

· 毒理 ·

## 醋甘遂不同提取物对斑马鱼幼鱼的毒性

罗隽<sup>1</sup>, 梅雪<sup>1</sup>, 夏青<sup>1</sup>, 冯娅茹<sup>1</sup>, 王雨彤<sup>1</sup>, 李二文<sup>1</sup>, 邹迪新<sup>2</sup>, 马志强<sup>1</sup>, 林瑞超<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院 中药品质评价北京市重点实验室, 北京 100102;

2. 内蒙古医科大学, 呼和浩特 010110)

**[摘要]** **目的:**研究非致死剂量醋甘遂对斑马鱼幼鱼的毒性及毒性可逆性,并验证斑马鱼模型用于中药毒性快速评价的可行性。**方法:**用索氏提取器以不同极性溶剂依次提取样品,制备不同提取物。将健康斑马鱼成鱼配对产卵,以正常发育受精后3 d的斑马鱼幼鱼为模型,用醋甘遂不同极性提取物处理斑马鱼幼鱼,统计给药72 h死亡率,对毒性最强的提取部位观察评价其对斑马鱼心血管系统、肝脏、神经系统、胃肠道系统、肾脏及其他脏器系统的毒性特征及可逆性。**结果:**醋甘遂不同溶剂提取物毒性顺序依次为石油醚提取物>二氯甲烷提取物>乙酸乙酯提取物>乙醇提取物,与空白组比较,石油醚提取部位处理后的幼鱼给药组肝区相对光强度随给药浓度的升高而降低,肝脏颜色变暗( $P < 0.01$ );肝脏经苏木精-伊红染色后,在石油醚提取部位 $0.054 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药组中有轻微的肝损伤,在恢复组中肝损伤明显好转。与空白组和石油醚提取部位 $0.004 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较,肠道尼罗红排泄实验显示残留率在石油醚提取部位 $0.012, 0.036, 0.054 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组中显著下降( $P < 0.01$ ),胃肠道被促进排空。其他系统毒性特征不明显,差异均无统计学意义。**结论:**醋甘遂的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和乙醇提取物中,石油醚提取物毒性最大,且主要毒性为肝毒性和胃肠道刺激性,肝毒性造成肝变性,具有可逆性。斑马鱼模型快速评价中药毒性具有较好的应用前景。

**[关键词]** 醋甘遂; 斑马鱼幼鱼; 毒性; 可逆性; 半数致死浓度

**[中图分类号]** R965.3;R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0160-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040160

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1129.020.html>

**[网络出版时间]** 2017-11-14 11:29

## Toxicity of Different Vinegar-preparing Kansui Radix Extracts on Zebrafish Larvae

LUO Jun<sup>1</sup>, MEI Xue<sup>1</sup>, XIA Qing<sup>1</sup>, FENG Ya-ru<sup>1</sup>, WANG Yu-tong<sup>1</sup>, LI Er-wen<sup>1</sup>, ZOU Di-xin<sup>2</sup>,

MA Zhi-qiang<sup>1</sup>, LIN Rui-chao<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, School of

Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the toxicity and toxicity reversibility of non-lethal dose of vinegar-preparing Kansui Radix on zebrafish larvae, and validate the feasibility of zebrafish model for rapid assessment of drug toxicity. **Method:** Samples were continuously extracted with soxhlet extractor in different polar solvents to prepare different extracts. Healthy adult zebrafish were paired for spawning. The 72 hour-post-fertilization (hpf) zebrafish larvae were chosen as models to investigate their mortality rate after 72 h treatment with different extracts of processed Kansui. The toxicity and reversibility of the most toxic extraction part was evaluated on zebrafish cardiovascular system, liver, nervous system, gastrointestinal system, kidneys and other organs and systems. **Result:** The order of toxicities for different extraction parts of processed Kansui Radix on zebrafish larvae was as

