

中药及其活性成分在斑马鱼药物筛选模型中的适用性研究¹

韩利文^{1,2}, 袁延强¹, 何秋霞¹, 王思锋¹, 彭维兵¹, 刘可春¹, 刘昌孝³(1、山东省科学院生物研究所, 山东省生物传感器重点实验室, 山东, 济南, 250014; 2、天津中医药大学中药学院, 天津, 300193; 3、天津药物研究院药代动力学和药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津, 300193)

摘要: **目的** 斑马鱼是生命科学领域热门的模式生物, 斑马鱼药物筛选模型在新药研发以及新药评价过程中发挥了重要作用。本文旨在考察斑马鱼抑制血管生成模型对于各类成分复杂的中药样品的适用性。**方法** 选用 TG(VEGFR2:GFP) 系血管荧光转基因斑马鱼和 AB 系斑马鱼作为筛选模型, 分别用中药单体靛玉红、单位药材(虎杖、长春花)提取物、复方(西黄丸)处理斑马鱼胚胎, 以节间血管数作为指标, 考察不同类型中药样品对斑马鱼胚胎血管生成的影响。**结果** 中药单体靛玉红高剂量组(50 $\mu\text{g/ml}$)明显抑制斑马鱼节间血管的生成($P<0.05$); 中药材虎杖部位 II(10 $\mu\text{g/ml}$)和部位 III(1 $\mu\text{g/ml}$)统计学显示具有显著性差异($P<0.05$); 长春花的部位 II 100 $\mu\text{g/ml}$ 时明显抑制斑马鱼血管生成($P<0.01$), 同时未见胚胎死亡; 西黄丸 50 $\mu\text{g/ml}$ 剂量以上显示显著性差异, 100 $\mu\text{g/ml}$ 剂量对节间血管生成的影响显示了极其显著的统计学差异($P<0.01$)。**结论** 斑马鱼模型对于成分复杂的中药样品也具有很好的适应性, 对于从我国丰富的中草药资源中发现结构新颖活性独特的先导化合物具有重要价值。

关键词: 斑马鱼; 中药; 血管生成; 靛玉红; 西黄丸

斑马鱼(*Danio rerio*)又名蓝条鱼、花条鱼、斑马担尼鱼等, 是一种热带观赏鱼, 属鲤科短担尼尔属, 原产于印度、孟加拉国。斑马鱼体型较小, 成鱼体长 4-6 厘米。随着斑马鱼基因组测序工程的完成, 发现斑马鱼的基因与人类的基因保守度达到 85%, 为斑马鱼作为一种研究人类疾病的模式动物奠定了坚实基础, 目前斑马鱼模型主要用于构建人类疾病模型^[1]及相关药物筛选^[2,3]等方面。

斑马鱼最大的特点在于胚胎早期发育的过程中, 血管生成的模式比较简单, 主要出现在头部和躯干部体节间, 体节间的血管最初由背部的动脉出芽形成于相

¹ 韩利文, (1980-)男, 在读博士, 研究方向: 药物代谢动力学及代谢组学, E-mail:hanliwen08@yahoo.com.cn.

邻体节之间,是一种理想的血管生成活体动物模型。山东省科学院生物研究所与哈佛大学麻省总医院合作建立了斑马鱼药物筛选平台,目前使用抑制血管生成模型对抗肿瘤药进行大规模筛选评价。

我国拥有极为丰富的中药材资源优势,中药材种类达一万两千余种。从天然产物中发现结构新颖、活性独特的先导化合物已经成为国际上新药研究的一个重要途径。本平台利用斑马鱼抑制血管生成模型对不同层次的中药形式(中药单体成分、单味中药、复方)进行考察,对该模型在中药(天然产物)领域的应用进行初步探索。

1 材料

1.1 药品与试剂

靛玉红单体(本实验室自制,纯度 98%以上);虎杖(*Rhizoma Polygoni Cuspidati*)、长春花(*Catharanthus roseus*)购自济南建联药店,由生物研究所宋广运研究员进行了种属鉴定。西黄丸为北京同仁堂科技发展有限公司制药厂产品(批号:9042075)。链霉蛋白酶(*pronase*)为 Sigma 公司产品。PTK787 由山东省科学院生物化工研究室合成提供,纯度 98%以上。其余试剂为分析纯。

