DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.012
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
276 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0276-04

去甲二氢愈创木酸对活体血管生成作用的实验研究

孙慧勤[1],陈意生[1],史景泉[1],卞修武[1],邹仲敏[2],傅晓岚[3],章 容[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院病理学研究所;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所;[3]高原军事医学系中心实验室;重庆 400038)

提 要:目的 观察去甲二氢愈创木酸(NDGA)对在体血管生成的影响。方法 采用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)试验,检测NDGA对血管生成的影响。结果 2.5×10^{-6} mmol以上量的NDGA均对血管生成有抑制作用,在实验剂量$(0.5\sim50)\times10^{-6}$ mmol范围内,随给药量的增加,其抑制作用愈加明显。采用Bouin's液原位固定后取膜、DAB染色、普通显微镜下观察或用图像分析方法可使结果更具可信性与可比性。结论 NDGA可抑制血管生成,对肿瘤及其它病理情况下的抗血管生成治疗可能具有重要的应用价值。

关键词:血管生成;去甲二氢愈创木酸;鸡胚绒毛尿囊膜;形态学
中图法分类号:R322.12;R977.3 文献标识码:A

Effects of nordihydroguaiaretic acid on angiogenesis *in vivo*

SUN Hui-qin, CHEN Yi-sheng, SHI Jing-quan, BIAN Xiu-wu, ZOU Zhong-min, FU Xiao-lan, ZHANG Rong (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on angiogenesis. Methods The chicken chorioallantoic membrane (CAM) assary was used to detect the effect of NDGA on angiogenesis. Results NDGA inhibited blood vessel formation in chicken chorioallantoic membrane, with the lowest effective dose of 2.5×10^{-6} mmol. This inhibitory effect was proportional to the dose of NDGA. The modified CAM assay, such as fixing CAMs *in situ* with Bouin's solution, staining samples with DAB, and being quantified by image analysis, could make the results more convincible. Conclusion Our study find primarily that NDGA, an inhibitor of tumor cell growth, can effectively inhibit the angiogenesis of CAM, which implies its application in the treatment of tumor or angiogenesis in other pathological conditions.

Key words: angiogenesis; nordihydroguaiaretic acid (NDGA); chorioallantoic membrane(CAM); morphology

近年发现去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid, NDGA)具有多种生物学功能,其中以抑制多种肿瘤的发生和发展作用尤为引人关注[1,2],但具体作用机制不清。本室在既往的研究中发现NDGA对人恶性胶质瘤不但具有显著的抑制生长和诱导分化作用[3],而且亦能减低移植瘤和实验性胶质瘤的微血管密度,提示该药可能对胶质瘤的血管生成有影响;我们最近的研究发现NDGA在体外能有效抑制内皮细胞增殖、生长以及胶质瘤诱导的迁移、成型等抗血管生成作用。鸡胚绒毛尿囊膜(Chicken chorioallantoic membrane assay, CAM)试验法是一种经典的广泛用于血管生成的研究方法,本研究采用CAM法,研究NDGA对在体血管生成的作用,以验证其抗血管生成效果,为阐明NDGA抗肿瘤血管生成机制以及临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 测试物载体的制备

参照姜志钢等[4]的方法进行。0.5%甲基纤维素(Sigama产品)以无菌蒸馏水配制,9磅、10 min高压灭菌后,混匀,将10 μl的上述液体分1、2次加入模板内烘干,无菌针头挑出备用。

1.2 种蛋孵育及观察

新鲜种蛋购自重庆种鸡养殖厂,以湿纱布擦干净其表面,置于37 ℃、60%相对湿度的孵箱内培养,每日翻动2次。孵育至第8天,在照蛋箱下检查胚胎孵育及存活情况,此时,成活的鸡胚可见明显的尿囊膜主要血管,选择两条血管交接点而又离胚体有一定距离处作记号以确定开窗位置。

