

基于斑马鱼模型评价注射用益气复脉(冻干)的心血管和肝脏安全性研究

李德坤^{1,2}, 原景³, 许泽乾⁴, 张燕欣^{1,2}, 李智^{1,2}, 庄朋伟³, 鞠爱春^{1,2}, 杨峰^{1,2*}, 万梅绪^{1,2*}

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

3. 天津中医药大学, 天津 300193

4. 天津医科大学, 天津 300070

摘要: 目的 应用斑马鱼模型评价注射用益气复脉(冻干)(YQFM)的心血管毒性和肝毒性。方法 受精后48 h的野生型AB系斑马鱼随机分为空白对照组(未注射组)、溶剂对照组(注射0.9%氯化钠注射液10 nL)和YQFM 10、20、100、200、400、600、800和1 000 ng组, iv给药4 h后统计各剂量组斑马鱼死亡数量, 计算最大非致死剂量(MNLD)和10%致死剂量(LD₁₀)值。心血管毒性和肝毒性评价剂量设置为MNLD/10(20 ng)、MNLD/3(60 ng)、MNLD(200 ng)和LD₁₀(400 ng); 在显微镜下观察YQFM对斑马鱼心率的影响, 观察斑马鱼有无心包水肿、血流速度变化、血液流失、心包瘀(出)血、血栓等, 计算各表型发生率; 在显微镜下对肝脏进行观察, 对典型表型进行拍照, 利用分析软件NIS-Elements D 3.10分析肝脏面积、肝脏不透光度和卵黄囊面积。结果 YQFM MNLD和LD₁₀分别为198.06 ng(约为200 ng)和397.12 ng(为400 ng); 与溶剂对照组比较, YQFM 20、60 ng组斑马鱼未见异常, 没有观察到心血管毒性, 未见心包水肿, 未见心率减慢, 未见心律不齐; YQFM 200 ng组斑马鱼出现发生率较低的心血管毒性, 表现为心包水肿(发生率为3.3%), 未见心率减慢, 未见心律不齐; 400 ng组斑马鱼出现较轻微的心血管毒性, 表现为心包水肿(发生率为13.3%)、血流变慢(发生率为6.7%)、血流缺失(发生率为3.3%), 未见心率减慢, 未见心律不齐。与溶剂对照组比较, YQFM各剂量(20、60、200、400 ng)组斑马鱼相对肝脏大小、肝脏不透光度平均值和卵黄囊延迟吸收倍数均无统计学差异。结论 YQFM在MNLD剂量下, 不诱发斑马鱼心血管毒性和肝毒性。

关键词: 注射用益气复脉(冻干); 斑马鱼; 心血管毒性; 肝毒性

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)11-2398-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.11.015

Evaluation of cardiovascular and hepatic safety of Yiqi Fumai Lyophilized Injection in zebrafish model *in vivo*

LI Dekun^{1,2}, YUAN Jing³, XU Zeqian⁴, ZHANG Yanxin^{1,2}, LI Zhi^{1,2}, ZHUANG Pengwei³, JU Aichun^{1,2}, YANG Feng^{1,2}, WAN Meixu^{1,2}

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

4. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: **Objective** The cardiotoxicity and hepatotoxicity of Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM) were evaluated by zebrafish model *in vivo* experiment. **Methods** At 48 h after fertilization, wild type AB zebrafish were randomly divided into blank control group (no injection group), solvent control group (injection of 0.9% sodium chloride injection 10 nL) and YQFM 10, 20, 100, 200, 400, 600, 800 and 1 000 ng groups. 4 h after iv administration, the death number of zebrafish in each dose group was

收稿日期: 2021-05-14

基金项目: 天津市科技计划项目(18YFCZZC00430)

