四川大学学报（医学版） 2026，57（3）：662－670
J Sichuan Univ（Med Sci） doi: 10.12182/20260560207

在线全文

建立斑马鱼动脉粥样硬化模型筛选平台评价理气活血方剂抗动脉粥样硬化的疗效*

殷久凤[1,2]，王 慧[1]，王浩颜[1]，姜 彤[1]，张新怡[1]，李明楷[1]，张 丹[3,4]，赵 峰[3△]，杨雯晴[1,4△]

1. 山东中医药大学中医药创新研究院（济南 250300）；2. 山东中医药大学中医学院（济南 250300）；
3. 山东中医药大学实验中心（济南 250300）；4. 山东中医药大学中医药经典理论教育部重点实验室（济南 250300）

【摘要】 **目的** 利用基于多品系*apoeb*基因敲除斑马鱼模型的抗动脉粥样硬化（arterial atherosclerosis, AS）中药复方筛选平台，系统筛选出具有抗AS潜力的理气活血功效的中药复方。**方法** 基于方剂大辞典数据库进行筛选，从933首活血化瘀方剂中筛选出复方丹参方、手拈散、金铃子散、理气活血汤。采用AB、*Tg(mpeg1:EGFP)*、*Tg(lyzc:dsRed)*、*Tg(gata1a:mCherry)*、*Tg(flk1:EGFP)*5种品系*apoeb*$^{-/-}$斑马鱼给予高脂饲料喂食2 d后构建AS模型，在此基础上给予DMSO（溶剂对照）、瑞舒伐他汀组（西药阳性对照）、复方丹参方组（中药阳性对照）、手拈散、金铃子散、理气活血汤药浴24 h，行油红O染色，检测血脂含量、氧化应激指标、血流速度、血管内皮细胞损伤情况以及炎症因子在斑马鱼体内表达情况，观察斑马鱼体内炎症细胞行为模式，综合评估理气活血方剂抗AS疗效。**结果** 与模型组比较，复方丹参方和手拈散可改善血管内脂质堆积，降低总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）含量，减少氧化应激反应，抑制中性粒细胞和巨噬细胞募集，修复血管内皮损伤，改善血流速度，降低炎症因子表达，从而减轻AS，差异有统计学意义；而金铃子散及理气活血汤对AS的改善效果有限。**结论** 该平台为抗AS中药复方的筛选和研究评价提供了一种高效性且靶向性较强的工具，加速推动抗AS中药复方的研究进程，为后续的药物开发和临床应用奠定了基础。

【关键词】 动脉粥样硬化 斑马鱼 药物筛选 中药复方

Establish a Zebrafish Atherosclerosis Model Screening Platform to Evaluate the Therapeutic Effects of Qi-Regulating and Blood-Activating Prescriptions on Atherosclerosis

YIN Jiufeng[1,2], *WANG Hui*[1], *WANG Haoyan*[1], *JIANG Tong*[1], *ZHANG Xinyi*[1], *LI Mingkai*[1], *ZHANG Dan*[3,4], *ZHAO Feng*[3△], *YANG Wenqing*[1,4△]. 1. *Institute of Innovation in Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China*; 2. *College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China*; 3. *Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China*; 4. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Classics Theory, Ministry of Education, Jinan 250300, China*

△ Corresponding author, ZHAO Feng, E-mail: 60019116@sdutcm.edu.cn; YANG Wenqing, E-mail: winnie0416q@163.com

This study was supported by the Shandong Province Natural Science Foundation (No. ZR2020KH034) and Shandong Provincial Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project (No. Z-2022045).

[**Abstract**] **Objective** To systematically identify traditional Chinese medicine (TCM) compound formulas with anti-atherosclerosis (AS) potential using a screening platform based on multi-strain *apoeb* gene knockout zebrafish models for anti-atherosclerosis TCM compounds **Methods** Screening was conducted using a formula dictionary database, and compound formulas such as Dan Shen Fang, Shang Ni San, Jin Lingzi San, and Li Qi Hua Liang Tang were selected from 933 blood-activating and stasis-resolving formulas. Five strains of *apoeb*$^{-/-}$ zebrafish–*AB*, *Tg(mpeg1:EGFP)*, *Tg(lyzc:dsRed)*, *Tg(gata1a:mCherry)*, and *Tg(flk1:EGFP)*—were fed a high-fat diet for 2 days, after which the AS model was established. DMSO (solvent control), rosuvastatin (western medicine positive control), compound Dan Shen Fang (TCM positive control), Shang Ni San, Jin Lingzi San, and Li Qi Hua Liang Tang were administered by bathing for 24 hours. Oil red O staining was used to detect lipid content, oxidative stress indicators, blood flow velocity, vascular endothelial cell damage, and the expression of inflammatory factors in zebrafish. The behavior patterns of inflammatory cells in zebrafish were observed, and the anti-AS efficacy of the Li Qi Hua Liang formulas was comprehensively evaluated.

* 山东省自然科学基金（No. ZR2020KH034）和山东省中医药科技项目（No. Z-2022045）资助

△ 通信作者，赵峰，E-mail: 60019116@sdutcm.edu.cn；杨雯晴，E-mail: winnie0416q@163.com

出版日期：2026-05-20

Results　Compared with the AS model group, compound Dan Shen Fang and Shang Ni San improved lipid accumulation in the vascular lumen, reduced total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels, decreased oxidative stress response, inhibited the recruitment of neutrophils and macrophages, repaired vascular endothelial damage, improved blood flow velocity, and reduced the expression of inflammatory factors, thereby alleviating AS, with statistically significant differences. Jin Lingzi San and Li Qi Hua Liang Tang had limited effects on AS. **Conclusion**　This platform provides an efficient and targeted tool for the screening and research evaluation of anti-atherosclerosis TCM compound formulas, accelerates the research progress of anti-atherosclerosis TCM compound formulas, and lays a foundation for subsequent drug development and clinical application.

