

基于斑马鱼模型的蟾酥甲醇提取物抑制血管生成和抗炎活性研究

朱成悦^{1,2}, 张姗姗^{1,2}, 杨 飞^{1,2}, 张长青^{1,2}, 刘可春^{1,2}, 张 云^{1,2*}

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103

2. 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

摘 要: 目的 对蟾酥甲醇提取物中化学成分进行初步分析, 并利用斑马鱼模型评价其抑制血管生成及抗炎活性。方法 采用液质联用(LC-MS)技术, 用反相C₁₈色谱柱, 以0.1%甲酸溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾-三重四级杆飞行时间质谱正/负离子双重扫描方式, 对提取物中的样品进行分析; 采用受精后24 h(24 hpf)绿色荧光标记血管的转基因斑马鱼作为实验动物模型, 荧光显微镜下观察背部节间血管生成情况, 计算节间血管长度, 研究PTK787(阳性药, 0.2 μg/mL)和蟾酥甲醇提取物2、4、6 μg/mL浓度对斑马鱼血管生成的影响; 采用受精后3 d(3 dpf)健康绿色荧光标记炎症细胞的转基因斑马鱼作为实验动物模型, 设置对照组、模型(CuSO₄, 20 μmol/L)组、布洛芬(阳性药, 20 μmol/L)组和蟾酥甲醇提取物(0.4、0.8 μg/mL)组, 计数神经丘周围炎症细胞个数。结果 蟾酥甲醇提取物中共检测出33个色谱峰, 并鉴定出其中7个为结合型蟾蜍二烯酸内酯。与对照组比较, 蟾酥甲醇提取物4、6 μg/mL浓度组斑马鱼血管生成受到抑制, 血管长度变短, 具有显著性差异($P < 0.05$ 、 0.01); 与对照组比较, CuSO₄模型组斑马鱼迁移到神经丘侧线部位的炎症细胞数量显著增多($P < 0.01$); 与模型组比较, 蟾酥甲醇提取物0.8 μg/mL组炎症细胞迁移减少, 具有显著差异($P < 0.01$)。结论 通过LC-MS法从蟾酥甲醇提取物中鉴定出7个结合型蟾蜍二烯酸内酯, 蟾酥甲醇提取物具有抑制血管生成和抗炎活性。

关键词: 蟾酥; 甲醇提取物; 斑马鱼; 血管生成; 抗炎; 蟾蜍二烯酸内酯

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)07-1392-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.07.005

Antiangiogenic and anti-inflammatory activities of methanol extract of *Bufo venenosus* based on zebrafish model

ZHU Chengyue^{1,2}, ZHANG Shanshan^{1,2}, YANG Fei^{1,2}, ZHANG Changqing^{1,2}, LIU Kechun^{1,2}, ZHANG Yun^{1,2}

1. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

2. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Jinan 250103, China

Abstract: Objective To preliminarily analyze the chemical constituents in methanol extract of *Bufo venenosus* (MEBV), and to evaluate its anti-angiogenesis and anti-inflammatory activities in zebrafish. **Methods** A reversed-phase C₁₈ column with 0.1% formic acid solution-acetonitrile as mobile phase was used for gradient elution by liquid-mass spectrometry (LC-MS). The samples were analyzed by electrospray and triple quadrupole time-of flight mass spectrometry (TFMS) with positive/negative ion dual scanning. The transgenic zebrafish with green fluorescent protein (GFP) labeled blood vessels at 24 hpf (hours post fertilization) were used as the experimental animal model. The angiogenesis of back internode was observed under fluorescent microscope, the development of dorsal longitudinal anastomotic vessel (DLAV) and the length of inter-segmental blood vessels (ISV) were measured to study the effects of MEBV (2, 4, and 6 μg/mL) and PTK787 (positive medicine, 0.2 μg/mL) on zebrafish angiogenesis at different concentrations. The transgenic zebrafish with GFP labeled inflammatory cells on 3 dpf (days post fertilization) were used to study the effect of MEBV on inflammatory response by counting the number of inflammatory cells around the neuromast. The control group, model group (CuSO₄, 20 μmol/L), ibuprofen group (positive drug, 20 μmol/L) and MEBV (0.4 and 0.8 μg/mL) groups were set. **Results** A total of 33 chromatographic peaks were detected in methanol extract of toad venom, and seven of them were conjugated bufadienolides. In the experiment of antiangiogenesis, the formation of new blood vessels were inhibited at the