**[收稿日期]** 20170620(008)

**[基金项目]** 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-YN44)

**[第一作者]** 罗隽, 硕士, 从事中药、民族药品品质评价研究, E-mail: leluo71@163.com

**[通信作者]** \* 林瑞超, 博士, 教授, 从事中草药活性、中药、民族药品品质评价研究, Tel: 010-84738653, E-mail: linrch307@sina.com

follows; petroleum ether extract > ethyl acetate extract > dichloromethane extract > ethanol extract. In the petroleum ether extract treated group, the liver intensity of the zebrafish larvae was significantly changed with the drug concentration, and the color the liver became dark as compared with blank group ( $P < 0.01$ ). Minor liver injury was found in the  $0.054 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  petroleum ether extract group by hematoxylin-eosin staining, but it was significantly improved in the recovery group. The residual was decreased significantly in  $0.012$ ,  $0.036$ ,  $0.054 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  petroleum ether extract groups as compared to blank control group and  $0.004 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  petroleum ether extract group ( $P < 0.01$ ), and their gastrointestinal tract was promoted to empty. Other systems had no obvious toxicity characteristics, with no statistically significant differences between the groups. **Conclusion:** In the petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol extracts of vinegar-preparing Kansui, petroleum ether extract had the greatest toxicity, mainly in hepatotoxicity and gastrointestinal irritation on zebrafish larvae. Hepatotoxicity caused liver degeneration and showed high reversibility. What's more, zebrafish as a reliable mammal model for screening acute toxic agents has good application prospects.

**[Key words]** vinegar-preparing Kansui Radix; zebrafish larvae; acute toxicity; reversibility; lethal concentration of 50%

甘遂为大戟科植物甘遂的干燥块根<sup>[1]</sup>,为逐水良药,始载于《神农本草经》,被列为下品。其性苦寒,有毒,主要毒副作用包括皮肤、口腔和胃肠道刺激性,肝损伤和致癌作用。临床一般采用醋制以降低毒性,缓解药性。

近年来,斑马鱼(zebrafish)在国内外已成为一种热门的药学研究工具,被用来建立各种疾病模型,进行药物活性、毒性的高通量筛选以及药物代谢等方面的研究<sup>[2-3]</sup>。与哺乳动物相比,斑马鱼具有饲养成本低、体积小、发育周期短、体外受精、胚胎以及幼生期透明易观察<sup>[4]</sup>、单次产卵数高等优势。因此,以斑马鱼为实验模式生物,可以获得大量样本,减少误差,同时能大幅度缩短实验周期<sup>[5]</sup>。斑马鱼还拥有与人类相似的药物代谢系统,药物对细胞色素 P450 及其亚酶 CYP3A4 家族所产生的效应与人体观察到的基本一致<sup>[6]</sup>。斑马鱼已知基因被证实与人类相似度高达 87%,不同物种的脊椎动物在早期发育阶段具有很强的相似性,且其在这一阶段对于外来化学物质的影响能够产生更灵敏的反应<sup>[7]</sup>。在给药方式上,可以采用水溶暴露给药、卵黄囊(肌肉)注射给药、静脉注射给药以及腹腔注射(成鱼)或灌胃给药(成鱼)等多种方式,能够满足多种不同剂型药物的给药要求。利用斑马鱼模型可以快捷、高效、直观地评价药物的心血管、肝脏、肾脏和神经等靶器官毒性等<sup>[8]</sup>。

在当前的报道中,虽然有关于醋制后甘遂毒性变化的研究,但仅限于对致死剂量或致死浓度的比较,缺乏醋制对甘遂具体毒性指标影响的研究,也未有毒性可逆性评价相关报道。本实验利用 4 种不同

极性溶剂连续提取醋甘遂,并比较不同溶剂连续提取的提取物毒性差异,筛选得到毒性最强的提取部位,后评价该部位的毒性特征及可逆性。探讨醋制对甘遂毒性特征及毒性可逆性的影响,并为斑马鱼模型用于中药毒性快速评价提供理论支持。

## 1 材料

**1.1 药材和试剂** 甘遂购自安国药材市场,经北京中医药大学杨瑶珺教授和林瑞超教授鉴定为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* 的干燥块根。由北京中医药大学中药学院李向日教授实验室按 2015 年版《中国药典》所述炮制而成醋甘遂。二甲基亚砜(DMSO,西陇科技有限公司,批号 1610041),石油醚(批号 20170209),二氯甲烷(批号 20170218),乙酸乙酯(批号 20170210),95%乙醇(批号 20170216)等试剂均为分析纯,购于中国北京化工厂。

**1.2 动物** AB 系野生斑马鱼购于中国科学院水生生物研究所,丰年虾购于天津丰年水产养殖有限公司。

**1.3 仪器** 斑马鱼循环水养殖系统(中国北京爱生科技公司),Axio Zoom V16 型蔡司体式荧光显微镜(德国 Zeiss 公司),KQ5200DE 型数控超声波清洗器(中国昆山市超声仪器有限公司),DK-2000-III L 型数显恒温水浴锅(中国天津泰斯特有限公司),OSB-2100 型旋蒸蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),BPZ-6003LC 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 不同提取液的制备** 本实验用索氏提取器以不同极性溶剂依次提取样品,制备不同提取物。醋

