

· 毒理 ·

氯化两面针碱和羟基喜树碱对斑马鱼胚胎发育的影响

黄惠琳¹, 刘华钢^{2*}, 蒙怡², 金秋²

(1. 广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021; 2. 广西医科大学, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 研究氯化两面针碱和羟基喜树碱对斑马鱼发育的影响。方法: 氯化两面针碱(NC)分成 5.00, 3.15, 2.00, 1.58, 1.12 mg·L⁻¹等 5 个含药剂量组, 各组的 DMSO 终浓度为 0.01%, 并设含 0.01% DMSO 的孵化液组及对照组(纯孵化液组)。羟基喜树碱(HCPT)分为 16.00, 10.00, 6.50, 4.00, 2.50 mg·L⁻¹ 5 个含药剂量组, 各组的 DMSO 终浓度为 0.01%。并设对照组(纯孵化液组)及含 0.01% DMSO 的孵化液组。在显微镜下将正常发育 6 h(6 hpf)和 48 h(48 hpf)的斑马鱼胚胎, 随机分入以上各组中, 每个实验组 20 颗胚胎。观察药物处理至 72 hpf 时, 胚胎的死亡和畸形情况。**结果:** 氯化两面针碱的 6 hpf 实验组中, 半数致死浓度(LC₅₀)为 1.66 mg·L⁻¹, 半数致畸效应浓度(EC₅₀)为 1.33 mg·L⁻¹; 48 hpf 实验组中, LC₅₀为 2.51 mg·L⁻¹, EC₅₀为 2.02 mg·L⁻¹。羟基喜树碱的 6 hpf 实验组中, LC₅₀为 4.21 mg·L⁻¹, EC₅₀为 3.29 mg·L⁻¹; 48 hpf 实验组中, LC₅₀为 7.70 mg·L⁻¹, EC₅₀为 6.18 mg·L⁻¹。斑马鱼胚胎的死亡率和畸形率随着氯化两面针碱和羟基喜树碱药物浓度的降低和给药时间的推迟而显著降低($P < 0.01$)。**结论:** 6 hpf 胚胎对氯化两面针碱和羟基喜树碱的药物敏感性均大于 48 hpf; 氯化两面针碱对斑马鱼胚胎的发育毒性大于羟基喜树碱。

[关键词] 氯化两面针碱; 羟基喜树碱; 斑马鱼; 胚胎毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0238-04

Effect of Nitidine Chloride and Hydroxycamptothecine on Development of Zebrafish Embryo

HUANG Hui-lin¹, LIU Huang-gang^{2*}, MENG Yi², JIN Qiu²

(1. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China;

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of nitidine chloride(NC) and hydroxycamptothecine(HCPT) on the development of zebrafish embryo. **Method:** The 6 h and 48 h post-fertilization zebrafish embryos were randomly treated with NC (5.00, 3.15, 2.00, 1.58, 1.12 mg·L⁻¹) and HCPT (16.00, 10.00, 6.50, 4.00, 2.50 mg·L⁻¹). The death rate and malformation rate of zebrafish embryos were observed after 72 h. **Result:** 50% lethal concentration (LC₅₀) of was 1.66 mg·L⁻¹ and 50% malformation effect concentration (EC₅₀) was 1.33 mg·L⁻¹ in NC 6 hpf group. LC₅₀ was 2.51 mg·L⁻¹ and EC₅₀ was 2.02 mg·L⁻¹ in NC 48 hpf group. In HCPT 6 hpf group, LC₅₀ was 4.21 mg·L⁻¹, EC₅₀ was 3.29 mg·L⁻¹; LC₅₀ was 7.70 mg·L⁻¹, EC₅₀ was 6.18 mg·L⁻¹ in the HCPT 48 hpf group. Death rate and malformation rate were decreased when the drugs concentration reduced and test time were delayed. **Conclusion:** zebrafish embryos of 6 hpf are more sensitive to NC and HCPT than embryos of 48 hpf; both NC and HCPT can cause embryotoxicity to zebrafish; NC is more toxic to the development of zebrafish embryos than HCPT.

[Key words] nitidine chloride; hydroxycamptothecine; zebrafish; embryotoxicity

[收稿日期] 20110311(012)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 0815007-2-5)

[第一作者] 黄惠琳, 药师, 硕士研究生, 从事中药药理学作用机制的研究, Tel: 13617814485, E-mail: happycow4444@sina.com