第一作者: 李德坤, 男, 高级工程师, 主要从事中药工艺、质量控制、中药药理及药物警戒研究。E-mail: lidekun@tasly.com

*共同通信作者: 万梅绪(1981—), 高级工程师, 主要从事中药注射剂安全性再评价、中药药理药效研究。Tel: (022)84498197

E-mail: wanmx@tasly.com

杨峰, 男, 中级工程师, 执业药师, 主要从事中药工艺、质量控制及中药注射剂生产研究。E-mail: Yangfeng@tasly.com

counted, and the maximum non-lethal dose (MNLD) and 10% lethal dose (LD_{10}) values were calculated. The evaluation doses of cardiovascular toxicity and hepatotoxicity were set as MNLD/10 (20 ng), MNLD/3 (60 ng), MNLD (200 ng) and LD10 (400 ng). The effects of YQFM on the heart rate of zebrafish were observed under a microscope, and the incidence of each phenotype was calculated. The liver was observed under a microscope and the typical phenotypes were photographed. The liver area, liver impermeability and yolk sac area were analyzed using nIS-Elements D 3.10 software. **Results** The MNLD and LD10 of YQFM were 198.06 ng (about 200 ng) and 397.12 ng (400 ng), respectively. Compared with solvent control group, zebrafish in YQFM 20 and 60 ng groups showed no abnormalities, no cardiovascular toxicity, no pericardium edema, no slow heart rate, and no arrhythmia. 200 ng zebrafish showed low incidence of cardiovascular toxicity, such as pericardium edema (3.3%), no slow heart rate, no arrhythmia. In the 400 ng group, zebrafish showed mild cardiovascular toxicity, including pericardium edema (13.3%), hemorheology slowness (6.7%), loss of blood flow (3.3%), and no slow heart rate or arrhythmia. Compared with solvent control group, there were no significant differences in relative liver size, mean value of liver impermeability and delayed absorption ratio of yolk capsule of zebrafish in YQFM (20, 60, 200 and 400 ng) groups. **Conclusion** YQFM did not induce cardiotoxicity and hepatotoxicity in zebrafish at the MNLD dose.

Key words: Yiqi Fumai Lyophilized Injection; zebrafish; cardiovascular toxicity; hepatotoxicity

斑马鱼,属硬骨鱼类、辐鳍纲、鲤形目、鲤科、鲇属,原产喜马拉雅山南麓的印度、巴基斯坦、孟加拉和尼泊尔等南亚国家。斑马鱼成体雌鱼为银灰色,体态丰满,腹部膨大;成体雄鱼为柠檬色,身材修长,腹部扁平。常用的有源于德国的Tubingen和源于美国的AB两个品系^[1]。斑马鱼是一种小型硬骨鱼,性情温和,易于饲养,产卵率高,一对性成熟的斑马鱼每周可产卵300枚;且斑马鱼基因与人类基因具有高度相似,至少70%的人类基因组在斑马鱼中有直系同源基因,在已知人类疾病相关基因中,至少82%有斑马鱼同源基因^[2]。此外,以斑马鱼为研究对象,试药量少,可进行高通量筛选;不仅如此,斑马鱼在心血管器官方面的早期发育过程和人类也非常相似。因此斑马鱼作为模式生物在评价药物的安全性和有效性上具有一定的优势^[3]。

中药注射剂与传统口服剂型相比,起效迅速、生物利用度高,已被广泛应用于临床危急重症领域^[4-5]。注射用益气复脉(冻干)(YQFM)是天津天士力之骄药业有限公司独有的中药注射剂冻干剂型,分别在治疗心衰、心绞痛方面具有广泛的市场优势^[6-7]。前期针对该产品开展了多项安全性研究,除常规的对鼠、犬的一般药理学(心血管、神经和呼吸系统)试验和大鼠及犬的长期毒性试验外,还有诸如小鼠耳廓蓝染类过敏^[8]和RBL-2H3嗜碱性肥大细胞脱颗粒模型^[9]考察等。国家鼓励企业自主开发新的药品安全评价方法,以期在多角度确定产品的安全性,因此经过筛选本课题组选择斑马鱼作为模式生物来评价YQFM的安全性。

斑马鱼模型近年来才广泛应用于早期药物研发阶段的初筛,其在体模型在毒理学研究中发挥了

独有的优势,具有一定的预见作用。YQFM在临床使用过程中是连续14 d的长期给药,本研究拟通过斑马鱼评价YQFM的心血管毒性和肝脏毒性,进一步考察YQFM的可能潜在不良反应。

1 材料

1.1 药品和主要试剂

YQFM,天津天士力之骄药业有限公司(批号20190311,规格0.65 g/支);甲基纤维素(Aladdin, Shanghai, China);0.9%氯化钠注射液,石家庄四药有限公司(批号1612193402)。

1.2 主要仪器

显微注射仪(PCO-1500, ZGENEBIO, Taiwan);拉针仪(PC-10, Narishige, 日本);解剖显微镜(SZX7, OLYMPUS, 日本);与显微镜相连的相机(TK-C1481EC, JVC, 日本);六孔板(Nest Biotech, 中国)。

