

· 中药现代化论坛 ·

## 基于斑马鱼模型的中药代谢研究思路与方法

韦英杰<sup>1</sup>, 宁青<sup>1</sup>, 贾晓斌<sup>1\*</sup>, 龚祝南<sup>2</sup>

- (1. 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局方适宜剂型重点研究室, 江苏 南京 210028;  
2. 南京师范大学生命科学学院新药中心, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210097)

**摘要:** 通过查阅国内外文献, 概述中药代谢研究方法的现状及不足。分析模式生物斑马鱼中药代谢模型的依据, 并提出该模型的建立思路与方法。模式生物斑马鱼代谢模型有望为中药代谢研究提供一种简单的、模式的、生物的、系统的、高效的新方法, 对提高我国中药体内过程的研究水平, 推动中药现代化进程具有重要意义。

**关键词:** 斑马鱼; 中药代谢; 思路与方法; 中医药现代化

**中图分类号:** R285.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)07-1009-03

### Thoughts and methods for metabolic study of Chinese materia medica based on zebrafish model

WEI Ying-jie<sup>1</sup>, NING Qing<sup>1</sup>, JIA Xiao-bin<sup>1</sup>, GONG Zhu-nan<sup>2</sup>

- (1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Key Laboratory of Scientific Preparation for Clinical Effective Prescription of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Province Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Center for New Drug Research and Development, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** Access to domestic and foreign literatures, the status and lack of metabolic study on Chinese materia medica (CMM) have been overviewed; The basis for establishing the zebrafish metabolic model of CMM has been analyzed; The thoughts and methods for the establishment of the model have been put forward. The metabolic model of zebrafish could be expected to provide a simple, model, biological, systematic, and efficient new method for CMM metabolic study. It is of great significance to enhance the research level of physiological disposition of CMM and to accelerate the modernization process of CMM.

**Key words:** zebrafish; metabolism of Chinese materia medica; thought and method; modernization of traditional Chinese medicine

近年来, 中药在体内的代谢化学研究已成为中药物物质基础、作用机制、质量控制等关键领域的有效手段。当前的中药代谢研究方法主要借助于化学药物代谢的基本理论和方法, 虽取得了瞩目成就, 但也存在不足。从中药作用整体观出发, 从中药作用多靶点、多环节的特点出发, 建立中药代谢研究新模型, 有益于丰富中药代谢研究的思路与方法, 有益于促进中药现代化进程。

斑马鱼(zebrafish)是一种器官、系统发育完善的良好实验模式鱼, 已在国外成为一种热门的药学研究工具, 如用斑马鱼建立疾病模型<sup>[1,2]</sup>, 进行药物

活性成分的高通量筛选<sup>[3,4]</sup>、安全性评价<sup>[5,6]</sup>以及药物代谢<sup>[7]</sup>等研究。国内对斑马鱼的研究主要限于发育遗传学方面, 近年来, 逐步将其作为新模式用于药物研究<sup>[8-10]</sup>, 但在中药研究特别是代谢研究方面的应用尚为空白。根据斑马鱼的基因特点及生理特点, 可将其作为一个理想的模式生物代谢新模型用于中药复杂体系的代谢研究。

### 1 中药代谢研究的方法学国内外研究现状

1.1 体内实验法: 动物给药后, 在一定时间内将动物处死, 取消化道各部分内容物进行分析, 并检查血

\* 收稿日期: 2009-02-06

基金项目: 江苏省中药领军人才(2006); 2007年度公益性行业科研专项(中医药)(200707008)

作者简介: 韦英杰(1970—), 女, 辽宁省葫芦岛人, 助理研究员, 博士, 主要从事中药化学、分析及制剂研究。曾参加国家自然科学基金项目部分研究内容“复方丹参方的化学成分和代谢成分分析”; 主持江苏省卫生厅 2007 年度卫生科研项目基金 1 项; 发表学术论文 28 篇, 其中 9 篇为 SCI 转载; 获中国发明专利 5 项。 Tel: 13809020740 E-mail: wjy970@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 贾晓斌 Tel/Fax: (025) 85637809 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

