

基于斑马鱼的香青兰总黄酮整体发育急性毒性评价研究

冉凯凯¹, 苏文灵^{2, 4}, 郑瑞芳^{2, 4}, 夏青³, 张长青³, 刘可春³, 张云^{3*}, 邢建国^{2, 4*}

1. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

3. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103

4. 新疆维吾尔药重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830002

摘要:目的 利用模式生物斑马鱼研究香青兰总黄酮(TFDM)整体发育急性毒性。方法 采用发育至48 h的斑马鱼暴露于5、10、20、40、42、44、46、48、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的TFDM, 分别于暴露后24、48 h(24、48 hpe), 计算死亡率、半数死亡浓度(LC₅₀)值; 测量每组斑马鱼幼鱼的体长, 进行形态学观察并评分; 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; 显微镜下观察各组斑马鱼是否有体侧水肿来判断TFDM对肾脏的影响并拍照; 应用肝脏标记绿色荧光的转基因斑马鱼Tg(L-FABP:EGFP), 通过检测肝脏荧光强度和面积, 观察TFDM对肝脏毒性的影响。结果 TFDM的24 hpe LC₅₀为50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 48 hpe LC₅₀为48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TFDM组斑马鱼幼鱼全部死亡。与空白对照组比较, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下的TFDM对斑马鱼的形态和心、肝、肾各脏器无影响; 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的TFDM处理斑马鱼48 h导致个别斑马鱼鱼鳃体积减小或缺失, 对其他脏器无显著影响; 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的TFDM导致斑马鱼出现轻微的心包水肿, 处理48 h以后斑马鱼体长显著减小($P<0.01$), 形态评分显著下降($P<0.01$), 斑马鱼的肝脏形态出现轻微变化, 但肝脏荧光强度和肝脏荧光面积无显著性变化, 对肾脏无影响; 暴露在50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的TFDM中24 h, 斑马鱼出现心包水肿, 心率显著下降($P<0.05$), 肝脏荧光强度和面积显著减小($P<0.05$), 肾脏无明显变化。结论 TFDM对斑马鱼的毒性较小, 低浓度($\leq 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的TFDM对斑马鱼无毒性; 中浓度(20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)下TFDM对斑马鱼的毒性微弱, 仅导致部分斑马鱼鱼鳃体积减小或缺失, 对其他各脏器无毒性; 高浓度($\geq 40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及以上)下有轻微的心脏毒性和肝脏毒性, 在临床应用中有必要合理控制用量。

关键词: 香青兰总黄酮; 整体发育急性毒性; 斑马鱼; 心脏; 肾脏; 肝脏

中图分类号: R994.21 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)06-1119-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.015

Study on overall developmental acute toxicity evaluation of total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* L. based on zebrafish

RAN Kaikai¹, SU Wenling^{2,4}, ZHENG Ruifang^{2,4}, XIA Qing³, ZHANG Changqing³, LIU Kechun³, ZHANG Yun³, XING Jianguo^{2,4}

1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Institute of Medicine, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830002, China

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

4. Xinjiang Uygur Medicine Key Laboratory, Urumqi 830002, China

Abstract: **Objective** To study the effects of total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* L. (TFDM) on overall developmental acute toxicity of zebrafish. **Methods** Zebrafish embryos at 48 hpf (hours post fertilization) were exposed to different concentrations

收稿日期: 2022-02-21

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题(2021D04017); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所科研项目(KY2021097); 2020年自治区高层次人才引进工程(柔性引进人才)项目; 山东省自然科学基金资助项目(ZR2020YQ60)

第一作者: 冉凯凯(1994—), 女, 硕士, 研究方向为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: 18293113283@163.com

***共同通信作者:** 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

邢建国(1968—), 男, 硕士, 研究员, 研究方向为中药民族药新制剂与新剂型研究。Tel: (0991)2828537 E-mail: xjguodd@163.com

