

## 二十五味珍珠片对斑马鱼微血管功能的影响

陈维武<sup>1\*</sup>, 白玛卓玛<sup>2</sup>, 郭胜亚<sup>3</sup>, 徐懿乔<sup>3</sup>, 周生军<sup>2</sup>, 陈伦举<sup>2</sup>

(1. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 2. 西藏奇正藏药股份有限公司, 拉萨 850030;  
3. 杭州环特生物科技股份有限公司, 杭州 310051)

**[摘要]** 目的:探究二十五味珍珠片对斑马鱼微血管功能的改善作用。方法:分别采用花生四烯酸、辛伐他汀、普纳替尼诱导斑马鱼血栓模型,微血管缺失模型以及血管内皮损伤模型。二十五味珍珠片药物干预后,统计斑马鱼心输出量和血流速度,计算斑马鱼肠下血管面积和斑马鱼体节间血管直径,观察尾静脉血栓形成情况,评价二十五味珍珠片对血管内皮的保护作用以及对血栓生成的影响。结果:与模型组比较,二十五味珍珠片 $27.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组心输出量显著性增加( $P < 0.05$ ),血流速度显著性增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,质量浓度为 $0.11, 0.33, 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二十五味珍珠片干预后,斑马鱼肠下血管面积增加( $P < 0.01$ );血管内皮损伤模型中,与模型组比较, $33, 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二十五味珍珠片干预后,斑马鱼节间血管直径有明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,质量浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二十五味珍珠片干预后,斑马鱼血栓发生率显著降低( $P < 0.01$ )。结论:二十五味珍珠片可以改善微血管功能障碍,其作用机制可能与其减少血管内皮损伤促进其再生,改善微血管血流动力学作用减少血栓生成有关。

**[关键词]** 二十五味珍珠片; 微血管功能; 内皮损伤; 血栓

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)13-0049-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190801

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190101.1059.006.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-03 15:32

## Effect of Ershiwuwei Zhenzhu Tablets on Microvascular Function in Zebrafish

CHEN Wei-wu<sup>1\*</sup>, BAI MA Zhuo-ma<sup>2</sup>, GUO Sheng-ya<sup>3</sup>, XU Yi-qiao<sup>3</sup>, ZHOU Sheng-jun<sup>2</sup>, CHEN Lun-ju<sup>2</sup>

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Tibet Qizheng Tibetan Medicine Co. Ltd, Lhasa 850030, China;

3. Hunter Biotechnology Inc., Hangzhou 310051, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Ershiwuwei Zhenzhu tablets (EZT) on microvascular function. **Method:** The zebrafish models of thrombosis, microvascular defect and vascular endothelial injury were induced by using arachidonic acid, simvastatin and ponatinib respectively, and treated with EZT, astragaloside or aspirin. To evaluate the protective effect of EZT on vascular endothelium and its effect on thrombus formation, zebrafish heart output and blood flow velocity were counted, and the vascular area of the zebrafish intestine and the intervascular diameter were calculated. The thrombus in the tail vein was observed under microscope. **Result:** Compared with model group, EZT improved the cardiac output ( $P < 0.05$ ) and blood flow velocity ( $P < 0.01$ ) of zebrafish in thrombus model at a concentration of  $27.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , and promoted angiogenesis in zebrafish at concentrations of  $0.11, 0.33, 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Compared with the model group, the vascular diameter of the zebrafish internode was significantly increased at the concentrations of  $33\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ) and  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ), and the incidence of zebrafish thrombosis was significantly reduced after EZT intervention at  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** EZT could improve microvascular dysfunction, and its mechanism may be related to the reduction of vascular endothelial damage to promote its angiogenesis and the improvement of microvascular

**[收稿日期]** 20180905(002)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09031059)

**[通信作者]** \* 陈维武,在读博士,从事医药创新和产业发展研究, Tel:010-84766062, E-mail: weiwuchen@sina.com

hemodynamics to reduce thrombus formation.

