

非洲爪蟾在药物筛选和评价中的应用及研究进展

侯越¹, 尚海花¹, 魏玲², 侯文彬¹, 李祎亮^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院放射医学研究所, 天津 300192

2. 广东药科大学, 广东 广州 510006

摘要: 非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 作为一种经典的模式生物, 在疾病模型的建立、药物筛选、药理学机制研究等领域都发挥着重要的作用, 这主要得益于其独特的生物学特征。非洲爪蟾在药物研究中的应用优势主要表现在遗传相似性、解剖学和生理学相似性、胚胎透明易观察、基因编辑的可行性。非洲爪蟾中常用的药物筛选方法包括基于表型的药物筛选、无细胞筛选系统和卵母细胞筛选系统等。目前非洲爪蟾在神经系统疾病治疗药物、抗肿瘤药物、代谢性疾病治疗药物、罕见病治疗药物的筛选及药物安全性评价、药物代谢和药效评价中的应用均取得一定进展。综述非洲爪蟾作为模式生物的优势及其在药物研究中的应用实例, 同时也探讨其发展中面临的挑战以及应用前景, 以期药物的筛选和评价选择更高效的模式生物提供参考。

关键词: 非洲爪蟾; 药物筛选; 疾病模型; 毒性评价; 基因编辑; 神经系统; 抗肿瘤; 罕见病

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 11-2665-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.022

Applications and advances in use of *Xenopus laevis* in drug screening and evaluation

HOU Yue¹, SHANG Haihua¹, WEI Ling², HOU Wenbin¹, LI Yiliang¹

1. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: As a classical model organism, *Xenopus laevis* plays an important role in the establishment of disease models, drug screening, and pharmacological mechanism research, mainly due to its unique biological characteristics. The advantages of the application of *X. laevis* in drug research are mainly in genetic similarity, anatomical and physiological similarity, embryonic transparency and easy observation, and the feasibility of gene editing. Commonly used drug screening methods in *X. laevis* include phenotype-based drug screening, cell-free screening system and oocyte screening system. Currently, *X. laevis* has made some progress in the screening of therapeutic drugs for neurological diseases, anti-tumor drugs, metabolic diseases, and rare diseases, as well as in the evaluation of drug safety, drug metabolism, and pharmacodynamic evaluation. We summarize the advantages of *X. laevis* as a model organism and its applications in drug research, and also discuss the challenges in its development and application prospects, with a view to selecting more efficient model organisms for drug screening and evaluation.

Key words: *Xenopus laevis*; drug screening; disease modeling; toxicity evaluation; gene editing; neurological system; anti-tumor; rare disease

非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 是一种经典的模式生物, 原产自南非, 属脊椎动物门两栖纲负子蟾科爪蟾属, 在发育生物学、遗传学等研究领域发挥着重要作用。非洲爪蟾对生存环境要求相对较低, 可以

收稿日期: 2024-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82003846); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目资助(2021-I2M-1-042)

第一作者: 侯越, 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: houyue055@outlook.com

*通信作者: 李祎亮, 博士生导师, 研究方向为药物化学。E-mail: liyiliang@irm-cams.ac.cn

在多种生活条件中生存,容易饲养和繁殖。非洲爪蟾繁殖周期为2个月,方式为体外受精。胚胎易于培养,可以在简单的盐溶液中迅速发育,并且胚胎数量众多。在发育过程中,胚胎在蝌蚪期呈透明状态,这使得研究人员能够直接观察到各器官的发育情况,而且易于成像。由于具备上述优点,非洲爪蟾已经成为药物研发领域应用广泛的动物模型。

1 非洲爪蟾模型在药物研究中的优势

在过去的10年里,斑马鱼已经被成功地应用于药物发现和疾病模型的建立,而一些经由斑马鱼筛选的药物已进入临床试验阶段。斑马鱼作为脊椎动物,具有胚胎数量多、透明易操作、试验周期短等特点,其进化过程与人类具有相关性,因此得到许多科研人员的青睐。然而,斑马鱼模型存在着一些局限性,将在斑马鱼中得到的实验结果转移到哺乳动物中仍存在很大的不确定性。这些问题可以通过转向在进化上更接近人类的动物模型来解决。

非洲爪蟾作为一种重要的脊椎动物模型,与斑马鱼等其他模式生物相比具有其独特的优势(表1)。具体而言,非洲爪蟾在药物研究中的应用优势主要表现在以下几个方面。

(1)遗传相似性:非洲爪蟾和哺乳动物在基因组上具有高度的相似性,特别是许多疾病相关基因

在物种间是高度保守的。近90%的人类疾病基因在非洲爪蟾中都有同源基因,而且基因序列通常具有较高的保守性,这是建立疾病模型的先决条件^[1]。

(2)解剖学和生理学相似性:非洲爪蟾包含了大部分常见的人类疾病发病器官和组织,如心血管系统、消化道、排泄器官、感觉器官、造血系统和中枢神经系统等^[2-4]。

(3)胚胎透明易观察:非洲爪蟾胚胎透明,观察其内部结构和发育过程非常方便,尤其是在药物安全性评价中,通过心脏跳动、肠道卷曲等可以初步判断药物的安全性。

(4)基因编辑的可行性:基因编辑是进行疾病建模的重要手段,可通过对关键基因进行沉默或过表达达到模拟疾病发病机制的目的。近年来随着分子生物学技术的发展,锌指核酸酶(ZFN)、转录激活效应因子核酸酶(TALENs)、CRISPR/Cas9、反义吗啉寡核苷酸(MO)等技术成功应用于非洲爪蟾基因编辑,为其基因功能研究、疾病建模提供了良好的技术支撑。

此外显微注射、双电极电压钳、原位杂交等实验技术拓展了非洲爪蟾在药物研究中的应用范围。同时,Xenbase、Xenmine等非洲爪蟾基因组数据库也为研究人员提供了便利^[5-6]。因此非洲爪蟾在药物发现和研究领域具有十分广阔的应用前景。

表1 非洲爪蟾和斑马鱼模型的特征对比

Table 1 Overview of characteristics between *X. laevis* and zebrafish

动物	与人类进化相似度	染色体组	基因组大小/bp	蛋白编码基因	胚胎产量	胚胎直径/mm	寿命/年
非洲爪蟾	高	四倍体	3.1×10^9	25 000~30 000	约3 000	1.4~1.5	5~15
斑马鱼	低	二倍体	1.4×10^9	26 206	约200	0.6~0.7	2~3

