

【基于斑马鱼模型的药物活性筛选和安全性评价专栏】

斑马鱼炎症模型及其在中药抗炎领域的应用

段秀英^{1,2}, 马瑞娇^{1,2}, 张云^{1,2*}, 刘可春^{1,2*}

1. 齐鲁工业大学(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: 中药抗炎在近年来已成为一个重要的研究领域, 中药制剂的抗炎临床研究已经取得了一定进展, 但具体活性成分及作用机制仍需进一步明确。斑马鱼由于其独特的生物学优势, 目前已被广泛应用于中药抗炎活性的筛选。综合近年来国内外有关斑马鱼模型在中药抗炎领域的报道, 从已构建的斑马鱼炎症模型、斑马鱼模型中的炎症介质、斑马鱼模型在中药抗炎药物筛选中的应用3个方面对斑马鱼炎症模型及其在中药抗炎领域的研究进展进行综述, 以期为模式生物斑马鱼在中药抗炎领域的研究应用提供新思路, 为抗炎中药的开发与利用提供借鉴参考。

关键词: 斑马鱼; 转基因; 炎症模型; 炎症介质; 中药; 抗炎; 药物筛选

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)08-1573-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.08.001

Zebrafish inflammation model and its application in anti-inflammatory field of traditional Chinese medicine

DUAN Xiuying^{1,2}, MA Ruijiao^{1,2}, ZHANG Yun^{1,2}, LIU Kechun^{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: The anti-inflammatory properties of traditional Chinese medicine have become an important research area in recent years. At present, the anti-inflammatory clinical research of traditional Chinese medicine has made some progress, but the active ingredient and specific mechanism still needs to be further clarified. Due to its unique biological advantages, zebrafish has been widely used in the anti-inflammatory field of traditional Chinese medicine. This review synthesizes domestic and foreign reports on zebrafish models in the anti-inflammatory field of traditional Chinese medicine in recent years, and comprehensively reviews the recent advances of zebrafish models in this field from three aspects: the first one is different inflammation models of zebrafish, the second one is mediators of inflammation in zebrafish, and the last one is application of zebrafish in screening of anti-inflammatory drugs in traditional Chinese medicine. It will provide a new idea for the application of zebrafish in the anti-inflammatory field of traditional Chinese medicine and a reference for development and utilization of anti-inflammatory Chinese medicine.

Key words: zebrafish; transgene; inflammatory model; inflammatory mediators; traditional Chinese medicine; anti-inflammation; drug screening

收稿日期: 2021-06-09

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1707300); 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); 济南市“高校20条”资助项目(2020GXRC053)

第一作者: 段秀英(1995—), 女, 博士, 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: duanxiuying123@163.com

*共同通信作者: 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

刘可春(1964—), 男, 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)82605352

E-mail: liukechun2000@163.com

炎症反应是机体应对内外界刺激的一种防御性反应,炎症反应触发后会激活免疫细胞,清除异物刺激,促进组织愈合。但是,过度的炎症反应又会引起组织损伤,如果炎症长期存在,会引发慢性炎症性疾病^[1],如自身免疫病^[2]、炎症性肠病^[3]等。这类疾病具有患病率高、病程长、患病人数多等特点,对个人及社会造成较大的医疗和经济负担。然而,目前的大多数治疗方法并没有解决根本问题,迫切需要更好的治疗方法。因此研究炎症疾病以及有效的抗炎手段具有重大意义。

中药是指在中医理论指导下,用于预防、治疗、诊断疾病并具有康复与保健作用的天然药物及其加工代用品^[4]。自20世纪90年代以来,国际中药市场蓬勃发展,与化学药物相比,中药一直被认为毒性低、安全,但中药成分复杂,具有多靶点、多效应的作用体系,其有效成分不明确,这增加了人们对中药认知的难度^[5]。因此,中药制剂及其成分的活性筛选、药效研究及作用机制成为目前中药领域研究的热点。

中药抗炎在近年来已成为一个重要的研究领域。针对一些炎症疾病,我国的传统中药制剂在临床治疗以及实验研究中均表现出了良好的抗炎功效。尽管许多中药的疗效已经被长期临床实践所反复证实,但要推动中药的现代化进程,需要使用动物模型对其进行科学化、客观化和量化的全面研究^[6]。

