

乐脉颗粒促进鸡胚绒毛尿囊膜血管的生成**

钟志英¹, 苏海¹, 唐昱², 王伶¹, 涂荣祖¹

¹Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China; ²Department of Cardiology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China

Zhong Zhi-ying*, Master, Resident physician, Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China
zhyingzhong@126.com

Correspondence to: Su Hai, Chief physician, Professor, Tutor of doctor, Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China
suyihappy@sohu.com

Supported by a grant from the State Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 04-05JP34*

Received: 2006-08-29
Accepted: 2007-06-05

¹南昌大学第二附属医院心内科, 江西省南昌市 330000; ²江西省人民医院心内科, 江西省南昌市 330000

钟志英*, 女, 1977年生, 江西省瑞金市人, 汉族, 2006年南昌大学医学院毕业, 硕士, 现工作单位为南昌大学第四附属医院心内科, 医师。
zhyingzhong@126.com

通讯作者: 苏海, 主任医师, 教授, 博士生导师, 南昌大学第二附属医院心内科, 江西省南昌市 330000
suyihappy@sohu.com

国家中医药管理局课题(04-05JP34)*

中图分类号: R329
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2007)36-07126-04

收稿日期: 2006-08-29
修回日期: 2007-06-05
(06-50-10-7602/WL-Y)

Angiogenetic effect of *Le-Mai* granule on the chick embryo chorioallantoic membrane

Abstract

AIM: *Le-Mai* granule is effective in treatment of ischemic cardio-cerebrovascular diseases, but its angiogenesis effect is unclear. This study is designed to investigate the angiogenesis effect of *Le-Mai* granule on the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model.

METHODS: From March to August in 2005, the experiment was carried out in the Jiangxi Provincial Key Laboratory, Molecule Center at the Second Affiliated Hospital of Nanchang University. ①Experimental materials: Eight New Zealand rabbits weighed 2-2.5 kg; Seventy fresh white hatching eggs weighed 50-60 g. ②Experimental methods: Hatching eggs were incubated at (37.5±0.5) °C and fertilized for over 90%. Every egg underwent fenestration on day 7 to expose CAM and establish CAM model. Sixty survival chick embryos were randomly divided into 6 groups (n=10): normal saline group, normal serum group, *Le-Mai* treatment group (T), intimal injury group (I), intimal injury and *Le-Mai* treatment group (IT), and vascular endothelial growth factor (20 mg/L) group. Vascular intimal injury was induced by Foley's tube in abdominal aorta of rabbits. *Le-Mai* treatment referred to 25 mg/kg granule fed on rabbits every day. On day 8, one filter membrane of 5 mm diameter was placed on every CAM and 5 μL sample of each group was subtracted onto membrane once a day for three days continuously. ③Experimental evaluation: The CAMs were harvested on day 11 and placed on slide after digital camera photograph. The blood vessels around the membrane were counted. And the vascular branch 0.5-cm far from the membrane was measured and compared.

RESULTS: Eight rabbits and sixty chick embryos were all involved in the result analysis. Compared with normal serum group, the proliferation of blood vessels around CAM was obviously increased in the group T, and the growth presented a convergence trend (P < 0.05); The group I showed an extremely significant proliferated vessels compared with normal serum group (P < 0.01); There was no significant difference in the total number of blood vessels around CAM between group IT and group I.

CONCLUSION: ①Serum of rabbits fed with *Le-Mai* granule can stimulate angiogenesis of CAM. ②Serum of rabbits suffering from vascular intimal injury can also stimulate angiogenesis of CAM.

