

· 综 述 ·

斑马鱼在中药研究中的应用进展

赵崇军, 田敬欢, 王金凤, 马志强, 曹丹, 夏青, 李丹, 张文婷, 姜岩, 林瑞超*
北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 斑马鱼作为一种模式动物, 已经被广泛应用于遗传学和发育生物学研究。近些年, 斑马鱼的研究已经拓展和延伸到中药领域。作为一种整体动物模型, 斑马鱼能够全面地检测、评估中药的活性和毒性, 进而实现高通量筛选。概括介绍了斑马鱼模型的特点及其在中药毒性、活性物质筛选和中药代谢方面的研究进展。

关键词: 斑马鱼; 中药; 活性物质筛选; 毒性; 代谢

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)17-2635-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.17.022

Application advances on zebra-fish model in study on Chinese materia medica

ZHAO Chong-jun, TIAN Jing-huan, WANG Jin-feng, MA Zhi-qiang, CAO Dan, XIA Qing, LI Dan, ZHANG Wen-ting, JIANG Yan, LIN Rui-chao

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Zebra fish, as a model organism, has been widely used in genetics and developmental biology. In recent years, researches on the zebra fish have expanded and extended the field of Chinese materia medica (CMM) since it is a useful model of choice for *in vivo* pharmacology dynamic screening. Through zebra fish, we are able to fully detect and identify the substances of activity and/or toxicity of CMM with the advantage of real-time dynamic monitoring, thus achieving high-throughput screening. In this article, we outline the features of the zebra fish model and summarize its progress in screening toxicity and active substances of CMM as well as metabolic study *in vivo*.

Key words: zebra fish; Chinese materia medica; active ingredient screening; toxicity; metabolism

斑马鱼最早是生活在印度和南亚的一种热带鱼, 作为一种器官、系统发育完善的良好实验模式鱼, 从20世纪80年代到90年代, 斑马鱼已经成为了一个用来研究基因和发育的脊椎动物模型。近年来, 斑马鱼在国内外已成为一种热门的药学研究工具, 被用来建立各种疾病模型进行药物活性、毒性的高通量筛选以及药物代谢等方面的研究^[1-2], 该方法既具有细胞等体外实验用药量少、实验费用低、周期短、高通量等特点, 又具备整体动物实验可观察多个器官、可评价药效学及药动学、可评价代谢物活性等优势。本文对斑马鱼在中药毒性、活性物质筛选以及药物的代谢中的应用进展进行综述。

1 斑马鱼在中药毒性方面的研究

有效性和毒性是中药的两大基本属性。随着临床中药不良反应的日益增加, 中药的安全性问题愈来愈受到重视, 因此中药在进入临床前必须进行安全性评价。急性毒性实验是中药安全性评价的重要指标之一, 处于药物毒理研究的早期阶段, 对阐明药物的毒性作用和了解其毒性靶器官具有重要意义。长期毒性实验所获得的信息对药物I期临床试验起始剂量的选择具有重要参考价值, 并能提供一些与人类药物过量急性中毒相关的信息。啮齿类动物是目前进行中药临床前安全性评价研究的主要体内模型, 其结果对临床研究具有较高的参考价值。但该模型用药量大, 所用动物数量多, 研究周期长,

收稿日期: 2015-01-31

作者简介: 赵崇军 (1988—), 硕士研究生, 从事中药毒性研究。E-mail: 1014256537@qq.com

*通信作者 林瑞超 E-mail: linrcha307@sina.com.cn

同时这种模型需要进行解剖才能观察靶器官。在体外细胞模型评价中,细胞培养对环境要求高,离体模型评价不准确,筛选药物毒性和急性毒性需要较大数量、高纯度的化合物,这对实现高通量化合物筛选和药物开发具有一定的局限性,因此这种模型主要应用于药物研发的后期阶段。近年来,随着动物实验 3R 原则(replacement, reduction, refinement)的提出,各国特别是欧盟对实验动物的使用进行了管制,更加限制了使用传统动物模型进行药物大规模筛选的发展。此外,中药成分的复杂性、中药配伍的变化性、中医的辨证论治等特征以及不同制剂工艺或剂型对疗效的影响,都在一定程度上造成了中药毒性研究的困难:大多数有毒中药和常用中药的毒性成分远未弄清;有毒中药和常用中药的毒性靶器官、安全剂量范围、有效剂量与最小有毒剂量、量-毒效应范围等并不完全明确;中药毒性的化学、毒理学乃至毒代动力学等方面的研究数据明显缺乏。斑马鱼发育比较快、易于实验室饲养且发育周期短,为长期毒性研究提供大量的动物模型^[3];斑马鱼每周可以产卵 1 次,数量多且不受季节的影响,为实现高通量筛选提供条件^[4];斑马鱼体积小,可以在 96 孔板中给药,所需要的药量比哺乳动物少;斑马鱼特别是发育早期的斑马鱼,胚胎透明,在显微镜下可以清楚地观察到各个发育阶段的内部器官和结构,以及药物所致的畸形等现象,在毒理学实验中这种直接观察靶器官的方式可获得多角度实验资料,更便于评价毒理学实验的终点^[5];斑马鱼基因组和人类的具有较高的相似性(相似度高达 87%)^[6-7];人类体内具有重要功能的基因或者小分子在斑马鱼体内也能找到,特定药物和化合物在斑马鱼胚胎和幼鱼体内也发生较强的生物积累、异源物质代谢和生物转化,这些特征也是毒性评价中重要的方面^[8-9]。

关于斑马鱼毒性评价实验的检测方法,Hu 等^[10]建立了胚胎发育毒性实验、幼鱼发育毒性实验,具体包括通过斑马鱼在受试药物作用下表现出的各种特征和参数的变化,如胚胎孵化率、 IC_{50} 、发育异常、形态改变、色素消失、胚胎和幼鱼死亡率、血流速度,以及畸变率实验、幼鱼体长检测实验、幼鱼心搏检测实验和斑马鱼幼鱼组织切片实验等,来测试药物作用的靶器官及其毒性作用。

1.1 心血管毒性研究

一般条件下,药物引起的心电图 QT 间期延长,

将增加致命性尖端扭转型室性心动过速的风险,QT 间期延长主要的原因是 hERG (human ether-a-go-go related gene) 通道被阻断。斑马鱼体内有与人类 hERG 通道相类似的 zERG 通道^[11],二者在结构和药物靶点等方面都非常相似,大部分引起人 QT 间期延长的药物可导致斑马鱼心动过缓或心律失常^[12-13]。斑马鱼胚胎受精 48 h 后心脏结构已基本形成,心率也较稳定,此时斑马鱼的心脏一直都是透明的,将此时的胚胎进行分组后暴露在不同浓度的待测物或者溶剂中,通过光学显微镜可以全程直接观察、记录药物诱导心脏发育、心脏功能的变化情况以及血液流动状况^[14-15]。斑马鱼在非临床阶段药物毒性筛选中是一个体内模型和易于解释实验结果的结合体,在以细胞为主的体外模型和以啮齿类动物为主的体内模型之间起到承上启下的作用,这使斑马鱼及其胚胎模型成为心血管药物毒性评价及毒性高通量筛选等方面重要的模式生物之一^[16-17]。按照 ECVAM 替代动物验证标准,斑马鱼模型预测药物心血管药物毒性的准确性被评为“好”到“显著”,敏感性从 78%~100%,特异性从 77%~100%^[18]。

中药中提取的许多单体化合物具有明显的生物活性,可以作为药物研发过程中的先导化合物,但是它们潜在的对心脏的毒性作用限制了它们临床应用,方芳等^[19]以不同浓度的乌头碱处理受精后 48 h 且发育正常的斑马鱼胚胎,以处理后 12、24 h 胚胎心脏的形态和心率的变化为标准,发现 10 mg/L 以上质量浓度乌头碱均可导致胚胎心脏中毒,出现心膜出血、血细胞在心区堆积、心包囊水肿等现象。乌头碱处理 12 h 后斑马鱼胚胎心率随着质量浓度的升高而升高,且随后随着时间的延长心率下降。统计数据表明乌头碱作用 24 h 引起斑马鱼胚胎心脏毒性的半数效应浓度 (EC_{50}) 为 14.49 mg/L。这表明乌头碱对斑马鱼胚胎有心脏毒性作用,且与乌头碱的质量浓度呈正相关。

黄惠琳等^[20]用不同质量浓度的氯化两面针碱 (NC) 处理受精后 48 h 的斑马鱼,5 mg/L 和 3.15 mg/L 组在处理斑马鱼胚胎 12 h 后,胚胎心脏区域有出血、心跳微弱、血液循环受阻等症状,药物处理 24 h 时,心率值继续下降,胚胎心脏中毒症状加剧,甚至出现血液循环停止的现象;低质量浓度处理组 (2.00、1.58、1.12 mg/L) 处理胚胎 12 h 以后,均观察到心脏轮廓肿大,心率明显低于对照组 ($P < 0.01$);同一质量浓度下,药物作用时间

