

基于斑马鱼模型的中药来源化合物血管抑制活性筛选

罗国良¹, 朱小翠¹, 潘红辉^{1,2}, 王芳芳¹, 范杰¹, 姚建标^{1,2*} (1.浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江省中药制药技术重点实验室, 杭州 310052; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 利用斑马鱼高通量模型, 对 10 种中药来源化合物进行筛选。方法 选取受精后转基因血管荧光 Fli-1 品系斑马鱼对 10 个中药来源的化合物进行筛选, 用不同的药物浓度分别作用于斑马鱼, 观察对斑马鱼体血管的影响。以斑马鱼肠下血管面积为主要指标, 斑马鱼肠下血管出芽数为次要指标进行定量分析, 考察各化合物对斑马鱼血管生成的抑制作用。结果 木犀草素($87.34 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、洋川芎内酯 A($52.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、盐酸小檗碱($537.91 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、和厚朴酚($9.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、齐墩果酸($10.95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组斑马鱼肠下血管面积与正常对照组相比肠下血管面积显著减少($P<0.01$ 或 $P<0.001$); 木犀草素、洋川芎内酯 A、盐酸小檗碱、齐墩果酸、和厚朴酚对肠下血管面积的抑制作用分别为 12%, 17%, 18%, 15%, 24%; 各化合物与正常对照组相比斑马鱼肠下血管出芽数无显著性差异; 阳性对照组(索拉非尼 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)斑马鱼肠下血管面积与正常对照组比较显著性减少($P<0.05$), 其对血管新生的抑制作用为 22%, 肠下血管出芽数与正常对照组相比显著性减少($P<0.05$)。结论 木犀草素、洋川芎内酯 A、盐酸小檗碱、齐墩果酸、和厚朴酚具有抑制血管新生作用。

关键词: 斑马鱼; 中药来源化合物; 血管抑制

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2022)17-2186-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.17.003

引用本文: 罗国良, 朱小翠, 潘红辉, 等. 基于斑马鱼模型的中药来源化合物血管抑制活性筛选[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(17): 2186-2191.

Screening of Angiogenic Inhibitory Activity of Herbal-derived Compounds Based on Zebrafish Model

LUO Guoliang¹, ZHU Xiaocui¹, PAN Hongye^{1,2}, WANG Fangfang¹, FAN Jie¹, YAO Jianbiao^{1,2*} (1.Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd., Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China; 2.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To screen 10 herbal-derived compounds by using zebrafish high-throughput model. **METHODS** Selection of transgenic vascular fluorescent Fli-1 zebrafish after fertilization for screening of 10 herbal-derived compounds, and the effects on the body vasculature of zebrafish were observed by applying different drug concentrations to zebrafish. The inhibition effects of the compounds on the angiogenesis of zebrafish were quantified by using the area of subintestinal vessels as the main index and the number of subintestinal vessels sprouting as the secondary index. **RESULTS** The subintestinal vascular area of zebrafish was significantly reduced in the groups of lignocaine($87.34 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), senkyunolide A($52.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), berberine hydrochloride($537.91 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), honokiol($9.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and oleanolic acid($10.95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) compared with the normal control group($P<0.01$ or $P<0.001$). The inhibitory effects of lignocaine, senkyunolide A, berberine hydrochloride, oleanolic acid and honokiol on the area of subintestinal vessels were 12%, 17%, 18%, 15% and 24%, respectively. There was no significantly difference in the number of subintestinal vascular outgrowth in zebrafish between each compound and normal control group. The positive control group($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sorafenib) had a significant reduction in subintestinal vascular area of zebrafish compared with normal control group($P<0.05$), and its inhibition effect on neovascularization was 22% and the number of subintestinal vascular outgrowth was significantly reduced compared with normal control group($P<0.05$). **CONCLUSION** Lignocaine, senkyunolide A, berberine hydrochloride, oleanolic acid, and honokiol have inhibitory effects on angiogenesis.