Zhong ZY, Su H, Tang Y, Wang L, Tu RZ. Angiogenetic effect of *Le-Mai* granule on the chick embryo chorioallantoic membrane. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2007;11(36):7126-7129(China)
[www.zgckf.com/zgckf/ejournal/upfiles/07-36/36k-7126(ps).pdf]

摘要

目的:乐脉颗粒在缺血性心脑血管病的治疗中具有较好的效果,其是否通过促进血管生成而发挥作用还不清楚。观察乐脉颗粒对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响。

方法:实验于2005-03/08在江西省重点实验室南昌大学第二附属医院分子中心完成。①实验材料:新西兰大白兔8只,体质量2-2.5 kg;新鲜白皮种蛋70只,质量50-60 g。②实验方法:种蛋在(37.5±0.5) °C条件下孵育,种蛋受精率90%以上。第7天开窗暴露鸡胚绒毛尿囊膜建立鸡胚绒毛尿囊膜模型。将60枚存活鸡胚随机分为生理盐水组、正常血清组、乐脉血清组、内膜损伤血清组、内膜损伤乐脉治疗组以及血管内皮生长因子(20 mg/L)组,每组10枚鸡胚。新西兰大白兔腹主动脉用球囊导管损伤建立血管内膜损伤模型,乐脉血清组及内膜损伤乐脉治疗组给予乐脉颗粒25 mg/(kg·d)喂饲,各组7 d后取血清。第8天,在鸡胚绒毛尿囊膜上放一直径为5 mm的滤膜作为载体,分别加样5 μL,1次/d,连续3 d。③实验评估:第11天取鸡胚绒毛尿囊膜,数码相机拍照后平铺于载玻片上,计数载体周围血管数目及滤膜周围0.5 cm范围内的血管分支点数并进行比较。

结果:纳入大白兔8只,存活鸡胚60枚,均进入结果分析,无脱落。与正常血清组相比较,乐脉血清组鸡胚绒毛尿囊膜周围血管总数明显增多,血管以载体为中心呈辐射状生长,差异具有显著性意义(P < 0.05);与正常血清组相比较,内膜损伤血清组血清载体周围血管数量明显增多,差异具有极显著性意义(P < 0.01);与内膜损伤乐脉治疗组相比较,血管总数差异无显著性。

结论:①免乐脉颗粒血清能够明显促进鸡胚绒毛尿囊膜上血管生成。②血管内膜损伤7 d后的血清能够促进鸡胚绒毛尿囊膜上血管生成。

关键词:鸡胚绒毛尿囊膜;血管生成;内膜损伤;乐脉

钟志英, 苏海, 唐昱, 王伶, 涂荣祖. 乐脉颗粒促进鸡胚绒毛尿囊膜血管的生成[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(36):7126-7129
[www.zgckf.com/zgckf/ejournal/upfiles/07-36/36k-7126(ps).pdf]

0 引言

近年来,血管新生已经成为医学研究的热点,血管内皮生长因子具有肯定的促血管新生作用,因此,临床和实验研究中常常使用外源性血管内皮生长因子,或利用血管内皮生长因

子基因治疗缺血性心脑血管疾病^[1-6]。临床实践表明乐脉颗粒在缺血性心脑血管疾病的治疗中具有良好效果,其作用机制一般认为与其具有的行气活血、解郁化瘀、养血通脉作用有关。乐脉颗粒治疗缺血性疾病是否还通过促进血管生成作用的机制,经查找万方、维普等,目前未见报道。为此,本实验中应用鸡胚绒毛尿

囊膜模型,探讨乐脉颗粒是否具有促进血管生成的作用。

1 材料和方法

设计:随机分组设计、对照观察。

单位:南昌大学第二附属医院心内科,江西省人民医院心内科。

材料:实验于2005-03/08在江西省重点实验室南昌大学第二附属医院分子中心完成。新西兰大白兔8只,体质量2~2.5 kg,由南昌大学医学院医学实验动物科学部提供。新鲜白皮种蛋70只,质量50~60 g,由江西省种鸡厂提供。

主要试剂:重组人血管内皮生长因子(recombinant human vascular endothelial growth factor 165, rhVEGF165, 英国Peprotech公司生产);乐脉颗粒(成都华西医科大学制药厂提供,批号050414)。

设计、实施、评估者:实验设计为第二作者,干预实施为第一、三、五作者,评估为第四作者。评估者经过正规培训,采用双盲法评估。

方法:

