

重楼皂苷 I 对斑马鱼发育毒性、抗血管新生活性及其机制研究

王璇, 陈林珍, 林瑞超, 陈美琳, 范琦琦, 李芝奇, 赵崇军*, 李向日*

北京中医药大学 中药品质评价北京市重点实验室/中药炮制研究中心, 北京 102488

摘要: 目的 基于模式生物斑马鱼研究重楼皂苷 I 的发育毒性、抗血管新生活性, 并利用网络药理学探究重楼皂苷 I 抗血管新生的作用机制。方法 将受精后 6 h (6 h post fertilization, 6 hpf) 的斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的重楼皂苷 I 中 96 h, 在实验终点确认重楼皂苷 I 对斑马鱼胚胎的致死曲线, 计算 20% 致死浓度 (20% lethal concentration, LC₂₀)。在实验终点, 以斑马鱼自主抽动次数、96 hpf 心率、斑马鱼肝脏面积、静脉窦-动脉球间距、总胆固醇 (total cholesterol, T-CHO)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 含量等指标, 结合吖啶橙、油红 O 染色观察综合评价重楼皂苷 I 的发育毒性及其相关靶器官毒性。安全剂量条件下, 以斑马鱼肝脏面积和静脉窦-动脉球间距评价重楼皂苷 I 对相关靶器官的影响, 同时以节间血管数评价重楼皂苷 I 对斑马鱼节间血管生长的影响。基于网络药理学预测重楼皂苷 I 抗血管新生的作用机制并通过 qRT-PCR 技术进行验证。结果 重楼皂苷 I 对斑马鱼胚胎的致死曲线为 $y=270x-23.62$, LC₂₀ 为 0.16 $\mu\text{g/mL}$; 在亚致死浓度暴露条件下的实验终点, 与对照组比较, 0.16 $\mu\text{g/mL}$ 重楼皂苷 I 能够诱导斑马鱼幼鱼出现卵黄囊吸收延迟, 脊柱弯曲, 尾巴畸变等明显的毒性特征, 且 T-CHO、TG、LDL-C 含量明显升高 ($P<0.05$ 、 0.01); 吖啶橙染色及油红 O 染色表明 0.16 $\mu\text{g/mL}$ 重楼皂苷 I 能引起斑马鱼肝脏细胞凋亡和脂肪变性。在安全剂量条件下, 与对照组比较, 0.06、0.09 $\mu\text{g/mL}$ 重楼皂苷 I 对主要脏器没有明显影响, 但可以抑制节间血管数 ($P<0.01$)。网络药理学预测发现重楼皂苷 I 可通过调节血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、类固醇受体共激活因子 (steroid receptor coactivator, SRC)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 等关键靶点, 调控 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等相关信号通路, 进而发挥抗血管新生的作用, qRT-PCR 实验结果验证了以上靶点。结论 重楼皂苷 I 过高剂量使用会造成斑马鱼胚胎发育毒性, 而在安全剂量条件下, 重楼皂苷 I 通过调节 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等相关通路发挥明显的抗血管新生活性, 为重楼皂苷 I 的临床用药安全及开发利用提供了思路, 同时也为毒性中药的“有效性-安全性”综合评价提供了参考。

关键词: 重楼皂苷 I; 斑马鱼; 发育毒性; 抗血管新生; 血管内皮生长因子 A; 雷帕霉素靶蛋白; 类固醇受体共激活因子; 表皮生长因子受体

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)14-4548-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.015

Developmental toxicity, anti-angiogenesis activity and mechanism of polyphyllin I on zebrafish

WANG Xuan, CHEN Lin-zhen, LIN Rui-chao, CHEN Mei-lin, FAN Qi-qi, LI Zhi-qi, ZHAO Chong-jun, LI Xiang-ri

Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Materia Medica/Chinese Medicine Processing Research Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To study the developmental toxicity and anti-angiogenesis of polyphyllin I based on the model organism zebrafish, and explore the anti-angiogenesis mechanism of polyphyllin I by network pharmacology. **Methods** The zebrafish embryos 6 h post fertilization (6 hpf) were exposed to different concentrations of polyphyllin I for 96 h. The lethal curve of polyphyllin I on zebrafish embryos was confirmed at the end of the experiment, and 20% lethal concentration (LC₂₀) was calculated. At the end point of the experiment, the developmental toxicity of polyphyllin I and its related target organ toxicity were comprehensively evaluated by

收稿日期: 2023-02-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204753); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-YN-44)

作者简介: 王璇 (2000—), 硕士研究生, 研究方向为中药安全性评价及主要活性/毒性物质基础筛选。E-mail: wangxuan9962@163.com

*通信作者: 赵崇军 (1988—), 博士, 助理研究员, 研究方向为中药安全性评价及主要活性/毒性物质基础筛选。E-mail: 1014256537@qq.com

