

实验研究

补肾生血中药血管生成活性整体效应的初步探讨

王 蕾¹ 吴志奎¹ 张树成² 吕新霞¹ 王介东²

摘要 以鸡胚绒毛尿囊膜模型(鸡胚 CAM)用中药血清药理学方法,研究补肾生血中药对血管生成活性的影响,并用 IPP 计算机图像处理系统分析新生血管。结果表明,补肾生血中药含药血清可促进鸡胚 CAM 的血管增加,并以细小血管为主,这符合新生血管特征。提示补肾生血中药有促进血管生成和血管生成活性样作用。提出中医肾生髓理论可能与血脉生成有关,补肾生血与血脉生成的关系值得探讨。

主题词 补肾药/药理学 补血药/药理学 血清学试验

血管生成是指毛细血管从原血管以出芽方式形成新血管床的过程。除女性月经周期、胚盘和胚胎发育外,成熟机体很少出现血管新生。但病理条件下则会出现,这与许多疾病的发生有关。目前,靶向血管的药物和基因治疗缺血性疾病及肿瘤的临床应用是该研究的最新进展^[1]。筛选血管生成活性的方法有体内、体外分析方法,体内分析常用模型有兔或大鼠的角膜囊(眼前房)模型^[2]、地鼠颊囊模型^[3,4]和鸡胚绒毛尿囊膜模型(鸡胚 CAM)^[5]。其中,鸡胚 CAM 模型具有实验周期短、易于大样本重复、实验成本低等特点,得到广泛应用。补肾生血中药是根据中医肾主髓理论,在多年临床实践基础上总结出来的有效方剂,具有滋肾养阴、填精生血的功效^[6]。在前期动物实验中发现,服用该药的去卵巢的大鼠子宫内毛细血管数目增加,提示该药可能有促进血管生成样的效用。

1 实验材料

药品和试剂:补肾生血中药购自广安门医院制剂室,醇提、水煎后浓缩。M-450 羧甲基纤维素、丙酮、甲醇为北京化工厂产品。

动物:鸡胚、雌性金黄地鼠:9~10 月龄为老龄动物,3 月龄为青年动物,由中国医学科学院流行病学微生物学研究所动物中心提供。

2 实验方法

鸡胚 CAM 模型的建立^[7]:选用受精率在 90%以上的来航鸡种蛋,重 55~65g。0.1%新洁尔灭消毒,37.6±0.2℃、60%湿度的隔水式恒温孵箱内孵育。每

日翻动 2 次,孵育第 7 天时(满 24 小时为 1 天),在绒毛尿囊膜体表投影距胚头 1cm 处上划定开窗位置。无菌条件下,磨切暴露绒毛尿囊膜,制出假气室。透明胶带封闭窗口。

甲基纤维素盘制备:双蒸水配制 0.5%的 M-450 羧甲基纤维素溶液,高温高压消毒,取 150μl 甲基纤维素溶液分 6 次加入直径为 5mm 的半圆形模具中,60℃烤箱烘干成盘状。80℃烤箱中烘烤 60 分钟消毒。

补肾生血中药含药血清制备:老龄金黄地鼠随机分为老龄对照组、补肾生血药大剂量组、小剂量组,每组 12 只动物;青年金黄地鼠 12 只为青年对照组。大剂量组给予补肾生血中药 7g 生药/kg 体重,小剂量组 3.5g 生药/kg 体重。每日灌胃两次,连续 20 天。最后 1 次喂药 1 小时后处死动物,取血清分装, -20℃保存。56℃水浴灭活,微孔滤器过滤杀菌。

含药血清加入鸡胚 CAM 模型:鸡胚开窗后 24 小时,甲基纤维素盘放入假气室(避开大血管),对照组盘中加入 20μl 灭菌蒸馏水,实验组盘中各加入老龄对照血清、补肾生血药大剂量含药血清、小剂量含药血清、青年对照血清 20μl,透明胶带封闭假气室,继续孵育。每日加样 1 次,第 12 天取材。注入假气室丙酮甲醇混合固定液,20 分钟后,取假气室一侧的蛋壳固定 20 分钟,剥离 CAM 膜铺在滤纸上,室温阴干保存。