(5, 10, 20, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of TFDM. The mortality rate and half death concentration (LC_{50}) were recorded at 24 and 48 hpe (hours post exposure). The body length of each group of juvenile zebrafish was measured, morphological observation and scoring were carried out. 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 zebrafish venous sinus and arterial sphere (SV-BA). The influence of TFDM on kidney was determined by observing lateral edema of zebrafish in each group under the microscope and taking pictures. Transgenic zebrafish *Tg(L-FABP:EGFP)* labeled with green fluorescence in liver was used to observe the effect of TFDM on liver toxicity by detecting the intensity and area of liver fluorescence. **Results** The 24 hpe LC_{50} of TFDM was 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the 48 hpe LC_{50} was 48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and all the juvenile zebrafish in TFDM 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group died. Compared with blank control group, TFDM under 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ had no effect on morphology and organs of heart, liver and kidney of zebrafish. TFDM treatment with 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration for 48 h resulted in decreased or lost swim bladder volume of individual zebrafish, but had no significant effect on other organs. After treatment for 48 h, the body length and morphology score of zebrafish were significantly decreased ($P < 0.01$), and the liver morphology of zebrafish was slightly changed, but the liver fluorescence intensity and liver fluorescence area had no significant change, and had no effect on kidney. After exposure to 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TFDM for 24 h, pericardium edema was observed, heart rate decreased significantly ($P < 0.05$), liver fluorescence intensity and area decreased significantly ($P < 0.05$), and kidney did not change significantly. **Conclusion** In this study, TFDM was found to be less toxic to zebrafish. At low concentration ($\leq 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), TFDM had no toxicity to zebrafish. TFDM showed weak toxicity to zebrafish at medium concentration (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), which only reduced or lost the swim bladder of some zebrafish, and had no toxicity to other organs. Slight cardiotoxicity and hepatotoxicity were observed at high concentrations ($\geq 40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Therefore, it is necessary to strengthen the management and control the dosage in clinical application.

Key words: total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* L.; overall developmental acute toxicity; Zebrafish; heart; kidneys; liver

香青兰 *Dracocephalum moldavica* L. 为蒙古族和维吾尔族的常用药材, 临床常用来治疗冠心病、高血压、心绞痛、动脉硬化、心肌缺血等疾病^[1]。随着香青兰研究的逐步深入, 现已从香青兰中提取分离出糖类、蛋白质和氨基酸类、挥发油类、甾体类、三萜类、苯丙素类、黄酮类和各种微量元素等成分^[2]。近些年来, 香青兰中黄酮类化合物因具有广泛的生物功能而成为研究热点。大量研究显示, 黄酮类化合物对心血管系统和内分泌系统等都具有调节作用^[3]。前期研究证实, 香青兰有效部位香青兰总黄酮 (total flavonoids of *Dracocephalum moldavica*, TFDM) 具有较好的心脏保护作用^[4-5]。而关于 TFDM 的整体发育急性毒性尚未见报道。

斑马鱼成年鱼个体小、易饲养, 繁殖力强、发育快速、性成熟期短, 胚胎体外发育且透明, 便于观察^[6]。斑马鱼基因与人类基因组约有 87% 的相似性^[7], 约 70% 的人类基因至少有 1 个明显的斑马鱼同源基因^[8]。斑马鱼的生理特性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^[9-10]。因此本研究选择新型模式生物斑马鱼, 探讨 TFDM 对斑马鱼整体发育急性毒性的影响, 为临床指导合理用药提供理论参考依据。

1 材料

1.1 实验动物

本实验采用的斑马鱼为野生型 AB 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。斑马鱼在黑暗/光照 (10 h/14 h) 条件下培养, 温度 28 $^{\circ}\text{C}$ 。在实验前 1 天 15:30 时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。第 2 天 8:30 时抽板, 11:00 时收集受精卵。将收集好的胚胎放到 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中控光培养, 以备使用。

1.2 主要试剂

TFDM (新疆药物研究所自制, 批号 201804, 总黄酮质量分数为 60.60%~62.35%), 用二甲基亚砜 (DMSO) 配制成储备液; 斑马鱼幼鱼培养用水, 含 0.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 、0.17 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 、0.16 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 。

1.3 主要仪器

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 处理斑马鱼的方法

在斑马鱼发育至受精后 48 h (48 hours post fertilization, 48 hpf), 挑选发育正常的斑马鱼幼鱼, 移入 24 孔板的样孔中, 每孔 10 尾。根据预试验, 设定空白对照组 (斑马鱼幼鱼培养用水)、溶剂对照组 (0.5% DMSO)、TFDM (5、10、20、40、42、44、46、48、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组, 每组设 3 个重复孔。随后于光照培养箱中恒温 (28 $^{\circ}\text{C}$) 孵育, 连续处理 2 d, 每天换液。

2.2 TFDM 对斑马鱼死亡率的影响

观察并记录施药后 24、48 h (24、48 hours post exposure, 24、48 hpe) 各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、半数死亡浓度 (LC_{50}) 值。

