注射液,0.1 g·mL⁻¹;黄芪注射液(2 g·mL⁻¹),用前配制成 0.1 g·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;表皮生长因子(EGF),用前配制成 10 ng·mL⁻¹溶液,避光保存。

2.4 鸡胚孵育 种蛋先用 1%新洁尔灭液擦去表面污渍,再用 75%酒精消毒。种蛋应大头(气室端)朝上,与蛋托呈 45 度角倾斜,孵育于 37.8 °C 培养箱中,培养箱中放一水盘保持相对湿度在 40%~70%,留一通气孔,以保证氧气的供应。孵育过程中每天转蛋 4 次,防止胚胎粘连,促进羊膜运动^[6]。

2.5 CAM 模型制备^[5]

2.5.1 开窗 孵育第 7 天,75%的酒精棉球消毒蛋气室(大头端)表面约 2 cm×3 cm 区域,再用牙科砂轮磨切蛋壳。待磨出一凹痕后,用眼科弯镊小心夹去蛋壳及壳膜。窗口大小由气室大小决定,一般距气室底边约 0.5 cm。

2.5.2 暴露 CAM 开窗后,先用一次性注射器在气室膜上滴 1 小滴生理盐水,待生理盐水慢慢扩散开时,紧贴在气室膜下面的 CAM 血管就显现出来,并且在滴生理盐水处下层的 CAM 与上层的气室膜分离并向下凹陷,此时用注射器针头将此处的气室膜小心推开并挑起,另一手持眼科弯镊顺势将挑起的气室膜夹住,夹紧,同时在注射器针头的协助下,轻轻将气室膜一点点揭去,使 CAM 完全暴露。制备假气室时切勿损伤 CAM,以免导致微血管出血而影响鸡胚的存活。

2.5.3 加药 暴露 CAM 后,将事先预备好的载体置于 CAM 中央血管稀少区,以便待测药物充分发挥作用。按分组用微量加样器滴加相应药品 10 μL,然后用透明胶带封贴假气室,形成透明观察窗,观察鸡胚的存活情况。封窗后继续孵育,封窗一定要严密,整个操作过程应尽量保证无菌。

2.5.4 制作 CAM 标本 加药孵育 3 d,剪开透明胶带纸,由观察窗加入甲醇:丙酮=1:1 的固定液(5~10)滴,预固定(15~20)min,待 CAM 的血管完全凝固后,用眼科弯镊小心地去掉 CAM 平面以上的卵壳及卵壳膜,并用眼科剪以待测物为中心完整地剪下 CAM,将其置于盛有生理盐水的平皿中,用镊子抖展后平铺于载玻片上,阴干保存。

2.6 血管计数 解剖显微镜下以 1×10 倍计数新生毛细血管,以实验部位边缘(即微孔滤膜载体边缘)1 mm 范围内为一级血管,以实验部位边缘 5 mm 处为二级血管,凡属趋向性生长的血管,即以载体为

中心发出,与滤膜半径的夹角小于 45 度者均予计数,而穿行、绕行的血管则不算在内^[7]。一、二级血管分别观察计数。

2.7 统计学处理 应用 SPSS10.0 统计软件,新生血管数目以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行 One-Way ANOVA 方差分析。

3 实验结果

鸡胚在温度 37.8 ℃、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^[8]。

3.1 鸡胚存活情况观察 存活鸡胚: 胚体活动活跃,动脉血管搏动有力, CAM 透明,血管呈叶脉状分布,颜色鲜红,脉络清晰。死亡鸡胚: 胚体上浮,颜色发白,活动停止, CAM 血管颜色浅淡,脉络消失。导致死亡的原因主要有: (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。(2) 污染: 部分 CAM 上有青霉菌落,胚体粘连。鸡胚质量及孵育状况分别由受精率和存活率来反映。鸡胚受精率 = (鸡胚数目 - 死弱精) / 鸡胚数目 × 100%, 存活率 = 取材数目 / 开窗数目 × 100%。结果见表 1。

表 1 当归、黄芪注射液不同配比
对鸡胚 CAM 模型存活的影响 (n = 10)

组别	剂量 (μL)	作用时间 (d)	死弱精	开窗数目	取材数目	受精率 (%)	存活率 (%)
生理盐水	10	3	1	9	8	90	88.9
归芪 1:1	10	3	1	9	9	90	100
归芪 1:2	10	3	2	8	7	80	87.5
归芪 1:5	10	3	1	9	8	90	88.9
EGF	10	3	1	9	9	90	100

注: 当归注射液 0.1 g·mL⁻¹, 黄芪注射液 0.1 g·mL⁻¹, 两者体积比为 1:1、1:2、1:5; 表皮生长因子, 10 ng·mL⁻¹。

3.2 鸡胚 CAM 血管生成表现形式 解剖显微镜下观察显示: 自然状态下的鸡胚 CAM 血管生长呈叶脉状, 脉络分布均匀。而给药组在载体盘周围可以见到新生毛细血管从载体盘边缘垂直发出, 呈不同程度辐辏状密集生长, 与周围非用药区相比具有显著特异性。与药物组相比, 生理盐水组载体盘周围的血管密度明显低于药物组, 而 EGF 阳性对照组载体盘周围的血管密度却明显高于药物组(图 1)。

