·博士之窗·

麝香保心丸对鸡胚绒毛尿囊膜及培养的血管内皮细胞的促血管生成作用

汪姗姗△　李　勇　范维琥　戴瑞鸿

摘要　目的：探讨麝香保心丸在鸡胚绒毛尿囊膜模型及培养的微血管内皮细胞系统中的促血管生成作用。方法：分别以重组碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,贝复济)和生理盐水为阳性和阴性对照,作用于绒毛尿囊膜(chrioallantoic membrane, CAM),通过一级、二级血管计数,初步评价麝香保心丸的促血管生成活性；并通过观察它对培养的牛肾上腺微血管内皮细胞增殖及管腔结构形成的影响,验证其促血管生成效应；同时检测麝香保心丸作用于培养的人脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的 mRNA 表达及其上清液中 VEGF、bFGF 含量,初步探索其作用机理。结果：麝香保心丸组 CAM 上血管数比生理盐水组明显增加；麝香保心丸组内皮细胞及管腔数目均较生理盐水组明显增多,前者细胞表达 VEGF 和 bFGF mRNA 明显增高,上清液中 VEGF 和 bFGF 含量明显增多。结论：麝香保心丸能促进 CAM 及培养的微血管内皮细胞的血管生成。

关键词　麝香保心丸　鸡胚绒毛尿囊膜　内皮细胞　血管生成

Angiogenesis Promoting Effect of Shexiang Baoxin Pill on Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane and Cultured Microvascular Endothelial Cells WANG Shan-shan, LI Yong, FAN Wei-hu, et al *Laboratory of Cardiovascular Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040)*

Objective: To study the angiogenesis promoting effect of Shexiang Baoxin Pill (SXBXP) on chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) and cultured microvascular endothelial cells (MVEC). **Methods**: Using recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) and normal saline as positive and negative controls, the angiogenesis promoting effect of SXBXP on CAM was estimated primarily by counting the first and second grade vessels, which was then verified through observing the effect of SXBXP on the proliferation and tube formation of MVEC. The mechanism was studied by estimating vascular endothelial growth factor (VEGF), bFGF mRNA expression and their content in supernatant of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Results**: Number of vessels in CAM and MVEC, and tube formation after SXBXP treatment were obviously more than those after treated with normal saline. Furthermore, VEGF and bFGF content and their mRNA expression in supernatant of HUVEC culture in the SXBXP group were higher than those in the control group. **Conclusion**: SXBXP could promote angiogenesis in CAM and MVEC.

Key words　Shexiang Baoxin Pill, chicken embryo chorioallantoic membrane, endothelial cell, angiogenesis

血管生成在冠心病、缺血性脑栓塞、骨折创伤、肿瘤及白内障等的治疗、恢复和预后中,具有重要的意义。中医治疗缺血性疾病有着悠久的历史,也取得了显著的成效。然而,有关促血管生成中药的开发与研究,目前基本还是空白。麝香保心丸是中药治疗冠心病最具影响力的代表药,经多年来的临床实践和药理研究证明[1,2],有显著的抗心肌缺血作用,但对其在缺血心脏冠脉侧枝血管生成方面的作用与机制尚未探讨过,本实验通过观察麝香保心丸对鸡胚绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)模型、培养的牛肾上腺微血管内皮细胞增殖及管腔结构形成等的影响,探讨麝香保心丸的促血管生成效应,为进一步研究其在缺血心脏侧枝循环建立方面的作用提供依据。

材料与方法

1　药液与载体的制备　麝香保心丸由上海中药

复旦大学华山医院心血管病研究室(上海 200040)
△现在同济大学附属上海东方医院心血管内科(上海 200120)
通讯作者：汪姗姗,Tel：021－38804518 转 7213,E-mail：wss7213@163.com

万方数据

制药一厂生产,取 1g 加入蒸馏水微热搅拌制成 20ml 混悬液(50g/L),1 500r/min 离心去除沉淀,再用 0.22μm 微孔滤膜滤过除菌,4℃保存备用。重组碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast grouth factor, bFGF)由珠海东大生物制药有限公司生产(商品名"贝复济")。载体用直径为 6mm 的圆形微孔滤膜(孔径 0.45μm),121℃、20min 高压灭菌备用。

2 CAM 的制备及分析 参考付生法[3]、姜志钢[4]等方法加以改进。白皮种蛋购自上海沪广家禽育种有限公司,孵蛋第 7 天加样,分别以生理盐水、bFGF 为阴性和阳性对照,每组 12 胚,麝香保心丸药液经上述处理后加样量均为每蛋 10μl,3 天后制作 CAM 标本,照相记录结果。以实验部位边缘 1mm 范围内为一级血管,实验部位边缘 5mm 处为二级血管,分别观察计数,比较各组之间的差异。

