维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)03-0401-03

26种活血化瘀中药对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响

王淑美[1]，徐晓玉[2]，陈伟海[2]，季业伟[2]，叶　兰[2]

（1. 重庆医科大学中医药学院，重庆　400050；2. 重庆医科大学药学系，重庆　400016）

【摘　要】目的：采用鸡胚绒毛尿囊膜（Chick Chorioallantoic Membrane，CAM）法从 26 种活血化瘀中药中初筛血管生成抑制剂。方法：试验组分别为 26 种活血化瘀中药，所用片剂、胶囊剂、丸剂、散剂溶解成饱和溶液，汤剂制成含生药 2g/ml 的水煎醇沉液，注射液、口服液、膏剂用原药物浓度。种鸡蛋孵化 7 天，建立 CAM 模型，按 20μl 胚加药液于明胶海绵载体上，每日 1 次，连续 3 天。孵化第 10 天，计数 CAM 载体周围 5mm 的血管分支点。结果：15 种活血化瘀中药 CAM 的血管分支点数量降低（$P<0.05$）。结论：榄香烯乳剂、莪术油葡萄糖注射液、磷酸川芎嗪注射液、注射用阿魏酸钠、雷公藤多苷片、火把花根片、祖师麻片、复方斑蝥胶囊、大黄䗪虫丸、大活络丸、复方丹参滴丸、七厘散、活血通脉片、三棱丸及桃红四物汤Ⅱ号具有抑制 CAM 血管生成的作用。

【关键词】活血化瘀中药；抗血管生成；鸡胚绒毛尿囊膜；药物筛选

【中国图书分类法分类号】R285　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-10-16

Effects of 26 drugs for promoting blood circulation and removing blood stasis on the angiogenesis of chick chorioallantoic membrane

WANG Shumei, et al

(*College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To screen angiogenesis inhibitor from 26 drugs for promoting blood circulation and removing blood stasis through chick chorioallantoic membrane (CAM) model in vivo. *Methods*: The experimental groups were 26 drugs for promoting blood circulation and removing blood stasis. Tablets, capsules, pills and powder of the drugs were adopted in the form of saturated concentration, decoction was in the form of concentration of 2g/ml, and injection, oral liquid and electuary were in their own concentration. 7-day-old fertilized white chicken eggs incubated at 37℃ in chamber were prepared by creating a window in the shell. A sponge carrier was placed on CAM and treated with different liquid medicine with the dosage of 20μl per egg daily for 3 days. On day 10, the number of CAM blood vessel embranchment 5mm around the carrier was counted with a stereomicroscope. *Results*: 15 drugs for promoting blood circulation and removing blood stasis obviously inhibited the CAM blood vessels ($P<0.05$). *Conclusion*: Elemene Emulsion, Zedoary Turmeric Oil and Glucose injection, Ligustrazine Phosphate injection, Sodium Ferulate for injection, Tripterygium Glycosides, Huoba Huagen tablet, Zushima tablet, Fufang Banmao capsule, Dahuang Zhechong pill, Dahuoluo pill, Qili powder, Huoxue Tongmai tablet, Fufang Danshen drop pill, Shanleng pill and Taohong Siwu decoction Ⅱ have a potential effect on antiangiogenisis.

【Key words】Drugs for promoting blood circulation and removing blood stasis; Antiangiogenisis; Chick chorioallantoic membrane (CAM); Screening

抑制病理性新生血管形成，对于血管增生性疾病如肿瘤、局部炎症、动脉粥样硬化、糖尿病微血管病变、系统性红斑狼疮、血管炎、肾小球疾病及子宫内膜异位症等的治疗具有重要意义，目前已成为研究的热点[1,2]。以活血化瘀为主的中药广泛用于这些疾病的治疗，但其作用机理不明，是否与抑制病理性血管生成有关研究甚少。根据我们既往的研究表明，中药活血化瘀为主在抑制病理性新生血管生成方面具有独特的优势[3-5]。

鸡胚绒毛尿囊膜法（Chick Chorioallantoic Membrane，CAM）是目前研究血管生成最常用、简捷的体内试验模型。本研究根据自己实验室的条件建立了改良的 CAM 法[6,7]，观察了 26 种活血化瘀中药对血管生成的影响。

作者介绍：王淑美（1969-　），女，讲师，硕士，主要研究方向：调控血管生成中药药理。

基金项目：重庆市科委资助项目渝科发计字[2002]18 号-99。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

