

DOI: 10. 13288/j. 11-2166/r. 2014. 16. 016

# 土鳖虫含药血清对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响

宋 程<sup>1</sup>, 唐 蔚<sup>2</sup>, 潘 博<sup>2\*</sup>, 蒋益兰<sup>2</sup>, 曾普华<sup>2</sup>, 张 迪<sup>1</sup>, 李林洁<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南省长沙市含浦科教园象嘴路, 410208; 2. 湖南省中医药研究院附属医院)

基金项目: 湖南省科技计划项目资助 (2009JT3045); 湖南中医药大学青年教师科研基金课题

**[摘要]** 目的 探讨土鳖虫抗肿瘤的可能作用机制。方法 将 56 枚鸡胚制备成鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 模型, 随机分为空白组和土鳖虫含药血清高、中、低剂量组; 每组 14 枚。空白组不处理, 土鳖虫含药血清高、中、低剂量组分别加入经灌胃含土鳖虫生药 11 g/ (kg · d)、8 g/ (kg · d)、5. 5 g/ (kg · d) 剂量取得的大鼠土鳖虫含药血清, 继续孵育 72 h 后, 观察各药物组鸡胚的存活情况、CAM 模型的形态变化、CAM 模型血管生成数量。结果 加药 72 h 后, 各组鸡胚存活率相当。存活鸡胚可见胚胎活动活跃, CAM 透明, 分布清晰且血管颜色鲜红。死亡鸡胚 CAM 血管颜色变浅, 脉络不清, 胚胎活动消失。土鳖虫含药血清高、中、低剂量组新生血管数量均少于空白组 ( $P < 0. 05$ ); 土鳖虫含药血清高剂量组新生血管数量少于土鳖虫含药血清中、低剂量组 ( $P < 0. 05$ ); 而土鳖虫含药血清中、低剂量组间新生血管数量比较差异无统计学意义 ( $P > 0. 05$ )。结论 土鳖虫抗肿瘤作用可能与其抑制 CAM 血管生成有关, 且大剂量效果更佳。

**[关键词]** 土鳖虫; 鸡胚绒毛尿囊膜; 血管生成

近年来土鳖虫在抗肿瘤方面的研究取得了良好进展, 临床上含土鳖虫的复方在治疗肿瘤方面也取得了很好的疗效<sup>[1]</sup>。恶性肿瘤生长和转移中的重要生理过程之一是新生血管形成, 而新生血管形成的基础则是血管内皮细胞 (VEC) 增殖, 因此, 阻断肿瘤内新生血管的形成则是抑制肿瘤的生长和转移的良好途径<sup>[2]</sup>, 积极寻找具有抗肿瘤新生血管形成作用的中草药成分越来越成为当今研究的热点。我们观察土鳖虫含药血清对鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 血管生成的影响, 以探讨土鳖虫抗肿瘤的可能作用机制, 报道如下。

## 1 材料

### 1.1 药物与实验动物

土鳖虫购自湖南省药材公司, 批号: 091203。清洁级 SD 大鼠 16 只, 购于长沙东创实验动物科技服务部, 体重 (200 ± 20) g, 雌雄各半, 实验动物合格证号: SCXK (湘) 2009 - 0004; SPF 鸡胚 60 枚, 由湖南亚华生物制品有限公司提供。

### 1.2 实验器材

电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂, 型

号: HH-B11. 600-LBS-II); 高速离心机 (德国 Sigma 公司, 型号: 3-30K); 恒温水浴锅 (北京医疗器械厂, 型号: GSY2-II); 数码相机 (日本尼康公司, 型号: D90)。

## 2 方法

### 2.1 药物制备方法

将土鳖虫用 10 倍清水常温浸泡 30 min, 再加热煎煮 1 h 后趁热过滤。滤出的药渣另加 10 倍清水分 2 次煎煮, 每次 30 min, 同前趁热过滤。最后将 3 次煎煮的水溶液均匀混合、过滤、浓缩, 直至浓度 2 g/ml, 4℃ 保存。

### 2.2 含药血清制备方法

16 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白组和土鳖虫高、中、低剂量组, 每组 4 只。空白组每日给予生理盐水 5 ml 灌胃; 土鳖虫高、中、低剂量组分别给予相当于生药 11、8、5. 5 g/ (kg · d) 土鳖虫溶液灌胃, 每日 2 次, 共 7 天。最后 1 次灌胃 1 h 后进行股动脉采血, 2000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液对血清进行无菌分离, 同时与同组动物血清合并, 用 0. 22 μm 微孔滤膜滤过, 制成空白血清与土鳖虫高、中、低剂量含药血清, -20℃ 保存。

\* 通讯作者: 271146249@qq. com ,15364055596

### 2.3 鸡胚孵育方法

60 枚种蛋用温水清洗干净, 置入 1 : 1000 新洁尔灭水溶液中浸泡 3 min, 并在 37.8℃ 电热恒温培养箱中孵育, 培养箱中同时放入装满蒸馏水的烧杯, 保持湿度在 60% 左右。每天早、中、晚各开箱门 1 次通风凉蛋, 并转蛋 2 次。