李向日 (1972—), 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药炮制、质量控制及药效物质基础。E-mail: lixiangri@sina.com

the number of spontaneous twitches of zebrafish, the heart rate of 96 hpf, the liver area of zebrafish, the distance between venous sinus and arterial bulb, the contents of total cholesterol (T-CHO), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and the observation of acridine orange and oil red O staining. Under the safe dose condition, effect of polyphyllin I on related target organs was evaluated by the liver area of zebrafish and the distance between venous sinus and arterial bulb, and effect of polyphyllin I on growth of zebrafish internode vessels was evaluated by the number of internode vessels. The mechanism of polyphyllin I against angiogenesis was predicted based on network pharmacology and verified by qRT-PCR technology. **Results** The lethal curve of polyphyllin I on zebrafish embryos was $y = 270x - 23.62$, LC_{20} was $0.16 \mu\text{g/mL}$. The end point of the experiment under the sublethal concentration exposure, $0.16 \mu\text{g/mL}$ polyphyllin I showed obvious toxic characteristics such as delayed absorption of yolk sac, curvature of spine and tail distortion in larvae zebrafish, and the contents of T-CHO, TG and LDL-C were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Acridine orange and oil red O staining showed that $0.16 \mu\text{g/mL}$ polyphyllin I could induce liver cell apoptosis and steatosis. Compared with control group at safe dose, $0.06, 0.09 \mu\text{g/mL}$ polyphyllin I had no significant effects on main organs, but could inhibit the number of internode vessels ($P < 0.01$). Network pharmacology prediction found that polyphyllin I could regulate the resistance of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors and other related signaling pathways by regulating vascular endothelial growth factor A (VEGFA), mammalian target of rapamycin (mTOR), steroid receptor coactivator (SRC), EGFR and other key targets, so as to play the role of anti-angiogenesis. The results of qRT-PCR experiment confirmed the above targets. **Conclusion** Excessive dosage of polyphyllin I can cause developmental toxicity of zebrafish embryos. Under safe dose conditions, polyphyllin I exerts significant anti-angiogenesis activity by regulating EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance and other related pathways. This study provided a way of thinking for the safety and development of clinical drug use of polyphyllin I, and also provided a reference for the comprehensive evaluation of “efficacy-safety” of toxic traditional Chinese medicine.

Key words: polyphyllin I; zebrafish; developmental toxicity; anti-angiogenesis; vascular endothelial growth factor A; mammalian target of rapamycin; steroid receptor coactivator; epidermal growth factor receptor

毒性中药是中药临床使用中的特色,且大多数毒性中药在临床疑难杂症中发挥着显著的治疗作用。然而,目前大多数研究者更多关注于毒性中药中活性物质基础筛选以及活性机制探讨,对毒性中药的安全性研究相对缺乏,导致其临床应用中毒-效之间的联系和转化不明确,限制了毒性中药的广泛使用。因此,选择合适的技术和方法对毒性中药的毒-效进行同步评价,能够为阐释毒性中药的内涵和本质特征、指导临床安全使用提供参考。重楼皂苷 I 是中药重楼中含量最高的甾体皂苷类成分^[1],具有抗炎^[2]、抗肿瘤^[3]、抗菌^[4]和心血管保护^[5]等作用,然而,重楼皂苷 I 也存在毒性报道,且多集中于肝毒性^[6-7]、溶血作用^[8]、生殖毒性^[9]等,但目前未见胚胎发育毒性相关报道。同时,重楼皂苷 I 活性机制及毒-效关系尚不明确,一定程度上限制了其在临床中的应用。

血管新生是在原有血管的基础上构建新血管的过程^[10],肿瘤的增殖、分化依赖于血管新生,抗血管新生可能是治疗癌症的有效方法^[11]。目前抗血管新生药物及与血管新生有关的靶点识别已成为肿瘤靶向治疗的重要研究方向之一^[12]。研究表明,重楼皂苷 I 在抗肿瘤方面疗效显著^[3],但目前在其抑制血管新生方面研究较少。因此本研究对重楼皂苷 I 是否具有抗血管新生作用进行考察,并在假设成立

的前提下对其作用机制进行初步探究,旨在为重楼皂苷 I 抗肿瘤治疗提供新的思路。

斑马鱼与人类具有 87% 的基因同源性,其胚胎透明且实验周期短,被广泛应用于药物研究^[13],既具有细胞等体外实验用药量少、实验费用低、高通量等特点^[14],又具备整体动物实验可同步观察多个器官、进行药效学及安全性评价等优势^[15-16]。因此,本研究以斑马鱼为模式生物,对重楼皂苷 I 的发育毒性及抗血管新生活性进行探究,并通过网络药理学预测重楼皂苷 I 抗血管新生的作用机制并通过 qRT-PCR 加以验证,以期为重楼皂苷 I 的临床用药安全及开发应用奠定基础。

1 材料

1.1 动物

AB 系野生型斑马鱼和 Tg (fabp10a:dsRed; ela3l:EGFP)、Tg (VHL:cm1c-gfp) 荧光转基因斑马鱼购自中国科学院水生生物研究所,由北京中医药大学斑马鱼实验平台养殖于集中式斑马鱼养殖系统。斑马鱼的养殖、繁育和实验所需样本的收集和处理均按照 *Zebrafish Book* 标准^[17]进行。

1.2 药品与试剂

重楼皂苷 I (批号 PCB153,质量分数 $\geq 98\%$)购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;总蛋白测定试剂盒(批