KEYWORDS: zebrafish; herbal-derived compounds; vascular inhibition

肿瘤学专家们普遍认为, 肿瘤的生长、存活与转移需要凭借着血管的形成才得以实现。新生血管为肿瘤细胞的生长与生存提供氧气和营养物质^[1], 同时血管也是肿瘤细胞代谢产物的主要排泄

途径, 并且在没有血管形成的情况下, 肿瘤的营养供给及代谢物排泄仅依靠简单的物理弥散。新生血管也是肿瘤细胞向远处转移的重要通道, 肿瘤初生长时周围并没有血管, 一定要有新生血管长到肿

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2017ZX09304003)

作者简介: 罗国良, 男, 硕士, 工程师 E-mail: luogl@conbagroup.com

*通信作者: 姚建标, 男, 硕士, 正高级工程师 E-mail: tyjackie@163.com

瘤组织里,肿瘤细胞才能从血液中吸收生长所需的营养,继续长大或者转移到其他地方,因此,抑制血管新生与肿瘤的治疗有着紧密的关联^[2-5]。

中药是中国的传统药物,有着悠久的历史,对来源于中药的化合物,挖掘其药理作用有一定的研究价值。笔者前期以药理作用与心血管、肿瘤的相关性为化合物的入选标准,建立了中药材特色化合物库,以血管新生、抗肿瘤为关键词进行大量文献检索,确定了穗花杉双黄酮、绿原酸、柯里拉京、栀子苷、川芎嗪、木犀草素、洋川芎内酯 A、盐酸小檗碱、和厚朴酚、齐墩果酸为初步筛选目标化合物。传统药物大规模筛选往往采用细胞模型,但由于细胞模型与动物体系差异巨大,多数在细胞模型上表现出良好药物活性的化合物往往在动物模型上活性表现不如预期,能顺利开发成新药的概率小^[6-7]。

斑马鱼是一种模式生物,这种动物的独特优势在于,首先斑马鱼作为一种哺乳动物在遗传学的范畴上与人类相似,基因同源度高达 87%^[8];其次斑马鱼全身透明,可肉眼观察到体内的组织结构特点,被认为是最理想的血管生成在体研究模型,其从主动脉向背侧分出的节间血管从受精后 22~24 h(22~24 hours postertilization, 22~24 hpf)发育生长,到 48 hpf 时基本发育完全,血管生成过程与哺乳动物相似^[9];另外,斑马鱼发育生长迅速,在其 24 hpf 便可以进行简单的血液循环观察,相比大鼠,选择斑马鱼的实验周期可以大大地缩短。而且斑马鱼的体型相对微小,仅仅只有 2~3 mm 的体长,可放入 6 孔板中进行实验观察,实现高通量筛选的要求,提高实验效率。因此,本研究选择中药来源的化合物,采用斑马鱼模型为肿瘤药物的开发筛选先导化合物^[10-12]。

1 仪器与试剂

SZX7 解剖显微镜(日本 OLYMPUS 公司);TK-C1481EC CCD 相机(日本 JVC);AZ100 电动聚焦连续变倍荧光显微镜(日本 Nikon 公司);CP214 精密电子天平(美国 OHAUS 公司)。

二甲基亚砜(DMSO,批号:BCBN0845V)、甲基纤维素(批号:SLBT4343)均购自美国 Sigma 公司;穗花杉双黄酮(批号:P09J8F37712;纯度>98%)、绿原酸(批号:Y22M8K36544;纯度>98%)、柯里拉京(批号:P09A10F85329;纯度>98%)、栀子苷(批号:S14J10Y79596;纯度>98%)、洋川芎

内酯 A(批号:C29M11S114322;纯度>98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;川芎嗪(上海麦林生化科技有限公司,批号:C10530297;纯度>98%);木犀草素(批号:111520-200504;纯度>96.3%)、和厚朴酚(批号:110767-201106;纯度>98%)、齐墩果酸(批号:110709-201206;纯度>95.8%)均购自中国食品药品检定研究院;盐酸小檗碱(四川协力制药有限公司,批号:C025A180603;纯度>98%);索拉非尼(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:K1404068);6 孔板(中国 Nest Biotech 公司,批号:022522BA01)。