收稿日期: 2021-05-27

基金项目: 山东省优秀青年人才基金项目(ZR2020YQ60); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-ZD08)

第一作者: 朱成悦(1996—), 女, 硕士, 研究方向为基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。Tel: (0531)82605331 E-mail: xijingzhu@126.com

*通信作者: 张 云(1982—), 女, 博士, 研究员, 主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。Tel: (0531)82605331

E-mail: xiaohan_0818@163.com

concentration of 4 and 6 $\mu\text{g/mL}$, and the vascular development was not complete and the length of ISV was significantly decreased ($P < 0.05$ and 0.01). The results of anti-inflammatory experiment showed that compared with model group, the migration of inflammatory cells in zebrafish at the concentration of 0.8 $\mu\text{g/mL}$ was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Seven Bufonadienolides were identified by LC-MS from the MEBV. *Bufo venenum* has anti-angiogenesis and anti-inflammatory activities. **Key words:** *Bufo venenum*; methanol extract; zebrafish; antiangiogenesis; anti-inflammatory activity; conjugated bufadienolides

蟾酥是我国的传统中药,为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 耳后腺或皮肤腺的干燥分泌物,主要产于山东、河北、江苏、湖南、浙江、四川等地,其性温、味辛,有毒,具有解毒、消肿、止痛、开窍醒神之功效^[1]。现代药理研究表明,蟾酥具有极强的镇痛、强心、免疫调节、抗炎和抗肿瘤等作用,可用于治疗多种恶性肿瘤、慢性乙型肝炎、急慢性呼吸道感染等疾病^[2-3],临床应用广泛。但目前针对蟾酥的研究多集中在蟾酥制剂的活性研究,对于蟾酥甲醇提取物的体内抑制血管生成和抗炎活性评价少有报道。

斑马鱼是一种重要的脊椎动物模式生物,其基因组与人类的基因同源序列高达87%,且在进化上高度保守^[4]。斑马鱼具有个体小、繁殖周期短、产卵量多、胚胎透明且易于培养的优点,使实验能在短期内进行,并易于观察药物对机体功能的影响,在疾病模型构建和药物活性筛选中应用广泛。本研究采用绿色荧光标记血管和炎症细胞的转基因斑马鱼模型来分别评价蟾酥甲醇提取物的抑制血管和抗炎活性作用。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

蟾酥购自安徽亳州,经山东省中医药研究院林惠彬研究员鉴定为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor; 甲醇(分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);硫酸铜(CuSO_4 , 国药集团化学试剂有限公司);布洛芬(Ibuprofen, 上海源叶生物科技有限公司,规格为5 g,质量分数 $\geq 98\%$,批号 H01S9Z69098);链酶蛋白酶E(北京索莱宝科技有限公司);PTK787(Selleckchem 公司);绿色荧光标记血管的转基因斑马鱼 Tg(VEGFR2:GFP)和绿色荧光标记炎症细胞的转基因斑马鱼 Tg(zlyz:EGFP)由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。

1.2 主要仪器

Agilent Technologies 6530 Q-TOF LC/MS 电喷雾三重四级杆飞行时间高分辨质谱仪(美国 Agilent Technologies 公司);Agilent Technologies 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies 公司);

SZX16 型荧光显微镜及 DP2-BSW 图像采集系统、X51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器有限公司);IE204E 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);Forma 3111 型水套式 CO_2 培养箱(美国 Forma 公司);斑马鱼养殖饲养设备(北京爱生科技公司)。