2 非洲爪蟾在药物筛选中的应用

药物筛选是对可能具有药物活性的化合物进行初步活性筛查,以发现其开发成新药的潜力。利用非洲爪蟾作为研究工具进行药物筛选可以在组织器官水平、生化水平和分子水平展开,并可借助分子生物学或计算机技术进行结果评价(图1)。

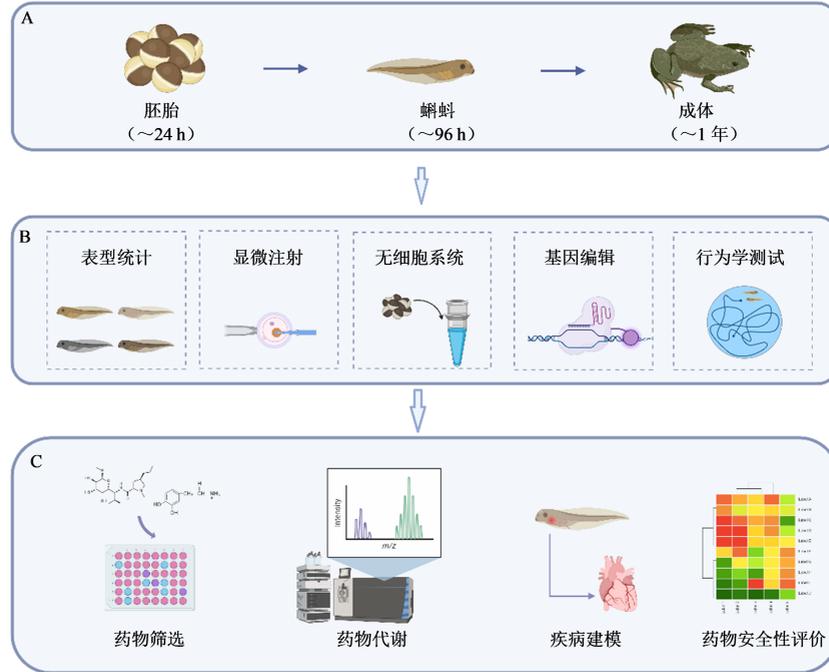
目前,非洲爪蟾中常用的药物筛选方法包括基于表型的药物筛选、无细胞筛选系统和卵母细胞筛选系统等。基于表型的药物筛选是通过表型的变化,如尾部弯曲、黑色素沉淀、心包积水等对药物的作用进行统计和评分。无细胞筛选系统是使用非洲爪蟾卵提取物作为药物筛选工具,其提取物是一种具有高度生物活性的系统,具有完整细胞中存在的大量复杂的化学反应和信号通路,模拟了一部分体内条件,是介于体内和体外模型之间的一种工

具,可以用于细胞周期、蛋白功能、DNA损伤和小分子化合物筛选等众多方面的研究,其最大的优势在于几乎无需考虑化合物细胞毒性和生物利用度的问题^[7]。卵母细胞筛选系统通常利用非洲爪蟾卵母细胞异源性表达特定的膜蛋白,以研究药物对目的蛋白的激动或抑制作用。

这些基于非洲爪蟾模型的药物筛选方法具有快速、大规模、低成本等优势,对于先导化合物的筛选和发现至关重要。此外,非洲爪蟾模型还可以用于人类疾病的建模,从而拓展了药物筛选的范围。

2.1 应用于神经系统疾病治疗药物筛选

大部分神经系统疾病具有发病原因复杂、药物开发失败率高等特点。同时,由于成熟神经元不再分化、人源性神经细胞难以获得、血脑屏障难以突破等原因,神经疾病模型的建立和神经系统疾病药



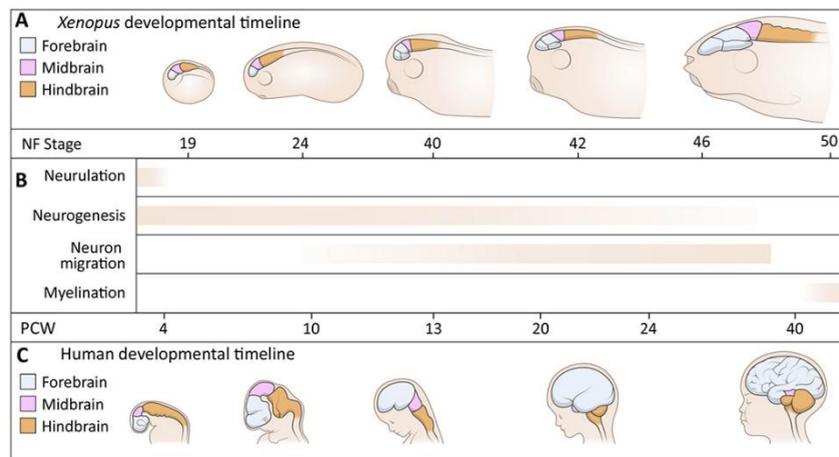
A-非洲爪蟾可用于药物研究的各发育阶段;B-非洲爪蟾应用于药物研究过程中的实验技术;C-非洲爪蟾应用于药物研究的各阶段。
A-developmental stages of *X. laevis* used in drug research; B-experimental techniques used in drug research; C-all stages of drug research.

图 1 非洲爪蟾在药物研究中应用示意图

Fig. 1 Diagram of *X. laevis* utilization in drug discovery

物筛选平台的开发面临着很大的困难。非洲爪蟾是进行神经疾病发病机制研究和药物筛选的优良工具。首先,非洲爪蟾的大脑结构与人类十分相似,都包括了前脑、中脑和后脑 3 个部分(图 2^[8])。其次,非洲爪蟾和人类的神经发育过程也类似,都经历了神经元发生、分化、突触成熟等过程(图 2)^[8-9]。此外,非洲爪蟾神经系统与人类神经系统都

存在大量相同的神经递质,如谷氨酸、乙酰胆碱、多巴胺、甘氨酸等,这些神经递质是机体进行正常神经活动所必须的重要物质。非洲爪蟾蝌蚪的血脑屏障通透性相对较高,有利于小分子药物的透过。同时,非洲爪蟾蝌蚪活体成像技术也在迅速发展,如体内延时成像、全脑钙成像、中枢神经系统线粒体动力成像等,这些技术帮助研究人员能够更直观



A.-非洲爪蟾大脑的发育时间表, NF Stage 代表非洲爪蟾 NF 分期; B-随着时间推移背侧胼胝体发育的主要事件; C-人类大脑发育时间表, PCW 代表受孕后周数。

A-*X. laevis* developmental timeline, NF stage represents Nieuwkoop and Faber's development stage; B-major events in dorsal pallium development over time; C-human developmental timeline, PCW represents postconceptional week.

