

## • 综 述 •

## 模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选中的应用进展

王 成, 龚莉虹, 郭朝成, 何林峰, 赵兴桃, 李芸霞\*

成都中医药大学药学院, 教育部中药材标准化重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

**摘 要:** 与哺乳动物相比, 斑马鱼在药物药效筛选方面具有独特的优势, 目前已受到医药学界越来越多的重视。近年来, 对斑马鱼的探索已延伸和扩展到中药领域, 特别是对我国具有多靶点、多途径、多环节作用的传统单味中药、复方和中成药等药效物质的筛选。作为一种完整的动物模型, 斑马鱼可以对中药中发挥作用的有效化学成分进行全方面、深层次的研究, 进而实现对中药药效物质进行便捷、快速和高通量的筛选。结合国内外近 5 年文献报道, 综述了模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选方面的最新研究进展, 主要从筛选心血管药物、调脂保肝药物、抗骨质疏松药物、抗肿瘤药物、抗炎药物和其他药物 6 个方面和独特优势进行归纳总结, 以期模式生物斑马鱼在中药中的应用研究提供新的思路, 以及为研究人员在中药新药研究方面提供借鉴参考。

**关键词:** 斑马鱼; 中药; 药效物质; 高通量筛选; 心血管药物; 调脂保肝药物; 抗骨质疏松药物; 抗肿瘤药物; 抗炎药物  
**中图分类号:** R285; R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)24-6125-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.030

## Application progress on model organism zebrafish in screening of pharmacodynamic substances of Chinese materia medica

WANG Cheng, GONG Li-hong, GUO Chao-cheng, HE Lin-feng, ZHAO Xing-tao, LI Yun-xia

Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources Co-Founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract:** Compared with mammals, zebrafish has unique advantages in screening pharmacodynamic substance, and has been paid more and more attention in the field of medicine. In recent years, the exploration of zebrafish has been extended and extended to the field of Chinese materia medica (CMM), especially for the screening pharmacodynamic substance of the single CMM, the CMM compound and Chinese patent medicines with multi-target, multi-channel and multi-link effects. As a complete animal model, zebrafish can carry out comprehensive and deep research on the effective chemical components that play a role in TCM, and then realize convenient, rapid and high-throughput screening of pharmacodynamic substances in CMM. Combined with the literature reports in recent five years at home and abroad, this paper reviews the latest research progress and unique advantages on the screening of pharmacodynamic substances in CMM in model organism zebrafish, mainly from the screening of cardiovascular drugs, lipid-lowering and liver-protecting drugs, anti-osteoporosis drugs, anti-tumor drugs, anti-inflammatory and other drugs, in order to provide a new idea for the application of model organism zebrafish in CMM and provide reference for the new drugs research of CMM.

**Key words:** zebrafish; Chinese materia medica; pharmacodynamic substances; high-throughput screening; cardiovascular drug; lipid-lowering and liver-protecting drug; anti-osteoporosis drug; antitumor drug; anti-inflammatory drug

斑马鱼 (zebrafish) 是一种原产于南亚地区的辐鳍亚纲鲤科热带硬骨鱼, 全身布满多条深蓝色纵纹。因成群游动时犹如奔驰在非洲草原的斑马群, 故得斑马鱼的美称。此外, 人们又称其为蓝条鱼、

收稿日期: 2019-09-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81373943); 国家自然科学基金面上项目 (81573583); 四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项 (2017TD0001); 四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项 (2016TD007)

作者简介: 王 成 (1995—), 男, 四川成都人, 在读硕士, 从事中药毒效物质基础及其作用机制研究。E-mail: wangcheng@stu.cdutcm.edu.cn

\*通信作者 李芸霞, 博士, 研究员, 从事中药安全性及有效性研究。E-mail: lyxcdutcm@126.com

花条鱼、印度鱼等。斑马鱼最初被用于监测水中的有毒物质和致畸物<sup>[1]</sup>。因其体积小,胚胎透明,易于大规模饲养,繁殖能力强和实验周期短,被广泛作为高通量筛选药物的经典模型<sup>[2]</sup>。斑马鱼基因组序列与人类有着 87% 的高度相似性<sup>[3]</sup>,作为模式生物的优势很突出,这意味着其实验结果大多数情况下也适用于人体。1981 年,Streisinger 等<sup>[4]</sup>首次将斑马鱼与遗传领域和生物学领域进行联系,并介绍斑马鱼是遗传学、分子生物学和胚胎学有机结合的一种模式生物,此后,斑马鱼成为了一种常用来研究基因和发育的脊椎动物模型,被广泛应用于药物药效与毒性的物质筛选研究<sup>[5]</sup>。

与哺乳动物相比,斑马鱼在筛选药物药效方面具有独特的优势。近年来,用模式生物斑马鱼对我国具有多靶点、多途径、多环节作用的传统单味中药、复方药和中成药等药效物质的筛选,已受到医药学界越来越多的重视。作为一种完整的动物模型,斑马鱼可以对中药中发挥作用的有效化学成分进行全方面、深层次地研究,进而实现对中药药效物质进行便捷、快速和高通量的筛选。结合国内外近 5 年文献报道,本文综述了模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选方面的最新研究进展,主要从筛选心血管药物、调脂保肝药物、抗肿瘤药物、抗骨质疏松药物、抗炎药物和其他药物 6 个方面的研究进展和独特优势进行归纳总结,以期为模式生物斑马鱼在中药中的应用研究提供新的思路,为研究人员在中药新药研究方面提供借鉴参考。

### 1 斑马鱼在心血管药物筛选中的应用

斑马鱼的心血管系统是由心房、心室、静脉窦和动脉球串联而成<sup>[6]</sup>,其生理功能和解剖结构与哺乳动物类似。幼鱼的心脏发育迅速,5 hpf(hours post fertilization)时心脏前体细胞成型,22 hpf 时心脏开始出现收缩动作,48 hpf 时功能性瓣膜基本完全形成。其胚胎在显微镜下观察是透明的,因此,可在心脏发育过程中进行无创的体内成像,能观察到心室的形成、心脏的收缩、血液的流动和血管的生长。此外,斑马鱼与哺乳动物还具有类似的血管发育过程和相同的基因<sup>[7]</sup>,这些基因可以促进血管生成和血管新生,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。斑马鱼因其在基因水平上与 70% 带注释的人类基因具有真正的同源性,在蛋白水平上与人类之间的药物结合靶点具有