甘遂粉碎过40目筛,称取粉末,装入纸筒,置于索氏提取器中,分别以10倍量石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和95%乙醇为溶剂,按顺序提取,每个溶剂提取6h。提取液经旋转蒸发仪浓缩,置于水浴锅上干燥,于真空干燥箱中干燥、保存。药材提取物溶于纯DMSO中,均制备成 $500\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液(醋甘遂石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和95%乙醇提取物的生药含量分别为16.61,15.15,39.37,17.12 $\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

**2.2 致死曲线建立及最小致死浓度(LC<sub>1</sub>),10%致死浓度(LC<sub>10</sub>),半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)测定** 将健康斑马鱼成鱼进行配对产卵,在显微镜下挑选发育正常的受精后3d(dp<sub>f</sub>)的幼鱼,置于12孔板中,每孔20条,每孔加药液3mL,连续给药72h,每24h更换药液。预实验设置各提取物质量浓度0.01,0.1,1,10,100,200,500 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,根据实验结果进行调整,确定药物给药72h(hpe)最大不致死浓度和最小全致死浓度。根据上述预实验所得范围,确定6~8个成等差数列的药物浓度建立致死曲线,进行LC<sub>1</sub>,LC<sub>10</sub>,LC<sub>50</sub>测定,并同时进行空白组和溶剂组实验(以胚胎培养水为空白组,以含0.1% DMSO胚胎培养水为溶剂组)。实验结果以72hpe死亡率与实验浓度梯度呈良好线性关系( $r^2\geq 85\%$ ),且半数致死浓度RSD $\leq 0.1$ 为有效值。实验重复3次。

**2.3 毒性指标及可逆性观察** 根据2.2项中所得实验结果,判定毒性最大提取部位为石油醚提取物,观察该毒性部位的毒性指标和可逆性。本实验选用1/10 LC<sub>1</sub>,1/3 LC<sub>1</sub>,LC<sub>1</sub>,LC<sub>10</sub>4个浓度作为毒性靶器官及可逆性研究的给药浓度,以培养水为空白组。每组实验重复6次,其中3个给药72h后观察药物对各个脏器系统产生的影响(给药组),剩余3个给药72h后吸除药物,并清洗3次后暴露于胚胎培养水中培养48h,观察各个脏器系统毒性的可逆性(恢复组)。斑马鱼挑选及培养同2.2项。给药或恢复结束后,进行镜下观察,并拍照,记录各毒性观察指标的变化。

**2.3.1 心血管系统毒性检测** 以心包水肿、心率、心律不齐、血流过快、血流过慢和瘀血为指标评价药物对心血管系统可能造成的毒性影响。心包水肿主要依靠形态学观察判定。心率以斑马鱼幼鱼1min心跳次数判定,实验中计数10s心跳次数的6倍即心率。心律不齐以心房与心室跳动节律异常判定。血流过快、血流过慢及瘀血依靠形态学观察判定。为排除环境温度等因素对斑马鱼幼鱼心率微弱的影响,本实验结果以各给药组相对于溶剂组的心率比

表示。

**2.3.2 神经系统毒性检测** 以脑变性(变黑)、脑畸形为指标评价药物对神经系统的毒性。脑变性和脑畸形主要依靠形态学观察判定。

**2.3.3 肝脏毒性检测** 以肝变性、萎缩、肿大和卵黄吸收延迟为指标评价药物对肝脏的毒性。肝变性的表现为肝脏颜色变灰,以肝脏区域的平均荧光强度表示。肝脏萎缩或肿大主要依靠给药组肝面积占溶剂组肝面积比表示。

**2.3.4 胃肠道系统毒性检测** 以肠道褶皱变少、褶皱缺失、肠变性、肠腔变大、肠腔变窄和肠动力变化为指标评价药物对胃肠道的毒性影响。肠道褶皱变少、褶皱缺失、肠变性、肠腔变大、肠腔变窄均依靠形态学观察判定。肠动力以给药组幼鱼对尼罗红染料排泄与溶剂组的比值进行评价,具体染色步骤,①配制 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼罗红孵育液,5dp<sub>f</sub>幼鱼孵育16h。②吸除孵育液,用培养水清洗3次,给药组、溶剂组和模型组分别给3mL相应溶液,孵育6h。③观察、拍照并计算尼罗红荧光强度。

**2.3.5 肾脏毒性检测** 斑马鱼肾脏为前肾,仅由2个在胚胎中线背部主动脉处融合的肾小球组成。斑马鱼肾脏于48hpf形成并初步具备肾功能,于96hpf完全实现血液渗透和渗透调节功能。斑马鱼肾脏中的管状上皮结构可分为近曲小管、近端小管和2个远端小管,在许多方面与哺乳动物肾脏分段是相似的。水肿是肾脏损伤的最重要表型特征,因此,本实验通过统计肾性水肿的发生率反映药物对肾脏的毒性影响。

