

## 安宫牛黄丸防治脑血管疾病作用研究

朱晓宇<sup>1,2</sup>, 郭胜亚<sup>2</sup>, 徐懿乔<sup>2</sup>, 杨华<sup>1</sup>, 李萍<sup>1\*</sup>, 李春启<sup>2\*</sup>

1. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009;

2. 杭州环特生物科技股份有限公司, 浙江 杭州 310051

**摘要:** **目的** 利用斑马鱼模型评价安宫牛黄丸防治脑血管疾病的药效。**方法** 辛伐他汀诱导斑马鱼脑出血模型, 评价安宫牛黄丸脑出血保护作用; 花生四烯酸诱导血栓模型, 评价其血栓预防作用; 辛伐他汀诱导微血管缺失模型, 评价其促血管再生作用; 用三氯化铝诱导阿尔茨海默病 (AD) 模型, 评价安宫牛黄丸对 AD 斑马鱼运动障碍恢复作用和反应能力的改善作用。**结果** 与模型组比较, 27.8、83.3 和 250  $\mu\text{g/mL}$  安宫牛黄丸脑出血保护率分别为 11%、41% 和 48%, 83.3 和 250.0  $\mu\text{g/mL}$  组脑出血发生率显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 质量浓度为 333 和 1 000  $\mu\text{g/mL}$  的安宫牛黄丸斑马鱼心脏红细胞染色强度显著增加 ( $P < 0.001$ ), 111、333 和 1 000  $\mu\text{g/mL}$  组的血栓预防率分别为 5%、33% 和 64%; 质量浓度为 11.1、33.3 和 100.0  $\mu\text{g/mL}$  的安宫牛黄丸斑马鱼肠下血管面积与模型组比较均显著上升 ( $P < 0.001$ ), 其促血管再生率分别为 21%、25% 和 26%; 质量浓度为 111、333 和 1 000  $\mu\text{g/mL}$  的安宫牛黄丸组斑马鱼运动速度与模型组比较均显著提高 ( $P < 0.05$ 、0.01), 其运动障碍恢复率分别为 48%、88%、78%; 安宫牛黄丸 111、333 和 1 000  $\mu\text{g/mL}$  反应能力改善率分别为 15%、82%、75%, 其中 333 和 1 000  $\mu\text{g/mL}$  组与模型组比较差异显著 ( $P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 安宫牛黄丸能预防脑出血、预防血栓形成、重建血管微循环, 对 AD 的运动功能障碍和反应能力具有改善作用。

**关键词:** 斑马鱼; 安宫牛黄丸; 阿尔茨海默病 (AD); 脑出血; 血栓; 促血管再生

**中图分类号:** R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)08-1067-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.08.005

## Therapeutic effects of Angong Niu Huang Pills on cerebrovascular diseases in Zebrafish models

ZHU Xiao-yu<sup>1,2</sup>, GUO Sheng-ya<sup>2</sup>, XU Yi-qiao<sup>2</sup>, YANG Hua<sup>1</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, LI Chun-qi<sup>2</sup>

1. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Hunter Biotechnology Inc, Hangzhou 310051, China

**Abstract: Objective** To investigate preventive and therapeutic effects of Angong Niu Huang Pills (ANP) on cerebrovascular diseases in Zebrafish models. **Methods** Zebrafish cerebral hemorrhage was induced by treatment with simvastatin, thrombosis by arachidonic acid, blood vessel loss by simvastatin, and Alzheimer's disease (AD) by  $\text{AlCl}_3$ . Zebrafish models were treated with ANP by direct drug soaking at various concentrations. **Results** ANP had a significantly preventive effect on Zebrafish cerebral hemorrhage with an efficacy of 11%, 41%, and 48% at concentrations of 27.8, 83.3, and 250  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and the incidence of cerebral hemorrhage in 83.3 and 250  $\mu\text{g/mL}$  groups decreased significantly compared with model group ( $P < 0.001$ ). Compared with model group, the red cell staining intensity of Zebrafish in 333 and 1 000  $\mu\text{g/mL}$  groups increased significantly ( $P < 0.001$ ), and the thrombus prevention rates of 111, 333, and 1000  $\mu\text{g/mL}$  groups were 5%, 33%, and 64% respectively. Compared with model group, the intestinal vascular area of Zebrafish in ANP 11.1, 33.3, and 100.0  $\mu\text{g/mL}$  groups increased significantly ( $P < 0.001$ ), and the rate of angiogenesis was 21%, 25% and 26% respectively. ANP promoted dyskinesia recovery by 48%, 88%, and 78%, and improved response efficiency by 15%, 82% and 75%, respectively in AD zebrafish at concentrations of 111, 333, and 1000  $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusions** Our results in this study support ANP as a preventive and therapeutic medicine for cerebral hemorrhage, cerebral ischemia, thrombosis and AD.

