

基于斑马鱼模型和网络药理学技术快速筛选 青花椒保护血管内皮损伤的主要活性成分

孙 英¹,董梦旋¹,谢永红²,韩利文^{1*},汪海洋^{1*}

¹山东第一医科大学药学院(药物研究所),济南 250000;²重庆市农科院果树研究所,重庆 402206

摘要:本研究利用斑马鱼动物模型及网络药理学技术探究青花椒保护血管内皮损伤的关键活性成分。建立斑马鱼血管内皮损伤模型探究青花椒提取物的活性;借助网络药理学蛋白互作网络方法和分子对接技术,筛选出潜在的活性成分;然后再利用斑马鱼模型,对候选关键活性成分进行血管内皮损伤的保护作用评价。斑马鱼体内实验显示,青花椒提取物能够明显促进转基因斑马鱼节间血管的直径,显示了一定的血管内皮保护作用。利用网络药理学和分子对接的方法发现青花椒4个成分(槲皮素、茵芋碱、香叶木素、香草木宁碱)与核心靶点 GAPDH 有较好的结合能力。进一步的斑马鱼整体动物实验结果显示,茵芋碱、槲皮素对血管内皮损伤具有显著的保护作用。综上,本研究首次发现了青花椒中茵芋碱、槲皮素是发挥血管内皮损伤保护作用的关键药效物质。这些研究结果为青花椒的资源开发利用、临床科学应用提供了理论依据。

关键词:青花椒;血管内皮损伤;网络药理学;分子对接;斑马鱼

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)Suppl-0113-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.S.014

Rapidly screening of key active components with protection potential on vascular endothelial injury in green prickly ash based on zebrafish model and network pharmacology

SUN Ying¹, DONG Meng-xuan¹,
XIE Yong-hong², HAN Li-wen^{1*}, WANG Hai-yang^{1*}

¹School of Pharmaceutical Sciences(Institute of Materia Medica), Shandong First Medical University, Jinan 250000, China;

²Institute of Pomology of Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 402206, China

Abstract: This study aims to investigate the key active components with protection potential on endothelial injury in green prickly ash by using a zebrafish model and network pharmacology technology. A vascular endothelial injury model was established using a transgenic zebrafish to evaluate the activity of green prickly ash extract. The potential active components were screened using network pharmacology protein-protein interaction network methods and molecular docking techniques. Then, the protective effect against vascular endothelial injury of the candidate components was evaluated by the zebrafish model again. Zebrafish experiments showed that the green prickly ash extract can significantly promote the diameter of intersegmental blood vessels in zebrafish, indicating a certain level of vascular endothelial protection. The four components (quercetin, skimmianine, diosmetin and kokusaginine) in green prickly ash were screened to have strong binding affinity with the core target GAPDH by the network pharmacology and molecular docking techniques. And the zebrafish results demonstrated that diosmetin and quercetin displayed significant protective effects against vascular endothelial injury. In summary, this study firstly identified that skimmianine and quercetin in green prickly ash are key pharmacologically active components exerting protective effects against vascular endothelial injury. These findings provide a theoretical basis for the development and utilization of green prickly ash resources and their clinical scientific applications.

Key words: green prickly ash; vascular endothelial injury; network pharmacology; molecular docking; zebrafish

血管内皮损伤(vascular endothelial injury, VEI)是血管病变的始动因素,可导致大血管、微血管及周围血管等病变,是常见缺血性心脑血管疾病的主要诱因^[1, 2]。VEI导致血管内皮功能异常,引起血管收缩、炎症反应以及血小板活化等从而导致血栓生成,同时受损的内皮细胞释放心肌内酶影响心脏的血液供应,加重心脏损伤。高糖、高脂等不健康的饮食习惯、手术并发症、机体疾病状态等都是引起VEI的潜在因素^[3]。VEI具有隐匿性、进展性、长期性特点,是许多心血管疾病的病理基础,对人类健康构成严重威胁^[4, 5]。因此,从天然药用植物中发现改善VEI的活性成分,可为VEI的干预和治疗提供新的思路^[6]。

青花椒为芸香科青椒(*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc)的干燥成熟果皮,是一种传统的天然药用植物,传统中医药理论认为其具有温中止痛、杀虫止痒的功效^[7, 8]。青花椒主要分布于四川、河南等地,品质以重庆四川等西南产区为佳^[9]。青花椒富含香豆素类化合物、黄酮化合物、多酚类化合物,具有较强的生物活性。现有研究显示,青花椒水提物和醚提物以及挥发油类具有抗血栓^[10]、减少心肌内酶消耗^[11]、缓解心脏损伤^[12]等作用。Xiao等^[13]发现青花椒籽油中的亚麻酸参与脂肪分解与新陈代谢,减少内源性胆固醇的合成,降低高血脂家兔的血脂和改善血液流变性。Wu等^[14]发现花椒提取物可以通过增加低密度脂蛋白受体的量并诱导胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)参与基因的表达来调节脂质代谢。但是青花椒抗VEI的关键活性成分仍不清楚。

