

斑马鱼在心血管病治疗药物筛选研究中的应用

胡杨兮 油红敏 任昌振 张艳达 梁春

【摘要】 斑马鱼因体积小、成本低廉、身体透明、基因组与人类高度同源及生理生化特征与哺乳动物相似等特点,近年来广泛应用于人类疾病的基础研究。通过高通量小分子筛选等方法,可在多种斑马鱼模型体内开发心血管疾病的新型治疗药物,鉴定现存药物的靶标或预测特定小分子药物的心血管毒性。

【关键词】 斑马鱼;心血管病;药物筛选

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.03.008

1 概述

斑马鱼(zebrafish)又名蓝条鱼、花条鱼、印度鱼,属辐鳍鱼纲鲤形目鲤科,多生活于中亚和南亚的热带地区。斑马鱼成鱼身体呈纺锤形,长度为3~5 cm,头尖吻短,因体表有银白或金黄与蓝色相间排列的花纹,形似斑马而命名。斑马鱼作为一种新型的模式动物,广泛应用于组织发育^[1]、心血管系统疾病^[2]以及肿瘤^[3]等领域的研究。相比其他经典的模型动物,斑马鱼有独特优势:(1)性成熟周期短,产卵量大。斑马鱼性成熟约3个月,母鱼每周产卵达200枚。(2)可视性好。斑马鱼胚胎及幼鱼通体透明,便于活体观察心脏、血管的实时状态并进行实验操作。(3)转基因鱼系丰富。科研人员通过基因编辑技术构建了多种心血管系统组织特异性的荧光鱼系,如 *Tg(fli1:EGFP)* 转基因鱼系用绿色荧光标记血管内皮细胞、*Tg(myl7:EGFP)* 鱼系用绿色荧光标记心肌细胞、*Tg(gata1:mcherry)* 鱼系用红色荧光标记红细胞等,极大提高了斑马鱼在心血管系统发育和疾病研究中的地位。心血管病治疗药物的研发需要进行短周期、高通量的筛选。许多药物需要在体内转化为有效的活性形式才能发挥作用,经典的小鼠等动物模型和细胞模型不能满足筛选研究的需要。2008年 Yu 等^[4]利用斑马鱼模型筛选出激活素受体样激酶(Alk)的第一个小分子拮抗剂多索吗啡(Dorsomorphin),其可以作用于血管内皮生长因子(VEGF)受体,从而阻断血管生

成^[5]。转基因斑马鱼体量小、繁殖快及可视性等特点,使其成为在体药物筛选研究的优选^[6]。

2 斑马鱼与心血管病治疗药物筛选研究

2.1 血管新生调节药物的筛选

斑马鱼模型在血管新生调节药物的筛选研究中广泛应用,在筛选有效药物的同时也发现众多精准调控斑马鱼血管发生的小分子及其相应受体介导的信号通路。较常用的是以荧光蛋白标记血管内皮细胞的转基因鱼系 *Tg(fli1:EGFP)* 和 *Tg(fli1:nEGFP)* 等。有研究者利用药物干扰斑马鱼血管新生过程,再对促进血管损伤修复的药物进行筛选,如利用酪氨酸酶抑制剂诱导幼鱼血管损伤后,用黄芪多糖处理可以显著修复损伤^[7]。利用 *Tg(fli1:EGFP)*、*Tg(fli1:nEGFP)* 鱼系对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)进行研究,发现毛蕊异黄酮^[8]和降香提取物^[9]通过上调 VEGF 受体表达,促进幼鱼血管新生和节间血管损伤修复。Liu 等^[10]对用地黄提取物处理 *Tg(fli1:EGFP)* 胚胎的肠下血管(SIV)新生长度和出芽数量进行统计,发现地黄提取物中的二氯甲烷、咖啡酸等物质也具有促进血管新生的作用。知母皂苷 B II 具有促血管新生和修复受损血管的作用,其机制可能是使 VEGF 受体和促炎性细胞因子(如白细胞介素-6)的表达上调^[11]。

