

## 肺热普清散对斑马鱼炎症模型的抗炎作用及机制研究

采金金<sup>1</sup>, 谢和兵<sup>1, 2\*</sup>, 吴永昊<sup>3, 4</sup>, 王荣春<sup>4</sup>, 王雪<sup>4</sup>, 陈锡强<sup>4</sup>

1. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012

2. 西藏神猴药业有限责任公司, 西藏 日喀则 858300

3. 山东师范大学 生命科学学院, 山东 济南 250103

4. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

**摘要:**目的 探讨藏药肺热普清散对斑马鱼炎症模型的作用及机制。方法 挑选受精后72 h斑马鱼随机移入24孔板中, 分为对照组、模型组和肺热普清散低、中、高质量浓度(3、10、30 mg·L<sup>-1</sup>)组, 对照组与模型组不加药, 肺热普清散与斑马鱼共孵育1 h后, 除对照组外, 其余各组用20 μmol·L<sup>-1</sup>硫酸铜处理2 h制备炎症模型。在荧光显微镜下观察绿色荧光标记中性粒细胞的Tg(Lyz:EGFP)系斑马鱼体内炎症细胞迁移情况; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测野生型斑马鱼核因子κB2(NF-κB2)、白细胞介素(IL)-1β、肿瘤坏死因子(TNF)-α、IL-8 mRNA水平; Western blotting实验检测野生型斑马鱼NF-κB、TNF-α蛋白表达水平; 免疫荧光法检测各组鱼尾NF-κB表达。结果 对照组斑马鱼荧光细胞主要分布于头部和主动脉部, 躯干部位主动脉以上荧光细胞稀少; 模型组荧光细胞在各区域均增加, 显示出炎症细胞向血管外迁移的明显趋势, 躯干侧线以上荧光细胞计数较对照组显著增加( $P < 0.001$ ); 肺热普清散10、30 mg·L<sup>-1</sup>组躯干部荧光细胞计数与模型组比较显著降低( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。与模型组比较, 肺热普清散3、10、30 mg·L<sup>-1</sup>组IL-1β、TNF-α、IL-8的mRNA水平显著下调( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 10、30 mg·L<sup>-1</sup>组NF-κB2 mRNA水平显著下调( $P < 0.01$ ); 10、30 mg·L<sup>-1</sup>组NF-κB、TNF-α蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。免疫荧光结果显示, 模型组躯干部位和鱼鳍NF-κB白色荧光点较对照组明显增加, 经10 mg·L<sup>-1</sup>肺热普清散处理后的相同部位荧光点减少。结论 肺热普清散对硫酸铜诱导的斑马鱼炎症模型具有抗炎作用, 机制与抑制NF-κB、TNF-α表达有关。

**关键词:** 肺热普清散; 斑马鱼; 炎症; 核因子(NF)-κB

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)02-0364-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.02.017

## Anti-inflammatory effect and mechanism of Feire Puqing Powder on zebrafish model

CAI Jinjin<sup>1</sup>, XIE Hebing<sup>1, 2\*</sup>, WU Yonghao<sup>3, 4</sup>, WANG Rongchun<sup>4</sup>, WANG Xue<sup>4</sup>, CHEN Xiqiang<sup>4</sup>

1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Tibet God Mokey Pharmaceutical Co., Ltd., Rikaze 858300, China

3. Faculty of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250103, China

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

**Abstract: Objective** To explore the effects of Feire Puqing Powder (FPP) on inflammation and its mechanism on zebrafish model. **Methods** Zebrafish 72 h after fertilization were randomly transferred into 24-well plates and divided into control group, model group and FPP low, medium and high concentration (3, 10, and 30 mg·L<sup>-1</sup>) groups. Control group and model group were not given any medicine. After FPP was co-incubated with zebrafish for one h, except the control group, the other groups were treated with 20 μmol·L<sup>-1</sup> copper sulfate for two h to prepare inflammation model. The number of inflammatory cells in the midline area of green fluorescence labeled neutrophils transgenic strain Tg(Lyz:EGFP) zebrafish was observed and recorded by fluorescence microscope.

