

活血化瘀中药对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响

高冬¹ 宋军² 胡娟¹ 林久茂¹ 郑良朴¹ 蔡晶¹ 杜建¹ 陈可冀²

摘要 目的 观察常用活血化瘀中药赤芍、当归、红花、川芎、丹参、黄芪及复方当归补血汤、血府逐瘀汤、芎芍胶囊等对鸡胚绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)新生血管生成的影响。**方法** 制备CAM模型,分别应用赤芍、当归、红花、川芎、丹参、黄芪及当归补血汤、血府逐瘀汤、芎芍胶囊的含药血清,观察CAM血管生成的情况,同时,设立生理盐水对照组、空白血清对照组、空白对照组及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)阳性对照组。**结果** 所选药物及bFGF皆有促进CAM新生血管生成的作用,其中,丹参及当归补血汤、血府逐瘀汤、芎芍胶囊等复方在血管生成及血管计数方面,均明显优于生理盐水对照组、空白血清对照组及空白对照组,与阳性对照药bFGF的作用相当;中药复方的作用优于丹参之外的其他单味中药。**结论** 活血化瘀中药丹参及当归补血汤、血府逐瘀汤、芎芍胶囊具有较好的促进CAM新生血管生成的作用。本实验从一个侧面阐明了活血化瘀中药及方剂治疗缺血性疾病的作用机理,同时,研究也体现了中药复方应用的科学依据。

关键词 鸡胚绒毛尿囊膜;血管生成;活血化瘀中药

Angiogenesis Promoting Effects of Chinese Herbal Medicine for Activating Blood Circulation to Remove Stasis on Chick Embryo Chorio-allantoic Membrane GAO Dong, SONG Jun, HU Juan, et al *Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350003)*

Abstract Objective To observe the angiogenesis promoting effects of clinical common used Chinese herbal medicines (CHM) for activating blood circulation to remove stasis on chick embryo chorio-allantoic membrane (CAM). **Methods** Chicken CAM model was established and mice blood serum containing different kinds of medicines, including Radix Peoniae rubra, Radix Angelicae sinensis, Flos Carthami, Rhizoma Chuanxiong, Radix Salviae miltiorrhizae, Astragalus membranaceus, and their complex prescriptions, Danggui Buxue Decoction, Xuefu Zhuyu Decoction, Xiongshao Capsule, was applied on it respectively to observe the condition of angiogenesis 72 hrs after incubation. Besides, the normal saline group, blank serum group, blank group and basic fibroblast growth factor (bFGF) group were set up for control. **Results** All the CHM applied and bFGF had the CAM angiogenetic promoting effect, among them, Radix Salviae Miltiorrhizae and the three complex prescriptions showed better effects than the three negative control groups in capillary formation and count, with the efficacy similar to that of bFGF. The effect of complex prescriptions was superior to that of single herb except Radix Salviae miltiorrhizae. **Conclusion** Radix Salviae miltiorrhizae, Danggui Buxue Decoction, Xuefu Zhuyu Decoction and Xiongshao Capsule have good angiogenesis promoting effect on CAM. This study elucidated, from a certain aspect, the mechanism of action of CHM on ischemic diseases, and unfolded the scientific evidence of applying complex prescription.

Key words chorio-allantoic membrane; angiogenesis; Chinese herbal medicine for activating blood circulation to remove stasis

临床研究^[1-4]显示,活血化瘀中药及其复方在治疗缺血性心脏病、缺血性脑血管病等缺血性疾病上有

着较好的临床疗效。探讨、研究活血化瘀中药及其复方的作用途径,进一步揭示活血化瘀中药的作用机理对于提高活血化瘀药物的临床治疗效果具有积极的意义。血管生成(angiogenesis)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。我们采用了鸡胚绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane,

基金项目:美国国立卫生研究院研究基金资助(No. R21AT001979)
 作者单位:1. 福建中医学院(福州 350003);2 中国中医研究院西苑医院
 通讯作者:宋 军, Tel: 010 - 62875599 转 6107, E-mail: jun-song86@sohu.com

CAM)模型,观察活血化瘀中药及其复方对血管生成的影响,从一个侧面阐明活血化瘀中药的作用机理。

材料和方法

1 动物 昆明种小鼠,由福建中医学院实验动物中心提供,体重 18~22 g,随机分为赤芍、当归、红花、川芎、丹参、黄芪、当归补血汤、血府逐瘀汤、芍药胶囊、生理盐水、空白血清等 11 组,每组 9 只。