2 方法

2.1 配制样品溶液

所有化合物用 DMSO 配制成母液保存。穗花杉双黄酮用 DMSO 配制成 $185.71 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 4°C 保存;绿原酸用 DMSO 配制成 $225.79 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 4°C 保存;柯里拉京,白色固体颗粒,用 DMSO 配制成 $157.62 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 4°C 保存;栀子苷,白色固体颗粒,用 DMSO 配制成 $205.99 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 4°C 保存;川芎嗪用 DMSO 配制成 $220.28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,室温保存;木犀草素用 DMSO 配制成 $209.61 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 4°C 避光保存;洋川芎内酯 A 用甲醇配制成 $1040.31 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 4°C 避光保存;盐酸小檗碱用 DMSO 配制成 $107.58 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,室温避光保存;和厚朴酚用 DMSO 配制成 $206.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, -20°C 保存;齐墩果酸用 DMSO 配制成 $21.90 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, -20°C 保存。索拉非尼用 DMSO 配制成 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,DMSO 稀释至所需浓度, -20°C 保存。

2.2 供试品对斑马鱼血管新生抑制作用评价

随机选取 360 尾 48 hpf 转基因血管荧光 Fli-1 品系斑马鱼于 6 孔板中,每组为 30 尾,共 12 组,以水溶给药的方式给予穗花杉双黄酮 $23.21 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、绿原酸 $564.48 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柯里拉京 $1576.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、栀子苷 $2059.89 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、川芎嗪 $183.57 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、木犀草素 $87.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、洋川芎内酯 A $52.02 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、盐酸小檗碱 $537.91 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、和厚朴酚 $9.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、齐墩果酸 $10.95 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,阳性对照组索拉非尼 $5.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,同时设置正常对照组(养鱼用水处理组)。每组(孔)均处理 30 尾斑马鱼,每组(孔)容量为 3 mL。处理 24 h 后,每组随机取 10 条斑马

鱼在荧光显微镜下观察斑马鱼肠下血管、拍照并保存图片。用尼康 NIS-Elements D 3.10 高级图像处理软件进行图像分析, 计算斑马鱼肠下血管面积(S)和斑马鱼肠下血管出芽数(N), 以肠下血管面积和肠下血管出芽数的统计学意义评价化合物对斑马鱼血管新生的抑制作用。

供试品对血管面积抑制作用计算公式如下:

$$\text{血管面积抑制作用(\%)} = \frac{S(\text{正常对照组}) - S(\text{供试品组})}{S(\text{正常对照组})} \times 100\%。$$

统计学分析采用方差分析和 Dunnett's T -检验进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

阳性对照组(索拉非尼 $5.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)斑马鱼肠下血管面积(21 049 像素)与正常对照组(27 023 像素)比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 其对血管新生的抑制率为 22%; 阳性对照组斑马鱼肠下血管出芽数(0 个)与正常对照组肠下血管出芽数(0.6 个)相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 表明索拉非尼具有抑制斑马鱼血管新生的作用。

穗花杉双黄酮浓度为 $23.21 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管面积为 26 510 像素, 与正常对照组(27 023 像素)相比差异无统计学意义, 对肠下血管面积的抑制作用为 2%。穗花杉双黄酮浓度为 $23.21 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管出芽数为 0.9 个, 与正常对照组(0.6 个)相比差异无统计学意义。表明穗花杉双黄酮浓度为 $23.21 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生无明显影响。

绿原酸浓度为 $564.48 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管面积为 26 190 像素, 与正常对照组(27 023 像素)相比差异无统计学意义, 对肠下血管面积的抑制率为 3%。绿原酸浓度为 $564.48 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管出芽数为 1.2 个, 与正常对照组(0.6 个)相比差异无统计学意义。表明绿原酸浓度为 $564.48 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生无明显影响。

柯里拉京浓度为 $1\,576.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管面积为 25 421 像素, 与正常对照组(27 023 像素)相比差异无统计学意义, 对肠下血管面积的抑制率为 6%。柯里拉京浓度为 $1\,576.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管出芽数为 0.7 个, 与正常对照组(0.6 个)相比差异无统计学意