1.3 动物

野生型AB系斑马鱼,购自南京尧顺禹生物科技有限公司。

2 方法

2.1 斑马鱼饲养

2.1.1 幼鱼饲养 胚胎和幼鱼每天喂食草履虫2~3次,每次喂食之前换养鱼水1次。然后按照5 mL草履虫/10条小鱼的量投喂。草履虫使用前需用细网过滤杂质。幼鱼自12 d起可开始使用草履虫和丰年虾混合喂养。待幼鱼可全部吃丰年虾时转入鱼房跟成鱼一起统一喂养。

2.1.2 成鱼饲养 适宜温度28.5 °C,光周期控制为14 h光照/10 h黑暗交替循环。10 L的鱼缸成鱼数目最好不超过10条。平时雌鱼和雄鱼可混养也可

分开饲养。养鱼系统保持日夜循环水,每天另补充10%新鲜去离子水。水的盐度使用NaCl调节保持450~500 μs/cm, pH使用NaHCO₃调节保持在7左右。对于胚胎和幼鱼可使用系统循环水喂养,也可使用各种培养液等培养。成鱼使用孵化的丰年虾喂养。

2.2 10%致死剂量(LD₁₀)和最大非致死剂量(MNLD)实验

通过iv YQFM处理受精后48 h的野生型AB系斑马鱼幼鱼。YQFM的注射质量浓度为1、2、10、20、40、60、80和100 mg/mL,每条斑马鱼的注射体积为10 nL;即YQFM的注射剂量分别为10、20、100、200、400、600、800和1 000 ng,同时设置空白对照组(未注射组)和溶剂对照组(注射0.9%氯化钠注射液10 nL);每个剂量处理30尾斑马鱼;药物处理4 h,统计各剂量组斑马鱼死亡数量,绘制最佳的浓度效应曲线,并使用Graphpad统计学软件计算LD₁₀和MNLD值;若在所设置的浓度范围内,有浓度出现全部死亡,且MNLD和LD₁₀值无法求得,则缩小剂量范围,重复上述实验步骤。

2.3 YQFM心血管毒性和肝毒性评价剂量设置、分组及给药

心血管毒性和肝毒性评价注射剂量设置为10%最大非致死剂量(MNLD/10)(20 ng)、MNLD/3(60 ng)、MNLD(200 ng)和LD₁₀(400 ng),即2、6、20、40 mg/mL分别注射10 nL/每条斑马鱼。iv YQFM处理受精后48 h的野生型AB系斑马鱼幼鱼4 h,同时设置空白对照组(未注射组)和溶剂对照组(注射用0.9%氯化钠注射液),每组30尾。

2.4 YQFM心血管毒性评价

每组随机选择10尾在显微镜下对心率进行计数,如发生心律不齐,则分别计数心房率和心室率。药物对心率影响采用以下公式计算:

$$\text{相对心率} = \text{YQFM组心率} / \text{溶剂对照组心率}$$

在立体解剖显微镜下观察斑马鱼有无心包水肿、血流速度变化、血液流失、心包淤(出)血、血栓等,计算各表型发生率,对典型表型进行拍照,留存图片或视频资料。

2.5 YQFM肝毒性评价

每组随机选择10尾斑马鱼在显微镜下对肝脏进行观察,对典型表型进行拍照,利用显微镜自带的专业图像分析软件NIS-Elements D 3.10分析肝脏面积、肝脏不透光度和卵黄囊面积。计算相对肝脏面积、不透光度平均值、卵黄囊延迟吸收倍数。

相对肝脏面积 = YQFM组肝脏面积 / 溶剂对照组肝脏面积

不透光度平均值 = 不透光度总和 / 肝脏面积

卵黄囊延迟吸收倍数 = (YQFM组卵黄囊面积 - 溶剂对照组卵黄囊面积) / 溶剂对照组卵黄囊面积

2.6 统计学方法

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Graphpad作图软件进行数据处理,采用SPSS 19.0统计学分析软件进行统计学分析。

3 结果

3.1 YQFM LD₁₀和MNLD实验结果

空白对照组、溶剂对照组、YQFM 10、20、100、200 ng组均无斑马鱼死亡;YQFM 400、600、800、1 000 ng组各有2、13、22、28只死亡。基于“剂量-致死”数据,利用Graphpad模拟求得,YQFM的MNLD和LD₁₀分别为198.06 ng(约200 ng)和397.12 ng(约400 ng),浓度致死曲线见图1。

