

# 利用斑马鱼模型和代谢组学技术研究丹红注射液促进血管生成作用及潜在代谢机制

王芳<sup>1,2</sup>, 毕成浩<sup>1</sup>, 毕文杰<sup>2</sup>, 李梦娇<sup>2</sup>, 王松松<sup>2</sup>, 韩利文<sup>2\*</sup>, 李遇伯<sup>1\*</sup>

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

2. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学院, 山东 济南 250117

**摘要:** **目的** 基于斑马鱼模型研究丹红注射液促进血管生成作用, 并利用代谢组学和 qRT-PCR 技术探索其代谢机制。**方法** 利用血管特异标记绿色荧光蛋白的转基因品系 Tg (*flk1:EGFP*) 斑马鱼作为模式动物, 观察丹红注射液对斑马鱼节间血管的促进作用。利用基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术 (ultra performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS) 的非靶向代谢组学检测斑马鱼在血管生成表型变化过程中的内源性差异代谢物, 进一步利用 qRT-PCR 技术探索与丹红注射液促进血管生成作用相关的潜在代谢机制。**结果** 丹红注射液能够呈剂量相关性逆转血管内皮细胞生长因子受体抑制剂 PTK787 对斑马鱼节间血管的抑制作用 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 丹红注射液组有 7 个内源性代谢物水平发生了显著变化, 主要与戊糖磷酸途径、精氨酸和鸟氨酸代谢途径相关。qRT-PCR 结果显示, 丹红注射液显著逆转了斑马鱼体内与戊糖磷酸通路关键酶 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, *g6pd*)、转醛缩酶 (transaldolase 1, *aldo1*)、转酮醇酶 (transketolase a, *tkta*)、核糖-5-磷酸异构酶 A (ribose 5-phosphate isomerase A, *rpia*) 和 5-磷酸核酮糖 3-差向异构酶 (ribulose-5-phosphate-3-epimerase, *rpe*) 基因的表达水平 ( $P < 0.05, 0.01$ )。**结论** 利用斑马鱼模型验证了丹红注射液的显著血管生成作用, 代谢组学和 qRT-PCR 研究结果表明其血管生成主要与磷酸戊糖途径有关。

**关键词:** 丹红注射液; 血管生成; 斑马鱼; 代谢组学; 磷酸戊糖途径

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)16-5551-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.017

## Effect and potential metabolic mechanism of Danhong Injection on angiogenesis based on zebrafish model and metabonomics technology

WANG Fang<sup>1,2</sup>, BI Chenghao<sup>1</sup>, BI Wenjie<sup>2</sup>, LI Mengjiao<sup>2</sup>, WANG Songsong<sup>2</sup>, HAN Liwen<sup>2</sup>, LI Yubo<sup>1</sup>

1. College of Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. School of Pharmacy, Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250117, China

**Abstract: Objective** To study the effect of Danhong Injection (丹红注射液, DHI) on angiogenesis based on zebrafish model and explore its metabolic mechanism by metabonomics and qRT-PCR. **Methods** The transgenic strain Tg (*flk1:EGFP*) was used as model animal to observe the promoting effect of DHI on the blood vessels of zebrafish internodes. The endogenous differential metabolites of zebrafish in the process of angiogenic phenotype change were detected by non-targeted metabonomics based on ultra performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), and the potential metabolic mechanism related to the angiogenic effect of DHI was further explored by qRT-PCR. **Results** DHI could reverse the inhibitory effect of vascular endothelial growth factor receptor inhibitor PTK787 on interganglia vessels of zebrafish in a dose-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, seven endogenous metabolites levels were found to have significant changes in DHI group, mainly related to the pentose phosphate pathway, arginine and ornithine metabolic pathway. qRT-PCR results showed that DHI significantly reversed the expression levels of glucose-6-phosphate dehydrogenase (*g6pd*), transaldolase 1 (*aldo1*), transketolase a (*tkta*), ribose 5-phosphate

收稿日期: 2024-04-09

基金项目: 山东省中医药高层次人才培养项目; 济南市“新高校 20 条”资助项目 (202333018)

作者简介: 王芳, 硕士研究生, 研究方向为药物分析学。E-mail: 17852097656@163.com

\*通信作者: 韩利文, 副研究员, 博士生导师, 从事药物筛选及中药质量控制研究。E-mail: hanliwen08@126.com

李遇伯, 教授, 博士生导师, 从事中药安全性与合理用药研究。E-mail: yuboli@163.com

isomerase A (*rpia*) and ribulose-5-phosphate-3-epimerase (*rpe*) genes in the pentose phosphate pathway in zebrafish ( $P < 0.05, 0.01$ ).

**Conclusion** Zebrafish model was used to verify the remarkable angiogenesis effect of DHI. Metabonomics and qRT-PCR studies showed that the angiogenesis of DHI was mainly related to pentose phosphate pathway.

