

## 三种斑马鱼血瘀模型在三七抗血栓及抗心肌缺氧能力评价中的应用

李明利<sup>1</sup>, 高波<sup>2</sup>, 郭胜亚<sup>3</sup>, 罗川<sup>2</sup>, 戴明珠<sup>3</sup>, 高文雅<sup>1</sup>, 边宝林<sup>1</sup>, 王宏洁<sup>1</sup>,  
周严严<sup>1</sup>, 张勇<sup>3\*</sup>, 赵海誉<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 安徽华润金蟾药业股份有限公司,  
安徽 淮北 235000; 3. 杭州环特生物科技有限公司, 杭州 310051)

**[摘要]** 目的:采用不同诱导剂建立3种斑马鱼血瘀模型,优选最适宜评价三七活血能力的模型。方法:花生四烯酸(AA),普纳替尼(Ponatinib),异丙肾上腺素(ISO)分别建立斑马鱼血瘀模型,设置正常组、模型组、阳性药组、不同浓度三七水提物冻干粉组,计算心脏红细胞染色强度、心脏凋亡细胞荧光强度,评价三七的抗血栓作用和抗心肌缺氧能力。基于优选的评价三七活血化瘀活性的血瘀模型—AA,ISO诱导的斑马鱼血瘀模型,比对三七水提取物及70%甲醇提取物之间的活性,并采用UHPLC LTQ-Orbitrap MS/MS技术比对其化学成分差异。结果:AA,Ponatinib诱导后斑马鱼心脏红细胞染色强度显著降低( $P<0.01$ ),ISO诱导后心脏凋亡细胞荧光强度显著升高( $P<0.01$ ),三七水提物冻干粉可以拮抗AA模型的血栓形成( $P<0.01$ )和ISO模型的心肌凋亡( $P<0.05$ ),对Ponatinib模型血栓形成无显著改善作用。三七70%甲醇提取物冻干粉可以抑制ISO血瘀模型的心肌凋亡( $P<0.01$ ),作用强于三七水提物冻干粉,其成分差别主要在于人参皂苷Re等部分皂苷类以及氨基酸类、炔醇等成分。结论:AA,Ponatinib,ISO均可建立斑马鱼血瘀模型,其中AA和ISO模型可以用于评价三七水提物冻干粉的活血能力。水提和70%甲醇提取三七冻干粉化学成分差异较大,对ISO血瘀模型,70%甲醇提取三七冻干粉抗心肌缺氧能力更强,皂苷、炔醇类成分可能与其活血化瘀功效密切相关。

**[关键词]** 斑马鱼;三七;血瘀模型;心肌缺氧;血栓

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0098-11

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220301

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211125.1502.004.html>

**[网络出版日期]** 2021-11-26 7:15

### Application of Three Blood Stasis Models in Zebrafish in Evaluation of Anti-thrombosis and Anti-myocardial Hypoxia Activities of Notoginseng Radix et Rhizoma

LI Ming-li<sup>1</sup>, GAO Bo<sup>2</sup>, GUO Sheng-ya<sup>3</sup>, LUO Chuan<sup>2</sup>, DAI Ming-zhu<sup>3</sup>, GAO Wen-ya<sup>1</sup>, BIAN Bao-lin<sup>1</sup>,  
WANG Hong-jie<sup>1</sup>, ZHOU Yan-yan<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>3\*</sup>, ZHAO Hai-yu<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700,  
China; 2. Anhui China Resources Jinchan Pharmaceutical Co. Ltd., Huaibei 235000, China;  
3. Hunter Biotechnology Co. Ltd., Hangzhou 310051, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish blood stasis models in zebrafish using three inducers and select the optimal model for evaluating the activity of Notoginseng Radix et Rhizoma in promoting blood circulation. **Method:** Arachidonic acid (AA), ponatinib, and isoprenaline (ISO) were used to induce blood stasis models

**[收稿日期]** 20210817(003)

**[基金项目]** 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04510);国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09201-005-006-002);杭州市钱江特聘专家项目(2020)

**[第一作者]** 李明利,在读硕士,从事中药饮片质量评价研究,E-mail:limingliggs@163.com

**[通信作者]** \*张勇,硕士,从事斑马鱼生物功效及安全性评价技术研究,Tel:0571-83782130,E-mail:zy@zhunter.com;

\*赵海誉,研究员,从事中药活性成分及生物学表征研究,Tel:010-84041249,E-mail:hyzhao@icmm.ac.cn

in zebrafish. A normal group, a model group, a positive drug group, and Notoginseng Radix et Rhizoma water extract freeze-dried powder groups at different concentrations were set up. The staining intensity of cardiac erythrocytes and the fluorescence intensity of cardiac apoptotic cells were calculated, the anti-thrombotic effect and anti-myocardial hypoxia activity of Notoginseng Radix et Rhizoma were evaluated. The activities of water extract and 70% methanol extract of Notoginseng Radix et Rhizoma were compared based on the preferred AA- and ISO-induced blood stasis models in zebrafish and the difference in the chemical composition was analyzed by UHPLC LTQ-Orbitrap MS/MS. **Result:** After induction by AA and ponatinib, the staining intensity of cardiac erythrocytes was reduced ( $P<0.01$ ), and the fluorescence intensity of cardiac apoptotic cells increased after the induction by ISO ( $P<0.01$ ). The freeze-dried powder of the water extract of Notoginseng Radix et Rhizoma could antagonize the thrombosis in the AA-induced model ( $P<0.01$ ) and the myocardial apoptosis in the ISO-induced model ( $P<0.05$ ), while no significant improvement in the thrombosis was observed in the ponatinib-induced model. The freeze-dried powder of 70% methanol extract of Notoginseng Radix et Rhizoma could inhibit myocardial apoptosis in the ISO-induced blood stasis model ( $P<0.01$ ), and the effect was stronger than that of the freeze-dried powder of Notoginseng Radix et Rhizoma water extract. The difference in chemical composition lay in some saponins (such as ginsenoside Re), amino acids, and acetylenic alcohols. **Conclusion:** AA, ponatinib, and ISO all can serve as inducers for the blood stasis model in zebrafish. AA- and ISO-induced models can be used to evaluate the activity of freeze-dried powder of Notoginseng Radix et Rhizoma water extract in promoting blood circulation. The chemical compositions of the freeze-dried powders of Notoginseng Radix et Rhizoma extracted with water and 70% methanol are quite different. For the ISO-induced blood stasis model, the freeze-dried powder of Notoginseng Radix et Rhizoma extracted with 70% methanol has a stronger ability against myocardial hypoxia. Saponins and acetylenic alcohols may be closely related to the effects of promoting blood circulation and resolving blood stasis.