利用转基因斑马鱼可以对成分复杂的中药方剂进行快速筛选研究。Tse 等^[12]发现地黄与黄芪配伍可通过上调 VEGF-A 及类激酶插入区受体(Kdr1)的表达,促进幼鱼节间血管过度生长。麝香保心丸有效成份之一的肉桂醛可部分改善由 VEGF 受体抑制剂瓦他拉尼二盐酸盐诱导的斑马鱼幼鱼

节间血管的缺失^[13]。

2.2 调脂药物的筛选

斑马鱼的脂质代谢过程与哺乳动物相似,高胆固醇饮食可诱导斑马鱼的脂蛋白氧化、血管内脂质堆积、免疫细胞迁移等早期动脉粥样硬化征象。利用斑马鱼构建脂代谢紊乱的疾病模型可用于高脂血症、动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化性心脏病等的机制研究和药物筛选。Han 等^[14]报道小檗胺可以显著降低高胆固醇饮食斑马鱼的血浆脂肪含量,伊折麦布则可显著改善脂质在斑马鱼血管内的堆积^[15]。Littleton 等^[16]利用脂代谢紊乱斑马鱼幼鱼模型发现山楂叶和山楂花可明显降低斑马鱼血浆低密度脂蛋白水平,抑制胆固醇的吸收,提高心输出量。用枇杷叶提取物处理脂代谢紊乱斑马鱼模型后发现斑马鱼血浆中总胆固醇和三酰甘油水平降低,提示枇杷叶有抗动脉粥样硬化作用^[17]。研究发现,姜黄和月桂的水提取物也可抑制斑马鱼胆固醇酯和低密度脂蛋白活性^[18],进而抑制动脉粥样硬化和糖尿病的进展。除了检测血脂,还可以通过其他方法探究药物对斑马鱼脂代谢的影响。如制首乌及大黄素还可显著降低斑马鱼的体质量、体长,并减轻肝脏中的脂质沉积,其机制可能是通过上调磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、丝氨酸/苏氨酸激酶 2 (AKT2)、一磷酸腺苷激活的蛋白激酶 α (AMPK α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、肉碱棕榈酰转移酶 1a(CPT-1a)和酰基辅酶 A 氧化酶 1(ACOX1)的表达,从而减少肝脏脂质合成^[19]。白藜芦醇虽然未明显改变斑马鱼血浆中脂质含量和体质量、体长,但能明显改善肝脏脂肪浸润,提示其可能存在长效调脂作用^[20]。

2.3 抗炎药物的筛选

许多心血管病与炎症反应密切相关,如动脉粥样硬化、血管炎以及结缔组织病的心血管系统病变等。目前已构建大量特异荧光标记炎症细胞的转基因鱼系模型^[21],如用绿色荧光标记中性粒细胞的 $Tg(lyz : EGFP)$ 转基因鱼系、用红色荧光标记巨噬细胞的 $Tg(corola : mCherry)$ 鱼系等,可实时、动态观察在心肌细胞或血管内皮细胞受到损伤后发生炎症反应,或使用抗炎药物后对特定炎症细胞的分化、分布等方面的影响。Luo 等^[22]对荧光标记中性粒细胞和血管内皮细胞的 $Tg(lyz : EGFP ; flk1 : mCherry)$ 转基因鱼系喂养高胆固醇饮食,证实高胆固醇饮食诱导斑马鱼的血管内皮炎症反应