图 2 非洲爪蟾大脑与人类大脑发育的比较

Fig. 2 Comparison of brain development between *X. laevis* and human

地观察到脑或神经元的病变情况^[10-12]。

目前已利用非洲爪蟾进行了多种神经疾病药物筛选,如阿尔茨海默病(AD)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、癫痫等。

2.1.1 利用非洲爪蟾卵母细胞进行AD药物筛选
AD是一种神经退行性疾病,其发病机制极为复杂,涉及多种因素和通路的紊乱。*N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体(NMDA)拮抗剂是一类代表性的AD治疗药物,一线药物有美金刚等。NMDA受体拮抗剂能够有效抑制NMDA受体的功能,从而调节谷氨酸的活性,被广泛应用于治疗中晚期AD患者。Kang等^[13]利用非洲爪蟾卵母细胞异源性表达大鼠NMDA受体,研究了钩藤提取物中的钩藤碱和异钩藤碱对NMDA受体的影响,研究结果显示,这2种化合物在NMDA受体复合物上的NMDA或甘氨酸识别位点非竞争性地发挥作用,对谷氨酸受体的NMDA亚型具有抑制作用。这项研究为新型AD治疗药物的开发提供了重要参考。

烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7nAChR$)激动剂已在临床研究中证明具有改善AD患者认知功能的作用。 $\alpha 7nAChR$ 是一种配体门控离子通道,主要在负责认知功能的关键大脑区域如大脑皮层和海马体中表达。激活 $\alpha 7nAChR$ 可启动细胞内信号级联,从而参与调节神经传递过程^[14]。Wallac等^[15]在非洲爪蟾卵母细胞中表达 $\alpha 7nAChR$,结合电生理学方法筛选出RG3487是一种 $\alpha 7nAChR$ 激动剂。Jr等^[16]利用类似的方法筛选出了尼古丁代谢物可替宁(异构体),发现其增加了 $\alpha 7nAChR$ 对低剂量乙酰胆碱的敏感性,可改善胆碱能化合物(例如多奈哌齐)在治疗AD和其他记忆障碍方面的有效剂量范围。

2.1.2 利用非洲爪蟾卵母细胞进行ALS药物筛选
ALS是一种神经退行性疾病,表现为骨骼肌无力、肌肉萎缩等,患者常死于呼吸衰竭。乙酰胆碱受体(AChR)功能的损伤被认为是ALS发病的原因之一^[17]。Palma等利用微膜移植技术将人类ALS患者肌肉膜移植到非洲爪蟾卵母细胞中,使肌肉中的AChR在卵母细胞中表达,将表达AChR的卵母细胞与 α -银环蛇毒素(α -BuTx)、乙酰胆碱(Ach)、大麻素棕榈酰乙醇酰胺(PEA)和利鲁唑等药物共孵育,同时进行电生理学记录,发现内源性PEA减少了ALS肌肉中AChR电流的下降,进一步的临床试验表明,该药物显著改善了ALS患者的肺功能^[18]。

2.2 应用于抗肿瘤药物筛选

癌症是当代社会危害人类健康的重要原因之

一,因此,抗肿瘤药物的研发备受关注。为了筛选出在体内能有效抑制肿瘤且没有严重不良反应的化合物,抗肿瘤化合物必须经过体内筛选。肿瘤组织的发生、转移、侵袭等行为与非洲爪蟾胚胎发育过程在某种程度上是相似的。因此,非洲爪蟾胚胎成为了一种有效的研究工具,被广泛应用于肿瘤模型建立及抗肿瘤药物的筛选。

2.2.1 非洲爪蟾胚胎用于转化生长因子(TGF- β)抑制剂的筛选
TGF- β 是一种多功能细胞因子,在健康细胞和早期癌细胞中,具有肿瘤抑制功能,包括调节细胞周期停滞和细胞凋亡等相关行为。然而TGF- β 在晚期癌症中的激活却可以促进肿瘤增殖、转移以及增强肿瘤的耐药性^[19]。因此,TGF- β 抑制剂正迅速成为极具前景、安全、有效的抗癌药物。利用非洲爪蟾胚胎进行TGF- β 抑制剂的筛选是一种有效的方法。当非洲爪蟾胚胎中的TGF- β 信号通路被阻断时,会引发一系列表型变化,包括血管发育异常和黑色素过度沉积等。这些表型变化可以作为筛选TGF- β 抑制剂的指标。通过观察这些表型变化,可以筛选出对TGF- β 信号通路具有抑制作用的化合物,为进一步研究和开发TGF- β 相关药物提供重要参考。

Dush等^[20]利用非洲爪蟾胚胎筛选了130种新化合物,鉴定出一种吡啶类似物,并将其命名为“heterotaxin”。该分子被确认为是一种TGF- β 抑制剂,能够诱导胚胎的不对称发育,对该化合物诱导的非洲爪蟾胚胎表型谱进行了进一步分析,发现它能够在整个发育过程中引发多种TGF- β 依赖性表型,包括扰乱血管发育、黑色素生成、细胞迁移和黏附,并抑制TGF- β 依赖性细胞内信号传导事件,于是将其确定为一种新的TGF- β 信号传导抑制剂。值得注意的是,heterotaxin类似物还具有破坏哺乳动物血管生成和肿瘤细胞增殖的作用,揭示了一类具有TGF- β 抑制治疗潜力的新型化合物。

2.2.2 非洲爪蟾胚胎用于Wnt通路抑制剂筛选
Wnt/ β -catenin途径对于细胞增殖和迁移等多种细胞功能至关重要。在缺乏Wnt信号的情况下,游离的 β -catenin被Axin/APC复合体磷酸化修饰,从而发生降解,不会在细胞中过度积累。而当Wnt通路被激活时,Axin/APC复合体被破坏,导致 β -catenin稳定性增加,继而进入细胞核激活下游T细胞因子(TCF)的转录功能(图3)。Wnt/ β -catenin通路的错误调节与各种人类疾病的发生密切相关,目前已在乳腺癌、肺癌、肝癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤中

