

基于斑马鱼模型上的蒙药相关实验研究进展

多兰

内蒙古鄂尔多斯市蒙医医院

DOI:10.12238/bmtr.v6i2.6954

[摘要] 斑马鱼(Danio rerio, zebrafish)是国际标准化组织认可的实验用鱼类,也是生命科学研究的四大模式动物之一。作为唯一适用于微孔板高通量筛选的脊椎动物,与人类基因高度同源性,有着哺乳动物的生理生化特性。斑马鱼体外受精发育、胚胎透明、胚胎生长周期短以及样本数量多、个体差异小、实验周期短、遗传背景清晰、效率高等特点,是现代医学研究治疗疾病的一种新型模式生物。作者主要在斑马鱼模型上的蒙药在神经、心血管肝脏以及抗癌等研究领域进行了综述。

[关键词] 斑马鱼; 蒙药; 机制; 综述

中图分类号: R197.3 文献标识码: A

Progress of experimental research on Mongolian medicine based on zebra fish model

Lan Duo

Ordos Mongolian Hospital

[Abstract] zebrafish (Danio rerio, zebrafish) is an experimental fish recognized by the International Organization for Standardization and one of the four model animals for life science research. As the only vertebrate suitable for microplate high-throughput screening, it is highly homologous to human genes and has the physiological and biochemical characteristics of mammals. Zebrafish is a new model organism for modern medical research and treatment of diseases, with the characteristics of in vitro fertilization development, embryo transparency, short embryo growth cycle, large number of samples, small individual differences, short experiment cycle, clear genetic background and high efficiency. The author mainly reviewed the application of Mongolian medicine on zebrafish model in the research fields of nerve, cardiovascular liver and anticancer.

[Key words] Zebrafish; A Mongolian medicine; Mechanism; summarize

斑马鱼(Danio rerio, zebrafish)是小型热带淡水鱼,鲤科、短担尼鱼属,染色体数为25对,与人类基因同源性达87%。2-3个月龄开始出现性别分化,3个月龄及以上性成熟,通常成年雄鱼呈流线形、腹部呈黄色,成年雌鱼呈纺锤形、腹部呈白色。成体身长仅4-6厘米。雌鱼单次产卵超200枚。样本数量多,个体差异小。胚胎及幼鱼通透透明,显微镜下可直接观察多种组织器官变化,实验结果直观易懂,可视化强。由于斑马鱼的基因序列、信号传导通路与人类保持高度相似性,斑马鱼也用在药物筛选、生物安全等研究中被用于某些疾病模型制备及药物筛选、器官发育与再生、生物安全等方面的研究。

1 蒙药在斑马鱼神经系统的相关研究

鱼类的神经系统由中枢神经系统,外周神经系统和植物神经系统三部分组成。中枢神经系统包括脑和脊髓;外周神经系统包括神经和脊神经;植物神经系统包括交感神经和副交感神经。中枢神经系统(CNS)是机体中可再生性最差的组织之一,在

面对外来毒性物质的伤害时非常脆弱,也是医学研究中最常见全身性毒性靶器官之一。目前已有文献^[1]采用吗替麦考酚酯诱导斑马鱼中枢神经损伤模型。用乙醇诱导建立斑马鱼外周运动神经损伤及轴索损伤模型;用溴化乙锭诱导建立斑马鱼髓鞘损伤模型。

白脉病最早在蒙医学经典《医学四部》里记载了,如:“白脉导源于胁向下运行像根;风之机素乱而入脉道形成白脉病”,后来也在《甘露四部》、《蓝琉璃》等蒙医学书本中此经典基础上解析了白脉,病的生理,病因病机,治疗法,预防等。蒙医学认为白脉是人体两大脉络系统之一,脑、脊髓、白脉可统称为白脉系统^[2]。它从脑部发出,泛指西医的神经系统,包括脑、脊髓及周围神经。蒙医认为白脉病是指赫依、血交搏,使得白脉受损所导致的以麻木、肿痛等为症状的疾病,又称为“白痹”^[3-4]。蒙医治疗总则:调体素,通白脉,行气血为总则。蒙药中关于治疗神经方面的药物有许多,如珍宝丸、额尔敦-乌日勒、嘎日迪-13、

