

# 基于斑马鱼模型的西洋参提取物心脏保护作用研究<sup>Δ</sup>

吕婧\*,李晨,杨龙飞,高燕,赵瀚年<sup>#</sup>(山东中医药大学药学院,济南 250355)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)03-0308-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.03.11

**摘要** 目的:研究西洋参提取物的心脏保护作用。方法:通过耐受性实验确定西洋参提取物的给药剂量以及特非那定的最优造模剂量后,将受精后24 h(24 hpf)的斑马鱼分为空白对照组(0.5%二甲基亚砜)、模型组(2.5 μg/mL特非那定)、阳性对照组(2.5 μg/mL特非那定+30 μg/mL白藜芦醇)和不同质量浓度西洋参提取物组(2.5 μg/mL特非那定+5、10、25 μg/mL西洋参提取物,以生药量计);孵育48 h后,以斑马鱼心率、心脏静脉窦-动脉球(SV-BA)间距为指标,并计算其心脏损伤修复率,以考察西洋参提取物的心脏保护作用。另取24 hpf的斑马鱼分为空白对照组、模型组、阳性对照组和20批不同产地西洋参提取物组(5 μg/mL,以生药量计),同法给药和孵育48 h后,测定其心率、心脏SV-BA间距,并计算其心脏损伤修复率和心脏损伤相对修复率,进一步验证西洋参提取物的心脏保护作用。结果:与空白对照组比较,模型组斑马鱼心率显著降低( $P<0.01$ ),心脏SV-BA间距显著增大( $P<0.01$ );与模型组比较,阳性对照组和5、10、25 μg/mL西洋参提取物组斑马鱼心率显著升高( $P<0.01$ ),5、10 μg/mL西洋参提取物组斑马鱼心脏SV-BA间距显著缩短( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),其中5 μg/mL西洋参提取物组斑马鱼的心脏损伤修复率达73.77%。验证实验显示,与模型组比较,20批不同产地西洋参提取物组斑马鱼心率均显著升高( $P<0.01$ ),心脏SV-BA间距均显著缩短( $P<0.01$ );其心脏损伤修复率在70.45%~85.78%之间,心脏损伤相对修复率在75.48%~98.12%之间。结论:西洋参提取物具有较好的心脏保护作用。

**关键词** 西洋参;斑马鱼;心脏保护;静脉窦-动脉球;间距;心率

于器皿的吸光度对光谱采集准确性的影响;选用气动隔膜泵是因为其具有较强的自吸能力,可将溶液由浓缩罐中吸出,使提取液循环,便于采集实时光谱。

本研究将NIRS法用于华盖散提取液的浓缩过程,建立了华盖散浓缩液中多指标同时在线测定的方法,解决了离线分析周期长的问题。该方法无需样品处理,操作简便、快速,可在线测定,后续可在实际生产中对所建立的模型进行完善和再校正,进一步提高模型在华盖散提取液浓缩过程的适用性与稳定性。

## 参考文献

- [1] 金叶,吴永江,刘雪松,等.蟾皮提取液浓缩过程中吡啶类生物碱等多指标近红外快速检测研究[J].中国药理学杂志,2012,47(9):712-717.
- [2] Food and Drug Administration. *Guidance for industry PAT: a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance*[EB/OL].[2019-03-15].<http://www.fda.gov/cder/guidance/published.html>.
- [3] 邹文博,尹利辉,胡昌勤.拉曼光谱与近红外光谱技术在药品快速分析中的应用[J].中国药房,2018,29(3):416-420.
- [4] 太平惠民和剂局.太平惠民和剂局方[M].刘景源,整理.

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家重点研发计划课题(No.2017YFC1701501)

\* 博士研究生。研究方向:中药质量综合评价、新药研究、中药有效成分分离。E-mail:13589056006@126.com

<sup>#</sup> 通信作者:研究员,博士生导师,硕士。研究方向:中药质量综合评价、新药研究、中药有效成分分离。E-mail:bonianzh@163.com

北京:人民卫生出版社,1985:140.

- [5] 朱贤旬,苏益仁,邹艳贤.华盖散治疗咳嗽变异性哮喘36例[J].光明中医,2014,29(6):1205-1207.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:320-321.
- [7] 牟倩倩,贺敬霞,张建琪,等.近红外漫反射光谱法结合PLS法快速测定红景天药材中水分和红景天苷的含量[J].中国药房,2017,28(30):4260-4264.
- [8] 胡昌勤,冯艳春.近红外光谱法快速分析药品[M].北京:化学工业出版社,2009:147-150.
- [9] 王永香,郑伟然,米慧娟,等.热毒宁注射液青蒿金银花浓缩过程近红外快速定量检测方法的建立[J].中草药,2017,48(1):102-108.
- [10] 雷晓晴,李耿,王秀丽,等.基于近红外光谱法快速测定丹参中5种成分模型的建立[J].中草药,2018,49(11):2653-2661.
- [11] 刘雪松,陈佳善,陈国权,等.近红外光谱法结合自动化控制在感冒灵颗粒浓缩过程中的在线检测技术研究[J].药学学报,2017,52(3):462-467.
- [12] 张叶霞,严国俊,徐佳颜,等.茵栀黄口服液提取过程的近红外光谱在线监测模型和含量测定[J].中药材,2015,38(12):2616-2618.
- [13] 王衮.博济方[M].上海:商务印书馆,1959:15.

