

I 型胶原蛋白对斑马鱼模型促组织再生及抗炎作用研究

陆欢欢^{1,2}, 周旭烨², 张智武²(1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江崇山生物制品有限公司, 杭州 311100)

摘要: 目的 观察 I 型胶原蛋白对斑马鱼模型的促组织再生及抗炎作用。方法 通过检测斑马鱼尾鳍再生面积和 *coll1b* 基因的相对表达量, 表征 I 型胶原蛋白促组织再生作用; 通过测量斑马鱼皮肤中性粒细胞数量变化表征 I 型胶原蛋白的抗炎作用。结果 与模型对照组相比, I 型胶原蛋白溶液处理斑马鱼尾鳍面积明显增大, 中性粒细胞数量明显减少。I 型胶原蛋白溶液处理后的斑马鱼 *coll1b* 基因的相对表达量明显高于正常对照组。结论 I 型胶原蛋白对斑马鱼模型具有促组织再生及抗炎作用。

关键词: I 型胶原蛋白; 斑马鱼模型; 组织再生; 抗炎

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2022)09-1182-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.09.008

引用本文: 陆欢欢, 周旭烨, 张智武. I 型胶原蛋白对斑马鱼模型促组织再生及抗炎作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(9): 1182-1186.

Study on Effect of Collagen Type I on Tissue Regeneration and Anti-inflammation in Zebrafish Model

LU Huanhuan^{1,2}, ZHOU Xuyue², ZHANG Zhiwu²(1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Chunsum Biological Products Co., Ltd., Hangzhou 311100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of collagen type I on tissue regeneration and anti-inflammation in zebrafish model. **METHODS** The effect of collagen type I on tissue regeneration was characterized by measuring the regeneration area of zebrafish caudal fin and the relative expression of *coll1b* gene. The anti-inflammatory effect of collagen type I was characterized by measuring the number of neutrophils in the skin of zebrafish. **RESULTS** Compared with the model control group, the caudal fin area of zebrafish treated with type I collagen solution increased significantly, while the number of neutrophils in zebrafish decreased significantly. The relative expression of *coll1b* gene in zebrafish treated with type I collagen solution was significantly higher than that in normal control group. **CONCLUSION** Type I collagen has the effects of promoting tissue regeneration and anti-inflammation in zebrafish model.

KEYWORDS: collagen type I; zebrafish model; tissue regeneration; anti-inflammatory

I 型胶原蛋白是动物细胞外间质蛋白质中的主要成分, 占人体总蛋白质的 25%~30%^[1-2]。I 型胶原蛋白与细胞外基质相互作用, 以促进细胞生长、黏附^[3]、移动和沉积; 能诱导成纤维细胞的趋化性, 促进创伤修复^[4]。I 型胶原蛋白促进细胞修复, 再生细胞胶原蛋白, 促进组织再生。近几年, 胶原蛋白作为医用生物材料, 在植入及其相关的配套设备和技术中得以运用, 成为国家战略性新兴产业之一。

研究 I 型胶原蛋白的功效的方法, 通常可以采用临床试验、小型哺乳动物试验等, 本课题采用斑马鱼试验。斑马鱼是种常见的热带鱼, 其试验周期短、个体差异小、实验结果直观易懂, 目前斑马鱼是经广泛验证的药物筛选通用模式之一^[5], 广泛用于研究人类疾病和高通量药物的筛选^[6-7]。田丽莉等^[8]对斑马鱼在中药中的应用做了概括, 如

对中药活性的筛选、抗炎药物筛选等。斑马鱼技术是传统体外试验向人体试验的有效过渡, 可全面评价有关产品及成分的安全性和功效。

1 材料与试剂

斑马鱼品系: 野生型 AB 品系、转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼(MPX 品系), 来源于国家斑马鱼资源中心, 由杭州环特生物科技股份有限公司饲养。

