

# 鱼藤素对斑马鱼胚胎毒性的作用\*\*

李文浩<sup>1</sup>, 吴新荣<sup>1, 2</sup>

## Embryotoxic effect of deguelin in zebrafish

Li Wen-hao<sup>1</sup>, Wu Xin-rong<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong Province, China;  
<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Li Wen-hao★, Studying for master's degree, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong Province, China  
lwh288@qq.com

Correspondence to: Wu Xin-rong, Doctor, Chief pharmacist, Master's supervisor, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong Province, China; Department of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China  
gzwxrong@yahoo.com.cn

Supported by: Natural Science Foundation of Guangdong, No.102510010020000\*

Received: 2011-09-30  
Accepted: 2011-12-16

### Abstract

**BACKGROUND:** The establishment of antitumor drug deguelin model provides basis for the *in vivo* experiment.

**OBJECTIVE:** To investigate the influence of different concentrations of deguelin on zebrafish embryonic development.

**METHODS:** The zebrafish embryos were treated with different concentrations of deguelin. The changes of the phenotype were observed at 48 and 72 hours after postfertilization, and the hatching rate was counted at 72 hours after postfertilization.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The development of embryo was remained under 0.1  $\mu\text{mol/L}$  concentration of deguelin. The development of embryo was delayed at 0.2  $\mu\text{mol/L}$  concentration of deguelin. 0.3  $\mu\text{mol/L}$  concentration of deguelin could inhibit the development of embryo and cause death of the embryo. These results show that high concentration of deguelin leads to embryonic lethality, while low concentration of deguelin delays the embryonic development.

Li WH, Wu XR. Embryotoxic effect of deguelin in zebrafish. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(2): 852-854.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 以模式生物斑马鱼构建生物模型, 易于开展活体实验。

**目的:** 探讨了不同鱼藤素浓度对斑马鱼胚胎发育的影响。

**方法:** 不同鱼藤素浓度作用于斑马鱼胚胎, 分别在受精后 48, 72 h 观测其表型变化, 受精后 72 h 统计其胚胎孵化率。

**结果与结论:** 鱼藤素在 0.1  $\mu\text{mol/L}$  浓度以下对斑马鱼胚胎发育无影响, 0.2  $\mu\text{mol/L}$  浓度延缓斑马鱼胚胎发育, 0.3  $\mu\text{mol/L}$  浓度以上抑制了斑马鱼胚胎发育, 使胚胎致死。结果表明, 鱼藤素高浓度使胚胎致死, 低浓度延缓胚胎发育。

**关键词:** 鱼藤素; 斑马鱼; 胚胎发育; 帕金森病; 肿瘤细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.022

李文浩, 吴新荣. 鱼藤素对斑马鱼胚胎毒性的作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 852-854.  
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

鱼藤素(Deguelin)是从植物中提取的黄酮类化合物, 结构明确。体外细胞实验表明其能抑制PI3K活性<sup>[1-2]</sup>, 并可降低pAkt水平, 促进肿瘤细胞凋亡。Chun等<sup>[1]</sup>指出鱼藤素的作用机理是高度专一性的, 其主要攻击目标是肿瘤细胞及癌前病变细胞, 对其周边组织的正常细胞影响甚微。鱼藤素选择性作用肿瘤细胞、抗肿瘤谱广及高效低毒等特性使其备受人们关注, 其抗肿瘤作用机制尚待进一步阐明。

斑马鱼(Danio rerio)是近几十年出现的新模式生物, 是目前生命科学研究中重要的模式脊椎动物之一。它具有其他模式生物不具有的显著优势: ①斑马鱼基因与人类基因的相似度达到87%, 这意味着在其身上做药物实验所得到的结果在多数情况下也适用于人体, 因此它受到生物学家的重视。②斑马鱼的胚胎是透明的, 易于观察和操作, 所以很容易观察到药物对其体内器官的影响。此外, 雌性斑马鱼可

