

灵芝孢子油对血管生成作用的研究

王超¹, 俞云², 龙军², 喻斌², 蒋宝平², 许立^{2*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 观察灵芝孢子油(GSO)对血管生成的作用。方法 应用人脐静脉内皮细胞(HUVEC)培养三维血管生成模型和鸡胚尿囊膜(CAM)模型, 观察灵芝孢子油含药血清对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)增殖和迁移的影响; 及对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响。结果 灵芝孢子油含药血清, 使CAM血管生成减少、变细, 其中较大剂量组中、小血管生成数量明显减少。对血管内皮细胞的出芽和管腔形成有抑制作用, 较大剂量组抑制作用明显。结论 灵芝孢子油具有抑制血管内皮细胞的增殖, 抑制新生血管的形成的作用。

关键词: 灵芝孢子油; 鸡胚尿囊膜; 血管内皮细胞; 血管生成

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1673-6427(2016)06-31-03

doi: 10.13728/j.1673-6427.2016.06.010

Research on Effects of Ganoderma Spore Oil on Angiogenesis

WANG Chao¹, YU Yun², LONG Jun², YU Bin², JIANG Bao-ping², XU Li^{2*}

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of Ganoderma spore oil(GSO) on angiogenesis. **Methods** The chicken chorioallantoic membrane (CAM) model was established. Migration of human allantoic veins endothelial cell(HUVEC) was observed by a microcarrier-based three dimension angiogenic model and GSO-contained serum was prepared to evaluate the influence of GSO-contained serum on the proliferation and removal of HUVEC *in vitro* and on the angiogenesis of CAM *in vivo*. **Results** GSO-contained serum could inhibit the angiogenesis in which the high-dosage group exhibited an obvious inhibition effect in the CAM model. On the basis of the three dimension angiogenic model, GSO has inhibition effect on endotheliocyte pullulation and blood vessel cavity formation of cultivated human allantoic veins. The effect of high-dosage GSO was notable. **Conclusion** GSO can inhibited angiogenesis, and inhibiting the proliferation of vessel endothelial cell.

Key words: Ganoderma spore oil; CAM; HUVEC; angiogenesis

上世纪70年代初, Folkman提出, 肿瘤迅速增殖和扩散重要条件之一就是新生血管生成^[1], 为此抗肿瘤血管生成即成为抗肿瘤治疗靶点之一^[2]。肿瘤血管生成(tumor angiogenesis)是一个多步骤复杂过程, 包括血管内皮细胞增殖、迁移及胞外基质降解, 指新生血管系统从已存在的血管床中产生。研究显示, 新的血管生成发生在当肿瘤细胞大于 10^7 个, 或肿瘤组织 $> 2\text{ mm}^3$ 情况时, 肿瘤与循环系统依赖新血管而直接连接起来, 从而使充足的营养能供给肿瘤细胞继

续增殖; 同时, 肿瘤细胞又可通过新生血管不断地向宿主输送、转移, 进一步发展为新生血管在其他部位继续诱导生长, 导致肿瘤转移, 所以原发肿瘤的生长和转移离不开新生血管的生成^[3-4]。

近年相关抗肿瘤中药作用及其机制研究中表明, 多种中药有效成分或是其中药复方制剂存在较强的抑制肿瘤新生血管作用^[5]。近年已有很多研究表明, 灵芝、灵芝孢子、灵芝孢子油具有的明显抗肿瘤作用, 灵芝孢子油(Ganoderma spore oil, GSO)是采用

基金项目: 江苏高校品牌专业建设工程资助项目 (PPZY2015A070)

作者简介: 王超 (1982—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 临床药学。E-mail: wangchao_mail@126.com

通讯作者: 许立 (1964—), 男, 教授, 研究方向: 中药药效与安全性评价。E-mail: xuli64@163.com

超临界二氧化碳流体萃取技术从破壁的灵芝孢子中萃取得到的油状脂质物,含有三萜类、多糖、核苷类、脂肪酸、维生素等多种成分^[6]。本研究观察灵芝孢子油对血管新生的影响,以探讨其可能的抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 灵芝孢子油(GSO)(由南京中科生化技术有限公司提供,批号:120702)甲基纤维素M450(美国Sigma公司产品);血管内皮细胞生长因子(VEGF)(Peprotech公司产品);内皮细胞培养基(EMB)(Clonetics公司产品);成人血清(采购自南京市血液中心);Cytodex3微载体(MC)(美国Sigma公司产品);纤维蛋白原(FIB)(中国药品生物制品检定所产品)。

1.2 动物及细胞株 受精鸡卵,白色Leghorn鸡蛋,45~55 g,购于南京青龙山种鸡场。原代人脐静脉内皮细胞(HUVECS),购于南京凯基生物有限公司提供,批号:20120912。

