

基于斑马鱼模型的中药抗肿瘤研究进展

梁沁沁^{1,2}, 黎 欣^{1,2}, 张冰月^{1,2}, 夏中尚², 张 帆², 郝二伟², 邓家刚^{2*}, 侯小涛^{1,2*}

1. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

2. 广西中医药大学 广西中药药效研究重点实验室, 中药资源循环利用广西高校工程研究中心, 广西中医湿病方药理论与转化重点实验室, 广西 南宁 530200

摘要: 恶性肿瘤是全球主要死亡原因之一, 随着其发病率和死亡率的逐年攀升, 关于其发病机制、进展过程、新药开发等相关研究亟待推进。中药在预防和治疗肿瘤中表现出极好的临床效果和前景。斑马鱼因与人类基因高度相似、胚胎和幼体透明、繁殖能力强、研究周期短、成本低等特性而备受青睐, 已被用于多种肿瘤的研究。通过对近十年国内外斑马鱼肿瘤模型的特征及其在中药治疗肺癌、结直肠癌、肝癌、乳腺癌和胃癌研究中的应用进展进行综述, 为实验建模提供新的思路和方法, 为新药研发提供参考。

关键词: 斑马鱼; 肿瘤; 模型; 中药; 中药单体; 中药复方

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)24-8644-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.031

Research progress on antitumor of traditional Chinese medicine based on zebrafish model

LIANG Qinqin^{1, 2}, LI Xin^{1, 2}, ZHANG Bingyue^{1, 2}, XIA Zhongshang², ZHANG Fan², HAO Erwei², DENG Jiagang², HOU Xiaotao^{1, 2}

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Guangxi Key Laboratory of TCM Formulas Theory and Transformation for Damp Disease, University Engineering Research Center of Reutilization of Traditional Chinese Medicine Resources of Guangxi, Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: Malignant tumors are one of the main causes of death in the world, and with their morbidity and mortality increasing year by year, a series of related studies on their pathogenesis, progress and new drug development need to be advanced. Traditional Chinese medicine has shown excellent clinical effects and prospects in the prevention and treatment of tumors. Zebrafish is favored by researchers because of its high genetic similarity to humans, transparent embryos and larvae, strong reproductive ability, short study cycle, and low cost, and has been used in the study of a variety of tumors. In this paper, the characteristics of zebrafish tumor models and their application in treatment of lung cancer, colorectal cancer, liver cancer, breast cancer and gastric cancer have been reviewed in recent ten years, to provide new ideas and methods for experimental modeling and provide references for the development of new drugs.

Key words: zebrafish; tumor; model; traditional Chinese medicine; traditional Chinese medicine monomer; traditional Chinese medicine compound

据国际癌症研究机构对 185 个国家的癌症数统计, 癌症死亡逐年升高。癌症死因依次为肺癌、结直肠癌、肝癌、乳腺癌和胃癌^[1]。化疗作为目前癌

症治疗的主流手段, 可提高患者的生存率, 但大多数患者会出现恶心、呕吐等不良反应, 严重影响患者的生活质量^[2]。中药在治疗癌症方面具有多成分、

收稿日期: 2024-07-20

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2020GXNSFBA159020); 引进博士科研启动基金项目 (2022BS022); 广西中医药大学“桂派中医传承创新团队” (2022A005)

作者简介: 梁沁沁, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药分析学。E-mail: 2018601535@qq.com

*通信作者: 侯小涛, 女, 教授, 从事中药物质基础与质量控制研究。E-mail: xthou@126.com

邓家刚, 男, 教授, 从事中药基础理论与药效筛选研究。E-mail: dengjg53@126.com

多靶点、不易产生耐药等优势,符合肿瘤多因素、多环节致病机制,在治疗上,主要以“扶正和祛邪”为主,在帮助患者克服不良症状方面具有重要作用^[3]。此外,中药来源的天然产物可以通过调节多种信号通路发挥抗肿瘤作用,是药物研发的重要来源。目前,长春新碱、长春碱、紫杉烷类和鬼臼毒素等抗癌化合物的临床批准进一步肯定了中药抗肿瘤的巨大价值和潜力^[4]。

合适的动物模型是中药筛选、药物作用机制深入研究的重要手段。当前运用较为广泛的是传统鼠、兔肿瘤模型,这些模型虽易于操作且重现性好,但实验周期长,成本高且肿瘤生长过程不易观察。斑马鱼是一种被广泛用于生理学、毒理学和分子遗传学研究的脊椎类动物,生长迅速、造模技术成熟且生长环境易控制,成本相对低廉。在长期的研究中发挥出明显的优势。本文基于斑马鱼模型对中药治疗肿瘤的研究进行综述,为促进斑马鱼模型在中药药效药理研究中的进一步应用及中药抗肿瘤药物的开发提供参考。

1 斑马鱼模拟人类肿瘤疾病的优势

斑马鱼是目前前景广泛的模式生物之一,在组织学和基因组水平上与人类高度相似,具有体积小、易饲养的特点,其简单的形态结构、较大的繁殖量、较短的实验周期,满足了多元化设置实验条件及优化实验方案的需求,也可用于大规模基因筛选和活体高通量药物筛选^[5-6]。此外,斑马胚胎适应性免疫系统在 7 d 后开始发育,直到受精后 4~6 周在形态和功能上成熟,这种免疫缺陷为植入肿瘤细胞提供了条件^[7]。斑马鱼在早期发育过程中具有光学透明性,使其成为体内成像的首选模式生物,通常采用荧光报告基因(*GFP*、*Dil* 等)对斑马鱼体内细胞、染色体等进行标记,以荧光强度、面积和数量评估药物的直接抗癌效果^[8]。

活体成像技术的发展为斑马鱼抗肿瘤药效评价提供了便利。目前使用较为广泛的是共聚焦荧光显微技术,具有操作简单、分辨率高、易实现高通量的特点^[9]。而光片流成像系统是一种基于流式光片的高通量显微成像技术,将流式成像技术与光片照明技术相结合,通过设计液流与光学耦合系统,结合精密的进取样控制时序与三维重建算法,可实现高通量 3D 成像,用于药物的大规模筛选^[10]。利用 3D 重建体内成像,研究者还可以监测癌细胞与斑马鱼血管外表面之间的相互作用,并记录肿瘤细

