

基于斑马鱼模型的交泰丸安全性评价

张明哲¹, 陈章美¹, 莫柳英¹, 郝二伟¹, 侯小涛¹, 温晓燕², 邓家刚¹, 杜正彩^{1*}

(1. 广西中医药大学 科学实验中心, 药学院, 南宁 530200;

2. 多伦多大学 医学院, 多伦多 M5S 1A8)

[摘要] 目的:以斑马鱼胚胎为研究对象,观察交泰丸水提物对斑马鱼胚胎的生长发育毒性,心脏毒性及肝肾毒性,为交泰丸临床安全合理用药及新产品开发提供参考。方法:生长发育及心脏毒性实验以受精后12 h(hpf)发育正常的斑马鱼胚胎作为模型动物,以125,250,500 mg·L⁻¹交泰丸水提物培养上述胚胎,于受精后72 h(hpf)观察半数致死量及药物对胚胎心率及心脏形态学的影响;肝肾毒性实验以受精后72 h(hpf)发育正常的斑马鱼幼鱼作为模型动物,以125,250,500 mg·L⁻¹交泰丸水提物培养上述胚胎,于受精后7 d(dpf)观察半数致死量及药物对斑马鱼幼鱼形态学改变,检测丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性和肌酐含量。结果:生长发育毒性实验中空白组斑马鱼胚胎发育正常,心脏发育完好,心跳均匀有力。交泰丸水提物对斑马鱼胚胎72 h的半数致死量(LD₅₀)为1 023 mg·L⁻¹。与空白组胚胎比较,250,500 mg·L⁻¹交泰丸水提物组可以观察到胚胎头部变小,体长变短($P<0.05$),眼睛半径减小($P<0.05$),可见显著心包水肿,心率显著降低($P<0.01$),静脉窦-动脉球(SV-BA)间距明显增大($P<0.05$),心房、心室面积均明显减小($P<0.05$),瓣膜间距(AV channel)距离显著变大($P<0.01$),入血口距离显著变小($P<0.01$)。急性毒性实验中,交泰丸水提物对斑马鱼幼鱼72 h的LD₅₀为1 067 mg·L⁻¹;与空白组比较,交泰丸水提物可明显降低斑马鱼幼鱼体内ALT活性($P<0.05$)。结论:该实验发现交泰丸具有明显胚胎发育毒性,主要表现为生长发育延缓及严重的心脏毒性,对孕妇、哺乳期妇女及心脏病患者临床用药时应予以高度重视。

[关键词] 交泰丸;发育毒性;心脏毒性;肝毒性;肾毒性;激光共聚焦

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)18-0051-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201821

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200721.0820.001.html>

[网络出版日期] 2020-7-21 08:31

Safety Evaluation of Jiaotaiwan Based on Zebrafish Model

ZHANG Ming-zhe¹, CHEN Zhang-mei¹, MO Liu-ying¹, HAO Er-wei¹, HOU Xiao-tao¹, WEN Xiao-yan²,
DENG Jia-gang¹, DU Zheng-cai^{1*}

(1. College of Pharmacy, Guangxi Science Research Center of Traditional Chinese Medicine,
Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto M5S 1A8, Canada)

[Abstract] **Objective:** To take zebrafish embryo as the research object, in order to investigate the development toxicity, cardiotoxicity, liver toxicity and kidney toxicity of water extract of Jiaotaiwan (JTW) on zebrafish embryo. **Method:** Zebrafish embryos with normal development at 12 h (hpf) after fertilization were selected as model animals for the growth and cardiotoxicity experiments. The embryos were treated with 125, 250, 500 mg·L⁻¹ of JTW water extracts, and the effects of the drugs on the heart rate and morphology of the embryos and LD₅₀ were observed at 72 h (hpf) after fertilization. Zebrafish embryos with normal development at

[收稿日期] 20200711(003)

[基金项目] 广西中医药大学校级重点硕士研究生科研创新项目(YCSZ20190001,YCSZ20190022);广西中药药效研究重点实验室(省级)开放课题项目(17-259-20-P5);广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心