义。表明柯里拉京浓度为 $1\,576.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生无明显影响。

栀子苷浓度为 $2\,059.89 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管面积为 27 874 像素, 与正常对照组(27 023 像素)相比差异无统计学意义, 对肠下血管面积的促进率为 3%。栀子苷浓度为 $2\,059.89 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管出芽数为 0.6 个, 与正常对照组(0.6 个)相比差异无统计学意义。表明栀子苷浓度为 $2\,059.89 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生无明显影响。

川芎嗪浓度为 $183.57 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管面积为 27 153 像素, 与正常对照组(27 023 像素)相比差异无统计学意义。川芎嗪浓度为 $183.57 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管出芽数为 0.8 个, 与正常对照组(0.6 个)相比差异无统计学意义。表明川芎嗪浓度为 $183.57 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生无明显影响。

木犀草素浓度为 $87.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管面积为 23 842 像素, 与正常对照组(27 023 像素)相比差异具有统计学意义($P < 0.01$), 对肠下血管面积的抑制率为 12%。木犀草素浓度为 $87.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管出芽数为 1.3 个, 与正常对照组(0.6 个)相比差异无统计学意义。表明木犀草素浓度为 $87.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生具有明显的抑制作用。

洋川芎内酯 A 浓度为 $52.02 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管面积为 22 498 像素, 与正常对照组(27 023 像素)相比差异具有统计学意义($P < 0.001$), 对肠下血管面积的抑制率为 17%。洋川芎内酯 A 浓度为 $52.02 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管出芽数为 0.2 个, 与正常对照组(0.6 个)相比差异无统计学意义。表明洋川芎内酯 A 浓度为 $52.02 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生具有明显的抑制作用。

盐酸小檗碱浓度为 $537.91 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管面积为 22 140 像素, 与正常对照组(27 023 像素)相比差异具有统计学意义($P < 0.001$), 对肠下血管面积的抑制作用为 18%。盐酸小檗碱浓度为 $537.91 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 斑马鱼肠下血管出芽数为 2.1 个, 与正常对照组(0.6 个)相比差异具有统计学意义($P < 0.001$)。综合小檗碱的 2 种作用认为盐酸小檗碱浓度为 $537.91 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生具有明显的抑制作用。

和厚朴酚浓度为 $9.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为 22 915 像素,与正常对照组(27 023 像素)相比差异具有统计学意义($P<0.001$),对肠下血管面积的抑制作用为 15%。和厚朴酚浓度为 $9.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管出芽数为 1.2 个,与正常对照组(0.6 个)相比差异无统计学意义。表明和厚朴酚浓度为 $9.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生具有明显的抑制作用。

齐墩果酸浓度为 $10.95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管面积为 20 605 像素,与正常对照组(27 023 像素)相比差异具有统计学意义($P<0.001$),对肠下血管面积的抑制作用为 24%。齐墩果酸浓度为 $10.95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼肠下血管出芽数为 1.1 个,与正常对照组(0.6 个)相比差异无统计学意义。表明齐墩果酸浓度为 $10.95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对斑马鱼血管新生具有明显的抑制作用。结果见图 1 和表 1。

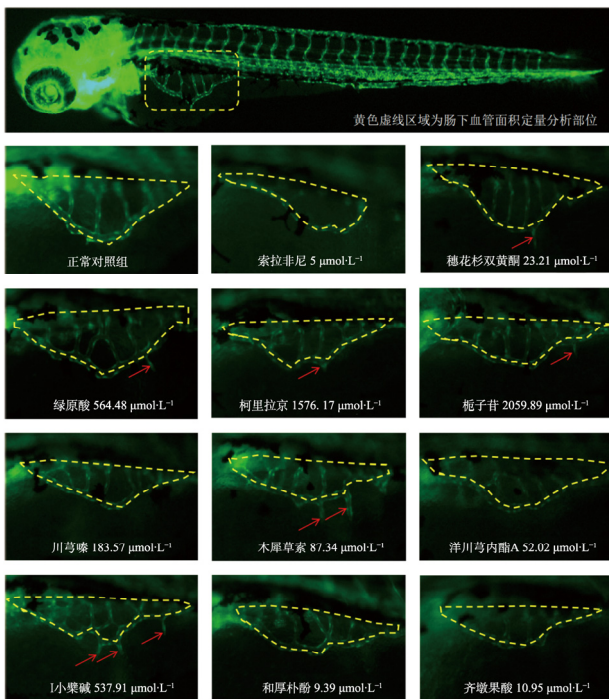


图 1 化合物对血管新生的抑制作用表型图
虚线标记部分为斑马鱼肠下血管,箭头所指为出芽数。

Fig. 1 Phenotype of the inhibitory effect of compounds on angiogenesis
Dashed line marked part was the subintestinal vessels of zebrafish, and the arrow indicated the number of outgrowths.