胞沿血管迁移的过程及在此过程中的形态变化^[11]。选择性平面照明显微技术可实时可视化肿瘤细胞的特征,并识别不同迁移模式,提供肿瘤特异性迁移速度和距离^[12]。单细胞分辨成像技术可动态可视化单个癌细胞的生物表型和药物治疗反应^[13]。结合插管技术,可以在倒置显微镜上对成年斑马鱼进行长期成像^[14]。荧光探针如近红外荧光探针^[15]、双通道荧光纳米探针^[16]等的发展,为斑马鱼活体成像提供了有力的工具,可实现斑马鱼体内靶向性成像。这些成像技术的应用,提高了斑马鱼成像的清晰度和准确性,利于全程监测肿瘤生长、转移、新生血管、细胞凋亡等情况。结合图像分析软件,可对斑马鱼体内的肿瘤细胞进行定量计算,评估药物对肿瘤生长的抑制作用^[17]。在生物信息学、纳米技术、计算机科学等领域的最新成果不断推动下,斑马鱼肿瘤成像技术得以快速发展并扩大应用领域,实现高通量、快速、同时实验成像,且被广泛用于抗肿瘤药物的筛选。

2 斑马鱼肿瘤模型的建立

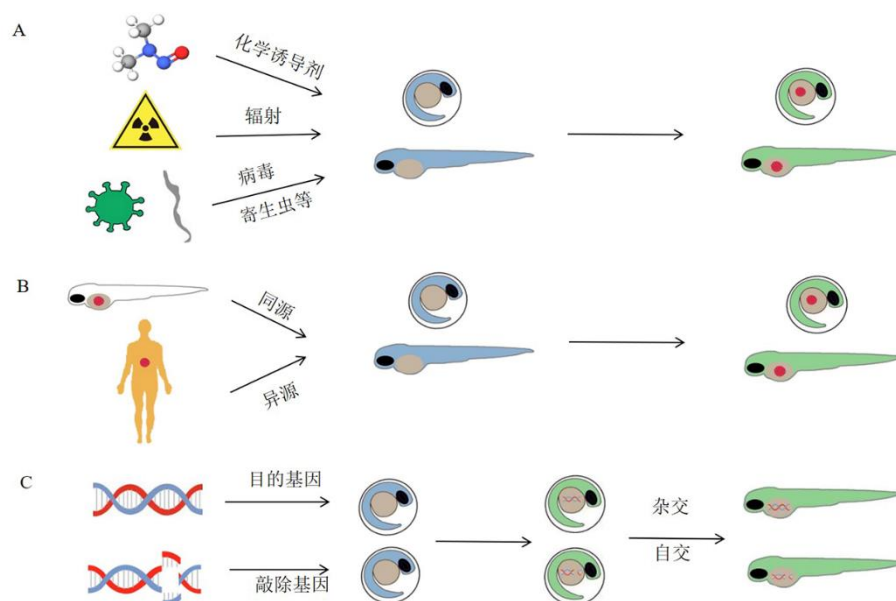
斑马鱼肿瘤模型是一种多功能新型活体动物模型,常见的肿瘤模型有诱发模型、移植模型和基因修饰模型(图 1)。

2.1 诱发模型

诱发是一种能快速获得斑马鱼肿瘤模型的方法,通过口服、注射、暴露致癌因素的方式诱发斑马鱼发生肿瘤。7,12-二甲基[a]苯并蒽是一种对脊椎动物具有强致癌性的化合物,可通过水溶液浸泡、胚胎微注射处理及饮食给药的方式,诱发斑马鱼发生肿瘤,主要靶器官为肝脏,也可用于诱发胰腺癌^[18-19]。其他化合物如二乙基亚硝胺^[20]、盐酸多西环素^[21]、*N*-亚硝基二甲胺^[22]等也可诱发肝癌。睾丸和血管是 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍的主要靶器官,可诱发精子瘤、血管瘤或血管肉瘤等^[23]。此外,1,4-苯醌^[24]、*N*-乙基-*N*-亚硝基胍^[25]是白血病常用诱导剂;朝藿定 B 可用于诱导黑色素瘤等^[26]。该类诱导方法操作简单、成本低廉,但易引起非特异性表型、耗时长、发病率低,且肿瘤定位困难,具有一定局限性。

2.2 移植模型

斑马鱼异种移植法常被用于肿瘤的生长和迁移等研究中。异种移植技术是采用微量注射的方法将肿瘤细胞移植到不同发育阶段的斑马鱼的卵黄囊、卵黄周间隙、居维叶导管和后脑室等特定部位,



A-诱发模型；B-移植模型；C-基因修饰模型。

A-induced model; B-transplant model; C-gene-modification model.

图 1 常见的斑马鱼肿瘤模型

Fig. 1 Common zebrafish tumor models

可很好地保持人类肿瘤的原始异质性，该方式被认为是斑马鱼在癌症研究的一大优势。其中，卵黄周间隙是识别新生血管、研究迁移和转移行为的较佳区域和理想注射部位，但该方法的成功率较低，因此，卵黄囊是首选的瘤体接种部位^[27]。此外，斑马鱼胚胎和幼体的免疫缺陷使其适用于异种移植，成年斑马鱼可提前使用免疫抑制剂或 γ -射线抑制机体的免疫系统，防止移植排斥，或直接使用免疫缺陷斑马鱼品系如 *rag2* 等^[28-29]。斑马鱼胚胎容易大量获得，允许单次建成大量异种移植模型，可用于高通量药物筛选。现有的斑马鱼肿瘤模型大多通过异种移植构建，常用细胞系包括人肺癌 A549 细胞^[30]、人结直肠癌 HCT116 细胞^[31]、人肝癌 HepG2 细胞^[32]、人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞^[33]、人胃癌 SGC-7901 细胞^[34]等。与其他造模方式相比，异种移植模型以其适用性强、操作简单、技术成熟、成功率高、成本低等优点，成为肿瘤研究中常用的斑马鱼模型。