相对于传统的哺乳动物模型,斑马鱼模型繁殖速度快,操作简便,显著提高药物筛选效率,加快药物研发进程,现已被应用于多种人类疾病的研究^[15, 16]。尤其是采用绿色荧光蛋白标记血管内皮的转基因斑马鱼,可以在显微镜下方便的观察内皮的生长状态以及对药物的响应^[17]。网络药理学是快速发现天然产物中潜在活性成分的新方法^[18],可方便地构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络图,进而预测发挥药效的关键成分^[19, 20]。基于此本研究以青花椒为研究对象,采用活性导向的网络药理学方法,从青花椒中发现抗VEI的关键活性成分,为血管内皮功能损伤相关疾病的防治治疗提供新的活

性物质。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

九叶青花椒采自重庆江津,由重庆农科院谢永红教授鉴定为芸香科植物青花椒(*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc)的干燥果皮。

普纳替尼(批号:M1648-04,纯度:98.91%, Ab-Mole 试剂公司);阿司匹林(批号:M5426-01,纯度:99.61%, AbMole 试剂公司);槲皮素(批号:B20527-100,纯度:98%, 上海源叶生物科技有限公司);茵芋碱(批号:PS1950-0010,纯度:98%, 成都普思生物科技股份有限公司);香叶木素(批号:B21369-20,纯度:98%, 上海源叶生物科技有限公司);香草木宁碱(批号:B37317-5,纯度:98%, 上海源叶生物科技有限公司);DMSO(批号:K1723046, 上海 Aladdin 生化科技股份有限公司)。

1.2 仪器

斑马鱼养殖系统(上海海圣生物实验设备有限公司);SZX-16型体视荧光显微镜(日本 Olympus 公司);IX83 + DP80型倒置荧光显微镜(山东第一医科大学提供);SPX-300B-G型博讯光照培养箱(上海基星生物科技有限公司);DFY-1000(摇摆式)型多功能高速中药粉碎机(温州顶历医疗器械有限公司);微型涡旋混悬仪(MINIVortex, 北京东陵昌盛生物科技有限公司);TDZ5型台式低速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);RE-2000A型旋转蒸发器(郑州科泰实验设备有限公司)。

1.3 动物

血管绿色荧光转基因斑马鱼 Tg(*fli1a*:EGFP)、野生 AB 系斑马鱼均由山东第一医科大学斑马鱼研究中心提供。相关实验严格遵循国际实验动物保护认证评估机构相关处理标准执行。

1.4 青花椒提取物斑马鱼体内实验

1.4.1 青花椒提取物的制备

用粉碎机粉碎 50 g 青花椒,通过 60 目筛筛选,放入圆底烧瓶中。按 1:10 比例加入 500 mL 纯净水。进行 4 h 的回流加热。离心后收集上清液,使用旋转蒸发器浓缩至一定体积。然后在 60 °C 下真空烘干 24 h,得到青花椒提取物,于 4 °C 保存。计算得出青花椒提取物产率为 19.32%。

1.4.2 斑马鱼胚胎的准备

成年斑马鱼在 28 °C 的养殖系统中饲养,呈 14 h

的光/10 h 的黑暗周期。每天两次喂食丰年虫。斑马鱼按雄性和雌性(2:2)放置在产卵缸中,次日开灯后 1 h 收集胚胎,用水清洗,之后被转移到养鱼水(pH 7.1~7.4、温度 26.5~28.5 °C、电导率 490~530 μ S、溶解氧质量浓度 5.0~7.5 mg/L),并放置在 28.5 °C 的光孵化器中进行后续实验。

1.4.3 青花椒提取物的斑马鱼耐受实验

选择 5 dpf(受精后天数,days post fertilization)的斑马鱼受精卵,使用青花椒提取物进行实验。设置不同质量浓度的青花椒提取物(25、50、100、200、400、800 μ g/mL)组和对照组(养鱼水)。于体式镜下观察,记录给药 18 h 后斑马鱼畸形与死亡情况,计算死亡率。

1.4.4 利用斑马鱼模型评价青花椒提取物的血管内皮保护活性

取正常孵化的 5 dpf 健康正常的斑马鱼幼鱼,在体视显微镜下尽量挑选发育情况一致的幼鱼放置于 6 孔板中,设置空白对照组(control, Con)、模型组(model, Mod)、阳性药组(aspirin, Asp)、青花椒提取物组(青花椒提取物 20、50、100 μ g/mL),每组 30 条,模型组及给药组使用 5 mg/L 的普纳替尼的进行造模。阳性药组给予 45 mg/L 的阿司匹林,青花椒给药组分别给予不同剂量的药液使其达到实验设定终浓度进行给药。每组总体积 4 mL。光照培养箱温度保持在 28 °C,培养 18 h,观察斑马鱼幼鱼活动状态。

