

孙一涵, 毛爱华, 王强. 三七总皂苷对斑马鱼胚胎初级和次级造血的抑制作用 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 148–153.
Sun YH, Mao AH, Wang Q. Panax notoginsenosides inhibit primitive and definitive hematopoiesis during the zebrafish embryonic development[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 148–153.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.004

三七总皂苷对斑马鱼胚胎初级和次级造血的抑制作用

孙一涵², 毛爱华^{1*}, 王强^{1*}

(1. 中国科学院动物研究所, 膜生物学国家重点实验室, 北京 100101; 2. 河北省安国中学, 河北 保定 071200)

【摘要】 目的 探讨三七总皂苷(Panax notoginsenosides, PNSs)对斑马鱼胚胎造血的作用, 为三七的药理学应用提供实验依据。方法 通过乙醇提取得到 PNSs, 用 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的 PNSs 从 75% 外包时期开始处理斑马鱼胚胎。收集发育至不同时期的胚胎, 检测药物处理后, 斑马鱼初级造血和次级造血的分子标记的变化。结果 PNSs 处理后, 初级造血的分子标记 *gata1*、*hbbe3* 明显下降, 生成的红细胞显著减少; PNSs 处理还可以抑制造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)发育。次级造血的分子标记 *runx1*、*cmv* 在 PNSs 处理下表达下调, 由 HSC 分化生成的 T 淋巴细胞分子标记 *rag1* 表达也显著降低。有意思的是, PNSs 对斑马鱼初级和次级造血的抑制作用均呈剂量依赖效应。结论 孕期可能需要慎重使用三七总皂苷药物。

【关键词】 三七总皂苷; 初级造血; 次级造血; 造血干细胞; 斑马鱼

【中图分类号】 Q95-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1005-4847(2019) 02-0148-06

Panax notoginsenosides inhibit primitive and definitive hematopoiesis during the zebrafish embryonic development

SUN Yihan², MAO Aihua^{1*}, WANG Qiang^{1*}

(1. State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China.
2. Hebei Anguo Middle School, Anguo, Baoding 071200)

Corresponding authors: MAO Aihua. E-mail: ahmao09@163.com; WANG Qiang. E-mail: qiangwang@ioz.ac.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of Panax notoginsenosides (PNSs) on primitive and definitive hematopoiesis of zebrafish embryos, and provide new insights into pharmacological application of PNSs. **Methods** PNSs were obtained by ethanol extraction from panax notoginseng powder. Zebrafish embryos were treated with 50 or 100 $\mu\text{g/mL}$ PNSs from the 75% epiboly stage until harvest to detect hematopoietic markers by *in situ* hybridization. **Results** Compared with the control larvae, the embryos treated with PNSs exhibited obviously reduced expression of primitive hematopoietic markers such as *gata1* and *hbbe3*. Consistently, the formation of erythrocytes was also impaired in the PNSs-treated embryos at later stages. Furthermore, PNSs treatments disrupted the definitive hematopoiesis as indicated by decreased expression of hematopoietic stem cell markers *runx1* and *cmv* and the T lymphocyte marker *rag1*. Interestingly, the inhibitory effects of PNSs on the primitive and definitive hematopoiesis were concentration-dependent. **Conclusions** Our results indicate that PNSs impair primitive and definitive hematopoiesis during zebrafish embryonic development, implying that PNSs should be used with caution during pregnancy.

【Keywords】 Panax notoginsenosides; primitive hematopoiesis; definitive hematopoiesis; hematopoietic stem

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(31571501)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31571501)。