(收稿日期:2019-08-11 修回日期:2019-10-17)

(编辑:唐晓莲)

# Study on the Heart Protective Effect of *Panax quinquefolium* Extract Based on Zebra Fish Model

LYU Jing, LI Chen, YANG Longfei, GAO Yan, ZHAO Bonian (College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the heart protective effect of *Panax quinquefolium* extract of Zebra fish. **METHODS:** The drug dosage of *P. quinquefolium* extract and the optimal modeling dose of terfenadine were determined by tolerance test; 24 hours post fertilization (24 hpf), Zebra fish were divided into control group (0.5% dimethyl sulfoxide), model group (2.5  $\mu\text{g/mL}$  terfenadine), positive control group (2.5  $\mu\text{g/mL}$  terfenadine + 30  $\mu\text{g/mL}$  resveratrol) and different mass concentration *P. quinquefolium* extract groups (2.5  $\mu\text{g/mL}$  terfenadine+5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$  *P. quinquefolium* extract, by raw material). 48 h after incubation, the heart rate and sinus venous-bulbus arteriosus (SV-BA) interval of Zebra fish were used as indexes, and the heart injury repair rate was calculated to investigate the heart protection of *P. quinquefolium* extract. Another 24 hpf Zebra fish were divided into blank control group, model group, positive control group, 20 batches of *P. quinquefolium* extract from different producing area groups (5  $\mu\text{g/mL}$ , by raw material), with same administration route and 48 h of incubation. The heart rate, SV-BA interval of heart was determined, heart injury repair rate and heart injury relative repair rate were calculated; the heart protective effect of *P. quinquefolium* extract was further validated. **RESULTS:** Compared with blank control group, heart rate was decreased significantly ( $P<0.01$ ), while SV-BA interval was increased significantly in model group ( $P<0.01$ ). Compared with model group, heart rate of Zebra fish was increased significantly in positive control group and 5, 10, 25  $\mu\text{g/mL}$  *P. quinquefolium* extract groups ( $P<0.01$ ), while SV-BA interval of Zebra fish was shortened significantly in 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  *P. quinquefolium* extract groups ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); heart injury repair rate of Zebra fish in 5  $\mu\text{g/mL}$  *P. quinquefolium* extract group reached 73.77%. In validation test, compared with model group, heart rate was increased significantly ( $P<0.01$ ), while SV-BA interval of Zebra fish was decreased significantly in 20 batches of *P. quinquefolium* extract groups ( $P<0.01$ ); heart injury repair rate ranged 70.45%-85.78%, and heart injury relative repair rate ranged 75.48%-98.12%. **CONCLUSIONS:** *P. quinquefolium* extract has good heart protective effects.

**KEYWORDS** *Panax quinquefolium*; Zebra fish; Heart protection; Sinus venous-bulbus arteriosus; Interval; Heart rate

西洋参为五加科植物西洋参(*Panax quinquefolium* L.)的干燥根,其味甘、微苦,性凉,归心、肺、肾经<sup>[1]</sup>,可补气养阴<sup>[2]</sup>,常用于治疗气虚阴亏型冠心病<sup>[3-4]</sup>。相关研究表明,西洋参通过益气养阴、和血来补益心气<sup>[5]</sup>,可改善冠心病患者经皮冠状动脉介入治疗(PCI)术后的胸闷、心悸、乏力等症状,提高患者生活质量<sup>[6]</sup>。但关于西洋参是否均具有心脏保护作用尚不明确,而且目前常用的心脏功能研究动物模型造模过程操作复杂,不便于进行在体的心脏结构及功能研究,也不适宜进行高通量药材心脏保护活性筛选。斑马鱼是国际认可的新型模式生物<sup>[7]</sup>,具有体型小、心脏发育周期全透明、繁殖周期短、产卵量大、发育迅速等优点<sup>[8]</sup>。基于此,本研究采用特非那定复制斑马鱼心脏损伤模型<sup>[9-10]</sup>,以心脏静脉窦-动脉球(SV-BA)间距为主要指标、心率为辅助指标探讨西洋参提取物的心脏保护作用,并进一步为西洋参提取物心脏保护作用谱-效相关质量评价系统的建立提供药效学基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