给药结束后将斑马鱼幼鱼置 6 孔板中,加三卡因麻醉,随机挑选 10 条幼鱼,利用荧光显微镜下观察并拍照采集图像。利用 image-pro plus 6.0 图像处理软件进行图像分析,选取泄殖孔上方对应的三根血管进行测量,计算斑马鱼节间血管直径。

1.5 血管内皮功能损伤作用靶点及靶点基因的筛选

通过中药系统药理学分析平台(TCMSP 数据库:<http://www.tcmsp. php/>)检索青花椒活性成分,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) \geq 30% 及药物相似性(drug-likeness, DL) \geq 0.18 作为条件进行筛选,获得青花椒的活性成分,通过 UniPort 数据库(<http://www.uniport. org/>)收集作用靶点对应的基因名并校正,得到青花椒靶点数据库。以“Vascular endothelial injury”为关键词,通过 GeneCards 数据库(<http://www.genecards. org/>), GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), OMIM 数据库(<http://omim. org/>)等与疾病靶点相关的数据库

中进行检索及筛选,综合数据库数据并保留唯一值,获得已知的 Vascular endothelial injury 疾病相关靶点,得到疾病相关靶标库。

1.6 靶点蛋白相互作用(PPI)网络构建

将青花椒靶点数据库和疾病相关靶标库构建韦恩图,筛选出韦恩图中交集靶点作为核心靶点,导入 STRING 数据库(<http://www.string-gb.org/>)构建靶点蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。构建条件:Multiple Protein(多种蛋白质:青花椒与血管内皮功能损伤共同靶点蛋白)、Homo sapiens(人源),后将数据导入 Cytoscape3.7.2 软件分析,依据度值进行拓扑分析同时绘制 PPI 网络。

1.7 关键靶点与青花椒有效成分的分子对接验证

将青花椒潜在活性成分和 PPI 网络中度值第一的靶点进行整理筛选后,从小分子数据库 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中分别下载关键活性成分的 2D 结构 Sdf 格式文件,运用 Chem 3D 进行小分子能量最小化并将化合物另存 pdb 格式;从 RCSB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)中下载靶点蛋白的 pdb 文件。对于目标蛋白,将文件导入到 PyMOL 对蛋白进行预处理,再采用 Pyrx 软件对关键成分和关键靶点进行分子对接模拟,验证关键靶点蛋白与化学成分的结合活性,通过 PyMOL 进行可视化处理。

1.8 青花椒关键内皮保护活性成分的斑马鱼体内试验

1.8.1 青花椒活性成分的斑马鱼耐受实验

选择 5 dpf 的斑马鱼健康受精卵,分别设置不同质量浓度的活性成分处理组和对照组,处理 18 h,于体式镜下观察记录斑马鱼畸形与死亡情况,计算死亡率。

1.8.2 利用斑马鱼模型对青花椒关键血管内皮保护成分进行活性评价

实验方法同前,设置空白对照组、模型组(普纳替尼溶液 5 mg/L)、阳性药组(阿司匹林溶液 45 mg/L + 普纳替尼溶液 5 mg/L)、槲皮素组(普纳替尼溶液 5 mg/L + 槲皮素 10、20、40 μ g/mL)、茵芋碱组(普纳替尼溶液 5 mg/L + 茵芋碱 5、10、20 μ g/mL)、香叶木素组(普纳替尼溶液 5 mg/L + 香叶木素 2.5、5、10 μ g/mL)和香草木宁碱组(普纳替尼溶液 5 mg/L + 香草木宁碱 2.5、5、10 μ g/mL),给药后进行拍照并统计结果。

1.9 统计学分析

应用 SPSS 25.0 统计软件分析处理数据,应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行作图分析,计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组均数比较使用单因素方差分析,两组均数比较采用成组 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青花椒提取物在斑马鱼模型的耐受性实验结果

使用不同浓度的青花椒提取物处理斑马鱼 18 h 后,结果显示,当质量浓度达到 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,斑马鱼出现死亡,随着提取物浓度升高,死亡率逐渐增加。当小于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,斑马鱼正常存活,因此后续的实验剂量选择在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下进行(见图 1)。

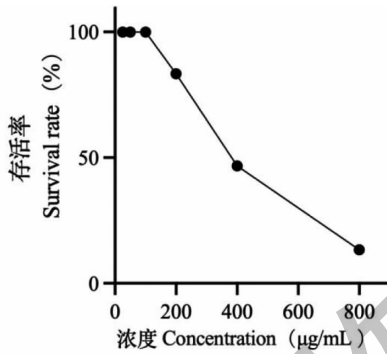


图 1 不同质量浓度青花椒提取物对斑马鱼生存率的影响

Fig. 1 Effect of green prickly ash extract at different concentrations on the survival rate of zebrafish

