

## • 综 述 •

## 利用药用植物组织培养生产次生代谢产物的研究进展

刘谦, 张永清

(山东中医药大学 济南 250014)

**摘要:**本文论述了药用植物组织培养生产次生代谢物的研究进展,包括影响次生代谢产物的因素、提高产量的途径、生物反应器技术的应用等。

**关键词:**组织培养 次生代谢产物

**中图分类号:**R282.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-7738(2006)06-0350-04

## Research progress of using tissue culture to produce secondary metabolite of medicinal plant

LIU Qian, ZHANG Yong-qing

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014)

**ABSTRACT:** This article elaborated the research progress of using tissue culture to produce medicinal plant secondary metabolite, including the influence factor of secondary metabolite, the way of enhancing the output, the bioreactor technology application and so on. **key words:** Tissue culture; secondary metabolite

**KEY WORDS:** tissue culture; secondary metabolite

人们利用药用植物防治疾病的历史非常悠久,大部分中药就来源于药用植物。随着国际社会“回归自然”潮流的涌起,药用植物的需求量越来越大,但其野生资源却越来越少,供求矛盾日益扩大,许多品种濒临灭绝,如何解决这一问题备受世人关注。药用植物所以能够发挥防治疾病的作用,是因为其体内含有一些药理活性成分,包括酚类化合物、萜类化合物、含氮化合物三大类<sup>[1]</sup>。由于植物体内的任何一个细胞都包含整体植物全部的遗传信息,在一定条件下具有发育成一个完整植株和合成次生代谢产物的能力。利用现代生物组培技术直接获得这些次生代谢产物用于药物生产,不仅具有保护植物资源、生产周期短、不受地区和季节限制、个体差异小、便于工业化生产等优点,而且还有利于筛选高产细胞株和利用生物转化生产更加有效的药物等<sup>[2]</sup>,具有较大的社会效益、经济效益和生态效益。

## 1 影响次生代谢产物生物合成的因素

1.1 外植体选择 能够发生次生代谢的细胞株往往来自适当生理状态下的外植体<sup>[3]</sup>。一般来讲,由次生代谢活动旺盛的植物或器官诱导出的愈伤组织中的次生代谢产物含量也高<sup>[4]</sup>。有人证明,杜仲植株叶片中绿原酸、总黄酮的含量比茎高,以叶片作为外植体诱导出的愈伤组织绿原酸、总黄酮含量也均高于茎来源的愈伤组织<sup>[4]</sup>。也有人发现,组织分化与次生代谢产物生物合成之间并无明显关联,次生代谢产物可能是慢速生长或老龄期细胞处于或接近稳定生长期时产生的多余物质,如从人参植株不同器官上分离外植体形成的愈伤组织中人参皂苷含量便相差不大<sup>[5]</sup>。在采集样品时由于忽视了地域、立地、个体、品系、年龄、部位、时期、贮存时间

等因素对次生代谢产物合成积累的干扰,特别是对个体差异因素的影响认识不足<sup>[6]</sup>,目前对外植体个体水平的选择仍然没有得到满意的答案。

1.2 培养基组成 培养基通常由碳、氮、磷源和无机盐、维生素、氨基酸及生长调节物质等组成,其组分对植物次生代谢产物生产具有重要影响。

1.2.1 碳源:经常使用的碳源为蔗糖。高浓度蔗糖由于提高了培养基的渗透压,所以往往能够提高次生代谢产物含量,但愈伤组织生长与次生代谢产物积累对蔗糖浓度的要求有时是不同的。杜仲组织培养中,在  $10 \sim 40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖浓度范围内,其愈伤组织增长量随蔗糖浓度的升高而升高,在浓度达  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时开始下降,但高渗条件对细胞中绿原酸的生物合成还是有利的,绿原酸含量随着糖浓度的升高而升高<sup>[7]</sup>。

1.2.2 氮源:在天山雪莲组织培养中,氮源对愈伤组织生长和总黄酮生物合成的影响最为明显,提高培养基中  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  浓度,有利于愈伤组织生长和总黄酮的形成<sup>[8]</sup>。