斑马鱼作为科学研究中一种重要且应用广泛的脊椎动物模型,由于其独特的生物学、基因组学、遗传学优势及其高度保守的疾病信号转导通路等特点,已被广泛用作研究人类疾病的动物模型^[7-8]。随着斑马鱼遗传品系的增多,分子生物学技术的发展及活体成像、细胞追踪等研究技术的进步,斑马鱼成为研究人类炎症疾病及炎症药物筛选的良好模式生物。

本文综合近年来国内外相关报道,介绍斑马鱼炎症模型、斑马鱼模型中常见的炎症介质、斑马鱼模型在抗炎中药筛选中的应用,以展现斑马鱼作为中药抗炎研究模式生物的应用及发展前景。

1 斑马鱼炎症模型

1.1 斑马鱼简介及研究优势

斑马鱼 *Danio rerio* 是一种原产于南亚的热带淡水观赏鱼,因其体侧具有像斑马一样纵向的蓝色与银色相间的条纹而得名。20世纪七八十年代美国分子生物学家 Streisinger 及其同事率先将斑马鱼

用作实验动物^[9],目前斑马鱼已广泛应用于发育生物学、肿瘤学、毒理学、遗传学、神经生物学等领域^[10-13],被认为是研究发育、免疫、生理、营养、遗传和行为的理想模型^[13-16]。

与其他模式动物相比,斑马鱼物种稳定,个体差异小;体积小,对病原体抵抗力强,易于大规模饲养,品系维护费用低;繁殖能力强,产卵量大,可实现基于表型的正向遗传学研究;繁殖周期短,可以明显缩短研究周期。与其他鱼类相比,斑马鱼的卵较大,胚胎体外发育且透明,便于胚胎操作和成像;发育快,器官发育与哺乳动物具有极高的相似性;并且具有易观察测试的发育行为,适用于进行形态学观察及解剖学研究。斑马鱼基因组已被完全测序,与人类基因组有70%~80%的相似性^[17];斑马鱼比其他脊椎动物模型(如小鼠)更易于进行遗传操作,基因编辑技术及各种细胞生物学技术在斑马鱼模型中已发展成熟,有利于斑马鱼中基因功能的研究;同时大量斑马鱼遗传品系的建立与发展,为以斑马鱼为模型的研究提供了巨大便利。

斑马鱼的免疫系统高度保守,其免疫细胞类型和形态与人类相似,存在中性粒细胞、单核巨噬细胞、淋巴细胞等。斑马鱼成鱼与哺乳动物一样拥有天然免疫系统和获得性免疫系统,天然免疫系统的细胞(中性粒细胞和巨噬细胞)首先出现,并在受精后3~4周发展出获得性免疫^[18]。斑马鱼对感染和组织损伤的天然免疫反应迅速,并且容易诱发炎症反应,使其成为研究炎症和伤口修复的理想系统^[19]。出生后前2周完全透明的斑马鱼胚胎以及免疫细胞荧光标记的转基因斑马鱼品系的建立与发展,使得在斑马鱼胚胎这一完整有机体中跟踪观察免疫反应具有可行性^[20]。

1.2 常用的转基因斑马鱼品系

通过特异性基因启动子控制下游的荧光蛋白在特定的器官或细胞中表达而建立的斑马鱼转基因系,可实现对某一特定器官或细胞的示踪。目前已开发和利用的一系列标记中性粒细胞和巨噬细胞的转基因斑马鱼品系,实现了炎症情况下细胞反应的可视化,使得在体内三维环境中追踪中性粒细胞和巨噬细胞的迁移成为可能,为观察炎症反应提供了独特视角。

Mathias 等^[21]、Renshaw 等^[22]开发了新型的中性粒细胞特异性表达 eGFP 荧光的转基因斑马鱼 Tg(MPO:eGFP),其中性粒细胞在特异性髓过氧化物酶(MPO 或 mpx)启动子的调控下表达 eGFP。

