

· 药剂与炮制 ·

斑马鱼神经元损伤模型 在养血清脑颗粒质量控制中的应用分析

李晓稳¹, 佟玲², 李东翔², 孙国祥^{1*}, 朱桃桃³, 李春启³

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 天士力制药集团股份有限公司, 天津 300410;
3. 杭州环特生物科技有限公司, 杭州 311231)

[摘要] 目的:探讨斑马鱼神经元损伤模型在养血清脑颗粒质量控制应用的可行性,为该制剂提供一种新型生物活性质量控制方法。方法:以养血清脑颗粒为例,采用吗替麦考酚酯诱导的斑马鱼神经元损伤药效模型对养血清脑颗粒进行神经细胞保护生物活性评价和质量稳定性检测。结果:斑马鱼神经元损伤模型作为神经细胞保护药物生物活性质控方法具有较好的精密度,日内RSD 2.2%~3.7%,日间RSD 1.2%;重复性(RSD 8.4%)和稳定性(RSD 4.9%)良好;在0.10~1.00 g·L⁻¹内养血清脑颗粒对神经细胞保护率成良好的线性关系,方法学考察符合生物活性测定指导原则的要求。结论:采用斑马鱼神经元损伤模型评价养血清脑颗粒神经细胞保护作用的方法快速、稳定可靠,可作为现有质量控制方法的有效补充,为中药的生物活性质量控制研究提供一定的技术参考。

[关键词] 养血清脑颗粒; 斑马鱼; 神经元损伤模型; 生物活性; 吗替麦考酚酯

[中图分类号] R945;R285.5;O213.1;R944.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160314.1606.012.html>

[网络出版时间] 2016-03-14 16:06

Research and Application of Zebrafish Neuronal Injury Model on Quality Control of Yangxue Qingnao Granules

LI Xiao-wen¹, TONG Ling², LI Dong-xiang², SUN Guo-xiang^{1*}, ZHU Tao-tao³, LI Chun-qi³

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
2. Tasly Pharmaceutical Group Co. Ltd., Tianjin 300410, China;
3. Hunter Biotechnology Co. Ltd., Hangzhou 311231, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate feasibility of application of zebrafish neuronal injury model on quality control for Yangxue Qingnao granules and to provide a new quality control method for this preparation. **Method:** Biological activity effect and stability of Yangxue Qingnao granules were quantitatively assessed in a zebrafish neuronal injury model which was established by mycophenolate mofetil (MMF). **Result:** Central nerve injury zebrafish model as a biological quality control standard for Yangxue Qingnao granules nerve cell protection exhibited excellent precision (intra-day RSD of 2.2%-3.7%, inter-day RSD of 1.2%), repeatability (RSD of 8.4%) and stability (RSD of 4.9%). In the range of 0.1-1.0 g·L⁻¹, there was a significant linear correlation; this method met requirements of biological activity determination of guiding principles. **Conclusion:** It can be turned out that methodology which established in dissertation is good at determining neuroprotective efficacy of Yangxue Qingnao granules, it is reliable, simple and repeatable, this method also provides a reference for development and improvement of bioassay of Chinese medicines.

[收稿日期] 20150717(016)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402202)

[第一作者] 李晓稳,博士,从事中药质量标准研究,Tel:022-26736585,E-mail:xiaowenli89@163.com

[通讯作者] *孙国祥,博士,教授,从事中药质量标准研究,Tel:024-23986286,E-mail:sgxwm0416@163.com

[Key words] Yangxue Qingnao granules; zebrafish; neuronal injury model; biological activity; mycophenolate mofetil

中药质量控制的最终目的是保证中药的安全性和有效性;而现行质量控制方法主要用于评价其表观成分的一致性,不仅无法关联药效或毒副作用,且存在被勾兑的风险。同时,表观化学成分的重现也可能导致对样品质量合格与否的误判,潜在风险更大^[1-4]。生物活性测定法因具有整体可控、药效相关等技术优势,作为符合中医药特点的适用质量控制模式及方法,渐已成为中药质量控制和评价的重要发展方向之一^[5]。国家药典委员会已明确表示,中药质量标准逐步由单一指标成分定性定量测定开始向活性有效成分及生物检定的综合检测过渡。美国植物药指南中关于药材、提取物、制剂的质量标准制定中也一直强调增加生物测试项目^[6-7]。说明生物活性测定方法可有效弥补现行化学成分层面难以全面监控中药复方质量的局限性。前期研究中,本课题组已成功将斑马鱼模型应用于药物药效学、毒理学及药物代谢研究中^[8-10]。