2.3 基因修饰模型

在构建特定组织斑马鱼肿瘤模型时，通过基因编辑或基因操作，可在组织特异性启动子如 *fabp*、*krt*、*kita* 和 *mitfa* 的控制下，精确调控斑马鱼 *kras*、*xmrk*、*ras* 等癌症基因的表达，从而诱导进化保守的实体瘤，如肝癌、结肠癌和黑色素瘤等，较好地模拟人类的肿瘤性病态^[35-39]。此外，作

为构建转基因模型的重要工具，基因工程技术主要通过“敲除”一些关键基因或“敲入”与疾病相关的基因改变转录^[40]。目前，针对斑马鱼的基因操作技术已经相当成熟，其中成簇的规律间隔的短回文重复序列系统（clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated system, CRISPR/Cas）技术因其高精密、高效等优点而得到广泛应用。通过设计特定的引导 RNA 和特异性 Cas9 内切酶，CRISPR/Cas9 系统可以在斑马鱼基因组中实现精确切割，从而实现基因的敲除、插入和修饰等操作^[41]。转基因斑马鱼肿瘤模型具有较高的可控性，肿瘤发生率高，但操作复杂，存在一定技术难度，且耗时长、成本较高。

3 斑马鱼模型在中药抗肿瘤研究中的应用

斑马鱼肿瘤模型已经被广泛用于探索疾病机制，筛选新的治疗靶点和潜在治疗药物。中药作为抗癌药物重要来源，研究者使用斑马鱼模型对中药提取物、中药单体及中药复方在抗癌方面进行药效学评价，通过相关研究明确其抗癌的作用靶点、信号通路等机制，为现代抗癌药物研发提供新思路，对于深入挖掘中医宝库、探索传统中药的抗癌潜能大有裨益。

3.1 肺癌

郭新邓等^[42]利用斑马鱼模型，探讨了连翘饮片

水提物和连翘颗粒抗肿瘤药效差异,发现二者均显示出显著的抗 A549 细胞增殖作用,且无明显差异。Li 等^[43]通过在斑马鱼体内注射 NCI-H2170 细胞建立肺鳞癌模型,结合生物信息学分析发现经三叶青醇提物处理后,谷氨酸代谢型受体 3 mRNA 表达显著增加,而谷氨酸代谢型受体 7 mRNA 表达显著降低,进一步阐明了三叶青醇提物在斑马鱼模型中抗肿瘤作用的可能作用机制。

中药单体是从中药复杂的成分中分离、提纯的单一化学成分,化学结构清晰,作用效果明确。如苦参碱^[44]、麦冬皂苷 B^[45]、朝藿素 B^[46]等中药单体对斑马鱼体内 A549 细胞的增殖均具有抑制作用。Zhang 等^[47]借助斑马鱼异种移植模型,首次从调节脑微环境的角度描述了虫草素抗小细胞肺癌的机制,发现其主要是通过介导维生素 D 代谢、脂质转运和蛋白水解失调,调节 *CYP24a1*、*apoA1a*、*ctsl* 等关键基因的表达,从而起到抑制癌细胞增殖的作用。此外,溪黄草中的疏展香茶菜宁 B 在斑马鱼体内显示出抗血管生成作用,有助于抑制肿瘤生长和扩散^[48]。白花丹中的白花丹素可增加斑马鱼体内肿瘤抑制基因 *p53* 的表达,从而促进细胞凋亡^[49]。

采用中药复方干预斑马鱼模型可以综合评价方剂或成药多靶点的作用,十一味参芪片可以提高顺铂对斑马鱼模型的半致死浓度,改善巨噬细胞数量减少及恢复巨噬细胞吞噬功能,体现出良好的增效减毒作用,对斑马鱼血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, *VEGFA*) 及 Fms 相关酪氨酸激酶 1 (Fms-related tyrosine kinase-1, *FLT1*)、激酶插入区受体样 (kinase insert domain receptor, *KDRL*) 的基因表达具有不同程度的抑制作用^[50]。青蒿鳖甲汤能抑制斑马鱼肺癌细胞的增殖并促进细胞凋亡,在该研究中,青蒿鳖甲汤对 H1299 肿瘤生长的抑制率可达到 39%,其作用机制可能与磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路有关^[51]。

3.2 结直肠癌

Pan 等^[52]分别将 200 个和 100 万个 SW480 细胞注入斑马鱼和小鼠体内建立结直肠癌模型,结果表明,经麻藤醇提物处理 5 d,可观察到斑马鱼体内红色肿瘤病灶的面积减小,且肿瘤细胞迁移距离明显缩短,而在 28 d 内裸鼠异种移植模型中也观察到肿瘤细胞减小的趋势,表明斑马鱼模型具有高通量、周期短、实验设置方便等优点,在体内研究中

优于裸鼠模型,进一步揭示了斑马鱼模型在中药抗肿瘤药效评价中的适用性。败酱草水提取物可通过降低血管内皮生长因子受体 *FLT1*、*FLT4*、*KDRL*、*VEGFaa*、*VEGFc* 和酪氨酸激酶受体 *Tie1* 的 mRNA 表达,显著缩短斑马鱼胚胎肠下血管,并抑制 HCT116 细胞的迁移^[53]。

一系列的研究表明,中药中广泛存在具有抑制肿瘤血管生成的天然植物活性成分。基于 HCT116 斑马鱼移植模型,Maradonna 等^[54]发现大麻素可下调细胞因子信号传导阻抑物 3 mRNA,诱导白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 VEGF 蛋白减少,通过调节 IL-6/Janus 激酶 (Janus kinase, JAK)/信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路,抑制肿瘤细胞增殖和血管生成。Silva 等^[55]发现一种来自白羽扇豆的蛋白低聚物 (deflamin) 可以抑制癌细胞的迁移和侵袭,并抑制胶原重塑和血管生成,显著控制癌症行为。Wang 等^[56]采用 HT29 结肠癌异种移植模型发现,肉桂酸乙酯能够抑制斑马鱼血管生成,进而抑制肿瘤转移。此外,丹参中的隐丹参酮^[57]、铁皮石斛的多糖组分 W-1 可抑制斑马鱼体内肿瘤细胞的增殖,表现出一定的抗肿瘤活性^[58]。