**[Keywords]** zebrafish; Notoginseng Radix et Rhizoma; blood stasis model; myocardial hypoxia; thrombus

大宗药材三七具有补血、活血、降血压、降血脂、调节免疫功能、抗炎、保肝等诸多功效,应用范围广泛,适用于中枢神经系统、循环系统、泌尿生殖系统、消化系统等多系统疾病的临床治疗<sup>[1]</sup>。作为活血化瘀的代表药物,三七在治疗血栓、抗心肌缺氧等方面的作用尤为突出,临床常用于冠心病、心绞痛等血症病症的治疗。整体、器官、细胞、分子水平的多项研究表明,三七及其主要成分三七总皂苷(PNS)具有改善心肌缺血、抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化、调节血管内皮细胞功能等方面的作用<sup>[2]</sup>,可以通过降低氧化应激、抑制血小板聚集、减少血栓素A<sub>2</sub>等,改善心肌缺氧缺血性损伤,抑制血栓生成<sup>[3]</sup>。此外,以三七总皂苷为主要成分的活血化瘀药—血栓通在心血管疾病方面也取得了良好的临床疗效<sup>[4-5]</sup>。三七化学成分复杂,含有皂苷、黄酮、多糖、挥发油、环肽等多类成分<sup>[6]</sup>。其中皂苷类成分表现出扩张血管、抗凝、降血脂、抗炎、抗氧化等作用<sup>[7]</sup>,是三七中的常量功效成分<sup>[8]</sup>。槲皮素等黄酮类成分也具有活血化瘀功效<sup>[9]</sup>。三七水提、醇提成

分差异明显,醇提取所得的总皂苷类成分含量较高<sup>[10]</sup>,对三七水、醇提取物活血功效开展研究具有一定意义。

当前,三七质量评价多局限于以三七规格大小或皂苷类成分含量为主体的质量控制方法,缺乏生物效应评价支撑研究,质量评价工作亟需建立能够快速筛查、评价三七活性的动物模型。鉴于三七在血症病症方面的显著疗效,评价三七的活血化瘀功效是衡量三七质量、选择优质三七的首要活性指标。三七活性评价目前多以啮齿类动物作为实验模型,实验成本高、周期长,缺乏快速整体评价三七疗效的手段。新型模式生物——斑马鱼既具有体外实验快速、高效、价廉和用药量小的优点,又具有哺乳类动物实验可比性高、观察器官指标明确的优势<sup>[11]</sup>,可以实现对药物的快速评价,已被广泛应用到心血管疾病研究领域。已有研究采用苯肼,花生四烯酸(AA),盐酸肾上腺素,普纳替尼(Ponatinib)等诱导剂构建斑马鱼血栓模型,用于抗血栓药物质筛选和丹红注射液、冠心宁片等多种药物的质量

评价<sup>[12-14]</sup>。

斑马鱼模型多应用于探究三七的急性毒性<sup>[15]</sup>和促血管新生作用<sup>[16]</sup>,在血瘀证方面的开发研究尚不充足,建立能够快速、经济表征三七活血功效的斑马鱼血瘀模型可以填补三七活血化瘀功效评价方面的空缺,从生物学角度关联三七临床功效、评价三七质量。为此,本研究采用不同诱导剂 AA, Ponatinib, 异丙肾上腺素(ISO)建立活体斑马鱼血瘀模型,给予水提三七冻干粉进行干预,分别用于研究三七的抗血栓作用和抗心肌缺氧的能力,选择适宜的评价三七活血能力的模型。同时,对斑马鱼血瘀模型给予不同溶剂提取的三七冻干粉进行干预,并采用UHPLC LTQ-Orbitrap MS/MS技术比较不同溶剂提取的三七冻干粉的化学成分,探究醇提和水提三七的活血作用差异。本研究建立的中药材三七活血化瘀功效快速评价方法,操作便捷、准确、高通量,与临床病理生理机制相似,可以为三七质量评价、药效物质基础研究和作用机制的阐明提供一定参考。

## 1 材料

**1.1 动物** 实验用斑马鱼为健康AB系和Albino系野生型斑马鱼,来源于杭州环特生物科技股份有限公司斑马鱼实验室。在28℃条件下用养鱼用水繁育胚胎,饲养管理符合国际AAALAC认证(001458)的要求。

**1.2 药物及试剂** 三七(批号AG-20-1,三年生,产地为云南文山,购自安徽亳州康美中药城,由中国中医科学院中药研究所赵海誉研究员鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* 的干燥根和根茎);甲醇,乙腈(色谱纯,美国 Thermo Fisher 公司,批号分别为 203398, 210363);AA,阿司匹林, *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸(NAC)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号分别为 H1909147, MKCG5423, H1527072);邻联茴香胺,吖啶橙(AO)染料,甲基纤维素(美国 Sigma 公司,批号分别为 MKCC7501, 494-38-2, 079K0054V);普纳替尼(美国 MedChemExpress 公司,批号 13771);异丙肾上腺素盐酸盐(梯希爱上海化成工业发展有限公司,批号 PTAPE-L)。

**1.3 仪器** LTQ Orbitrap Velos Pro 型质谱仪(高分辨静电场轨道阱质谱,ESI源,美国 Thermo Fisher 公司);98-I-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);ALPHA 1-2 LD plus 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司);RV10 digital V 型数显型旋转蒸发

仪,HB 10 型数字显示水浴箱(德国 IKA 公司);SZX7 型解剖显微镜(日本 Olympus 公司);VertA1 型 CCD 相机(上海土森视觉科技有限公司);CP214 型精密电子天平(美国 Ohaus 公司);6 孔板(中国 Nest Biotech 公司);AZ100 型电动聚焦连续变倍荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

## 2 方法

**2.1 样品制备** 称取三七粉末约 12 g,放置于 500 mL 圆底烧瓶中,电热套加热提取 2 次,每次用 120 mL 蒸馏水提取 2 h,合并提取液,过滤,冻干,得到三七水提物冻干粉(PNW)3.939 g,得率 32.83%。

称取三七粉末约 12 g,放置于 500 mL 圆底烧瓶中,电热套加热提取 2 次,每次用 120 mL 70% 甲醇溶液提取 2 h,合并提取液,过滤,旋蒸至基本无甲醇,冻干,得到三七 70% 甲醇提取物冻干粉(PNM)3.006 g,得率 25.08%。

### 2.2 斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用

**2.2.1 AA 诱发斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用** 受精后 3 d(3 dpf)的黑色素等位基因突变型斑马鱼(Albino)血小板含量丰富,同时心脏部位无黑色素干扰,因此随机选取此类斑马鱼于 6 孔板中,每孔(实验组)均处理 30 尾斑马鱼。分别水溶给予终质量浓度为 62.5, 125, 250, 500 mg·L<sup>-1</sup> 的三七水提物冻干粉(给药浓度依据冻干粉量计算,未折合生药量,下同;给药浓度的确定主要基于模型组斑马鱼对三七水提物冻干粉的耐受性,高浓度三七提取物具有心脏毒性,本研究所有模型建立均首先开展预实验摸索最大给药浓度,在此浓度下,模型组斑马鱼无心跳减慢、静脉瘀血、卵黄囊变性等不良反应),45.00 mg·L<sup>-1</sup> 的阳性药阿司匹林,同时设置正常组和模型组,每孔容量为 3 mL。28℃处理 3 h 后,除正常组外,其余各实验组均水溶给予 80 μmol·L<sup>-1</sup> AA(1% 二甲基亚砷溶解)建立斑马鱼血瘀模型。28℃处理 1.5 h 后,用邻联茴香胺进行染色,染色后每个实验组随机选取 10 尾斑马鱼置于解剖显微镜下拍照并保存图片,用 NIS-ElementsD 3.20 高级图像处理软件进行图像分析并采集数据,分析统计斑马鱼心脏红细胞染色强度(SI),以该指标的统计学分析结果评价样品预防血栓作用<sup>[14,17]</sup>。预防血栓药效=[SI(药物干预组)-SI(模型组)]/[SI(正常组)-SI(模型组)]×100%。

**2.2.2 Ponatinib 诱发斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用** 斑马鱼 5 dpf 发育完全,内皮细胞生长完整,Ponatinib 诱发血栓与其对血管内皮细胞生