2.3 TFDM 对斑马鱼体长的影响及形态评分

24、48 hpe, 显微镜下观察斑马鱼自主活动情况, 利用质量浓度为 0.3% 的三卡因溶液麻醉斑马鱼, 固定焦距侧面拍照。记录斑马鱼的形态学观察指标, 如体形、脑、上面部结构 (眼、耳囊、嗅区)、下面部结构 (上下颌)、脊索、体节、尾、鳍、心脏、肝、鳃、色素沉着等, 并按照报道中方法^[11]对每条斑马鱼进行形态评分。5 分: 斑马鱼形态完全正常; 4 分: 轻微的形态变异, 表现为发育迟缓或异常, 并可恢复; 3 分: 形态结构轻微的异常^[11]。利用 Image-Pro Plus 5.1 软件测量每组斑马鱼幼鱼的体长 (从鱼头至鱼尾), 评价 TFDM 作用后对斑马鱼生长是否有影响。

2.4 TFDM 对斑马鱼心脏毒性的影响

24、48 hpe, 利用质量浓度为 0.3% 的三卡因麻醉幼鱼 1 min, 于倒置显微镜下观察各组斑马鱼幼鱼心脏情况。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。

2.5 TFDM 对斑马鱼肾脏毒性的影响

24、48 hpe, 将斑马鱼利用质量浓度为 0.3% 的三卡因麻醉 1 min。显微镜下观察各组斑马鱼是否有体侧水肿来判断 TFDM 对斑马鱼肾脏的影响并拍照。

2.6 TFDM 对斑马鱼肝脏毒性的影响

24、48 hpe, 将斑马鱼用质量浓度为 0.3% 的三卡因麻醉 1 min, 然后用 4% 甲基纤维素固定于载玻片上, 将斑马鱼固定侧面体位进行拍照。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 软件测量斑马鱼幼鱼肝脏荧光强度和面积。

2.7 统计学分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 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 TFDM 对斑马鱼死亡率的影响

斑马鱼暴露在 5、10、20、40、42 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下的 TFDM 时均无死亡。44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下, 斑马鱼出现死亡, 24 hpe 的 LC_{50} 为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 48 hpe 的 LC_{50} 为 48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下斑马鱼幼鱼全部死亡。结果见表 1。

表 1 暴露于不同浓度的 TFDM 的斑马鱼累积死亡率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Cumulative mortality of zebrafish exposed to different concentrations of TFDM ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	死亡率/%	
		24 hpe	48 hpe
空白对照	—	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
溶剂对照	—	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
TFDM	5	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	10	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	20	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	40	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	42	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	44	6.67 $\pm$ 3.33	23.33 $\pm$ 8.82
	46	23.33 $\pm$ 3.33**	33.33 $\pm$ 3.33**
	48	26.67 $\pm$ 3.33**	50.00 $\pm$ 0.00**
	50	50.00 $\pm$ 5.77**	100.00 $\pm$ 0.00**
	100	100.00 $\pm$ 0.00**	100.00 $\pm$ 0.00**

3.2 TFDM 对斑马鱼形态的影响

3.2.1 TFDM 对斑马鱼体长的影响 与空白对照组比较, 24 hpe, 5、10、20、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TFDM 组斑马鱼的体长无显著差异; 48 hpe, 5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TFDM 组斑马鱼的体长无显著差异, 但在 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TFDM 处理下, 斑马鱼体长显著减小 ($P < 0.01$)。结果见图 1。

3.2.2 形态评分 图 2 为 TFDM 暴露 48 h 的各浓度斑马鱼的图像记录。空白对照组斑马鱼各器官清晰可见、色素分布均匀、鱼鳃发育正常、体节明显可见, 形态评分为 5 分。与空白对照组比较, 暴露在 5、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TFDM 时, 斑马鱼幼鱼的形态无显著差异; 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下, 24 hpe 斑马鱼幼鱼的