COIC-ZSA302 型体视显微镜、XSJ-D 型倒置显微镜、COIC XSZ-H 型荧光显微镜均为重庆光电仪器有限公司产品。FW177 型中草药万能粉碎机为天津泰斯特公司产品。

1.2 实验动物

TG(VEGFR2:GFP) 系血管荧光转基因斑马鱼、AB 系斑马鱼(本实验室提供)。

2 方法

2.1 实验样品制备

2.1.1 单体成分

称取靛玉红 5mg,溶于 DMSO 中获得 100mg/ml 样品母液,再用胚胎培养用水稀释得到不同浓度溶液,并保证筛选体系中 DMSO 终浓度不高于 0.1%^[4]。

2.2.2 单味中药

中药材粉碎后过 20 目筛,称取 50g 置于圆底烧瓶中,依次用石油醚、乙酸乙酯、水各回流提取 2 次,更换溶剂前挥干上次残余溶剂,合并石油醚提取液、乙酸乙酯提取液、水提取液,减压浓缩干燥,记为虎杖部位 I、II、III。其余药

材同法操作。

2.3.3 复方

西黄丸用甲醇超声提取，制成 10mg/ml 样品母液，再用胚胎培养用水稀释得到不同浓度溶液，并保证筛选体系中甲醇终浓度不高于 1%^[4]。

2.2 斑马鱼试验用胚胎收集

斑马鱼在喂养时，照明 14h/黑暗 10h 交替进行，定时喂以人工颗粒状饵料和刚孵出的卤虫无节幼体(*Artemia nauplii*)。采卵时，取健康性成熟的斑马鱼，按雌雄 1/1 或 1/2 的比例放入交配缸内，次日 6~8 时获得受精卵。对受精卵进行消毒和清洗后，移入斑马鱼胚胎培养用水中，28℃下控光培养。

2.3 施药方式

挑选受精后 24h (hours post fertilization, hpf) 健康胚胎，置于 1mg/ml 链霉蛋白酶 (pronase) 溶液中 2-5min，脱掉外膜后再用培养用水清洗 2-3 遍，备用。

将胚胎置 24 孔培养板中，每孔至少 8 个。每孔加入药物 200 μ l，再加入培养水至满孔，置于可控温光照培养箱中共同恒温孵育 (28℃)。

2.4 抑制血管生成活性检测

斑马鱼胚胎与药物孵育一定时间，转基因 TG 荧光鱼用荧光显微镜观察体节间血管 (Intersegmental vessel, ISV) 作为指标；AB 系鱼使用倒置显微镜观察 ISV 中血流通过作为指标，并采用内源性碱性磷酸染色法观察血管生成情况^[5]。

2.4 数据统计

应用 SPSS11.5 对实验所得数据进行统计分析。

3 结果

3.1 中药单体成分对斑马鱼血管生成的抑制作用

中药单体靛玉红在试验设计的两个剂量范围内，低剂量未观察到抑制活性，而到 50 μ g/ml 时即能够明显抑制斑马鱼节间血管的生成 ($P<0.05$)，见表 1。

Tab.1 Inhibition of angiogenesis of Zebrafish larva by Indirubin

material	Concentration (μ g/ml)	Intersegmental vessel
control	-	27.82 \pm 1.14
PTK787	50	3.12 \pm 2.05**
Indirubin	10	22.02 \pm 1.43
	50	17.01 \pm 6.40*

*: $P<0.05$; ** $P<0.01$

3.2 单味中药不同极性部位对斑马鱼血管生成的抑制作用

两种中药在实验条件下均显示出了抑制斑马鱼节间血管生成的活性，见表

2. 正常对照组中不加药, 正常的血管数为 26-28 条。虎杖部位 II 随着药物浓度的增加活性增强, 10 $\mu\text{g/ml}$ 时节间血管数为 19.57 条, 统计学显示具有显著性差异 ($P < 0.05$), 但是增加到 100 $\mu\text{g/ml}$ 时胚胎全部死亡, 剂量过大。部位 III 则显示了相反的规律, 在低剂量 1 $\mu\text{g/ml}$ 时显示了明显的抑制 (17.50 条), 随着剂量加大, 抑制率下降, 到 100 $\mu\text{g/ml}$ 时胚胎也全部死亡。长春花的部位 II 随着剂量的加大, 活性增加非常明显, 100 $\mu\text{g/ml}$ 时血管数为 2.83 条 ($P < 0.01$), 同时未见胚胎死亡。两组的部位 I 都没有观察到活性。