养血清脑颗粒是在四物汤的基础上,以当归、川芎、钩藤、白芍、夏枯草等 11 味中药组方而成,具有养血平肝、活络止痛的功效,主要用于血虚肝旺所致头痛、眩晕眼花、心烦易怒及失眠多梦,是中药保护品种(编号 ZYB20720120200)。本实验以斑马鱼神经元损伤模型作为生物模型载体,对不同批次的养血清脑颗粒的生物活性进行检测,初步探索中药复方质量标准中建立生物活性测定项目的可行性,为其他药效物质不清楚的中药复方生物活性质量控制研究提供参考。

1 材料

IPP6.0 型图像处理软件(Media Cybernetics 公司),CSW-ZY02 型荧光显微镜(深圳市科视威光学仪器有限公司)。吗替麦考酚酯(阿拉丁试剂有限公司,批号 128794-94-5),还原型谷胱甘肽(阿拉丁试剂有限公司,批号 70-18-8),吖啶橙染料[Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号 494-38-2],养血清脑颗粒(天津天士力制药集团有限公司,有效期内制剂 6 批,批号 130225,130226,130175,130565,130601,130606,编号 S1~S6;过期制剂 3 批,批号 090829,091134,091211,编号 S7~S9;特殊处理制剂 3 批,批号 130225,编号 S10~S12),水为超纯水,试剂均为分析纯。

斑马鱼选用的是受精后 24 h 野生型 AB 系斑马

鱼胚胎,胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行。在 28 ℃ 条件下用养鱼用水孵育胚胎(养鱼用水水质为每 1 L 反渗透水中加入速溶海盐 200 mg,电导率 480 ~ 510 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH 6.9 ~ 7.2,水硬度以 CaCO_3 计质量浓度 53.7 ~ 71.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。因为胚胎可从自身的卵黄囊中获取营养物质,所以在受精后 9 d 内不需要喂食。用 0.64 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三卡因甲磺酸对斑马鱼胚胎进行过度暴露处理,将斑马鱼麻醉处死,麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA)对动物麻醉处死的规范要求。斑马鱼胚胎由杭州环特生物科技有限公司提供,许可证号 SYXK(浙)2012-0171。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 取不同批次的养血清脑颗粒 2.0 g,用水 100 mL 溶解,得 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,置 4 ℃ 冰箱中,备用;用水稀释到相应质量浓度进行药效活性检测。

2.2 养血清脑颗粒的神经细胞保护药效测试 选用受精 1 d 的野生型 AB 系斑马鱼胚胎,将受精 24 h 斑马鱼胚胎放入 6 孔板中,加入培养基 3 mL,每孔加入幼鱼胚胎 30 条,吗替麦考酚酯(MMF)造模但无药物治疗组为模型组,0.1% 二甲基亚砜(DMSO)为空白组,0.50 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 还原型谷胱甘肽(GSH)为阳性组,选择 S1 养血制剂样品(批号 130225)用于方法建立;配制不同浓度的 S1 样品作为受试组,造模同时分别加入不同浓度 S1 样品处理 24 h。药物处理结束后,使用 0.64 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三卡因甲磺酸对斑马鱼进行过度暴露处死;用吖啶橙(AO)染料对斑马鱼胚胎进行活体染色 1 h;染色结束后在荧光显微镜下观察、拍照。统计斑马鱼凋亡细胞荧光强度(F),定量评价养血清脑颗粒神经细胞保护率效果。参照生物检定的要求,运用建立的方法检测不同批次养血清脑颗粒制剂的神经细胞保护药效。利用 GraphPad 5.0 软件对试验结果统计,通过方差分析和 Dunnett's T -检验进行统计学分析。

$$\text{相对荧光强度} = F_{\text{养血清脑颗粒组}} / F_{\text{模型组}} \times 100\%$$

$$\text{神经细胞保护率} = (F_{\text{模型组}} - F_{\text{养血清脑颗粒组}}) / (F_{\text{模型组}} - F_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