[Key words]　Atherosclerosis　Zebrafish　Drug screening　Chinese medicine compound formulas

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)由脂质代谢紊乱引起,可诱发严重心脑血管疾病。中医认为AS的发生与气滞血瘀密切相关,许多活血化瘀方剂理论上具备防治潜力。AS早期主要涉及脂质代谢紊乱、炎症反应、氧化应激及血管内皮细胞损伤等环节[1]。虽有众多活血化瘀方剂用于治疗血瘀证并疗效确切,但其抗AS作用尚缺乏系统验证。AS与载脂蛋白E(ApoE)密切相关[2]。*ApoE*基因敲除会阻碍脂蛋白颗粒清除,导致血浆脂质代谢紊乱,促进AS等心血管疾病发展,因此研究*ApoE*在AS中的表达及功能异常具有重要意义[3]。斑马鱼*ApoE*基因亚功能化为ApoEa与ApoEb, ApoEa在胚胎早期高表达后下调, ApoEb随发育持续高表达,其保守区域与人类*ApoE*基因脂蛋白受体结合区高度相似,是成年斑马鱼的主要功能同源异构体[4-7]。基于斑马鱼的高通量活性筛选平台在中药活性成分筛选、天然产物开发及药物新功能研究中具有明显优势,已成为药物研发热点。本研究利用*apoeb*基因敲除斑马鱼模型,结合*Tg(mpeg1:EGFP)*、*Tg(lyzc:dsRed)*、*Tg(gata1a:mCherry)*和*Tg(flk1:EGFP)*等转基因品系,构建针对AS早期病理过程的中药复方筛选平台,以高效、低成本地验证方剂治疗AS的潜在作用。以复方丹参方为阳性对照,多角度评价手拈散、金铃子散和理气活血汤的抗AS效果,为AS的中药治疗提供新方案,并为其作用机制研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　实验动物

本研究选用来自山东中医药大学动物中心斑马鱼房的WT(野生型)AB品系斑马鱼,以及多种转基因斑马鱼品系,包括*Tg(mpeg1:EGFP)*、*Tg(lyzc:dsRed)*、*Tg(gata1a:mCherry)*和*Tg(flk1:EGFP)*。其中,*Tg(mpeg1:EGFP)*以绿色荧光蛋白特异性标记巨噬细胞; *Tg(lyzc:dsRed)*以红色荧光蛋白特异性标记中性粒细胞; *Tg(gata1a:mCherry)*以红色荧光蛋白特异性标记红细胞; *Tg(flk1:EGFP)*以绿色荧光蛋白特异性标记血管内皮细胞。此外,本研究还使用本实验室繁育获得的*apoeb*$^{-}$/$^{-}$AB、*apoeb*$^{-}$/$^{-}$ *Tg(mpeg1:EGFP)*、*apoeb*$^{-}$/$^{-}$ *Tg(lyzc:dsRed)*、*apoeb*$^{-}$/$^{-}$ *Tg(gata1a:mCherry)*和*apoeb*$^{-}$/$^{-}$ *Tg(flk1:EGFP)*,用于相关功能研究。所有斑马鱼均饲养于循环水养殖系统中,饲养条件为水温28.5 ℃, pH值7.2~7.6,光照周期为10 h黑暗/14 h光照,每日投喂2次。本研究所涉及的斑马鱼饲养管理、实验操作及实验流程均严格遵循山东中医药大学实验动物伦理委员会的相关规范,并经山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会批准(批准号SDUTCM20231008409)。

1.2　主要实验药品、试剂、仪器及耗材

斑马鱼养殖系统(北京爱生公司)、普通PCR扩增仪(美国Applied Biosystem公司)、琼脂糖凝胶电泳仪及电泳槽(美国Bio-Rad公司); 凝胶成像仪(美国SynGene公司); 显微注射仪(美国Harvard Apparatus公司); 体式显微镜(卡尔·蔡司股份公司)、全波长酶标仪(BioTek Instrument)。引物序列见表1,其余实验药品、试剂、仪器及耗材见网络资源附件附表1。

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequences

Primer	Sequences (5'-3')	Catalog No.
β-actin-F	AGAGCTATGAGCTGCCTGACG	202404090544
β-actin-R	CCGCAAGATTCCATACCCA	202404090544
Q-IL-6-F	GGCATTTGAAGGGGTCAGGA	202406090216
Q-IL-6-R	GCGTTAGACATCTTTCCGTGC	202406090216
Q-IL-1β-F	AGATCCGCTTGCAATGAGCTA	202406090217
Q-IL-1β-R	GCTTCATTCTGTTCAGGGCG	202406090217
Q-TNF-α-F	GCTGGATCTTCAAAGTCGGGTGTA	202406090216
Q-TNF-α-R	TGTGAGTCTCAGCACACTTCCATC	202406090216

TNF-α: tumor necrosis factor-alpha; IL: interleukin.

1.3　药物浓度筛选

基于方剂大辞典数据库进行筛选,从933首活血化瘀方剂中,根据其功能及主治范围、方剂组成的可行性、药物制剂及有无AS前期研究基础等因素,我们最终筛选出复方丹参方、手拈散、金铃子散、理气活血汤、复元活血汤、

血府逐瘀汤(6首方剂)。基于斑马鱼(单位为mg/mL)转换人用剂量(单位为g/d)的方法,按照换算公式得出初始浓度(斑马鱼)= 人用剂量×1 000/6。初始浓度基于斑马鱼与人类代谢速率差异(1∶6)进行异速缩放,并参考水体药物浓度与血浆暴露水平的线性关系[8-9]。为平衡药效与安全性,我们针对每首方剂设置了5个递减浓度梯度(比例4∶2∶1∶0.5∶0.25)进行24 h预实验(详见网络资源附件附表2)。预实验发现,随着浓度降低,死亡率呈梯度下降趋势;然而,最低浓度组(梯度5)的药效信号显著减弱,其脂质沉积改善率(如油红O染色所示)不足10%。值得关注的是,血府逐瘀汤和复元活血汤在各浓度梯度下均表现出较高的斑马鱼死亡率,即使在最低测试浓度下仍难以满足实验安全阈值,因此无法纳入后续正式实验。其余方剂在梯度5浓度条件下,既维持了可观测的药效趋势,又实现了实验组的最低死亡率,故最终选择该浓度进行正式实验。具体实验浓度设定为:复方丹参方2.81 mg/mL、手拈散0.85 mg/mL、金铃子散2 mg/mL、理气活血汤1 mg/mL。通过梯度预实验发现,梯度浓度5(最低浓度)在24 h药浴下的死亡率仍接近50%,但相较于梯度浓度1~4死亡率最低,且是唯一观察到药效趋势(如脂质沉积减少)的组别。最终选取梯度5浓度用于正式实验:复方丹参方2.81 mg/mL、手拈散0.85 mg/mL、金铃子散2 mg/mL、理气活血汤1 mg/mL(网络资源附件附图1)。