Tab.2 Inhibition of angiogenesis of Zebrafish larva by two Traditional Chinese Medicines

material	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Intersegmental vessel		
		Group I	Group II	Group III
control	-		25.78 \pm 1.67	
PTK787	100		0**	
Rhizoma Polygoni	1	24.34 \pm 4.95	25.08 \pm 1.57	17.50 \pm 3.64*
Cuspidati	10	25.14 \pm 1.88	19.57 \pm 4.18*	25.56 \pm 0.89
	100	death	death	death
Catharanthus roseus	1	25.25 \pm 1.25	25.00 \pm 2.05	23.36 \pm 3.98
	10	26.11 \pm 2.55	23.57 \pm 3.88	24.18 \pm 3.58
	100	25.32 \pm 2.98	2.83 \pm 2.64**	24.60 \pm 4.32

*: $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3.3 中药复方对斑马鱼血管生成的抑制作用

西黄丸提取液 1 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 药物对胚胎体节间血管形成无明显影响, 随着剂量的增加抑制作用明显增加, 呈现良好的量效关系, 结果见表 3。碱性磷酸酶的染色结果, 也显示了同样的规律, 见图 1。50 $\mu\text{g/ml}$ 剂量以上显示显著性差异, 100 $\mu\text{g/ml}$ 剂量节间血管数为 4.88 条, 显示了极其显著的统计学差异 ($P < 0.01$)。

Tab.3 Inhibition of angiogenesis of Zebrafish larva by *xihuangwan*

material	Concentration($\mu\text{g/ml}$)	Intersegmental vessel
control	-	24.63 \pm 0.74
PTK787	100	0**
	1	24.88 \pm 1.21
	10	22.28 \pm 3.16
<i>xihuangwan</i>	50	12.88 \pm 7.30*
	100	4.88 \pm 6.08**

*: $P < 0.05$; ** $P < 0.01$



Fig. 1 Inhibition of angiogenesis of Zebrafish larva by *xihuangwan*

A:control; B:PTK787(100μg/ml); C:*xihuangwan*(100μg/ml)

4 讨论

目前抗血管生成疗法成为国内外抗肿瘤研究的热点之一。药物筛选是发现、开发药物过程中一个重要的环节，而筛选模型在药物筛选过程中起着关键性作用。斑马鱼药物筛选模型已经被证明是一个有效而快捷的抗血管生成剂的筛选模型。

已有研究表明，斑马鱼模型对化药的适用性良好，国外研究人员已经对此作了大量的研究工作，并发现了一些有价值的化合物。与化药相比，中药是一个多成分的复杂体系，每味中药材都至少含有上百种成分，是一个从非极性到极性成分的巨大成分集合体。这种复杂体系能否应用于斑马鱼药物筛选体系，或者用斑马鱼模型评价中药复杂体系的活性就成为了斑马鱼药物筛选技术平台建设的重要组成部分。

中药单体成分在本质是即为一个结构明确，性质明确的化学成分，故单体成分的应用即可以简单借鉴以往的方法。靛玉红是从大青叶中的发现的一种抗肿瘤成分，通过抑制周期素依赖性蛋白激酶来阻止细胞增殖，对慢性粒细胞白血病具有明显的抑制作用^[6]。在我们的实验中观察到了靛玉红对血管生成也有抑制作用。本实验结果显示，靛玉红对于斑马鱼胚胎血管生成具有明显的剂量效应关系，模型适用性良好。

