

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20160674

丹参酮ⅡA磺酸钠在缺血性斑马鱼模型中的促血管新生作用

陈 飞¹, 乔 祺¹, 王张生¹, 许 澎¹, 陆 刚^{2*}

1. 复旦大学附属上海市第五人民医院心血管内科, 上海 200240

2. 复旦大学附属上海市第五人民医院急诊科, 上海 200240

[摘要] **目的:**观察丹参酮ⅡA磺酸钠(TanⅡA)对缺血性斑马鱼模型的促血管新生作用及其潜在机制。**方法:**用内皮细胞生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(VRKI)诱导血管损伤斑马鱼模型,分别予以50、100、200 μmol/L的TanⅡA处理。观察TanⅡA在上述浓度下对缺血性斑马鱼肠下静脉血管(SIVs)和节间血管(ISVs)的影响,并利用real-time PCR技术检测flt-1、flk-1A(kdr)、flk-1B(kdr)3个调节血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路相关基因的表达变化。**结果:**在VRKI诱导的血管损伤斑马鱼模型中,TanⅡA呈浓度依赖性地逐渐恢复ISVs和SIVs血管;通过VEGF通路上的相关基因[flt-1、flk-1A(kdr)、flk-1B(kdr)]进行调控。**结论:**在缺血性斑马鱼模型中,TanⅡA可通过VEGF信号通路发挥其促血管新生和保护血管作用。

[关键词] 丹参酮ⅡA磺酸钠;血管新生;斑马鱼;血管内皮生长因子

[中图分类号] R 285 **[文献标志码]** A

The angiogenic effect and potential mechanism of sodium tanshinone Ⅱ A sulfonate in ischemic zebrafish model

CHEN Fei¹, QIAO Qi¹, WANG Zhang-sheng¹, XU Peng¹, LU Gang^{2*}

1. Department of Cardiology, the Fifth People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai 200240, China

2. Department of Emergency, the Fifth People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the angiogenic effect and potential mechanism of sodium tanshinone Ⅱ A sulfonate (Tan Ⅱ A) in ischemic zebrafish model. **Methods:** Vascular endothelial growth factor receptor kinase inhibitor (VRKI) was used to induce vascular injury in zebrafish model. Then the ischemic zebrafish model was treated with 50, 100, 200 μmol/L Tan Ⅱ A, respectively. The effects of Tan Ⅱ A on ischemic zebrafish subintestinal veins (SIVs) and intersegmental vessels (ISVs) were observed. Meanwhile, the expression changes of three vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway-related genes (flt-1, flk-1A, flk-1B) were detected by real-time PCR. **Results:** In VRKI-induced vascular injury zebrafish model, Tan Ⅱ A gradually restored ISVs and SIVs in a concentration-dependent manner, reversed the down-regulated expressions of three key VEGF signaling pathway-related genes (flt-1, flk-1A, flk-1B), and promoted angiogenesis. **Conclusions:** In the ischemic zebrafish model, Tan Ⅱ A plays a role in angiogenesis and vascular protection by regulating VEGF signaling pathway.

[Key Words] sodium tanshinone Ⅱ A sulfonate; angiogenesis; zebrafish; vascular endothelial growth factor

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)作为中国传统中药,具有活血祛瘀、通经止痛、凉血消痈等功效。丹参是复方丹参滴丸(已通过全球9个国家127个临床中心的Ⅲ期临床试验并得到FDA认可)的主要成分,其诸多单体和复方制剂广泛应用于冠心病、缺血性卒中等疾病。其中丹参酮ⅡA是丹参的主要活性成分(脂溶性),经过能够提高水溶性的磺酸化结构修饰之后^[1],成为丹参酮ⅡA磺酸钠(TanⅡA)。TanⅡA在临床上已广泛应用于冠心病、心

绞痛、心肌梗死,近年来也用于室性早搏。研究^[2-5]证实,TanⅡA具有血管新生双向调节机制,其可通过抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达来抑制乳腺癌细胞株的细胞增殖和血管拟态形成,进而抑制肿瘤血管新生;另一方面其具有促血管新生作用。