收稿日期: 2022-08-12

**基金项目:** 西藏自治区科技厅中央引导地方科技发展项目(XZ202202YD0020C); 济南市“高校20条”资助项目引进创新团队项目(2020GXRC031); 山东省自然科学基金重大基础研究项目(ZR2021ZD29)

**第一作者:** 采金金, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂工艺与质量标准。E-mail: caijj1113@163.com

**\*通信作者:** 谢和兵, 男, 硕士生导师, 研究方向为高原医学、传统藏药的产业化开发。E-mail: Binghe\_8213@163.com

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect mRNA levels of nuclear factor  $\kappa$ B2 (*NF- $\kappa$ B2*), interleukin (*IL-1 $\beta$* ), tumor necrosis factor (*TNF*) - $\alpha$  and *IL-8* in wild-type zebrafish. The expression levels of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in wild-type zebrafish were detected by Western blotting assay. The expression of NF- $\kappa$ B in fish tail of each group was detected by immunofluorescence method.

**Results** In the control group, the fluorescent cells were mainly distributed in the head and the aorta, and the fluorescent cells above the aorta were rare in the trunk. The fluorescence cells in the model group were increased in all areas, showing an obvious trend of extravascular migration of inflammatory cells, and the fluorescence cell count above the lateral trunk line was significantly increased compared with the control group ( $P < 0.001$ ). Compared with model group, the fluorescent cell count of trunk cadre in 10 and 30 mg·L<sup>-1</sup> groups was significantly decreased ( $P < 0.01, 0.001$ ). Compared with model group, mRNA levels of *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  and *IL-8* in FPP 3, 10 and 30 mg·L<sup>-1</sup> groups were significantly down-regulated ( $P < 0.05, 0.01$ ), and *NF- $\kappa$ B2* mRNA levels in 10 and 30 mg·L<sup>-1</sup> groups were significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ). The expression levels of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in 10 and 30 mg·L<sup>-1</sup> groups were significantly decreased ( $P < 0.01, 0.001$ ). The white fluorescence spots of NF- $\kappa$ B in the trunk and fin of the model group were significantly increased compared with the control group, and the fluorescence spots in the same parts of the model group were decreased after 10 mg·L<sup>-1</sup> FPP treatment. **Conclusion** Feirepuqing Powder had anti-inflammatory effect on zebrafish inflammation model induced by copper sulfate, and the mechanism was related to the inhibition of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  expression.

**Key words:** Feire Puqing Powder; zebrafish; inflammation; NF- $\kappa$ B

小儿肺炎是由细菌或病毒等病原体引起的小儿肺部炎症,世界卫生组织已将小儿肺炎列为全球3种重要儿科疾病之一,我国政府也将其列为儿保四病之一。目前我国城市医院儿科住院的1/4~1/2患儿,县医院儿科住院的1/2以上患儿是肺炎病例。据报道全世界每年5岁以下儿童约400万死于肺炎,其中绝大多数是发展中国家儿童,有2/3是婴儿<sup>[1-2]</sup>。根据2020年《中国儿童肺炎发表及疫苗普及白皮书》表明肺炎是造成5岁以下儿童死亡的主要原因之一,我国每年约有30万5岁以下儿童死于肺炎,因而治疗小儿肺炎药物的研发迫在眉睫。

藏药是我国重要的民族医药分支之一,是具有长期实践特征的医药体系,虽然藏医药在我国拥有千年临床应用历史,但是利用现代药学研究方法开展系统性研究还远远不足,其作用机制和相关的药效学缺乏针对性的研究方法和内容。斑马鱼是近年公认的模式动物,在系统发育、器官功能评价和疾病模型方面取得了瞩目的研究成果<sup>[3]</sup>,并且在化合物高通量初筛方面具有独特优势,在炎症方面的活性评价也有成熟的研究方法<sup>[4]</sup>,近年来在抗炎药物发掘和机制研究方面都有广泛应用<sup>[5-6]</sup>。

肺热普清散收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药:第一册》<sup>[7]</sup>中,为西藏神猴药业有限责任公司独家生产的国药准字藏药复方制剂产品(批准文号:国药准字Z54020045),由天竺黄、红花、力嘎都、甘草、铁棒锤幼苗、诃子等14味药味组方,具有清肺泄热、消炎的作用,临床用于小儿肺炎、流行性感、风热、疟疾。本方已有400多年的临床实践应用历史,始载于公元16世纪的《验方百编》,并

