



# 巴戟天寡糖促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成研究

杨景柯<sup>1,2</sup>, 冯国清<sup>2\*</sup>, 于爽<sup>2</sup>, 乔鹏<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅二医院, 湖南长沙410011; 2. 郑州大学基础医学院, 河南郑州450052)

**[摘要]** **目的:**探讨巴戟天寡糖(MOO)对鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管生成的影响。**方法:**运用血清药理学的方法制备含药血清。60只鸡胚随机分为MOO低、中、高剂量组及生理盐水(NS)阴性对照组、空白血清对照组、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)阳性对照组,每组10只。孵育7d后建立CAM模型,将NS、空白血清、bFGF( $2\ 500\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、MOO 3种剂量含药血清分别加在CAM表面的载体上,继续孵育3d后制备CAM标本,观察血管生成表现,并进行新生血管计数。**结果:**MOO各剂量组与bFGF组血管生成表现明显优于NS组与空白血清组。MOO各剂量组新生血管数目较空白血清组均明显增加( $P < 0.05$ ),但药效均弱于bFGF组( $P < 0.05$ )。与MOO低剂量组相比,中、高剂量组新生血管数显著增加( $P < 0.05$ ),但两者之间无显著性差异。NS组与空白血清组新生血管数目之间无显著性差异。**结论:**MOO可促进鸡胚绒毛尿囊膜的血管增生,具有一定的促血管新生作用。

**[关键词]** 巴戟天寡糖;血管生成;鸡胚绒毛尿囊膜

血管新生疗法在冠心病患者中具有潜在的广泛市场<sup>[1]</sup>。各种血管生长因子及其转基因治疗的促进血管生成作用已获得认可,但在临床应用中仍存在有效性和安全性等问题<sup>[2]</sup>。近年来,中医药的促血管生成活性及其对心肌缺血保护作用的研究取得了一定进展<sup>[3]</sup>。巴戟天为茜草科植物,肉质根入药,具有补肾壮阳,强筋骨,祛风湿之功效。巴戟天寡糖(*Morinda officinalis oligosaccharides*, MOO)是巴戟天醇提物中的主要有效成分<sup>[4]</sup>。本课题组根据中医“心本于肾”的观点,近年来对MOO在心血管方面的药理活性进行了系统研究。研究表明,MOO具有显著的抗缺氧复氧及缺血再灌注损伤、保护心肌作用<sup>[5-6]</sup>。然而其是否具有促血管生成作用,其心肌保护作用是否与其促血管生成活性有关等研究尚属空白。本实验拟通过鸡胚绒毛尿囊膜(chick chorioallantoic membrane, CAM)模型,探讨MOO对血管生成的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 白皮种蛋60枚(购于郑州市种鸡孵化厂),每枚50~65g,表面清洁,蛋壳均质,蛋形规范,气室、气孔均匀。Wistar大鼠(由郑州大学实验动物

中心提供,合格证号410116),雌雄不拘,体重250~300g。

**1.2 药品与载体的制备** MOO的制备:巴戟天(广东省德庆县药材公司提供,一等品,河南省药品检验所李杰副研究员鉴定)生药15kg粉碎后,分次用70%乙醇在90℃水浴中煮60min,将乙醇提取液旋蒸回收乙醇,得浓缩液。用适量的蒸馏水稀释后,分别用乙醚、醋酸乙脂、正丁醇依次萃取,弃去乙醚、醋酸乙脂、正丁醇可溶部分,得到醇提物的水溶部分,用蒸馏水配成0.28,0.14,0.07g·mL<sup>-1</sup>3种质量浓度药液,4℃冰箱保存备用。

重组碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)注射剂(商品名:扶济复,购于北京双鹭药业有限公司,规格每支4000U),无菌蒸馏水配成2500U·mL<sup>-1</sup>溶液,4℃冰箱保存备用。混合纤维素微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂,孔径0.45μm),制成直径5mm圆片,121℃20min高压湿热灭菌,无菌蒸馏水浸泡2次后作为加药载体备用。

