

斑马鱼模型在中药活性筛选中的适用性研究

韩利文^{1,2}, 袁延强², 何秋霞², 王思锋², 李遇伯¹, 楚杰², 刘可春^{2*}, 刘昌孝³

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

2. 山东省科学院生物研究所 生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014

3. 天津药物研究院 药代动力学和药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 考察斑马鱼血管生成抑制模型在中药各类样品活性筛选中的适用性。**方法** 选用 TG (VEGFR2:GFP) 系血管荧光转基因斑马鱼和 AB 系斑马鱼作为筛选模型, 分别用中药单体靛玉红、单味药材 (虎杖、长春花) 提取物、复方 (西黄丸) 处理斑马鱼胚胎, 以节间血管数作为指标, 考察不同类型中药样品对斑马鱼胚胎血管生成的影响。**结果** 靛玉红高剂量 (50 $\mu\text{g/mL}$) 明显抑制斑马鱼节间血管的生成 ($P<0.05$); 虎杖醋酸乙酯提取部位随着质量浓度的升高抑制作用增强, 10 $\mu\text{g/mL}$ 时与对照组比较差异显著 ($P<0.05$); 长春花醋酸乙酯提取部位 100 $\mu\text{g/mL}$ 时明显抑制斑马鱼血管生成 ($P<0.01$), 同时未见胚胎死亡; 西黄丸质量浓度大于 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制斑马鱼血管生成作用与对照组比较差异显著 ($P<0.05$), 100 $\mu\text{g/mL}$ 时呈非常显著的统计学差异 ($P<0.01$)。**结论** 斑马鱼模型对于成分复杂的中药样品具有很好的适应性, 这对于从我国丰富的中药资源中发现结构新颖、活性独特的先导化合物具有重要价值。

关键词: 斑马鱼; 血管生成; 中药; 药物筛选; 先导化合物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2037-05

Adaptability of zebrafish model in activity screening of Chinese materia medica

HAN Li-wen^{1,2}, YUAN Yan-qiang², HE Qiu-xia², WANG Si-feng², LI Yu-bo¹, CHU Jie², LIU Ke-chun², LIU Chang-xiao³

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Key Laboratory for Biosensors, Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

3. State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the adaptability of zebrafish anti-angiogenesis model in activity screening of Chinese materia medica. **Methods** Two strains of zebrafish, TG (VEGFR2:GFP) transgenic zebrafish and AB zebrafish, were used for the screening models. Intersegmental vessel number was considered as an index for angiogenesis inhibition when different types of samples such as indirubin, extracts of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* and *Catharanthi Herba*, and Compound Xihuang Pills were administrated to zebrafish embryo. **Results** High-dose group of indirubin (50 $\mu\text{g/mL}$) could obviously inhibit intersegmental vessel of zebrafish ($P<0.05$). The EtOAc extract of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* showed higher inhibitory activity with the concentration increased and there was a significant difference at 10 $\mu\text{g/mL}$ compared with control group ($P<0.05$). The EtOAc extract of *Catharanthi Herba* at 100 $\mu\text{g/mL}$ significantly inhibited angiogenesis of zebrafish embryo ($P<0.01$) and no embryo death was found. Significant difference was found when the concentration of Compound Xihuang Pills was above 50 $\mu\text{g/mL}$ when compared with control group and 100 $\mu\text{g/mL}$ group showed obvious significance ($P<0.01$). **Conclusion** Zebrafish model shows good adaptability for Chinese materia medica samples with complex constituents, which is very valuable for discovering the leading compound with novel structure and unique activity from abundant traditional herb resources in China.

Key words: zebrafish; angiogenesis; Chinese materia medica; drug screening; leading compound

收稿日期: 2011-04-13

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (SY2008C179); 山东省科技发展计划项目 (2006GG3202038)