解剖显微镜观察^[9]:统计与载体盘边缘接触的总、大、中、小血管数目,根据血管管径将血管分为 3 类:直径>0.1mm 为大血管;直径>0.05mm<0.1mm 为中血管;直径<0.05mm 为小血管。正常鸡胚 CAM 上的血管呈叶脉状分布,由一主干向两侧发出细的分枝走行。把从主干分枝出的血管称为一级血管、自一级再分枝为二级血管,依次类推为三级、四级……,记录各个膜上的血管分级状况^[10]。以被检物为中心,周围血管放射状朝向被检物的生长状态,称为血管辐辏;主干血管向载体盘的弯曲和靠近称之为血管的吸引^[11]。另外,观察比较载体盘周围 1cm 范围内与远离盘(大于 1cm)位置的血管密度,计数出现血管增生或抑制的鸡胚数目,并对比不同组间的差异。数据进行方差分析。

使用图像分析系统 IPP 软件进行处理:解剖显微镜落射光条件放大 10.5 倍时,观察鸡胚 CAM 上的血

1 中国中医研究院广安门医院分子生物实验室,北京市宣武区北线阁 5 号(100053)

2 国家计划生育委员会科学技术研究所细胞生物室

收稿日期:2000-02-21;修回日期:2000-09-09

管新生情况。数码相机在鸡胚绒毛尿囊膜上选取两个视野,1个为载体边缘部分,1个为载体远端距载体中心约1.5cm处。处理图像时,启动Imagine-Pro Plus软件。测量指标选取“Area(面积)”、“Prearea(面积比)”、“Perimeter(周长)”、“Radius(max/min)(最长最短半径比)”,计算机将自动处理图像。测量结果使用SPSS大型统计软件进行各指标的多组间单因素方差分析。

3 结果

补肾生血中药含药血清经微孔滤膜灭菌后,加在鸡胚绒毛尿囊膜上的甲基纤维素载体盘上孵育5天。取材时可见:CAM膜外观与甲基纤维素对照组的形态相似,质地薄而透明,无CAM膜肥厚及变质。膜上的血管呈叶脉状排列,且相互连成网状。

解剖显微镜形态学观察:甲基纤维素对照组中,载体盘下CAM膜与甲基纤维素融合,部分可见中血管或大血管的贯穿,与载体盘接触的多是中、小血管,属于3~4级血管,未见大血管向载体的吸引和辐辏,整个CAM上的血管呈叶脉状分布。老龄血清对照组中,载体盘周有中小血管的密集,血管增生的范围主要集中在载体盘边缘5mm以内,多为4级血管。补肾生血中药大、小剂量组盘周有大量的细小血管围绕,集中在距载体边缘0.8~1.0mm的范围以内,多是6~7级的细小血管,以载体为中心呈包绕或放射状分布。而且小血管的管径比对照组增粗,且有扭曲和分枝。尤其在大剂量血清组可见细血管的分枝等级显著增加,部分微血管呈松针状成簇生长,血管充盈较饱满,整体的血管数量有显著增加。各组阳性反应鸡胚数均明显高于甲基纤维素空白组($P<0.01$)。见表1。补肾生血中药大

剂量含药血清组CAM上与载体边缘相接触的血管总数目、小血管数目明显多于甲基纤维素空白组、老龄血清对照组和青年对照组(P 均 <0.01),小剂量血清组、老龄血清对照组和青年血清对照组的总、小血管数多于甲基纤维素对照组($P<0.05$),大、中血管数目无显著差异($P>0.05$)。见表2。

表1 补肾生血中药含药血清促进鸡胚CAM血管生成作用的观察[个(%)]

组别	鸡胚数	阳性反应数
甲基纤维素空白组	20	2(10)
老龄对照血清组	20	15(75)
老龄大剂量血清组	20	19(95)
老龄小剂量血清组	20	20(100)
青年血清对照组	20	15(75)

在本实验中,根据鸡胚CAM的特点,计算机图像处理时选用了以下4个测量指标Area、Perarea、Perimeter、Radius。测量结果经单因素方差分析可得:补肾生血中药大剂量组视野中血管的总面积为 $341165.6+89949.3$ 像素(计算机图形大小单位),显著大于甲基纤维素对照组、老龄血清对照组和青年血清对照组($P<0.05$),其血管的密度呈同步增加。补肾生血中药小剂量组及青年血清对照组的血管数目显著大于甲基纤维素对照组。Radius显示,青年血清对照组小于甲基纤维素对照组。见表3。

