

基于斑马鱼模型的三峡阳菊叶水提物安全性评价研究

李陈钦瑶^{1,2}, 朱成悦^{1,2}, 张杰³, 辛元尧⁴, 任凤鸣^{4*}, 张长青^{1,2}, 刘可春^{1,2}, 张云^{1,2*}

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

2. 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

3. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物工程学院生物材料与绿色造纸国家重点实验室, 山东 济南 250301

4. 重庆市药物种植研究所, 重庆 408435

摘要:目的 以斑马鱼为模型, 评价三峡阳菊叶水提物(WELTGY)对斑马鱼整体形态以及心脏、肾脏和肝脏等主要脏器的影响。方法 用不同浓度(2.8、3.4、3.8、4.8、5.8、6.8 mg/mL)的WELTGY处理受精后72 h(72 hpf)的斑马鱼, 处理24、48 h后, 观察斑马鱼死亡率、畸形率和整体形态; 显微镜下观察斑马鱼心脏形态并拍照, 记录心率, 使用Image-Pro Plus 5.1测量斑马鱼静脉窦-动脉球(SV-BA)距离, 评价WELTGY对斑马鱼心脏的影响; 显微镜下观察拍照记录各组斑马鱼是否有眼水肿, 判断WELTGY对斑马鱼肾脏的影响; 用WELTGY处理肝脏标记绿色荧光的转基因斑马鱼Tg(L-FABP:EGFP), 荧光显微镜下拍照记录斑马鱼肝脏荧光情况, 评价WELTGY对斑马鱼肝脏的影响。结果 与对照组比较, 2.8 mg/mL及以下浓度的WELTGY对斑马鱼的整体形态、心脏、肾脏和肝脏无明显影响; 3.4 mg/mL以上浓度的WELTGY导致斑马鱼鱼鳃减小, 对心脏、肝脏、肾脏无影响; 4.8 mg/mL以上浓度的WELTGY导致斑马鱼心率显著降低($P < 0.01$), 对心脏SV-BA距离、肾脏、肝脏荧光强度和荧光面积无明显影响。结论 WELTGY毒性微弱, 对斑马鱼幼鱼几乎没有毒性; 高浓度下会导致轻微心脏毒性, 在家禽养殖业的使用中有必要合理控制用量。

关键词: 三峡阳菊叶水提物; 菊花副产物; 斑马鱼; 安全性评价

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)08-1607-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.08.006

Safety evaluation of water extract from leaves of Three Gorges Yangju based on zebrafish model

LI Chenqinyao^{1,2}, ZHU Chengyue^{1,2}, ZHANG Jie³, XIN Yuanyao⁴, REN Fengming⁴, ZHANG Changqing^{1,2}, LIU Kechun^{1,2}, ZHANG Yun^{1,2}

1. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

2. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Jinan 250103, China

3. School of Bioengineering, State Key Laboratory of Biobased Material and Green Papermaking, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250301, China

4. Chongqing Pharmaceutical Planting Research Institute, Chongqing 408435, China

Abstract: Objective To evaluate the effects of water extract from leaves of Three Gorges Yangju (WELTGY) on the development of morphology and main organs such as heart, kidney and liver by zebrafish model. **Methods** Zebrafish embryos at 72 hpf (hours post fertilization) were treated with different concentrations (2.8, 3.4, 3.8, 4.8, 5.8, and 6.8 mg/mL) of WELTGY. The mortality rate,

收稿日期: 2021-05-29

基金项目: 山东省技术创新引导计划(鲁渝科技协作)项目(2020LYXZ017); 重庆市科技局鲁渝科技合作项目(CSTC2020JSCX-LYJ-SA0030); 山东省优秀青年人才基金项目(ZR2020YQ60); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-ZD08)

第一作者: 李陈钦瑶(1998—), 女, 本科。Tel: (0531)82605331 E-mail: ChenqinyaoLi@outlook.com

*共同通信作者: 任凤鸣(1985—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药资源与利用、药用植物基因组学研究。E-mail: 348080877@qq.com
张云(1982—), 女, 博士, 研究员, 主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。Tel: (0531)82605331
E-mail: xiaohan_0818@163.com