【作者简介】孙一涵(2001—),男,高中生。此工作为作者在中国科学院动物研究所进行科学实践期间完成。Email: agzl2009@163.com

【通信作者】毛爱华(1991—),女,博士研究生,主要从事发育信号转导的研究。Email: ahmao09@163.com; 王强(1975—),男,研究员,博士生导师,主要从事发育信号转导的研究。Email: qiangwang@ioz.ac.cn * 共同通信作者

cell; zebrafish

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

造血干细胞是一群维持生命体正常生理功能所必需的多能造血祖细胞,随着发育进行,可以生成各种成熟的血细胞,包括:红细胞、髓系细胞和淋巴细胞等。造血作用指造血祖细胞经过增殖、分化最终形成成熟的血细胞过程。脊椎动物胚胎造血在进化上高度保守,斑马鱼和哺乳动物胚胎造血类似,根据造血的时间和位置以及生成细胞的特征,可分为初级造血(primitive hematopoiesis)和次级造血(definitive hematopoiesis)两个阶段^[1]。在斑马鱼胚胎中,初级造血中心大约形成于胚胎受精后 18 hpf (hours post-fertilization),位于胚胎脊索腹侧躯干区域的中间细胞团(intermediate cell mass, ICM)。斑马鱼胚胎的中间细胞团类似于哺乳动物的卵黄囊,能够产生造血干细胞、红细胞前体细胞等。这些细胞随着血液循环的开始进入循环体系,生成红细胞,为胚胎发育提供氧气和营养物质。斑马鱼次级造血过程与哺乳动物类似,其起源也与哺乳动物类似,均起始于主动脉腹侧壁,也称为主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区域,产生造血干细胞并分化为各种成熟的血细胞^[2]。因此,以斑马鱼研究造血发育以及药物筛选所获得的发现和结论,对于研究哺乳类甚至人类的造血作用都具有十分重要的借鉴作用。

三七是我国名贵中药,属于五加科人参属。三七的根茎和花均可用药,三七根中提取的有效活性成分是三七总皂苷(Panax notoginsenosides, PNSs),主要包括三七皂苷、黄酮、蛋白氨基酸及非蛋白的多糖、甾醇等成分^[3]。三七总皂苷具有良好的止血、活血化瘀、消炎止痛等功效,近年来也用作心血管疾病的药物,用于治疗冠心病、心律失常等^[4-5]。目前关于 PNSs 的药理学研究主要针对成体小鼠模型以及体外培养的细胞系^[6-8]。关于 PNSs 是否影响胚胎造血作用,目前并不清楚。因此,本文以斑马鱼胚胎为研究对象,用不同浓度的 PNSs 处理,观察是否影响斑马鱼胚胎造血发育,为三七的药理学应用和价值开发提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验所用的野生型斑马鱼(*Danio rerio*)为

Tuebingen 品系,斑马鱼胚胎用含 Holfreter 水(0.05 g/L KCl, 0.1 g/L CaCl₂, 0.2 g/L NaHCO₃, 3.5 g/L NaCl)的培养皿于 28.5℃ 恒温培养箱培养。

1.1.2 试剂与仪器

三七粉(河北康派中药材有限公司),联甲氧基苯胺(O-dianisidine),冷冻离心机,激光共聚焦显微镜。

1.2 方法

1.2.1 三七总皂苷提取

本实验采用乙醇提取法获得 PNSs,方法参考文献^[9]。准确称取 4 g 三七粉,置于 100 mL 的锥形瓶中,加入 40 mL 70%乙醇,采用热回流提取 3 次,每次 30 min。然后合并所获得的上清,蒸发浓缩至一定体积,通过冷冻离心干燥,获得 1.23 g 干粉,得率为 30.75%。用 DMSO 溶解这些粉末,配成 100 mg/mL 的母液,-20℃ 保存,备用。

1.2.2 药物浓度的确定

用 Holfreter 水稀释 PNSs 母液,设置 4 个浓度梯度,依次为 25、50、100、250 μg/mL。对照组胚胎用含 0.25% 的 DMSO 的 Holfreter 水培养。将受精后发育至 75% 外包的胚胎置于 6 孔板内,每孔放入约 40 枚胚胎,观察受精后 24 h 胚胎的发育情况,统计胚胎延迟发育和死亡率。

1.2.3 斑马鱼胚胎处理

收集受精后发育至 75% 外包的胚胎置于六孔板,按照(1.2.2)中探究好的 PNSs 浓度梯度给药处理,28.5℃ 恒温培养箱遮光培养。每隔 12 h 更换药物,然后置于培养箱继续培养。收集发育至相应时期的胚胎,用于原位杂交、O-dianisidine(联甲氧基苯胺)染色以及活体拍照等。

