

· 毒理 ·

## 去水卫矛醇应用于斑马鱼胚胎的安全性评价

彭晓丽<sup>1</sup>, 刘华钢<sup>2\*</sup>, 苏桂玉<sup>1</sup>, 徐红娟<sup>1</sup>, 王小洁<sup>2</sup>, 周莹<sup>2</sup>, 梁乔芳<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001; 2. 广西医科大学药学院, 南宁 530021)

**[摘要]** 目的: 利用斑马鱼胚胎评价抗肿瘤药物去水卫矛醇(DAG)的安全性。方法: 以受精后6 h(6 hpf)发育正常的斑马鱼胚胎作为实验对象, 分别暴露于A、B两个不同实验组的DAG溶液中, A组: 98.00, 110.00, 125.00, 141.00, 160.00 mg·L<sup>-1</sup>的低质量浓度剂量组, B组: 661.00, 871.00, 1 148.00, 1 514.00, 1 995.00 mg·L<sup>-1</sup>的高质量浓度剂量组, 两组均设空白组, 每隔24 h更换一次DAG溶液。观察药物处理至不同时间点时斑马鱼胚胎的发育情况, 计算半数致死浓度(LC<sub>50</sub>), 半数致畸效应浓度(EC<sub>50</sub>), 治疗指数(TI)和安全指数(SI)。结果: B组斑马鱼胚胎在48 hpf时心率随着DAG浓度增大而下降, 48, 72, 96 hpf孵化率随着观察时间点不同呈现不同趋势, 与空白组比较有统计学差异(P < 0.01)。斑马鱼胚胎的畸形率和死亡率均随着给药浓度增大和给药时间的延长而增加(P < 0.01)。72 hpf的LC<sub>50</sub>为1 851.33 mg·L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub>为184.50 mg·L<sup>-1</sup>, TI为10.03 mg·L<sup>-1</sup>, SI为1.59 mg·L<sup>-1</sup>; 96 hpf的LC<sub>50</sub>为1 071.96 mg·L<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub>为74.76 mg·L<sup>-1</sup>, TI为14.34 mg·L<sup>-1</sup>, SI为2.94 mg·L<sup>-1</sup>; 6 dpf的LC<sub>50</sub>为133.12 mg·L<sup>-1</sup>。结论: DAG的浓度与斑马鱼胚胎发育的毒性存在量效关系; DAG作用时间长短与斑马鱼胚胎发育毒性也存在明显的剂量效应。DAG安全性评价指数相对较高。

**[关键词]** 去水卫矛醇; 斑马鱼胚胎; 毒性; 安全性评价

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0134-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060134

## Safety Evaluation of Dianhydrogalactitol to Zebrafish Embryos

PENG Xiao-li<sup>1</sup>, LIU Hua-gang<sup>2\*</sup>, SU Gui-yu<sup>1</sup>, XU Hong-juan<sup>1</sup>,  
WANG Xiao-jie<sup>2</sup>, ZHOU Ying<sup>2</sup>, LIANG Qiao-fang<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacology, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;  
2. College of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the safety of dianhydrogalactitol (DAG) in zebrafish embryos. **Method:** The 6 hours post fertilization (hpf), normally developed zebrafish embryos were exposed to DAG solution in two different experimental groups (A and B). Group A was a low-dose concentration group: 98.00, 110.00, 125.00, 141.00, 160.00 mg·L<sup>-1</sup>, while group B was a high-dose concentration group: 661.00, 871.00, 1 148.00, 1 514.00, and 1 995.00 mg·L<sup>-1</sup>. The corresponding blank controls were set for both groups. The DAG solution was refreshed every 24 h. Microscope was used to observe embryos development at different treating periods. Finally, the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>), median effect concentration (EC<sub>50</sub>), therapeutic index (TI) and safety index (SI) were calculated. **Result:** Zebrafish heart rate of group B at 48 hpf was decreased with the increase of concentration of DAG solution. In addition, 48, 72, 96 hpf hatchabilities showed different trends at different observation time points (48, 72, 96 hpf). Difference was statistically significant compared with controls in both groups (P < 0.01). Deformity rate and mortality rate of zebrafish embryos were increased with the increasing