Mathias等^[21]利用Tg(MPO:eGFP)斑马鱼观察了组织损伤诱导的炎症反应,其特征是损伤发生时中性粒细胞迅速向伤口部位趋化,损伤后期中性粒细胞向血管系统定向逆行趋化。Renshaw等^[22]利用Tg(MPO:eGFP)斑马鱼首次提出证据表明抑制中性粒细胞凋亡与延迟炎症消退有关。Hall等^[23]建立了新的转基因斑马鱼报告基因系Tg(lysC::EGFP)和Tg(lysC::DsRED2),利用溶菌酶C(lysC或lyz)启动子驱动荧光蛋白表达,并且报告基因的表达模式与内源性LysC表达模式一致,实验数据表明荧光蛋白标记巨噬细胞群体,但后来发现斑马鱼Lyz与Mpx共定位,因此该品系应作为中性粒细胞标记品系使用。Li等^[24]构建了可以同时标记巨噬细胞和中性粒细胞的斑马鱼转基因品系Tg(corola:eGFP),该品系是eGFP在corola调控序列的驱动下表达。Coronin 1a是一种肌动蛋白结合蛋白,其RNA是在白细胞中被特异性合成的。Li等^[24]利用Tg(corola:eGFP;lyz:Dsred)斑马鱼记录了组织再生过程中巨噬细胞和中性粒细胞的不同行为和功能,Tg(corola:eGFP;lyz:Dsred)可以同时观察并区分巨噬细胞和中性粒细胞,绿色荧光标记巨噬细胞,黄色荧光标记中性粒细胞。

1.3 斑马鱼中常用的炎症模型

炎症的诱发因素有很多,可以是机械损伤,可以是细菌、病毒感染,也可以是化学诱导。目前的斑马鱼实验基本采用以下3种方法模拟免疫系统对于炎症的应激过程,分别是经过断尾诱导的局部炎症、脂多糖(LPS)诱导的全身炎症和硫酸铜(CuSO₄)诱导的急性炎症。

斑马鱼断尾炎症模型是一种创伤性炎症模型,对斑马鱼尾部进行断尾处理,可以诱发斑马鱼尾部局部损伤,促使斑马鱼免疫细胞发生免疫应答^[25]。斑马鱼胚胎发育早期,巨噬细胞和中性粒细胞一起参与炎症反应,在斑马鱼断尾6h时,伤口处的巨噬细胞和中性粒细胞数量达到高峰,6h后炎症反应开始消退^[21,26-27]。研究者可以通过阐述损伤后免疫细胞的迁移、聚集及断尾恢复再生情况进行炎症机制研究及药物抗炎活性评价。

斑马鱼LPS炎症模型是由LPS诱导的全身性炎症模型。LPS是革兰阴性细菌细胞壁的主要结构成分,是一种内毒素,是先天免疫系统通过模式识别受体所识别的主要配体之一,能够引起炎症级联反应^[28],是哺乳动物炎症模型的常见诱导剂,在斑马鱼炎症造模中也被广泛使用。对受精后2~3d斑

马鱼胚胎进行LPS浸泡给药或者卵黄囊显微注射给药,可诱导斑马鱼免疫细胞数量增多,诱发炎症反应^[29]。药物处理能否逆转LPS引起的免疫细胞数量增多成为其抗炎活性评价的重要指标之一。

斑马鱼CuSO₄炎症模型是由CuSO₄诱导的急性炎症模型。铜是先天性免疫系统的一个功能成分,通过活性氧(ROS)等途径诱导氧化应激积极调节炎症反应。在斑马鱼的幼鱼和成鱼中,CuSO₄刺激可以使斑马鱼免疫细胞迅速迁移到神经丘,因此CuSO₄暴露常被用来诱导和模拟炎症特征^[30]。与物理损伤和感染剂方法不同,铜作为致炎剂在操作时可以采用无创方法。一些抗炎药物可以抑制免疫细胞向神经丘的迁移,使免疫细胞回流,利用这一模型可以评价药物的抗炎活性。

2 斑马鱼模型中的炎症介质

斑马鱼炎症反应过程中,免疫细胞被激活后,会产生多种类型的可溶性介质,主要有细胞因子、趋化因子、补体系统、脂质介质等,这些介质会在后续放大炎症反应,消除入侵病原体或修复受损组织^[31]。由于斑马鱼中炎症介质的保守性,使得斑马鱼成为一种有潜力的炎症评价动物模型。

2.1 细胞因子

细胞因子是由免疫细胞和某些非免疫细胞经刺激而合成、分泌的一类小分子蛋白质,是炎症的关键调节剂,通过复杂的信号通路参与急性和慢性炎症。斑马鱼的细胞因子在结构和功能上与哺乳动物的相似^[23],越来越多的研究利用斑马鱼炎症模型,通过检测细胞因子的表达水平进行中药抗炎活性评价。在众多细胞因子中,起主要作用的是白细胞介素(interleukin)-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等^[32-33]。其中IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ 可以刺激和维持炎症反应,是重要的促炎细胞因子^[1,34];IL-10、TGF- β 参与炎症反应和免疫抑制,是关键抗炎细胞因子^[1,33,35]。Chen等^[36]利用斑马鱼CuSO₄炎症模型研究栀子提取物的抗炎活性时,通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测了IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等细胞因子的mRNA水平,发现栀子提取物能显著降低这些细胞因子的表达水平,证实了栀子提取物的抗炎活性。