4 讨论

本研究选择斑马鱼作为模式生物,模拟中药源化合物临床给药方式,高通量筛选了 10 种来源于不同中药材的单体化合物对斑马鱼血管新生的影

表 1 化合物对血管新生的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Inhibition effect of compounds on angiogenesis($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	肠下血管 面积/像素	血管面积抑 制作用/%	肠下血管 出芽数
正常对照组	—	27 023±492	—	0.6±0.2
阳性对照组	5.00	21 049±2 520 ¹⁾	22	0±0.0 ¹⁾
穗花杉双黄酮	23.21	26 510±263	2	0.9±0.3
绿原酸	564.48	26 190±808	3	1.2±0.5
柯里拉京	1 576.17	25 421±936	6	0.7±0.3
栀子苷	2 059.89	27 874±949	0	0.6±0.4
川芎嗪	183.57	27 153±1 316	0	0.8±0.3
木犀草素	87.34	23 842±672 ²⁾	12	1.3±0.3
洋川芎内酯 A	52.02	22 498±492 ³⁾	17	0.2±0.1
盐酸小檗碱	537.91	22 140±990 ³⁾	18	2.1±0.3 ³⁾
和厚朴酚	9.39	22 915±864 ³⁾	15	1.2±0.3
齐墩果酸	10.95	20 605±604 ³⁾	24	1.1±0.2

注:与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

响情况,以此判断各化合物对血管生成抑制的活性作用强度,寻找抑制肿瘤等疾病的先导化合物。

穗花杉双黄酮是一种天然的双黄酮类化合物,具有很多生物活性,包括抗炎、抗氧化、神经保护等作用。可通过抑制细胞内氧化应激水平保护过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤^[13-14]。绿原酸是咖啡和茶中的主要酚类化合物。它具有一些重要的治疗作用,如抗氧化活性、抗菌、保肝、心脏保护、抗炎、解热、神经保护、抗肥胖、抗病毒、抗微生物、抗高血压等^[15-16]。柯里拉京属天然植物多酚单宁酸类化合物,在心血管系统的作用主要集中在其抗高血压作用、抗凝降纤作用、抑制血栓形成、预防缺血再灌注损伤、抑制低密度脂蛋白的氧化等方面^[17]。栀子苷是从栀子花中提取的环烯醚萜甙,具有多种生物活性,例如解热、镇痛、镇静、降压及止血、抗糖尿病、抗氧化、抗增殖和神经保护活性^[18-19]。川芎嗪已在中国广泛用于心脑血管疾病约 40 年。由于其在多系统中的有效性,尤其是在心血管方面。川芎嗪还被用于各种疾病,如冠心病、糖尿病、癌症和肝损伤^[20]。木犀草素是一种很具有代表性的天然黄酮,属弱酸性四羟基黄酮类化合物,在植物界分布较广。木犀草素通过抑制 p65 NF- κ B 磷酸化或促进 p85 PI3K 磷酸化调节微血管内皮细胞 VCAM-1 表达^[21]。洋川芎内酯 A 为伞形科植物川芎的干燥根茎,为活血化瘀常用中药,具有扩张血管、解痉