越长,心脏毒性越大;各给药组在受精后 60 和 72 h 时均出现胚胎心脏中毒现象;并推测其机制可能在于 NC 对斑马鱼机体中的超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)的量产生不同的影响^[21]。在此基础上,蒙怡等^[22]选用受精后 4 h 发育正常的胚胎为模型,测定不同发育时间点 NC 对斑马鱼胚胎发育的畸形率、死亡率、半数致死量(LD₅₀)和半数有效量(ED₅₀)。结果表明 NC 与斑马鱼胚胎发育毒性存在明显的剂量-效应关系;NC 作用时间与斑马鱼胚胎发育毒性亦存在明显的相关效应。

Huang 等^[23]用马兜铃酸处理斑马鱼胚胎 6 h,在受精后 24 h 心脏都能正常发育且开始收缩,但是在此之后,心脏出现畸形,心率降低,随后心脏收缩逐渐消失,最终死亡。这就暗示马兜铃酸主要影响心脏生理而不是心脏结构。解剖分析发现马兜铃酸能够引起心脏肥大,心肌细胞混乱,心内膜缺失。在透射显微镜下发现马兜铃酸能够引起心脏纤维损坏与混乱,还能够诱导促炎性基因环氧化酶(Cox-2)、白细胞介素-1b(IL-1b)和一些其他基因的表达。朱淑珍等^[24]在对比研究马兜铃酸毒性的基础上,研究了不同质量浓度马兜铃水提液对胚胎的致畸性和心脏毒性的影响,当水提液中马兜铃酸的量为 0.5 μg/mL 时,胚胎在 24~48 h 心率明显减慢;马兜铃酸量为 5 μg/mL 时,胚胎在 24~48 h 全部死亡;水提液的 LC₅₀ 为 1.43 μg/mL。说明马兜铃水提液对斑马鱼胚胎有着更强的致畸性和心脏毒性,且毒性作用具有时间和浓度依赖性。

王思锋等^[25-26]以 48 h 的斑马鱼胚胎为模型,研究雷公藤红素的心脏毒性,发现 1 μmol/L 浓度雷公藤红素处理胚胎 24 h 未出现心瓣膜出血、血液循环异常等中毒症状,但是斑马鱼胚胎的孵出率明显降低,到 48 h 时胚胎内没有血液流动,其 EC₅₀ 为 0.94 μmol/L;1.5 μmol/L 处理组在胚胎受精后 72 h,虽然能够孵化出来,但是却出现心包腔严重水肿;2、3、4 μmol/L 浓度组可导致斑马鱼胚胎心脏中毒,出现心脏线性化、心膜出血、血细胞在心区堆积等现象;雷公藤红素对斑马鱼胚胎的致死率呈现剂量依赖性,对受精 1 h 胚胎的 LD₅₀ 为 1.40 μmol/L,同时雷公藤红素引起斑马鱼胚胎心率下降的 EC₅₀ 为 1.78 μmol/L。

此外,Lu 等^[27]发现苦参碱和槐角碱对受精 96、120 h 斑马鱼胚胎均有致畸性和致死性,苦参碱和槐角碱的 EC₅₀ 和 LC₅₀ 值分别为 145、87.1, 240、166

mg/L。较低的质量浓度处理不能引起斑马鱼胚胎的畸形和死亡,但是能够改变其自主运动,限制其游泳表现。He 等^[28]发现 0.25 μg/mL 以上质量浓度的大黄素能够降低斑马鱼胚胎的存活率和孵化率,大黄素能够诱导大量的斑马鱼胚胎发生畸形,比如水肿、躯干弯曲和形态异常;反转录链式聚合酶反应(PCR)结果表明药物代谢基因(CYP3A)和多重抗性基因(MDR1)参与了影响过程。陈怡君等^[29]发现不同浓度麝香酮处理受精 3 h 的斑马鱼胚胎 48 h 后出现脊柱弯曲、心包水肿、卵黄囊水肿,游泳异常、心率降低等毒性症状,这可能与麝香酮抑制胚胎 *sepn1* 基因的表达有关。

朱淑珍等^[30]用大黄不同炮制品(酒大黄、生大黄、熟大黄)的不同质量浓度提取液处理斑马鱼胚胎,发现大黄对斑马鱼胚胎的致死作用具有浓度和时间的双重依赖性,大黄不同炮制品的胚胎死亡情况表现出一定差异:酒大黄及生大黄药液质量浓度达到 25 μg/mL 时,斑马鱼胚胎即开始出现死亡,而熟大黄组的胚胎在质量浓度达到 40 μg/mL 时才开始出现死亡;在 84 h 之前,大黄及其酒制品的高质量浓度组对胚胎的毒性作用共同表现为心包水肿、腹部水肿,血循环缺失、减缓心率;此外,酒大黄组还可引起胚胎腹部延伸处短小或缺失,尾部短小或缺失。因此,酒大黄对斑马鱼胚胎发育的毒性最强,生大黄次之,熟大黄的影响最弱。Tristani-Fironzi 等^[31]和董永新等^[32]用不同质量浓度的桔梗总苷对不同发育阶段的斑马鱼胚胎进行处理,发现桔梗总苷对斑马鱼的心率及胚胎发育具有不良的影响,心脏功能相关的离子通道基因 *kcnj* 表达水平略有降低,但不能使斑马鱼心率减缓;而高质量浓度(10 mg/L)的桔梗总苷可导致斑马鱼胚胎死亡与畸形比例显著增加,斑马鱼胚胎发育过程受到抑制,提示有潜在的致心律失常风险。张孝敏等^[33-34]将飞机草 95%乙醇提取物冻干粉加入到斑马鱼培养液中,结果发现斑马鱼心肌细胞发生溶解、萎缩,严重时坏死,脑组织局灶性炎性细胞浸润、血栓形成和各细胞层结构变化,并且斑马鱼心、脑的病理组织学改变随着提取物冻干粉量的增大呈现依赖性。

1.2 肾脏毒性研究

斑马鱼尤其是幼鱼肾脏的解剖结构相对简单,在细胞组成及分子水平上与哺乳动物的肾脏相似且已具备同样复杂的生物功能^[35]。许多引起斑马鱼胚胎肾损伤的肾毒性化合物在人体内能够显现

出相同的效果,在斑马鱼实验中得到的结果也可应用于人类及其他模型^[36]。同时作为整体动物模型,选用斑马鱼胚胎有利于研究毒性损伤时肾组织内肾小管、血管与免疫细胞间的联系及相互作用规律^[37]。Ding 等^[38]将斑马鱼胚胎浸入马兜铃酸溶液中来研究马兜铃酸对斑马鱼胚胎诱导的肾脏毒性,发现马兜铃酸能够诱导斑马鱼畸形肾脏表型,比如弯曲。当马兜铃酸暴露剂量逐渐增加时,畸形肾脏斑马鱼胚胎的比例也逐渐增加。此外,马兜铃酸处理能够显著降低肾小球的过滤速率,提示马兜铃酸不仅能够引起肾脏形态学的改变,还能够引起肾衰竭。使用 *cmlc2* 和 *wt1b* 进行原位混合实验表明,斑马鱼肾脏比心脏对马兜铃酸更敏感。实时 PCR 表明马兜铃酸能够上调促炎基因肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、Cox-2 和有髓过氧化物酶 (*mpo*) 基因的表达,说明马兜铃酸诱导的肾脏衰竭是通过炎症反应介导的。

1.3 脾脏毒性研究

飞机草(香泽兰)不仅对心脑血管组织具有毒性,对脾脏也显示出一定毒性。郑美娜等^[39]用不同浓度香泽兰总黄酮冻干粉对斑马鱼进行水触媒染毒,21 d 后取脾脏,制作石蜡切片,苏木精-伊红染色,显微观察发现随着香泽兰总黄酮水触媒染毒浓度的增加,斑马鱼脾脏显微组织结构含铁血黄素沉着增多,脾窦扩张,脾脏内淋巴细胞增多,血细胞核浓缩、溶解,甚至导致脾脏坏死。说明一定浓度的香泽兰总黄酮对斑马鱼脾脏具有一定的毒性作用,也说明斑马鱼可以用来作为脾脏毒性研究的模型。

1.4 神经毒性研究

斑马鱼作为一种与人类基因同源性较高的新型模式动物,其神经系统简单但能够支配复杂的活动,这样就避免了复杂神经系统对行为的综合调控,有利于发现行为调控的基本神经环路,也利于在细胞分子水平上研究抽象心理过程如何调控具体行为表现,进行运动、学习、记忆等相关评价^[40];此外,斑马鱼作为神经毒性模型在实验中产生的应激少,实验结果比较客观,因此,斑马鱼作为模式动物已广泛应用于神经发育、神经损伤和神经行为学等神经科学研究。