[第一作者] 张明哲,在读硕士,从事中药药理与中药新药研发研究,E-mail:zhangmingzhe184@163.com

[通信作者] *杜正彩,硕士,研究员,从事中药药效筛选及新产品开发研究,E-mail:duzhengcai8@163.com

72 h (hpf) after fertilization were used as model animals for the liver and kidney toxicity experiments. The embryos were treated with 125, 250, 500 mg·L⁻¹ of JTW water extracts, and the effect of the drugs on morphological changes, Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST) activity, and creatinine content of the larvae and LD₅₀ were observed at 72 d (dpf) after fertilization. **Result:** The zebrafish embryos in control group developed normally, the heart was well developed, and the heartbeat was even and powerful. The LD₅₀ of JTW water extract on zebrafish embryos for 72 h was 1 023 mg·L⁻¹. Compared with the embryos in the control group, 250, 500 mg·L⁻¹ treatment groups in the development toxicity had a smaller head, shorter body lengths ($P<0.05$), and decreased eye size ($P<0.05$). Compared with the control group embryos, the pericardial edema was observed in the 500 mg·L⁻¹ group, the heart rate was significantly decreased in the 250, 500 mg·L⁻¹ JTW water extract groups ($P<0.01$), the atrial and ventricular areas were significantly reduced ($P<0.05$), the distance of SV-BA became significantly larger ($P<0.05$), the distance of AV channel became significantly larger ($P<0.01$), and the in-flow distance was significantly shorter ($P<0.01$). In the acute toxicity experiment, the LD₅₀ of JTW water extract for zebrafish larvae for 72 h was 1 067 mg·L⁻¹. Compared with control group, JTW water extract significantly reduced ALT activity in zebrafish larvae ($P<0.05$). **Conclusion:** This experiment found that JTW has an obvious toxicity in embryonic development, which is mainly manifested as delayed growth and severe cardiotoxicity. Great attention shall be paid to clinical administration to pregnant women, lactating women and patients with heart disease.

[Key words] Jiaotaiwan; developmental toxicity; cardiotoxicity; liver toxicity; kidney toxicity; laser confocal

交泰丸出自明·韩懋《韩氏医通》，该方由黄连、肉桂组成。黄连苦寒入心，清降心火以下交肾水，为君药；肉桂辛热入肾，温升肾水以上济心火，为臣药。二者一寒一热，一阴一阳，合调阴阳，能使心肾水火阴阳相交^[1]。该方以其药简效佳被广泛应用于临床，是治疗中医临床“心肾不交”证经典方剂^[2]，现代临床多用于治疗失眠、更年期综合征、糖尿病及糖尿病并发症等^[3-6]，具有广泛的临床应用。在查阅交泰丸相关研究文献时发现，虽然对交泰丸的各方面药理作用及临床使用情况具有较深研究，但未见毒性相关研究报道。随着交泰丸药理作用的发掘，应用范围被拓宽，广泛应用于临床治疗中，关于交泰丸的毒性研究对于指导临床合理用药，降低药物不良反应等方面起到了至关重要的作用。因此对其毒理学研究及安全性评价的需求更为迫切。斑马鱼作为一种重要的模式动物，具有胚胎数量大，易获取，发育周期短，结构简单，实验成本低，胚胎透明易观察等优点^[7-9]，在高通量筛选、毒理学研究方面有其独特优势^[10]。斑马鱼在发育初期完全透明，荧光转基因斑马鱼 cmlc2:GFP 及 gz15Tg/(AB) 使得心脏及肝脏形态观察更加方便^[11-12]，并广泛用于毒理学研究。本文以荧光转基因斑马鱼为模型，对交泰丸水提物进行发育毒性、心脏毒性、肝脏毒性、肾脏毒性进行观察评价。

1 材料

1.1 动物 实验采用心脏荧光转基因斑马鱼 (cmlc2:GFP)，由加拿大多伦多大学温晓燕副教授馈赠。AB系野生型斑马鱼，gz15Tg/(AB)肝脏荧光蛋白转基因斑马鱼均由广西中医药大学中斑马鱼中药筛选联合实验室提供。斑马鱼饲养及繁殖参照 *The Zebrafish Book*。雌雄斑马鱼培养于 28 °C 水循环系统中，交配产卵时，于前 1 日下午将雌雄斑马鱼按 1:1 置于交配缸中并用隔板隔开。次日早上抽取隔板进行交配，抽取隔板 1 h 后收集受精卵，除去杂物、死卵、未受精卵后，将健康的受精卵置于 28 °C 培养箱中培养。本文涉及的动物实验符合广西中医药大学实验动物伦理委员会的相关规定。

1.2 药物 黄连(广东汇群中药饮片股份有限公司,批号 20171001);肉桂(南宁生源中药饮片有限责任公司,批号 20170901);两种饮片经广西中医药大学韦松基教授分别鉴定为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎,樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥树皮。