2 方法

2.1 斑马鱼的饲养和胚胎收集

雌雄斑马鱼在照明 14 h/黑暗 10 h、28 $^{\circ}\text{C}$ 标准条件下分开饲养。在实验前 1 d 取健康性成熟的雌雄斑马鱼,按雌雄 1:1 或者 1:2 的比例放入产卵缸,隔板分开。次日雌雄斑马鱼交配产卵,2 h 后获得受精卵。对受精卵进行消毒和洗涤后移入斑马鱼胚胎培养用水(含 5.0 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl_2 、0.16 mmol/L MgSO_4)中,28 $^{\circ}\text{C}$ 下控光培养。

2.2 甲醇提取物的制备

称取蟾酥适量,用研钵充分研磨,过 100 目筛,即得蟾酥细粉。精密称取蟾酥细粉 10 g,加入甲醇 500 mL,加热回流提取 2 h,滤过,滤液减压蒸干,即得甲醇提取物。

2.3 LC-MS 的分析条件

色谱条件:Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱;流动相:0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B),进行梯度洗脱,梯度洗脱条件为 0~10 min,95%~72%(A);10~30 min,72%~46%(A);30~50 min,46%~5%(A);柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;体积流量 0.6 mL/min;进样量 10 μL 。

质谱条件:电喷雾离子源,正/负离子模式检测,质量扫描范围 m/z 50~1 500,毛细管电压为 3 500 V,锥孔电压为 30.00 V,离子源温度为 350 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气体体积流量为 10 L/min,脱溶剂温度为 500 $^{\circ}\text{C}$,离子能为 0.5 eV。

供试品溶液的制备:临用前精密称取提取物适量,甲醇溶解配成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,取 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.4 抑制血管生成活性评价研究

在受精卵发育 24 h 时,使用链酶蛋白酶 E(1.0 mg/mL)脱去卵膜,移入 24 孔培养板中,每孔 10 枚,设 2 个重复孔。设置对照组(斑马鱼胚胎培养用

水)、PTK787组(阳性药,0.2 $\mu\text{g/mL}$)和蟾酥甲醇提取物2、4、6 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组。将各组斑马鱼胚胎置于光照培养箱(28 $^{\circ}\text{C}$)继续培养,在受精后48 h时,荧光显微镜拍照记录斑马鱼节间血管发育情况,利用Image Pro Plus软件计算各组斑马鱼节间血管长度。

2.5 抗炎活性评价研究

在受精卵发育至3 dpf时,在体视显微镜下挑选正常的斑马鱼胚胎,移入24孔培养板中,每孔10枚,每次每组2个重复孔。设置对照组、模型(CuSO_4 ,20 $\mu\text{mol/L}$)组、布洛芬(阳性药,20 $\mu\text{mol/L}$)组和蟾酥甲醇提取物(0.4、0.8 $\mu\text{g/mL}$)组。给药后将24孔板置于光照培养箱(28 $^{\circ}\text{C}$)让胚胎继续发育,对照组和模型组分别加培养水至2 mL,孵育2 h后,除对照组外,用20 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 处理斑马鱼,继续在28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光培养1 h。荧光显微镜下观察炎症细胞分布,计数神经丘周围炎症细胞个数。

2.6 数据处理

数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学差异通过SPSS 13.0软件 t 检验来检测分析。

3 结果

3.1 蟾酥甲醇提取物成分分析

蟾酥提取物中成分相似,相互干扰,因此先对液相色谱条件中所用的洗脱体系进行了考察(乙腈-水、甲醇-水、乙腈-甲酸水及乙腈-乙酸等),使成分更好的分离,最终采用“2.3”项下LC-MS分析条件对蟾酥甲醇提取物的化学成分进行分析,总离子流色谱图见图1。蟾酥甲醇提取物中,共检测出33个色谱峰,分别根据正、负离子模式下各峰精确相对分子质量,对此33个色谱峰的分子式进行初步推测,结果见表1。通过将质谱信息与文献比对,初步鉴定了其中7个成分,分别为保留时间19.806 min的蟾蜍它里定-3-丁二酸-精氨酸-酯(hellebrigenin-3-suberate-arginine-ester)、20.595 min的 hellebrige-glutarate-arginine、20.695 min的蟾毒它灵-3-丁二酸-精氨酸-酯(gamabufotalin-3-suberate-arginine-ester)、20.784 min的远华蟾毒精-3-丁二酸-精氨酸-酯(telocinobufagin-3-suberate-arginine-ester)、24.731 min的蟾毒灵-3-己二酸-精氨酸-酯(bufalin-3-adipate-arginine ester)、25.098 min的华蟾蜍毒醇-3-丁二酸-精氨酸-酯(cinobufaginol-3-succinate-arginine ester)以及28.099 min的华蟾蜍精-3-丁二酸-精氨酸-酯(cinobufagin-3-succinate-arginine ester),为结合型蟾蜍二烯酸内酯,需要通过蟾酥甲醇提取物进行进一步分离及分析,才能鉴定其余各成分。