**Key words:** Danhong Injection; angiogenesis; zebrafish; metabonomics; pentose phosphate pathway

血管生成, 即由原有血管生成新血管, 对维持循环功能和能量供应至关重要<sup>[1]</sup>。心肌缺血、脑缺血、创伤和骨折愈合缓慢、闭塞性血管炎、糖尿病周围血管疾病等, 都可归因于血管生成不足<sup>[2-3]</sup>。探索与血管相关的新的生物学机制对疾病的预防和治疗至关重要。

丹红注射液是由丹参、红花组成的中药复方注射剂, 具有活血化瘀、通脉舒络的功效<sup>[4]</sup>, 临床上主要用于治疗缺血性脑血管疾病<sup>[5-7]</sup>、冠心病<sup>[8]</sup>和心绞痛<sup>[9]</sup>等。研究表明, 丹红注射液具有明显的促进心、脑等急性梗死病灶的血管生成作用, 能够改善组织氧供应及代谢功能缓解症状<sup>[10-15]</sup>。但是丹红注射液促进血管生成的分子代谢机制尚缺乏足够的证据。

斑马鱼是研究代谢性血管生成的最佳体内模型, 因为它具有体外受精、生产大量受精卵的成本效益以及通过转基因标记可视化血管而无需解剖的能力, 因此易于在实验中使用<sup>[16]</sup>。斑马鱼胚胎中节段性血管的发育遵循可预测的时间表, 有助于识别细微的代谢影响<sup>[17]</sup>。并且, 发育中的斑马鱼胚胎的血管解剖结构与其他脊椎动物具有显著的相似性<sup>[18]</sup>。此外, 斑马鱼基因组测序揭示了斑马鱼和人类在蛋白质编码基因上有相当程度的保守性<sup>[19]</sup>。这种相似性强调了斑马鱼作为研究一系列人类疾病的模式生物的效用<sup>[20-21]</sup>。鉴于这些优势, 斑马鱼越来越被认为是研究体内血管发生和血管生成的宝贵物种<sup>[22]</sup>。因此, 本研究利用斑马鱼模型来研究丹红注射液促进血管生成作用相关的代谢机制, 以期为进一步了解丹红注射液治疗梗死性疾病提供新证据。

## 1 材料

### 1.1 动物

转基因斑马鱼 Tg (*flil: EGFP*) 由山东第一医科大学斑马鱼研究中心提供, 在自动循环槽系统中进行 14 h 光照/10 h 黑暗循环。每天投喂 2 次卤虾, 水温维持在  $(28 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , pH  $7.0 \pm 0.5$ 。通过自然产卵获得胚胎, 在产卵 1 h 后收集, 并转移到含有胚胎水 (60 mg/L 速溶海盐、pH 7.2) 的单独水箱中。在所有实验过程中仅使用受精胚胎。

### 1.2 药品与试剂

丹红注射液 (国药准字 20226866, 批号 23091019) 购自山东步长药业有限公司; 血管内皮细胞生长因子受体抑制剂 PTK787 (批号 63163722, 质量分数 98%) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 C15210581) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 脱模剂链霉菌蛋白酶 (批号 63163722) 购自瑞士 Roche 公司; PBS 缓冲液 (批号 ED0011) 购自北京索莱宝科技有限公司; 乙腈 (批号 23085026) 购自美国 TEDIA 公司; 水 (批号 112113JN) 购自杭州娃哈哈集团有限公司; SparkZol Reagent (批号 AC0101)、SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR (With gDNA Eraser, 批号 AG0305)、2×SYBR Green qPCR Mix (With ROX, 批号 AH0104) 购自山东思科捷生物技术有限公司。

### 1.3 仪器

五层单排斑马鱼养殖系统 (上海海圣生物实验设备有限公司); SZX16 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); SPX-280B-G 型博讯光照培养箱 (哈尔滨市东联电子技术开发公司); GL224I-ISCN 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); BO-IR 型样品冷冻研磨仪 (山东百欧医疗科技有限公司); MD200 型氮吹仪、Nano-300 型微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司); Waters UPLC-Q/TOF-MS (美国 Waters 公司); VELOCITY 18R 型高速冷冻离心机 (英国 Dynamica 公司); PowerPac Basic 基础电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); JY300C 型电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司); Tanon 1600 型凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司); LightCycler 480 型 qRT-PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

## 2 方法

### 2.1 丹红注射液对斑马鱼幼体节间血管的影响

PTK787 为血管内皮细胞生长因子受体抑制剂, 对斑马鱼节间血管有抑制作用, 可作为造模剂。称取适量的 PTK787 溶解在 DMSO 中配成母液 (DMSO 终体积分数不超过 0.1%<sup>[23]</sup>), 然后以养鱼水稀释成相应质量浓度。设置对照组、模型组 (0.05、

0.20、0.80、1.60 μg/mL 的 PTK787) 和丹红注射液给药组 (0.2 μg/mL 的 PTK787 和 15、30、60 μL/mL 的丹红注射液)。取受精后 24 h (24 h post fertilization, hpf) 的斑马鱼胚胎, 脱膜后置于 6 孔板中, 每孔 35~40 个胚胎, 分别加入不同浓度的药物, 在温度 28 °C 的培养箱中培养。在 48 hpf 时使用荧光显微镜观察斑马鱼表型, 用 Image J 软件定量节间血管长度。

## 2.2 代谢组学分析

**2.2.1 样本制备** 设置对照组、模型组 (0.2 μg/mL PTK787) 和丹红注射液组 (0.2 μg/mL PTK787 和 60 μL/mL DHI), 按“2.1”项下方法处理, 将 48 hpf 各组斑马鱼胚胎转移至 1.5 mL EP 管中, 每管 40 个胚胎, 用纯净水洗涤 3 次。加入 300 μL PBS 缓冲液, 研磨机匀浆 6 min, 14 000 r/min 离心 15 min, 取 200 μL 上清液与 600 μL 乙腈混合, 涡旋混合 120 s。4 °C、14 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液, 用氮气吹风机干燥。随后, 加入 200 μL 乙腈-水 (1:1) 以促进溶解。旋涡 60 s, 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 180 μL 进行代谢组学分析。