2.0 mg·mL⁻¹ 的 I 型胶原蛋白溶液(浙江崇山生物制品有限公司, 批号: 20201103); 无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20200302); iTaq Universal SYBR Green Supermix(美国 Bio-Rad, 批号: 1725124); FastQuant RT Kit(With gDNase)试剂盒(天根生化科技有限公司, 批号: KR106); RNA 快速提取试剂盒(上海奕杉生物科技有限公司, 批号: RN001); 甲醇(国药集团化学试剂有限公司,

作者简介: 陆欢欢, 女, 药师 E-mail: 402939973@qq.com

批号: 20190618); 十二烷基磺酸钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: K1928143)。

2 方法

2.1 I型胶原蛋白培养浓度的选择

添加I型胶原蛋白溶液于斑马鱼培养体系中, 设置斑马鱼培养体系中 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的I型胶原蛋白溶液的浓度为 1.25%, 2.50%, 5.00%, 即斑马鱼培养体系中胶原蛋白最终浓度为 0.025, 0.050, $0.100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每组斑马鱼数量 30 尾, 观察在 0.025, 0.050, $0.100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胶原蛋白浓度下, 斑马鱼的存活率及状态。

2.2 斑马鱼尾鳍再生试验

选择状态良好, 受精后 3 d 的野生型 AB 系斑马鱼 45 尾于 6 孔板中。将斑马鱼分成 3 组, 分别是正常对照组、模型对照组和 I 型胶原蛋白溶液组, 每组 1 孔, 每孔 15 尾斑马鱼。正常对照组不做任何处理, 模型对照组以及 I 型胶原蛋白溶液组采用同等操作方法切断斑马鱼尾鳍。挑选尾鳍损伤程度一致的斑马鱼随机分组于 6 孔板。将 I 型胶原蛋白溶液添加到 I 型胶原蛋白溶液组的孔板中, 每孔定容 3 mL, 将各实验组于 28°C 条件下避光孵化 48 h。在各实验组中, 随机挑选斑马鱼 10 尾, 在可见光显微镜下拍照, 用 Image J 图像处理软件将斑马鱼尾鳍圈起来, 自动计算尾鳍面积(像素), 记录尾鳍面积(A)。

数据处理: 样品组织再生功效按公式(1)计算。

促进尾鳍再生功效(%)=

$$\frac{A(\text{I型胶原蛋白溶液组}) - A(\text{模型对照组})}{A(\text{正常对照组}) - A(\text{模型对照组})} \times 100\% \quad (1)$$

2.3 斑马鱼的 *coll1a1b* 基因的相对表达量

选择状态良好, 受精后 4 d 的野生型 AB 系斑马鱼 180 尾, 每组取斑马鱼 30 尾于其中 1 孔。将 I 型胶原蛋白溶液添加至 I 型胶原蛋白溶液组, 定容 3 mL。同时设置正常对照组, 共设置 3 次生物学重复。将各实验组于 28°C 条件下避光孵化 24 h。

RNA 提取: 用超纯水将斑马鱼清洗干净(2~3 遍), 转移至 1.5 mL EP 管, 吸干水分, 放置 -20°C 。使用 RNA 快速提取试剂盒提取各组斑马鱼总 RNA, 利用紫外-可见分光光度计对总 RNA 浓度进行测定。

q-PCR 检测: 已知总 RNA 浓度, 取 $2 \mu\text{g}$ 斑马鱼样品总 RNA, 按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明操作, 合成 $20 \mu\text{L}$ cDNA, 用 q-PCR 检测 $\beta\text{-actin}$