3 细胞培养 参考徐新来等[5]的方法用大白鼠尾腱制作胶原培养基。微血管内皮细胞取材于新鲜牛肾上腺,其原代培养与纯化参考文献[5]的方法。用含 10ng/ml 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、1μg/ml 氢化可的松、5% 胎牛血清(FBS)、50μg/ml庆大霉素及 50ng/ml 两性霉素的 F12 培养液,每两天换液 1 次,Ⅷ因子相关抗原间接免疫荧光染色鉴定。初代内皮细胞生长汇合后用 0.5% 胰蛋白酶消化传代,取第 4~6 代细胞进行实验。

麝香保心丸药液在 50℃减压蒸干,重新定溶在细胞培养液中,在加入细胞培养液前亦用 0.22μm 微孔滤膜滤过。

4 内皮细胞增殖的检测 内皮细胞以 3×10^4 个/孔接种于 24 孔培养板,第 1 天用含 5%FBS 的 F12 培养液,24h 后换成分别加有麝香保心丸药液或 bFGF、生理盐水的含 0.25% 牛血清白蛋白(BSA)的 F12 培养液继续培养 3 天,然后用胰蛋白酶消化下来在血球计数板上计数,比较分析麝香保心丸与 bFGF、生理盐水对内皮细胞增殖的作用。麝香保心丸分大(40μl/孔)、小(20μl/孔)两个剂量组,bFGF 亦分大(250μl/孔)、小(125μl/孔)两个剂量组,生理盐水对照设一个剂量组(40μl/孔),每组 8 个样本,每孔为 1 个样本。

5 管腔结构形成的检测 参考 Kanda 等[6]方法。内皮细胞以 4×10^5 个/孔接种于 24 孔培养板,用含 0.25%BSA 的 F12 培养液培养 60min 后,分别加入麝香保心丸药液或 bFGF、生理盐水(分组同内皮细胞增殖的检测)接着培养 3h,此时,吸除培养液,在细胞上加入第二层胶原,待形成凝胶后再加入含 0.25%BSA 及麝香保心丸药液或 bFGF、生理盐水的 F12 培养液培养过夜,次日,倒置显微镜下随机选取 10 个高倍视野(×100)计数血管芽数,显微摄影记录结果。

6 VEGF、bFGF 测定 采用酶联免疫吸附反应(ELISA)法,培养至第 4 代的人脐静脉内皮细胞(细胞株购自中国科学院细胞所细胞库)以 4×10^5 个/孔接种于 24 孔培养板,第 1 天用含 5% FBS 的 F12 培养液,次日换成分别加有麝香保心丸药液或 bFGF、生理盐水(分组同 4)的含 0.25% 牛血清白蛋白(BSA)的 F12 培养液接着培养 24h,留取上清液,ELISA 法(试剂盒购自沃森生物制品公司)测定 VEGF 和 bFGF 含量(其中 bFGF 不测阳性对照组)。