1.2.3 无机盐:按照无机盐含量,培养基一般可以分为高盐量、高硝酸钾、中等无机盐和低盐四种类型<sup>[7]</sup>。无机盐较高的培养基比较适合细胞生长,无机盐较低的培养基比较适合次生代谢产物积累<sup>[9]</sup>。如  $\text{B}_5$  培养基中较高  $\text{KNO}_3$  含量有利于杜仲愈伤组织生长,而  $2/3\text{B}_5$  培养基的  $\text{KNO}_3$  最利于绿原酸和总黄酮的积累。

1.2.4 生长调节物质:生长调节物质的种类与浓度对愈伤组织细胞产量和次生代谢物质含量均有影响。高浓度萘乙酸(NAA)对迷迭香酸甲酯和咖啡酸的生成具有一定的抑制作用,而 6-苄基腺嘌呤(6-BA)对萘乙酸(NAA)具有一定的

拮抗作用<sup>[10]</sup>。高浓度激动素(KT)对丹参酮的形成具有明显的促进作用<sup>[11]</sup>。以3-吲哚乙酸或3-吲哚辛酸替代吲哚乙酸(IAA)应用于人参细胞培养,可提高培养细胞生长速度和皂苷含量。不同生长素组合使用的效果往往比单一使用更好。在长春花组织培养中,萘乙酸(NAA)、吲哚乙酸(IAA)共同使用与单一使用2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)相比,其吲哚总碱含量提高<sup>[11]</sup>。

1.3 pH值 pH值既影响药用植物愈伤组织生长,也影响其代谢水平。pH5.15对南方红豆杉愈伤组织生长最为有利,但紫杉醇含量较低,仅占干重的0.10%~0.12%。随着pH值的提高,愈伤组织的生长越来越差,而紫杉醇的含量却显著提高<sup>[12]</sup>,这说明有利于愈伤组织生长的pH值不适于次生代谢产物的形成,从而减少了次生代谢物的积累。pH值在4.5~7.5范围变动时,对长春花愈伤组织生长及吲哚总碱的积累影响不大,表明长春花愈伤组织对pH值的变化有较强的适应能力<sup>[11]</sup>。

1.4 光照 光强和光质变化对生物碱、黄酮、萜类内酯、挥发性成分、糖苷等次生代谢产物含量均会产生影响<sup>[13]</sup>。红光强烈抑制黄酮的合成,蓝光则相反;在毛地黄叶组织培养中,蓝光、绿光、黄光对细胞生长和强心苷积累均有促进作用,红光则有抑制作用<sup>[14]</sup>。红光较蓝光更有利于长春花悬浮培养细胞中阿玛碱的生成<sup>[15]</sup>。杜仲愈伤组织培养中采用光暗交替处理时,绿原酸和黄酮含量高于全光 and 全暗处理<sup>[7]</sup>。在有光、无光两种情况下,黑暗无光有利于紫杉细胞的生长,但紫杉醇的含量变化则截然相反<sup>[16]</sup>。

1.5 温度 温度可以影响愈伤组织形成过程中的细胞分裂速度,对次生代谢中酶的活性也起着重要调节作用。因此,只有温度调节适宜才能得到较多的次生代谢产物。在天山雪莲愈伤组织培养过程中,采用温度梯度培养方式即愈伤组织培养温度由28℃到26℃再到24℃梯度递减时,培养周期15d,有利于天山雪莲愈伤组织的细胞生长和总黄酮的积累<sup>[17]</sup>。

1.6 诱导剂 诱导剂可以改变次生代谢途径中催化酶的活力或者活化次生代谢途径中特定酶基因,诱导新酶的形成,引起次生代谢途径通量和反应速率的改变,从而提高次生代谢物产量<sup>[18]</sup>。

1.6.1 生物诱导剂:常见的生物诱导剂有真菌类、茉莉酸甲酯、水杨酸、花生四烯酸等,多是植物在防御过程中为对抗微生物感染而产生的物质。实验证明,红豆杉细胞培养时加入0.1 mg·L<sup>-1</sup>水杨酸,紫杉醇含量最高可达6.8 mg·L<sup>-1</sup>,而对照组仅为1.2 mg·L<sup>-1</sup><sup>[19]</sup>。

1.6.2 非生物诱导剂:重金属离子:重金属离子有可能引起或促进与植物防御机制有关的特异性次生代谢产物合成途径<sup>[20]</sup>。在颠茄毛状根的培养中,将培养基中三价铁换成二价铁,可提高生物碱含量<sup>[15]</sup>。在紫杉愈伤组织培养中,添加Ag<sup>+</sup>等重金属离子有助于紫杉醇合成<sup>[21]</sup>。丹参组织培养中,低含量的Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>,较高含量的Fe<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>有利于丹参酮IIA合成,较高含量的Mn<sup>2+</sup>利于原儿茶醛的合成<sup>[22]</sup>。

