

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.15.015

实验研究

鳖甲煎丸对体外培养大鼠主动脉环血管新生的影响

铁明慧, 王科, 张颖*

(四川大学华西医院, 四川省成都市武侯区国学巷 37 号, 610041)

摘要 目的 观察不同浓度鳖甲煎丸含药血清对血管新生的影响。方法 14 只 SD 大鼠随机分成鳖甲煎丸组 (12 只) 和生理盐水组 (2 只)。鳖甲煎丸组给予鳖甲煎丸 6 mg/(kg·d) 灌胃, 生理盐水组给予等量生理盐水灌胃, 连续 5 天。末次给药 1 h 后, 腹主动脉取血分离血清。采用体外培养大鼠腹主动脉环血管生成模型, 用含不同浓度的鳖甲煎丸血清 (含 5%、10%、15%、20%、30%、40%) 培养基培养, 并设对照组 (生理盐水组血清), 共培养 10 天。倒置显微镜下观察并拍摄微血管生长图像, 计算微血管出芽面积; 将培养物进行免疫组织化学染色, 计算每高倍视野中平均微血管密度。并将血管环新生微血管密度与鳖甲煎丸含药血清浓度进行 Spearman 等级相关分析。结果 与对照组比较, 20%、15%、10%、5% 鳖甲煎丸含药血清组微血管出芽面积均明显减少 ($P < 0.01$), 30%、40% 鳖甲煎丸含药血清组微血管出芽面积差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。15% 鳖甲煎丸含药血清组出芽面积最少, 明显低于 5%、20%、30%、40% 鳖甲煎丸含药血清组 ($P < 0.01$), 但与 10% 鳖甲煎丸含药血清组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。相关分析结果显示, 鳖甲煎丸含药血清浓度 $\leq 15\%$ 时, 随着浓度增加, 对血管环新生血管抑制作用逐渐增强, 血管环新生微血管密度逐渐减少 ($r = -0.637$, $P < 0.05$)。结论 鳖甲煎丸对新生血管具有抑制作用, 且以 15% 浓度含药血清效果最好。

关键词 鳖甲煎丸; 动脉环; 血管新生; 微血管密度

血管新生是指在成熟血管的基础上, 内皮细胞通过增生和迁移, 向特定区域延伸并形成新的血管^[1]。血管新生不仅在生殖、发育及损伤修复等生理过程中具有重要作用, 而且与实体瘤的生长、增殖性视网膜病变、冠心病及风湿性关节炎等病理变化密切相关^[2]。中药鳖甲煎丸目前临床用于治疗肿瘤及肝脏疾病, 并取得一定疗效^[3-5], 但其作用机制尚未明确。既往动物实验研究表明, 鳖甲煎丸能够显著降低肿瘤组织的微血管密度、抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 及增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达^[6-7]。为探究鳖甲煎丸对新生微血管结构及功能的影响, 本研究采用体外培养大鼠腹主动脉环血管生成模型研究鳖甲煎丸对新生微血管的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 16 只, 雌雄各半, 6~8 周龄,

体重 (200 ± 10) g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (川) 2014-028, 由四川大学华西实验动物供应站普通饲料喂养, 自由饮水。

1.2 实验药物

鳖甲煎丸 (50 g/瓶, 购于武汉中联药业集团股份有限公司, 批号: Z42020772), 称取 12 g 加入 10 ml 生理盐水, 制备成 0.6 g/ml 的混悬液, 置于 4℃ 冰箱备用。

1.3 主要试剂及仪器

Matrigel (BD Bioscience 公司, 批号: 356234); 羊抗鼠 CD31 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司, 批号: sc-4506); 戊巴比妥钠 (Sigma 公司, 批号: P3761); MCDB131 培养基 (Sigma 公司, 批号: AL133A)。倒置显微镜 (Olympus 公司, 型号: IX50); 成像系统: (日本尼康公司, 型号: DS-U3); 超净工作台 (SANYO 公司, 型号: Class II); CO₂ 恒温培养箱 (SANYO 公司, 型号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81202784)

* 通讯作者: 18980602088@189.cn, (028) 62539431

MCO-15AC)。

1.4 鳖甲煎丸含药血清制备

14 只 SD 大鼠采用随机数字表法分成鳖甲煎丸组 (12 只) 和生理盐水组 (2 只)。鳖甲煎丸组给予鳖甲煎丸 6 mg/(kg·d) 灌胃, 生理盐水组给予等量生理盐水灌胃, 连续 5 天。末次给药前禁食 12 h, 不禁水。末次给药 1 h 后, 采用 4 mg/100 g 戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠, 于超净工作台中腹主动脉取血, 待血液凝固后 4000 r/min 离心 30 min 分离血清, 56℃ 水浴灭活 30 min, 0.22 μm 过滤除菌, 分装, -20℃ 保存备用。