2.2 趋化因子

趋化因子是免疫细胞迁移不可或缺的一组炎症介质,在炎症和正常生理条件下均可发挥作用。

趋化因子的定义是基于它们的氨基酸组成,包括CXC、CC、C和CX3C 4类^[37-38]。斑马鱼中,目前已经鉴定到89种趋化因子基因和33种趋化因子受体^[39]。其中只有Cxcl12a、Cxcl12b、Ccl19和Cxcl8(IL-8)配体-受体间的相互作用与哺乳动物是保守的^[40],这些炎症介质的鉴定,使得在斑马鱼中研究以趋化因子为靶标的炎症治疗策略成为可能。同时,仍有大量斑马鱼趋化因子未被鉴定,这些趋化因子遗传和生化特性的研究将进一步扩大斑马鱼模型在中药抗炎领域的优势。

2.3 补体系统

补体系统是一个复杂的蛋白质网络,参与急性或慢性炎症反应^[41]。补体的沉积经常被用作炎症的免疫组化标志物。哺乳动物中补体系统的许多组分和信号通路在斑马鱼体内是高度保守的^[42],李宗耀等^[43]通过对斑马鱼早期胚胎中补体系统的发育过程及功能的研究,发现在胚胎发育到咽胚期之前,检测的8个补体相关基因(C3、C4、C9、Bf1、Bf2、Bf3、RCA2.1、RCA2.2)的mRNA在整个胚胎中广泛表达。经LPS刺激后,C3、C9、Bf1、Bf2、Bf3基因表达上调,RCA2.1基因表达下调,C4、RCA2.1基因无显著变化,提示斑马鱼可在胚胎发育早期构建补体系统,参与急性期反应等免疫反应。

2.4 脂质介质

脂质介质广泛参与炎症反应,主要包括前列腺素等,前列腺素会引起血管舒张,促进炎症的发生^[44-45]。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)存在于巨噬细胞中并能够产生活性氮自由基,是一种可以反映炎症程度的催化酶^[46]。巨噬细胞和其他细胞受炎症刺激后可以产生一种可以调节前列腺素合成的酶——环氧合酶(COX)^[47],它的一种同工酶COX-2作为诱导酶,可以参与炎症调控过程。前列腺素E2(PEG2)合成酶(Ptges)可以在炎症反应过程中由iNOS和COX-2激活调节产生PEG2^[48]。Li等^[49]利用RAW264.7细胞系和斑马鱼模型研究红菇多糖提取组分(Rap)的抗炎活性,发现Rap能显著逆转LPS诱导的iNOS、COX-2蛋白水平上调情况。Kwon等^[50]研究桑叶水提取物(WEMF)对炎症介质产生的影响时,发现WEMF能显著抑制PEG2的分泌。

3 斑马鱼模型在中药抗炎药物筛选中的应用

斑马鱼胚胎及幼鱼作为一种新型高通量药物筛选模型,是目前唯一能在96孔细胞培养板中进行实验研究的脊椎动物模型^[51],可以应用于大规模的药物活性成分筛选工作,目前研究人员主要是利用