1.6.3 稀土元素:稀土元素在促进细胞生长及次生代谢产物合成方面效果显著,如用于长春花、银杏细胞培养分别生产

长春碱、和总黄酮等物质<sup>[23~24]</sup>,能明显促进次生代谢产物合成。部分稀土元素还有类似植物激素作用,在培养水母雪莲的培养基中,在不加外源激素6-苄基腺嘌呤(6-BA)时,合适浓度的Ce<sup>3+</sup>可替代6-BA对细胞生长及黄酮合成的促进作用<sup>[25]</sup>。

1.7 前体化合物的加入 在培养基中加入或向培养物中注入已知或假定的前体,可消除关键酶阻碍(即“瓶颈”作用)。或阻断内源性中间体的分隔及有效贮存<sup>[3]</sup>。在东北红豆杉的培养基中添加苯丙氨酸、苯甲酸、苯甲酰甘氨酸、丝氨酸和甘氨酸,能使紫杉醇含量高出1~4倍,这些物质参与了紫杉醇侧链合成<sup>[26]</sup>。在三尖杉悬浮细胞培养过程中,添加前体物质酪氨酸和苯丙氨酸也不同程度地提高了三尖杉酯碱含量<sup>[9]</sup>。

## 2 提高次生代谢产物产量的组培技术

2.1 二步培养技术 次生代谢产物往往在培养后期生成,这可能是因为迅速生长不利于细胞间的彼此接触,从而妨碍了养分和生长调节物质的交换<sup>[3]</sup>。根据生长与代谢的不同需求,对培养基组分和培养条件进行调整,使生长和代谢均能在最适条件下进行,就可以有效地解决细胞生物量增长与次生代谢产物积累之间的矛盾,从而大大提高次生代谢物质产量,这就是二步培养法。丹参悬浮培养采取二步培养法时,在整个培养期间可以连续产生隐丹参酮和铁锈醇<sup>[27]</sup>。用组织培养方法生产绿原酸时,也宜用二步培养法,即先在生长培养基B<sub>5</sub>上增加细胞的生物量,然后在生产培养基1/2MS上生产绿原酸<sup>[7]</sup>。

2.2 固定化细胞培养技术 固定化细胞培养与液体悬浮培养相比,具有培养细胞可以再利用、增加稳定性、细胞生长缓慢促进次生代谢物积累、利于细胞的组织化,以及有利于化学环境的控制和次生代谢产物的回收等优点<sup>[28]</sup>。采用此技术通过小规模细胞培养就可生产出大量胞外次生代谢物质<sup>[29]</sup>。在硬紫草固定化培养过程中,培养30d的紫草色素产量达到4.2 mg·g<sup>-1</sup>鲜重(FW),相对色素分泌量达到70%<sup>[30]</sup>。

2.3 两相培养技术 两相培养是指在植物细胞培养体系中加入水溶性或脂溶性有机化合物,或具有吸附作用的多聚化合物,使培养体系由于分配系数不同而形成上、下两相,细胞在其中一相中生长并合成次生代谢物,这些次生代谢物又通过主动或被动运输释放到胞外,并被另一相吸附。这样由于产物的不断释放与回收,可以降低由于产物积累在胞内形成的反馈抑制,从而有利于提高次生代谢物质产量,并有可能真正实现植物细胞的连续培养,大大降低生产成本<sup>[31]</sup>。

2.4 毛状根培养技术 将发根农杆菌含有的Ri质粒中的T-DNA片段整合到植物细胞DNA上,可诱导出毛状根。毛状根培养具有生长快、培养条件简单、不需要外源激素、次生代谢合成能力较为稳定等优点,几乎所有双子叶植物中由根部合成的次生代谢物质都可以通过毛状根来生产,这为植物有用成分的大量生产提供了新途径,因而受到了广泛的关注<sup>[32]</sup>。转化的毛状根大部分都能检测到与原植株含量相当或高于原植株含量的次生代谢产物,有些毛状根有用成分的含量甚至大大高于原植株<sup>[33]</sup>。目前已经在长春花、紫草、人