### 2.4 CAM 模型及载体的制备

取生长状况良好的孵育第 8 天鸡胚, 碘氟棉签清洁消毒两遍。参照文献 [3-4] 改良法, 在无菌操作台上采用照卵灯照射并寻找胚头, 在胚头下方约 0.5~1 cm 处划定约 1.5 cm × 1.5 cm 的开窗位置。在鸡蛋气室端钻 1~2 mm 的小孔, 小心揭去开窗处的蛋壳。用 1 ml 无菌注射器在气室膜上轻轻划破 1 个小孔, 滴加 2 滴无菌温热 PBS, 静置 1 min, 然后用无菌眼科镊轻轻拨起小孔边缘的气室膜, 让液体浸入气室膜与 CAM 之间, 待 CAM 下沉后, 用无菌眼科镊揭去窗口内的卵壳膜及气室膜, 将鸡胚绒毛尿囊膜暴露于空气中。

载体采用打孔器将孔径为 0.45 μm 的混合纤维素微孔滤膜制成直径为 0.5 cm 的小圆片, 用蒸馏水浸泡并灭菌干燥备用, 放置在 CAM 表面的无血管或血管最少处。

### 2.5 加药方法

将开窗成功的 56 枚鸡胚用随机数字表法分为土鳖虫含药血清高、中、低剂量组和空白组, 每组各 14 枚。采用微量加样器分别吸取空白血清和土鳖虫高、中、低剂量血清 30 μl/鸡胚于载体上, 满 24 h 滴加 1 次, 共滴加 3 次。后放入孵化箱中窗口朝上继续孵育, 采用无菌透明胶带封闭。每天开箱检查, 随时除去死亡鸡胚。

### 2.6 观察指标与方法

2.6.1 原位观测 用数码相机摄片记录 CAM 载体周围血管加药后 72 h 生长状况。

2.6.2 CAM 标本制作 揭开胶带, 加入 2.5 ml 多聚甲醛固定液, 浓度为 4%, 常温固定 20 min, 待

血管内血液完全凝固后, 以滤膜载体为中心, 用眼科剪完整裁下 CAM, 置于载玻片舒展开来, 数码相机摄片并计数后, 将标本置于阴干处保存。

2.6.3 CAM 血管计数 新生毛细血管在 10 倍解剖放大镜下计数, 在微孔滤膜载体边缘 5 mm 内, 属趋向性生长的血管 (毛细血管、小动脉、小静脉) 即以载体为中心发出, 与滤膜半径的夹角在 45°者之内均予计数, 排除而穿行、绕行血管。

### 2.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理, 新生血管数目以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用方差分析。

## 3 结果

### 3.1 鸡胚存活情况

加药后, 24 h 观察点见土鳖虫含药血清中剂量组损耗 1 枚; 48 h 观察点见土鳖虫含药血清高剂量组、空白组各损耗 1 个, 土鳖虫含药血清低剂量组损耗 2 枚; 72 h 观察点土鳖虫含药血清高剂量组、中剂量组和空白组各损耗 1 枚。各组鸡胚存活率相当。存活鸡胚可见胚胎活跃, CAM 透明, 分布清晰且血管颜色鲜红。死亡鸡胚 CAM 血管颜色变浅, 脉络不清, 胚胎活动消失。致使鸡胚死亡主要原因是 CAM 出血或污染, 发展为较大瘀斑。

### 3.2 鸡胚 CAM 血管生长状况比较

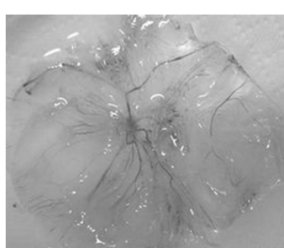
图 1 示, 在解剖显微镜下可见, 与其余各组比较, 空白组血管呈放射性生长, 脉络清晰, 主血管长势旺盛, 管径明显粗大, 且有侧枝循环建立。土鳖虫含药血清高、中、低剂量组血管数量少且细, 甚至有血管断裂。

### 3.3 鸡胚 CAM 新生血管计数

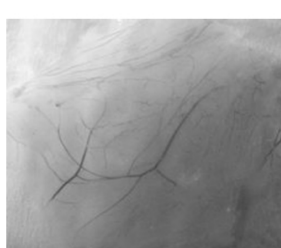
表 1 示, 土鳖虫含药血清高、中、低剂量组与空白组比较新生血管计数明显降低 ( $P < 0.05$ )。土鳖虫含药血清高剂量组新生血管计数明显低于土鳖虫含药血清中、低剂量组 ( $P < 0.05$ ); 但土鳖