斑马鱼普遍用于多种药物的筛选中^[6]。研究^[7]表明,斑马鱼血管系统及其对调节血管新生的药物治疗反应与哺乳动物类似。虽然TanⅡA已用于

[收稿日期] 2016-09-07

[接受日期] 2017-01-03

[作者简介] 陈 飞, 硕士, 主治医师. E-mail: chenmilan@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-24289511, E-mail: xiaogang@126.com

多种细胞和动物模型,但其在缺血性模型中的应用较少。因此,本研究应用内皮细胞生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(vascular endothelial growth factor receptor kinase inhibitor II, VRKI)诱导血管损伤转基因斑马鱼 Tg(fli1 α : EGFP)y1 模型,观察了 Tan II A 对此模型血管新生的作用,并初步探讨相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物 转基因斑马鱼 Tg(fli1 α : EGFP)y1 由中国科学院生物化学与细胞生物学研究所斑马鱼技术平台提供。

1.2 药物、试剂与仪器 Tan II A 购于上海永恒生物科技有限公司,溶解于 DMSO 中配制为 50 mmol/L 的储备液。VRKI 购于美国 Calbiochem 公司(Cat. No. 676481),溶解在 DMSO 中配制为 500 μ g/mL 的储备液, -20 $^{\circ}$ C 储存。紫外可见分光光度计(UV 8453 Agilent Technologies)、奥林巴斯旋转盘共聚焦显微镜系统购自日本 Olympus 公司。

1.3 健康转基因斑马鱼模型实验 选择状态良好,发育至 24 h 的转基因斑马鱼 Tg(fli1 α : EGFP)y1 胚胎,除去卵壳,将其放入含有饲养液(0.2% DMSO)的 24 孔板中(每孔不少于 15 个)。Tan II A 组分别为 50、100、200 μ mol/L 的 Tan II A,对照组仅以 0.2% DMSO 为饲养液。两组均放入 28.5 $^{\circ}$ C 的饲养箱里饲养。48 hpf (hours post fertilization)时,清洗 24 孔板上的加药孔,重新加入饲养液和不同浓度的 Tan II A。72 hpf 时,在荧光显微镜下观察斑马鱼肠下静脉血管(subintestinal veins, SIVs)及节间血管(intersegmental vessels, ISVs)的状态。

1.4 VRKI 诱导血管损伤转基因斑马鱼模型实验 选择状态良好,发育至 21 h 的斑马鱼胚胎,除去卵壳,将其放入含饲养液(0.2% DMSO)的 24 孔板中(每孔不少于 15 个)。对照组仅以饲养液培养;VRKI 组预先在饲养液中加入 VRKI 500 ng/mL,在饲养箱里处理 3 h 后,以 0.2% DMSO 清洗 3~4 遍,继续以 0.2% DMSO 培养;Tan II A 组分别为 50、100、200 μ mol/L 的 Tan II A,在饲养箱里处理 3 h,以 0.2% DMSO 清洗 3~4 遍后,再加入不同浓

度 Tan II A。3 组放入 28.5 $^{\circ}$ C 的饲养箱里。48 hpf 时,清洗 24 孔板上的加药孔,重新换液加药。72 hpf 时,在荧光显微镜下观察斑马鱼 SIVs 及 ISVs 的影响。