高度的同源性,又因其与人类具有相似的心脏形态、心率和功能,可以通过正向和反向遗传方法结合非侵入性、高分辨率成像和基于表型的筛查<sup>[8]</sup>,以及当血管缺失时,仍然能够通过对氧的被动运输而继续存活 7 d,使得斑马鱼成为近年来筛选心血管药物的一种有价值的脊椎动物模型。

随着人们生活水平的提高和饮食习惯的改变,糖尿病、高血压、高脂血症、心血管疾病、肥胖等代谢性疾病的发病率呈逐年递增趋势<sup>[9]</sup>。有研究表明<sup>[10]</sup>,高血压、糖尿病以及其他心脑血管性疾病的发生与微血管功能的失调和障碍有着十分密切的联系,其中血管内皮细胞功能紊乱和血栓的形成分别是导致微血管功能障碍的始发因素和重要因素。陈维武等<sup>[11]</sup>利用普纳替尼、花生四烯酸和辛伐他汀 3 种药物诱导斑马鱼幼鱼制备血管内皮损伤模型、血栓模型和微血管缺失模型,测定心输出量、血流速度、肠下血管面积和节间血管直径等相关指标,探究二十五味珍珠片对斑马鱼微血管功能的改善作用。结果发现,二十五味珍珠片质量浓度为 1 mg/L 时,能促进斑马鱼损伤血管的再生;质量浓度为 27.8 mg/L 时,可显著增加斑马鱼的心输出量和血液流动速度;质量浓度为 100 mg/L 时,可显著增加斑马鱼节间血管直径,保护血管内皮功能,减少血栓的形成。

近年来,随着转基因技术的发展,Chico 等<sup>[12]</sup>利用在特定的组织表达特异荧光蛋白的转基因斑马鱼进行实验研究,可直观呈现幼鱼组织器官的生长发育或心血管疾病模型下药物对斑马鱼心血管的改善作用。Liao 等<sup>[13]</sup>利用转基因斑马鱼 Tg(VEGFR2:GFP)(血管中表达绿色荧光蛋白)研究新化合物丹参醇冰片酯(tanshinol borneol ester, DBZ)对人内皮细胞增殖、迁移和血管生成的影响。该团队使用酪氨酸激酶抑制剂瓦他拉尼(vatalanib, PTK787)建立斑马鱼血管损伤模型,通过在荧光显微镜下观察斑马鱼体节间血管(intersegmental vessel, ISV),评价 DBZ 促血管生成的作用。结果表明,DBZ 可以部分恢复 PTK787 诱导的斑马鱼 ISV 的阻断作用,其机制可能是通过激活蛋白激酶 B(AKT)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路对损伤的血管产生保护作用,DBZ 促进了血管生成的多个关键步骤,可开发成用于治疗心肌梗死和其他心血管疾病的药物。斑马鱼在心血管中药筛选中的研究进展见表 1。

表 1 斑马鱼在心血管中药筛选中的应用

Table 1 Application on zebrafish in screening of cardiovascular drugs from Chinese materia medica

| 药物              | 斑马鱼基因型                                       | 造模药物                         | 造模时间/h  | 检测指标                                                   | 结果及作用机制                                                               | 文献 |
|-----------------|----------------------------------------------|------------------------------|---------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 白芍              | AB 品系 Tg<br>(VEGFR2:GFP)                     | PTK787、FeCl <sub>3</sub>     | 48      | 有血流的斑马鱼体节间血管数；腹部血管血流停止时间                               | 芍药苷代谢素-1 具有显著的促血管生成活性和抗血栓的作用                                          | 14 |
| 丹参              | FLK/AB 品系                                    | PTK787/ 特非那定                 | 24/48   | 斑马鱼节间血管长度；斑马鱼心脏形态；静脉窦-动脉球 (SV-BA) 距离                   | 丹参水溶性成分是丹参促血管生成及心脏保护作用的重要部位                                           | 15 |
| 黄芪              | Tg (fli-1a:EGFP)、Tg (fli-1a:nEGFP)           | VEGF 受体络氨酸激酶抑制剂 (VRI)        | 3       | 斑马鱼节间血管数；Kdr1、Kdr、Flt-1 的 mRNA 表达                      | 黄芪多糖能减少 VRI 诱导的斑马鱼血管损伤，有助于治疗血管生成缺陷的相关疾病                               | 16 |
| 降香              | Tg (fli-1a:EGFP)                             | VRI                          | 48、72   | 斑马鱼节间血管数；肠下静脉血管数                                       | 降香提取物 B3 能通过调控 VEGF 受体，发挥促血管新生和修复血管损伤的作用                              | 17 |
| 黄地安消胶囊          | AB 品系 Tg (VEGFR2:GFP)、Tg 胰岛β细胞斑马鱼、Tg 巨噬细胞斑马鱼 | 0.2%高脂饲料和 8%、3%葡萄糖溶液<br>16 h | 96      | 斑马鱼眼底血管壁厚度；胰岛β细胞和巨噬细胞荧光强度；血流速度                         | 黄地安消胶囊明显降低血管壁厚度，增加胰岛β细胞和巨噬细胞荧光强度表达，增加体内血流速度                           | 18 |
| NF3 (黄芪-地黄 2:1) | Tg (fli1:EGFP)                               | —                            | 52      | 内皮细胞进行细胞周期分析；VEGF、成纤维细胞生长因子 (FGF)、MAPK 通路相关基因的 mRNA 表达 | NF3 可以促进斑马鱼胚胎血管生成和内皮细胞的增殖，其机制可能是 NF3 显著上调 VEGF-A、Flk-1、fgf 和 bRaf 的表达 | 19 |
| 丹参注射液           | Tg (VEGFR2:GFP)                              | PTK787                       | 24      | 斑马鱼节间血管长度；节间血管相对生长率                                    | 丹参注射液对斑马鱼节间血管具有明显的再生功能，对血管损伤有修复保护作用                                   | 20 |
| 二十五味珍珠片         | AB 品系 Tg (VEGFR2:GFP)                        | 花生四烯酸/辛伐他汀/普纳替尼              | 4/48/24 | 斑马鱼心输出量；血流速度；肠下血管面积；体节间血管直径；尾静脉血栓形成情况                  | 二十五味珍珠片可以改善微血管功能障碍，其作用机制可能与其减少血管内皮损伤促进其再生，改善微血管血流动力学，减少血栓生成有关         | 11 |