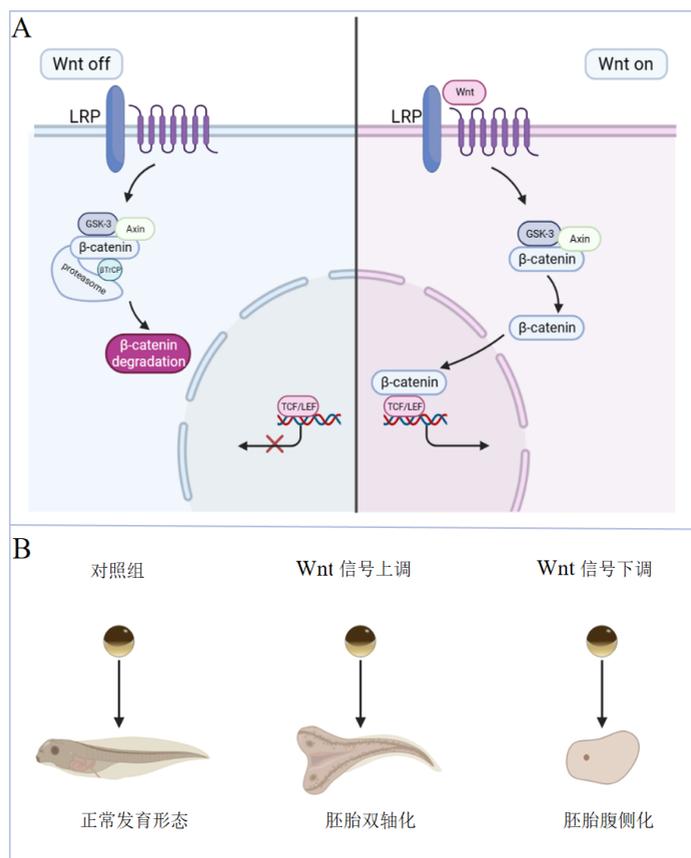
A-Wnt/ β -catenin 信号通路; B-不同 Wnt 通路状态下的胚胎表型。A-Wnt/ β -catenin signaling pathway; B-phenotypes of embryos under different states of the Wnt pathway.

图3 Wnt 信号通路及非洲爪蟾胚胎发育表型

Fig. 3 Pattern map of Wnt signaling pathway and developmental phenotype of *X. laevis* embryos

发现 Wnt 通路的异常激活,且该通路在肿瘤复发中也起到重要作用^[21]。当通过药物刺激或基因编辑在非洲爪蟾胚胎中激活 Wnt 通路时,胚胎会出现轴向发育异常的表型,而当 Wnt 通路被抑制时,胚胎则会出现发育停滞的表型(图 3-A、B)。因此,非洲爪蟾胚胎可作为筛选 Wnt 通路抑制剂的模型。

Amado 等^[22]以非洲爪蟾胚胎为模型研究了槲皮素和芦丁对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响,结果显示,槲皮素能够诱导非洲爪蟾胚胎的轴向缺陷,抑制非洲爪蟾中的 Wnt8 特异性报告基因,对 Wnt/ β -catenin 有负调节作用,而芦丁则没有表现出显著作用。在 Amado 等^[23]的另一项研究中,同样以非洲爪蟾胚胎为模型,发现了异槲皮素能够抑制爪蟾胚胎内 Wnt 信号的激活,并通过进一步研究证实异槲皮素通过靶向 Wnt/ β -Catenin 信号通路抑制结肠癌细胞的体外生长。

Thorne 等^[24]建立了一种非洲爪蟾卵提取物系统来鉴定 Wnt 通路调节剂,且在液氮中,该提取物系统对 β -catenin 和 Axin 的有效降解活性可维持超

过 1 年之久。利用该系统筛选了包括小分子化合物和天然产物在内的 6 400 种化合物,最终筛选出 3, 6-二羟基黄酮为有效的 Wnt 抑制剂,并且在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中进一步确定了 3, 6-二羟基黄酮对 Wnt 依赖性癌细胞的增殖抑制作用。

Robertis 等^[25]筛选出了小分子 Wnt 通路抑制剂 sen461 可作为治疗多形性胶质母细胞瘤的潜在药物。通过将 XWnt8 mRNA 注射到四细胞阶段的非洲爪蟾胚胎腹侧区域诱导 Wnt 胚胎轴向发育缺陷,再将小分子 Wnt 抑制剂 sen461 注射到胚胎中,观察 sen461 是否能拯救胚胎轴向发育缺陷的表型。结果发现与对照组相比,注射 sen461 的胚胎中轴向发育缺陷的表型减少了 56%。

2.2.3 非洲爪蟾胚胎用于口腔癌药物筛选 肿瘤组织具有与胚胎相似的生物学特征。许多类型的癌细胞通过上皮-间充质转化(EMT)获得侵袭能力,在爪蟾胚胎发育的早期阶段也观察到类似的过程:原肠胚形成和颅神经嵴细胞(CNCC)的迁移。Tanaka 等^[26]以非洲爪蟾胚胎为模型,从 100 多种化

合物中筛选出了9种阻止原肠胚形成和CNCC迁移的化合物,并进一步在细胞实验中筛选出C-572(鬼臼毒素的类似物)和D-157(吡啶类生物碱)具有抑制口腔鳞状细胞(SAS)增殖和侵袭的功能。

2.2.4 非洲爪蟾胚胎用于黑色素瘤药物筛选
BAP1肿瘤抑制因子在许多人类癌症特别是葡萄膜黑色素瘤中发生突变导致患者预后不佳。非洲爪蟾发育过程中BAP1缺失确实会产生如小眼症、无眼症等独特的表型,可以作为BAP1缺失的判定依据。Kuznetsoff等^[27]通过MO定向敲除非非洲爪蟾胚胎中的BAP1,得到BAP1缺陷的非非洲爪蟾模型,首先经过计算机对LOPAC¹²⁸⁰和一种定制的表现遗传学文库的高通量筛选,得到若干种候选化合物,接着在BAP1缺陷胚胎模型中进行二次筛选,Quisinostat(组蛋白去乙酰化酶抑制剂)有效地挽救了BAP1缺陷的表型。进一步体内实验验证了Quisinostat对BAP1突变的黑色素瘤小鼠的治疗作用。