1.3 试剂 丁香油,二甲基亚砜(DMSO),马兜铃酸(Sigma公司,批号分别为 MKBZ4497V, 1400002089, WXBC8652V);二奎咻甲酸法(BCA)蛋白质定量试剂盒(Thermo公司,批号 UC281369);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶

(AST)试剂盒(BMR公司,批号分别为532,520);肌酐试剂盒(BioAssay Systems公司,批号BJ04A08)。

1.4 仪器 EP64C型1/10万电子分析天平(瑞士Ohaus公司);M205 FA型体视显微镜,TL300 Ergo型荧光倒置显微镜,LSM700型激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司);SpectraMax M5e型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

2 方法

2.1 交泰丸水提物(黄连-肉桂10:1)制备 取肉桂粗粉10 g,加8倍水浸泡1 h,蒸馏5 h,收集挥发油,蒸馏后的水溶液滤过另器收集;取黄连粗粉100 g,用10倍量的水浸泡1 h,肉桂药渣和黄连煎煮3次,第1次2 h,第2次1.5 h,第3次1 h。滤过,合并滤液与上述蒸馏水溶液,常压浓缩至1 mL相当于原药材1.2 g,将浓缩液在60 °C水浴蒸发水分得稠膏。干燥(60 °C)36 h,干膏研成粉末状,将肉桂挥发油与干膏粉混匀为实验药品,置4 °C冰箱保存。临用时精密称取实验药品约10 mg,用5%DMSO水溶液溶解成50 mg·L⁻¹的储备液,超声30 min溶解,配制完成后4 °C冰箱保存备用,实验前涡旋仪混匀,用5%DMSO水溶液稀释至实验所需浓度。稀释后将药物混悬液按1:9的比例加入胚胎水中。

2.2 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎生长发育毒性

2.2.1 药物处理 显微镜下选取正常发育受精后6~8 h的斑马鱼胚胎,并将其随机转移到含有培养液和不同浓度样品溶液的24孔板中,每孔10枚胚胎,设3个复孔。置于28 °C恒温培养箱中培养,每隔24 h更换1次含药培养液,培育至72 hpf。

2.2.2 斑马鱼胚胎半数致死量(LD₅₀)的测定 根据预实验,设置7个给药浓度,另设空白组,每个浓度3个复孔,给药后每24 h观察斑马鱼胚胎孵化及死亡情况并记录,重复3次实验。实验完成后,整理数据并进行分析,绘制量-毒曲线图,计算LD₅₀。

2.2.3 斑马鱼胚胎形态学测定 根据2.2.2项结果,适当选取低于LD₀的3个浓度,处理方式同2.2.1项,处理后72 h的斑马鱼胚胎,移去含药培养液,用胚胎培养水清洗3次后转移至盛有3%甲基纤维素钠水溶液的培养盘中,于体视显微镜下拍照,并用Diano scope软件进行分析,对斑马鱼胚胎的体长,眼睛大小进行测量。

2.3 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎心脏毒性评价

2.3.1 样品对斑马鱼胚胎心跳的影响 将不同给药组处理后72 h的斑马鱼胚胎,移去含药培养液,用胚胎培养水清洗3次后转移至盛有3%甲基纤维

素钠水溶液的培养盘中,于体视显微镜下观察并录制视频,并用Diano scope软件进行分析。

2.3.2 斑马鱼胚胎心脏形态学观察 将不同给药组处理后72 h的斑马鱼胚胎,移去含药培养液,用胚胎培养水清洗3次后转移至盛有3%甲基纤维素钠水溶液的培养盘中,并加入适量鱼安定,使心脏停止跳动,于体视显微镜下观察并拍照。拍照后固定,用共聚焦扫描显微镜对斑马鱼心脏进行拍照,并利用Image J软件对静脉窦-动脉球(SV-BA)间距,心包、心房、心室面积,瓣膜间距(AV channel)及入血口(In flow)距离进行统计分析。

2.4 交泰丸水提物对斑马鱼幼鱼LD₅₀测定

2.4.1 药物处理 显微镜下选取正常发育受精后4 dpf的斑马鱼胚胎,并将其随机转移到含有培养液和不同浓度样品溶液的24孔板中,每孔10枚胚胎,设3个复孔。置于28 °C恒温培养箱中培养,每隔24 h更换1次含药培养液,培育至7 dpf。

2.4.2 斑马鱼幼鱼半数致死量的测定 根据预实验情况,设置合适的7个给药浓度,每个浓度3个复孔,给药后每24 h观察斑马鱼胚胎死亡情况并记录,重复3次实验。实验完成后,整理数据并进行分析,绘制量-毒曲线图,计算LD₅₀。