**Keywords:** Zebrafish; Angong Niu Huang Pills; Alzheimer's disease; cerebral hemorrhage; thrombosis; angiogenesis

收稿日期: 2016-10-11

基金项目: 浙江省科技重大专项 (2014C03009)

作者简介: 朱晓宇 (1985—), 女, 博士, 中级工程师, 从事药理毒理研究。Tel: (0571)83782173 Email: zxy@zhunter.com

\*通信作者 李萍 (1960—), 女, 博士, 教授, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室主任, 从事中药及天然药物有效成分发现和质量评价研究。Tel: (025)83271379 Email: liping2004@126.com

李春启 (1963—), 男, 博士, 教授级高级工程师, 从事药理毒理研究。Tel: (0571)83782173 Email: jackli@zhunter.com

安宫牛黄丸由牛黄、犀角、麝香、珍珠、朱砂、雄黄、黄连、黄芩、栀子、郁金、冰片等12味中药组成<sup>[1]</sup>，具有脑保护<sup>[2-4]</sup>、清热<sup>[5-6]</sup>、抗惊厥、镇静、抗炎消肿等药理作用<sup>[7-8]</sup>。临床研究证实，安宫牛黄丸治疗脑卒中、卒中昏迷及卒中闭锁总有效率均在85%以上，其能用于治疗各种急性脑血管病，如脑卒中、脑缺血、脑出血、中风昏迷等，能有效抑制血小板聚集，预防血栓形成<sup>[1]</sup>。作为一个疗效显著、家喻户晓的百年老药，在功效研究方面，质和量都存在很大差距，目前缺乏有力的实验证据。

斑马鱼血管与神经系统在分子信号通路上与人和哺乳动物的同源性达到85%以上，近年来广泛用于血管与神经疾病研究领域<sup>[9-10]</sup>。斑马鱼作为模式动物具有很多优势：胚胎透明，可同时观察分析多个器官，实验周期短，样本容量大，结果可信度高，所需费用低，已成功应用于药效学、毒理学及药物代谢等方面的研究<sup>[11-17]</sup>。本课题组已经成功建立并验证了斑马鱼阿尔兹海默症(AD)<sup>[18]</sup>和血栓模型<sup>[19-20]</sup>，并优化了斑马鱼脑出血和促血管再生模型<sup>[21-23]</sup>。本研究应用斑马鱼模型，评价了安宫牛黄丸对AD的防治作用、脑出血保护作用、预防血栓作用和促血管再生作用。

## 1 材料

### 1.1 药品及主要试剂

安宫牛黄丸(杭州胡庆余堂药业有限公司,批号14011091,规格3g/丸);辛伐他汀(日本TCI公司,批号404-520-2,纯度为97%);黄芪甲苷、花生四烯酸、阿司匹林、三氯化铝、淫羊藿苷(上海晶纯实业有限公司,批号分别为G1325036、F1418031、059K0199、F1211008、I141014,纯度分别为98%、99%、99%、99%、98%);多奈哌齐(加拿大TRC公司,批号120011-70-3,纯度为98%);邻联茴香胺(美国Sigma公司,批号MKBG4648V,纯度为98%)。

### 1.2 主要仪器

解剖显微镜(SZX7, OLYMPUS, Japan);电动聚焦连续变倍荧光显微镜(AZ100, Nikon);行为分析仪(V3, ViewPoint Life Sciences公司);精密电子天平(CP214, OHAUS, America);尼康NIS-Elements D 3.10高级图像处理软件。