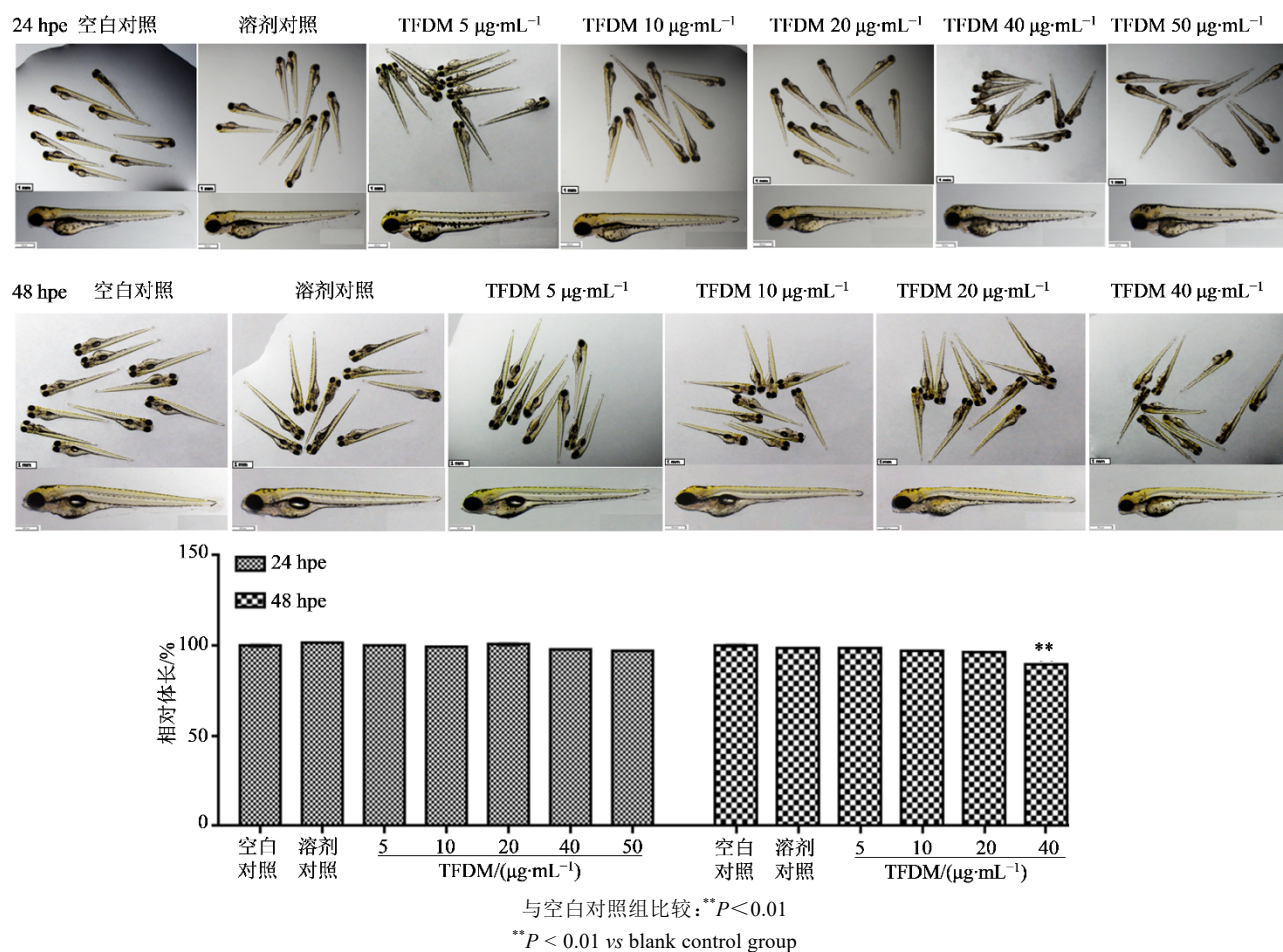


图1 斑马鱼幼鱼经TFDM处理24、48 h后的形态学变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Morphological changes of zebrafish embryos treated with TFDM for 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=5$)

形态正常,48 hpe 部分斑马鱼幼鱼的鱼鳔体积减小或缺失,但未出现其他畸形,形态评分均值为4.6;40 µg·mL⁻¹ 质量浓度下,48 hpe 斑马鱼幼鱼出现鱼鳔缺失的现象,并出现轻微的心包水肿,形态评分均值为3.4,差异显著($P < 0.01$)。

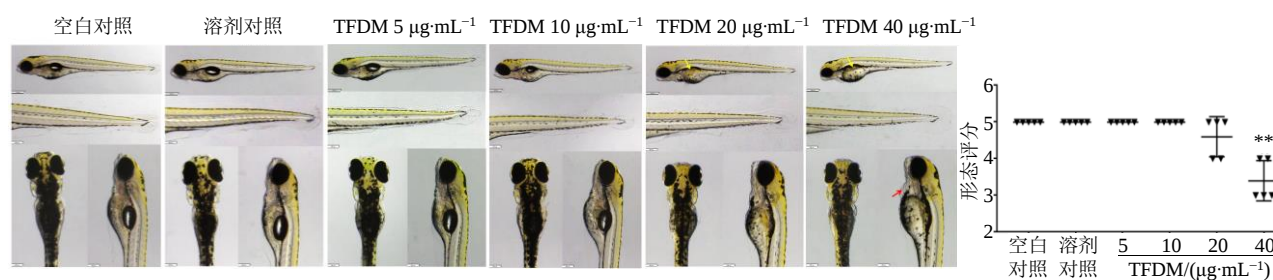
3.3 TFDM对斑马鱼心脏的影响

3.3.1 TFDM对斑马鱼心脏形态的影响 24 hpe,与空白对照组比较,TFDM 5、10、20 µg·mL⁻¹ 组斑马

鱼心脏形态正常,心包无水肿;TFDM 40、50 µg·mL⁻¹ 组斑马鱼出现轻微的心包水肿。

48 hpe,与空白对照组比较,TFDM 5、10、20 µg·mL⁻¹ 组斑马鱼心脏形态正常,心包无水肿;TFDM 40 µg·mL⁻¹ 组斑马鱼出现轻微的心包水肿现象。结果见图3。