[**Key words**] Ershiwuwei Zhenzhu tablets; microvascular function; endothelial injury; thrombus

随着人们生活水平的提高,心血管疾病、糖尿病、肥胖等代谢性疾病的发病率逐年增加<sup>[1]</sup>。血脂异常、高血压、胰岛素抵抗等病理改变严重危害着人类的健康<sup>[2]</sup>,微血管功能障碍是这一系列病理改变的始动环节。正常状态下,机体内充盈的微循环血流量可以保证各组织器官的血液灌流量并调节回心血量。当微血管结构和功能发生异常,如血栓、内皮功能障碍、心输出量病理性减少等危险因素发生时,将会直接影响各器官的正常运作,严重时危及生命<sup>[3]</sup>。二十五味珍珠丸是始载于藏族医名著《四部医典》的经典名方,由珍珠、肉豆蔻、珍珠母、红花、丁香、沉香、黑种子草、人工麝香、水牛角等成分组成,具有安神开窍的功效,临床中主要用于神经性疾病、心脑血管疾病和精神障碍性疾病的治<sup>[4-7]</sup>。已有研究证明二十五味珍珠丸能够有效缓解脑循环障碍性缺氧,降低脑血栓后遗症的危害,促进脑神经功能恢复<sup>[8-10]</sup>,并且可以扩张冠状动脉、降低血液黏度,改善冠心病心绞痛<sup>[11]</sup>。此外,张黎明等<sup>[12]</sup>发现二十五味珍珠丸对实验性大鼠脑缺血所致脑水肿也具有一定的预防作用。

二十五味珍珠片是在保持原经典配方的基础上,通过现代制药工艺,将原来服用不便、崩解差的传统丸剂改良后研制而成的新型藏族药,具有药物性质稳定,口服顺应好,生物利用度高的特点。目前对于二十五味珍珠片的研究主要集中在对脑血管疾病的治疗,以药效学评价为主,缺乏具体的作用机制,而对于机体微血管功能的改善作用尚未有人报道。本研究使用斑马鱼诱导微血管功能障碍实验动物模型,给予二十五味珍珠片药物干预,进一步探究二十五味珍珠片对微血管功能的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 野生型 AB 品系斑马鱼,转基因血管荧光斑马鱼,均以自然成对交配方式进行繁殖。以上斑马鱼均饲养于 28 ℃ 的养鱼用水中,饲养管理符合国际 AAALAC 认证(001458)的要求。

**1.2 药物与试剂** 二十五味珍珠片[奇正(北京)传统藏医药外治研究院有限公司提供,批号 Z20130023];花生四烯酸(淡黄色液体,-20 ℃ 避光保存,上海晶纯实业有限公司,批号 F1418031);阿司匹林[白色粉末,含量 ≥ 98% (HPLC)],黄芪甲苷

[黄色粉末,含量 ≥ 98% (HPLC)],甲基纤维[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号分别为 G1220028, G1325036, C104987];辛伐他汀[白色粉末,含量 ≥ 98% (HPLC),东京化成工业株式会社,批号 04RUC-QP];普纳替尼[淡黄色粉末,含量 ≥ 98% (HPLC),美国 Med Chem Express 公司,批号 13771];二甲基亚砜,邻联茴香胺(美国 Sigma 公司,批号分别为 D2650, D9143)。

**1.3 仪器** SZX7 型解剖显微镜,TK-C1481EC 型显微镜相连的相机(日本 Olympus 公司);PB2084C 型 ZebraLab3.3 心跳血流分析系统(法国 Viewpoint 公司);CP214 型精密电子天平(中国奥豪斯仪器有限公司);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 斑马鱼血栓模型建立<sup>[13-15]</sup>与指标检测** 随机选取 180 尾受精后 3 d(3 dpf)野生型 AB 系斑马鱼于六孔板中。分别水溶给予二十五味珍珠片(27.8, 83.3, 250 mg·L<sup>-1</sup>),阿司匹林(25 mg·L<sup>-1</sup>)处理 3 h 后,除正常组外,其余实验组均水溶给予花生四烯酸诱导斑马鱼血栓模型。各实验组分别与花生四烯酸共同处理 1 h 后,每实验组随机取 10 尾斑马鱼置于心跳血流分析系统下录制斑马鱼血流视频,分析统计斑马鱼心输出量(O)和血流速度(V),评价对心输出量和血流速度的增加作用,以心输出量和血流速度的统计学意义分别评价二十五味珍珠片和阿司匹林对花生四烯酸诱导血栓模型斑马鱼血流动力学的改善作用。