3.3 肝癌

莪术和三棱是一组以活血化瘀抗肿瘤的药对,在 HepG2 细胞移植模型中,Wei 等^[59]发现其水提物均可下调斑马鱼类固醇受体辅激活因子、肿瘤表皮生长因子受体、雌激素受体 1、前列腺素内环氧化物合成酶和淀粉样前体蛋白的表达从而发挥抗癌细胞增殖、转移、血管生成和促进凋亡等抗肝癌活性,且两药联用抗肝癌活性增强。Xu 等^[60]研究表明,珍珠梅水提物通过调节 VEGFR/细胞间质上皮转换因子凋亡通路,显著抑制肿瘤诱导的新生血管生成,有效促进斑马鱼 HepG2 细胞的凋亡。肉桂水提物通过抑制肿瘤血管的生成,阻断肿瘤生长发育所需的营养物质,从而抑制肿瘤的生长,并促进凋亡^[61]。Ning 等^[62]评价了白花蛇舌草不同极性提取物的抗肿瘤活性,发现其醋酸乙酯部位对斑马鱼体内 Hep3B 细胞的抑制作用最为显著,为白花蛇舌草抗肝癌药效物质基础的研究提供依据。

重楼皂苷 VII 能够抑制斑马鱼血管生成,抑制癌细胞的侵袭、扩散和转移,并抑制癌细胞增殖^[63-64]。Tian 等^[65]通过对斑马鱼新生和再生血管水平评估,发现冬凌草甲素可降低斑马鱼 VEGFA 及受体

VEGFR2、VEGFR3 的表达,抑制血管生成,并通过增加 *p53* 基因的表达,抑制肿瘤的生长和转移。Zhao 等^[66]研究表明,射干多糖 80-2 能显著抑制斑马鱼肿瘤的生长、转移和血管生成。和厚朴酚能够减少 HepG2 细胞在斑马鱼体内的外渗漏,抑制肿瘤细胞的转移,并促进细胞凋亡^[67]。沙蟾毒精和 1 β -OH-沙蟾毒精均是蟾酥中的主要活性成分,被证实对肝癌斑马鱼具有治疗作用,研究表明,沙蟾毒精可调节脂质稳态,影响甘油磷脂代谢从而抑制癌细胞增殖和促进凋亡;1 β -OH-沙蟾毒精可能是通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路诱导线粒体凋亡,从而促进癌细胞凋亡,发挥抗肝癌活性^[68-69]。一些广泛存在于天然植物中的活性成分,如苦豆碱、没食子酸甲酯亦可通过不同途径实现对斑马鱼体内肝癌细胞的抑制作用^[70-71]。

在中药复方研究方面,范琦琦等^[72]利用肝癌 LPC H12 细胞移植斑马鱼模型,发现复方苦参注射液通过上调半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteine-aspartate protease-3, *Caspase-3*)、*Caspase-9* 和降低 B 淋巴细胞瘤-2、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, *PI3K*)/蛋白激酶 B(protein kinase B, *Akt*)等相关基因的表达,在一定程度上可抑制斑马鱼 *PI3K/Akt* 信号转导通路的激活,促进癌细胞凋亡,抑制肿瘤生长。

3.4 乳腺癌

转移是癌症患者发病率的主要因素,斑马鱼异种移植模型证实了肉桂皮提取物可抑制 MDA-MB-231 细胞的转移和扩散,其机制可能与糖酵解代谢有关^[73]。地榆水提物可能通过缺氧诱导因子-1 α /窖蛋白-1 信号通路调节癌细胞自噬,并发挥抗转移的作用^[74]。

抑制肿瘤血管生成是一种强有力的乳腺癌预防和干预方法,在斑马鱼异种移植模型中,观察到全缘金粟兰中的氯青霉素 D 可抑制斑马鱼血管生成,且显著抑制肿瘤的增殖和迁移^[75]。Wang 等^[76]发现在含有麝香酮的栓塞附近,斑马鱼新生血管生成更少,其肿瘤细胞迁移距离更短。此外,大量研究表明,肿瘤干细胞参与肿瘤的发生和发展,靶向肿瘤干细胞可能是抗肿瘤的有效途径。五味子素 M2 可抑制斑马鱼体内乳腺癌干细胞的生长和增殖,进而抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖^[77]。补骨脂酚通过诱导乳腺癌干细胞凋亡,进而抑制斑马鱼

体内乳腺癌细胞的转移^[78]。在斑马鱼乳腺癌移植模型中,宝藜苷 i 可降低人乳腺管癌 BT549 细胞中转移相关蛋白(波形蛋白)和干细胞相关蛋白(乙醛脱氢酶 1A1 和 β -连环蛋白)的表达,通过调节肿瘤相关巨噬细胞/C-X-C 基序趋化因子配体 1 通路抑制癌细胞的转移^[79]。Chen 等^[80]研究发现蛇床子素可显著降低斑马鱼热休克蛋白 70、膜突蛋白和 S100 钙结合蛋白 A 的 mRNA 表达水平,通过下调重组整合素 $\alpha 3/\beta 5$ 信号传导抑制乳腺癌转移。

在中药复方研究方面,Guo 等^[81]采用中药方剂防己黄芪汤治疗乳腺癌斑马鱼,结果发现斑马鱼血管和淋巴管的生长受到抑制,并且可通过增加 E-钙黏蛋白和减少乳腺癌上皮间质转化标记物(如扭曲螺旋转录因子 1、E 盒结合锌指蛋白 2)的表达来抑制肿瘤细胞的生长和抗癌细胞转移,是肿瘤治疗的新靶点。癌毒清方在斑马鱼异种移植模型中抑制了乳腺癌的生长、自噬和转移^[82]。乳移平抗乳腺癌作用可能与抗血管生成有关^[83]。小金胶囊能诱导细胞凋亡,抑制斑马鱼 MCF-7 移植瘤生长和新生血管的形成,具有潜在的抗肿瘤作用^[84]。基于斑马鱼异种移植模型,消痞方和紫杉醇联合使用可导致肿瘤组织细胞凋亡明显增加,显著增强紫杉醇对乳腺癌的化疗敏感性,可见消痞方是治疗乳腺癌的潜在辅助药物^[85]。这些研究成果不仅丰富了中医治疗乳腺癌的手段,也为乳腺癌的综合治疗提供了新的思路和方法。