1.2.4 斑马鱼整胚原位杂交

整胚原位杂交中所用探针采用 Roche 公司生产的地高辛(DIG)标记,探针的合成参考说明书。原位杂交所需要的试剂及其配制方法和具体的操作步骤参考文献^[10]。

1.2.5 联甲氧基苯胺染色

联甲氧基苯胺能够特异性的标记红细胞中的血红蛋白。通过联甲氧基苯胺染色可以检测斑马鱼胚胎中血红蛋白的表达,从而验证 PNSs 在造血过程中对红细胞生成的作用。实验试剂的配制和实验方法参考文献^[11],收集发育至 48 hpf 的胚胎,

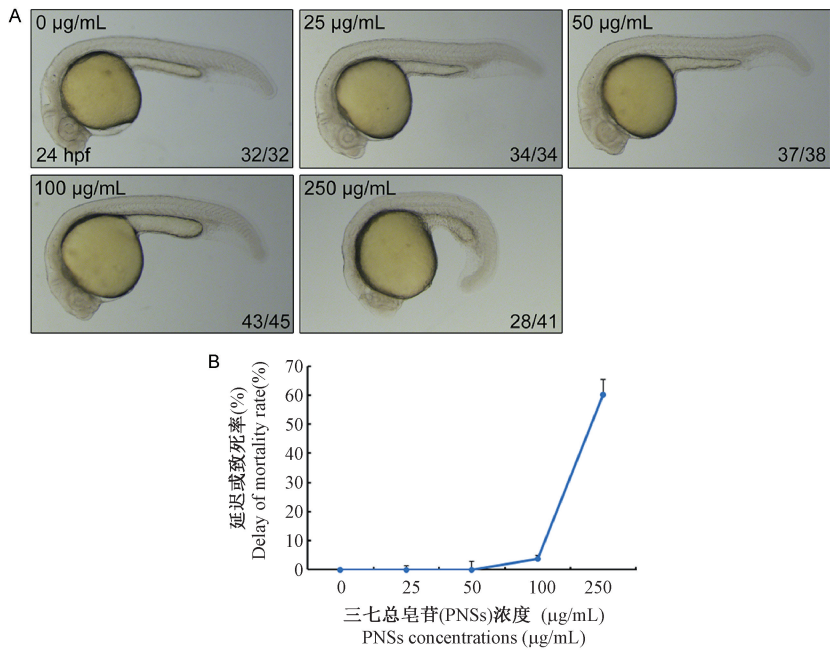
脱膜后用 Holfreter 水重复洗两次。吸去 Holfreter 水,加入联甲基苯胺染液室温下遮光染色。

2 结果

2.1 药物浓度确定

为了探索 PNSs 作用于斑马鱼胚胎的最佳实验浓度,我们进行了浓度梯度实验。收集受精后发育至 75% 外包的胚胎,分成五组,分别为 DMSO 处理的对照组和 25、50、100、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PNSs 处理

组。待胚胎发育至受精后 24 h,观察胚胎发育情况。结果如图 1A 所示,低浓度的 PNSs 处理后,对胚胎形态无明显影响;但是当浓度达到 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,大部分胚胎发育明显滞后或卵黄发黑死亡。如图 1B 所示,统计分析三次独立实验,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PNSs 处理组,胚胎几乎发育正常,而 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组,60% 以上的胚胎发育受阻或者死亡。因此后续实验主要选择 25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度梯度进行处理,研究 PNSs 对斑马鱼胚胎造血发育的影响。



注:A. 用不同浓度的 PNSs 从 75% 外包开始处理斑马鱼胚胎,观察发育至受精后 24 h 的胚胎形态;B. 统计学分析不同浓度梯度处理后斑马鱼胚胎发育延迟或者死亡率。统计数据来自三次生物学重复。

图 1 不同浓度的 PNSs 对斑马鱼胚胎发育的影响

Note. A. Zebrafish embryos were treated with different concentrations of PNSs from 75% epiboly stage, and embryo morphology was observed at 24 hpf. B. After treatment of zebrafish with different concentration of PNSs, embryonic development delay or mortality rate was statistically analyzed. All measurements were performed in triplicate.