参、曼陀罗、颠茄等几十种药用植物中建立了毛状根培养体系<sup>[34]</sup>。黄芪毛状根经 21d 培养,产量可达  $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (干重)<sup>[35]</sup>,并且其作用效价基本上与药材黄芪类似,且粗皂苷含量稍高于药材<sup>[36]</sup>。利用发根农杆菌 A4、15834 等菌株转化短叶红豆杉愈伤组织细胞,可使紫杉醇含量最多提高 50 倍<sup>[16]</sup>。

### 3 生物反应器

植物组织培养不仅可以作为生产有用次生代谢产物的资源,而且还具有转化培养液中外源性底物的能力。因此,可以利用组织培养作为生物反应器,把廉价、活性较低的次生代谢物转化为稀有、具有较高药用价值的物质加以利用<sup>[37]</sup>。生物反应器是组织培养走向产业化、商业化的基础。

利用生物反应器大量培养植物细胞,生产植物次生代谢产物在技术上是可行的,但目前商业上获得成功的只有紫草宁(素)和人参皂苷。主要问题是植物细胞生长慢、产量低,导致成本太高<sup>[38]</sup>。但是,目前长春碱等次生代谢产物的生产研究进展迅速,进入了中试水平,从而增强了人们进行工业化生产次生代谢物的信心。

### 4 展望

近 50 年来,我国药用植物组织培养研究取得了很大的进展,但仍存在许多问题,如有的单子叶植物和裸子植物发根难以诱导,生产中转化系统相对独立,并且没有一种模式系统,高产细胞系稳定性差等。因此,我们离药用植物次生代谢物产业化的目标还有很长的距离。另外,在进行组织培养生产次生代谢产物的同时,还需要开展生长迅速和产量稳定的细胞系的种质保存工作,需要利用药用植物组织培养进行药物代谢研究、遗传机理研究等,只有这样才能使利用植物组织培养生产活性物质更持久、有效地进行下去。相信随着研究的不断深入,利用药用植物组织培养技术生产有效药物一定会有更大的发展。