3.3.2 TFDM对斑马鱼心率和SV-BA距离的影响 24 hpe,与空白对照组比较,TFDM 5、10、



黄色箭头-鱼鳔缺失;红色箭头-心包水肿;与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

Yellow arrow - loss of swim bladder; red arrow - pericardium edema; ** $P < 0.01$ vs blank control group

图2 暴露于不同浓度的TFDM 48 h的斑马鱼形态变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Morphological changes of zebrafish exposed to different concentrations of TFDM for 48 h ($\bar{x} \pm s, n=5$)

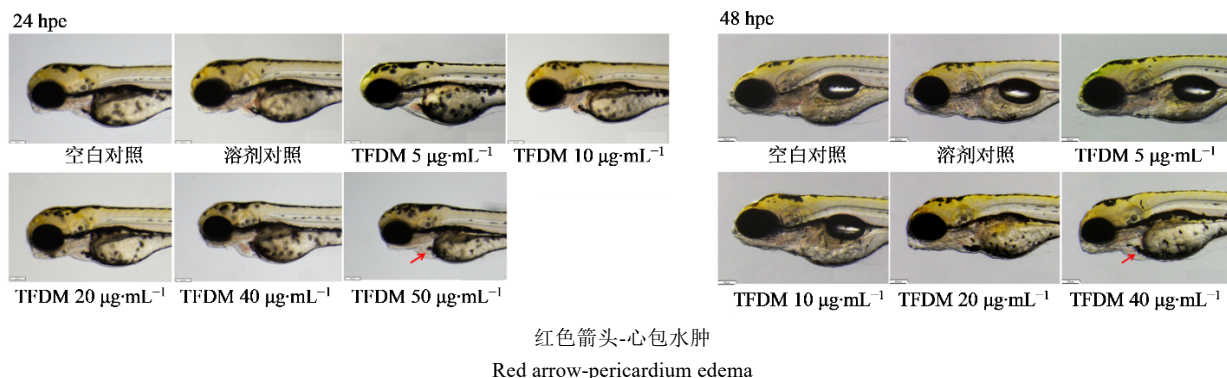


图3 斑马鱼幼鱼经TFDM处理24、48 h后的心脏形态学变化

Fig. 3 Morphological changes of zebrafish heart embryos treated with TFDM for 24 and 48 h

20、40 µg·mL⁻¹组斑马鱼心率均无显著变化, 50 µg·mL⁻¹组斑马鱼幼鱼心率显著下降($P < 0.05$)。与空白对照组比较, TFDM组的斑马鱼幼鱼SV-BA距离无显著变化。

48 hpe, 与空白对照组比较, 暴露在5、10、20、40 µg·mL⁻¹浓度下斑马鱼幼鱼的心率和SV-BA距离均无显著变化。结果见图4。

3.4 TFDM对斑马鱼肾脏的影响

通过观察24、48 hpe各组斑马鱼体侧形态的变化情况来判断TFDM对斑马鱼肾脏的毒性。与空白对照组比较, TFDM各处理组斑马鱼幼鱼体侧均无水肿, 形态正常。结果见图5。

3.5 TFDM对斑马鱼肝脏的影响

利用荧光显微镜观察TFDM对斑马鱼肝脏的影响。结果显示, 24 hpe, 与空白对照组比较, TFDM在5、10、20、40 µg·mL⁻¹时斑马鱼幼鱼的肝脏形态、肝脏荧光强度和肝脏荧光面积无显著性差异, 50 µg·mL⁻¹的TFDM导致斑马鱼肝脏荧光面积和肝脏荧光强度显著减小($P < 0.05$)。

48 hpe, 与空白对照组比较, 暴露在TFDM 5、10、20 µg·mL⁻¹的斑马鱼幼鱼肝脏形态、肝脏荧光强度、肝脏荧光面积均无显著差异; 40 µg·mL⁻¹浓度下斑马鱼幼鱼的肝脏荧光强度和肝脏荧光面积无显著差异, 但肝脏形态发生变化。结果见图6。