### 1.3 实验动物

实验用斑马鱼,为野生型AB系、黑色素等位基因突变型Albino系、转基因血管荧光斑马鱼,

来源于杭州环特生物科技股份有限公司。胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行,在28℃条件下用养鱼用水孵育胚胎(养鱼用水水质:每1升反渗透水中加入200mg速溶海盐,电导率为480~510μS/cm;pH为6.9~7.2;硬度为53.7~71.6mg/L CaCO<sub>3</sub>)。本研究实验单位杭州环特生物科技股份有限公司,已获得实验动物使用许可证SYXK(浙)2012-0171,并通过国际AAALAC认证(001458)。

## 2 方法

### 2.1 对脑出血的保护作用评价

根据预试验,得到安宫牛黄丸对斑马鱼脑出血模型的最大耐受浓度(MTC)为250.0μg/mL,药效学评价浓度设为27.8、83.3、250.0μg/mL(分别为1/9MTC、1/3MTC和MTC)。

随机选取野生型AB系斑马鱼于六孔板中,每孔30尾,用0.5μmol/L辛伐他汀诱导24h建立斑马鱼脑出血模型,同时分别水溶给予安宫牛黄丸27.8、83.3和250.0μg/mL浓度、阳性对照药淫羊藿苷3μmol/L浓度,同时设置对照组和模型组,对照组斑马鱼不做任何处理,模型组斑马鱼水溶给予0.5μmol/L辛伐他汀处理24h。样品处理结束后,分析统计斑马鱼脑出血尾数和脑出血发生率(S)。安宫牛黄丸对斑马鱼脑出血的保护率计算公式如下:

$$\text{脑出血保护率} = (S_{\text{模型}} - S_{\text{给药}}) / (S_{\text{模型}} - S_{\text{对照}})$$

### 2.2 对血栓的预防作用评价

根据预试验,得到安宫牛黄丸对斑马鱼血栓模型的MTC为1000μg/mL,药效学评价浓度设为111、333、1000μg/mL(分别为1/9MTC、1/3MTC和MTC)。

随机选取黑色素等位基因突变型Albino系斑马鱼于六孔板中,每孔30尾,分别水溶给予安宫牛黄丸111、333、1000μg/mL、阳性对照药阿司匹林22.5μg/mL,每孔3mL溶液,同时设置对照组和模型组。给药3h后,水溶给予80μmol/L花生四烯酸处理1.5h诱发斑马鱼血栓模型,用邻联茴香胺进行染色,染色后每个实验组随机选取10尾斑马鱼在解剖显微镜下拍照并采集数据,用NIS-Elements DTM图像处理软件进行图像分析,根据杭州环特生物科技股份有限公司专利<sup>[24]</sup>计算斑马鱼心脏红细胞染色强度(S),安宫牛黄丸预防血栓的作用计算公式如下:

$$\text{血栓预防率} = (S_{\text{给药}} - S_{\text{模型}}) / (S_{\text{对照}} - S_{\text{模型}})$$

### 2.3 促血管再生作用评价

根据预试验, 得到安宫牛黄丸对斑马鱼微血管缺失模型的 MTC 为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 药效学评价浓度设为 11.1、33.3、100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (分别为 1/9 MTC、1/3 MTC 和 MTC)。

随机选取转基因血管荧光斑马鱼于六孔板中, 每孔 30 尾, 用 60 nmol/L 辛伐他汀诱导建立微血管缺失模型, 3 h 后移除, 分别水溶给予安宫牛黄丸 11.1、33.3、100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和阳性对照药黄芩甲苷 23.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每孔 3 mL 药液, 同时设置对照组和模型组。安宫牛黄丸处理 45 h 后, 每组随机取 10 条斑马鱼在显微镜下观察肠下血管面积 ( $S$ ), 安宫牛黄丸对斑马鱼的促血管再生作用计算公式如下:

$$\text{促血管再生率} = (S_{\text{给药}} - S_{\text{模型}}) / S_{\text{模型}}$$

### 2.4 对 AD 斑马鱼的防治作用评价

根据预试验, 得到安宫牛黄丸对斑马鱼 AD 模型的 MTC 为 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 药效学评价浓度设为 111、333、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (分别为 1/9 MTC、1/3 MTC 和 MTC)。