3 结果

3.1 斑马鱼神经元损伤模型建立 用 0.25 $\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ MMF 对受精 1 d 野生型 AB 系胚胎斑马

鱼处理 24 h, 诱导斑马鱼中枢神经损伤模型; AO 染料染色, 凋亡细胞呈荧光绿色, 荧光显微镜下拍照观察斑马鱼神经凋亡细胞荧光强度来判断造模成功率(造模成功率 95%), 见图 1。斑马鱼凋亡细胞荧光强度定量分析可对药物对神经细胞保护效率进行快速、可靠的评价。

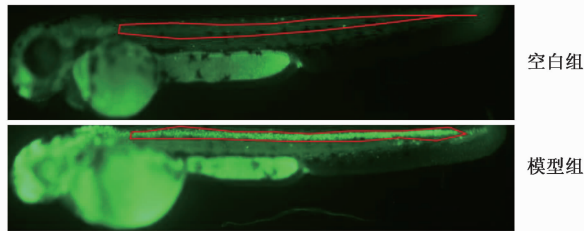


图 1 吗替麦考酚酯造模后斑马鱼表型(荧光点为凋亡神经细胞)
Fig. 1 Phenotype map of zebrafish neuronal injury model induced by mycophenolate mofetil

3.2 养血清脑颗粒对斑马鱼神经细胞保护的量效关系考察 将 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 养血清脑颗粒工作参照物 S1 用水分别稀释至 $1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 各 5 mL, 按 2.2 项下方法测定养血清脑颗粒处理下斑马鱼凋亡细胞 F , 计算神经细胞保护率(P), 见表 1。

表 1 不同给药组对斑马鱼神经细胞的保护作用
Table 1 Protective efficiency of different drug administration group on nerve cells of zebrafish

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	n	F	P
空白	-	19	32.8 ± 5.1	-
模型	-	18	100.0 ± 27.5	-
阳性	-	20	$29.8 \pm 6.4^{2)}$	104.6
养血清脑颗粒	0.10	17	90.5 ± 21.7	14.2
	0.25	18	86.2 ± 24.0	20.5
	0.50	18	$66.8 \pm 19.8^{2)}$	49.5
	0.75	18	$56.2 \pm 16.7^{2)}$	65.1
	1.00	17	$42.5 \pm 9.8^{2)}$	85.7

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

由图 2 可知, 空白组斑马鱼中枢神经细胞凋亡较少, 凋亡细胞荧光信号弱; 模型组斑马鱼中枢神经凋亡细胞非常明显。阳性组与模型组相比, 斑马鱼中枢神经凋亡细胞显著减少。以药物质量浓度(C)为横坐标, P 为纵坐标, 通过试验数据进行线性回归和计算, 得回归方程 $P = 0.082C + 4.439$ ($r = 0.995$), 表明在 $0.10 \sim 1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内养血清脑颗粒与 P 成良好线性关系。利用 GraphPad 5.0 软件拟合量-效曲线, 计算养血清脑颗粒对斑马鱼神经细胞保护作用的半数有效浓度(EC_{50}) $522 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 故选择给药质量浓度 $522 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3 方法学考察