26 种活血化瘀中药分别为榄香烯乳剂、莪术油葡萄糖注射液、磷酸川芎嗪注射液、注射用阿魏酸钠、血栓通注射液、香丹注射液、葛根素注射液、红花注射液、延胡索乙素注射液、雷公藤多苷片、火把花根片、祖师麻片、复方斑蝥胶囊、血府逐瘀口服液、大黄庶虫丸、大活络丸、复方丹参滴丸、银杏叶片、七厘散、活血通脉片、桂枝茯苓丸、益母草膏、失笑散、三棱丸、桃红四物汤Ⅱ号及补阳还五汤，由重庆医科大学天然药学教研室鉴定为正品。硫酸鱼精蛋白注射液，上海第一生化药业公司产品，批号 001008。明胶海绵，金陵药业股份有限公司产品。伤口膜，美国 3M 公司产品。奥林巴斯体视学显微镜，日本 OLYMBUS 公司产品。307-213 牙科台式电钻车，宁波医疗器械总厂产品。

1.2 药物制备

所用片剂、胶囊剂、丸剂、散剂溶解成饱和溶液，汤剂制成含生药 2g/ml 的水煎醇沉液，注射液、口服液、膏剂用原药物浓度。所有药液经 0.45μm 微孔滤膜过滤除菌，4℃保存备用。将大小为 4mm×4mm×4mm 的明胶海绵以三蒸水浸透，挤干备用。

1.3 CAM 模型制备[3]、分组与给药

种鸡蛋购自四川内江种鸡场，为尼克 T 白壳种蛋，重量 50~55g/ 只。种蛋气室向上，温度 37℃，湿度 40%~60% 孵化。每天翻蛋 2 次，及时淘汰死胎及胚胎发育不良者。孵育至第 7 天，鸡胚随机分为 29 组，每组 8 只。即治疗组为 26 个不同的活血化瘀中药组，阴性对照组为硫酸鱼精蛋白组，空白对照组为载体组，阴性对照组为蒸馏水组。无菌条件下用牙科细砂轮切割蛋壳侧面开窗，制备假气室。将明胶海绵置于 CAM 表面两条主干血管之间相对无血管区，按 20μl 胚加药液于载体上。伤口膜封闭窗口，继续孵育。每日 1 次，连续 3 天。

1.4 拍照及计数

孵化第 10 天，拍摄以载体为中心的鸡胚照片，保存试验结果。去除载体，解剖镜下放大 10 倍计数载体区域及周围 5mm 内的可见血管分支点数量。

1.5 统计分析

实验数据用 SPSS12.0 统计软件进行方差分析，用 Dunnett's 检验进行组间比较，计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

正常 CAM 血管呈树枝状、叶脉样生长。空白载体组、蒸馏水组 CAM 血管呈轻度辐轴状、放射状生长。中药组榄香烯乳剂、莪术油葡萄糖注射液、磷酸川芎嗪注射液、注射用阿魏酸钠、雷公藤多苷片、火把花根片、祖师麻片、复方斑蝥胶囊、大黄庶虫丸、大活络丸、复方丹参滴丸、七厘散、活血通脉片、三棱丸及桃红四物汤Ⅱ号共 15 组和鱼精蛋白组 CAM 血管形态出现无血管区或血管断裂现象。上述 15 种活血化瘀药 CAM 血管生成数量减少，与空白载体组和蒸馏水组比较差异有显著性（$P<0.05$）；与鱼精蛋白组比较差异无显著性（$P>0.05$）。提示这 15 种活血化瘀药具有抗 CAM 血管生成作用（见表 1，图 1~4）。



图 1 鱼精蛋白组 CAM 出现血管断裂无血管区（原位微距摄影）



图 2 复方斑蝥胶囊组 CAM 出现血管断裂和无血管区（原位微距摄影）



图 3 空白明胶海绵载体组 CAM 血管轻度辐轴状、放射状生长（×10 倍）



图 4 火把花根片组 CAM 出现血管断裂和无血管区（×10 倍）

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 26 种活血化瘀中药对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响