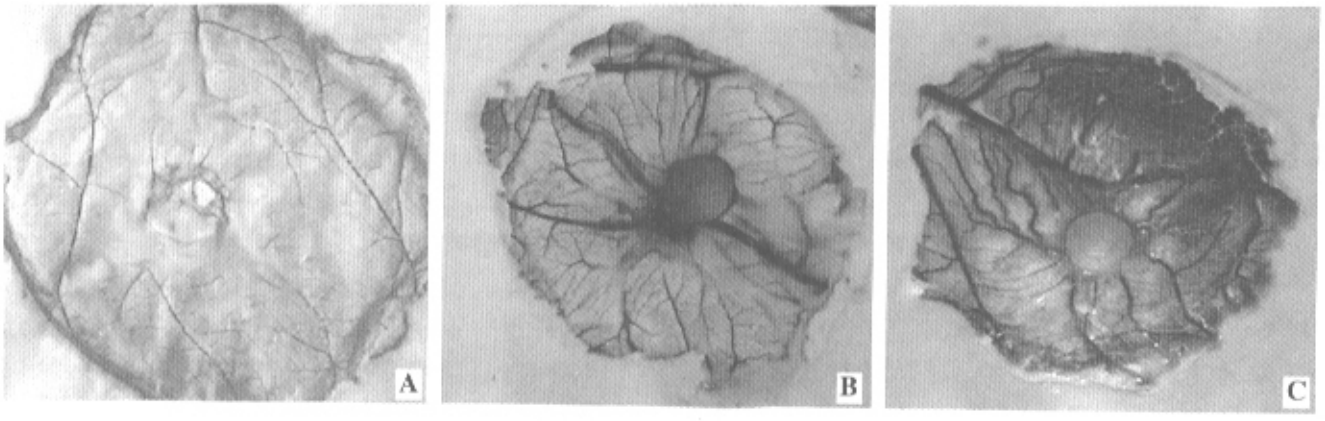
7 VEGF 和 bFGF 的 mRNA 表达量 采用 RT-PCR 法检测,按前法分组培养脐静脉内皮细胞,积累细胞量至 10^7,总 RNA 抽提采用异硫氰酸胍法,用紫外分光光度计测定 OD_{260}/CD_{280}光密度值定量并用电泳法鉴定其分子完整性;根据人 VEGF 基因保守序列并应用 Oligo 软件辅助设计引物,上下游引物分别为:5′-CAT CCT GTG TGC CCC TGA TGC-3′和 5′-ACT CAA GCT GCC TCG CCT TGC-3′,预计产物长度为 312bp;bFGF 测定上下游引物分别为:5′-GGC TGT ACT GCA AAA ACG-3′和 5′-GTG CCA CAT ACC AAC TGG-3′,预计产物长度为 288bp;β-actin 对照引物为:5′-GGC GGC AAC ACC ATG TAC CCT-3′和 5′-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3′,预计产物长度为 202bp,引物由上海申友生物工程公司合成;RT 反应:在缓冲液中加总 RNA 和 AMV 酶,42℃进行逆转录反应 50min,70℃反应 10min 灭活逆转录酶,完成后迅速进行 PCR 反应;PCR 反应:将 RT 产物加入 PCR 反应体系(PE5700 全自动 PCR 仪器),94℃预变性 5min,然后按 94℃ 30s→55℃ 30s→72℃ 30s 循环 30 次;取 PCR 产物各 10μl 进行电泳,应用凝胶成像系统(Pharmacia Biotech)照相并进行电泳条带光密度分析,某标本靶基因条带光密度参数与内参基因(β-actin)条带的光密度参数之比值作为该标本 mRNA 的表达水平参数。

8 统计学方法 各组间差异比较用单因素方差分析中的多重比较 q 检验。

结 果

1 麝香保心丸在 CAM 上的促血管生成作用 麝香保心丸促进 CAM 的血管生成,见图 1。50g/L 浓度的麝香保心丸 10μl,使 CAM 血管数比生理盐水组明显增加,血管分支增多,但较 bFGF 组要少。计数各

万方数据



注:A:加有生理盐水的 CAM;B:加有麝香保心丸的 CAM;C:加有 bFGF 的 CAM

图 1　麝香保心丸对 CAM 血管生成的影响

处理组的一、二级血管数,进行统计分析,结果见表 1。说明麝香保心丸能促进新生血管形成;但在本实验条件下,效果较 bFGF 有所不及。

表 1　麝香保心丸对 CAM 血管生成的影响　($\bar{x} \pm s$)

组别	胚数	一级血管数	二级血管数
麝香保心丸	12	$34.7 \pm 4.8^{*\triangle}$	$45.2 \pm 4.8^{*\triangle}$
bFGF	12	$67.8 \pm 8.4^{**}$	$76.2 \pm 8.8^{**}$
生理盐水	12	21.0 ± 4.2	32.5 ± 3.9

注:与生理盐水组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与 bFGF 组比较,$^{\triangle}P<0.01$

2　麝香保心丸促进体外微血管内皮细胞增殖　见表 2。麝香保心丸促进培养的牛肾上腺微血管内皮细胞增殖,表现出一定的浓度依赖性趋势,其大剂量组(40μl,即 2g/L)的细胞数多于其小剂量组(20μl,即 1g/L),但在本实验条件下未显示出统计学差异。阳性对照 bFGF 大剂量组(250μl,即 9 000AU/ml)作用明显强于其小剂量组(125μl,即 4 500AU/ml),具有显著性意义。即使是麝香保心丸的大剂量组,其促内皮细胞增殖作用较 bFGF 小剂量组要弱。

3　麝香保心丸促进体外微血管内皮细胞形成管腔结构　麝香保心丸促进培养的牛肾上腺微血管内皮细胞形成管腔结构,也表现出一定的浓度依赖性趋势,但其两剂量组在本实验条件下未显示显著性差异。与生理盐水对照组相比,麝香保心丸处理组与 bFGF 阳性对照组在显微镜下均可见内皮细胞排列成管腔结构明显增多(见图 2),尤其是后者更为显著,bFGF 大剂量组(250μl,即 9 000AU/ml)与小剂量组(125μl,即 4 500AU/ml)之间作用无明显差异。计数各处理组管腔结构数目,进行统计分析,结果见表 2。结果提示麝香保心丸可能通过促进微血管内皮细胞形成管腔结构,从而促进新生血管形成。