号 20220322)、总胆固醇 (total cholesterol, T-CHO) 试剂盒 (批号 20211023)、三酰甘油 (triglyceride, TG) 试剂盒 (批号 20210716)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂盒 (批号 20210719) 购自南京建成生物工程研究所; 4%多聚甲醛 (批号 p1110) 购自北京生物科技有限公司; 20×SSC 缓冲液 (批号 DE0176)、丙二醇 (批号 0575-41)、油红 O 染料 (批号 S19039) 购自北京拜尔迪生物技术有限公司; 丙三醇 (批号 1198677873) 购自北京虹湖联合化工产品有限公司; NaCl、KCl、Na₂HPO₄、K₂HPO₄、MgSO₄、NaHCO₃、CaCl₂ 均为分析纯, 购自北京化工厂; TransZol Up Plus RNA Kit (批号 ER501)、Fast King cDNA 第一链合成试剂盒 (批号 KR116) 购自兰博利德生物技术有限公司。

1.3 仪器

Stemi508 型体视显微镜 (卡尔·蔡司股份公司); TE-2000-S 型光学倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); HPG-280BX 型光照培养箱 (哈尔滨市东联电子技术开发公司); ESEN-AW-S 型斑马鱼养殖系统 (北京爱生生物科技有限公司); Gene5 型酶标仪 (伯腾仪器有限公司); CFX96 型 Real-Time PCR System (美国 Bio-Rad 公司); NanoDrop 2000 型微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 给药溶液的配制

参照课题组前期研究方法^[18]配制斑马鱼胚胎养殖水和给药溶液, 精密称取 0.003 mg 重楼皂苷 I 溶于 200 μL 的二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解液 (DMSO 体积分数小于 0.5%), 充分摇匀后待完全溶解即为储备液。实验前, 用胚胎培养液将储备液稀释至所需质量浓度即可。

2.2 重楼皂苷 I 的安全性评价

2.2.1 重楼皂苷 I 的安全性评价及安全剂量的确定 根据预实验结果, 将受精后 6 h (6 h post fertilization, 6 hpf) 的健康胚胎随机转入含有不同浓度的重楼皂苷 I 溶液的 12 孔板中暴露 96 h, 以胚胎水为对照组, 于药物不同处理时间观察并记录胚胎死亡率和健康状态。在实验终点, 利用 Graph Pad Prism 9 软件绘制剂量-反应曲线, 计算 20%致死浓度 (20% lethal concentration, LC₂₀)。

2.2.2 重楼皂苷 I 对不同发育阶段斑马鱼胚胎主要脏器发育表型的影响 在安全剂量条件下 (<LC₀) 暴露给药, 观察药物暴露 24、48、72、96 hpf 后胚

胎的发育情况与形态变化, 并拍照记录; 于倒置显微镜下观察各剂量组斑马鱼幼鱼心脏发育情况, 录像记录各剂量组 24 hpf 时 1 min 内胚胎鱼尾的自主抽动次数 ($n=6$) 及 96 hpf 时斑马鱼幼鱼 10 s 内心脏跳动次数 ($n=6$); 每组收集 80 尾幼鱼样本, 于 PBS (1:9) 中匀浆, 2500 r/min 离心 10 min, 取上清液按照试剂盒说明书测定 T-CHO、TG、LDL-C 水平; 暴露终点时, 使用 2.5 μg/mL 吖啶橙染色确认重楼皂苷对主要脏器的影响; 通过油红染色方法确认主要脏器脂肪堆积状态。

2.3 重楼皂苷 I 的抗血管新生活性评价

在安全剂量条件下 (<LC₀) 进行暴露给药, 同时设置对照组 (斑马鱼培养水), 在实验暴露终点, 于倒置显微镜下观察各浓度组斑马鱼的节间血管、肝脏及心脏表型, 拍照记录。观察完整体节间血管 (intersegmental vessel, ISV) 和缺陷 ISV 的形态, 手动统计各组 ISV 数目, 以评估重楼皂苷 I 的抗血管新生活性; 斑马鱼的 SV-BA 距离即静脉窦 (sinus venosus, SV) 和动脉球 (bulbus arteriosus, BA) 的间距, 若斑马鱼心脏受到影响, 其心房和心室的位置将发生改变, SV-BA 距离随之改变, 故以此作为本研究心脏毒性评估指标, 用 Image J 软件测量各浓度组 SV-BA 距离及肝面积变化。

2.4 基于网络药理学研究重楼皂苷 I 抗血管新生的作用机制

2.4.1 活性靶点预测及抗血管新生靶点获取 通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库和 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中进行重楼皂苷 I 的靶点基因预测。以 “antiangiogenic” 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中筛选获得抗血管新生的靶点基因。取重楼皂苷 I 靶点基因与抗血管新生靶点基因的交集作为重楼皂苷 I 发挥抗血管新生作用的潜在靶点基因, 并运用 Venny2.1 (<https://string-db.org/>) 绘制 Venny 图, 通过 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 并利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络。

2.4.2 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将关键靶点基因输入 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>), 获得 GO 功能注释及 KEGG 通路富集分析结果, 并

利用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/login/>) 进行可视化分析。

2.4.3 qRT-PCR 验证 取“2.2.1”项下处理的斑马鱼, 加入 Trizol 试剂提取总 RNA 后, 通过凝胶电泳和紫外分光光度计检测 RNA 的完整性, 再用 FastKing cDNA 合成试剂盒说明逆转录为 cDNA 后进行 qRT-PCR 分析。β-actin、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, *VEGFA*)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, *mTOR*)、类固醇受体共激活因子 (steroid receptor coactivator, *SRC*)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*)、*JUN*、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, *CASP3*)、表皮生长因子受体 2 (epidermal growth factor receptor 2, *ERBB2*)、趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, *CXCR4*)、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, *FGF2*) 引物序列见表 1。