产卵200枚, 胚胎在24 h内就可发育成形, 繁殖周期短, 这使得生物学家可以在同一代鱼身上进行不同的实验, 进而研究病理演化过程并找到病因。

本文研究了不同浓度的鱼藤素对斑马鱼胚胎发育的影响作用, 初步探讨了鱼藤素在模式生物斑马鱼上的作用浓度及胚胎表型变化, 为进一步研究鱼藤素作用机制提供基础依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 胚胎发育观察。

**时间及地点:** 于2011-07/09在北京大学深圳研究生院遗传与发育实验室完成。

**材料:** Tubingen 野生型斑马鱼, 取自北京大学深圳研究生院遗传与发育实验室; 鱼藤素、二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司; 甲基纤维素(M450)购于国药集团化学试剂有限公司; 正置显微镜为 ZEISS 公司生产; 体视显微镜(Zeiss Stemi 2000-C)为北京普瑞赛司仪器有限公司生产(CANON Power Shot A2100 IS)。

## 方法:

**胚胎收集:** 根据Zebrafish book中描述的方法养殖斑马鱼<sup>[3]</sup>, 鱼房内光照和黑暗的比例为14/10, 成年斑马鱼雌雄分开饲养, 并定时喂以饲料。实验前天晚上, 将雌雄以1:2移入产卵缸, 并用隔板将雌雄分开。次日清晨, 移去隔板, 雄鱼追逐雌鱼后, 约30 min便可收集胚胎。胚胎用养鱼水清洗干净后, 转入一次性消毒平板培养皿中, 于28.5 °C恒温箱中对胚胎进行控光培养, 根据实验要求选取合适的发育时段。

**试剂配制:** 鱼藤素用二甲亚砜(DMSO)助溶, 将其配成贮存液, 避光置于-20 °C冰箱。实验时再稀释到所需浓度。斑马鱼培养液参照Zebrafish book 标准配制。将鱼藤素药物分为0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 μmol/L 6个浓度组, 并设含DMSO孵化液的对照组, DMSO终浓度为1%。

**胚胎的处理:** 在体式显微镜下挑选培养皿中正常发育受精后6 h (hour past fertilization) 的斑马鱼胚胎, 随机移入12孔板的样孔中, 每孔25枚, 每个实验浓度组75枚胚胎, 样孔中吸干原有培养液后迅速加入2 mL配好的药液, 28.5 °C恒温箱中培养。

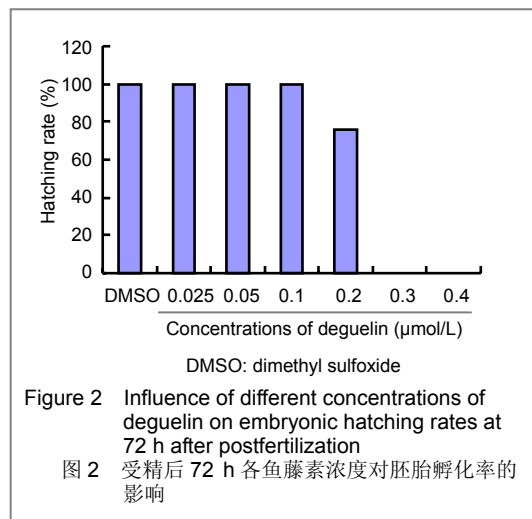
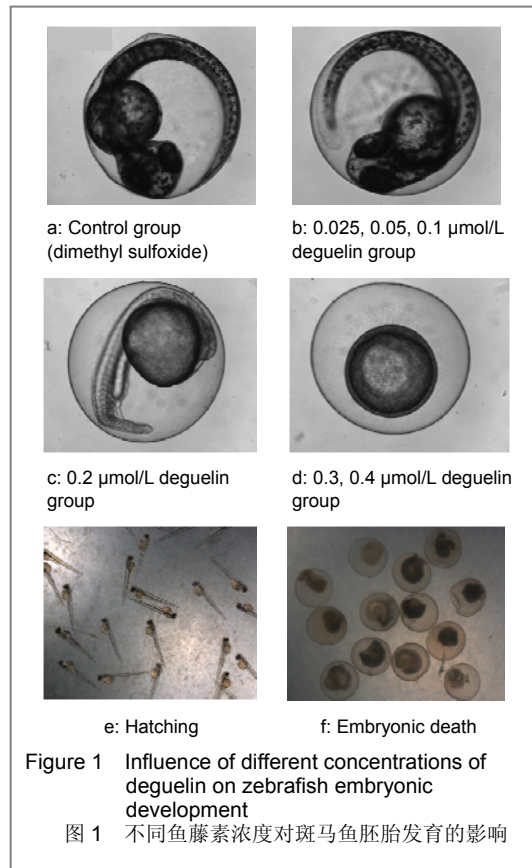
**主要观察指标:** 定期观察胚胎发育情况, 及时剔除死亡胚胎, 于受精后48, 72 h观察、拍照和孵化率统计。