1.3 开窗

先以有齿镊在气室顶端开一1~2 mm的小孔减压,然后,以记号为中心,用碘酒及酒精消毒,以眼科有齿镊轻轻敲开一小孔(注意防止因用力过猛而伤及下方的卵壳膜),再向四周开一约0.5 cm×0.5 cm的窗口,滴少许等渗盐水在窗口的卵壳膜上以使下方的尿囊膜与之分离,以眼科镊小心掀起壳膜(尽量不要撕掉该膜),此时可见下方的尿囊膜与其血管。

1.4 加测试物

将已制备的甲基纤维素小丸小心放置于所选中的测试区,用微量移液器吸取不同浓度及体积的NDGA(0.1 mmol/L×5,×10 μl;0.5 mmol/L×5,×10 μl;1 mmol/L×10 μl;5 mmol/L×

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570295),重庆市应用基础研究资助项目
作者简介:孙慧勤(1964—),女,云南省昆明市人,博士,副教授,主要从事肿瘤病理方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68752246
通信作者:卞修武(E-mail:bianxiuwu@263.net)
收稿日期:2000-05-25;修回日期:2001-03-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5 μl, × 10 μl)或等体积的 PBS 液于甲基纤维素小丸上, 将壳膜盖回原位。然后以透明胶纸封闭卵壳开口, 熔化石蜡封固四周, 放回孵箱继续培养至第 11 天。每个剂量组保证至少存活 8 只鸡胚。

1.5　原位观测、取膜及标本制备

加测试物后 3 d, 用镊子去掉 CAM 平面以上的卵壳及卵壳膜(注意勿伤及血管), 在体视显微镜下原位观察并摄像记录给药后的血管变化。然后以 Bouin' s 液原位固定 30 min, 剪下, 以 70% 乙醇洗数次, 褪去固定液的颜色, 置于涂有 1% 白乳胶的载玻片上, 参照 Strawn 等[5] 的方法, 用 DAB 液(配制方法: DAB 适量入 PBS 中溶解, 过滤, 用前加入少许 30% H_2O_2 混匀)染膜 5 min 以显示红细胞内源性过氧化酶的活性, 待显色后, 洗去 DAB 液, 置 37 ℃烘干, 中性树胶封片, 长期保存。此外, 小心剪下部分鸡胚的 CAM, 作大体摄像, 4% 多聚甲醛固定后长期保存。

1.6　血管面积的测定

将上述经 DAB 染色、制备的标本在显微镜下观察、摄像采用德国 Leica 公司 MD20 型真彩色图像分析仪测量分析, 测定条件: 物镜放大倍数× 6.3, 测出测试区 DAB 阳性反应的总面积(Area)。

1.7　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 Microsoft Excel 提供的统计程序进行单因素方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　CAM 血管生成状况的大体变化

8 日龄的鸡胚绒毛尿囊膜主枝血管及血管网清晰可见, 加 NDGA 作用后 3 d, 大体与体视显微镜观察, 与对照组(图 1)相比, 除(0.5、1、2.5)× 10^{-6} mmol 的剂量外, (5、10、25、50)× 10^{-6} mmol 剂量组, 给药区及其周围直径约 1 cm 处, 小血管及血管网明显减少甚至未见, 见图 2, 部分鸡胚还出现溶血现象。此外, NDGA 组鸡胚存活率也有下降。