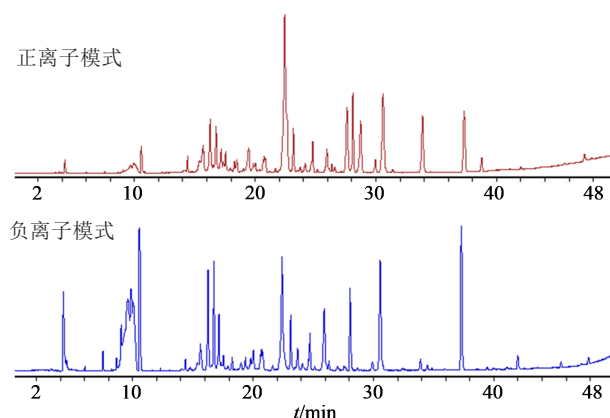


图1 蟾酥甲醇提取物总离子流色谱图

Fig. 1 Total ions chromatogram of methanol extract of toad venom

表1 蟾酥甲醇提取物LC-MS信息

Table 1 LC-MS profile of methanol extract of toad venom

编号	t/min	负离子 m/z	正离子 m/z	分子式
1	7.531	603.311 7	605.326 2	$\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{NO}_{10}\text{S}_2$
		625.292 4	627.303 1	
2	10.587	989.561 0	991.585 0	$\text{C}_{57}\text{H}_{82}\text{O}_{14}$
3	14.380	500.264 0	502.280 5	$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_8\text{O}_2$
4	15.358	573.297 6	575.316 1	$\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_9$
5	15.625	600.390 3	566.434 0	$\text{C}_{18}\text{H}_{46}\text{N}_{18}\text{O}_3$
6	15.703	573.298 5	575.317 3	$\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_9$
7	16.270	723.502 5	701.492 4	$\text{C}_{34}\text{H}_{64}\text{N}_9\text{O}_5$
8	16.758	836.586 7	792.601 8	$\text{C}_{34}\text{H}_{75}\text{N}_{14}\text{O}_7$
9	17.171	949.672 0	927.656 5	$\text{C}_{44}\text{H}_{94}\text{N}_3\text{O}_{15}$
10	17.337	671.329 6	673.347 0	$\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_{12}\text{O}_2$
11	17.538	1062.752	1 040.747 2	$\text{C}_{53}\text{H}_{103}\text{N}_5\text{O}_{13}$
12	19.016	685.378 8	687.396 8	$\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{N}_{11}\text{O}_4$
13	19.361	699.360 7	701.381 4	$\text{C}_{24}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_{17}$
14	19.806	727.392 6	729.406 3	hellebrigenin-3-suberate-arginine-ester ^[5] , $\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{10}$
15	20.595	727.392 4	729.407 6	hellebrige-glutarate-arginine ^[5] , $\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{10}$
16	20.695	713.411 3	715.423 2	gamabufotalin-3-suberate-arginine-ester ^[5] , $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_9$
17	20.784	713.379 7	715.399 9	telocinobufagin-3-suberate-arginine-ester ^[5] , $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_9$
18	20.862	727.391 2	729.412 1	$\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_4$
19	21.618	713.410 9	715.427 0	$\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{N}_{14}\text{O}_3$
20	22.408	727.393 1	729.413 7	$\text{C}_{43}\text{H}_{50}\text{N}_9\text{O}_3$
21	23.130	713.414 2	715.430 2	$\text{C}_{25}\text{H}_{56}\text{N}_{13}\text{O}_{11}$
		749.390 0		
22	24.598	769.402 1	771.424 1	$\text{C}_{28}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_{18}$
23	24.731	669.385 6	671.395 0	bufalin-3-adipate-arginine ester ^[5] , $\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_8$
24	25.098	713.412 6	715.436 2	cinobufaginol-3-succinate-arginine ester ^[5] , $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{11}$
25	25.932	755.421 5	757.444 2	$\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_7$
26	26.310	683.399 9	685.422 2	$\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_{11}\text{O}_3$
27	27.610	803.473 0	827.474 5	$\text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{13}$
28	28.099	697.315 4	699.307 7	cinobufagin-3-succinate-arginine ester ^[5] , $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{10}$
29	30.623	753.408 6	755.428 5	$\text{C}_{32}\text{H}_{66}\text{O}_{19}$
30	32.425	767.422 5	769.436 3	$\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{O}_{14}$
31	33.881	/	795.487 7	$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{N}_3\text{O}_{12}$
32	37.261	571.290 8	595.294 5	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_{16}\text{O}_6$
33	42.008	599.323 2	623.325 8	$\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_{17}\text{O}_3$