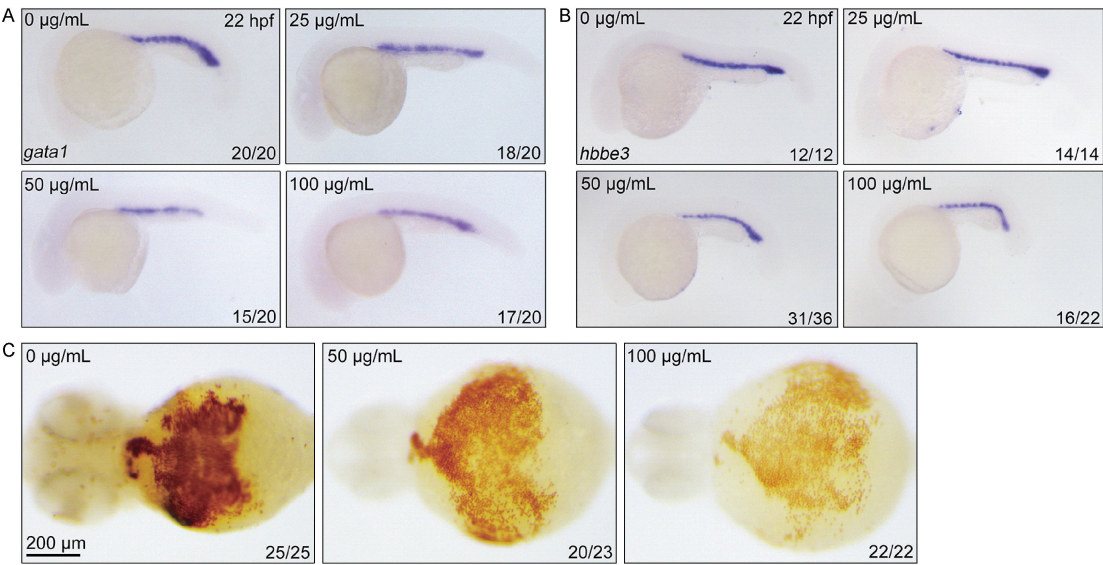
Figure 1 Effects of different concentrations of PNSs on the embryonic development of zebrafish

2.2 PNSs 处理导致造斑马鱼初级造血缺陷

通过摸索三七总皂苷浓度梯度,我们确定了以 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 PNSs 梯度处理斑马鱼胚胎,没有明显的毒副作用。因此,我们分别用 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PNSs,从 75% 外包开始处理胚胎,待其发育至受精 22 h 后,通过整胚原位杂交技术检测初级造血红细胞特异性标记基因 *gata1* 和 *hbbe3* 在 ICM 区的表达。与对照组相比,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组胚胎 *gata1* 和 *hbbe3* 的表达均略有减少,而 50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组的胚胎 *gata1* 和 *hbbe3* 的表达均明显降低(图 2A 和 2B)。这些结果说明 PNSs 处理

抑制了斑马鱼胚胎的初级造血发育。由于 50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PNSs 抑制效果比较明显,后续实验均采用这两个浓度梯度处理胚胎。

为了进一步确认 PNSs 对斑马鱼初级造血的影响,我们通过联甲基苯胺染色实验检测了受精后 48 h 的斑马鱼胚胎中红细胞的生成情况。与对照组相比,50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PNSs 处理的胚胎红细胞明显减少,且 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组的胚胎抑制效果更显著(图 2C)。这些结果证明,PNSs 对斑马鱼胚胎初级造血发育有抑制作用,而且其浓度越高,抑制作用越明显。



注:A-B. 不同浓度 PNSs 从 75% 外包开始处理胚胎,在受精后 22 h 检测初级造血的分子标记基因 *gata1* 和 *hbbe3* 的表达;
C. 联甲氧基苯胺染色检测受精后 48 h 的斑马鱼胚胎中红细胞的发育。

图 2 PNSs 抑制斑马鱼胚胎初级造血

Note. A-B. Embryos were treated with different concentrations of PNSs from 75% epiboly stage, and the expression of primitive hematopoietic marker genes *gata1* and *hbbe3* were detected at 22 hpf. C. O-Dianisidine staining was used to detect the development of erythrocytes of 48 hpf zebrafish embryos.