和 *coll1a1b* 的基因表达。

数据处理: 用 $\beta\text{-actin}$ 作为基因表达的内参, 计算 *coll1a1b* 基因的 RNA 相对表达量。

2.4 斑马鱼抗炎功效试验

选择状态良好, 受精后 2 d 的转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼(MPX), 随机选取 90 尾斑马鱼于 6 孔板中。将斑马鱼分成 3 组, 分别是正常对照组、模型对照组和 I 型胶原蛋白溶液组, 每组 1 孔, 每孔 30 尾, 每孔定容 3 mL。正常对照组不做处理, 模型对照组仅用 $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 十二烷基磺酸钠处理, I 型胶原蛋白溶液组在用 $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 十二烷基磺酸钠的同时添加 I 型胶原蛋白溶液。各实验组于 28°C 条件下避光孵化 18 h 后, 随机挑选 10 尾斑马鱼, 将斑马鱼整体放到荧光显微镜下拍照并保存图片, 用 NIS-Elements D 3.10 高级图像处理软件计算皮肤中性粒细胞数量(N)。

数据处理: 样品抗炎功效按公式(2)计算。

抗炎功效(%)=

$$\frac{N(\text{模型对照组}) - N(\text{I型胶原蛋白溶液组})}{N(\text{模型对照组}) - N(\text{正常对照组})} \times 100\% \quad (2)$$

2.5 数据处理

实验数据采用 SPSS 软件 26.0 版本进行统计学分析, 符合正态分布的实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用方差分析和 Dunnett's-*t* 检验进行统计, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 I型胶原蛋白培养浓度的选择

斑马鱼培养体系中胶原蛋白最终浓度为 0.025, $0.050 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 野生型 AB 品系斑马鱼与转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼(MPX)培养体系中斑马鱼存活率均 100%, 状态佳。斑马鱼培养体系中胶原蛋白最终浓度为 $0.100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 2 种品系斑马鱼存活率 100%, 但状态差, 表现为侧翻、触碰无反应。最终选择斑马鱼培养体系中胶原蛋白最终浓度为 $0.050 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2 斑马鱼尾鳍再生试验

正常对照组平均尾鳍面积($82\ 832.30 \pm 6\ 748$)像素, 模型对照组平均尾鳍面积($43\ 864.90 \pm 7\ 025$)像素, I 型胶原蛋白溶液组平均尾鳍面积($52\ 718.33 \pm 4\ 312$)像素。I 型胶原蛋白溶液组斑马鱼尾鳍面积与模型对照组相比明显增大, 结果见图 1。I 型胶原蛋白溶液促尾鳍再生功效为 23%。用 GraphPad 软件形成鱼尾鳍面积的柱状图, 结果见图 2。