3.2 蟾酥甲醇提取物对斑马鱼血管生成的影响

对照组斑马鱼节间血管完整,与对照组比较,PTK787组血管长度显著下降($P<0.01$),新生血管受到显著抑制;蟾酥甲醇提取物 $2\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼节间血管生成良好,没有统计学差异;4、 $6\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼血管生成受到抑制,血管长度明显变短,具有显著性差异($P<0.05, 0.01$),且浓度为 $6\mu\text{g/mL}$ 时,抑制血管生成效果更明显。结果见图2。

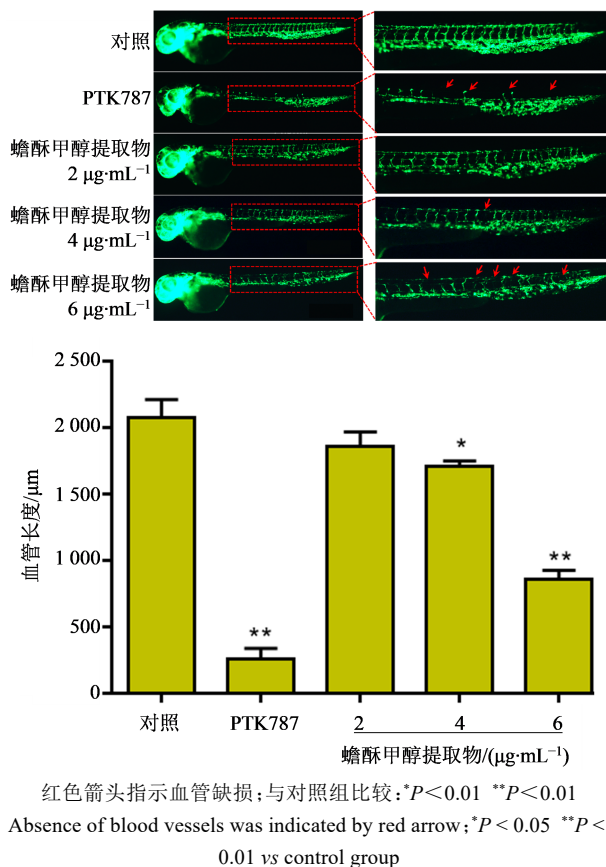


图2 蟾酥甲醇提取物对斑马鱼节间血管的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of methanol extract of toad venom on development of zebrafish DLAV($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.3 蟾酥甲醇提取物对斑马鱼炎症细胞的影响

蟾酥甲醇提取物的抗炎结果如图3所示,与对照组比较, CuSO_4 模型组斑马鱼迁移到神经丘侧线部位的炎症细胞数量显著增多($P<0.01$),显示炎症造模成功。与模型组比较, $0.4\mu\text{g/mL}$ 蟾酥甲醇提取物组斑马鱼炎症细胞迁移数量无明显变化, $0.8\mu\text{g/mL}$ 组炎症细胞迁移明显减少,具有显著差异($P<0.01$),表明该浓度具有抗炎活性。