2.3 应用于代谢性疾病治疗药物筛选

非洲爪蟾在代谢性疾病领域的应用虽然相对较少,但近年来逐渐受到关注。其中,非洲爪蟾被用作模拟新生儿糖尿病,这种疾病通常由于基因突变导致胰岛 β 细胞功能受损而引起。研究人员利用TALEN基因编辑技术,针对关键的胰腺转录因子(如pdx1和ptf1a)进行突变,使非洲爪蟾胚胎的胰

腺发育受到影响,导致胰岛 β 细胞功能丧失,从而模拟新生儿糖尿病的发生过程^[28]。通过这种模型,研究人员可以深入了解新生儿糖尿病的发病机制,探索潜在的治疗方法和药物靶点。这为研究代谢性疾病的发病机制和治疗提供了新的途径,有望为未来的临床治疗提供更有效的手段。

Yoo等^[29]在非洲爪蟾卵母细胞中异源性表达钠/葡萄糖转运蛋白-1(SGLT-1),结合电生理学实验验证了冬虫夏草提取物4- β 乙酰氧基双簧二醇(4-ASD)对SGLT-1的显著抑制作用,有望与SGLT-1的特异性抑制剂共同在治疗糖尿病方面发挥重要作用。

2.4 应用于罕见病治疗药物筛选

罕见病,也称孤儿病。根据《中国罕见病定义研究报告2021》定义,新生儿发病率小于万分之一、患病率小于万分之一、患病人数小于14万的疾病划入罕见病。大多数的罕见病都属于遗传性疾病,而非非洲爪蟾胚胎是研究遗传性疾病的优良工具。非洲爪蟾中基因编辑技术的成功实践为罕见疾病建模、疾病分子机制的研究及药物开发提供了极大便利。同时,非洲爪蟾也可一定程度上克服罕见病治疗药物开发成本高的问题。表2列举了以基因编辑的非非洲爪蟾胚胎为工具的罕见病模型建立实例。

表2 利用基因编辑工具在非非洲爪蟾中建立罕见疾病模型

Table 2 Establishment of rare disease models in *X. laevis* using gene editing tools

疾病模型	基因编辑工具	靶点	文献
Charge综合征	Morpholino	CHD7	30
肾单位肾痹	Morpholino	ANKS6	31
视网膜色素变性	CRISPR/Cas9	RHO	32
威廉姆斯综合征	Morpholino	WSTF	33
多发性硬化症	CRISPR/Cas9	MBP	34
歌舞伎综合征	Morpholino	KMT2D	35
班布里奇-罗珀斯综合征	Morpholino	ASXL3	36
Galloway-Mowat综合征	Morpholino	PRDM15	37
Nager综合征	Morpholino	SF3B4	38
激素耐药型肾病综合征	Morpholino	nup85、nup107、nup133	39
早期婴儿型癫痫性脑病	CRISPR/Cas9	NEUROD2	40

利用非洲爪蟾模型进行了成功的药物筛选。范可尼贫血(FA)是一种罕见疾病,属于癌症易感性的血液系统遗传病。FA通路抑制剂可用于特定肿瘤的靶向治疗^[41]。Landais等^[42]利用卵母细胞提取物构建了一种无细胞系统来筛选FA通路的小分子抑制剂。在772种候选化合物中成功筛选出了抑制

xFANCD2-L形成的最有效的化合物DNN(2,3-dichloro-5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone),其有望成为治疗FA的候选药物。

多发性硬化症(MS)是一种免疫介导中枢神经系统炎症性脱髓鞘疾病,髓鞘再生是治疗MS的一个方向。Abdelkrim等^[34]将绿色荧光蛋白与大肠杆

菌硝基还原酶融合,并在非洲爪蟾蝌蚪髓鞘少突胶质细胞中特异性表达,将甲硝唑溶液与蝌蚪共孵育后,大肠杆菌硝基还原酶可将甲硝唑转化为细胞毒素,从而诱导脱髓鞘反应。由于非洲爪蟾蝌蚪呈透明状,因此在显微镜下很容易观察脱髓鞘及髓鞘再生情况。利用该模型筛出西尼莫德(siponimod)是鞘氨醇-1-磷酸受体1/鞘氨醇-1-磷酸受体5的双重激动剂,是促进髓鞘再生的最有效分子之一。该药物已于2019年由美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市,用于治疗复发性MS成人患者。

3 非洲爪蟾在药物安全性评价中的应用

哺乳动物致畸试验是药物研发过程中不可缺少的环节,但基于3R原则的考量,迫切需要开发替代试验系统。由于两栖动物的发育阶段与哺乳动物高度相似,因此它们正逐渐成为药物安全性评价中备受重视的模型。

Frog Embryo Teratogenesis Assay—Xenopus



图4 非洲爪蟾应用于药物安全性评价的流程

Fig. 4 Processes for application of *X. laevis* to drug safety evaluation

目前,FETAX试验在药物安全性评价中的应用越来越广泛。Yoon等^[45]应用FETAX试验对塞来昔布进行了毒性评价,发现其具有胚胎致畸作用,可抑制血管壁成熟和血管网络形成从而导致严重的心脏和血管畸形,且胚胎的畸形率与塞来昔布的浓度呈正相关。

在抗肿瘤药物的安全性评价方面,Marina等^[46]研究了5种抗肿瘤药物:5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他滨(CAP)、顺铂(CDDP)、依托泊苷(ET)和伊马替尼(IM)对非洲爪蟾胚胎的影响,发现除CDDP以外的4种药物会显著诱导胚胎畸形,具有致畸风险。

针对抗癌药物的安全性评价,Longo等^[47]利用FETAX试验验证了双氢青蒿素的发育毒性。研究发现,双氢青蒿素通过扰乱红细胞代谢导致胚胎发育毒性,表明其具有非物种特异性的毒性特性。