作者简介: 韩利文 (1980—), 男, 助理研究员, 在读博士, 研究方向为斑马鱼药物筛选及药物代谢。

Tel: (0531)82605331 E-mail: hanliwen08@yahoo.com.cn

*通讯作者 刘可春 E-mail: hliukch@keylab.net

斑马鱼 (zebrafish), 又名蓝条鱼、花条鱼、斑马担尼鱼等, 是一种热带观赏鱼, 体长 4~6 cm, 属鲤科短担尼属, 原产于印度、孟加拉。自 1994 年冷泉港集会以及 *Nature* 和 *Science* 等杂志发表专题评述, 到 2009 年斑马鱼全基因组测序完成, 斑马鱼已成为一种公认的新型模式生物, 正逐渐拓展和深入到生命体的多种系统的发育、功能和疾病的研究中。与线虫、果蝇、鼠等其他模式生物相比, 斑马鱼器官与人器官在结构、生理、分子水平等方面惊人地相似, 其和人类的基因组保守性很高, 在蛋白质水平上, 关键部位的同源性几乎是 100%。国内外利用斑马鱼以及突变体已建立了多种人类疾病模型, 如抗新生血管形成、肿瘤、血液疾病、细胞凋亡和增殖、脂质代谢、炎症和中枢耐受等^[1-3], 并开展了相关的药物筛选评价研究工作。斑马鱼最大的特点在于胚胎发育透明, 早期血管生成的模式比较简单, 主要出现在头部和躯干部体节间, 体节间的血管最初由背部的动脉出芽形成于相邻体节之间, 可以在显微镜下方便观察, 是一种理想的血管生成活体动物模型。

从天然产物中发现结构新颖、活性独特的先导化合物已经成为新药研究的一个重要途径。我国拥有极为丰富、种类繁多的中药材资源, 与化学药相比, 中药成分具有复杂的药用形式, 其中单体化合物与化学药类似, 有效部位、提取物、水煎剂等均为由大量化学成分构成的复杂成分体系, 为药物筛选带来了很大困难。本研究室在抑制血管生成斑马鱼模型的建立及血管生成抑制剂的筛选过程中, 初步选择清热解毒类中药以及常用抗癌中药进行活性筛选, 考察了中药样品成分复杂程度、极性、给药时间、剂量等因素对斑马鱼血管生成的影响。本研究报告以其中几种中药的活性考察为研究内容, 在一定程度上反映了斑马鱼模型对于不同层次的中药形式 (单体成分、单味中药、复方) 的适用性, 为利用斑马鱼模型开展中药复杂成分体系药物筛选提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

靛玉红对照品, 中国药品生物制品检定所提供, 批号 717-2002204; 虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.、长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 购自济南建联药店, 由山东省科学院生物研究所宋广运研究员鉴定; 西黄丸为北京同仁堂科技发

展有限公司制药厂产品, 批号: 9042075; 阳性对照药 1-[4-氯苯氨基]-4-[4-吡啶甲基]丁二酸酐琥珀酸盐 (PTK787), 山东省科学院生物化工研究室提供, 质量分数 >98%。链霉蛋白酶, Sigma 公司产品; 其余试剂为分析纯。

1.2 仪器

COIC—ZSA302 型体视显微镜、XSJ—D 型倒置显微镜, 重庆光电仪器有限公司产品; SZX16 型体视荧光显微镜, Olympus 产品; FW177 型万能粉碎机, 天津泰斯特公司产品。

1.3 动物

TG (VEGFR2: GFP) 系血管荧光转基因斑马鱼、AB 系斑马鱼由本实验室提供。

2 方法

2.1 斑马鱼胚胎收集

斑马鱼在喂养时, 照明 14 h 与黑暗 10 h 交替进行, 定时喂饲人工颗粒状饵料和刚孵出的卤虫无节幼体。采卵时, 取健康性成熟的斑马鱼, 按雌雄 1:1 或 1:2 的比例放入交配缸内, 次日获得受精卵。对受精卵进行消毒和清洗后, 移入斑马鱼胚胎培养用水 (5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl₂、0.16 mmol/L MgSO₄) 中, 28 °C 下控光培养。

2.2 试药制备

2.2.1 单体成分 称取靛玉红 5 mg, 溶于 DMSO 中获得 100 mg/mL 样品母液, 再用胚胎培养用水稀释得至不同质量浓度溶液, 并保证筛选体系中 DMSO 终体积分数不高于 0.1%^[4]。

2.2.2 单味中药 按照本实验室中药活性筛选样品制备通法: 虎杖药材粉碎后过 20 目筛, 称取 50 g 置于圆底烧瓶中, 加入 95%乙醇 500 mL、300 mL 回流提取 2 次, 合并乙醇提取液, 减压浓缩回收乙醇, 加水 100 mL 分散, 分别加入石油醚、醋酸乙酯萃取, 每次 100 mL, 萃取 3 次, 合并石油醚、醋酸乙酯萃取液, 连同水液, 减压浓缩干燥。石油醚提取部位主要为脂溶性色素、脂肪油等低极性成分; 醋酸乙酯部位主要含大黄素、大黄素甲醚和大黄酚等蒽醌类化合物, 紫外分光光度法^[5]测定总蒽醌的量不低于 14%; 水提取部位主要含白藜芦醇、白藜芦醇苷等二苯乙烯类化合物及部分蒽苷类成分, 紫外分光光度法^[5]测定二苯乙烯类成分不低于 30%。