malformation rate and overall morphology of zebrafish were observed after treatment for 24 and 48 h. The heart morphology of zebrafish was observed and photographed under a microscope, and the heart rate was recorded. Image-Pro Plus 5.1 was used to measure the distance between the venous sinus-artery bulb (SV-BA) of zebrafish, so the effect of WELTGY on the heart of zebrafish was evaluated. The effect of WELTGY on the kidney of zebrafish was determined by observing and photographing zebrafish eye edema in each group under microscope. The liver labeled green fluorescent transgenic zebrafish *Tg (L-FABP:EGFP)* was treated with WELTGY, and the liver fluorescence of zebrafish was photographed under fluorescence microscope to evaluate the effect of WELTGY on the liver of zebrafish. **Results** WELTGY at a concentration of 2.8 mg/mL or less had no effect on the overall morphology, heart, liver and kidney of zebrafish. Concentrations above 3.4 mg/mL caused the swim bladder to decrease, and had no effects on the heart, kidney, and liver. Concentrations above 4.8 mg/mL caused a significant decrease in zebrafish heart rate, and had no effects on the distance between the heart venous sinus -bulus arteriosus, kidney, liver fluorescence intensity, and fluorescence area. **Conclusion** In this study, WELTGY was found to be weakly toxic and had almost no effects on zebrafish embryogenesis. High concentrations could cause slight cardiotoxicity. It is necessary to strengthen the management and control the dosage in the use of poultry breeding.

Key words: water extract from leaves of Three Gorges Yangju; Chrysanthemum by-products; zebrafish; safety evaluation

菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat 作为我国传统中草药,因含有大量生物活性物质,有抗炎及抗氧化功能,广泛应用于保健茶饮的制作^[1-3]。菊花近年来在畜牧养殖中的应用也越来越广泛^[4-5]。已有研究表明畜禽养殖饲料中加入菊花粉,可改善动物的皮肤颜色以及蛋鸡蛋壳的颜色,具有显著的清热祛火作用,可提高动物的免疫力^[5]。例如在猪饲料中添加3%~5%野菊花干粉,对预防流感、肝病及皮炎等具有一定作用^[6];在黄河鲤饲料中添加怀菊花能显著提高增质量率和特定生长率^[7]。菊花中富含多糖物质,通过促进有益肠道菌群生长、调节肠道微生态的平衡恢复免疫系统,有效改善溃疡性结肠炎^[8]。陈辉等^[9]研究了蛋鸡日粮中添加不同剂量的金盏菊花粉提取物,对蛋鸡血液生化指标的影响。

目前对菊花的研究与利用主要集中在花序上,花序采集后废弃的植株产量是花序产量的10余倍。大量的根、茎、叶被丢弃或焚烧,不仅造成了资源浪费还导致了环境污染^[10]。三峡阳菊是重庆独特的药用菊资源,主产于三峡库区腹地的云阳、万州和奉节县^[11],是杭白菊在三峡库区经多年驯化、选择形成的地方栽培品种,目前已达33平方公里以上的种植规模。每年在三峡阳菊的采收及加工过程中,产生高达数十万吨的茎、叶及数百吨的碎菊末。这些未被充分利用的副产物仍含有大量黄酮等具有清热解毒、抗菌消炎功能的化学物质,可作为禽畜用药及饲料添加剂的原料^[12]。但目前对菊花副产物的活性和安全性研究较少^[13],菊花副产物对动物组织器官是否具有毒性目前并未见研究报道,对其进行安全性评价显得尤为重要。

模式生物斑马鱼的基因表达及生理特性均与哺乳动物高度相似,已被广泛应用于化合物的安全性评价,尤其是研究化合物对心、肝、肾等主要脏器的影响^[14]。李兆利等^[15]利用斑马鱼模型对兽药及饲料添加剂噻乙醇、阿散酸和土霉素进行毒性研究,结果发现噻乙醇、阿散酸可影响斑马鱼的胚胎发育,提示应该严格控制噻乙醇、阿散酸在水产养殖中的使用。本实验利用斑马鱼进行三峡阳菊副产物叶水提取物对心、肾、肝等脏器的安全性评价,为其作为饲料添加剂的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

野生型AB系斑马鱼和肝脏标记绿色荧光的转基因斑马鱼 *Tg (L-FABP:EGFP)*,由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。在黑暗/光照(10 h/14 h)、28 °C条件下饲养。在实验前1 d取健康性成熟的雌雄斑马鱼,按雌雄1:1或者1:2的比例放入产卵缸,隔板分开。次日8:30抽板,11:00收集受精卵。将收集好的胚胎放到28 °C恒温培养箱中控光培养,以备使用。

1.2 药物、主要试剂、主要仪器

三峡阳菊叶水提取物(water extract from leaves of Three Gorges Yangju, WELTGY),由重庆市药物种植研究所提供;斑马鱼幼鱼培养用水(0.4 mmol/L CaCl_2 、5 mmol/L NaCl 、0.17 mmol/L KCl 、0.16 mmol/L MgSO_4)。