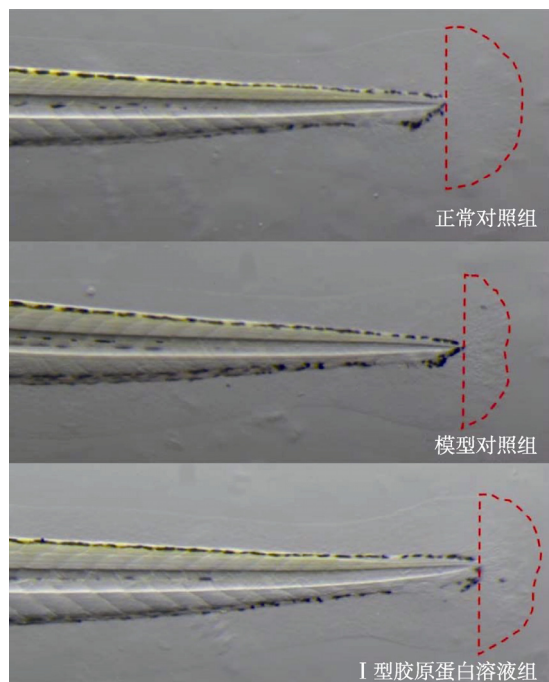


图 1 斑马鱼尾鳍面积典型图

Fig. 1 Typical diagram of tail fin area of zrfish

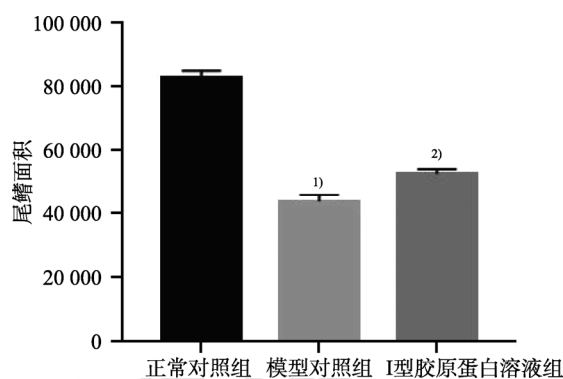


图 2 各组斑马鱼尾鳍面积柱状图 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与模型对照组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Histogram of caudal fin area of zrfish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model control group, ²⁾ $P<0.01$.

3.3 斑马鱼的 *colla1b* 基因的相对表达量

正常对照组斑马鱼 RNA 总浓度均值为 $1.01 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, I 型胶原蛋白溶液组斑马鱼 RNA 总浓度均值为 $0.92 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。经 q-PCR 检测, 正常对照组斑马鱼 *colla1b* 基因相对表达量为 1 ± 0.055 , I 型胶原蛋白溶液组斑马鱼 *colla1b* 基因相对表达量为 1.27 ± 0.086 。I 型胶原蛋白溶液组斑马鱼 *colla1b* 基因相对表达量与正常对照组相比明显升高 ($P<0.01$), 结果见图 3。

3.4 斑马鱼抗炎功效试验

I 型胶原蛋白溶液组斑马鱼中性粒细胞数量与

模型对照组相比有明显减少, 红色区域为中性粒细胞计数区域, 见图 4。正常对照组平均中性粒细胞数量 (21.4 ± 5.1) 个, 模型对照组平均中性粒细胞数量 (86.2 ± 13.7) 个, I 型胶原蛋白溶液组平均中性粒细胞数量 (65.4 ± 13.6) 个, 与模型对照组相比具有统计学差异 ($P<0.01$), I 型胶原蛋白溶液抗炎功效为 32%, 见图 5。

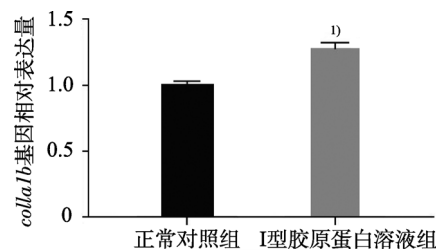


图 3 斑马鱼 *colla1b* 基因相对表达量柱状图 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Histogram of relative expression of zrfish *colla1b* gene ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$.

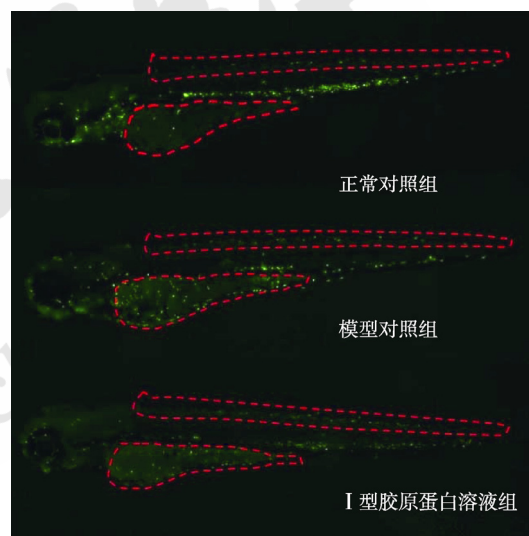


图 4 斑马鱼抗炎功效典型图

Fig. 4 Typical diagram of anti-inflammatory effect of zrfish

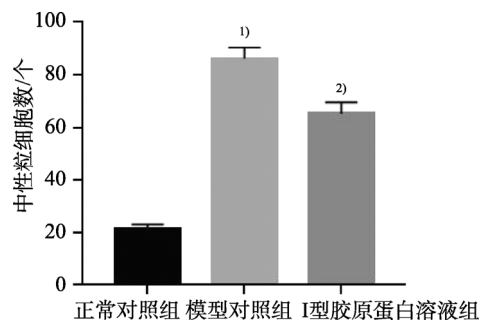


图 5 斑马鱼中性粒细胞个数的柱状图 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与模型对照组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Histogram of neutrophil number in zrfish ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with model control group, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