1.4 动物分组

将*apoeb*$^{-/-}$AB、*apoeb*$^{-/-}$ *Tg(mpeg1:EGFP)*、*apoeb*$^{-/-}$*Tg(lyzc:dsRed)*、*apoeb*$^{-/-}$*Tg(gata1a:mCherry)*、*apoeb*$^{-/-}$*Tg(flk1:EGFP)*转基因斑马鱼各分为7组,每组30条。对于每个品系,分别以其未敲除*apoeb*基因的斑马鱼作为正常对照组〔即各品系正常对照组分别为WT(野生型)AB、*Tg(mpeg1:EGFP)*、*Tg(lyzc:dsRed)*、*Tg(gata1a:mCherry)*和*Tg(flk1:EGFP)*〕,每品系30条,不给予任何饲料及药物处理。*apoeb*$^{-/-}$AB系斑马鱼是经过基因编辑的品系,因*apoeb*基因缺失而具有天然的AS易感性,被用于构建疾病模型并进行后续药物干预。AB品系斑马鱼为野生型品系,其遗传背景正常,不携带*apoeb*基因缺陷,因此在本实验中作为*apoeb*$^{-/-}$AB系斑马鱼的正常对照组。以*apoeb*$^{-/-}$AB斑马鱼为例,具体分组干预如下:7个组食物干预为每2 d投喂4次高脂饲料,每隔8 h更新一次培养水。其中,Model组仅给予高脂饲料喂食(预实验已确认高脂喂养2 d可成功诱导AS模型),不进行药浴;DMSO 组(溶剂对照组)、瑞舒伐他汀组(西药阳性对照组)、复方丹参方组(中药阳性对照组)在给予高脂饲料喂食2 d后,分别给予体积分数0.05% DMSO、0.4 μg/mL瑞舒伐他汀、2.81 mg/mL复方丹参方药液24 h药浴;3个活血化瘀方(分别为手拈散、金铃子散、理气活血汤)组给予高脂饲料喂食2 d后,分别给予手拈散0.85 mg/mL、金铃子散2 mg/mL、理气活血汤1 mg/mL药液24 h药浴。其余*apoeb*$^{-/-}$ *Tg(mpeg1:EGFP)*、*apoeb*$^{-/-}$*Tg(lyzc:dsRed)*、*apoeb*$^{-/-}$*Tg(gata1a:mCherry)*、*apoeb*$^{-/-}$*Tg(flk1:EGFP)*品系斑马鱼均采用相同的分组及干预方式。

1.5 指标检测及检测方法

本研究以油红O染色的脂质沉积面积作为主要结局指标(反映AS核心病理特征),血脂〔总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)〕、氧化应激〔丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)〕、炎症因子〔肿瘤坏死因子(TNF)-α、IL-1β、IL-6〕及血流速度等为次要结局指标(仅作为机制探索性分析)。

1.5.1 油红O染色

仅使用*apoeb*$^{-/-}$AB系斑马鱼及其正常对照进行此项检测,荧光转基因品系不参与此项检测。每组经药物干预后进行油红O染色(预实验已确认高脂喂养2 d可成功诱导AS模型),对具有抗AS作用的活血化瘀方进一步筛选。所有显微图像均使用ImageJ软件(NIH)校准标尺,图片标尺为250 μm。

1.5.2 全组织匀浆液生化指标检测

仅使用*apoeb*$^{-/-}$AB系斑马鱼及其正常对照进行此项检测,荧光转基因品系不参与此项检测。脂质代谢指标:TC、TG、HDL-C、LDL-C通过酶比色法测定;氧化应激指标:MDA采用硫代巴比妥酸法、SOD通过四唑盐法检测。均按试剂盒说明书操作。

1.5.3 影像学观察斑马鱼体内炎症细胞行为模式

使用共聚焦显微镜(ImageXpress Micro Confocal)对*apoeb*$^{-/-}$*Tg(mpeg1:EGFP)*和*apoeb*$^{-/-}$*Tg(lyzc:dsRed)*转基因斑马鱼进行成像观察。其中,*Tg(mpeg1:EGFP)*品系斑马鱼的巨噬细胞特异性表达绿色荧光蛋白,*Tg(lyzc:dsRed)*品系斑马鱼的中性粒细胞特异性表达红色荧光蛋白,无需额外染色即可直接观察。图像采集参数:激发波长488 nm(绿色荧光蛋白)和561 nm(红色荧光蛋白),Z-stack扫描厚度10 μm。所有显微图像均使用ImageJ软件(NIH)校准标尺,共聚焦图片标尺为200 μm。

1.5.4 血流速度监测

用微视系统对*apoeb*$^{-/-}$*Tg(gata1a:mCherry)*转基因品系斑马鱼进行自动拍摄,观察血流速度变化情况。用共聚焦成像系统对*apoeb*$^{-/-}$*Tg(gata1a:mCherry)*转基因斑马鱼体内红细胞变化趋势进行观察,辅助判断血流速度。

1.5.5　血管内皮细胞损伤程度监测

用共聚焦成像系统对*apoeb*$^{-/-}$*Tg(flk1:EGFP)*转基因斑马鱼进行自动拍摄，观察血管内皮损伤情况。

1.5.6　*apoeb*$^{-/-}$斑马鱼炎症因子表达水平监测

仅使用*apoeb*$^{-/-}$AB系斑马鱼及其正常对照进行此项检测，荧光转基因品系不参与此项检测。分别提取各组斑马鱼的总RNA并进行逆转录，随后通过实时荧光定量PCR技术，检测炎症因子*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* mRNA表达水平。本实验以β-actin作为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因的相对表达量。

1.6　统计学方法

所有统计分析均使用GraphPad Prism 8.0软件（GraphPad Software, USA）完成。数据正态性通过Shapiro-Wilk检验，方差齐性通过Levene's检验验证。符合正态分布且方差齐性时采用单因素方差分析（one-way ANOVA），进一步以Tukey's HSD检验进行两两比较；不符合条件时采用Kruskal-Wallis检验，进一步以Dunn's检验进行两两比较。主要结局指标（油红O染色）采用Bonferroni法校正α值（校正后α= 0.012 5），次要结局指标为探索性分析（血脂、炎症因子等），采用原始α= 0.05。

2　结果

2.1　油红O染色

apoeb$^{-/-}$AB系各组斑马鱼油红O染色结果显示，与Model组〔（2 854±321）μm^2〕相比，瑞舒伐他汀组〔（1 246±189）μm^2，P< 0.001〕、复方丹参方组〔（1 423±215）μm^2，P< 0.001〕、手拈散组〔（1 567±238）μm^2，P< 0.001〕、金铃子散组〔（2 015±297）μm^2，P= 0.01〕的脂质沉积面积降低，而理气活血汤组〔（2 712±315 μm）^{2}〕与Model组相比差异无统计学意义（图1）。