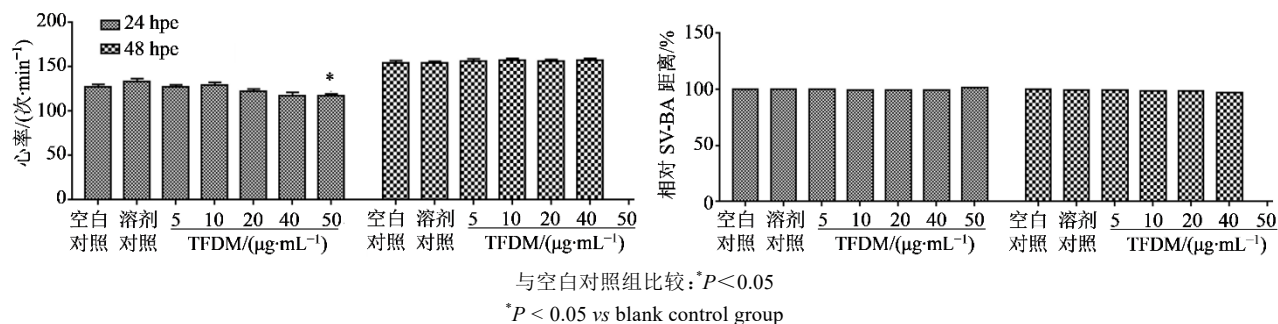
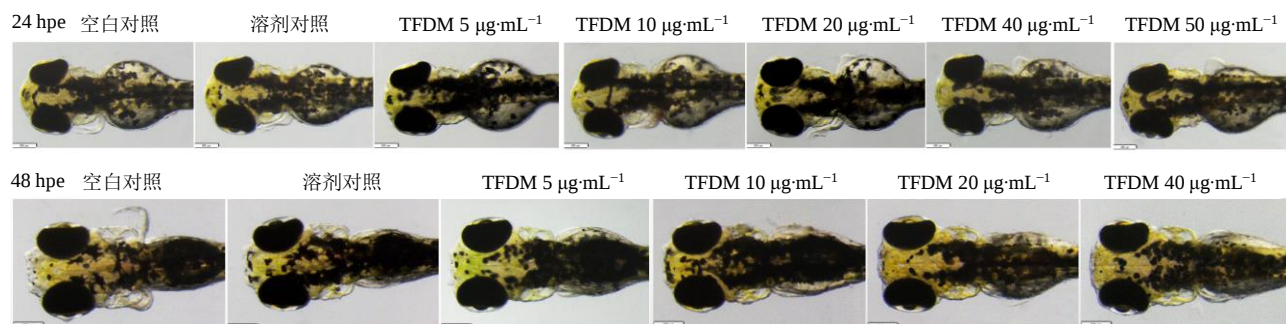
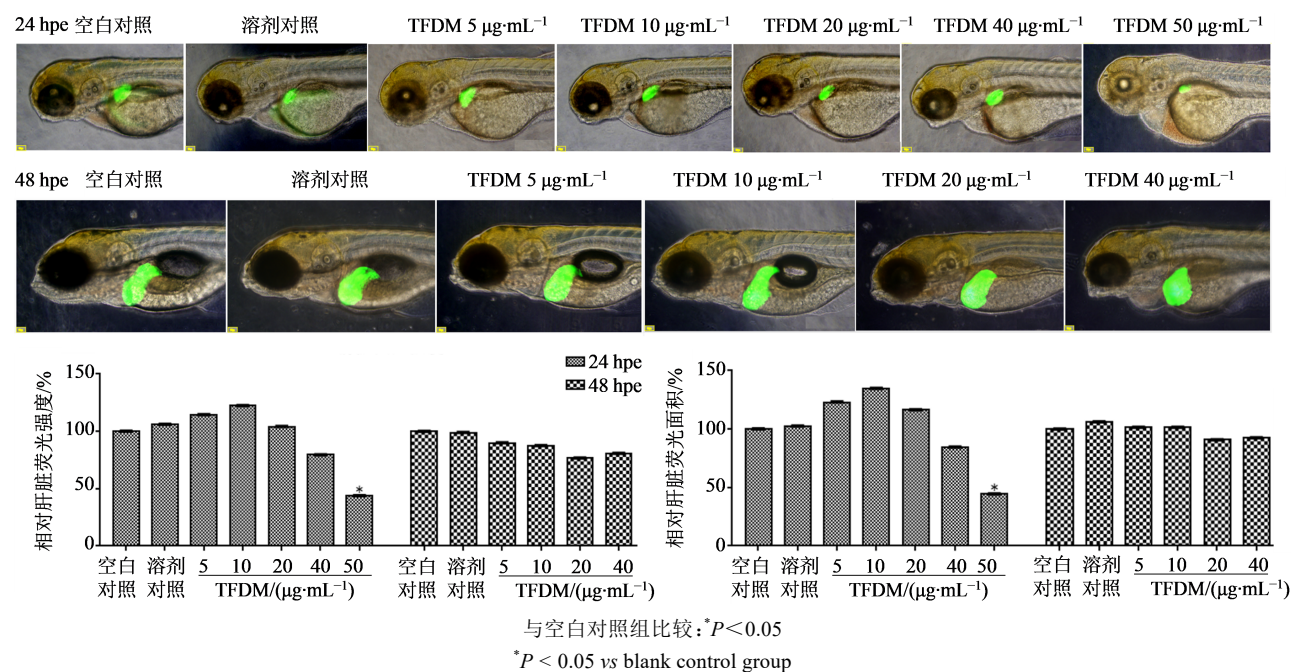
图4 斑马鱼幼鱼经TFDM处理后心率和SV-BA距离的变化($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 4 Changes of heart rate and SV-BA distance of juvenile zebrafish treated with TFDM ($\bar{x} \pm s, n=5$)