斑马鱼与人类存在相似基因调控路径^[9],广泛用于组织再生研究。斑马鱼尾鳍再生分为创面修复、芽基形成、再生 3 个过程^[10-11],以芽基形成最为核心。鳍再生的细胞有多个来源,包括表皮细胞、成纤维细胞、成骨细胞在内的多种细胞类型均具有促进斑马鱼尾鳍再生的功能^[12]。斑马鱼尾鳍的再生与人类皮肤、骨骼、血管等修复作用机制相似。斑马鱼尾鳍因其结构极其简单、易于手术实验操作,且斑马鱼尾鳍在术后不影响存活、易于观察等特点,因此成为研究创面修复、组织再生的重要模型。课题组利用野生型 AB 系斑马鱼,在显微镜下拍照,利用图像处理软件记录尾鳍面积,该方式通用性强且数据可靠。

在四足动物中,I 型胶原蛋白的结构呈三股螺旋结构^[13],由 3 条多肽链组成,2 个 $\alpha 1$ 链和 1 个 $\alpha 2$ 链,它们分别由 *colla1a* 和 *colla2* 基因编码生成,在结缔组织和骨中执行胶原蛋白相关生物功能。在斑马鱼基因中有 3 种 I 型胶原蛋白基因,为编码 $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 3(I)$ 和 $\alpha 2(I)$ 链的 *colla1a*、*colla1b* 和 *colla2*。其中 *colla1b* 编码 $\alpha 3(I)$ 肽,主要执行胶原蛋白的传递过程,对胶原蛋白的传输补充起重要作用^[14]。因此,*colla1b* 的基因表达量是个很好的表征,利用斑马鱼 *colla1b* 基因的相对表达量,很直观表明斑马鱼的促组织再生作用。

炎症产生的机理是外界的伤害性因素被受体识别,受体向细胞传递信号,机体作出相应的保护性反应,可表现为中性粒细胞的免疫应答。Loynes 等^[15]通过调解斑马鱼中性粒细胞及其寿命的靶点而进行抗炎药物的筛选。本实验利用转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼(MPX)处理前后皮肤中性粒细胞数量变化来验证 I 型胶原蛋白的抗炎功效^[16]。样品对皮肤产生的刺激大体表现为皮肤炎症,皮肤炎症初期会产生毛细血管扩张、红肿、水肿等现象。在人体皮肤刺激物模型斑贴试验中,通常选用十二烷基磺酸钠作为阳性对照物^[17]。十二烷基磺酸钠进入斑马鱼体内,诱导产生炎症,而后斑马鱼体内的免疫细胞(中性粒细胞)表现出免疫应答,向皮肤表层进行迁移及聚集。在斑马鱼的抗炎功效实验中,胶原蛋白表现出具有抗炎功效,可能是胶原蛋白作为信号因子^[18],能触发特异性细胞反应,与细胞受体相结合,而这些反应可能调节

了细胞炎症因子的分泌。孙位军等^[19]指出,胶原蛋白可能通过下调 TNF- α 炎症因子来治疗炎症反应。斑马鱼抗炎功效实验中,斑马鱼对刺激物的反应较为灵敏,本实验选择转基因中性粒细胞绿色荧光品系斑马鱼(MPX),在荧光显微镜下可清晰看到中性粒细胞,利用图像处理软件转化数量,更加便捷可靠。

