

牛黄镇惊丸对斑马鱼胚胎发育的影响

刘静¹, 张靖溥², 孟杰², 戴忠^{1*}, 马双成¹

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 北京协和医学院 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 研究牛黄镇惊丸对斑马鱼胚胎发育的影响。**方法** 以斑马鱼胚胎为实验对象, 体视光学显微镜下观察牛黄镇惊丸不同给药浓度(40、200、400、800、1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时斑马鱼胚胎的发育情况, 包括胚胎致畸、致死检测。**结果** 给药浓度不高于200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 未见胚胎发育异常。浓度高于200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (约相当于成人用量30倍, 远超出正常有效剂量)时对胚胎发育具有一定的毒性, 胚胎出现头和眼发育较小, 瞳孔无色; 心脏畸形、心率较弱、血池充血-回心血流不畅; 腹部透明度较差、尾干扭曲, 卵黄囊延伸结构变粗, 脊索变细, 无正常胎动, 体长变短; 撤药后畸形表型未见恢复, 且毒性呈浓度相关性; 半数致畸浓度(TD_{50} , 受精后3 d)约373 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 半数致死浓度(LD_{50})约为485 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。浓度为1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 胚胎在受精后1 d之内全部死亡。**结论** 牛黄镇惊丸给药浓度大于200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时影响斑马鱼胚胎发育。其毒性作用发生在胚胎器官形成期, 主要对胚胎的神经系统、心血管系统和骨骼等发育有影响。

关键词: 牛黄镇惊丸; 斑马鱼胚胎; 发育; 毒性; 畸形

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)07-0931-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.009

Toxic effect of Niu Huang Zhenjing Pill on zebrafish embryo development

LIU Jing¹, ZHANG Jing-pu², MENG Jie², DAI Zhong¹, MA Shuang-cheng¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To study the toxic effect of Niu Huang Zhenjing Pill on zebrafish embryo development. **Methods** Zebrafish embryo was used to investigate the development situation under stereo microscope at different drug concentration (40, 200, 400, 800, 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) including embryo teratogenic and lethal tests. **Results** No abnormal embryo development was found when the concentration was not greater than 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Approximately equal to 30 times the normal adult dosage, exceeding the normal effective dose). While, there was toxicity to embryo development at the concentration greater than 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The head and eyes of the embryo were smaller, and the pupils were colorless. Zebrafish embryonic heart malformation was observed, heart rate was weak, blood pool congestion happened and back blood flow was not smooth. The abdominal surface of the embryo was poor in transparency, the tail was twisted, the yolk sac elongation structure became thicker, the notochord became thin, there was no normal embryo movement, and the body length became shorter. After the withdrawal, the abnormal phenotype was not recovered, and severity of the abnormal phenotype was concentration-dependent. It was also observed that all embryos died within 1 d after fertilization at the concentration of 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **Conclusion** The drug could influence the development of zebrafish embryos when the concentration was higher than 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Its toxic effect occurs during embryonic organogenesis. And it mainly affects the development of embryonic nervous system, cardiovascular system and bone.

Key words: Niu Huang Zhenjing Pill; zebrafish embryo; development; toxicity; malformation

收稿日期: 2017-01-16

基金项目: 国家十二五“重大新药创制”专项课题(2014ZX09304307-002)

作者简介: 刘静(1982-), 女, 副研究员。Tel: (010)67095150 E-mail: liujing_zsm@126.com

*通信作者 戴忠 E-mail: daizhong@nifdc.org.cn 马双成 E-mail: masc@nifdc.org.cn

牛黄镇惊丸是由牛黄、天麻、防风、人工麝香、钩藤、朱砂、雄黄、甘草等 18 味药组成的中药复方制剂，具有镇惊安神、祛风豁痰的功效，现行标准收载于《中国药典》2015 年版一部^[1]。现有研究主要围绕处方中牛黄、麝香以及天麻等药味化学成分展开^[2-3]，无相关毒性研究报道，而处方分析显示其中含有朱砂、雄黄两味矿物药，其毒性一直被广泛关注，因此有必要开展毒性相关研究，为其临床安全使用提供科学的数据支持。

斑马鱼作为一种新的模式动物，近些年来在国内外引起广泛关注。由于斑马鱼胚胎在母体外发育，发育时间短、数量多，胚胎通体透明，用简单的光学显微镜就能观察组织器官发育情况，因此，斑马鱼模型具有实验快速、高效等优势^[4-5]。此外，报道表明，斑马鱼与高等脊椎动物人类、小鼠的基因同源性达 60%~80%^[6-8]，且其对药物反应与人类临床反应相似^[9-10]。因此，斑马鱼是作为评价药物毒性研究的理想模型^[11-13]。

本试验以斑马鱼胚胎为观察对象，通过考察牛黄镇惊丸对其发育的影响及胚胎畸形率、死亡率的检测来探讨其急性毒性作用，为本品安全性提供初步的数据支持，同时也可对中药毒性评价进行有益的尝试与参考。

