

实验研究

补肾生血和补肾调经方药促血管生成作用实验研究

张树成¹ 吴志奎² 王 蕾² 王弘毅¹ 沈明秀³ 王介东¹

摘要 利用鸡胚绒毛尿囊膜(Chicken Chorioallantoic Membrane, CAM)血管生成模型,检测补肾生血和补肾调经方药的动物血清血管生成作用,结果显示,两种中药均可产生特异性的血管生成作用,明显促进血管生长,明显增加血管数目($P < 0.01$),促进血管生成作用增加 55%~124%。提出中药所具有的血管生成活性样作用有重要意义。

主题词 补肾病/药理学 血管/药物作用

我们在对补肾生血和补肾调经两种方药的研究中,发现老年生理性肾虚的雌性金黄地鼠,在服用这两种中药后,子宫组织中血管数目显著增加,树枝状分支广泛,可见明确的血管出芽生长。该实验提示中药可能具有明确的血管生成作用。为了验证这一形态学发现,我们应用鸡胚绒毛尿囊膜(Chicken Chorioallantoic Membrane, CAM)血管生成模型,进行了本实验,结果显示两中药方剂确有促进血管生成的作用。

1 材料和方法

1.1 药物:补肾生血胶囊,由中国中医研究院广安门医院提供,由山茱萸、熟地黄、龟甲胶、阿胶、当归等组成^[1],按成人临床用药量换算为动物用药量 0.075g/kg;补肾调经方剂,由中国中医研究院西苑医院提供,由当归、熟地黄、菟丝子、枸杞子、五灵脂等组成^[2],按成人临床用药量换算为动物用药量 0.36g/kg。

1.2 动物分组和给药方法:选择昆明小鼠,雌雄各半,50 日龄,体重 25 ± 2 g,分为高、中、低剂量和阴性对照 4 组,分别给予补肾生血水溶液临床用量 20 倍、10 倍、5 倍和等量蒸馏水,连续灌胃给药 10 天,每天 1 次,每只动物给药量 0.5ml。选择雌性金黄地鼠,60 日龄,体重 90 ± 5 g,分为给予临床用量 5 倍补肾调经方剂的实验组和给予等量蒸馏水的阴性对照组,连续灌胃给药 20 天,每天 1 次,每只动物给药量 0.8ml。补肾生血方药和补肾调经方药每组分别为 20 只动物。

1.3 动物血清的制备:最后 1 次给药后 24 小时,由眼

眶处去除眼珠取血,待血凝后,吸取血清, -30°C 冰柜保存。实验时,将血清溶化后, 56°C 20 分钟灭活,无菌 0.45μ 的微孔滤膜过滤,无菌低温保存。同组血清混合备用。

1.4 CAM 模型的准备:参照文献[3]方法,选择北京白鸡受精种蛋,自来水清洗后于 1:1000 新洁尔灭水溶液中浸泡 3 分钟消毒,于 $37.8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育,孵育的最初 6 天,每天转蛋 2 次,检查胚胎发育情况。选择发育正常的鸡胚胎,在胚胎发育第 7 天,于蛋壳表面制备假气室,用碘伏和酒精消毒制备假气室区域($1\text{cm} \times 2\text{cm}$),用牙科砂轮锉出 $1\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ 凹痕,在蛋气室处用解剖针打一小孔,用钝物揭开凹痕处白色蛋壳,轻轻撕去蛋壳下的白色内壳膜,这时可见 CAM 连同鸡胚下陷,气室消失,假气室形成,用透明胶带纸封贴,形成透明观察窗。

1.5 中药血管生成作用的检测:选择甲基纤维素为载体。M-450 甲基纤维素配成 1% 溶液,9 磅 10 分钟湿热高压消毒后,平铺在无菌玻璃板上, 60°C 烤干,无菌制成 5mm 直径的小圆片备用。

实验操作:制备假气室第 3 天(鸡胚胎发育第 9 天),轻轻撕掉透明胶带纸,将甲基纤维素载体置于正对观察窗的 CAM 表面,用无菌加样器头吸取 $20\mu\text{l}$ 动物血清,滴于载体表面中央,用透明胶带纸封贴,继续孵育。

CAM 血管生成标本的收集:在鸡胚胎发育第 12 天(动物血清作用 3 天),去除透明胶带纸,将甲醇与丙酮各半的固定液滴入观察窗,将表面 CAM 固定,去除鸡胚,分离观察窗周围 CAM,用上述固定液后固定 10 分钟,将 CAM 标本平展于滤纸上,干燥。

CAM 血管生成作用的观察和评价:将 CAM 标本置于解剖显微镜下,固定观察倍数 15 倍。根据 CAM 血管直径分为大、中、小血管,统计血管数目,分析载体周围血管生成形式。

中药血清作用的实验检测:共完成 161 个鸡胚胎的实验,其中补肾生血方药阴性对照组和高剂量实验组各 20 个鸡胚,中、低剂量实验组各 19 个鸡胚;补肾调经方药阴性对照组和实验组各 20 个鸡胚。载体纯水

1 国家计划生育委员会科学技术研究所,北京海淀区大慧寺 12 号(100081)

2 中国中医研究院广安门医院

3 中国中医研究院西苑医院

收稿日期:1999-02-01;修回日期:1999-04-04

对照组 20 个鸡胚,在甲基纤维素表面滴加 20 μ l 蒸馏水;载体空白对照组 23 个鸡胚,对载体不做任何处理。
1.6 统计处理:采用医学统计软件计算机处理数据,进行方差分析和 Q 检验,以均值($\bar{x}$)表示。