2.5 交泰丸水提物对斑马鱼幼鱼肝肾毒性测定

2.5.1 斑马鱼幼鱼形态学观察 根据2.4.2项实验结果,适当选取低于LD₀的3个浓度,处理方式同2.4.1项,另增加何首乌提取物^[13-14]100 mg·L⁻¹及马兜铃酸^[15-16]8 mg·L⁻¹组作为阳性药组。处理后72 h的斑马鱼幼鱼,移去含药培养液,用胚胎培养水清洗3次后转移至盛有3%甲基纤维素钠水溶液的培养盘中,于荧光显微镜下拍照。

2.5.2 斑马鱼幼鱼肝、肾生化指标测定 显微镜下选取正常发育受精后4 dpf的斑马鱼胚胎,并将其随机转移到含有培养液和不同浓度样品溶液的12孔板中,每孔30枚胚胎,设3个复孔,给药浓度同2.5.1项。置于28 °C恒温培养箱中培养,每隔24 h更换1次含药培养液,培育至7 dpf,移去含药培养液,用胚胎培养水清洗3次后转移至1.5 mL离心管中,吸干水分后迅速转移至干冰中,待斑马鱼幼鱼完全冷冻后再转移至-80 °C冰箱中保存,随后按照试剂盒的相关步骤进行ALT,AST酶活性测定及肌酐含量测定。

2.6 统计学分析 数据使用GraphPad Prism 7.0及SPSS 20.0软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素

方差分析分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎 72 h 的 LD₅₀ 的测定 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎 72 h 的 LD₅₀ 为 1 023 mg·L⁻¹。见图 1。

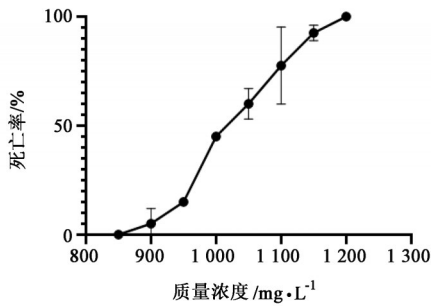
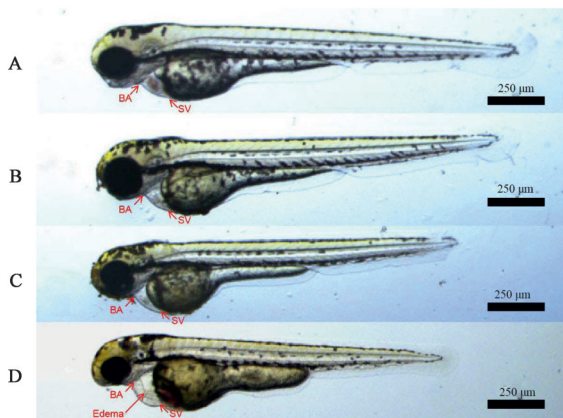


图1 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎的量-毒曲线
Fig. 1 Concentration-toxicity curve of water extract of Jiaotaiwan (JTW) on zebrafish embryos

3.2 对斑马鱼胚胎生长发育的影响 空白组斑马鱼胚胎发育正常, 状态良好, 无死亡现象。与空白组比较, 交泰丸各给药组, 125 mg·L⁻¹ 未见明显形态学改变, 250, 500 mg·L⁻¹ 给药组可以观察到头部变小, 体长变短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 眼睛半径减小 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明交泰丸水提物可延缓发育, 且呈一定的剂量依赖性。见图 2, 表 1。



A. 空白组; B~D. 交泰丸低、中、高剂量组
图2 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎形态的影响
Fig. 2 Effect of water extract of Jiaotaiwan (JTW) on zebrafish embryo morphology

3.3 对斑马鱼胚胎心脏的影响

3.3.1 对斑马鱼胚胎心脏发育的影响 空白组斑马鱼胚胎发育正常, 心脏发育完好, 未见心包水肿。交泰丸各给药组, 250 mg·L⁻¹ 组开始出现轻微的心脏水肿, 500 mg·L⁻¹ 组可见明显的心包水肿。表明交泰丸水提物在剂量较高的组别中, 对斑马鱼胚胎

表1 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎体长、眼睛大小的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 1 Effect of water extract of JTW on zebrafish embryo body length and eye size ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	体长/mm	眼睛大小/μm ²
空白	-	17.48±0.39	16 971.95±867.34
交泰丸	125	17.20±0.46	16 339.82±694.08
	250	16.04±0.69 ²⁾	15 901.46±663.29 ¹⁾
	500	14.73±0.27 ²⁾	15 554.89±947.22 ²⁾