Figure 2 PNSs inhibited the primitive hematopoiesis of zebrafish embryos

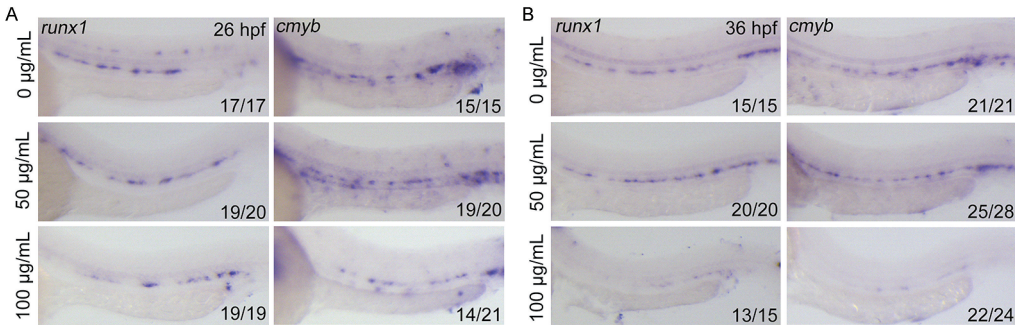
2.3 PNSs 影响造血干细胞生成

在斑马鱼胚胎受精后 24 h,位于 AGM 区域主动脉腹侧壁的生血内皮通过内皮-造血转化过程产生造血干细胞,继而起始次级造血。为了探讨 PNSs 对胚胎次级造血的影响,我们检测了造血干细胞的分子标记 *runx1* 和 *cmyb* 的表达。与对照组相比,在受精后 26 h,50 µg/mL PNSs 处理的胚胎,*runx1* 和 *cmyb* 均无明显变化,但是 100 µg/mL 处理显著抑制

runx1 和 *cmyb* 表达(图 3A),说明在造血干细胞产生初期,PNSs 就已经对次级造血产生影响。当胚胎发育至 36 hpf 时,高浓度 PNSs 的抑制作用更加明显,*runx1* 和 *cmyb* 的表达均显著下调(图 3B)。这些结果表明,PNSs 处理抑制斑马鱼胚胎次级造血。

2.4 PNSs 影响 T 细胞生成

在斑马鱼中,造血干细胞在 AGM 出现后,迁移至尾部造血组织进行增殖扩张。部分造血干细胞



注:A-B. 不同浓度 PNSs 从 75% 外包开始处理胚胎,在受精后 26 h (A) 和 36 h (B) 通过原位杂交检测斑马鱼胚胎造血干细胞的分子标记 *runx1* 和 *cmyb* 的表达。

图 3 PNSs 抑制斑马鱼的造血干细胞生成

Note. A-B. Embryos were treated with different concentrations of PNSs from 75% epiboly stage, and the expressions of molecular marker genes *runx1* and *cmyb* in zebrafish embryo hematopoietic stem cells were detected by *in situ* hybridization at 26 hpf (A) and 36 hpf (B).

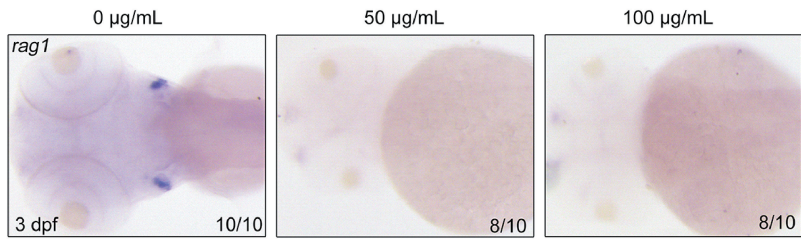
Figure 3 PNSs inhibited the zebrafish hematopoietic stem cells