沿用至今。目前关于该复方的抗炎活性和机制缺乏系统性研究,严重制约产品的临床推广,因而本研究利用硫酸铜刺激的斑马鱼炎症模型,首次对肺热普清散在炎症方面的药效及作用机制进行系统评价,为本品的临床推广和二次开发提供实验依据,同时也为藏药的药效和作用机制研究提供评价方法参考。

## 1 材料

### 1.1 试剂和主要仪器

肺热普清散由西藏神猴药业有限公司提供(批号20210601,每袋装1g),取原药粉末200mg溶于纯净水中,制成100g·L<sup>-1</sup>母液,有少量沉淀,置于4℃保存,用前混匀;脱膜剂(链霉菌蛋白酶E)和麻醉剂(Tricaine, MS222)购自北京索莱宝公司;核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B,货号SZ10-04)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ,货号NBP2-61611)一抗购自美国NOVUS公司;5水硫酸铜[货号A603008,生工生物工程(上海)股份有限公司];总RNA提取试剂盒(货号RC112-01,江苏诺维赞生物科技股份有限公司)。

Multiskan FC型酶标仪购自美国therom公司;超净工作台由苏州安泰净化消毒设备厂提供;IX51倒置显微镜、DYY-6D电泳仪和DYZC-24C转印电泳仪均购自北京六一公司;体视荧光显微镜SZX 61购自奥林巴斯(中国)有限公司;LightCycler®480实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪购自罗氏有限公司(美国);Nanodrop 2000超微量分光光度计(genetech, USA);斑马鱼养殖饲养系统(北京爱生科技公司);LiCOR-odyssey 400化学成像仪(genetech, USA)。

## 1.2 实验动物

野生型AB斑马鱼与绿色荧光标记中性粒细胞的斑马鱼Tg(Lyz:EGFP)均由山东省科学院生物研究所药物筛选平台提供,培养方法10/14 h明暗交替,实验所用为斑马鱼96 h胚胎,24 h使用1.0 g·L<sup>-1</sup> Pronase E溶液脱去卵膜。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12~14枚。

## 2 方法

### 2.1 肺热普清散对硫酸铜引起的炎症细胞聚集的影响

挑选受精后72 h健康并带有荧光的Tg(Lyz:EGFP)系斑马鱼,随机移入24孔板中,分为5组,每组2个重复孔,每孔10条。设置对照组、模型组和肺热普清散低、中、高质量浓度(3、10、30 mg·L<sup>-1</sup>)组,对照组与模型组不加药,肺热普清散组用各剂量肺热普清散与斑马鱼共孵育1 h后,除对照组外,

其余组别用20 μmol·L<sup>-1</sup>硫酸铜处理2 h制备炎症模型<sup>[8]</sup>。随后用4%多聚甲醛处理斑马鱼1 h,清除多聚甲醛并使用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗斑马鱼,逐一在荧光显微镜下拍照。用Image pro-plus软件计算躯干部荧光炎症粒细胞迁移个数。

### 2.2 qRT-PCR实验<sup>[9]</sup>

采用给药且硫酸铜造模后的野生型斑马鱼,给药及造模操作同“2.1”项。每组20条进行qRT-PCR检测,RNA的提取参照试剂盒说明书,利用super-nano分光光度计测定提取的RNA浓度, $A_{260}/A_{280}$ 应在2.0~2.5;RNA反转录为cDNA参照反转录试剂盒说明书进行;qRT-PCR参照qRT-PCR仪说明书进行。PCR扩增结束后输出对照组和给药组目的基因C<sub>t</sub>及内参基因β-actin的C<sub>t</sub>值,以相对定量法用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>计算各组基因的相对表达量。斑马鱼源相关引物序列见表1,由上海博尚公司提供。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

| 基因                    | 正向引物序列(5'→3')             | 反向引物序列(5'→3')                     |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| <i>TNF-α</i>          | TGACTGAGGAACAAGTGCTTATGAG | GCAGCGCCGAGGTAAATAGTG             |
| 白细胞介素( <i>IL</i> )-1b | ATGGCAGAAGTACCTAAGCTC     | TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGTCACT |
| <i>IL-8</i>           | CAAGAACCATTGGGATGAAGGAC   | CCTTCAGTAGCCTCTGTCTCTTG           |
| <i>NF-κB2</i>         | ACAAGACGCAAGGAGCCAG       | AACTGTCTCTTGCACAAAGGGCTCA         |
| <i>β-actin</i>        | AGAGCTATGAGCTGCCTGACG     | CCGCAAGATTCCATACCCA               |

