

基于转基因血管荧光斑马鱼的芦丁、甘草酸、汉防己甲素、葛根素、柚皮素、鞣花酸、黄芩苷、大黄素、穿心莲内酯、苦参碱促血管新生活性初探

周 祥¹, 潘红烨¹, 许 照¹, 平夏婷¹, 林 冀^{1,2}, 姚建标^{1,3*}, 朱小翠¹

1. 浙江康恩贝制药股份有限公司/浙江省中药制药技术重点实验室, 浙江 杭州 310052

2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

3. 浙江大学 药学院, 浙江 杭州 310058

摘要: 目的 采用转基因血管荧光斑马鱼研究芦丁、甘草酸、汉防己甲素、葛根素、柚皮素、鞣花酸、黄芩苷、大黄素、穿心莲内酯、苦参碱促进血管新生的作用。方法 选取48 hpf转基因血管荧光Fli-1品系斑马鱼3 480尾于六孔板中,每孔均处理30尾(实验组),分别水浴给予芦丁81.90~1 637.95 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、甘草酸60.76~1 215.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、汉防己甲素5.02~80.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、葛根素120.08~2 161.49 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、柚皮素3.67~734.59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、鞣花酸0.21~3.31 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、黄芩苷28.00~448.07 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、大黄素0.19~740.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、穿心莲内酯35.67~570.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、苦参碱50.33~805.28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,同时设置对照组(养鱼用水处理斑马鱼),处理24 h后观察记录斑马鱼的毒性表型和死亡情况,确定供试品对斑马鱼的最大耐受浓度(MTC)。用10个化合物的MTC与斑马鱼共培养24 h,检测肠下血管面积和肠下血管出芽数。结果 与对照组比较,芦丁组、甘草酸组、汉防己甲素组、葛根素组、柚皮素组、黄芩苷组、穿心莲内酯组、苦参碱组斑马鱼肠下血管面积像素升高,其中甘草酸组、汉防己甲素组、黄芩苷组、穿心莲内酯组差异显著($P<0.05, 0.01, 0.001$);鞣花酸组、大黄素组斑马鱼肠下血管面积像素降低,差异不显著;芦丁组、汉防己甲素组、葛根素组、柚皮素组、鞣花酸组、苦参碱组斑马鱼肠下血管出芽数比对照组多,芦丁组差异显著($P<0.05$);甘草酸组、黄芩苷组、穿心莲内酯组斑马鱼肠下血管出芽数比对照组少,大黄素组斑马鱼肠下血管出芽数与对照组相当。结论 芦丁、甘草酸、汉防己甲素、黄芩苷和穿心莲内酯对斑马鱼具有促进血管新生作用;葛根素、柚皮素、鞣花酸、大黄素和苦参碱对血管新生无明显影响。

关键词: 斑马鱼; 中药源化合物; 血管新生; 芦丁; 甘草酸; 汉防己甲素; 黄芩苷; 穿心莲内酯

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)06-1052-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.006

Preliminary study on angiogenesis promoting activities of rutin, glycyrrhizic acid, tetrandrine, puerarin, naringin, ellagic acid, baicalin, emodin, androgynolide and matrine in transgenic fluorescein zebrafish

ZHOU Xiang¹, PAN Hongye¹, XU Zhao¹, PING Xiating¹, LIN Ming^{1,2}, YAO Jianbiao^{1,3}, ZHU Xiaocui¹

1. Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd./Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

3. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: **Objective** The effects of rutin, glycyrrhizic acid, tetrandrine, puerarin, naringin, ellagic acid, baicalin, emodin, androgynolide and matrine on angiogenesis were studied by transgenic fluorescein vascular zebrafish. **Methods** A total of 3 480 zebrafish of 48 hpf transgenic fluorescein Fli-1 strain were selected and placed in six well plates, with 30 fish in each well (experimental group). Rutin of 81.90—1 637.95 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, glycyrrhizic acid of 60.76—1 215.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, tetrandrine of 5.02—80.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, puerarin of 120.08—2 161.49 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, naringin of 3.67—734.59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ellagic acid of 0.21—3.31 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,

收稿日期: 2021-11-01

基金项目: 重大新药创制科技重大专项(2017ZX09304003)

第一作者: 周 祥(1988—),男,硕士,中级工程师,研究方向为基于斑马鱼模型的中药药物评价研究。Tel:(0571)87774840 E-mail: 575058392@qq.com