细胞生物学、分子生物学手段,通过观察免疫细胞的迁移、聚集,检测细胞因子等炎症介质的表达,研究相关信号通路等方式进行中药抗炎活性评价。

免疫细胞向炎症部位异常迁移、聚集是炎症反应的主要病理过程,抑制免疫细胞向炎症部位的迁移、聚集是抗炎治疗的关键,也为抗炎药物筛选提供评价方向。秦帅等^[52]利用转基因斑马鱼(zlyz:EGFP)的断尾炎症模型,筛选296种中药,发现50、100 mg/L血人参和飞龙掌血的乙醇提取物可抑制斑马鱼巨噬细胞向急性损伤部位迁移、聚集,具有显著的抗炎作用。但成丽等^[53]在利用转基因斑马鱼(zlyz:EGFP)的断尾炎症模型研究血人参提取物的抗炎活性时发现,血人参中石油醚层质量浓度在10~90 mg/L、醋酸乙酯层质量浓度在10~30 mg/L、正丁醇层质量浓度在10~20 mg/mL时具有显著的抗炎活性,水层没有抗炎活性。谢珮^[54]利用转基因斑马鱼(MPO:EGFP)的CuSO₄炎症模型、断尾炎症模型、LPS炎症模型评价中药大黄中的蒽醌化合物大黄素(0.05 μmol/L)以及穿心莲内酯衍生物3-脱水穿心莲内酯(10 μmol/L)的抗炎作用,发现2种化合物均可明显抑制斑马鱼的炎症反应中出现的中性粒细胞迁移、聚集的现象,并降低斑马鱼死亡率。王召平等^[55]检测忍冬根中分离得到的13种化合物的抗炎活性,发现齐墩果酸-3-乙酸酯、原儿茶醛在质量浓度为100 μg/mL时,能降低斑马鱼(zlyz:EGFP)CuSO₄炎症模型中炎症部位巨噬细胞的数量,表现出明显的抗炎活性。

细胞因子的表达水平一定程度上反映炎症水平,可以以此为指标评价中药活性物质的抗炎活性。Zhou等^[56]发现250 μg/mL凉膈散可以逆转LPS诱导的免疫细胞增多现象,降低IL-6和TNF-α的表达水平,并降低斑马鱼死亡率。杨丽玲^[29]发现凉膈散方中活性成分连翘酯苷A在8 μg/mL的最佳浓度时,可以明显抑制斑马鱼LPS炎症模型中中性粒细胞迁移的情况,炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α的表达水平明显降低,推测连翘酯苷A通过抑制细胞因子释放,进而影响细胞因子的级联反应,从而调控炎症反应;同时研究发现10 μg/mL连翘苷、0.22 μg/mL大黄素、5 μg/mL黄芩苷均能提高斑马鱼机体免疫功能并提高LPS感染后斑马鱼的存活率。张瑜^[57]发现蟾皮的亲水性成分吡啶烷类生物碱(25、50、100 μg/mL)对LPS诱导的炎症有明显的抗炎作用,能回调LPS引起的炎症因子(IL-6、TNF-α、IL-1β、IFN-γ、IL-10)的基因表达水平。李丽丽^[58]利用斑马

鱼 CuSO₄ 炎症模型探讨衢枳壳提取液(QFAE)的抗炎作用,发现 667、2 000 μg/mL 质量浓度的 QFAE 通过减少炎症部位的中性粒细胞数表现出显著的抗炎作用, QFAE 也能显著性抑制促炎细胞因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平,显著升高抗炎细胞因子 IL-10 水平。

据报道, NF-κB、AP-1、MAPK (包括 p38、ERK 和 JNK 通路) 等途径与炎症反应息息相关。Li 等^[59] 利用转基因斑马鱼 Tg(zlyz:EGFP) 研究通关藤苷 H(TH) 的抗炎活性, 荧光显微镜下观察发现 0.05、0.10、0.15 mg/mL TH 能抑制炎症反应中免疫细胞的迁移和数量的增多, qRT-PCR 检测细胞因子表达水平, 发现 TH 能降低 TNF-α、IL-1β 和 IL-8 的表达水平, 促进 IL-10 的表达, 推测 TH 抑制炎症的机制可能与 NF-κB 和 p38 信号通路及其下游靶基因有关。Nguyen 等^[60] 在研究大青乙醇提取物(5、20、40 μg/mL) 的抗炎效果和 Yang 等^[61] 在研究灯笼果中分离出的 4β-羟基内酯 E(0.5、1.0、1.5 μmol/L) 的抗炎活性时, 也得到相似的结论。钱哲^[62] 在研究中药方剂龟鹿二仙胶的抗炎效果时, 对 IL-1β、IL-6、TNF-α 的含量进行了测定, 结果表明该方剂在质量浓度为 25、50、100 mg/L 时能明显抑制上述 3 种细胞因子的表达。在对龟鹿二仙胶的抗炎机制进行进一步探究时, 发现该方剂调控 NF-κB 和 AP-1 抑制炎症反应。

斑马鱼模型中关于中药抗炎活性的研究目前主要集中在对细胞因子及相关信号通路的研究上, 中药对趋化因子、补体系统等其他炎症介质影响的研究较少, 增加这方面的研究将有利于完善抗炎机制的研究, 增加抗炎药物的筛选评价方向, 促进抗炎药物的开发与利用。