1.5 Real-time PCR 检测基因表达 选择状态良好,发育至 21 h 的斑马鱼胚胎,除去卵壳,将其放入含饲养液(含 VRKI 500 ng/mL)的 12 孔板中(每孔不少于 30 个),在饲养箱里处理 3 h,用饲养液清洗 3~4 遍,再加入 Tan II A 处理 24 h,然后提取不同浓度组别的 RNA。每组至少 30 条胚胎,利用 RNeasy Mini Kit (美国 Qiagen)将 RNA 反转录到 cDNA,利用 7500 Real-time PCR 系统(美国 Applied Biosystems)进行扩增 PCR 和基因表达检测实验(美国 Invitrogen)。斑马鱼 β -actin-1 引物为 5'-CAA GAT TCC ATA CCC AGG AAG GA-3' (F) 和 5'-CAA GAT TCC ATA CCC AGG AAG GA-3' (R); 斑马鱼 flk-1A(kdrl)引物为 5'-GAC CAT AAA ACA AGT GAG GCA GAA G-3' (F) 和 5'-CTC CTG GTT TGA CAG AGC GAT A-3' (R); 斑马鱼 flk-1B(kdr)引物为 5'-CAA GTA ACT CGT TTT CTC AAC CTA AGC-3' (F) 和 5'-GGT CTG CTA CAC AAC GCA TTA TAA C-3' (R); 斑马鱼 flt-1 引物为 5'-AAC TCA CAG ACC AGT GAA CAA GAT C-3' (F) 和 5'-GCC CTG TAA CGT GTG CAC TAA A-3' (R)。

1.6 统计学处理 在健康斑马鱼模型中,通过统计 SIVs 的光滑拱形结构外围平均出芽数来评估 Tan II A 对正常斑马鱼血管新生的影响。在 VRKI 诱导血管损伤模型中,将从背主动脉(dorsal aorta, DA)或脊椎后主静脉(posterior cardinal vein, PCV)发芽延伸并连接到背部脊索血管(DLAVs)的 ISVs 定义为完整型血管;而一些已经从 DA 或 PCV 延伸出但并未连接到 DLAVs 的 ISVs 定义为非完整型血管(缺陷型血管)。分别对每条斑马鱼的完整型和缺陷型血管进行统计分析。不少于 3 次重复实验。采用 GraphPad Prism 软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 Tan II A 对健康斑马鱼 SIVs 的影响 72 hpf 时,健康转基因斑马鱼中,50、100、200 μ mol/L Tan

II A 并没有引起正常斑马鱼 SIVs 区域的异常变化;对照组 SIVs 区域是 1 个类似于篮网的光滑拱形结构,内部有 4~6 根血管(图 1)。Tan II A 组拱形血管外围未出现与对照组具有显著差异的尖锐出芽血管,说明在最高无毒浓度(200 $\mu\text{mol/L}$)下,Tan II A 并不会干扰斑马鱼机体自身的血管新生平衡,安全性较好。

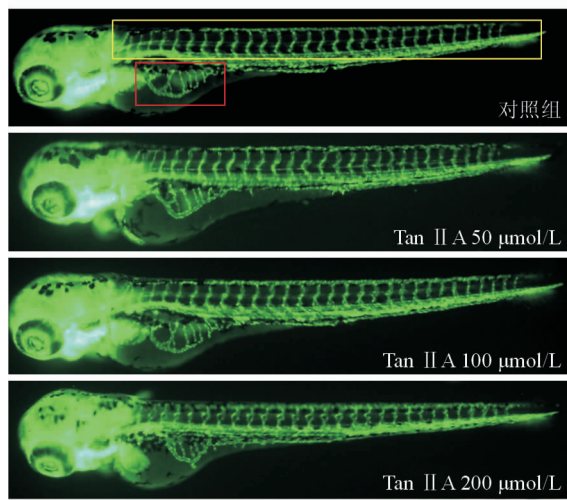


图 1 丹参酮 II A 磺酸钠(Tan II A)对健康 Tg(fli1 α :EGFP)y1 斑马鱼胚胎血管的影响
红色框内:SIVs 区域;黄色框内:ISVs 区域