1.3 主要仪器 超净工作台:苏州净化设备厂生产;AY120型电子天平:Shimadzu公司;DH-2型光学显微镜:Olympus公司。二氧化碳培养箱:SANYO公司;IX50型倒置显微镜:Olympus公司。

2 方法

2.1 含药血清制备 参考文献方法^[7]制备含药血清。以10 ml/kg的剂量灌胃大鼠,每天两次,于第三天第二次灌胃1 h后取血,离心分离血清,56℃灭活30 min。无菌过滤,密封,-20℃冰箱中冻存备用。临用前用空白血清稀释成1:1和1:10的含药血清,分别作为高、低剂量用药。

2.2 对鸡胚尿囊膜(Chicken chorioallantoic membrane, CAM)血管生成的影响 参考文献^[8-9]的方法。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。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。取7日龄鸡胚,随机分GSO大、小剂量组、VEGF、空白血清对照组,每组10枚。于气室和毛细血管稀疏区域右下方1~1.5处,消毒后开窗暴露有丰富血管的透明尿囊膜(CAM)。将无菌甲基纤维素薄片剪成3 mm的小块,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。阳性对照组载体中加入100 ng VEGF;阴性对照组加入空白血清;实验组加不同比例的GSO。用无菌透明胶带封住窗口后,放回孵育箱中继续孵育72 h。72 h后揭开鸡胚小窗上的透明胶带,固定液固定20 min后,

取下尿囊膜,敷贴在滤纸上,于显微镜下计数1 cm范围内的血管数,并根据血管的直径分为大、中、小血管进行血管根数的计数。直径<0.05 mm为小血管;0.05 mm≤直径≤0.2 mm为中血管;直径>0.2 mm为大血管。

2.3 对HUVECS三维培养中血管新生的影响 体外三维血管新生模型的构建:参考文献方法^[10]。预先将HUVECS培养传2~4代,取5×10⁴个/ml密度的细胞液1 ml,加入MC液0.2 ml,置4℃摇摆放置4 h,然后置37℃温箱中摇摆培养,定时观察,至微载体上的内皮细胞包裹MC。取24孔培养板,每孔加入250 μl含不同比例含药血清的1 mg/ml的纤维蛋白原,用1.5 μl凝血酶诱导聚合。数分钟后,再加入含约100个包被有内皮细胞的微载体于纤维蛋白原溶液中,同法诱导聚合。对照组为不含药物的空白血清。第2天,每个培养孔在倒置显微镜下,随机取3个视野拍照。并计数每10个珠子上有几个出现芽生细胞(MC+);第5天计数每个珠子上形成管腔结构的数量(capillary-like formations,内皮细胞芽生延展≥150 μm,且≥3个紧密连接的内皮细胞。cap/MC)。

2.4 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS11.5软件包进行统计,单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 对CAM血管生成的影响

表1 灵芝孢子油对CAM血管生成的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Effect of GSO on the CAM angiogenesis ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	血管数量		
		< 0.05 mm	0.05 ~ 0.2 mm	> 0.2 mm
对照组	—	42.4±3.7	9.0±2.0	3.0±1.1
VEGF	5 mg/L	45.3±3.1	11.0±2.0*	4.8±1.5**
GSO	1:1	37.3±4.0**	7.1±1.7*	1.9±0.7*
GSO	1:10	39.1±3.1*	8.3±1.6	2.2±0.6

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 对照组

结果如表1和图1所示,对照组(空白血清)甲基纤维素片周围新生血管生长良好,分支适中;与对照组相比,GSO组出现血管抑制作用,血管减少、变细,其中大剂量组的大、中、小血管数均出现明显减少现象($P < 0.05$, $P < 0.01$),而小剂量组则仅见有中、小血管数量的明显减少($P < 0.05$);而VEGF组出现血管生长旺盛、血管变粗的现象,尤其是大、中血管数显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

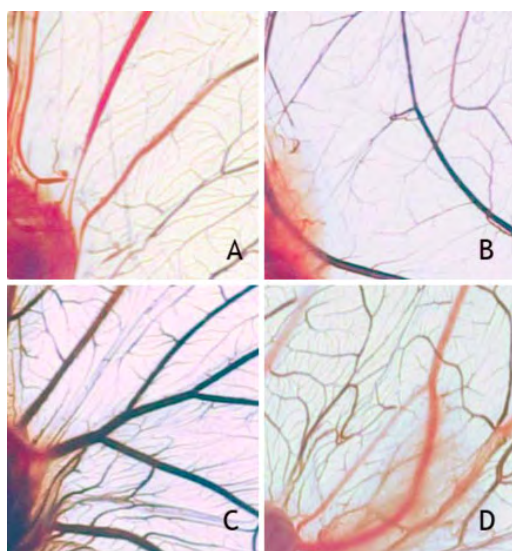


图1 灵芝孢子油对 CAM 血管生成的影响
Fig. 1 Effect of GSO on the CAM angiogenesis
(A. GSO1:10 ; B. GSO1:1 ; C. VEGF 组 ; D. 对照组)