4　麝香保心丸促进培养的血管内皮细胞分泌 VEGF 和 bFGF　细胞上清液中 VEGF 和 bFGF 的测定结果:见表 3。麝香保心丸组与 bFGF 组 VEGF 水平均较生理盐水对照组明显增高,两药的大、小剂量组间结果虽都显现量-效差异,但均无统计学意义。即使是麝香保心丸的大剂量组(40μl,即 2g/L),其升高 VEGF 的作用也远不及 bFGF 的小剂量组(125μl,即 4500AU/ml)。上清液中 bFGF 水平麝香保心丸组比生理盐水对照组明显增高,其两个剂量组间虽表现出一定的正向量效比例趋势,但未显示统计学差异。

表 2　麝香保心丸对培养的牛肾上腺微血管内皮细胞增殖及管腔结构形成的影响　($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞数 ($\times 10^4$ 个/孔)	管腔结构数 (个/HP,×100)
麝香保心丸小剂量	8	$11.9 \pm 0.8^{**\triangle}$	$6.2 \pm 0.6^{*\triangle}$
麝香保心丸大剂量	8	$13.1 \pm 0.8^{**\triangle}$	$7.6 \pm 0.8^{**\triangle}$
bFGF 小剂量	8	$32.3 \pm 0.6^{**}$	$25.7 \pm 1.7^{**}$
bFGF 大剂量	8	$36.3 \pm 0.9^{**}$	$24.9 \pm 1.7^{**}$
生理盐水	8	7.6 ± 0.6	3.3 ± 0.4

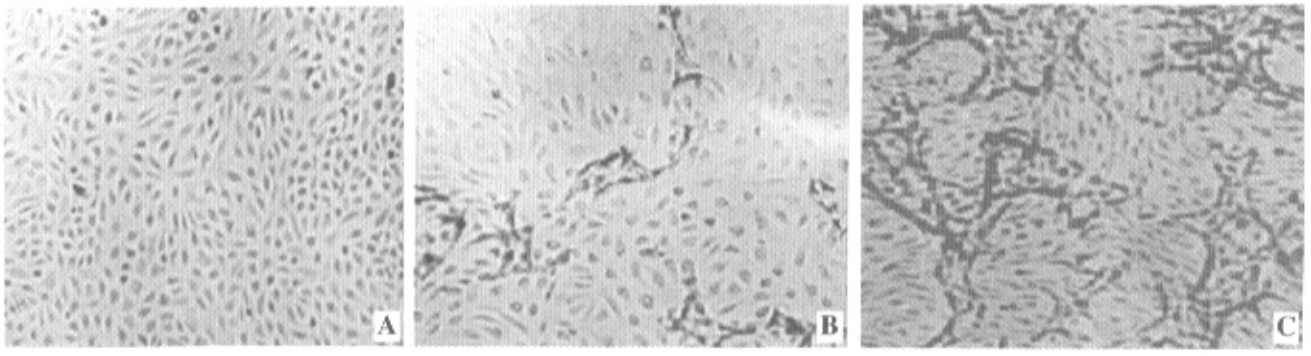
注:与生理盐水组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与两个 bFGF 组比较,$^{\triangle}P<0.01$

5　麝香保心丸增加培养的血管内皮细胞 VEGF 和 bFGF mRNA 的表达　凝胶电泳结果见图 3,各组 mRNA 表达定量分析结果见表 4。加入麝香保心丸或 bFGF 后内皮细胞 VEGF mRNA 表达明显增高,而以

表 3　麝香保心丸对培养的人脐静脉内皮细胞分泌 VEGF 和 bFGF 的影响　($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	VEGF(ng/L)	bFGF(pg/10^5cells)
麝香保心丸小剂量	8	$40.7 \pm 4.4^{*\triangle}$	$9.1 \pm 1.9^{*}$
麝香保心丸大剂量	8	$49.8 \pm 4.3^{*\triangle}$	$7.8 \pm 1.5^{*}$
bFGF 小剂量	8	$110.2 \pm 12.1^{**}$	—
bFGF 大剂量	8	$122.7 \pm 8.9^{**}$	—
生理盐水	8	22.3 ± 5.1	5.2 ± 1.1