注: 与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

心脏发育有一定影响, 显示出心脏毒性。见图 2。

3.3.2 对斑马鱼胚胎心率的影响 利用显微镜录像功能, 拍取 1 min 斑马鱼胚胎的录像, 导入 Danio scope 软件进行分析, 统计各给药组斑马鱼胚胎心跳。空白组斑马鱼胚胎心跳平稳, 搏动有力, 每分钟心率为 (138.36±8.06) 次, 见图 1。与空白组比较, 交泰丸 250, 500 mg·L⁻¹ 组心率显著降低 ($P < 0.01$), 且呈一定的剂量依赖性, 见表 2。

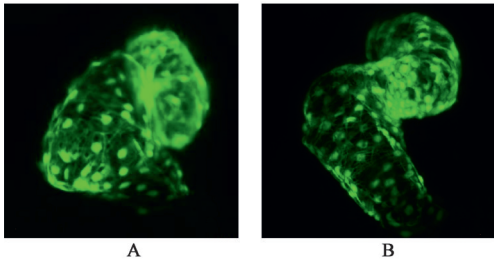
表2 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎心率及 SV-BA 间距的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 2 Effect of water extract of JTW on heart rate and distance of SV-BA of zebrafish embryos ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	心率/bpm	SV-BA 间距/μm
空白	-	138.36±8.06	218.49±42.54
交泰丸	125	128.91±4.16	272.47±52.84 ²⁾
	250	113.34±6.29 ²⁾	289.37±41.44 ²⁾
	500	87.90±12.81 ²⁾	342.93±55.65 ²⁾

3.3.3 对斑马鱼胚胎心脏形态学的影响 通过激光共聚焦显微镜对斑马鱼心脏进行扫描, 每个心脏扫描 20 层, 将扫描结果组合得到斑马鱼胚胎心脏 3D 图片, 见图 3。与空白组比较, 交泰丸水提物 250 mg·L⁻¹ 组斑马鱼胚胎心脏形态发生明显变化, 心房心室拉长。并利用 Image J 软件测量 SV-BA 间距, 心房、心室面积、瓣膜间距及入血口距离对斑马鱼胚胎心脏形态进行评价, 见图 4。与空白组比较, 交泰丸各组斑马鱼胚胎心脏的 SV-BA 间距明显增大 ($P < 0.05$), 心房、心室面积均明显减小 ($P < 0.05$), 瓣膜间距显著变大 ($P < 0.01$), 入血口距离显著变小 ($P < 0.01$), 表明给药后斑马鱼胚胎心脏形态发生改变。见表 3, 4。

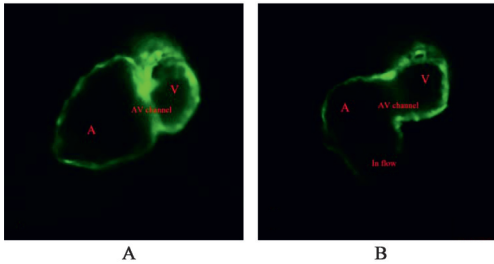
3.4 对斑马鱼幼鱼 72 h 的 LD₅₀ 的测定 交泰丸水提物对斑马鱼幼鱼 72 h 的 LD₅₀ 为 1 067 mg·L⁻¹,



A. 空白组; B. 交泰丸水提物 250 mg·L⁻¹组(图4同)

图3 斑马鱼胚胎心脏激光共聚焦扫描3D拟合

Fig. 3 3D fitting of laser confocal scanning of zebrafish embryo heart



图中A. 心房; V. 心室; AV channel. 瓣膜; In flow. 入血口

图4 斑马鱼胚胎心脏激光共聚焦扫描

Fig. 4 Laser confocal scanning of zebrafish embryos heart

表3 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎心脏心房、心室面积的影响($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 3 Effect of water extract of JTW on atrial and ventricular area of zebrafish embryo heart($\bar{x}\pm s$, n=5)

区域	组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	面积/ μm^2
心房	空白	-	8 763.12±480.87
	交泰丸	250	7 111.93±1122.82 ¹⁾
心室	空白	-	4 842.63±318.79
	交泰丸	250	3 963.59±394.91 ¹⁾

表4 交泰丸水提物对斑马鱼胚胎心脏瓣膜间距、入血口距离的影响($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 4 Effect of water extract of JTW on distance of AV channel and in-flow of zebrafish embryo heart($\bar{x}\pm s$, n=5)