2 海南褐鸡受精种蛋 购自福州鱗溪种禽养殖场,每枚重 50~65 g,种蛋孵化 1 周用于实验。

3 药物 赤芍、川芎、丹参、当归、红花、黄芪、生地、桃仁、枳壳、柴胡、甘草、桔梗、牛膝,均系干品,由福建中医学院药系中药鉴定室鉴定;芍药胶囊(由川芎总酚和赤芍总苷按 0.11:0.14 组成),批号 02-250,由北京国际生物制品研究所提供;当归补血汤由黄芪 30 g 当归 6 g 组成;血府逐瘀汤由当归 9 g 生地 9 g 桃仁 12 g 红花 9 g 枳壳 6 g 赤芍 6 g 柴胡 3 g 甘草 6 g 桔梗 4.5 g 川芎 4.5 g 牛膝 9 g 组成)。除芍药胶囊外的上述单味药及复方分别水煎两次,煎液过滤,混合后加热浓缩至 1 g/ml 的浓度,4℃ 保存备用。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)冻干粉由北京大学心血管研究所唐朝枢教授提供,每支 20 mg, -20℃ 保存。

4 试剂及仪器 混合纤维素酯微孔滤膜(0.45 μm),由上海兴亚净化材料厂生产;定性滤纸,杭州富阳特种纸厂产品。YZ-875SA 型超净工作台为苏州净化设备厂生产。CO-25 型恒温培养箱为美国产。数码相机为 Nikon Coolpix E5000 数码相机日本产。

5 实验方法

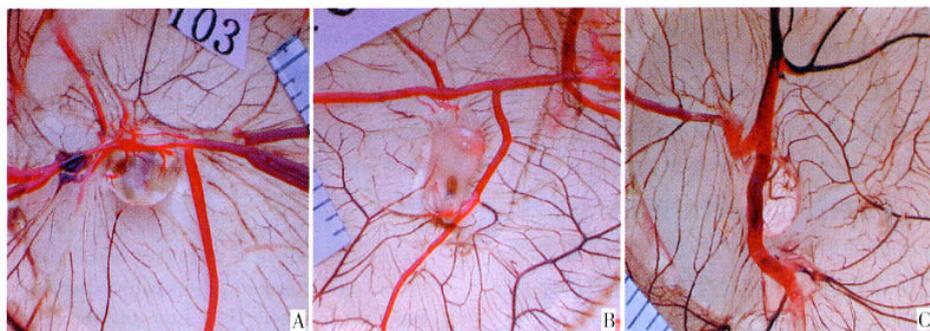
5.1 含药血清制备 参考文献^[5,6]方法制备。赤芍、当归、红花、川芎、丹参、黄芪、当归补血汤、血府逐瘀汤、芍药胶囊组小鼠分别按 1.0、0.5、0.83、0.75、

2.5、2.5、3.0、6.5 和 0.125 g/kg 体重(相当于成人临床用药剂量的 5 倍)给予药物,用蒸馏水将上述药液及芍药胶囊内的药物溶解、稀释至 0.2 ml 后给小鼠灌胃,每天 1 次;另外 1 组每日给予生理盐水 0.2 ml 灌胃;还有 1 组仅正常饲养,不予任何药物和生理盐水灌胃作为对照。5 天后,于最后 1 次灌服药物后 1 h(灌药前禁食不禁水 12 h),摘眼球取血,离心处理后,取血清 0.5 ml 左右,置于无菌试管中,56℃ 灭活 30 min,密封, -20℃ 冰箱中冻存。

5.2 鸡胚孵育 种蛋以 1‰ 新洁尔灭水溶液浸洗揩干,气室朝上,置于(37.0±0.5)℃ 恒温箱中孵化培养,内置湿盘保持相对湿度在 65%,每天翻蛋 2 次,3 天后于透射灯下观察种蛋生长情况,剔除未受精卵。