## 2 结果

**2.1 鱼藤素对胚胎表型的影响** 由图1可以看出, 在受精后48 h时期胚胎在不同药物浓度处理下出现了不同的发育表型。0.025, 0.05, 0.1 μmol/L 药物浓度的胚胎都出现相同的表型和对照组无差别, 见图1a, b, 0.2 μmol/L 药物浓度发育明显比对照组缓慢, 此浓度抑制了胚胎发育, 见图1c。0.3, 0.4 μmol/L 药物浓度组也表现一样的表型, 见图1d, 正常发育, 受精后72 h全部孵出, 见图1e, 说明0.1 μmol/L 药物浓度以下对胚胎发育无影响。加药后胚胎停止发育, 受精后24 h大部分胚胎死亡, 受精后72 h胚胎全部死亡, 见图1f, 此浓度阻断了胚胎发育。

**2.2 鱼藤素对胚胎孵化率的影响** 受精后72 h, 对照组、0.025, 0.05, 0.1 μmol/L 鱼藤素浓度组胚胎孵化率为100%; 0.2 μmol/L 浓度组孵化率为75.5%; 0.3, 0.4 μmol/L 浓度组孵

化率为零, 胚胎全部死亡, 见图2。



综上所述, 鱼藤素在0.1 μmol/L 浓度以下对斑马鱼胚胎发育无影响, 0.2 μmol/L 浓度延缓斑马鱼胚胎发育, 0.3 μmol/L 浓度以上抑制了斑马鱼胚胎发育, 使胚胎致死。

## 3 讨论

鱼藤素是从豆科毛鱼藤植物中分离的一种黄酮类化合物, 是一种潜在的强有力的天然抗癌药物, 实验表明鱼藤素对多种进展期肿瘤有

<sup>1</sup> 华南理工大学轻工与食品学院, 广东省广州市510641; <sup>2</sup> 解放军广州军区广州总医院药剂科, 广东省广州市510010

李文浩★, 男, 1986年生, 广东省五华市人, 华南理工大学在读硕士, 主要从事抗肿瘤药物方面的研究。  
lwh288@qq.com

通讯作者: 吴新荣, 博士, 主任药师, 博士生导师, 华南理工大学轻工与食品学院, 广东省广州市510641  
gzwrong@yahoo.com.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)05-00852-03

收稿日期: 2011-09-30  
修回日期: 2011-12-16  
(20110930011/D · C)

治疗作用<sup>[1-5]</sup>。尽管鱼藤素在体内和体外试验都有抗肿瘤活性, 但作为临床用药的话也有很多潜在的副作用。长期或高剂量的使用鱼藤素处理大鼠会出现像帕金森病样的综合征<sup>[6]</sup>。因此, 鱼藤素作为一种具有很强生物活性的抗肿瘤药物, 在研究其抗肿瘤活性的同时也应考虑其所带来的副作用。现在对于鱼藤素的研究大多都是细胞层面上的研究, 在生物个体上的研究尚少。斑马鱼作为一种新型的脊椎动物模式生物, 对于筛选药物及研究药物作用机制具有很大的优势。本实验为利用斑马鱼模型研究鱼藤素的作用机制提供了基础的实验依据。