**2.2 微血管缺失模型建立<sup>[16-17]</sup>与指标检测** 根据预实验结果,二十五味珍珠片对微血管缺失模型斑马鱼的最大耐受浓度为 1 mg·L<sup>-1</sup>。随机选取 180 尾转基因血管荧光斑马鱼,使用辛伐他汀诱导建立微血管缺失模型。辛伐他汀移除后,分别水溶给予二十五味珍珠片(0.11, 0.33, 1 mg·L<sup>-1</sup>)和阳性药黄芪甲苷(23.5 mg·L<sup>-1</sup>),处理 2 d 后,每组随机取 10 条斑马鱼在荧光显微镜下观察斑马鱼肠下血管、拍照并保存图片。用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析,计算斑马鱼肠下血管面积(S),以肠下血管面积的统计学意义分别评价二十五味珍珠片和黄芪甲苷对辛伐他汀诱发的斑马鱼微血管缺失的再生作用。

**2.3 斑马鱼血管内皮损伤模型建立<sup>[14,18]</sup>与指标检测** 根据预实验结果,二十五味珍珠片对血管内皮损伤模型斑马鱼的最大耐受浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用普纳替尼分别处理野生型 AB 品系斑马鱼和转基因血管荧光斑马鱼,建立斑马鱼血管内皮损伤模型。随机选取 180 尾 5 dpf 转基因血管荧光斑马鱼,水浴给予二十五味珍珠片 11, 33,  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和阳性药阿司匹林  $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。节间血管直径:每实验组分别处理 24 h 后随机选取 10 尾斑马鱼在荧光显微镜下拍照并采集数据,拍照部位统一选取泄殖孔上方对应的三根血管,利用尼康 NIS-Elements D 3.10 高级图像处理软件进行图像分析,计算斑马鱼节间血管直径(D)。以节间血管直径的统计学意义评价二十五味珍珠片和阿司匹林对普纳替尼诱发的斑马鱼血管内皮损伤的保护作用。血栓发生率,每实验组分别处理 24 h 后,用邻联茴香胺染料进行染色,每组斑马鱼在解剖显微镜下观察记录血栓发生尾数并拍照,计算各组斑马鱼血栓发生率 = 血栓发生的斑马鱼尾数/斑马鱼总数  $\times 100\%$ ,以血栓发生率评价二十五味珍珠片和阿司匹林对普纳替尼诱发的血管内皮损伤所致血栓的保护作用。

**2.4 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据前后对比采用配对 *t* 检验,组间对比采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 确定二十五味珍珠片的最大耐受浓度 在血

栓模型中,二十五味珍珠片在  $125, 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度下,对斑马鱼未产生任何明显的毒副作用,也未引起斑马鱼死亡。在  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度下诱发 16.7% (5/30) 斑马鱼死亡、诱发 100% (25/25) 斑马鱼尾鳍烂和身体弯曲、诱发 92% (23/25) 斑马鱼血流缺失和 8% (2/25) 血流减慢。在 1 000, 1 500,  $2 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度下均诱发 100% (30/30) 斑马鱼死亡。因此,确定斑马鱼对二十五味珍珠片的最大耐受浓度为  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见图 1, 表 1。同样,在微血管缺失模型以及血管内皮损伤模型中也进行了最大耐受浓度的筛选,确定微血管缺失模型中斑马鱼对二十五味珍珠片的最大耐受浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 血管内皮损伤模型中斑马鱼对二十五味珍珠片的最大耐受浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二十五味珍珠片  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图 1 斑马鱼毒性表型

Fig.1 Toxic effect of Ershiwuwei Zhenzhu tablets on zebrafish

表 1 不同浓度二十五味珍珠片对斑马鱼死亡的影响

Table 1 Effect of different concentrations Ershiwuwei Zhenzhu tablets on death of zebrafish

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	总数/尾	死亡数/尾	死亡率/%	毒性表型
正常	-	30	0	0	未见异常
模型	-	30	0	0	未见异常
二十五味珍珠片	125	30	0	0	未见异常
	250	30	0	0	未见异常
	500	30	5	16.7	100% 斑马鱼尾鳍烂、身体弯曲, 92% 斑马鱼血流缺失, 8% 斑马鱼血流减慢
	1 000	30	30	100	-
	1 500	30	30	100	-
	2 000	30	30	100	-

**3.2 二十五味珍珠片对斑马鱼微血管血流动力学改善作用** 与正常组比较,模型组斑马鱼心输出量显著降低 ( $P < 0.01$ ),表明模型建立成功。与模型

组比较,阿司匹林组、二十五味珍珠片  $27.8, 83.3, 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组斑马鱼心输出量明显增加,二十五味珍珠片  $27.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组心输出量明显增加 ( $P <$