**1.3 仪器** SW-CJ-IF型净化工作台(苏州安泰技术有限公司);HERAcell二氧化碳培养箱(德国GmbH公司);KL400型体视显微镜(厦门Motic有限公司)。

## 2 方法

**2.1 制备MOO含药血清** 参照文献报道的方法制备含药血清<sup>[7]</sup>。大鼠随机分为MOO低、中、高剂量组及空白血清对照组,每组4只。前3组按每日

**[收稿日期]** 2009-07-18

**[基金项目]** 河南省重点科技攻关项目(072102330041)

**[通信作者]** \*冯国清,教授,硕士生导师,主要研究方向为心血管生药药理,Tel:(0371)67781117,E-mail:fengggq202@yahoo.com.cn



10 mL · kg<sup>-1</sup> 分别灌胃给予 0.07, 0.14, 0.28 g · mL<sup>-1</sup> 巴戟天醇提物水溶性部分药液; 空白血清组按每日 10 mL · kg<sup>-1</sup> 灌胃给予蒸馏水。1 日剂量分 2 次灌胃, 早晚各 1 次, 连续给药 3 天, 第 4 天 1 次灌胃全天剂量。采血前禁食 12 h, 末次给药 1 h 后腹主动脉采血, 3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清, 血清分装, 56 °C 水浴灭活, 微孔滤器 (孔径 0.22 μm) 过滤除菌, -20 °C 冰箱保存备用。

**2.2 鸡胚的孵育** 种蛋孵育前用自来水清洗 2 次, 放入 1:1 000 新洁尔灭水溶液中浸泡 3 min。使用 CO<sub>2</sub> (5%) 培养箱, (37.8 ± 0.5) °C 孵育, 内置湿盘保持相对湿度在 65%。种蛋钝端向上, 呈 45° 倾斜。孵育过程中每日转蛋 4 次。使用照卵灯每日检查鸡胚发育情况, 随时淘汰发育不良胚胎。

**2.3 制备 CAM 模型** 参照贺国安等<sup>[8]</sup> 报道的方法并略加改进。取 7 日龄鸡胚, 随机分为 NS 对照组 (NS 组)、空白血清对照组 (空白血清组)、bFGF 阳性对照组 (bFGF 组)、MOO 低、中、高剂量组, 每组 10 枚。用碘伏和乙醇消毒气室表面。在照卵灯照射下, 于气室上方画出 1.5 cm × 1.5 cm 区域。乙醇消毒后, 用砂轮沿边线磨切透卵壳, 用眼科弯镊小心揭去卵壳, 暴露出下方的卵壳膜。用无菌注射器针头在卵壳膜上轻轻划破一小孔, 滴加无菌 NS 少许。在针头协助下, 用眼科弯镊轻轻揭去卵壳膜, 使 CAM 完全暴露, 形成假气室。将载体置于 CAM 中央血管稀少区, 各组分别加入 10 μL 的各待测物

表 1 MOO 含药血清对 CAM 模型存活率的影响 (n = 10)

组别	剂量/g · mL <sup>-1</sup>	死弱精数	开窗胚数	存活胚数	受精率/%	存活率/%
NS	-	2	8	7	80	87.5
空白血清	-	1	9	8	90	88.9
bFGF	2 500	2	8	8	80	100
MOO	0.07	3	7	7	70	100
	0.14	1	9	8	90	88.9
	0.28	0	10	9	100	90

注: bFGF 剂量单位为 U · mL<sup>-1</sup> (表 2 同)。

**3.2 血管生成表现** 自然状态下 CAM 血管呈叶脉状生长。NS 组、空白血清组血管生成表现均无特异性, 或特异性放射状血管程度低, 以非特异性贯穿、杂乱、包绕、叶脉样、平行等表现形式为主。bFGF 组、MOO 低、中、高剂量组血管生成以载体为中心, 周围血管放射状朝向被检物的生长状态, 即血管辐辏。也可见主干血管向载体盘的弯曲和靠近, 即血管的吸引 (图 1)。

(NS, 空白对照血清, bFGF 2 500 U · mL<sup>-1</sup>, MOO 低、中、高剂量含药血清), 透明胶纸封口, 继续孵育。加药后第 3 天, 计数鸡胚存活个数, 甲醇丙酮 (1:1) 混合液室温固定 15 min。待 CAM 的血管完全凝固后, 去除 CAM 平面以上的卵壳及卵壳膜, 以载体为中心完整剪下 CAM, 置于蒸馏水中展开, 平铺于载玻片上, 阴干保存。