综上所述,I 型胶原蛋白对斑马鱼模型具有促组织再生及抗炎作用。

REFERENCES

- [1] ZHANG H W, HU J Y, WANG L. Research progress of collagen in cosmetic surgery[J]. Sci Technol Vis(科技视界), 2019(2): 152-154.
- [2] ZHANG Y F, PANG X Y, YE Z J, et al. Collagen modification method and application[J]. J Fish Res(渔业研究), 2020, 42(2): 185-194.
- [3] ZHU B K, LUO S C, LUO S X. Progress and main application of fish skin collagen in tissue engineering[J]. Chin J Tissue Eng Res(中国组织工程研究), 2021, 25(28): 4561-4566.
- [4] SMITH K J, SKELTON H G, BARRETT T L, et al. Histologic and immunohistochemical features in biopsy sites in which bovine collagen matrix was used for hemostasis[J]. J Am Acad Dermatol, 1996, 34(3): 434-438.
- [5] YANG B R, LIN Y Q, WANG Y H, et al. Effects of anti-angiogenesis activity of sinensetin on human umbilical vein endothelial cells and zebrafish[J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai(上海中医药大学学报), 2012, 26(4): 76-80.
- [6] DELVECCHIO C, TIEFENBACH J, KRAUSE H M. The zebrafish: A powerful platform for *in vivo*, HTS drug discovery[J]. Assay Drug Dev Technol, 2011, 9(4): 354-361.
- [7] QIAN X W, TAN Z H, ZHU C, et al. Effect of Yiganshu on the anti-alcohol in zebrafish[J]. Pharm Today(今日药学), 2020, 30(7): 474-477.
- [8] TIAN L L, ZHU G F. Application of zebra fishes in studies on traditional Chinese medicines[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(5): 822-827.
- [9] DU Z C, YU H P, CHEN Z M, et al. Study on effect of Zhonghua Dieda pill on fracture healing of zebrafish[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(12): 1454-1460.
- [10] 田丽莉, 盛东来, 朱国福. 白藜芦醇对斑马鱼尾鳍再生的促进作用及机制研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1098-1101.
- [11] POSS K D, KEATING M T, NECHIPORUK A. Tales of regeneration in zebrafish[J]. Dev Dyn, 2003, 226(2): 202-210.
- [12] YAN L F, GU A H. Progress and application of zebrafish in regenerative medicine[J]. Hereditas(遗传), 2013, 35(7): 856-866.
- [13] CHEN J T, XU Z, GU Q S. Progress in research and

- development on collagens[J]. Shanghai J Biomed Eng(上海生物医学工程), 2004, 25(2): 52-55, 47.
- [14] GISTELINCK C, GIOIA R, GAGLIARDI A, et al. Zebrafish collagen type I: Molecular and biochemical characterization of the major structural protein in bone and skin[J]. Sci Rep, 2016(6): 21540.
- [15] LOYNES C A, MARTIN J S, ROBERTSON A, et al. Pivotal Advance: Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish[J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(2): 203-212.
- [16] ZHOU H, CAO H, ZHENG Y, et al. Liang-Ge-San, a classic traditional Chinese medicine formula, attenuates acute inflammation in zebrafish and RAW 264.7 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2020(249): 112427.
- [17] YANG L J, HU W Y, MA Y F, et al. Establishment of positive control for benchmark in human single patch test[J]. China J Lepr Ski Dis(中国麻风皮肤病杂志), 2017, 33(2): 88-91.
- [18] FERTALA A. Three decades of research on recombinant collagens: Reinventing the wheel or developing new biomedical products?[J]. Bioengineering, 2020, 7(4): 155.
- [19] SUN W J, WANG F Q, XU W L, et al. Research for adjust TNF- α of medical collagen for the treatment of allergic contact dermatitis mechanism[J]. China Med Her(中国医药导报), 2017, 14(18): 188-192.
- 收稿日期: 2021-07-29
(本文责编: 曹粤锋)

中国现代应用药理学
http://www.chinjmap.com