3.5 胃癌

Zhang 等^[86]采用斑马鱼体内生理性血管生成、肿瘤诱导血管生成实验,发现对香豆酸甲酯可以破坏斑马鱼胚胎节段间血管和肠下血管的生理形成,并通过抑制 VEGF/VEGFR2 和血管生成素/酪氨酸激酶信号通路,抑制肿瘤血管生成。熊果酸和齐墩果酸是猕猴桃根的主要抗肿瘤成分,可抑制斑马鱼体内 HGC-27 细胞增殖和转移,结合细胞实验推测其可能是通过调节细胞凋亡、铁死亡和和间充质细胞表型而成为一种有前景的抗肿瘤药物^[87]。

综上,基于斑马鱼肿瘤模型所开展的中药抗肿瘤、结直肠癌、肝癌、乳腺癌、胃癌的研究中,涉及 *PI3K/Akt*、*JAK/STAT*、*mTOR* 等信号通路,通过促进癌细胞凋亡和自噬,抑制癌细胞增殖、迁移、血管生成等发挥中药的抗癌作用(图 2)。基于斑马鱼可模拟人体发育机制及病理机制的优势,斑马鱼模型用于肿瘤机制研究具有广阔的前景。

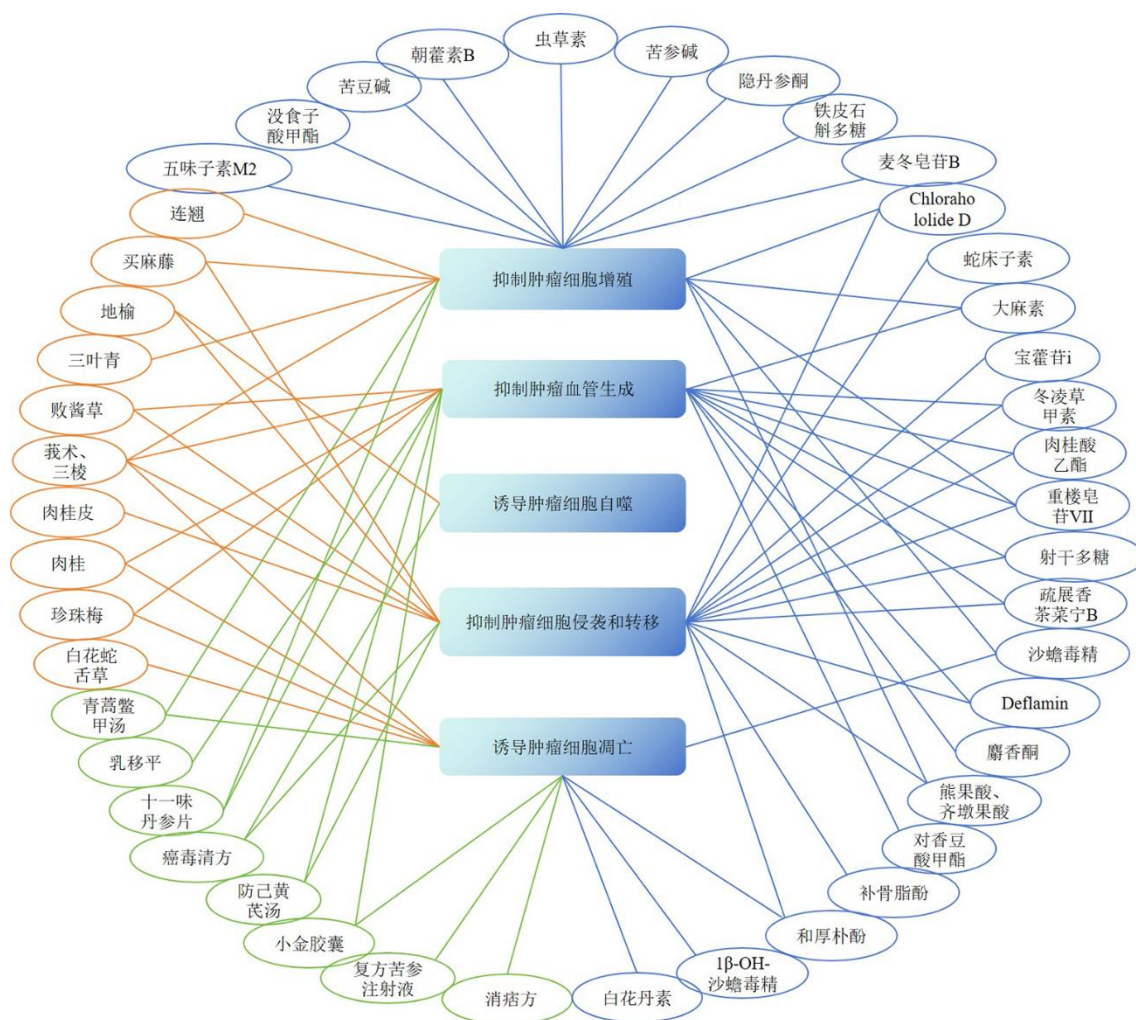


图 2 基于斑马鱼模型中药抗肿瘤机制研究

Fig. 2 Study on antitumor mechanism of traditional Chinese medicine based on zebrafish models

4 结语与展望

近年来,研究者利用斑马鱼肿瘤模型,结合细胞模型或其他传统动物模型对中药提取物,中药单体和中药复方等进行了药效学评价,并阐释其主要活性机制,取得显著的研究成果,进一步证实了斑马鱼模型的可靠性,同时也揭示了中药在抗肿瘤方面的潜力。本文综述了黄连等 11 味中药提取物、朝藿定 B 等 28 个中药单体及青蒿鳖甲汤等 8 个中药复方基于斑马鱼模型在抗恶性肿瘤中的研究。其中中药复方的研究相对较少且不够深入,而斑马鱼的生理学优势及现代科技的发展,为今后中药复方的抗肿瘤研究提供强有力的工具,可以帮助研究者更好地阐明中药复方的物质基础和作用机制。