长因子受体的抑制作用有关,因此选取5 dpf野生型AB品系斑马鱼开展Ponatinib诱发斑马鱼血瘀模型的建立实验。随机选取此类斑马鱼于6孔板中,每孔(实验组)均处理30尾斑马鱼。分别水溶给予终质量浓度为7.81, 15.63, 31.25, 62.50 mg·L<sup>-1</sup>的三七水提物冻干粉, 45.00 mg·L<sup>-1</sup>的阳性药阿司匹林,同时设置正常组和模型组,每孔容量为3 mL。除正常组外,其余各实验组均水溶给予2 mg·L<sup>-1</sup> Ponatinib建立斑马鱼血瘀模型。28℃处理18 h后,用邻联茴香胺进行染色,染色后每个实验组随机选取10尾斑马鱼置于解剖显微镜下拍照并保存图片,用NIS-ElementsD 3.20高级图像处理软件进行图像分析并采集数据,分析统计斑马鱼心脏红细胞染色强度,以该指标的统计学分析结果评价样品预防血栓作用<sup>[14,17]</sup>。

**2.2.3 ISO诱发斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用** 斑马鱼2 dpf心脏发育完全,开始行使功能,在这个阶段诱导心脏凋亡最敏感,因此随机选取2 dpf野生型AB品系斑马鱼于6孔板中,每孔(实验组)均处理30尾斑马鱼。分别水溶给予终质量浓度为500, 1 000, 2 000 mg·L<sup>-1</sup>的三七水提物冻干粉, 125 mg·L<sup>-1</sup>的阳性药NAC,同时设置正常组和模型组,每孔容量为3 mL。除正常组外,其余各实验组均水溶给予5 g·L<sup>-1</sup> ISO建立斑马鱼心肌凋亡模型。28℃处理5 h后,用吖啶橙进行染色,染色后每个实验组随机选取10尾斑马鱼置于荧光显微镜下拍照并保存图片,用NIS-ElementsD 3.20高级图像处理软件进行图像分析并采集数据,分析统计斑马鱼心脏凋亡细胞荧光强度,以该指标的统计学分析结果评价样品心肌凋亡抑制作用<sup>[18]</sup>。心肌凋亡抑制率=[心脏凋亡荧光强度(模型组)-心脏凋亡荧光强度(药物干预组)]/心脏凋亡荧光强度(模型组)×100%。

**2.3 三七70%甲醇提取物冻干粉对ISO诱发斑马鱼血瘀模型的干预作用** 随机选取2 dpf野生型AB品系斑马鱼于6孔板中,每孔(实验组)均处理30尾斑马鱼。分别水溶给予终质量浓度为31.25, 62.5, 125, 250, 500 mg·L<sup>-1</sup>的三七70%甲醇提取物冻干粉, 125 mg·L<sup>-1</sup>的阳性药NAC,同时设置正常组和模型组,每孔容量为3 mL。除正常组外,其余各实验组均水溶给予ISO建立斑马鱼心肌凋亡模型。28℃处理5 h后,用吖啶橙进行染色,染色后每个实验组随机选取10尾斑马鱼置于荧光显微镜下拍照并保存图片,用NIS-ElementsD 3.20高级图像处理

软件进行图像分析并采集数据,分析统计斑马鱼心脏凋亡细胞荧光强度,以该指标的统计学分析结果评价样品心肌凋亡抑制作用。心肌凋亡抑制率=[心脏凋亡荧光强度(模型组)-心脏凋亡荧光强度(药物干预组)]/心脏凋亡荧光强度(模型组)×100%。

#### 2.4 不同提取溶剂三七冻干粉的化学成分研究

**2.4.1 样品制备** 分别精密称取0.328 g PNW(折合生药量1.00 g)溶于30 mL水,精密称取0.251 g PNM(折合生药量1.00 g)溶于30 mL 70%甲醇,超声10 min,过0.22 μm微孔滤膜,得供试品溶液。

**2.4.2 色谱条件** 采用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);柱温30℃;样品盘温度4℃;流动相为A(0.1%甲酸)和B(乙腈),梯度洗脱(0~4 min, 2%~20%B; 4~13 min, 20%~30%B; 13~15 min, 30%~32%B; 15~22 min, 32%~33%B; 22~29 min, 33%~50%B; 29~36 min, 50%~90%B);流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>;进样体积3 μL。

**2.4.3 质谱条件** 电喷雾离子源,正负离子扫描模式,分别采用超高纯氦(He)和高纯氮(N<sub>2</sub>)作为碰撞气和雾化气。ESI源参数设定如下:毛细管温度350℃,毛细管电压35 V,喷雾电压3.5 kV,正离子模式下鞘气(N<sub>2</sub>)流速40 arb,辅助气(N<sub>2</sub>)流速10 arb;负离子模式下鞘气(N<sub>2</sub>)流速35 arb,辅助气(N<sub>2</sub>)流速10 arb。样品一级质谱在FT模式下进行全扫描(分辨率R为3万, m/z扫描范围为100~1 200),二级质谱采用数据依赖性扫描(data dependent scan)。数据采集和分析采用Xcalibur 3.0, Metworks 1.3和Mass Frontier 7.0软件。

**2.5 统计学处理** 采用GraphPad 14.1软件进行统计分析,所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和Dunnett's *t*检验, *P*<0.05表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用

**3.1.1 AA诱发斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用** 与正常组比较,AA模型组SI显著降低(*P*<0.01),提示造模成功;与模型组比较,45 mg·L<sup>-1</sup>阿司匹林干预后能显著增加SI(*P*<0.01),预防血栓效率达75.30%。使用62.5, 125, 250, 500 mg·L<sup>-1</sup>的三七水提物冻干粉干预后,SI有不同程度增加,其中250~500 mg·L<sup>-1</sup>剂量组的作用明显(*P*<0.05, *P*<0.01),各剂量组的预防血栓效率分别为27.69%, 37.00%, 56.05%, 63.90%,呈一定量效依赖效应。

见表1。

表1 AA诱发斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Establishment of a zebrafish blood stasis model induced by AA and intervention effect of Notoginseng Radix et Rhizoma ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	心脏红细胞染色强度	预防血栓作用/%
正常		9 760.63±533.36	-
模型		6 753.47±331.02 <sup>1)</sup>	-
阿司匹林	45	9 017.66±270.21 <sup>3)</sup>	75.29±8.98 <sup>4)</sup>
三七	62.5	7 586.20±513.49	27.69±17.08
	125	7 865.93±500.75	36.99±16.65
	250	8 438.66±288.31 <sup>3)</sup>	56.04±9.58 <sup>3)</sup>
	500	8 675.13±602.27 <sup>2)</sup>	63.90±20.03 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

**3.1.2 Ponatinib 诱发斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用** 与正常组比较, Ponatinib 模型组 SI 显著减少 ( $P<0.01$ ), 提示建模成功; 与模型组比较, 45 mg·L<sup>-1</sup> 阿司匹林干预后能显著增加 SI ( $P<0.01$ ), 预防血栓效率达 33.23%。使用 7.81, 15.63, 31.25, 62.50 mg·L<sup>-1</sup> 的三七水提物冻干粉干预, 低剂量 7.81, 15.63 mg·L<sup>-1</sup> 组 SI 升高, 高剂量 31.25, 62.50 mg·L<sup>-1</sup> 组 SI 降低, 各剂量组的预防血栓效率分别为 8.68%, 11.26%, -2.60%, -1.34%, 均差异无统计学意义。见表2。