组 别	n	药物浓度	血管分支点数量（$\bar{x} \pm s$）
载体组	8	—	75.27 ± 7.62
蒸馏水组	8	—	74.99 ± 8.01
鱼精蛋白组	8	60μg/ml	45.81 ± 7.14*
槐香烯乳剂	8	5mg/ml	51.26 ± 5.52*△
莪术油葡萄糖注射液	8	0.4mg/ml	60.91 ± 8.17*△
磷酸川芎嗪注射液	8	25mg/ml	57.32 ± 6.81*△
阿魏酸粉针剂	8	25mg/ml	63.62 ± 8.15*△
血栓通注射液	8	35mg/ml	71.95 ± 5.02
香丹注射液	8	含生药 2g/ml	76.12 ± 7.28
葛根素注射液	8	25mg/ml	80.97 ± 8.20
红花注射液	8	含生药 1.2g/ml	70.63 ± 8.51
延胡索乙素注射液	8	含生药 1g/ml	76.67 ± 7.33
雷公藤多苷片	8	20mg/ml	51.90 ± 8.84*△
火把花根片	8	300mg/ml	52.44 ± 7.53*△
祖师麻片	8	300mg/ml	59.91 ± 8.52*△
复方斑蝥胶囊	8	300mg/ml	52.18 ± 7.61*△
血府逐瘀口服液	8	含生药 4.05g/ml	68.91 ± 8.37
大黄䗪虫丸	8	300mg/ml	52.22 ± 7.29*△
大活络丸	8	300mg/ml	54.90 ± 8.02*△
桂枝茯苓丸	8	300mg/ml	69.32 ± 8.61
复方丹参滴丸	8	270mg/ml	62.39 ± 7.72*△
银杏叶片	8	160mg/ml	70.91 ± 8.23
七厘散	8	300mg/ml	58.90 ± 8.21*△
活血通脉片	8	300mg/ml	61.91 ± 8.92*△
益母草膏	8	含生药 1.8g/ml	72.52 ± 7.54
失笑散	8	2g/ml	68.9 ± 9.29
三棱丸	8	2g/ml	54.57 ± 7.68*△
桃红四物汤Ⅱ号	8	2g/ml	58.46 ± 5.01*△
补阳还五汤	8	2g/ml	81.2 ± 10.58

注：* 与空白载体组，阴性对照组比较降低 $P < 0.05$；△与鱼精蛋白组比较差异无显著性（$P > 0.05$）。

3 讨 论

血管增生性疾病临床常见疼痛、肿胀或包块。病理方面均有微血管增生、微循环障碍。中医辨证以血瘀证为基础，多出现气滞血瘀、痰瘀交阻和气虚血瘀等复合证。以活血化瘀兼化痰、行气或益气治疗。目前报道具有抗血管生成效应的中药多为活血化瘀类药（莪术、郁金、雷公藤、川芎嗪、姜黄素等）、祛痰除湿类药（昆布、薏苡仁等）及益气类药（人参皂苷 Rg3、云芝多糖等）[3,8]。

我们用 CAM 法对 26 种活血化瘀中药进行初筛，结果显示，抑制 CAM 血管生成作用较好的有从活血化瘀药中提取的单体和有效成分如槐香烯、莪术油、川芎嗪、阿魏酸、雷公藤多苷等，也有活血破血作用强的含有乳香、没药、三棱、莪术、红花、皂角刺、桃仁、干漆、水蛭、虻虫及䗪虫等的复方。本研究表明，某些从活血化瘀药中提取的有效成分及活血破血作用强的复方，具有一定抑制血管生成作用，可能是其临床对血管增生性疾病有很好疗效的作用机理之一。

CAM 法是国内外公认的初筛抗血管和促血管生成药物的最理想的体内实验模型之一。CAM 模型方法有开窗法和无壳法。加药的天数各实验室也从 4 天至 12 天不等。在加药前都须先置入固体载体以起到吸附和缓释药物作用，并便于结果的观察，但载体的选择也有甲基纤维素、混合纤维素滤膜、滤纸和明胶海绵等很多种[6,7]。我们根据自己实验室的条件建立了改良的 CAM 法。选择 7 天鸡胚是因为此时鸡胚尿囊膜血管发育稳定、存活率高。一次完成减压、CAM 分离和加待测药物等操作，简化了试验过程，降低了污染，并且提高了鸡胚的存活率。明胶海绵为载体有轻度促血管生成作用，用于 CAM 法抗血管生成研究较适合。结果判断采用直观的形态学观察法和计数血管分支点法。本试验具有条件稳定、特异性强、敏感性高及重复性好的特点[8]。

本试验所用药物为临床常用的活血化瘀中成药和复方，是以活血化瘀中药为主药加辅料而制成。目前国内外尚无辅料如赋形剂、填充剂、稀释剂、粘合剂、抗氧化剂、崩解剂、润滑剂等对血管生成有影响的报道，可见对血管生成的影响主要是活血化瘀中药的作用。鉴于是对不同制剂，不同浓度中成药和复方的一个初筛试验，其药效成分的定性、定量以及药理作用机制等尚待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Folkman J. Angiogenesis in cancer,vascular,rheumatoid,and other diseases [J]. Nat Med, 1995;1:27-31.