**2.2.2 色谱条件** Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~0.5 min, 1% B; 0.5~2 min, 1%~50% B; 2~9 min, 50%~99% B; 9~10 min, 99% B; 10~10.5 min, 99%~1% B; 10.5~14 min, 1% B; 进样量 2 μL; 柱温 40 °C; 体积流量 0.25 mL/min。

**2.2.3 质谱条件** 采用正离子扫描模式采集质谱信号; 毛细管电压 3.0 kV; 脱溶剂气体积流量 600 L/h; 离子源温度 120 °C; 脱溶剂气温度 400 °C; 锥孔反吹氮气体积流量 50 L/h; 扫描范围 *m/z* 50~1 200; 采用高纯氮气作为辅助喷雾和溶剂去除气体。

**2.2.4 数据处理** 利用 Progenesis QI 软件对 UPLC-Q-TOF/MS 非靶向代谢组学获得的数据进行色谱峰鉴定。在离子强度归一化之后, 确定离子总数, 从而生成原始数据, 包括保留时间、*m/z* 值和归一化峰面积。采用 MarkerLynx Ezinfo 软件, 采用主成分分析 (principal components analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 进行建模, 通过检查 *R*<sup>2</sup><sub>X</sub>、*Q*<sup>2</sup> 和 *R*<sup>2</sup><sub>Y</sub> 参数以及排列测试来评估模型。在 HMDB、Metabo Analyst 数据库中进行检索, 以确定潜在的疾病生物标志物及通路。

**2.3 qRT-PCR 检测 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, *g6pd*)、转醛缩酶 (transaldolase 1, *taldo1*)、转酮醇酶 a (transketolase a, *tkta*)、核糖-5-磷酸异构酶 A (ribose 5-phosphate isomerase A, *rpia*) 和 5-磷酸核酮糖 3-差向异构酶 (ribulose-5-phosphate-3-epimerase, *rpe*) 基因表达**

为了研究斑马鱼血管生成与富集代谢物通路之间的关系, 对这些通路中编码酶的基因进行 qRT-PCR 分析, 以评估酶的表达水平。设置对照组、模型组 (0.2 μg/mL PTK787) 和 DHI 组 (0.2 μg/mL PTK787 和 60 μL/mL DHI), 每组 50 尾, 设置 3 个生物学重复。按“2.1”项下方法处理, 除水后, 使用 SparkZol Reagent 提取总 RNA, 使用 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp
<i>gapdh</i>	F: TGACCCGTGCTGCTTTCTTGAC	146
	R: TTTGCCGCCTTCTGCCTTAACC	
<i>g6pd</i>	F: GACCGAGCTGGACCTGACCTAC	133
	R: GGCTTCCCTCAACTCATCACTGC	
<i>taldo1</i>	F: TGACTACAGGACGGTGGTGATGG	100
	R: CAGCAGTGCAGGTGAGATGGTG	
<i>tkta</i>	F: GCCTCCCTCTCTTCTCCTCCTTC	144
	R: CCGTCTGCTGGTCTGGTTTGTG	
<i>rpia</i>	F: GTGTGATGAGGAGGGTTGTGTTCCG	110
	R: CCGCCTGCTGCTGTTGATTAGTC	
<i>rpe</i>	F: GAGAAGCAGCATGGCGTACAC	104
	R: CAGCACCGCACTCCATCATTC	

## 2.4 统计学分析

使用 Graphpad Prism 8.0.1 软件进行数据分析和制图, 用 Image J 软件定量节间血管长度, 多组数据之间比较采用单因素方差分析 (One way-ANOVA), 各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

### 3.1 丹红注射液对斑马鱼幼体节间血管的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, PTK787 呈剂量相关性地抑制斑马鱼幼体的节间血管长度, 质量浓度为 0.2、0.8、1.6 μg/mL 时有统计学差异, 因此后续实验以 0.2 μg/mL PTK787 造模。如图 2 所示, 与模型组比较, 丹红注射液 (30、60 μL/mL) 组斑马鱼幼体的节间血管长度显著增加 (*P*<0.01), 表明丹红注射液具有显著的促血管生成作用。