胡占英等^[41]采用表型观察、触及逃避、幼鱼的自主运动、强光刺激惊恐反射能力等实验以及 RT-PCR、整体免疫荧光等手段来研究长春新碱对斑马鱼神经发育和行为的影响,发现长春新碱具有幼

体神经毒性,能引起幼鱼呈浓度依赖性的侧卧体位,降低常规转弯能力,干扰运动轨迹,降低平均运动速度,增加不活跃运动的持续时间;在高剂量(30、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组中,幼鱼被刺激后应激反应能力和学习记忆能力下降,且呈浓度依赖性,提出可能与长春新碱具有多巴胺能神经元毒性,导致下丘脑多巴胺能神经元细胞丢失有关。

1.5 急性毒性研究

急性毒性实验一般采用“半静态法”,即选择发育 7 d 以上的斑马鱼作为研究对象,在保证鱼缸内水温、pH 值以及溶氧量的前提下加入不同浓度的待测药物或溶剂,于不同时间点观察鱼群的中毒症状(如毒性初期的侧翻、沉底、窜动等症状以及后期的反应迟钝、泳动减少直至丧失运动能力)和死亡情况,计算出各时间点的 LD_{50} 值。

舒斌等^[42]将雷公藤甲素、苦参碱和大黄素 3 种药物加到斑马鱼生活的水中,通过观察给药后 24 h 的死亡情况来判断待测药物的急性毒性及毒性的大小,结果表明这 3 种化合物对斑马鱼的毒性从高到低依次为雷公藤甲素、苦参碱、大黄素,用 Bliss 法计算得出雷公藤甲素、苦参碱和大黄素对斑马鱼的 LD_{50} 值依次为 5.02×10^{-3} 、 113.2×10^{-3} 和 $1.18 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$,并认为该结果与这 3 种成分小鼠口服 LD_{50} 毒性大小测定结果基本一致。姜玮等^[43]将甘遂水提物、醇提物、先醇提后水提物按照一定的浓度梯度处理斑马鱼,以给药后 96 h 鱼的死亡情况评价甘遂不同提取物对斑马鱼的急性毒性;结果表明斑马鱼对甘遂不同提取物均表现出急性毒性反应,并呈现出明显的量-毒关系;水提物毒性最弱, LD_{50} 为 31.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$;甘遂醇提物毒性次之, LD_{50} 为 6.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$;甘遂先醇提后水提物急性毒性最强, LD_{50} 为 4.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在此基础上,曹雨诞等^[44]采用同样的处理方法来评价甘遂不同炮制品及其提取物的急性毒性,发现斑马鱼对甘遂不同炮制品的水提液和醇提液均表现出急性毒性反应,且毒性作用呈现明显的量-毒关系;不同炮制品水提液 LD_{50} 明显高于相应醇提液;同一提取方法不同炮制品的急性毒性大小顺序为甘遂生品 > 清炒品 > 醋润品 > 醋炙品,为进一步认识与评价甘遂毒性及醋炙减毒机制提供了依据。王薇等^[45]采用发育正常的斑马鱼胚胎为模型,用麻黄汤等 3 个中医经典方剂超微饮片与传统饮片不同浓度的水煎液培养 72 h 后,倒置显微镜下观察其对斑马鱼胚胎的存活、发育、致畸情况,以

及LD₅₀,发现相同药物和相同浓度时,超微中药饮片毒性大于传统中药饮片。

尽管如此,在斑马鱼毒性实验中依旧存在着假阳性和假阴性结果,说明还存在着很大的缺陷。例如斑马鱼胚胎卵膜对药物吸收产生的生理屏障作用还没有明确的解决方案;药物在胚胎培养间质中的溶解性、受试药物受到胚胎耐受性的限制后浓度设置范围存在着不确定性;生理上,斑马鱼胚胎发育迅速,缩短了实验的周期,同时也缩短了观察的时间窗。很多药物都是在体内经过代谢活化而产生毒性,由于药物在斑马鱼体内的代谢与人类存在着一定的差异,在评价过程中,很难确定是原药产生的毒性作用还是代谢产物产生的毒性,也很难判断在人体中是否会产生同样的代谢产物,因此不能完整地显示药物相互作用的结果^[46]。更为重要的是,虽然现在研究表明化合物对斑马鱼的急性毒性实验结果和啮齿类动物具有很大的相似性^[47-48],但是中药对斑马鱼和啮齿类动物急性毒性相关性数据还相对缺乏。许多降低斑马鱼心率的化合物不能诱导人类QT间期的延长,这就说明hERG通道的阻断不是唯一能够引起心率过缓的机制,化合物诱导的发育缺陷也可能影响心率^[49]。此外,与哺乳动物相比,斑马鱼对药物吸收的方式存在很大差异,在一定程度上需要去验证在不同的动物模型中其是否会造成毒性的差异,比如在哺乳动物模型中,马兜铃酸仅仅引起其肾脏毒性,在斑马鱼模型中却能引起心脏毒性和肾脏毒性,因此在未来的研究中需要建立一套科学、客观、合理的转基因斑马鱼药理学数学模型,将传统仪器与现代微量测定技术结合起来,以促进斑马鱼对中药的毒性筛选进程,开展中药毒效物质基础研究、安全性系统评价,积累中药量-毒、毒-效、毒性靶器官、毒性等基本数据,加快建立由药物诱导的斑马鱼器官毒性和有毒表型综合数据库、斑马鱼表型和同源临床前特征之间的相关性,进而加快中药的研发过程,为中药的临床安全、合理用药提供参考和指导。

2 斑马鱼用于中药药效物质筛选方面的研究

药物筛选是药物开发中的首要步骤,本质上就是对化合物进行药理活性、安全性评价的过程,需要对不同化合物的药理活性、毒性等多方面进行横向比较,因此,药物筛选的实验方案需具有标准化和定量化的特点。选择合适的高通量药物筛选模型在现代药物筛选流程中逐渐成为发现先导化合物的

主要瓶颈和热点之一^[50]。对于中药或复方来说,中药是一个多成分的复杂体系,其显著的药效很可能是由于中药复杂的活性成分在体内多靶点作用而产生的。中药成分及代谢产物(尤其是微量成分)的富集、分离、分析、在体活性评价的影响因素众多,因此限制了中药药效物质筛选,特别是有效部位、提取物、水煎剂等均为大量化学成分构成的复杂成分体系。对于中药中的微量成分,即使它们具有明显的结构多样性和生物活性,也很难通过目前的模型进行准确地筛选,更别说在后续的筛选中对其结构进行结构修饰。

斑马鱼作为一种新的模式生物,既具有与哺乳动物类似的生理、生化特征,又具有高效、快捷、大规模的特点。具体来说,在生理上,筛选周期较短,一般24~30h即可得到研究结果;斑马鱼胚胎透明,适宜在活体状态下观察药物的作用情况;斑马鱼可以浸泡方式给药,使其可适用于中药复杂成分体系(单体成分、有效部位、多种提取物、水煎剂等)的活性筛选,且每次测定只需将少量的药物直接溶于培养介质中,使其检验中药的活性变得非常方便;斑马鱼具有独特的生物学、基因组学、遗传学优势及其高度保守的疾病信号转导通路;通过转基因、诱导敲除、反义吗啉代寡核糖核酸及活体成像等技术可以获得各种与人类疾病具有相似临床症状的突变模型,这样就为药物筛选和研究人类疾病提供了有用的工具^[51-52]。

斑马鱼在中药活性物质筛选研究中的应用则主要集中在调节血管新生、神经保护及行为学研究等方面。

2.1 心血管系统药物筛选

新血管生成是从已有的内皮细胞中通过神经发芽来形成新的血管,是各种生物过程中一个重要的组成部分,在许多生理和病理过程,包括胚胎血管发展、分化、伤口愈合和器官再生中都发挥着重要的作用。斑马鱼胚胎是透明的,当能够用荧光标记技术来实时监测药物在斑马鱼体内的响应时,斑马鱼早期胚胎更适合进行心血管系统药物筛选,更容易进行定量评价^[53-54]。另外,在缺少血液流通的时候,斑马鱼胚胎能够在前几天通过被动扩散吸收足够多的氧气来进行发育,在这种情况下,即使在对血管生成进行干扰的过程中,也能进行血管系统的研究^[55]。Langheinrich等^[56]发现斑马鱼血管系统及其对调节血管新生类药物的治疗反应与哺乳动物类似,且便于观察药物对斑马鱼模型新生血管的影响,

值得一提的是转基因心血管模型的建立使其更加适合对不同层次的中药形式,即中药单体成分(靛玉红)、单味中药(虎杖)、复方(西黄丸)的样品进行筛选,进一步推动斑马鱼胚胎成为心血管药物筛选的有力平台^[57]。