早于血管内中性粒细胞的募集和脂质沉积,且在动脉粥样硬化的初始阶段中性粒细胞募集早于脂质沉积。另外,用脂多糖处理斑马鱼胚胎可构建急性炎症反应斑马鱼模型。Fan 等^[23]利用绿色荧光标记中性粒细胞、红色荧光标记巨噬细胞的 $Tg(corola : mCherry ; lyz : dsRed)$ 转基因鱼系构建急性炎症反应模型,并对斑马鱼尾鳍进行部分切除,发现毛竹黄酮处理的斑马鱼模型的切口处中性粒细胞和巨噬细胞的募集显著减少。研究发现,利用特异荧光标记淋巴中性粒细胞和心肌细胞的转基因鱼系,在反复发生冷冻损伤后心肌恢复能力降低,这与中性粒细胞的募集增强和再生心肌细胞早期增殖和去分化减少有关^[24]。组胺在多种炎症反应中大量释放,有研究发现用组胺 H1 受体拮抗剂处理用特异荧光标记心肌细胞的 $Tg(cmlc2 : mCherry)$ 转基因斑马鱼胚胎,可引起胚胎心脏早期发育异常^[25]。还有研究发现干巴菌主要成分之一的菌丝体锌多糖-2(MZPS-2)可清除斑马鱼模型自由基,减少由炎症反应引起的活性氧的生成,并抑制中性粒细胞向损伤部位的聚集。

2.4 抗心肌损伤药物的筛选

Li 等^[26]将用特异荧光标记血管内皮细胞的 $Tg(kdrl : mCherry)$ 和用特异荧光标记心肌细胞的 $Tg(myl7 : GFP)$ 转基因斑马鱼暴露于拟除虫菊酯杀虫剂溴氰菊酯,联用褪黑素和丹参酮 II A 磺酸钠可以显著减轻溴氰菊酯引起的心血管毒性和睡眠唤醒,同时相关基因的表达恢复到正常水平。酒精可引起斑马鱼胚胎体长缩短和心脏水肿,而白藜芦醇对酒精引起的斑马鱼胚胎心脏有保护作用^[27]。阿霉素对斑马鱼心脏收缩力和心率有明显的负性作用,可导致斑马鱼胚胎心脏出血,心搏减弱甚至停跳;丹参的天然产物二氢丹参酮可减轻阿霉素对斑马鱼幼鱼的心脏毒性,提高心脏收缩功能、促进尾静脉血流^[28]。

2.5 其他心血管病治疗药物的筛选

在抗血栓药物筛选方面,利用花生四烯酸可在绿色荧光标记血红蛋白的 $Tg(LCR : EGFP)$ 斑马鱼上建立血栓模型。Qi 等^[29]发现丹红注射液的主要成分(丹参、红花、迷迭香酸和对香豆酸等)均有抗血栓形成作用。Sheng 等^[30]利用苯肼在绿色荧光标记成熟血小板的 $Tg(CD41 : EGFP)$ 和 $Tg(LCR : EGFP)$ 转基因斑马鱼上建立血栓模型,发现通脉的主要化学成分——隐丹参酮具有显著的抗

血栓作用。Zuo 等^[31]利用苯肼诱导的斑马鱼血栓模型,发现丹参可直接与凝血途径调控靶点中的凝血酶、凝血因子Ⅹa和环氧合酶-1发生反应,而川芎可以特定的比例与丹参配伍,发挥协同抗血栓作用。在抗心律失常药物筛选方面,Liu 等^[32]利用特非那定在 *Tg(cmlc2 : GFP)* 斑马鱼胚胎上建立心律失常模型,发现稳心颗粒中提取的人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、三七皂苷 R1、党参炔苷和党参提取物 Lobetyolinin 等化合物具有抗心律失常作用。

多种药物可通过诱导心肌损伤构建心力衰竭斑马鱼模型。异丙肾上腺素诱导的慢性心力衰竭模型中斑马鱼出现心率降低,心室腔面积增大,射血分数降低和心包水肿^[33]。利用特定浓度的阿奇霉素处理斑马鱼胚胎 3 d 后,胚胎可出现心率降低和心输出量减少^[34],而雷公藤红素处理的斑马鱼胚胎会发生心脏畸形及出血^[35]。Huang 等^[36]发现马兜铃酸可使幼鱼心脏肌节聚集、肌纤维破坏和内皮细胞数量减少,从而使幼鱼出现心率减低、循环减慢或停止、血管淤血水肿等。