**[收稿日期]** 20150831(021)

**[基金项目]** 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 12237007)

**[第一作者]** 彭晓丽, 硕士, 从事中药新制剂、新剂型研究, Tel: 15676723309, E-mail: pengxiaoli87@qq.com

**[通讯作者]** \*刘华钢, 博士, 教授, 从事中药新剂型、新制剂及药理毒理学研究, Tel: 13907862166, E-mail: hgliu@263.net

concentration of DAG solution and extended medication time ( $P < 0.01$ ). The  $LC_{50}$  was  $1\ 851.33\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $EC_{50}$  of  $184.50\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , TI of  $10.03\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and SI of  $1.59\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at 72 hpf.  $LC_{50}$  at 96 hpf was  $1\ 071.96\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $EC_{50}$  of  $74.76\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , TI of  $14.34\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and SI of  $2.94\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .  $LC_{50}$  at 6 dpf was  $133.12\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Conclusion:** There is a significant dose-dependent relationship between the concentration of DAG solution and the toxicity in zebrafish embryos development. There is also a significant dose-dependent relationship between the exposure time and the toxicity. In conclusion DAG's safety evaluation index is relatively high.

[**Key words**] dianhydrogalactitol; zebrafish embryos; toxicity; safety assessment

去水卫矛醇(DAG),国内最早是广西中医药研究所从当地生长的密花美登木 *Maytenus confertiflorus* 中分离得卫矛醇,并以此为原料经脂化和离子交换而制成的抗癌药物<sup>[1]</sup>。关于 DAG 的早期报道多集中于慢性粒细胞性白血病的治疗,早在 30 年前临床就开始将 DAG 用于慢性粒细胞性白血病的治疗并取得较好的效果<sup>[2]</sup>,且临床显示 DAG 治疗慢性粒细胞性白血病时毒性较低,除了骨髓粒细胞减少外,未见其他器官损伤<sup>[3]</sup>。除了对慢性粒细胞性白血病有较好疗效外,国内研究者樊亦军等<sup>[4]</sup>发现 DAG 对实体瘤(W256, S180, S37, U14),肝癌(HepS, HepA)及腹水型 S180 等均有效。张慧玲等<sup>[5]</sup>用 DAG 对胃癌细胞 SGC-7901,鼻咽癌细胞 CNE,肝癌细胞 BEL-7404 及肺癌细胞 H460 进行体外抑制,结果表明 DAG 对胃癌、鼻咽癌、肝癌和肺癌具有潜在的治疗价值。此外, DAG 在脑肿瘤方面的作用也早有报道<sup>[6-7]</sup>,有研究发现,使用 DAG 和射线结合对多形性成胶质细胞瘤患者治疗效果明显,且 DAG 能够增加癌细胞对放疗的敏感性<sup>[8]</sup>。近年来随着各种肿瘤的多发,本课题组在 DAG 抗人脑胶质瘤方面开始进行更加深入的研究。但抗肿瘤药物多数存在非特异性,在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常细胞也有杀伤作用,因此在讨论药效的同时,药物的毒性也应该同时被考虑,以寻求既有效又低毒的安全剂量范围。而文献对 DAG 的相关毒性报道较少,且所得资料年代久远,后期跟踪监测报道未见详尽。为了探讨 DAG 用于除了慢性粒细胞性白血病外的其他肿瘤治疗的毒副作用高低以及潜在的毒性效应,需要进一步对 DAG 进行安全性评价。

近年来,斑马鱼(zebrafish)成为继人和小鼠之后的第 3 种模式生物,利用其胚胎进行毒性实验作为经济合作与发展组织(OECD)推荐的测定药品毒性的标准方法,被广泛应用于化学品的毒性测定研究中<sup>[9-10]</sup>。斑马鱼胚胎有其天然的利用优势,其胚胎体积小,能够像细胞一样利用孔板进行操作,其对药物毒性敏感,能够高通量进行实验;除此之外,斑