1 材料

1.1 实验动物

实验所用斑马鱼 (*Danio rerio*) 为野生型 (wild type, WT) TU 品系，由北京大学生命科学学院张博教授惠赠，养殖于 (28.5±1) °C 的人工海水中，繁殖方法参照文献进行^[11]。

1.2 药物及主要试剂

牛黄镇惊丸样品 (规格 1.5 g/丸，批号 16013047，试验样品为其加蜜制丸前粉末状样品；由 18 味中药组成，涵盖常见天然产物种类以及矿物药成分，现行标准见《中国药典》2015 年版一部^[1])，来自中国食品药品检定研究院；乙醇为分析纯，购于国药化学试剂有限公司；水为超纯水、人工海水 (反渗透水配制)；高级海水晶，购于天津中盐海洋生物科学有限公司。

1.3 主要仪器

METTLER XS105 型电子分析天平 (瑞士 Mettler 公司)；Milli-Q 超纯水处理系统 (美国 Millipore 公司)；KQ-300DA 型数控超声波清洗机 (中国昆山市超声仪器有限公司)；奥林巴斯 SZ61

体式显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 斑马鱼饲养与繁殖

斑马鱼养殖于 (28.5±1) °C 的斑马鱼饲养液中，繁殖方法参考文献^[11]进行。

2.2 药物配制及给药浓度预实验

由于一般水溶性成分除大分子之外，均可溶于稀醇，为去除制剂中淀粉等类大分子成分，有利于斑马鱼给药，本研究采用 70% 乙醇提取，样品经 70% 乙醇超声提取，过滤，滤液蒸干，取适量，以斑马鱼饲养液为溶剂配制母液约 40 mg/mL，保存于 -20 °C。选取早期胚胎，进行多组给药处理，经预实验确定稀释成 40、200、400、800、1 200 μg/mL 工作液。

2.3 指标检测

显微镜下选取正常发育的受精后 6 h 左右的胚胎 30 枚，置 5 mL 玻璃皿中，分别浸入各测试液中，置于标准环境下使之发育，当胚胎发育至第 3 天时，换入正常饲养液中继续发育观察直至第 5 天。以在斑马鱼饲养液中发育的胚胎为对照组，在体视光学显微镜下于受精后 24、48、72、96、120 h 观察记录胚胎发育情况，如脑、眼、心、血流、躯干 (脊索/神经管、体节)、胚体生长速度、游动及对刺激的反应能力等 (包括统计发育第 3 天的畸形和死亡数/存活胚数)，直至实验结束。每个浓度测试液平行检测至少 3 次。

2.4 数据处理

采用 Excel 进行数据处理，畸形率和死亡率以 $\bar{x} \pm s$ 表示，制作柱状图。采用概率单位法，计算半数致畸剂量 (TD₅₀) 和半数致死剂量 (LD₅₀)。

3 结果

3.1 对斑马鱼胚胎发育影响的观察

结果显示，在不大于 200 μg/mL 时，未见胚胎发育异常，200 μg/mL 浓度约相当于成人用量 30 倍，远超出正常有效剂量；浓度为 200 μg/mL 时部分胚胎头部和眼睛较小，腹部较大，部分胚胎血池轻微瘀血，孵化期的幼体略显发育滞后，撤药后这些异常表型可恢复，未见明显的胚胎死亡；浓度在 400~800 μg/mL 时，胚胎出现头和眼发育较小，瞳孔无色，心脏畸形、心率较弱、血池充血-回心血流不畅，腹部透明度较差、尾干扭曲，卵黄囊延伸结构变粗，脊索变细，无正常胚动，体长变短，撤药后畸形表型未见恢复，且这些异常表型具有浓度依赖性。当

浓度达到 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,胚胎在受精后 1 d 之内全部死亡。表明牛黄镇惊丸在检测浓度范围内对胚胎