(FETAX)是一种以非洲爪蟾为实验对象的、应用广泛的药物毒性评价试验,尤其是对于药物致畸潜力和发育毒性的评价^[43]。实验过程中,将非洲爪蟾胚胎或蝌蚪与一定浓度的药物溶液共孵育,96 h后记录表型,收集半数致死浓度(LC₅₀)、半数效应浓度(EC₅₀)等主要参数即可(图4)。LC₅₀/EC₅₀作为畸形参数(TI),以此来评价药物的发育毒性或致畸潜力。FETAX试验的优点在于:(1)所需的化合物量少,并且能够在短时间内(96 h)得出试验结果。(2)实验结果可信,对已知哺乳动物或人类具有发育毒性的化合物进行FETAX测试,准确率可达到81%;结合FETAX与代谢激活系统(MAS)以预测哺乳动物发育毒性的试验准确率可达到95%^[44]。因此在药物安全开发的早期进行FETAX测试可得到有效的安全预警信息。(3)允许实验人员以快速、低成本的方式进行药物发育毒性测试。

这些研究为药物毒性评价提供了重要的实验数据,并对药物安全性评估和临床使用提供了参考。

4 非洲爪蟾卵母细胞在药物代谢和药效评价中的应用

药物代谢是指药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄过程。非洲爪蟾的卵母细胞是一种独特的系统,成熟的卵母细胞是母体mRNA和蛋白质的储存库,具有翻译外源性RNA的能力,可以通过外源性蛋白质的表达来研究细胞背景下的复杂生物过程,是一种能够异源性表达药物代谢酶和转运体的优秀载体^[48]。因此,非洲爪蟾卵母细胞可用于代谢酶和转运体的功能表征,同时结合放射性元素标记法、荧光标记法、电生理学实验等进行功能测定和药物代谢性质考察。已有很多药物转运体在非洲爪蟾卵母细胞中成功表达,如MDR1、BCRP、OATP-A、

OATP-B 等^[49-52]。

非洲爪蟾也是进行离子通道研究的优秀工具。对于一些作用于离子通道的药物,如甲氟喹、曲马多、安非他酮等,研究人员已成功应用非洲爪蟾卵母细胞进行了进一步的药理学研究,揭示了新的作用机制^[53-55]。

5 利用非洲爪蟾揭示疾病发生机制

非洲爪蟾在揭示疾病发生机制中发挥着不可或缺的作用。作为基因功能研究、胚胎发育研究和信号转导途径研究的可靠模型,非洲爪蟾提供了独特的实验平台。其遗传相似性使其成为理想的基因功能研究对象,胚胎发育过程的相似性使其成为探索发育相关疾病的有效工具,而其细胞信号转导途径的相似性则为疾病信号传导机制的研究提供了有益参考。因此,利用非洲爪蟾作为模型生物,有助于深入理解疾病的发生机制,为疾病治疗和预防提供新的思路和策略。

乳腺癌易感蛋白1(BRCA1)是一种肿瘤抑制因子,在乳腺癌和卵巢癌的发展中具有关键作用。BRCA1的缺失会导致DNA修复、细胞应激信号传导、细胞周期进程和细胞凋亡等功能异常,但其在转录调控中的具体作用尚未完全明确。Barrows等^[56]利用非洲爪蟾卵提取物研究了BRCA1在无细胞转录系统中的作用,通过构建BRCA1质粒载体、染色质免疫沉淀等技术,发现BRCA1-BARD1复合体通过限制BRD4(表观遗传调节因子)的募集来抑制转录起始。这项研究结果将BRCA1与BRD4联系起来,确认了BRD4的失调是基因组诱导细胞死亡的重要因素。这些遗传相互作用机制的揭示将在肿瘤治疗和干预中发挥重要作用。

蛋白磷酸酶4催化亚基(PPP4C)是一种进化保守的蛋白质,参与多种生物学和病理过程,包括胚胎发育、器官形成、细胞稳态和肿瘤发生。然而,调控这些过程的详细分子机制在很大程度上仍然未知。Wang等^[57]利用非洲爪蟾胚胎模型研究了PPP4C与生物过程(BPs)和典型Wnt信号传导之间的潜在关联,在非洲爪蟾胚胎中敲低PPP4C干扰正常的胚胎发育和Wnt通路。此外,对非洲爪蟾胚胎的生化分析表明,内源性和外源性PPP4C均负调节了AXIN1(Wnt抑制剂)的丰度。该研究为PPP4C在Wnt激活中的作用提供了新的见解,同时支持了PPP4C在生物过程和Wnt信号传导调控中的相似性,从而建立了肿瘤发生和早期胚胎发育之间的内在联系。

6 结语与展望

非洲爪蟾作为一种经典模式生物,在药物筛选、评价过程中越来越多地得到应用。与传统细胞模型相比,非洲爪蟾模型可以打破细胞模型的体外局限性,一定程度上阐明体内环境对药物作用的影响;与哺乳动物模型相比,非洲爪蟾具有周期短、子代多、成本低等优势;与斑马鱼模型相比,非洲爪蟾的解剖学特征和生理功能与人类更加接近,实验结果更加具有说服力,可减少药物临床试验失败的可能性。

目前,在药物研发领域利用非洲爪蟾进行的研究已经取得了一些成果,但尚有许多领域等待开发。除前述用途之外,研究人员也在积极拓展非洲爪蟾在药物研发领域的其他用途。2020年,Blackiston等^[55]利用非洲爪蟾胚胎创造出了一种活体机器人,命名为“Xenobots”。这是世界上第1个生物机器人,完全由生物外植体培养形成,且具有运动能力、创口愈合能力和集体行为能力。随后,Solank等^[58]提出了Xenobot在药物研究领域应用的可能性,如药物靶向递送等。

非洲爪蟾的发展也存在不足和局限性。首先,动物模型虽然可以为研究者提供思路和启发,但其结果在临床预测方面并非完全正确。尽管非洲爪蟾作为脊椎动物在生物学上与人类有一定的相似性,但是仍有可能被模型误导。如Rottmann等^[59]的1项研究中提到在非洲爪蟾卵母细胞得到的实验数据无法重现。其次,缺乏特定基因突变株。与小鼠等其他模式生物相比,非洲爪蟾缺乏大量的特定基因突变株,这限制了对特定基因功能的研究和疾病建模的深入进行。此外,共享资源较少。相比于其他模式生物如小鼠和斑马鱼,非洲爪蟾的共享资源相对较少,包括基因组数据库、突变库等,这给研究者的工作带来了一定的不便。