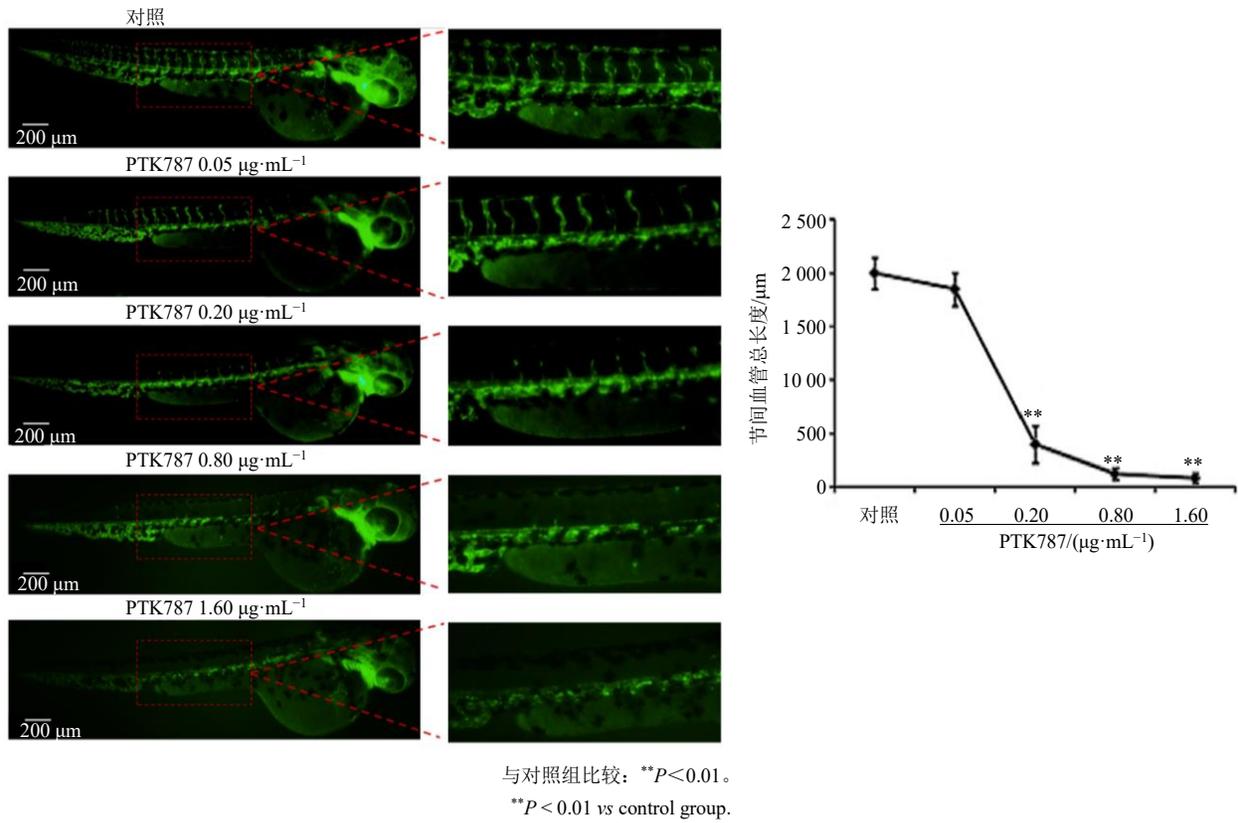


图 1 PTK787 对斑马鱼幼体节间血管的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of PTK787 on intersegmental blood vessels of zebrafish larva ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

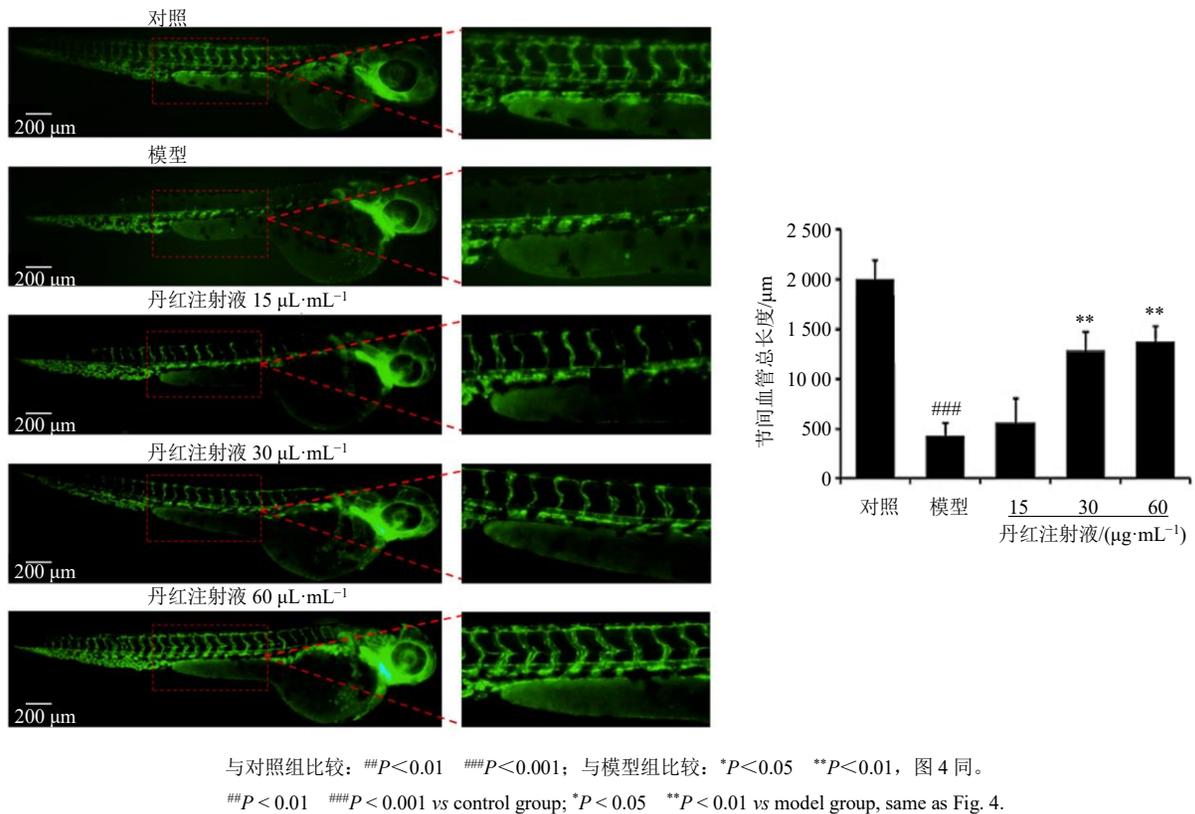


图 2 丹红注射液对 PTK787 诱导的斑马鱼幼体节间血管的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of Danhong Injection on intersegment vessels of PTK787-induced zebrafish larvae ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