干预分组:将60枚存活鸡胚随机分为生理盐水组、正常血清组、乐脉血清组、内膜损伤血清组、内膜损伤乐脉治疗组以及血管内皮生长因子(20 mg/L)^[7]组,其中生理盐水组为阴性对照组,血管内皮生长因子组为阳性对照组,每组各10枚鸡胚。

血管内膜损伤模型的建立^[8,9]:新西兰大白兔用戊巴比妥钠(30~50 mg/kg)静脉麻醉,无菌条件下,分离右侧髂总动脉,用2.5 F球囊导管经右髂动脉逆行插入腹主动脉,2~4个大气压下,来回拖拉3次,损伤兔腹主动脉约5 cm,再结扎右髂动脉,缝合皮肤,术后给予青霉素80万单位/d,连续5 d。

血清的制备:共8只家兔,每组2只。乐脉血清组及内膜损伤乐脉治疗组均在术前1 d开始喂饲乐脉颗粒25 mg/(kg·d),乐脉颗粒溶于100 mL纯净水中,共喂饲7 d。正常血清组和血管内膜损伤血清组喂饲等量纯净水。第8天从兔耳缘静脉采取静脉血4 mL,在无抗凝剂的试管中离心,各组的血清混合后分装,-20℃保存备用。

鸡胚绒毛尿囊膜实验:①鸡胚的孵育:新鲜白皮种蛋1 g/L新洁尔灭擦洗消毒后放入

(37.5±0.5)℃、相对湿度60%的恒温箱中孵育,气室向上,种蛋长轴与蛋托呈45°,转动并验照各蛋2次/d,逐步剔除未受精、弱精及死蛋。种蛋受精率90%以上。②开窗及加样^[10,11]:孵至第7天,在照蛋灯下画定1.0 cm×1.0 cm的开窗位置,体积分数为0.75的乙醇消毒种蛋大头端及开窗位置,在气室端钻一小孔并穿透气室壳膜,用锯条磨切蛋壳,掀开蛋壳,注射器针头刺破壳膜,滴加2滴生理盐水使鸡胚绒毛尿囊膜下陷,吸尔球从大头端吸气,使鸡胚绒毛尿囊膜与壳膜分离,去除壳膜,暴露鸡胚绒毛尿囊膜,制成假气室,用灭菌透明胶封闭窗口,窗口朝上继续孵育,不再翻蛋。开窗后第2天揭开透明胶,将直径为5 mm的混合纤维素微孔滤膜小碟放于两条前卵黄静脉之间相对无血管的鸡胚绒毛尿囊膜上,分别加5 μL各待测物,每24 h加1次,连续加3 d^[12]。

取膜及标本的制备:孵育第11天,揭去透明胶,向假气室内加入体积分数为0.1的甲醛,固定20 min,剪下鸡胚绒毛尿囊膜,平铺于加有固定液的玻璃平皿中继续固定,数码相机拍照,并将鸡胚绒毛尿囊膜平铺于载玻片上,阴干保存。

血管计数:在显微镜(×10)下载体边缘的血管数目^[13],根据管径将血管分为3类:①>0.1 mm为大血管。②0.1 mm~0.05 mm为中血管。③<0.05 mm为小血管。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°者均予计数,而穿行、绕行的血管则不计算在内。计数载体周围0.5 cm内的血管分支点数。以载体为中心,周围血管放射状朝向载体的生长状态,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。

主要观察指标:载体周围血管生长情况。

统计学分析:由第一作者采用SPSS 11.5软件完成统计处理,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐采用组间 t 检验,方差不齐采用 Q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入大白兔8只,存活鸡胚60枚,均进入结果分析,无脱落。

2.2 载体周围血管生长情况 见图1。

课题背景:慢性缺血性心脑血管疾病因供氧和需氧之间失去平衡,如能促进新生血管生成,可以增加细胞血液供应,改善功能,减少细胞的凋亡。乐脉颗粒的促进血管生成作用可能为其改善器官功能的机制之一。为此,本实验中应用鸡胚绒毛尿囊膜模型,探讨乐脉颗粒是否具有促进血管生成的作用。

