

西黄丸及其拆方药味对斑马鱼胚胎血管生成的影响

陈锡强^{1,2}, 侯海荣^{1,2}, 刘可春^{1,2*}, 王思锋^{1,2}, 王希敏^{1,2}, 韩利文^{1,2}

1. 山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014
2. 山东省科学院 生物研究所, 山东 济南 250014

摘要: 目的 研究西黄丸中具有抑制血管生成活性的组方药味。方法 采用发育时间为 24 h 的血管荧光标记转基因斑马鱼胚胎作为模型, 荧光显微镜下观察 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西黄丸甲醇提取物及其组方药味人工牛黄、人工麝香、乳香和没药甲醇提取物 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 给药 24 h 后对斑马鱼节间血管 (IV) 形成的影响。结果 人工麝香、没药提取物对斑马鱼 IV 数量无影响, 人工牛黄组 IV 数为 22.67 ± 2.60 , 抑制率为 17.3%; 乳香提取物组 IV 数分别为 17.2 ± 5.71 , 抑制率为 37%; 与对照组比较, 人工牛黄、乳香提取物具有显著的抑制斑马鱼 IV 生成的作用 ($P < 0.05$ 或 0.01)。结论 乳香与人工牛黄是西黄丸中具有抑制血管生成作用的主要药味。

关键词: 西黄丸; 拆方研究; 斑马鱼; 荧光标记; 胚胎; 血管生成

中图分类号: R285.5; R293 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)01-0050-04

Effect of Xihuang Pills and its decomposed formula on zebrafish embryonic angiogenesis

CHEN Xi-qiang^{1,2}, HOU Hai-rong^{1,2}, LIU Ke-chun^{1,2}, WANG Si-feng^{1,2}, WANG Xi-min^{1,2}, HAN Li-wen^{1,2}

1. Key Laboratory for Biosensors of Shandong Province, Jinan 250014, China
2. Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To study the component herbs for angiogenesis inhibition in Xihuang Pills. **Methods** Using 24 h vascular fluorescent transgenic zebrafish embryos as model, with fluorescent microscope the effects of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Xihuang Pills' methanol extracts and four herbs methanol extracts which are artificial *Bovis Calculus*, artificial moschus, frankincense, and myrrh methanol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the zebrafish intersegmental vessels (IV) angiogenesis were observed in administration of 24 h. **Results** Extract of artificial musk and myrrh had no effect on zebrafish IV angiogenesis, IV number in artificial *Bovis Calculus* group was 22.67 ± 2.60 , inhibition rates was 17.3%; IV number in frankincense group were 17.2 ± 5.71 , inhibition rates was 37%. Artificial *Bovis Calculus* and frankincense could inhibit zebrafish IV angiogenesis significantly ($P < 0.05$ or 0.01) compared with the non-treated group. **Conclusion** The frankincense and artificial *Bovis Calculus* are main herbs in the Xihuang Pills that could inhibit angiogenesis.

Key words: Xihuang Pills; separated prescriptions; zebrafish; fluorescent labelling; embryo; angiogenesis

西黄丸又名“犀黄丸”, 是清代王洪绪《外科全生集》中的代表方, 由牛黄、麝香、乳香、没药4味中药组成, 具有消坚化结、解毒散痈、消肿止痛的功效, 用于乳岩、横痃、瘰疬、痰核、流注等外科疮疡病^[1]。目前西黄丸临床较多地用于乳腺癌、肝癌、白血病等恶性肿瘤的治疗^[2-3]。本研究室的前期研究表明西黄丸具有抑制血管生成的作用^[4]。本实验将进一步考察了西黄丸及其拆方对斑马鱼节间血管 (intersegmental vessel, IV) 生成的影响。

1 材料

Olympus SZX—16 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), 恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司)。

转基因血管荧光斑马鱼 (VEGFR2: GFP, 本实验室繁殖)。人工牛黄、人工麝香、乳香和没药购自山东建联中药有限公司, 经山东省科学院生物研究所宋广运研究员鉴定; 西黄丸购自浙江天一堂药业有限公司 (批号 081042)。

收稿日期: 2010-09-19

基金项目: 山东省科学院科技发展基金项目 (SY2007BS10)

作者简介: 陈锡强 (1972—), 博士, 研究方向为天然产物抗肿瘤筛选。E-mail: cxqq_1972@163.com

* 通讯作者 刘可春 (1964—) 博士, 研究员, 研究方向为天然药物活性筛选。Tel: (0531)82605352 E-mail: hliukch@keylab.net