2.2 Tan II A 对 VRKI 诱导的血管损伤斑马鱼模型胚胎血管的保护作用 72 hpf 时,在 VRKI 诱导的血管损伤转基因斑马鱼模型中,对照组的 SIVs 区域是一个类似于篮网的光滑拱形结构,内部有 4~6 根血管(图 2A 红色框内);ISVs 区域完整,平均血管数目为 27 根,完好连接 DA 和 DLAVs(图 2A 黄色框内)。而 VRKI 组 ISVs 和 SIVs 以及 DLAVs 都出现了明显的缺失,平均有(0.74 $\pm$ 0.56)根完整 ISVs 及(3.40 $\pm$ 1.45)根非完整型 ISVs。Tan II A 组处理 48 h 后,SIVs 及 ISVs 均逐渐恢复,并呈浓度依赖性(图 2A)。尤其在 200 $\mu\text{mol/L}$ Tan II A 组中,完整 ISVs 平均有(23.55 $\pm$ 1.04)根,非完整 ISVs 平均有(3.36 $\pm$ 1.97)根,与对照组接近(图 2B)。另外,Tan II A 组处理 48 h 与 24 h 的血管数目明显增多,说明 Tan II A 不仅对 VRKI 诱导前期的血管有保护作用,也在后期起到促血管新生作用。

2.3 Tan II A 对 VEGF 关键基因 mRNA 影响的 real-time PCR 检测结果 为了确定 Tan II A 在缺血性斑马鱼模型中的安全性和促血管新生作用,进

一步用 real-time PCR 分析 VEGF 信号通路上几个关键基因的表达变化。结果(图 3)显示:在健康斑马鱼模型中,与对照组相比,Tan II A 在 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下均没有引起 flk-1A、flk-1B、flt-1 mRNA 的基因表达变化(图 3A)。在 VRKI 诱导的缺血性斑马鱼模型中,Tan II A 呈剂量依赖性地逆转由 VRKI 引起的 flk-1A、flk-1B、flt-1 mRNA 的基因表达下降。其中,200 $\mu\text{mol/L}$ Tan II A 处理后 flk-1A 表达是 VRKI 组的 2.32 倍($P<0.05$),flk-1B 是 1.79 倍($P<0.05$),flt-1 是 2.78 倍($P<0.01$,图 3B)。这些结果表明,Tan II A 不会引起正常斑马鱼的基因表达变化,较安全;而在 VRKI 诱导的缺血斑马鱼模型中,Tan II A 能够逆转 3 个 VEGF 关键基因的表达下调,进而促血管新生。

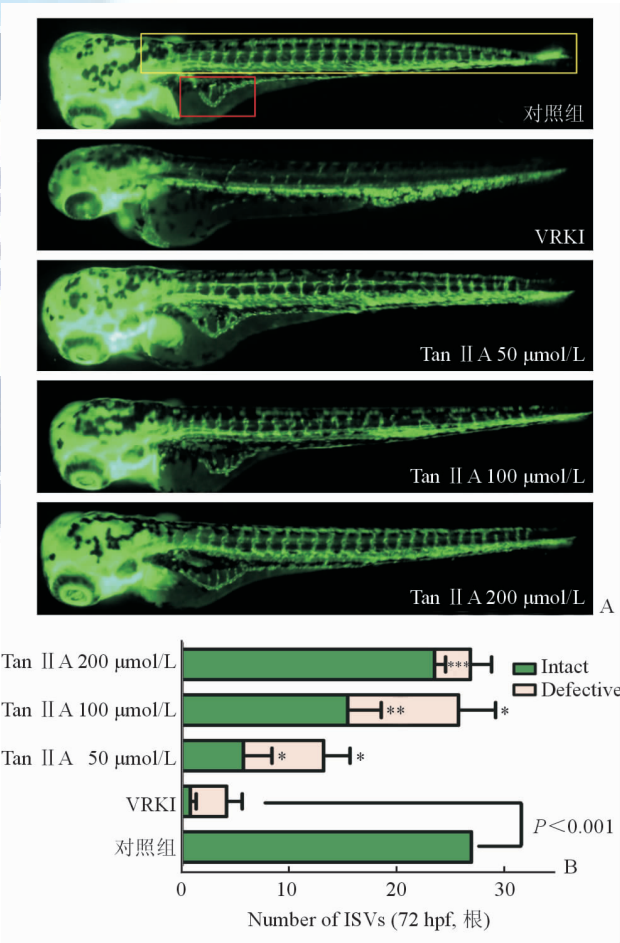


图 2 丹参酮 II A 磺酸钠(Tan II A)对 VRKI 诱导 Tg(fli1 α :EGFP)y1 斑马鱼 ISVs 和 SIVs 血管损伤模型的保护作用