3.2 对 HUVECS 三维培养中血管新生的影响

表2 灵芝孢子油对 HUVEC 微载体培养血管生成的影响 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of GSO on angiogenesis of HUVEC (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	MC+		cap/MC	
		数量	抑制率 (%)	抑制率 (%)	
对照组	—	5.9±1.1	—	4.7±1.8	—
VEGF	5mg/L	7.9±1.9 ^{**}	-33.9	6.1±1.1 ^{**}	-29.8
GSO	1 : 1	4.6±1.3 [*]	15.2	3.3±0.9 ^{**}	37.8
GSO	1 : 10	4.7±1.5	27.7	3.7±1.1 [*]	16.4

^{*}P < 0.05 ^{**}P < 0.01 vs Control group

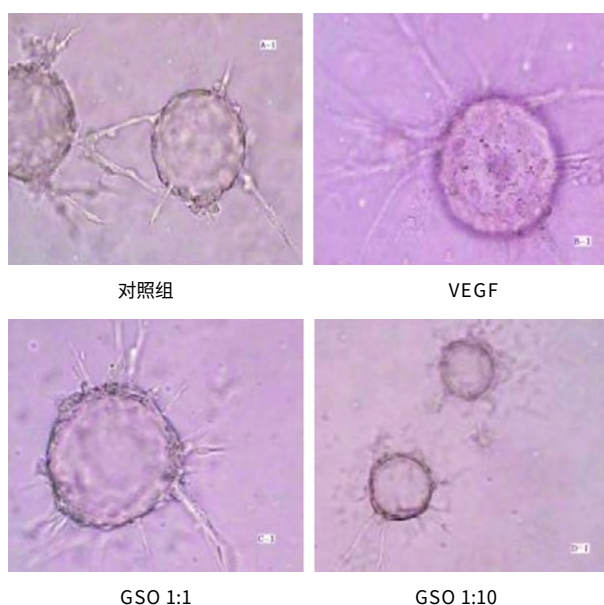


图2 灵芝孢子油对 HUVEC 微载体培养血管生成的影响
Fig. 2 The photographs of angiogenesis of HUVEC cultured in microcarrier

结果如表 2 和图 2 所示,较大浓度的灵芝孢子油含药血清对 HUVEC 在血管形成增殖过程中的出芽和形成管腔结构的数量有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。表明灵芝孢子油对血管内皮细胞增殖具有抑制作用。

4 讨论

本研究为观察灵芝孢子油对血管生成的影响,分别建立了两个模型,鸡胚尿囊膜 (CAM) 模型和体外 HUVEC 三维血管生成模型。CAM 模型是研究血管生长的在体模型,为国内外所常用,可用于研究药物对微血管诱导生长或抑制生长的作用,实验结果可肉眼直接观察或在解剖显微镜下,观察新生血管情况。结果显示 在鸡胚尿囊膜 (CAM) 血管生成的实验中,灵芝孢子油组出现血管抑制作用,血管减少、变细,VEGF 组出现血管生长旺盛、血管变粗的现象 ;对体外 HUVEC 培养三维血管生成模型,灵芝孢子油含药血清对 HUVEC 在血管形成增殖过程中的出芽和形成管腔结构的数量有明显的抑制作用。本研究得出,灵芝孢子油能明显抑制 CAM 血管的生成,血管内皮细胞增殖具有抑制作用。

在鸡胚尿囊膜 (CAM) 模型中,VEGF 组出现血管生长旺盛、血管变粗的现象,而灵芝孢子油组出现血管抑制作用,血管减少、变细。在影响血管新生化发生中,其中最重要的关键因子血管内皮生长因子 (VEGF),对肿瘤增殖、维持血管功能影响最大,VEGF 能诱导内皮细胞增殖、迁徙,甚至改变其基因表达 ;VEGF 还能够增加微血管的通透性,使血浆蛋白渗出血管外,改变局部的细胞外基质以适应血管生成 ;并促进肿瘤细胞的脱落,导致肿瘤的浸润、转移进一步发展^[1],提示灵芝孢子油抗肿瘤作用的可能机制与影响 VEGF 的表达有关,其对血管生成的抑制有待于今后进一步的研究。

参考文献

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis therapeutic implication[J]. N Engl J Med, 1971, 285: 1182.
- [2] 王志东, 杨 军, 李宗芳. 肿瘤抗血管生成靶向治疗 [J]. 中国实用外科杂志, 2010, 30(7): 613- 615.
- [3] Mauriz J L, Linares P, Gonzalez P, *et al*. Antiangiogenic treatment of cancer[J]. Cir ESP, 2005, 78(1): 3-10.
- [4] Zhao Y, Adjei A A. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor [J]. Oncologist, 2015, 20(6): 660-673.
- [5] 张俊利, 李宜放. 中医药抗肿瘤血管生成研究现状 [J]. 医学综述, 2015, 21(8): 1394- 1395.
- [6] 卢锦照, 曾荣华, 王腾华, 等. 灵芝孢子油化学成分研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(4): 553- 556.
- [7] 陈赐慧, 花宝金. 关于中药血清药理学实验的几个问题和探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1): 46-47.