表3 ISO诱发斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Establishment of a zebrafish blood stasis model induced by ISO and intervention effect of Notoginseng Radix et Rhizoma ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	心脏红细胞染色强度	心肌凋亡抑制率/%
正常		207 387.13±6 746.43	-
模型		364 017.16±12 203.47 <sup>1)</sup>	-
NAC	125	301 504.86±18 924.70 <sup>2)</sup>	17.17±5.19 <sup>2)</sup>
三七	500	371 883.20±15 147.05	-2.16±4.16
	1 000	335 042.78±20 036.89	7.96±5.50
	2 000	317 603.17±16 959.12 <sup>2)</sup>	12.75±4.65 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

### 3.1.4 不同诱导剂诱发斑马鱼血瘀模型的比较

本实验采用三种诱导剂——AA, Ponatinib, ISO 诱发建立斑马鱼血瘀模型, 分别用于评价三七的抗血栓作用和抗心肌缺氧的能力。实验结果显示, 3种诱导剂诱发的斑马鱼血瘀模型与正常组相比检测指标均有显著性变化(AA 诱导的血瘀模型  $P<0.01$ , Ponatinib, ISO 诱导的血瘀模型  $P<0.01$ ), 建模

表2 Ponatinib 诱发斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Establishment of zebrafish blood stasis model induced by ponatinib and intervention effect of Notoginseng Radix et Rhizoma ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	心脏红细胞染色强度	预防血栓作用/%
正常		8 016.50±290.69	-
模型		2 862.61±198.09 <sup>1)</sup>	-
阿司匹林	45	4 575.13±303.20 <sup>2)</sup>	33.23±5.88 <sup>2)</sup>
三七	7.81	3 310.18±251.25	8.68±4.87
	15.63	3 442.88±381.01	11.26±7.39
	31.25	2 728.52±329.53	-2.60±6.39
	62.50	2 793.66±238.52	-1.33±4.62

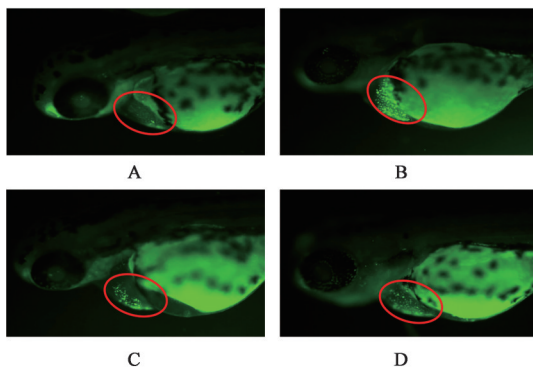
注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

**3.1.3 ISO 诱发斑马鱼血瘀模型的建立及三七的干预作用** 与正常组比较, ISO 模型组心脏凋亡荧光强度明显增加 ( $P<0.01$ ), 提示建模成功; 与模型组比较, 125 mg·L<sup>-1</sup> NAC 干预后能显著降低心脏凋亡荧光强度 ( $P<0.05$ ), 心肌凋亡抑制率达 17.17%。使用 500, 1 000, 2 000 mg·L<sup>-1</sup> 的三七水提物冻干粉干预后, 心脏凋亡荧光强度有一定改变, 500 mg·L<sup>-1</sup> 剂量组心脏凋亡荧光强度增加, 1 000, 2 000 mg·L<sup>-1</sup> 组降低, 其中 2 000 mg·L<sup>-1</sup> 剂量组的作用显著 ( $P<0.05$ ), 各剂量组心肌凋亡抑制率分别为 -2.16%, 7.96%, 12.75%。见表3。

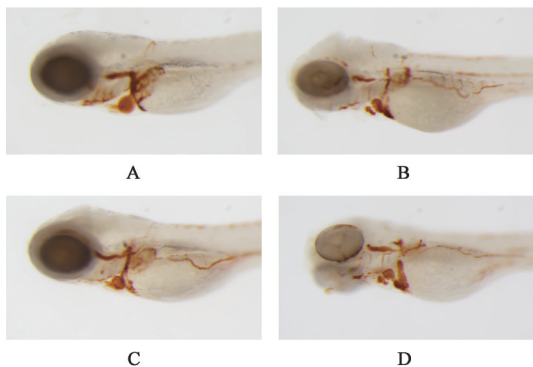
成功。

三七水提物冻干粉可以剂量依赖性干预 AA 诱导的斑马鱼血栓形成, 给药量 500 mg·L<sup>-1</sup> 时疗效最佳 ( $P<0.05$ ), 预防血栓效率可达 63.90%。而三七水提物冻干粉对 Ponatinib 斑马鱼血瘀模型无显著治疗作用, 该模型不适合用于三七活血化瘀作用的评价。ISO 诱导后斑马鱼的心脏凋亡细胞强度升

高,三七水提物冻干粉能显著对抗ISO诱导的斑马鱼心脏细胞凋亡( $P<0.05$ ),具有剂量依赖效应。实验结果显示,AA,ISO诱导的斑马鱼血瘀模型适用于评价三七水提物冻干粉的活血能力。本研究进一步选取AA,ISO诱导的斑马鱼血瘀模型给予不同溶剂提取的三七冻干粉进行干预,比较醇提和水提三七冻干粉的活血作用差异。对AA诱导的斑马鱼血瘀模型,模型组斑马鱼使用 $125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 三七70%甲醇提取物冻干粉给药即出现明显心血管毒性反应。因此,实验仅选取ISO诱导的斑马鱼血瘀模型给予不同溶剂提取的三七冻干粉进行干预,确立评价中药材三七活血化瘀作用的最佳模型及提取溶剂。见图1~3。

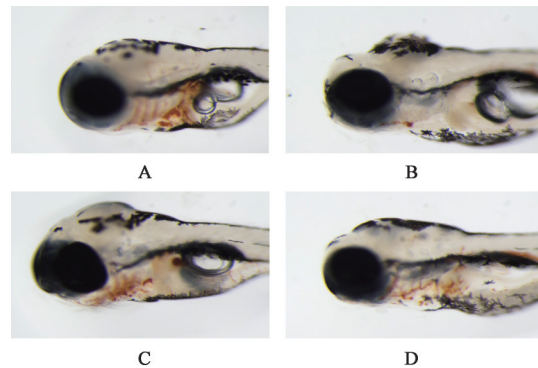


A. 正常组;B. 模型组;C. NAC组;D. 三七组  
图1 ISO诱导斑马鱼心肌缺氧模型及三七的干预作用  
Fig. 1 Iso-induced myocardial hypoxia model of zebrafish and intervention effect of Notoginseng Radix et Rhizoma



A. 正常组;B. 模型组;C. 阿司匹林组;D. 三七组  
图2 Ponatinib诱导斑马鱼血栓模型及三七的干预作用  
Fig. 2 Ponatinib-induced thrombus model in zebrafish and intervention effect of Notoginseng Radix et Rhizoma

**3.2 三七70%甲醇提取物冻干粉对ISO诱发斑马鱼血瘀模型的干预作用** 与正常组比较,ISO模型组心脏凋亡荧光强度明显增加( $P<0.01$ ),提示建模成功;与模型组比较, $125.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAC干预后能显著降低心脏凋亡荧光强度( $P<0.05$ ),心肌凋亡抑制



A. 正常组;B. 模型组;C. 阿司匹林组;D. 三七组  
图3 AA诱导斑马鱼血栓模型及三七的干预作用  
Fig. 3 AA-induced thrombus model in zebrafish and intervention effect of Notoginseng Radix et Rhizoma

率达17.17%。使用 $31.25, 62.50, 125.00, 250.00, 500.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三七70%甲醇提取物冻干粉干预后,心脏凋亡荧光强度有不同程度增加,其中 $125\sim 500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组的作用显著( $P<0.01$ ),各剂量组心肌凋亡抑制率分别为13.87%,15.75%,31.15%,51.97%,75.37%,呈一定的量效依赖效应。见表4。