马鱼作为一个整体生物,拥有一套完整的吸收、分布、代谢、排泄生物学过程,其基因与人类基因的同源性高达 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<sup>[11]</sup>。斑马鱼模型已被广泛应用于包括一般毒性评价、发育毒性评价、神经毒性评价、靶器官毒性评价、生殖毒性评价和局部毒性评价等在内的一系列药物毒性和安全性评价当中<sup>[12]</sup>,据报道,利用斑马鱼胚胎检测非致畸化合物的成功率可达 75%,检测致畸化合物的成功率更是高达 100%<sup>[13]</sup>。因此,本实验利用斑马鱼胚胎对 DAG 进行毒性实验,重新评价药物安全性,以观察 DAG 的潜在毒性,对临床合理应用 DAG 提供新的理论参考。

## 1 材料

**1.1 动物** 德国 Tübingen 品系斑马鱼,由北京大学提供,于广西医科大学斑马鱼实验室养殖,养殖方法与条件参考文献[14]中所述方法。

**1.2 药物与试剂** 去水卫矛醇[广西梧州制药(集团)股份有限公司,批号 20150204]; NaCl, KCl, 无水  $\text{CaCl}_2$ , 无水  $\text{NaHCO}_3$  (天津博迪化工股份有限公司,批号分别为 20150101, 20140801, 20150201, 20150201)。

**1.3 仪器** HS-ZS 型五层单排独立养殖系统(上海海圣水生物实验设备有限公司), OPT-11-20T 型超纯水机(优普公司), HP250HS 型恒温恒湿培养箱(武汉瑞华仪器设备有限公司), XTZ-D 型体式显微镜(上海光学仪器五厂), CX31-DP73 型正置显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司]。

## 2 方法

**2.1 胚胎收集** 实验前 1 天喂食结束后,将雌雄成年斑马鱼按 1:1 数量放入底部带有隔离筛板的产卵缸中,并用垂直隔板将雌雄斑马鱼分开,次日清晨将隔板抽开,雄鱼追逐雌鱼约 30 min 后完成交配产卵,用密度高的筛网收集胚胎。新收集的胚胎放置于新的培养皿中,除去未受精卵、粪便、死胎等杂物,放入 28 °C 的生化培养箱中培养至受精后 6 h

(6 hpf)。挑选正常发育的胚胎进行毒性实验,为排除胚胎间个体差异影响,每次实验尽量使用同对斑马鱼所产胚胎。

## 2.2 试剂配制

**2.2.1 溶液配制** 称取 NaCl 35.0 g, KCl 0.5 g, 无水 CaCl<sub>2</sub> 1.0 g, 用双蒸水溶解定容至 1 L, 配成 10 × Holt Buffer 储备液。用时取储备液 100 mL, 加双蒸水定容至 1 L, 加 NaHCO<sub>3</sub> 0.025 g, 调节 pH 7.0 ~ 7.2, 配成 1 × Holt Buffer 工作液, 用于胚胎孵化。

**2.2.2 药物配制** DAG 极易溶于水, 将其先用 Holt Buffer 工作液溶解, 配制成 10 g·L<sup>-1</sup> 的 DAG 母液; 根据预实验结果, 按照等对数浓度, 将 DAG 母液稀释成 2 个实验组, 低剂量 (A) 组: 0.098, 0.110, 0.125, 0.141, 0.160 g·L<sup>-1</sup>; 高剂量 (B) 组: 0.661, 0.871, 1.148, 1.514, 1.995 g·L<sup>-1</sup>, 每个剂量组设空白组。

**2.3 给药方法** 选用 12 孔板, 每孔分别放入 24 枚挑选好的胚胎和药液 2.5 mL, 每个浓度设置 3 组平行, 将给药后的斑马鱼置于生化培养箱中 28 °C 恒温暴露染毒孵育, 每 24 h 更换 1 次药液, 并及时将实验过程中的死亡胚胎挑出, 防止对其他胚胎产生影响。