## 2 斑马鱼在调脂保肝药物筛选中的应用

肝脏代谢相关的疾病已成为严重危害全人类身体健康的主要因素<sup>[21]</sup>，且由此引发的发病率和死亡率呈逐年上升趋势，因此，对肝脏代谢相关疾病的发病机制研究和对高效、低毒的调脂保肝药物的开发显得尤为重要。斑马鱼作为一种基因组序列与人类有着 87% 的高度相似性的模式生物<sup>[22]</sup>，因其血脂构成、脂质吸收、脂质代谢等过程与人类基本一致，近年来被广泛应用在与肝脏代谢相关的疾病研究中，如高脂血症、酒精性脂肪肝、肝炎、非酒精性脂肪肝、肝纤维化、肝硬化和肝癌等<sup>[23]</sup>。又因其与人类在肝细胞组成、功能、信号和对损伤的反应等方面很相似，且所有的消化器官在幼鱼 120 hpf 时就已经完全成熟，可在数天内快速发展成发育缺陷或由毒素/乙醇所致的一些肝胆疾病<sup>[24]</sup>，使它们成为筛选调脂保肝类药物和研究肝病发病机制的有用系

统。近年来，使用斑马鱼研究肝脏病理学的研究者数量正逐渐增长<sup>[25]</sup>，2014 年还建立了斑马鱼疾病模型协会。

非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 和非酒精性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 是最常见的慢性肝病，其发病率高达 25%<sup>[26]</sup>。有文献报道<sup>[27]</sup>，在未来的 10 年，NAFLD 很可能会超越乙型肝炎成为威胁全球人民健康的新疾病。因此，我国传统的调脂保肝类中药，因具有副作用小、多靶点、多途径和多环节的优点而受到了格外的关注。余琳媛等<sup>[28]</sup>使用 2 mg/mL 的蛋黄粉复制斑马鱼非酒精性脂肪肝病模型，用于研究传统调脂中药制首乌及其主要成分大黄素对 NAFLD 的治疗作用。预防给药 72 h 后，观察各组存活率、体质量、体长、体质量指数 (body mass index, BMI) 的变化，用油红 O

染色检测肝脏脂质的沉积,用苏木精-伊红染色检测肝组织的病理形态,以及用三酰甘油(TG)和总胆固醇试剂盒检测体内脂质含量。结果显示,制首乌醇提取物和大黄素均能显著降低 NAFLD 斑马鱼的死亡率、BMI 和 TG 水平,可明显改善斑马鱼幼鱼肝脏脂质的沉积,由此推测制首乌治疗 NAFLD 的主要有效成分是大黄素。

Ahmad 等<sup>[29]</sup>采用高胆固醇饮食诱导 NAFLD 斑马鱼幼鱼模型,研究传统中药天麻中的主要活性成分天麻素(gastrodin, GAS)的调脂保肝和抗氧化作用。通过对斑马鱼进行尼罗红染色、苏木精-伊红染色、ROS 荧光染料染色、实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)实验以及对体内脂质水平和活性氧、丙二醛水平进行测定,结果表明,GAS 显著降低 NAFLD 斑马鱼 TG、总胆固醇、活性氧和丙二醛水平,对高胆固醇饲料(high cholesterol diet, HCD)诱导的 NAFLD 斑马鱼幼鱼模型具有脂质调节和抗氧化作用,其可能的机制是抑制甾醇调节原件结合蛋白(SREBP1)、脂肪酸合酶(FANS)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 $\beta$  和 TGFB 等基因的表达,提示过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$ (PPAR $\alpha$ ) 途径和核转录因子红系 2 相关

因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶 1(HO-1)途径可能是 GAS 对脂质调节和抗氧化的作用靶点,揭示 GAS 是一种潜在治疗 NAFLD 的药物。此外,随着人们饮食习惯清淡到油腻的改变,我国的肥胖患者也在逐年递增,肥胖常与其他复杂的疾病共存,如心血管疾病、2 型糖尿病以及一些癌症<sup>[30]</sup>。因此,开发新的抗肥胖药物迫在眉睫。Costa 等<sup>[31]</sup>利用斑马鱼和细胞模型探讨蓝藻菌株治疗肥胖相关并发症的可能,并对其生物活性、毒性以及代谢产物进行了评估分析,其结果表明,蓝藻菌株对代谢性疾病具有巨大的治疗作用。这项研究提示<sup>[32-33]</sup>,海洋极可能是新型抗肥胖药物的一个极具前景的来源。斑马鱼在调脂保肝中药筛选中的研究进展见图 1 和表 2。

### 3 斑马鱼在抗骨质疏松药物筛选中的应用

斑马鱼骨骼发育的机制也与哺乳动物高度类似,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也被发现<sup>[39]</sup>。同时,斑马鱼所有骨骼细胞的类型和调节方式都是和高等脊椎动物守恒的<sup>[40]</sup>。通过对这些细胞的荧光转基因报告基因进行标记,可以快速且动态地观察到斑马鱼骨骼早期的发育过程,这为大规模的抗骨质疏松药物的筛选提供可能。

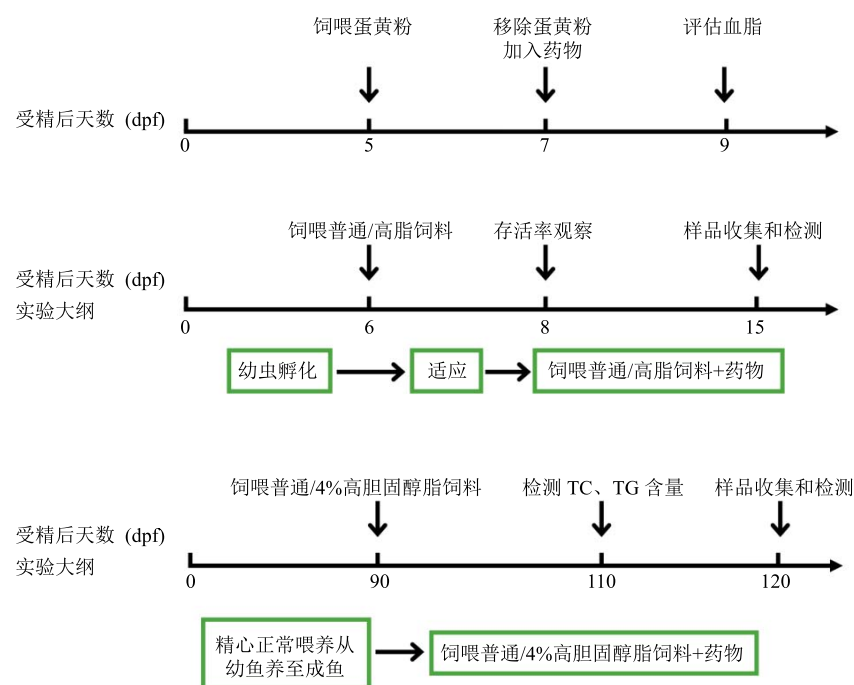


图 1 常用于筛选调脂保肝中药的斑马鱼实验大纲

Fig. 1 Experimental outline of zebrafish for screening lipid-lowering and liver-protecting drugs from Chinese materia medica