长春花同法操作, 石油醚部位为低极性部分; 醋酸乙酯部位包含大部分的生物碱类成分, 如长春碱、长春新碱、文多灵等, HPLC 法^[6]测定脱水长

春碱不低于 0.7%；水提取部位主要为糖类、有机酸类及少量极性较大的生物碱。

2.2.3 复方 西黄丸粉碎过 80 目筛，称取 5 g，加入甲醇 500 mL 超声提取 30 min，滤过制成 10 mg/mL 样品母液，HPLC 法^[7]测定 11-羰基-β-乙酰乳香酸 0.24 mg/mL。母液再用胚胎培养用水稀释得到不同质量浓度溶液，并保证筛选体系中甲醇终体积分数不高于 1%^[4]。

2.3 给药

挑选受精后 24 h 健康胚胎，置 1 mg/mL 链霉蛋白酶溶液中 2~5 min，脱外膜后再用培养用水清洗 2~3 遍，备用。将胚胎置 24 孔培养板中，每孔 8 枚，加入不同质量浓度试药 200 μL（靛玉红 5、10、50 μg/mL，虎杖和长春花各提取部位 1、10、100 μg/mL，西黄丸 1、10、50、100 μg/mL，PTK787 50 μg/mL），再加入培养用水至 2 mL，置可控温光照培养箱中恒温（28 ℃）孵育。

2.4 血管生成检测

受精后 24 h 左右斑马鱼胚胎节间血管开始出现，到受精后 48 h 左右血管基本形成，这段时间作为本斑马鱼模型利用的实验时间^[2]。斑马鱼胚胎经试药处理 24 h 后，转基因 TG 荧光鱼用荧光显微镜观察体节间血管；AB 系斑马鱼使用倒置显微镜观察体节间血管中血流通过情况，并采用内源性碱性磷酸酶染色法观察血管生成情况^[8]。

2.5 数据统计

应用 SPSS 11.5 软件对数据进行方差分析，数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 单体成分对斑马鱼血管生成的抑制作用

靛玉红 5 μg/mL 未显示血管生成抑制作用，50 μg/mL 能明显抑制斑马鱼节间血管的生成，与对照组比较差异显著（ $P < 0.05$ ）。见表 1。

3.2 单味中药不同提取部位对斑马鱼血管生成的抑制作用

虎杖和长春花提取部位在实验条件下均显示抑制斑马鱼节间血管生成的作用，见表 2。未加药的对照组的血管数为 26~28 条。虎杖醋酸乙酯提取部位随着给药质量浓度的升高而抑制作用增强，10 μg/mL 时侧枝血管数为 19.57 条，与对照组比较差异显著（ $P < 0.05$ ），但质量浓度增至 100 μg/mL 时胚胎全部死亡，提示给药量过大；其水提取部位显示了相反的规律，即在低剂量（1 μg/mL）时明显抑

制血管生成（17.50 条），而随着质量浓度的升高，抑制作用反而下降，但 100 μg/mL 时胚胎也全部死亡。长春花醋酸乙酯部位随着质量浓度的升高，血管生成抑制作用增强非常明显，100 μg/mL 时血管数为 2.83 条（ $P < 0.01$ ），且未见胚胎死亡。两味中药的石油醚提取部位均未观察到活性。

表 1 靛玉红对斑马鱼胚胎节间血管生成的抑制作用
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Inhibition of indirubin on angiogenesis of zebrafish embryo ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	节间血管数
对照	—	26.12 ± 0.87
靛玉红	5	25.90 ± 0.95
	10	25.86 ± 1.23
	50	17.00 ± 6.40*
PTK787	50	0**