4 结语

目前, 中药已在抗炎领域占有重要地位。在新型冠状病毒肺炎疫情防控过程中, 莲花清瘟制剂^[63]、清肺排毒汤^[64] 等中医药制剂因发挥良好的抗炎、预防作用, 成为抑制患者病情恶化及增强易感者机体免疫功能的重要治疗方法, 且在新型冠状病毒肺炎患者恢复及出院后的康复期中起主导作用, 由此可见中药在抗炎领域具有巨大的发展潜力。

斑马鱼作为一种新型模式生物, 具有体积小、繁殖能力强、发育快、易于观察、免疫系统高度保守等优势, 随着技术和方法的不断改进, 近年来斑马鱼在中药抗炎领域的应用也逐渐深入。斑马鱼作为一个完整生命机体, 能够客观、全面、系统地对其有效成分的抗炎活性进行评价, 实现快速、

有效的高通量筛选, 同时也为抗炎中药作用机制的研究提供了良好模型。斑马鱼模型的充分利用将为抗炎中药的研究提供新思路和新方法, 促进中药抗炎领域的发展, 同时斑马鱼模型在中药抗炎领域也将拥有更广阔的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Germolec D R, Shipkowski K A, Frawley R P, et al. Markers of inflammation [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1803: 57-79.
- [2] Sharma D, Kanneganti T D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation [J]. *J Cell Biol*, 2016, 213(6): 617-629.
- [3] Mao L M, Kitani A, Strober W, et al. The role of NLRP3 and IL-1β in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2566.
- [4] 梁高山, 吴文博. 论中药的定义与特征 [J]. *陕西中医*, 2008, 29(7): 851-853.
Liang G S, Wu W B. Definition and characteristics of traditional Chinese medicine [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2008, 29(7): 851-853.
- [5] 孙晨, 韩利文, 何秋霞, 等. 斑马鱼模型在中药毒性研究中的应用进展 [J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(22): 3467-3469.
Sun C, Han L W, He Q X, et al. Application progress of zebrafish model in the study of toxicity of traditional Chinese medicine [J]. *J Mod Med Health*, 2016, 32(22): 3467-3469.
- [6] 陈静, 赵璐, 王毅. 模式生物斑马鱼在中药药效物质多模态辨识中的应用 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(14): 3387-3394.
Chen J, Zhao L, Wang Y. Application of zebrafish model in multimodal identification of active constituents of traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(14): 3387-3394.
- [7] 杨丽玲, 余林中. 斑马鱼: 一种可用于中药抗炎免疫药理研究的模式生物 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(2): 175-178.
Yang L L, Yu Z L. Zebrafish -- a model organism which can be used in the study of anti-inflammatory immune pharmacology of traditional Chinese medicine [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2012, 28(2): 175-178.
- [8] 吕婧, 高燕, 李晨, 等. 基于斑马鱼模式生物的西洋参皂苷类成分增强免疫作用研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(14): 3728-3733.
Lv J, Gao Y, Li C, et al. Effect of American ginseng saponins on enhancing immunity based on zebrafish