表4 三七70%甲醇提取物冻干粉对ISO诱发斑马鱼血瘀模型的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )  
Table 4 Effect of freeze-dried powder of 70% methanol extract of Notoginseng Radix et Rhizoma on ISO zebrafish blood stasis model ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	心脏红细胞染色强度	心肌凋亡抑制率/%
正常		157 088.50±8 783.79	-
模型		325 358.16±13 588.59 <sup>1)</sup>	-
NAC	125	248 963.54±20 184.06 <sup>2)</sup>	23.48±6.20 <sup>2)</sup>
三七	31.25	280 240.29±24 419.00	13.87±7.50
	62.5	274 117.22±20 340.42	15.75±6.25
	125	224 005.49±13 471.12 <sup>2)</sup>	31.15±4.14 <sup>2)</sup>
	250	156 283.92±23 008.35 <sup>2)</sup>	51.97±7.07 <sup>2)</sup>
	500	80 137.62±9 771.81 <sup>2)</sup>	75.37±3.00 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

### 3.3 不同提取溶剂三七冻干粉的化学成分研究

采用UHPLC LTQ-Orbitrap MS/MS技术对不同提取溶剂三七冻干粉的化学成分进行比较分析。通过高分辨质谱及二级质谱的碎片离子推测化合物的结构式,结合文献进一步比对<sup>[16,19-20]</sup>,共鉴定得到60个化合物,其中皂苷类成分20个,氨基酸类成分20个,小分子有机酸类成分5个,炔类、醇类3个,烯、酯类3个,核苷酸类3个,其他成分6个。在每个对应色谱峰的保留时间、准分子离子峰信息基本相

同的情况下,色谱峰峰面积变化可以反映不同提取溶剂三七冻干粉的对应化合物的含量差异,即 Fold Change(PNM:PNW)>1.2 可认为在三七 70% 甲醇提取物冻干粉中含量大于水提取物冻干粉, Fold Change(PNM:PNW)<0.8 可认为在三七 70% 甲醇提取物冻干粉中含量小于水提取物冻干粉。见表 5。

实验结果显示,PNM 和 PNW 存在明显化学成分差异。所鉴定的 60 个成分中,34 个在 PNM 中含量大于 PNW,主要包括 12 个氨基酸类成分,7 个皂苷类成分,2 个炔类和醇类成分等。仅 11 个成分在 PNM 中含量小于 PNW。三七 70% 甲醇提取的效率高于三七水提取的效率。

表 5 PNM 和 PNW 化学成分比较

Table 5 Comparison of chemical composition of PNM and PNW

No.	离子模式	PNW $t_R$ /min	实测相对分子质量	分子式	MS/MS	推测化合物	PNM 峰面积	PNW 峰面积	差异倍数
1	+	0.86	133.096 6	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	鸟氨酸	47 892	52 973	0.90
2	+	0.86	147.112 4	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	赖氨酸	1 167 562	665 715	1.75
3	+	0.97	175.118 4	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	158.092*, 157.108, 140.081, 130.097, 130.097, 112.087, 70.064, 60.055	精氨酸	80 398 435	61 128 026	1.32
4	+	1.00	106.049 2	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	-	丝氨酸	192 227	123 147	1.56
5	+	1.01	120.065 1	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	-	苏氨酸	1 022 077	791 579	1.29
6	+	1.01	133.060 3	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	天冬酰胺	2 536 765	2 294 926	1.11
7	+	1.01	134.044 3	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	-	天冬氨酸	960 699	780 201	1.23
8	+	1.01	148.059 9	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	-	谷氨酸	222 105	176 601	1.26
9	+	1.01	132.065 1	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	-	羟脯氨酸	44 426	54 558	0.81
10	+	1.03	147.075 9	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	DL-谷氨酰胺	5 924 661	369 227	16.05
11	+	1.06	156.076 2	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	138.055, 110.023, 84.044*, 73.028	组氨酸	1 227 850	799 256	1.54
12	+	1.07	176.102 4	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-	瓜氨酸	159 281	64 599	2.47
13	+	1.11	116.070 3	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-	脯氨酸	10 220 551	9 367 324	1.09
14	+	1.11	124.039 0	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	106.028*, 80.049, 78.033	烟酸	6 791 213	4 098 379	1.66
15	+	1.35	118.085 9	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-	γ-氨基丁酸	3 764 220	5 276 173	0.71
16	+	1.35	118.086 0	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-	缬氨酸	3 764 220	5 276 173	0.71
17	+	1.63	150.057 8	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> NS	-	甲硫氨酸	690 744	742 435	0.93
18	+	1.88	193.033 8	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	-	异柠檬酸	1 939 916	1 886 924	1.03
19	+	2.32	132.101 5	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	86.096*, 69.069	异亮氨酸	4 982 838	3 890 561	1.28
20	+	2.48	132.101 5	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	86.096*, 69.069	亮氨酸	13 192 295	11 204 188	1.18
21	+	2.48	123.043 6	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	106.028, 96.044, 80.049*	苯甲酸	405 789	368 508	1.10
22	+	2.48	182.080 6	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	165.054*, 147.044, 136.075, 123.044, 119.049	酪氨酸	4 523 680	3 584 639	1.26
23	+	2.59	113.034 0	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	尿嘧啶	758 116	760 676	1.00
24	+	2.83	268.104 0	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	269.107, 250.093, 137.065, 136.062*, 119.035	腺苷	20 410 280	15 379 884	1.33
25	+	3.02	284.098 4	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	252.107, 225.085, 193.058, 169.097, 152.057*, 141.102, 135.030	鸟嘌呤核苷	3 327 660	2 333 903	1.43
26	+	3.04	153.040 2	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-	黄嘌呤	164 636	110 177	1.49
27	+	3.62	166.085 7	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	149.059, 131.049, 120.081*, 107.049, 103.054	苯丙氨酸	12 849 597	9 952 555	1.29
28	+	4.53	205.096 6	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	色氨酸	2 561 657	1 678 569	1.53
29	+	4.62	143.106 1	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	-	环己基乙酸酯	208 235	44 734	4.65
30	+	6.84	287.055 0	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	287.055*, 269.044, 258.052, 241.049, 231.065, 213.055, 197.059, 165.018, 153.018, 147.044, 133.028, 121.028	山柰酚	1 045 763	46 152	22.66
31	-	9.55	1 007.534 0	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>19</sub>	986.496, 961.536*, 799.478, 655.449	noto ginsenoside R <sub>3</sub>	649 714	1 113 845	0.58