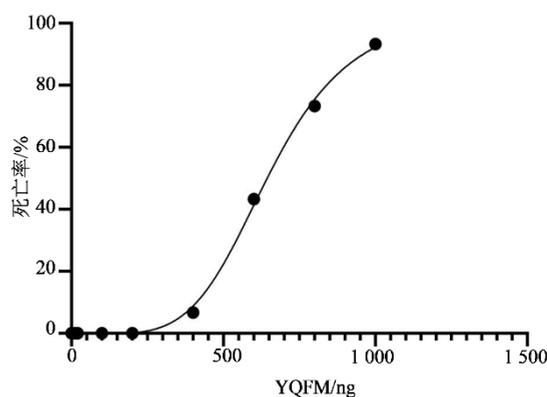


图1 YQFM对斑马鱼的“剂量-致死”曲线
Fig. 1 Dose - lethal curve of YQFM on zebrafish

3.2 YQFM心血管毒性评价

斑马鱼心血管毒性各指标发生率如表1所示,与溶剂对照组比较,YQFM 20、60 ng组斑马鱼未见异常,没有观察到心血管毒性,未见心包水肿(图2);未见心率减慢(图3);未见心律不齐(图4)。

表1 心血管毒性各项指标发生率

Table 1 Incidence rate of cardiovascular toxicity indicators

组别	剂量/ ng	n/ 只	心包水 肿/(n/只)	血流变慢/ %(n/只)	血流缺失/ %(n/只)	心包瘀 (出)血/%	血栓/ %
空白对照	—	30	0	0	0	0	0
溶剂对照	—	30	0	0	0	0	0
YQFM	20	30	0	0	0	0	0
	60	30	0	0	0	0	0
	200	30	3.3(1)	0	0	0	0
	400	28	13.3(4)	6.7(2)	3.3(1)	0	0

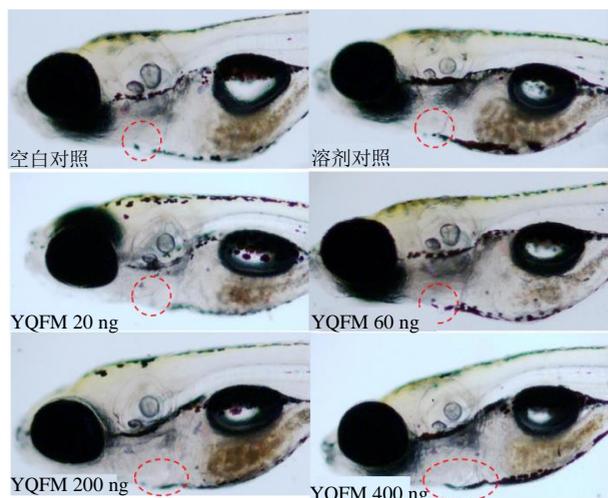


图2 心血管毒性(心包水肿)表型图

Fig. 2 Phenotypic map of cardiovascular toxicity (pericardial edema)

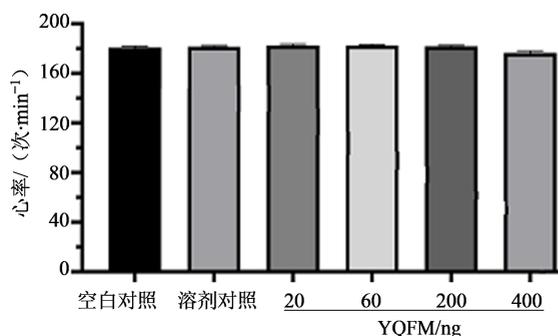


图3 YQFM对斑马鱼心率的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 3 Effect of YQFM on heart rate of zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=10$)

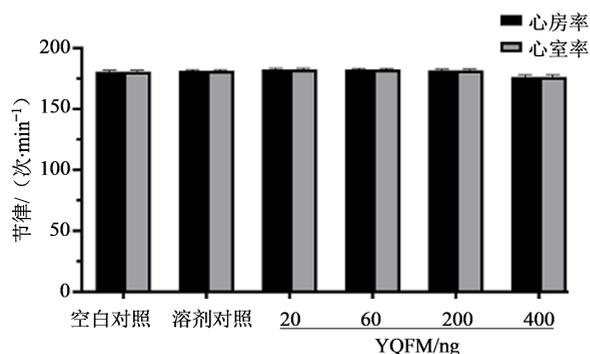


图4 YQFM对斑马鱼心节律的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 4 Effects of YQFM on heart rhythm of zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=10$)