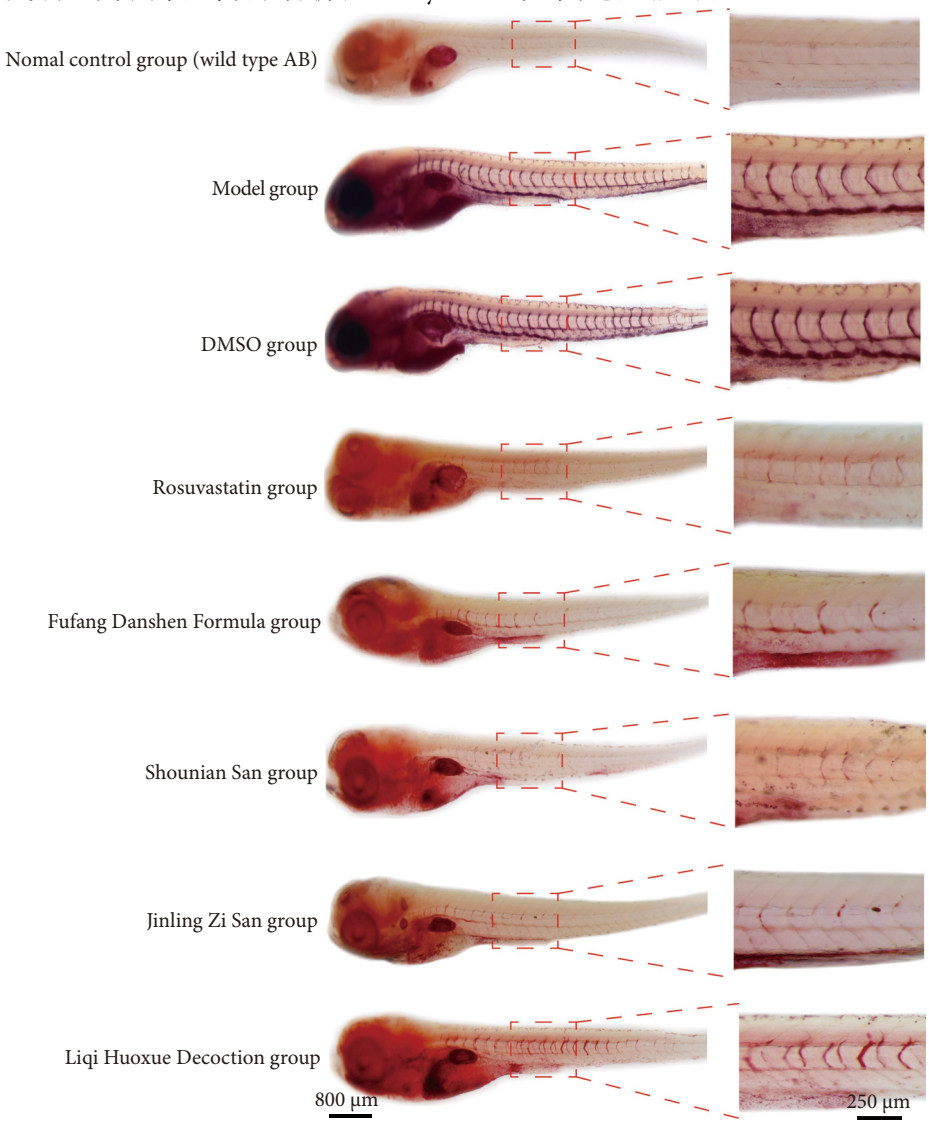

图 1　*apoeb*$^{-/-}$AB系斑马鱼品系经药物筛选后油红O染色

Fig 1　Oil Red O staining of the *apoeb*$^{-/-}$ AB zebrafish strain after drug screening

2.2 全组织匀浆液生化指标检测

apoeb$^{-/-}$AB系各组斑马鱼经药物干预后，检测血脂及氧化应激相关指标，结果显示(图2)：与正常对照组相比，Model组斑马鱼的HDL-C、LDL-C、TC、TG、MDA水平及SOD活性均升高，提示本次构建的*apoeb*$^{-/-}$斑马鱼动脉粥样硬化模型成功，符合AS伴随血脂代谢紊乱、氧化应激损伤的病理特征。DMSO组所有检测指标与Model组相比差异均无统计学意义。与Model组相比，阳性对照瑞舒伐他汀组HDL-C水平降低(P< 0.000 1)，LDL-C(P< 0.001)、TC(P< 0.05)、TG(P< 0.01)、MDA水平及SOD活性(P< 0.05)均下调，可有效改善模型的血脂异常与氧化应激损伤；中药阳性对照复方丹参方组HDL-C、LDL-C、TC、TG、MDA水平均下降(P< 0.05)，SOD活性回调(P< 0.001)，整体调治效果与瑞舒伐他汀组相近；手拈散组LDL-C、TG、MDA水平及SOD活性均降低(P< 0.05)，但HDL-C与TC水平差异无统计学意义；金铃子散组仅HDL-C水平降低(P= 0.02)，其余各指标与Model组相比均无明显差异；理气活血汤组所有检测指标均未观察到差异有统计学意义。综上，不同中药方剂在该*apoeb*$^{-/-}$斑马鱼AS模型中对血脂和氧化应激的调控效果存在明显差异，其中中药阳性对照复方丹参方及手拈散处理组均可有效改善模型的血脂紊乱、缓解氧化应激损伤，二者作用效果相当。

2.3 影像学观察斑马鱼体内炎症细胞行为模式

图3显示，与Model组相比，经复方丹参方、手拈散、金铃子散处理的*apoeb*$^{-/-}$*Tg(mpeg1:EGFP)*转基因斑马鱼体内巨噬细胞积聚减少(减少约40% ~ 50%，P< 0.01)，而DMSO和理气活血汤组则无明显差异。进一步观察*apoeb*$^{-/-}$*Tg(lyzc:dsRed)*斑马鱼发现，复方丹参方、手拈散和金铃子散处理组的中性粒细胞在腹部血管的浸润减少约35% ~ 45 %(P < 0.05)。上述结果提示，复方丹参方、手拈散与金铃子散可显著抑制*apoeb*$^{-/-}$转基因斑马鱼体内巨噬细胞过度积聚及中性粒细胞异常浸润，而理气活血汤在此炎症细胞调控方面未表现出明显作用。