**2.3.6 其他脏器系统毒性检测** 眼畸形、下颌畸形、躯干(尾)异常、出血、黑色素异常、皮肤刺激和肌肉异常等均通过形态学观察判定。

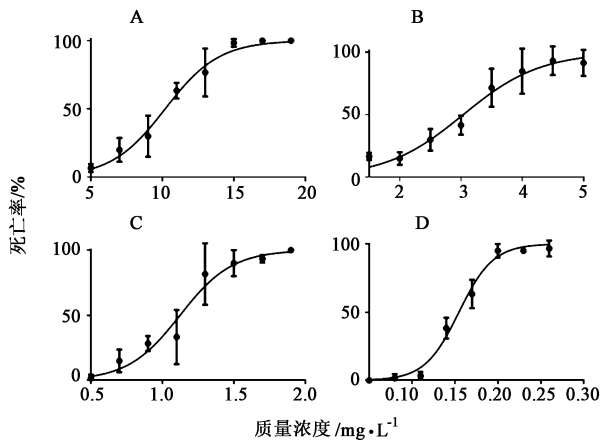
**2.4 苏木精-伊红(HE)染色观察病理改变** 给药结束后和恢复结束后,将存活幼鱼用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次,置于离心管中,加4%多聚甲醛4℃固定24h,常规切4 $\mu\text{m}$ 切片。切片用二甲苯脱蜡,经梯度乙醇至水洗;苏木素染色5min,自来水冲洗;盐酸-乙醇分化10s;自来水浸泡15min;置伊红液2min;常规脱水,透明,封片。

**2.5 统计学方法** 采用SPSS 20.0统计软件。所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 的方式表示,组间差异性判断采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 醋甘遂不同溶剂提取物的毒性** 根据2.1项

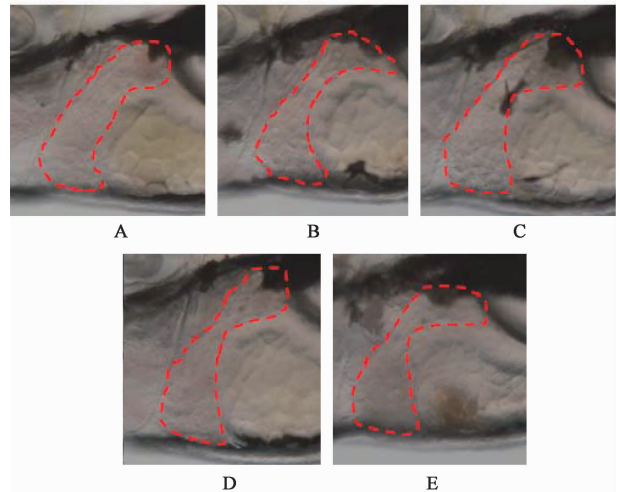
下方法,得出醋甘遂石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和 95% 乙醇的提取率分别为 3.01%、3.30%、1.27%、2.92%。根据 2.2 项下方法,确定了醋甘遂不同溶剂提取物的实验浓度,重复给药 3 次,统计斑马鱼幼鱼死亡数并根据死亡率建立了致死曲线(图 1),并计算出提取物半数致死浓度分别为石油醚提取物 ( $0.078 \pm 0.003$ )  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,二氯甲烷提取物 ( $1.923 \pm 0.128$ )  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,乙酸乙酯提取物 ( $3.902 \pm 0.141$ )  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,乙醇提取物 ( $10.698 \pm 0.745$ )  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结合各溶剂提取率,原药材半数致死浓度分别为石油醚提取物 ( $2.591 \pm 0.100$ )  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,二氯甲烷提取物 ( $58.272 \pm 3.879$ )  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,乙酸乙酯提取物 ( $307.244 \pm 11.102$ )  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,乙醇提取物 ( $366.370 \pm 25.514$ )  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果显示醋甘遂不同溶剂提取物毒性顺序依次为石油醚提取物 > 二氯甲烷提取物 > 乙酸乙酯提取物 > 乙醇提取物;说明醋甘遂毒性最大的部位为石油醚提取物,且毒性明显强于其他溶剂提取物。因此以石油醚提取物为研究对象,研究其毒性。



A. 石油醚提取物;B. 二氯甲烷提取物;C. 乙酸乙酯提取物;D. 乙醇提取物  
图 1 醋甘遂不同溶剂提取物对斑马鱼致死曲线的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig.1 Effect of different vinegar-preparing Kansui Radix extracts on zebrafish lethal curve( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3.2 醋甘遂石油醚提取物对斑马鱼最大毒性部位的毒性指标及可逆性的影响