图5 斑马鱼幼鱼经TFDM处理24、48 h后的体侧形态学变化

Fig. 5 Somatic morphological changes of zebrafish treated with TFDM for 24 and 48 h

图6 斑马鱼幼鱼经TFDM处理后的肝脏荧光强度和荧光面积($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 6 Liver fluorescence intensity and fluorescence area of zebrafish embryos treated with TFDM ($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 讨论

在欧洲,动脉粥样硬化性心血管疾病(CVD)是导致人类过早死亡的主要原因,80%以上的心血管疾病死亡率发生在发展中国家。CVD造成的死亡率和残疾非常高,因此CVD仍然是导致生产力损失的主要原因^[12]。香青兰在我国北方地区较多见,主要作为民族药物使用,被广泛用于治疗冠心病、心绞痛和心肌缺血等,其化学成分复杂,药理作用广泛^[13]。但目前未见对TFDM整体发育急性毒性评价的报道,这限制了香青兰的充分开发利用。

斑马鱼在心血管系统、神经系统以及肾脏、肝脏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。很多欧美国家现已广泛应用斑马鱼模型进行化合物的活性筛选与安全性评价^[14]。因此本研究采用斑马鱼模型对TFDM的整体发育急性毒性进行评价,为对TFDM的综合开发利用提供参考。

本实验采用不同浓度的TFDM来暴露48 hpf的斑马鱼胚胎,结果显示,TFDM在20 µg·mL⁻¹浓度以下对斑马鱼的死亡率、形态、心肝肾各脏器无影响,20 µg·mL⁻¹浓度处理斑马鱼48 h导致个别斑马鱼鱼鳃体积减小或缺失,对其他脏器无显著影响。40 µg·mL⁻¹浓度时导致斑马鱼出现轻微的心包水肿,在处理48 h以后斑马鱼的肝脏形态出现轻微变化,但对肾脏无影响。斑马鱼暴露在50 µg·mL⁻¹的TFDM中24 h,斑马鱼出现心包水肿和肝脏形态

的变化。

斑马鱼全身透明,可以利用显微镜直观的观察其心脏形态变化和心率变化等^[15]。斑马鱼的心率反映了心脏的泵血功能^[16]。斑马鱼的SV是血液进入心房的部位,BA是血液流出心室的部位,心脏SV-BA距离的变化能反映心脏损伤程度^[17]。本实验以心率和SV-BA距离为指标来判断TFDM对斑马鱼心脏的毒性影响。24 hpe,与空白对照组比较,除TFDM为50 µg·mL⁻¹时斑马鱼心率减小外,其他各浓度组(5、10、20、40 µg·mL⁻¹)的斑马鱼心率均无显著性变化;TFDM组斑马鱼的SV-BA距离无显著性差异。48 hpe,与空白对照组比较,各浓度组(5、10、20、40 µg·mL⁻¹)斑马鱼的心率、SV-BA距离均无显著性差异。提示高浓度的TFDM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,如心包水肿、脑水肿和体侧水肿等^[18-19]。本实验观察到所有浓度下斑马鱼幼鱼的心包、脑部、体侧形态没有变化,证明TFDM对斑马鱼幼鱼的肾脏没有毒性。本实验利用肝脏荧光转基因品系斑马鱼Tg(L-FABP:EGFP),通过检测斑马鱼肝脏荧光强度和肝脏荧光面积来评价TFDM对斑马鱼肝脏的毒性。结果发现,在24 hpe,与空白对照组比较,50 µg·mL⁻¹的TFDM导致斑马鱼肝脏荧光强度和肝脏荧光面积显著减小,其他浓度组斑马鱼的肝脏荧光强度和肝脏荧光面积无显著性差