*通信作者: 姚建标(1980—),男,硕士,正高级工程师,研究方向为中药与天然药物研究开发。Tel:(0571)87774836 E-mail:tyjackie@163.com

baicalin of 28.00—448.07 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, emodin of 0.19—740.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, androgynolide of 35.67—570.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, matrine 50.33—805.28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were given respectively in aqueous solution, and the control group (zebrafish treated with fish culture water) were set up at the same time. After 24 h of treatment, the toxic phenotype and death of zebrafish were observed and recorded. The maximum tolerance concentration (MTC) of zebrafish was determined. Zebrafish were co-cultured with MTC of 10 compounds for 24 h, and the area and sprouted number of subintestinal vessels were detected. **Results** Compared with control group, the rutin group, the glycyrrhizic acid group ($P < 0.05$), the hanfangenin group ($P < 0.001$), the gerberoside group, the naringenin group, the baicalin group ($P < 0.01$), the andrographolide group ($P < 0.001$), and the bitter ginseng base group had higher subintestinal area pixels in zebrafish, ellagic acid group, rhodopsin group zebrafish subintestinal vascular area pixel was lower. The number of subintestinal vascular outgrowths in zebrafish was more in the rutin group ($P < 0.05$), hanfangenin, geranium group, naringenin group, ellagic acid group, and bitter ginseng base group than that in control group. The number of subintestinal vascular sprouts in zebrafish of glycyrrhizic acid group, baicalin group, and andrographolide group was less than that in the normal control group, and the number of subintestinal vascular sprouts in the rutin group was comparable to that in the rhodopsin group. **Conclusion** Rutin, glycyrrhizic acid, hanfangenin, baicalin, and andrographolide had pro-angiogenic effects on zebrafish. Puerarin, naringenin, ellagic acid, rhodopsin and bitter ginseng alkaloids had no significant effect on angiogenesis.

Key words: zebrafish; herbal-derived compounds; angiogenesis; rutin; glycyrrhizic acid; hanfangenin; baicalin; andrographolide

中药在我国已经形成了屈指可数的具有自主知识产权优势的现代经济产业^[1],由中药种植业(农业)、中成药流通业(商业)与中药制造业组成了相对完整的经济产业链^[2]。与化学药相比,中药有源于天然、副作用小、疗效确切、价格相对低廉的特点和优势^[3],日益受到大众的关注,发展迅猛^[4]。中药是中华民族的宝库,物种资源丰富,所含的化学成分有多种活性或药理作用^[5]。

心血管疾病主要包括高血压、动脉粥样硬化、心脏肥大、心肌梗死和心力衰竭,是世界范围内人类死亡的主要原因^[6]。血管新生(angiogenesis)在治疗机体的创伤愈合、缺血性心血管疾病等过程中有着重要价值。迄今为止,缺血性心脏病的标准治疗包括血运重建(溶栓、经皮冠状动脉介入治疗和冠状动脉旁路移植术)、抗血栓治疗(抗血小板和抗凝剂)、稳定/逆转动脉粥样硬化进展(控制动脉粥样硬化危险因素)和心肌重塑(交感和肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂)^[7-10]。治疗方案复杂与治疗性药物潜在的不良反应及预后使得人们越来越意识到中药可能在治疗心血管疾病中有独特的作用。

斑马鱼是一种发现于印度和巴基斯坦水域的热带鱼,属于辐鳍鱼纲鲤形目鲤科 *Danio* 属,因体侧有银蓝色的纵向条纹而得名^[11]。斑马鱼胚胎的小尺寸、半透明性和遗传上的可操作性,再加上大量的荧光转基因品系,可以直接观察体内血管的形成,大大促进了研究人员对血管生物学的理解,因此,斑马鱼成为研究脊椎动物血管网络形成的一个重要动物模型^[12]。

为了探索中药源化合物的促进血管新生作用,

本课题组前期建立心血管疾病相关中药材特色化合物库,以血管新生为关键词进行了大批量的文献检索,确定了以芦丁、甘草酸、汉防己甲素、葛根素、柚皮素、鞣花酸、黄芩苷、大黄素、穿心莲内酯、苦参碱为初步筛选目标化合物。本研究运用转基因血管内皮荧光 Fli-1 斑马鱼(呈绿色),对 10 种化合物进行筛选,对比其促进血管新生的作用差别。

1 材料

1.1 实验动物

转基因血管荧光 Fli-1 品系斑马鱼,以自然成对交配方式进行繁殖,由杭州环特生物科技股份有限公司斑马鱼药物筛选平台提供,实验动物生产许可证号为 SYXK(浙)2012-0171,日龄为受精后 48 h (48 hpf),斑马鱼均饲养于 28 °C 的养鱼用水中(水质:每升反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐,电导率为 450~550 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; pH 值为 6.5~8.5;硬度为 100~300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3),饲养在环特生物斑马鱼养殖中心,饲养管理符合国际 AAALAC 认证的要求。

1.2 药物、主要试剂

芦丁(浙江康恩贝制药股份有限公司,批号 121217);甘草酸(批号 C10530297)、葛根素(批号 C10656460)、柚皮素(批号 C11107823)、鞣花酸(批号 C10881856)、穿心莲内酯(批号 C10037148),购自上海麦克林生化科技有限公司;汉防己甲素(批号 S2609C73236)、苦参碱(批号 T22M10F88874),购自上海源叶生物科技有限公司;黄芩苷(批号 110715-201821)、大黄素(批号 110756-201512),中国食品药品检定研究院;毛蕊异黄酮(阳性对照,批