Waters液相色谱2695(美国Shimadzu公司);SZX16型体视荧光显微镜、DP2-BSW图像采集系统(日本Olympus公司);斑马鱼养殖饲养系统(中国北京爱生科技有限公司);SPX-280B-G型光照培养

箱(中国上海基星生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 WELTGY提取

三峡阳菊叶片材料来源于重庆市云阳县芸山农业阳菊种植基地(108°42' E, 30°54' N, 665 m), 于菊花采摘完毕后割取地上部分茎叶, 自然风干取菊叶部分, 样品采集时间为2020年12月1日。取风干叶片材料200 g, 剪碎, 水回流提取法提取, 液料比为10:1, 提取时间为120 min。提取液经真空泵滤纸抽滤, 滤液65 °C减压蒸馏浓缩至200 mL, 得1 g/mL WELTGY, 提取率为32.5%。采用高效液相色谱法, 参照《中国药典》2020版一部菊花含量测定方法^[16], 测得WELTGY中3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、绿原酸、木犀草苷质量分数分别为0.42、0.37和0.18 mg/mL。

2.2 给药方法

挑选发育正常的受精后72 h(72 hpf)斑马鱼幼鱼, 移入24孔板的样孔中, 每孔10尾。根据预试验, 设定对照组(斑马鱼幼鱼培养用水)和WELTGY(2.8、3.4、3.8、4.8、5.8、6.8 mg/mL)组, 每个组设3个重复孔。随后于光照培养箱中恒温(28 °C)孵育, 连续处理2 d, 每天换液。

2.3 WELTGY对斑马鱼急性毒性的影响

观察并记录暴露于药物24、48 h(24、48 hours post exposure, 24、48 hpe)各实验组斑马鱼的死亡情况(是否有心跳作为判断斑马鱼是否存活的标准), 计算死亡率; 在24、48 hpe记录斑马鱼的形态学观察指标, 如体形、脑、上面部结构、下面部结构、脊索、体节、尾、鳍、心脏、肝、鳃、色素沉着等, 并计算畸形率。

在48 hpe将斑马鱼用质量浓度为0.3%的三卡因麻醉1 min, 显微镜下观察斑马鱼整体形态并拍照。

2.4 WELTGY对斑马鱼心脏的影响

在48 hpe将斑马鱼用质量浓度为0.3%的三卡因麻醉1 min, 显微镜下观察斑马鱼心脏形态并拍照; 记录心率; 使用Image-Pro Plus 5.1软件测量斑马鱼静脉窦-动脉球(SV-BA)距离。

2.5 WELTGY对斑马鱼肾脏的影响

在48 hpe将斑马鱼利用质量浓度为0.3%的三卡因麻醉1 min。显微镜下观察拍照记录各组斑马鱼是否有眼水肿, 判断WELTGY对斑马鱼肾脏的影响。

2.6 WELTGY对斑马鱼肝脏的影响

在48 hpe将斑马鱼利用质量浓度为0.3%的三卡因麻醉1 min。荧光显微镜下拍照记录斑马鱼肝脏荧光情况, 利用Image-Pro Plus 5.1软件测量肝脏荧光强度和荧光面积。

2.7 统计学分析

数据使用GraphPad Prism 7.0、SPSS 20.0和Image-Pro Plus 5.1软件进行统计分析, 统计学差异采用ANOVA进行分析。

3 结果

3.1 WELTGY对斑马鱼急性毒性的影响

斑马鱼暴露在2.8、3.4、3.8、4.8 mg/mL质量浓度下的WELTGY时均无死亡; WELTGY 5.8 mg/mL组斑马鱼在24 hpe出现死亡; WELTGY 6.8 mg/mL组斑马鱼全部死亡。与对照组比较, WELTGY 2.8 mg/mL组斑马鱼幼鱼形态无显著差异; 3.4 mg/mL组出现畸形; 3.8、4.8、5.8 mg/mL质量浓度下畸形率显著上升($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表1。

表1 暴露于不同浓度的WELTGY的斑马鱼累积死亡率和畸形率

组别	剂量/ (mg mL ⁻¹)	累积死亡率/%		畸形率/%	
		24 hpe	48 hpe	24 hpe	48 hpe
对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
WEL	2.8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
TGY	3.4	0.00±0.00	0.00±0.00	20.00±0.00	20.00±0.00
	3.8	0.00±0.00	0.00±0.00	40.00±5.77*	50.00±0.00*
	4.8	0.00±0.00	0.00±0.00	66.66±3.33**	66.66±3.33**
	5.8	6.66±3.33	10.00±0.00	63.33±3.33**	60.00±0.00**
	6.8	100.00±0.00**	100.0±0.00**	—	—