目前斑马鱼模型用于中药抗肿瘤的研究受到众多研究者的青睐,是验证传统功效、探索疾病机

制、筛选新治疗靶点和潜在治疗药物的重要工具。但其同时也有一定的局限性:(1) 斑马鱼个体小,解剖及组织定位具有一定难度,原位肿瘤植入难度较大。(2) 大约 70% 的人类基因至少有 1 个明显的斑马鱼同源基因,但斑马鱼与人类蛋白质的差异仍不可避免地对药效产生影响^[88]。(3) 斑马鱼主要通过浸泡给药,因此对药物的水溶性有一定要求。(4) 斑马鱼的生长环境与健康体内环境存在差异,其药物代谢途径与人也有一定差异,难以预测可能造成的影响^[89]。当前,血管特异性基因转移的出现^[90]、新型荧光生物成像探针及高分辨显微镜仪器和技术的不断发展,扩展了斑马鱼模型用于药物和疾病研究的能力,未来对斑马鱼肿瘤模型的应用将能突破其局限性,在模型研究、药物筛选、安全性评价等领域发挥更大作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Wang D S, Hu M T, Wang Z Q, *et al.* Effect of aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in women: A randomized clinical trial [J]. *JAMA Netw Open*, 2021, 4(4): e215250.
- [3] 金国梁, 章红燕, 方罗. 临床常用抗癌中药 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2022.
- [4] Mazumder K, Aktar A, Roy P, *et al.* A review on mechanistic insight of plant derived anticancer bioactive phytochemicals and their structure activity relationship [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 3036.
- [5] 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.
- [6] 王璇, 陈林珍, 林瑞超, 等. 基于斑马鱼模型的中药抗骨质疏松的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 5088-5100.
- [7] Li X, Li M Y. The application of zebrafish patient-derived xenograft tumor models in the development of antitumor agents [J]. *Med Res Rev*, 2023, 43(1): 212-236.
- [8] Dryer Y, Berghausen J, Creswell K, *et al.* Comparison of tumor growth assessment using GFP fluorescence and DiI labeling in a zebrafish xenograft model [J]. *Cancer Biol Ther*, 2023, 24(1): 2234140.
- [9] Khadem H, Mangini M, Farazpour S, *et al.* Correlative Raman imaging: Development and cancer applications [J]. *Biosensors*, 2024, 14(7): 324.
- [10] Yang G, Wang L B, Qin X F, *et al.* Heterogeneities of zebrafish vasculature development studied by a high throughput light-sheet flow imaging system [J]. *Biomed Opt Express*, 2022, 13(10): 5344-5357.
- [11] Fornabaio G, Barnhill R L, Lugassy C, *et al.* Angiotropism and extravascular migratory metastasis in cutaneous and uveal melanoma progression in a zebrafish model [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10448.
- [12] Asokan N, Daetwyler S, Bernas S N, *et al.* Long-term *in vivo* imaging reveals tumor-specific dissemination and captures host tumor interaction in zebrafish xenografts [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13254.
- [13] Yan C, Brunson D C, Tang Q, *et al.* Visualizing engrafted human cancer and therapy responses in immunodeficient zebrafish [J]. *Cell*, 2019, 177(7): 1903-1914.e14.
- [14] Castranova D, Samasa B, Venero Galanternik M, *et al.* Long-term imaging of living adult zebrafish [J]. *Development*, 2022, 149(4): dev199667.
- [15] Gao C, Chen D D, Liu H W, *et al.* An innovative aggregation-induced emission-based NIR fluorescent probe for visualizing carboxylesterases in living cells, zebrafish, and tumor-bearing mice [J]. *Molecules*, 2024, 29(15): 3660.
- [16] Hou M J, Wang Z Q, Chen J T, *et al.* A dual-channel fluorescent nanoprobe for sequential detection of ATP and peroxynitrite to accurately distinguish between normal cells and cancer cells [J]. *Anal Chem*, 2022, 94(41): 14257-14264.
- [17] 劳乔聪, 徐懿乔, 金凡茂, 等. 斑马鱼肿瘤异种移植模型在抗癌药敏感性评价中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 24-31.
- [18] Spitsbergen J M, Tsai H W, Reddy A, *et al.* Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages [J]. *Toxicol Pathol*, 2000, 28(5): 705-715.
- [19] Haramis A P G, Hurlstone A, van der Velden Y, *et al.* Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia [J]. *EMBO Rep*, 2006, 7(4): 444-449.
- [20] 胡光, 李丹, 陈阳, 等. 二乙基亚硝胺诱导斑马鱼肝癌模型的探索与优化 [J]. 重庆理工大学学报: 自然科学版, 2022, 36(4): 262-267.
- [21] 吕昊坤, 杨腾辉, 吴启赐, 等. 利用斑马鱼肝癌模型探究氨基葡萄糖盐酸盐对肝癌的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 332-340.
- [22] Mizgirev I V, Majorova I G, Gorodinskaya V M, *et al.* Carcinogenic effect of *N*-nitrosodimethylamine on diploid and triploid zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(5): 514-518.
- [23] Spitsbergen J M, Tsai H W, Reddy A, *et al.* Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine by three exposure routes at different developmental stages [J]. *Toxicol Pathol*, 2000, 28(5): 716-725.
- [24] Zhang A, Wu M, Tan J L, *et al.* Establishment of a zebrafish hematological disease model induced by 1,4-benzoquinone [J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12(3): dmm037903.
- [25] Peng X, Dong M, Ma L, *et al.* A point mutation of zebrafish *c-cbl* gene in the ring finger domain produces a phenotype mimicking human myeloproliferative disease [J]. *Leukemia*, 2015, 29(12): 2355-2365.
- [26] Hong C, Zhang Y F, Yang L L, *et al.* Epimedin B exhibits pigmentation by increasing tyrosinase family proteins