SPX-280B-G型光照培养箱(上海基星生物科技有限公司);AGBP210S型电子天平(德国Sartorius公司);Milli-Q IQ7000型纯水机(美国Millipore公司);KDM-A型控温电热套(金坛市医疗仪器厂);GZX-9140MBE型

电热鼓风干燥箱(上海博讯有限公司);KQ2200DV型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);AXIO Zoom.V16型体式显微镜(德国Carl Zeiss公司);FW-80型高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

20批西洋参药材购自安徽省亳州市中药材交易市场,经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定均为真品,其总皂苷含量均符合2015年版《中国药典》(一部)<sup>[11]</sup>规定;特非那定标准品、链酶蛋白酶E(北京索莱宝科技有限公司,批号:607A023、515S021,纯度: $\geq 98\%$ );白藜芦醇标准品(成都普思生物科技股份有限公司,批号:PS000122,纯度: $\geq 98\%$ );其他试剂均为市售分析纯,水为蒸馏水。20批西洋参样品信息见表1。

### 1.3 动物

野生型AB品系斑马鱼,雌雄兼有,由山东省科学院生物所提供。在专用的养殖房内,斑马鱼采用明暗交替方式饲养(光照14 h后避光10 h),循环水及环境温度控制为 $(28.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ,并按雌雄分缸饲养,每日饲喂丰年虾。

## 2 方法与结果

### 2.1 西洋参提取物母液的制备

取西洋参粉末(过三号筛)1 g,精密称定,置于具塞圆底烧瓶中,精密加入70%乙醇50 mL,称定质量,加热

表1 20批西洋参样品信息

Tab 1 Information of 20 batches of *P. quinquefolium* samples

样品编号	批号	部位	产地	总皂苷含量, %
1	2018001	支根	中国山东	4.45
2	2018002	主根	中国山东	2.98
3	2018003	短主根	加拿大魁北克	3.72
4	2018004	短主根	加拿大魁北克	4.22
5	2018005	支根	加拿大魁北克	3.47
6	2018006	支根	中国山东	3.61
7	2018007	支根	中国山东	4.01
8	2018008	主根	美国威斯康辛州	4.62
9	2018009	主根	美国威斯康辛州	4.02
10	2018010	主根	中国吉林	3.83
11	2018011	主根	中国吉林	3.50
12	2018012	主根	中国吉林	3.72
13	2018013	主根片	中国吉林	2.57
14	2018014	主根片	中国吉林	3.75
15	2018015	主根	中国吉林	3.11
16	2018016	短主根	美国威斯康辛州	3.51
17	2018017	大号主根	美国威斯康辛州	3.11
18	2018018	主根	美国威斯康辛州	2.78
19	2018019	细长条主根	美国威斯康辛州	3.16
20	2018020	硬质主根	美国威斯康辛州	2.94

回流提取2 h,放冷,再次称质量,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液25 mL,蒸干。干燥提取物以二甲基亚砜(DMSO)溶解,制成质量浓度为50 mg/mL(以生药量计)的西洋参提取物母液,置于4℃冰箱中保存备用。给药前,取适量母液用蒸馏水稀释为所需质量浓度。

### 2.2 斑马鱼胚胎的收集

实验前将斑马鱼按雌雄比例1:1或1:2放置于产卵缸中,采用隔板将雌雄斑马鱼隔开,次日光照前抽离隔板,使雌雄斑马鱼自由受精。于抽离隔板时计时为0 hpf(Hours post fertilization,受精后时间),抽离隔板后2 h(2 hpf)收集受精卵,置于清洁培养液中滴加适量亚甲基蓝溶液,放置于28℃恒温光照培养箱中孵育至24 hpf。

### 2.3 斑马鱼对西洋参提取物的耐受性考察

将发育至24 hpf的斑马鱼受精卵用1 mg/mL的脱膜剂链酶蛋白酶E脱膜处理,体式显微镜下筛选发育正常的幼鱼,然后置于24孔板中,每孔10条。将实验分为不同质量浓度西洋参提取物组(1、5、10、25、50、100、200、400、800 μg/mL,以生药量计)和空白对照组(0.5% DMSO),每组平行2孔(即每组20条斑马鱼样本)。加盖后将斑马鱼置于28℃恒温光照培养箱中孵育,每隔24 h更换1次新鲜药液或DMSO。记录给药48 h后斑马鱼幼鱼的死亡情况,计算其死亡率,并采用SPSS 23.0统计软件通过回归分析计算西洋参提取物的最低致死质量浓度,考察斑马鱼对西洋参提取物的耐受性。斑马鱼对西洋参提取物的耐受性考察结果见图1。