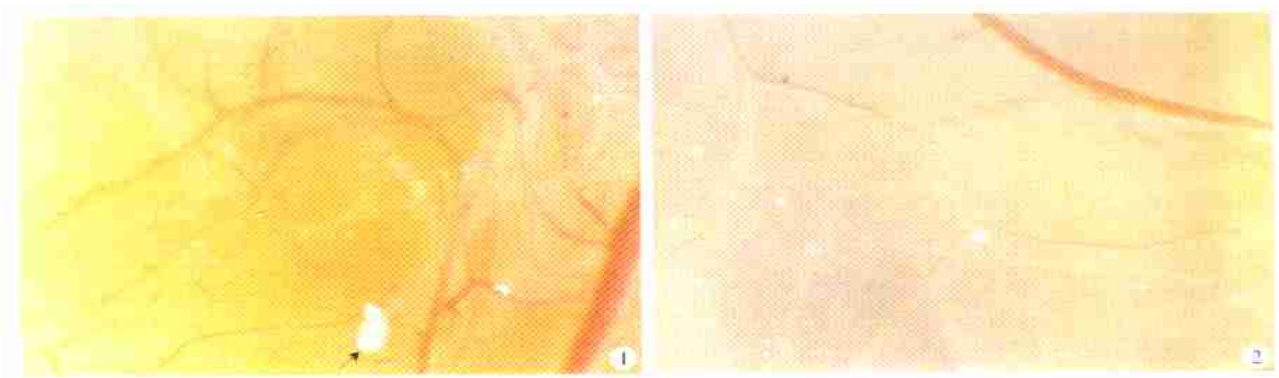


图 1　**PBS** 组鸡胚绒毛尿囊膜　可见丰富的血管及毛细血管网(→: 卵壳膜碎片)　(× 20)

Fig 1　Chicken chorioallantoic membrane in PBS control group　Abundant blood vessels and capillary network were found (→: egg shell fragments)　(× 20)

图 2　**NDGA** 组 **50× 10^{-6} mmol** 鸡胚绒毛尿囊膜　测试区毛细血管网明显减少　(× 20)

Fig 2　CAM treated with 50× 10^{-6} mmol NDGA　In tested area, less blood vessels and capillary network were found　(× 20)

2.2　原位固定取膜、内源性过氧化酶显色观察 CAM 微血管方法的效果与比较

采用原位固定后取膜、用 DAB 染色显示红细胞内源性过氧化酶观察微血管情况的方法进行实验, 固定后的 CAM 不但韧性增加, 且又避免了出血, 使取膜容易而完整, 较好地保持了 CAM 实验标本的完整性。DAB 染色后在普通显微镜下观察可见由血管内着棕黄色或红棕色的红细胞, 显示出非常清晰的血管或毛细血管网, 易用图像分析方法处理结果。

2.3　CAM 微血管网的显微观察与定量分析

经固定、DAB 染色后的 CAM 在显微镜下观察, 对照组可见由着棕黄色或棕红色的红细胞显示出的非常清楚的血管或毛细血管网, 见图 3; 在 NDGA 组, 当给药量为 2.5× 10^{-6} mmol 以上时, 其给药区及附近的毛细血管也明显减少, 表现为 DAB 染色减弱、毛细血管稀疏, 见图 4。图像分析表明: 2.5× 10^{-6} mmol 以上的各个 NDGA 剂量组毛细血管网面积均明显减少, 且随给药量的增加毛细血管网面积减少程度愈加明显, 统计学差异显著, 见表 1。

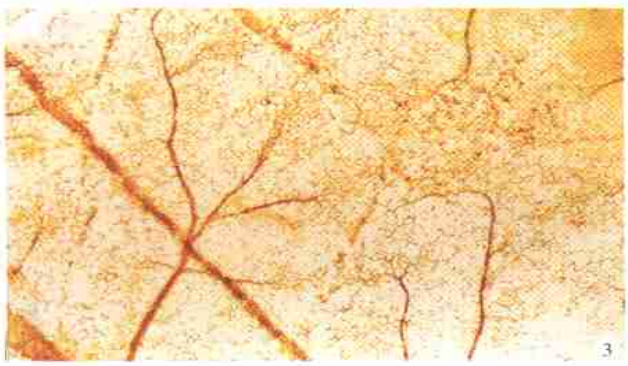
表 1　不同剂量 **NDGA**(× 10^{-6} **mmol**)作用下 **CAM** 毛细血管网面积的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of capillary network areas in CAM after different dose of NDGA treatment($\bar{x}\pm s$)