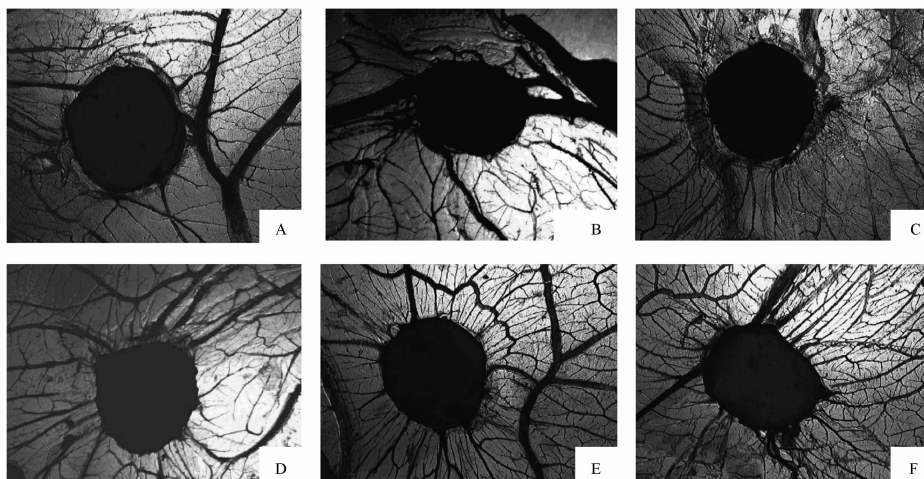
**2.4 血管计数** 体视显微镜下观察血管生成表现。以相同放大倍数计数血管, 以实验部位边缘 (即微孔滤膜载体边缘) 1 mm 范围内为 1 级血管, 以实验部位边缘 5 mm 处为 2 级血管。凡属趋向性生长的血管, 即以载体为中心发出, 与滤膜半径的夹角小于 45° 者均予计数, 而穿行、绕行的血管则不计算在内<sup>[9]</sup>。

**2.5 统计学分析** 计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。统计学处理用 SPSS13.0 作单因素方差分析, 当差异有统计学意义时进一步用 *q* 检验进行两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 鸡胚存活情况观察** 存活鸡胚观察: 胚胎活动活跃, 动脉血管搏动有力, CAM 透明, 血管丰富, 脉络清晰。死亡鸡胚观察: CAM 血管颜色浅淡, 脉络消失, 胚胎颜色发白, 活动停止。导致死亡的主要原因是造模失败, 表现为: 出血, CAM 上有散在出血点, 出血不易停止, 发展为大的瘀血斑, 鸡胚很快死亡; 污染, 部分 CAM 上有青霉菌落, 胚胎粘连 (表 1)。

**3.3 MOO 含药血清对 CAM 1, 2 级血管生成的影响** 与空白血清组相比, MOO 低、中、高剂量组 1, 2 级血管数目显著增加 (P < 0.05), 但药效均低于 bFGF 组 (P < 0.05); 与 MOO 小剂量组相比, 中、高剂量组 1, 2 级血管数显著增加 (P < 0.05), 但两者之间无显著性差异。NS 组与空白血清组 1, 2 级血管数目之间无显著性差异 (表 2)。



A. NS 组; B. 空白血清组; C. bFGF 组; D. MOO 低剂量组; E. MOO 中剂量组; F. MOO 高剂量组。

图 1 体视显微镜下各组 CAM 血管生成情况 (× 10)

表 2 MOO 含药血清对 CAM 血管生成的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot mL^{-1}$	存活胚数	1 级血管数	2 级血管数
NS	-	7	$17.50 \pm 4.07^{2,3)}$	$30.75 \pm 3.62^{2,3)}$
空白血清	-	8	$20.78 \pm 3.15^{2,3)}$	$34.36 \pm 7.58^{2,3)}$
bFGF	2 500	8	$65.67 \pm 9.35^{1,3)}$	$81.78 \pm 13.30^{1,3)}$
MOO	0.07	7	$29.33 \pm 8.52^{1,2)}$	$42.11 \pm 6.85^{1,2)}$
	0.14	8	$37.78 \pm 13.79^{1,2,3)}$	$50.14 \pm 6.25^{1,2,3)}$
	0.28	9	$41.78 \pm 7.89^{1,2,3)}$	$54.65 \pm 7.43^{1,2,3)}$

注:与空白血清组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 bFGF 组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与 MOO 小剂量组相比<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

血管生成是指从原血管床中长出新的毛细血管的过程,它在缺血性疾病的创伤愈合、组织再生和修复、侧支循环建立过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。由于 CAM 模型具有周期短、成本低、易于大样本重复等特点,且观察结果客观可靠,体视可见<sup>[10]</sup>,本研究选用 CAM 模型,观察 MOO 对局部血管生成的影响,初步评价了其促血管生成能力。