相关链接: 近年来,血管新生已经成为医学研究的热点,血管内皮生长因子具有促进血管新生作用,因此,临床和实验研究中常常使用外源性血管内皮生长因子,或利用血管内皮生长因子基因治疗缺血性心脑血管疾病。

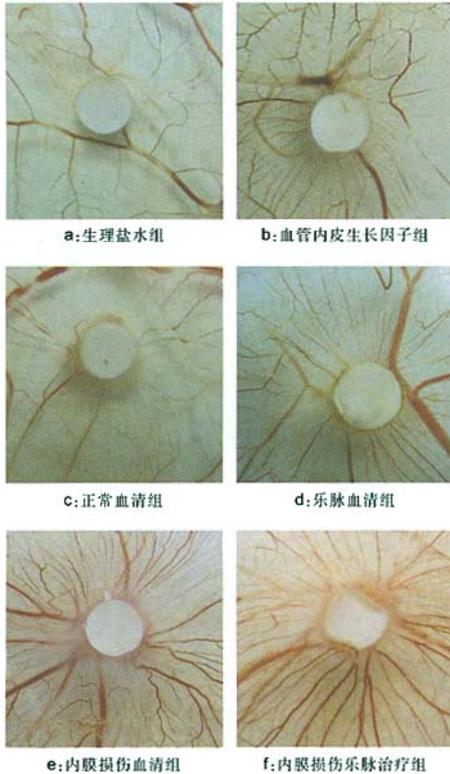


图1 各组鸡胚绒毛尿囊膜血管生成程度的比较(显微镜,×10)

2.2.1 无血管损伤 生理盐水组载体周围血管数量较少,呈正常的树枝状分布。与生理盐水组比较,正常血清组血管生成数量无明显差异。血管内皮生长因子组血管生成数量明显多于生理盐水组及正常血清组,血管以载体为中心呈辐辏状生长,血管数量明显增多。乐脉血清组血管生成数明显高于正常血清组,与血管内皮生长因子组相似,见表1。

表1 各组鸡胚绒毛尿囊膜上载体周围的血管数比较 (x±s, n=10, 根)

组别	大血管	中血管	小血管	血管总数
生理盐水组	3.10±0.99	4.20±1.03	19.90±2.38	27.10±2.07
血管内皮生长因子组	4.50±1.27	5.60±0.97	23.70±3.34	33.80±4.19
正常血清组	3.50±1.43	6.10±1.60	18.80±3.22	28.40±3.75
乐脉血清组	5.20±1.87	4.90±1.14	21.70±3.53	31.80±3.08*
内膜损伤血清组	10.40±2.80 ^b	12.10±2.23 ^b	24.80±3.39	47.30±3.27 ^b
内膜损伤乐脉治疗组	9.60±1.78	11.30±2.21	26.70±3.74	47.60±3.89

与正常血清组相比, *P < 0.05, ^bP < 0.01

生理盐水组载体周围血管数量较少,呈正常的树枝状分布。正常血清组血管生成情况与生理盐水组相似。血管内皮生长因子组血管以载体为中心呈辐辏状生长,血管数量明显增

多。乐脉血清组血管生成现象与血管内皮生长因子组相似。内膜损伤血清组及内膜损伤乐脉治疗组血管生成现象与血管内皮生长因子组相似,但血管数量较血管内皮生长因子组明显增多。内膜损伤乐脉治疗组和内膜损伤血清组相比较,血管数量无明显差异。

2.2.2 血管损伤 内膜损伤血清组血管生成数明显多于正常血清组,而且较血管内皮生长因子组也明显更多,血管以载体为中心呈辐辏状生长,且可见血管吸引现象,大、中血管数更多。但内膜损伤乐脉治疗组与内膜损伤血清组相比,两组血管生成数量无显著差异。