萨乌日勒、二十五味珍珠丸等等。其中珍宝丸是一种传统的临床蒙药,主要用于白脉病,半身不遂,风湿,类风湿,肌筋萎缩,神经麻痹,肾损脉伤,瘟疫热病不治不愈等症。目前关于珍宝丸的报道有基于网络药理学修复萨病神经损伤^[5]、对糖尿病末梢神经炎临床疗效^[6]、联合单唾液酸四己糖神经节苷脂钠治疗高血压脑出血^[7]等。陈泓松^[8]通过A1C13诱导并建立了拟似AD斑马鱼模型来评估珍宝丸对AD斑马鱼治疗效果。结果中发现A1C13诱发了拟似AD的行为障碍,增加了斑马鱼脑部细胞凋亡,提高了AChE的活性。而不同浓度的珍宝丸通过抑制细胞凋亡的发生和降低乙酰胆碱酯酶的活性,减弱了A1C13诱发的拟似AD的行为障碍。在进行斑马鱼脑部染色检测后发现珍宝丸对AD斑马鱼模型有着脑部病理变化的修复作用。转录组学的结果分析,珍宝丸主要作用通路为细胞凋亡、p53信号通路,以及AChE来对抗A1C13诱发的拟似AD的症状。此外高娃等人^[9]利用液相色谱-质谱联用法(LC-MS)鉴定额尔敦-乌日勒大鼠灌胃给药后的入血成分,发现额尔敦-乌日勒给药后可对核黄素、胆碱、乙酰胆碱、睾酮等对机体有益的差异代谢物含量升高,给药后的差异代谢物主要富集于核黄素代谢、甘油磷脂代谢、甾类激素生物合成代谢、柠檬酸循环代谢和乙醛酸和二羧酸代谢等代谢通路。

2 蒙药在斑马鱼心血管方面的相关研究

斑马鱼的心脏位于最后一对腮的后面下方,靠近头部,由一个心房和一个心室组成。与哺乳动物不同,斑马鱼的心脏从左室前方发出的动脉干(腹主动脉)起始有一球状肥厚部,称为动脉球;在心房的外侧有一薄、腔细管状的结构,称为静脉窦。斑马鱼只有一个心室,壁厚,肌肉发达。

心脑血管疾病一直以来是一种严重威胁人类,这种疾病发病速度快,往往也没有什么先兆。根据《中国心血管健康与疾病报告2022》报告显示,我国心血管病(cardiovascular disease, CVD)现患病人数3.3亿,这对健康造成了巨大威胁^[10]。特别是对于50岁以上中老年人健康的常见病,具有高患病率、高致残率和高死亡率的特点,即使应用最先进、完善的治疗手段,仍可有50%以上的脑血管意外幸存者生活不能完全自理,全世界每年死于心脑血管疾病的人数高达1500万人,居各种死因首位。

蒙医认为心血管疾病系由三根失调相搏,进而导致了意识出现模糊、心悸怔忡的症状。心脏又是脏腑之首,与主脉相连,在普行赫依的作用下,将血液输送到全身,营养全身的组织器官。蒙医将心血管疾病分为心悸、心热、心刺痛、心黄水病、心迷、先天性心脏病、高血压心脏病等。蒙药中关于治疗心血管疾病的药有很多,如珍宝丸、额尔敦-乌日勒、赞旦-3汤、广枣七味丸、阿嘎如-35、沉香-8散、珍宝丸、古日古木-13、嘎日迪-13等。其中蒙药毛勒日-达布斯-4汤联合维生素D可以有效调节高脂血症大鼠的血脂水平及维生素D含量^[11]。蒙药沙棘-5味散可调节小鼠脂质代谢紊乱抑制动脉粥样硬化的发展^[12]。临床观察中,当贡-3改善患者心功能水平和血液流变来改善冠心病不稳定性心绞痛^[13]等。

蒙医在治疗心血管疾病方面的效果显著,而且蒙药不仅疗效好而且更加天然安全。其中治疗心血管疾病的常用方剂额尔敦-乌日勒为临床上治疗多种疾病的常用蒙成药,具有好的疗效。林玉凤等人^[14]在斑马鱼上建立其心肌损伤模型后再加入蒙药额尔敦-乌日勒对其心肌损伤的修复进行了研究。研究结果表明治疗组斑马鱼胚胎经过蒙药额尔敦-乌日勒治疗后,心肌损伤后的再生修复比例明显上升,且再生心肌细胞的增殖速度较对照组加快、炎症因子表达量明显低于对照组。表明蒙药额尔敦-乌日勒能够促进斑马鱼胚胎心肌细胞的修复再生,并促进心肌细胞的增殖,抑制心室损伤后的炎症反应。这也说明蒙药额尔敦-乌日勒对于防治心脑血管疾病的疗效显著。相比于其他模式生物,斑马鱼在心血管相关疾病研究方面具有以下优势。大模式生物如大小鼠类以及兔类实验动物周期长、实验成本高尤其对于不适于活体观察,斑马鱼从胚胎形成开始就幼体通透透明,可在显微镜下观察到心跳、血流等基本指标。