本研究前期预实验曾将中药原液直接加到 CAM 上,发现异物刺激过大,鸡胚成活率降低,且无法体现药物经体内代谢后的作用,因此尝试了中药血清药理学方法作为给药方式,以期克服中药粗提取物本身理化性质对实验的干预,并更好地反映药物在体内环境中产生药理效应的真实过程<sup>[11]</sup>。实验结果显示,NS 组与空白血清组血管数目无显著性差异,提示含药血清对 CAM 血管生成无特异性刺激。

本研究结果表明,MOO 可促进 CAM 血管生成,

其药效虽低于阳性对照药 bFGF,但具有明显的促血管生成活性。这一结果是对 MOO 以往药理研究成果的重要补充,有利于进一步深入研究和探讨其在心血管方面的保护作用。然而,本研究与临床尚有相当距离,从 CAM 得出的这一结论尚不能证明 MOO 一定能促进缺血心肌形成新生血管、建立侧支循环。

#### [参考文献]

- [1] Syed I S, Sanborn T A, Rosengart T K. Therapeutic angiogenesis: A biologic bypass[J]. *Cardiology*, 2004, 101(1/3): 131.
- [2] Losordo D W, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: Angiogenic cytokines[J]. *Circulation*, 2004, 109: 2487.
- [3] 戴瑞鸿,李勇. 冠心病心肌缺血的治疗性血管生成与中医药[J]. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20(3): 163.
- [4] 张中启,袁莉,赵楠,等. 巴戟天醇提取物的抗抑郁作用[J]. *中国药理学杂志*, 2000, 35(11): 739.
- [5] 韩联合,冯国清,张贺鸣. 巴戟天正丁醇提取物对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤后炎症细胞因子的影响[J]. *中国医院药理学杂志*, 2008, 28(17): 1450.



- [6] 汪宝军,付润芳,岳云霄,等. 巴戟天寡糖对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国医药导刊, 2009, 11(4):625.
- [7] 王力,王和鸣,李楠,等. 巴戟天醇提物对骨髓基质细胞增殖影响的血清药理学实验方法的建立[J]. 江西中医学院学报, 2004, 16(6):39.
- [8] 贺国安,罗进贤,张添元,等. 改进的鸡胚绒毛尿囊膜技术——无气室孵育法[J]. 中山大学学报, 2003, 42(2):126.
- [9] 张树成,吴志奎,王蕾,等. 研究中药血管生成活性和作用的鸡胚绒毛尿囊膜试验模型的应用[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(5):16.
- [10] Zwadlo-Klarwasser G, Gorlitz K, Hafemann B, et al. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials[J]. J Mater Sci Mater Med, 2001, 12(3):195.
- [11] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(1):59.

## Angiogenesis promoting effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides on chicken embryo chorioallantoic membrane

YANG Jingke<sup>1,2</sup>, FENG Guoqing<sup>2\*</sup>, YU Shuang<sup>2</sup>, QIAO Peng<sup>2</sup>

(1. Xiangya Second Hospital, Central South University, Changsha 410011, China;

(2. Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

[Abstract] **Objective:** To study the angiogenesis promoting effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides(MOO) on chick embryo chorioallantoic membrane(CAM). **Method:** Rats blood serum containing low, medium and high doses of MOO was prepared using Chinese herbs serum pharmacology method. 60 chick embryos were randomly divided into low, medium and high doses of MOO groups, as well as NS group, blank serum group and bFGF group. Each group included 10 embryos. CAM model was prepared after 7 days incubation. Then NS, blank serum, bFGF( $2\ 500\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), three doses of serum containing MOO were added respectively onto the carriers on the CAM. CAM sample was prepared after 3 days incubation. The state of angiogenesis was observed and the number of new blood vessels was counted. **Result:** Compared with blank serum and NS group, a more specific CAM angiogenesis appearance could be observed in each MOO group and bFGF group. Compared with blank serum group, the number of new blood vessels in each MOO group increased significantly( $P < 0.05$ ). But the drug had a lower efficacy than bFGF( $P < 0.05$ ). Compared with low dose group, the number of new blood vessels increased significantly in medium and high doses groups( $P < 0.05$ ). But there was no significant difference between the latter two groups. The number of new blood vessels showed no significant difference between NS group and blank serum group. **Conclusion:** MOO can obviously promote angiogenesis of CAM.

[Key words] *Morinda officinalis* oligosaccharides; angiogenesis; chick chorioallantoic membrane

doi: 10.4268/cjcmm20100323

[责任编辑 张宁宁]