

· 综述 ·

斑马鱼药物代谢模型的适用性研究进展

宁青¹, 韦英杰^{1*}, 王丹丹¹, 贾晓斌¹, 谢林²

1. 中国中医科学院江苏分院, 江苏省中医药研究院, 国家中医药管理局中药口服释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028
2. 南京中医药大学附属江苏省中西医结合医院, 江苏 南京 210028

摘要: 根据相关研究及国外有关文献资料, 对斑马鱼药物代谢的实验方法、代谢类型及适用性进行归纳和总结。斑马鱼较成功地模拟了哺乳动物 I 相代谢、II 相代谢、肠道菌群代谢及多途径整体代谢, 适用于微量单体化合物及其组合物的在体代谢研究, 有利于代谢产物的简单、高效富集, 具简单、高效、低成本、化合物用量少(毫克级)等优势, 是一种早期、快速预测微量成分在体代谢的极具前景的模式生物模型。

关键词: 斑马鱼; I 相代谢; II 相代谢; 肠菌代谢; 药物代谢

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)08-1231-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.025

Advances in study on applicability of drug metabolism model in zebrafish

NING Qing¹, WEI Ying-jie¹, WANG Dan-dan¹, JIA Xiao-bin¹, XIE Lin²

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Science, Nanjing 210028, China
2. Affiliated Jiangsu Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: According to relative research and foreign references, we summarized the experimental method, drug metabolism type, and applicability of drug metabolism model in zebrafish. Zebrafish successfully simulated the mammals in phase I metabolism, phase II metabolism, intestinal bacteria metabolism, and multiway *in vivo* metabolism. Zebrafish is suitable for *in vivo* metabolism of trace monomeric compounds and their combinations, and is benefit for the efficient enrichment of metabolites in simple way. It has the advantages of simplicity, high efficiency, low cost, and less amount of compound (a few mg) etc. It is a very prospect organisms model for early and rapid prediction of *in vivo* metabolism of trace elements.

Key words: zebrafish; phase I metabolism; phase II metabolism; intestinal bacteria metabolism; drug metabolism

斑马鱼(zebrafish)是近年来用于药物早期发现的重要药学工具,是被广泛用于药效筛选及毒性评价的重要模式生物^[1-3]。而药物在生物体内的代谢转化至其活性及毒性的产生,因此研究斑马鱼对外源物质的代谢是斑马鱼模型的重要组成部分,虽然起步较晚,但正日益受到重视^[4]。现有研究表明斑马鱼表达多种药物代谢酶,如 I 相代谢酶细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450), 以及 II 相代谢酶尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(uridine-diphospho-

glucuronosyltransferase, UGT)和磺基转移酶(sulfo-transferase, SULT)等,这些酶的基因或氨基酸序列与人类具有 50%以上同一性^[4-7]。此外,斑马鱼还具有肠道菌群^[8],这些代谢酶和肠道菌的存在能否使斑马鱼用于药物代谢研究?其模拟哺乳动物进行药物代谢的合理性与适用性如何?其能否成为有力补充现有药物代谢模型的新模型?相关实验支持具有重要价值。本文对斑马鱼药物代谢的国内外实验研究进行综述,为斑马鱼药物代谢模型的进一步推

收稿日期: 2014-08-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973978); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20141507); 江苏省六大人才高峰(2013-YY006, 2010-WS-071); 2014 年度江苏省第四期“333 工程”科研资助项目(BRA2014348)