3 讨论

乐脉颗粒主要由丹参、川芎、赤芍、红花、香附、木香及山楂等中药组成,具有行气活血、解郁化痰、养血通脉的功效,现已广泛应用于心脑血管病的治疗,并取得了很好的疗效^[14,15]。

近年,有关中药的作用机制研究,推荐含药血清的方法。本实验观察到喂服乐脉颗粒的兔血清具有明显的促鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的作用。血管生成受到多种生长因子调节,其中血管内皮生长因子和碱性成纤维生长因子是血管生成过程中的两个最重要的生长因子。已有实验表明,乐脉颗粒中的丹参具有促进侧支血管形成的作用^[16]。丹参多酚酸盐是丹参的水溶性有效活性部位,对培养的人单核细胞通过对血管内皮生长因子、碱性成纤维生长因子释放及其 mRNA 表达的促进作用,促进内皮细胞迁移^[17]。川芎嗪在体内的主要代谢产物川芎醇具有促进正常人胎儿脐静脉血管内皮细胞增殖的作用^[18]。因此认为,丹参和川芎的促血管内皮生长因子和碱性成纤维生长因子释放、促内皮细胞迁移作用、促血管内皮细胞增殖作用,可能为乐脉颗粒促进血管生成的作用机制之一。

在本实验中,还观察到血管内膜损伤后兔血清具有明显的促血管生成作用,其效应好于 20 mg/L 浓度的血管内皮生长因子。实验表明血管内膜损伤可以通过机体动员作用,产生多种促血管生长因子,如血管内皮生长因子、碱性成纤维生长因子、血小板生长因子、表皮生长因子等多种细胞因子^[19,20]。血管损伤兔血清明显的促血管生成作用与上述促血管生长因子的浓度明显增高有关。

同行评价: 实验通过观察喂服乐脉颗粒兔子血清对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的作用,间接表明乐脉颗粒具有促进血管生成的作用,推测其作用机制与促进血管生成因子增加有关。该方法对血管反应的观察,直接明了,对探讨乐脉颗粒的治疗作用机制有一定意义。

然而,本实验兔血管内膜损伤后,乐脉血清组未能呈现更为明显的促血管生成作用,内膜损伤乐脉治疗组与单纯内膜损伤血清组的血管生成情况相似,这一结果与预想的不同。究其原因,可能与血管损伤^[19,20]及切口愈合^[21-24]激活的、机体自身产生的多种促血管生长因子具有强大的促血管新生作用,已经达到血管生成的最大程度,此时药物的作用未能很好表现出来。为阐明这一点,在血管损伤后更长的时间段内采取血清进行研究,可望得到有价值的资料。可以推测,那时机体自身动员的促血管生长作用减退,乐脉血清组的血管生成作用能很好地表现出来,因为这一作用已经在正常家兔研究中体现出来。

慢性缺血性心脑血管疾病因供氧和需氧之间失去平衡,如能促进新生血管生成,可以增加细胞血液供应,改善功能,减少细胞的凋亡。乐脉颗粒的促进血管生成作用可能为其改善器官功能的机制之一。