随机选取野生型 AB 系斑马鱼于六孔板中, 每孔 30 尾, 用 120  $\mu\text{mol}/\text{L}$  三氯化铝处理 48 h 诱发 AD 斑马鱼, 同时分别水溶给予安宫牛黄丸 111、333、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和阳性对照药多奈哌齐 8  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 每孔 3 mL 药液, 同时设置对照组和模型组。给药 3 d 后, 用行为分析仪分别观察记录各实验组在 60 min 内 3 个明暗周期 (即黑暗 10 min、光照 10 min 交替 3 个周期) 的运动速度, 分析斑马鱼 60 min 的运动速度 ( $D$ ) 和速度差值 ( $S$ )。安宫牛黄丸对 AD 斑马鱼运动障碍的恢复作用和反应能力的改善作用计算公式如下:

$$\text{运动障碍恢复率} = (D_{\text{给药}} - D_{\text{模型}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{模型}})$$

$$\text{反应能力改善率} = (S_{\text{给药}} - S_{\text{模型}}) / (S_{\text{对照}} - S_{\text{模型}})$$

### 2.5 数据处理

用 GraphPad Prim5.0 软件进行统计学分析, 统计学处理结果用  $\bar{x} \pm s$  表示; 计数资料采用卡方检验; 计量资料用方差分析和 Dunnett's T-检验进行统计学分析。

## 3 结果

### 3.1 对脑出血的保护作用

模型组斑马鱼脑出血尾数为 27/30 尾, 脑出血发生率为 90%; 淫羊藿苷组脑出血尾数为 18/30 尾, 脑出血发生率为 60%, 其脑出血保护率为 33%。

质量浓度为 27.8、83.3、250.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的安宫牛黄丸斑马鱼脑出血尾数分别为 24、16、14 尾, 脑出血发生率分别为 80%、53%、46%, 与模型组比较, 83.3 和 250.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量组差异显著 ( $P < 0.001$ ), 其脑出血保护率分别为 11%、41%、48%, 表明安宫牛黄丸对斑马鱼脑出血具有明显的保护作用。结果见表 1。

表 1 安宫牛黄丸对脑出血斑马鱼的保护作用

Table 1 Preventive efficacy of ANP on Zebrafish cerebral hemorrhage

组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	脑出血发 生率/%	脑出血保 护率/%
对照	—	0	—
模型	—	90	0
淫羊藿苷	3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	60**	33
安宫牛黄丸	27.8	80	11
	83.3	53***	41
	250.0	46***	48

与模型组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

### 3.2 对血栓的预防作用

如表 2 所示, 阳性对照药阿司匹林斑马鱼心脏红细胞染色强度 (1 526 像素) 与模型组 (613 像素) 比较差异显著 ( $P < 0.001$ ), 其斑马鱼血栓预防率为 65%。质量浓度为 111、333 和 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的安宫牛黄丸斑马鱼心脏红细胞染色强度分别为 687、1075 和 1515 像素, 与模型组比较, 333、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量组差异显著 ( $P < 0.001$ ), 血栓预防率分别为 5%、33% 和 64%。

表 2 安宫牛黄丸处理后预防血栓定量结果 ( $n = 10$ )

Table 2 Preventive efficacy of ANP on Zebrafish thrombosis ( $n = 10$ )

组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	心脏红细胞染 色强度/像素	血栓预防 率/%
对照	—	2 015 $\pm$ 42	—
模型	—	613 $\pm$ 53###	—
阿司匹林	22.5	1 526 $\pm$ 69***	65
安宫牛黄丸	111	687 $\pm$ 37	5
	333	1 075 $\pm$ 45***	33
	1 000	1 515 $\pm$ 43***	64

与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \*\*\* $P < 0.001$

### $P < 0.001$  vs control group; \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

### 3.3 促血管再生作用

与模型组 (22 276 像素) 比较, 阳性对照药黄芪甲苷组斑马鱼肠下血管面积显著增加 ( $P < 0.05$ ), 其促血管再生率为 14%。质量浓度为 11.1、33.3、100.0  $\mu\text{g/mL}$  的安宫牛黄丸斑马鱼肠下血管面积分别为 26 939、27 942、28 139 像素, 与模型组比较差异显著 ( $P < 0.001$ ), 其促血管再生率分别为 21%、25% 和 26%。结果见表 3。