*通信作者 韦英杰,女,研究员。Tel: (025)85637809 E-mail: wyj970@163.com

广与应用提供详细参考。

1 斑马鱼药物代谢方法的研究现状

本课题组在国内首次提出将斑马鱼用于中药代谢研究的思路与方法^[9], 并从鱼龄、给药与取样方法、药物剂量、样品处理及分析等方面进行了相关研究, 确定了简单、易行的斑马鱼代谢研究方法, 即取斑马鱼成鱼(6~10月龄, 0.8~1.2 g), 雌雄均有, 分别置于含有 20~30 mL 溶液的玻璃瓶中 [每瓶 1 条鱼, (23±1) °C], 随机分成 2 组, 每组 5 条鱼。其中 1 组为空白鱼组(给予 0~1.0% DMSO 纯净水), 另一组为药物鱼组(给予供试药的 0~1.0% DMSO 纯净水溶液, 供试药浓度以 24 h 内不影响斑马鱼的活动状态为宜)。同时设空白溶剂组(0~1.0% DMSO 纯净水)和空白药物组(供试药的 0~1.0% DMSO 纯净水溶液)。药物鱼组分别于斑马鱼暴露药液后 0~24 h 内定时每条鱼取药液 0.4~0.5 mL, 各时间点药液分别混合, 放置于-70 °C 冰箱。于末次取样时间点(24 h)同时将鱼取出, 用纯净水迅速洗涤 3 次, 处死, 去除鱼鳍和鱼鳞, 称质量, 放置于-70 °C 冰箱。空白溶剂组、空白鱼组和空白药物组于 0~24 h 时同法取样。将药液冷冻或减压干燥, 斑马鱼体匀浆、除蛋白后氮气吹干, 药液与鱼体的残渣均加适量甲醇或乙腈溶解, 过 0.22 μm 滤膜, 滤液分别进行 HPLC-MS 分析。

斑马鱼幼鱼也常被用来进行药物代谢研究, 方法与成体鱼相似, 一般采用受精后 3 d 幼鱼, 将其暴露于含供试药的溶液中, 取 24 h 的药液和鱼体, 并用 LC-MS 分析代谢产物^[10]。

2 斑马鱼药物代谢的适用性研究

2.1 斑马鱼用于药物 I 相代谢的适用性研究

斑马鱼表达多种 CYP450 酶, 为将其用于药物的 I 相代谢研究提供生理基础。

以代谢研究相对成熟的丹参二萜醌类成分丹参酮 II_A (tanshinone II_A)、隐丹参酮 (cryptotanshinone) 和丹参酮 I (tanshinone I) 为模式化合物, 将斑马鱼成鱼暴露于丹参酮 II_A、隐丹参酮和丹参酮 I 的 1% DMSO 纯净水溶液中, 采用高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱 (HPLC-MS) 分析斑马鱼暴露 24 h 后的药液及鱼体中的代谢产物。结果丹参酮 II_A 经斑马鱼代谢产生了 2 个单羟基化 (M_w 310) 和 1 个双羟基化 (M_w 326) 的产物, 未见丹参酮 II_A 脱氢产物 (M_w 292), 但是发现了丹参酮 II_A 脱氢后的羟基化产物 (M_w 308), 提示丹参酮 II_A 经斑马鱼作用后主要发生

了羟基化反应; 隐丹参酮经斑马鱼代谢主要产生了脱氢产物丹参酮 II_A (M_w 294), 其次尚发现 2 个单羟基丹参酮 II_A (M_w 310), 1 个单羟基隐丹参酮 (M_w 312), 3 个双羟基隐丹参酮 (M_w 328) 和 2 个 D 环开环产物 (M_w 315), 提示隐丹参酮经斑马鱼作用后主要代谢途径为脱氢, 其次为羟基化、氧化开环; 丹参酮 I 经斑马鱼作用后未发生转化。3 个丹参二萜醌类化合物的斑马鱼代谢结果与已有大鼠、肝微粒体的代谢结论一致 (图 1)^[11]。

进一步将斑马鱼成鱼暴露于丹参酮 II_A、隐丹参酮和丹参酮 I 组合物的溶液中, 结果检测到丹参酮 II_A 和隐丹参酮的羟基化和脱氢产物, 未发现丹参酮 I 的代谢产物。斑马鱼对组合物的代谢与大鼠或鼠肝微粒体的代谢机制高度一致, 为将斑马鱼用于更复杂的中药体系代谢研究提供依据^[12]。

Jones 等^[10]将斑马鱼幼鱼(受精后 72 h)暴露于布洛芬 (ibuprofen, 100 mg/L) 溶液 24 h, 用 LC-MS-MS 检测溶液及幼鱼体的代谢产物, 结果检测到羟基化布洛芬 (hydroxy-ibuprofen) 产物。表明斑马鱼幼鱼能以哺乳动物 CYP450 酶样的方式代谢布洛芬, 为将斑马鱼用于毒性和药效筛选提供支持。