与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

表 2 虎杖和长春花不同提取部位对斑马鱼胚胎节间血管生成的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Inhibition of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix* and *Catharanthi Herba* on angiogenesis of zebrafish embryo ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别		$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	节间血管数
对照		—	25.78 ± 1.67
虎杖	石油醚提取部位	1	24.34 ± 4.95
		10	25.14 ± 1.88
		100	死亡
	醋酸乙酯提取部位	1	25.08 ± 1.57
		10	$19.57\pm 4.18^*$
		100	死亡
	水提取部位	1	$17.50\pm 3.64^*$
		10	25.56 ± 0.89
		100	死亡
长春花	石油醚提取部位	1	25.25 ± 1.25
		10	26.11 ± 2.55
		100	25.32 ± 2.98
	醋酸乙酯提取部位	1	25.00 ± 2.05
		10	23.57 ± 3.88
		100	$2.83\pm 2.64^{**}$
	水提取部位	1	23.36 ± 3.98
		10	24.18 ± 3.58
		100	24.60 ± 4.32
PTK787		50	0**

3.3 西黄丸对斑马鱼血管生成的抑制作用

西黄丸提取液 1、10 $\mu\text{g/mL}$ ，对斑马鱼胚胎体节间血管形成无明显影响，而随着剂量的增加其抑制血管生成的作用明显增强，呈现良好的量效关系，见表 3。碱性磷酸酶的染色结果也显示了同样的规律，见图 1。50 $\mu\text{g/mL}$ 剂量以上显示显著性差异，100 $\mu\text{g/mL}$ 剂量侧枝血管数为 4.88 条，显示了非常显著的统计学差异 ($P < 0.01$)。

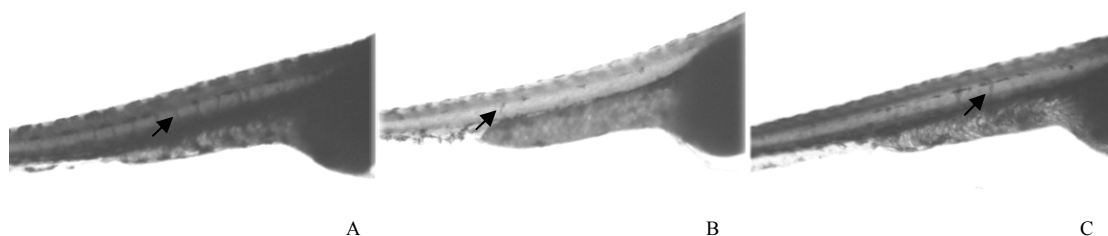
4 讨论

多年来人类一直在探寻抗肿瘤的有效手段。20

表 3 西黄丸对斑马鱼胚胎节间血管的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Inhibition of Xihuang Pills on angiogenesis of zebrafish embryo ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	节间血管数
对照	—	24.63 ± 0.74
西黄丸	1	24.88 ± 1.21
	10	22.28 ± 3.16
	50	$12.88 \pm 7.30^*$
	100	$4.88 \pm 6.08^{**}$
PTK787	50	0^{**}



A-对照组 B-PTK787 组 C-西黄丸 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组; 箭头所示为节间血管
A-control group B-PTK787 group C-Xihuang Pills 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group; arrows show intersegmental vessel

图 1 西黄丸对斑马鱼节间血管生成的抑制作用

Fig. 1 Inhibition of Xihuang Pills on angiogenesis of zebrafish embryo

世纪 70 年代，美国哈佛医学院的 Folkman 教授提出实体瘤的生长和扩散依赖于瘤内新血管的形成，并通过新形成的血管获取养分；新血管的形成和生长，又促进了癌细胞的转移和扩散。20 世纪 90 年代中后期，肿瘤内新血管形成抑制因子的发现、分离以及在实验动物身上神奇的治疗癌症的效果，证实了 Folkman 的理论。依据肿瘤血管生成理论研发抗血管生成药物已成为抗肿瘤药物研究领域的热点之一。

斑马鱼药物筛选模型已被证实是一个有效而快捷的抗血管生成剂的筛选模型。中药是一个多成分的复杂体系，这种复杂体系能否用斑马鱼筛选模型以及如何用斑马鱼模型评价中药复杂体系的活性是药物筛选工作者关注的问题。有研究表明，斑马鱼模型对化学药的适用性良好，国外研究人员采用该模型进行了大量的研究工作，并发现了一些有价值的化合物，其中 PTK787 就是一个典型的酪氨酸激酶抑制剂^[9]。中药单体成分的活性筛选可以借鉴化学药筛选的方法。