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

在48 hpe, 与对照组比较, WELTGY 2.8 mg/mL组斑马鱼形态正常, 无畸形; 3.4 mg/mL组个别斑马鱼出现鱼鳃缺失的现象; 3.8、4.8、5.8 mg/mL组斑马鱼出现鱼鳃缺失现象的数量显著增加, 但未出现其他畸形。结果见图1。

3.2 WELTGY对斑马鱼心脏的影响

在48 hpe, 与对照组比较, WELTGY 2.8、3.4、3.8、4.8、5.8 mg/mL组斑马鱼心脏形态正常, 心包无水肿, 见图2。与对照组比较, WELTGY 2.8、3.4、3.8 mg/mL组斑马鱼心率无显著差异, 4.8、5.8 mg/mL组斑马鱼心率显著下降($P < 0.01$)。与对照组比较,

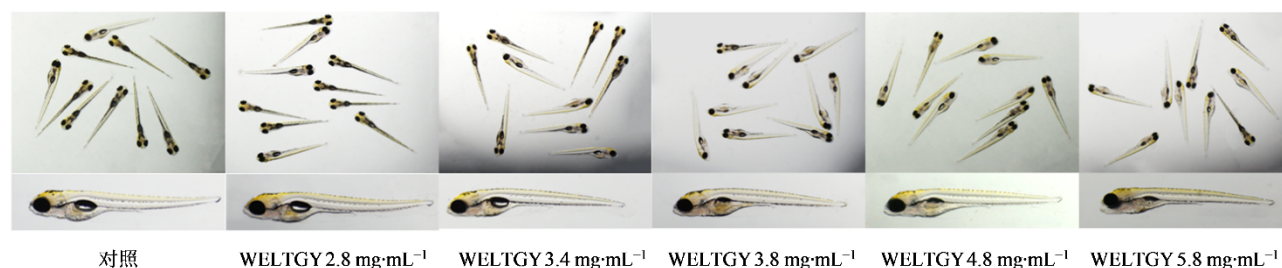


图1 斑马鱼幼鱼经WELTGY处理48 h后的形态学变化

Fig. 1 Morphological changes of zebrafish embryos treated with WELTGY for 48 h

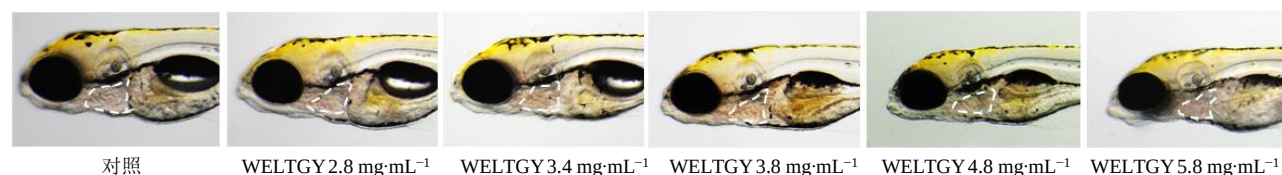


图2 斑马鱼幼鱼经WELTGY处理48 h后的心脏形态学变化

Fig. 2 Morphological changes of zebrafish heart embryos treated with WELTGY for 48 h

WELTGY组斑马鱼SV-BA距离无显著变化。结果见图3。

3.3 WELTGY对斑马鱼肾脏的影响

在48 hpe,与对照组比较,WELTGY处理组斑马鱼眼部无水肿,形态正常,结果见图4。

3.4 WELTGY对斑马鱼肝脏的影响

在48 hpe,与对照组比较,WELTGY处理组斑马鱼肝脏形态、肝脏荧光强度、肝脏荧光面积无显著差异。结果见图5、6。

4 讨论

抗生素大量滥用导致细菌耐药性的增加,抗生素残留在动物及畜牧农产品中,进而威胁人类的健康^[17-18],绿色安全的饲料添加剂开发迫在眉睫。每年三峡阳菊的采摘过程中产生了数十万吨的茎、叶及数百吨的碎菊沫。菊叶中富含多糖类的物质,黄酮类化合物,具有抗菌消炎活性^[19-20]。薛梦莹^[21]对菊花不同部位的药效研究中发现菊叶挥发油的抑菌效果最佳,对金黄色葡萄球菌的抑制力最强,且菊叶具有与菊花相当的抗氧化能力。因此可将菊花副产物作为饲料添加剂原料加以利用,充分利用生物资源。