续表5

No.	离子模式	PNW $t_R$ /min	实测相对分子质量	分子式	MS/MS	推测化合物	PNM峰面积	PNW峰面积	差异倍数
32	-	10.00	977.527 3	$C_{47}H_{80}O_{18}$	931.523*, 811.826, 765.070, 629.486, 530.629, 460.422	notoginsenoside R <sub>1</sub>	10 231 983	11 692 731	0.88
33	-	10	931.519 0	$C_{47}H_{80}O_{18}$	932.546*, 787.495, 423.235	quiquenoside L <sub>3</sub>	1 315 620	1 770 396	0.74
34	+	11.3	123.080 2	$C_8H_{10}O$	-	甲基茴香醚	81 518	65 398	1.25
35	+	11.3	143.085 0	$C_{11}H_{10}$	-	naphthalene, 1-methyl	857 134	354 206	2.42
36	-	11.03	991.543 6	$C_{42}H_{82}O_{18}$	-	ginsenoside Re	5 837 359	296 234	19.71
37	+	11.3	135.116 3	$C_{10}H_{14}$	-	邻异丙基甲苯	1 927 311	715 361	2.69
38	+	11.3	149.132 0	$C_{11}H_{16}$	-	benzene, 1-ethyl-2, 4, 5-trimethyl-	2 688 727	1 103 021	2.44
39	+	11.3	245.189 5	$C_{17}H_{24}O$	-	人参炔醇	553 191	245 453	2.25
40	+	11.3	209.132 0	$C_{16}H_{16}$	-	1,3-二苯基-1-丁烯	305 970	130 386	2.35
41	-	10.97	845.485 3	$C_{42}H_{72}O_{14}$	800.491*, 637.434, 619.422, 475.380, 391.285	ginsenoside Rf	3 1362 033	42 386 437	0.74
42	-	11.11	845.483 0	$C_{43}H_{74}O_{16}$	799.482*, 637.430, 475.377, 391.283	ginsenoside Rg <sub>1</sub>	31 362 033	89 816 766	0.35
43	-	12.11	1 123.580 0	$C_{53}H_{90}O_{22}$	-	ginsenoside Rc	865	14 269	0.06
44	-	12.16	885.480 4	$C_{45}H_{74}O_{17}$	841.493*, 781.473, 722.409, 679.440	(malonyl-PPT)-(Glc-Glc) <sup>e</sup>	22 286 122	326 773	68.20
45	+	20.53	145.049 0	$C_6H_8O_4$	-	甲顺丁烯二酸二甲酯	3 319 414	975 901	3.40
46	-	20.2	1 107.589 0	$C_{54}H_{92}O_{23}$	-	ginsenoside Rb <sub>1</sub>	774 258	2 843 642	0.27
47	-	18.89	829.492 3	$C_{42}H_{72}O_{13}$	815.494, 784.491*, 769.484, 599.311, 576.804, 553.797	20(S) ginsenoside Rg <sub>2</sub>	6 608 217	10 027 315	0.66
48	-	18.91	783.483 9	$C_{42}H_{72}O_{13}$	621.435*, 537.340, 459.383, 375.288	ginsenoside F <sub>2</sub>	837 694	2 332 194	0.36
49	-	19.04	683.434 3	$C_{36}H_{62}O_9$	637.433*, 475.379, 329.236	20(R) ginsenoside Rh <sub>1</sub>	14 183 792	54 364 525	0.26
50	-	23.6	1 123.583 0	$C_{53}H_{90}O_{22}$	-	ginsenoside Rb <sub>2</sub>	6 683	153 060	0.04
51	-	24.78	993.459 5	$C_{47}H_{80}O_{19}$	947.544*, 785.403, 638.437, 475.383	(O+PPT)-Glc-Xyl-Glc	16 282	7 806	2.09
52	-	26	991.543 6	$C_{42}H_{82}O_{18}$	945.535*, 700.430, 683.447, 637.433, 475.380	ginsenoside Rd	8 253 815	6 882 358	1.20
53	-	27.11	991.544 9	$C_{48}H_{82}O_{18}$	945.537*, 637.441, 475.378	ginsenoside Re	8 253 815	7 026 725	1.17
54	-	26.64	1 031.537 0	$C_{51}H_{84}O_{21}$	987.553*, 945.538, 927.530, 825.496	malonyl-ginsenoside Rd	362 930	39 197	9.26
55	-	11.03	991.543 6	$C_{42}H_{82}O_{18}$	945.536*, 781.469, 357.062	notoginsenoside K	1 969 223	883 522	2.23
56	-	26.64	1 033.5500	$C_{50}H_{84}O_{19}$	1 012.514, 989.558*, 945.534, 828.440, 725.431, 648.849, 543.595	PPD-(Glc-Glc)-Glc-acetyl	135 352	28 894	4.68
57	+	30.63	261.1844	$C_{17}H_{24}O_2$	243.174, 159.080, 145.065, 131.085, 117.070, 105.033*, 77.038	人参环氧炔醇	2 689 185	769 596	3.49
58	-	18.89	829.4923	$C_{42}H_{72}O_{13}$	830.512, 783.487*, 621.446, 459.389, 375.273	ginsenoside Rg <sub>3</sub>	1 645 745	9 912 520	0.17
59	+	31.75	279.1955	$C_{17}H_{26}O_3$	-	人参炔三醇	141 648	148 767	0.95
60	+	31.98	277.2157	$C_{18}H_{28}O_2$	259.205*, 241.195, 221.153, 207.138, 161.132, 149.132, 135.117, 121.101, 107.085, 93.069	4,7-十八烷二酸	3 234 259	85 693	37.74

注: \*表示MS/MS为基峰。

#### 4 讨论

心血管疾病血瘀证发病机制多样<sup>[21]</sup>,血栓和心肌缺氧是引发疾病的关键诱因。血栓是心血管疾病的核⼼环节<sup>[22]</sup>,多属于血瘀证范畴,超过80%的中风病例是由血栓引起的,血栓性并发症也是患者死亡和残疾的最主要原因<sup>[23]</sup>。心肌缺氧则是指各

种因素引起冠状动脉血流量降低,致使心肌氧不足、代谢产物清除减少的临床状态,是气滞血瘀型血瘀证的直接诱因。临床研究表明,抗血小板药物和改善心肌缺氧状态是治疗心血管疾病血瘀证的有效方法<sup>[24]</sup>。因此,运用血瘀模型评价药物的抗血栓能力和抗心肌缺氧能力是心血管疾病血瘀证相

关药物研究的有效手段。

AA, Ponatinib, ISO能够诱发血栓、诱导心肌缺氧,是血瘀证的良好造模剂。AA途径是3种主要的血小板活化聚集途径之一<sup>[25]</sup>。AA可以在环氧化酶的催化下生成血栓素A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)和不稳定的前列腺素G<sub>2</sub>,促进血小板的前聚集和血管收缩,诱导血小板颗粒直接释放二磷酸腺苷(ADP),引发血小板凝集<sup>[25-27]</sup>。低剂量AA即可诱发血小板聚集性血栓,是最常用的血栓模型诱导剂,阳性药阿司匹林,可以影响TXA<sub>2</sub>和前列环素的合成,阻止血小板聚集,针对性消除AA的作用<sup>[14,28]</sup>。Ponatinib是新一代酪氨酸激酶抑制剂,临床中具有诱发血栓的副作用<sup>[28]</sup>。研究表明,Ponatinib诱发血栓与其对血管内皮细胞生长因子受体的抑制作用有关,可能通过抑制内皮细胞增殖、迁移、血管形成,诱发动静脉血管狭窄、血栓等病理变化<sup>[29]</sup>,诱导建立血管损伤性血栓模型,常采用氯吡格雷、阿司匹林、利伐沙班等药物作为阳性药。ISO是一种强β受体激动剂,可以使心率增快、心肌收缩力增强,心肌耗氧量显著增加,从而引起心肌缺血、缺氧,最终导致心肌细胞凋亡坏死。ISO诱导心肌缺血模型能较好地模拟在体心肌缺血的病理生理状况,操作方便、易行,是建立血瘀模型的经典方法,被广泛用于心血管疾病领域的研究<sup>[30]</sup>。抗氧化剂NAC可以通过清除自由基的作用保护心脏,减轻ISO诱发的心肌缺血坏死,是ISO心肌缺氧模型的常用阳性药<sup>[31]</sup>。3种造模剂所构建的斑马鱼血瘀模型在造模机制方面存在区别,分别与AA代谢途径、血管内皮细胞生长因子、氧化应激密切相关,因此选择的阳性药也有所不同,三七对其的作用结果能够一定程度反应三七的作用机制。AA, Ponatinib诱导的血栓模型能够评价药物治疗血栓性疾病等血瘀病症的作用,ISO诱导的心肌缺氧模型则提示药物在活血、调节氧化应激、抑制细胞凋亡等方面的作用。在模型动物选择方面,斑马鱼能够全面地检测、评估中药的活性和毒性,进而实现高通量筛选,是在活体内进行先导药物筛选的最佳模式生物之一<sup>[32]</sup>。因此,本实验最终选择AA, Ponatinib, ISO诱导建立斑马鱼血瘀模型,分别选用阿司匹林, NAC作为阳性药,用于评价三七的抗血栓能力和抗心肌缺氧能力。