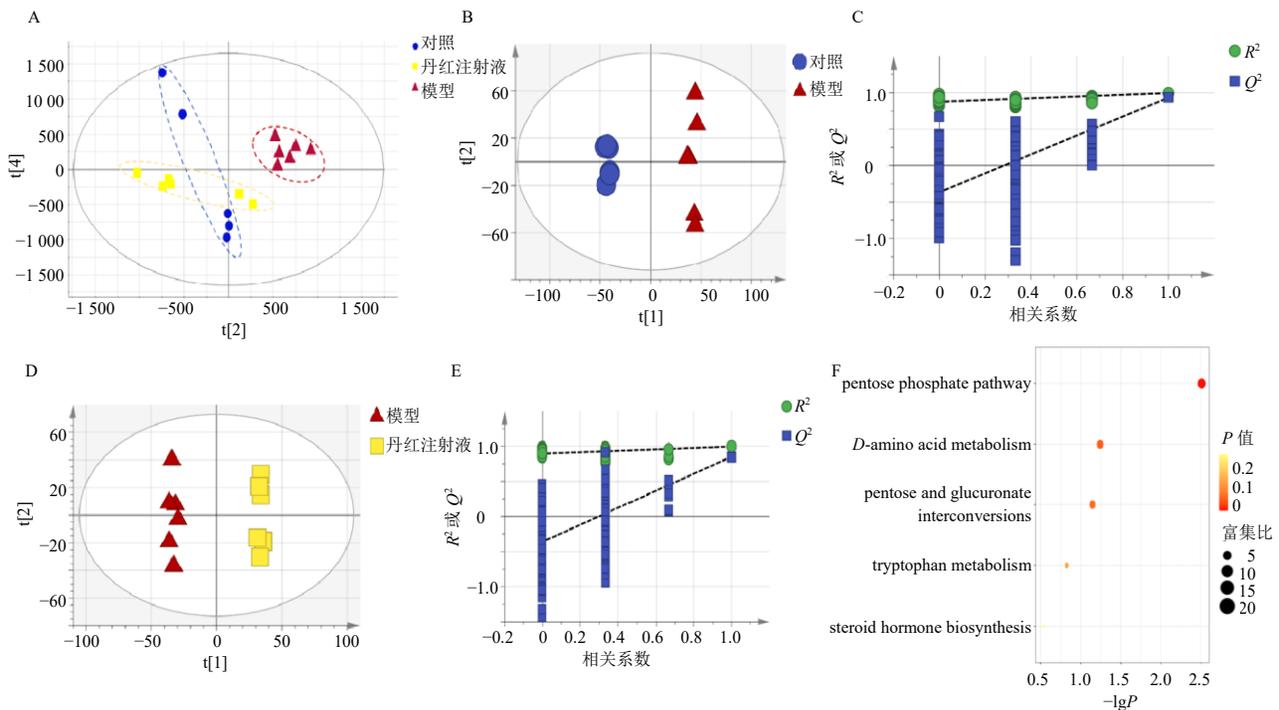
### 3.2 代谢轮廓分析

PLS 结果 (图 3-A) 显示, 对照组、模型组和丹红注射液组样本在不同象限上明显分离。3 组之间的差异比组内的差异更为明显, 表明组间存在显著的代谢变化。丹红注射液组的代谢物水平介于对照组和模型组之间, 表明在 PTK787 诱导血管生成抑制后, 模型组斑马鱼的代谢物水平与对照组相比发生了显著变化; 给予丹红注射液治疗后, 这些偏离正常水平的代谢物显示出回归基线水平的趋势。OPLS-DA 模型中 VIP>1 且 P<0.05 的代谢物被鉴

定为差异代谢物。分别建立两组之间的 OPLS-DA 模型, 结果表明预测效果较好且模型中不存在过拟合, 显示出较强的预测能力 (图 3-B~E)。

### 3.3 潜在生物标志物鉴定及代谢物通路分析

为了研究与血管生成相关的代谢标志物, 分析各组斑马鱼的代谢谱。通过变量筛选和数据库鉴定, 共发现脱氧核糖、D-核糖、视黄酸、n-乙酰-5-羟色胺、17 $\alpha$ ,21-二羟基孕烯醇酮、1-阿拉伯糖醇和 D-精氨酸 7 个生物标志物。如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组 7 种代谢物的水平降低。丹红注射液可以减



A-PLS 结果; B-对照组和模型组的 OPLS-DA; C-对照组和模型组置换检验结果; D-模型组和丹红注射液组的 OPLS-DA; E-模型组和丹红注射液组的置换检验结果; F-通路富集分析。

A-PLS result; B-OPLS-DA of control group and model group; C-replacement test results of control group and model group; D-OPLS-DA of model group and Danhong Injection group; E-replacement test results of model group and Danhong Injection group; F-pathway enrichment analysis.