斑马鱼在心血管系统、肝脏、肾脏系统以及神经系统等方面都与人类对应的组织具有极其相似的发育机制与特点。斑马鱼模型现已在欧美国家广泛应用于化合物的活性筛选与安全性评价^[22]。以斑马鱼模型进行安全性评价的指标主要有化合物对斑马鱼的死亡率、畸形率影响,对心、肝、肾等脏器的影响等^[14,23]。因此本研究采用斑马鱼模型对

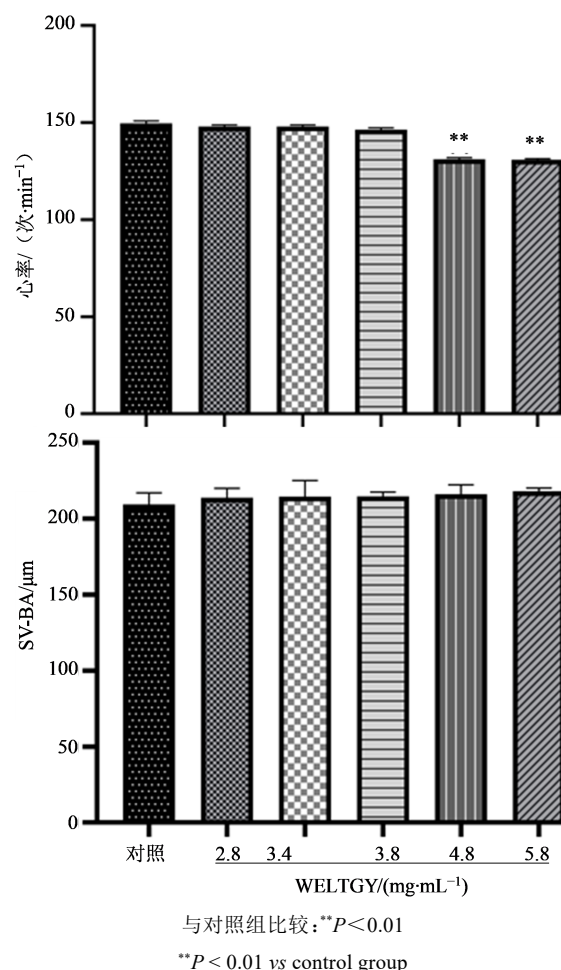


图3 斑马鱼幼鱼经WELTGY处理48 h后的心率和SV-BA距离的变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Changes in heart rate and SV-BA distance of zebrafish treated with WELTGY for 48 h($\bar{x} \pm s, n=10$)