由图1可知,当西洋参提取物质量浓度≤50 μg/mL

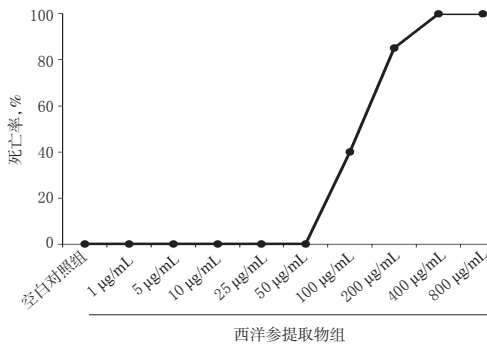


图1 斑马鱼对西洋参提取物的耐受性考察结果

Fig 1 Tolerance result of Zebra fish to *P. quinquefolium* extract

时,斑马鱼幼鱼死亡率均为0;当西洋参提取物质量浓度≥100 μg/mL时,斑马鱼幼鱼死亡率随着西洋参提取物质量浓度的增加而升高。回归分析结果显示,西洋参提取物的最低致死质量浓度为44.18 μg/mL。为了保证实验过程中斑马鱼的正常存量,故将西洋参提取物的给药质量浓度设为5、10、25 μg/mL(以生药量计)进行后续心脏保护作用研究。

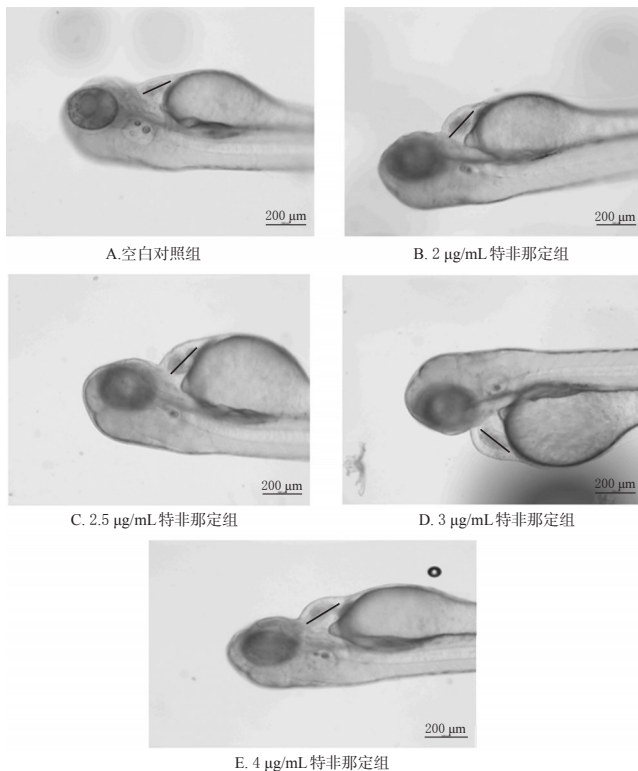
### 2.4 特非那定对斑马鱼心脏形态的影响考察

将发育至24 hpf的斑马鱼受精卵用1 mg/mL链酶蛋白酶E脱膜后,体式显微镜下筛选发育正常的幼鱼,然后随机置于24孔板中,每孔10条。将实验分为不同质量浓度特非那定组(2、2.5、3、4 μg/mL)和空白对照组(0.5% DMSO),每组平行2孔(即每组20条斑马鱼样本)。加盖后将斑马鱼置于28℃恒温光照培养箱中孵育48 h后,采用体式显微镜观察斑马鱼心脏部位的形态变化。采用Image Pro-plus 5.0软件测量斑马鱼心脏SV-BA间距,录像20 s观察其心脏律动及血流情况,以此来筛选特非那定最优心脏损伤造模剂量。在每组20条斑马鱼样本中剔除死亡、畸形以及数据异常的斑马鱼样本,以每组11条斑马鱼为统计学分析样本量( $n=11$ ),采用SPSS 23.0软件进行单因素方差分析和t检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。不同质量浓度特非那定对斑马鱼心脏损伤情况观察结果见图2,对斑马鱼心脏SV-BA间距的影响结果见表2。

结果显示,特非那定给药后引起了斑马鱼心脏损伤,包括心包水肿、血细胞在心房心室堆积、卵黄囊下出现明显淤血、心房心室律动不齐、血流速度减慢等现象,各质量浓度特非那定组斑马鱼心脏SV-BA间距均较空白对照组显著增大( $P<0.05$ ),并且以2.5 μg/mL特非那定组最为明显,故最终选择特非那定的造模剂量为2.5 μg/mL。

### 2.5 西洋参提取物对斑马鱼的心脏保护作用考察

将发育至24 hpf的斑马鱼受精卵用1 mg/mL链酶蛋白酶E脱膜后,体式显微镜下筛选发育正常的幼鱼,然



注:图中线段表示斑马鱼心脏SV-BA间距

Note: line segment in graph means SV-BA interval of Zebra fish heart

图2 不同质量浓度特非那定对斑马鱼心脏损伤情况观察结果

Fig 2 Observation results of different concentrations of terfenadine on heart damage of Zebra fish