号C31630, 华中海威基因科技有限公司); 二甲基亚砜(批号BCBN0845V, 美国Sigma公司); 甲基纤维素(批号SLBT4343, 美国Sigma公司)。

1.3 主要仪器

解剖显微镜(日本OLYMPUS公司); CCD相机(TK-C1481EC); 电动聚焦连续变倍荧光显微镜(日本Nikon公司); 精密电子天平(美国OHAUS公司); 六孔板(中国Nest Biotech公司)。

2 方法

2.1 溶液配制

按各化合物的最大溶解度, 用DMSO配制成母液; 毛蕊异黄酮用DMSO配制成 $37.60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, -20°C 保存。

2.2 化合物最大耐受浓度(MTC)测定

随机选取48 hpf转基因血管荧光斑马鱼1 830尾于六孔板中, 每孔(实验组)均处理30尾, 分别水溶给药给予芦丁 81.90 、 163.79 、 327.59 、 818.97 、 $1\ 637.95 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 甘草酸 60.76 、 121.52 、 243.03 、 607.59 、 $1\ 215.17 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 汉防己甲素 5.02 、 10.04 、 20.07 、 40.14 、 $80.29 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 葛根素 120.08 、 240.17 、 480.33 、 $1\ 080.74$ 、 $2\ 161.49 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 柚皮素 3.67 、 9.18 、 18.36 、 27.55 、 36.73 、 91.82 、 183.65 、 367.30 、 $734.59 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 鞣花酸 0.21 、 0.41 、 0.83 、 1.66 、 $3.31 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄芩苷 28.00 、 56.01 、 112.02 、 224.03 、 $448.07 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 大黄素 0.19 、 0.37 、 1.85 、 3.70 、 11.56 、 23.13 、 46.26 、 92.51 、 185.02 、 370.04 、 $740.08 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 穿心莲内酯 35.67 、 71.34 、 142.67 、 285.35 、 $570.69 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 苦参碱 50.33 、 100.66 、 201.32 、 402.64 、 $805.28 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时设置对照组(养鱼用水处理斑马鱼), 每孔液体体积 3 mL 。供试品处理24 h后观察记录斑马鱼的毒性表型和死亡情况, 确定供试品对斑马鱼的MTC。

2.3 化合物对斑马鱼肠下面积及血管出芽数的影响

随机选取360尾48 hpf转基因血管荧光Fli-1品系斑马鱼于六孔板中, 以水溶给药的方式给予芦丁 $818.97 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、甘草酸 $121.52 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、汉防己甲素 $80.29 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、葛根素 $2\ 161.49 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柚皮素 $27.55 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、鞣花酸 $3.31 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、黄芩苷 $224.03 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、大黄素 $0.19 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、穿心莲内酯 $285.35 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、苦参碱 $402.64 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 阳性对照毛蕊异黄酮 $37.6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [13], 同时设置对照组(养鱼用水处理)。每组(孔)30尾斑马鱼, 液体体积为 3 mL 。处理24 h后, 每组随机取10条斑马鱼在荧光显微镜

下观察斑马鱼肠下血管、拍照并保存图片。用尼康NIS-Elements D 3.10高级图像处理软件进行图像分析, 计算斑马鱼肠下血管面积(S)和斑马鱼肠下血管出芽数, 计算血管面积促进率。以肠下血管面积和肠下血管出芽数的统计学意义评价化合物对斑马鱼血管新生的促进或抑制作用。

$$\text{血管面积促进率} = (S_{\text{供试品}} - S_{\text{对照}}) / S_{\text{对照}}$$

2.4 统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 26.0软件、方差分析和Dunnett's T -检验进行统计学分析。

3 结果

3.1 化合物的MTC

芦丁浓度在 $81.90 \sim 818.97 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不诱发斑马鱼死亡, 且无明显毒性表型; 浓度在 $1\ 637.95 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 第2天有析出。确定芦丁对斑马鱼的MTC为 $818.97 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

甘草酸浓度在 $60.76 \sim 121.52 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不诱发斑马鱼死亡, 且无明显毒性表型; 浓度在 $243.03 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 第2天有析出; 浓度在 $607.59 \sim 1\ 215.17 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有析出。确定甘草酸对斑马鱼的MTC为 $121.52 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

汉防己甲素浓度在 $5.02 \sim 80.29 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不诱发斑马鱼死亡, 且无明显毒性表型。选取 $80.29 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (溶解度)进行后续实验。

葛根素浓度在 $120.08 \sim 2\ 161.49 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不诱发斑马鱼死亡, 且无明显毒性表型。选取 $2\ 161.49 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (溶解度)进行后续实验。