平喘、镇痛及抗肿瘤等作用^[22]。小檗碱又称黄连素，一种常见的异喹啉生物碱，它存在于小檗科等 4 个科 10 个属的许多植物中，主要的药理作用为抗菌，同时也有治疗糖尿病和调节血脂的作用^[23]。齐墩果酸是从龙胆科植物獐牙菜属的青叶胆全草或女贞子的果实中分离提取而得的一种五环三萜类化合物，主要具有护肝降酶、促进肝细胞再生、抗炎、强心、利尿、抗肿瘤等作用，还具有降血糖、降血脂、镇静的作用，是开发治疗肝病和降血糖等药物的有效成分^[24-25]。和厚朴酚是一种具有生物活性的双酚类植物化学物质，靶向多种信号分子，具有有效的抗氧化、抗炎、抗血管生成和抗肿瘤活性。它抑制 Akt 的活化并增强 ERK1/ERK2 的磷酸化^[26-29]。

本研究结果显示，在本实验浓度条件下，木犀草素、洋川芎内酯 A、盐酸小檗碱、齐墩果酸、和厚朴酚具有抑制血管新生的作用；穗花杉双黄酮、绿原酸、柯里拉京、栀子苷、川芎嗪对血管新生无抑制作用。

索拉非尼是一种口服多靶点多激酶抑制剂，具有双重抗肿瘤作用，一方面，可以通过抑制 RAF/MEK/ERK 信号传导通路，直接抑制肿瘤生长；另一方面，索拉非尼又可通过抑制 VEGFR 和 PDGFR 而阻断肿瘤新生血管的形成，间接抑制肿瘤细胞的生长^[30]。它的上述适应证已在美国获得了 FDA 授予的“快通道”审批地位。索拉非尼在中国临床主要用于治疗晚期肝癌以及晚期肾癌患者，有很好的疗效，但索拉非尼的价格昂贵，国内进口索拉非尼 1 盒近 25 000 元人民币，许多患者负担不起高昂的药费。所以研究出更有效又实惠的抗肿瘤药物对于肿瘤患者有着重大的现实意义。

因此，在后续的研究中，对于木犀草素、洋川芎内酯 A、小檗碱、齐墩果酸、和厚朴酚可以从抗肿瘤方面着手研究，采用传统药效研究模型，比如大鼠、小鼠、转基因裸鼠等确定各化合物的抗肿瘤作用，并进一步探讨其发挥作用的机制。

REFERENCES

- [1] CHEN Y S, ZHU Y R, LIU H, et al. Advances in the role of angiogenesis inhibitors and their application in anti-tumor therapy[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(16): 2042-2048.
- [2] EELLEN G, TREPS L, LI X R, et al. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis updated[J]. Circ Res, 2020, 127(2): 310-329.

- [3] TU Z W, TAO Y F, DONG J, et al. Cytotoxic drugs and its anti-angiogenesis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(7): 618-622.
- [4] SIGAUD R, DUSSAULT N, BERENGUER-DAIZÉ C, et al. Role of the tyrosine phosphatase SHP-2 in mediating adrenomedullin proangiogenic activity in solid tumors[J]. Front Oncol, 2021(11): 753244.
- [5] HAN Q M, HOU H L, ZHANG X C. Research progress on antitumor therapy of domestic innovative medicine anlotinib[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2020, 39(2): 65-70.
- [6] 冯堃, 曹咏. 积极推进中医药科研创新[N]. 河南日报, 2021-05-26(9).
- [7] SINGAREDDY S S, ROESSLER H I, MCCLENAGHAN C, et al. ATP-sensitive potassium channels in zebrafish cardiac and vascular smooth muscle[J]. J Physiol, 2022, 600(2): 299-312.
- [8] GORE A V, PILLAY L M, VENERO GALANTERNIK M, et al. The zebrafish: A fantastic model for hematopoietic development and disease[J]. WIREs Dev Biol, 2018, 7(3): e312.
- [9] 刘建勋, 李欣志. 中药新药有效性研究的新进展与新方法[J]. 世界科学技术, 2005, 7: 78-82, 89.
- [10] LIN Q, LIU J, HUANG L, et al. Application of zebra fish models in heart disease research and drug induced cardiotoxicity evaluation[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2021, 37(1): 247-251.
- [11] SUNDARRAJ S, SUJITHA M V, ALPHONSE C R W, et al. Bisphenol-A alters hematopoiesis through EGFR/ERK signaling to induce myeloblastic condition in zebrafish model[J]. Sci Total Environ, 2021(787): 147530.
- [12] MARRS J A, SARMAH S. The genius of the zebrafish model: Insights on development and disease[J]. Biomedicine, 2021, 9(5): 577.
- [13] HE F R, CAO L B, ZHANG L, et al. Effect of amentoflavone on H₂O₂-induced oxidative stress injury of vascular endothelial cells[J]. Int Med Heal Guid News(国际医药卫生导报), 2021, 27(13): 1941-1945.
- [14] XU P, JIANG E J, WEN S Y, et al. Amentoflavone acts as a radioprotector for irradiated v79 cells by regulating reactive oxygen species(ROS), cell cycle and mitochondrial mass[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(18): 7521-7526.
- [15] PARK J J, HWANG S J, PARK J H, et al. Chlorogenic acid inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of the HIF-1 α /AKT pathway[J]. Cell Oncol (Dordr), 2015, 38(2): 111-118.
- [16] WANG Q H, DU T T, ZHANG Z H, et al. Advances in research on the pharmacological effects and mechanism of action of chlorogenic acid[J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2020, 55(10): 2273-2280.
- [17] REN D J. The study of *Terminalia chebula* active ingredients promoting angiogenesis after cerebral ischemia injury by Nrf2/HO-1[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2019.
- [18] LIU H, CHEN Y F, LI F, et al. Fructus Gardenia (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) phytochemistry, pharmacology of cardiovascular, and safety with the perspective of new drugs development[J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15(1): 94-110.