200 ng组斑马鱼出现发生率较低的心血管毒性,表现为心包水肿(发生率为3.3%),未见心率减慢,未见心律不齐。400 ng组斑马鱼出现较轻微的心血管毒性,表现为心包水肿(发生率为13.3%);血流变慢(发生率为6.7%)、血流缺失(发生率为3.3%);未见心率减慢;未见心律不齐。结果提示YQFM在注射

剂量小于MNLD时,不诱发斑马鱼心血管毒性。

3.3 YQFM肝毒性评价结果

肝脏表型图见图5。与溶剂对照组比较, YQFM各剂量(20、60、200、400 ng)组斑马鱼相对肝脏大小、肝脏不透光度平均值和卵黄囊延迟吸收倍数均无统计学差异;提示YQFM不诱发斑马鱼肝毒性。结果见图6。

4 讨论

目前“水中的小白鼠”——斑马鱼模型因其成活率高、繁殖快速、经济和高效等优点,被认为是药

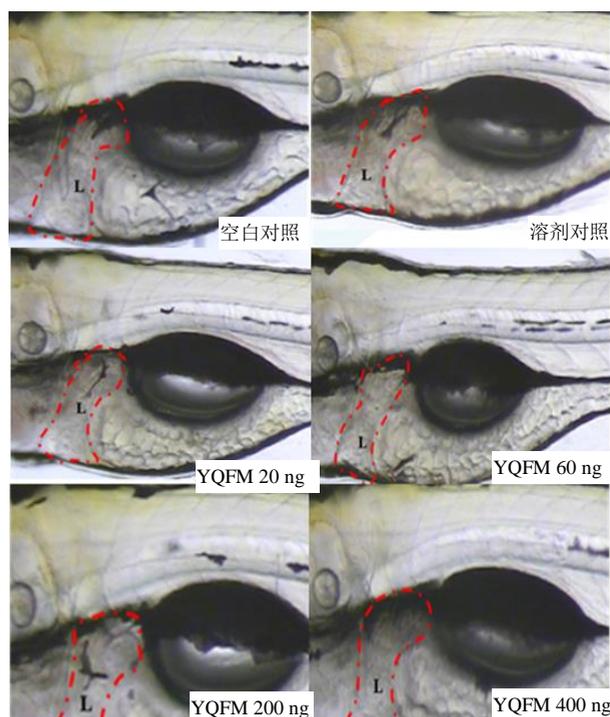


图5 斑马鱼肝毒性表型图

Fig. 5 Hepatotoxicity phenotype diagram of zebrafish

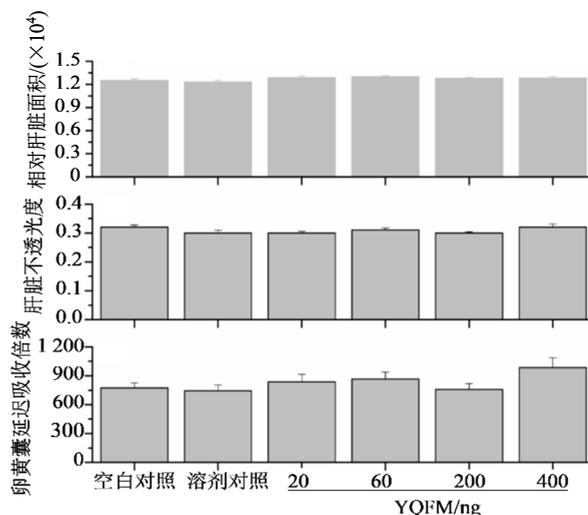


图6 肝毒性定量评价

Fig. 6 Quantitative evaluation of hepatotoxicity

物研究或毒性物质对脊柱发育和心脏发育的最好在体模型,有研究表明斑马鱼模型几乎是预测心脏毒性的最佳模型,且准确率几乎达到了100%。本研究利用野生型AB品系斑马鱼,评价了YQFM的血管毒性和肝毒性。YQFM的临床给药方式为iv注射,说明书用量是8支溶于250~500 mL的注射用氯化钠注射液或5%的葡萄糖注射液中,因此YQFM的临床最大浓度为20.8 mg/mL。实验结果表明,YQFM的MNLD和LD₁₀分别约为200 ng和400 ng(分别为20 mg/mL和40 mg/mL,几乎达到了临床最大使用浓度和最大使用浓度的2倍浓度)。YQFM在注射剂量小于MNLD时,不诱发斑马鱼心血管毒性;在接近或超过LD₁₀时,YQFM对心血管的影响是引起轻微的心包水肿和血流减慢;与溶剂对照组比较,YQFM各注射剂量组(20、60、200、400 ng)斑马鱼肝脏大小、肝脏不透光度平均值和卵黄囊面积均无统计学差异;提示YQFM不诱发斑马鱼肝毒性。