#### 参考文献

- [1]高丽君,崔建华,刘风云,等.植物次生代谢物的应用和开发.植物学通报,2004,39(7),15~17.
- [2]徐忠东.植物组织培养生产药物研究进展.生物学杂志,2001,18(6),13~14.
- [3]方唯硕.植物组织培养的应用与局限性.国外医药·植物药分册,1995,10(5),213~217.
- [4]李琰,董娟娥,姜在民,等.杜仲愈伤组织中次生代谢产物积累动态研究.西北植物学报,2004,24(11),2033~2037.
- [5]刘贤旺.人参组织培养研究的进展.江西中医学院学报,1993,5(2),51~54.
- [6]董娟娥,梁宗锁.植物次生代谢物积累量影响因素分析.西北植物学报,2004,24(10),1979~1983.
- [7]李琰,王冬梅,姜在民,等.培养基及培养条件对杜仲愈伤组织生长及次生代谢产物含量的影响.西北植物学报,2004,24(10),1912~1916.
- [8]贾景明,吴春福,吴立军,等.天山雪莲愈伤组织培养与次生代谢物形成的研究.中药研究与信息,2005,7(7),11~15.
- [9]白雪芳,杜昱光.抗肿瘤药物——三尖杉酯类碱的开发研究进展.中国生化药物杂志,1998,19(1),50~52.
- [10]王康才,罗庆云,陈红霞.丹参愈伤组织中次生代谢产物形成的研究.中国中药杂志,1998,23(10),592~594.
- [11]张向飞,张荣涛,曹岚,等.不同因子对长春花愈伤组织中药用成分积累的影响.中国药理学杂志,2004,39(11),817~819.
- [12]盛长忠,王淑芳,王勇,等.pH 对红豆杉愈伤组织生长、PAL 活性和紫杉醇含量的影响.中草药,2001,32(10),929~931.
- [13]戴绍军,王洋,阎秀峰,等.滤光膜对喜树幼苗叶片生长和喜树碱含量的影响.生态学报,2004,24(5),869~875.
- [14]Feng M, Mao X W, Chen Q. The influences of different light quality and medium composition on the glucoside content in *Digitalis purpurea* leaves in vitro culture. Journal of Shaoguan University (Natural Science), 1994, 15(4), 70~73.
- [15]郑珍贵,缪红,杨文杰,等.营养和环境因子对长春花激素自养型细胞生长和阿玛碱生成的影响.植物学报,1999,41(2),184~189.
- [16]丁如闲,王昊,许铁峰,等.红豆杉的生物工程研究进展. The Journal of Practice, 2000, 18(5), 274~276.
- [17]郭志刚,冯莹,刘瑞芝.无机元素对紫杉醇和紫杉烷类化合物生物合成的调控作用.天然产物研究与开发,2000,12(5),23.
- [18]施中东,朱作君,元英进.南方红豆杉细胞组织培养合成紫杉醇诱导子浓度的优化.天然产物研究与开发,1999,13(12),36~40.
- [19]李俊,彭正松.刺激剂对植物细胞悬浮培养的影响.广西植物,2005,25(4),341~348.
- [20]仇燕,贾宁,王丽,等.诱导子在红豆杉细胞培养生产紫杉醇中的应用研究进展.植物学通报,2003,20(2),184~189.
- [21]邱德有,韩一凡.红豆杉器官、组织、细胞培养和基因工程的研究进展.天然产物研究与开发,1998,10(1),90.
- [22]郭肖红,高文远,陈海霞,黄璐琦.金属离子对丹参酮 II A 和原儿茶醛生物合成的影响.中国中药杂志,2005,30(12),885~888.
- [23]元英进,胡国武,王传贵,等.铜、钾对红豆杉细胞生长及紫杉醇合成与释放的影响.中国稀土学报,1998,16(1),56~60.
- [24]元英进,胡宗定.稀土元素对长春花植物细胞培养的影响.稀土,1993,14(3),30~33.
- [25]袁晓凡,赵兵,王玉春.稀土元素在药用植物细胞和组织培养中的应用.植物学通报,2005,22(1),115~120.
- [26]陈永勤,朱蔚华.红豆杉属植物的组织、细胞及胚培养.植物生理学通讯,1997,33(3),213~219.
- [27]姜广奋.丹参组织和细胞培养研究概况.中草药,1994,25(3),156~157.
- [28]郭敏亮,隋德新.固定化植物细胞.植物学通报,1994,9(3),58~62.
- [29]陈晓亚,刘培.植物次生代谢的分子生物学及基因工程.生命科学,1996,8(2),8~11.
- [30]吕华,赵群华,曹日强,等.固定化培养和产物释放促进剂对硬紫草细胞代谢的影响.植物生理学报,1995,21(1),111~116.
- [31]陈士云.植物细胞的两相培养技术.植物生理学通讯,1995,31(4),297~303.
- [32]于龙江.紫杉醇及其类似物生产的代谢工程研究进展.高技术通讯,2003,13(1),106~110.
- [33]陈敏,王和勇,廖志华,等.发根农杆菌介导的药用植物遗传转化研究进展.天然产物研究与开发,1998,12(3),98~102.
- [34]刘焱,胡之璧,宋纯清.传统药材生物技术研究是重要现代化的重要内容.国外医药·植物药分册,1998,13(6),245~250.
- [35]郑志仁,彭佑松,刘焱,等.黄芪毛状根的大量培养.植物生理学通讯,1997,33(2),133~134.

- [36]郑志仁,刘泳,宋纯清,等. 黄芩毛状根化学成分和免疫功能活性的研究. 生物工程学报,1998,14(2):153~157.
- [37]果德安. 生物技术在重要现代化研究中的作用. 国外医药·植

物学分册,1998,13(6):257~260.

- [38]张磊,开国银,许铁峰,等. 利用基因工程生产植物次生代谢产物. 国外医药·植物药分册,2002,17(6):231~234.

## 鸡胚绒毛尿囊膜在血管生成活性研究中的应用

贾雷,王彦厚<sup>1</sup>

(淄博科技职业学院 淄博 255015; 1. 淄博市药品检验所 淄博 255040)

**摘要:**本文综述了鸡胚绒毛尿囊膜血管生成模型在药物促血管生成和抑制血管生成研究中的应用,对药物载体的选择及药物置入时间的选择等进行了介绍。

**关键词:**鸡胚绒毛尿囊膜 血管生成 应用

**中图分类号:**R965.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-7738(2006)06-0353-03

### Applications of chicken chorioallantoic membrane model in angiogenesis activity research

JIA Lei, WANG Yan-hou<sup>1</sup>

(Pharmaceutical Department, Zibo Vocational College of Science and Technology, Zibo, 255015;

1. Zibo Institute for Drug Control, Zibo, 255040)

**ABSTRACT:** In this article, we reviewed the applications of chicken chorioallantoic membrane model in anti-angiogenesis and promote angiogenesis research, the selection of drug carrier and drug input time and so forth are also introduced.