研究表明,三七及其有效成分对ISO诱导的心肌缺氧模型具有显著的治疗作用。三七总皂苷能够减轻ISO所致的大鼠心肌缺血病理损伤程度,三七茎叶皂苷能够降低受损心肌酶的释放,提高大鼠

血清和心肌组织中超氧化物歧化酶活性,降低丙二醛含量,从而发挥对ISO诱导的大鼠急性心肌缺血损伤的保护作用<sup>[33]</sup>。目前,使用ISO诱导建立啮齿类动物血瘀模型或细胞的缺氧状态的研究较多,关于ISO斑马鱼血瘀模型的研究较少,本研究首次使用该模型评价活血化瘀药三七,结果显示,ISO诱导后斑马鱼的心脏凋亡细胞强度升高,使用阳性药抗氧化剂NAC干预,凋亡率明显降低,同时三七水提取物冻干粉和70%甲醇提取物冻干粉均能显著对抗ISO诱导的斑马鱼心脏细胞凋亡,且具有剂量依赖效应。根据文献推测,三七的治疗效应是多成分多靶点作用,与磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/内皮型一氧化氮合酶(PI3K/Akt/eNOS)信号通路,转化生长因子-β<sub>1</sub>/磷酸化信号传导蛋白3(TGF-β<sub>1</sub>/Smad3)通路,核转录因子-κB(NF-κB)通路,缺氧诱导因子-1α/腺病毒E1B 19 kDa蛋白3(HIF-1α/BNIP3)自噬通路,B细胞淋巴瘤-2/B细胞淋巴瘤-2关联X蛋白(Bcl-2/Bax)比值等均有关联<sup>[1,34-36]</sup>。

同时,本研究比较了三七水提取物冻干粉和三七70%甲醇提取物冻干粉对ISO诱导的斑马鱼血瘀模型的疗效差异,结果显示,使用500, 2 000 mg·L<sup>-1</sup>的三七水提取物冻干粉干预模型,心肌凋亡抑制率分别为-2.16%, 12.75%,而使用500 mg·L<sup>-1</sup>的三七70%甲醇提取物冻干粉干预,心肌凋亡抑制率可达75.37%,三七70%甲醇提取物冻干粉抗心肌缺氧的能力显著高于三七水提取物冻干粉。采用UHPLC LTQ-Orbitrap MS/MS技术进一步研究二者的化学成分,发现三七70%甲醇提取的化合物种类和含量均优于水提,总体提取效率更高,70%甲醇提取物中部分氨基酸类、皂苷类、炔醇类的化学成分含量更高,人参环氧炔醇、人参皂苷Re等10种成分的含量差异可达3倍以上,药理活性上的差异可能与化学成分的含量差异相关,如三七70%甲醇提取物冻干粉中人参皂苷Re的含量是三七水提取物冻干粉的近20倍,而人参皂苷Re正是三七抗心肌缺血、缺氧损伤的重要成分,能够调节TGF-β<sub>1</sub>/Smad3通路、调节核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)介导谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC)和谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚基(GCLM)的高抗氧化功能<sup>[37]</sup>。

综上所述,AA, Ponatinib, ISO斑马鱼血瘀模型均可用于快速评价药物的活血化瘀能力,针对中药材三七,三七水提取物冻干粉对AA斑马鱼血瘀模型和ISO斑马鱼血瘀模型均有治疗效果,其心血管疾病的治疗作用存在多靶点效应,可能与AA代谢途

径和氧化应激存在一定关联。进一步比较三七水提物冻干粉和70%甲醇提取物冻干粉对ISO诱导的斑马鱼血栓模型的疗效差异,70%甲醇可以更好地提取三七中皂苷、炔醇等有效成分,抗心肌缺氧的能力较强。实验最终确立以ISO作为诱导剂建立斑马鱼血栓模型,以70%甲醇作为提取溶剂的中药材三七活血化瘀功效快速评价方法,为三七的药效评价和药效物质基础的阐明提供理论参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王丽娟. 中药三七药理药效分析及临床应用效果观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(5): 195, 197.
- [2] 韩淑娴, 游云. 三七总皂苷心脑血管药理作用及其溶血反应[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 818-822.
- [3] 王海燕, 容蓉, 田景振. 三七活性成分药理作用及临床应用概述[J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(2): 178-180.
- [4] LYU J, XIE Y, SUN M, et al. Efficacy and safety of Xueshuantong injection on acute cerebral infarction: clinical evidence and GRADE assessment [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 822.
- [5] WANG F J, WANG S X, CHAI L J, et al. Xueshuantong injection (lyophilized) combined with salvianolate lyophilized injection protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through attenuation of oxidative stress[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(6): 998-1011.
- [6] WANG T, GUO R, ZHOU G, et al. Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen: a review [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 188: 234-258.
- [7] 陈红艳, 陈安, 卢芳国, 等. 三七总皂苷的药理研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(1): 154-157.
- [8] 项昌培, 周瑞, 张毅, 等. 三七中皂苷类成分及其抗脑缺血分子机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3045-3054.
- [9] 刘耀晨, 张铁军, 郭海彪, 等. 三七的研究进展及其质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2733-2745.
- [10] 黄加文, 李倩, 杨和金, 等. 三七止血和活血活性部位的筛选[J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(6): 12-18.
- [11] 亓雨青. 基于化学探针与斑马鱼模型的中药活性成分筛选方法研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [12] 陈维武, 白玛卓玛, 郭胜亚, 等. 二十五味珍珠片对斑马鱼微血管功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 49-54.
- [13] 樊娇娇, 李发荣, 赵崇军, 等. 盐酸肾上腺素诱导建立斑马鱼血栓模型的优化与适用性研究[J]. 环球中医药, 2017, 10(6): 663-668.
- [14] ZHANG Y, GUO S Y, ZHU X Y, et al. Arachidonic acid induced thrombosis in zebrafish larvae for assessing human anti-thrombotic drugs [J]. JSM Cell Dev Biol, 2017, 5(1): 1023.
- [15] 费倩倩, 韦英杰, 汪晶, 等. 基于代谢组学研究三七总皂苷在斑马鱼幼鱼中的急性毒性机制[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17): 3798-3805.
- [16] 李铭源. 基于斑马鱼平台结合多种模型系统研究三七花皂苷促血管新生作用及机制[Z]. 2016.
- [17] 朱晓宇, 李春启. 建立斑马鱼血栓模型的方法及筛选抗栓/致栓药物的方法: 浙江, CN102266313A [P]. 2011-12-07.
- [18] KOSSACK M, HEIN S, JUERGENSEN L, et al. Induction of cardiac dysfunction in developing and adult zebrafish by chronic isoproterenol stimulation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 108: 95-105.
- [19] JIA L, ZUO T, ZHANG C, et al. Simultaneous profiling and holistic comparison of the metabolomes among the flower buds of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and *Panax notoginseng* by UHPLC/IM-QTOF-HDMSE-based metabolomics analysis [J]. Molecules, 2019, 24(11): 2188.
- [20] 赵静, 秦振娟, 彭冰, 等. 基于UPLC-Q-TOF MS技术的三七中皂苷类成分质谱裂解规律研究[J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 97-108.
- [21] 姜志胜. 心血管病理生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020.
- [22] CHEN X, ZHAO X, COOPER M, et al. The roles of GRKs in hemostasis and thrombosis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5345.
- [23] DI CERA E. Thrombin as an anticoagulant [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011, 99: 145-184.
- [24] XU Z, XU Y, XIE X, et al. Anti-platelet aggregation of *Panax notoginseng* triol saponins by regulating GP1BA for ischemic stroke therapy [J]. Chin Med, 2021, 16(1): 12.
- [25] VANHOUTTE P M. COX-1 and vascular disease [J]. Clin Pharmacol Ther, 2009, 86(2): 212-215.
- [26] BIJAK M, SALUK-BIJAK J. Flavonolignans inhibit the arachidonic acid pathway in blood platelets [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 396.
- [27] TROSTCHANSKY A, MOORE-CARRASCO R, FUENTES E. Oxidative pathways of arachidonic acid as targets for regulation of platelet activation [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2019, 145: 106382.
- [28] LINA B, GEMMA V, BIANCA R, et al. The key contribution of platelet and vascular arachidonic acid metabolism to the pathophysiology of atherothrombosis