2.4 血流速度监测

利用微视系统对*apoeb*$^{-/-}$*Tg(gata1a:mCherry)*斑马鱼进行观察，结果显示，与Model组相比，经瑞舒伐他汀、复方丹参方及手拈散药浴处理后的斑马鱼血流速度显著提升(图4)。然而，经DMSO、金铃子散及理气活血汤药浴处理的斑马鱼，其血流速度虽缓慢，但与Model组相比无明显差异，表明这些处理对血流速度的影响有限。通过共聚焦显微镜成像系统观察*apoeb*$^{-/-}$*Tg(gata1a:mCherry)*斑马鱼体内红细胞的变化趋势(图3)，发现经复方丹参方及手拈散药浴处理的斑马鱼腹部未出现红细胞积聚现象，而经DMSO、金铃子散及理气活血汤药浴处理的斑马

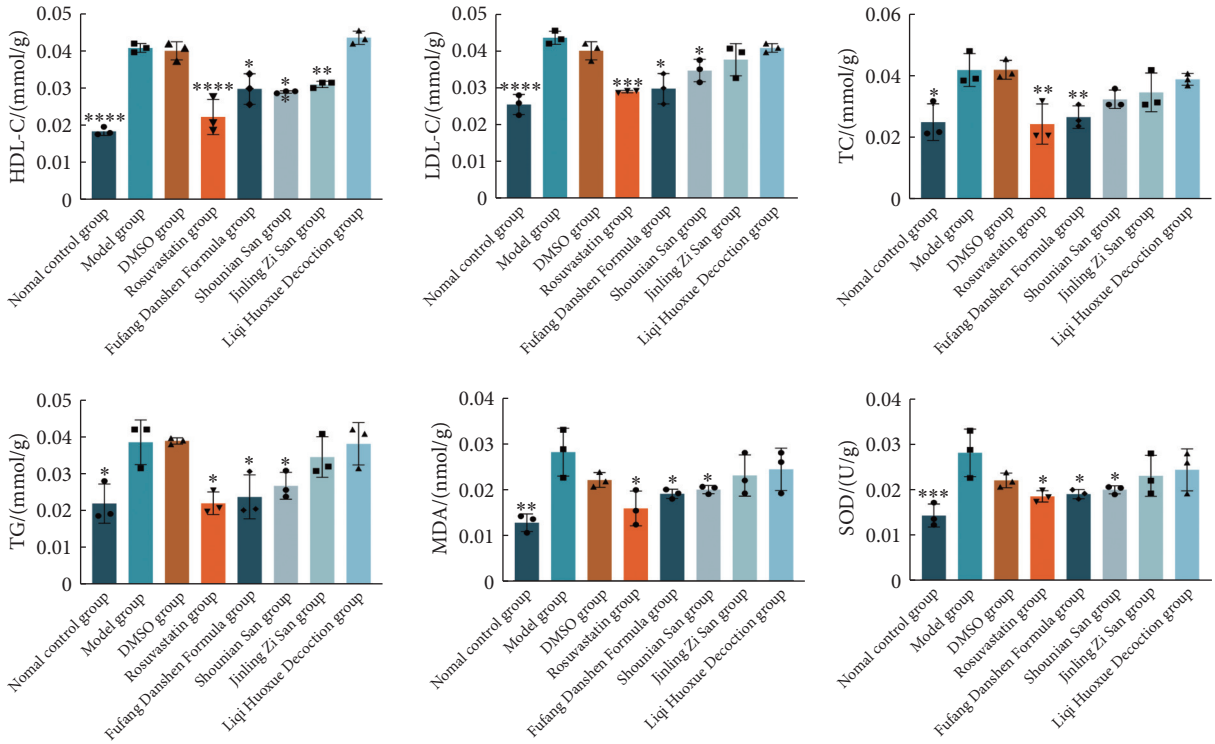

图 2 *apoeb*$^{-/-}$AB系斑马鱼经药物筛选后TC、TG、HDL、LDL、MDA、SOD体内含量测定

Fig 2 Measurement of *in vivo* levels of TC, TG, HDL, LDL, MDA, and SOD in *apoeb*$^{-}$/$^{-}$ AB zebrafish after drug screening

TC: total cholesterol; TG: triglyceride; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase. **** P < 0.000 1, *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, vs. the model group. n = 30 per group.