3.3.1 精密度的试验 分别平行制备 3 批养血清脑

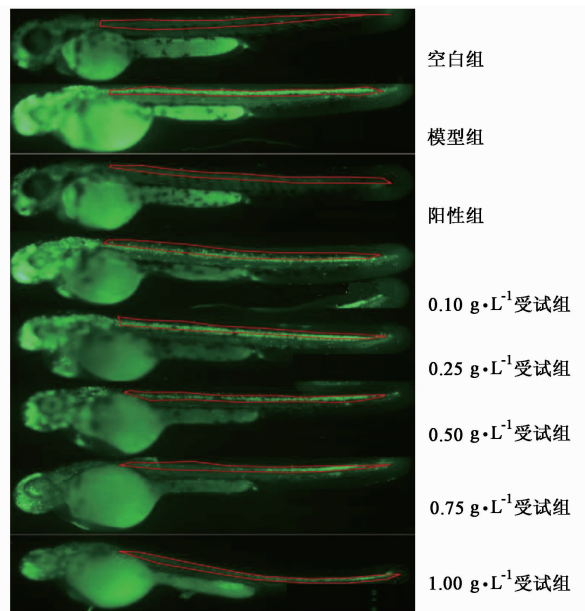


图 2 养血清脑颗粒神经保护作用表型
Fig. 2 Phenotype map of neuroprotective effect of Yangxue Qingnao granules

颗粒(S1, S2, S3)样品 3 份, 按 2.2 项下方法分别进行日内精密度的考察, 重复操作 6 次。结果不同批次制剂的 P 平均值分别为 62.9%, 62.3%, 63.5%, 无明显差异, $RSD 2.2\% \sim 3.7\%$ 。日间精密度的考察采用同一批养血清脑颗粒对 3 个不同批次斑马鱼 P 测定, 结果 $RSD 1.2\%$ 。

3.3.2 重复性试验 平行制备养血清脑颗粒(S1) 6 份, 分别处理同一批次的斑马鱼 24 h, 不同样品处理后均有明显的神经细胞保护药效, 且 6 个样品处理组斑马鱼的 P 均无显著性差异, $RSD 8.4\%$ 。

3.3.3 稳定性考察 分别于 0, 3, 6, 12, 24 h 将室温放置的同一供试品溶液进行生物药效活性检测, 计算 $RSD 4.9\%$, 说明室温放置 24 h 内稳定。

3.4 神经细胞保护药效的测定 按 2.2 项下方法测定不同批次的养血清脑颗粒的神经细胞保护药效, 包括在效期内的 6 批制剂, 3 批过期制剂, 3 批经破坏后的制剂(分别为高温、光照和 $10\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 破坏后样品), 见表 2。结果发现不同条件下的样品对斑马鱼神经细胞保护药效有明显差异, 样品 S1 ~ S6 具有显著的神经细胞保护作用; 样品 S7 ~ S9 的 P 较低; 样品 S10 ~ S12 的 P 差异较大; 提示通过斑马鱼神经细胞保护药效活性测定可定性表征养血清脑颗粒质量的优劣。

4 讨论

前期药理研究表明养血清脑颗粒通过选择性地抑制谷氨酸和 Caspase-3 的表达, 并且通过谷氨酸盐

表 2 养血清脑颗粒的神经保护药效

Table 2 Neuroprotective effect of Yangxue Qingnao granules %

组别	F	P
模型	100.0 ± 18.6	-
阳性	39.5 ± 4.8	-
S1	64.2 ± 21.0 ²⁾	59.2
S2	65.0 ± 12.6 ²⁾	57.8
S3	66.3 ± 10.7 ²⁾	55.8
S4	64.8 ± 16.8 ²⁾	57.5
S5	62.5 ± 10.0 ²⁾	61.3
S6	63.0 ± 18.0 ²⁾	60.4
S7	71.7 ± 23.2 ²⁾	46.3
S8	71.7 ± 21.1 ²⁾	46.2
S9	83.6 ± 14.9	26.7
S10	62.9 ± 30.5 ²⁾	61.4
S11	81.4 ± 18.7 ¹⁾	29.3
S12	117.7 ± 17.1	-27.8

合成酶选择性抑制兴奋性氨基酸谷氨酸的神经毒性作用,减少神经细胞的死亡,从而发挥神经保护作用^[11-15]。根据养血清脑颗粒的神经保护机制,选择同样是通过抑制谷氨酸表达而发挥神经元保护作用的 GSH 为阳性药^[16-17]。