### 3.4 对 AD 斑马鱼的防治作用

阳性对照药多奈哌齐运动速度 (4.09 mm/s) 与模型组 (3.06 mm/s) 比较差异显著 ( $P < 0.01$ ), 其运动障碍恢复作用为 88%。浓度为 111、333 和 1 000  $\mu\text{g/mL}$  的安宫牛黄丸组斑马鱼运动速度分别为 3.61、4.08、3.96 mm/s, 与模型组比较差异显著 ( $P < 0.05$ 、0.01), 其运动障碍恢复率分别为 48%、88%、78%。

阳性对照药多奈哌齐速度差值 (2.74 mm/s) 与模型组 (2.26 mm/s) 比较差异显著 ( $P < 0.01$ ), 其反应能力恢复率为 86%, 说明 8  $\mu\text{mol/L}$  多奈哌齐对

AD 斑马鱼的反应能力有改善作用。安宫牛黄丸 111、333、1 000  $\mu\text{g/mL}$  速度差值分别为 2.35、2.71、2.67 mm/s, 其中 333 和 1 000  $\mu\text{g/mL}$  剂量组与模型组比较差异显著 ( $P < 0.05$ 、0.01), 其反应能力改善率分别为 15%、82%、75%, 说明安宫牛黄丸对 AD 斑马鱼具有防治作用。结果见表 4。

表 3 安宫牛黄丸的促血管再生作用 ( $n = 10$ )

Table 3 Promotion of ANP on Zebrafish hemangiogenesis ( $n = 10$ )

组别	浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	肠下血管 面积/像素	促血管再 生率/%
对照	—	28 478±536	—
模型	—	22 276±858 <sup>###</sup>	—
黄芪甲苷	23.5	25 567±1081 <sup>*</sup>	14 <sup>*</sup>
安宫牛黄丸	11.1	26 939±788 <sup>***</sup>	21 <sup>***</sup>
	33.3	27 942±766 <sup>***</sup>	25 <sup>***</sup>
	100.0	28 139±764 <sup>***</sup>	26 <sup>***</sup>

与对照组比较: <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$

<sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group

表 4 安宫牛黄丸对 AD 斑马鱼运动障碍的恢复、反应能力的改善作用 ( $n = 15$ )

Table 4 Effect of ANP on dyskinesia recovery rate and reaction ability of AD Zebrafish ( $n = 15$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	运动速度/ $(\text{mm}\cdot\text{s}^{-1})$	运动障碍恢复率/%	速度差值/ $(\text{mm}\cdot\text{s}^{-1})$	反应能力改善率%
对照	—	4.22±0.24	—	2.81±0.15	—
模型	—	3.06±0.18 <sup>##</sup>	—	2.26±0.07 <sup>##</sup>	—
多奈哌齐	8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	4.09±0.16 <sup>**</sup>	88 <sup>**</sup>	2.74±0.10 <sup>**</sup>	86 <sup>**</sup>
安宫牛黄丸	111	3.61±0.16 <sup>*</sup>	48 <sup>*</sup>	2.35±0.11	15
	333	4.08±0.26 <sup>**</sup>	88 <sup>**</sup>	2.71±0.14 <sup>**</sup>	82 <sup>**</sup>
	1 000	3.96±0.20 <sup>*</sup>	78 <sup>*</sup>	2.67±0.15 <sup>*</sup>	75 <sup>*</sup>

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

## 4 讨论

斑马鱼在靶点鉴别、疾病模型及毒性评价中应用广泛<sup>[11-17]</sup>。本研究利用斑马鱼模型, 针对安宫牛黄丸功效主治中对脑血管疾病的作用, 从脑出血保护、血栓预防、促血管再生和 AD 防治作用 4 个方面探讨安宫牛黄丸的功效。

有研究表明他汀类药物用于斑马鱼胚胎后干扰三羟三甲基辅酶 A 还原酶 (HMGCR) 正常功能, 引起发育阶段的斑马鱼颅内出血<sup>[25]</sup>, 其机制可能是由于 HMGCR 作用被抑制, 介导的下游信号途径受到干扰, 从而使成血管细胞聚集成新生血管的过程减弱, 使得血管脆弱易渗漏甚至破裂<sup>[26]</sup>。研究表明淫羊藿能够减轻阿托伐他汀诱导的斑马鱼颅内出血, 因此选择淫羊藿作为治疗脑出血的阳性对照药物<sup>[21]</sup>。