表 2 斑马鱼在调脂保肝中药筛选中的应用

Table 2 Application on zebrafish in screening of lipid-lowering and liver-protecting drugs from Chinese materia medica

| 药物        | 斑马鱼基因型            | 造模药物                                    | 检测指标                                                                                                                 | 结果及作用机制                                                                                                                          | 文献 |
|-----------|-------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 柴胡        | Tg (L-FABP; EGFP) | 0.9%乙醇                                  | 肝脏相对荧光强度; 相对肝面积; 肝脏脂肪含量; 肝细胞凋亡情况; 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)                                                         | 柴胡皂苷 a 在 $1.77 \sim 5.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对酒精性脂肪肝斑马鱼具有肝保护作用                                                     | 34 |
| 制首乌 / 大黄素 | AB 品系             | $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋黄粉 | 存活率; BMI; 整体油红 O 染色; 肝脏 HE 染色; 总胆固醇; TG                                                                              | 制首乌醇提物和大黄素能显著降低 NAFLD 的死亡率及 BMI 和 TG 含量, 且大黄素可能为制首乌治疗 NAFLD 的主要有效成分                                                              | 28 |
| 金线莲       | TU 品系             | 2%葡萄糖                                   | 幼鱼组织液葡萄糖浓度; pdx-1、insulin、pck-1、neurod-1 基因的表达; 与糖代谢相关基因的时空表达                                                        | 金线莲醇提物可以促进 pdx-1、insulin、pck-1 的正常表达, 表明其对斑马鱼高糖模型具有明显的降血糖功效                                                                      | 35 |
| 牛大力       | AB 品系             | 二乙基亚硝胺                                  | HE 染色; 天狼星红苦味酸染色; I 型胶原蛋白 I 免疫组化染色; $\alpha$ -平滑肌激动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、TNF- $\alpha$ 、Bax 基因的表达                      | 牛大力水提物减轻肝脏纤维化程度、病理损伤和胶原纤维沉积, 其抗肝纤维化作用可能与 $\alpha$ -SMA、TNF- $\alpha$ 和 Bax 的表达有关                                                 | 36 |
| 白凤菜       | TU 品系             | 1%、2%乙醇                                 | 肝脏指数; ALT、AST; 总胆固醇、TG; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛; 肝脏 HE 染色; Acc1、Fasn、Fads2、Hmgcs1、Hmgcr、Hmgcrb 基因的表达                       | 白凤菜能降低脂肪肝斑马鱼血清 ALT、AST 和丙二醛的活性, 升高 SOD 水平, 改善肝脏脂肪变性, 其治疗酒精肝疾病的机制可能为抑制脂肪和胆固醇相关基因的表达                                               | 37 |
| 地五养肝胶囊    | AB 品系             | 二乙基亚硝胺                                  | 死亡率; 肝脏面积的相对光密度; 整体油红 O 染色; 肝内脂滴数                                                                                    | $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 地五养肝胶囊能减少肝脏的脂滴, 表明地五养肝胶囊对肝损伤的斑马鱼具有一定保护作用                                                   | 38 |
| 天麻        | AB 品系             | 5%高胆固醇饲料                                | 尼罗红染色; 苏木精-伊红染色; ROS 荧光染料染色; 总胆固醇、TG; SOD、丙二醛; SREBP1、FANS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 等基因的表达 | 天麻素可显著降低 NAFLD 斑马鱼 TC、TG、SOD 和 MDA 水平, 具有脂质调节和抗氧化作用, 其可能的机制是抑制 SREBP1、FANS、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 和 TGF $\beta$ 等基因的表达 | 29 |

杨胜杰等<sup>[41]</sup>用  $10 \text{ mg/L}$  泼尼松龙处理斑马鱼幼鱼 144 h, 建立斑马鱼骨质疏松模型, 用来研究传统中药补骨脂中的主要成分补骨脂酚对骨质疏松症的治疗作用。采用 0.2% 的钙黄绿素溶液对各组幼鱼避光染色 1 h, 在荧光显微镜下进行观察拍照, 并定量分析骨荧光强度和脊椎骨数目, 计算其治疗作用和骨发育钙化促进率。结果表明, 补骨脂酚能剂量依赖性地增加骨质疏松症斑马鱼的骨密度, 且对正常斑马鱼骨骼发育钙化有显著地促进作用, 提示补骨脂酚可开发成预防或治疗骨质疏松症的食品和药品。杨国柱等<sup>[42]</sup>也以同样的造模方式对中药复方桃红四物汤 (tao hong si wu decoction, THSWD) 的抗骨质疏松作用进行了评价, 发现  $10 \mu\text{g/mL}$  泼尼松可以使斑马鱼脊椎骨荧光硬度显著降低,  $450 \mu\text{g/mL}$  的 THSWD 对斑马鱼骨质疏松有显著的治疗作用。随后研究发现<sup>[43]</sup>, 没食子酸、绿原酸和羟基红花黄色素 A 是抑制泼尼松诱导斑马鱼骨量丢失的主要活性成分, 暗示着 THSWD 提取物有着良好的抗骨质

疏松的作用, 可增强成骨细胞的活性, 促进骨胶原表达和骨矿化。斑马鱼在抗骨质疏松中药筛选中的研究进展见表 3。

#### 4 斑马鱼在抗肿瘤药物筛选中的应用

最近几年, 斑马鱼在肿瘤疾病的发生、再生等基本特性方面的发现, 使其成为肿瘤生物医学研究领域比较突出的新模式生物<sup>[25,46]</sup>。建立的肿瘤斑马鱼在组织学上、基因表达和基因组水平上与人类癌症高度相似, 并且能够对其进行体内成像和高通量的遗传筛选, 这为癌症基因组从机体上进行研究提供了一个独特的机会<sup>[47]</sup>。采用正向遗传学、反向遗传学、基因敲除、癌细胞移植和化学诱导剂等技术, 可以充分对幼鱼/成鱼进行多种斑马鱼肿瘤模型的复制、发病机制的研究和具有抗肿瘤活性药物的筛选。随着以上技术手段的快速发展, 目前研究者已建立了多种斑马鱼肿瘤细胞模型, 如神经母细胞瘤模型<sup>[48]</sup>、胶质母细胞瘤模型<sup>[49]</sup>、胃癌模型<sup>[50]</sup>、乳腺癌模型<sup>[51]</sup>、白血病模型<sup>[52]</sup>、肝脏与胰腺肿瘤模型<sup>[53]</sup>等。