图 3 对照组、模型组和丹红注射液组代谢轮廓分析

Fig. 3 Metabolic profile analysis of control group, model group and Danhong Injection group

表 2 差异代谢物

Table 2 Differential metabolites

代谢物	HMDB	分子式	m/z	模型组 vs 对照组	丹红注射液组 vs 模型组
脱氧核糖	HMDB0003224	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	133.049	↓	↑
D-核糖	HMDB0000283	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	131.035	↓	↑
视黄酸	HMDB0012874	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	299.200	↓	↑
n-乙酰-5-羟色胺	HMDB0001238	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	522.352	↓	↑
17 $\alpha$ ,21-二羟基孕烯醇酮	HMDB0006762	C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> C <sub>14</sub>	214.901	↓	↑
1-阿拉伯糖醇	HMDB0001851	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	133.049	↓	↑
D-精氨酸	HMDB0003416	C <sub>40</sub> H <sub>70</sub> O <sub>8</sub>	701.502	↓	↑

↑表示上调, ↓表示下调。

↑ indicates up-regulation, ↓ indicates down-regulation.

轻 PTK787 引起的代谢紊乱，与模型组比较，丹红注射液组以上 7 种代谢物水平升高。表明丹红注射液具有促进血管生成、调节代谢失衡的能力。

利用 Metabo Analyst 进行富集分析，确定与 7 种特定代谢物相关的生物代谢途径及其各自的生物学功能。如图 3-F 所示，这 7 种代谢物参与了 5 种不同的代谢途径，与标记物显著相关的途径包括戊糖磷酸途径、D-氨基酸代谢、戊糖和葡萄糖醛酸盐的相互转化、类固醇激素生物合成和色氨酸代谢。在这些途径中，戊糖磷酸途径与这些代谢物的相关性最强。

### 3.4 qRT-PCR 检测磷酸戊糖途径相关基因表达

如图 4 所示，与对照组比较，模型组 *g6pd*、*taldo1*、*tkta*、*rpia* 和 *rpe* 基因表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ )，提示在抑制戊糖磷酸途径的同时抑制血管。与模型组比较，丹红注射液组 *g6pd*、*taldo1*、*tkta*、*rpia* 和 *rpe* 基因表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，表明血管生成促进与戊糖磷酸途径的激活之间确实存在联系 (图 5)。

### 4 讨论

丹红注射液在经注射进入患者机体后，可迅速

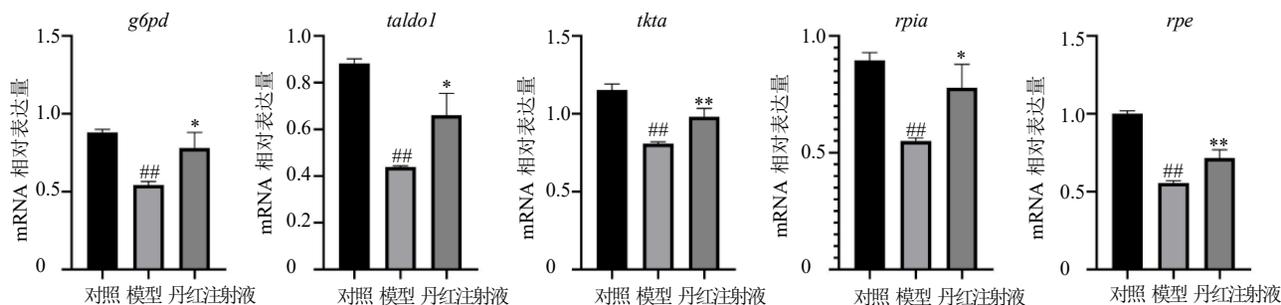


图 4 各组斑马鱼中磷酸戊糖途径相关基因的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Expressions of pentose phosphate pathway related genes in zebrafish of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