区域	组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	距离/ μm
瓣膜间距	空白	-	28.38±1.96
	交泰丸	250	34.96±1.55 ²⁾
入血口距离	空白	-	55.21±1.59
	交泰丸	250	45.52±5.66 ²⁾

见图5。

3.5 对斑马鱼幼鱼形态学的影响 空白组斑马鱼胚胎发育正常, 状态良好, 无死亡现象, 肝脏荧光显示肝脏呈马鞍形, 发育良好, 且未见水肿。与空白组比较, 何首乌提取物肝脏形态发生明显改变, 提示具有肝毒性; 马兜铃酸组可见明显水肿, 可能是

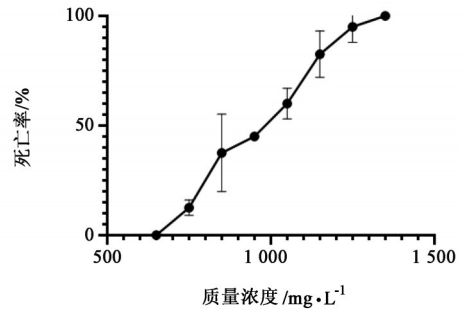
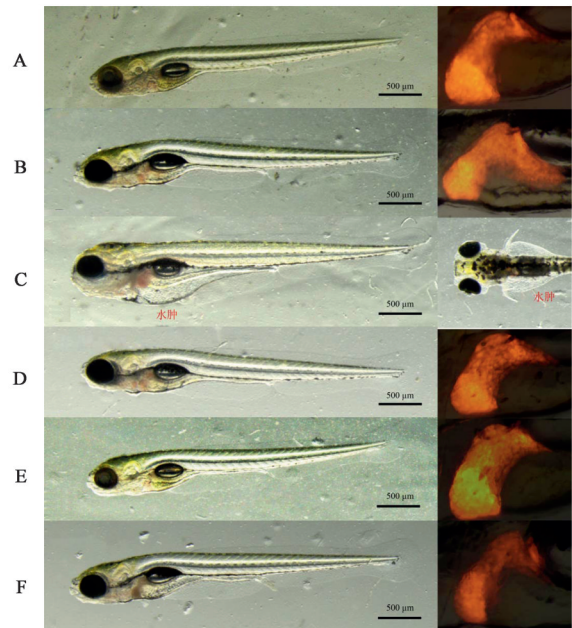


图5 交泰丸水提物对斑马鱼幼鱼的量-毒曲线

Fig. 5 Concentration-toxicity curve of water extract of JTW on zebrafish larvae

由于肾脏损伤导致的代谢功能障碍从而导致水肿, 提示可能具有肾毒性。交泰丸水提物交泰丸各给药组, 肝脏未见明显形态学改变, 肝脏发育良好, 同时未见水肿。见图6。



A. 空白组; B. 何首乌水提物; C. 马兜铃酸; D~F. 交泰丸低、中、高剂量组; 左侧为各组斑马鱼幼鱼明场, 右侧马兜铃酸组为斑马鱼幼鱼俯视图, 其余为肝脏荧光

图6 交泰丸水提物对斑马鱼幼鱼形态学的影响

Fig. 6 Effect of water extract of JTW on morphology of zebrafish larvae

3.6 对斑马鱼幼鱼肝脏ALT, AST活性的影响 结果表明, 与空白组比较, 交泰丸水提物对AST的活性没有明显影响, 但可明显降低斑马鱼幼鱼体内ALT活性($P<0.05$, $P<0.01$)。见表5。

3.7 对斑马鱼幼鱼肾脏肌酐含量的影响 与空白组比较, 交泰丸水提物处理对斑马鱼幼鱼体内肌酐含量没有明显影响, 表明交泰丸水提物对斑马鱼没

表 5 交泰丸水提物对斑马鱼幼鱼体内 ALT, AST 活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 5 Effect of water extract of JTW on ALT and AST activity in zebrafish larvae ($\bar{x}\pm s, n=20$) U·L⁻¹

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	ALT	AST
空白	-	25.25±1.62	29.25±4.87
何首乌水提物	200	52.31±1.61 ²⁾	51.09±2.18 ²⁾
交泰丸	125	17.94±0.79 ²⁾	22.80±1.35
	250	20.99±1.57 ¹⁾	23.09±1.14
	500	20.18±2.03 ¹⁾	26.90±5.70