A:各组 SIVs 和 ISVs 状态(红色框内:SIVs 区域;黄色框内:ISVs 区域);B:各组 ISVs 血管数目的比较。* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 与对照组比较; $n=3$, $\bar{x}\pm s$

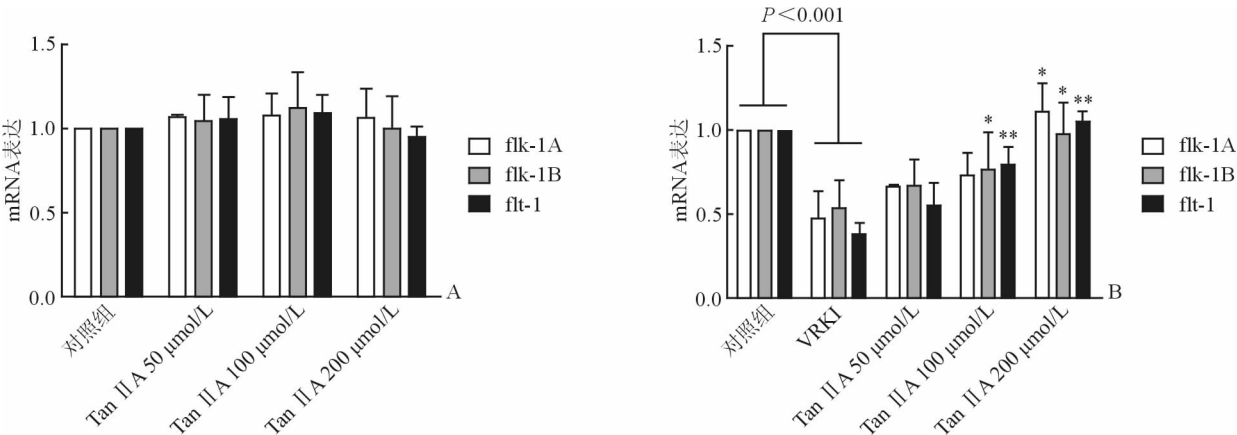


图3 丹参酮ⅡA磺酸钠(Tan II A)对健康及VRKI诱导Tg(fli1α:EGFP)y1斑马鱼VEGF相关基因表达的影响
A: Tan II A对健康斑马鱼flk-1A、flk-1B、flt-1 mRNA表达的影响; B: Tan II A对VRKI引起的flk-1A、flk-1B、flt-1 mRNA表达下调的作用。* P<0.05, ** P<0.01与VRKI组相比; n=3, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

在我国,缺血性心脏病已成为仅次于脑血管疾病的第二大致死疾病,严重影响我国人民健康和生命安全。其中,男性中每10万人就有137.6人死于缺血性心脏病,而女性也有95.1人死于此病^[8]。而血管新生不足是缺血性心脏病的共同病理基础。大量药理和临床研究已表明,活血化瘀类中药对诸多缺血性疾病有一定的疗效,其中Tan II A已在临床上广泛应用。Tan II A是改善微循环的常用药,但其在血管新生方面的研究较有限。本研究观察了Tan II A对斑马鱼模型的促血管新生作用,并初步探讨其可能的机制。