**3.2.1 肝脏毒性** 空白组中正常斑马鱼肝脏界限清晰,纹理清晰均匀,给药组中斑马鱼肝脏界限变的模糊且肝区颜色变为灰暗色,纹理混乱。见图 2,3。与空白组比较,给药组和恢复组中肝脏面积均未发生显著性变化,肝区光强度在各浓度给药组中均显著降低( $P < 0.01$ ),停药后恢复 48 h 光强度出现可逆性。见表 1,2。醋甘遂具有肝毒性,可使肝变性,



A. 空白组;B~E. 醋甘遂石油醚提取物(0.004,0.012,0.036,0.054  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )组(图 3~8 同)

图 2 醋甘遂石油醚提取物对斑马鱼给药组肝脏形态变化的影响(fluorescence microscope,  $\times 80$ )

Fig.2 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on morphological changes in liver of zebrafish(fluorescence microscope,  $\times 80$ )

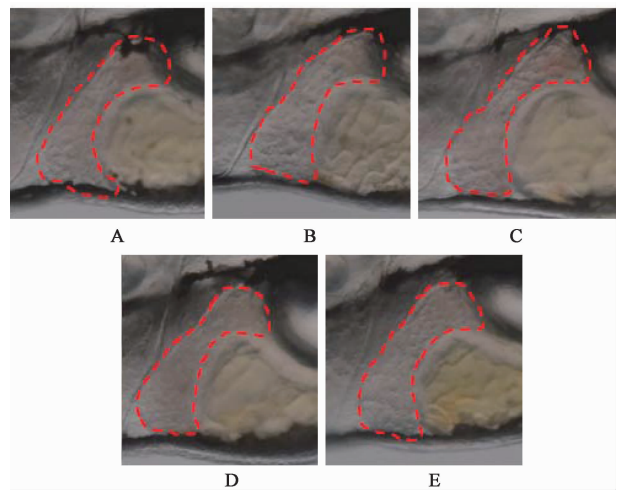


图 3 醋甘遂石油醚提取物对斑马鱼恢复组肝脏形态变化的影响(fluorescence microscope,  $\times 80$ )

Fig.3 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on morphological changes in liver of recovered groups(fluorescence microscope,  $\times 80$ )

但具有可逆性。

**3.2.2 心脏毒性** 与空白组比较,给药组和恢复组斑马鱼幼鱼心脏区域未出现出血、水肿等异常现象,显微镜下心脏形态正常,心区血流正常,心律正常。见图 4,5。与空白组比较,给药组和恢复组心率无显著性差异,说明醋甘遂无心脏毒性。见表 3。

**3.2.3 神经毒性** 与空白组比较,给药组和恢复组斑马鱼脑部未出现水肿、畸形等异常形态,脑区颜色正常,说明脑部未发生变性,说明醋甘遂无脑毒性。见图 4,5。

表 1 醋甘遂石油醚提取物对斑马鱼相对肝面积的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 1 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on relative liver area of zebrafish ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	相对肝面积/%
给药	-	100.00 ± 4.76
	0.004	99.33 ± 7.10
	0.012	98.22 ± 7.46
	0.036	97.05 ± 8.99
	0.054	95.21 ± 9.56
恢复	-	100.00 ± 8.01
	0.004	99.13 ± 5.28
	0.012	98.44 ± 3.32
	0.036	102.72 ± 6.61
	0.054	96.98 ± 8.82

表 2 醋甘遂石油醚提取物对斑马鱼肝区相对光强度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 2 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on relative light intensity in liver of zebrafish ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	肝区相对光强度/%
给药	-	100.00 ± 1.55
	0.004	93.36 ± 5.77 <sup>1)</sup>
	0.012	94.34 ± 4.08 <sup>1)</sup>
	0.036	92.24 ± 2.92 <sup>1)</sup>
	0.054	91.77 ± 4.52 <sup>1)</sup>
恢复	-	100.00 ± 5.75
	0.004	98.97 ± 3.79
	0.012	98.95 ± 2.32
	0.036	98.61 ± 4.16
	0.054	98.99 ± 2.60

注:与给药空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2.4 胃肠道刺激性** 结合镜下观察,与空白组比较,给药组和恢复组斑马鱼胃肠道区域颜色和肠褶皱均无明显变化。见图 4,5。肠道尼罗红排泄实验显示,与空白组比较,残留率在醋甘遂石油醚提取物 0.012, 0.036, 0.054  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组中显著下降 ( $P < 0.01$ ), 残留率越低说明排泄率越高,说明醋甘遂具有胃肠道刺激性。见图 6, 表 4。