有明显肾毒性。见表 6。

表 6 交泰丸水提物对斑马鱼幼鱼体内肌酐含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 6 Effect of water extract of JTW on creatinine content in zebrafish larvae ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	肌酐 /mg·L ⁻¹
空白	-	0.52±0.06
马兜铃酸	8	1.07±0.13 ²⁾
交泰丸	125	0.55±0.06
	250	0.46±0.04
	500	0.39±0.05

4 讨论

中医药是中华民族的文化瑰宝之一,为我国人民身体健康做出了巨大的贡献,在长期的临床实践中,形成了许许多多行之有效的经典名方。是药三分毒,中药的安全性近年来也越来越受到人们的关注与重视。目前我国绝大部分中药的现代毒理学研究资料是缺失的,因此,尽快对常用单味中药与市售中成药及常用经典名方开展系统的安全性评价研究显得尤为迫切与重要。

斑马鱼作为一类脊椎模式动物,具备体型小、繁殖率高、传代周期短、体外受精发育、胚胎透明、饲养管理方便等优势,在毒理学研究领域发挥着越来越重要的作用^[17-18]。同时斑马鱼的胎心类似于人类胚胎的心脏,分为心房和心室,房室之间有瓣膜,因而为研究人类心血管系统提供了一类较好的模型^[19]。而且,斑马鱼幼鱼早期发育存活不完全依赖于血液循环,可用显微镜直接观察活鱼卵心脏的明显形态和功能缺陷,或通过分子标记物来识别细微差别^[20-21]。伴随显微镜技术与计算图像信息处理技术的发展与荧光转基因斑马鱼的培育成功,对斑马鱼心率与器官形态都实现了自动量化采集与处理^[22-23]。因此,利用斑马鱼研究药物胚胎发育毒性

与心脏等器官毒性具体独特优势。且斑马鱼模型现已广泛应用于包括急性毒性、发育毒性与致畸性、心血管毒性、肝毒性、神经毒性、肾毒性、行为毒性和生殖毒性等在内的一系列药物毒性评价中^[24-25]。2009年欧洲斑马鱼药物筛选技术服务公司 Biobide 获得了美国食品与药品管理局(FDA)和欧洲药品评估局(EMA)的 GLP 认证,标志着斑马鱼药物毒理学与安全性评价模型在药物研发中已经得到了欧美国家政府的正式认可。

交泰丸为临床常用经典方剂,对于治疗心肾不交型失眠具有很好的疗效^[26]。近年来有临床及药理研究表明,交泰丸还具有治疗抑郁、老年性痴呆及糖尿病并发症等作用。但对于交泰丸毒性的研究鲜有报道,由于在前期实验中发现交泰丸对于斑马鱼胚胎具有一定的毒性作用,所以进行进一步探究。本文研究结果显示交泰丸水提物对斑马鱼胚胎及幼鱼的 LD₅₀均>1 g·L⁻¹,远>1 mg·L⁻¹的参考值,因此是较为安全的。但在毒性剂量下,交泰丸水提物可显著减缓斑马鱼胚胎发育,同时对心脏形态学及功能性上也具有显著影响,可减慢心率,引起心包水肿,通过 SV-BA 间距的测量及激光共聚焦扫描可明显发现心脏狭长畸形,提示交泰丸水提物具有明显的发育毒性及心脏毒性。AST, ALT 与肌酐水平在临床上反映肝功能与肾功能,当肝功能受损时氨基转移酶通常会升高,肌酐含量明显增加时提示肾功能受损。本文实验结果显示交泰丸水提物不同剂量对斑马鱼肝脏,肾脏形态未发生明显影响,也未出现水肿情况,同时 ALT, AST, 肌酐水平也未见明显升高,因此初步估计交泰丸水提物对斑马鱼无明显肝、肾毒性。有研究发现交泰丸药物中黄连的生物碱类成分可能具有心脏毒性,其中小檗碱、氧化小檗碱、小檗胺和巴马汀可以导致心肌细胞的心律失常与心脏骤停。因此这些化合物可能是交泰丸对斑马鱼幼鱼心脏毒性的物质基础^[27],这与本研究结果相印证。因此,临床中使用含有黄连的方剂,特别是使用交泰丸时应予以高度重视,建议孕妇哺乳期妇女应该禁用、婴幼儿及有心脏疾病患者应慎用。关于交泰丸的安全性还有待进一步深入系统研究,在多种动物模型上进行验证,并对作用机制进行探究,为临床安全合理用药提供科学参考。

[参考文献]