3 蒙药在斑马鱼肝脏系统的相关研究

斑马鱼的消化腺和消化管构成消化系统,共同将摄入的食物变成能被吸收的小分子物质。消化腺包括肝脏、胆囊和胰腺等。斑马鱼的肝脏位于腹腔前部,是内脏团中最大的实质性器官。斑马鱼的肝脏薄而狭长,分为左叶、右叶与腹叶三叶,分别从肠道起始端左右两肩及腹部向尾端延伸,覆盖肠道大部分以及左右两叶在尾端相连。

2023年7月,据数据统计,中国各类肝脏疾病患者达4亿多人,大约每3个人中就有一人患有慢性肝病,其中患有乙肝的人群占到了大约24%,肝脏疾病已经成为了危及人们健康的最普遍疾病。现代人生活节奏快、工作压力大,这导致很多人没有良好的生活习惯,据研究表明,长期饮酒、熬夜等对肝脏影响很大,容易诱发肝炎。肝脏作为主要的解毒和代谢器官,是碳水化合物的合成、代谢、储存和再分配的主要场所。如肝脏出现了病理性病变人体将引起慢性炎症性肝病以及其他代谢问题。如不及时检查,这些问题会导致脂肪性肝炎蒙医认为,肝在肋下,胆附于其中,血希拉总位。肝病主要由于饮食精浊相混,血与希拉相搏而伤及肝脏,导致肝脏功能紊乱,恶血激增所致。饮食精华部分在肝脏的变色希拉作用下化生为血,因此肝主血。另外肝属木,木易生火。因而饮食不节,过度食用辛辣及酸辣食品,饮酒过度,过度疲劳,粘疫,中毒,长期在高温或强烈日光下劳动都是诱发肝病的外在原因。因此,肝脏疾病主要表现为食欲不振,肝及左右肋部胀痛,皮肤发黄,目赤^[15]。目前肝病方面报道的有德都红花-7散对大鼠慢性肝损伤有保护作用^[16]。古日古木-13对CCI4诱导的大鼠肝纤维化有改善作用^[17]。蒙药清肝二十七味对酒精性肝纤维有一定干预作用^[18]。红花清肝十三味丸对病毒性肝炎和新生儿肝炎有一定疗效^[19,20]。给旺-9散对急性肝衰竭的大鼠有保肝抗炎的作用^[21]等。

萨日盖其其格^[22]以蒙医药经典的复方保肝药为代表的“伊赫汤”研究其“伊赫汤”对酒精性脂肪肝的保护作用。作者研

究发现在持续黑暗处理诱导的斑马鱼体重增加、脂肪变性, 而伊赫汤能抑制这种体重的增加, 并抑制斑马鱼肝脏脂肪变性。在基因测序研究中发现, 持续黑暗处理导致斑马鱼肝脏中脂质合成相关基因、*fasn*显著上调, 脂质合成相关基因*cpt1*、*acadm*显著下调, 而伊赫汤处理的斑马鱼几乎恢复到了对照组相同水平。在肠道微生物群测序研究中发现, 经伊赫汤投喂的斑马鱼物种丰度*chao1*和ACE指数也明显升高。在肠道菌群研究发现, 伊赫汤投喂的斑马鱼恢复了变形菌门(Proteobacteria)的丰度, 趋近于对照组水平, 也增加了梭杆菌门(Fusobacteria)和鲸杆菌属(Cetobacterium)丰度。说明了蒙药“伊赫汤”对酒精性脂肪肝有保护作用。此外宋磊^[23]使用硫代乙酰胺诱导斑马鱼幼鱼肝脏病变, 制作肝脏纤维化模型, 并对肝脏面积、脂肪沉积、纤维化程度以及谷胱甘肽含量进行评估。之后分别监测两种保护肝的药物伊赫汤和姜黄素的修复效果。结果发现, 硫代乙酰胺染毒8d后, 肝脏荧光面积下降, 苦味酸天狼星红染色可见显著的胶原纤维沉积, 谷胱甘肽含量降低, 而伊赫汤组或姜黄素处理后显著恢复了硫代乙酰胺造成的各种指标的变化。硫代乙酰胺染毒显著升高了纤维化关联基因(*Tgf-β*、*ACTA2*、和*Col1α1*)基因表达的上升($P < 0.05$), 而伊赫汤处理(0.5mg/g+TAA)抑制这些基因表达的上升($P < 0.05$), 姜黄素处理后也表现出类似的表达趋势。以上结果表明硫代乙酰胺可制作肝脏纤维化模型, 而伊赫汤和姜黄素都有显著抑制肝纤维化作用。