表 3 斑马鱼在抗骨质疏松中药筛选中的应用

Table 3 Application on zebrafish in screening of anti-osteoporosis drugs from Chinese materia medica

| 药物    | 斑马鱼基因型 | 造模方法                           | 检测指标                                                    | 结果及作用机制                                                                                    | 文献 |
|-------|--------|--------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 补骨脂   | AB 品系  | 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 泼尼松龙  | 0.2% 的钙黄绿素染色；骨荧光强度；<br>脊椎骨数目                            | 补骨脂酚能增加骨质疏松症斑马鱼的骨密度，且对<br>正常斑马鱼骨骼发育钙化有显著的促进作用，表<br>明补骨脂酚具有治疗骨质疏松症的作用                       | 41 |
| 箭叶淫羊藿 | TU 品系  | 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 泼尼松龙 | 茜素红染色；定量分析骨骼染色区域                                        | 6.25~25.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的箭叶淫羊藿具有明显的抗泼<br>尼松龙诱导斑马鱼骨丢失的作用                           | 44 |
| 桃红四物汤 | AB 品系  | 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 泼尼松龙 | 茜素红染色；骨矿化面积及其累积光<br>密度；AKP、RUNX-2、OPG 等基<br>因的表达；体内矿物含量 | 桃红四物汤可升高斑马鱼的骨矿化面积、累积光密<br>度值和相关基因的表达，表明其能够增强成骨细胞<br>活力，促进骨胶原表达和骨矿化，具有潜在的逆<br>转糖皮质激素性骨质疏松作用 | 43 |
| 壮骨关节丸 | TU 品系  | 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 泼尼松龙 | 存活率；茜素红染色；定量分析骨骼<br>染色区域                                | 12.5~50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的壮骨关节丸具有一定的抗泼尼松<br>龙诱导斑马鱼骨丢失的作用                              | 45 |

随着各种癌症发病率的增長，人们正努力地寻找天然的治疗方法和疗效显著的中药。丹参是我国常用中药，因具有良好的抗血管生成、抗炎、抗血小板聚集作用，被公认为是抗肿瘤细胞增殖的潜在抑制剂<sup>[54-55]</sup>，丹参酮 II<sub>A</sub> 是其活性成分。然而，因丹参酮 II<sub>A</sub> 的水溶性较差<sup>[56]</sup>，以致于生物利用度低，阻碍了其在抗肿瘤药物研发中的进展。Wu 等<sup>[57]</sup> 基于丹参酮 II<sub>A</sub> 设计了一系列类似物，通过引入咪唑基来增加其水溶性和分子稳定性，从而降低亲脂性，增强抗肿瘤活性。随后又采用移植异种乳腺癌细胞于斑马鱼胚胎中，研究这一系列新丹参酮 II<sub>A</sub> 类似物在体内的抗肿瘤作用。研究发现，5  $\mu\text{mol/L}$  改良的丹参酮 II<sub>A</sub> 类似物（TA12）能显著抑制移植瘤细胞 MDA-MB-231 在斑马鱼体内的增殖和转移，暗示 TA12 可作为抑制乳腺癌转移的潜在候选药物。黄志军等<sup>[58]</sup> 用显微注射的方式将癌细胞移植到斑马鱼幼鱼卵黄囊内，建立斑马鱼肿瘤模型，用于评价中药复方小金胶囊的抗肿瘤活性。通过对转基因斑马鱼新生血管抑制和对经吡啶橙染色后斑马鱼细胞凋亡的观察，发现不同质量浓度的小金胶囊溶液对体内肿瘤的荧光强度有不同程度的降低作用。特别是当小金胶囊质量浓度为 264.72  $\mu\text{g/mL}$  时，能显著性地抑制血管生成和诱导人乳腺癌细胞凋亡，表明小金胶囊具有较好的抗肿瘤活性。提示斑马鱼肿瘤异种移植模型是一类快速、可靠、灵敏以及能够在体内测定药物抗癌效果的动物模型。

## 5 斑马鱼在抗炎药物筛选中的应用

斑马鱼拥有与人类相似的免疫系统<sup>[59]</sup>，和人类

在细胞水平和分子水平上都具有高度同源性<sup>[3]</sup>，其免疫细胞与哺乳动物细胞也具有相似的表型特征。由于斑马鱼幼鱼从出生到受精后 28 d (28 dpf) 都是透明的，在体内出现炎症时可以显示绿色荧光蛋白标记的白细胞，并且可通过一系列的正向和反向遗传技术来操作。这些优点使斑马鱼成为研究体内炎症过程以及筛选具有抗炎活性化合物的有力工具。

炎症是机体对于各种有害生理刺激的一种防御反应，包括激活各种免疫细胞和组织，其急性炎症的主要特点表现为发红、肿胀、发热和疼痛<sup>[60]</sup>。炎症反应是免疫系统中的重要组成部分，与很多疾病的发生及发病机制密切相关。有研究表明<sup>[61]</sup>，受诱导型一氧化氮合酶（iNOS）、内皮型一氧化氮合酶（eNOS）和环氧合酶-2（COX-2）表达控制的 NO 和前列腺素 E<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）是促进炎症发展的原因。脂多糖（LPS）又称细菌内毒素，可以引起机体发热、免疫功能紊乱及多器官炎症等<sup>[62-63]</sup>。周俊怡等<sup>[64]</sup> 对 LPS 诱导的斑马鱼实热炎症模型进行了探讨。采用 LPS 建立转基因荧光标记的中性粒细胞斑马鱼炎症模型，通过活体成像系统实时监测和统计炎症部位的中性粒细胞，对此模型的建立进行评价分析。结果表明，与正常组相比，LPS 诱导的模型组斑马鱼炎症部位的中性粒细胞显著增多，表明使用 LPS 可以成功建立斑马鱼炎症模型，可用于研究炎症的具体发病机制和抗炎活性药物药效的评价筛选。此外，Bhardwaj 等<sup>[65]</sup> 通过 RAW264.7 细胞体外实验和斑马鱼体内实验联合分析，对  $\alpha$ -蜕皮酮的抗炎活性和抗炎机制进行了探讨。结果表明， $\alpha$ -蜕皮酮在 LPS 刺