4 讨论

鸡胚绒毛尿囊膜模型是研究血管生成活性的经典方法,但文献记载的方法有很大差异,我们选取鸡胚孵育8~12天为药物刺激的最佳时间^[12,13]。并且采用中药血清药理方法,中药在动物体内经胃肠道消化和吸

表2 补肾生血中药含药血清对鸡胚CAM影响的血管计数结果($\bar{x}\pm s$)

组别	鸡胚数	大血管	中血管	小血管	血管总数
甲基纤维素空白组	20	4.40±1.17	4.20±1.68	56.10±9.70*	64.90±8.67*
老龄血清对照组	20	5.80±2.20	5.50±2.17	81.00±11.56*△	92.30±12.37*△
老年小剂量血清组	20	5.44±0.88	5.78±1.30	84.55±8.26*△	95.78±8.63*△
老年大剂量血清组	20	5.09±1.58	5.36±1.63	107.64±19.27△	118.10±19.64△
青年血清对照组	20	4.30±1.70	5.20±1.55	77.10±10.10*△	86.60±10.05*△

与老年大剂量血清组比较,* $P<0.01$;与甲基纤维素空白组比较,△ $P<0.05$

表3 补肾生血中药含药血清对鸡胚CAM血管生成作用的计算机处理结果(像素, $\bar{x}\pm s$)

组别	鸡胚数	Area	Preared	Perimeter	Radius
甲基纤维素空白组	20	247511.5±32150.5	0.187±0.024	39645.4±5249.0	702.0±25.0
老龄血清对照组	20	287979.8±46480.5	0.220±0.036	43441.5±7599.8	615.3±108.2
老龄大剂量血清组	20	341165.6±89949.3**▲	0.267±0.050**▲	40653.2±5562.9	660.2±125.1
老龄小剂量血清组	20	320793.7±61668.2*	0.245±0.047*	41582.1±4265.1	657.1±130.8
青年血清对照组	20	291932.0±42986.9*	0.223±0.033*	41260.7±6176.1	593.0±102.4*

*与甲基纤维素空白组比较, $P<0.05$;★与老龄血清对照组比较, $P<0.05$;▲与青年血清对照组比较, $P<0.05$

收,血清中的成分可能接近于药物在人体内起效的有效成分和水平,这弥补了中药生药所含的大量无效成分对培养组织、细胞的非特异性影响^[14]。本实验结果表明血清对鸡胚 CAM 无特异性刺激作用。

本实验采用鸡胚 CAM 模型研究了补肾生血药的血管生成活性,结果表明,血清对鸡胚 CAM 的血管有一定促进增生作用,这可能与血清中的活性成分有关。但补肾生血中药,尤其是大剂量,可促进鸡胚绒毛尿囊膜模型的血管的明显增加,并且以细小血管增生为主,符合新生血管化的特征,效用优于血清对照组。表明服用补肾生血中药后,血清中促进血管生成的活性物质增加,其具体物质有待探讨。同时,给药组可观察到粗大血管向药物作用局部的辐辏。可见,补肾生血中药可以促进血管生成活性或具备血管生成活性样的作用。

本实验采用了计算机图像处理系统——Imagine—Pro Plus 软件(IPP 软件)分析实验结果,比较解剖镜下计数与计算机处理的数据,发现两组结果基本一致,但药物刺激后,CAM 上的血管多是围绕载体盘周围的弥漫状增加,图像处理系统可测量视野内血管总面积及血管的密度值,更能全面地反映 CAM 膜上血管增减的变化,并且可以避免人为计数中的主观因素干扰。所以,计算机图像处理系统是形态学计量的最佳选择。

中医关于血脉的生成起源的论述较少。《难经·八难》云:“诸十二经脉者,皆系于生气之原,所谓生气之原者,谓十二经之根本也,谓肾间动气也。此五脏六腑之本,十二经脉之根本,呼吸之门,三焦之源”^[15]。《图注八十一难经辨真》说:“经乃脉所由之真路也,脉者,资使于肾间动气,资生于胃中谷气,贯出于十二经中”。从以上的记载可见,脉的生成始于先天之本——肾中之精气,并受到后天之本——脾化生水谷精微的濡养。本实验发现补肾生血中药的含药血清有促进鸡胚 CAM 模型中血管生成的作用,本方作为滋补肾阴