	PBS	Dosage of NDGA(× 10^{-6} mmol)						
		0.5	1	2.5	5	10	25	50
Area(μm^2)	18 887±7 090	19 525±2 833	21 223±4 587	8 377±5 377 *	6 746±2 554 *	6 069±682 *	4 598±1 713 **	2 492±2 144 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* PBS

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



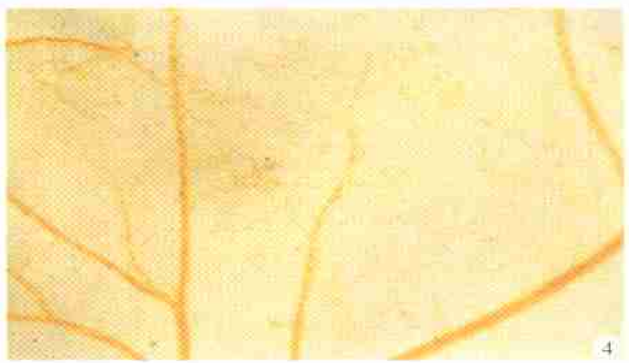


图 3 PBS 组鸡胚绒毛尿囊膜 DAB 染色显示丰富的毛细血管网 (DAB×40)

Fig 3 Micrographs of DAB stained CAM in PBS control group Showed abundant capillary network (DAB×40)

图 4 NDGA 组 10×10^{-6} mmol 鸡胚绒毛尿囊膜 测试区毛细血管网显著减少,DAB 染色弱 (DAB×40)

Fig 4 Micrographs of DAB stained CAM in 10×10^{-6} mmol NDGA treatment In tested area with less blood vessels and capillary network, DAB staining much lighter (DAB×40)

3 讨论

在鸡胚发育的第 4 至第 5 天,绒毛膜的体中胚层与尿囊的内脏中胚层融合形成了鸡胚绒毛尿囊膜,此高度血管化的膜作为鸟类胚胎的第一个呼吸系统进行气体交换,一直维持至鸡胚发育的第 19 天。由于发育中组织的生长、分化使胚胎所需的氧量剧增,CAM 对氧的弥散能力也必须与氧的需求相匹配,这使得在鸡胚第 6~10 天,间质中的毛细血管网迅速扩张,在第 10~14 天,毛细血管从深部间质移向绒毛、甚至进入绒毛上皮,极大的减少了弥散屏障。因此,胚龄 6~14 d 的鸡胚绒毛尿囊膜便成为与血管生成相关研究的极好模型。Schlatter[6] 的研究表明,鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成经历了 3 个时期:早期,从胚胎的第 5~7 天,毛细血管网主要以芽生方式进行血管生成;中期,从胚胎的第 8~12 天,则以套叠生长方式(Intussusceotive microvascular growth, IMG)形成新生血管占优势;后期,第 13~14 天,CAM 结构已经成熟,毛细血管网主要是发生膨胀。我们选择在 8 d 胚龄给药,正是鉴于此时鸡胚绒毛尿囊膜的血管正处于生长高峰,如果 NDGA 能抑制血管生成,则给药区的血管减少应有明显表现。

本实验观察了不同量的 NDGA 对 CAM 血管生成的影响,小剂量[$(0.5、1)\times10^{-6}$ mmol]时对血管生成无明显影响;2.5×10^{-6} mmol 以上的量,则开始显示抑血管生长效应,并随给药量的增加,作用越明显。2.5×10^{-6} mmol 剂量组在大体上观察血管的变化与对照无明显差异,但在显微镜下,其毛细血管网却明显较对照稀疏。如果单纯只以大体观察血管变化的话,则该剂量组将被认为与对照组无差异,在体视显微镜尤其是经固定、DAB 染色后于普通显微镜下观察则见给药区域附近的毛细血管明显减少,与对照组存在差异。