迁移至胸腺后分化为 T 淋巴细胞。因此通过检测胸腺内 T 淋巴细胞的生成可以反映造血干细胞发育。我们检测了 T 淋巴细胞标记基因 *rag1* 的表达,发现处理组胚胎 *rag1* 几乎不表达(图 4)。这些结果同样证明,PNSs 对胚胎的次级造血具有较强的抑制作用。

2.5 PNSs 对胚胎血管形成没有明显影响

我们观察到 PNSs 处理后导致造血干细胞生成明显减少。由于 HSC 来源于 AGM 区主动脉腹侧壁

的内皮细胞,我们猜想造血干细胞发育缺陷可能与主动脉血管发育受阻相关。因此,接下来我们观察了特异性标记血管内皮细胞的转基因品系 *Tg(kdrl:eGFP)* 胚胎在 36 hpf AGM 区血管的发育情况。与我们的推测不同,50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ PNSs 处理的胚胎血管形成并未发生明显变化(图 5)。因此,PNSs 并不是通过影响血管的发育而间接抑制造血干细胞生成。



注:不同浓度 PNSs 处理胚胎后,原位杂交检测受精后第 3 天 T 淋巴细胞分子标记 *rag1* 的表达。

图 4 PNSs 抑制 T 淋巴细胞生成

Note. After treatment of the embryos with different concentrations of PNSs, the expression of T lymphocyte molecular marker *rag1* was detected by *in situ* hybridization at 3 dpf.

Figure 4 PNSs inhibit the T lymphocyte formation

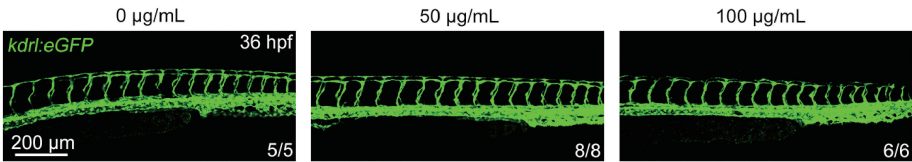


图 5 活体观察不同浓度 PNSs 处理胚胎后 36 hpf AGM 区血管结构(比例尺:200 μm)

Figure 5 Vascular structure of AGM region of the 36 hpf embryos was observed *in vivo* after treatment with different concentrations of PNSs(Scale bar=200 μm)

3 讨论

近年来,利用斑马鱼作为模式生物探讨中药的临床功能的相关研究越来越多,对中药的开发利用、中药有效成分的筛选以及中药作用机制的阐明具有巨大的促进作用^[12]。本文以斑马鱼为动物模型来研究 PNSs 对胚胎造血的影响。实验结果表明,PNSs 对斑马鱼胚胎初级造血和次级造血均有抑制作用,且这种抑制效果具有浓度依赖性。通过活体观察,我们发现 50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ PNSs 处理胚胎,整体发育并没有受到明显影响,但是红细胞的生成受到严重抑制,说明初级造血受到影响。然而,PNSs 影响初级造血的具体分子机制还需进一步探讨。

在 AGM 区检测 HSC 的分子标记 *runx1* 和

cmyb,低浓度的 PNSs 处理后并没有明显变化,但浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,次级造血在起始阶段就有缺陷,造血干细胞生成减少,而且胸腺中 HSC 分化产生的 T 淋巴细胞也受到抑制。PNSs 处理的胚胎血管发育正常,说明 PNSs 可能通过影响动脉内皮向 HSC 转化而直接调控造血干细胞生成,而不是通过影响血管发育而间接抑制次级造血。

在体外实验中,PNSs 具有生血功能,调控与造血细胞增殖、分化相关基因的表达^[13]。本研究通过用 PNSs 处理斑马鱼胚胎,发现 PNSs 对胚胎期造血发育具有抑制作用,为三七药物的合理有效使用提供了实验依据。我们的结果提示,在孕期可能需要慎重使用三七总皂苷药物。