0.05)。与正常组比较,模型组斑马鱼血流速度显著降低( $P < 0.01$ )。阿司匹林组斑马鱼血流速度为  $978 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ,其对斑马鱼血流速度增加作用为 74%,有显著性差异( $P < 0.01$ );与模型组比较,二十五味珍珠片  $27.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组血流速度显著增加( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 二十五味珍珠片处理后斑马鱼血流动力学量化的影响  
Table 2 Effect of Ershiwuwei Zhenzhu tablets on quantitation of hemodynamics of zebrafish

组别	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	心输出量 ( $\bar{x} \pm s$ , $n = 10$ ) $/\text{nL} \cdot \text{s}^{-1}$	心输出量增加 作用 /%	血流速度 ( $\bar{x} \pm s$ , $n = 10$ ) $/\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$	血流速度 增加作用 /%
正常	-	$0.36 \pm 0.02$	-	$186.94 \pm 64.24$	-
模型	-	$0.11 \pm 0.01^{2)}$	-	$398.18 \pm 36.55^{2)}$	-
阿司匹林	25	$0.30 \pm 0.02^{4)}$	$76^{4)}$	$978.03 \pm 42.63^{4)}$	$74^{4)}$
二十五味珍珠片	27.8	$0.17 \pm 0.02^{3)}$	$23^{3)}$	$623.53 \pm 41.37^{4)}$	$29^{4)}$
	83.3	$0.12 \pm 0.01$	4	$420.25 \pm 34.42$	3
	250	$0.07 \pm 0.01$	-17	$214.76 \pm 30.59$	-23

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 3,4 同)。

**3.3 二十五味珍珠片对斑马鱼微血管缺失的再生作用** 与正常组比较,模型组斑马鱼肠下血管面积显著降低( $P < 0.01$ ),表明模型建立成功。与模型组肠下血管面积比较,黄芪甲苷、二十五味珍珠片  $0.11, 0.33, 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组斑马鱼肠下血管面积显著升高,对微血管再生的促进作用分别为 75%, 78% 和 91% ( $P < 0.01$ )。见图 2,表 3。

**3.4 二十五味珍珠片对斑马鱼血管内皮损伤(直径减小)的影响** 与正常组斑马鱼节间血管直径比较,模型组斑马鱼节间血管直径极显著性减小( $P < 0.01$ ),表明模型建立成功;与模型组节间血管直径比较,二十五味珍珠片  $11, 33, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组斑马鱼节间血管直径分别为 9.5, 10.3, 10.8 像素,对血管内皮的保护作用分别为 16%, 32%, 41%,与模型组比较,二十五味珍珠片  $33, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组斑马鱼节间血管直径明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 3,表 4。

**3.5 二十五味珍珠片对斑马鱼血管内皮损伤(血栓发生)影响** 与正常组比较,模型组斑马鱼血栓发生率显著增加( $P < 0.01$ ),表明模型建立成功。与模型组比较,阿司匹林干预后,斑马鱼血栓发生率显著降低( $P < 0.01$ )。质量浓度为 11, 33,

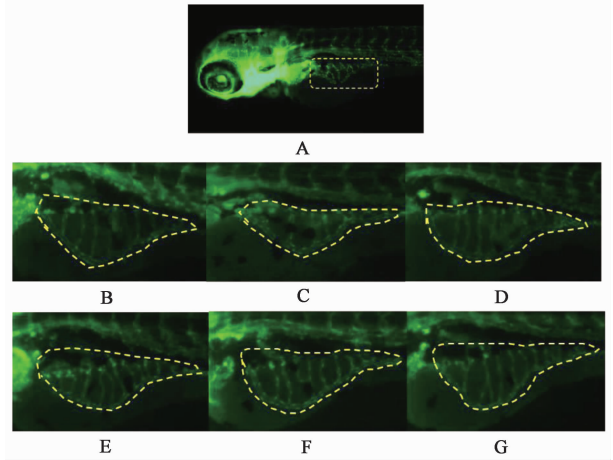


图 2 二十五味珍珠片对微血管再生的促进作用表型  
Fig. 2 Effect of Ershiwuwei Zhenzhu tablets on microvascular regeneration

表 3 二十五味珍珠片对微血管再生的促进作用的影响  
Table 3 Effect of Ershiwuwei Zhenzhu tablets on microvascular regeneration