大量动物实验证实长时间摄入过量铝能引起动

物大脑铝含量增加, 学习记忆能力下降, 出现与 AD 病理过程相似的形态学改变<sup>[27]</sup>。多奈哌齐是一种胆碱酯酶抑制剂, 可有效选择性抑制中枢神经系统中乙酰胆碱的降解, 增加神经细胞突触间隙乙酰胆碱的浓度, 改善痴呆患者的记忆和智能状态<sup>[28]</sup>, 因此选择多奈哌齐作为防治 AD 的阳性对照药物。

血小板膜磷脂在磷脂酶 A2 作用下可产生花生四烯酸, 后者在环氧酶的作用下生成环内过氧化物, 环内过氧化物在血栓素合成酶作用下生成 TXA2, TXA2 可激活血小板, 促使血小板聚集形成血栓<sup>[29]</sup>, 阿司匹林可通过抑制环氧酶、阻断花生四烯酸代谢、减少 TXA2 生成而发挥抗血小板聚集作用<sup>[30]</sup>, 因此选择阿司匹林作为防治血栓形成的阳性对照药物。

体外和体内研究表明辛伐他汀能够抑制鸡胚尿囊膜的血管形成, 能够抑制注射了成纤维生长因子

的大鼠角膜的血管形成。辛伐他汀抑制血管形成的机制主要是通过抑制 Rho 的牛儿基牛儿酯化,进而抑制血管内皮生长因子受体的焦磷酸化,发挥抗血管生成作用。同时,辛伐他汀能下调 NF- $\kappa$ B 的活性,影响 uPA、MMP9 的表达,从而抑制血管生成<sup>[31]</sup>。黄芪甲苷是黄芪中提取的天然产物,已有斑马鱼在体实验表明,黄芪甲苷能够促进血管内皮生长因子受体抑制剂引起的体节间血管、肠下血管缺失的新生,经细胞实验证实,其作用机制与刺激细胞的增殖和迁移、促进伤口愈合相关<sup>[32-33]</sup>。

临床观察证实,安宫牛黄丸治疗脑血管疾病疗效确切,安宫牛黄丸能促进脑出血患者清醒、增加存活率等<sup>[34-36]</sup>。付宪文等<sup>[36]</sup>研究发现,安宫牛黄丸对大鼠脑出血后脑损害有保护作用。杨文清等<sup>[37]</sup>发现,安宫牛黄丸能明显减少大鼠脑出血急性期脑组织中 NO 含量,明显降低一氧化氮合酶(NOS)活性,对脑出血急性期的大脑具有保护作用。殷妮娜等<sup>[38-39]</sup>发现,安宫牛黄丸能有效地抑制大鼠脑出血后脑组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达,减轻脑水肿,抑制脑出血后炎症反应。刘宗涛等<sup>[40-41]</sup>和董世芬等<sup>[1]</sup>发现,安宫牛黄丸可以改善全血黏度、血浆黏度,保护缺血性大鼠脑损伤。本研究证实,安宫牛黄丸对斑马鱼脑出血具有显著的保护作用;能有效抑制花生四烯酸诱导的血小板聚集,预防血栓形成;并且能够促进微血管再生,重建微循环,提示对脑缺血有治疗作用。

叶世龙等<sup>[42]</sup>通过对急性脑损伤动物模型脑组织、脑电波、单胺类和氨基酸类神经递质的研究,发现安宫牛黄丸能明显降低大鼠脑出血后脑含水量,改善神经功能障碍和意识障碍,有明显的脑电波激活作用,调节海马区乙酰胆碱和单胺类神经递质的含量<sup>[43-44]</sup>。谢裕华<sup>[45]</sup>和徐震<sup>[46]</sup>等发现安宫牛黄丸能保护血脑屏障,修复受损的神经系统。临床研究也证实安宫牛黄丸能明显改善患者的神经功能损伤,恢复意识障碍。本研究利用斑马鱼 AD 模型评价了安宫牛黄丸对 AD 的防治作用,发现安宫牛黄丸不仅能恢复 AD 斑马鱼运动功能障碍,而且显著提高 AD 斑马鱼反应能力,其作用机制是否与安宫牛黄丸调节脑内神经递质、修复损伤的神经功能相关,值得进一步研究。