2.2 斑马鱼用于药物 II 相代谢的适用性研究

斑马鱼表达多种 II 相代谢酶, 为将其用于药物的 II 相代谢研究提供了生理基础。

以 3 种黄酮苷元 5-羟基黄酮 (5-hydroxy flavone, 5-HF)、7-羟基黄酮 (7-hydroxy flavone, 7-HF) 和白杨素 (5,7-二氢黄酮, 5,7-dihydro flavonoids, 5,7-DHF) 为模式化合物, 探索斑马鱼用于微量黄酮苷元 II 相代谢的可行性及合理性。结果经斑马鱼成鱼代谢, 5-HF 产生了 2 个单羟基葡萄糖醛酸结合物和 1 个单羟基硫酸结合物; 7-HF 则产生 1 个单羟基葡萄糖醛酸结合物和 1 个单羟基硫酸结合物; 而 5,7-DHF 则分别在 5 位和 7 位羟基处葡萄糖醛酸化或单羟基葡萄糖醛酸结合物, 以及在 7 位羟基处硫酸化成单羟基硫酸结合物 (图 2)。结果表明斑马鱼能使 3 个黄酮化合物发生葡萄糖醛酸化和硫酸化的 II 相代谢反应, 提示为斑马鱼体内 II 相代谢酶尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶 (UGT) 和磺基转移酶 (SULT) 所介导, 这与已有人、大鼠、细胞或 II 相代谢酶对 3 个化合物的代谢结论高度一致^[13-17]。