液、尿、粪便、胆汁,测定代谢物的结构及量的变化,可研究药物的代谢转化,并推断其在消化道内的代谢过程,从而阐明复方在体内真正发挥药效的物质,进而研究复方的作用机制和物质基础。王喜军等<sup>[11,12]</sup>分析了口服茵陈蒿汤、六味地黄丸的血清化学成分;Sun等<sup>[13]</sup>采用HPLC-ESI-DAD-MS<sup>n</sup>法鉴定了大鼠口服丹参总酮后胆汁中丹参酮类代谢产物及其转化机制;韦英杰等<sup>[14]</sup>采用HPLC-ESI-MS法,分析了复方丹参方中多类成分及其在家兔和大鼠的血浆、尿和粪便中的多种代谢产物并推测其转化机制。

## 1.2 体外实验法

1.2.1 肝细胞代谢:取肝匀浆、肝细胞微粒体或细胞色素P450酶与药物共孵育,检查原型成分及其代谢物的种类和量,是研究肝脏对药物代谢的有效体外方法。Li等<sup>[15]</sup>研究了丹参酮A在肝微粒体中的消除;崔升森等<sup>[16]</sup>用肝微粒体研究葛根素的代谢及其动力学,表明葛根素可被肝微粒体代谢成大豆苷元;Rüer等<sup>[17]</sup>分析了大豆黄素经大鼠肝微粒体作用后的10个代谢产物。

1.2.2 胃肠道菌群代谢:粪便温孵法和离体消化道内容物温孵法是研究药物在消化道内代谢的方法。许多中药成分是在消化道菌丛作用下代谢的,特别是将肠道内细菌的苷键水解酶或人的粪便悬浮液与药物在厌氧条件下温孵,检查原型成分及其代谢物的种类和量,是研究肠内菌对药物代谢的有效方法。Rüer<sup>[17]</sup>等研究了大豆黄素经肠内菌作用后产生4个代谢产物及其转化机制;肠内菌群对七叶皂苷、积雪草苷及黄芩汤的体外代谢转化产物研究<sup>[18-20]</sup>等。

1.3 目前中药代谢研究方法学的不足:中药的代谢研究方法主要借助于化学药物代谢的基本理论和方法,虽然已取得了令人瞩目的成就,但也存在不足,主要表现在体内代谢方面,由于中药成分复杂,有效成分特别是体内成分的量低微,即使采用现代分析手段有时也难以满足中药体内复杂体系的检测需求,有时仅检测到少数成分,并不能体现整个复方的效应成分;体内实验法难以满足活性相关代谢物的分离制备要求。体外代谢方面,体外实验法虽然较有效地模拟了中药在体内代谢的不同环节,有益于富集、制备代谢产物,但脱离了完整代谢体系对中药的作用,难以体现体内代谢的综合结果;体外实验条件要求相对较高,一般实验室难以进行。

因此建立新的代谢研究方法,使该方法既能体现现在体代谢的综合效应,又能实现条件简单、低劳动

强度的高通量代谢研究,对丰富中药代谢的研究思路与方法具有重要意义。

## 2 模式生物斑马鱼中药代谢模型的研究思路与方法

2.1 斑马鱼中药代谢模型的思路提出:中药特别是复方为一个复杂的科学体系,化学成分复杂,通过多途径、多环节作用于多靶点对机体产生整体调节作用。因此从中药作用的整体观出发,研究中药在完整代谢体系下的整体代谢作用,建立能兼容体内、体外代谢实验方法的优点,弥补它们不足的代谢模型将会是一个较理想的中药代谢模型。采用器官系统发育完善,代谢系统完整的模式生物进行中药代谢研究有望实现这一目标。

模式生物是指在人们研究生命现象过程中长期、反复作为研究材料的物种,从这个物种研究中得出的许多生命活动规律往往代表了许多物种共同的规律。常见的有线虫、果蝇、酵母、大肠杆菌、斑马鱼等。其中斑马鱼较其他模式生物具备完整的器官、系统,斑马鱼同人类基因的相似度与老鼠相当,有其他模式生物所不具备的优点,是一种很好的用于研究脊椎动物胚胎学和发育遗传学的模式生物。将斑马鱼用于中药代谢研究将会是一个理想的模型生物代谢模型。