### 2.3 Western blotting实验<sup>[10]</sup>

采用给药且硫酸铜造模后的野生型斑马鱼,给药及造模操作同“2.1”项。取各组斑马鱼幼鱼麻醉后进行匀浆,用裂解液提取蛋白,使用SDS-PAGE电泳进行蛋白分离,随后转至NC膜,一抗(NF-κB或TNF-α)和二抗分别进行1:1 000和1:10 000的稀释孵育,LiCOR-odyssey 400化学成像仪显影,利用机带软件进行灰度分析。

### 2.4 免疫荧光实验

采用给药且硫酸铜造模后的野生型斑马鱼,给药及造模操作见“2.1”项。斑马鱼用PBS清洗2次,放置于冰上处死,加4%多聚甲醛过夜,用PBST/乙醇多次脱水,然后用冷丙酮处理10 min,3%马血清封闭2 h,更换封闭液,加入NF-κB一抗4 °C过夜,换为荧光二抗(Alexa Fluor@488)4 °C过夜,荧光显微镜下观察拍照,利用image J软件将照片改为灰色背景。

### 2.5 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0对数据两组间比较采用成对样本t检验。

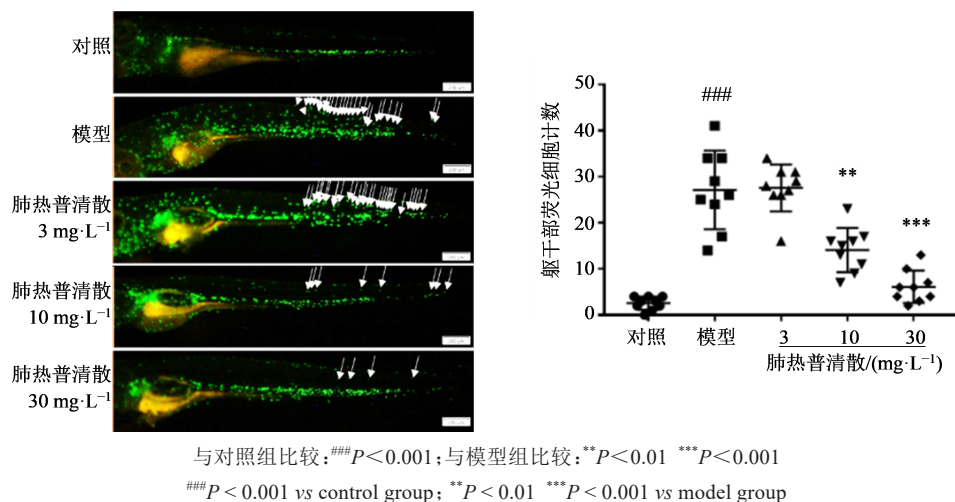
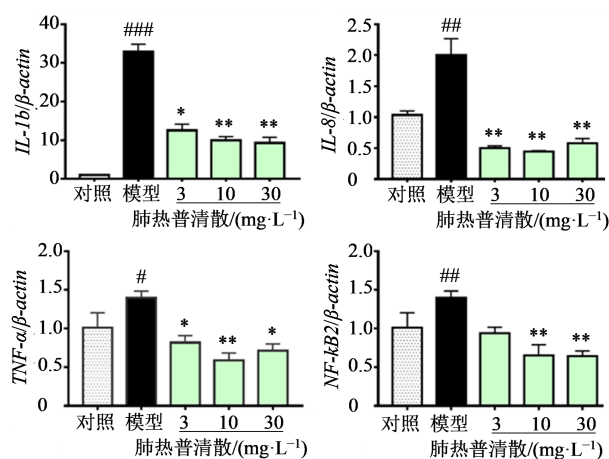
## 3 结果

### 3.1 肺热普清散对硫酸铜引起的炎症细胞聚集的影响

如图1所示,对照组的胚胎荧光细胞主要分布于头部和主动脉部,躯干部位主动脉以上荧光细胞稀少,平均值在2.56;模型组荧光细胞在各区域均有增加,显示出炎症细胞向血管外迁移的明显趋势,在躯干侧线以上部位荧光细胞增加,平均值在26.67,较对照组显著增加( $P < 0.001$ );肺热普清散中、高质量浓度组头部和躯干部的炎症细胞迁移明显被抑制,躯干部荧光细胞计数均值降低,与模型组比较具有显著性差异( $P < 0.01$ 、0.001)。