1.5 腹主动脉环获取^[8-9]及培养

取剩余 2 只 SD 大鼠, 颈椎脱臼处死, 75% 乙醇浸泡 15 min, 于超净工作台中无菌条件下剪取腹主动脉, 放入 100 mm 培养皿中, PBS 缓冲液清洗 2 次, 去除动脉外周膜组织和纤维组织, 将血管切成 1~1.5 mm 长的主动脉环, PBS 缓冲液清洗动脉环 2 次, MCDB131 培养基漂洗 2 次。将动脉环纵切面平行于培养孔底部, 放进预先铺有 Matrigel 基质胶的 48 孔板 (50 μl/well), 随后每孔加入预先融化的 Matrigel 基质胶 70 μl, 放入细胞培养箱中 (37℃、5% CO₂) 孵育 2 h, 使基质胶凝固。待基质胶凝固后, 加入含有不同鳖甲煎丸含药血清的 MCDB131 培养基 100 μl。按鳖甲煎丸含药血清浓度不同分为无血清组 (只加入 MCDB131 培养基)、对照组 (于 MCDB131 培养基中加入 10% 生理盐水组大鼠血清) 和 40%、30%、20%、15%、10%、5% 鳖甲煎丸含药血清组 (于 MCDB131 培养基中加入不同浓度鳖甲煎丸含药大鼠血清)。完成后, 将 48 孔板放回细胞培养箱中继续培养, 每 2 天换液一次, 共培养 10 天。每天于倒置显微镜下观察微血管生长情况, 并拍照记录, 每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 新生微血管出芽面积 整个实验过程由同一人操作、观察和记录。每天在同一时间于显微镜下观察主动脉环生长情况, 拍摄新生微血管图像。待血管较多时则每孔从 3 个平面分别拍摄生成的微血管, 取 3 个平面微血管面积的平均值作为该孔的新生微血管面积^[10-11], 于培养第 10 天结束拍摄, 并用 Image-Pro Plus 6.0 版图像分析软件进行图像分析, 计算各组新生微血管出芽面积。

1.6.2 微血管计数和血管结构观察 血管培养物用 10% 甲醛固定过夜, 石蜡包埋, 切片, 常规 HE

染色或用于免疫组化染色。用免疫组织化学法对血管内皮细胞 CD31 分子进行染色后, 按照 Weidner 标准^[12]进行血管密度计数, 被抗 CD31 抗体染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇, 同时根据管腔大小区分新老血管内皮细胞, 内皮细胞及微小血管均予以计数。在 100 倍光镜下扫描整个切片, 寻找血管高密度区, 再在高倍镜 (400 倍) 下采集 4 个相应血管高密度区视野照片, 每个高倍镜视野 (HP) 的面积为 150 μm × 100 μm。后用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算每高倍视野中的微血管密度, 并取其平均值作为各组微血管数。另在显微镜下观察血管周细胞和内皮细胞的覆盖情况。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析及 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