妇炎舒抗炎镇痛作用研究

申旭霁^{1*}, 郑 蕾¹, 徐 浩², 张 寒¹, 张 彦¹, 汪兴军¹

(1. 西安医学院药学院, 陕西 西安 710021 ;

2. 西安医学院基础医学部基础医学研究所, 陕西 西安 710021)

摘要 :目的 研究妇炎舒镇痛及抗炎作用,并观察工艺优化的影响。方法 采用醋酸扭体法和热板法进行镇痛实验,利用连续二倍梯度琼脂平板稀释法,液体转染平板法及大鼠棉球肉芽肿形成模型,观察妇炎舒的抗炎活性。结果 妇炎舒对热刺激引起的小鼠疼痛阈明显延长,并明显减少醋酸引起的小鼠扭体次数;妇炎舒(除小剂量组)对大鼠棉球肉芽肿有明显抑制作用;与妇炎舒(原)比较,大剂量妇炎舒明显减少醋酸引起的小鼠扭体次数,并对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、阴道加特纳菌、淋病奈瑟氏菌的 MIC 和 MBC 值均降低。结论 妇炎舒具有较好的镇痛及抗炎活性,且工艺优化后妇炎舒的镇痛及抗炎作用有明显提高。

关键词 :妇炎舒胶囊;盆腔炎;抗炎作用;镇痛作用

中图分类号 :R285.5

文献标识码 :A

文章编号 :1673-6427(2016)06-34-04

doi: 10.13728/j. 1673-6427. 2016. 06. 011

Experimental Study on Analgesic and Anti-inflammatory Effects of the New Process Fuyanshu

SHEN Xu-ji^{1*}, ZHENG Lei¹, XU Hao², ZHANG Han¹, ZHANG Yan¹, WANG Xing-jun¹

(1. School of Pharmaceutical, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Institution of Basic Medical Science, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Abstract: Objective To study the analgesic and anti-inflammatory effects of Fuyanshu, and observe the effect of process optimization. **Methods** Analgesic effect was observed by acetic acid-induced writhing and hot plate test. MIC was determined by dilution method of double times gradient agar plate. MBC was determined by liquid transfer plate method, and the formation model of rat cotton ball granuloma. By these means, study on analgesic and anti-inflammatory effects of Fuyanshu. **Results** Fuyanshu could significantly prolong the pain threshold of mice by thermal stimulation, and decrease the number of writhing, and Fuyanshu(except for small dose group) could inhibit the formation of granuloma in rats. Compared with the Fuyanshu (pre-process) group, Fuyanshu (1.32 g/kg) could significantly decrease the number of writhing. MIC and MBC of Fuyanshu on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolysis-β*, *Gardnrella vaginallis*, *Neisseria gonorrhoeae* were decreased. **Conclusions** Fuyanshu has good performance on analgesic and anti-inflammatory, and the effect of Fuyanshu was significantly improved by process improvement.

Key words: Fuyanshu Capsule; pelvic inflammation; anti-inflammatory effect; analgesic effect

盆腔炎为女性内生殖器及其周围结缔组织、盆腔腹膜的炎症,常发生在宫颈至腹膜腔段^[1],有急慢之

分,常发生在性活跃期、有月经的女性,主要因感染病原体引起,也可由附近器官炎症扩散引起。急性盆

基金项目 :国家自然科学基金(81500063);西安医学院 2015 年博士科研启动基金项目(2015DOC15)

通讯作者 :申旭霁(1982—),男,博士,讲师,研究方向 :中药有效成分提取分离及活性筛选。E-mail: jhk1007@163.com

[8] 周 秦,何晓东,开翠玲,等. DMPP 对于鸡胚血管形成的抑制作用[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(3): 323-325.

[9] 朱 雷,袁 野,赵凤丽,等. 鸡胚尿囊膜移植瘤模型的优选及 HepG2-CAM 模型生物学特性研究[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2597-2601.

[10] 施 森,何延政,宋 丽,等. 血管内皮生长因子在鼠尾胶原凝胶诱导

三维血管新生中的作用研究[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(16): 2879-2882.

[11] Tomanek R J, Schattman G C. Angiogenesis new insights and therapeutic potential[J]. J Anat Rec, 2000, 261: 126-135.

收稿日期 :2016-04-01