空白组



土鳖虫含药血清低剂量组



土鳖虫含药血清中剂量组



土鳖虫含药血清高剂量组

图 1 加药 72 h 后各组鸡胚 CAM 新生血管情况

虫含药血清中、低剂量组组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组鸡胚 CAM 新生血管数量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鸡胚数 (个)	新生血管数 (条)
空白组	12	9.83 ± 1.75
土鳖虫含药血清低剂量组	12	4.33 ± 0.78* <sup>#</sup>
土鳖虫含药血清中剂量组	12	4.58 ± 0.79* <sup>#</sup>
土鳖虫含药血清高剂量组	12	2.00 ± 0.60* <sup>△</sup>

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与土鳖虫含药血清高剂量组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与土鳖虫含药血清中剂量组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

#### 4 讨论

许多研究表明土鳖虫具有抑制肿瘤细胞增长,诱导肿瘤细胞凋亡坏死的作用<sup>[5-6]</sup>。肿瘤新血管生成从中医学角度可视为瘀血中之“离经之血”。因此,从活血化瘀药中寻找抗血管生成的药物可望为肿瘤治疗研究带来新的希望。本研究采用 CAM 模型,探讨土鳖虫含药血清对血管生成的影响。CAM 血液供应充足,具有丰富的毛细血管网,可直接检测到药物在其血管生成的影响效果,是国内外研究血管生长最常用的实验技术<sup>[7]</sup>。与其他动物模型比较,具有以下优点:①异种排斥反应很小,可应用于人或鼠源性肿瘤移植,且可显著观察其血管生成和侵袭情况;②指标易于观测,CAM 技术可进行定性或半定量评价;③取材及接种简便易行,条件要求不高;④价格低廉且经济,可用于大样本研究实验<sup>[8]</sup>。

#### Effect of Tubiechong-Containing Serum on Angiogenesis in Chick Chorioallantoic Membrane

SONG Cheng<sup>1</sup>, TANG Wei<sup>2</sup>, PAN Bo<sup>2</sup>, JIANG Yilan<sup>2</sup>, ZENG Puhua<sup>2</sup>, ZHANG Di<sup>1</sup>, LI Linjie<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Province 410208; 2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine)

**ABSTRACT Objective** To research the possible anti-neoplastic mechanism of Tubiechong (*Eupolyphaga Seu Steleophaga*). **Methods** Totally 56 chick embryos were prepared into the chick chorioallantoic membrane (CAM) models and randomized into the blank group and Tubiechong-containing serum high-dose, middle-dose and low-dose groups. The blank group was given no treatment. The Tubiechong-containing serum high-dose, middle-dose and low-dose groups were given 11 g/kg · d, 8 g/kg · d and 5.5 g/kg · d Tubiechong-containing serum respectively. The incubation was continued for 72 hours. The survival of chick embryos, morphology of CAM models and angiogenesis of CAM models were observed. **Results** The survival rate of chick embryos in each group was same. The embryo was active, CAM was transparent and vascular was clear and red in survival chick. The vascular was lighter and unclear and embryo was inactive in the dead chick. Comparing with the blank group, the angiogenesis in the Tubiechong-containing serum high-dose, middle-dose and low-dose groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Comparing with the Tubiechong-containing serum middle-dose and low-dose groups, the angiogenesis in the Tubiechong-containing serum high-dose group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the Tubiechong-containing serum middle-dose and low-dose groups in the angiogenesis ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The anti-neoplastic effect of Tubiechong may be related to inhibiting the angiogenesis of CAM, with a better effect of large dose.

**Keywords** Tubiechong (*Eupolyphaga Seu Steleophaga*); chick chorioallantoic membrane; angiogenesis

(收稿日期: 2014-04-15; 修回日期: 2014-05-27)

[编辑: 焦 爽]

本研究结果显示,土鳖虫含药血清具有抑制 CAM 血管生成的作用,其抑制效果可能与剂量有关,但对其调节机制还有待进一步的实验研究揭示。

#### 参考文献

- [1] 宋程, 蒋益兰, 唐蔚. 土鳖虫抗肿瘤的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2011, 27(6): 132-133.
- [2] 曾益新. 肿瘤学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 255.
- [3] Ribatti D, Vacca A, Roncali L, et al. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-angiogenesis [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2000, 1(1): 73-82.
- [4] Karmnabatidis D, Dimopoulos JC, Siablis D, et al. Quantification of the ionising radiation effect over angiogenesis in the chick embryo and its chorioallantoic membrane by computerised analysis of angiographic images [J]. Acta Radiol, 2001, 42(3): 333-338.
- [5] 张微, 邹玺, 钱晓萍, 等. 土鳖虫含药血清对肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(4): 257-259.
- [6] 邹玺, 刘宝瑞, 钱晓萍, 等. 土鳖虫提取液对人胃低分化腺癌细胞 BGC-823 的抑制作用 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1695-1696.
- [7] Li WI, Brackett BG, Halper J. Culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* stimulates proliferation of embryonic cells [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2005, 230(7): 494-500.
- [8] 张彦民. 一种新的鸡胚尿囊膜模型的建立与应用 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2011, 32(5): 589-591.