- model organisms [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51 (14): 3728-3733.
- [9] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, 1981, 291(5813): 293-296.
- [10] Rocha M, Singh N, Ahsan K, et al. Neural crest development: insights from the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 2020, 249(1): 88-111.
- [11] Hason M, Bartůněk P. Zebrafish models of cancer-new insights on modeling human cancer in a non-mammalian vertebrate [J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(11): E935.
- [12] Bambino K, Chu J. Zebrafish in toxicology and environmental health [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 124: 331-367.
- [13] Cheresiz S V, Volgin A D, Kokorina Evsyukova A, et al. Understanding neurobehavioral genetics of zebrafish [J]. *J Neurogenet*, 2020, 34(2): 203-215.
- [14] Novoa B, Figueras A. Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 946: 253-275.
- [15] Watts S A, Lawrence C, Powell M, et al. The vital relationship between nutrition and health in zebrafish [J]. *Zebrafish*, 2016, 13(Suppl 1): S72-S76.
- [16] Orger M B, de Polavieja G G. Zebrafish behavior: opportunities and challenges [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2017, 40: 125-147.
- [17] 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.
- [18] Zapata A, Diez B, Cejalvo T, et al. Ontogeny of the immune system of fish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20(2): 126-136.
- [19] LeBert D C, Huttenlocher A. Inflammation and wound repair [J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(4): 315-320.
- [20] Brugman S. The zebrafish as a model to study intestinal inflammation [J]. *Dev Comp Immunol*, 2016, 64: 82-92.
- [21] Mathias J R, Perrin B J, Liu T X, et al. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(6): 1281-1288.
- [22] Renshaw S A, Loynes C A, Trushell D M, et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation [J]. *Blood*, 2006, 108(13): 3976-3978.
- [23] Hall C, Flores M V, Storm T, et al. The zebrafish *lysozyme C* promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish [J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 42.
- [24] Li L, Yan B, Shi Y Q, et al. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (30): 25353-25360.
- [25] Martin P, Feng Y. Inflammation: Wound healing in zebrafish [J]. *Nature*, 2009, 459(7249): 921-923.
- [26] Rhodes J, Hagen A, Hsu K, et al. Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish [J]. *Dev Cell*, 2005, 8(1): 97-108.
- [27] Zhang Y, Bai X T, Zhu K Y, et al. *In vivo* interstitial migration of primitive macrophages mediated by JNK-matrix metalloproteinase 13 signaling in response to acute injury [J]. *J Immunol*, 2008, 181(3): 2155-2164.
- [28] Beutler B, Rietschel E T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(2): 169-176.
- [29] 杨丽玲. 斑马鱼内毒素炎症模型建立及中药抗内毒素炎症活性筛选研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- Yang L L. The modeling of zebrafish endotoxic inflammation and use of it as a screening method to assess anti-endotoxic properties of the active component of Traditional Chinese Medicine [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2013.
- [30] Pereira T C, Campos M M, Bogo M R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model [J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 36(7): 876-885.
- [31] Zandrea R, Bonan C D, Campos M M. Zebrafish as a model for inflammation and drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(12): 2201-2211.
- [32] Turner M D, Nedjai B, Hurst T, et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(11): 2563-2582.
- [33] Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(4): 984-1010.
- [34] Campos-Sánchez J C, Esteban M Á. Review of inflammation in fish and value of the zebrafish model [J]. *J Fish Dis*, 2021, 44(2): 123-139.
- [35] Harjula S E, Ojanen M J T, Taavitsainen S, et al. Interleukin 10 mutant zebrafish have an enhanced interferon gamma response and improved survival against a *Mycobacterium marinum* infection [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10360.
- [36] Chen J R, Tchivelekete G M, Zhou X Z, et al. Anti-inflammatory activities of *Gardenia jasminoides* extracts in retinal pigment epithelial cells and zebrafish embryos [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 700.
- [37] Bird S, Tafalla C. Teleost chemokines and their receptors