组别	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	肠下血管面积 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )	促血管再生 作用/%
正常	-	$27395.77 \pm 1294.81$	-
模型	-	$19335.36 \pm 1049.05^{2)}$	-
黄芪甲苷	23.5	$25040.81 \pm 1117.02^{4)}$	$71^{4)}$
二十五味珍珠片	0.11	$25371.38 \pm 506.57^{4)}$	$75^{4)}$
	0.33	$25610.84 \pm 519.85^{4)}$	$78^{4)}$
	1	$26705.98 \pm 374.87^{4)}$	$91^{4)}$

表 3 二十五味珍珠片对微血管再生的促进作用的影响  
Table 3 Effect of Ershiwuwei Zhenzhu tablets on microvascular regeneration

组别	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	肠下血管面积 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )	促血管再生 作用/%
正常	-	$27395.77 \pm 1294.81$	-
模型	-	$19335.36 \pm 1049.05^{2)}$	-
黄芪甲苷	23.5	$25040.81 \pm 1117.02^{4)}$	$71^{4)}$
二十五味珍珠片	0.11	$25371.38 \pm 506.57^{4)}$	$75^{4)}$
	0.33	$25610.84 \pm 519.85^{4)}$	$78^{4)}$
	1	$26705.98 \pm 374.87^{4)}$	$91^{4)}$

$100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的二十五味珍珠片干预后,斑马鱼血栓发生率分别为 83%, 63% 和 37%。与模型组比较,二十五味珍珠片  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组斑马鱼血栓发生率显著降低( $P < 0.01$ )。见图 4,表 5。

#### 4 讨论

正常的微血管功能是保证体内重要脏器维持正常功能的首要前提,已有研究表明微血管功能障碍与高血压、糖尿病及许多心脑血管等疾病的发生密切相关<sup>[19-20]</sup>。血管内皮细胞结构和功能的紊乱是发生微血管功能障碍的始动因素,血管内皮细胞可以调节血管的收缩和舒张、免疫细胞的募集和活化、血小板的凝集等维持微循环的稳态。血栓的形成是导致微血管功能障碍的重要因素,流动状态下的血液会因血小板的活化和凝血因子被激活而发生异常

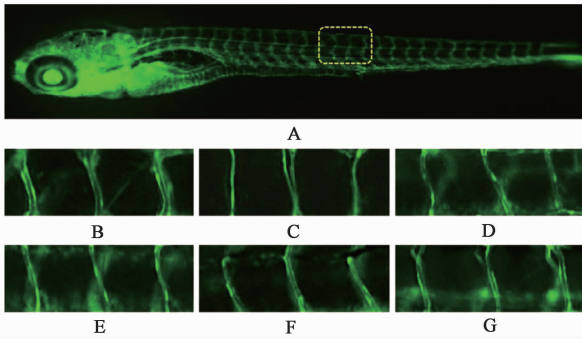


图 3 二十五味珍珠片对血管内皮的保护作用  
A. 图中黄色虚线标记部分为黄色虚线区域为泄殖孔上方三根节间血管, 血管直径定性分析部位; B. 正常组; C. 模型组; D. 阿司匹林组; E. 二十五味珍珠片 11 mg·L<sup>-1</sup>组; F. 二十五味珍珠片 33 mg·L<sup>-1</sup>组; G. 二十五味珍珠片 100 mg·L<sup>-1</sup>组

Table 4 Effect of Ershiwuwei Zhenzhu tablets on vascular endothelium-intervascular diameter

表 4 二十五味珍珠片对血管内皮的保护作用-节间血管直径的影响

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	节间血管直径 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )	血管内皮保护作用 /%
正常	-	13.80 ± 0.31	-
模型	-	8.66 ± 0.36 <sup>2)</sup>	-
阿司匹林	45	10.38 ± 0.25 <sup>4)</sup>	33 <sup>4)</sup>
二十五味珍珠片	11	9.49 ± 0.23	16
	33	10.30 ± 0.41 <sup>3)</sup>	32 <sup>3)</sup>
	100	10.78 ± 0.44 <sup>4)</sup>	41 <sup>4)</sup>