2.2 斑马鱼中药代谢模型的建立依据:斑马鱼自身的生理特点和基因特点,以及斑马鱼与哺乳动物及其他模式生物相比的独特优势<sup>[21,22]</sup>,为斑马鱼中药代谢模型的建立提供了合理性依据。

2.2.1 斑马鱼生理特点:斑马鱼成体鱼长3~4cm,具备完整的器官系统,如心脏、肝脏、胰腺、肾、眼睛、耳朵、复杂的血管网、血液循环系统、神经系统、消化系统等。

2.2.2 斑马鱼基因特点:斑马鱼存在许多与人类疾病相关的基因,且在蛋白质水平上,其关键部位的同源性几乎是100%,所以可用斑马鱼模拟人类疾病。目前,人们已成功用斑马鱼建立的许多人类疾病模型,如神经系统、循环系统、听觉、视觉、癌症等方面的疾病。

2.2.3 斑马鱼与传统动物老鼠相比:斑马鱼饲养和维持的费用更便宜,仅为老鼠的0.1%~1%,所需空间场地不大,易于室内大规模繁殖。一对成年鱼每周产卵一次,每次产100~200个卵,胚胎发育速度快,一天内就形成主要的组织和许多器官前体,如心脏、循环血液、神经系统、眼睛、耳朵,且都易于在透射显微镜下观察。受精5d后,斑马鱼已经形成了主要的内脏器官,包括肝脏、胰腺、复杂的血管网。

每代斑马鱼的周期与小鼠类似,约为2~3个月。斑马鱼同人类基因的相似度与老鼠相当,生长迅速,对DMSO有耐受性,且易从水中吸收化合物,这样使用在体模型进行药物高通量代谢研究成为可能。

2.2.4 斑马鱼与其他模式生物相比:虽然其他模式生物如线虫、果蝇也可用于大规模筛选,但并不能阐明脊椎动物特异组织,如肾、心脏、脊索、神经脊细胞和血细胞的发育和功能。因此利用斑马鱼作为探索人类疾病的动物模型,为研究相关的病理生理学提供了有利的方法。

斑马鱼具有完整的代谢器官系统和与哺乳动物相似的基因,可用于建立人类多种疾病模型。因此可将其作为具有完整代谢体系的理想模式生物用于中药多成分的代谢研究。

2.3 斑马鱼中药代谢模型的建立方法:韦英杰等<sup>[23]</sup>曾以复方丹参为研究对象,探索了斑马鱼对方中三七皂苷类、丹参二萜醌类和丹参酚酸类活性成分的代谢规律,建议该模型的建立可以从以下几方面着手:研究对象的选择;给药与取样方法的研究;药物剂量选择;样品处理及分析。

2.3.1 研究对象的选择:化学成分和药理作用研究明确,且能体现中药复杂体系的中药或复方可作为合适的研究对象。

2.3.2 给药与取样方法的研究:与哺乳动物不同,斑马鱼的体积太小,口服给药方式很困难。如能将药物溶解于斑马鱼所生活的水中,则斑马鱼会自主连续地从溶液中吸收药物,药物的代谢物也会随着斑马鱼的排泄物被连续地排到水中,这样就可通过分析药液的成分变化来掌握药物的部分代谢信息。此外,鱼的血液量太少,又难取,通过取血来分析血样的方式不现实。而对整体鱼内成分进行分析也能掌握药物在鱼体内的变化情况,因此通过定时取样分析中药成分的斑马鱼体及体外的变化规律来较为全面地探索斑马鱼对中药的代谢情况,方法简单可行。

2.3.3 药物剂量选择:将斑马鱼置于含有不同浓度中药药液中,选择对其活动状态改变较小的药物浓度作为合适的参考浓度。

2.3.4 样品处理及分析:斑马鱼体外药液及鱼体的处理均需考虑可最大限度地减少样品处理过程中的损失及误差;鱼体的处理尚需考虑除蛋白。样品过0.45 μm 滤膜,滤液进行HPLC或LC-MS分析。