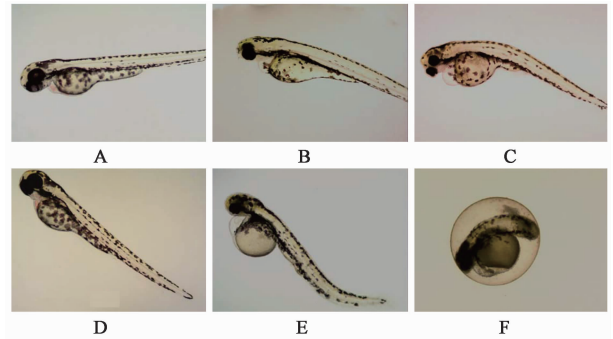
**2.4 观察指标** 显微镜下观察斑马鱼不同发育阶段胚胎形态变化, 记录各种发育情况; 分别观察不同浓度给药组斑马鱼在 72 hpf, 96 hpf, 6 dpf 不同时间终点的畸形情况、死亡情况、统计畸形率、死亡率。计算不同观察时间点的半数致死浓度 (LC<sub>50</sub>), 半数致畸效应浓度 (EC<sub>50</sub>), 结合药物安全指标, 治疗指数 (TI) = LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>, 安全指数 (SI) = LC<sub>1</sub>/EC<sub>99</sub>, 对该药物的安全性进行分析, TI 及 SI 越大, 表示药物越安全。

**2.5 统计学方法** 数据采用 SPSS 17.0 软件处理分析, 采用单因素方差分析组间差异, 用多重比较 LSD-*t* 检验分析各组之间差异, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。实验结果趋势图采用 Origin Pro 9 软件进行绘制。

## 3 结果

**3.1 DAG 对斑马鱼胚胎发育的影响** 正常情况下, 斑马鱼胚胎从 48 hpf 开始孵化, 72 hpf 大部分胚胎孵化出膜, 到 96 hpf 基本孵化完成<sup>[15]</sup>。经 DAG 处理后, A 组在 24, 48 hpf 时胚胎自主抽动频率和心率与空白组比较没有明显差别。72, 96 hpf 内, A 组孵化率与空白组均在规定时间内孵化出膜, 但各浓度组出现不同程度的畸形情况, 相同时间点下畸形

情况随着剂量加大而严重; 相同浓度下畸形情况随着作用时间延长而严重; 畸形主要表现为心包水肿并伴有细胞沉积, 心区血红细胞减少, 尾部和脊椎弯曲, 卵黄突出吸收不良, 头部和眼部发育不良。见图 1。以无心跳, 不孵化, 无自主运动等致死性观察指标作为判断终点<sup>[16]</sup>, 显示 96 hpf 时各组仍未出现死亡情况, 至 6 dpf 时死亡率出现剂量依赖性增加。



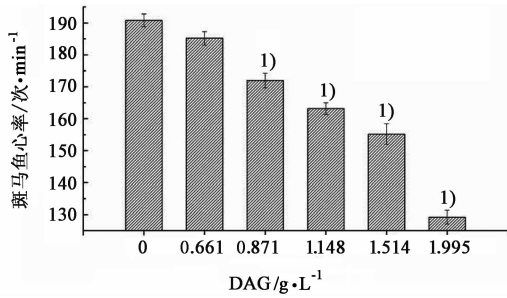
A ~ C. 空白组, 0.098 g·L<sup>-1</sup> 组, 0.16 g·L<sup>-1</sup> 组; D ~ F. 空白组, 0.661 g·L<sup>-1</sup> 组, 1.995 g·L<sup>-1</sup> 组

图 1 DAG 对斑马鱼胚胎 72 hpf 形态发育的影响 (DAG 处理, × 20)

Fig. 1 Effect of DAG on morphological development of zebrafish embryos at 72 hpf (DAG treatment, × 20)

B 组 24 hpf 时给药组胚胎自主抽动频率与空白组比较没有明显差别。48 hpf 时, 各质量浓度组斑马鱼心率随着浓度增加而下降, 除了 0.661 g·L<sup>-1</sup> 组外, 其余各浓度组心率均比空白组显著降低 (*P* < 0.01), 见图 2。给药后的斑马鱼胚胎在 48 hpf 时出膜时间比空白组早, 且中间浓度出膜数更多, 呈钟型趋势, 而 72, 96 hpf 孵化率随着浓度增大而有所降低, 见图 3。高剂量组均全部出现严重畸形, 见图 1。畸形表现比低剂量组严重, 还出现中高浓度组出膜后斑马鱼刻板式转圈现象。随着给药时间延长和给药浓度的加大, 死亡率呈梯度增加, 且比低剂量组严重。