本研究通过斑马鱼实验证实安宫牛黄丸能预防脑出血,预防血栓形成,重建血管微循环,对 AD 的运动功能障碍和反应能力也有改善作用。本研究

结果为安宫牛黄丸的进一步研究开发提供借鉴,安宫牛黄丸作为复方中药制剂,其治疗脑血管疾病和 AD 的功效与机制可能较复杂,尚需深入研究。

#### 参考文献

- [1] 董世芬,楼黎明,张硕峰,等. 安宫牛黄丸(含天然麝香或人工麝香)对实验性脑缺血的保护作用 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013(1): 85-90.
- [2] 匡宇,郜彦. 安宫牛黄丸在中风阳闭证中的应用 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(2): 155-156.
- [3] 刘宗涛,刘江,李继斌,等. 安宫牛黄丸对实验性大鼠脑缺血模型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 188-191.
- [4] 张云桥,刘远新. 安宫牛黄丸对出血性中风大鼠的实验研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(5): 574-576.
- [5] 石景洋,唐学敏. 安宫牛黄丸治疗中枢性高热 37 例临床观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(4): 692-693.
- [6] 代兴斌,蒋楠,魏学礼,等. 安宫牛黄丸治疗热毒炽盛证不明原因发热 24 例 [J]. 中国中医急症, 2011, 20(10): 1695-1696.
- [7] 张锋,陆远富,刘杰,等. 雄黄是安宫牛黄丸抗细菌脂多糖诱导神经胶质细胞致炎作用的有效成分 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3333-3338.
- [8] 郑铁军. 安宫牛黄丸治疗颅脑外伤昏迷疗效观察 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(2): 294-295.
- [9] 鲍丙浩,谢尚论,宋彬锋,等. 血液和心血管疾病研究的重要模式生物——斑马鱼 [J]. 发育医学电子杂志, 2014, 2(3): 135-138.
- [10] 陈侃,王长谦. 模式生物斑马鱼在心血管疾病研究中的应用 [J]. 自然杂志, 2013, 35(1): 64-72.
- [11] He J H, Guo S Y, Zhu F, et al. A Zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2013, 67(1): 25-32.
- [12] Yang R, Lao Q C, Yu H P, et al. Tween-80 and impurity induce anaphylactoid reaction in Zebrafish [J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(3): 295-301.
- [13] Xua M, Lao Q C, Zhao P, et al. 6'-O-Caffeoylarbutin inhibits melanogenesis in Zebrafish [J]. Nat Prod Res, 2014, 28(12): 932-934.
- [14] Zhou J, Guo S Y, Zhang Y, et al. Human prokinetic drugs promote gastrointestinal motility in Zebrafish [J]. Neurogastroenterol Motil, 2014, 26(4): 589-595.
- [15] McGrath P, Li C Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. Drug Discov Today, 2008, 13(9-10): 394-401.
- [16] Zhu J J, Xu Y Q, He J H, et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish [J]. J Appl Toxicol, 2014, 34(12): 1215-1222.