激后以浓度依赖的方式降低丙二醛水平, 促炎介质减少, 且对 LPS 诱导的斑马鱼形态学畸形有保护作用。其发挥抗炎作用的具体机制是  $\alpha$ -蜕皮酮通过抑制 MAPK 和 AKT 的磷酸化, 从而抑制 LPS 刺激细胞中的 NF- $\kappa$ B 易位, 刺激 HO-1 和 Nrf2 的产生, 抑制促炎介质和细胞因子而产生抗炎作用。

## 6 斑马鱼在其他药物筛选中的应用

斑马鱼的中枢神经系统与其他脊椎动物的中枢神经系统排列相似, 且与人类相关的神经退行性疾病蛋白有很多是同源的, 可以很轻易地进行检测<sup>[66]</sup>。因此, 斑马鱼比啮齿动物具有更好的优势来复制神经退行性疾病和神经系统疾病模型<sup>[67]</sup>, 目前被大量应用于筛选神经系统疾病药物。同样, 因感染了海洋分枝杆菌的斑马鱼和感染了结核分枝杆菌 (*mycobacterium tuberculosis*, MTB) 的人类在病理学和组织学上有诸多的相似之处<sup>[68]</sup>, 且斑马鱼体型小、价格便宜、易于实验操作, 基于上述特点, 斑马鱼也被广泛用于评估抗结核病的新疫苗和高通量筛选可能具有抗结核活性的现有药物<sup>[69]</sup>。

近年来, 随着抗生素耐药结核菌株的不断出现, 寻求新的治疗方法和开发新型抗结核药物迫在眉睫。建立理想的体内结核病动物模型一直是开发新抗结核药物的瓶颈问题<sup>[70-71]</sup>。目前, 杨国威等<sup>[72]</sup>利用海洋分枝杆菌, 建立了一种可以依赖于 qRT-PCR 计数法来评价抗结核药物的斑马鱼海洋分枝杆菌感染模型。采用人工注射海洋分枝杆菌于 2 hpf 斑马鱼胚胎卵黄囊内, 对幼鱼生存率、体内细菌数目、HE 染色、Ziehl-Neelsen 染色以及抗结核药物异烟肼和利福平的药效评测等多个指标进行了分析。结果表明, 该模型是一种快速、简便、高效可用于体内筛选抗结核药物的评价系统, 与其他抗结核动物模型相比, 大大缩短实验周期, 显著提高抗结核药物的评价效率。Aspatwar 等<sup>[73]</sup>利用结核斑马鱼幼鱼模型, 对可能具有抗结核作用的二硫代氨基甲酸盐衍生的  $\beta$ -碳酸酐酶抑制剂 FC14-594A 和 FC14-584B 进行了毒性和药性的初步探索。通过毒性实验, 发现在斑马鱼幼鱼中, FC14-584B 比 FC14-594A 更安全。随后对 FC14-584B 在斑马鱼体内的抗结核活性进行了验证。采用带绿色荧光的海洋分枝杆菌感染斑马鱼幼鱼 1 d, 然后给予不同剂量的 FC14-584B, 结果发现 FC14-584B 能有效抑制海洋分枝杆菌的生长, 表明 FC14-584B 可以显著抑制结核分枝杆菌碳酸酐酶的活性。提示 FC14-584B 是一种有效的抗真

菌候选药物, 未来可能会开发成有效的抗结核药物。

## 7 结语与展望

目前有多种多样的模型可复制人类的疾病, 但各种模型均有其优势和局限。如因具有实验周期短、成本低和可控性强等优点的细胞模型被广泛使用, 但生物体终究是一个有机整体, 其各个组织器官之间均存在着密切的联系, 单纯用细胞模型对其进行研究, 只能反映药物或疾病是对这种细胞的单独作用效果, 而无法替代整个生物体, 暗示其体外细胞实验结果和体内实验结果可能会有一定的差距。此外, 哺乳动物模型虽有抗病力强、稳定性好和采样方便等优点, 但其造模时间长、饲喂成本高和不能进行实时活体病变观察等劣势, 阻碍了哺乳动物模型在某些疾病上的深入研究。因此, 寻求一个创新的、理想的实验动物模型来筛选中药药效物质已迫在眉睫。

随着新理论、新技术和新概念的出现, 斑马鱼可能在不远的将来会成为同时具有细胞模型优势和哺乳动物优势的另一个新兴模型生物。因其与人类具有 87% 的高度同源性基因及体内的代谢与人类相似, 实验周期短、给药方式简便, 胚胎透明, 很容易观察到体内器官的病变情况, 且样本量大, 可进行高通量筛选和成本低等优点, 使得斑马鱼成为筛选中药药效物质的动物模型。此外, 斑马鱼在疾病机制、中药毒理、中药体内代谢和中药作用机制研究等方面也发挥着越来越重要的作用。

尽管斑马鱼模型在中药药效物质筛选方面表现出独有的优势, 但是由于与人类物种间的差异, 其必然存在一些局限性。如斑马鱼的给药方式大都是浸泡给药, 少部分是显微注射给药, 这与人的给药方式明显不同, 在一定程度上会影响中药药效物质筛选的结果, 造成结果的差异性和不准确性。其次, 斑马鱼的血液含量较少, 很难采集血液对其进行脂质分析及相关指标的检测, 进而限制了斑马鱼在筛选某些调血脂中药中的应用。再者, 与其他动物模型相比, 斑马鱼作为模式生物来研究人类相关疾病的时间还较短, 实验过程中可用的试剂和造模的方法相对局限, 尤其是抗体的缺乏, 目前只有少量的斑马鱼抗体可以使用, 因此对斑马鱼在蛋白水平上进行相关的机制研究也有一定的难度。未来, 随着斑马鱼自动化分选技术、基因敲除技术和胚胎原位杂交技术的不断发展和创新, 这一新兴的模式生物在中药药效物质筛选方面将会有更加广阔的应用前景, 为推动中药的研究与开发提供新的思路 and 新的平台。