郑浩江等^[58]和 Alex 等^[59]在荧光显微镜下观察靛玉红(Ind)对 48 h 斑马鱼体节间血管生成的影响情况并进行定量分析,运用整体原位杂交的方法和 RT-PCR 技术检测 *flk1* 基因的表达情况;与空白对照组相比,靛玉红各浓度组体节间血管(ISV)长度有显著性差异($P < 0.01$);对斑马鱼胚胎 *flk1* mRNA 表达有明显抑制作用,并呈剂量依赖性,其机制可能是通过阻断血管内皮生长因子(VEGF)/血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)信号通路的某个环节来发挥作用。在此基础上,靛玉红作为先导化合物,不少学者对天然产物中的靛玉红衍生物进行筛选,韩利文等^[60]分别用 Ind 及其衍生物靛玉红-3-单脲(IMO)、6-溴-靛玉红-3-单脲(BIO)处理斑马鱼胚胎,考察它们的抑制血管生成活性及其量效关系。结果表明在相同的剂量下,Ind、IMO 与 BIO 抑制斑马鱼 ISV 生成的作用依次增强,都显示明显的量效关系;在靛玉红母体结构改造中,随着 C-3'位脲化以及 C-6 位溴原子的引入,其抑制血管生成活性也逐渐增强。此外,indirubin-30-(2,3-dihydroxypropyl)-oximether(E804)在 0.04 ~ 10 mmol/L 浓度条件下也能够剂量依赖性地抑制斑马鱼肠下静脉的形成^[61]。

金秋等^[62-63]以氯化两面针碱为受试药物,设计不同的给药组和不同的药物浓度,运用形态学观察、心率统计、NBT/BCIP 血管染色法等技术,研究其对斑马鱼心脏发育形态、血管生成以及心率的影响,结果发现各给药组给药时间越早胚胎心脏发育对药物敏感性越强,随着药物浓度的增加,呈剂量和时间依赖性抑制胚胎 ISV、肠下静脉血管生成和心率,这种抑制作用可能与影响 VEGF 及其受体基因的表达有关。

除此之外,杨彬睿等^[64]发现不同浓度(3、10、30 $\mu\text{mol/L}$)甜橙黄酮能够下调血管新生相关基因 *hras*、*kdrl* 和 *vegfaa* 的表达,进而剂量依赖性地抑制斑马鱼 ISV 的形成。朱亚杰等^[65]通过荧光显微镜发现不同浓度红景天苷能有效抑制 TG(VEGFR2/GFP)系斑马鱼背部 ISV 生成数目且不显示明显细胞毒性。田丽莉等^[66]发现莪术醇可能是通过 VEGF

通路使斑马鱼胚胎体 ISV 侧生出新的血管,使成鱼、仔鱼剪尾后血管再生加快。Lin 等^[67]发现槲皮素-4'-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷通过抑制 VEGF 诱导的 VEGFR2 的磷酸化作用,抑制体外脐静脉内皮细胞和斑马鱼体内血管生成。研究报道斑马鱼胚胎模型还被用于温郁金挥发油中的莪术呋喃二烯^[68]、七叶一枝花中重楼皂苷 D^[69]、羟基茜草素^[70]、黄芪中黄芪甲苷^[71]等单体化合物在心血管方面活性的筛选研究,发现前两者有明显的血管生成抑制作用,黄芪甲苷能够促进血管形成。

在对药效物质进行活性筛选的基础上,研究者还用斑马鱼模型对结构相似的自然产物单体的生物活性进行比较,赵洋等^[72]在荧光显微镜下观察发现蛇藤素与扁蒴藤素对斑马鱼新生血管的抑制作用相近,抑制新生血管形成,促进血管芽生长,而且这种抑制作用与给药浓度呈正相关。He 等^[73]将斑马鱼应用于雷公藤甲素、雷公藤红素和 cangoronine 抑制血管生成作用的研究,结果表明雷公藤甲素活性最强,浓度在 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著下调胚胎 Ang-2/Tie2 mRNA 表达,从而抑制斑马鱼血管生成。Yang 等^[74]从藤黄属植物分离出 11 个吡酮类化合物,并且通过 MS、NMR 和 UV 鉴定出它们的结构。在斑马鱼体内模型中,以死亡率和心率为指标,发现藤黄酸、藤黄精宁和 isogambogenic acid 比氧杂蒽酮具有更强的抗血管生成活性,且毒性较小。氧杂蒽酮在 8 ~ 16 $\mu\text{mol/L}$ 时表现出抗血管生成活性,且没有毒性。Lam 等^[75]使用体外人脐静脉内皮细胞和体内斑马鱼模型筛选柑橘中 7 个多甲基黄酮化合物(橙皮素、橙皮苷、新橙皮苷、川橙皮素、野黄芩素、橙黄酮和黄芩配四甲基乙醚)的抗血管生成活性,除了柚皮苷和新橙皮苷,均具有不同程度的抗血管生成活性潜力;橙黄酮能够诱导 HUVEC 的细胞周期停滞在 G_0/G_1 期,下调血管生成基因的表达进而表现最强抗血管生成活性,且毒性最小;体内构效关系分析表明 C-3 位具有甲醇钠基团的黄酮具有较强的抗血管生成活性;C-8 位甲基钠基团缺失的黄酮类除能增强抗血管生成活性外还具有较低的致死毒性。

Zhou 等^[76]通过 MTT 实验、损伤修复实验和血管生成实验发现红花提取物(先水提再醇提)能够增加斑马鱼体内肠下静脉的出芽数量,实时定量 PCR 发现红花提取物能够上调斑马鱼血管生成相关基因的表达,包括血管生成相关的生成因子和受

体、转录因子、基质降解和内皮细胞迁移相关因子、细胞黏附分子、小管形成因子及血管成熟和形成因子。实时 PCR 发现三七皂苷提取物能够以多途径促进血管生成,其中包括 VEGF-KDR/Flk-1 和 PI3K-Akt-eNOS 信号通道^[77]。不同浓度的三七根总皂苷 (*Panax notoginseng* saponin, PNS) 和三七花总皂苷 (Sanqi F) 干预处理正常健康转基因斑马鱼和由内皮细胞生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (VRI) 诱导血管损伤形成的转基因斑马鱼 2 种模型,发现 Sanqi F 比 PNS 有更强地促进正常斑马鱼血管新生的效果, ISV 区域有明显的出芽现象,并呈浓度依赖性;在 VRI 损伤模型中, Sanqi F 能够对血管损伤进行有效的保护和恢复。

Yu 等^[78]先通过斑马鱼模型中内源性碱性磷酸酶的定量检测来评价 95% 的淫羊藿乙醇提取物及正己烷、醋酸乙酯、正丁醇和水提取部分的活性,然后通过转基因 Tg (*flil1a*:EGFP) y1 斑马鱼胚胎和人脐静脉内皮细胞对活性部分进行进一步检测,最后通过野生型斑马鱼胚胎和人脐静脉内皮细胞进一步研究淫羊藿的活性机制,结果 10 mg/mL 醋酸乙酯提取部分能够抑制 48 和 72 h 斑马鱼胚胎的 ISV 形成,处理 48 h 能够完全抑制肠下静脉血管的形成,机制研究表明在斑马鱼胚胎中通过多个分子靶标 (*vegfa*、*angpt2*、*tie2*) 来发挥作用。

Liu 等^[79]通过斑马鱼模型来研究地黄水粗提物促血管生成的活性及其活性成分,在转基因斑马鱼胚胎中,地黄水粗提物 (250 $\mu\text{g/mL}$) 具有明显的促血管生成的活性,能促进毛细芽的形成。二氯甲烷、醋酸乙酯和正丁醇依次对地黄水粗提物进行萃取,发现二氯甲烷部分处理组在 ISV 区域毛细芽的数量最多;在柱色谱和 NMR 和质谱分析中,发现具有明显的促血管生成活性的成分是咖啡酸;在斑马鱼模型中合成的咖啡酸质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时表现出显著的促血管生成活性。

Crawford 等^[80]将斑马鱼模型与高性能薄层色谱、高分辨率电喷雾电离质谱结合起来对植物粗提物进行筛选,从中获得可抑制血管生成的化合物大黄素和 1 个松香烷二萜类化合物鞣蕊酮 A 内酯。大黄素被证明在体内外均可抑制血管生成,而鞣蕊酮 A 内酯可影响相关内皮细胞增殖和血管形成。

在复方的筛选中, Tse 等^[81]将处方 NF3 (黄芪和地黄比例为 2:1) 不同浓度提取液处理斑马鱼胚胎,直到 72 h,进而研究 NF3 对血管生成的影响。