2.3 斑马鱼用于肠道菌群代谢的适用性研究

斑马鱼体内具有肠道菌群, 为将其用于药物的肠道菌群代谢研究提供生理基础^[8]。

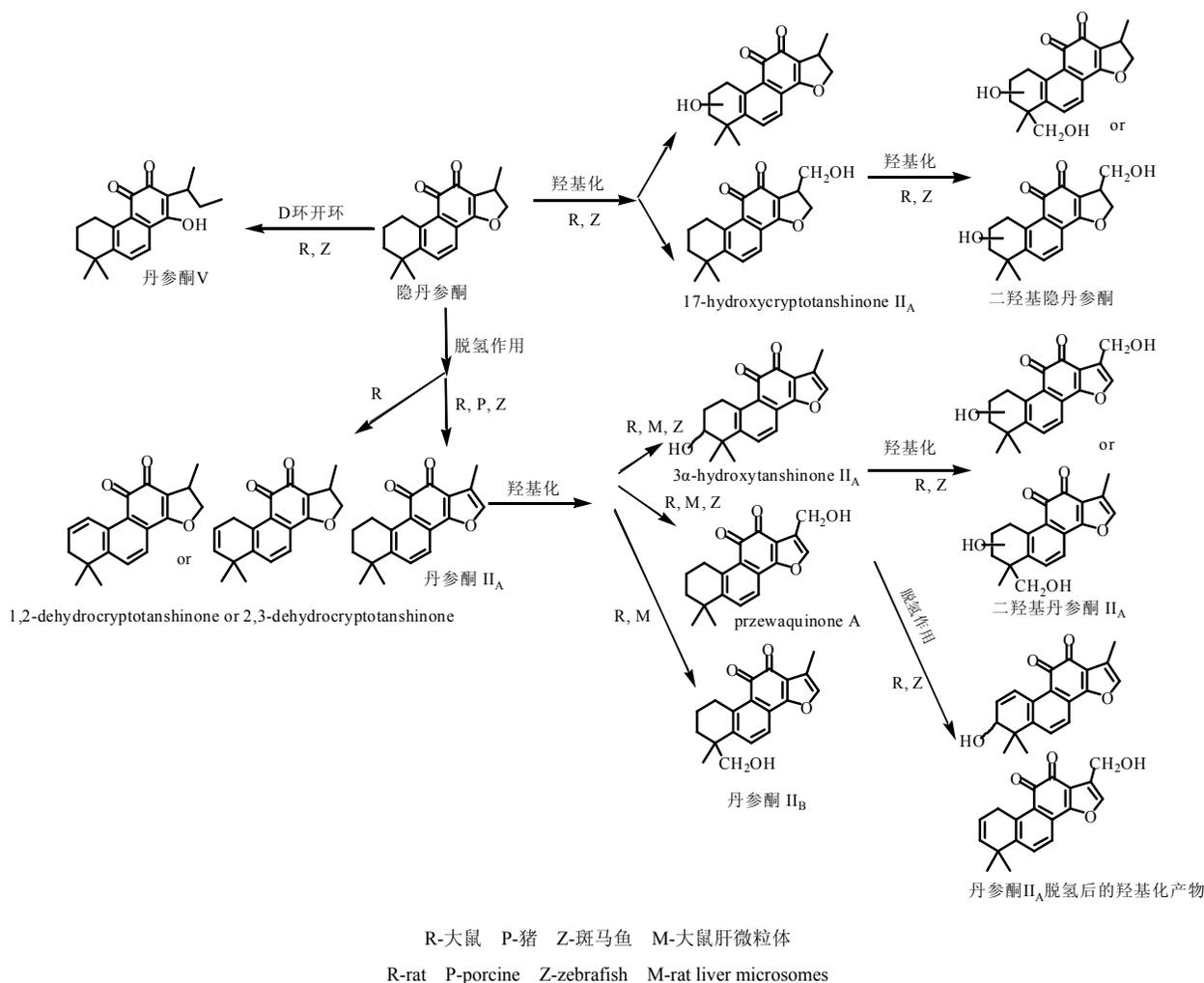


图1 斑马鱼与现有代谢模型对隐丹参酮代谢的比较分析

Fig. 1 Comparison on metabolic pathways of cryptotanshinone between zebrafish and current metabolism model

用斑马鱼成鱼研究淫羊藿中4个主要黄酮苷淫羊藿苷 (icariin)、宝藿苷 I (baohuoside I)、朝藿定 A (epimedin A) 和朝藿定 C (epimedin C) 的代谢, 探索斑马鱼用于研究微量黄酮苷肠道菌群代谢的可行性及合理性。将斑马鱼暴露于淫羊藿苷 (5.8 μg/mL)、宝藿苷 I (6.5 μg/mL)、朝藿定 A (7.0 μg/mL) 和朝藿定 C (7.85 μg/mL) 的 0.5% DMSO 纯净水溶液 24 h, 用 LC-MS 分析溶液与鱼体中的代谢产物, 结果显示淫羊藿苷经斑马鱼体内代谢后发生了脱葡萄糖基的代谢转化, 产生宝藿苷 I, 而宝藿苷 I 不再脱去鼠李糖基, 这与已有的大鼠代谢及肠道菌代谢机制高度相似; 朝藿定 A 和朝藿定 C 经斑马鱼体内代谢后也脱去了3位葡萄糖基, 朝藿定 A 还进一步脱去了7位葡萄糖基变成宝藿苷 I, 宝藿苷 I 也不再脱去鼠李糖基, 结论与目前报道的淫羊藿苷类化合物公认的代谢机制高度一致, 提示斑马鱼模型有效

模拟了现有代谢模型, 其用于微量淫羊藿黄酮类成分淫羊藿苷、宝藿苷 I、朝藿定 A 和朝藿定 C 的肠道菌代谢研究具有合理性 (图3) [18]。

Li 等 [19] 研究表明, 淫羊藿中黄酮苷化合物淫羊藿苷和朝藿定 C 经斑马鱼幼鱼代谢, 也主要发生脱糖基代谢, 但在幼鱼暴露 24 h 时产生较少脱糖基产物, 在 72 h 时才比较完全。此外, 淫羊藿苷和朝藿定 C 在斑马鱼和哺乳动物体内脱去全部糖基转化成淫羊藿素却高度保守。

用斑马鱼成鱼研究了三七中代谢机制相对明确的三七皂苷 R₁ (notoginsenoside R₁)、人参皂苷 Rg₁ (ginsenoside Rg₁)、人参皂苷 Rb₁ 的代谢, 结果3个皂苷均发生脱糖基肠菌代谢 (图4)。三七皂苷 R₁ 的脱糖基产物主要有脱去1分子葡萄糖的代谢产物三七皂苷 R₂ (M_w 770), 脱去1分子木糖的代谢产物人参皂苷 Rg₁ (M_w 800), 脱去1分子木糖和