## 参考文献

- [1] Laale H W. The biology and use of zebrafish, brachydanio rerio in fisheries research: A literature review [J]. *J Fish Biol*, 1977, 10(2): 121-173.
- [2] Gratacap R L, Wheeler R T. Utilization of zebrafish for intravital study of eukaryotic pathogen-host interactions [J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 46(1): 108-115.
- [3] Howe K, Clark M D, Torroja C F, *et al*. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [4] Streisinger G, Walker C, Dower N, *et al*. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, 1981, 291(5813): 293-296.
- [5] 彭蕴茹, 韦英杰, 丁永芳, 等. 基于斑马鱼模型的药物毒性研究进展与中药毒性研究新策略 [J]. *中草药*, 2017, 48(1): 17-30.
- [6] Rocke J, Lees J, Packham I, *et al*. The zebrafish as a novel tool for cardiovascular drug discovery [J]. *Recent Pat Cardio Drug Discov*, 2009, 4(1): 1-5.
- [7] Seto S W, Kiat H, Lee S M, *et al*. Zebrafish models of cardiovascular diseases and their applications in herbal medicine research [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.10.031.
- [8] Giardoglou P, Beis D. On zebrafish disease models and matters of the heart [J]. *Biomedicines*, 2019, doi: 10.3390/biomedicines7010015.
- [9] Jongh R T D, Erik H S, Ijzerman R G, *et al*. Impaired microvascular function in obesity implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance [J]. *Circulation*, 2004, 109(21): 2529-2535.
- [10] Bairey Merz C N, Pepine C J. Syndrome X and microvascular coronary dysfunction [J]. *Circulation*, 2011, 124(13): 1477-1480.
- [11] 陈维武, 白玛卓玛, 郭胜亚, 等. 二十五味珍珠片对斑马鱼微血管功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(13): 49-54.
- [12] Chico T J A, Ingham P W, Crossman D C. Modeling cardiovascular disease in the zebrafish [J]. *Trends Cardio Med*, 2008, 18(4): 150-155.
- [13] Liao S, Han L, Zheng X, *et al*. Tanshinol borneol ester (DBZ), a novel synthetic small molecule angiogenesis stimulator inspired by botanical formulations for angina pectoris [J]. *British J Pharmacol*, 2019, doi: 10.1111/bph.14714.
- [14] 段文娟, 李月, 杨国红, 等. 白芍对斑马鱼促血管生成和抗血栓作用的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(4): 834-837.
- [15] 杨龙飞, 赵瀚年, 丁晓彦, 等. 基于斑马鱼模型的丹参促血管生成及心脏损伤保护作用的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(6): 2620-2624.
- [16] Hu G S, Mahady G B, Li S, *et al*. Polysaccharides from *Astragali Radix* restore chemical-induced blood vessel loss in zebrafish [J]. *Vascular Cell*, 2012, 4(1): 1-8.
- [17] 范竹鸣, 王佑华, 周昕, 等. 降香提取物 B3 对斑马鱼模型促血管新生作用的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(4): 66-69.
- [18] 高家荣, 郭明飞, 方朝晖, 等. 黄地安消胶囊对高糖高脂诱导的斑马鱼血管病变保护作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(21): 4317-4322.
- [19] Tse H Y G, Hui M N Y, 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.
- [20] 李艳, 刘晓金, 王平, 等. 丹红注射液对斑马鱼促血管作用的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(6): 2270-2273.
- [21] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, *et al*. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- [22] Howe K, Clark M D, Torroja C F, *et al*. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [23] Hölttävuori M, Salo V T, Nyberg L, *et al*. Zebrafish: Gaining popularity in lipid research [J]. *Biochem J*, 2010, 429(2): 235-242.
- [24] Goessling W, Sadler K C. Zebrafish: An important tool for liver disease research [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(6): 1361-1377.
- [25] Phillips J B, Westerfield M. Zebrafish models in translational research: Tipping the scales toward advancements in human health [J]. *Dis Mod Mechan*, 2014, 7(7): 739-743.
- [26] Goh B B, McCullough A J. Natural history of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Digest Dis Sci*, 2016, 61(5): 1226-1233.
- [27] Xu C, Yu C, Ma H, *et al*. Prevalence and risk factors for the development of nonalcoholic fatty liver disease in a nonobese Chinese population: The Zhejiang Zhenhai study [J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(8): 1299-1304.
- [28] 余琳媛, 全云云, 龚莉虹, 等. 制首乌醇提物及其主要成分大黄素对斑马鱼非酒精性脂肪肝的治疗作用 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(5): 766-771.