4 蒙药在斑马鱼癌症方面的研究探索

癌症是由于机体细胞失去正常调控, 过度增殖而引起的疾病。其病因可分为外源性和内源性两大类。蒙药在对癌症的治疗中有着独特的经验和治疗手法, 也有许多良好疗效的药物, 如温建勋等人^[24]以蒙药巴特尔-7治疗口腔上皮癌的KB细胞增殖。布图雅等人^[25]研究发现蒙药尼如优化剂可预防治疗溃疡性结肠炎相关癌。武超等^[26]在临床中收集了蒙药乌门-17味散治疗晚期食管贲门癌234例临床观察等相关报道。黑色毒瘤为常见的恶性皮肤癌, 也是恶性度高、转移很快的皮肤癌。目前仍没有良好的药物去治疗该疾病。董文静^[27]利用蒙药狼毒中苯乙酮类化合物狼毒乙素对黑色素瘤的治疗抑制效果。作者将建立好的黑色素肿瘤细胞注射在斑马鱼卵黄囊内诱发癌变, 再使用狼毒乙素进行治疗利用RT-PCR技术、相关基因表达、凋亡方面进行了比对。结果发现, 狼毒乙素对肿瘤细胞造成的斑马鱼SIV的异位血管长度和数量的增加有显著的抑制作用, 也同样抑制A2058细胞在斑马鱼体内的迁移。在进行血管生长相关的基因表达中狼毒乙素可以降低*vegfr2*、*vegfr3*这些基因的mRNA的表达, 并且狼毒乙素能够促进斑马鱼*p53*和*caspase3*基因的表达。体外实验也发现狼毒乙素能够有效抑制A2058细胞的生长, 促进A2058细胞的凋亡。

5 讨论

蒙医药是蒙古族的文化遗产之一, 它是蒙古族人民在长期的医疗实践中逐渐形成与发展起来的, 它吸收了藏医、汉医以及古印度医学理论和医疗经验, 逐步发展形成了具有鲜明民族特

色、地域特点和独特理论体系、临床特点的民族传统医学, 也是祖国传统医学的重要组成部分。是祖国传统医学的绚烂瑰宝。蒙药由于低毒、高效、多靶点等优点在临床上得到了广泛的应用。斑马鱼是近年来一种新的模式生物, 因具有易饲养、体型小、生长与繁殖周期短、胚胎透明、体外发育、遗传背景清晰、与人类同源性高、有较为完整的基因组注释易于进行基因工程操作以及用样量仅小鼠的1%, 雌鱼单次产卵超200枚, 个体差异小、胚胎在24h内可发育成形等特点以及在实验周期方面斑马鱼的1天相当于鼠类的8-10天, 实验周期短, 效率高。养殖和实验成本较大小鼠和家兔等哺乳动物低, 实验费用成本优势等特点现广泛应用于生物学、细胞学、病理学、遗传学、药理学、毒理学、水产学以及环境检测等学科领域。

6 展望

现阶段, 相比于西药的发展蒙药在斑马鱼模型上的实验研究起步较晚, 实验研究较少, 相关的基础实验还有待发展。斑马鱼是现代医学优良的动物疾病模式, 这对于蒙药今后的筛选、评估以及治疗疾病的发病机制有很大的研究价值。蒙药在心血管、神经以及炎症方面有很多的优秀传统药物, 可利用自身的特点在斑马鱼实验模式上研究其药物的机制作用, 充分发挥蒙医药在各类疾病中特色优势。同时, 公司、医学院或医院也可以选拔一批精英人才, 组建学术团队, 利用斑马鱼的自身特点来进行药物的研究和创新, 更多的培养出优秀的医学界的精英。