[通讯作者] * 刘华钢, 博士, 教授, 从事中药新剂型、新制剂及中药药理学作用机制的研究, E-mail: hgliu@263.net

氯化两面针碱(nitidine chloride, NC)是从广西特有药用植物芸香科花椒属植物两面针的干燥根中提取的一种生物碱,属苯并菲类。近年来的研究表明该生物碱有抗肿瘤活性,能抑制 Lewis 肺癌、人体鼻咽癌、肝癌等癌症的发展^[1]。此外 NC 还可以抑制人肺癌 SPC-A-1、舌癌 Tca8113 细胞的增殖,促进细胞凋亡^[2]。刘丽敏实验表明,氯化两面针碱对部分耐药细胞株表现出生长抑制的作用,耐药因子(RF)为 1.03,显著低于阿霉素(ADR)、长春新碱(VCR)和氟尿嘧啶(5-FU)的 RF^[3]。实验研究表明,氯化两面针碱可以明显抑制 Topo I, Topo II 的催化活性,并呈现出较好的量-效关系^[4]。

羟基喜树碱是从珙桐科植物喜树中提取的微量生物碱,是一种新型有效的抗肿瘤药物,是一种拓扑异构酶抑制剂,可通过抑制 DNA 拓扑异构酶 I 的活性达到治疗恶性肿瘤的目的,其不良反应较其他化疗药物轻,在许多国家获得广泛的临床应用,是美国食品及药物管理局(FDA)批准临床使用的药物^[5-6]。本实验通过观察二药物对斑马鱼胚胎发育的影响,初步了解二药的药物安全性,为安全用药提供初步研究资料。

1 材料

1.1 动物 斑马鱼由北京大学提供,为德国 Tubingen 品系。养殖根据 Zebrafish book 中描述的方法进行^[7],鱼房内光照和黑暗的比例为 14/10,成年斑马鱼雌雄分开饲养,并定时喂以饲料。实验前天晚上,将雌雄以 1:2 移入产卵缸,并用隔板将雌雄分开。次日清晨,移去隔板,雄鱼追逐雌鱼后,约 30 min 便可收集胚胎。胚胎用养鱼水清洗干净后,转入一次性消毒平板培养皿中。于 28.5 °C 恒温水浴箱中对胚胎进行控光培养,根据实验要求选取合适的发育时段。受精卵按照 Kinmmel^[8]等描述对发育阶段分期。

1.2 试剂及仪器 氯化两面针碱(纯度 >98.5%)购自天津中新药业研究中心;注射用羟基喜树碱(纯度 >99%)购自黄石李时珍药业;体视显微镜,型号 XTL-165-VT,江西凤凰光学有限公司。

2 方法

2.1 试剂配制 氯化两面针碱用二甲亚砜(DMSO)助溶,将其配成贮存液,避光置于 -20 °C 冰箱。实验时再稀释到所需浓度。

斑马鱼培养液参照 Zebrafish Book 标准配制

(0.137 mol·L⁻¹ NaCl, 5.4 mmol·L⁻¹ KCl, 0.25 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.44 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 1.3 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 1.0 mmol·L⁻¹ MgSO₄, 4.2 mmol·L⁻¹ NaHCO₃)。

根据预实验,按照等对数浓度,将氯化两面针碱药物稀释成 5.00, 3.15, 2.00, 1.58, 1.12 mg·L⁻¹ 等 5 个含药剂量组,各组所含 DMSO 终浓度为 0.01%。并设纯孵化液组(对照组)及含 0.01% DMSO 的孵化液组。

羟基喜树碱药物浓度设定为 16.00, 10.00, 6.50, 4.00, 2.50 mg·L⁻¹ 等 5 个含药剂量组,各组的 DMSO 终浓度为 0.01%。另设对照组(纯孵化液组)及含 0.01% DMSO 的孵化液组。

2.2 胚胎的处理 在体视显微镜下挑选正常发育 6 h(6 hpf)和 48 h(48 hpf)的斑马鱼胚胎,随机移入 96 孔板的样孔中,每孔 1 枚,样孔中预先加入配好药液,每次 7 个实验组,每组 20 个重复,药物暴露 72 h。为尽量减少实验误差,以上实验重复 3 遍,所用胚胎为同一批受精胚胎。

2.3 检测指标及判断标准 观察的指标有: I 类指标(致死性指标):卵凝结,无心跳,不孵化; II 类指标(揭示受试药物特定的作用方式的非致死性指标):无血液循环,发育畸形、孵化延迟^[9]。

2.4 数据处理 采用概率单位法分析斑马鱼胚胎在不同药物浓度,不同给药时间下,药物暴露 72 h 后,氯化两面针碱及羟基喜树碱的药物半数致死浓度及半数致畸浓度;用 SPSS 13.0 卡方检验对各组间死亡率和畸形率进行比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 氯化两面针碱作用于斑马鱼胚胎的死亡率和畸形率 氯化两面针碱的 6 hpf 实验组中,药物暴露 72 h 后,各给药组中均观察到卵凝结,无血液循环,发育畸形、孵化延迟的现象。其中 5 mg·L⁻¹ 组中,死亡率和畸形率均达到 100%,表现出很强的胚胎毒性。对照组胚胎发育正常,按时出膜。含药实验组与对照组相比,死亡率和畸形率差异均有统计学意义($P < 0.01$)。此时的 LC₅₀ 为 1.66 mg·L⁻¹, EC₅₀ 为 1.33 mg·L⁻¹。含 0.01% DMSO 的孵化液组与对照组相比,差异无统计学意义,说明了 DMSO 的浓度在 0.01% 时,不会对实验结果造成显著影响。48 hpf 实验组中,各组胚胎出现了不同程度的死亡和畸