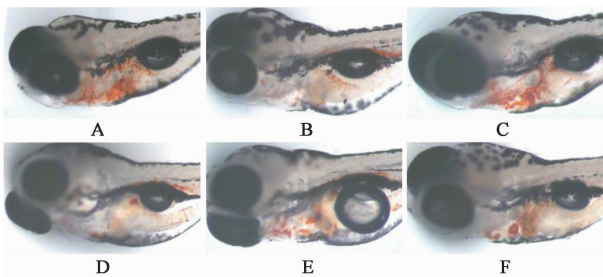


图 4 二十五味珍珠片对血管内皮损伤(血栓发生)的保护作用  
A. 正常组; B. 模型组; C. 阿司匹林组; D. 二十五味珍珠片 11 mg·L<sup>-1</sup>组; E. 二十五味珍珠片 33 mg·L<sup>-1</sup>组; F. 二十五味珍珠片 100 mg·L<sup>-1</sup>组

Table 5 Effect of Ershiwuwei Zhenzhu tablets on thrombus induced by vascular endothelial injury (n = 30)

表 5 二十五味珍珠片对血管内皮损伤所致血栓的保护作用 (n = 30)

Table 5 Effect of Ershiwuwei Zhenzhu tablets on thrombus induced by vascular endothelial injury (n = 30)

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	血栓发生率/%
正常	-	0
模型	-	87 <sup>2)</sup>
阿司匹林	45	50 <sup>4)</sup>
二十五味珍珠片	11	83
	33	63
	100	37 <sup>4)</sup>

功能障碍以  $\beta$  受体阻滞剂、钙拮抗剂、硝酸甘油等为主<sup>[24-25]</sup>, 药物治疗效果参差不齐, 副作用明显, 尚无疗效显著的中成药。

斑马鱼是模拟人类疾病的经典模型, 其与人类基因同源性高达 85%, 生物功能和结构与哺乳动物高度相似, 具有发育周期短、个头小、实验周期短等优点, 因此实验中笔者选用斑马鱼作为模式动物模型<sup>[29-32]</sup>。外源性给予花生四烯酸可以诱导斑马鱼血栓的形成, 普纳替尼以及辛伐他汀可以诱发血管内皮损伤、心输出量减少、血液流速减慢等血管异常的发生。实验结果发现二十五味珍珠片在 27.8 mg·L<sup>-1</sup> 质量浓度条件下可以显著改善斑马鱼的心输出量, 增加血液流动速度, 但改善作用不随药物浓度的增加而增加。提示二十五珍珠片可能改善微血管血流动力学特征。微血管功能损伤后, 血管内皮细胞可以在内皮细胞生长因子的作用下修复再生。与模型组比较, 二十五味珍珠片在 0.11, 0.33, 1 mg·L<sup>-1</sup> 质量浓度下均能促进斑马鱼血管损伤后再生。水溶性给予 33, 100 mg·L<sup>-1</sup> 二十五味珍珠片能增加斑马鱼节间血管直径, 保护血管内皮功能, 减少血栓的形成。综上所述, 二十五味珍珠片可以减少血管内皮损伤, 促进其再生, 改善微血管血流动力学作用, 减少血栓生成, 改善微血管功能障碍。

功能障碍以  $\beta$  受体阻滞剂、钙拮抗剂、硝酸甘油等为主<sup>[24-25]</sup>, 药物治疗效果参差不齐, 副作用明显, 尚无疗效显著的中成药。

二十五味珍珠片改善微血管功能的研究发现为二十五味珍珠片在临床中的应用提供了药理基础, 也为临床治疗微血管功能障碍提供了潜在的治疗药物。

凝固<sup>[21-22]</sup>。在高血脂、高血压和糖尿病等病理状态下, 机体的氧化应激和炎症水平增加, 活性氧自由基可导致内皮细胞氧化损伤、凋亡、老化, 启动血液凝集反应引发血栓形成<sup>[23]</sup>。目前临床中治疗微血管

[参考文献]