针对中药材本身的复杂成分体系，我们提出了按照极性划分区段的办法，采用不同极性溶剂提取获得不同极性的部位，然后进行活性评价。文献显示虎杖中的蒽醌类成分^[7]、长春花中的生物碱类成分^[8]具有抑制血管生成作用，本文中虎杖的乙酸乙酯、水提取部位以及长春花的乙酸乙酯部位发现了活性，按照极性判断，上述的活性成分包含在本实验提取物中，在斑马鱼模型上体现了相似的作用。

中药复方是中医药的精华所在，复方根据“君臣佐使”理论配伍，是中医实

现“辨证论治”的主要载体。然而复方内药味众多，构成一个巨大化学成分的集合体，药效物质解析以及药效作用的阐述都是困扰中药实现现代化的巨大障碍。文献报道西黄丸对肝癌细胞 SMMC7721 分泌的血管内皮生长因子 VEGF 及基质金属蛋白酶 2、9 具有明显的抑制作用^[9]。本实验通过利用斑马鱼模型考察了西黄丸对血管生成作用的影响，显示了较明显的量效关系。

综上，分别利用不同类型的中药形式，考察了斑马鱼模型对于复杂成分体系的适用性。实验结果显示，在文献报道具有血管生成活性的中药单体成分、提取物、以及复方在斑马鱼模型上都显示了对血管生成的抑制作用。相比其他模型，斑马鱼胚胎受精后数天内都是透明的，可进行活体观察体内器官发育情况；斑马鱼胚胎 DMSO 耐受良好，药物尤其是极性相差很大的天然产物可以溶解在其中通过皮肤扩散吸收^[10]；消耗样品量极少，只需几 mg 即满足实验需求；胚胎获得容易，每对亲鱼每次可排卵 200-400 枚，而且饲养繁殖比哺乳动物成本低得多。所以，斑马鱼模型可作为细胞试验评价和常规动物实验评价之间的桥梁，在新药研发的过程中，对候选药物进行早期测试、早期评价，可极大程度节约实验成本。对于我国特有的中草药资源，斑马鱼模型将充分发挥早期活性成分（部位）发现以及活性评价的优势，对于我国现有的新药药物发现和早期筛选模型将会是一个有力的补充。

REFERENCES

- [1] LANGENAU DM, TRAVER D, FERRANDO A A, *et al.* Myc-Induced T Cell Leukemia in Transgenic Zebrafish[J]. *Science*, 2003, 299(5608): 887-890 .
- [2] CHILDS S, CHEN JN, GARRITY DM, *et al.* Patterning of Angiogenesis in the Zebrafish Embryo[J]. *Development* , 2002 , 129 , 973 - 982.
- [3] PARNG C , SENGWL , SEMINO C , *et al.* Zebrafish : a Preclinical Model for Drug Screening[J] . *Assay Drug Develop Technol* , 2002 ,1 : 41 - 48.
- [4] WANG SF,WANG XM, HOU HR, *et al.* Selection of Organic Cosolvents in Experiment with Zebrafish[J]. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*(实验动物与比较医学), 2008,28(4):238-242
- [5] HABECK H, ODENTHAL J, WALDERICH B, *et al.* Analysis of a zebrafish VEGF receptor mutant reveals specific disruption of angiogenesis[J].*Curr Biol*,2002,12(16):1405-1412

- [6] WU QW, GE ZL, GAO Y. et al. Inhibitory effect of indirubin on growth of some cancer cells and its mechanism[J]. *Tianjin Journal of Traditional Chin Medicine*(天津中医药),2008,25(1):55-58
- [7] WANG XH, WU SY, ZHEN YS. Inhibitory effects of emodin on angiogenesis [J]. *Acta Pharm Sinica* (药学学报),2004, 39(4):254-258
- [8] KLEMENT G, BARUCHEL S, RAK J, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity[J]. *J Clin Invest*, 2000,105(8):R15-24
- [9] JIN SR,ZHANG XS,ZHU BD,et al. Inhibiting effect of xihuangwan on VEGF and matrix metalloproteinase-2,-9 expression of the Human Hepatocellular Carcinoma SMMC-7721 Cells[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine* (中成药) ,2008,30(7):1079-7081.
- [10] ROMBOUGH P. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O₂ uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*[J].*J Exp Biol*,2002,205: 1787–1794.