2.5 统计学分析

运用 SPSS 21.0 统计软件处理数据, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组之间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用最小显著性差异法, 采用 GraphPad Prism 9 进行绘图。

表 1 引物序列

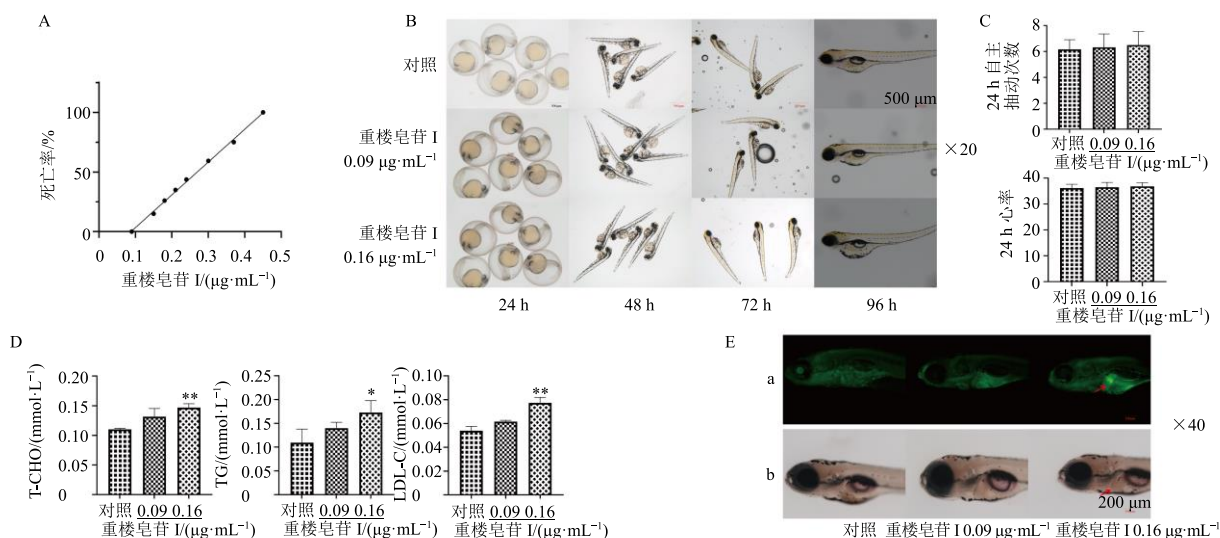
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
β-actin	F: GGCTGTGCTGTCCCTGTAT R: GGGCGTAACCCCTCGTAGAT
VEGFA	F: TACATCCCCTGTGTGGTTCTC R: TTGACCCGACACCTCCATAG
mTOR	F: GGGAGAGCGTATGAGAGAGGAGATG R: AAAGTGGTGAAGGCGGTGATGTG
SRC	F: AACCGCAGTCCACCATAGAGG R: ACGCCGCTAATATGCCGATTC
EGFR	F: CTGGACGAGACGGAAGAGGAGTATC R: GCTGAAGAAGGGCTTTGTGGAGAG
JUN	F: GAGAGCCAGGAGCGGATTAAAGC R: TGCGACTTCAGGGTCTTGACTTTG
CASP3	F: CGGAGACTGTGTGGACGCAAAG R: GAAGGCATGGGATTGAGGCTTGG
ERBB2	F: GAGGCTTATGTGATGGCAGGTGTAG R: CCGTATGGCATGAGCTGAGTAACC
CXCR4	F: ATGGACTTGTGGTGTCTGTGATGG R: AAATGGCAGGGTGAGGACAAACAG
FGF2	F: AAGGCATCTGTACCAACCGTTTCC R: AGTCGGGATACTTGCGGGATCTG

3 结果

3.1 重楼皂苷 I 的安全性评价

3.1.1 剂量-反应曲线的绘制 依据统计药物处理后 96 hpf 胚胎的死亡率, 用 GraphPad Prism 9 软件曲线拟合绘制剂量-反应曲线 (图 1-A), 拟合所得曲



A-不同质量浓度的重楼皂苷 I 处理 24 h 后斑马鱼幼鱼的量-毒曲线 B-重楼皂苷 I 对不同发育阶段斑马鱼胚胎发育影响的表型观察 C-重楼皂苷 I 对斑马鱼胚胎 24 h 自主抽动次数及对幼鱼 96 h 心率的影响 D-重楼皂苷 I 对 T-CHO、TG 及 LDL-C 含量的影响 E-吖啶橙和油红 O 染色 (图 E-a 中箭头表示肝细胞区域, 图 E-b 中箭头表示肝脏脂肪变性区域) 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

A-toxicity curves of zebrafish larvae treated with different concentrations of polyphyllin I for 24 h B-phenotypic observation of the effects of polyphyllin I on embryonic development of zebrafish at different developmental stages C-effect of polyphyllin I on 24 h spontaneous pumping times of embryos and 96 h heart rate of zebrafish larvae D-effect of polyphyllin I on contents of T-CHO, TG and LDL-C E-acridine orange and oil red O staining (arrows in fig. E-a represent areas of hepatocytes and arrows in fig. E-b represent areas of hepatic steatosis) * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below figures