在斑马鱼发育过程中,其脑部血管在初期就有极其复杂的蜂窝状网络结构,而在后期能衍生出更加复杂且难以观察的血管,这不利于我们实验观察。但斑马鱼的SIVs和ISVs区域内血管在发育初期清晰可见,利于观察和统计,较易获得客观可信的实验结果^[9]。在健康斑马鱼模型中,将SIVs的光滑拱形结构外围出芽作为血管新生的评判依据^[10]。研究^[11]发现,VRKI能引起斑马鱼SIVs和ISVs区域的丢失,并使斑马鱼胚胎的血管新生过程受阻。由此,本研究利用VRKI来建立血管损伤斑马鱼模型。在此基础上,探讨Tan II A对VRKI损伤血管的保护和修复效果,为进一步评价Tan II A在缺血性心脏病、冠心病以及局部缺血、植入手术等提供理论依据。VEGF受体(VEGFRs)在血管新

生过程中起促进作用^[12],调节VEGFR1的flt-1基因以及VEGFR2的flk-1A(kdr1)、flk-1B(kdr)基因作为VEGFRs的关键基因,均被作为目标基因检测。本研究结果表明:在健康转基因斑马鱼模型中,Tan II A并不会明显刺激SIVs区域出芽,也未引起flt-1、flk-1A(kdr1)和flk-1B(kdr)基因的表达变化,因此不会干扰血管新生平衡,说明安全性较好,与研究^[13-15]结果一致;而在VRKI损伤模型中,Tan II A显示了强效的恢复ISVs和SIVs的效果。综上所述,本研究表明Tan II A在缺血性斑马鱼模型中通过上调VEGF信号通路上flt-1、flk-1A(kdr1)、flk-1B(kdr)表达来促血管新生和保护血管,且安全性良好,为临床应用提供了理论依据。

参考文献

[1] 夏成峰,李大山,王连富. 一种制备高纯度丹参酮ⅡA磺酸钠的方法;201310495778. X[P]. 2014年1月8日.
[2] 庄钦,毛威. 丹参多种活性成分调节血管新生机制的研究概述[J]. 浙江中医药大学学报,2014,38(4): 506-510.
[3] 胡志华,梁黔生,郑智,等. 丹参酮ⅡA对血管紧张素Ⅱ诱导心肌细胞肥大的影响[J]. 中国临床医学,2009,16(1): 34-36.
[4] 高丽,徐长亮,何赞绵,等. 丹参酮ⅡA对乳腺癌细胞株MDA-MB-231体外血管生成拟态的抑制作用[J]. 药学与临床研究,2011,19(4): 315-317.
[5] 周利红,王炎,范忠泽,等. 丹参酮ⅡA调节COX-2对人结肠癌HCT-116细胞VEGF表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(15): 1561-1567.
[6] TRAN T C, SNEED B, HAIDER J, et al. Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds

- using transgenic zebrafish[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11386-11392.
- [7] LANGHEINRICH U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk [J]. *Bioessays*, 2003, 25(9): 904-912.
- [8] ZHOU M, WANG H, ZHU J, et al. Cause-specific mortality for 240 causes in China during 1990-2013: a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. *Lancet*, 2016, 387(10015): 251-272.
- [9] CHILDS S, CHEN J N, GARRITY D M, et al. Patterning of angiogenesis in the zebrafish embryo[J]. *Development*, 2002, 129(4): 973-982.
- [10] RAGHUNATH M, SY WONG Y, FAROOQ M, et al. Pharmacologically induced angiogenesis in transgenic zebrafish[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(4): 766-771.
- [11] REICHARDT W, HU-LOWE D, TORRES D, et al. Imaging of VEGF receptor kinase inhibitor-induced antiangiogenic effects in drug-resistant human adenocarcinoma model[J]. *Neoplasia*, 2005, 7(9): 847-853.
- [12] HOEBEN A, LANDUYT B, HIGHLEY M S, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis [J]. *Pharmacol Rev*, 2004, 56(4): 549-580.
- [13] ZON L I, PETERSON R T. *In vivo* drug discovery in the zebrafish[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(1): 35-44.
- [14] RUBINSTEIN A L. Zebrafish assays for drug toxicity screening[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2(2): 231-240.
- [15] BERGHMANS S, BUTLER P, GOLDSMITH P, et al. Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function—potential safety screens for early drug discovery[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2008, 58(1): 59-68.

[本文编辑] 姬静芳