[2] 何爱彬，曾昭淳.血管生成抑制剂 arresten 的 cDNA 一步法

（下转第 407 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆地区正常殆青少年的牙弓宽度为男性大于女性，牙弓长度，除上颌中切牙区、下颌中侧切牙区外，其余均为男性大于女性。与西安地区[13]相比，牙弓前、中、后段宽度较西安大，而牙弓长度普遍小于西安人；上下牙弓前后段指数均小于西安人，表明重庆地区青少年的牙弓形态较西安地区略显短宽。与北京地区相比[14]，男性上下牙弓前后段宽度大于北京地区，上下牙弓前段长度大于北京地区，上下牙弓后段长度小于北京地区，女性下牙弓前段宽度及长度大于北京地区；男女牙弓前段指数大于北京地区，牙弓后段指数小于北京地区，牙弓后段形态较北京地区也略显短宽。与广西壮族[15]相比，男性上颌牙弓宽度和长度较广西壮族男性大，女性上颌牙弓宽度与广西壮族女性接近，牙弓长度较广西壮族女性大，存在地区差异。上颌牙弓宽度大于美国黑人和白人[1]，上颌牙弓长度小于美国黑人和白人，存在种族差异。从男女上下颌牙弓弓形图可以看出上下牙弓形态、大小是协调的，男性上下颌牙弓分别较女性上下颌牙弓大。

正畸矫治的目的不仅要改变牙齿的异常排列，还应修正异常的牙弓形态，建立与患者牙齿、颜面形态、口周肌群相匹配的牙弓形态，因此牙弓的大小、形态是正畸临床中所必须考虑的问题，同时治疗后的牙弓形态对治疗结果的美观、功能及稳定均有直接影响。建立本地区正常殆儿童的牙弓大小均值，了解本地区人群的牙弓特点有助于指导临床。

参 考 文 献

[1] Burris BG, Harris EF. Maxillary arch size and shape in American blacks and whites[J].Angle Orthod, 2000;70(4):297-302.

[2] Marz LM, Isaacsan RJ, Germane N, et al. Tooth diameters and arch perimeters in a black and white population [J]. Am J Orthod Dentofac Orthop, 1991;100(3):53-62.

[3] 曾祥龙，主编. 现代口腔正畸学诊疗手册[M]. 第 1 版. 北京：北京医科大学出版社，2000;385-397.

[4] 方志欣，周 嫣，陈世稳，等. 广西壮族正常殆青少年模型测量研究 [J]. 临床口腔医学杂志，2001;17(2):117-119.

[5] 杨新海，曾祥龙. 中国人正常殆牙齿位置和形态 [J]. 北京医科大学学报，1998; 30(6):528-531;

[6] Andrews LF. The six keys to normal occlusion [J]. Am J Orthod,1972;62(3):296-309.

[7] Brader AC. Dental arch form related with intraoral forces: PR= C [J]. Am J Orthod, 1972;61(6):541-561.

[8] Begole EA. A computer program for the analysis of dental arch form using the catenary curve[J]. Comput-Programs-Biomed, 1981;13(1):93-99.

[9] De La Cruz A, Sampson P, Little R, et al. Long-term changes in arch form after orthodontic treatment and retention[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1995;107(5):518-530.

[10] Begole EA. Application of the cubic spline function in the description of dental arch form[J]. J Dent Res,1980;59(9):1549-1556.

[11] Richards LC, Townsend GC, Brown T, et al. Dental arch morphology in south Australian twins [J]. Archs Oral Biol,1990;35(12):983-993.

[12] Currier JH. A computerized geometric analysis of human dental arch form [J]. Am J Orthod, 1969;56(1):165-172.

[13] 柯杰，赵桂芝，林珠，等. 正常殆模型近景立体摄影测量研究(一)——牙齿及牙列的测量研究 [J].实用口腔医学杂志，1995;11(4):283-286.

[14] 周立新，厉 松，王邦康. 牙殆模型视频立体测量系统的建立与应用[J]. 现代口腔医学杂志，2002;16(4):347-349.

[15] 方志欣，周 嫣，陈世稳，等. 广西壮族正常殆青少年牙弓测量分析 （模型研究 II）[J]. 口腔医学研究，2002;18(3):191-193.

（上接第 403 页）

克隆与原核表达[J].重庆医科大学学报,2004;29(3):337-339.

[3] 徐晓玉，王淑美，陈伟海，等.桃红四物汤 II 号抗血管生成作用及对 KDR/flk-1 表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理，2005;16(4):329-332.

[4] 徐晓玉，陈 刚，严鹏科，等.川芎嗪对小鼠肺癌血管生长和 VEGF 表达的抑制[J].中国药理学通报,2004;20(2):151-154.

[5] 王淑美，徐晓玉，陈 刚.桃红四物汤 II 号抑制小鼠 B16 黑色素瘤生长及 VEGF、KDR/flk-1 表达 [J]. 中国中药杂志，2005;30(23):1866-1869.

[6] Ribatti D, Vacca A. The chick embryochorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis[J]. Int J Devel Biol, 1996;40(6):1189-1996.

[7] HE Guoan, LUO Jinxian, ZHANG Tianyuan, et al. Improved Chick Chorioallantoic Membrane Technique[J]. Acta Scientlarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2003;42(2):126-128.

[8] 王淑美，徐晓玉，张文亮，等. 桃红四物汤及其拆方对血管生成的抑制或促进作用观察[J]. 中药药理与临床, 2005;21(4):4-7.