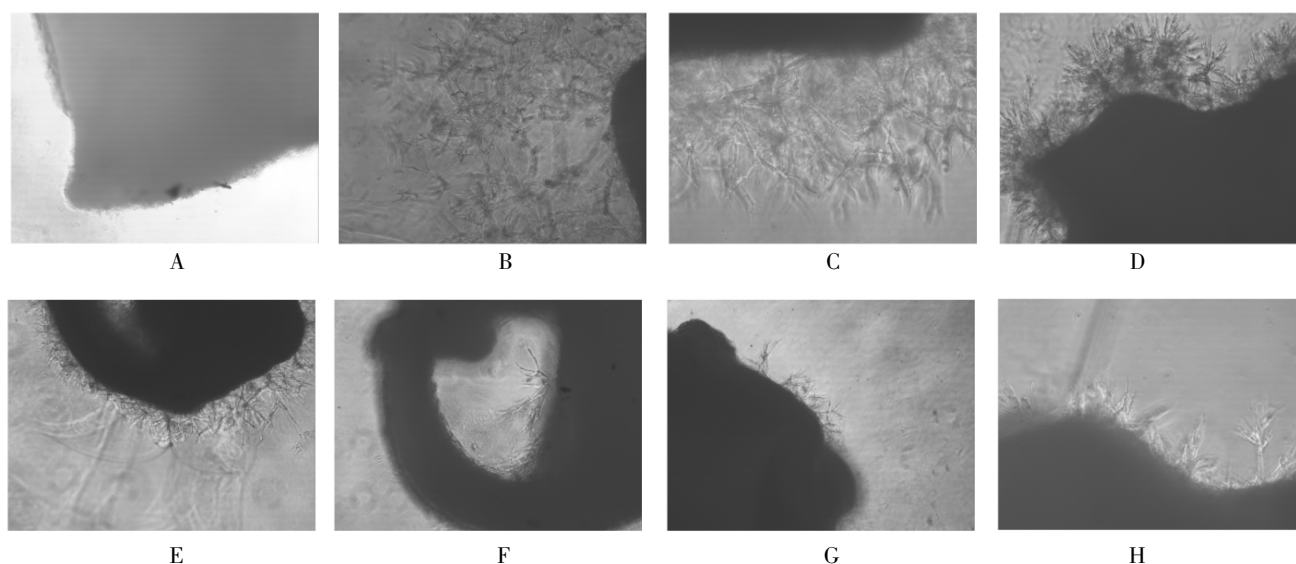
2 结果

2.1 各组大鼠主动脉环新生微血管形态学观察

除无血清组, 各组在培养 3~5 天后, 可观察到动脉环周围有大量的内皮细胞迁移、增殖, 大鼠主动脉环开始出芽。出芽的细胞呈细长梭形, 从血管环外膜表面呈放射状向四周延伸, 多个细胞首尾相接, 使出芽伸长或出现分支或几个芽间交织成网状结构。图 1 示, 在培养第 10 天, 无血清组仍然无微血管新生; 微血管出芽较多的对照组、40% 及 30% 鳖甲煎丸含药血清组新生微血管开始出现萎缩, 结构凌乱模糊; 20% 及 5% 鳖甲煎丸含药血清组新生微血管较为均匀, 呈树枝状向周围空间延伸; 10% 及 15% 则仅见少量粗短小血管芽。