3 小结

斑马鱼模型极大地推动了心血管病药物的高通量筛选研究。利用斑马鱼模型进行药物筛选研究的规模大,效率高,成本低,有巨大的应用潜力。目前基于斑马鱼模型建立的心血管病治疗药物筛选平台的应用多集中于血管新生、脂代谢、心脏毒性等方面,而心律失常、心肌代谢病、高血压等疾病的斑马鱼模型和治疗药物筛选平台还有待完善。另外,现阶段利用斑马鱼模型进行药物筛选时一般是将药物溶于培养水,无法精确定量个体摄入量和血药浓度,可能导致实验结果偏倚。

参 考 文 献

[1] Gebuijs IGE, Metz JR, Zethof J, et al. The anti-epileptic drug valproic acid causes malformations in the developing craniofacial skeleton of zebrafish larvae[J]. *Mech Dev*, 2020, 163:103632.

[2] Zhu XY, Xia B, Ye T, et al. Ponatinib-induced ischemic stroke in larval zebrafish for drug screening [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 889:173292.

[3] Gauert A, Olk N, Pimentel-Gutierrez H, et al. Fast, In vivo model for drug-response prediction in patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(7):1883-1889.

[4] Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(1):33-41.

[5] Yu PB, Deng DY, Lai CS, et al. BMP type I receptor

inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification [J]. *Nat Med*, 2008, 14(12):1363-1369.

[6] Kithcart A, Macrae CA. Using zebrafish for high-throughput screening of novel cardiovascular drugs [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2017, 2(1):1-12.

[7] Hu G, Mahady GB, Li S, et al. Polysaccharides from astragalus radix restore chemical-induced blood vessel loss in zebrafish[J]. *Vasc Cell*, 2012, 4(1):2-9.

[8] Tang JY, Li S, Li ZH, et al. Calycosin promotes angiogenesis involving estrogen receptor and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in zebrafish and HUVEC[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7):e11822.

[9] Fan ZM, Wang DY, Yang JM, et al. Dalbergia odorifera extract promotes angiogenesis through upregulation of VEGFRs and PI3K/MAPK signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 204:132-141.

[10] Liu CL, Cheng L, Kwok HF, et al. Bioassay-guided isolation of norviburtinal from the root of *Rehmannia glutinosa*, exhibited angiogenesis effect in zebrafish embryo model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3):1323-1327.

[11] Du MJ, Chen JP, Lian BW, et al. Cardioprotective effects of timosaponin B-II isolated from *Anemarrhena rhizoma* in a zebrafish model[J]. *Pharmazie*, 2020, 75(5):201-204.

[12] Tse HY, Hui MN, 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.

[13] Yuan X, Han L, Fu P, et al. Cinnamaldehyde accelerates wound healing by promoting angiogenesis via up-regulation of PI3K and MAPK signaling pathways[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(6):783-798.

[14] Han B, Kou S, He K, et al. Anti-hypercholesterolemic effect of berbamine isolated from rhizoma coptidis in hypercholesterolemic zebrafish induced by high-cholesterol diet[J]. *Iran J Pharm Res*, 2018, 17(1):292-306.

[15] Stoletov K, Fang L, Choi SH, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish[J]. *Circ Res*, 2009, 104(8):952-960.

[16] Littleton RM, Miller M, Hove JR. Whole plant based treatment of hypercholesterolemia with *Crataegus laevigata* in a zebrafish model[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12:105-109.

[17] Kim JY, Hong JH, Jung HK, et al. Grape skin and loquat leaf extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-diabetic activity in vitro and in vivo in hypercholesterolemic zebrafish[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(3):606-614.

[18] Jin S, Hong JH, Jung SH, et al. Turmeric and laurel aqueous extracts exhibit in vitro anti-atherosclerotic activity and in vivo hypolipidemic effects in a zebrafish model[J]. *J Med Food*, 2011, 14(3):247-256.