5.3 药物对 CAM 的作用 参照文献^[7]的方法制备 CAM 模型。取 7 日龄鸡胚,随机分为赤芍、当归、红花、川芎、丹参、黄芪、当归补血汤、血府逐瘀汤、芍药胶囊、bFGF、生理盐水、空白血清及空白对照 13 组,每组 9 枚,碘伏消毒蛋气室表面,用砂轮和解剖针启开约 1 cm×1 cm 的窗口,暴露 CAM,无菌胶带封口,继续孵化。隔日,取直径约 0.5 cm 的混合纤维素微孔滤膜片(预先高压灭菌)作为载体置于 CAM 上,分别滴加不同药物的含药血清 20 μl 于载体上,3 个对照组分别为加 20 μl 的未喂药(等量生理盐水灌胃)小鼠血清、20 μl 生理盐水(NS)及空白对照的鸡胚,密封后继续孵育 72 h,以甲醇和丙酮混合液(1:1)室温固定 15 min,以载体为中心剪下 CAM 约 3 cm×3 cm,展铺于滤纸上,晾干。以滤纸为背景,由专人观察肉眼可及的载体周围的血管数并进行比较,在自然光线下,将 Nikon 尼康 Coolpix E5000 数码相机固定在三角架上,禁用闪光灯,采用近距离模式拍照,放大 2.3 倍。

5.4 统计学方法 用 SPSS 11.0 软件包进行方差分析。



注:A:空白血清对照组;B:丹参组;C:bFGF 组

图 1 丹参、bFGF 及空白血清组 CAM 血管形态比较

结 果

1 丹参、bFGF 及空白血清组 CAM 血管形态比较 CAM 自然状态(空白血清组)的血管生成呈叶脉状(见图 1A),丹参组及 bFGF 组在载体周围可见到不同程度放射状密集生长的血管网(见图 1B、1C),而空白血清对照组无特异性密集血管生成。

2 各组 CAM 血管生成数比较 见表 1。各给药组在血管生成表现形式及血管计数方面均优于对照组,其中,丹参及当归补血汤、血府逐瘀汤、芎芎胶囊等复方与空白血清对照组、生理盐水对照组及空白对照组比较,差异有显著性($P < 0.05$),但与阳性对照药 bFGF 作用比较差异无显著性(P 均 > 0.05)。表明活血化瘀中药对 CAM 新生血管生成均有不同程度的促进作用,另外,当归补血汤促血管生成作用也优于单味黄芪、当归(P 均 < 0.05)。芎芎胶囊的作用也优于单味赤芍或单味川芎(P 均 < 0.05);血府逐瘀汤也优于单味川芎、赤芍、当归、红花(P 均 < 0.05)。

表 1 各组 CAM 血管生成数比较 (支, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	血管数
赤芍	9	142.00 ± 13.11
当归	9	152.67 ± 11.37
红花	9	148.67 ± 6.66
川芎	9	146.00 ± 10.09
丹参	9	180.00 ± 9.17*
黄芪	9	141.00 ± 5.57
当归补血汤	9	176.67 ± 10.69* [△]
血府逐瘀汤	9	195.33 ± 8.74* [△]
芎芎胶囊	9	178.00 ± 6.25* [△]
bFGF	9	197.00 ± 7.21*
生理盐水	9	118.67 ± 7.37
空白对照	9	121.67 ± 2.52
空白血清	9	132.20 ± 11.50

注:与空白血清、空白对照及生理盐水组比较,* $P < 0.05$;与组方中单味药组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

活血化瘀中药在治疗缺血性疾病上有着较好的临床疗效,以往的研究已经发现,活血化瘀中药的作用是多途径的^[8],尽管如此,许多治疗作用机理目前仍然无法得到很好的阐明。血液供应正常是一切缺血性疾病得以康复的保障,而血供正常又是以血管通畅为基础,由此也使得血管生成的研究在国内外成为医学研究领域的重点。我们在以往临床研究证实方药有效的基础上,选取了一些临床常用的单味中药和复方作用于 CAM,观察中药对血管生成的影响,取得了满意的结果。部分单味中药和选取的中药复方血府逐瘀汤、当

归补血汤、芎芎胶囊均有较好的促进血管新生的作用,同时,在实验中还发现,在促进 CAM 血管生成方面,我们选取的中药复方均优于单味中药的作用,该现象也为中药临床配伍使用提供了科学的依据,说明中药合理、适当的伍用可以起到增效的作用。其中芎芎胶囊属于两药作用近似,经过配伍出现叠加效应,与中药理论中的“相须”相合;当归补血汤则属于两药的作用不同而相辅相成,体现了中药七情理论中的“相使”原则;而血府逐瘀汤的药味较多,药物间的关系相对复杂,我们就不在此讨论。本研究中当归补血汤的良好作用,又为中医气血理论中的“气血相关”和“补气活血”提供了新的佐证。