靛玉红是从大青叶中发现的一种抗肿瘤活性成分，通过抑制周期素依赖性蛋白激酶阻止细胞增殖，

对慢性粒细胞白血病具有明显的抑制作用^[10]。本实验观察结果显示，靛玉红对于斑马鱼胚胎血管生成具有明显的剂量效应关系，模型适用性良好。针对中药材具有复杂成分体系的特点，笔者提出了按照极性划分区段的方法，采用不同极性溶剂萃取获得不同极性的部位，然后进行活性评价。虎杖中的蒽醌类成分、长春花中的生物碱类成分均具有抑制血管生成作用^[11-12]。在本实验中观察到虎杖醋酸乙酯提取部位和水提取部位、长春花的醋酸乙酯部位对斑马鱼模型血管生成均具有较强的抑制作用。中药复方药味众多，构成一个巨大化学成分的集合，药效物质解析以及药效的阐述一直以来都是中药实现现代化的难题。西黄丸对肝癌细胞 SMMC-7721 分泌的血管内皮生长因子及基质金属蛋白酶-2、-9 具有明显的抑制作用^[13]。本实验利用斑马鱼模型考察了西黄丸对血管生成的影响，结果显示了西黄丸抑制血管生成具有较明显的量效关系。

本实验考察了斑马鱼模型对于具有复杂成分体系的中药的适用性，表明已知具有血管生成抑制作用的中药单体成分、提取物、复方在此模型上也显示了血管生成抑制作用。相比其他模型，斑马鱼胚

胎受精后数天内都是透明的,可进行活体观察体内器官发育情况;此外斑马鱼胚胎对 DMSO 耐受良好,溶解在 DMSO 极性相差很大的药物可通过皮肤扩散吸收^[14],消耗样品量极少;斑马鱼胚胎获得容易,每对亲鱼每次可排卵 200~400 枚,饲养繁殖比哺乳动物成本低得多。因此斑马鱼模型可作为细胞实验和常规动物实验评价之间的桥梁。斑马鱼模型将凭借自身优势对新药药物发现和早期筛选模型是一个有力的补充。

参考文献

- [1] Langheinrich U. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk [J]. *Bioessays*, 2003, 25(9): 904-912.
- [2] Cross L M, Cook M A, Lin S, *et al.* Rapid analysis of angiogenesis drugs in a live fluorescent zebrafish assay [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(5): 911-912.
- [3] Liu S, Leach S D. Zebrafish models for cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 71-93.
- [4] 王思锋, 王希敏, 侯海荣, 等. 有机助溶剂对血管生成斑马鱼模型的适用性研究 [J]. *实验动物与比较医学*, 2008, 28(4): 238-241.
- [5] 倪网东, 满瑞林, 李志明, 等. 紫外分光光度法同时测定虎杖中芪类和蒽醌类化合物 [J]. *化学工程师*, 2006, 125(2): 35-39.
- [6] 杨 蕾, 唐中华, 祖元刚. 高效液相色谱法同时测定长春花中的文多灵、长春质碱和脱水长春碱 [J]. *色谱*, 2007, 25(4): 550-552.
- [7] 孔 静, 于海云, 耿桂霞, 等. HPLC 法测定乳香药材中 11-羰基- β -乙酰乳香酸的含量 [J]. *齐鲁药事*, 2007, 126(17): 403-404.
- [8] Habeck H, Odenthal J, Walderich B, *et al.* Analysis of a zebrafish. VEGF receptor mutant reveals specific disruption of angiogenesis [J]. *Curr Biol*, 2002, 12(16): 1405-1412.
- [9] Paesler J, Gehrke I, Gandhirajan R K, *et al.* The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vatalanib and pazopanib potentially induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(13): 3390-3398.
- [10] 吴琦玮, 葛忠良, 高 月, 等. 靛玉红对肿瘤细胞抑制作用的研究及相关机制探讨 [J]. *天津中医药*, 2008, 25(1): 55-58.
- [11] 王心华, 吴淑英, 甄永苏. 大黄素对血管生成的抑制作用 [J]. *药学报*, 2004, 39(4): 254-258.
- [12] Kiemient G, Baruchel S, Rak J, *et al.* Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(8): R15-24.
- [13] 金沈锐, 张新胜, 祝彼得, 等. 西黄丸对肝癌细胞 SMMC 7721 分泌的血管内皮生长因子及基质金属蛋白酶 2、9 的影响 [J]. *中成药*, 2008, 30(7): 1079-1081.
- [14] Rombough P. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O₂ uptake in developing zebrafish, *Danio rerio* [J]. *J Exp Biol*, 2002, 205(12): 1787-1794.