2.2 青花椒提取物对斑马鱼血管内皮损伤的保护作用

与空白对照组斑马鱼节间血管直径比较,模型组斑马鱼节间血管直径极显著性减小 ($P < 0.01$),表明模型建立成功(见图 2)。青花椒提取物给药组中,青花椒提取物浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的给药组较模型组血管直径没有明显改变;当青花椒剂量增加到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,斑马鱼血管直径出现明显的增加 ($P < 0.05$)。实验结果表明,青花椒提取物对斑马鱼血管内皮损伤有保护的作用,见图 3。

2.3 青花椒活性成分与作用靶点及靶点基因的筛选

通过 TCMSPP 数据库筛选和相关文献检索,得到青花椒活性成分 100 个;根据 $\text{OB} \geq 30\%$ 、 $\text{DL} \geq 0.18$ 条件筛选出 4 种有效成分:茵芋碱、香叶木素、香草木宁碱、槲皮素(见表 1)。将 4 个活性成分数据上

传到 TCMSPP、SwissTargetPrediction、Targetnet 数据库检索筛选,合并去重后得到青花椒活性成分的相关靶点 222 个,青花椒靶点数据库。

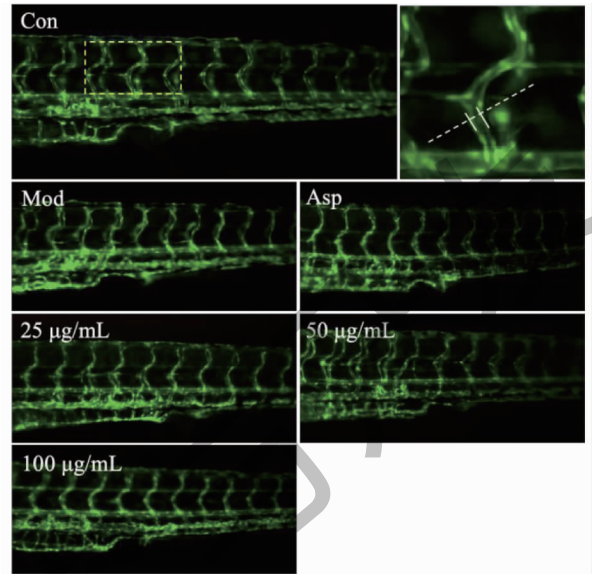


图 2 青花椒提取物对斑马鱼血管内皮保护作用

Fig. 2 Protective effects of green prickly ash extract on the vascular endothelium of zebrafish

注:左侧图中黄色虚线框标记部分为泄殖孔上方三根节间血管,血管直径定性分析部位;右侧图是黄色线框内中间血管的放大图,图中白色虚线标记位置为统一测量位置,白色实线之间距离表示血管直径。Note:The left side of the figure in the yellow dashed line box marking part of the cloaca above the three intersegmental blood vessels, blood vessel diameter qualitative analysis of the site; the right side of the figure is a magnified view of the middle blood vessels in the yellow line box. In the figure, the position marked by white dotted line is the unified measurement position, and the distance between the white solid lines indicates the blood vessel diameter.

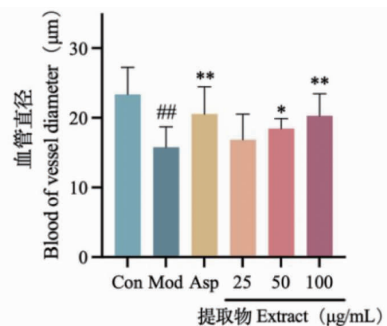


图 3 不同浓度青花椒提取物对斑马鱼节间血管直径的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of green prickly ash extract on the diameter of zebrafish intersegmental vessels

注:与对照组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。Note:Compared with Con, ## $P < 0.01$;Compared with Mod, ** $P < 0.01$.

表 1 青花椒活性成分

Table 1 Active ingredients of green prickly ash

序号 No.	MOL ID	化合物名称 Compound name	OB(%)	DL
1	MOL002663	茵芋碱 Skimmianine	40.14	0.20
2	MOL002881	香叶木素 Diosmetin	31.14	0.27
3	MOL013271	香草木宁碱 Kokusaginine	66.68	0.20
4	MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28

2.4 血管内皮功能损伤作用靶点及靶点基因的筛选

通过 GeneCards、GEO、OMIM 数据库筛选检索,合并去重后共得到血管内皮损伤疾病靶点 7 860 个,即疾病相关靶标库。将 222 个青花椒活性成分靶点和 7 559 个疾病相关靶点合并取交集,得到 191 个青花椒治疗血管内皮功能损伤的靶点,绘制韦恩图(见图 4)。