参 考 文 献

- 1 陈可冀,史大卓,刘建勋,等. 血府逐瘀浓缩丸防治经皮血管腔内成形术后再狭窄的研究. 医学研究通讯 1998; 27(11):19—20.
Chen KJ, Shi DZ, Liu JX, et al. Study of concentrated Xuefu Zhuyu Pill on preventing and treating restenosis after PTCA. Med Res Report 1998; 27(11):19—20.
- 2 陈可冀,钱振淮,周绍华. 活血 II 号注射液治疗急性闭塞性血管病 147 例临床疗效观察. 中西医结合杂志 1985;5(2):100—101.
Chen KJ, Qian ZH, Zhou SH. Clinical observation on 147 cases of acute occlusive vascular diseases treated with Huoxue No. 2 injection. Chin J Integr Tradit West Med 1985;5(2):100—101.
- 3 徐浩,史大卓,陈可冀,等. 芎芎胶囊预防冠状动脉介入治疗后再狭窄的临床研究. 中国中西医结合杂志 2000;20(7):494—497.
Xu H, Shi DZ, Chen KJ, et al. Clinical study on Xiongshao Capsule on preventing restenosis after PTCA or/and stenting. Chin J Integr Tradit West Med 2000;20(7):494—497.
- 4 于蓓,陈可冀,毛节明,等. 血府逐瘀浓缩丸防治 43 例冠心病冠脉内支架植入术后再狭窄的临床研究. 中国中西医结合杂志 1998;18(10):585—589.
Yu P, Chen KJ, Mao JM, et al. Clinical study of concentrated Xuefu Zhuyu Pill on restenosis of 43 cases coronary heart disease after intracoronary stenting. Chin J Integr Tradit West Med 1998;18(10):585—589.
- 5 Amagaya S, Harada K, Miyake A, et al. A new pharmacological testing method—different effects of levamisole and the serum of mice orally treated with levamisole on mitogenic activity of lipopolysaccharide. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1989;37(4):1117—1119.
- 6 Iwama H, Amagaya S, Ogihara Y. Effect of shoshaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method. J Ethnopharmacol 1987;21(1):45—53.
- 7 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实验模型的应用. 中国中医基础医学

杂志 1999;5(5):16—18.

Zhang SC, Wu ZK, Wang L, et al. Application of chicken chorioallantoic membrane as a model for study of effects of Chinese medicine on angiogenesis. China J Basic Med Tradit Chin Med 1999;5(5):16—18.

8 陈可冀, 史载祥主编. 实用血瘀证学. 北京:人民卫生出版

社, 1999:120—203.

Chen KJ, Shi ZX, editors. Practical studies and treatment of syndrome of blood stasis. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999: 120—203.

(收稿:2005-02-25 修回:2005-07-25)

滋肾消抗方治疗免疫性不孕的临床观察

黄健 徐两蒲

免疫性不孕系因抗原抗体反应干扰破坏内分泌、排卵、受精、着床等各个环节而引起的不孕,已被证实的常见抗体有抗精子抗体(ASAb)、抗子宫内抗体(EMAb)等,现代医学多采用免疫抑制疗法、隔绝疗法、宫腔内人工授精、体外受精等治疗方法,但疗效欠佳,不良反应较多。我们自拟滋肾消抗方治疗免疫性不孕 85 例,取得较好疗效,现报道如下。

资料与方法

1 病例选择标准 (1)符合原发性不孕或继发性不孕诊断标准(国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准. 上海:上海科学技术出版社,1994:72),同时符合中医辨证分型中肾虚型患者。(2)月经周期正常,基础体温呈双相改变,子宫输卵管造影检查证实双侧输卵管通畅,并排除染色体异常及生殖器畸形。(3)排除合并糖尿病或甲状腺功能异常等其他疾病者。(4)男方抗精子抗体(ASAb)检查阴性,精液常规基本正常。

2 临床资料 病例均来源于 2000 年 7 月—2003 年 4 月本院中医专科门诊,共 168 例,运用顺序分配方法随机分为两组。滋肾消抗方组 85 例,其中原发性不孕 46 例,继发性不孕 39 例;年龄 25~38 岁,平均(28.1±2.5)岁;月经周期(29.8±3.4)天;平均不孕时间(3.6±0.8)年;免疫学检测单一 ASAb 阳性 12 例,单一 EMAb 阳性 16 例,两种抗体阳性 57 例。激素组 83 例,其中原发性不孕 50 例,继发性不孕 33 例;年龄 23~39 岁,平均(27.4±2.4)岁;月经周期(29.0±3.4)天;平均不孕时间(3.8±0.9)年;免疫学检测单一 ASAb 阳性 11 例,单一 EMAb 阳性 18 例,两种抗体阳性 54 例。两组一般资料比较,差异无显著性($P>0.05$),具有可比性。