4 讨论

近年来,斑马鱼已经成为重要的脊椎动物模型,被广泛的应用到药物筛选和活性评价实验中。Tg(VEGFR2:GFP)品系斑马鱼的血管系统内皮细

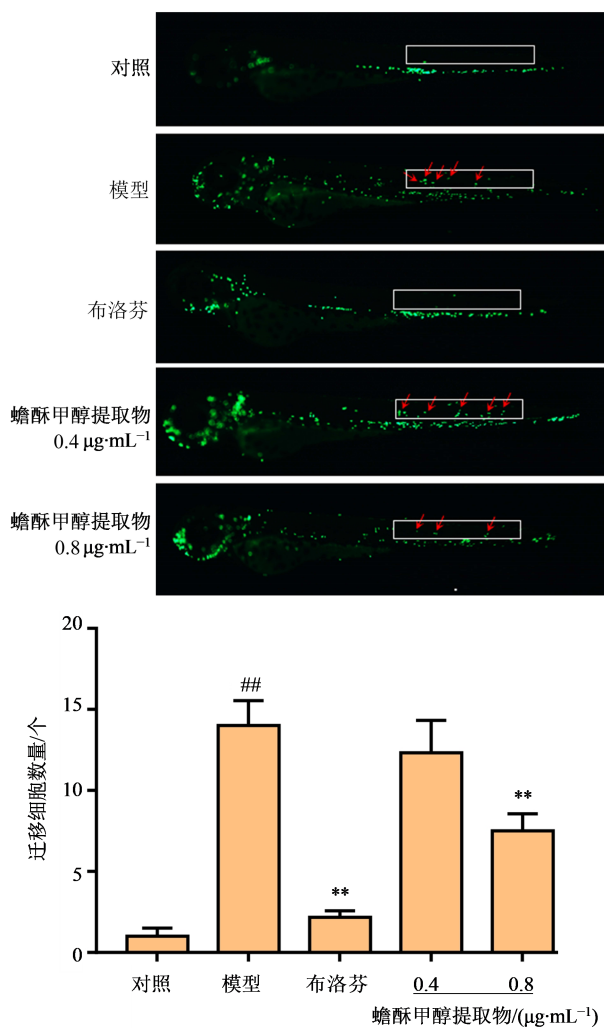


图3 蟾酥甲醇提取物对斑马鱼炎症细胞的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 3 Effects of methanol extract of toad venom on zebrafish inflammatory cells($\bar{x}\pm s, n=6$)

胞有绿色荧光蛋白的表达,可直接观察到药物对血管的效应,是血管生成研究的重要模型^[7]。周玲晓等^[8]利用 Tg(VEGFR2:GFP)品系斑马鱼筛选来源于不同药性中药的主要成分抑制血管的活性;朱宗萍等^[9]在 48 hpf 观察姜黄和阳性对照 PTK787 抑制斑马鱼血管生成的作用,并对姜黄抗血管新生的作用机制进行研究,为姜黄防治血管新生依赖性疾病的药效物质基础提供科学依据,以上研究为筛选蟾酥甲醇提取物的抑制血管生成活性提供了方法思路。此外,斑马鱼体内的免疫系统与人类高度相似,免疫细胞与哺乳动物的免疫细胞也有相似的表型特征, Tg(zlyz:EGFP)品系斑马鱼的炎症细胞标记有绿色荧光蛋白,可直接观察药物对炎症细胞聚

集迁移的影响,是研究体内炎症和筛选药物抗炎活性的有力工具^[10]。本实验利用绿色荧光标记血管的转基因斑马鱼 Tg(VEGFR2:GFP)和绿色荧光标记炎症细胞的转基因斑马鱼 Tg(zlyz:EGFP)进行蟾酥甲醇提取物的抑制血管生成和抗炎活性评价实验。