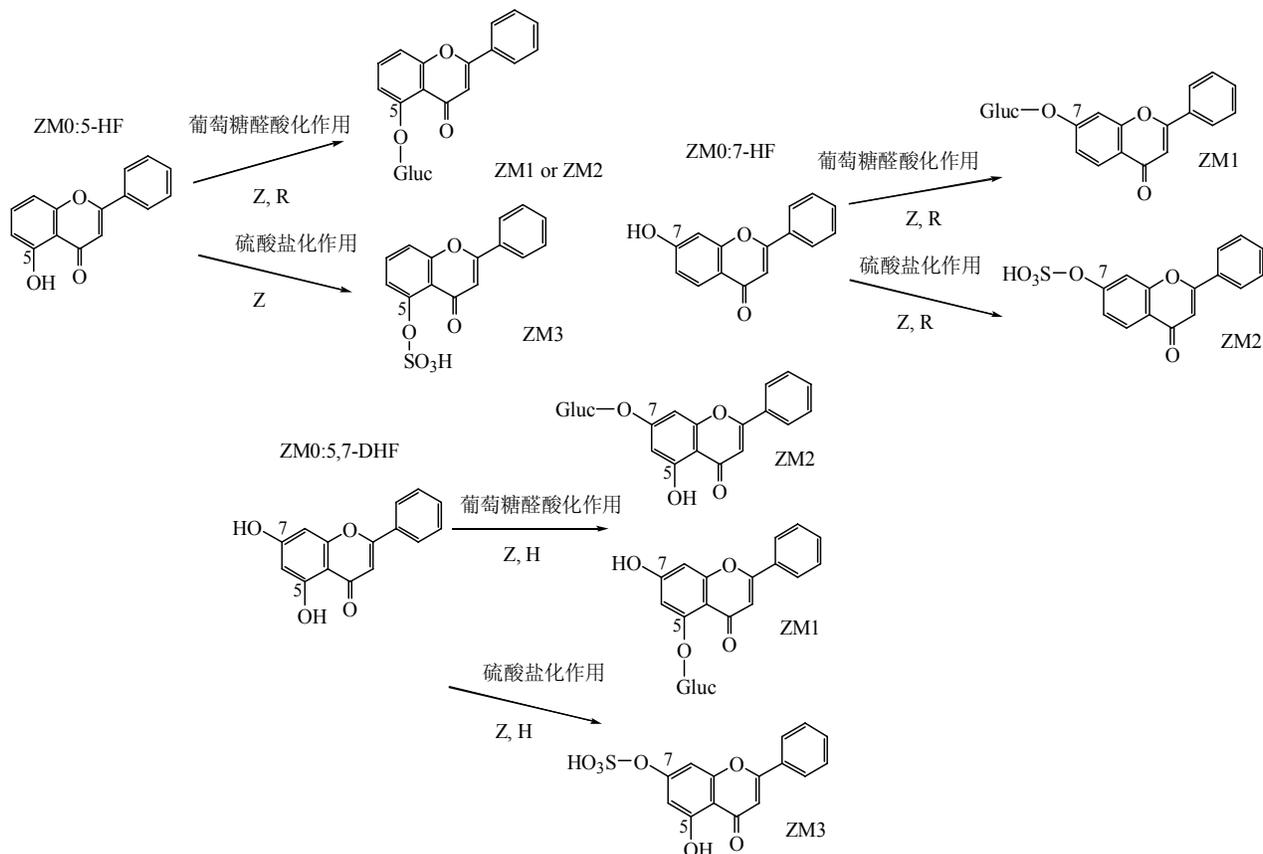


图 2 5-羟基黄酮、7-羟基黄酮及白杨素在斑马鱼 (Z) 和大鼠 (R)/人 (H) 体内的代谢路径比较

Fig. 2 Comparison on *in vivo* metabolic pathways of 5-HF, 7-HF, and chrysin between zebrafish (Z) and rat (R)/human (H)