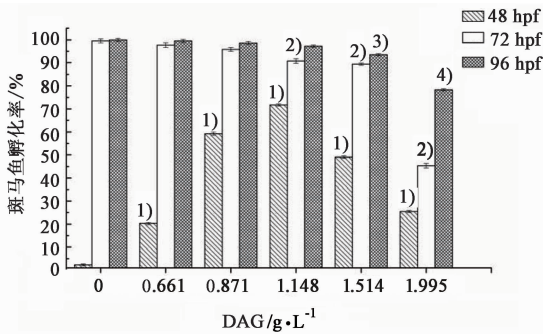
**3.2 DAG 对不同斑马鱼胚胎畸形率和死亡率的影响** 根据畸形率 = (畸形数 + 死亡数) / 总个体数 × 100%, 死亡率 = 死亡数 / 总个体数 × 100%。相同发育时间点, 斑马鱼胚胎畸形率和死亡率随着给药浓度的增加而上升。72 hpf 时, A 组浓度内斑马鱼畸形率随着给药浓度增加而升高, 与空白组相比差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。到 B 组随着给药浓度继续加大, 各浓度畸形率上升至 100.00%。在 A 组浓度范围内未出现死亡情况, 随着浓度加大, 到 B 组范围, 开始出现死亡情况, 与空白组相比差异有统计



与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$

图 2 DAG 对斑马鱼胚胎 48 hpf 心率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Effect of DAG on heart rate of zebrafish embryos at 48 hpf ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )



与 48 hpf 空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 72 hpf 空白组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 96 hpf 空白组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$

图 3 DAG 对斑马鱼胚胎 48, 72, 96 hpf 孵化率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 3 Effect of DAG on hatching rate of zebrafish embryos at 48, 72, 96 hpf ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

表 1 DAG 对不同时间段斑马鱼胚胎畸形率和死亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of DAG on deformity rate and mortality rate of zebrafish embryos in different periods ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	给药浓度 /g·L <sup>-1</sup>	畸形率			死亡率		
		72 hpf	96 hpf	6 dpf	72 hpf	96 hpf	6 dpf
A	0	-	-	-	-	-	-
	0.098	4.63 ± 1.22	81.02 ± 3.79 <sup>2)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>2)</sup>	-	-	0.93 ± 0.46
	0.110	6.94 ± 0.80 <sup>1)</sup>	89.82 ± 1.23 <sup>2)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>2)</sup>	-	-	4.16 ± 0.81 <sup>1)</sup>
	0.125	11.11 ± 1.39 <sup>2)</sup>	95.37 ± 2.12 <sup>2)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>2)</sup>	-	-	20.83 ± 0.58 <sup>1)</sup>
	0.141	21.30 ± 2.02 <sup>2)</sup>	97.68 ± 0.80 <sup>2)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>2)</sup>	-	-	71.29 ± 1.23 <sup>1)</sup>
	0.160	36.11 ± 1.61 <sup>2)</sup>	99.54 ± 0.80 <sup>2)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>2)</sup>	-	-	98.61 ± 0.80 <sup>1)</sup>
B	0	-	-	-	-	-	-
	0.661	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	1.39 ± 0.00	18.51 ± 0.45 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>
	0.871	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	6.94 ± 0.00 <sup>2)</sup>	21.82 ± 0.38 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>
	1.148	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	11.11 ± 0.80 <sup>3)</sup>	46.49 ± 1.41 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>
	1.514	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	25.92 ± 0.76 <sup>3)</sup>	83.64 ± 1.28 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>
	1.995	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>	62.50 ± 2.41 <sup>3)</sup>	99.53 ± 0.47 <sup>3)</sup>	100.00 ± 0.00 <sup>3)</sup>

注:与 A 组空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 B 组空白组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