图 1 重楼皂苷 I 的安全性评价

Fig. 1 Safety evaluation of polyphyllin I

线方程为 $y=270x-23.62$, $R^2=0.9975$ 可计算出 LC_{20} 为 $0.16 \mu\text{g/mL}$ 。

3.1.2 重楼皂苷 I 对不同发育阶段斑马鱼胚胎主要脏器发育表型的影响 亚致死浓度暴露条件下, 与对照组比较, 各暴露组 24、47、72 hpf 的胚胎及幼鱼未见明显异常; 96 hpf 的 $0.16 \mu\text{g/mL}$ 组幼鱼均出现明显的毒性特征, 如卵黄囊吸收延迟, 脊柱弯曲, 尾巴畸变等 (图 1-B)。与对照组比较, 0.09、 $0.16 \mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼在 24 hpf 的 1 min 内自主抽动次数及 96 hpf 的 10 s 内心脏跳动次数差别不大, 均无显著的统计学差异 (图 1-C); 此外, $0.16 \mu\text{g/mL}$ 组中 T-CHO、TG、LDL-C 含量均明显升高 ($P<0.05$ 、 0.01 , 图 1-D)。吖啶橙染色结果显示, $0.16 \mu\text{g/mL}$ 组肝脏区域出现黄绿色荧光小点, 表明存在肝细胞凋亡现象 (图 1-E-a), 同时油红 O 染色结果显示该浓度组斑马鱼肝脏区域呈现红色, 提示存在肝脏脂肪变性 (图 1-E-b)。

3.2 重楼皂苷 I 的抗血管新生活性评价结果

安全剂量条件下, 与对照组比较, 各组斑马鱼肝脏均形态清晰, 呈透明状, 未见明显肝损伤 (图 2-A), 同时各组肝脏面积无显著性差异 (图 2-C)。斑马鱼的 SV-BA 距离, 即 SV 和 BA 的间距, 会在斑马鱼心脏受到影响后, 随心房和心室位置的改变而改变, 而在

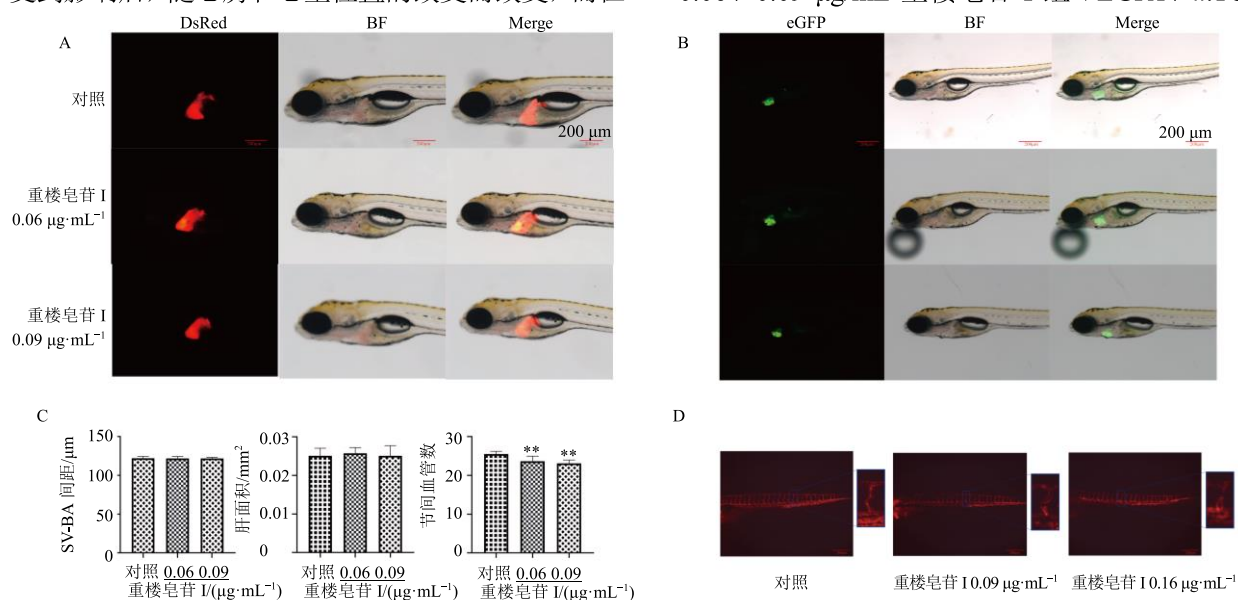
本实验中, 各组 SV-BA 间距无显著性差异 (图 2-B、C)。然而, 0.06 、 $0.09 \mu\text{g/mL}$ 组的节间血管新生缺失且杂乱、断裂 (图 2-D), 同时节间血管数下降且与对照组存在显著性差异 ($P<0.01$, 图 2-C)。

3.3 网络药理学预测重楼皂苷 I 抗血管新生的作用机制

3.3.1 活性靶点预测及抗血管新生靶点获取 重楼皂苷 I 在 SwissTargetPrediction 数据库中共预测得靶点基因 208 个, 在 GeneCards 数据库中预测抗血管新生相关靶点共 237 个, 将二者取交集所得重楼皂苷 I 发挥抗血管新生活性的 24 个潜在靶点基因 (图 3-A)。将筛选基因导入 STRING 数据库, 选取置信度 >0.4 的蛋白互作关系数据并通过 Cytoscape 3.7.2 构建网络, 得到度值前 10 位的关键靶点 VEGFA、mTOR、SRC、EGFR、JUN、CASP3、信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、ERBB2、CXCR4、FGF2 (图 3-B)。