### 3.2 肺热普清散对斑马鱼炎症模型NF-κB2、IL-1b、TNF-α、IL-8 mRNA水平的影响

如图2所示,与对照组比较,模型组中NF-κB2、IL-1b、TNF-α、IL-8 mRNA水平显著上调( $P < 0.05$ 、0.01、0.001);与模型组比较,肺热普清散3、10、30 mg·L<sup>-1</sup>组IL-1b、TNF-α、IL-8的mRNA水平明显下调且具

图1 肺热普清散对斑马鱼炎症模型中炎症细胞迁移的抑制作用( $\bar{x}\pm s, n=9$ )Fig. 1 Inhibition of inflammatory cell migration in a zebrafish inflammation model by FPP ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )图2 肺热普清散对斑马鱼炎症模型中炎症相关基因的抑制作用( $\bar{x}\pm s, n=30$ )Fig. 2 Inhibition of inflammation-related genes in a zebrafish inflammation model by FPP ( $\bar{x}\pm s, n=30$ )

有统计学意义( $P<0.05, 0.01$ ); 10, 30  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组  $\text{NF-}\kappa\text{B2}$  mRNA 水平显著下调( $P<0.01$ )。结果表明肺热普清散能够逆转由硫酸铜刺激造成的炎症基因异常表达。

### 3.3 肺热普清散对斑马鱼炎症模型 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 蛋白表达的影响

如图3所示, 与对照组比较, 模型组  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  蛋白表达显著升高( $P<0.05, 0.01$ ); 与模型组比较, 肺热普清散 10、30  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  蛋白表达水平显著降低( $P<0.01, 0.001$ ), 作用呈剂

量相关性。

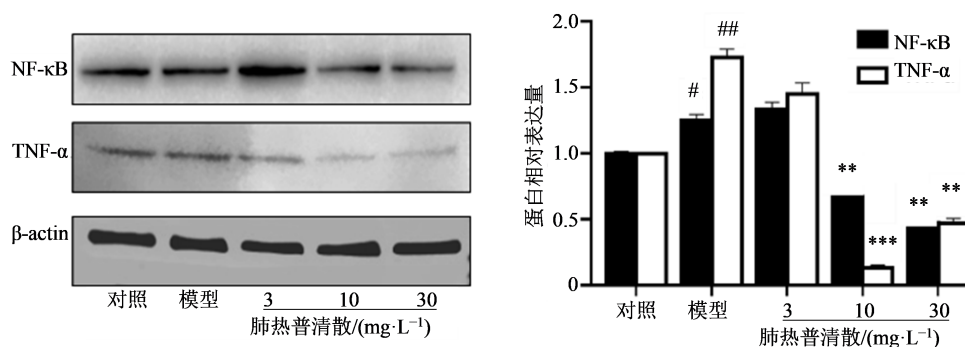
### 3.4 斑马鱼 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 免疫荧光结果

免疫荧光处理后的斑马鱼全身都有荧光点分布, 本研究以鱼尾部位作为观察部位, 对照组仅能见到少量白色荧光小点, 而硫酸铜处理后无论是躯干部位还是鱼鳍白色荧光点明显增加; 经过 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  肺热普清散处理后的相同部位荧光点减少, 表明经过肺热普清散处理可减少炎症条件下的  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  表达水平。结果见图4。

## 4 讨论

由于幼儿的自身免疫屏障不成熟以及肺部感染的病因复杂、病情发展迅速, 小儿肺炎在临床是高发病, 另一方面多种致病源的交叉感染也增加了临床治疗的难度, 进而造成抗生素的盲目滥用, 导致耐药菌问题的涌现。近5年来, 小儿肺炎的诱导病毒病原比例逐步增加, 使得中成药在其治疗中有较高频率的运用。藏药肺热普清散在小儿肺炎的临床治疗上有明显的优势, 开展其抗炎活性以及作用机制相关研究, 不仅可以利用现代医学手段研究其药用活性和机制, 而且为该类药二次开发积累必要的药理学数据。