柚皮素浓度在 $3.67 \sim 27.55 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不诱发斑马鱼死亡, 且无明显毒性表型; 浓度在 $36.73 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 诱发20%(6/30尾)斑马鱼身体变短; 浓度在 $91.82 \sim 734.59 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 诱发全部斑马鱼死亡。确定柚皮素对斑马鱼的MTC为 $27.55 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

鞣花酸浓度在 $0.21 \sim 3.31 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不诱发斑马鱼死亡, 且无明显毒性表型。选取 $3.31 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (溶解度)进行后续实验。

黄芩苷浓度在 $28.00 \sim 224.03 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不诱发斑马鱼死亡, 且无明显毒性表型; 浓度在 $448.07 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有析出。因此确定黄芩苷对斑马鱼的MTC为 $224.03 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

大黄素浓度在 $0.19 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不诱发斑马鱼死亡, 且无明显毒性表型; 浓度在 $0.37 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱发26.7%(8/30尾)斑马鱼肠道出血; 浓度在 $1.85 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱发全部斑马鱼肠道出血; 浓度在 $3.70 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱

发全部斑马鱼肠道出血和身体弯曲;浓度在 $11.56\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时诱发50%(15/30尾)斑马鱼死亡;浓度在 $23.13\sim 740.08\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时诱发全部斑马鱼死亡。确定大黄素对斑马鱼的MTC为 $0.19\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

穿心莲内酯浓度在 $35.67\sim 285.35\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不诱发斑马鱼死亡,且无明显毒性表型;在 $570.69\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时有析出,因此确定穿心莲内酯对斑马鱼的MTC为 $285.35\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

苦参碱浓度在 $50.33\sim 402.64\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不诱发斑马鱼死亡,且无明显毒性表型;浓度在

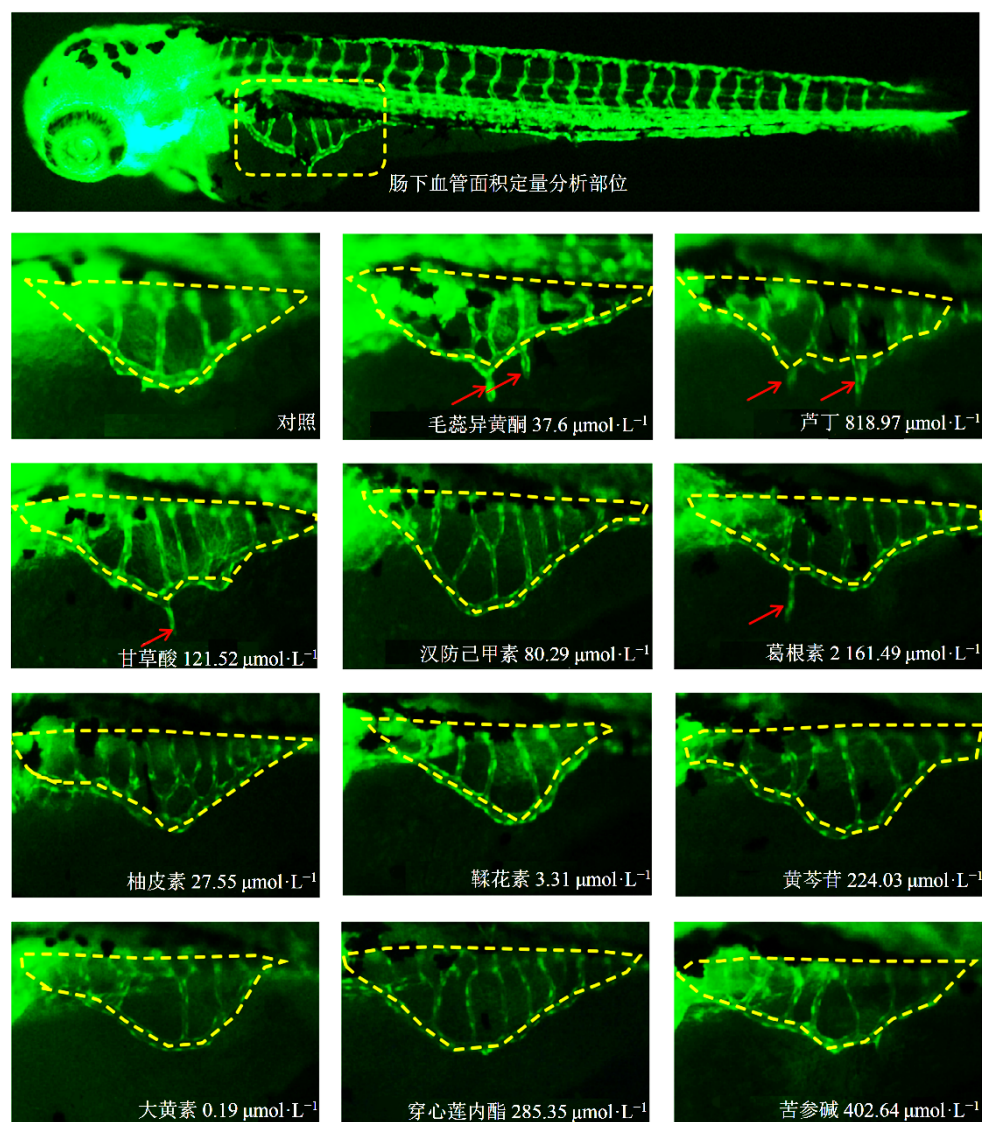
$805.28\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,诱发46.7%(14/30尾)斑马鱼心包水肿和身体弯曲。确定苦参碱对斑马鱼的MTC为 $402.64\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果见表1。