异。48 hpc,与空白对照组比较,各浓度组的肝脏荧光强度和肝脏荧光面积均无显著变化。提示高浓度的TFDM对肝脏具有轻微毒性。

本实验对TFDM整体发育急性毒性进行初步探索,研究证明了TFDM对斑马鱼的毒性较小,在高浓度下(40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及以上)才会影响斑马鱼的形态,致畸的表现鱼鳔的缺失或充气功能障碍、心包轻微水肿、肝脏荧光强度和肝脏荧光面积减小,但致畸毒性较小。因此,说明TFDM在应用中较安全,副作用较小,但应合理控制用量。但是,TFDM在临床应用中的急性毒性,尚需通过其他的方法或者动物模型做进一步探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 洪秀芳,魏好,王晓雯,等.香青兰冲剂治疗冠心病心绞痛疗效分析[J].新疆中医药,1999,17(2):38-40.
Hong X F, Wei H, Wang X W, et al. Effect of *Dracocephalum Moldavica* L. granule on angina pectoris of coronary heart disease [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med, 1999, 17(2): 38-40.
- [2] 天亮,吴香杰,梦月.蒙药材香青兰的化学成分研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(14):31,37.
Tian L, Wu X J, Meng Y. Research progress on chemical constituents of Mongolian medicinal material *Dracocephalum Moldavica* L. [J]. World Latest Med Inf, 2017, 17(14): 31, 37.
- [3] 刘云,靳敏,王占黎.香青兰总黄酮化学成分和药理作用研究进展[J].中国民族民间医药,2019,28(1):68-71.
Liu Y, Jin M, Wang Z L. Advances in the study of flavonoids content and pharmacological action of *Dracocephalum moldavica* [J]. Chin J Ethnomedicine Ethnopharmacy, 2019, 28(1): 68-71.
- [4] 信盼,王新春,黄川生,等.香青兰总黄酮对ApoE基因敲除小鼠动脉粥样硬化及TGF- β 1/Smad通路的影响[J].石河子大学学报:自然科学版,2018,36(4):492-497.
Xin P, Wang X C, Huang C S, et al. Effect of *Dracocephalum moldavica* L. total flavones on the atherosclerotic and TGF- β 1/Smad pathway in ApoE knockout mice [J]. J Shihezi Univ Nat Sci, 2018, 36(4): 492-497.
- [5] 马丽月,曾诚,郑瑞芳,等.田蓟苷对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织的保护作用研究[J].中国药房,2018,29(20):2805-2810.
Ma L Y, Zeng C, Zheng R F, et al. Protective effects of tilianin on brain tissue in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats [J]. China Pharm, 2018, 29(20): 2805-2810.
- [6] 孙智慧,贾顺姬,孟安明.斑马鱼:在生命科学中畅游[J].生命科学,2006,18(5):431-436.
Sun Z H, Jia S J, Meng A M. Zebrafish: swimming in life sciences [J]. Chin Bull Life Sci, 2006, 18(5): 431-436.
- [7] Lieschke G J, Currie P D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(5): 353-367.
- [8] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503.
- [9] 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 on application and mechanism of zebrafish in drug toxicology assessment [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(1): 278-288.
- [10] 冉凯凯,郑瑞芳,夏青,等.模式生物斑马鱼在心功能评价中的应用[J].药物评价研究,2021,44(8):1581-1587.
Ran K K, Zheng R F, Xia Q, et al. Zebrafish inflammation model and its application in anti-inflammatory field of traditional Chinese medicine [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(8): 1581-1587.
- [11] Panzica-Kelly J M, Zhang C X, Danberry T L, et al. Morphological score assignment guidelines for the dechorionated zebrafish teratogenicity assay [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2010, 89(5): 382-395.
- [12] Kurrelmeyer K. Cardiovascular disease in women [J]. Methodist Debakey Cardiovasc J, 2017, 13(4): 183-184.
- [13] 闫丽丽.香青兰总黄酮抗支气管哮喘的药效学及作用机制研究[D].石河子:石河子大学,2013.
Yan L L. To study pharmacodynamics and effect mechanisms of *Dracocephalum moldavica* L. total flavonoids on bronchial asthma [D]. Shihezi: Shihezi University, 2013.
- [14] 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.
- [15] 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 zebra fish models in heart disease research and drug induced

- cardiotoxicity evaluation [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(1): 247-251.
- [16] 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. Establishment and study of zebrafish vessel inhibition and cardiac damage model [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2016.
- [17] 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.
- Lyu J, Li C, Yang L F, et al. Study on the heart protective effect of *Panax quinquefolium* extract based on zebra fish model [J]. China Pharm, 2020, 31(3): 308-313.
- [18] 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.
- [19] 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 Renal Physiol, 2005, 288(5): F923-F929.

[责任编辑 兰新新]

· 公益广告 ·