3 治疗及观察方法 两组均采用维生素 C 300 mg/d、维生素 E 100 mg/d,每天 1 次口服;ASAb 阳性者治疗期间采用避孕套避孕。激素组于月经第 5 天开始采用地塞米松 0.75 mg,每天 1 次,饭后服用,6 周为 1 个周期,3 个周期为 1 个疗程;若 1 个疗程后 ASAb、EMAb 仍未转阴可继续治疗至 2 种抗体均转阴为止,但连续治疗期间应注意地塞米松的减量或停用。滋肾消抗方组加用滋肾消抗方(生地 15 g 山萸肉 10 g 桑寄生 15 g 桑椹 15 g 枸杞 15 g 何首乌 10 g 茯苓 15 g 薏苡仁 30 g 黄柏 6 g 赤芍 15 g),每天 1 剂,水煎 2 次,分早、晚两次温服,服用疗程同对照组。每周结束均复查 ASAb、

EMAb。

4 检测方法 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测,ASAb、EMAb 试剂盒由南京军区南京总医院临床免疫科提供,操作过程及结果判断严格按说明书进行。

5 统计学方法 采用 χ^2 检验,数据均采用 SPSS 11.5 统计学软件处理。

结果

1 两组 ASAb、EMAb 转阴疗效比较 治疗 1 个疗程后滋肾消抗方组单一 ASAb 阳性 12 例转阴 11 例;单一 EMAb 阳性 16 例转阴 13 例;两种抗体阳性 57 例仅 ASAb 转阴 14 例,仅 EMAb 转阴 2 例,两种抗体均转阴 37 例,两种抗体均未转阴 4 例。激素组治疗 1 个疗程后单一 ASAb 阳性 11 例转阴 11 例;单一 EMAb 阳性 18 例转阴 15 例;两种抗体阳性 54 例仅 ASAb 转阴 5 例,仅 EMAb 转阴 3 例,两种抗体均转阴 35 例,两种抗体均未转阴 11 例。两组总转阴率比较差异无显著性($P>0.05$)。

2 ASAb、EMAb 转阴后临床妊娠疗效比较 滋肾消抗方组抗体转阴后临床妊娠 33 例(ASAb 转阴 11 例,EMAb 转阴 5 例,两种抗体阳性转阴 17 例),占 38.8%;激素组抗体转阴后临床妊娠 20 例(ASAb 转阴 9 例,EMAb 转阴 4 例,两种抗体阳性转阴 7 例),占 24.1%,两组妊娠率比较差异有显著性($P<0.05$)。其疗效均以单一 ASAb 阳性者为优。

讨论

现代医学研究表明,滋肾消抗方中生地、山萸肉、何首乌、桑椹、桑寄生、枸杞子等补肾药能增强巨噬细胞活力,增强人体免疫力,双相调节免疫功能;茯苓、薏苡仁能促进红细胞对细胞免疫的调控作用;黄柏能促进巨噬细胞吞噬抗原;赤芍能抑制血小板凝集,改善血液流变学,具有抗过敏作用。由此可见,这些药物在不同水平上影响机体免疫功能,达到提高细胞免疫、减少和清除免疫复合物的综合效果,故可有效减少免疫性不孕患者体内抗体的产生及免疫反应对妊娠过程各环节的影响,从而达到促进妊娠的目的。本结果表明,治疗 1 个疗程后两组抗体转阴率无明显差异,但临床妊娠率滋肾消抗方组较高,提示中药治疗除抑制免疫反应外,尚能综合调理全身机能状态,间接改善人体免疫功能,以提高妊娠率。在观察过程中发现抗体转阴后仍有半数以上患者并未妊娠,可能与不孕症病因的复杂性相关,有待于今后进一步深入研究。

(收稿:2005-03-09 修回:2005-07-08)

作者单位:福建省妇幼保健院(福州 350001)

通讯作者:黄健, Tel: 0591-87555497, E-mail: lincm@fjtc.

edu.cn