**3.2.5 肾毒性** 与空白组比较,给药组与恢复组斑马鱼躯体形态正常,未出现肾性水肿等异常现象,说明醋甘遂无肾脏毒性。见图 7,8。

**3.2.6 其他毒性特征** 与空白组比较,给药组与恢复组斑马鱼眼、下颌、身体着色、鱼鳃、肌肉和鱼鳍等均无异常,全身无出血、瘀血等现象。见图 7,8。

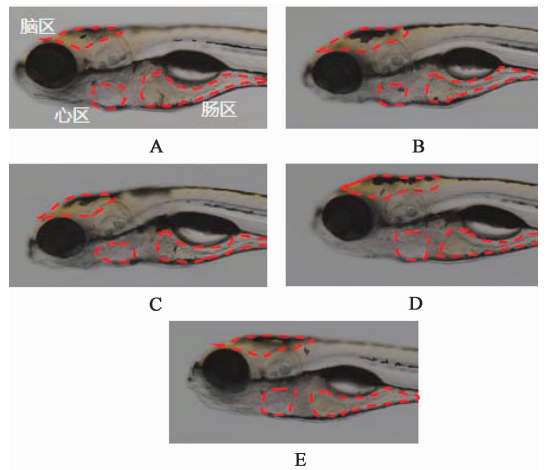


图 4 醋甘遂给药对斑马鱼心区、脑区和肠区形态变化的影响 (fluorescence microscope,  $\times 80$ )

Fig. 4 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on morphological changes in heart, brain and intestinal tract of zebrafish (fluorescence microscope,  $\times 80$ )

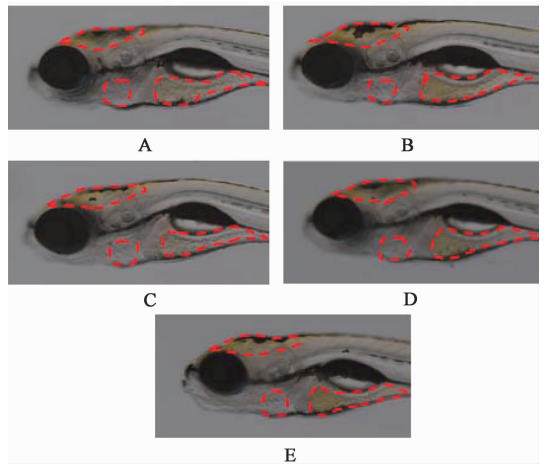


图 5 醋甘遂对斑马鱼恢复组心区、脑区和肠区形态变化的影响 (fluorescence microscope,  $\times 80$ )

Fig. 5 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on morphological changes in heart, brain and intestinal tract of recovered groups (fluorescence microscope,  $\times 80$ )

**3.2.7 肝脏病理损伤** 醋甘遂给药后对肝脏组织有一定的损害作用。空白组和溶剂组中,肝脏等区域细胞完整,细胞核明显,细胞质均匀。在醋甘遂  $\text{LC}_{10}$  浓度给药组中,肝脏细胞排列略松散,空泡现象略增多,显示有轻微的肝损伤。在恢复组中,肝损伤明显好转。见图 9。

#### 4 讨论

甘遂为 2015 年版《中国药典》收录的 83 种有毒中药之一,中医用为“峻下逐水药”,具有损伤肝细胞、致炎及促发肿瘤等毒性,对皮肤、黏膜和胃肠道均有严重的刺激作用<sup>[9]</sup>。其毒性成分主要为

表 3 醋甘遂石油醚提取物对斑马鱼相对心率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on relative heart rate of zebrafish ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	相对心率/%
给药	-	100.00 $\pm$ 6.66
	0.004	99.53 $\pm$ 5.33
	0.012	101.88 $\pm$ 5.44
	0.036	99.53 $\pm$ 9.34
	0.054	97.65 $\pm$ 8.22
恢复	-	100.00 $\pm$ 12.21
	0.004	98.98 $\pm$ 4.93
	0.012	101.52 $\pm$ 8.95
	0.036	105.08 $\pm$ 8.31
	0.054	102.54 $\pm$ 7.10