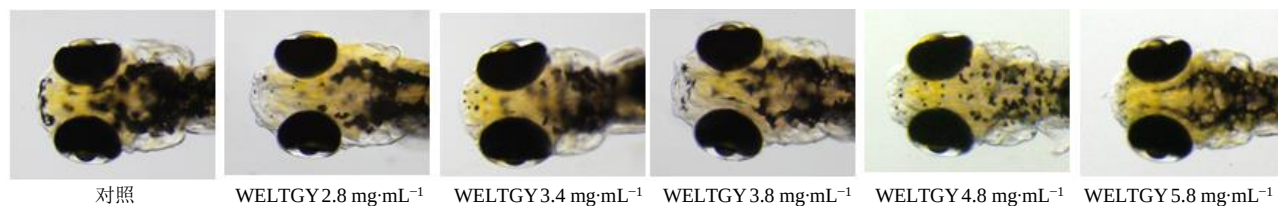


图4 斑马鱼幼鱼经WELTGY处理48 h后的眼部形态学变化

Fig. 4 Morphological changes of zebrafish eyes treated with WELTGY for 48 h

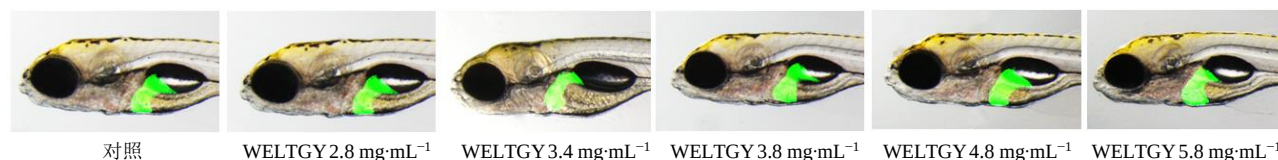
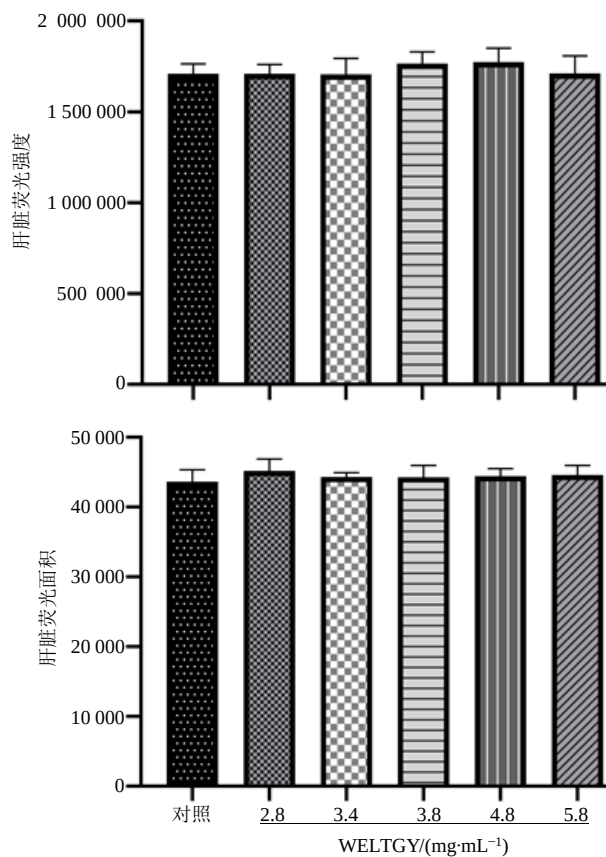


图5 斑马鱼幼鱼经WELTGY处理48 h后的肝脏荧光情况

Fig. 5 Liver fluorescence of zebrafish embryos treated with WELTGY for 48 h

图6 斑马鱼幼鱼经WELTGY处理48 h后的肝脏荧光强度和荧光面积 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Fig. 6 Liver fluorescence intensity and fluorescence area of zebrafish embryos treated with WELTGY for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=10$)

WELTGY的安全性进行评价,为对阳菊全植株进行综合开发利用提供参考。

研究结果显示,WELTGY在2.8 mg/mL浓度以下,对斑马鱼的死亡率、形态、心、肝、肾各脏器无影响。3.4 mg/mL浓度以上处理斑马鱼48 h导致个别斑马鱼鱼鳔体积减小或不充气,对其他脏器无显著

影响,未造成斑马鱼形态严重畸形^[24]。斑马鱼全身透明,可以使用非侵入性的方式观察心脏形态变化、心率变化和血液循环等^[25]。斑马鱼的心脏静脉窦是血液进入心房的部位,动脉球是血液流出心室的部位,心脏SV-BA距离变化能反映心脏损伤程度^[26]。斑马鱼的心率反映了心脏的泵血功能^[27]。本实验将SV-BA距离作为评价WELTGY对斑马鱼毒性的主要指标,将心率作为辅助指标。在48 hpe,所有浓度下斑马鱼幼鱼心包无水肿,SV-AB距离无显著变化,WELTGY未造成斑马鱼幼鱼心脏损伤。4.8、5.8 mg/mL浓度导致斑马鱼心率显著下降,提示高浓度的WELTGY对心脏有轻微毒性。肾脏是动物最主要的排泄器官,肾毒性会引起斑马鱼幼鱼的局部水肿,包括心包水肿、眼水肿和脑水肿等^[28-29]。本实验观察到所有浓度下斑马鱼幼鱼心包、眼部、脑部形态没有变化,证明WELTGY对斑马鱼幼鱼肾脏没有毒性。斑马鱼幼鱼在72 hpf肝脏发育功能齐全^[30],本实验利用肝脏荧光转基因斑马鱼 *Tg(L-FABP:EGFP)*品系,通过对肝脏面积大小和肝脏荧光强度进行定量分析评价WELTGY对肝脏的影响^[31]。结果显示,所有浓度下,斑马鱼幼鱼肝脏面积和肝脏荧光强度均无显著变化,证明WELTGY对斑马鱼幼鱼肝脏没有毒性。