形,胚胎的出膜时间及孵化时间较对照组的延迟,部分胚胎还出现无法出膜的现象。另外,药物还使胚胎出现不同程度的脊柱弯曲。见图 1。给药组死亡率和畸形率与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。此时的 LC_{50} 为 $2.51 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, EC_{50} 为 $2.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 1)。6 hpf 和 48 hpf 实验组中,胚胎的死亡率和畸形率随着氯化两面针碱浓度的增加而增大,呈现出量效关系。对比 6 hpf 与 48 hpf 实验组的结果,6 hpf 的斑马鱼胚胎对氯化两面针碱的药物敏感性大于 48 hpf 的胚胎。

3.2 羟基喜树碱作用于斑马鱼胚胎的死亡率和畸形率 羟基喜树碱的 6 hpf 实验组中,药物暴露 72 h 后,观察到卵凝结,无血液循环,发育畸形、孵化延迟

等现象。见图 1。其中 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组中,死亡率和畸形率均达到 100%,表现出很强的胚胎毒性。各含药实验组与对照组相比,死亡率和畸形率均具有极显著差异($P < 0.01$)。此时的 LC_{50} 为 $4.21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, EC_{50} 为 $3.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。48 hpf 实验组中,各给药组的胚胎均出现不同程度的死亡和畸形,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。此时的 LC_{50} 为 $7.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, EC_{50} 为 $6.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2)。6 hpf 和 48 hpf 实验组中,胚胎的死亡率和畸形率随着羟基喜树碱浓度的增加而增大,呈现出量效关系。对比 6 hpf 与 48 hpf 实验组的结果,6 hpf 的斑马鱼胚胎对羟基喜树碱的药物敏感性大于 48 hpf 的胚胎。

表 1 氯化两面针碱作用于斑马鱼的胚胎毒性($n = 60$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6 hpf 暴露组		48 hpf 暴露组	
		死亡率/%	畸形率/%	死亡率/%	畸形率/%
NC	5	100 ^{1,2)}	100 ^{1,3)}		80 ^{1,3)}
	3.15	75 ^{1,2)}	80 ^{1,3)}	55 ^{1,2)}	60 ^{1,3)}
		65 ^{1,2)}	75 ^{1,3)}	45 ^{1,2)}	55 ^{1,3)}
	1.58	40 ^{1,2)}	55 ^{1,3)}	30 ^{1,2)}	40 ^{1,3)}
	1.12	35 ^{1,2)}	40 ^{1,3)}	25 ^{1,2)}	30 ^{1,3)}
含 DMSO 孵化液	0	0	0	0	0
对照	0	0	0	0	0

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$; 同一浓度不同给药时间的死亡率比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

表 2 羟基喜树碱作用于斑马鱼的胚胎毒性($n = 60$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6 hpf 暴露组		48 hpf 暴露组	
		死亡率/%	畸形率/%	死亡率/%	畸形率/%
HCPT	16	100 ^{1,2)}	100 ^{1,3)}	80 ^{1,2)}	85 ^{1,3)}
	10	75 ^{1,2)}	85 ^{1,3)}	60 ^{1,2)}	65 ^{1,3)}
	6.5	65 ^{1,2)}	75 ^{1,3)}	35 ^{1,2)}	45 ^{1,3)}
	4	45 ^{1,2)}	55 ^{1,3)}	25 ^{1,2)}	30 ^{1,3)}
	2.5	35 ^{1,2)}	40 ^{1,3)}	15 ^{1,2)}	25 ^{1,3)}
含 DMSO 孵化液	0	0	0	0	0
对照	0	0	0	0	0

