

参麦注射液对血管生成影响的研究*

尹丽慧 丁志山 高承贤 楼兰花 沃兴德

内容提要 目的:探讨参麦注射液(简称参麦)对血管生成的影响。**方法:**采用 MTT 法检测参麦对牛血清促进的牛内皮细胞、人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的影响;琼脂糖刮除法检测参麦对牛血清促进的牛内皮细胞迁移的影响。利用鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型,观察参麦对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响。**结果:**参麦能明显抑制牛内皮细胞增殖,与 SMMC-7721 比较,差异有显著性;参麦能抑制牛内皮细胞迁移;并可抑制鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成。**结论:**参麦能抑制血管生成;抑制内皮细胞增殖和迁移可能是参麦抗血管生成的机理之一;同时也说明参麦是一种特异性血管生成抑制剂。

关键词 参麦注射液 抗血管生成 内皮细胞 鸡胚绒毛尿囊膜 迁移

Experimental Study on Effect of Angiogenesis with Shenmai Injection YIN Li-hui, DING Zhi-shan, GAO Cheng-xian, et al *Molecular Medical Institute, Zhejiang Traditional Chinese Medical College, Hangzhou (310053)*

Objective: To study the effect of Shenmai injection (SMI) on angiogenesis. **Methods:** Effect of SMI on proliferation of fetal bovine serum (FBS) induced bovine aortic endothelial cell (BAECs) and human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721 was measured by MTT colorimetric assay; effect on migration of FBS induced BAECs was investigated by agarose scraping method and effect on angiogenesis in chick chorioallantoic membrane (CAM) was studied by using CAM model. **Results:** SMI could inhibit the proliferation of BAECs, as compared with the inhibition on SMMC-7721, the difference was significant. SMI could inhibit the migration of BAECs and the angiogenesis in CAM. **Conclusion:** SMI can inhibit angiogenesis, one of the mechanisms might be the inhibition on proliferation and migration of endothelial cells. The fact suggests that SMI is a specific angiogenesis inhibitor.

Key words Shenmai injection, anti-angiogenesis, endothelial cell, migration, chick chorioallantoic membrane

血管生成在胚胎发育、创伤愈合等过程中起重要作用,也与肿瘤、慢性关节炎、糖尿病、动脉粥样硬化等病理过程密切相关⁽¹⁾,1987年,Folkman⁽²⁾将这类毛细血管异常增殖的疾病称为“血管生成性疾病”。近几年来对血管生成的研究已取得较大进展,认为血管生成是一个受多种不同层次调节的过程,已经发现多种血管生成的抑制因子⁽³⁾。血管系统已成为一个新的、有希望的治疗血管生成性疾病的治疗靶点。

益气养阴是冠心病和肿瘤的重要治法。由人参与麦冬两味药组成的参麦散即是代表方药之一,具有防治冠心病与抗肿瘤的作用。本研究旨在探讨参麦注射液(简称参麦)对血管生成的影响,为临床治疗提供实验依据。

材料与方法

1 细胞株 人肝癌细胞株 SMMC-7721,购自中国科学院细胞生物学研究所。

2 试剂 超级新生牛血清,购于杭州四季青生物工程材料研究所,批号 20000914。RPMI 1640 培养液,美国 GIBCO 公司产品,批号 1083954。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT),华美生物工程公司,进口分装,批号 991102。1:250 胰蛋白酶,吉泰科技有限公司,进口分装。琼脂糖,华美生物工程公司,进口分装,批号 9812。

3 药物 参麦注射液(由人参与麦冬组成,2g 生药/10ml),正大青春宝公司生产,批号:0010156。

3 实验方法

3.1 牛内皮细胞(EC)培养 从杭州四季青生物工程材料研究所获得无菌新生小牛主动脉, D-Hanks 液冲洗 3 遍,剪开主动脉,将内皮层朝下置于培养皿中

* 浙江省自然科学基金(No. 399009),浙江省中医管理局科研基金(No. 2000C11)资助项目

浙江中医学院分子医学研究所(杭州 310053)