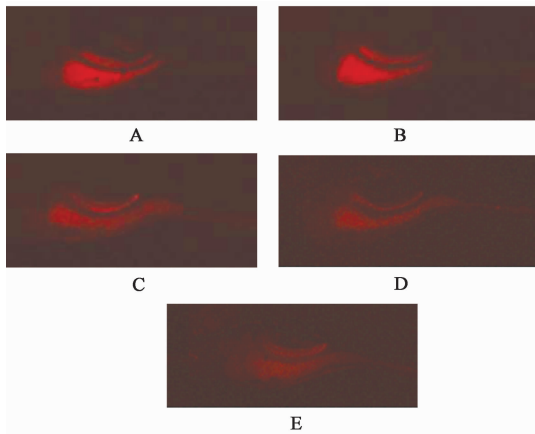


图 6 醋甘遂石油醚提取物给药对斑马鱼肠刺激的影响 (尼罗红,  $\times 80$ )

Fig. 6 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on intestinal irritation of zebrafish (nile red,  $\times 80$ )

表 4 醋甘遂石油醚提取物给药对斑马鱼肠染色相对荧光强度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on relative fluorescence intensity in zebrafish ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	相对荧光强度/%
空白	-	100.00 $\pm$ 9.69
醋甘遂石油醚提取物	0.004	101.08 $\pm$ 4.84
	0.012	82.21 $\pm$ 7.11 <sup>1,2)</sup>
	0.036	81.47 $\pm$ 2.60 <sup>1,2)</sup>
	0.054	83.60 $\pm$ 4.18 <sup>1,2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与醋甘遂石油醚提取物 0.004  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

萜类化合物<sup>[10]</sup>,甘遂醋制后萜类成分含量有所降低<sup>[11-13]</sup>。为了考察醋制后甘遂的毒副作用及毒性可逆性,实验利用斑马鱼幼鱼对醋甘遂进行毒性

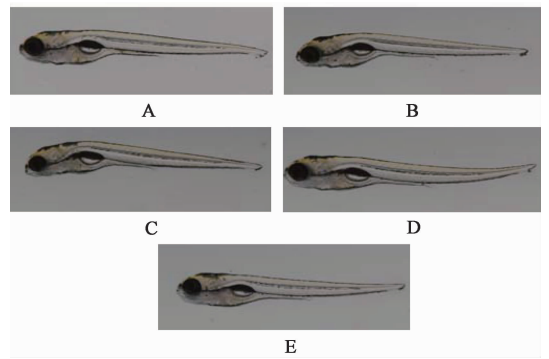


图 7 醋甘遂石油醚提取物给药对斑马鱼肾性水肿及其他毒性特征的影响 (fluorescence microscope,  $\times 30$ )

Fig. 7 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on renal edema and other toxic characteristics in zebrafish (fluorescence microscope,  $\times 30$ )

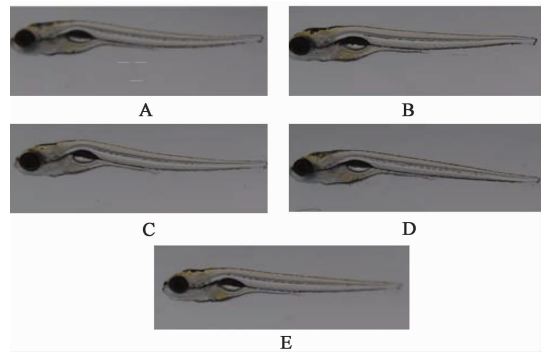
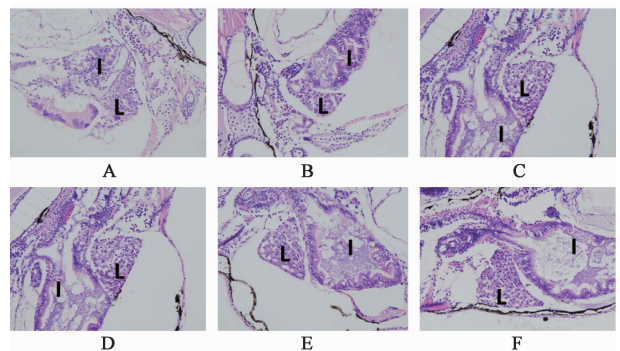


图 8 醋甘遂石油醚提取物恢复对斑马鱼肾性水肿及其他毒性特征的影响 (fluorescence microscope,  $\times 30$ )

Fig. 8 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on renal edema and other toxic characteristics in recovered groups (fluorescence microscope,  $\times 30$ )



L. 肝脏;I. 肠道;A. 空白给药组;B. 溶剂给药组;C. 醋甘遂石油醚提取物 0.054  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  给药组;D. 空白恢复组;E. 溶剂恢复组;F. 醋甘遂石油醚提取物 0.054  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  恢复组