参 考 文 献(References)

[1] Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the

- emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo [J]. Curr Top Dev Biol, 2003, 53:139-158.
- [2] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology [J]. Cell, 2008, 132(4): 631-644.
- [3] 王本祥. 现代中药药理与临床 [M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2004: 79
- Wang BX. Modern Pharmacology and Clinic of Chinese Traditional Medicine [M]. Tianjin: Tianjin Science & Technology Translation & Publishing Company, 2004: 79.
- [4] 古丽丽, 王慧敏. 三七总皂苷对血液及造血系统的药理作用研究进展 [J]. 首都医药, 2012 (10): 37-38.
- Gu LL, Wang HM. Research progress on pharmacological action of blood and hematopoietic system induced by Panax notoginsenosides [J]. Cap Med, 2012 (10): 37-38.
- [5] 郭爽, 张强, 周伟龙, 等. 三七及其制剂联合化学药物防治心血管病的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5518-5522.
- Guo S, Zhang Q, Zhou WL, et al. Research progress of *Radix Notoginseng* and its preparation combined with chemical drugs in prevention and treatment of cardiovascular diseases [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(12): 5518-5522.
- [6] 刘咏梅, 孙秀玲, 刘瑞华, 等. 三七总皂苷调控 miRNA-466b 抑制急性心梗大鼠心肌细胞凋亡的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22): 6-10.
- Liu YM, Sun XL, Liu RH, et al. Panax notoginseng regulation of miRNA-466b to inhibit cardiomyocyte apoptosis in rats with acute myocardial infarction [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2015, 21(22): 6-10.
- [7] 郑茵红, 高瑞兰, 朱大元, 等. 三七总皂苷及其单体对人骨髓造血祖细胞增殖作用的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(3): 135-137.
- Zheng YH, Gao RL, Zhu DY, et al. Proliferation of hematopoietic progenitor cells from human bone marrow induced by panax notoginsenosides [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2003, 10(3): 135-137.
- [8] 杨军, 任婷, 李学东, 等. 三七总皂促进骨折愈合作用的实验研究 [J]. 医学研究杂志, 2010, 39(6): 69-71.
- Yang J, Ren T, Li XD, et al. The experiment study of total panax notoginseng on promoting fracture healing [J]. J Med Res, 2010, 39(6): 69-71.
- [9] 吴韶, 张瑜, 杨春红, 等. 三七不同部位止血活血成分三七皂苷 Fc 的 HPLC 测定 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3289-3292.
- Wu S, Zhang Y, Yang CH, et al. HPLC determination of notoginsenoside Fc, a hemostatic and activating blood component, in different parts of *Panax notoginseng* [J]. Chin Tradit Herbal Drug, 2016, 47(18): 3289-3292.
- [10] Ning G, Liu X, Dai M, et al. MicroRNA-92a upholds Bmp signaling by targeting noggin3 during pharyngeal cartilage formation [J]. Dev Cell, 2013, 24(3): 283-295.
- [11] 李响. Mta3/NuRD 复合体在斑马鱼初级造血过程中的功能研究 [D]. 清华大学, 2010: 56-57.
- Li X. Functional analysis of Mta3/NuRD complex in zebrafish primitive hematopoiesis [D]. Tsinghua University, 2010: 56-57.
- [12] 陈磊, 刘怡. 模式生物斑马鱼在中药研究中的应用 [J]. 药学报, 2012, 47(4): 434-439.
- Chen L, Liu Y. Application of zebrafish model organism in the research of Chinese materia medica [J]. Acta Pharm Sin, 2012, 47(4): 434-439.
- [13] 高瑞兰, 徐卫红, 林筱洁, 等. 三七皂甙对造血细胞 GATA-1 和 GATA-2 转录调控蛋白的诱导作用 [J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(5): 281-284.
- Gao RL, Xu WH, Lin XJ, et al. Up-regulation of transcription factors GATA-1 and GATA-2 induced by Panax notoginsenosides in hematopoietic cells [J]. Chin J Hematol, 2004, 25(5): 281-284.

[收稿日期] 2019-01-08