[1] 祝建材. 从交泰丸谈“心肾相交理论”[J]. 中国中医

- 基础医学杂志, 2017, 23(1): 117-118.
- [2] 翁剑平. 交泰丸治疗心肾不交型不寐症的临床疗效研究[D]. 杭州:浙江中医药大学, 2019.
- [3] 陈志亮. 斑马鱼在药物筛选中的应用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1235-1239.
- [4] 李娟娥, 姜小帆. 交泰丸对糖尿病小鼠认知功能障碍的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 23-27.
- [5] 王雪萍, 张皓月, 王婷, 等. 交泰丸中小檗碱联合 cinnamtannin D₁ 的降血糖作用[J]. 中成药, 2018, 40(12): 2613-2618.
- [6] 雒明池, 梁如, 高杉, 等. 基于 NO-cGMP 信号转导通路交泰丸对慢性温和不可预知性应激抑郁大鼠的抗抑郁作用研究[J]. 中草药, 2018, 49(18): 4344-4348.
- [7] 雒明池, 梁如, 高树明, 等. 基于 cAMP-CREB-BDNF 信号通路探讨交泰丸抗抑郁的作用机制[J]. 天津中医药, 2018, 35(5): 365-369.
- [8] GERLAI R, LEE V, BLASER R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006, 85(4): 752-761.
- [9] ZON L I, PETERSON R T. *In vivo* drug discovery in the zebrafish[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(1): 35-44.
- [10] 罗隽, 梅雪, 夏青, 等. 醋甘遂不同提取物对斑马鱼幼鱼的毒性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 160-166.
- [11] 彭夕洋, 陈婷芳, 黄婷, 等. 心脏特异表达绿色荧光斑马鱼模型的建立与评估[J]. 遗传, 2013, 35(4): 411-418.
- [12] LI S, JIANG Y, SUN Q, et al. Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2020, 241: 125-129.
- [13] DING Y J, CHEN Y H. Developmental nephrotoxicity of aristolochic acid in a zebrafish model [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 261(1): 59-65.
- [14] DINH Y J, SUN C Y, WEN C C, et al. Nephroprotective role of resveratrol and ursolic acid in aristolochic acid intoxicated zebrafish [J]. *Toxins*, 2015, 7(1): 97-109.
- [15] 全云云, 周忆梦, 刘美辰, 等. 斑马鱼模型筛选何首乌肝毒性的物质基础[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 52-57.
- [16] 全正扬, 孙震晓. 基于斑马鱼模型的何首乌水提取物及其主要成分的肝毒性研究[J]. 中国药物警戒, 2018, 15(1): 1-5.
- [17] HILL A J, TERAOKA H, HEIDEMAN W, et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 86(1): 6-19.
- [18] SEGNER H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2009, 149(2): 187-195.
- [19] 曹雨诞, 张楷承, 姚芳, 等. 京大戟醋制前后对斑马鱼胚胎心脏的毒性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 73-77.
- [20] WARREN K S, FISHMAN M C. "Physiological genomics": mutant screens in zebrafish [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(1 Pt 2): H1-H7.
- [21] PARNG C, SENG W L, SEMINO C, et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2002, 1(1Pt1): 41-48.
- [22] LOMBÓ M, GONZÁLEZ-ROJO S, FERNÁNDEZ-DÍEZ C, et al. Cardiogenesis impairment promoted by bisphenol A exposure is successfully counteracted by epigallocatechin gallate [J]. *Environ Pollut*, 2019, 246: 1008-1019.
- [23] YANG Y X, LI B B, ZHANG X, et al. The zinc finger protein *Zfpml* modulates ventricular trabeculation through Neuregulin-ErbB signalling [J]. *Dev Biol*, 2019, 446(2): 142-150.
- [24] HUNG M W, ZHANG Z J, LI S, et al. From omics to drug metabolism and high content screen of natural product in zebrafish: a new model for discovery of neuroactive compound [J]. *Evid-Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 605303.
- [25] 张勇, 贺剑辉, 刘洪翠, 等. 斑马鱼在药物临床前毒理学研究中的应用进展及现状[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 482-483.
- [26] 钱拉拉, 张红, 翁金月, 等. 交泰丸结合针刺治疗心肾不交型失眠的疗效及对血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(3): 525-527.
- [27] ZHANG M Y, YU Y Y, WANG S F, et al. Cardiotoxicity evaluation of nine alkaloids from, *Rhizoma Coptis* [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2018, 37(2): 185-195.

[责任编辑 张丰丰]