**致谢:** 感谢北京大学深圳研究生院遗传与发育实验室为本实验完成提供斑马鱼及实验器材。

#### 4 参考文献

- [1] Chun KH, Kosmeder JW 2nd, Sun S, et al. Effects of deguelin on the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(4):291-302.
- [2] Lee HY, Oh SH, Woo JK, et al. Chemopreventive effects of Deguelin, a novel Akt inhibitor, on tobacco-induced lung tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(22):1695-1699.
- [3] Westerfield M. *The zebrafish Book*. Eugene: University of Oregon Press, 1995:16-21.
- [4] Gerhauser C, Lee SK, Kosmeder JW, et al. Regulation of ornithine decarboxylase induction by deguelin, a natural product cancer chemopreventive agent. *Cancer Res.* 1997;57(16): 3429-3435.
- [5] Lee HY. Molecular mechanisms of deguelin-induced apoptosis in transformed human bronchial epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):1119-1124.

- [6] Caboni P, Sherer TB, Zhang N, et al. Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. *Chem Res Toxicol.* 2004;17(11):1540-1548.

#### 来自本文课题的更多信息一

**基金声明:** 广东省自然科学基金 (10251001002000000), 课题名称: 基于 flk-GFP 斑马鱼模型鱼藤素血管生成抑制作用机制研究。

**作者贡献:** 第一作者进行实验设计, 实施, 资料收集, 成文; 第二作者实验评估, 审校; 第一、二作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**本文创新性:** 检索 CNKI, PubMed 数据库, 检索时间 2001-01/08, 检索关键词设定为鱼藤素; 斑马鱼; 抗肿瘤; Deguelin; Zebrafish; Antitumour。检索结果表明, 国内外此类研究多为细胞层面上研究鱼藤素的抗肿瘤作用, 很少在动物模型上研究其抗肿瘤作用。本实验利用斑马鱼这一很好的动物模型研究其抗肿瘤作用, 发现了鱼藤素作用斑马鱼胚胎的浓度及其胚胎表型, 为鱼藤素在斑马鱼模型上的抗肿瘤机制及可能潜在的不良反应研究提供了实验依据。

### 《中国组织工程研究》杂志 2012 年各专题组稿重点

干细胞培养与移植      骨损伤修复的组织构建      生物材料选择及应用      数字化组织工程技术研究      软组织移植存活和免疫

干细胞研究 骨髓来源干细胞 外周血来源干细胞 脂肪来源干细胞 脐带脐血干细胞 肿瘤来源干细胞 胚胎来源干细胞 干细胞培养与分化 干细胞移植 干细胞因子及调控因子 干细胞转基因表达 干细胞与中医药 干细胞基础实验 干细胞临床应用	组织构建研究 骨及软骨组织构建 口腔组织构建 皮肤组织构建 肌肉肌腱组织构建 心肺组织构建 血管组织构建 神经组织构建 泌尿系统组织构建 组织构建实验造模 组织构建细胞学实验 组织构建与生物活性因子 组织构建与生物力学 组织构建与中医药 组织构建基础实验 组织构建临床应用	生物材料研究 组织工程骨材料 组织工程软骨材料 组织工程血管材料 组织工程神经材料 组织工程口腔材料 纳米生物材料 膜生物材料 细胞外基质材料 抗菌抗病毒材料 组织工程复合支架材料 材料生物相容性 生物材料与药物控释 材料力学及表面改性 生物材料模型构建 生物材料基础实验 生物材料临床应用	数字化骨科及骨科 植入物研究 人工假体 骨科植入物 硬组织植入物 植入物与生物力学 数字化骨科 数字化图像与影像 数字化医学 植入物实验造模 植入物基础实验 植入物临床应用	器官组织细胞移植研究 肝移植 肾移植 心肺移植 组织细胞移植 移植与免疫 移植与影像技术 移植伦理与心理 移植与人工器官 器官移植与中医药 器官移植动物模型 器官移植基础实验 器官移植临床应用
--	---	---	---	--