发育具有一定的毒性。图 1 为受精后 3 d 牛黄镇惊丸不同浓度作用下的代表性异常表型。

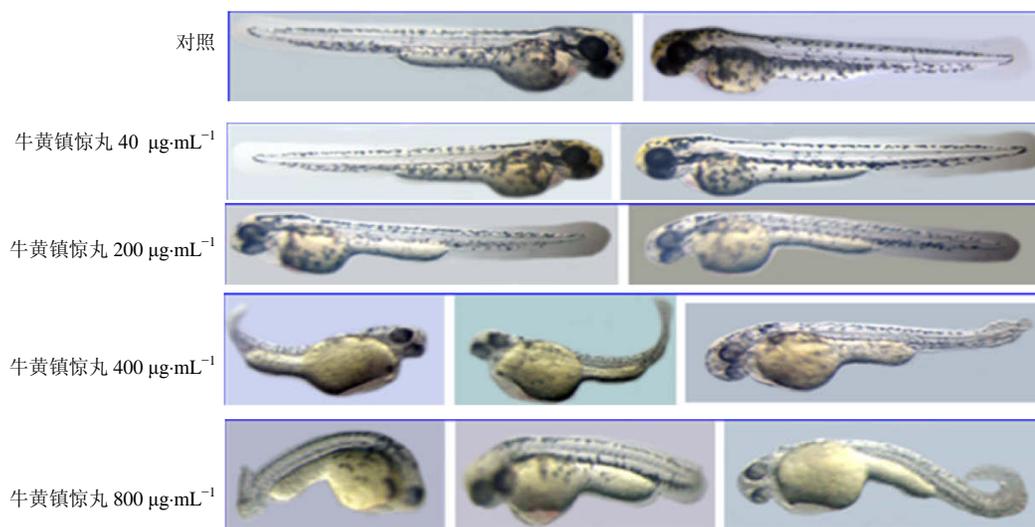


图 1 受精后 3 d 牛黄镇惊丸导致斑马鱼胚胎发育异常的表型

Fig. 1 Abnormal phenotype of zebrafish embryo development at 3 d after fertilization treated by Niu Huang Zhenjing Pill

3.2 数据分析

根据试验统计结果,牛黄镇惊丸样品的胚胎毒性随浓度的升高增大,毒性最低浓度约 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。初步估算 TD_{50} (受精后 3 d) 约 373 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LD_{50} 约为 485 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 结果见图 2。

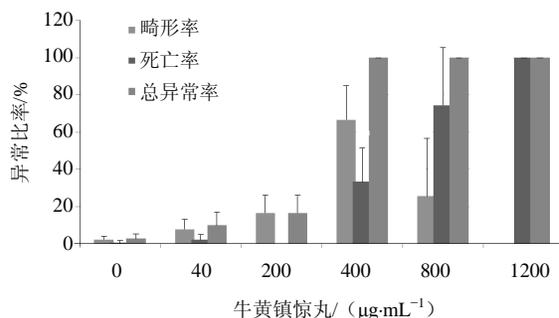


图 2 牛黄镇惊丸导致斑马鱼胚胎发育异常的统计图 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Statistical chart of zebrafish embryo abnormal development treated by Niu Huang Zhenjing Pill ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

样品前处理考察了 70% 乙醇、乙醇超声提取等条件,经 HPLC-DAD-ELSD 检测分析,结果表明,70% 乙醇提取物色谱峰最为丰富,能够更好地反映样品中可溶性成分信息及临床作用物质基础。

试验结果表明,样品浓度高于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可

以影响斑马鱼胚胎发育。其毒性作用发生在胚胎器官形成期,主要对胚胎的神经系统、心血管系统和骨骼等发育有影响。

试验样品处方中含有朱砂、雄黄、全蝎、制白附子和胆南星等多味毒性药材,这些药材本身均具有一定毒性,至于影响斑马鱼胚胎发育的具体相关成分还有待进一步深入研究。

斑马鱼模式动物既具有体外试验高效、快速、经济等优势,又具有体内试验可预测性强等优点,同时,斑马鱼早期通体透明,便于光学显微镜下直接进行组织器官水平的观察。因此,近年来斑马鱼作为一种小型脊椎模式动物备受药理学工作者关注。目前,斑马鱼在化学药品及天然单体成分的毒性研究与安全性评价中应用较多,而在中药安全性研究中应用较少。本研究表明,斑马鱼模型同样适用于成分复杂的中成药毒性研究,可以很好地补充和完善现有的中药安全性评价方法和体系。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 牛俊瑞, 郝来义, 王风华. 牛黄镇惊丸中牛黄与天麻的 TLC 鉴别研究 [J]. 疾病监测与控制杂志, 2009, 3(3): 145-146.
- [3] 崔鸿江. 牛黄镇惊丸中牛黄麝香的薄层色谱鉴别 [J]. 内蒙古医学杂志, 2011, 43(13): 4-5.

- [4] 张 勇, 郭胜亚, 邓中平, 等. 斑马鱼在中药毒性靶器官研究中的进展 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(12): 1343-1347.
- [5] 许冰洁, 张立将, 李春启, 等. 斑马鱼胚胎评价 5 种药物的发育毒性与模型验证 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 74-79.
- [6] 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(12): 98-103.
- [7] Rinkwitz S, Mourrain P, Becker T S. Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences [J]. Prog Neurobiol, 2011, 93(2): 231-243.
- [8] De Esch C, Slieker R, Wolterbeek A, et al. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review [J]. Neurotoxicol Teratol, 2012, 34(6): 545-553.
- [9] Mittelstadt S W, Hemenway C L, Craig M P, et al. Evaluation of zebrafish embryos as a model for assessing inhibition of hERG [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2008, 57(2): 100-105.
- [10] Zhu J J, Xu Y Q, He J H, et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish [J]. Appl toxicol, 2014, 34(2): 139-148.
- [11] 郭 隽, 耿兴超, 汪巨峰. 药物发育毒性体外替代方法研究进展及组合策略 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 345-349.
- [12] 佟军威, 张靖溥, 孟 杰. 17 α -乙炔雌二醇对斑马鱼胚胎发育的致畸作用及其基因靶位 [J]. 药学学报, 2011, 46(1): 50-55.
- [13] 彭蕴茹, 韦英杰, 丁永芳, 等. 基于斑马鱼模型的药物毒性研究进展与中药毒性研究新策略 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 17-30.