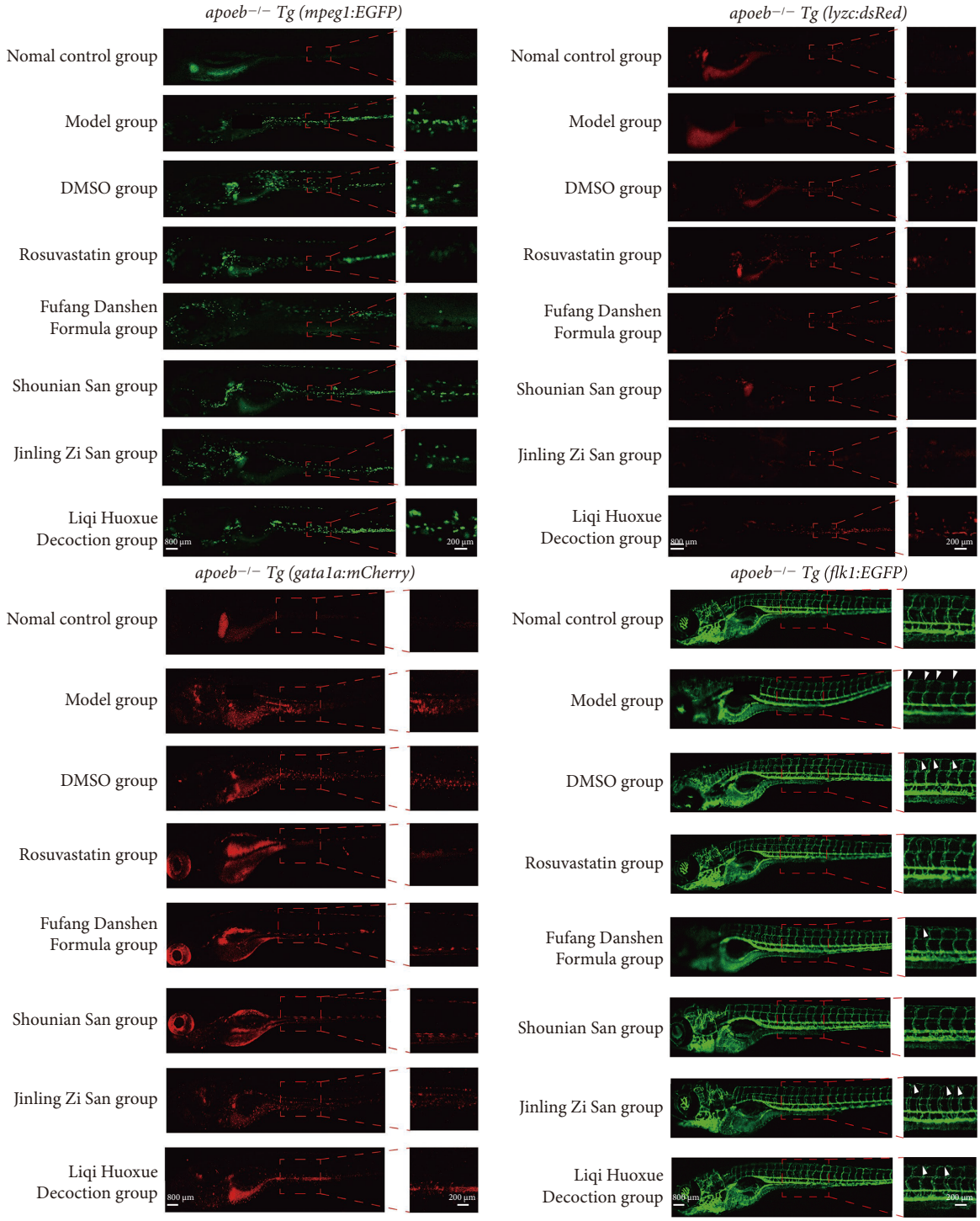

图 3 *apoeb*$^{-/-}$转基因斑马鱼经药物筛选后免疫细胞及血管内皮分布特征

Fig 3 Distribution characteristics of immune cells and vascular endothelium in *apoeb*$^{-/-}$ transgenic zebrafish after drug screening

For each zebrafish strain, zebrafish without the *apoeb* gene knockout were used as the normal control group, respectively. *Tg(mpeg1:EGFP)* specifically labels macrophages with green fluorescent protein. *Tg(lyzc:dsRed)* specifically labels neutrophils with red fluorescent protein. *Tg(gata1a:mCherry)* specifically labels red blood cells with red fluorescent protein. *Tg(flk1:EGFP)* specifically labels vascular endothelial cells with green fluorescent protein. (Scale bar: 800 μm on the left, 200 μm on the right). The arrowheads indicate the defect site in the vascular endothelial cells.

鱼腹部则出现明显的红细胞积聚。

2.5　血管内皮细胞损伤程度监测

利用共聚焦荧光成像系统对*apoeb*$^{-/}$*Tg(flk1:EGFP)*转基因斑马鱼的血管内皮细胞进行观察，结果显示，与Model组相比，经复方丹参方和手拈散药浴处理的斑马鱼未出现明显的血管内皮细胞损伤(图3)。然而经DMSO、金铃

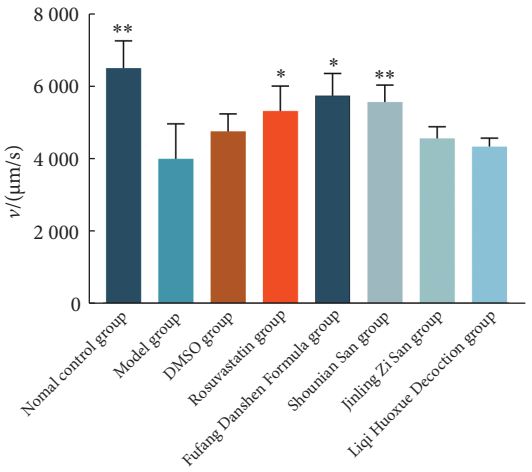

图 4 *apoeb*$^{-/-}$*Tg*(*gata1a:mCherry*)斑马鱼经药物筛选后的血流速度折线图

Fig 4 Line graph showing the blood flow velocity of *apoeb*$^{-/-}$*Tg* (*gata1a:mCherry*) zebrafish after drug screening

$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, vs. the model group. $n = 30$ per group.

子散和理气活血汤药浴处理的斑马鱼,其血管内皮细胞出现了轻度缺损,且与模型组相比未见明显差异。相比之下,金铃子散和理气活血汤在修复血管内皮细胞损伤方面未表现出明显效果。

2.6 *apoeb*$^{-/-}$斑马鱼炎症因子表达水平变化

通过实时荧光定量PCR检测*apoeb*$^{-/-}$AB系斑马鱼AS模型中炎症因子基因(*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*)的表达水平,发现不同药物组对炎症反应的调控作用存在差异(图5)。与Model组相比,复方丹参方组、瑞舒伐他汀组和手拈散组抑制促炎因子表达,使*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* mRNA表达下调(P均< 0.01)。相比之下,DMSO对照组、金铃子散及理气活血汤组的炎症因子表达呈轻微增高趋势,但与Model组相比差异均无统计学意义。上述结果表明,复方丹参方和手拈散在AS早期可能通过调控炎症反应发挥保护作用;而金铃子散和理气活血汤在本研究中未表现出显著的抗炎效果。

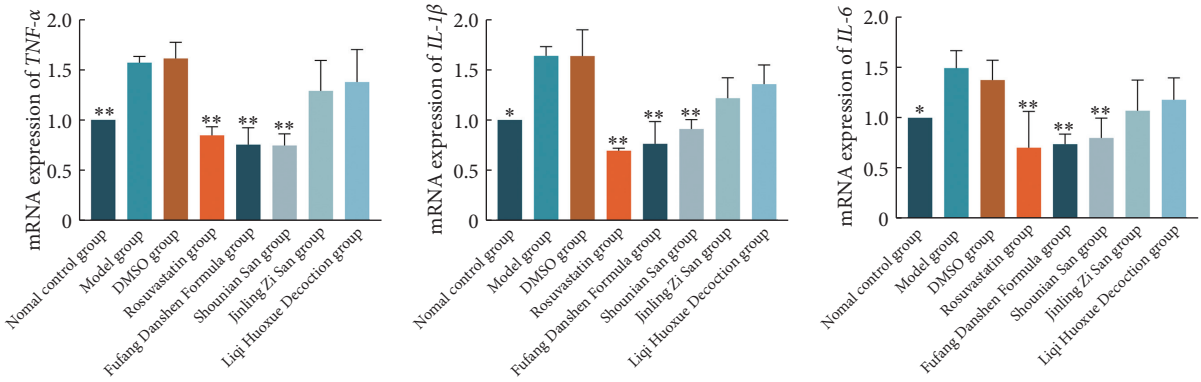

图 5 *apoeb*$^{-/-}$AB系斑马鱼经药物筛选后的体内 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* mRNA表达含量

Fig 5 The expression levels of *TNF-α*, *IL-1β*, and *IL-6* mRNA in *apoeb*$^{-/-}$ AB zebrafish after *in vivo* drug screening

TNF-α: tumor necrosis factor-alpha; IL: interleukin. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, vs. the model group. $n = 30$ per group.