- expression, activity, and stability [J]. *J Pharm Anal*, 2024, 14(1): 69-85.
- [27] Fontana C M, Van Doan H. Zebrafish xenograft as a tool for the study of colorectal cancer: A review [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15: 23.
- [28] Tang Q, Abdelfattah N S, Blackburn J S, *et al.* Optimized cell transplantation using adult rag2 mutant zebrafish [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 821-824.
- [29] Tang Q, Moore J C, Ignatius M S, *et al.* Imaging tumour cell heterogeneity following cell transplantation into optically clear immune-deficient zebrafish [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10358.
- [30] Fan R Y, Wu J Q, Liu Y Y, *et al.* Zebrafish xenograft model for studying mechanism and treatment of non-small cell lung cancer brain metastasis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 371.
- [31] Fior R, Póvoa V, Mendes R V, *et al.* Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(39): E8234-E8243.
- [32] Tonon F, Farra R, Zennaro C, *et al.* Xenograft zebrafish models for the development of novel anti-hepatocellular carcinoma molecules [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(8): 803.
- [33] Sokary S, Zakaria Z, Bawadi H, *et al.* Testing the anticancer effect of matcha using zebrafish as an animal model [J]. *Nutrients*, 2023, 15(10): 2369.
- [34] Wu J Q, Zhai J, Li C Y, *et al.* Patient-derived xenograft in zebrafish embryos: A new platform for translational research in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 160.
- [35] Nguyen A T, Emelyanov A, Koh C H V, *et al.* A high level of liver-specific expression of oncogenic Kras (V12) drives robust liver tumorigenesis in transgenic zebrafish [J]. *Dis Model Mech*, 2011, 4(6): 801-813.
- [36] Li Z, Huang X Q, Zhan H Q, *et al.* Inducible and repressable oncogene-addicted hepatocellular carcinoma in tet-on xmrk transgenic zebrafish [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(2): 419-425.
- [37] Lu J W, Raghuram D, Fong P S A, *et al.* Inducible intestine-specific expression of kras^{V12} triggers intestinal tumorigenesis in transgenic zebrafish [J]. *Neoplasia*, 2018, 20(12): 1187-1197.
- [38] Santoriello C, Gennaro E, Anelli V, *et al.* Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15170.
- [39] Dovey M, White R M, Zon L I. Oncogenic NRAS cooperates with p53 loss to generate melanoma in zebrafish [J]. *Zebrafish*, 2009, 6(4): 397-404.
- [40] Dudziak K, Nowak M, Sozoniuk M. One host-multiple applications: Zebrafish (*Danio rerio*) as promising model for studying human cancers and pathogenic diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10255.
- [41] 龙雨青, 曾娟, 王玲, 等. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在药用植物中的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2940-2952.
- [42] 郭新邓, 郭卓琳, 孙冬梅, 等. 连翘配方颗粒与饮片的抗炎、抗肿瘤和抑菌效果的比较研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44 (3): 594-604.
- [43] Li P, Wang C C, Chen G, *et al.* Molecular mechanisms of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels&Gilg against lung squamous cell carcinoma: From computational biology and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 331: 118326.
- [44] Li J, Huang Y X, Xu J T, *et al.* Mechanism of *Sophorae Flavescentis Radix* (Kushen) in treating NSCLC: Insights from miRNA-mRNA network analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117232.
- [45] Cheng Z Y, Li Z H, Gu L, *et al.* Ophiopogonin B alleviates cisplatin resistance of lung cancer cells by inducing Caspase-1/GSDMD dependent pyroptosis [J]. *J Cancer*, 2022, 13(2): 715-727.
- [46] Zheng H, Liu Q Y, Wang S Q, *et al.* Epimedokoreanin B inhibits the growth of lung cancer cells through endoplasmic reticulum stress-mediated paraptosis accompanied by autophagosome accumulation [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 366: 110125.
- [47] Zhang S R, Pan M, Gao Y B, *et al.* Efficacy and mechanism study of cordycepin against brain metastases of small cell lung cancer based on zebrafish [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154613.
- [48] Hou J T, Li Y, Xing H H, *et al.* Effusanin B inhibits lung cancer by prompting apoptosis and inhibiting angiogenesis [J]. *Molecules*, 2023, 28(23): 7682.
- [49] Vinothkumar R, Ceasar S A, Divyarupa A. Chemosuppressive effect of plumbagin on human non-small lung cancer cell xenotransplanted zebrafish [J]. *Indian J Cancer*, 2017, 54(1): 253-256.
- [50] 李琦. 十一味参芪片对非小细胞肺癌化疗增效减毒的潜在作用及机制研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2021.
- [51] Ye Y H, Yang Y P, Yan L, *et al.* Integrating network pharmacology and experimental validation to explore the effects and mechanisms of Qinghao Biejia Decoction and its active compound artemisinin B against non-small-cell lung cancer [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 2461-