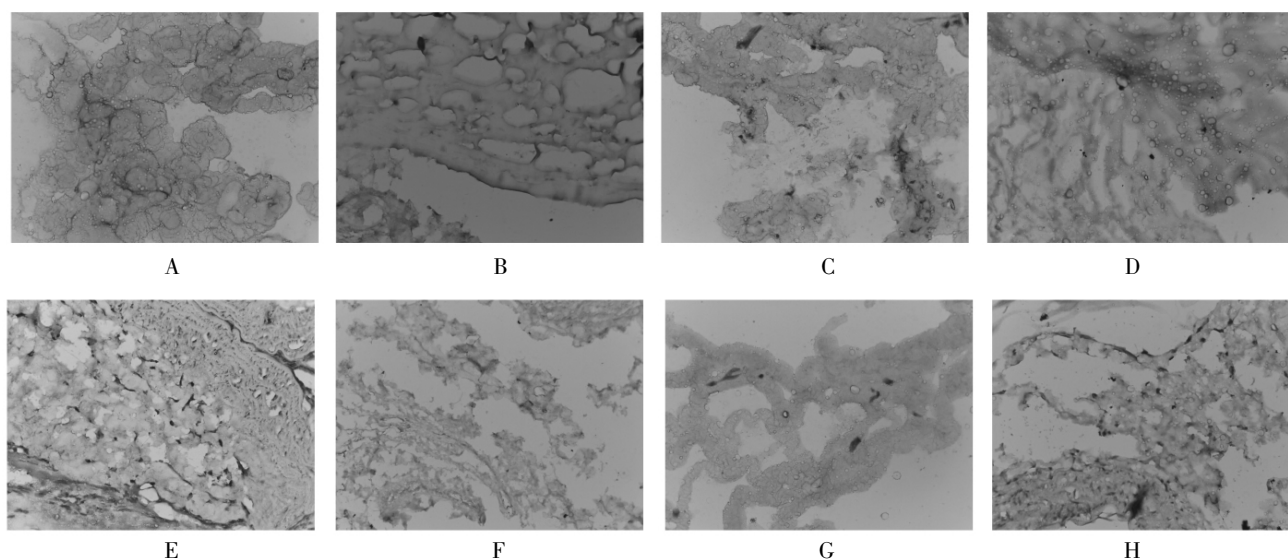
2.2 各组大鼠主动脉环新生微血管出芽面积比较

表 1 示, 与对照组比较, 20%、15%、10%、5% 鳖甲煎丸含药血清组微血管出芽面积均明显减少 ($P < 0.01$), 30%、40% 鳖甲煎丸含药血清组微血管出芽面积差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。15% 鳖甲煎丸含药血清组出芽面积最少, 明显低于 5%、20%、30%、40% 鳖甲煎丸含药血清组 ($P < 0.01$), 但与 10% 鳖甲煎丸含药血清组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。5%、10%、20% 鳖甲煎丸含药血清组微血管出芽面积组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但都较 30%、40% 鳖甲煎丸含药血清组微血管出芽面积明显减少 ($P < 0.01$)。



注：A，无血清组；B，对照组；C，40% 鳖甲煎丸含药血清组；D，30% 鳖甲煎丸含药血清组；E，20% 鳖甲煎丸含药血清组；F，15% 鳖甲煎丸含药血清组；G，10% 鳖甲煎丸含药血清组；H，5% 鳖甲煎丸含药血清组

图 1 各组大鼠主动脉环培养 10 天后微血管出芽情况 ($\times 100$)



注：A，无血清组；B，对照组；C，40% 鳖甲煎丸含药血清组；D，30% 鳖甲煎丸含药血清组；E，20% 鳖甲煎丸含药血清组；F，15% 鳖甲煎丸含药血清组；G，10% 鳖甲煎丸含药血清组；H，5% 鳖甲煎丸含药血清组

图 2 各组大鼠主动脉环培养 10 天后培养物免疫组织化学染色结果 ($\times 400$)

表 1 各组大鼠主动脉环新生血管出芽
面积比较 (μm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	微血管出芽面积
对照组	8	1361.19 $\pm$ 335.20
5% 鳖甲煎丸含药血清组	8	832.93 $\pm$ 275.87 * Δ $\blacktriangle$
10% 鳖甲煎丸含药血清组	8	585.70 $\pm$ 124.92 * $\blacktriangle$
15% 鳖甲煎丸含药血清组	8	372.25 $\pm$ 168.34 *
20% 鳖甲煎丸含药血清组	8	811.06 $\pm$ 168.61 * Δ $\blacktriangle$
30% 鳖甲煎丸含药血清组	8	1203.02 $\pm$ 383.59 Δ
40% 鳖甲煎丸含药血清组	8	1362.65 $\pm$ 322.08 Δ

注：与对照组比较，* $P < 0.01$ ；与 15% 鳖甲煎丸含药血清组比较， $\Delta P < 0.01$ ；与 30%、40% 鳖甲煎丸含药血清组比较， $\blacktriangle P < 0.01$

2.3 各组大鼠主动脉环培养物免疫组织化学染色结果

图 2 示，无血清组内可见较多空泡，但无棕黄色内皮细胞；对照组、40% 及 30% 鳖甲煎丸含药血清组可见较多染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇，血管结构分布密集、内皮细胞着色较深；20% 及 5% 鳖甲煎丸含药血清组可见均匀分布的棕黄色内皮细胞或内皮细胞簇，血管结构分布也较为均匀清晰；15% 及 10% 鳖甲煎丸含药血清组仅偶见较为完整的内皮细胞。

2.4 各组大鼠主动脉环培养新生微血管密度比较

表 2 示, 与对照组比较, 20%、15%、10%、5% 鳖甲煎丸含药血清组微血管密度均明显降低 ($P < 0.01$), 而 30%、40% 鳖甲煎丸含药血清组微血管密度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 15% 鳖甲煎丸含药血清组比较, 30%、40% 鳖甲煎丸含药血清组微血管密度明显升高 ($P < 0.01$), 10%、20% 鳖甲煎丸含药血清组微血管密度亦明显低于 40% 鳖甲煎丸含药血清组 ($P < 0.05$)。

血管环新生微血管密度与鳖甲煎丸含药血清浓度之间的相关性采用 Spearman 等级相关分析, 结果显示: 鳖甲煎丸含药血清浓度 $\leq 15\%$ 时, 随着浓度增加, 对血管环新生血管抑制作用逐渐增强, 血管环新生微血管密度逐渐减少, 特别是含药血清浓度为 15% 时与对照组比较差异显著 ($r = -0.637$, $P < 0.05$); 当鳖甲煎丸含药血清浓度 $\geq 15\%$ 时, 随着浓度增加, 对血管环新生微血管抑制作用逐渐减弱, 当含药血清浓度 $\geq 30\%$ 后, 与对照组比较差异无统计学意义 ($r = 0.447$, $P = 0.146$)。