### 3 模式生物斑马鱼中药代谢模型的展望

本文首次提取出了基于模式生物斑马鱼模型的中药复杂体系的代谢研究方法,有望建立一种能体

现中药作用整体观的模式生物的中药代谢研究新平台。与经典的在体代谢方法相比,它最大限度地保留了在体动物代谢的系统性,克服了在体动物实验强度大,样本处理分析困难等缺陷;与体外代谢方法相比,它能有效地模拟在体完整代谢体系,克服了体外实验难以体现中药作用整体观的缺陷。模式生物斑马鱼代谢模型有望为中药复杂体系的代谢研究提供一种简单的、模式的、生物的、系统的、高效的新方法,有望为中药复杂体系的代谢研究提供新思路,这对提高我国中药体内过程的研究水平,推动中药现代化进程具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] Barut B A, Zon E I. Realizing the potential of zebrafish as a model for human disease [J]. *Physiol Genomics*, 2000, 2: 49-51.
- [2] Kari G, Rodeck U, Dicker A P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82(1): 70-80.
- [3] Den Hertog J. Chemical genetics: Drug screens in zebrafish [J]. *Biosci Rep*, 2005, 25(5-6): 289-297.
- [4] Zon L I, Peterson R T. *In vivo* drug discovery in the zebrafish [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(1): 35-44.
- [5] Rubinstein A L. Zebrafish assays for drug toxicity screening [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2(2): 231-240.
- [6] Parg C. *In vivo* zebrafish assays for toxicity testing [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2005, 8(1): 100-106.
- [7] Lindholm C, Wynne P M, Marriott P, et al. Meabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response [J]. *Comp Biochem Physiol Part C*, 2003, 135: 169-177.
- [8] 王思锋, 刘可春, 韩利文, 等. 抗血管生成药物筛选及其新模型——斑马鱼 [J]. 山东科学, 2007, 20(4): 12-15.
- [9] 刘昌盛, 穆宇, 杜久林. 斑马鱼在生命科学中的应用 [J]. 生命科学, 2007, 19(4): 382-385.
- [10] Qun S S, Wu X R. Zebrafish:ideal model animal of research on human disease [J]. *Chem Life*, 2008, 28(3): 260-263.
- [11] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究进展 [J]. 世界科学技术——中药现代化, 2002, 4(2): 1-4.
- [12] 王喜军, 孙文军, 张宁, 等. 六味地黄丸血中移行成分的分离及结构鉴定 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(4): 277-280.
- [13] Sun J H, Yang M, Wang X M, et al. Identification of tanshinones and their metabolites in rat bile after oral administration of TTE-50, a standardized extract of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-ESI-DAD-MSn [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 564-574.
- [14] 韦英杰, 李萍, 舒斌, 等. 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法鉴定复方丹参方的化学成分和代谢成分 [J]. 分析化学, 2007, 35(1): 13-18.
- [15] Li P, Wang G J, Li J, et al. Identification of tanshinone A metabolites in rat liver microsomes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chromatogr A*, 2006, 1104(1-2): 366-369.
- [16] 崔升森, 赵春顺, 高坤, 等. 大鼠肝微粒体中葛根素的液相色谱质谱测定法及药物代谢动力学 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(1): 32-36.
- [17] R Uer C E, Maul R, Donauer E, et al. *In vitro* and *in vivo* metabolism of the soy isoflavone glycitein [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(7): 813-823.
- [18] 陈继永, 吴立军, 腾厚雷, 等. 肠内菌群对七叶皂苷体外代谢转化产物的研究 [J]. 中草药, 2003, 37(7): 1008-1011.
- [19] 翁骏, 吕秋军, 田瑛, 等. 肠内菌群对积雪草苷的代谢转化研究 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1008-1011.
- [20] Zuo F, Zhou Z M, Yyan M Z, et al. Metabolism of constituents in Huangqin Tang, a prescription in traditional Chinese medicine, by human intestinal flora [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(5): 558-563.
- [21] Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why, and when [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4: 504-512.
- [22] Sumannas S, Lin S. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation [J]. *DDT: Targets*, 2004, 3(3): 89-96.
- [23] 韦英杰. 复方丹参方的化学成分和代谢成分分析 [D]. 南京: 中国药科大学, 2007.