加适量 0.1% 胰酶, 消化 2min 后, 用刮匙刮下内皮细胞, 离心 5min, 取沉淀, 调整细胞浓度, 加到含青霉素与链霉素的 10% 超级新生牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养基中置 37℃ 培养箱培养。24h 后观察细胞生长情况。每 3 天换 1 次液, 待长满后传代, 第 3~8 代可供实验用。

3.2 参麦对 SMMC-7721 和 EC 增殖的影响 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液培养的 SMMC-7721 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养 24h 后换成无血清培养基继续培养, 24h 后换成 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液, 同时加入不同浓度的参麦, 每剂量组 6 复孔, 继续培养 36h, 加入 MTT 孵育 5h 后, 吸弃上清液, 加入 DMSO 150μl 震荡 10min, 酶标仪 630nm 波长处测其光吸收值(OD 值)。同样测定参麦对牛内皮细胞增殖的影响, 并计算增殖抑制率。

抑制率(%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值)/对照组 OD 值 × 100%。

3.3 参麦对牛 EC 迁移的影响 参照 Trochon 方法^[4], 将琼脂在平皿上制成胶, 并切去其中的 2/3, 将消化好的内皮细胞接种在切去胶的部分, 培养 3 天后待内皮细胞长满单层后, 刮去另一部分胶, 并同时加入含有不同浓度参麦的培养基, 每剂量组 4 个平板, 继续培养 48h 后取出培养物, 甲醛固定, 染色后, 显微摄影记录结果, 计数迁移细胞数, 计算迁移抑制率。抑制率(%) = (对照组细胞数 - 实验组细胞数)/对照组细胞数 × 100%。

3.4 鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型的建立 白色种鸡蛋(受精率 > 90%)于普通培养箱中(37.8 ± 0.5)℃培养, 每天转动鸡蛋 3~4 次。孵育第 5 天, 用牙科钻在蛋壳表面划刻出凹痕, 用三棱针在蛋气室外扎一小孔, 置培养箱中稳定 24h, 用刀片轻揭凹痕处蛋壳, 轻轻撕掉蛋壳下的白色内壳膜, 此时 CAM 连同鸡

胚下陷, 形成假气室, 然后用透明胶带封贴, 形成透明观察窗, 供观察和加药操作。

3.5 参麦对 CAM 血管生成的影响 选择定性滤纸为载体, 用打孔器制成直径 5mm 的小圆片, 双蒸水浸泡 3 次, 晾干备用。制备假气室第 2 天(鸡胚胎发育第 8 天), 将鸡胚随机分成生理盐水对照组、参麦低(5μl)、中(10μl)、高(15μl)剂量组, 共 4 组, 每组 8 个鸡胚, 轻轻撕掉透明胶带纸, 将定性滤纸载体置于正对观察窗的 CAM 表面, 然后将生理盐水及不同浓度参麦滴加于载体上, 用透明胶带纸封贴, 继续孵育。加药第 3 天, 撕开透明胶带纸, 由观察窗加入甲醛:丙酮 = 1:1 的固定液预固定 15min, 取下 CAM, 将其平铺于滤纸上, 干燥后用扫描仪扫描成图像, 计数载体周围 5mm 内大、中、小血管数目, 分析参麦对血管生成的影响。

4 统计学方法 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 应用 *t* 检验。

结 果

1 牛主动脉内皮细胞培养 刮取的牛主动脉内皮细胞光镜下观察, 可见成片的内皮细胞, 呈铺石状。培养 24h 后, 可见呈鹅卵石状的内皮细胞贴壁生长, 呈半汇合状态后传代培养。