2 结果和分析

2.1 CAM 血管标本的表现:经充分固定的标本,血管鲜红,显示鸡胚活体实时固定保存的标本,不会损伤血管,不经染色,可很好地观察。

2.2 CAM 血管的表现形式:载体和血清的各 2 个对照组,载体周围的血管生成呈自然状态生长,以包绕、杂乱、贯穿、平行、围绕形式存在,或呈自然叶脉样生长,表明其血管生成无特异性,无血管生成促进作用。两种中药的实验组,载体周围血管具有明显的特异性,以甲基纤维素载体为中心,向周围呈放射状增生,且增生血管均以载体边缘为起点向周围呈放射状辐射生长。表明两种中药血清血管生成的作用具有特异性,存在血管生成促进作用。

2.3 CAM 血管的计数:附表示,各实验组血管总数均比对照组明显增加,差异均具有极显著性($P<0.01\sim0.001$);两种载体对照组结果十分接近,差异无显著性($P>0.05$);两种阴性血清对照组结果十分接近,差异无显著性($P>0.05$),与两种载体对照组比较虽略增高,但差异均无显著性(P 均 >0.05)。表明只有两种中药血清具有促进血管生成的显著作用。

附表 各组血管数目比较(个)

组 别	鸡胚数	大血管	中血管	小血管	血管总数
载体纯水对照组	20	4.2	8.8	43.6	56.6
载体空白对照组	23	4.4	10.6	49.1	64.1
补肾调经中药					
阴性血清对照组	20	5.5	9.8	60.4	75.7
血清实验组	20	9.7	20.9	110.4	141.0
补肾生血中药					
阴性血清对照组	20	6.8	10.1	59.6	76.5
小剂量血清实验组	19	13.4	19.2	108.8	141.4
中剂量血清实验组	19	11.6	18.4	92.2	122.2
大剂量血清实验组	20	12.3	22.6	109.8	144.7

两种中药作用比较:两种中药促进大、中、小血管生成作用同时存在,其中以促进中血管生成作用最强,可达 1 倍以上;促进大、小血管生成作用接近,表明中药在促进血管生成的同时,也促进了血管的生长,而大血管生长的作用不如中血管可能是由于血清作用时间只有 3 天所致。两种中药具有的促进血管生成作用和促进血管生长的作用相似。补肾生血中药的作用,并未显示出剂量效应关系,有待深入探讨,显示中药促

进血管生成作用的特殊性,可能在剂量效应关系上是一种“有和无”的作用,值得引起重视。

3 讨论

迄今为止,国内学者对血管生成的研究,仅有对肿瘤、生殖医学领域的研究工作^[3~5]。本文首次提出补肾、生血中药配伍的复方中药可能具有促进血管生成的作用。

血管生成是指毛细血管由原血管床以出芽方式生长、形成新血管的生物等过程^[6],以毛细血管增生开始,以形成新的微血管而告终。真正的毛细血管以 2~3 个内皮细胞组成,是血液与组织进行物质交换的场所,其密度反映了组织新陈代谢率,首先是氧的摄入和营养的供应。体内大部分血管一经发育完全具有高度稳定性,内皮细胞更新缓慢,只有在创伤修复及一些疾病情况下才产生血管固有的再生能力。近 10 年来,血管生成研究成为医学研究中热点课题,发现血管生成受到正向和负向调节信号之间平衡的严密控制,平衡失调,可产生血管生成病,如肿瘤、糖尿病性视网膜病变、风湿性关节炎、牛皮癣、血管瘤、动脉粥样硬化等疾病都有血管的持续生长。而血管生成不良,也不能产生很好的应答,如溃疡愈合、创伤恢复、骨折愈合、微循环障碍等,直接影响病症的治疗。中医中药在治疗这些与血管生成相关的病症中,具有不同于西医的特殊性,并在这些顽症的治疗上有着优势。

本实验通过补肾生血和补肾调经两种方药以血清药理学方法,在 CAM 血管生成模型中发现,两种复方中药均可在模型中产生特异性的血管生成,明确地促进血管生长和血管数目的增加。中药具有的这种作用,有待实验加以证实和深入探讨。

中医理论中对血与脉的关系有很多记载,“脉者血之府也”。血管生成,应属“脉”的成份。中医药研究中,对血管生成的研究很少。CAM 血管生成模型可检测中药的血管生成作用和血管生成活性。

参考文献

- 1 吴志奎,蔡辉国,陈佩贞,等. 补肾生血方对 β -地中海贫血基因水平的影响. 中医杂志,1997,38(12):91-93.
- 2 沈明秀,李荣辉,海鸿,等. 中医中药治疗 30 例不孕症的追踪观察. 中医杂志,1997,38(11):677-678.
- 3 王介东,张树成,王弘毅,等. 人蜕膜和绒毛膜组织在鸡胚绒毛尿囊膜的种植和在体培养观察. 生殖与避孕,1998,18:22.
- 4 沈先荣,贾福星,于志浩,等. 软骨血管生成抑制因子抑制血管生成的研究. 生物化学与生理物理进展,1995,22(3):237-241.
- 5 姜志钢,郭征. 鸡胚绒毛尿囊膜检测肿瘤促血管生长作用改良技术方法. 解剖学杂志,1989,(2):142-143.
- 6 Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. Annu Rev Physiol,1991,53:217-239.