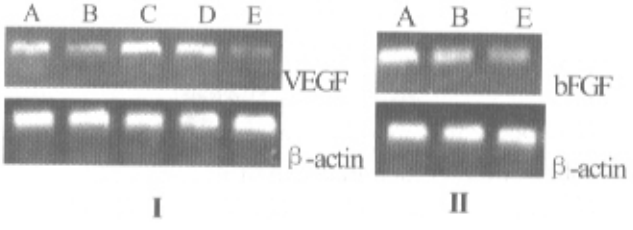
注:与生理盐水组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与两个 bFGF 组比较,$^{\triangle}P<0.01$



注：A：生理盐水对照组细胞；B：麝香保心丸组细胞；C：bFGF 对照组细胞

图 2　麝香保心丸对培养的牛肾上腺微血管内皮细胞管腔结构形成的影响

bFGF 作用更显著，两者均表现出一定的量－效趋势。加入麝香保心丸使内皮细胞 bFGF mRNA 表达也明显增高，大剂量组比小剂量组升高更明显。



注：I：VEGF；II：bFGF；A：麝香保心丸小剂量组；B：麝香保心丸大剂量组；C：bFGF 小剂量组；D：bFGF 大剂量组；E：生理盐水组

图 3　麝香保心丸对培养的人脐静脉内皮细胞 VEGF 和 bFGF mRNA 表达的影响

表 4　麝香保心丸对培养的人脐静脉内皮细胞 VEGF 和 bFGF mRNA 表达的影响　（$\bar{x} \pm s$）

组别	mRNA 表达量（灰度值）			
	β-actin	VEGF	β-actin	bFGF
麝香保心丸小剂量	64973	80067	58411	40628
麝香保心丸大剂量	67576	97910	59233	45696
bFGF 小剂量	52030	96776	—	—
bFGF 大剂量	40273	88118	—	—
生理盐水	63766	57806	58171	30527

讨　论

本研究表明，麝香保心丸这一治疗冠心病最具代表性的中药，具有较明显的促血管生成活性，在体内能促进 CAM 的血管生成，在体外能促进微血管内皮细胞增殖并形成管腔结构，它促血管生成的机理可能与其能使内皮细胞表达 VEGF 和 bFGF mRNA 增高并释放 VEGF 和 bFGF 增多有关。这一结果是对其以往药理研究成果的重要补充，为它用于冠心病的治疗提供了有利依据。从我们的实验结果也可以看出，麝香保心丸在 CAM 模型与培养细胞模型上的作用均弱于 bFGF，这一方面可能与实验中所取药物的浓度有关，同时也提示我们，如果能进一步改良剂型，或找出单味的促血管生成中药并纯化其中所含的有效化合物，可能将大大提高临床治疗效果。然而，本实验与临床尚有相当距离，从鸡胚和细胞得出的这一结论并不能证明麝香保心丸一定能促进机体缺血心脏形成新生血管、建立侧枝循环，因此，我们计划做心肌缺血动物模型实验和临床研究以作进一步探讨。

万方数据

血管生成治疗在冠心病等缺血性疾病患者中具有潜在的广泛的市场[7]，寻求更多促血管生成药物和方法尤其是适合于外周给药的有效药物，无疑具有重要的意义。中医中药治疗冠心病等缺血性疾病有着悠久的历史和明确的疗效，其机理是否和血管生成有关，至今国内外尚缺乏研究报告，应用 CAM 等模型加强这方面的研究，不仅可使我们做到在治疗中有的放矢，且有利于药物资源的充分开发，做到物尽其用。

参　考　文　献

1 张宜春，周力军. 麝香保心丸治疗冠心病心绞痛临床研究. 上海医药 1997；(8)：22.

2 储　敏，宋国秀. 麝香保心丸对狗及大鼠实验性心肌梗塞的保护作用. 中成药 1996；18(5)：30.

3 付生法，陆应麟，张朝山，等. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术. 军事医学科学院院刊 1993；17：294—296.

4 姜志钢，鄂　征. 鸡胚绒毛尿囊膜检测肿瘤促血管生成作用改良技术方法. 解剖学杂志 1989；12(2)：142—143.

5 徐新来，鄂　征. 组织培养和分子生物学技术. 北京：北京出版社，1995：124—156.

6 Kanda S，Shono T，Johansson BT，et al. Role of thrombospondin-1-derived peptide，4NIK，in FGF-2-induced angiogenesis. Exp Cell Res 1999；252：262—272.

7 Mukherjee D，Bhatt DL. Roe MT，et al. Direct myocardial revascularization and angiogenesis—how many patients might be eligble？Am J Cardiol 1999；84(5)：598—600，A8.

（收稿：2002－03－21　修回：2002－11－02）