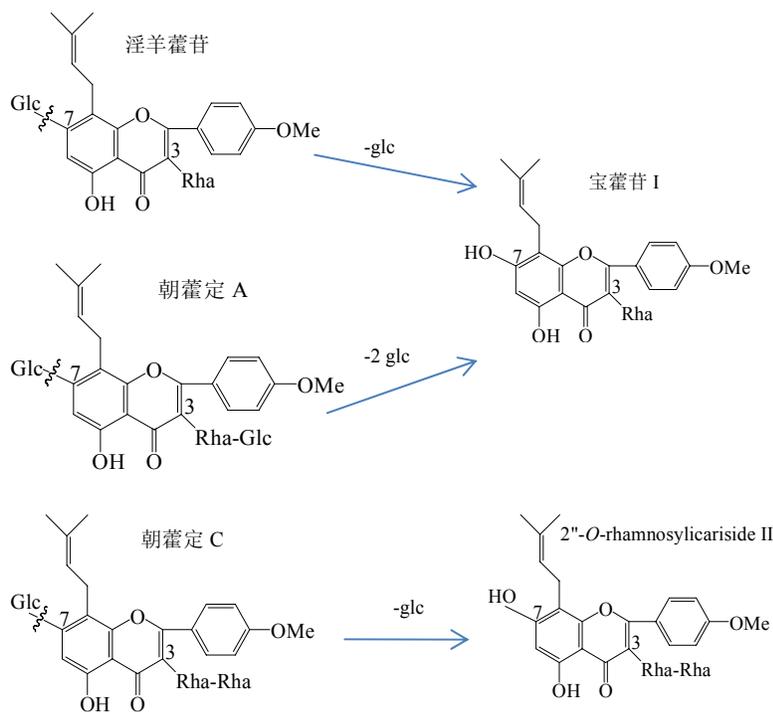


图 3 斑马鱼对淫羊藿苷、宝藿苷 I、朝藿定 A 和朝藿定 C 的代谢机制

Fig. 3 Possible metabolic mechanism of icariin, baohuoside I, epimedin A, and epimedin C by zebrafish

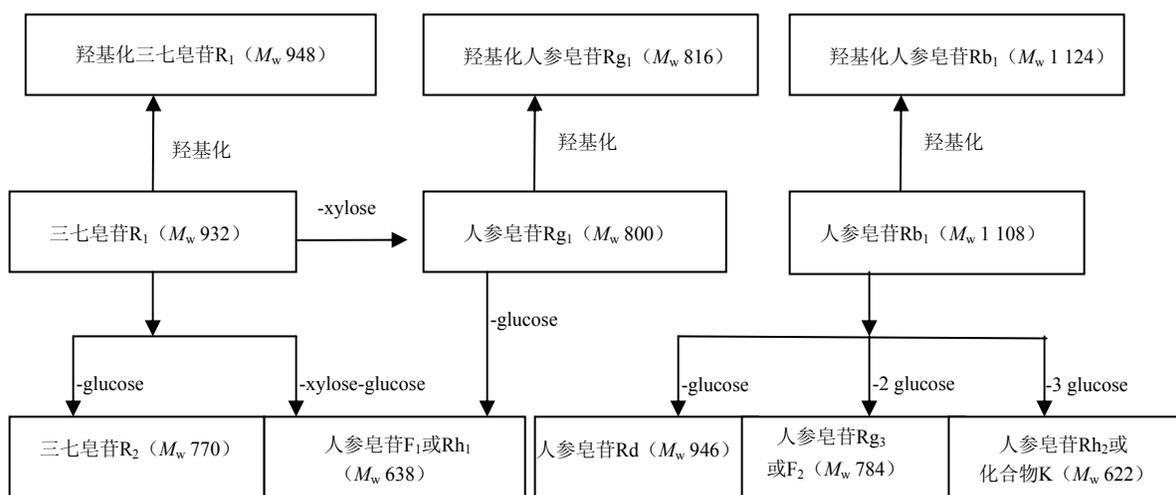


图 4 三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 经斑马鱼作用代谢途径

Fig. 4 Possible metabolic pathway of notoginsenoside R₁, ginsenoside R_{g1}, and ginsenoside R_{b1} by zebrafish

1 分子葡萄糖的代谢产物人参皂苷 F₁ 或 Rh₁ (即 1 分子葡萄糖原人参三醇皂苷, M_w 638); 人参皂苷 R_{g1} 的脱糖基产物有脱去 1 分子葡萄糖的代谢产物人参皂苷 F₁ 或 Rh₁ (M_w 638); 人参皂苷 R_{b1} 的脱代谢产物有脱去 1 分子葡萄糖的代谢产物人参皂苷 R_d (M_w 946), 脱去 2 分子葡萄糖的代谢产物人参皂苷 R_{g3} 或 F₂ (M_w 784), 脱去 3 分子葡萄糖的代谢产物人参皂苷 Rh₂ 或化合物 K (M_w 622)。上述 3 种皂苷的脱糖基产物与已有大鼠的代谢结果一致^[20]。

此外, 用斑马鱼成鱼研究了续断中代谢机制不十分明确的川续断皂苷 VI 的代谢过程, 结果川续断皂苷 VI 经斑马鱼代谢后, 产生了脱去 1 分子、2 分子及全部糖基的 5 种脱糖基代谢产物, 这与川续断皂苷 VI 在大鼠粪样中产物完全一致^[21-22]。

2.4 斑马鱼体现药物多途径整体代谢的适用性研究

药物进入体内, 在机体多种代谢酶及肠道菌群的作用下, 通常发生多途径代谢, 斑马鱼能否体现药物多途径的整体代谢, 对其模拟哺乳动物在体代谢, 进行整体毒性和活性筛选^[23]具有重要意义。