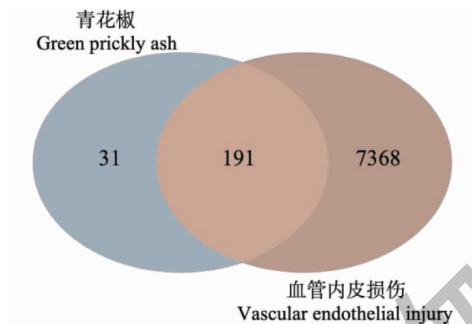


图 4 青花椒与血管内皮损伤靶点韦恩图

Fig. 4 Venn plot of targets of green prickly ash and vascular endothelial injury

2.5 靶点蛋白相互作用网络构建

蛋白互作网络 (protein-protein interaction, PPI) 是识别药物分子与作用靶点关系的中药手段。将 191 个青花椒治疗血管内皮功能损伤的靶点导入 String 数据库,利用 Cytoscape 3. 7. 0 重新构建 PPI,根据 degree 值的大小,得到关键靶点拓扑分析图(见图 5)。网络图中节点颜色越深,图形越大表明在网络中越重要。结果显示其中最关键的靶点为 GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶),为筛选青花椒内皮保护关键活性成分进行后续研究,筛选青花椒中重要的活性成分以及潜在关键靶点。

2.6 关键靶点与青花椒成分的分子对接结果

活性成分与核心靶点进行分子对接,以结合能表示小分子与靶蛋白结合的优劣,结合能小于 0 代表小分子与靶蛋白可自由结合,结合能越小结合的可能性也就越高。分子对接技术仅作为药物与靶点

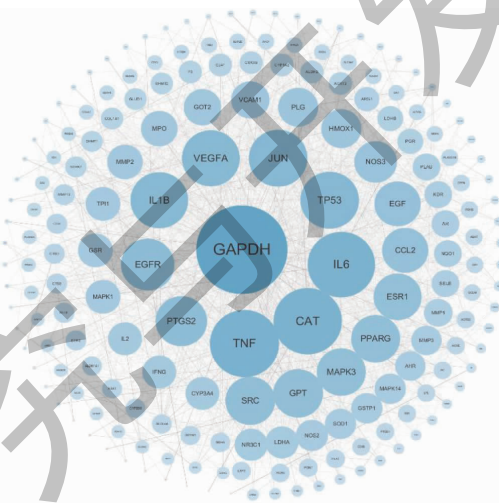


图 5 关键靶点蛋白互作网络

Fig. 5 Key target protein interaction network diagram

的结合情况的参考研究,后续将再细化深入。GAPDH 靶点与茵芋碱、香草木宁碱、香叶木素、槲皮素的结合能分别为-5.5、-5.8、-6.9、-7 kJ/mol,对接示意图见图6。结果发现,活性成分与关键靶点蛋白

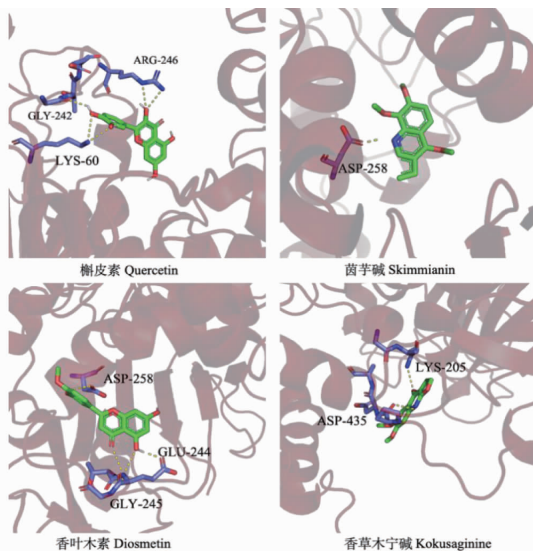


图 6 关键活性成分与 GAPDH 分子对接示意图

Fig. 6 Molecular docking pattern of active components to GAPDH

GAPDH 的结合能均 < -5.0 kJ/mol, 说明活性成分均与靶点对接稳定。

2.7 活性关键成分斑马鱼耐受实验结果

使用不同浓度的活性关键成分(茵芋碱、香草木宁碱、香叶木素、槲皮素)处理斑马鱼 18 h 后, 结果显示, 当槲皮素质量浓度达到 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 斑马鱼出现死亡; 香草木宁碱质量浓度达到 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 斑马鱼出现死亡; 香叶木素质量浓度达到 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 斑马鱼出现死亡; 茵芋碱质量浓度达到 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 斑马鱼出现死亡。且都随着关键活性成分质量浓度升高, 死亡率逐渐增加。因此分别将槲皮素、香草木宁碱、香叶木素和茵芋碱的安全剂量定为 40 、 10 、 10 和 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下(见图 7)。