**KEY WORDS:** Chicken chorioallantoic membrane; angiogenesis; application

自20世纪70年代Folkman<sup>[1]</sup>首先提出抗血管生成(anti-angiogenesis)理论至今,人们对血管形成的机制等方面的研究已取得较大进展。目前,抑制肿瘤血管形成已被公认为一种崭新的抗癌战略,以肿瘤血管生成成为靶点,开发血管生成抑制剂在抗肿瘤研究中是一个新的十分活跃的研究领域。抗血管形成治疗的研究已推广到新生儿血管瘤、类风湿性关节炎、银屑病、糖尿病性视网膜病变等疾病的治疗;而促进血管生成对心血管疾病、胃肠道消化性溃疡等疾病的治疗也有一定的意义<sup>[2]</sup>。利用鸡胚绒毛尿囊膜(chicken chorioallantoic membrane, CAM)模型进行血管生成的研究,国内主要集中于抑制血管生成方面,而在促进血管生成研究方面还处于起步阶段。

血管生成是指从已经存在的毛细血管或微静脉通过内皮细胞增殖和迁移,以芽生或非芽生的方式生成新的毛细血管的过程。通常情况下,体内大部分血管在发育完全后呈高度的稳定性,除创伤修复、女性血管生成的周期性变化及一些疾病(如肿瘤)之外,血管生成作用缓慢<sup>[3]</sup>。筛选血管生成活性物质可利用内环境与人体相似且血管新生的过程易于观察的动物模型来检测。常用模型有兔或大鼠的角膜囊(眼前房)模型<sup>[4]</sup>、仓鼠颊囊模型<sup>[5]</sup>和鸡胚绒毛尿囊膜模型<sup>[6]</sup>。其中CAM模型简便易行、计数指标客观成熟并具有良好的重复性,可定性定量地检测不同组织或细胞系分泌成分及生物因子等对血管的作用<sup>[7]</sup>,成本较低、实验周期短、易于大样本重复等特点而得到了广泛应用。此法有蛋壳上开窗和将

鸡胚孵育在平皿中观察等方法。

#### 1 在抑制血管生成研究中的应用

1.1 柏长青<sup>[8]</sup>等采用CAM实验方法,观察克拉霉素(clarithromycin)的抗血管生成作用,为肿瘤和其他疾病的抗血管生成治疗提供了实验依据。方法是将受精鸡卵在37℃、55%的相对空气湿度下孵育3d,每天翻动3次,第3天以75%酒精清洗卵壳,超净台中吹干后用无菌眼科镊和小钢锯在鸡蛋的平钝端小心开出一长约2.0cm的矩形小窗,移去蛋壳和其内面的壳膜,小心用无菌石蜡膜覆盖以防干燥,鸡卵窗口朝上在37℃、55%的相对空气湿度和3%CO<sub>2</sub>的条件下继续孵育,但不再翻动。开窗后第3天将药物一甲基纤维素薄片小心放置于矩形窗口的边缘1/3处,远离已形成的致密血管网。克拉霉素浓度分别为10, 30, 60, 90, 120, 150mmol·L<sup>-1</sup>,同时用碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)20ng、PBS和环孢素20μg分别作为阳性、阴性对照。盖上石蜡膜后继续孵育<sup>[9]</sup>。第10天用Leica图像分析系统观察、拍摄实验区域(以药物一甲基纤维素薄片为中心范围约1cm<sup>2</sup>)明确可辨的血管,测定、计算其面积<sup>[10]</sup>。

在Leica解剖显微镜下观察存活鸡胚实验区域(以药物一甲基纤维素薄片为中心范围约1cm<sup>2</sup>),结果显示:b-FGF组的血管面积明显多于其它实验组,克拉霉素和环孢素实验组的血管及其网络较b-FGF和PBS组稀疏。

1.2 金艳<sup>[11]</sup>等采用改进的Folkman平皿法观察硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)对血管生成抑制作用。采用孵育4d