用斑马鱼研究三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和川续断皂苷 VI 的代谢时发现, 4 个皂苷不仅均发生了肠菌代谢的脱糖基反应, 而且发生了 I 相代谢羟基化反应, 其羟基化产物分别为羟基化三七皂苷 R₁ (hydroxynotoginsenoside R₁)、羟基化人参皂苷 R_{g1} (hydroxyginsenoside R_{g1})、羟基化人参皂苷 R_{b1} (hydroxyginsenoside R_{b1}) (图 4) 和羟基化川续断皂苷 VI (hydroxyl asperosaponin VI), 4 个皂苷在斑马鱼体内的代谢与已有哺乳动物代谢

研究结论具一致性^[20-22]。

Hu 等^[24]研究表明, 黄芪中的毛蕊异黄酮经斑马鱼幼鱼曝露 24 h 后, 主要发生 II 相结合代谢, 其次为氧化代谢, 共鉴定葡萄糖醛酸化 (glucuronidation)、葡萄糖基化 (glucosylation)、硫酸化 (sulfation)、氧化 (oxidation) 及其组合的代谢产物。毛蕊异黄酮在斑马鱼幼鱼体内的 II 相结合代谢与其在哺乳动物体内的现有代谢结论一致, 为将斑马鱼作为整体药物代谢模型的可行性提供依据。

Li 等^[19]研究表明, 淫羊藿素经斑马鱼幼鱼代谢, 产生了 I 相代谢的氧化产物及 II 相代谢的葡萄糖醛酸化和硫酸化产物, 并利用转录组学及蛋白质组学的方法检测到斑马鱼与哺乳动物的代谢酶体系的极度相似性和保守性。

3 斑马鱼药物代谢模型的优势与前景分析

斑马鱼体内的代谢酶系高度保守, 与哺乳动物的代谢酶系高度相似。斑马鱼幼鱼与成鱼均较成功地模拟了哺乳动物 I 相代谢、II 相代谢、肠道菌群代谢及多途径整体代谢。该模型克服了体外代谢模型作用环节单一的缺陷, 弥补了体内代谢劳动强度大, 用样量大的不足, 突破微量成分难以进行在体代谢的瓶颈。该模型适用于中药单体、组合物的在体代谢研究, 利于代谢产物的简单、高效富集, 具简单、高效、低成本、化合物用量少 (毫克级) 的优势, 有望实现早期、快速预测大量微量成分在体代谢, 是一种模式的、生物的新型在体代谢模型, 有力地丰富了现有代谢研究思路与方法。同时亦为将斑马鱼高效用于化合物的整体毒性和活性筛选研究提供有力支撑。

同时,也应注意到,斑马鱼对药物的代谢途径有时与人也不尽完全相同,Chng 等^[25]选择对乙酰氨基酚(acetaminophen)和睾酮(testosterone)作为探针底物,研究斑马鱼对探针底物的代谢,结果表明,斑马鱼使对乙酰氨基酚产生了与在人体内相同的活性代谢产物 *N*-乙酰-对-苯醌亚胺;但斑马鱼对睾酮产生了 CYP3A4/5 样和 UDP 葡萄糖醛酸转移酶活性的作用,这与在人体内的代谢机制有一定差异,提示有必要深入表征斑马鱼的药物代谢表型,充分挖掘其作为药物毒性、活性筛选替代模型的潜力。