- [19] Yu L, Gong L, Wang C, et al. Radix polygoni multiflori and its main component emodin attenuate non-alcoholic fatty liver disease in zebrafish by regulation of AMPK signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:1493-1506.
- [20] Ran G, Ying L, Li L, et al. Resveratrol ameliorates diet-induced dysregulation of lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7):e0180865.
- [21] Balkrishna A, Solleti SK, Verma S, et al. Validation of a novel zebrafish model of dengue virus (DENV-3) pathology using the pentaherbal medicine denguenil vati [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(7):971-980.
- [22] Luo H, Li QQ, Wu N, et al. Chronological in vivo imaging reveals endothelial inflammation prior to neutrophils accumulation and lipid deposition in HCD-fed zebrafish [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 290:125-135.
- [23] Fan H, Wu Q, Peng L, et al. Phyllobium chinense Fisch Flavonoids (PCFF) suppresses the M1 polarization of LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages by inhibiting NF-kappaB/iNOS signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:864-869.
- [24] Bise T, Sallin P, Pfefferli C, et al. Multiple cryoinjuries modulate the efficiency of zebrafish heart regeneration [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):11551.
- [25] Zhu X, Ding S, Li H, et al. Disruption of histamine/H1R signaling pathway represses cardiac differentiation and maturation of human induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):27-34.
- [26] Li M, Zhang T, Jia Y, et al. Combined treatment of melatonin and sodium tanshinone II A sulfonate reduced the neurological and cardiovascular toxicity induced by deltamethrin in zebrafish [J]. *Chemosphere*, 2020, 243:125373.
- [27] Wang F, Lin J, Jian J, et al. Protection role of resveratrol against alcohol-induced heart defect in zebrafish embryos [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(8):990-993.
- [28] Wang X, Wang Q, Li W, et al. TFEB-NF-kappaB inflammatory signaling axis; a novel therapeutic pathway of Dihydrotanshinone I in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):93.
- [29] Qi Y, Zhao X, Liu H, et al. Identification of a quality marker (Q-marker) of Danhong injection by the zebrafish thrombosis model [J]. *Molecules*, 2017, 22(9):1443.
- [30] Sheng J, Meng Q, Yang Z, et al. Identification of cryptotanshinone from Tongmai to inhibit thrombosis in zebrafish via regulating oxidative stress and coagulation cascade [J]. *Phytomedicine*, 2020, 76:153263.
- [31] Zuo HL, Linghu KG, Wang YL, et al. Interactions of antithrombotic herbal medicines with Western cardiovascular drugs [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159:104963.
- [32] Liu H, Chen X, Zhao X, et al. Screening and identification of cardioprotective compounds from Wenxin Keli by activity index approach and in vivo zebrafish model [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1288.
- [33] Kossack M, Hein S, Juergensen L, et al. Induction of cardiac dysfunction in developing and adult zebrafish by chronic isoproterenol stimulation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 108:95-105.
- [34] Yan Z, Huang X, Xie Y, et al. Macrolides induce severe cardiotoxicity and developmental toxicity in zebrafish embryos [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 649:1414-1421.
- [35] Wang S, Liu K, Wang X, et al. Toxic effects of celastrol on embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2011, 34(1):61-65.
- [36] Huang CC, Chen PC, Huang CW, et al. Aristolochic acid induces heart failure in zebrafish embryos that is mediated by inflammation [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 100(2):486-494.

(收稿:2020-09-16 修回:2020-11-17)

(本文编辑:丁媛媛)

(上接第 148 页)

- [36] Rattanawong P, Kanitsoraphan C, Kewcharoen J, et al. Chronic kidney disease is associated with increased mortality and procedural complications in transcatheter aortic valve replacement; a systematic review and meta-analysis [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2019, 94(3):E116-E127.
- [37] 李西慧, 李岩, 肖锋, 等. 终末期肾病透析依赖患者型心脏

手术的围手术期管理和随访结果 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2013, 45(4):634-638.

(收稿:2020-06-15 修回:2021-03-15)

(本文编辑:丁媛媛)