- 2479.
- [52] Pan X L, Hou X T, Zhang F, *et al.* *Gnetum montanum* extract induces apoptosis by inhibiting the activation of Akt in SW480 human colon cancer cells [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 915-930.
- [53] Yang H H, Yue G G L, Yuen K K, *et al.* Mechanistic insights into the anti-tumor and anti-metastatic effects of *Patrinia villosa* aqueous extract in colon cancer via modulation of TGF- β R1-Smad2/3-E-cadherin and FAK-RhoA-cofilin pathways [J]. *Phytomedicine*, 2023, 117: 154900.
- [54] Maradonna F, Fontana C M, Sella F, *et al.* A zebrafish HCT116 xenograft model to predict anandamide outcomes on colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(12): 1069.
- [55] Silva S, Cavaco A, Basso B, *et al.* Therapeutic potential of deflamin against colorectal cancer development and progression [J]. *Cancers*, 2022, 14(24): 6182.
- [56] Wang S Y, Yang J Z, Kuang X L, *et al.* Ethyl cinnamate suppresses tumor growth through anti-angiogenesis by attenuating VEGFR2 signal pathway in colorectal cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 326: 117913.
- [57] Fu X J, Zhao W W, Li K K, *et al.* Cryptotanshinone inhibits the growth of HCT116 colorectal cancer cells through endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 653232.
- [58] Tao S C, Ren Z Y, Yang Z R, *et al.* Effects of different molecular weight polysaccharides from *Dendrobium officinale* Kimura & Migo on human colorectal cancer and transcriptome analysis of differentially expressed genes [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 704486.
- [59] Wei J, Wang X P, Dong Y, *et al.* *Curcuma* *Rhizoma* combined with *Sparganii Rhizoma* in the treatment of liver cancer: Chemical analysis using UPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ, network analysis, and experimental assessment [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1027687.
- [60] Xu Z H, Dang Y, Dong Y, *et al.* Anti-hepatocellular carcinoma activity of *Sorbaria sorbifolia* by regulating VEGFR and c-Met/apoptotic pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 324: 117758.
- [61] 梁文举. 基于斑马鱼模型研究肉桂水提物抑制肝癌细胞的机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [62] Ning W M, Xu N S, Zhou C H, *et al.* Ethyl acetate fraction of *Hedyotis diffusa* Willd. induces apoptosis via JNK/Nur77 pathway in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1932777.
- [63] 张超, 黄喜燕, 李祥, 等. 重楼皂苷 VII 对肝癌的体内抗肿瘤作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(1): 7-13.
- [64] Zhang C, Li Q R, Qin G Z, *et al.* Anti-angiogenesis and anti-metastasis effects of polyphyllin VII on Hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 41.
- [65] Tian L L, Xie K J, Sheng D L, *et al.* Antiangiogenic effects of oridonin [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 192.
- [66] Zhao Y N, Hou J T, Liu Y H, *et al.* An Arabinose-rich heteropolysaccharide isolated from *Belamcanda chinensis* (L.) DC. treats liver cancer by targeting FAK and activating CD40 [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 331: 121831.
- [67] Yang J H, Pei H Y, Luo H, *et al.* Non-toxic dose of liposomal honokiol suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma through destabilizing EGFR and inhibiting the downstream pathways [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 915-932.
- [68] Zhao L J, Zhao H Y, Wei X L, *et al.* The lipid homeostasis regulation study of arenobufagin in zebrafish HepG2 xenograft model and HepG2 cells using integrated lipidomics-proteomics approach [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 112943.
- [69] Deng L J, Lei Y H, Quan J Y, *et al.* 1 β -OH-arenobufagin induces mitochondrial apoptosis in hepatocellular carcinoma through the suppression of mTOR signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266: 113443.
- [70] Liu J S, Huo C Y, Cao H H, *et al.* Aloperine induces apoptosis and G₂/M cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 61: 152843.
- [71] Huang C Y, Chang Y J, Wei P L, *et al.* Methyl gallate, gallic acid-derived compound, inhibit cell proliferation through increasing ROS production and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0248521.
- [72] 范琦琦, 折改梅, 魏静, 等. 复方苦参注射液抗肿瘤、镇痛活性评价及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(10): 2712-2720.
- [73] Nakayama J, Konno Y, Maruyama A, *et al.* Cinnamon bark extract suppresses metastatic dissemination of cancer cells through inhibition of glycolytic metabolism [J]. *J Nat Med*, 2022, 76(3): 686-692.
- [74] Wang N, Muhetaer G, Zhang X T, *et al.* *Sanguisorba officinalis* L. suppresses triple-negative breast cancer metastasis by inhibiting late-phase autophagy via HIF-1 α /caveolin-1 signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 591400.

- [75] Li Y, Liu W H, Xu J, *et al.* Chlorahololide D, a lindenane-type sesquiterpenoid dimer from *Chloranthus holostegius* suppressing breast cancer progression [J]. *Molecules*, 2023, 28(20): 7070.
- [76] Wang D H, Liu X Z, Hong W M, *et al.* Muscone abrogates breast cancer progression through tumor angiogenic suppression via VEGF/PI3K/Akt/MAPK signaling pathways [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 214.
- [77] Yang Y G, Hao E W, Pan X L, *et al.* Gomisin M2 from *Baizuan* suppresses breast cancer stem cell proliferation in a zebrafish xenograft model [J]. *Aging*, 2019, 11(19): 8347-8361.
- [78] Li L, Liu C C, Chen X P, *et al.* Mechanistic study of bakuchiol-induced anti-breast cancer stem cell and *in vivo* anti-metastasis effects [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 746.
- [79] Wang S Q, Wang N, Huang X W, *et al.* Baohuoside i suppresses breast cancer metastasis by downregulating the tumor-associated macrophages/C-X-C motif chemokine ligand 1 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153331.
- [80] Chen Y Q, Song H Y, Zhou Z Y, *et al.* Osthole inhibits the migration and invasion of highly metastatic breast cancer cells by suppressing ITG α 3/ITG β 5 signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(6): 1544-1555.
- [81] Guo Y B, Fan Y Y, Pei X H. Fangjihuangqi Decoction inhibits MDA-MB-231 cell invasion *in vitro* and decreases tumor growth and metastasis in triple-negative breast cancer xenografts tumor zebrafish model [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(7): 2564-2578.
- [82] Yang B W, Peng F, Zhang Y, *et al.* Aiduqing Formula suppresses breast cancer metastasis via inhibiting CXCL1-mediated autophagy [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153628.
- [83] Xie R F, Liu S, Yang M, *et al.* Effects and possible mechanism of Ruyiping Formula application to breast cancer based on network prediction [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5249.
- [84] 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.
- [85] Wang N, Yang B W, Muhetaer G, *et al.* XIAOPI Formula promotes breast cancer chemosensitivity via inhibiting CXCL1/HMGB1-mediated autophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109519.
- [86] Zhang H Z, Li C Y, Wu J Q, *et al.* Anti-angiogenic activity of para-coumaric acid methyl ester on HUVECs *in vitro* and zebrafish *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2018, 48: 10-20.
- [87] Gao Z W, Deng G H, Li Y J, *et al.* *Actinidia chinensis* Planch prevents proliferation and migration of gastric cancer associated with apoptosis, ferroptosis activation and mesenchymal phenotype suppression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110092.
- [88] 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.
- [89] Chng H T, Ho H K, Yap C W, *et al.* An investigation of the bioactivation potential and metabolism profile of zebrafish versus human [J]. *J Biomol Screen*, 2012, 17(7): 974-986.
- [90] Wang Z L, Chen W, Zuo L, *et al.* The Fibrillin-1/VEGFR2/STAT2 signaling axis promotes chemoresistance via modulating glycolysis and angiogenesis in ovarian cancer organoids and cells [J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(3): 245-265.

[责任编辑 赵慧亮]