表2 不同质量浓度特非那定对斑马鱼心脏SV-BA间距的影响( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

Tab 2 Effects of different concentrations of terfenadine on heart SV-BA interval of Zebra fish ( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

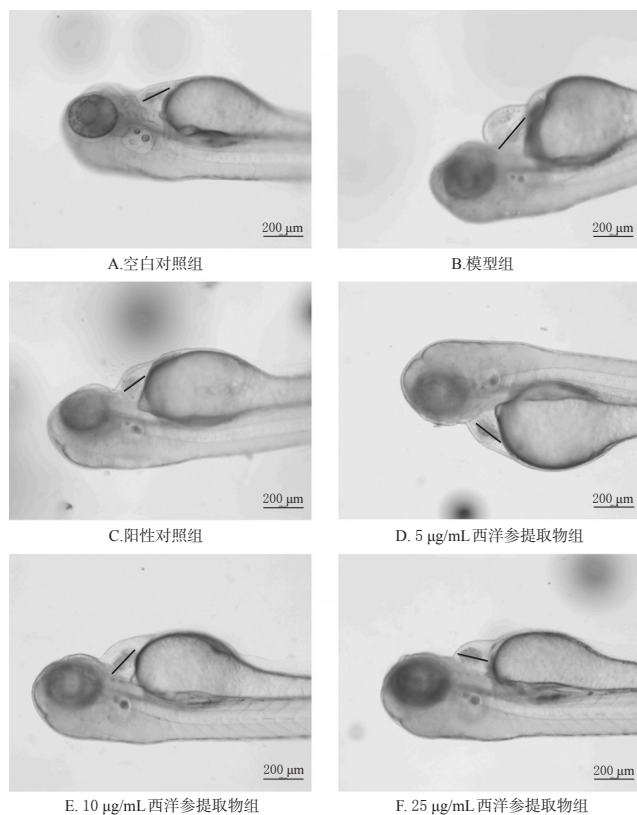
组别	质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	SV-BA间距, $\mu\text{m}$
空白对照组		271.56 $\pm$ 33.63
特非那定组	2	316.23 $\pm$ 22.38*
	2.5	346.29 $\pm$ 35.00**
	3	313.25 $\pm$ 53.12*
	4	317.93 $\pm$ 37.15*

注:与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

后随机置于24孔板中,每孔10条。将实验分为空白对照组(0.5% DMSO)、模型组、阳性对照组(白藜芦醇30  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>[10-11]</sup>和西洋参提取物组(样品批号:20180185, 10、25  $\mu\text{g/mL}$ ,以生药量计),每组平行2孔(即每组20条斑马鱼样本)。除空白对照组外,其余各组均按“2.4”项下方法添加2.5  $\mu\text{g/mL}$ 特非那定,加盖后将斑马鱼置于28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温光照培养箱中孵育48 h后,采用体式显微镜观察斑马鱼心脏部位的形态变化,录像20 s观察其心脏律

动及血流情况。采用Image Pro-plus 5.0软件测量斑马鱼SV-BA间距,并对录像中斑马鱼心跳进行计数以推算其心率,同时计算斑马鱼心脏损伤修复率[心脏损伤修复率(%)=(给药组斑马鱼心脏SV-BA间距-模型组斑马鱼心脏SV-BA间距)/(空白对照组斑马鱼心脏SV-BA间距-模型组斑马鱼心脏SV-BA间距) $\times 100\%$ ]。统计分析方法同“2.4”项下。各组斑马鱼心脏损伤情况观察结果见图3,心率测定结果见表3,心脏SV-BA间距、心脏损伤修复率测定结果见表4。



注:图中线段表示斑马鱼心脏SV-BA间距

Note: line segment in graph means SV-BA interval of Zebra fish heart

图3 各组斑马鱼心脏损伤情况观察结果

Fig 3 Heart damage observation result of Zebra fish in each group

表3 各组斑马鱼心率测定结果( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

Tab 3 Heart rate measurement results of Zebra fish in each group ( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

组别	质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	心率, 次/min
空白对照组		179 $\pm$ 11.32
模型组	2.5	59 $\pm$ 12.02**
阳性对照组	30	137 $\pm$ 13.85 <sup>##</sup>
西洋参提取物组	5	141 $\pm$ 8.86 <sup>##</sup>
	10	111 $\pm$ 8.86 <sup>##</sup>
	25	108 $\pm$ 6.82 <sup>##</sup>

注:与空白对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P < 0.01$

表4 各组斑马鱼心脏SV-BA间距和心脏损伤修复率测定结果( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

Tab 4 Results of heart SV-BA interval and heart injury repair rate of Zebra fish in each group ( $\bar{x} \pm s, n=11$ )