斑马鱼胚胎中有额外的节间血管生成,转基因斑马鱼流式细胞术发现 NF3 能够诱导内皮细胞中处于 S 期和 G₂/M 的细胞数量比率增加;实时 PCR 检测技术发现 NF3 暴露能显著诱导 VEGF-A、Flk-1、*fgf1* 和 *bRaf* 基因在斑马鱼胚胎中的表达。李惠玲^[82]以重组碱性成纤维细胞生长因子为阳性对照,以生理盐水为阴性对照,来评估麝香保心丸对斑马鱼血管生成的促进作用,发现麝香保心丸 50 g/L 组整体血管长度和血管面积与阳性对照组相比有明显的差异 ($P < 0.01$),并且呈现剂量依赖性。王思锋等^[83]研究了西黄丸对转基因斑马鱼胚胎血管生成的影响,结果西黄丸 25、50、100 mg/L 甲醇浸提液组能显著抑制斑马鱼胚胎体 ISV 生长。陈锡强等^[84]在西黄丸拆方药味研究中通过与对照组比较,发现人工牛黄、乳香提取物是西黄丸中具有抑制血管生成作用的主要药味,可显著抑制斑马鱼 ISV 生成的作用。这也为未来复方的临床使用筛选提供了一种模式。

尽管斑马鱼模型在血管研究方面有很大的优势,但是研究发现一些在其他模型上证实有抗血管生成作用的中药活性成分在斑马鱼模型中无明显抑制斑马鱼胚胎血管生成效果。

2.2 抗炎药物筛选

目前,哺乳动物是最常用的内源性毒性模型。然而,不同的动物种类对脂多糖的敏感性不同;同种动物在不同实验条件下对脂多糖的响应、致死量也不同^[85]。斑马鱼作为理想的抗内毒素炎症药物筛选模型主要在于其拥有大量的转基因系,与疾病相关的信号高度保守;此外,在形态学和遗传学方面斑马鱼也具有独特的优势。杨丽玲^[86]选择发育 3 d 斑马鱼,采用 0.5 mg/mL LPS 卵黄显微注射染毒方式建立炎症模型,以实时活体诱导的白细胞的迁移聚集情况、斑马鱼死亡率、生存时间为指标来筛选凉膈散方中主要活性成分,结果发现连翘苷、连翘酯苷、大黄素、黄芩苷均能显著提高致命性感染后斑马鱼的存活率,延长生存时间,减少白细胞募集,减轻卵黄坏死,抑制刺激所致的中性粒细胞大量产生和炎性迁移。Yang 等^[87]也通过注射脂多糖来建立了斑马鱼急性炎症模型,以地塞米松作为阳性对照来评价绿原酸的抗炎活性。在炎症反应中,巨噬细胞和中性粒细胞被吸收进脂多糖注射位点。在 48 h 内,死亡数逐渐增加,并呈现剂量依赖性;脂多糖注射斑马鱼胚胎内, IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达水平上调;绿原酸与糖皮质激素地塞米松表现出相

似的效果, 都能抑制巨噬细胞和中性粒细胞向脂多糖注射位点的吸收, 提高存活率。Wang 等^[88]在通过柱色谱和半自动 HPLC 对龙胆乙醇、醋酸乙酯和正丁醇提取物中化学成分研究的基础上, 以巨噬细胞中 LPS 诱导的 NO 产生量和斑马鱼模型中 COX-2/1 产生量为指标来评价从不同秦艽品种中得到的 30 个化合物的抗炎活性, 结果发现 21 个化合物能对 COX-2/1 具有较强的抑制作用, 浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制率达到 78%, 此外, 其具有潜在的抑制 NO 产生的作用, 但是研究还发现其对人类骨髓性白血病 HL-60 细胞有微弱的细胞毒性。

2.3 抗骨质疏松药物筛选

斑马鱼与哺乳动物骨骼生长发育的分子机制高度相似, 而且调节哺乳动物骨骼发育关键基因的同源基因在斑马鱼基因组中被发现^[89], 这就为建立斑马鱼骨质疏松模型提供了生理及遗传学依据。

詹扬等^[90]用不同浓度泼尼松龙制备斑马鱼骨质疏松模型, 采用茜素红对各组斑马鱼幼鱼骨骼染色, 并以显微检测、数码成像方法定量分析骨骼染色区域、计算斑马鱼头骨矿化面积之和及累积光密度值来评价淫羊藿总黄酮的抗骨质疏松活性、对骨骼生长的促进作用, 结果表明淫羊藿总黄酮能对抗泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松, 同时表明该模型可成功用于评价淫羊藿总黄酮抗骨质疏松活性。景莉君等^[91-92]以同样的方式来评价续断提取物及其大孔树脂分离不同部位的抗骨质疏松活性, 发现 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙使斑马鱼骨量显著丢失, 续断皂苷类和非皂苷类成分均能抑制泼尼松龙诱导的斑马鱼骨丢失, 随后研究发现川续断皂苷 V 和川续断皂苷 VI 是抑制泼尼松龙诱导斑马鱼骨量丢失的活性成分, 暗示着斑马鱼模型成功评价了微量川续断皂苷 V 和川续断皂苷 VI 的抗骨质疏松活性。

2.4 神经系统药物筛选

斑马鱼脑组织有不同部位的区分, 可利用斑马鱼进行运动、学习、记忆等行为学评价; 幼鱼发育至 5 d 便可自由游泳, 可以同时为数百条幼鱼进行运动速度、运动轨迹以及光刺激等行为学分析^[93]。最重要的是, 斑马鱼表现出的学习、睡觉、药物成瘾和神经保护表型均与人类相似^[94], 因此斑马鱼是建立神经药物高通量筛选模型良好的模式生物。

王言等^[95]将斑马鱼暴露于续断总皂苷 120 h, 采用穿梭箱法进行斑马鱼学习和认知行为实验; 采用 Bornting 法考察 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性, 在体实验

结果表明, 高剂量的续断总皂苷可能通过提高 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性来显著增强斑马鱼的认知和记忆能力。Wang 等^[96]在谷精草对斑马鱼胚胎神经系统的保护作用实验中, 发现谷精草提取物能够抑制 6-羟基多巴胺对斑马鱼胚胎运动距离的抑制作用; 不同浓度的谷精草预处理能够增加 6-羟基多巴胺诱导损伤的 P12 细胞的存活率, 而且具有剂量依赖性; 同时谷精草前处理对 6-羟基多巴胺诱导的细胞核断裂具有保护作用。Buenafe 等^[97]发现丹参丙酮粗提物能够抑制戊四氮 (PTZ) 诱导的斑马鱼胚胎癫痫发作。基于斑马鱼生物评价从粗提物中分离得到 4 个主要丹参酮, 在不同程度上都能抑制 PTZ 诱导的斑马鱼胚胎癫痫的活性。其中丹参酮 I_A 能降低 PTZ 处理组斑马鱼胚胎头部 c-fos 的表达^[98]。

2.5 抗衰老活性药物筛选

现在已有研究者利用斑马鱼来研究衰老以及老年病的预防。夏广清等^[99]使用 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 及吖啶橙 (AO) 的荧光染色分析黄芪多糖对斑马鱼胚胎细胞衰老及凋亡的影响; 通过 RT-PCR 检测与衰老相关基因的表达, 发现当黄芪多糖质量浓度为 0.25 mg/mL 时, 可以延缓斑马鱼细胞凋亡, 增强斑马鱼端粒酶基因 (TERT) 的表达, 降低 bax、p21、p53 基因的表达, 从而起到一定的抗衰老作用。质量浓度过低 (0.125~0.25 mg/mL) 时, 斑马鱼生长发育正常, 当质量浓度过高 (0.5 mg/mL) 时, 斑马鱼生长发育受到抑制。

3 斑马鱼用于中药质量控制的研究

中药安全性和有效性是衡量中药质量评价体系的重要标准, 但中药成分复杂, 其多组分药物存在的物质基础不清, 简单的化学标准和指纹图谱不能控制临床上的有效性和安全性。针对这种情况, 已经有学者尝试应用斑马鱼模型建立中药的生物学质量控制标准。郭殿武等^[100]用高脂肪食物喂食斑马鱼, 建立高脂血症模型, 采用脂肪染色与斑马鱼尾部血管脂肪染色定量分析来评价山青之片的体内调血脂效果。结果表明斑马鱼高脂血症模型作为调血脂药物生物学内控检测方法具有较好的可重复性 (RSD 为 3.5%) 及稳定性 (RSD 为 3.6%)。

4 斑马鱼在中药体内代谢的研究

中药代谢研究已经应用于中药研究的各个方面, 包括物质基础、作用机制和质量控制等。中药代谢产物, 这里主要是说活性生物体产生的小分子, 尤其是次级代谢产物是药物发现过程中未经广泛利

用的来源,且具有多样性。从中药中提取出的许多生物活性化合物能够用来治疗人类多种疾病,并且是研究细胞生理、生物化学和药理学的有效物质^[101]。

目前中药代谢研究主要借助化学药物研究的基本理论和方法。体内实验虽能提供可比性较高的筛选评估结果,但有许多疾病还不能在动物身上复制出来;生物体内存在大量内源性物质的干扰,因此从受药动物体内分析中药活性成分、从代谢产物出发推断活性成分的物质结构将比直接分析中药成分更为困难;中药成分复杂,常规动物模型(啮齿类)体内代谢产物用量大,难以满足活性相关代谢物的分离制备要求,大量微量成分的在体代谢分析即使采用现代分析手段有时也无法进行,整个复方的效应成分更难以体现;实验周期较长、成本高等因素又限制了该方法在中药活性物质筛选领域的应用。体外代谢方面,体外实验法(肝细胞代谢、胃肠道菌群代谢)虽然较有效地模拟了中药在体内代谢的不同环节,且具有快速、高效和经济等优点,有益于富增、制备代谢产物,但体外代谢作用环节单一,脱离了完整代谢体系对中药的作用,难以体现中药作用的整体性,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;并且体外实验通常不涉及药物体内的吸收、分布、代谢与排泄,因此筛选结果与整体动物实验结果可比性差^[102]。