麻醉剂 Tric-aïne (MS222, Sigma 公司)。DMSO、甲醇、三卡因均为分析纯；水为双蒸水；斑马鱼培养水配方为 5 mmol/L NaCl, 0.17 mmol/L KCl, 0.14 mmol/L CaCl₂, 0.16 mmol/L MgSO₄。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取 100 g 西黄丸颗粒, 粉碎, 过 80 目筛, 300 mL 甲醇冷浸提取 3 次, 每次浸提 5 d, 合并上清液, 回收甲醇, 浓缩, 挥干, 减压干燥, 得西黄丸提取物 4.6 g; 用 0.1% DMSO 配制成质量浓度为 500 μg/mL 的西黄丸甲醇提取物溶液, 4 °C 保存, 备用。

人工牛黄、乳香、没药的提取方式与西黄丸颗粒的相同; 分别用 DMSO 配制成质量浓度为 200 μg/mL 的溶液, 冷藏, 备用。取人工麝香 20 g, 以 100 mL 甲醇冷浸提取 3 次, 每次浸提 5 d, 合并提取液, 回收甲醇, 浓缩, 挥干, 减压干燥后, 用甲醇溶解, 配制成质量浓度为 200 μg/mL 的麝香提取物溶液, 冷藏, 备用。

2.2 斑马鱼胚胎的准备

斑马鱼的养殖和培育参照 Westerfield^[5]的方法。选择成熟的雌雄斑马鱼一对, 傍晚时分放入繁殖缸中, 待次日早晨产卵后取出受精卵, 单独放入 28 °C 光照培养箱中孵化, 备用。

2.3 分组与给药

斑马鱼胚胎于孵化 24 h 后取出, 置于 1 mg/mL 链霉菌蛋白酶溶液中数分钟后, 用吸管吹去胚胎卵膜。

将脱膜胚胎随机分为对照组、DMSO 组、西黄丸、人工麝香、人工牛黄、没药、乳香提取物组, 每组 10 个; 分别加入 96 孔板中, 每孔 1 个。

按分组不同, 分别向各孔加入 30 μL 蒸馏水、1% DMSO、500 μg/mL 西黄丸提取物溶液、200 μg/mL 人工麝香、人工牛黄、没药、乳香提取物溶液, 随后分别加入培养水至 300 μL。

2.4 胚胎培养及指标观察

给药后将 96 孔板放入 28 °C 恒温培养箱中培养; 24 h 后取出, 每孔取出 30 μL 培养液, 加入 0.1% 三卡因溶液 30 μL 麻醉鱼体; 随后用吸管吸出鱼体, 放于载玻片上, 在荧光显微镜下观察斑马鱼的生长状况及血管荧光强弱, 拍照并对 IV 进行计数。

2.5 数据处理

各药物对斑马鱼胚胎血管生成的抑制作用以抑制率表示。应用统计软件 SPSS 11.5 处理数据, 组间比较采用方差分析和 *t* 检验。

抑制率 = (对照组平均血管数 - 实验组平均血管数) / 对照组平均血管数 × 100%

3 结果

各组实验结果见表 1, 荧光照片见图 1。可见对照组, DMSO 组, 人工麝香、没药提取物组的斑马鱼 IV 生成良好, 无缺失, 无断裂, 荧光强。西黄丸、人工牛黄、乳香提取物组的斑马鱼胚胎均出现 IV 明显缺失、断裂现象, 血管数减少, 荧光强度减弱。

表 1 西黄丸及其组方药味对斑马鱼胚胎 IV 生成的影响

Table 1 Effect of Xihuang Pills and its decomposed formulas on zebrafish IV angiogenesis

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	血管数	抑制率/%
对照组	—	27.4 ± 1.34	—
DMSO 组	0.1	28.0 ± 1.35	0
西黄丸提取物组	50	19.4 ± 5.60*	29.2
人工麝香提取物组	20	27.1 ± 1.04	1.1
人工牛黄提取物组	20	22.7 ± 2.60*	17.3
没药提取物组	20	26.5 ± 1.85	3.2
乳香提取物组	20	17.2 ± 5.71**	37.2