参考文献

- [1] Goldsmish P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when [J]. *Curr Opin Pharm*, 2004, 4(5): 504-512.
- [2] Sukardi H, Chng H T, Chan E C Y, et al. Zebrafish for drug toxicity screening: bridging the *in vitro* cell-based models and *in vivo* mammalian models [J]. *Expert Opin Drug Met*, 2011, 7(5): 579-589.
- [3] Kitambi S S, Nilsson E S, Sekyrova P, et al. Small molecule screening platform for assessment of cardiovascular toxicity on adult zebrafish heart [J]. *BMC Physiol*, 2012, 12(1): 3-9.
- [4] 陈秋霞, 曾 苏. 斑马鱼在药物代谢中的研究进展 [J]. *药学报*, 2011, 46(9): 1026-1031.
- [5] Thompson E D, Burwinkel K E, Chava A K, et al. Activity of Phase I and Phase II enzymes of the benzopyrene transformation pathway in zebrafish following waterborne exposure to arsenite [J]. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 2010, 152(3): 371-378.
- [6] Almeida D V, Da Silva Nornberg B F, Geracitano L A, et al. Induction of phase II enzymes and hsp70 genes by copper sulfate through the electrophile-responsive element (EpRE): Insights obtained from a transgenic zebrafish model carrying an orthologous EpRE sequence of mammalian origin [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2010, 36(3): 347-353.
- [7] Bresolin T, Defreitasrebelo M, Celso Dias Bainy A. Expression of PXR, CYP3A and MDR1 genes in liver of zebrafish [J]. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 2005, 140(3/4): 403-407.
- [8] Lv A J, Yang Z H, Liu H, et al. Isolation of intestinal bacteria from zebrafish (*Danio rerio*) and their physiological and biochemical characteristics [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(24): 412-415.
- [9] 韦英杰, 宁 青, 贾晓斌, 等. 基于斑马鱼模型的中药代谢研究思路与方法 [J]. *中草药*, 2009, 40(7): 1009-1011.
- [10] Jones H S, Trollope H T, Hutchinson T H, et al. Metabolism of ibuprofen in zebrafish larvae [J]. *Xenobiotica*, 2012, 42(11): 1069-1075.
- [11] Wei Y J, Li P, Wang C M, et al. Metabolism of tanshinone II_A, cryptotanshinone and tanshinone I from *Radix Salvia Miltiorrhiza* in zebrafish [J]. *Molecules*, 2012, 17(7): 8617-8632.
- [12] 韦英杰, 贾晓斌, 詹 扬, 等. 丹参酮 II_A、隐丹参酮和丹参酮 I 组合物在斑马鱼体内的代谢研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(9): 1149-1156.
- [13] 韦英杰, 詹 扬, 王长梅, 等. 模式生物斑马鱼用于 5-羟基黄酮代谢的合理性研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2013, 30(5): 461-465.
- [14] 韦英杰, 王长梅, 詹 扬, 等. 模式生物斑马鱼对 7-羟基黄酮代谢的合理性研究 [J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(9): 1078-1082.
- [15] 韦英杰, 贾晓斌, 詹 扬, 等. 白杨素在模式生物斑马鱼中的代谢研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(7): 565-568.
- [16] 韦英杰, 姜金生, 谭晓斌, 等. HPLC-ESI/MS 分析 5-羟基黄酮在大鼠体内的代谢产物 [J]. *中国现代应用药学*, 2012, 29(1): 60-63.
- [17] 韦英杰, 姜金生, 谭晓斌, 等. 高效液相电喷雾质谱分析 7-羟基黄酮在大鼠体内的代谢产物 [J]. *中国医院药理学杂志*, 2012, 32(4): 241-243.
- [18] Wei Y J, Li P, Fan H W, et al. Metabolite profiling of four major flavonoids of *Herba Epimedium* in zebrafish [J]. *Molecules*, 2012, 17(1): 420-432.
- [19] Li Z H, Alex D, Siu S O, et al. Combined *in vivo* imaging and omics approaches reveal metabolism of icaritin and its glycosides in zebrafish larvae [J]. *Mol Biosyst*, 2011, 7(7): 2128-2138.
- [20] Wei Y J, Li P, Fan H W, et al. Metabolism study of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ of *Radix Panax notoginseng* in zebrafish [J]. *Molecules*, 2011, 16(8): 6621-6633.
- [21] 韦英杰, 薛小露, 刘 炜, 等. 模式生物斑马鱼对川续断皂苷 VI 的代谢研究 [J]. *药学报*, 2013, 48(2): 281-285.
- [22] 韦英杰, 刘 炜, 彭蕴茹, 等. 高效液相色谱-电喷雾质谱分析川续断皂苷 VI 在大鼠体内的代谢产物 [J]. *药物分析*, 2013, 33(7): 1132-1136.
- [23] 詹 扬, 韦英杰, 孙 娥, 等. 基于斑马鱼模型的朝鲜淫羊藿抗骨质疏松活性部位筛选 [J]. *中草药*, 2014, 45(14): 2036-2041.
- [24] Hu G, Siu S O, Li S, et al. Metabolism of calycosin, an isoflavone from *Astragalus Radix*, in zebrafish larvae [J]. *Xenobiotica*, 2012, 42(3): 294-303.
- [25] Chng H T, Ho H K, Yap C W, et al. An investigation of the bioactivation potential and metabolism profile of zebrafish versus human [J]. *J Biomol Screen*, 2012, 17(7): 974-986.