本研究证明了WELTGY对斑马鱼的毒性很小,在高浓度下才会影响斑马鱼的形态,畸形的表现也仅是鱼鳔的体积减小或充气功能的障碍,没有明显的致畸毒性。WELTGY可以在农业家禽饲养中推广,但有必要合理控制用量,科学使用。本研究为WELTGY的安全使用提供了数据支撑和理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li Y, Yang P, Luo Y, et al. Chemical compositions of *Chrysanthemum* teas and their anti-inflammatory and antioxidant properties [J]. Food Chem, 2019, 286: 8-16.
- [2] Zhang N, He Z J, He S Y, et al. Insights into the importance of dietary *Chrysanthemum* flower (*Chrysanthemum morifolium* cv. Hangju) -wolfberry (*Lycium barbarum* fruit) combination in antioxidant and anti-inflammatory properties [J]. Food Res Int, 2019, 116: 810-818.
- [3] Jiang M, Zhang W, Zhang T, et al. Assessing transfer of pesticide residues from *Chrysanthemum* flowers into tea solution and associated health risks [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 187: 109859.
- [4] 常相伟, 魏丹丹, 陈栋杰, 等. 药用与茶用菊花资源形成源流与发展变化 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(1): 116-123, 145.
Chang X W, Wei D D, Chen D J, et al. The origin and development of medicinal and tea chrysanthemum resources [J]. China Mod Chin Med, 2019, 21(1): 116-123, 145.
- [5] 李万秀. 菊花成分、药理作用及其在饲料工业中的应用研究进展 [J]. 饲料与畜牧, 2014(8): 43-46.
Li W X. Chrysanthemum components, pharmacological effects and application research progress in feed industry [J]. Feed Anim Husb, 2014(8): 43-46.
- [6] 江朝鑫, 杨杏华, 徐品格. 猪的常用中草药饲料添加剂 [J]. 云南畜牧兽医, 2007(6): 14.
Jiang C X, Yang X H, Xu P G. Commonly used Chinese herbal medicine feed additives for pigs [J]. Yunnan An Husb Veter Med, 2007(6): 14.
- [7] 乔志刚, 张英英, 李学军, 等. 饲料中添加怀山药与怀菊花对黄河鲤鱼生长及血液理化指标的影响 [J]. 大连水产学院学报, 2010, 25(1): 62-65.
Qiao Z G, Zhang Y Y, Li X J, et al. Effects of adding Huai Yam and Huai chrysanthemum in feed on growth and blood physical and chemical indexes of juvenile Yellow River carp [J]. J Dalian Fish Univ, 2010, 25(1): 62-65.
- [8] Tao J H, Duan J A, Jiang S, et al. Polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* Ramat ameliorate colitis rats by modulating the intestinal microbiota community [J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 80790-80803.
- [9] 陈辉, 黄仁录, 邸科前. 金盏菊花粉提取物对蛋鸡血液生化指标的影响 [J]. 现代畜牧兽医, 2010(10): 47-48.
Chen H, Huang R L, Di K Q. Effects of calendula flower powder e-xtract on blood biochemical indexes of laying hens [J]. Mod An Husb Veter Med, 2010(10): 47-48.
- [10] 朱琳, 郭建明, 杨念云, 等. 菊非药用部位化学成分分布及其动态积累研究 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 425-431.
- [11] Zhu L, Guo J M, Yang N Y, et al. Distribution and dynamic accumulation of chemical components in non-medicinal parts of chrysanthemum [J]. Chin Tradit Herb Med, 2014, 45(3): 425-431.
- [12] 三峡阳菊 [J]. 厦门航空, 2019(8): 46-47.
Three Gorges Yangju [J]. Xiam Airl, 2019(8): 46-47.
- [13] 赵明, 段金殿, 张森, 等. 基于中药资源产业化过程副产物开发禽畜用药及饲料添加剂的策略与路径 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3628-3632.
Zhao M, Duan J A, Zhang S, et al. Strategies and paths for the development of medicines and feed additives for poultry and livestock based on the by-products of the industrialization of traditional Chinese medicine resources [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(18): 3628-3632.
- [14] 罗爱琼, 赵志辉, 杨俊花, 等. 家禽饲料添加剂的应用和安全性评价 [J]. 吉林农业科学, 2012, 37(3): 36-41.
Luo A Q, Zhao Z H, Yang J H, et al. Application and safety evaluation of poultry feed additives [J]. Jilin Agric Sci, 2012, 37(3): 36-41.
- [15] 李红燕, 谢倩, 王成, 等. 斑马鱼在药物毒理学评估中应用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 278-288.
Li H Y, Xie Q, Wang C, et al. Research progress in the application and mechanism of zebrafish in drug toxicology evaluation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(1): 278-288.
- [16] 李兆利, 陈海刚, 徐韵, 等. 3种兽药及饲料添加剂对鱼类的毒理效应 [J]. 生态与农村环境学报, 2006(1): 84-86.
Li Z L, Chen H G, Xu Y, et al. Toxicological effects of three veterinary drugs and feed additives on fish [J]. J Ecol Rur Envi, 2006(1): 84-86.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [18] 马朵妈麻. 全面禁用抗生素饲料添加剂, 保证肉食品安全 [J]. 食品安全导刊, 2020(33): 20-21.
Ma D M M. Antibiotic feed additives are completely banned to ensure meat food safety [J]. Food Saf Guid, 2020(33): 20-21.
- [19] 王丽琴, 史耀东. 全面禁用抗生素饲料添加剂, 保证人畜安全 [J]. 畜牧兽医科学: 电子版, 2017(11): 19-20.
Wang L Q, Shi Y D. Completely ban antibiotic feed additives to ensure the safety of humans and animals [J]. An Husb Veter Sci: Elect Edit, 2017(11): 19-20.
- [20] 纪丽莲. 菊花脑茎叶挥发油的化学成分与抗霉菌活性的研究 [J]. 食品科学, 2005(10): 91-94.