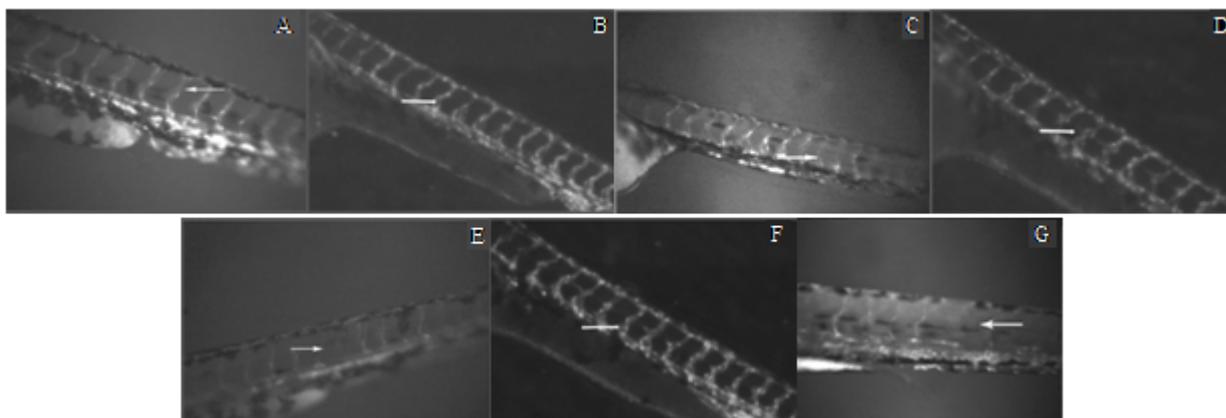
与对照组相比: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs control group

4 讨论

斑马鱼是近年来逐渐深入研究的模式动物^[6-7], 在斑马鱼胚胎发育初期其胚胎透明, 可直接观察到

各组织器官。由于斑马鱼节间血管 (intersegmental vessel, IV) 生成的方式比较简单, 与肿瘤血管生成方式类似, 且在显微镜下就能够观察到 IV、血流和



A-对照组 B-DMSO 组 C-西黄丸组 D-人工麝香组 E-人工牛黄 F-没药组 G-乳香组
A-control group B-DMSO group C-Xihuang Pills group D-artificial moschus group E-artificial Bovis Calculus group F-myrrh group

图 1 西黄丸及其组方药味对斑马鱼胚胎 IV 生成的影响

Fig. 1 Effect of Xihuang Pills and its decomposed formulas on zebrafish IV angiogenesis

红细胞的形态，因而常常用于血管形成和血液类疾病的药物筛选^[8-9]。血管荧光标记的转基因斑马鱼可以在显微镜下清晰地进行 IV 计数，通过考察药物对血管生成的影响，能够快捷地计算抑制率。

利用斑马鱼模型优势，本研究室对近 200 种常见中药材和中成药的提取物进行了抑制血管生成活性筛选，发现了一些具有抑制血管生成活性的中药材，同时还发现一些抗肿瘤中成药的药理作用，包括抑制新血管生成活性，西黄丸就是具有这样作用的中成药之一。实验中终体积分数为 0.1% 的甲醇对斑马鱼胚胎发育的影响可以忽略^[10]。实验结果提示，西黄丸的抑制血管生成作用与单味中药材的活性密切相关。人工牛黄、乳香提取物都显示出了明显的抑制血管生成的作用，其中乳香甲醇提取物对斑马鱼胚胎 IV 生成的抑制率达到了 30% 以上。肖娟及 Mark 等^[11-12]的研究报道发现乳香挥发油具有体外抑制肿瘤细胞增殖的作用；有研究报道天然乳香中的 11-羧基-β-乙酰乳香酸具有抑制基质金属蛋白酶（MMPs）的作用，较高浓度时对 MMP-1、MMP-2 的活性有抑制作用，低浓度时对 MMP-9 活性有抑制作用，并呈剂量相关性^[13]。MMPs 不仅能通过降解细胞外基质（ECM）而促进血管的生成，而且 MMP-2、MMP-9 和 MMP-14 可直接调节血管的生成，内皮细胞生长因子（VEGF）的分泌也受 MMPs 的调节^[14]。本实验的结果与报道基本一致。人工牛黄提取物对血管荧光标记的斑马鱼胚胎 IV 的生成具有抑制作用，其机制还缺乏必要的研究，是否与乳香提取物具有协同作用有待进一步揭示。

实验表明，荧光标记血管的转基因斑马鱼适用于抑制血管生成活性的中成药及其药材的筛选评价，利用此模型有助于研究中成药的抗肿瘤作用机制，为研究抑制血管生成的新复方提供了思路；同时可以对名方中最佳的药材剂量配伍关系进行验证，为中成药的精简增效，新组方的发掘，复方的二次开发等提供新的工具。