- [1] de Jongh R T, Serne E H, Ijzerman R G, et al. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance [J]. *Circulation*, 2004, 109 (21): 2529-2535.
- [2] Serne E H, Stehouwer C D, Maaten J C, et al. Microvascular function relates to insulin sensitivity and blood pressure in normal subjects [J]. *Circulation*, 1999, 99(7): 896-902.
- [3] 何金孝,王炜中,张海锋,等. 微血管功能在代谢综合征发生机制中的研究进展[J]. *心脏杂志*, 2016, 28(2): 234-236.
- [4] 宇妥·元丹贡布. 四部医典[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983:216.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药. 第一册[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 1995:140.
- [6] 吴洪福,耿排力. 藏药研究现状及发展前景[J]. *中药材*, 2002, 25(1): 65-66.
- [7] 才让措,郭登海. 藏药“二十五味珍珠丸”方解及功能浅述[J]. *中国民族民间医药*, 2012, 21(7): 1.
- [8] 王智森,赵献超,郑学军,等. 二十五味珍珠丸治疗脑血栓后遗症的临床疗效观察[J]. *世界中西医结合杂志*, 2013, 8(2): 165-167.
- [9] 万高. 藏药二十五味珍珠丸治疗脑血栓后遗症对疗效、神经功能缺损评分和日常生活活动能力的影响[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(64): 12630.
- [10] 周盛年,韩永涛,魏先森,等. 藏药二十五味珍珠丸治疗缺血性脑卒中的临床研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2007, 5(11): 1063-1064.
- [11] 王智森,刘水娟,赵献超,等. 藏诺牌二十五味珍珠丸治疗冠心病心绞痛临床疗效观察[J]. *中西医结合研究*, 2014, 6(2): 71-74.
- [12] 张黎明,刘生. 二十五味珍珠丸对实验性脑缺血大鼠脑毛细血管通透性及脑含水量的影响[J]. *中国药房*, 2006, 17(9): 664-665.
- [13] 张勇,朱晓宇,郭胜亚,等. 苯胍诱发建立斑马鱼血栓模型的方法[J]. *实验动物与比较医学*, 2015, 35(1): 27-31.
- [14] 王木兰,潘永明,金敏,等. 斑马鱼血栓模型的建立与冠心宁片的干预作用[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(4): 432-438.
- [15] 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.
- [16] 朱晓宇,郭胜亚,徐懿乔,等. 安宫牛黄丸防治脑血管疾病作用研究[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(8): 1067-1072.
- [17] WANG C Y, TAO W Y, WANG Y D, et al. Rosuvastatin, identified from a zebrafish chemical genetic screen for antiangiogenic compounds, suppresses the growth of prostate cancer [J]. *Eur Urol*, 2010, 58(3): 418-426.
- [18] 张亚楠,孙继红,黄新益,等. 普纳替尼对人血管内皮细胞功能的影响[J]. *药物评价研究*, 2015, 38(2): 156-160.
- [19] Bairey Merz C N, Pepine C J. Syndrome X and microvascular coronary dysfunction [J]. *Circulation*, 2011, 124: 1477-1480.
- [20] Camici P G, Crea F. Coronary microvascular dysfunction [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356: 830-840.
- [21] 郑乘龙. 益气活血药对心梗大鼠冠脉微血管内皮损伤活性分子的调控机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2012.
- [22] 黄琨. 益气活血中药对心梗大鼠冠脉微血管功能障碍及相关分子调控机制的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2013.
- [23] 杜海波,麝香保心丸治疗微血管功能障碍的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(56): 34-35.
- [24] Lanza G A, Crea F. Primary coronary microvascular dysfunction: clinical presentation, pathophysiology, and management [J]. *Circulation*, 2010, 121(21): 2317-2325.
- [25] 逯雯洁,王慧春,海平,等. 高效液相色谱法同时测定二十五味珍珠丸中7种成分及其特征图谱[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(21): 1885-1890.
- [26] Herrmann J, Kaski J C, Lerman A. Coronary microvascular dysfunction in the clinical setting: from mystery to reality [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(22): 2771-2783.
- [27] 刘旭杰,秦焯,陈淑珍. 吉西他滨对肺微血管内皮细胞的损伤及表没食子儿茶素没食子酸酯的保护作用[J]. *中国医药生物技术*, 2014, 9(6): 438-445.
- [28] 郭建友,霍海如,刘洪斌,等. 桂皮醛对IL-1刺激下脑微血管内皮细胞COX-1、COX-2活性及释放PGE2的影响[J]. *中药药理与临床*, 2005, 21(6): 16-18.
- [29] McGrath P, LI C Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(9/10): 394-401.
- [30] 高家荣,郭明飞,方朝晖,等. 黄地安消胶囊对高糖高脂诱导的斑马鱼血管病变保护作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 42(21): 4317-4322.
- [31] 李晓稳,佟玲,李东翔,等. 斑马鱼神经元损伤模型在养血清脑颗粒质量控制中的应用分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(9): 1-4.
- [32] 罗隽,梅雪,夏青,等. 醋甘遂不同提取物对斑马鱼幼鱼的毒性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4): 160-166.

[责任编辑 周冰冰]