蟾酥作为一种蟾蜍应激状态下产生的耳后腺分泌物,其化学成分复杂多样。现代研究表明,蟾酥主要有蟾蜍甾二烯类、强心甾烯蟾毒类、吲哚碱类、甾醇类以及其他多糖类。本实验以蟾酥为研究对象,从甲醇提取物中共检出33个色谱峰,鉴定出其中7个为结合型蟾蜍二烯酸内酯,而蟾蜍二烯酸内酯类化合物是蟾酥中的主要抗肿瘤成分^[11]。

血管生成是一个复杂的生理过程,在胚胎发育、个体生长和创伤愈合等方面发挥着重要的作用。肿瘤存在区域的血管分布密集且生长旺盛,推断血管生成不仅为肿瘤生长提供大量养分,同时也为肿瘤的侵袭、转移提供途径,导致肿瘤迅速增殖^[12-13]。因此发现和开发有效的血管生成抑制剂是癌症治疗的重要组成部分。Li等^[14]发现通过调节Akt/mTORC1/HIF-1 α 通路和触发活性氧(ROS)介导的血管内皮细胞凋亡,华蟾毒精能抑制结直肠癌血管生成。蟾毒灵与索拉非尼通过调节mTOR/血管内皮生长因子(VEGF)通路产生协同抗肝癌作用,导致肝癌SMMC-7721细胞分泌VEGF减少,血管内皮细胞上VEGF与受体结合的减少导致人脐静脉内皮细胞和肿瘤血管生成的减少,从而产生抗癌作用^[15]。本实验研究发现蟾酥甲醇提取物能抑制血管生成,提示蟾酥可通过抑制血管生成,从而产生抗肿瘤作用。

大量的流行病学研究表明炎症微环境在促进肿瘤发生发展过程中发挥重要作用,胃癌、肝癌和宫颈癌等均继发于慢性炎症^[16]。CuSO₄可破坏斑马鱼侧线神经丘毛细胞,导致炎症细胞从血管渗漏到神经丘侧线部位,造成急性炎症反应^[17]。Hou等^[18]采用CuSO₄造模的实验方法研究异绿原酸A在斑马鱼胚胎体内模型中的抗炎活性,发现异绿原酸A可以抑制CuSO₄诱导的斑马鱼体内炎症细胞向侧线部位的迁移。本实验也采用同样的造模方法,结果显示蟾酥具有显著的抗炎活性,抑制CuSO₄诱导的炎症状态下炎症细胞的迁移和聚集,有效减轻炎症,这与以往的体外细胞抗炎实验结果一致。如梁正敏等^[19]研究发现蟾酥醇提物能显著降低细胞内ROS水平,抑制炎症因子肿瘤坏死因子(TNF)- α 、

NO、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 表达,减轻细胞的炎症反应。蟾毒灵可通过调节炎症基因产物表达调控因子的活力,减少BALB/c小鼠肺部炎症细胞浸润和杯状细胞产生,抑制NF- κ B和p-p65蛋白表达,从而产生抗炎作用^[20]。

蟾酥作为一种重要的传统中药,其化学成分复杂并具有多种药理活性。本实验基于LC-MS技术,鉴定出其甲醇提取物中含有7种结合型蟾蜍二烯酸内酯,同时利用斑马鱼模型,发现蟾酥甲醇提取物可抑制血管生成,导致节间血管长度显著降低,且对于炎症细胞的迁移具有一定的抑制作用,验证了其具有抑制血管和抗炎活性,为天然药物的药理活性研究和临床使用提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2015.
- [2] Qi J, Zulfiker A H M, Li C, et al. The development of toad toxins as potential therapeutic agents [J]. Toxins (Basel), 2018, 10(8): E336.
- [3] 高瑞霖,邵义祥.蟾酥的临床应用[J].中国临床康复, 2006, 30(35): 142-144.
Gao R L, Shao Y X. Clinical application of *Venenum Bufonis* [J]. Chin J Clin Rehabil, 2006, 30(35): 142-144.
- [4] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503.
- [5] 王子月,王洪兰,周婧,等.利用UPLC-TQ-MS比较蟾酥鲜品和蟾酥上皮化学成分[J].中国中药杂志, 2015, 40(20): 3967-3973.
Wang Z Y, Wang H L, Zhou J, et al. Comparison of chemical composition between fresh and processed *Bufonis Venenum* by UPLC-TQ-MS [J]. China J Chin Mat Med, 2015, 40(20): 3967-3973.
- [6] 应金琴,杨明,张普照,等.蟾酥的炮制历史沿革、化学成分及药理活性研究进展[J].中国中药杂志, 2021-04-12, DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210409.601.
Ying J Q, Yang M, Zhang P Z. Processing evolution, chemical components and pharmacological effects of *Bufonis Venenum* [J]. China J Chin Mater Med, 2021-04-12, DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210409.601.
- [7] 王佑华,黎响,杨彬睿,等.斑马鱼模型在中医药研究中的应用现状[J].中西医结合学报, 2012, 10(11): 1189-1197.
Wang Y H, Li X, Yang B R. Use of zebrafish models for