- Ji L L. Study on the chemical constituents and antifungal activity of volatile oil from chrysanthemum brain stems and leaves [J]. Food Sci, 2005(10): 91-94.
- [20] 李 孟, 张靖柯, 石静亚, 等. 怀菊花及其茎叶脂溶性成分 GC-MS 分析及其抗氧化活性研究 [J]. 中国医药科学, 2020, 10(19): 78-82.
- Li M, Zhang J K, Shi J Y, et al. GC-MS analysis of fat-soluble constituents in chrysanthemum and its stems and leaves and their antioxidant activity [J]. Chin Med Sci, 2020, 10(19): 78-82.
- [21] 薛梦莹. 菊不同部位类黄酮与挥发油的化学鉴定及其抗氧化应激和抑菌作用 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2019.
- Xue M Y. Chemical identification of flavonoids and volatile oil from different parts of chrysanthemum and their anti-oxidative stress and antibacterial effects [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2019.
- [22] Lam P Y, Peterson R T. Developing zebrafish disease models for in vivo small molecule screens [J]. Curr Opin Chem Biol, 2019, 50: 37-44.
- [23] 李佳妍, 刘欣欣, 宁 青, 等. 基于斑马鱼模型的补骨脂毒性相关成分群的高效辨识研究 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 129-136.
- Li J Y, Liu X X, Ning Q, et al. Effective identification of toxic related components of Psoraleae Fructus based on zebrafish model [J]. Chin Tradit Herb Med, 2021, 52(1): 129-136.
- [23] 韩 建, 何秋霞, 韩利文, 等. 化学污染物对鱼鳔的毒理学研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2016, 11(6): 37-43.
- Han J, He Q X, Han L W, et al. Research progress in the toxicology of chemical pollutants to swim bladder [J]. J Ecotoxicol, 2016, 11(6): 37-43.
- [24] 林 巧, 刘 杰, 黄 露, 等. 斑马鱼模型在心脏疾病研究及药物心脏毒性评价中的应用 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(1): 247-251.
- Lin Q, Liu J, Huang L, et al. Application of zebrafish model in heart disease research and drug cardiotoxicity evaluation [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(1): 247-251.
- [25] 吕 婧, 李 晨, 杨龙飞, 等. 基于斑马鱼模型的西洋参提取物心脏保护作用研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(3): 308-313.
- Lv J, Li C, Yang L F, et al. Cardioprotective effects of American ginseng extract based on zebrafish model [J]. China Pharm, 2020, 31(3): 308-313.
- [26] 薛 迪. 斑马鱼血管抑制和心脏损伤模型的构建及研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2016.
- Xue D. Construction and research of zebrafish vascular inhibition and heart injury model [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2016.
- [27] Berman N, Lectura M, Thurman J, et al. A zebrafish model for uremic toxicity: role of the complement pathway [J]. Blood Purif, 2013, 35(4): 265-269.
- [28] Hentschel D M, Park K M, Cilenti L, et al. Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease [J]. Am J Physiol Ren Physiol, 2005, 288(5): F923-F929.
- [29] 李芝奇, 徐 玥, 赵 霞, 等. 斑马鱼作为一种重要的工具进行肝脏疾病研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2): 320-332.
- Li Z Q, Xu Y, Zhao X, et al. Zebrafish as an important tool for liver disease research [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(2): 320-332.
- [30] 马瑞娇, 贾智莉, 王学芳, 等. 基于斑马鱼模型的抗结核药物肝脏毒性比较研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(9): 953-959.
- Ma R J, Jia Z L, Wang X F, et al. Comparative study on liver toxicity of antituberculosis drugs based on zebrafish model [J]. Chin J Antibiot, 2020, 45(9): 953-959.

[责任编辑 兰新新]