与传统体内与体外代谢方法相比,斑马鱼模型具有完善的器官系统、与哺乳动物相似的复杂组织、肠道菌群^[103]和相关代谢酶系尤其是 P450 酶^[104],最大限度地保留了哺乳动物代谢的系统性,克服动物实验成本高、劳动强度大等缺陷,同时大大降低化合物的用量,使大量微量成分的在体代谢研究成为可能。与体外代谢方法相比,斑马鱼能有效模拟在体的完整代谢体系,实验条件简单,克服了体外实验条件苛刻、作用环节单一的缺陷。总之,斑马鱼模型能够兼顾体内、体外代谢实验方法的优点,弥补它们在代谢方面的不足。因此,建立斑马鱼中药代谢研究模型,对丰富中药代谢的研究思路与方法具有重要意义。

目前已成功将斑马鱼用于丹参二萜醌类、淫羊藿黄酮类^[105]及三七皂苷类^[106]成分的代谢研究。还有报道将丹参酮 II_A、隐丹参酮和丹参酮 I 组合物暴露于斑马鱼 24 h 后,通过高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱(HPLC-MS)检测药液及鱼体中的代谢产

物来研究组合物在斑马鱼体内的代谢,结果表明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^[107-108]。用同样的方法还研究了 7-羟基黄酮化合物^[109]和 5-羟基黄酮化合物^[110]在斑马鱼体内的代谢情况,结果发现在斑马鱼体内或体外药液分别检测到 5-羟基黄酮原型、2 个单羟基葡萄糖醛酸结合物和 1 个单羟基硫酸结合物以及 7-羟基黄酮原型、1 个单羟基葡萄糖醛酸结合物和 1 个单羟基硫酸结合物,这与已有体内外的 II 相代谢机制一致。韦英杰等^[111]研究还发现川续断皂苷 VI 经斑马鱼作用后,产生了脱去 1 分子、2 分子、全部糖基的 5 种脱糖基代谢产物和 1 个羟基化产物,这与川续断皂苷 VI 在大鼠体内的代谢机制一致。此外,在斑马鱼体内或体外药液检测到的白杨素原型、2 个单羟基葡萄糖醛酸结合物和 1 个单羟基硫酸结合物,与白杨素已有体内、体外的 II 相代谢机制高度一致^[112]。这都表明斑马鱼对中药的代谢研究具合理性,且具有化合物用量少、成本低、简单、高效的优势,特别是能体现在体代谢的综合结果,有望成为能快速预测微量中药成分代谢、补充现有模型不足的生物代谢模型,更为斑马鱼用于复杂的中药体系代谢研究提供依据。但是斑马鱼模型能否描绘中药中所有典型化合物的代谢情况,以及能否预测代谢机制还没有弄清楚的化合物的代谢方式都需要大量的实验来进行进一步验证。

5 结语与展望

在传统动物模型或者细胞膜型上对活性和毒性物质的筛选,通常难以避免非特异性影响,从而产生假阳性或假阴性结果。

斑马鱼作为一种较好的模式生物,斑马鱼胚胎和幼鱼体积很小,可用微孔板来培养,且只需要将小分子化合物直接加入培养介质中,斑马鱼的受精卵或者鱼苗能够从培养介质中吸收亲水或亲脂的物质,故适用于中药药效和毒性成分大规模筛选,而且操作步骤也相当简单。重要的是,斑马鱼是一种活体研究体系,是对基于靶标进行药物筛选的有力补充,可以针对某一生物学事件而不指定靶标进行筛选,因此能够发现一些意外的活性化合物和药物靶标;斑马鱼模型在实验初始阶段就可以排除那些具有明显毒副作用的化合物,缩短药物研发周期,并且可保留中药的代谢动力学过程。在某种程度上,斑马鱼可以替代青蛙、果蝇和小鼠等作为研究对象来建立疾病模型,进行药物活性和毒性成分的高通

量筛选及药物代谢的研究。

目前,通过斑马鱼体内模型来进行中药毒性和活性的筛选很大部分只是对单体化合物进行筛选和验证,而单味药尤其是中药复方中的化学成分极其复杂,一个复方中可能存在几百个化合物,其广泛的生物活性可能是由于复杂成分之间的多途径、多靶标相互作用来实现的,不仅仅中药的预处理过程会影响筛选过程与结果,而且在斑马鱼实验的操作过程中偶然因素的存在也会影响实验结果的准确性,因此要建立合适的斑马鱼模型来准确评估多成分之间的相互作用、这些成分在疾病治疗中的贡献度,并将其进行定量化考量。此外,斑马鱼在毒理学研究中还仅是应用于中药的毒性研究,未见中药毒性代谢动力学方面的研究,而中药毒性代谢动力学研究可用于阐明中药毒理学及其与临床安全性的关系。斑马鱼进入中药药效和毒性物质筛选领域的时间短,积累的数据还不够多,缺乏相关的研究数据来评估该系统的适宜性和可靠性,没有完备模型系统能够与传统哺乳动物模型建立起对应关系,因此必须进行广泛的研究来评估;此外斑马鱼模型要求大量形态学观察,而这方面的自动化观察分析技术还不成熟。

尽管斑马鱼模型在中药活性物质筛选方面表现出独特的优势,但是斑马鱼与人类毕竟存在着一定的差异:斑马鱼与人的给药方式不同,这在一定程度上会影响筛选药物的药效并可能导致筛选结果的偏差^[113];其次在斑马鱼胚胎发育过程中,体内的器官和组织具有很强的再生能力,这与人类也不同,也会在一定程度上影响中药活性筛选的准确性^[114];再者,大部分情况下都是通过早期胚胎来进行活性筛选,那么考虑胚胎、仔鱼和成鱼之间生理上的不同也是必要的;此外,单体化合物活性的筛选都是基于特定靶标途径,很难体现单味药尤其是复方对某些疾病的真正治疗作用机制,因此在任何情况下,通过斑马鱼模型筛选得到的先导化合物必须在合适的啮齿类动物模型中进行验证。另外,根据一些化合物的相对分子质量和疏水性,一些小分子化合物不能被斑马鱼胚胎和仔鱼所吸收,容易造成假阳性结果。值得一提的是,一些法律机构认为在完整的法律意义上来说,未孵化的胚胎不属于真正的脊椎动物。因此,在未来通过斑马鱼进行活性物质筛选的过程中,应该进行不同层次的筛选,先通过现代分析技术对在生物活性指导下分离出的成分先进行

化学筛选,确定在斑马鱼体内具有某些潜在的生物活性的成分群,然后对具有潜在生物活性且无明显毒性的成分群进行针对性结构鉴定和活性验证,并且保证这些化合物不会引起生物体其他不良效应,最后再通过斑马鱼模型和目前公认的哺乳动物模型来确认这些化合物所具有的效应。

斑马鱼毒性和药效代谢动力学实验研究是一种能够快速、简单来研究药物毒性、活性的模式生物新方法,是一种能体现中药作用整体观的中药药效、代谢研究的新平台,更加适合于中药这种复杂化学体系的药效学和毒性筛选,为推动新药研发进程具有重要意义。

参考文献

- [1] Zon L I, Peterson R T. *In vivo* drug discovery in the zebrafish [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(1): 35-44.
- [2] Huang C C, Monte A, Cook J M, et al. Zebrafish heart failure models for the evaluation of chemical probes and drugs [J]. *ASSAY Drug Dev Technol*, 2013, 11(9/10): 561-572.
- [3] Scholz S, Fischer S, Gvndel U, et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2008, 15(5): 394-404.
- [4] Eimon P M, Rubinstein A L. The use of *in vivo* zebrafish assays in drug toxicity screening [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009, 5(4): 393-401.
- [5] 赵新东, 吴少玲, 常 灿, 等. 利用斑马鱼检测药物发育毒性方法的初步建立 [J]. 青岛大学医学院学报, 2014, 50(1): 52-54.
- [6] Barbazuk W B, Korf I, Kadavi C, et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes [J]. *Genome Res*, 2000, 10(9): 1351-1358.
- [7] Santos-Ledo A, Jenny A, Marlow F L. Comparative gene expression analysis of the fmn1 family of formins during zebrafish development and implications for tissue specific functions [J]. *Gene Expr Patterns*, 2013, 13(1/2): 30-37.
- [8] Jones H S, Panter G H, Hutchinson T H, et al. Oxidative and conjugative xenobiotic metabolism in zebrafish larvae *in vivo* [J]. *Zebrafish*, 2010, 7(1): 23-30.
- [9] Alderton W, Berghmans S, Butler P, et al. Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae [J]. *Xenobiotica*, 2010, 40(8): 547-557.
- [10] Hu N, Yost H J, Clark E B. Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish [J]. *Anat Rec*, 2001, 264(1): 1-12.
- [11] Langheinrich U, Vacun G, Wagner T. Zebrafish embryos