3.3.2 GO 功能与 KEGG 通路分析 使用 Metascape 数据库对 10 个关键靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 并利用微生信平台进行可视化分析 (图 3-C、D)。

3.3.3 qRT-PCR 验证 如图 4 所示, 与对照组比较, 0.06 、 $0.09 \mu\text{g/mL}$ 重楼皂苷 I 组 VEGFA、mTOR、



A-重楼皂苷 I 对斑马鱼肝脏影响的表型观察 B-重楼皂苷 I 对斑马鱼心脏影响的表型观察 C-重楼皂苷 I 对斑马鱼 SV-BA 间距、肝面积和节间血管数的影响 D-重楼皂苷 I 对斑马鱼节间血管的影响

A-phenotypic observation of the effect of polyphyllin I on zebrafish liver B-phenotypic observation of the effect of polyphyllin I on zebrafish heart C-effect of polyphyllin I on SV-BA spacing, liver area and number of internode vessels of zebrafish D-effect of polyphyllin I on internode blood vessels of zebrafish

图 2 安全剂量下重楼皂苷 I 对斑马鱼抗血管新生活性研究 (x50)

Fig. 2 Anti-angiogenesis activity of polyphyllin I in zebrafish at safe dose (x50)

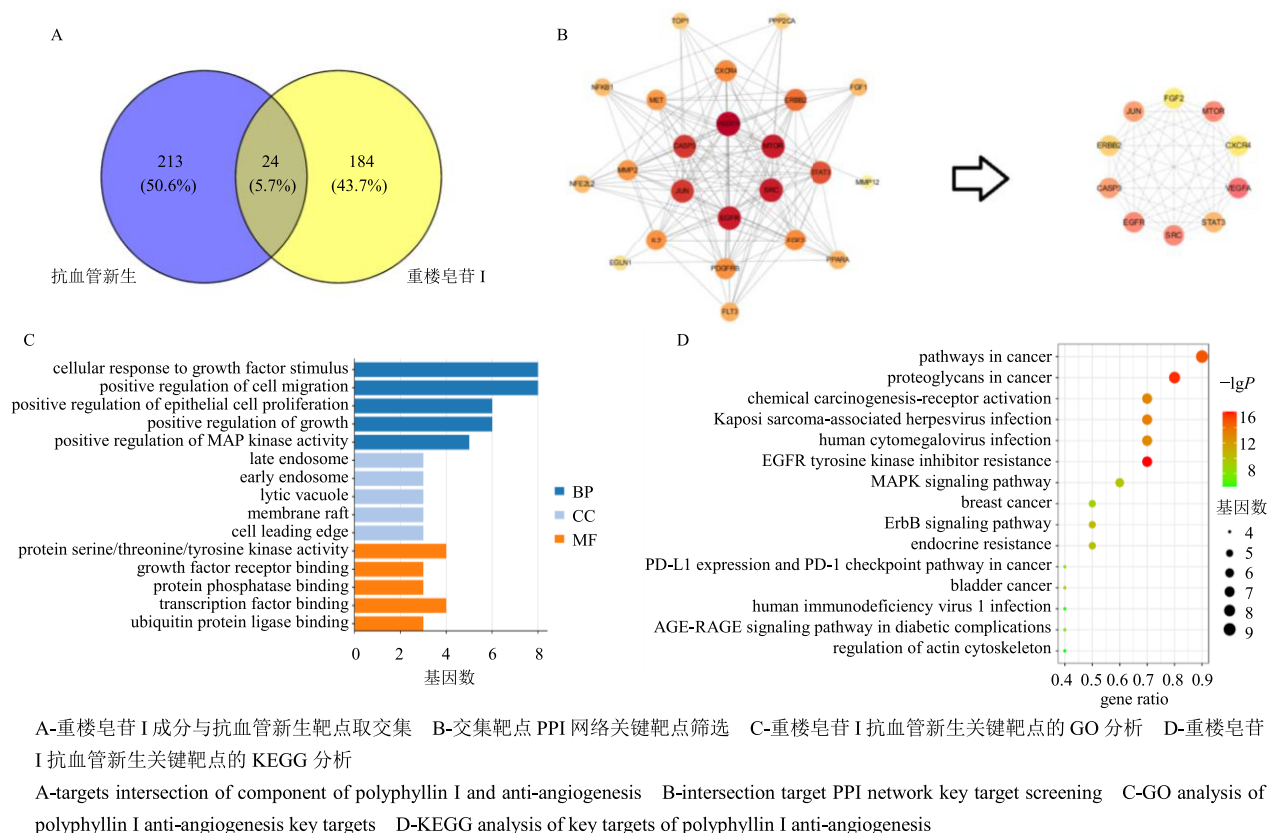


图 3 网络药理学预测重楼皂苷 I 抗血管新生的作用机制

Fig. 3 Anti-angiogenesis mechanism of polyphyllin I predicted by network pharmacology