- [19] LI F H, LI W H, LI X G, et al. Geniposide attenuates inflammatory response by suppressing P2Y₁₄ receptor and downstream ERK1/2 signaling pathway in oxygen and glucose deprivation-induced brain microvascular endothelial cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016(185): 77-86.
- [20] ZHAO Y K, LIU Y, CHEN K J. Mechanisms and clinical application of tetramethylpyrazine (an interesting natural compound isolated from *Ligusticum wallichii*): Current status and perspective[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016(2016): 2124638.
- [21] CHI D C, WANG D, ZHANG M H, et al. CLEC12B suppresses lung cancer progression by inducing SHP-1 expression and inactivating the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 409(2): 112914.
- [22] KAN W L T, CHO C H, RUDD J A, et al. Study of the anti-proliferative effects and synergy of phthalides from *Angelica sinensis* on colon cancer cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120(1): 36-43.
- [23] CAO Y Q, ZHOU L F, YU H, et al. The anti-diabetic chronic inflammation mechanism of berberine based on transcriptomics and proteomics analysis[J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2021, 30(5): 424-433.
- [24] MARTÍN R, CORDOVA C, SAN ROMÁN J A, et al. Oleanolic acid modulates the immune-inflammatory response in mice with experimental autoimmune myocarditis and protects from cardiac injury. Therapeutic implications for the human disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014(72): 250-262.
- [25] XIE B P, CHEN Z X, ZHAO Y, et al. Advances in the prevention and treatment of cardiovascular diseases with oleanolic acid[J]. *J Gannan Med Univ*(赣南医学院学报), 2019, 39(12): 1201-1206, 1257.
- [26] CHANG K H, YAN M D, YAO C J, et al. Honokiol-induced apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme cells[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(5): 1435-1438.
- [27] GODUGU C, DODDAPANENI R, SINGH M. Honokiol nanomicellar formulation produced increased oral bioavailability and anticancer effects in triple negative breast cancer(TNBC)[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017(153): 208-219.
- [28] LEE T Y, CHANG C C, LU W J, et al. Honokiol as a specific collagen receptor glycoprotein VI antagonist on human platelets: Functional *ex vivo* and *in vivo* studies[J]. *Sci Rep*, 2017(7): 40002.
- [29] ZHAI H F, NAKADE K, ODA M, et al. Honokiol-induced neurite outgrowth promotion depends on activation of extracellular signal-regulated kinases(ERK_{1/2})[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 516(2): 112-117.
- [30] JINDAL A, THADI A, SHAILUBHAI K. Hepatocellular carcinoma: Etiology and current and future drugs[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2019, 9(2): 221-232.

收稿日期: 2021-08-04
(本文责编: 李艳芳)