- the research of traditional Chinese medicine [J]. J Integr Med, 2012, 10(11): 1189-1197.
- [8] 周玲晓, 彭维兵, 付先军, 等. 基于斑马鱼模式生物的中药主要成分抑制血管生成的活性筛选 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(6): 1064-1069.
- Zhou L X, Peng W B, Fu X J, et al. Screening for active components of anti-angiogenesis from Chinese medicine using zebrafish model [J]. Nat Prod Res Develop, 2015, 27(6): 1064-1069.
- [9] 朱宗萍, 王继森, 廖婉, 等. 基于模式生物斑马鱼研究姜黄抗血管新生的作用及机制 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3257-3268.
- Zhu Z P, Wang J S, Liao W, et al. Effect and mechanism of *Curcuma longa* anti-angiogenesis based on model biology zebrafish [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(11): 3257-3268.
- [10] Luderman L N, Unlu G, Knapik E W. Zebrafish developmental models of skeletal diseases [J]. Curr Topics Dev Biol, 2017, 124: 81-124.
- [11] Wei W L, Hou J J, Wang X, et al. Venenum bufonis: an overview of its traditional use, natural product chemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 237: 215.
- [12] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other diseases [J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31.
- [13] Ramjiawan R R, Griffioen A W, Duda D G. Antiangiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy ? [J]. Angiogenesis, 2017, 20(2): 185-204.
- [14] Li X, Chen C, Dai Y, et al. Cinobufagin suppresses colorectal cancer angiogenesis by disrupting the endothelial mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor 1 α axis [J]. Cancer Sci, 2019, 110(5): 1724-1734.
- [15] Wang H, Zhang C, Chi H, et al. Synergistic anti-hepatoma effect of bufalin combined with sorafenib via mediating the tumor vascular microenvironment by targeting mTOR/VEGF signaling [J]. Int J Oncol, 2018, 52(6): 2051-2060.
- [16] 夏娟, 李东, 郑伟萍, 等. 炎症与肿瘤的关系研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(1): 63-65.
- Xia J, Li D, Zheng W, et al. Progress in study of interaction between inflammation and tumor [J]. Int J Lab Med, 2013, 34(1): 63-65.
- [17] d'Alencon C A, Pena O A, Witmann C, et al. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish [J]. BMC Biol, 2010, 8(1): 151.
- [18] Hou C P, He Q X, Liu K C, et al. The anti-inflammatory activity of isochlorogenic acid a in an in vivo model of zebrafish embryo [J]. Lat Am J Pharm, 2017, 36(10): 1915-1923.
- [19] 梁正敏, 何家康, 彭健波, 等. 蟾酥醇提取物的体外抗炎作用研究 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(11): 2843-2845, 2848.
- Liang Z M, He J K, Peng J B. Anti-inflammatory activities of extract from *Venenum Bufonis* in vitro [J]. Hubei Agr Sci, 2016, 55(11): 2843-2845, 2848.
- [20] Zhakeer Z, Hadeer M, Tuerxun Z, et al. Bufalin inhibits the inflammatory effects in asthmatic mice through the suppression of nuclear factor-kappa B Activity [J]. Pharmacology, 2017, 99(3/4): 179-187.

[责任编辑 兰新新]