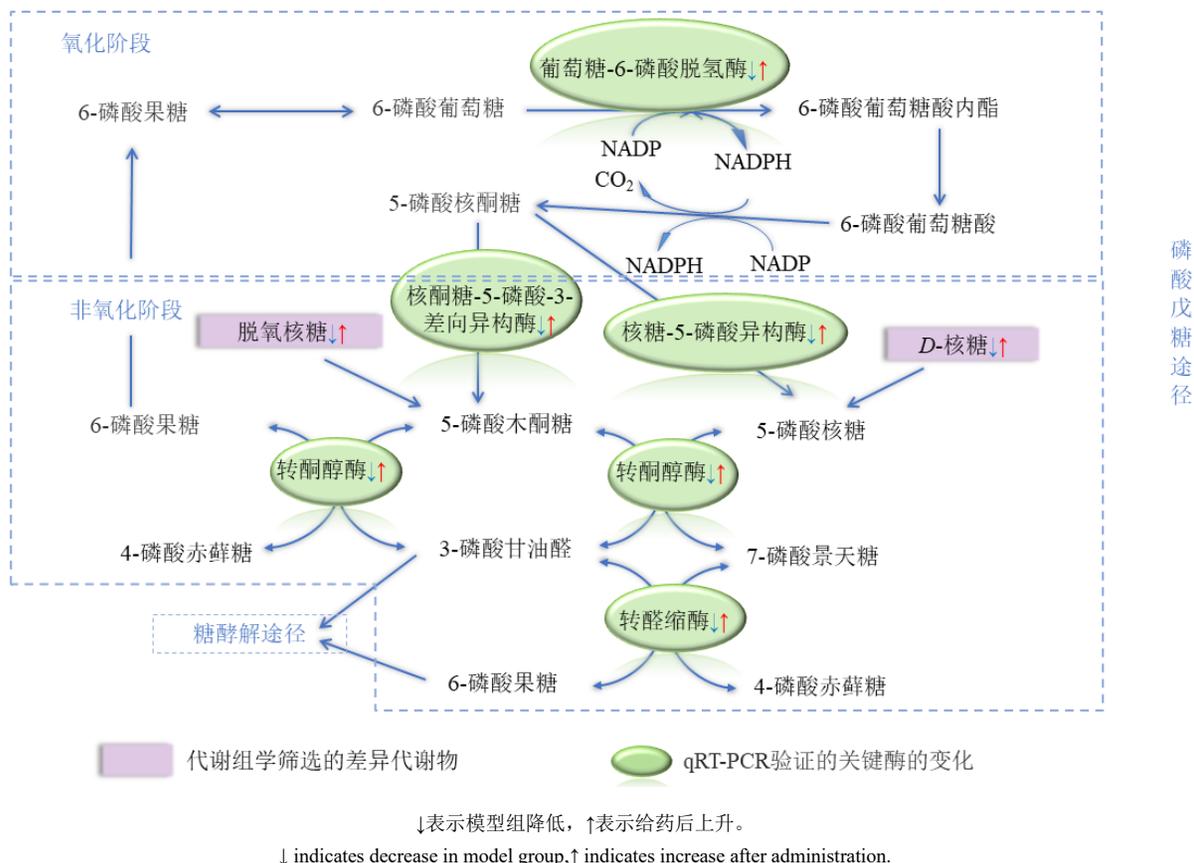


图 5 磷酸戊糖途径

Fig. 5 Pentose phosphate pathway

扩张脑部血管, 下调血管血流阻力, 改善脑部血流量, 对血小板聚集具有明显的拮抗作用, 可改善患者脑部微循环<sup>[24-26]</sup>。丹红注射液具有明显的促血管生成作用, 可能是由于丹红注射液主要成分中的丹参酮及红花黄色素等成分可有效对缺血缺氧导致的血管内皮细胞凋亡形成抑制, 促进了内皮细胞的生长<sup>[27-29]</sup>。丹参多酚酸盐是丹参的水溶性有效活性部位, 能够增加人单核细胞 VEGF、bFGF 释放及其 mRNA 的表达, 进而促进内皮细胞迁移<sup>[30]</sup>, 但其促进血管生成的具体代谢机制仍需进一步研究。本研究结果表明, 丹红注射液能有效促进斑马鱼节间血管的新生。

在组织急性缺血病理状态(如梗死)下, 组织局部的血管生成会被重新启动。糖酵解、脂肪酸氧化等细胞代谢过程被激活<sup>[31]</sup>。内皮细胞表达的谷氨酰胺合成酶以及谷氨酰胺代谢会影响内皮细胞的迁移<sup>[32]</sup>, 这有助于发育和疾病中新血管的形成。代谢组学结果表明丹红注射液给药后可回调斑马鱼体内 7 种代谢物水平, 这些代谢物有可能作为血管生成的生物标志物。将 7 个回调代谢物进行 MetaboAnalyst 通路富集分析, 结果表明主要与戊糖磷酸途径显著相关。

戊糖磷酸途径通过调节碳稳态, 为核苷酸和氨基酸的生物合成提供前体, 为合成代谢提供还原分子, 减轻氧化应激, 在细胞代谢中起着至关重要的作用<sup>[33-34]</sup>。研究表明戊糖磷酸途径与血管生成密切相关, 氧化和非氧化戊糖磷酸途径通量的不平衡对血管生成和癌细胞存活都至关重要<sup>[35-36]</sup>。Facchinello 等<sup>[37]</sup>研究基于人内皮细胞、斑马鱼和小鼠模型发现氧化戊糖磷酸途径 (pentose phosphate pathway oxide, oxPPP) 通过调控血管基底膜沉积和内皮细胞-壁细胞相互作用, 在发育过程中调节血管形成。本研究利用 qRT-PCR 分析戊糖磷酸通路相关关键基因的表达水平, 从而建立血管生成与该代谢网络之间的联系。qRT-PCR 分析结果显示, 模型组 *g6pd*、*taldo1*、*tkta*、*rpia*、*rpe* 表达水平显著降低, 而丹红注射液组 *g6pd*、*taldo1*、*tkta*、*rpia*、*rpe* 表达水平显著升高, 提示戊糖磷酸途径与血管生成相关, 且戊糖磷酸途径的激活可以促进血管生成。丹红注射液由丹参、红花组成, 其促血管生成的作用与戊糖磷酸途径相关, 对于其中组成的药味(丹参、红花)对戊糖磷酸通路的作用, 将有待进一步研究。