巨噬细胞迁移到炎症或损伤部位, 消除组织损伤引起的炎症诱导信号, 并修复组织。斑马鱼作为模式动物之一, 其侧线毛细胞的结构、功能与人毛细胞相似, 利用硫酸铜对神经的蓄积毒性特点诱发侧线系统的神经细胞损伤, 诱发应激反应和炎症反应<sup>[11-12]</sup>。侧线神经损伤诱导巨噬细胞等炎症细胞的趋近迁移, 可以作为炎症的一个可观察表型<sup>[13]</sup>。利用该模型在中药抗炎活性筛选和炎症机理研究都



与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$   
<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group

图3 肺热普清散对斑马鱼炎症模型NF-κB、TNF-α蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 3 Effect on expression of NF-κB and TNF-α in a zebrafish inflammation model by FPP ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

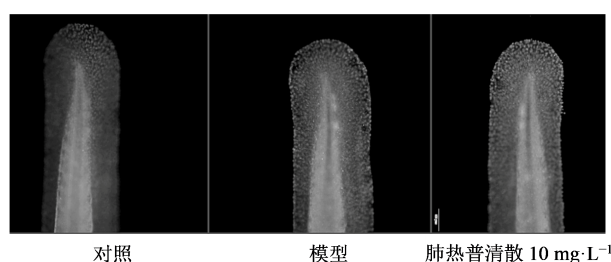


图4 斑马鱼炎症模型中NF-κB免疫荧光

Fig. 4 Immunofluorescence of NF-κB in a zebrafish inflammation model

有较多报道<sup>[14-19]</sup>。在本研究中可以观察到硫酸铜处理组躯干部侧线上荧光巨噬细胞的显著增多,而经过肺热普清散处理后,侧线上的巨噬细胞迁移的现象得到明显的逆转,说明硫酸铜引起的急性炎症情况得到了改善,提示肺热普清散具有抗炎活性。

NF-κB在所有的动物细胞中普遍存在,在微生物(尤其是细菌和病毒)和免疫引起的炎症反应中起关键介导作用,是感染和非感染性炎症的关键性蛋白之一。研究表明病毒蛋白直接介导的炎症往往与NF-κB信号通路的激活重叠,而致病菌虽然通过toll样受体-NF-κB通路激活体内炎症反应,其中炎症因子和NF-κB都是必不可少的下游执行信号通路<sup>[20-21]</sup>。从已有研究来看,斑马鱼炎症模型无论是脂多糖还是病原菌诱导,在炎症细胞迁移、toll样受体信号通路和免疫因子的反应方面都与哺乳动物的反应类似<sup>[22-24]</sup>。本实验的结果提示,在硫酸铜诱导的斑马鱼炎症模型中,肺热普清散具有显著的抑制炎症因子表达的作用,降低*IL-1b*和*IL-8* mRNA水平,并且在转录水平和蛋白表达水平对NF-κB/TNF-α的升高有逆转的作用,提示肺热普清散的抗炎作用与抑制NF-κB和TNF-α的表达有关。

本研究首次开展传统藏药名方肺热普清散的

药效和作用机制实验研究,基于斑马鱼炎症模型和分子药理学结果分析提示:肺热普清散具有显著的抗炎活性,其抗炎作用与抑制NF-κB、TNF-α表达有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] McAllister D A, Liu L, Shi T, et al. Global, regional, and national estimates of pneumonia morbidity and mortality in children younger than 5 years between 2000 and 2015: A systematic analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2019, 7 (1): e47-e57.
- [2] Global Burden of Disease Child and Adolescent Health Collaboration, Kassebaum N, Kyu H H, et al. Child and adolescent health from 1990 to 2015: Findings from the global burden of diseases, injuries, and risk factors 2015 study [J]. *JAMA Pediatr*, 2017, 171(6): 573-592.
- [3] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 等. 基于斑马鱼模型的中药安全性评价研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 278-287.  
Fan Q Q, Li Z Q, Chen M L, et al. Research progress on safety evaluation of traditional Chinese medicine based on zebrafish model [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53 (1): 278-287.
- [4] Angosto D, Mulero V. The zebrafish as a model to study the inflammasome [J]. *Inflammasome*, 2014, 1(1): 2-5.
- [5] Lee S H, Ko C I, Jee Y, et al. Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 84-89.
- [6] Loes A N, Hinman M N, Farnsworth D R, et al. Identification and characterization of zebrafish Tlr4 coreceptor Md-2 [J]. *J Immunol*, 2021, 206(5): 1046-1057.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020.  
*Pharmacopoeia of the People's Republic of China* [S].