在未来的研究中,有必要进一步探究非洲爪蟾作为模式生物的能力和局限性以及与人类的差异性、相关性,以使非洲爪蟾在更广泛、准确地应用于药物研究。并且要将最新的分子生物学技术、计算机技术、人工智能整合到模式生物的研究当中,发挥交叉学科的优势。近5年来现代生物学技术更多地应用到了非洲爪蟾的研究中,例如单细胞测序、转录组学、蛋白质组学等^[60-62]。2021年的1项研究将深度学习应用到了非洲爪蟾胚胎发育和疾病模型的表型分析中,这将会加快模式生物的发展,从而发挥模式生物的最大优势^[63]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Blum M, Ott T. *Xenopus*: An undervalued model organism to study and model human genetic disease [J]. Cells Tissues Organs, 2018, 205(5/6): 303-313.
- [2] Session A M, Uno Y, Kwon T, et al. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis* [J]. Nature, 2016, 538(7625): 336-343.
- [3] Christensen E I, Raciti D, Reggiani L, et al. Gene expression analysis defines the proximal tubule as the compartment for endocytic receptor-mediated uptake in the *Xenopus* pronephric kidney [J]. Pflugers Arch, 2008, 456(6): 1163-1176.
- [4] Raciti D, Reggiani L, Geffers L, et al. Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping [J]. Genome Biol, 2008, 9(5): R84.
- [5] Karimi K, Fortriede J D, Lotay V S, et al. Xenbase: A genomic, epigenomic and transcriptomic model organism database [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D861-D868.
- [6] Reid C D, Karra K, Chang J, et al. XenMine: A genomic interaction tool for the *Xenopus* community [J]. Dev Biol, 2017, 426(2): 155-164.
- [7] Costanzo V, Robertson K, Gautier J. *Xenopus* cell-free extracts to study the DNA damage response [J]. Methods Mol Biol, 2004, 280: 213-227.
- [8] Exner C R T, Willsey H R. *Xenopus* leads the way: Frogs as a pioneering model to understand the human brain [J]. Genesis, 2021, 59(1/2): e23405.
- [9] Lee-Liu D, Méndez-Olivos E E, Muñoz R, et al. The African clawed frog *Xenopus laevis*: A model organism to study regeneration of the central nervous system [J]. Neurosci Lett, 2017, 652: 82-93.
- [10] Cline H T. Imaging structural and functional dynamics in *Xenopus* neurons [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2022, doi: 10.1101/pdb.top106773.
- [11] Offner T, Daume D, Weiss L, et al. Whole-brain calcium imaging in larval *Xenopus* [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2020, doi: 10.1101/pdb.prot106815.
- [12] Feng M S, Bestman J E. Imaging mitochondrial dynamics in the *Xenopus* central nervous system (CNS) [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2021, doi: 10.1101/pdb.prot106807.
- [13] Kang T H, Murakami Y, Takayama H, et al. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on *in vitro* ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: Putative neurotransmitter receptors involved in their action [J]. Life Sci, 2004, 76(3): 331-343.
- [14] Ma K G, Qian Y H. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease [J]. Neuropeptides, 2019, 73: 96-106.
- [15] Wallace T L, Callahan P M, Tehim A, et al. RG3487, a novel nicotinic $\alpha 7$ receptor partial agonist, improves cognition and sensorimotor gating in rodents [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 336(1): 242-253.
- [16] Terry A V, Callahan P M, Bertrand D. R-(+) and S-(-) isomers of cotinine augment cholinergic responses *in vitro* and *in vivo* [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2015, 352(2): 405-418.
- [17] Ohnari K, Okada K, Higuchi O, et al. Late-onset myasthenia gravis accompanied by amyotrophic lateral sclerosis with antibodies against the acetylcholine receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein 4 [J]. Intern Med, 2018, 57(20): 3021-3024.
- [18] Palma E, Reyes-Ruiz J M, Lopergolo D, et al. Acetylcholine receptors from human muscle as pharmacological targets for ALS therapy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(11): 3060-3065.
- [19] Colak S, Ten Dijke P. Targeting TGF- β signaling in cancer [J]. Trends Cancer, 2017, 3(1): 56-71.
- [20] Dush M K, McIver A L, Parr M A, et al. Heterotaxin: A TGF- β signaling inhibitor identified in a multi-phenotype profiling screen in *Xenopus* embryos [J]. Chem Biol, 2011, 18(2): 252-263.
- [21] Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors [J]. Cancer Treat Rev, 2018, 62: 50-60.
- [22] Amado N G, Fonseca B F, Cerqueira D M, et al. Effects of natural compounds on *Xenopus* embryogenesis: A potential read out for functional drug discovery targeting Wnt/ β -catenin signaling [J]. Curr Top Med Chem, 2012, 12(19): 2103-2113.
- [23] Amado N G, Predes D, Fonseca B F, et al. Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth *in vitro* by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. J Biol Chem, 2014, 289(51): 35456-35467.
- [24] Thorne C A, Lafleur B, Lewis M, et al. A biochemical screen for identification of small-molecule regulators of the Wnt pathway using *Xenopus* egg extracts [J]. J Biomol Screen, 2011, 16(9): 995-1006.
- [25] de Robertis A, Valensin S, Rossi M, et al. Identification and characterization of a small-molecule inhibitor of Wnt signaling in glioblastoma cells [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(7): 1180-1189.
- [26] Tanaka M, Kuriyama S, Itoh G, et al. Identification of anti-cancer chemical compounds using *Xenopus* embryos