组别	质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	SV-BA间距, $\mu\text{m}$	心脏损伤修复率, %
空白对照组		227.46 $\pm$ 17.54	
模型组	2.5	297.49 $\pm$ 34.28**	
阳性对照组	30	239.64 $\pm$ 42.70 <sup>##</sup>	82.60
西洋参提取物组	5	245.83 $\pm$ 38.60 <sup>##</sup>	73.77
	10	256.77 $\pm$ 51.01 <sup>#</sup>	58.15
	25	267.02 $\pm$ 29.15	52.68

注:与空白对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. blank control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

结果显示,模型组斑马鱼出现了明显的心脏损伤症状,表现为心包水肿、卵黄囊下淤血、心房心室律动不齐、血流速度减慢等;阳性对照组及西洋参提取物各给药组斑马鱼心包水肿和卵黄囊下淤血减轻,心房心室律动趋近整齐,血流速度恢复正常。与空白对照组比较,模型组斑马鱼心率显著降低( $P<0.01$ ),心脏SV-BA间距显著增大( $P<0.01$ ),说明特非那定造成了斑马鱼心脏损伤。与模型组比较,阳性对照组和5、10、25  $\mu\text{g/mL}$ 西洋参提取物组斑马鱼心率显著升高( $P<0.01$ ),阳性对照组和5、10  $\mu\text{g/mL}$ 西洋参提取物组斑马鱼心脏SV-BA间距显著缩短( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),说明西洋参提取物对特非那定引起的斑马鱼心脏损伤具有一定的保护作用,并且以5  $\mu\text{g/mL}$ 西洋参提取物的心脏保护作用最好(心脏损伤修复率达73.77%),故后续研究以此质量浓度进行大样本的心脏保护作用验证实验。

## 2.6 20批不同产地西洋参提取物对特非那定所致斑马鱼心脏损伤的保护作用考察

将发育至24 hpf的斑马鱼受精卵用1 mg/mL链酶蛋白酶E脱膜后,在体式显微镜下筛选发育正常的幼鱼,然后随机置于24孔板中,每孔10条。将实验分为空白对照组(0.5% DMSO)、模型组、阳性对照组和20批不同产地西洋参提取物组(质量浓度均为5  $\mu\text{g/mL}$ ,以生药量计),每组设2个复孔(即每组20条斑马鱼样本)。除空白对照组外,其余各组均按“2.5”项下方法加入2.5  $\mu\text{g/mL}$ 特非那定孵育和相应指标检测及统计分析外,同时计算西洋参提取物组较阳性对照组的心脏损伤相对修复率[心脏损伤相对修复率(%)=西洋参提取物组斑马鱼心脏损伤修复率/阳性对照组斑马鱼心脏损伤修复率 $\times$ 100%]。验证实验中各组斑马鱼心率、心脏SV-BA间距、心脏损伤修复率及心脏损伤相对修复率测定结果见表5(图略)。

表5 验证实验中各组斑马鱼心率、SV-BA间距、心脏损伤修复率及心脏损伤相对修复率测定结果( $n=11$ )

Tab 5 Heart rate, heart SV-BA interval, heart injury repair rate, heart injury relative repair rate of Zebra fish in each group in validation test( $n=11$ )