3.2 化合物对斑马鱼肠下血管面积及肠下血管出芽数的影响

如图1和表2所示,芦丁浓度为 $818.97\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为27 724像素,与对照组(27 023像素)比较无显著差异,对肠下血管面积促进率为3%;斑马鱼肠下血管出芽数为1.5个,与对照组(0.6个)比较显著增加($P<0.05$)。表明芦丁

表1 化合物“浓度-致死性”结果($n=30$)
Table 1 "Concentration-lethality" results after compound treatment ($n=30$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	死亡 数/尾	死亡 率/%	毒性表型	组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	死亡 数/尾	死亡 率/%	毒性表型
对照	—	0	0	无明显异常	鞣花酸	0.21	0	0	无明显异常
芦丁	81.90	0	0	无明显异常		0.41	0	0	无明显异常
	163.79	0	0	无明显异常		0.83	0	0	无明显异常
	327.59	0	0	无明显异常		1.66	0	0	无明显异常
	818.97	0	0	无明显异常		3.31	0	0	无明显异常
	1 637.95	0	0	第2天有析出	黄芩苷	28.00	0	0	无明显异常
甘草酸	60.76	0	0	无明显异常		56.01	0	0	无明显异常
	121.52	0	0	无明显异常		112.02	0	0	无明显异常
	243.03	0	0	第2天有析出		224.03	0	0	无明显异常
	607.59	0	0	有析出		448.07	0	0	有析出
	1 215.17	0	0	有析出	大黄素	0.19	0	0	无明显异常
汉防己甲	5.02	0	0	无明显异常		0.37	0	0	8尾肠道出血
素	10.04	0	0	无明显异常		1.85	0	0	30尾肠道出血
	20.07	0	0	无明显异常		3.70	0	0	30尾肠道出血,身体弯曲
	40.14	0	0	无明显异常		11.56	15	50	—
	80.29	0	0	无明显异常		23.13	30	100	—
葛根素	120.08	0	0	无明显异常		46.26	30	100	—
	240.17	0	0	无明显异常		92.51	30	100	—
	480.33	0	0	无明显异常		185.02	30	100	—
	1 080.74	0	0	无明显异常		370.04	30	100	—
	2 161.49	0	0	无明显异常		740.08	30	100	—
柚皮素	3.67	0	0	无明显异常	穿心莲	35.67	0	0	无明显异常
	9.18	0	0	无明显异常	内酯	71.34	0	0	无明显异常
	18.36	0	0	无明显异常		142.67	0	0	无明显异常
	27.55	0	0	无明显异常		285.35	0	0	无明显异常
	36.73	0	0	6尾身体变短		570.69	0	0	有析出
	91.82	30	100	—	苦参碱	50.33	0	0	无明显异常
	183.65	30	100	—		100.66	0	0	无明显异常
	367.30	30	100	—		201.32	0	0	无明显异常
	734.59	30	100	—		402.64	0	0	无明显异常
						805.28	0	0	14尾心包水肿和身体弯曲



黄色虚线标记部分为斑马鱼肠下血管;红色箭头所指为出芽数
Yellow dashed line marks subintestinal vessels of zebrafish; Red arrows indicate number of sprouts

图1 化合物对血管新生的促进作用表型图

Fig. 1 Phenotypes of promotion or inhibition of angiogenesis by test article

浓度为 $818.97 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼具有促进血管新生作用。

汉防己甲素浓度为 $80.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为34 670像素,与对照组(27 023像素)比较显著增加($P<0.001$),对肠下血管面积的促进率为28%;斑马鱼肠下血管出芽数为0.9个,与对照组(0.6个)比较差异无统计学意义。表明汉防己甲素对斑马鱼具有促进血管新生作用。

甘草酸浓度为 $121.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为30 223像素,与对照组(27 023像素)比较显著增加($P<0.05$),对肠下血管面积的促进率为12%。斑马鱼肠下血管出芽数为0.8个,与对照组(0.6个)比较差异不显著。表明甘草酸对斑马鱼