- [J]. *Biology (Basel)*, 2015, 4(4): 756-784.
- [38] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity [J]. *Immunity*, 2000, 12(2): 121-127.
- [39] Nomiyama H, Osada N, Yoshie O. Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history [J]. *Genes Cells*, 2013, 18(1): 1-16.
- [40] Bussmann J, Raz E. Chemokine-guided cell migration and motility in zebrafish development [J]. *EMBO J*, 2015, 34(10): 1309-1318.
- [41] Hajishengallis G, Reis E S, Mastellos D C, et al. Novel mechanisms and functions of complement [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(12): 1288-1298.
- [42] Zhang S C, Cui P F. Complement system in zebrafish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 46(1): 3-10.
- [43] 李宗耀, 杨雨佳, 张士瑾, 等. 斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎免疫反应: 补体基因在早期胚胎以及LPS刺激胚胎中的表达 [J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(6): 1444-1450.
Li Z Y, Yang Y J, Zhang S C, et al. Immune response in zebrafish (*Danio rerio*) embryos: expression of complement genes in early embryos and LPS-stimulated embryos [J]. *Oceanol Limnol Sin*, 2015, 46(6): 1444-1450.
- [44] Zarini S, Hankin J A, Murphy R C, et al. Lysophospholipid acyltransferases and eicosanoid biosynthesis in zebrafish myeloid cells [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2014, 113/114/115: 52-61.
- [45] Teraoka H, Okuno Y, Nijoukubo D, et al. Involvement of COX2-thromboxane pathway in TCDD-induced pericardiac edema in developing zebrafish [J]. *Aquat Toxicol*, 2014, 154: 19-26.
- [46] Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation [J]. *Life Sci*, 2004, 75(6): 639-653.
- [47] Ko E Y, Cho S H, Kwon S H, et al. The roles of NF- κ B and ROS in regulation of pro-inflammatory mediators of inflammation induction in LPS-stimulated zebrafish embryos [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 68: 525-529.
- [48] Surh Y J, Chun K S, Cha H H, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation [J]. *Mutat Res*, 2001, 480/481: 243-268.
- [49] Li Y L, Li X J, Chu Q, et al. *Russula alutacea* Fr. polysaccharide ameliorates inflammation in both RAW264.7 and zebrafish (*Danio rerio*) larvae [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 145: 740-749.
- [50] Kwon D H, Jeong J W, Choi E O, et al. Inhibitory effects on the production of inflammatory mediators and reactive oxygen species by *Mori folium* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and zebrafish [J]. *An Acad Bras Cienc*, 2017, 89(1 Suppl 0): 661-674.
- [51] Gratacap R L, Wheeler R T. Utilization of zebrafish for intravital study of eukaryotic pathogen-host interactions [J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 46(1): 108-115.
- [52] 秦帅, 张永萍, 陈希, 等. 应用斑马鱼高通量筛选平台筛选抗炎民族药研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(8): 4146-4148.
Qin S, Zhang Y P, Chen X, et al. Study on screening anti-inflammatory ethnic medicine by zebrafish high-throughput platform [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(8): 4146-4148.
- [53] 但成丽, 张艳焱, 张永萍, 等. 基于转基因斑马鱼炎症模型的血人参提取物抗炎活性筛选研究 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(11): 2617-2620.
Dan C L, Zhang Y Y, Zhang Y P, et al. Study on anti-inflammatory activity of *Radix Indigofera* extract based on transgenic zebrafish mode - screening [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2016, 27(11): 2617-2620.
- [54] 谢佩. 基于斑马鱼炎症模型筛选的中药活性成分药理效应与作用机制研究: 大黄素和3-脱水穿心莲内酯抑制LPS诱导急性肺损伤的作用机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
Xie P. Mechanism study of emodin and 3-dehydroandrographolide on attenuating lipopolysaccharide-induced acute lung injury based on traditional Chinese medicine screening via zebrafish inflammation models [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2019.
- [55] 王召平, 朱娟, 李岗, 等. 忍冬根的化学成分与抗炎活性研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(14): 2412-2417.
Wang Z P, Zhu H, Li G, et al. Chemical constituents of *Lonicera japonica* roots and anti-inflammatory activity [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(14): 2412-2417.
- [56] Zhou H L, Cao H H, Zheng Y R, et al. Liang-Ge-San, a classic traditional Chinese medicine formula, attenuates acute inflammation in zebrafish and RAW 264.7 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112427.
- [57] 张瑜. 蟾皮中吡啶烷胺类生物碱化学成分及抗炎活性机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
Zhang Y. The chemical and anti-inflammatory activity mechanism research of indolealkylamines in toad skin [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2020.
- [58] 李丽丽. 衢枳壳提取液在呼吸道炎症中的保护作用与抗炎机制研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019.
Li L L. Study on protective effect and anti-inflammatory mechanism of Quzhou *Fructus Aurantii* extract on

- respiratory inflammation [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019.
- [59] Li J J, Zhang Y, Han L W, et al. Tenacissoside H exerts an anti-inflammatory effect by regulating the NF- κ B and p38 pathways in zebrafish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 83: 205-212.
- [60] Nguyen T H, Nachtergaele A, Nguyen T M, et al. Anti-inflammatory properties of the ethanol extract from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz based on *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112739.
- [61] Yang W J, Chen X M, Wang S Q, et al. 4 β -hydroxywithanolide E from goldenberry (whole fruits of *Physalis peruviana* L.) as a promising agent against chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(4): 1217-1228.
- [62] 钱哲. 基于TGF- β 与NF- κ B信号探讨龟鹿二仙胶对GIOP斑马鱼治疗作用机制 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- Qian Z. Researching the mechanism of the treatment of zebrafish GIOP model by the signal of TGF- β and NF- κ B [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2017.
- [63] Shen P, Li J, Tu S H, et al. Positive effects of Lianhuaqingwen granules in COVID-19 patients: a retrospective study of 248 cases [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 278: 114220.
- [64] Chen J, Wang Y K, Gao Y, et al. Protection against COVID-19 injury by qingfei paidu decoction via anti-viral, anti-inflammatory activity and metabolic programming [J]. *Biomed Pharmacoth*, 2020, 129: 110281.

[责任编辑 兰新新]