- express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 193(3): 370-382.
- [12] Mittelstadt S W, Hemenway C L, Craig M P, *et al.* Evaluation of zebrafish embryos as a model for assessing inhibition of hERG [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2008, 57(2): 100-105.
- [13] Arnaout R, Ferrer T, Huisken J, *et al.* Zebrafish model for human long QT syndrome [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2007, 104(27): 11316-11321.
- [14] 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.
- [15] Wang S W, Lui K C, Wang X M, *et al.* Preliminary study on cardiotoxicity of celastrol to zebrafish embryo [J]. *Chin Pharm Bull*, 2009, 25(5): 634-636.
- [16] Carney S A, Chen J, Burns C G, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor activation produces heart specific transcriptional and toxic responses in developing zebrafish [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(2): 549-561.
- [17] Chen J, Carney S A, Peterson R E, *et al.* Comparative genomics identifies genes mediating cardio-toxicity in the embryonic zebrafish heart [J]. *Physiol Genomics*, 2008, 33(2): 148-158.
- [18] Sukardi H, Chng H T, Chan E C, *et al.* Zebrafish for drug toxicity screening: bridging the *in vitro* cell-based models and *in vivo* mammalian models [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2011, 7(5): 579-89.
- [19] 方芳, 赵杰, 余林中, 等. 乌头碱对斑马鱼心脏毒性的初步研究 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(2): 32-34.
- [20] 黄惠琳, 刘华钢, 蒙怡, 等. 氯化两面针碱对斑马鱼胚胎心脏影响的初步研究 [J]. *广西医学*, 2011, 33(5): 546-548.
- [21] 黄惠琳, 刘华钢, 蒙怡, 等. 氯化两面针碱对斑马鱼胚胎 SOD 和 MDA 的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2011, 25(4): 243-245.
- [22] 蒙怡, 刘华钢, 梁瑜, 等. 氯化两面针碱对斑马鱼胚胎毒性的研究 [J]. *毒理学杂志*, 2012, 26(5): 368-371.
- [23] Huang C C, Chen P C, Huang C W, *et al.* Aristolochic acid induces heart failure in zebrafish embryos that is mediated by inflammation [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 100(2): 486-494.
- [24] 朱淑珍, 李银保, 陈缙光, 等. 马兜铃水提液对斑马鱼胚胎的致畸作用和心脏毒性的研究 [J]. *中国野生植物资源*, 2013, 32(6): 10-13.
- [25] 王思锋, 刘可春, 王希敏, 等. 雷公藤红素对斑马鱼胚胎心脏毒性的初步研究 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(5): 634-636.
- [26] Wang S F, Liu K C, Wang X M, *et al.* Toxic effects of celastrol on embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2010, 34(1): 61-65.
- [27] Lu Z G, Li M H, Wang J S, *et al.* Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae [J]. *Reprod Toxicol*, 2014, 47: 33-41.
- [28] He Q X, Liu K C, Wang S F, *et al.* Toxicity induced by emodin on zebrafish embryos [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2012, 35(2): 149-154.
- [29] 陈怡君, 钟玉绪, 董武, 等. 麝香酮对斑马鱼胚胎的发育毒性 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(2): 267-273.
- [30] 朱淑珍, 李银保, 陈缙光, 等. 不同酒制大黄对斑马鱼胚胎发育的影响研究 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(4): 796-798.
- [31] Tristani-Fironzi M, Jensen J L, Donaldson M R, *et al.* Function and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome) [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(3): 381-388.
- [32] 董永新, 王跃祥, 钱林溪, 等. 桔梗皂苷对斑马鱼心功能及胚胎发育的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2006, 15(5): 299-303.
- [33] 郑润凯, 张琦玲, 张孝敏, 等. 飞机草提取物对斑马鱼毒性病理组织学研究 [J]. *动物毒物学*, 2009, 24(1/2): 67.
- [34] 张孝敏, 陈柳红, 郑润凯, 等. 飞机草提取物对斑马鱼心、脑毒性的病理组织学影响 [J]. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(1): 27-31.
- [35] Drummond I A. The zebrafish pronephros: a genetic system for studies of kidney development [J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 14(5): 428-435.
- [36] Hentschel D M, Park K M, Cilenti L, *et al.* Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288(5): F923-F929.
- [37] Thadhani R, Pascual M, Bonventre J V. Acute renal failure [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(22): 1448-1460.
- [38] Ding Y J, Chen Y H. Developmental nephrotoxicity of aristolochic acid in a zebrafish model [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 261(1): 59-65.
- [39] 郑美娜, 刘金荣, 吴雄宇, 等. 香泽兰总黄酮对斑马鱼脾脏毒性病理组织学作用 [J]. *中兽医医药杂志*, 2012(1): 5-8.
- [40] Kimmel C B. Genetics and early development of

- zebrafish [J]. *Trends Genet*, 1989, 5(8): 283-288.
- [41] 胡占英, 张靖溥. 长春新碱对斑马鱼神经发育和行为的影 响 [J]. 毒理学杂志, 2014, 28(2): 98-103.
- [42] 舒 斌, 韦英杰, 张陆勇, 等. 采用模式生物斑马鱼评 价三种中药成分的急性毒性 [J]. 云南中医学院学报, 2010, 33(1): 35-37.
- [43] 姜 玮, 王新敏, 唐于平, 等. 甘遂不同提取物对斑马 鱼急性毒性的初步观察 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(1): 53-56.
- [44] 曹雨诞, 李征军, 陈海鹰, 等. 甘遂不同炮制品及提取 物对斑马鱼的急性毒性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(2): 140-143.
- [45] 王 薇, 刘宇聪, 佟 丽. 麻黄汤等超微饮片与传统饮 片对斑马鱼胚胎毒性的比较研究 [J]. 中药新药与临床 药理, 2011, 22(5): 488-491.
- [46] 常 嘉, 陆 亮, 王庆利, 等. 斑马鱼在药物早期毒性 筛选中的应用进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(13): 1500-1504.
- [47] Brannen K C, Panzica-kelly J M, Danberri T L, *et al*. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2010, 89(1): 66-77.
- [48] Ali S, van Mil H G, Richardson M K. Large-scale assessment of the zebra fish embryo as a possible predictive model in toxicity testing [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21076.
- [49] Rubinstein A L. Zebrafish assays for drug toxicity screening [J]. *Drug Metab Toxicol*, 2006, 2(2): 231-240.
- [50] Feitsma H, Cuppen E. Zebrafish as a cancer model [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(5): 685-694.
- [51] Lam I K, Alex D, Wang Y H, *et al*. *In vitro* and *in vivo* structure and activity relationship analysis of polymethoxylated flavonoids: identifying sinensetin as a novel anti-angiogenesis agent [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(6): 945-956.
- [52] Tran T C, Sneed B, Haider J, *et al*. Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11386-11392.
- [53] Isogai S, Horiguchi M. The vascular anatomy of the developing zebrafish: An atlas of embryonic and early larval development [J]. *Dev Biol*, 2001, 230(2): 278-301.
- [54] Tran T C, Sneed B, Haider J, *et al*. Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11386-11392.
- [55] Ny A, Autiero M, Cameli P. Zebrafish and xenopus tadpoles: Small animal models to study angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(5): 684-693.
- [56] Langheinrich U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk [J]. *Bioessays*, 2003, 25(9): 904-912.
- [57] 韩利文, 袁延强, 何秋霞, 等. 中药及其活性成分在斑 马鱼药物筛选模型中的适用性研究 [A] // 2010 年中国 药学会大会暨第十届中国药师周大会论文集 [C]. 天津: 中国药学会, 2010.
- [58] 郑浩江, 许文学, 刘晓伟, 等. 靛玉红抗斑马鱼胚胎血 管生成活性机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(4): 32-34.
- [59] Alex D, Lam I K, Lin Z X, *et al*. Indirubin shows anti-angiogenic activity in an *in vivo* zebrafish model and an *in vitro* HUVEC model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(2): 242-247.
- [60] 韩利文, 何秋霞, 赵 亮, 等. 利用斑马鱼模型研究靛 玉红及其衍生物抑制血管生成作用的构效关系 [J]. 中 国现代应用药学, 2013, 30(5): 457-460.
- [61] Chan Y K, Kwok H H, Chan L S, *et al*. An indirubin derivative, E804, exhibits potent angiostatic activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(5): 598-607.
- [62] 金 秋. 基于斑马鱼胚胎评价体系的氯化两面针碱对 心血管作用的研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.
- [63] 金 秋, 刘华钢, 蒙 怡, 等. 氯化两面针碱对斑马鱼 胚胎血管生成的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(11): 1602-1605.
- [64] 杨彬睿, 林衍祺, 王佑华, 等. 甜橙黄酮对斑马鱼及人 脐静脉内皮细胞抗血管新生活性的作用 [J]. 上海中医 药大学学报, 2012, 26(4): 76-80.
- [65] 朱亚杰, 程 朋, 苏晓妹, 等. 红景天甙对肝癌细胞增 殖及斑马鱼血管生成作用的研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2012(11): 2239-2243.
- [66] 田丽莉, 董建勇, 黄长江. 莪术醇对斑马鱼的血管生成 活性及作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1822-1825.
- [67] Lin C, Wu M, Dong J. Quercetin-49-O- β -D-glucopyranoside (QODG) inhibits angiogenesis by suppressing VEGFR2-mediated signaling in zebrafish and endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31708.
- [68] Zhong Z F, Hoi P M, Wu G S, *et al*. Anti-angiogenic effect of furanodiene on HUVECs *in vitro* and on zebrafish *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 141(2): 721-727.
- [69] Chan J Y, Koon J C, Liu X, *et al*. Polyphyllin D, a steroidal saponin from *Paris polyphylla*, inhibits endothelial cell functions *in vitro* and angiogenesis in zebrafish embryos *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011,