2.8 活性关键成分验证结果

与空白相相比, 模型组的斑马鱼节间血管直径明显变小(见图 8)。阿司匹林组相较于模型组有显著性差异, 高浓度的茵芋碱与槲皮素给药组的斑马鱼节间血管直径明显变大, 与模型组相比, 槲皮素

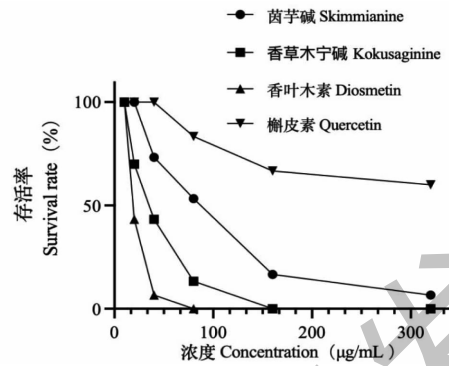


图 7 不同质量浓度活性关键成分对斑马鱼生存率的影响

Fig. 7 Effect of different mass concentrations of active key components on the survival rate of zebrafish

$10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组与茵芋碱 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 组无统计学差异。香叶木素与香草木宁碱给药组对斑马鱼节间血管直径无明显增大作用。结果表明, 槲皮素与茵芋碱对普纳替尼诱导的斑马鱼血管内皮损伤有明显的保护作用, 香叶木素与香草木宁碱并未表现出保护血管内皮的活性(见图 9)。

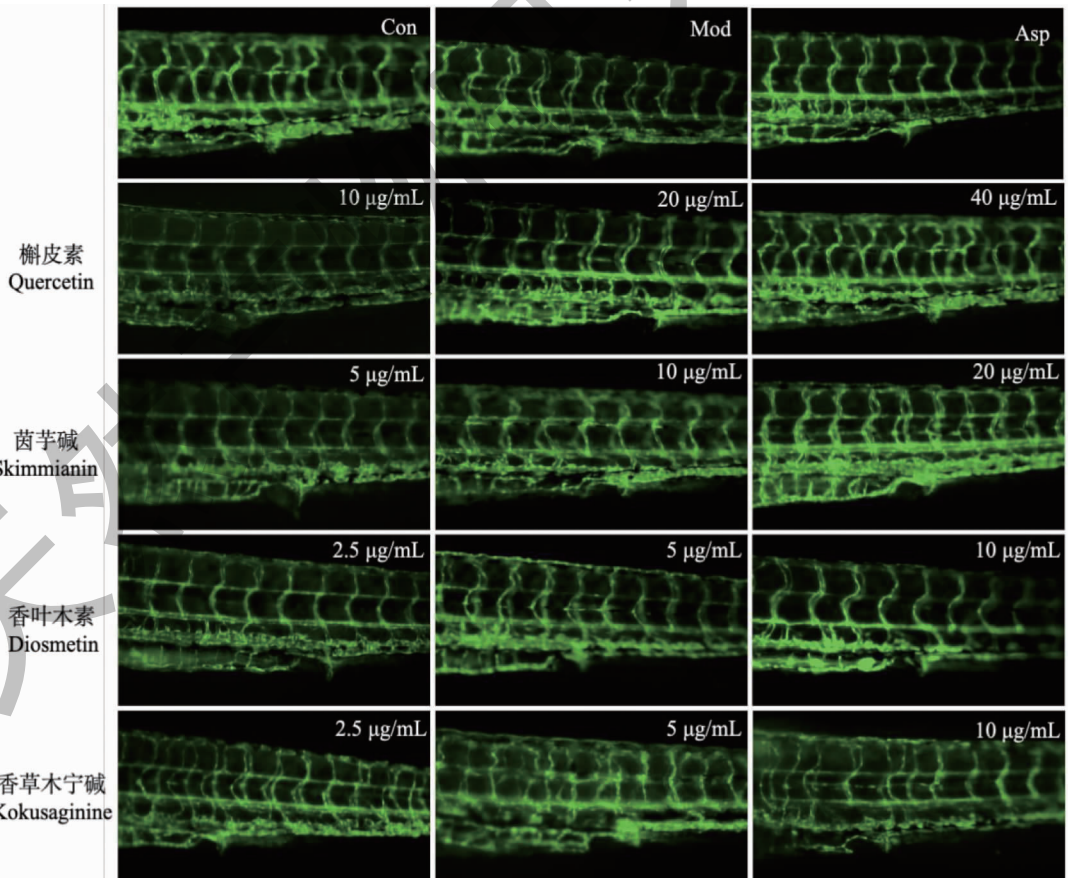


图 8 青花刺关键成分对斑马鱼血管内皮保护作用

Fig. 8 Protective effects of key components of green prickly ash on the vascular endothelium of zebrafish