组别	药材批号	心率( $\bar{x} \pm s$ ), 次/min	SV-BA间距( $\bar{x} \pm s$ ), $\mu\text{m}$	心脏损伤修复率, %	心脏损伤相对修复率, %
空白对照组		190.05 $\pm$ 1.02	249.83 $\pm$ 1.99		
模型组		62.00 $\pm$ 1.21**	274.46 $\pm$ 2.01**		
阳性对照组		162.91 $\pm$ 1.33 <sup>##</sup>	253.40 $\pm$ 1.06 <sup>##</sup>	85.51	
西洋参提取物组	2018001	181.64 $\pm$ 1.73 <sup>##</sup>	255.75 $\pm$ 1.41 <sup>##</sup>	75.96	88.84
	2018002	188.00 $\pm$ 2.56 <sup>##</sup>	254.50 $\pm$ 3.06 <sup>##</sup>	81.05	94.79
	2018003	184.91 $\pm$ 2.34 <sup>##</sup>	253.98 $\pm$ 2.42 <sup>##</sup>	83.17	97.26
	2018004	183.30 $\pm$ 2.29 <sup>##</sup>	254.29 $\pm$ 2.58 <sup>##</sup>	81.91	95.79
	2018005	182.65 $\pm$ 2.29 <sup>##</sup>	254.99 $\pm$ 2.83 <sup>##</sup>	79.07	92.47
	2018006	187.70 $\pm$ 2.97 <sup>##</sup>	253.80 $\pm$ 4.05 <sup>##</sup>	83.90	98.12
	2018007	180.23 $\pm$ 2.99 <sup>##</sup>	256.00 $\pm$ 2.90 <sup>##</sup>	74.97	87.67
	2018008	178.50 $\pm$ 2.62 <sup>##</sup>	254.99 $\pm$ 2.89 <sup>##</sup>	79.07	92.47
	2018009	167.79 $\pm$ 4.12 <sup>##</sup>	256.31 $\pm$ 2.75 <sup>##</sup>	73.71	86.20
	2018010	170.30 $\pm$ 3.03 <sup>##</sup>	255.91 $\pm$ 2.00 <sup>##</sup>	75.33	88.10
	2018011	172.51 $\pm$ 4.70 <sup>##</sup>	255.34 $\pm$ 2.71 <sup>##</sup>	77.65	90.81
	2018012	173.00 $\pm$ 4.12 <sup>##</sup>	255.00 $\pm$ 2.79 <sup>##</sup>	79.03	92.42
	2018013	177.70 $\pm$ 3.55 <sup>##</sup>	254.64 $\pm$ 3.07 <sup>##</sup>	80.49	94.13
	2018014	173.92 $\pm$ 4.46 <sup>##</sup>	255.01 $\pm$ 2.68 <sup>##</sup>	78.99	92.37
	2018015	160.32 $\pm$ 3.53 <sup>##</sup>	289.22 $\pm$ 4.15 <sup>##</sup>	70.45	75.48
	2018016	169.82 $\pm$ 4.96 <sup>##</sup>	275.51 $\pm$ 3.55 <sup>##</sup>	85.78	91.90
	2018017	167.30 $\pm$ 1.60 <sup>##</sup>	281.11 $\pm$ 2.88 <sup>##</sup>	79.51	85.19
	2018018	166.65 $\pm$ 3.86 <sup>##</sup>	245.83 $\pm$ 1.98 <sup>##</sup>	73.77	89.31
	2018019	166.60 $\pm$ 4.84 <sup>##</sup>	282.43 $\pm$ 2.30 <sup>##</sup>	78.04	83.61
	2018020	166.11 $\pm$ 3.30 <sup>##</sup>	252.91 $\pm$ 2.45 <sup>##</sup>	77.04	84.64

注:与空白对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. blank control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$

结果显示,模型组斑鱼表现出了上述心脏损伤症状;阳性对照组和20批不同产地西洋参提取物组斑马鱼以上症状均明显减轻甚至恢复正常。与空白对照组比较,模型组斑马鱼心率显著降低,心脏SV-BA间距显著增大( $P<0.01$ ),说明特非那定造成了斑马鱼心脏损伤。与模型组比较,阳性对照组和20批西洋参提取物组斑马鱼心率均显著升高,心脏SV-BA间距均显著缩短( $P<0.01$ )。通过分析20批西洋参提取物组心脏损伤相对修复率数值可知,由于西洋参的产地及批次不同,所以20批西洋参提取物对斑马鱼心率及心脏SV-BA间距改善作用略有不同,但心脏损伤相对修复率在75.48%~98.12%之间,说明各产地的西洋参提取物均具有一定的心脏保护作用。其中,以批号为2018006的西洋参提取物的心脏保护作用最优,其心脏损伤相对修复率达98.12%。

## 3 讨论

斑马鱼心脏静脉窦是血液进入心房的部位,动脉球

是血液流出心室的部位,心脏 SV-BA 间距最能反映其心脏损伤程度;另外,斑马鱼的心率反映了心脏的泵血功能<sup>[11-12]</sup>。所以,本研究选用斑马鱼心脏 SV-BA 间距为主要指标、心率为辅助指标,考察西洋参提取物对斑马鱼心脏损伤的保护作用。

研究显示,目前具有明确的心脏保护作用或常用于治疗由毒副作用引起的心脏损伤的药物有右丙亚胺、复方丹参滴丸、白藜芦醇等<sup>[13]</sup>。其中,右丙亚胺作为美国 FDA 的批准药物,因价格昂贵,极大地限制了其应用。白藜芦醇作为一种抗氧化剂<sup>[14]</sup>,对冠心病、缺血性心脏病具有防治作用<sup>[15-16]</sup>;尤其在斑马鱼心脏损伤/保护的领域中,考虑到斑马鱼独特的透皮吸收给药方式,白藜芦醇常用作斑马鱼心脏保护药来改善毒副作用引发的的心脏损伤<sup>[17]</sup>。由于复方丹参滴丸独特的质地不适用于斑马鱼给药,所以在前期研究中,笔者比较了丹参原药材、含有丹参提取物的丹红注射液以及白藜芦醇对斑马鱼的心脏保护作用。结果发现丹参及丹红注射液主要通过促进斑马鱼血管生成、扩张血管等作用减轻心脏损伤;而白藜芦醇可改善斑马鱼心脏 SV-BA 间距、心率及血流情况,具有直接的心脏保护作用,并且其心脏保护的作用途径与西洋参提取物类似,这更有利于作为对照物研究西洋参提取物心脏保护作用机制和作用靶点,故本研究最终选择白藜芦醇作为阳性对照药。