参考文献

[1] 王洪绪. 外科证治全生集 [M]. 第 11 卷. 上海: 上海科学技术出版社, 2009.
[2] 何欣, 黄立中. 犀黄丸临床应用及实验研究 [J]. 湖南中医药导报, 2003, 9(4): 82-84.
[3] 张衡, 张建英, 付艳梅, 等. 西黄消瘤胶囊治疗食管癌 112 例临床研究 [J]. 河北中医, 2006, 28(7): 496-497.
[4] 王思锋, 王希敏, 刘可春, 等. 西黄丸对斑马鱼胚胎血管形成的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(10): 821-823.
[5] Westerfield M, Wegner J, Jegalian B G. Specific activation of mammalian Hox promoters in mosaic transgenic zebrafish [J]. *Genes Dev*, 1992, 6(4): 591-598.
[6] Rubinstein A L. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery [J]. *Drug Discov Develop*, 2003, 6(2): 218-223.
[7] 韦英杰, 宁青, 贾晓斌, 等. 基于斑马鱼模型的中药代谢研究思路与方法 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1009-1011
[8] Cross L M, Cook M A, Lin S, et al. Rapid analysis of angiogenesis drugs in a live fluorescent zebrafish assay [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 911-912.
[9] Mirella B, Domenico R, Stefania N, et al. Antiangiogenic

- and vascular-targeting activity of the microtubule-destabilizing trans-resveratrol derivative 3,5,4-trimethoxy-stilbene [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67: 1451-1459.
- [10] 王思锋, 王希敏, 候海荣, 等. 有机溶剂对血管生成斑马鱼模型的适用性研究 [J]. *实验动物与比较医学*, 2008, 28(4): 238-241.
- [11] 肖娟, 刘选明, 颜冬兰, 等. 乳香挥发油抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞株增值及诱导凋亡的作用 [J]. *中国天然药物*, 2007, 5(1): 68-72.
- [12] Mark B K, Qing Y, Jeanette O, *et al.* Frankincense oil derived from *Boswellia carteri* induces tumor cell specific cytotoxicity [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2009, 9(6): 1472-1482.
- [13] Liang Y H, Li P, Huang Q F, *et al.* Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid regulates the activities of matrix metalloproteinases-1,-2,-9 [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2009, 25(10): 2004-2011.
- [14] 曹晓林, 吴正虎. 基质金属蛋白酶与肿瘤血管生成相关性研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2007, 36(11): 105-106.

《中草药》杂志 2011 年征订启事

《中草药》杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级期刊, 月刊, 国内外公开发行人。本刊创刊于 1970 年 1 月, 1992 年荣获首届全国优秀科技期刊评比一等奖; 2001 年荣获中国期刊方阵“双奖期刊”; 2003 年荣获第二届国家期刊奖; 2005 年荣获第三届国家期刊奖提名奖; 2004—2009 年连续 6 年荣获“百种中国杰出学术期刊”; 2008 年度荣获“中国精品科技期刊”; 2009 年荣获“新中国 60 年有影响力的期刊”。本刊为中国中文核心期刊、中国科技核心期刊。多年来一直入选“CA 千刊表”, 并被美国《国际药学文摘》(IPA)、荷兰《医学文摘》(EM)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《质谱学通报(增补)》(MSB-S)、荷兰《斯高帕斯数据库》(Scopus)、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JST)、《英国皇家化学学会系列文摘》(RSC)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD) 等国际著名检索系统收录。本刊主要报道中草药化学成分; 药剂工艺、生药炮制、产品质量、检验方法; 药理实验和临床观察; 药用动、植物的饲养、栽培、药材资源调查等方面的研究论文, 并辟有中药现代化论坛、综述、新产品、企业介绍、学术动态和信息等栏目。

承蒙广大作者、读者的厚爱和大力支持, 本刊稿源十分丰富。为了缩短出版周期, 增加信息量, 2011 年本刊由 A4 开本每期 168 页扩版为 208 页, 定价 35.00 元。国内邮发代号: 6—77, 国外代号: M221。请到当地邮局订阅。欢迎广大作者踊跃投稿, 欢迎广大读者订阅, 欢迎与中外制药企业合作, 宣传推广、刊登广告(包括处方药品广告)。

中草药杂志社在线投稿、审稿、查询系统于 2010 年 1 月开通, 欢迎广大读者、作者、编委使用。

《中草药》杂志编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号

邮编: 300193

电话: 022-27474913 23006821

传真: 022-23006821

邮箱: zcy@tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行

账号: 44114010010081504

户名: 天津中草药杂志社

网址: www.中草药杂志社. 中国

www.tiprpress.com