学意义 ( $P < 0.05$ )。96 hpf 时间点时,斑马鱼胚胎畸形和死亡情况趋势与 72 hpf 一致,但比 72 hpf 更严重。6 dpf 时间点时,A 组浓度范围内胚胎畸形率为 100.00%,死亡率随着浓度加大而增加,与空白组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );B 组浓度范围内胚胎畸形率和死亡率均为 100.00%。见表 1。

相同 DAG 给药浓度,斑马鱼胚胎畸形率和死亡率随着给药时间的延长而上升。A, B 组空白组各发育时间点无死亡,A 组各浓度组畸形率随时间增加而逐渐上升;B 组各浓度组死亡率随时间增加而逐渐上升。见表 1。

3.3 DAG 安全性评价 指标参数评价 72 hpf LC<sub>50</sub> 为 1 851.33 mg·L<sup>-1</sup>, 96 hpf LC<sub>50</sub> 为 1 071.96 mg·L<sup>-1</sup>, 6 dpf LC<sub>50</sub> 为 133.12 mg·L<sup>-1</sup>; 72 hpf EC<sub>50</sub> 为 184.50 mg·L<sup>-1</sup>, 96 hpf EC<sub>50</sub> 为 74.76 mg·L<sup>-1</sup>。根据药物安全性评价,随着给药时间的延长和给药浓度的增大, TI, SI 增大,与同等条件下的其他药物 IT, SI 比较,说明 DAG 安全性较高。见表 2, 3。

#### 4 讨论

DAG 是目前临床上治疗慢性粒细胞性白血病的有效抗肿瘤药物,据临床用于白血病治疗的监测发现,最大的不良反应为骨髓抑制<sup>[17-20]</sup>,在治疗剂量下没有发现肾、肝、中枢神经系统、心脏、肺的毒性毒性反应报道<sup>[17]</sup>。现为了考察 DAG 治疗除了慢性

表 2 DAG 对不同暴露时间斑马鱼胚胎的  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  和 95% 置信区间 (CI) 的影响

Table 2 Effect of DAG on  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  and 95% confidence interval for zebrafish embryos at different exposure time

序号	时间	$LC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	95% CI ( $LC_{50}$ )	$EC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	95% CI ( $EC_{50}$ )
1	72 hpf	1 851.33	1 593.85, 2451.77	184.50	169.14, 214.90
2	96 hpf	1 071.96	818.99, 1388.05	74.76	57.32, 84.47
3	6 dpf	133.12	126.59, 140.41	-	-

表 3 DAG 对不同时间段斑马鱼胚胎的 TI 及 SI 的影响

Table 3 Effect of DAG on TI and SI of zebrafish embryos in different periods

序号	时间	$LC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	$EC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	TI	$LC_1/mg \cdot L^{-1}$	$EC_{99}/mg \cdot L^{-1}$	SI
1	72 hpf	1 851.33	184.50	10.03	662.46	416.58	1.59
2	96 hpf	1 071.96	74.76	14.34	448.14	152.52	2.94

粒细胞性白血病外的其他肿瘤可能会发生的毒副作用及潜在毒性情况,利用斑马鱼胚胎重新对其毒性进行了安全性评价。

实验发现 DAG 对斑马鱼胚胎的致畸量和致死量之间剂量跨度很大,同一个发育时间终点下,剂量已达 100.00% 致畸率时,仍未见死亡情况,致死率为 0,因此,本实验设置了 A, B 组,即设定了低浓度组和高浓度组以考察准确的畸形情况和死亡情况。结果可见 DAG 对斑马鱼胚胎的发育 24 hpf 时表现未见毒性反应,48 hpf 后毒性主要表现为各种畸形,畸形情况与给药的浓度和时间均呈现相关关系;主要畸形表现除了呈现一般药物毒性会出现的心包水肿、尾部和脊椎弯曲、卵黄突出吸收不良等现象外,较特殊的畸形表现为心区血红细胞减少,头部和眼部发育不良,高浓度出现刻板式转圈现象;B 组中 48 hpf 时出膜较空白组早,且组间出膜率呈钟型趋势,即中浓度出膜率较低浓度及高浓度大,而 72 hpf 后出膜率均比空白组小,且高浓度组表现为出膜延迟或者不出膜。