- 137(1): 64-69.
- [70] Park H, Shim J S, Kim B S, *et al.* Purpurin inhibits adipocyte-derived leucine aminopeptidase and angiogenesis in a zebrafish model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 561-567.
- [71] Zhang Y, Hu G, Li S H, *et al.* Pro-angiogenic activity of astragaloside IV in HUVECs *in vitro* and zebrafish *in vivo* [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(3): 805-811.
- [72] 赵洋, 颜妙虹, 白殊同, 等. 过山枫有效成分南蛇藤素和扁蒴藤素对斑马鱼节间血管生成的抑制作用研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(6): 537-540.
- [73] He M F, Lin L, Ge W, *et al.* Antiangiogenic activity of *Tripterygium wilfordii* and its terpenoids [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121(1): 61-68.
- [74] Yang J, He S, Li S, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antiangiogenic activity of caged polyprenylated xanthenes isolated from *Garcinia hanburyi* Hook. f. [J]. *Molecules*, 2013, 18(12): 15305-15313.
- [75] Lam I K, Alex D, Wang Y H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* structure and activity relationship analysis of polymethoxylated flavonoids: Identifying sinensetin as a novel antiangiogenesis agent [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(6): 945-956.
- [76] Zhou X, Siu W S, Fung C H, *et al.* Pro-angiogenic effects of *Carthami Flos* whole extract in human microvascular endothelial cells *in vitro* and in zebrafish *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(11): 1256-1263.
- [77] 张哲睿, 黎响, 王佑华, 等. 三七及三七花总皂苷对斑马鱼模型促血管新生作用的研究 [J]. *上海中医药大学学报*, 2013, 27(1): 45-49.
- [78] Yu X B, Tong Y, Han X Q, *et al.* Anti-angiogenic activity of *Herba Epimedii* on zebrafish embryos *in vivo* and HUVECs *in vitro* [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(9): 1368-1375.
- [79] Liu C L, Cheng L, Kwok H F, *et al.* Bioassay-guided isolation of norviburtinal from the root of *Rehmannia glutinosa*, exhibited angiogenesis effect in zebrafish embryo model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1323-1327.
- [80] Crawford A D, Esguerra C V, de Witte P A. Fishing for drugs 278 from nature: Zebrafish as a technology platform for natural product discovery [J]. *Planta Med*, 2008, 74(6): 624-632.
- [81] Tse H Y, Hui M N, Li L, *et al.* Angiogenic efficacy of simplified 2-herb formula (NF3) in zebrafish embryos *in vivo* and rat aortic ring *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 447-453.
- [82] 李惠玲. 麝香保心丸促进斑马鱼血管生成作用 [J]. *中国实用医药*, 2012(16): 173-175.
- [83] 王思锋, 刘可春, 王希敏, 等. 西黄丸对斑马鱼胚胎血管生成的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30(10): 821-823.
- [84] 陈锡强, 侯海荣, 刘可春, 等. 西黄丸及其拆方药味对斑马鱼胚胎血管生成的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(1): 50-53.
- [85] Tao C M, Chen S J, Tou M Y, *et al.* Effect of propofol on vascular reactivity in thoracic aortas from rats with endotoxemia [J]. *J Chin Med Assoc*, 2012, 75(6): 262-268.
- [86] 杨丽玲. 斑马鱼内毒素炎症模型建立及中药抗内毒素炎症活性筛选研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [87] Yang L L, Wang G Q, Yang L M, *et al.* Endotoxin molecule lipopolysaccharide-induced zebrafish inflammation model: A novel screening method for anti-inflammatory drugs [J]. *Molecules*, 2014, 19(2): 2390-2409.
- [88] Wang Y M, Xu M, Wang D, *et al.* Anti-inflammatory compounds of "Qin-Jiao", the roots of *Gentiana dahurica* (Gentianaceae) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(2): 341-348.
- [89] Li N, Felber K, Elks P, *et al.* Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation [J]. *Dev Dyn*, 2009, 238(2): 459-466.
- [90] 詹扬, 韦英杰, 王长梅, 等. 淫羊藿总黄酮对泼尼松龙诱导斑马鱼致骨质疏松的防治作用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(4): 251-255.
- [91] 景莉君, 王长梅, 韦英杰, 等. 基于斑马鱼模型的续断抗骨质疏松活性部位筛选 [J]. *中药材*, 2014, 37(4): 635-640.
- [92] 王长梅, 景莉君, 韦英杰, 等. 利用斑马鱼模型评价川续断皂苷 V 和 VI 的抗骨质疏松活性 [J]. *中国药科大学学报*, 2014, 45(1): 88-91.
- [93] Richendrfer H, Créton R. Automated high-throughput behavioral analyses in zebrafish larvae [J]. *J Vis Exp*, 2013, 4(77): e50622.
- [94] Panula P, Sallinen V, Sundvik M, *et al.* Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases [J]. *Zebrafish*, 2006, 3(2): 235-247.
- [95] 王言, 杨中林. 续断总皂苷对斑马鱼空间认知能力的影响研究 [J]. *中医药学报*, 2010, 38(2): 22-24.
- [96] Wang M, Zhang Z, Cheang L C, *et al.* Eriocaulon buergerianum extract protects PC12 cells and neurons in zebrafish against 6-hydroxydopamine-induced damage [J]. *Chin Med*, 2011, 6(1): 1-10.
- [97] Buenafe O E, Orellana-Paucar A, Maes J, *et al.*

- Tanshinone II_A exhibits anticonvulsant activity in zebrafish and Mouse seizure models [J]. *Neuroscience*, 2013, 4(11): 1479-1487.
- [98] Wang Y N, Hou Y Y, Sun M Z, *et al.* Behavioural screening of zebrafish using neuroactive traditional Chinese medicine prescriptions and biological targets [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(5311): 1-10.
- [99] 夏广清, 韩晓娟. 黄芪多糖对斑马鱼发育及与衰老相关基因表达的影响 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(13): 1039-1041.
- [100] 郭殿武, 周娟, 唐礼可, 等. 斑马鱼高血脂模型在山青之片质量控制中的应用研究 [J]. 中国药品标准, 2013, 14(4): 255-259.
- [101] Crawford A D, Esguerra C V, de Witte P A M. Fishing for drugs from nature zebrafish as a technology platform for natural product discovery [J]. *Planta Med*, 2008, 74(6): 624-632.
- [102] 邹汉法, 汪海林. 生物色谱技术分离、鉴定和筛选中药活性成分 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2000, 2(2): 9.
- [103] 吕爱军, 杨正行, 刘欢, 等. 斑马鱼肠道细菌的分离与生理生化特性 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(24): 412-415.
- [104] Scornaienchi M L, Thornton C, Willett K L, *et al.* Functional differences in the cytochrome P450 family enzymes from zebrafish (*Danio rerio*) using heterologously expressed proteins [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 502(1): 17-22.
- [105] Wei Y J, Li P, Fan H W, *et al.* Metabolite profiling of four major flavonoids of *Herba Epimediin* zebrafish [J]. *Molecules*, 2012, 17(1): 420-432.
- [106] 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.
- [107] 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.
- [108] 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.
- [109] 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.
- [110] 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.
- [111] 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]. 药学学报, 2013, 48(2): 281-285.
- [112] 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]. 中国药学杂志, 2013, 48(7): 565-568.
- [113] 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.
- [114] Chablais F, Jazwinska A. The regenerative capacity of the zebrafish heart is dependent on TGFβ signaling [J]. *Development*, 2013, 139(11): 1921-1930.