在本研究中,2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的特非那定可明显造成斑马鱼心脏损伤。阳性对照药白藜芦醇和 5、10、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的西洋参提取物作用后,斑马鱼心脏损伤情况均不同程度地改善,其心包水肿和卵黄囊下淤血减轻、血流速度恢复正常、心脏 SV-BA 间距显著缩短、心率显著升高,并且以 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  西洋参提取物作用后效果最为明显(心脏损伤修复率为 73.77%)。在验证实验中,由于用于实验研究的西洋参产地、批次较多,不可能通过 1 次实验就完成验证,而每次实验用于配对产卵的斑马鱼存在个体差异,这导致了所产的鱼卵状态不同,对同一质量浓度的同一种药物反应也不同,故心脏 SV-BA 间距及心率测量值也会有一定差异。所以为了减少斑马鱼个体误差及操作误差,在参考相关文献<sup>[10-11]</sup>后,针对多批次西洋参提取物心脏保护作用的评价,本研究以每次实验中阳性对照组斑马鱼心脏损伤修复率作为参比,计算心脏损伤相对修复率作为西洋参提取物心脏保护药效评价指标,实现高通量药材药效评价的目的。本研究结果显示,20 批西洋参提取物(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,以生药量计)对斑马鱼的心脏损伤相对修复率在 75.48%~98.12% 之间,提示其均具有一定的心脏保护作用。

综上所述,本研究利用斑马鱼模型,以心脏 SV-BA 间距为主要指标、心率为辅助指标,证实了西洋参提取物具有一定的心脏保护作用,且方法稳定、结果可靠。

但是西洋参提取物心脏保护的药效物质基础及西洋参提取物心脏保护作用的谱-效关系还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:131-132.
- [2] 尚金燕,李桂荣,邵明辉,等.西洋参的药理作用研究进展[J].人参研究,2016,28(6):49-51.
- [3] 林红强,李平亚,刘金平.野生西洋参鉴别、化学成分及药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2017,29(12):2157-2162.
- [4] 张蕾,段文慧,刘剑刚,等.西洋参赤芍配伍对大鼠心肌梗死后早期心室重构心肌纤维化的影响[J].中药新药与临床药理,2019,30(4):430-437.
- [5] 张颖.西洋参茎叶总皂苷对绝经后女性冠心病患者的血管保护效应及机制研究[D].北京:中国中医科学院,2013.
- [6] 王璐卓.西洋参胶囊联合西药基础治疗对冠心病 PCI 术后气阴两虚患者的临床疗效研究[D].兰州:甘肃中医药大学,2015.
- [7] 韩利文,袁延强,何秋霞,等.斑马鱼模型在中药活性筛选中的适用性研究[J].中草药,2011,42(10):2037-2041.
- [8] 侯林,周芹芹,崔清华,等.不同分子量段全蝎蛋白对转基因斑马鱼血管生成的影响[J].中国药房,2015,26(25):3490-3492.
- [9] 李智平,韩利文,何秋霞,等.原花青素对特非那定诱导的斑马鱼心脏损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2017,33(3):54-57.
- [10] 杨龙飞,赵渤年,丁晓彦,等.基于斑马鱼模型的丹参促血管生成及心脏损伤保护作用的研究[J].中华中医药杂志,2018,33(6):2620-2624.
- [11] 杨龙飞,赵渤年,丁晓彦,等.丹参水溶性成分促斑马鱼血管生成及心脏保护活性的谱-效关系研究[J].中草药,2019,50(12):2899-2907.
- [12] 薛迪.斑马鱼血管抑制和心脏损伤模型的构建及研究[D].太原:山西医科大学,2016.
- [13] 高霏.右丙亚胺和白藜芦醇对阿霉素致心脏毒性的实验研究[J].中医临床研究,2019,11(20):3-5.
- [14] 郑晓英,朱深银.白藜芦醇血管保护作用的研究进展[J].中国药房,2013,24(11):1053-1056.
- [15] 薛丽娟,张文龙,李灵芝.白藜芦醇苷对心脏缺血再灌注损伤大鼠的保护作用[J].中成药,2019,41(2):451-453.
- [16] 谭小田,张志敏,贾磊,等.白藜芦醇苷对糖尿病小鼠心肌损伤的保护作用及机制研究[J].现代生物医学进展,2018,18(9):1669-1673.
- [17] 薛迪,韩利文,杨继芳,等.白藜芦醇对阿司咪唑诱导斑马鱼心脏损伤的保护作用[J].山东科学,2015,28(3):29-33.

(收稿日期:2019-09-25 修回日期:2019-11-17)

(编辑:林 静)