从上述结果猜测 24 hpf 时药物处于积聚过程,未发生明显作用;心区血红细胞减少可能是由于药物有骨髓抑制作用,血细胞不能正常分化,导致红细胞减少<sup>[17,21]</sup>;药物作用出现了斑马鱼幼鱼头部变小,高浓度出现旋转现象,提示 DAG 容易透过血脑屏障并在脑内积聚<sup>[22-23]</sup>,该现象对胶质瘤的治疗的可能性提供了一定科学依据。同时药物在脑内积聚,剂量过大会出现刻板式转圈,产生脑部及中枢神经的影响,但低浓度未出现旋转现象,说明 DAG 对脑部神经的影响与剂量有关,剂量过高,对脑部及中枢神经的影响越大,因此控制临床用药剂量应该被关注。给药后斑马鱼胚胎中剂量出膜较快可能是由于胚胎神经受到药物影响,产生兴奋行为,较空白组

出膜快,而高浓度由于浓度过高,神经由兴奋变为抑制,因而出现出膜延迟或不出膜现象<sup>[15]</sup>。

黄惠琳等<sup>[24]</sup>研究氯化两面针碱和羟基喜树碱的 72 hpf  $LC_{50}$  分别为  $1.66 mg \cdot L^{-1}$  和  $4.21 mg \cdot L^{-1}$ ,而 DAG 的 72 hpf  $LC_{50}$  为  $1 851.33 mg \cdot L^{-1}$ ,提示 DAG 毒性远小于类似的抗肿瘤药物。实验结果与临床反应其毒性较低<sup>[10]</sup>的报道基本一致。治疗指数 TI 为评价药物安全性指标之一,其为  $LC_{50}/EC_{50}$ ,若治疗效应和致死效应的量效曲线相互不平行,则不能准确反应药物安全性,结果不可靠。因此,用安全指数 SI,即  $LC_1/EC_{99}$ ,结果能更准确的反应安全性。蒙怡等<sup>[25]</sup>研究得出 4 种已上市使用的抗肿瘤药物 72 hpf 斑马鱼胚胎的安全指数 SI,其大小顺序:硫酸长春新碱 > 氟尿嘧啶 > 环磷酰胺 > 盐酸阿糖胞苷,而本实验中 DAG 的 72 hpf 安全指数 SI 与文献报道的抗肿瘤药物比较,DAG 安全指数较高,与预期结果一致。该结果可为新增适应症的用药方案提供参考依据。

本实验对 DAG 的毒性进行了基础的评价,对其进行安全性分析。实验中发生的高剂量给药组斑马鱼出现自主旋转的表征现象更加体现了 DAG 对神经的影响,为了更深入地了解 DAG 的毒性机制,在进一步的实验研究中,将利用斑马鱼模型继续进行药物对神经等局部毒性机制进行研究。利用斑马鱼模型评价 DAG 毒性除有其自身优势外,由于该模型存在着药物剂量与临床用药剂量换算,及药物给药方式与临床给药方式的差异等待解决的问题,因此,在斑马鱼模型实验所得结果仍需要进行人体临床试验才能最终确认。近年来随着斑马鱼相关研究的深入,斑马鱼显微注射,斑马鱼基因敲除,斑马鱼病理造模等技术也日益成熟,可对药物的研究领域发挥更大作用和价值。

[参考文献]