本实验表明,乐脉颗粒治疗的家兔血清具有促血管新生作用,这一作用为乐脉颗粒治疗冠心病的机制提供了新的理论基础。

4 参考文献

- 1 Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428(6983):668-673
- 2 Henry TD, Annex BH, Mckendall GR, et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003;107(10):1359-1365
- 3 Rutanen J, Rissanen TT, Markanen JE, et al. Adenoviral Catheter-Mediated Intramyocardial Gene Transfer Using the Mature Form of Vascular Endothelial Growth Factor-D Induces Transmural Angiogenesis in Porcine Heart. *Circulation* 2004;109(8):1029-1035
- 4 Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003;107(21):2677-2683
- 5 Yanagisawa MA, Uchida Y, Nadamura F, et al. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1992;257(5075):1401-1403
- 6 Udelson JE, Dilsizian V, Laham RJ, et al. Therapeutic Angiogenesis With Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 Improves Stress and Rest Myocardial Perfusion Abnormalities in Patients With Severe Symptomatic Chronic Coronary Artery Disease. *Circulation* 2000;102(14):1605-1610
- 7 Blebea J, Vu JH, Assadnia S, et al. Differential effects of vascular growth factors on arterial and venous angiogenesis. *J Vasc Surg* 2002;35(3):532-538
- 8 Kipshidze N, Nikolaychik V, Muckerheid M, et al. Effect of Short Pulsed Nonablative Infrared Laser Irradiation on Vascular Cells In Vitro and Neointimal Hyperplasia in a Rabbit Balloon Injury Model. *Circulation* 2001;104(15):1850-1855
- 9 Chen SW, Li XH, Ye KH, et al. Total saponins of Panax notoginseng protected rabbit iliac artery against balloon endothelial denudation injury. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(9):1151-1156
- 10 刘静霞,龙超良,杨永林,等.1H-异吗啉-1,3(2H)-二酮新衍生物对鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的抑制作用研究[J].中国药理学通报,2004,20(12):1375-1378
- 11 胡定慧,马润娣,于立坚.土贝母苷甲抑制血管生成[J].中国药理学通报,2003,19(6):713-715
- 12 王世军,孙静,张栋,等.鸡胚尿囊膜血管生长的特点及观测方法[J].生物医学工程研究,2004,23(1):38-40
- 13 王雷,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的应用方法探讨[J].中国药理与临床,2000,16(6):46-47
- 14 徐炜华.乐脉颗粒治疗冠心病 102 例疗效观察[J].浙江中西医结合杂志,2003,13(9):541-542
- 15 赵东.乐脉颗粒对老年脑梗塞患者 D-二聚体的影响[J].中国中医药信息杂志,2002,9(1):21-22
- 16 刘启功,王琳,陆再英,等.丹参注射液对犬缺血心肌更新供血的影响[J].中国医院药学杂志,1999,19(11):653-655
- 17 徐杰,范维琥.丹参多酚酸盐对血管内皮细胞迁移的影响[J].中西医结合学报,2003,1(3):211-214
- 18 李朝武,刘新泳,张蕊,等.川芎醇对血管内皮细胞增殖与损伤保护作用的研究[J].山东大学学报:医学版,2003,41(4):402-405
- 19 Crowley ST, Ray CT, Nawaz D, et al. Multiple growth factors are released from mechanically injured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995;269(5 Pt 2):H1641-H1647
- 20 Hutter R, Carrick FE, Valdiviezo C, et al. Vascular endothelial growth factor regulates reendothelialization and neointima formation in a mouse model of arterial injury. *Circulation* 2004;110(16):2430-2435
- 21 Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech* 2003;60(1):107-114
- 22 Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis-a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol* 2006;44(5):265-274
- 23 Haroon ZA, Raleigh JA, Greenberg CS, et al. Early Wound Healing Exhibits Cytokine Surge Without Evidence of Hypoxia. *Ann Surg* 2000;231(1):137-147
- 24 Bates DO, Jones RO. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 2003;2(2):107-120



欢迎订阅、投稿《南京中医药大学学报》

《南京中医药大学学报》1959 年创刊,由南京中医药大学主办。为中国科技论文统计源刊(中国科技核心期刊)、江苏省双十佳期刊、华东地区优秀期刊,设有学术探讨、临床研究、方药研究、针灸推拿、医史文献、临证集萃等专栏,刊登中医、中药、针灸、中西医结合

等方面的学术论文及有关情报资料,为全国有影响的综合性中医药学术刊物。

本刊为双月刊,国际标准大 16 开本,每期 68 页,定价 5.00 元,全年定价 30.00 元,逢单月 10 日出版。

ISSN 1000-5005, CN 32-1247/R, 邮发代

号 28-232。向编辑部直接邮购,请与张秀春老师联系。

地址:南京市治中路 282 号《南京中医药大学学报》编辑部

邮编 210029

新校区地址:南京市仙林大道 138 号

邮编:210046

电话:025-85811934

E-mail:xb@njutcm.edu.cn.