的代表方剂,此结果提示肾生髓与血脉生成的关系有其客观的物质基础,补肾可能促进血脉的化生。

参考文献

- 1 Lewis BS, Flugelman MY, Weisz A, et al. Angiogenesis by gene therapy; a new horizon for myocardial revascularization. Cardiovasc Res. 1997, 35(3):490—497.
- 2 Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Leapman SB, et al. Tumor growth neovascularization; an experimental model using rabbit cornea. J Natl Cancer Inst. 1974, 52(2):413—427.
- 3 Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R, et al. Transforming growth factor — alpha; a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. Science, 1986, 232(4755):1250—1253.
- 4 周磊, 王翰章, 王模英, 等. 颊粘膜癌变过程中血管生成与细胞增殖的关系. 中华口腔医学杂志, 1994, 29(7):210—213.
- 5 Barnhill RL, Ryan TJ. Biochemical modulation of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of the chick embryo. J Invest Dermatol, 1983, 81(6):485—488.
- 6 吴志奎, 危巍, 何忠效等. 肾生髓理论分子基础的研究. 中医杂志, 1996, 37(2):109—110.
- 7 Peek MJ, Norman TM, Morgan C, et al. The chick chorioallantoic membrane assay: an improved technique for the study of angiogenic activity. Exp Pathol, 1988, 34(1):35—40.
- 8 曾南, 杨奎, 沈映君. 雪莲虫草精对 NK 细胞活性和 IL-2 活性的影响. 中药药理和临床, 1995, 11(2):36—37.
- 9 Nguyen M, Shing Y, Folkman J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. Microvasc Res, 1994, 47(1):31—40.
- 10 Defouw DO, Rizzo VJ, Steinfeld R, et al. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. Microvasc Res, 1989, 38(2):136—147.
- 11 姜志刚, 鄂征. 不同肿瘤组织和细胞促血管生成活性的研究. 中华肿瘤杂志, 1989, 11(3):165—167.
- 12 王庆民. 家禽孵化与雏禽雌雄鉴别. 北京: 金盾出版社, 1990:29.
- 13 Auerbach R, Kubai L, Knighton D, et al. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. Dev Biol, 1974, 41(2):391—394.
- 14 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药药理研究的新思路——中药血清药理学. 中国中医药科技, 1997, 4(4):239—240.
- 15 南京中医学院校释. 难经注释. 北京: 人民卫生出版社, 1979:17.

(上接第 695 页)

- 疗肝肿瘤的实验研究. 实用放射学杂志, 1989, 14(2):67—70.
- 21 董生, 肖湘生, 陈庆华, 等. 肝动脉注入羟基喜树碱明胶微球对大鼠移植性肝癌的疗效研究. 中华放射学杂志, 1996, 30(1):45—48.
- 22 章永红, 金树文. 补肝软坚汤抗癌增效作用的临床观察. 湖北中医杂志, 1998, 20(1):21—22.
- 23 王炳胜, 刘秀芳, 付显成, 等. 益气活血散结加介入化疗治疗晚期非小细胞肺癌. 中国中西医结合外科杂志, 1999, 5(4):203—206.
- 24 陈闯, 张作军. 茵陈蒿汤加味治疗肝动脉插管化疗所致肝损害的对照观察. 中医药研究, 1998, 14(2):19—20.
- 25 易成, 叶剑飞, 吴万垠. 中药减轻肝癌介入治疗所致的慢性肝功能

- 损害的临床研究. 中药药理与临床, 1998, 14(3):39—40.
- 26 林仰光. 赤芍甘草煎剂抗肝癌肝动脉化疗栓塞术后疼痛的观察. 中西医结合实用临床急救, 1998, 5(10):442—444.
- 27 林钧华, 倪惠芳, 李国安, 等. 中西医结合治疗肝癌介入栓塞后综合征. 上海中医药杂志, 1995, (10):16.
- 28 黄金平, 张建魁. 中药枢呕汤抗介入呕吐的临床观察. 实用中西医结合杂志, 1998, 11(8):690.
- 29 陈群雄. 针灸中药治疗介入后呕吐 60 例观察. 新中医, 1998, 30(7):20—21.
- 30 张辉, 高文斌. 穴位注射治疗肝癌介入术后呃逆观察. 实用中医药杂志, 2000, 16(1):34.