表 2 各组大鼠主动脉环新生微血管密度比较 (血管数/HP, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	微血管密度
对照组	4	106.50 $\pm$ 13.201
5% 鳖甲煎丸含药血清组	4	70.00 $\pm$ 8.178*
10% 鳖甲煎丸含药血清组	4	63.25 $\pm$ 9.784*▲
15% 鳖甲煎丸含药血清组	4	50.50 $\pm$ 10.780*
20% 鳖甲煎丸含药血清组	4	65.25 $\pm$ 9.581*▲
30% 鳖甲煎丸含药血清组	4	84.50 $\pm$ 7.588 Δ
40% 鳖甲煎丸含药血清组	4	93.50 $\pm$ 5.513 Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 15% 鳖甲煎丸含药血清组比较, Δ $P < 0.01$; 与 40% 鳖甲煎丸含药血清组比较, ▲ $P < 0.05$

3 讨论

血管新生在很多生理和病理过程中发挥着重要的作用, 它既与机体正常发育生殖和组织修复有关, 也与某些疾病的病理过程如慢性炎症、伤口愈合等息息相关; 在肿瘤疾病、风湿性关节炎及糖尿病等疾病中, 血管新生过度将会导致病理组织过度增生, 进而损坏正常组织^[3]。中医理论中虽然没有血管新生的概念, 但却有“生脉”“生肌”等理论的记载, 认为温阳益气、活血生肌均可“生脉”。有研究表明, 一些中药单体或复方制剂能够有效促进或抑制血管新生^[4-13]。鳖甲煎丸出自《金匱要略》, 具有攻补兼施、益气活血、活血化瘀、解毒散结之功。张绪慧等^[6-7]研究表明, 鳖甲煎丸可以显著降低荷瘤小鼠肿瘤的微血管计数, 这

说明鳖甲煎丸可通过抑制荷瘤小鼠肿瘤的血管生成来达到抑瘤作用。郑艳等^[14]研究亦表明, 鳖甲煎丸能够抑制人脐静脉血管内皮细胞的快速增殖并且显著地降低 HepG2 中 VEGF 的表达水平, 从而在抗肝细胞癌血管生成方面具有一定作用。

体外培养主动脉环血管新生模型是研究血管新生的重要实验方法, 既排除了体内一些刺激因子及血管环境的影响, 也便于及时观察血管新生情况^[17]。本研究结果显示, 在血管出芽的过程中, 当鳖甲煎丸含药血清浓度在 0 ~ 15% 之间时, 血管新生的抑制作用随着含药血清的浓度增加逐渐增强, 当含药血清浓度为 15% 时, 抑制作用最强。然而, 当含药血清浓度大于 15% 时, 对血管新生的抑制作用随着含药浓度的增加其抑制作用反而逐渐减弱, 当浓度到 30% 及以上对血管新生没有抑制作用。为何会出现这样的量效关系, 目前尚不明确。有研究发现, 强效的抗血管生成药物在过度抑制血管生成后, 可能刺激其他促血管生成通路的旁路激活, 抵消抗血管生成药物的血管抑制作用, 使得对抗血管生成治疗耐受^[18-20]。我们推测鳖甲煎丸在浓度大于 15% 后, 随着浓度的增加, 对血管的抑制作用逐渐减弱是否与激活了其他促血管生成旁路有关, 或者还存在其他原因, 值得进行进一步研究。

参考文献

- [1] CANNELLIET P. Angiogenesis in health and disease [J]. Nat Med, 2003, 9(6): 653-660.
- [2] FOLKMAN J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(4): 273-286.
- [3] 罗庆东, 姜德友. 鳖甲煎丸的临床研究与进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2012, 33(6): 764-766.
- [4] 武如通. 鳖甲煎丸对中晚期肝癌保肝抑制瘤的临床研究 [J]. 按摩与康复医学, 2014, 5(4): 139-140.
- [5] 徐礼通. 鳖甲煎丸治疗慢性乙型肝炎早期肝硬化 36 例 [J]. 中国药业, 2012, 21(A01): 149-150.
- [6] 张绪慧, 梁磊, 蔡长青, 等. 鳖甲煎丸对 H22 荷瘤小鼠肿瘤血管抑制作用的研究 [J]. 山东中医杂志, 2010, 29(5): 330-331.
- [7] 张绪慧, 梁磊. 鳖甲煎丸对荷瘤小鼠 VEGF、PCNA 表达的影响 [J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(3): 48-49.
- [8] APLIN AC, NICOSIA RF. The rat aortic ring model of angiogenesis [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1214: 255-264. doi: 10.1007/978-1-4939-1462-3_16.
- [9] BAKER M, ROBINSON SD, LECHERTIER T, et al. Use