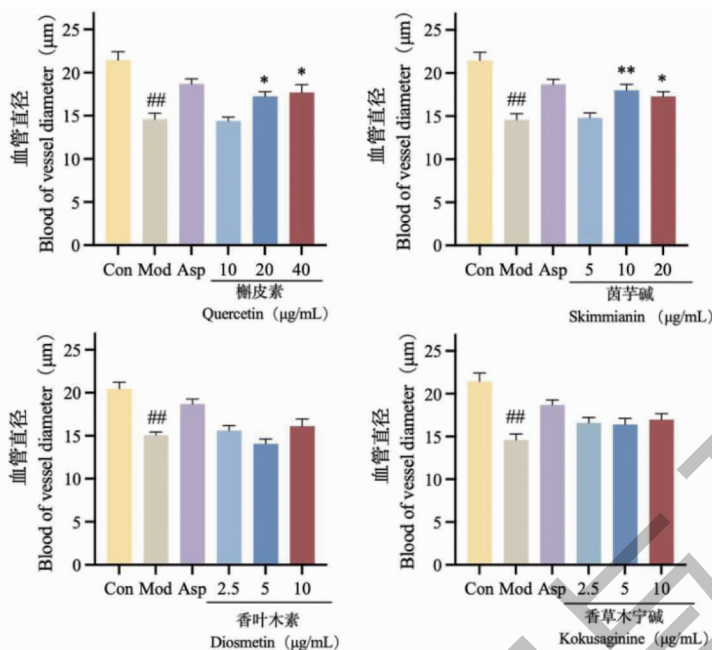


图9 不同浓度关键成分对斑马鱼节间血管直径的影响

Fig. 9 Effects of different concentrations of key components on the diameter of zebrafish intersegmental vessels

注:与对照组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note:Compared with Con,## $P < 0.01$;Compared with Mod,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

3 讨论与结论

斑马鱼的血管系统在结构上与人类相似,包括主动脉、静脉、毛细血管等,许多与血管内皮功能相关的基因在斑马鱼和人类中都具有高度的同源性^[21, 22]。血管相关活性也是斑马鱼模型最早开展的药物研究领域^[23, 24]。血管内皮在维持血管结构的完整性、调节血管功能、参与炎症和凝血过程中具有关键作用,是维持整个血管系统正常功能的重要组成部分^[25]。斑马鱼具有快速的生殖周期且胚胎透明易于观察血管,可以实现快速筛选天然成分^[26]。本研究利用普纳替尼诱导的斑马鱼模型也发现青花椒提取物具有较好的保护血管内皮的活性。

已有研究显示花椒的水提物和醚提物表现出对心血管系统的积极影响,主要体现在抗主动脉粥样硬化的形成、降低血脂水平以及抗血栓等方面^[27]。花椒挥发油通过减缓脂质过氧化损伤和降低血清过氧化脂质水平的途径发挥其抗主动脉粥样硬化的作用^[28]。然而目前人们对青花椒中保护血管内皮损伤的活性成分了解还十分有限。本研究发现茵芋碱、槲皮素具有显著的血管内皮保护活性,其中茵芋碱是首次发现具有在修护血管内皮损伤的活性,这为后续深入研究提供了重要基础。

青花椒中成分复杂,本研究使用网络药理学和分子对接能够对成分进行快速筛选,但是虚拟筛选技术在二维水平上容易产生假阳性的配体-蛋白结合,导致筛选结果出现偏差,降低了有效筛选关键活性成分的准确性^[18, 29]。本研究中采用虚拟筛选技术与斑马鱼体内试验相结合形成了活性导向的网络药理学技术,大大提高了关键有效成分发现的准确性。

综上所述,本研究利用活性导向的网络药理学方法,从天然产物青花椒中发现了新的关键的抗VI活性物质,为进一步揭示青花椒药效物质基础、拓展青花椒的药用用途以及为VEI相关疾病的防治提供新的活性物质。

参考文献

- 1 Wang DY, Wang JK. The relationship between endothelial microparticles and cardiovascular disease [J]. Adv Cardiovasc Dis (心血管病学进展), 2018, 39: 855-858.
- 2 Liao KB, Li CS. Effect of hyperglycemia on mechanism of vascular endothelial cell injury [J]. Med Recapit (医学综述), 2019, 25: 2128-2132.
- 3 Schiffrin LE. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury [J]. Clin Sci, 2014, 126: 267.
- 4 Su EY, Gao CY. Relationship between endothelial dysfunction and hypertension [J]. J Hypertens, 2014, 32: 100-105.