3 讨论

在祖国传统医学中,并无“AS”这一病名的明确记载,中医多将其归入“血瘀”“癥结”“痹证”等范畴。病位主要在脉,与心密切相关[10]。其病机属本虚标实,本虚以气虚为主,标实以血瘀常见,气机郁滞、心脉瘀阻是发病主要基础,气滞与血瘀相互影响、互为因果。《素问·至真要大论》提出“疏其血气,令其调达,坚者削之,结者散之”,体现了调畅气血、活血化瘀的核心思想。研究表明[11-13],肝气郁结可升高动脉壁张力,引起血压上升和内皮损伤,是AS的重要诱因。现代药理学发现[14-15],野黄芩苷等成分具有活血化瘀、降脂及抗氧化作用,理气活血法可改善冠状动脉粥样硬化并延缓病程。临床应用中,理气活血滴丸、通心络胶囊、麝香保心丸等药物以活血化瘀、化瘀通络为治则,针对气滞血瘀型AS效果显著。

斑马鱼模型在AS及代谢性疾病研究中显示出独特优势。研究者利用基因编辑及表型模拟构建多种AS模型,用于揭示病理机制与药物验证[16]。多项研究已证实中药复方在斑马鱼早期AS模型中具有明显疗效[17-20],为中药防治AS和筛选平台构建提供了理论与技术基础。

复方丹参方(阳性对照)由丹参、三七、冰片组成,具有活血化瘀、行气止痛作用[21];手拈散主含延胡索、灵脂、香附、没药,行气活血、止痛疏肝;金铃子散由金铃子与延胡索组成,行气活血、疏肝止痛[22];理气活血汤含柴胡、归尾、牡丹皮、香附、青皮、栀子,活血理气、祛瘀消肿。本研究利用斑马鱼药物筛选平台系统评估其药效及毒性。结果显示,不同方剂在血脂代谢、氧化应激及炎症细胞募集等方面呈现明显差异,其中复方丹参方与手拈

散在多指标上表现出类似阳性对照瑞舒伐他汀的改善效果，而理气活血汤则未见显著作用。这些结果提示，本平台能够有效区分有效与无效方剂，并识别出药效强度与作用特点的差异。该平台基于斑马鱼模型，具备高通量优势：单次实验可同时评估24个浓度梯度或12个复方，结合自动化成像与数据分析，日均筛选效率可达百例。斑马鱼在短期(72 h内)禁食并不会引起明显的应激损伤，部分研究采用禁食作为正常对照以排除外源性脂质干扰[23]。本实验中的正常对照组未喂食，旨在模拟基础代谢状态，而模型组通过高脂饲料诱导急性高脂负荷，二者对比可清晰反映高脂刺激的作用。

本研究对四首方剂的验证结果表明，该平台可在脂质代谢、氧化应激以及炎症细胞募集、红细胞聚集、血流速度等多个终点上进行联合评价，从而综合判断药物抗AS的潜力。例如，模型组HDL-C较正常组显著升高，可能源于急性高脂负荷诱导的代偿反应；而金铃子散降低HDL-C的作用虽与临床降脂目标不尽相同，但平台依然能够捕捉到这一代谢调节效应，提示其具有多维度解析药物作用特征的能力。此外，手拈散抑制巨噬细胞及中性粒细胞在血管内募集、减少红细胞聚集等表型被平台明确检出，进一步验证了其筛选早期炎症干预药物的灵敏度。同时，斑马鱼器官结构简化、与哺乳动物存在基因保守性差异，可能影响部分表型的可靠性；金铃子散降低HDL-C的效应等个别统计结果需经独立实验验证；理气活血汤无显著作用的结果也应结合毒性评估及后续类器官、多动物模型研究加以确认。综上，本平台能够正确筛选出有效的抗AS方剂，并区分出作用较弱的方剂及无效方剂，为中药抗AS机制的快速筛选与复方优化提供了高效、可靠的实验基础。

*　　*　　*

作者贡献声明　殷久凤负责论文构思、正式分析、研究方法、软件、可视化、初稿写作和审读与编辑写作，王慧和王浩颜负责调查研究和研究项目管理，姜彤负责经费获取、提供资源和监督指导，张新怡负责论文构思和数据审编，李明楷负责正式分析、经费获取、研究方法、软件、可视化、初稿写作和审读与编辑写作，张丹负责调查研究，赵峰和杨雯晴负责监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊，且对将要发表的版本进行最终定稿，并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution　YIN Jiufeng is responsible for conceptualization, formal analysis, methodology, software, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. WANG Hui and WANG Haoyan are responsible for investigation and project administration. JIANG Tong is responsible for funding acquisition, resources, and supervision. ZHANG Xinyi is responsible for conceptualization and data curation. LI Mingkai is responsible for formal analysis, funding acquisition, methodology, software, visualization, writing--original draft, and writing--review and editing. ZHANG Dan is responsible for investigation. ZHAO Feng and YANG Wenqing are responsible for supervision and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests　All authors declare no competing interests.

参　考　文　献

[1] 宋玮, 帅垠琦, 王楷, 等. 中药治疗颈动脉粥样硬化患者的临床特征、证型分布及用药规律研究. 中成药, 2025, 47(6): 2101-2108. doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.051.
SONG W, SHUAI Y Q, WANG K, *et al*. Clinical characteristics, syndrome type distribution and medication regularity of traditional Chinese medicine in treatment of patients with carotid atherosclerosis. Chinese Traditional Patent Medicine, 2025, 47(6): 2101-2108. doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.051.

[2] GETZ G S, REARDON C A. Apoprotein E and reverse cholesterol transport. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3479. doi: 10.3390/ijms19113479.

[3] 高佳. 载脂蛋白E基因多态性与中国老年人冠心病相关性的meta分析. 重庆: 重庆医科大学, 2020. doi: 10.27674/d.cnki.gcyku.2020.001120.
GAO J. Meta analysis of the association between apolipoprotein E gene polymorphism and coronary heart disease in chinese elderly. Chongqing: Chongqing Medical University, 2020. doi: 10.27674/d.cnki.gcyku.2020.001120.