- [29] Ahmad O, Wang B, Ma K, *et al.* Lipid modulating anti-oxidant stress activity of gastrodin on nonalcoholic fatty liver disease larval zebrafish model [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, doi: 10.3390/ijms20081984.
- [30] Mahmoud A, Le R C W, Docherty N G. Morbidity and mortality associated with obesity [J]. *Annals Transl Med*, 2017, 5(7): 161-172.
- [31] Costa M, Rosa F, Ribeiro T, *et al.* Identification of cyanobacterial strains with potential for the treatment of obesity-related co-morbidities by bioactivity, toxicity evaluation and metabolite profiling [J]. *Marine Drugs*, 2019, doi: 10.3390/md17050280.
- [32] Koyama T, Kawazoe Y, Iwasaki A, *et al.* Anti-obesity activities of the yoshinone A and the related marine  $\gamma$ -pyrone compounds [J]. *J Antib*, 2016, 69(4): 348-351.
- [33] Noinart J, Buttachon S, Dethoup T, *et al.* A new ergosterol analog, a new bis-anthraquinone and anti-obesity activity of anthraquinones from the marine sponge-associated fungus *Talaromyces stipitatus* KUFA 0207 [J]. *Marine Drugs*, 2017, doi: 10.3390/md15050139.
- [34] 夏青, 韩利文, 张云, 等. 基于斑马鱼模型的柴胡皂苷 a 保肝作用与肝毒性研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13): 2662-2666.
- [35] 许璟瑾, 张文娟, 陈志永, 等. 金线莲醇提物在斑马鱼中降血糖效果的探究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(6): 21-28.
- [36] 周楚莹, 赖裕玲, 谢凌鹏, 等. 牛大力水提物对斑马鱼药物性肝纤维化损伤的保护作用 [J]. 新中医, 2018, 50(12): 20-24.
- [37] 陈灿滨, 陈志亮, 薛钰, 等. 白凤菜醇提物对斑马鱼酒精性脂肪肝损伤的修复 [J]. 牡丹江师范学院学报: 自然科学版, 2016, 4(1): 53-56.
- [38] 黄丹萍, 袁伟渠, 黎少东, 等. 地五养肝胶囊对二乙基亚硝胺诱导斑马鱼肝损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2018, 40(7): 1468-1472.
- [39] Witten P E, Harris M P, Huyseune A, *et al.* Small teleost fish provide new insights into human skeletal diseases [J]. *Methods Cell Biol*, 2016, doi: 10.1016/bs.mcb.2016.09.001.
- [40] Djm B, Kague E, Hammond C L. Zebrafish as an emerging model for osteoporosis: A primary testing platform for screening new osteo-active compounds [J]. *Frontiers Endocrinol*, 2019, doi: 10.3389/fendo.2019.00006.
- [41] 杨胜杰, 钟少达, 杨进平, 等. 补骨脂酚的提取纯化工工艺优选及其对骨质疏松症的治疗作用分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 43-47.
- [42] 杨国柱, 段涛, 卢丽, 等. 桃红四物汤对泼尼松诱导斑马鱼骨质疏松的治疗作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(8): 1007-1010.
- [43] 赵蓉, 蒋俊, 肖世长, 等. 桃红四物汤逆转斑马鱼模型糖皮质激素性骨质疏松的研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 313-320.
- [44] 葛静, 凌洁, 宁青, 等. 基于斑马鱼 M-Act/Tox 联合评价箭叶淫羊藿的代谢-效/毒作用 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1614-1620.
- [45] 时克, 王茉, 景莉君, 等. 基于斑马鱼毒/效同步评价的壮骨关节丸促骨骼发育作用与初步安全性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 164-167.
- [46] Wilkins B J, Pack M. Zebrafish models of human liver development and disease [J]. *Comprehens Physiol*, 2013, 3(3): 1213-1230.
- [47] White R, Rose K, Zon L. Zebrafish cancer: The state of the art and the path forward [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(9): 624-636.
- [48] Zhu S Z, Thomas L A. Neuroblastoma and its zebrafish model [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 916: 451-478.
- [49] Gamble J T, Reed-Harris Y, Barton C L, *et al.* Quantification of glioblastoma progression in zebrafish xenografts: Adhesion to laminin alpha 5 promotes glioblastoma microtumor formation and inhibits cell invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.076.
- [50] Tsering J, Hu X. Triphala suppresses growth and migration of human gastric carcinoma cells and in a zebrafish xenograft model [J]. *Biomed Res Int*, 2018, doi: 10.1155/2018/7046927.
- [51] Zhang Q, Lu S, Li T, *et al.* ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, doi: 10.1186/s13046-019-1156-5.
- [52] Lu J W, Hsieh M S, Hou H A, *et al.* Overexpression of SOX4 correlates with poor prognosis of acute myeloid leukemia and is leukemogenic in zebrafish [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(8): e593.
- [53] Hwang K L, Goessling W. Baiting for cancer: Using the zebrafish as a model in liver and pancreatic cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-30654-4\_17.
- [54] Zhang Z R, Li J H, Li S, *et al.* *In vivo* angiogenesis screening and mechanism of action of novel tanshinone derivatives produced by one-pot combinatorial modification of natural tanshinone mixture from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e100416.
- [55] Lv C, Zeng H W, Wang J X, *et al.* The antitumor natural product tanshinone II<sub>A</sub> inhibits protein kinase C and acts

- synergistically with 17-AAG [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 165-177.
- [56] Ma K, Zhang C, Huang M Y, *et al.* Crosstalk between beclin-1-dependent autophagy and caspase-dependent apoptosis induced by tanshinone II<sub>A</sub> in human osteosarcoma MG-63 cells [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4): 1807-1818.
- [57] Wu Q, Zheng K, Huang X, *et al.* Tanshinone-II<sub>A</sub>-based analogs of imidazole alkaloid act as potent inhibitors to block breast cancer invasion and metastasis *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(23): 10488-10501.
- [58] 黄志军, 兰小红, 赵刚, 等. 小金胶囊对斑马鱼移植瘤的抗肿瘤作用 [J]. *中成药*, 2016, 38(9): 1902-1906.
- [59] Luderman L N, Unlu G, Knapik E W. Zebrafish developmental models of skeletal diseases [J]. *Curr Topics Dev Biol*, 2017, doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.11.004.
- [60] Lee J Y, Lee M S, Choi H J, *et al.* Hexane fraction from *Laminaria japonica* exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages via inhibiting NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Eur J Nutr*, 2013, 52: 409-421.
- [61] Yun K J, Koh D J, Kim S H, *et al.* Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor- $\kappa$ B inactivation [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(21): 10265-10272.
- [62] Bhan A, Alam S N, Raychowdhury A, *et al.* Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2013, 110(17): 7003-7008.
- [63] Shi J, Zhao Y, Wang Y, *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS [J]. *Nature*, 2014, 514(7521): 187-192.
- [64] 周俊怡, 周严严, 边宝林, 等. LPS 诱导斑马鱼炎症实热模型构建及脂质生物标志物筛选研究 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2018, 42(10): 782-789.
- [65] Bhardwaj M, Mamadalieva N Z, Chauhan A K, *et al.*  $\alpha$ -Ecdysone suppresses inflammatory responses via the Nrf2 pathway in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.038.
- [66] Laird A S, Mackovski N, Rinkwitz S, *et al.* Tissue-specific models of spinal muscular atrophy confirm a critical role of SMN in motor neurons from embryonic to adult stages [J]. *Human Mol Genetics*, 2016, 25(9): 1728-1738.
- [67] Babin P J, Goizet C. Zebrafish models of human motor neuron diseases: Advantages and limitations [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 118(6): 36-58.
- [68] Myllymäki H, Niskanen M, Luukinen H, *et al.* Identification of protective postexposure mycobacterial vaccine antigens using an immunosuppression-based reactivation model in the zebrafish [J]. *Dis Mod Mechan*, 2018, doi: 10.1242/dmm.033175.
- [69] Bouz G, Al Hasawi N. The zebrafish model of tuberculosis-no lungs needed [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2018, 44(6): 779-792.
- [70] Trofimov V, Costa-Gouveia J, Hoffmann E, *et al.* Host-pathogen systems for early drug discovery against tuberculosis [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 39(10): 143-151.
- [71] Sridevi J P, Anantaram H S, Kulkarni P, *et al.* Optimization and validation of *Mycobacterium marinum*-induced adult zebrafish model for evaluation of oral anti-tuberculosis drugs [J]. *Int J Mycobacteriol*, 2014, 3(4): 259-267.
- [72] 杨国威, 彭世泽, 赵建元, 等. 基于海分枝杆菌感染斑马鱼模型的抗结核药物评价方法研究 [J]. *药学报*, 2019, 54(5): 854-860.
- [73] Aspatwar A, Hammarén M, Koskinen S, *et al.*  $\beta$ -CA-specific inhibitor dithiocarbamate Fc14-584B: A novel antimycobacterial agent with potential to treat drug-resistant tuberculosis [J]. *J Enzyme Inhibit Med Chem*, 2017, 32(1): 832-840.