2 参麦对 SMMC-7721 及 EC 增殖的影响 见图 1。参麦对肿瘤细胞增殖的抑制作用随参麦的浓度的升高而增强, 但效果不是很明显, 380μl/ml 时的抑制率, 只有 42%。而 40μl/ml 参麦即可明显抑制内皮细胞生长, 且随着参麦浓度的增加, 抑制作用增强。180μl/ml 的参麦对 SMMC-7721 抑制率只有 31%, 而 EC 抑制率可达 82%, 与 SMMC-7721 比较, 差异有显著性(*P* < 0.01)。

3 参麦对牛主动脉 EC 迁移的影响 见图 2, 20 μl/ml 的参麦对 EC 迁移的抑制率为 58%, 60 μl/ml 的参麦抑制率为 85%, 100 μl/ml 的参麦抑制率为 93%。从抑制率可看出参麦对内皮细胞迁移的抑制作用非常明显, 迁移抑制率随着参麦浓度的增加而明显升高。

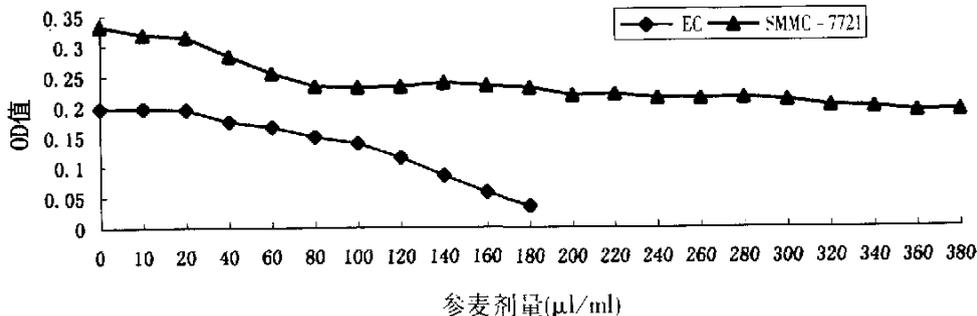


图 1 参麦注射液对 SMMC 7721 及 EC 增殖的影响

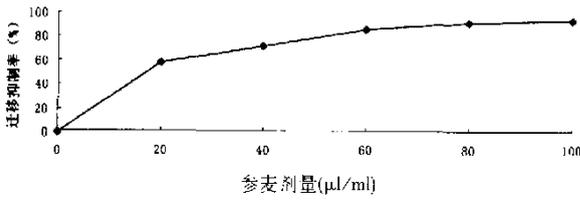


图 2 参麦对内皮细胞迁移的影响

4 参麦对 CAM 血管生成的影响 生理盐水对照组血管生成良好, 血管分支适中, 参麦低剂量组血管生成抑制作用不明显, 参麦中、高剂量组血管生长明显受到抑制, 血管分支显著减少(图略)。计数载体周围 5mm 内大、中、小 3 种血管数目, 结果见表 1。

表 1 各组血管数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鸡胚数	大血管	中血管	细小血管
生理盐水对照	8	2.88 ± 0.83	16.50 ± 2.51	61.75 ± 4.65
参麦低剂量	8	2.63 ± 1.06	17.00 ± 2.62	59.88 ± 4.76
参麦中剂量	8	2.50 ± 0.93	13.88 ± 1.73*	54.38 ± 3.74**
参麦高剂量	8	2.25 ± 1.04	12.50 ± 2.07**	48.13 ± 4.05***

注: 与生理盐水对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

讨 论

近年来, 关于肿瘤及动脉粥样硬化血管生成的研究取得了很大进展, 研究表明原发肿瘤的生长和转移都依赖于来源于既存血管的新生血管生成, 从宿主基质中建立自身的血液供应系统, 且血管生成的增强强度和肿瘤转移能力呈正相关, 而肿瘤细胞可以分泌多种促内皮细胞生长因子促进内皮细胞增殖和迁移从而促进新生血管生成; 1999 年有学者^[3]发现抗血管生成可以消退动脉粥样硬化斑块, 并验证了血管生成可促进斑块的发展, 人们才意识到动脉粥样硬化和肿瘤都是细胞异常增殖引起的, 都伴随着异常的血管增生。因此, 寻找有效的血管生成抑制剂, 通过抗血管生成以达到治愈疾病的目的, 已经成为当前药学研究领域的热点课题。目前已经能够证实的药物有多种, 但多由于毒性较大而不能应用于临床, 寻找新的高效低毒血管生成抑制剂已经引起人们极大的兴趣。