具有促进血管新生作用。

葛根素浓度为 $2\ 161.49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为28 192像素,与对照组(27 023像素)比较差异不显著,对肠下血管面积的促进率为4%。斑马鱼肠下血管出芽数为1.2个,与对照组(0.6个)比较差异不显著。

柚皮素浓度为 $27.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为30 329像素,与对照组(27 023像素)比较差异不显著,对肠下血管面积的促进率为12%。斑马鱼肠下血管出芽数为0.8个,与对照组(0.6个)比较差异不显著。

鞣花酸浓度为 $3.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为26 050像素,与对照组(27 023像素)比较

表2 化合物对血管新生的促进作用($n=10$)Table 2 Promotion of angiogenesis by test article ($n=10$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	肠下血管面积/像素	血管面积促进作用/%	肠下血管出芽数
对照	—	27 023±492	—	0.6±0.2
毛蕊异黄酮	37.60	31 873±1 397**	18	1.5±0.3*
芦丁	818.97	27 724±1 351	3	1.5±0.3*
甘草酸	121.52	30 223±1 153*	12	0.5±0.2
汉防己甲素	80.29	34 670±1 553***	28	0.9±0.3
葛根素	2 161.49	28 192±1 095	4	1.2±0.4
柚皮素	27.55	30 329±1 511	12	0.8±0.2
鞣花酸	3.31	26 050±793	-4	0.7±0.3
黄芩苷	224.03	30 131±735**	12	0.3±0.2
大黄素	0.19	26 156±553	-3	0.6±0.3
穿心莲内酯	285.35	30 676±712***	14	0.2±0.1
苦参碱	402.64	28 118±1 072	4	0.7±0.3

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

差异不显著,对肠下血管面积的抑制率为4%。斑马鱼肠下血管出芽数为0.7个,与对照组(0.6个)比较差异不显著。

黄芩苷浓度为224.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为30 131像素,与对照组(27 023像素)比较差异显著($P<0.01$),对肠下血管面积的促进率为12%。斑马鱼肠下血管出芽数为0.3个,与对照组(0.6个)比较差异不显著。表明黄芩苷对斑马鱼具有促进血管新生作用。

大黄素浓度为0.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为26 156像素,与对照组(27 023像素)比较差异不显著,对肠下血管面积的抑制率为3%。斑马鱼肠下血管出芽数为0.6个,与对照组(0.6个)比较差异不显著。

穿心莲内酯浓度为285.35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为30 676像素,与对照组(27 023像素)比较差异显著($P<0.001$),对肠下血管面积的促进率为14%。斑马鱼肠下血管出芽数为0.2个,与正常对照组(0.6个)比较差异不显著。表明穿心莲内酯对斑马鱼具有促进血管新生作用。

苦参碱浓度为402.64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为28 118像素,与对照组(27 023像素)比较差异不显著,对肠下血管面积的促进作用为4%。斑马鱼肠下血管出芽数为0.7个,与对照组(0.6个)比较差异不显著。

4 讨论

血管生成一般是源于已存在的毛细血管和毛细血管后微静脉的新的毛细血管性血管的生长^[14]。迁移性的血管内皮细胞在原位凝聚成血管索,随后

管腔内的血管就会发展起来。在原生血管形成后,最初的血管网络通过复杂的二级血管生成过程而扩大,该过程通过发芽和伸长或通过现有血管的分裂或融合来重塑已有的血管。在这些过程中,血管被指定为动脉和静脉,随后募集支持性平滑肌细胞和周细胞以保护内皮和维持血管的完整性^[12]。

斑马鱼模型实验用药量少、费用低、周期短、高通量^[15],另一方面,斑马鱼靶点蛋白与人类有71%同源,虽然,和人类蛋白质之间相比还是存在序列差异,但在现实中,这种药理效应的保守率还是很高的^[16]。本研究采用斑马鱼模型,对多个来源于中药的化合物进行血管新生活性筛选,综合各化合物对斑马鱼肠下血管面积与出芽数的研究结果来看,芦丁、甘草酸、汉防己甲素、黄芩苷和穿心莲内酯具有促进血管新生的作用。其中汉防己甲素对肠下血管面积的促进作用最好,高于阳性对照药毛蕊异黄酮。葛根素、柚皮素、鞣花酸、大黄素和苦参碱对血管新生无明显促进作用。

芦丁是一种糖苷,由黄酮苷元和二糖组成的芸香糖,它已显示出许多药理活性,包括抗氧化、细胞保护、血管保护、抗癌、神经保护和心脏保护活性^[17];甘草酸具有抗炎、抗病毒和保肝解毒及增强免疫功能等作用,具有肾上腺皮质激素样作用,能抑制毛细血管通透性,减轻过敏性休克的症状^[18];本研究发现2者具有促血管生成作用,进一步证明其心血管的保护作用。汉防己甲素具有良好的改善微血管反应性作用^[19],可能通过上调血管内皮生长因子(VEGF)表达促进缺血组织血管新生^[20-21],本