- [1] 陶瑞芳,林宝爵. 抗癌新药——二去水卫矛醇[J]. 中国新药与临床杂志,1985,4(4):56.
- [2] 黄彦云,林郁华. 1,2:5,6-二去水卫矛醇治疗慢性粒细胞性白血病21例的近期疗效[J]. 广西医学,1984,6(2):72-75.
- [3] 广西中医药研究所. 卫康醇(去水卫矛醇)[J]. 药学通报,1986,21(3):158-159.
- [4] 樊亦军,韦焕英,邢邦华,等. 1,2,5,6-二去水卫矛醇抗肿瘤作用及毒性[J]. 华西药理学杂志,1987,2(3):161-165.
- [5] 张慧玲,王稼农,梁艳,等. 二去水卫矛醇对四种肿瘤细胞的体外抑制作用[J]. 广西科学,2013,20(1):82-84.
- [6] Stehman F B, Blom J, Blessing J A, et al. Phase II trial of galactitol 1, 2: 5, 6-dianhydro (NSC 132313) in the treatment of advanced gynecologic malignancies: a Gynecologic Oncology Group study[J]. Gynecol Oncol, 1983,15(3):381-390.
- [7] Eagan R T, Ingle J N, Frytak S, et al. Platinum-based polychemotherapy versus dianhydrogalactitol in advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer Treat Rep,1977,61(7):1339-1345.
- [8] Shih K C, Patel M, Butowski N, et al. Phase I/II study of dianhydrogalactitol in patients with recurrent malignant glioblastoma multiforme (GBM) [J]. Neuro Oncol,2014,16(5):20.
- [9] Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Guideline for the Testing of Chemicals(Guideline 210)[S]. 1992:1-18.
- [10] Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Guideline for the Testing of Chemicals(Guideline 212)[S]. 1998:1-20.
- [11] Vogel C L, Winton E F, Moore M R, et al. Phase I trial of dianhydrogalactitol administered IV in a weekly schedule[J]. Cancer Treat Rep,1976,60(7):895-901.
- [12] 陈汝家,朱俊靖,周盛梅,等. 斑马鱼模型在药物毒性与安全性评价中的应用[J]. 毒理学杂志,2012,26(3):224-228.
- [13] 刘可春,孙晨,王希敏,等. 斑马鱼模型在药物早期安全评价中的应用.[J]. 山东科学,2014,27(5),1-13.
- [14] Westerfield M. The zebrafish book [M]. Eugene: University of Oregon Press,1995:16.
- [15] 尚艳楠,蒲韵竹,李小满,等. 细辛脑对斑马鱼胚胎发育及运动行为的影响[J]. 国际药学研究杂志,2015,42(2):176-182.
- [16] 朱琳,史淑洁. 斑马鱼胚胎发育技术在毒性评价中的应用[J]. 应用生态学报,2002,13(2):252-254.
- [17] Horváth I P, Somfai R, Hegedüs L, et al. Toxicity, antitumour and haematological effects of 1,2-anhydro-6-bromogalactitol and d-mannitol; a comparison with the related dibromo-and dianhydro-derivatives [J]. Eur J Cancer Clin Oncol,1982,18(6):573-577.
- [18] Eagan R T, Ames M M, Powis G, et al. Clinical and pharmacologic evaluation of split-dose intermittent therapy with dianhydrogalactitol[J]. Cancer Treat Rep, 1982,66(2):283-287.
- [19] Perry M C, Moertel C G, Schutt A J, et al. Phase II studies of dianhydrogalactitol and VP-16-213 in colorectal cancer[J]. Cancer Treat Rep,1976,60(9):1247-1250.
- [20] Vogl S E, Seltzer V, Camacho F, et al. Dianhydrogalactitol and cisplatin in combination for advanced cancer of the uterine cervix [J]. Cancer Treat Rep, 1982,66(10):1809-1812.
- [21] Ton C, Lin Y, Willett C. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol,2006,76(7):553-567.
- [22] 史慧勤,张利军,彭辉,等. 氯丙嗪在斑马鱼胚胎和早期幼鱼发育过程中的神经毒性作用[J]. 中国比较医学杂志,2011,21(21):150-156.
- [23] 胡占英,张靖溥. 长春新碱对斑马鱼神经发育和行为的影响[J]. 毒理学杂志,2014,28(2):98-103.
- [24] 黄惠琳,刘华钢,蒙怡,等. 氯化两面针碱和羟基喜树碱对斑马鱼胚胎发育的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):238-241.
- [25] 蒙怡,金秋,刘华钢,等. 斑马鱼胚胎试验比较4种抗肿瘤药物的毒性[J]. 中国组织工程研究,2012,16(50):9458-9462.

[责任编辑 张丰丰]