【参考文献】

- [1]朱晓宇,王红月,李怀平.如意珍宝丸对斑马鱼神经损伤的保护及促再生作用研究[J].药物评价研究,2017,40(3):307-313.
- [2]阿古拉.蒙医温针疗法专著[M].赤峰:内蒙古科学技术出版社,2018:9-10.
- [3]白清云.中国医学百科全书·蒙医学[M].上海:上海科学技术出版社,1992:92.
- [4]策·苏荣扎布.蒙医百科全书[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,2002:592,92.
- [5]伟华.基于网络药理学探讨蒙药珍宝丸修复萨病(脑卒中)神经损伤作用机制[D].通辽:内蒙古民族大学,2013.
- [6]兴安.蒙药额尔敦乌日勒治疗糖尿病末梢神经炎的临床疗效评价[D].通辽:内蒙古民族大学,2013.
- [7]单唾液酸四己糖神经节苷脂钠联合额尔敦-乌日勒治疗高血压脑出血的疗效研究[D].通辽:内蒙古民族大学,2013.
- [8]陈泓松.珍宝丸对拟似阿尔兹海默症斑马鱼神经病变的治疗作用[D].通辽:内蒙古民族大学,2013.
- [9]高娃,包斯琴,王青亮.蒙药额尔敦-乌日勒非靶向代谢组学研究[J].中医药导报,2023,29(9):1-6.
- [10]中国心血管健康与疾病报告编写组.中国心血管健康与疾病报告2022概要[J].中国循环杂志,2023,(38)6:613-620.
- [11]文都日娜.蒙药毛勒日-达布斯-4汤联合维生素D对高脂血症模型大鼠血脂水平的影响[D].内蒙古民族大学,2023.

- [12]健美.蒙药沙棘-5味散对动脉粥样硬化模型小鼠脂质代谢及氧化应激的影响[D].内蒙古民族大学,2023.
- [13]贾敏,苏和,张瑞芬.蒙药当贡-3对冠心病不稳定性心绞痛患者心功能的影响[J].中国民族医药杂志,2021,27(09):31-32+50.
- [14]林玉凤,赵蕊,陈向辉.蒙药额尔敦-乌日勒对心肌损伤的修复作用及机制探讨[J].包头医学院学报,2023,39(08):1-5+11.
- [15]孟根斯立木,梁洁金,蓉蒙.蒙医药治疗肝病的研究进展[J].中国民族医药,2018,24(8):60-63.
- [16]韩志强,巴图德力根,薛兰.德都红花-7散对大鼠慢性肝损伤保护机制[J].中国临床药理学,2022,38(21):2596-2599.
- [17]道力格玛,邓乌力吉,萨础拉.蒙药古日古木-13对CCI4诱导的大鼠肝纤维化的改善作用及其机制研究[J].亚太传统医药,2022,18(11):19-23.
- [18]金天亮,解玉兰,王亚娟.超声瞬时弹性成像评价蒙药清肝二十七味丸干预酒精性肝纤维化疗效研究[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2022,37(5):426-429.
- [19]唐莉.蒙药红花清肝十三味丸治疗病毒性乙型肝炎临床效果[J].中国民族医药,2022,28(2):14-15.
- [20]刘丹.蒙药红花清肝十三味丸辅治新生儿肝炎综合症临床观察[J].实用中医药杂志,2022,38(1):131-132.
- [21]乌日嘎,闹敏,赞根蒙药给旺-9散对D-Ga1N诱导急性肝衰竭大鼠保肝、抗炎及组织形态学改变的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(11):4090-4096.
- [22]萨日盖其其格.模拟黑暗养殖条件下蒙药伊赫汤对斑马鱼肝脏脂肪变性抑制作用[D].内蒙古民族大学,2022.
- [23]宋磊.伊赫汤及姜黄素对硫代乙酰胺诱导的斑马鱼幼鱼肝纤维化的抑制作用[D].内蒙古民族大学,2022.
- [24]温建勋,李二俊,包永利.蒙药巴特尔-7抑制口腔上皮癌KB细胞增殖及诱导细胞周期阻滞作用研究[J].内蒙古医科大学学报,2019,41(2):148-151.
- [25]布图雅,孙勤暖,广布加甫·藏登.蒙药尼如哈优化剂对溃疡性结肠炎相关癌小鼠的一般情况和结肠组织病变的影响[J].中成药,2015,37(4):883-887.
- [26]武超,马东野.乌门-17味散治疗晚期食管贲门癌234例临床观察[J].中国民族医药杂志,2001,7(2):12-13.
- [27]董文静.狼毒乙素对黑色毒瘤诱导斑马鱼血管增生抑制作用的研究[D].通辽:内蒙古民族大学,2020.

作者简介:

多兰(1996--),女,蒙古族,内蒙古锡林郭勒盟人,硕士研究生,初级蒙药师,研究方向:蒙药检验与斑马鱼科学研究。