斑马鱼在受精后7 d内全身透明,适合于显微镜下观察不同的组织器官,因此对于中药、天然药物的安全性研究,斑马鱼具有独到的优势。注射用益气复脉(冻干)作为已上市近15年的中药类冻干粉,安全性得到了诸多实验及临床验证;近年来国家鼓励通过多种评价方法对产品进行安全性再评价,本研究利用模式生物斑马鱼评价了YQFM的心血管和肝脏安全性,发现其注射剂量小于MNLD时,不诱发斑马鱼心血管毒性和肝毒性。这说明YQFM的安全性良好,不过建议在临床使用时应尽量将用药范围控制在安全剂量内,严格按照说明书用量和配制浓度进行给药,以减少不良反应的发生。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 周寅,张红菱. 斑马鱼的实验室养殖方法及其实验应用[J]. 武汉工业学院学报, 2010, 29(4): 13-16.
Zhou Y, Zhang H L. Zebrafish laboratory culture techniques[J]. J Wuhan Inst Technol, 2010, 29(4): 13-16.

[2] 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.
Peng Y R, Wei J Y, Ding Y F, et al. Progress in the study of drug toxicity based on zebrafish model and new strategies for the study of Chinese traditional medicine toxicity[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(1): 17-30.

[3] 钱星宇. 模式生物斑马鱼在药物毒性研究中的应用进展综述[J]. 科学技术创新, 2019(26): 137-138.

Qian X Y. Review of application progress of model biological zebrafish in drug toxicity study [J]. Sci Technol Innovat, 2019(26): 137-138.

[4] 聂忠富. 中药注射剂在急诊医学中的应用现状与发展前景研究[J]. 吉林医学, 2013, 34(16): 3173-3175.
Nie Z F. Study on the application status and development future of traditional Chinese medicine injection in emergency medicine [J]. Jilin Med Sci, 2013, 34(16): 3173-3175.

[5] 苏小琴, 张磊, 李海燕, 等. 基于Q-marker的中药注射剂质量控制研究思路——以注射用丹参多酚酸为例[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4663-4672.
Su X Q, Zhang L, Li H Y, et al. Quality control of Chinese materia medica injection based on Q-marker——Taking salvianolic acids for injection as an example [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(19): 4663-4672.

[6] 鞠爱春, 罗瑞芝, 秦袖平, 等. 注射用益气复脉(冻干)药理作用及临床研究进展[J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 354-364.
Ju A C, Luo R Z, Qin X P, et al. Pharmacological effects and clinical research progress of Yiqi Fumai Lyophilized Injection [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(3): 354-364.

[7] 孟静, 鲁晓燕. 注射用益气复脉(冻干)治疗心力衰竭的药理作用及临床应用研究进展[J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1506-1509.
Meng J, Lu X Y. Research progress on pharmacological effects and clinical efficacy of Yiqi Fumai Lyophilized Injection in treatment of cardiac failure [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(8): 1506-1509.

[8] 谷悦, 鞠爱春, 满淑丽, 等. 注射用益气复脉(冻干)安全性评价[J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 399-404.
Gu Y, Ju A C, Man S L, et al. Evaluating safety of Yiqi Fumai Lyophilized Injection [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(3): 399-404.

[9] 杨慧萍. 时间分辨荧光纳米粒的制备和类过敏反应评价模型的建立及应用[D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
Yang H P. Preparation of time-resolved fluorescent nanoparticles and establishment and application of anaphylaxis evaluation model [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2019.

[10] 万梅绪, 宋美珍, 李智, 等. 小鼠耳廓蓝染类过敏检测方法用于注射益气复脉(冻干)的质控研究[J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 405-410, 428.
Wan M X, Song M Z, Li Z, et al. Quality control study on Yiqi Fumai Lyophilized Injection for mouse ear blue staining pseudo - allergic reactions [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(3): 405-410, 428.

[责任编辑 兰新新]