3.3 当归、黄芪注射液不同配比对鸡胚 CAM 血管生成的影响(表 2) 结果表明, 当归、黄芪注射液不

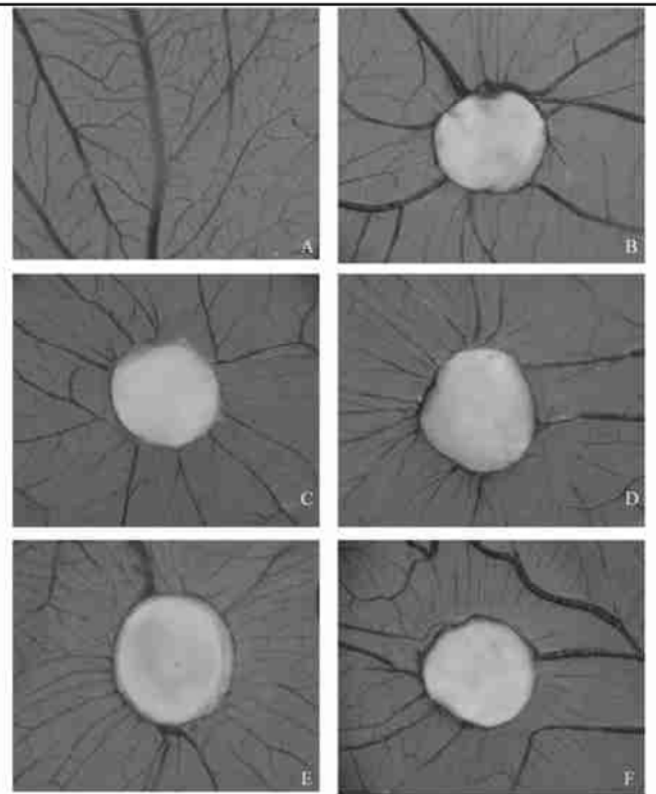


图 1 解剖显微镜下鸡胚 CAM 血管生成直观图 (×16)

A. 自然生长; B. 生理盐水组; C. 当归、黄芪注射液 1:1 组; D. 当归、黄芪注射液 1:2 组; E. 当归、黄芪注射液 1:5 组; F. 表皮生长因子组

同配比鸡胚 CAM 血管生成具有明显地促进作用, 一级血管及二级血管计数显示, 当归、黄芪注射液不同配比与生理盐水相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 并随着黄芪注射液比例的增加, 其促血管生成作用也随之增强, 其中归芪 1:5 组作用最强, 但各配比组间血管数目无统计学差异; 与 EGF 组相比, 除当归黄芪 1:5 组 ($P > 0.05$), 其他各组血管生成均明显低于 EGF ($P < 0.05$)。

表 2 当归、黄芪注射液不同配比对鸡胚
CAM 血管生成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	一级血管数	二级血管数
生理盐水	8	4.88 ± 1.25	9.38 ± 3.62
归芪 1:1	9	45.33 ± 7.25 ^{1,2)}	56.56 ± 8.26 ^{1,2)}
归芪 1:2	7	49.86 ± 6.67 ^{1,2)}	59.57 ± 9.78 ^{1,2)}
归芪 1:5	8	54.38 ± 10.97 ¹⁾	63.50 ± 11.53 ¹⁾
EGF	9	65.67 ± 10.17 ¹⁾	78.11 ± 9.56 ¹⁾

注: 与生理盐水比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 EGF 组比较²⁾ $P < 0.05$

4 讨论

当归补血汤始载于李东垣的《内外伤辨惑论》, 由当归与黄芪按 1:5 配伍而成, 为经典的益气生血复方。方中黄芪甘温补气, 当归补血和血, 二药合

用, 气血双调, 补气生血, 气足则血旺。临床上常用于劳力性心绞痛和心肌梗死后正虚邪恋、气血双亏、心失所养等证的治疗。本研究选用当归注射液和黄芪注射液为研究对象, 从血管新生的角度入手, 通过观察其不同对比对鸡胚 CAM 血管生成的影响, 探讨“当归补血汤”中“益气药”与“养血药”的配伍规律。长期临床实践证实, 当归注射液和黄芪注射液在临床上治疗血管生成障碍性疾病方面具有确切疗效, 其机理是否与促进血管生成有关, 这是我们进行本实验的目的所在。

本研究将当归、黄芪注射液按不同比例配伍, 运用 CAM 模型, 以 CAM 血管生成数量为指标观察不同比例当归、黄芪注射液配伍对血管生成的影响, 结果 3 种配比均具有促血管生成作用, 其中以 1: 5 的比例配伍效果最佳, 表明原方“当归补血汤”为最佳配伍。本研究结果揭示了古代医家关于本方当归与黄芪配伍的科学性, 同时也为寻找具有调节血管生成作用的中药复方提供了实验依据和实验方法。

[参考文献]

[1] 王兆钺. 血管新生的研究进展[J]. 中华医学杂志,

2004, 84(13): 1137.

- [2] GIMBYONEY M, GRITAN RS, FORLKMAN J, *et al.* Tumor growth neovascularization: an experimental model using rabbit cornea[J]. *J Natl Cancer*, 1974, 52: 413-427.
- [3] SCHREIBER AB, WINKLER ME, DERNYCK RE, *et al.* Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor [J]. *Science*, 1986, 232: 1250-1253.
- [4] RAYMOND L, BARNHILL MD. Biochemical modulation of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of the chick embryo[J]. *J Invest Dermatol*, 1983, 81: 485-488.
- [5] 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): 46-47.
- [6] 周 文. 谈谈电器孵鸡的几大要素[J]. *畜牧水产*, 2001, 2: 24-25.
- [7] 樊粤光, 刘建仁, 曾展鹏, 等. 单味成分生脉素促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的实验研究[J]. *中医药学刊*, 2004, 22(5): 774.
- [8] Auerbach R, Kubal L. A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryo[J]. *Dev Biol*, 1974, 11: 391.