- Volume I. 2020.
- [8] 李凤玲, 李陈钦瑶, 段秀英, 等. 三峡阳菊叶水提物的抗炎作用研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1600-1606.  
Li F L, Li C Q Y, Duan X Y, et al. Anti-inflammatory effect of water extract from leaves of Three Gorges Yangju [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(8): 1600-1606.
- [9] Zhang Y, Wang C, Jia Z L, et al. Isoniazid promotes the anti-inflammatory response in zebrafish associated with regulation of the PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B/AP-1 pathway [J]. Chem Biol Interact, 2020, 316: 108928.
- [10] 陈锡强, 韩利文, 王希敏, 等. 人乳腺癌斑马鱼移植瘤模型建立 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 128-132.  
Chen X Q, Han L W, Wang X M, et al. Model establishment of xenotransplantation of human breast cancer in zebrafish embryos [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(1): 128-132.
- [11] Chen X Q, Han L W, Wang X M, et al. Model establishment of xenotransplantation of human breast cancer in zebrafish embryos [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(1): 128-132.
- [12] Dambly-Chaudière C, Sapède D, Soubiran F, et al. The lateral line of zebrafish: A model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates [J]. Biol Cell, 2003, 95(9): 579-587.
- [13] Gong L H, Yu L Y, Gong X H, et al. Exploration of anti-inflammatory mechanism of forsythiaside A and forsythiaside B in CuSO<sub>4</sub>-induced inflammation in zebrafish by metabolomic and proteomic analyses [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 173.
- [14] Renshaw S A, Loynes C A, Trushell D M I, et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation [J]. Blood, 2006, 108(13): 3976-3978.
- [15] 朱成悦, 张姗姗, 杨飞, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(7): 1392-1397.  
Zhu C Y, Zhang S S, Yang F, et al. Antiangiogenic and anti-inflammatory activities of methanol extract of Bufonis Venenum based on zebrafish model [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(7): 1392-1397.
- [16] 杨汤佳, 刘俊珊, 曹惠慧, 等. 穿心莲内酯磺化物的抗炎活性评价 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(10): 801.  
Yang T J, Liu J S, Cao H H, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of andrographolide sulfonates [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2021, 35(10): 801.
- [17] 段秀英, 马瑞娇, 张云, 等. 斑马鱼炎症模型及其在中药抗炎领域的应用 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1573-1580.  
Duan X Y, Ma R J, Zhang Y, et al. Zebrafish inflammation model and its application in anti-inflammatory field of traditional Chinese medicine [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(8): 1573-1580.
- [18] 王召平, 朱姮, 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.
- [19] 彭维兵, 周玲晓, 付先军, 等. 基于斑马鱼模型的昆海姜辛汤组分配伍的抗炎作用研究 [J]. 山东科学, 2017, 30(2): 37-42.  
Peng W B, Zhou L X, Fu X J, et al. Anti-inflammatory research on component combination of Kunhai ginger decoction based on zebrafish model [J]. Shandong Sci, 2017, 30(2): 37-42.
- [20] 杜婷婷, 王海苹, 徐懿乔, 等. 斑马鱼模型评价如意珍宝丸抗炎镇痛作用研究 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(4): 498-502.  
Du T T, Wang H P, Xu Y Q, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of Ruyi Zhenbao pill in zebrafish [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2017, 33(4): 498-502.
- [21] 徐霄龙, 郭玉红, 赵京霞, 等. 参附黄方对斑马鱼炎症、巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(23): 2092-2097.  
Xu X L, Guo Y H, Zhao J X, et al. Effects of shenfu Huang formula on inflammation and phagocytic function of macrophages in zebrafish [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(23): 2092-2097.
- [22] Liu T, Zhang L Y, Joo D, et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation [J]. Signal Transduct Target Ther, 2017, 2: 17023.
- [23] Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, et al. NF- $\kappa$ B: At the borders of autoimmunity and inflammation [J]. Front Immunol, 2021, 12: 716469.
- [24] Lee F F, Davidson K, Harris C, et al. NF- $\kappa$ B mediates lipopolysaccharide-induced alternative pre-mRNA splicing of MyD88 in mouse macrophages [J]. J Biol Chem, 2020, 295(18): 6236-6248.