斑马鱼具有典型的脊椎动物脑部特征,神经行为遵循顺序发育原则。与啮齿动物模型相比,斑马鱼具有饲养经济、产卵量大、发育快速、胚胎透明、易于观察、动物产生的应激少及实验结果较客观等优点。目前模式动物斑马鱼已广泛应用于神经发育、神经损伤和神经行为学等神经科学研究^[18-20]。因此,本文采用标准化的斑马鱼神经元损伤药效模型,采用 AO 染色与凋亡细胞荧光强度定量分析,对药物的体内神经细胞保护效率进行评价。在本文研究中,斑马鱼神经损伤模型作为心脑血管药物生物学内控检测方法具有较好的精密度和重复性,还具有关联药效、可测可评的特点。研究发现合格制剂均具有显著的神经保护率,过期及破坏性样品的神经保护效率则大大降低,表明该方法可初步用于区分合格与不合格样品。

中药成分复杂,单纯效仿化学药基于成分论的质量控制模式,对于物质基础不明的中药很难控制临床上的有效性和安全性。因此,将生物测定引入到中药质量控制与品质评价中是未来的重要发展方向。本文建立的斑马鱼神经损伤模型具有简便、快速、稳定、有效的优点,可为养血清脑颗粒的质量控制和品质评价提供新思路和技术支持。

[参考文献]

[1] 刘静,周晓梅,祝与鸣,等. 中药质量控制方法研究进展[J]. 中国药房,2010,21(3):281-282.
[2] 刘占京. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 中医临床研究,2014,6(1):127-128.

[3] 王伽伯,李会芳,肖小河,等. 生物检定方法控制中药质量的思考[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2007,9(6):36-39.
[4] 肖小河,金城,赵中振,等. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 中国中药杂志,2007,32(14):1377-1381.
[5] 李发美,熊志立,鹿秀梅,等. 中药质量控制和评价模式的发展及系统生物学对其的作用[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2009,11(1):120-126.
[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:132-133.
[7] U. S. Food and Drug Administration. Guidance for industry botanical drug products[S/OL]. 2004; http://www.fda.gov/cder/guidance/4592fnl.pdf,2009-06-15.
[8] 韩利文,袁延强,何秋霞,等. 斑马鱼模型在中药活性筛选中的适用性研究[J]. 中草药,2011,42(10):2037-2041.
[9] 刘晨,陈斌,徐又佳. 斑马鱼疾病模型[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2014,7(3):277-280.
[10] 郭殿武,周娟,唐礼可,等. 斑马鱼高脂模型在山青之片质量控制中的应用研究[J]. 中国药品标准,2013,14(4):255-259.
[11] 冯梅,温万鑫,卢静敏,等. 养血清脑颗粒治疗血管性痴呆的系统评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):207-212.
[12] 陶涛,秦新月,徐广会. 养血清脑颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤后轴突再生及 RGMa 表达的影响[J]. 第三军医大学学报,2013,35(7):635-638.
[13] 王宏英,刘磊,谭岩,等. 养血清脑颗粒对血管性痴呆大鼠海马神经元的保护作用[J]. 中国老年学杂志,2014,34(15):4261-4263.
[14] 张玲,褚扬,马晓慧,等. 养血清脑颗粒的药理作用研究进展[J]. 医学综述,2011,17(5):769-771.
[15] 李建华,周长满,韩晶岩,等. 养血清脑颗粒对蒙古沙鼠全脑缺血再灌注后 Glu 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 青海医学院学报,2007,28(7):165-169.
[16] 胡尔滨,张载高. 还原性谷胱甘肽与缺血再灌注损伤保护[J]. 海军总医院学报,2004,17(4):231-234.
[17] 王晓虹,孙长凯,王苏平,等. 谷胱甘肽抗谷氨酸诱导海马神经元损伤钙超载机制研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2006,23(1):13-16.
[18] 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.
[19] 王佑华,黎响,杨彬睿,等. 斑马鱼模型在中医药研究中的应用现状[J]. 中西医结合学报,2012,10(11):1189-1197.
[20] 韦英杰,王长梅,蔡雪婷,等. 地塞米松影响骨骼发育的斑马鱼模型的建立[J]. 药学报,2013,48(2):255-260.

[责任编辑 刘德文]