本研究利用斑马鱼模型发现了丹红注射液是促

进血管生成的触发因素, 代谢组学和 qRT-PCR 结果均显示斑马鱼血管生成与戊糖磷酸途径之间的关联, 揭示了丹红注射液促进血管生成可能主要与激活磷酸戊糖途径有关, 从而为深入探索这一生理过程的潜在机制提供理论依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. *Nat Med*, 1995, 1(1): 27-31.
- [2] Chim S M, Tickner J, Chow S T, et al. Angiogenic factors in bone local environment [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24(3): 297-310.
- [3] Jude E B, Eleftheriadou I, Tentolouris N. Peripheral arterial disease in diabetes: A review [J]. *Diabet Med*, 2010, 27(1): 4-14.
- [4] 刘旭, 吴宿慧, 陈小菲, 等. 基于 vWF/GPIb-IX-V 信号通路的丹红注射液对急性血瘀大鼠模型活血化瘀作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(4): 1173-1183.
- [5] 高露. 丹红注射液在急性缺血性卒中患者中的应用效果 [J]. *实用中西医结合临床*, 2023, 23(20): 58-60.
- [6] 任鹏, 李赞, 王薇, 等. 中药注射液治疗血管性痴呆的网状 Meta 分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2863-2878.
- [7] 黄艺飞, 冯超男, 尹延哲, 等. 丹红注射液治疗急性脑梗死疗效和安全性的系统评价和 Meta 分析 [J]. *天津中医药*, 2022, 39(11): 1423-1431.
- [8] 王静, 陈伶俐, 李义伟, 等. 丹红注射液对比丹参注射液治疗冠心病有效性及安全性的 Meta 分析 [J]. *中国中医急症*, 2022, 31(1): 11-15.
- [9] 杨铁君, 陈永凤. 丹红注射液治疗冠心病心绞痛的疗效 [J]. *内蒙古中医药*, 2022, 41(12): 118-119.
- [10] 刘琼, 严辉兰, 周莉. 丹红注射液对缺血性脑卒中患者血液流变学及微炎症状态的影响 [J]. *检验医学与临床*, 2023, 20(22): 3403-3406.
- [11] 杜雨, 徐昕宇. 丹红注射液治疗皮层下动脉粥样硬化型脑病的临床效果研究 [J]. *中国实用医药*, 2023, 18(22): 94-97.
- [12] 张由美, 金虹艳, 吉亚军, 等. 丹红注射液治疗短暂性脑缺血发作的临床效果 [J]. *临床合理用药杂志*, 2022, 15(34): 60-63.
- [13] 卫国, 王慧芳, 刘娟, 等. 丹红注射液对急性心肌梗死大鼠的治疗性血管新生作用研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(3): 424-429.
- [14] 周洁, 曾晓云, 罗志秀, 等. 丹红注射液对沙鼠前脑缺血再灌注后脑组织的神经保护作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(3): 255-257.
- [15] 谭莉, 万芳超, 刘容, 等. 丹红注射液对大鼠急性脑梗死后血管新生的影响 [J]. *中医药导报*, 2019, 25(20):

- 71-75.
- [16] Jensen L D, Cao R, Cao Y. *In vivo* angiogenesis and lymphangiogenesis models [J]. *Curr Mol Med*, 2009, 9(8): 982-991.
- [17] Dahm R, Geisler R. Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species [J]. *Mar Biotechnol*, 2006, 8(4): 329-345.
- [18] Isogai S, Horiguchi M, Weinstein B M. The vascular anatomy of the developing zebrafish: An atlas of embryonic and early larval development [J]. *Dev Biol*, 2001, 230(2): 278-301.
- [19] 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.
- [20] Wilkinson R N, van Eeden F J M. The zebrafish as a model of vascular development and disease [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2014, 124: 93-122.
- [21] Lieschke G J, Currie P D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(5): 353-367.
- [22] Chávez M N, Aedo G, Fierro F A, *et al.* Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 56.
- [23] 韩利文, 袁延强, 何秋霞, 等. 斑马鱼模型在中药活性筛选中的适用性研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 2037-2041.
- [24] 王雅君, 张杰. 丹红注射液联合针刺对缺血性脑卒中患者血液流变学及 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白水平的影响 [J]. *陕西中医*, 2017, 38(3): 284-286.
- [25] 祝敬伟, 齐继红. 丹红注射液治疗急性脑梗死的效果及对患者神经功能、炎症因子水平的影响 [J]. *临床医学*, 2020, 40(2): 95-97.
- [26] 宋颖飞, 张喜云, 姜丙全. 丹红注射液联合乙酰谷酰胺注射液治疗急性脑梗死恢复期的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(2): 369-374.
- [27] 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.
- [28] 薛迪. 斑马鱼血管抑制和心脏损伤模型的构建及研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2016.
- [29] 唐昱, 钟志英, 盛国太, 等. 丹红注射液促进鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(12): 3133-3135.
- [30] 徐杰, 范维琥. 丹参多酚酸盐对人血管内皮细胞迁移的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2003, 1(3): 211-214.
- [31] Lee L Y, Oldham W M, He H M, *et al.* Interferon- $\gamma$  impairs human coronary artery endothelial glucose metabolism by tryptophan catabolism and activates fatty acid oxidation [J]. *Circulation*, 2021, 144(20): 1612-1628.
- [32] Eelen G, Dubois C, Cantelmo A R, *et al.* Role of glutamine synthetase in angiogenesis beyond glutamine synthesis [J]. *Nature*, 2018, 561(7721): 63-69.
- [33] Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, *et al.* The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(3): 421-436.
- [34] Alfarouk K O, Ahmed S B M, Elliott R L, *et al.* The pentose phosphate pathway dynamics in cancer and its dependency on intracellular pH [J]. *Metabolites*, 2020, 10(7): 285.
- [35] Zaied A A, Ushio-Fukai M, Fukai T, *et al.* Pentose pathway activation is superior to increased glycolysis for therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease [J]. *J Am Heart Assoc*, 2023, 12(7): e027986.
- [36] Cascante M, Benito A, Zanuy M, *et al.* Metabolic network adaptations in cancer as targets for novel therapies [J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(5): 1302-1306.
- [37] Facchinello N, Astone M, Audano M, *et al.* Oxidative pentose phosphate pathway controls vascular mural cell coverage by regulating extracellular matrix composition [J]. *Nat Metab*, 2022, 4(1): 123-140.

[责任编辑 李亚楠]