- 2014, 34(2): 139-148.
- [17] 郭殿武, 周娟, 唐礼可, 等. 斑马鱼高血脂模型在山青之片质量控制中的应用研究[J]. 中国药品标准, 2013, 14(4): 255-255.
- [18] Huang W, Li C, Shen Z, et al. Development of a Zebrafish model for rapid drug screening against Alzheimer's disease [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016(4): 162-173.
- [19] 朱晓宇, 刘洪翠, 俞航萍, 等. 神香苏合丸防治心血管疾病的实验研究 [J]. 浙江理工大学学报: 自然科学版, 2016, 35(7): 630-635.
- [20] Zhu X Y, Liu H C, Guo S Y, et al. A Zebrafish thrombosis model for assessing antithrombotic drugs [J]. *Zebrafish*, 2016, 13(4):335-344.
- [21] 李春梅. 淫羊藿苷减轻阿伐他汀诱导的斑马鱼颅内出血 [J]. 遵义医学院学报, 2014, 37(2): 181-182.
- [22] Shen M, Yu H, Li Y, et al. Discovery of Rho-kinase inhibitors by docking-based virtual screening [J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9(6):1511-1521.
- [23] Tang J Y, Li S, Li Z H, et al. Calycosin promotes angiogenesis involving estrogen receptor and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in zebrafish and HUVEC [J]. *Plos One*, 2009, 5(7): 1-14.
- [24] 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 [P]. 中国专利: CN102266313A, 2011-05-17.
- [25] Liang J, Wang J, Azfer A, et al. A novel CCCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(10): 6337-6346.
- [26] 周继红, 章蕊. 同型半胱氨酸对血管内皮细胞凋亡和核因子- $\kappa$ B 活化的影响 [J]. 蚌埠医学院学报, 2011, 36(2): 117-120.
- [27] 蒲韵竹. 斑马鱼阿尔茨海默病动物模型的建立 [D]. 西南大学, 2013.
- [28] 杨南竹, 贡相华, 周玉颖, 等. 多奈哌齐治疗阿尔茨海默病的系统评价 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(1): 61-66.
- [29] Zhou L, Schmaier A H. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field [J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 123(2):172-183.
- [30] O'Brien J R, Butterfield W J H. Aspirin in the prevention of thrombosis [J]. *Amer Heart J*, 1973, 86(5):711-712.
- [31] Park H J, Kong D, Iruela AL, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA [J]. *Circ Res*, 2002, 91(2): 143-150.
- [32] Zhang Y, Hu G, Li S, et al. Pro-angiogenic activity of astragaloside IV in HUVECs *in vitro* and Zebrafish *in vivo* [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5: 805-811.
- [33] Li S, Lou S, Lei B U, et al. Transcriptional profiling of angiogenic activity of calycosin in Zebrafish [J]. *Mol Biosyst*, 2011, 7(11): 3112-3121
- [34] 李丹, 李秀明, 周宁. 安宫牛黄丸的药理作用及临床新应用 [J]. 海军医学杂志, 2007, 28(2): 179.
- [35] 邓玲玲, 田莉, 王洪才. 安宫牛黄丸及其演化方剂的临床研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 215.
- [36] 付宪文, 赵继宗, 王硕. 安宫牛黄丸对大鼠自发性脑出血模型血肿周围脑组织氨基酸表达及超微结构的影响研究 [J]. 河北医学, 2007, 13(2): 224.
- [37] 杨文清, 任玉录, 郭克锋, 等. 安宫牛黄丸对急性脑出血大鼠脑组织中一氧化氮合酶及单胺类神经递质的影响 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(1): 83.
- [38] 殷妮娜, 孟运莲, 王秋桂. 安宫牛黄丸对大鼠脑出血后血肿周围脑组织含水量的影响[J]. 咸宁学院学报: 医学版, 2007, 21(3) : 196.
- [39] 殷妮娜, 王秋桂, 甘云波, 等. 安宫牛黄丸对大鼠脑出血后 MMP-9 表达的影响 [J]. 咸宁学院学报: 医学版, 2010, 24(1): 1.
- [40] 刘宗涛, 沙地克, 沙吾提, 等. 安宫牛黄丸对实验性大鼠脑缺血的保护作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(6): 710.
- [41] 刘宗涛, 刘江, 李继斌. 安宫牛黄丸对实验性大鼠脑缺血模型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 188.
- [42] 叶世龙, 刘爱芹. 安宫牛黄丸的实验药理学研究[J]. 中华中医药学刊, 2011(9): 1954-1957.
- [43] 方芳, 孙建宁, 杨莉, 等. 安宫牛黄丸全方及简方对大鼠脑出血损伤的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(9): 611-614.
- [44] 付宪文, 孙异临, 党国义, 等. 安宫牛黄丸对脑出血大鼠脑组织超微结构的影响 [J]. 河北中医药学报, 2008, 23(1): 39-41.
- [45] 谢裕华, 朱温锐. 安宫牛黄丸对脑外伤后血脑屏障损伤及脑水肿作用机制的研究 [J]. 国际医药卫生导报, 2010, 16(17): 2077.
- [46] 徐震, 黄李法, 戴亚光, 等. 安宫牛黄丸对脑外伤大鼠脑内载脂蛋白 E 合成的调节 [J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(4): 487.