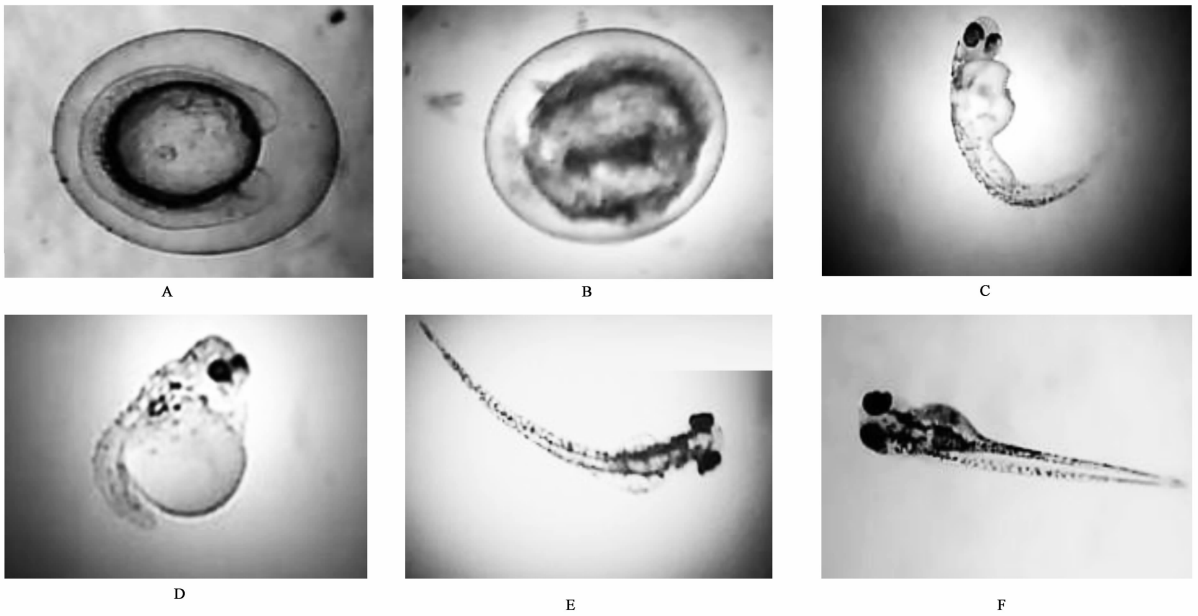
4 讨论

作为药物研发的重要组成部分,斑马鱼在药物毒理学和药物安全性评价方面发挥了积极的作用。斑马鱼主要优点为:试验时间短(3~5 d);单剂量即可;使用的药物量小;使用的试验动物数能达到统计学意义;试验终点可量化;处理操作方便,可在微量滴定板上用其胚胎进行药物高通量筛选,由此可对

大量药物作出快速评估^[10]。

胚胎尤其是体外发育的胚胎,由于大都具有外包膜的结构,对外界伤害有一定的抵御作用。加上胚胎的自我调节作用,少量的侵害可通过自身的调节机制消除。

6 hpf(原肠期)胚胎处于胚层分化时期,是胚胎发育的敏感时期。此期间,细胞开始分化,但细胞之



A. 正常的胚胎; B. 死亡的胚胎; C. 畸形的胚胎,示尾部畸形;D. 畸形的胚胎,示心脏畸形;E. 尾部畸形弯曲的幼鱼;F. 正常发育的幼鱼

图1 斑马鱼正常的胚胎与畸形胚胎

间未形成完整的体系,轻微的损伤就可能对发育产生巨大的影响。48 hpf 是幼鱼出膜的时间点,此时由于动物没有外包膜的保护,也是给药的敏感时期。但由于 48 hpf 的斑马鱼发育较 6 hpf 时成熟,对毒性的耐受力增加,因此 48 hpf 实验组的死亡率和畸形率均低于 6 hpf 实验组。在斑马鱼胚胎上的毒性实验结果显示,氯化两面针碱和羟基喜树碱的 LC_{50} 和 EC_{50} 较小,所以在应用这两种药物时,应考虑严格规范用药剂量,以降低毒性的发生。

[参考文献]

[1] Yang C L. *Poisonous herb* [M]. Beijing Publishing Company of Traditional Chinese Medicine, 1993:431.
 [2] 秦三海,刘华钢,王博龙,等. 氯化两面针碱体外诱导肺癌 SPC-A-1、舌癌 Tca8113 两种肿瘤细胞株凋亡的研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(2):279.
 [3] 刘丽敏,刘华钢,罗丹. 氯化两面针碱体外和体内的抗肿瘤作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2009,23(3):214.

[4] 刘丽敏,刘华钢. 氯化两面针碱的抗癌活性及对 DNA 拓扑异构酶的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(4):497.
 [5] 丁学强,王安训,孔庆瑜,等. 羟基喜树碱对口腔鳞癌细胞株的抗癌作用[J]. 癌症,2002,21(4):388.
 [6] 袁丹,容如滨,喻宗沅,等. 抗肿瘤药物 10-羟基喜树碱的研究与应用进展[J]. 化学与生物工程,2007,24(12):9.
 [7] Westerfield M. *The Zebrafish Book* [M]. Eugene: University of Oregon Press, 1995:16.
 [8] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, et al. Stage of embryonic development of the zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 1995,203(3):253.
 [9] 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):B252.
 [10] 李洁斐,李卫华,王强毅,等. 斑马鱼应用于毒理学研究的现状[J]. 实验动物与比较医学,2005,25(4):247.

[责任编辑 聂淑琴]