- [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(6): 803-811.
- [27] Kuznetsoff J N, Owens D A, Lopez A, et al. Dual screen for efficacy and toxicity identifies HDAC inhibitor with distinctive activity spectrum for BAP1-mutant uveal melanoma [J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(2): 215-222.
- [28] Lei Y, Guo X G, Liu Y, et al. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(43): 17484-17489.
- [29] Yoo O, Lee D H. Inhibition of sodium glucose cotransporter-I expressed in *Xenopus laevis* oocytes by 4-acetoxyscirpindiol from *Cordyceps takaomantana* (anamorph = *Paecilomyces tenuipes*) [J]. *Med Mycol*, 2006, 44(1): 79-85.
- [30] Bajpai R, Chen D A, Rada-Iglesias A, et al. CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation [J]. *Nature*, 2010, 463(7283): 958-962.
- [31] Hoff S, Halbritter J, Epting D, et al. ANKS6 is a central component of a nephronophthisis module linking NEK8 to INVS and NPHP3 [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(8): 951-956.
- [32] Borchers A, Pieler T. Programming pluripotent precursor cells derived from *Xenopus* embryos to generate specific tissues and organs [J]. *Genes*, 2010, 1(3): 413-426.
- [33] Barnett C, Yazgan O, Kuo H C, et al. Williams Syndrome Transcription Factor is critical for neural crest cell function in *Xenopus laevis* [J]. *Mech Dev*, 2012, 129(9/10/11/12): 324-338.
- [34] Mannioui A, Vauzanges Q, Fini J B, et al. The *Xenopus* tadpole: An *in vivo* model to screen drugs favoring remyelination [J]. *Mult Scler*, 2018, 24(11): 1421-1432.
- [35] Schwenty-Lara J, Nürnberger A, Borchers A. Loss of function of Kmt2d, a gene mutated in Kabuki syndrome, affects heart development in *Xenopus laevis* [J]. *Dev Dyn*, 2019, 248(6): 465-476.
- [36] Lichtig H, Artamonov A, Polevoy H, et al. Modeling bainbridge-roopers syndrome in *Xenopus laevis* embryos [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 75.
- [37] Mann N, Mzoughi S, Schneider R, et al. Mutations in PRDM15 are a novel cause of galloway-mowat syndrome [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2021, 32(3): 580-596.
- [38] Devotta A, Juraver-Geslin H, Gonzalez J A, et al. Sf3b4-depleted *Xenopus* embryos: A model to study the pathogenesis of craniofacial defects in Nager syndrome [J]. *Dev Biol*, 2016, 415(2): 371-382.
- [39] Braun D A, Lovric S, Schapiro D, et al. Mutations in multiple components of the nuclear pore complex cause nephrotic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(10): 4313-4328.
- [40] Segal A G, Mis E K, Lindstrom K, et al. *De novo* pathogenic variants in neuronal differentiation factor 2 (NEUROD2) cause a form of early infantile epileptic encephalopathy [J]. *J Med Genet*, 2019, 56(2): 113-122.
- [41] Nepal M, Che R, Zhang J, et al. Fanconi anemia signaling and cancer [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(12): 840-856.
- [42] Landais I, Sobeck A, Stone S, et al. A novel cell-free screen identifies a potent inhibitor of the Fanconi anemia pathway [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(4): 783-792.
- [43] Fort D J, Mathis M. Frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX): Use in alternative preclinical safety assessment [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, doi: 10.1101/pdb.prot098319.
- [44] Leconte I, Mouche I. Frog embryo teratogenesis assay on *Xenopus* and predictivity compared with *in vivo* mammalian studies [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 947: 403-421.
- [45] Chae J P, Park M S, Hwang Y S, et al. Evaluation of developmental toxicity and teratogenicity of diclofenac using *Xenopus* embryos [J]. *Chemosphere*, 2015, 120: 52-58.
- [46] Isidori M, Piscitelli C, Russo C, et al. Teratogenic effects of five anticancer drugs on *Xenopus laevis* embryos [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2016, 133: 90-96.
- [47] Longo M, Zanoncelli S, Della Torre P, et al. Investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) using the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX) [J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 25(4): 433-441.
- [48] Mowry K L. Using the *Xenopus* oocyte toolbox [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020, 2020(4): 095844.
- [49] Jutabha P, Wempe M F, Anzai N, et al. *Xenopus laevis* oocytes expressing human P-glycoprotein: Probing trans- and cis-inhibitory effects on [3H]vinblastine and [3H]digoxin efflux [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(1): 76-84.
- [50] Nakanishi T, Doyle L A, Hassel B, et al. Functional characterization of human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) expressed in the oocytes of *Xenopus laevis* [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 64(6): 1452-1462.
- [51] Su Y M, Zhang X P, Sinko P J. Human organic anion-transporting polypeptide OATP-A (SLC21A3) acts in concert with P-glycoprotein and multidrug resistance protein 2 in the vectorial transport of saquinavir in Hep G2 cells [J]. *Mol Pharm*, 2004, 1(1): 49-56.
- [52] Tamai I, Nozawa T, Koshida M, et al. Functional characterization of human organic anion transporting

- polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C [J]. *Pharm Res*, 2001, 18(9): 1262-1269.
- [53] Paiz-Candia B, Islas A A, Sánchez-Solano A, et al. Mefloquine inhibits voltage dependent Nav1.4 channel by overlapping the local anaesthetic binding site [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 796: 215-223.
- [54] Ogata J, Minami K, Uezono Y, et al. The inhibitory effects of tramadol on 5-hydroxytryptamine type 2C receptors expressed in *Xenopus* oocytes [J]. *Anesth Analg*, 2004, 98(5): 1401-1406.
- [55] Pandhare A, Pappu A S, Wilms H, et al. The antidepressant bupropion is a negative allosteric modulator of serotonin type 3A receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 113(Pt A): 89-99.
- [56] Barrows J K, Fullbright G, Long D T. BRCA1-BARD1 regulates transcription through BRD4 in *Xenopus* nucleoplasmic extract [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(6): 3263-3273.
- [57] Wang Y L, Han W, Yun S, et al. Identification of protein phosphatase 4 catalytic subunit as a Wnt promoting factor in pan-cancer and *Xenopus* early embryogenesis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 10240.
- [58] Solanki N, Mahant S, Patel S, et al. Xenobots: Applications in drug discovery [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2022, 23(14): 1691-1703.
- [59] Rottmann M, McNamara C, Yeung B K, et al. Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria [J]. *Science*, 2010, 329(5996): 1175-1180.
- [60] Zhang Z B, Dubiak K M, Shishkova E, et al. High-throughput, comprehensive single-cell proteomic analysis of *Xenopus laevis* embryos at the 50-cell stage using a microplate-based MICROFASP system [J]. *Anal Chem*, 2022, 94(7): 3254-3259.
- [61] Sun L L, Champion M M, Huber P W, et al. Proteomics of *Xenopus* development [J]. *Mol Hum Reprod*, 2016, 22(3): 193-199.
- [62] Amin N M, Tandon P, Osborne Nishimura E, et al. RNA-seq in the tetraploid *Xenopus laevis* enables genome-wide insight in a classic developmental biology model organism [J]. *Methods*, 2014, 66(3): 398-409.
- [63] Naert T, Cicek O, Ogar P, et al. Deep learning is widely applicable to phenotyping embryonic development and disease [J]. *Development*, 2021, doi: 10.1242/dev.199664.

[责任编辑 刘东博]