NDGA 是花生四烯酸代谢过程中脂氧化酶的强抑制剂。在花生四烯酸代谢过程中,通过环氧化酶(Cyclooxygenase, COX)途径产生前列腺素、前列环素等;通过脂氧化酶(Lipoxygenase, LOX)通路产生 HETES、白三烯,这些代谢产物已证明在肿瘤的增生、转移和免疫抑制等方面发挥作用从而促肿瘤生长。进一步的研究发现:花生四烯酸及其脂氧化酶通路产物通过增加细胞内钙、激活 MAPKs 信号通路的外部 ERKs 等机制而促细胞增生[7]。MAPKs 信号通路目前认为是一系列生长因子引起细胞分裂增生的常见通道,NDGA 通过抑制花生四烯酸及其脂氧化酶通路产物的产生而抑制细胞增生;同时 NDGA 能抑制 fos-jun-DNA 复合物的形成,抑制生长因子激活的 NF-κB 也抑制细胞增生[8]。因此,对于增殖活性越高的细胞,花生四烯酸代谢越快,NDGA 抑制作用就表现越强,这可能是 NDGA 对胶质瘤细胞的抑制作用强于对内皮细胞的原因之一。研究发现,NDGA 对内皮细胞增殖有明显抑制作用[9],我们的研究也证实 NDGA 不但对内皮细胞增殖有作用,对迁移、成型等多方面也有抑制[10,11];我们还发现,NDGA 能降低内皮细胞 flk-1/KDR 的表达水平(另文发表),而后者是血管形成和血管生成中的主要调节者[12],这可能是 NDGA 影响 CAM 血管生成的原因。本实验结果也与本室胶质瘤裸鼠移植、NDGA 抗移植瘤内血管生长的抑制作用相符合,说明 NDGA 对在体的血管生成有影响。由于 NDGA 的相对无毒性,进一步提示其在抗病理条件下的血管生成中可能具有良好的应用前景。

在研究方法上,鸡胚绒毛尿囊膜是一非常菲薄而又富于血管的薄膜,在实验操作(尤其是取膜)过程中,很容易造成撕破和出血,影响试验结果。用原位体视显微镜观察、摄影的方法,又因 CAM 下方的同样也是

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

富于血管的卵黄囊膜而影响和干扰结果。我们采用经原位固定后取膜、用 DAB 染色显示红细胞内源性过氧化酶观察微血管情况的方法则可避免上述方法的不足，固定后的 CAM 不但韧性增加，且又避免了出血，使取膜容易而完整，较好地保持了 CAM 实验标本的完整性。DAB 染色后可在普通显微镜下观察或用图像分析方法处理结果，使之更具可信性与可比性。

参考文献：

[1] Wang Z Y, Agarwal R, Zhou Z C, *et al*. Antimutagenic and antitumorigenic activities of nordihydroguaiaretic acid[J]. Mutat Res, 1991, 261(3): 153－162.

[2] Yu A, Hashimura T, Nishio Y, *et al*. Anti-promoting effect of nordihydroguaiaretic acid on N-butyl-N(-hydroxybutyl)nitrosamine and sodium saccharin-induced rat urinary bladder carcinogenesis[J]. Cancer Res, 1992, 83(9): 944－948.

[3] 卞修武，史景泉，辛　榕，等. 二氢去甲愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 生长和分化的影响[J]. 中华病理学杂志，1997，26(5)：285－288.

[4] 姜志钢，鄂　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[J]. 解剖学杂志，1989，12(2)：142－143.

[5] Strawn L M, McMahon G, App H, *et al*. Flk-1 as a target for tumor growth inhibition[J]. Cancer Res, 1996, 56(15): 3 540－3 545.

[6] Schlatter P, Konig M F, Karlsson L M, *et al*. Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo[J]. Microvas Res, 1997, 54(1): 65－73.

[7] Madamanchi N R, Bukoski R D, Runge M S, *et al*. Arachidonic acid activates JUn N-terminal kinase in vascular smooth muscle cells[J]. Oncogene, 1998, 16(3): 417－422.