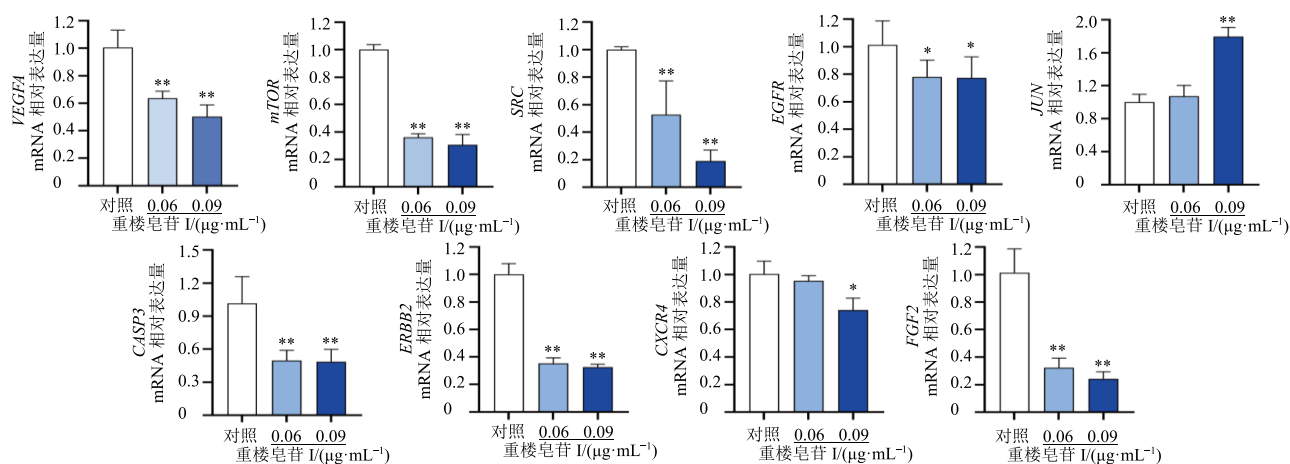


Fig. 4 Gene expressions verified by qRT-PCR

SRC、*EGFR*、*CASP3*、*ERBB2* 和 *FGF2* mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)； $0.09 \mu\text{g/mL}$ 组 *JUN* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)，*CXCR4* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

近年来，斑马鱼因其在基因组序列、信号通路、细胞分子机制方面与哺乳动物（包括人类）存在较

高的一致性的显著优势使其广泛被应用于中药药效及安全性评价中。此外，斑马鱼生命周期的短暂性、胚胎发育的透明性、发育阶段的明确性等优势能够为复杂化学体系中药的多生物效应提供准确的评价终点^[19-20]。基于此，本实验以斑马鱼胚胎为模型，系统评价了重楼皂苷 I 的发育毒性及抗血管新生活性，以期为重楼的临床安全使用以及其他毒性中药

的综合评价提供参考。

安全性评价结果表明,在一定条件下(0.16 $\mu\text{g/mL}$)的重楼皂苷 I 暴露确实能够引起幼鱼出现明显的毒性表型特征,同时主要能够引起肝细胞凋亡、脂肪变性及部分生活功能指标显著异常等,与前期课题组的研究结果一致。然而,在较低质量浓度暴露条件下,重楼皂苷 I 不会引起斑马鱼肝脏和心脏表型出现明显变化,却能够显著抑制斑马鱼节间血管新生。本研究采用斑马鱼模型成功地对重楼皂苷 I 的“安全性-有效性”进行了系统评价,证明了斑马鱼在多生物学事件综合评价中的显著优势,也为其他毒性中药的综合评价提供了思路。

基于此,本研究采用网络药理学和 qRT-PCR 技术对重楼皂苷 I 抗血管新生机制做进一步探讨,发现重楼皂苷 I 的抗血管生成活性可能与 VEGFA、EGFR、FGF2、JUN、CASP3 等 10 个关键靶点的调节密切相关。GO 生物功能分析结果显示,细胞增殖、细胞信号调控、化学刺激等可能为重楼皂苷 I 抗血管新生的关键生物过程,涉及催化活性、受体结合等阶段。KEGG 通路富集分析结果显示,重楼皂苷 I 可作用于 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染等通路,影响血管新生相关疾病发展过程。EGFR 可抑制 EGFR 酪氨酸激酶活性,阻断 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性信号通路,诱导细胞凋亡^[21]; VEGF 能促进血管通透性增加,其表达水平与原发肿瘤的大小、血管生成、淋巴管转移等多种因素呈正相关^[22],其中 VEGFA 在肿瘤新生血管的生成中发挥主导作用,其与内皮细胞增殖、血管通透性增加等密切相关^[23]; mTOR 信号通路下游为促血管生成性缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α),抑制 mTOR 表达有利于下调 HIF-1 α ,进而发挥抗血管新生作用^[24]; SRC 信号传导的激活通过上调各种肿瘤中的信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 转录调节促血管生成分子来促进血管生成^[25]; 凋亡性的 Caspase 具有特有的半胱氨酸酶活性,启动者 Caspase 被激活,其他的执行者 Caspase,包括 CASP3 可以降解细胞成分并产生凋亡^[26]; ERBB2 为抗 EGFR 单克隆抗体的生物标志物,研究表明 ERBB2 抑制剂在不同类型的肿瘤细胞中下调血管生成生长因子的表达或使抗血管生成因子上调^[27]。CXCR4 是一种 G 蛋白偶联受体,在缺氧、应激、损伤、损伤血管组织

时表达上调^[28]。FGF 可以促进新生血管生成,为肿瘤生长提供营养,在 FGFR 配体中,FGF2 已被报道具有促血管新生作用,能够诱导内皮细胞的增殖和迁移^[29]。以上说明,重楼皂苷 I 可能是通过上述通路及作用靶点发挥抗血管新生作用,从而阻止疾病进一步发展。