研究发现其具有促血管生成作用,与报道一致。有研究报道,在鸡胚绒毛尿囊膜模型上黄芩苷对血管生成具有剂量相关性双重作用,在低剂量($10\sim 50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)时促进血管生成,高剂量($5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 或以上)抑制血管生成^[22];本研究发现在斑马鱼模型上,黄芩苷在水中浓度为 $224.03\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (溶解度)时有促血管生成作用。多数研究结果表明穿心莲内酯有效地抑制了新血管生成^[23-25],本实验结果显示与对照组相比,穿心莲内酯能够显著地增加肠下血管面积,可能是穿心莲内酯在不同的剂量下对血管也具有双重作用,这需要再设计实验以验证猜想。葛根素具有降血糖、调血脂、保护血管、抗氧化应激、抗感染、提高胰岛素的敏感指数等作用,并且不良反应较少,被誉为“植物雌激素”^[26];柚皮素是一种天然类黄酮,通过激活肌细胞中BKCa通道对內皮剥脱血管起血管舒张作用^[27];鞣花酸是一种多酚二内酯,是没食子酸的二聚衍生物,具有抗氧化、抗炎、抗增殖、抗病毒、凝血等多种生物学效应^[28];大黄素是从大黄及决明子等传统中药中提取的一种蒽醌类生物活性成分,具有心血管保护、保肝、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗炎、皮肤调理、免疫调节及泻下等药理作用^[29];在实验剂量下,斑马鱼实验中未见显著的血管生成作用。

在10个目标化合物中,多数未有采用斑马鱼模型进行血管新生方面的研究,其中5个促进血管新生的化合物中,芦丁和黄芩苷都属于黄酮类,已有报道发现其对心血管疾病具有良好的预防和治疗作用^[29-30],若需要深入进行血管新生活性筛选研究的话建议以黄酮类化合物为重点研究对象。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张瀚. 中药产业发展策略浅析 [J]. 青春岁月, 2017(23): 437.
Zhang H. Analysis on development strategy of Traditional Chinese medicine industry [J]. Bloom Seas, 2017(23): 437.
- [2] 袁继新, 王小勇, 林志坚, 等. 产业链、创新链、资金链“三链融合”的实证研究: 以浙江智慧健康产业为例 [J]. 科技管理研究, 2016, 36(14): 31-36, 44.
Yuan J X, Wang X Y, Lin Z J, et al. An empirical study on industry chain, innovation chain and fund chain—a case of Zhejiang smart health industry [J]. Sci Technol Manag Res, 2016, 36(14): 31-36, 44.
- [3] Liu C Y, Yang S S, Wang K L, et al. Alkaloids from traditional Chinese medicine against hepatocellular carcinoma [J]. Biomedicine Pharmacother, 2019, 120: 109543.
- [4] 王阶, 乔夕瑶, 林飞. 医疗机构中药制剂现状研究及发展对策 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(21): 4117-4121.
Wang J, Qiao X Y, Lin F. Present situation and development strategies of Chinese medicine preparation in medical institutions [J]. China J Chin Mat Med, 2015, 40(21): 4117-4121.
- [5] 彭文烈, 徐安龙. 应用现代生物技术筛选中药创新药物 [J]. 世界科学技术, 2001, 3(3): 32-34.
Peng W L, Xu A L. Application of modern biotechnology to screen innovative drugs in Traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol, 2001, 3(3): 32-34.
- [6] 滕军燕. 缺血性心血管病风险评估模型的建立与研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
Teng J Y. Establishment and study of risk assessment model for ischemic cardiovascular disease [D]. Jinan: Shandong University, 2017.
- [7] Hao Y D, Zhao Y X, Yang S W, et al. High-energy phosphates and ischemic heart disease: From bench to bedside [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 675608.
- [8] Knuuti J, Wijns W, Saraste A, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes [J]. Eur Heart J, 2020, 41(3): 407-477.
- [9] Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. Eur Heart J, 2018, 39(2): 119-177.
- [10] Roffi M, Patrono C, Collet J P, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. Eur Heart J, 2016, 37(3): 267-315.
- [11] 冯康虎, 方鹏飞, 张文贤, 等. 斑马鱼模型及其在血管生成抑制剂筛选中的应用 [J]. 西部中医药, 2014, 27(12): 141-144.
Feng K H, Fang P F, Zhang W X, et al. The model of zebra fish and its application to the screening of angiogenesis inhibitor [J]. West J Tradit Chin Med, 2014, 27(12): 141-144.
- [12] Wilkinson R N, van Eeden F J M. The zebrafish as a model of vascular development and disease [M]//