- tion and cardiovascular diseases[J]. J Chin Pract Diagn Ther (中华实用诊断与治疗杂志), 2018, 32: 622-624.
- 5 Monteiro JP, Bennett M, Rodor J, et al. Endothelial function and dysfunction in the cardiovascular system: the long non-coding road[J]. Cardiovasc Res, 2019, 115: 1692-1704.
- 6 Sarah V, Omia BT, Cristina SV. Letter to the editor regarding: "resveratrol and endothelial function: A literature review" [J]. Pharmacol Res, 2021, 172: 105799.
- 7 Yao J, Pu B. Research progress on *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc [J]. China Condiment (中国调味品), 2010, 35: 35.
- 8 Yang QR, Pan ZM, Sun C, et al. Analysis on regularities of syndrome differentiation and prescription in treatment of polycystic ovary syndrome with Chinese medicinals [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med (山东中医杂志), 2022, 41: 1251-1263.
- 9 Zhou MJ, Shi FF, Chen K, et al. Research progress of the medicinal value of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim [J]. Farm Prod Proc (农产品加工), 2020, 1: 65-72.
- 10 Xi SY, Guo YX, Ma XH, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Zanthoxylum* [J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志), 2021, 36: 717-722.
- 11 Shi XP, Zhang WM, Zhang MD, et al. Analgesic, anti-inflammatory and antipruritic effects of *Zanthoxylum* alkaloids [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2011, 30: 46-49.
- 12 Wu RR, Tian SY, Chen Y, et al. Studies on chemical constituents and bioactivities of alkaloids from *Zanthoxylum schinifolium* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 1305-1309.
- 13 Xiao HM, He Y, Wang SW, et al. Component analysis of semen oil of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim and its effect on hyperlipidemic rabbits' model [J]. Prog Mod Biomed (现代生物医学进展), 2011, 11: 1454-1457.
- 14 Wu T, Zhong L, Hong Z, et al. The effects of *Zanthoxylum bungeanum* extract on lipid metabolism induced by sterols [J]. J Pharmacol Sci, 2015, 127: 251-259.
- 15 Sargent S, Brennan A, Clark J. Regenerative potential and limitations in a zebrafish model of hyperglycemia-induced nerve degeneration [J]. Dev Dyn, 2023, 252: 742-760.
- 16 Mrinalini R, Tamilanban T, Kumar VN, et al. Zebrafish-the neurobehavioural model in trend [J]. Neuroscience, 2022, 520: 95-118.
- 17 Song YQ, Lu ZX, Yu J, et al. Crucial proangiogenic components in *Salvia miltiorrhiza* based on zebrafish model and molecular docking technique [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 3394-3401.
- 18 Ma ZH, Dong R, Zhao HX, et al. Exploring the anti-hypoxic effects and potential targets of American ginseng based on zebrafish model and dynamic molecular docking techniques [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2023, 35: 592-601.
- 19 Chandran U, Mehendale N, Tillu G, et al. Network pharmacology: an emerging technique for natural product drug discovery and scientific research on ayurveda [J]. Proc Indian Nation Sci Acad, 2015, 81: 8.
- 20 Wu JS, Zhang FQ, Li ZZ, et al. Integration strategy of network pharmacology in traditional Chinese medicine: a narrative review [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 42: 479-486.
- 21 Gore AV, Pillay LM, Galanternik MV, et al. The zebrafish: a fantastic model for hematopoietic development and disease [J]. Wires Dev Biol, 2018, 7: e312.
- 22 Santos RJG, Carla L, Monica L. Zebrafish larvae behavior models as a tool for drug screenings and pre-clinical trials: a review [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 6647-6647.
- 23 Umans RA, Henson HE, Parupalli C, et al. Abstract IA19: modeling blood-CNS barriers in zebrafish [J]. Cancer Res, 2015, 75: IA19-IA19.
- 24 Webb AM, Francis CR, Judson RJ, et al. EHD2 modulates Dll4 endocytosis during blood vessel development [J]. Microcirculation, 2021, 29: e12740.
- 25 Sun JM, Chen XX. Changes and relationship of miRNA-29b and VEGF in preeclampsia [J]. Acad J Chin PLA Med School (解放军医学院学报), 2019, 40: 1074-1078.
- 26 Jin YH, Wei LX, Jiang QY, et al. Comparison of efficacy and toxicity of bevacizumab, endostar and apatinib in transgenic and human lung cancer xenograft zebrafish model [J]. Sci Rep, 2018, 8: 15837.
- 27 Qu CY, Wang LN, Zhang X, et al. Research progress on chemical components and pharmacological activities of *Zanthoxylum avicennae* (Lam. DC.) [J]. Chem Reag (化学试剂): 1-8 [2024-06-11]. <https://doi.org/10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0011>.
- 28 Ma JY, Shi YK, Fang DZ. Antiatherogenic effect of Huajiao volatile oil on experimental atherosclerosis in guinea pigs [J]. J Sichuan Univ (四川大学学报), 2005, 36: 696-699.
- 29 Wang HY, Sun Y, Xie YH, et al. Identification of key anti-inflammatory components of green prickly ash fruit based on zebrafish model and activity tracking strategy [J]. J Funct Foods, 2023, 107: 105656.