综上,本研究以重楼皂苷 I 为例,首次利用斑马鱼对其安全性和抗血管生成活性进行统一评价,证实了科学合理使用药物,在发挥药效的同时不会造成明显的不良反应。此外,本研究推测,重楼皂苷 I 发挥抗血管新生活性,其潜在机制可能与 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性信号通路等相关。为重楼皂苷 I 的临床用药安全及开发利用提供了思路,同时也为其他毒性中药的“有效性-安全性”综合评价提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙星,李承祥,陈扬扬,等.重楼皂苷 I 在大鼠膝关节炎中的治疗作用[J].医药论坛杂志,2021,42(4): 32-35.
- [2] Wang Q, Zhou X, Zhao Y, et al. Polyphyllin I ameliorates collagen-induced arthritis by suppressing the inflammation response in macrophages through the NF- κ B pathway [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2091.
- [3] Lai L, Shen Q, Wang Y, et al. Polyphyllin I reverses the resistance of osimertinib in non-small cell lung cancer cell through regulation of PI3K/Akt signaling [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 419: 115518.
- [4] 王奇飒,孙东杰,何黎,等.重楼皂苷及不同皂苷成分对痤疮相关病原菌抑菌效果的评价[J].中国皮肤性病杂志,2016,30(9): 899-901.
- [5] Huang R Z, Shu J, Dai X Q, et al. The protective effect of polyphyllin I on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(10): 644.
- [6] Li Z Q, Fan Q Q, Chen M L, et al. The interaction between polyphyllin I and SQLE protein induces hepatotoxicity through SREBP-2/HMGCR/SQLE/LSS pathway [J]. *J Pharm Anal*, 2023, 13(1): 39-54.
- [7] 李芝奇,陈美琳,郭思敏,等.基于斑马鱼模型结合网络药理学探究重楼肝毒性机制[J].世界中医药,2023,18(6): 739-747.
- [8] 陈清,阎姝.重楼的药理作用及其毒性反应的研究进展[J].医药导报,2012,31(7): 886-888.
- [9] 沈放,杨黎江,彭永芳,等.重楼皂苷类化合物体外抗生育功效研究[J].中国现代应用药学,2010,27(11): 961-964.

- [10] 朱宗萍, 王继森, 廖婉, 等. 基于模式生物斑马鱼研究姜黄抗血管新生的作用及机制 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3257-3268.
- [11] Nanda A, St Croix B. Tumor endothelial markers: New targets for cancer therapy [J]. *Curr Opin Oncol*, 2004, 16(1): 44-49.
- [12] Russo M, Giavazzi R. Anti-angiogenesis for cancer: Current status and prospects [J]. *Thromb Res*, 2018, 164(Suppl 1): S3-S6.
- [13] 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.
- [14] 李红燕, 谢倩, 王成, 等. 斑马鱼在药物毒理学评估中应用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 278-288.
- [15] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 等. 基于斑马鱼模型的吴茱萸提取物肝毒性评价 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1768-1775.
- [16] 赵崇军, 田敬欢, 王金凤, 等. 斑马鱼在中药研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2635-2648.
- [17] Westerfield M. *The Zebrafish Book* [M]. Eugene: University of Oregon Press, 1995.
- [18] Li Z, Tang Y, Liu Z, *et al*. Hepatotoxicity induced by PPVI and PPVII in zebrafish were related to the cholesterol disorder [J]. *Phytomedicine*, 2022, 95: 153787.
- [19] Cao Z, Huang Y, Xiao J, *et al*. Exposure to diclofop-methyl induces cardiac developmental toxicity in zebrafish embryos [J]. *Environ Pollut*, 2020, 259: 113926.
- [20] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 等. 基于斑马鱼模型的中药安全性评价研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 278-287.
- [21] Losanno T, Rossi A, Maione P, *et al*. Anti-EGFR and antiangiogenic monoclonal antibodies in metastatic non-small-cell lung cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(6): 747-758.
- [22] Maehara Y, Kabashima A, Koga T, *et al*. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma [J]. *Surgery*, 2000, 128(3): 408-416.
- [23] Melincovici C S, Boşca A B, Şuşman S, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59(2): 455-467.
- [24] Li W X, Yan J, Tian H, *et al*. A platinum@polymer-catechol nanobreaker enables radio-immunotherapy for crippling melanoma tumorigenesis, angiogenesis, and radioresistance [J]. *Bioact Mater*, 2022, 22: 34-46.
- [25] Tao X, Yin L, Xu L, *et al*. Dioscin: A diverse acting natural compound with therapeutic potential in metabolic diseases, cancer, inflammation and infections [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 137: 259-269.
- [26] 郭帅, 黄蓝萱, 贺高乐, 等. 兔单侧椎动脉结扎致颈髓急性缺血改变的研究 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(6): 541-551.
- [27] Petit A M, Rak J, Hung M C, *et al*. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells *in vitro* and *in vivo*: Angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors [J]. *Am J Pathol*, 1997, 151(6): 1523-1530.
- [28] Marchese A, Benovic J L. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(49): 45509-45512.
- [29] Giacomini A, Chiodelli P, Matarazzo S, *et al*. Blocking the FGF/FGFR system as a “two-compartment” antiangiogenic/antitumor approach in cancer therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 107: 172-185.

[责任编辑 李亚楠]