图 9 醋甘遂石油醚提取物对斑马鱼幼鱼毒性的影响 (HE,  $\times 400$ )  
Fig. 9 Effect of vinegar-preparing Kansui Radix on toxicity of juvenile zebrafish larvae (HE,  $\times 400$ )

评价。

本文结果显示甘遂醋制后不同溶剂提取物中,毒性最大的部位为石油醚提取物,且该提取物的

毒性明显强于其他溶剂提取物。以醋制后甘遂石油醚提取物  $LC_{10}$ ,  $LC_1$ ,  $1/3 LC_1$  和  $1/10 LC_1$  为给药浓度,评价了其毒性特征,结果显示,主要毒性为肝毒性和胃肠道刺激性,肝毒性只造成了肝变性,且可逆性强,胃肠道刺激性在  $1/10 LC_1$  组中未表现出显著性差异,在其他浓度给药组中存在显著性差异。对于心脏、肾、神经、皮肤、眼、下颌、身体着色、鱼鳃发育、肌肉、鱼鳍等观察,均未有明显毒性损伤。

传统中药毒性体内评价多采用哺乳类动物为模型,体外评价多采用人源靶器官等正常细胞为模型。然而传统模型评价费用高、实验周期长,体内实验所需药材量大、灌胃给药量有限,常在达到最大给药量时仍不能检测到中药所造成的毒性作用,尤其是毒性较弱的中药,且高灌胃量使得模型动物出现食欲不振等现象,影响了毒性指标的观察。中药多为长期重复用药,前期动物实验不能有效的反映中药的潜在毒性作用。斑马鱼与哺乳动物具有相似的药物代谢系统和早期发育,利用斑马鱼代替还具有周期短、成本低,且幼鱼透明,在显微镜下可直接观察到药物对其的影响等优势,实验结果对哺乳动物实验具有指导意义<sup>[14]</sup>。实验首次以斑马鱼幼鱼为模型,单次给药,研究醋甘遂毒性,同时评价了其对心脏系统、肝脏、肾脏、神经系统、胃肠道等脏器系统的毒性作用及可逆性,为醋甘遂临床安全、合理用药提供依据,并为斑马鱼模型用于药物毒性快速评价提供参考与指导。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:131.  
[2] Zon L I, Peterson R T. *In vivo* drug discovery in the zebrafish[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(1): 35-44.  
[3] Neelkantan N, Mikhaylova A, Stewart A M, et al.

Perspectives on zebrafish models of hallucinogenic drugs and related psychotropic compounds[J]. *Acs Chem Neurosci*, 2013, 4(8):1137-1150.

[4] 王秀华,李曙光. 外用砷制剂引起急性中毒病例[J]. *中国卫生检验杂志*, 2002, 12(2):163.  
[5] 陈亨宇,付爱玲,赵宝全. 应用斑马鱼模型评价纳米粒子毒性机制的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(2):251-254.  
[6] LI C, LUO L, Awerman J, et al. *Whole zebrafish cytochrome P450 assay for assessing drug metabolism and safety// Zebrafish: methods for assessing drug safety and toxicity*[M]. John Wiley & Sons, Inc., 2011:103-115.  
[7] Beliaeva N F, Kashirtseva V N, Medvedeva N V, et al. Zebrafish as a model organism for biomedical studies[J]. *Biomed Khim*, 2010, 56(1):120-131.  
[8] Kanungo J, Cuevas E, Ali S F, et al. Zebrafish model in drug safety assessment[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20(34):5416-5429.  
[9] 曹亮亮,丁安伟,窦志华,等. 醋甘遂的研究进展[J]. *中成药*, 2015, 37(6):1317-1320.  
[10] ZHANG L, GAO L, LI Z, et al. Bio-Guided isolation of the cytotoxic terpenoids from the roots of *Euphorbia kansui* against human normal cell lines L-O2 and GES-1[J]. *Inter J Mol Sci*, 2012, 13(9):11247-11259.  
[11] 李征军,李媛,高兰,等. 甘遂不同炮制品中二萜类成分的变化研究[J]. *中成药*, 2011, 33(12):2122-2125.  
[12] 张丽,李征军,束晓云,等. HPLC法测定甘遂及其醋制品中3种二萜类成分[J]. *中草药*, 2010, 41(12):1987-1990.  
[13] 修彦凤,施贝,王海颖,等. 甘遂炮制前后量变成分的初步研究[J]. *上海中医药大学学报*, 2009, 23(1):67-70.  
[14] 赵崇军,田敬欢,王金凤,等. 斑马鱼在中药研究中的应用进展[J]. *中草药*, 2015, 46(17):2635-2648.

[责任编辑 张丰丰]