[8] Brennan P, O' Neill L A. Inhibition of nuclear factor kappaB by direct modification in whole cells-mechanism of action of dihydroguaiaretic acid, curcumin and thiol modifers[J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55(7): 965－973.

[9] Dethlefsen S M, Shepro D, D' Amore P A. Arachidonic acid metabolites in bFGF-, PDGF-, and serum-stimulated vascular cell growth[J]. Exp Cell Res, 1994, 212(2): 262－273.

[10] 孙慧勤，陈意生，史景泉，等. NDGA 对内皮细胞增殖抑制的作用研究[J]. 第三军医大学学报，2000，22(3)：245－248.

[11] 孙慧勤，卞修武，陈意生，等. 去甲二氢愈创木酸对胶质瘤细胞诱导的内皮细胞迁移的影响[J]. 中华病理学杂志，2000，29(1)：30－33.

[12] Keyt B A, Nguyen H V, Berleau L T, *et al*. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and Flt-1 receptors [J]. J Biol Chem, 1996, 271(10): 5 638－5 646.

（编辑　陈聪连）

文章编号：1000-5404(2001)03-0279-01

经验与短篇

下颌阻生牙拔除后“痛必停”镇痛效果观察

Observation on the analgesia effect of “Tongbiting” used after mandibular third molar extraction

游古莲，王建华，周正贵，张新芳，张　纲　（第三军医大学附属新桥医院口腔科，重庆 400037）

一般资料：120 例(男 67，女 52)下颌阻生智齿拔除患者，既往无心血管、神经、精神病史，年龄 18～37 岁。随机分成实验组与对照组各 60 例。两组间年龄及性别组成、阻生类型及程度、拔除方法、术中情况(疼痛与断根)、手术时间(12.5±8.7) min 及创伤程度、服药时疼痛计数相似，无显著差异；疼痛分组计数：将疼痛强度作 0～10 计数，0 为无痛，1～3 轻微疼痛，4～6 中度疼痛，7～9 重度疼痛，10 极度疼痛；术后患者感到中度以上疼痛时开始服药。实验组口服痛必停胶囊 1 粒(布洛芬 50 mg，硝苯碇 10 mg)，对照组服乙酰水杨酸 500 mg。服药后 20、40 min 及 1、1.5、2、2.5、4、6 和 8 h 时记录疼痛程度并评价药效。用药后 2 h 无效者加服 1 粒(对照组 8 人)。患者根据药物的镇痛效果进行总评估：0：不好，1：尚可，2：较好，3：良好，4：优秀，共 5 组。

基线疼痛计数：实验组 5.6±1.2，对照组 5.4±1.1，$P>0.01$；各时点疼痛强度计数：服药后 20 min 及 40 min 两组相似，

作者简介：游古莲(1963－)，女，重庆市垫江县人，主管技师，主要从事口腔内科方面的研究，发表论文 14 篇。电话：(023)68774645

收稿日期：2000-03-03；修回日期：2000-09-05

2 h 后两组相差显著($P<0.01$)。总评估：实验组 3.5±0.6，对照组 2.2±1.1，相差显著($P<0.01$)。

讨论

痛必停是由布洛芬和硝苯碇制成的缓释胶囊，布洛芬[1]能抑制环氧脂酶活性，在创伤和炎症局部抑制前列腺素的产生，硝苯碇抑制 Ca^{2+} 内流，能拮抗前列腺素。两者协同作用，抗炎镇痛作用强。

经临床观察，痛必停镇痛作用强且药效持久(8 h 以上)，无毒副反应，成本低，病员易接受。

关键词：痛必停；疼痛强度；拔牙
中图法分类号：R782.11　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 傅风华，苏春芬. 双氯酚醛用于拔牙术后止痛[J]. 国外医学：口腔医学分册，1995，22(4)：251.

（编辑　王　红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net