刘鲁明^[6]等实验研究表明参麦对小鼠多种移植性肿瘤具有明显的抑制作用, 且呈良好的量效关系; 荷瘤小鼠化疗后生存期观察表明, 给予参麦后荷瘤小鼠生存期明显延长^[7]。宋建丽^[8]发现参麦具有抗动脉粥样硬化作用, 具有改善心肌的营养性血流作用等。

血管新生是一个复杂过程, 单就内皮细胞主要有游走、增殖和管腔形成等几个步骤。本实验研究发现, 参麦能直接作用于内皮细胞, 显著抑制其增殖与游走。

参麦在药物的浓度达到 40 μl/ml 时, 可明显地抑制内皮细胞生长, 但参麦直接抑制肿瘤细胞增殖的效果不是很明显, 180 μl/ml 的参麦对 SMMC-7721 只有 31%, 而对内皮细胞抑制率可高达 82%。由此可见参麦对内皮细胞具有选择性抑制作用, 是一种特异性内皮细胞生长抑制剂; 同时参麦在较低的剂量下 (20 μl/ml, 迁移抑制率为 58%) 即可显著抑制内皮细胞迁移, 而在相同剂量下对内皮细胞的增殖抑制率只有 8%, 提示参麦抗迁移能力明显大于抗增殖能力。因此作为一种抗血管生成物质, 参麦是一种特异性的抑制剂, 很少有副作用。同时我们观察了参麦对鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成的影响, 低剂量参麦对血管生成无明显影响, 中、大剂量组具有显著抑制血管生长效应。

戴瑞鸿等^[9]提出某些具有行气活血作用的中药可能具有促进血管生成的作用, 从而有利于冠心病患者心脏侧枝循环的形成, 减轻心肌缺血缺氧。我们的研究结果提示参麦可以通过抑制内皮细胞迁移, 抑制内皮细胞增殖, 从而抑制新生血管生成; 而对肿瘤细胞增殖的直接抑制作用效果不明显, 提示参麦可以通过抗血管生成而抑制肿瘤生长和转移; 同时也说明通过抗血管生成阻止动脉粥样硬化发展甚至消退动脉粥样硬化, 从而通畅血管, 改善心肌缺血缺氧, 同样也是某些中药防治冠心病的重要机制。

参 考 文 献

1. Trochon V, Mabilat C, Bertrand P, et al. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 1996;66(5):664—668.
2. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235(4787):442—447.
3. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407(6801):249—257.
4. Kuiper RA, Schellens JH, Blijham GH, et al. Clinical research on antiangiogenic therapy. *Pharmacol Res* 1998;37(1):1—16.
5. 朱建峰, 高 炜, 陈光慧. 内抑素在肿瘤生长和动脉粥样硬化斑块形成中的作用. *生理科学进展* 2000;31(3):243—245.
6. 刘鲁明, 钱 华, 陈 震, 等. 参麦注射液抗肿瘤作用的初步实验研究. *中国实验方剂学杂志* 1996;2(4):11—14.
7. 刘鲁明, 林胜友. 参麦注射液对恶性肿瘤化学药物治疗增效减毒作用的临床和实验研究. *中国肿瘤* 1993;2(9):22.
8. 宋建丽. 参麦注射液治疗冠心病的临床分析. *药学进展* 1999;23(1):44—46.
9. 戴瑞鸿, 李 勇. 冠心病心肌缺血的治疗性血管生成与中药. *中国中西医结合杂志* 2000;20(3):163—164.

(收稿: 2001-11-05 修回: 2002-01-25)