- [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(9):2001-2015.
- [29] 邹彬,石庆之. 第三代BCR-ABL酪氨酸激酶抑制剂普纳替尼[J]. *中国新药与临床杂志*, 2014, 33(5):329-333.
- [30] 张锦华,郭军. 心肌细胞损伤模型构建及应用的研究进展[J]. *中南大学学报:医学版*, 2020, 45(10):1223-1227.
- [31] MEERAN M, PRINCE P. Protective effects of N-acetyl cysteine on lipid peroxide metabolism on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2011, 25(3):151-157.
- [32] 秦小妹,郭帅杰,李悦,等. 斑马鱼模型在中药心血管药理学研究中的应用[J]. *世界中医药*, 2021, 16(15):2358-2361.
- [33] 高维明,周原,任小宇. 三七茎叶皂苷对异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(6):1615-1619.
- [34] ZOU X, LIU Q, GUO S, et al. A novel zebrafish larvae hypoxia/reoxygenation model for assessing myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Zebrafish*, 2019, 16(5):434-442.
- [35] MENG Y, DU Z, LI Y, et al. The synergistic mechanism of total saponins and flavonoids in Notoginseng Safflower pair against myocardial ischemia uncovered by an integrated metabolomics strategy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130:110574.
- [36] LIU X W, LU M K, ZHONG H T, et al. *Panax notoginseng* saponins attenuate myocardial ischemia-reperfusion injury through the HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 pathway of autophagy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 73(2):92-99.
- [37] 王全伟. 人参皂苷Re对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血损伤的保护作用及机制[D]. 长春:吉林大学, 2020.

[责任编辑 周冰冰]

·书讯·

## 普拉洛芬联合玻璃酸钠治疗眼科手术后干眼症的临床分析 ——评《有泪有健康——战胜干眼症》

当眼部泪液质量发生改变,出现眼部红、痒等不适症状表现时,临床上通常诊断为干眼症。干眼症也是眼科常见手术后并发症,眼科学家对此现象的解释因手术器械对眼表损伤造成的。根据干眼症的患病因素来看,由于眼部炎症侵害了患者泪膜稳态失衡,进而使泪液渗透压受到影响。若患上干眼症后,不可避免的是会导致角膜炎和的角膜溃疡穿孔的发生,随着病情的发展而导致视力下降甚至失明,严重影响患者的自理能力。因此在确诊为干眼症后,需及时采取有效的治疗措施,对于患者进行介入性治疗,减少危害性。临床上针对眼科手术后干眼症患者,目前采取的是药物治疗,可有效缓解疾病症状。

《有泪有健康——战胜干眼症》由杨威,郑霄主编,中国中医药出版社2008年出版。本书前言部分的文字风趣,读者在阅读时以反问的方式和语句增强读者兴趣,同时又做到了简要科普。本书设计巧妙,按照干眼症的特征设置了13个问题,实用性较强。全书分六个部分进行干眼症分析。第一个部分为干眼症的源起,用五个小节介绍了该部分的内容,“缘何欲哭无泪”章节标题构思巧妙,使读者在开篇阅读时掌握干眼症的主要症状;除此之外,还重点描述了临床上评定干眼症的要点与细节,充分为眼科医师提供参考性的依据,规范临床诊疗标准。第二部分带读者走进眼部世界,针对“目得血而能视、目为清窍,窍通目明”学说进行有理论述,旨在展现更深远的知识,让读者掌握深入的了解。第三部分为干眼症的预防之道,主要为“一个关键,两个手段,五种生活方式”,编者以口诀的形式总结了干眼症的预防措施。第四部分则从干眼症的治疗进行分析,编者以“治风先治血,血行风自灭”等原则围绕干眼症的养生之道展开叙述,为眼部干眼症有效的治疗措施和有效改善症状,包括中药内服和养眼操,可供干眼症患者及家属学习揣摩。第五部分的内容为你不了解的眼睛,涉及眼睛的神秘来源、如何保护视神经等。第六部分则是养血、养心、养目,该部分强调治标与预防的重要性。眼科手术后干眼症采用普拉洛芬联合玻璃酸钠治疗的临床分析,提高眼科医生和患者对干眼症的重视,在临床实现治疗有效性。眼科疾病须经侵入性手术治疗,这种治疗对患者眼部组织有一定的损害,会增加感染的风险。患者存在眼组织病变而接受手术治疗,眼动力学异常导致泪膜不稳定或眼组织损害,患者出现无法正常流泪,从而让眼球长时间维持干涩的状态。患者干眼症加重的因素可能有环境、精神、失眠等诱发。对于部分症状严重的患者做到及治疗才可以有效避免角膜炎和角膜溃疡穿孔、失明等,采取有效的治疗方案对于干眼症患者具有重要意义,可保证术后恢复的有效性,提高患者的生活质量。临床上治疗干眼症的常用药物为玻璃酸钠,是一种高分子多糖体生物材料,特点为高亲水性,润滑效果显著。采取玻璃酸钠治疗干眼症,可达到稳定患者角膜的作用,让角膜表面以及泪腺产生作用,恢复眼部湿润的状态,从而满足干眼症的治疗目的。在实际治疗过程中提倡联合用药的方式,发挥药物治疗的最优效果,在最大限度上增强治疗效果。普拉洛芬属于丙酸衍生物类药物,非甾体抗炎镇痛药物,在临床上疗效显著。具有抑制前列腺素合成的作用,达到解热镇痛的效果,其优势虽有解热作用,但不会影响患者的正常体温系统。应用普拉洛芬联合玻璃酸钠治疗眼科手术后干眼症患者,在改善临床症状的同时还兼备抗炎作用,能够有效促进患者的恢复速度。

《有泪有健康——战胜干眼症》对于眼科手术后干眼症患者,使用普拉洛芬联合玻璃酸钠优于单一药物的治疗效果,无论是临床医生还是眼科医生,干眼症患者或家属,在阅读此书时,都会有极大的收获和启发,同时本书为干眼症患者的临床治疗提供了可供参考。

(作者叶刚,武汉市蔡甸区人民医院,武汉 430100)