- of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis [J]. Nat Protoc, 2011, 7(1): 89-104.
- [10] NICOSIA RF, ZHU WH. The thin prep rat aortic ring assay: a modified method for the characterization of angiogenesis in whole mounts [J]. Angiogenesis, 2002, 5(1/2): 81-86.
- [11] NICOSIA RF, OTTINETTI A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro [J]. Lab Invest, 1990, 63(1): 115-122.
- [12] WEIDNER N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer [J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 9-19.
- [13] DEWIT T, NATALI E. Angiogenesis [J]. Nature, 2005, 438(7070): 931.
- [14] 赵海滨, 张秀静, 王帅. BMSCs “归巢”在 AMI 后心肌重塑中的作用及活血化瘀药的干预研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32(1): 28-31.
- [15] 韩敦正, 汤穆洽. 白藜芦醇对糖尿病下肢缺血大鼠氧化应激和血管新生的作用 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31(5): 723-724.
- [16] 郑艳, 贺松其, 文彬等. 鳖甲煎丸对 HUVEC 增殖及 HepG2 中 VEGF 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 132-136.
- [17] STATON CA, STRIBBLING SM, TAZZYMAN S, et al. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo [J]. Int J Exp Pathol, 2004, 85(5): 233-248.
- [18] JAIN RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy [J]. Nat Med, 2001, 7(9): 987-989.
- [19] JAIN RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy [J]. Science, 2005, 307(5706): 58-62.
- [20] JAIN RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(17): 2205-2218.

The Effect of *Biejia Jian Wan* (鳖甲煎丸) on Angiogenesis of vitro Cultured Aorta Ring in Rats

TIE Minghui, WANG Ke, ZHANG Ying

(Huaxi Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041)

ABSTRACT Objective To observe the effect of *Biejia Jian Wan* (鳖甲煎丸) medicine-containing serum of different concentration on angiogenesis. **Methods** Randomly divided 14 SD rats into the *Biejia Jian Wan* group (12 rats) and the saline group (2 rats). The *Biejia Jian Wan* group was given *Biejia Jian Wan* 6 mg/(kg · d) for gavage while the saline group was given the same volume of saline for gavage, both groups for 5 days. Took blood from abdominal aorta and separated serum one hour after the last gavage. Adopted in vitro cultured rat abdominal aorta ring to develop the model. Used culture medium containing *Biejia Jian Wan* serum of different concentrations (containing 5%, 10%, 15%, 20%, 30% and 40% respectively) for culture. Set the control group (serum of the saline group), cultivated for 10 days in total. Observed and filmed microvascular growth images under inverted microscope. Calculated microvascular budding areas; Conducted immunohistochemical staining on the culture. Calculated the average density of microvascular in every high power field. Conducted Spearman ranking correlation analysis between density of nascent capillaries in aorta ring and the concentration of *Biejia Jian Wan* serum. **Results** Compared with the control group, microvascular budding areas of the 20%, 15%, 10% and 5% *Biejia Jian Wan* serum groups all remarkably decreased ($P < 0.01$). There is no statistical significance in difference between microvascular budding areas of the 30% and 40% *Biejia Jian Wan* serum groups ($P > 0.05$). Microvascular budding area of the 15% *Biejia Jian Wan* serum group was the lowest, remarkably lower than the 5%, 20%, 30%, and 40% *Biejia Jian Wan* serum group ($P < 0.01$). But the difference between it and the 10% *Biejia Jian Wan* serum group has no statistical significance ($P > 0.05$). As is shown by related analysis results, when the concentration of *Biejia Jian Wan* serum $\leq 15\%$, its function to inhibit angiogenesis in aorta ring generally reinforced and density of nascent capillaries in aorta ring decreased with concentration increased ($r = -0.637$, $P < 0.05$). **Conclusion** *Biejia Jian Wan* had restraining function on new vessels and drug concentration of 15% seems to be the most effective.

Keywords *Biejia Jian Wan*; ring of aorta; angiogenesis; microvessel density

(收稿日期: 2015-09-24; 修回日期: 2016-01-15)

[编辑: 邓媛]