- Progress in Molecular Biology and Translational Science. Amsterdam: Elsevier, 2014: 93-122.
- [13] 黎响, 胡光, 李振华, 等. 毛蕊异黄酮的促血管新生研究 [A]//第十三届中国科协年会——生物医药博士论坛论文集 [C]. 天津: 中国科协, 2011: 116-123.
- Li S, Hu G, Li Z H, et al. Study on the effect of isoflavone on angiogenesis [A]// Proceedings of the 13th Annual Meeting of China Association for Science and Technology——Biomedical Doctor Forum [C]. Tianjin: China Association for Science and Technology, 2011: 116-123.
- [14] 张铁军, 刘昌孝. 新形势下中药新药研发的思路与策略 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 1-8.
- Zhang T J, Liu C X. Ideas and strategies of new traditional Chinese medicine research and development under new situation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(1): 1-8.
- [15] Gianni-Barrera R, Butschkau A, Uccelli A, et al. PDGF-BB regulates splitting angiogenesis in skeletal muscle by limiting VEGF-induced endothelial proliferation [J]. Angiogenesis, 2018, 21(4): 883-900.
- [16] 苏梅, 姜雅静, 姜雅琼, 等. 脑脉利颗粒对斑马鱼血管新生的促进及对血小板聚集性血栓形成的预防作用研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(5): 24-29.
- Su M, Lou Y J, Jiang Y Q, et al. Study on the effect of naomaili granule on angiogenesis and prevention of platelet aggregation thrombosis in zebrafish [J]. Res Pract Chin Med, 2019, 33(5): 24-29.
- [17] Ganeshpurkar A, Saluja A K. The pharmacological potential of rutin [J]. Saudi Pharm J, 2017, 25(2): 149-164.
- [18] Kim S R, Jeon H J, Park H J, et al. Glycyrrhetic acid inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced vascular permeability via the suppression of interleukin-8 [J]. Inflamm Res, 2013, 62(2): 145-154.
- [19] 李庆平, 陆泽安, 饶曼人. 高血压微血管反应性变化及粉防己碱的影响 [J]. 中国微循环, 1999, 3(4): 202-204, 207.
- Li Q P, Lu Z A, Rao M R. Effect of tetrandrine on microvascular reactivity in renovascular hypertensive rats [J]. J Chin Microcirc, 1999, 3(4): 202-204, 207.
- [20] 王虹, 赵鑫, 高秀梅. 汉防己甲素通过上调 VEGF 表达促进缺血组织血管新生 [A]//中华医学会第十五次全国心血管病学术大会论文汇编 [C]. 天津: 中华医学会, 2013: 57-58.
- Wang H, Zhao X, Gao X M. Tetrandrine promotes angiogenesis in ischemic tissues by upregulation of VEGF expression [A]//Proceedings of the 15th National Conference on Cardiovascular Diseases, Chinese Medical Association [C]. Tianjin: Chinese Medical Association, 2013: 57-58.
- [21] Zhu D Q, Wang S S, Lawless J, et al. Dose dependent dual effect of baicalin and herb Huang Qin extract on angiogenesis [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0167125.
- [22] Kajal K, Panda A K, Bhat J, et al. Andrographolide binds to ATP-binding pocket of VEGFR2 to impede VEGFA-mediated tumor-angiogenesis [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 4073.
- [23] Dai J W, Lin Y Y, Duan Y F, et al. Andrographolide inhibits angiogenesis by inhibiting the mir-21-5p/TIMP3 signaling pathway [J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(5): 660-668.
- [24] Sheeja K, Guruvayoorappan C, Kuttan G. Antiangiogenic activity of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(2): 211-221.
- [25] Zhou Y X, Zhang H, Peng C. Puerarin: A review of pharmacological effects [J]. Phytother Res, 2014, 28(7): 961-975.
- [26] Venkateswara Rao P, Kiran S, Rohini P, et al. Flavonoid: A review on naringenin [J]. J Pharmacogn Phytochem, 2017, 6: 2778-2783.
- [27] 吴小磊, 钟晨, 史金铭. 鞣花酸的生物学效应 [J]. 中国林副特产, 2019(1): 73-78.
- Wu X L, Zhong C, Shi J M. Biological effect of ellagic acid [J]. For Prod Speciality China, 2019(1): 73-78.
- [28] 李牧, 杜智敏. 芦荟大黄素的药理作用研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(9): 765-768.
- Li M, Du Z M. Research progress on pharmacological effects of aloe-emodin [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2015, 31(9): 765-768.
- [29] 廉博雯. 利用斑马鱼模型评价药物对心血管发育及神经行为的影响 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- Lian B W. Assessing the effects of agents on the cardiovascular development and neural behavior using zebrafish model [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2019.
- [30] 李旭光, 方莲花, 杜冠华. 黄酮类化合物的心血管保护作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(6): 741-744.
- Li X G, Fang L H, Du G H. Research advances in cardiovascular protective effects of flavonoids [J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(6): 741-744.

[责任编辑 兰新新]