[4] HU Y X, YOU H M, ZHU R F, *et al*. Establishment of a lipid metabolism disorder model in ApoEb mutant zebrafish. Atherosclerosis, 2022, 361: 18-29. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2022.10.008.

[5] KONDO H, MORINAGA K, MISAKI R, *et al*. Characterization of the pufferfish Takifugu rubripes apolipoprotein multigene family. Gene, 2005, 346: 257-266. doi: 10.1016/j.gene.2004.11.015.

[6] KIM K Y, CHO Y S, BANG I C, *et al*. Isolation and characterization of the apolipoprotein multigene family in Hemibarbus mylodon (Teleostei: Cypriniformes). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2009, 152(1): 38-46. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.09.084.

[7] OTIS J P, ZEITUNI E M, THIERER J H, *et al*. Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake. Dis Model Mech, 2015, 8(3): 295-309. doi: 10.1242/dmm.018754.

[8] MACRAE C A, PETERSON R T. Zebrafish as tools for drug discovery. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(10): 721-731. doi: 10.1038/nrd4627.

[9] Van WIJK R C, KREKELS E H J, KANTAE V, *et al*. Mechanistic and quantitative understanding of pharmacokinetics in zebrafish larvae through nanoscale blood sampling and metabolite modeling of paracetamol. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 371(1): 15-24. doi: 10.1124/jpet.119.260299.

[10] 高煜勋, 谢希朴, 王赫, 等. 从《素问·脉要精微论》看春秋平脉. 中医学报, 2024, 39(6): 1166-1170. doi: 10.13424/j.cnki.mtcm.1983.01.002.
GAO Y X, XIE X P, WANG H, *et al*. Viewing the Spring-Autumn Normal Pulse from 'Suwen · Maiyao Jingwei Lun'. Journal of Chinese Medicine, 2024, 39(6): 1166-1170. doi: 10.13424/j.cnki.mtcm.1983.01.002.

[11] 李帅帅, 于红红, 田维毅. 中医药防治动脉粥样硬化炎症反应相关信号通路研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23): 180-186. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201868.
LI S S, YU H H, TIAN W Y. Research progress of effect of Traditional Chinese Medicine in prevention and treatment of atherosclerosis based on signal pathway related to inflammatory response. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(23): 180-186. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201868.

[12] RAGGI P, GENEST J, GILES J T, *et al*. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. Atherosclerosis, 2018, 276: 98-108. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.07.014.

[13] 罗尧岳. 活血化瘀方对动脉粥样硬化心血瘀证干预作用的实验研究. 长沙: 湖南中医学院, 2004.
LUO Y Y. Experimental study of intervenient effects the recipes for promoting blood circulation and removing blood stasis on heart blood stasis syndrome in atheriosclerosis. Changsha: Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 2004.

[14] 樊华. 灯盏花中野黄芩苷对气滞血瘀型动脉粥样硬化的干预作用及机制研究. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2018.
FAN H. Intervention effect and mechanism of scutellarin from Erigeron breviscapus on atherosclerosis of qi stagnation and blood stasis type. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2018.

[15] 张琳枫. 理气活血法治疗气滞血瘀型劳累性稳定型心绞痛的疗效观察. 上海: 上海中医药大学, 2020. doi: 10.27320/d.cnki.gszyu.2020.000333.
ZHANG L F. Observation on the therapeutic effect of the method of Regulating Qi And Activating Blood circulation on angina pectoris with tiredness and stability of Qi Stagnation And Blood Stasis. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2020. doi: 10.27320/d.cnki.gszyu.2020.000333.

[16] MONTASSER M E, O'HARE E A, WANG X, *et al*. An APOO pseudogene on chromosome 5q is associated with low-density lipoprotein cholesterol levels. Circulation, 2018, 138(13): 1343-1355. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034016.

[17] 何菲. 芥菜籽对斑马鱼动脉粥样硬化的预防作用. 广州: 南方医科大学, 2013.
HE F. Mustard seeds prevent atherosclerosis in hypercholesterolemic zebrafish. Guangzhou: Southern Medical University, 2013.

[18] 水栋, 王宇卿, 李淑娇, 等. 泻心汤及其有效成分组合物抗动脉粥样硬化作用的比较研究. 中国医院药学杂志, 2021, 41(18): 1836-1841. doi: 10.13286/j.1001-5213.2021.18.04.
SHUI D, WANG Y Q, LI S J, *et al*. Comparative study on anti-atherosclerosis effect of Xiexin decoction and its compositions of effective components. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2021, 41(18): 1836-1841. doi: 10.13286/j.1001-5213.2021.18.04.

[19] 盛健. 基于转基因斑马鱼动脉粥样硬化与血栓疾病模型的药物筛选研究. 杭州: 浙江大学, 2021. doi: 10.27461/d.cnki.gzjdx.2021.004027.
SHENG J. Research on drug screening based on transgenic zebrafish disease models of atherosclerosis and thrombosis. Hangzhou: Zhejiang University, 2021. doi: 10.27461/d.cnki.gzjdx.2021.004027.

[20] 胡杨兮. 基于载脂蛋白*ApoEb*基因敲除斑马鱼调脂药物筛选平台的建立. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2020. doi: 10.26998/d.cnki.gjuyu.2020.000301.
HU Y X. Establishment of a lipid-lowering drug screening platform in zebrafish by *ApoEb* knockout. Shanghai: Naval Medical University of the Chinese People's Liberation Army, 2020. doi: 10.26998/d.cnki.gjuyu.2020.000301.

[21] 李翔, 吴磊宏, 范骁辉, 等. 复方丹参方主要活性成分网络药理学研究. 中国中药杂志, 2011, 36(21): 2911-2915.
LI X, WU L H, FAN X H, *et al*. Network pharmacology study on major active compounds of Fufang Danshen formula. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(21): 2911-2915.

[22] 王怡珍, 梁绿圆, 曹佳蕾, 等. 经典名方金铃子散关键信息考证与现代研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(24): 215-223. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20240817.
WANG Y Z, LIANG L Y, CAO J L, *et al*. Key information research and contemporary research progress of classical formula Jinlingzi San. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(24): 215-223. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20240817.

[23] DU Q, SHAO R, WANG W, *et al*. Vitamin D3 regulates energy homeostasis under short-term fasting condition in zebrafish (Danio Rerio). Nutrients, 2024, 16(9): 1271. doi: 10.3390/nu16091271.

(2025 – 05 – 16收稿, 2026 – 02 – 16修回)

编辑 吕 熙

开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

© 2026《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*