

基于斑马鱼模型的中药致肝脏毒性评价的研究进展

原 杨^{1,2}, 尚 悦², 王 鹏³, 樊慧蓉^{2*}, 侯文彬^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192

3. 天津市汉康医药生物技术有限公司, 天津 300409

摘要: 中药的广泛使用, 提高了肝脏毒性发生风险。斑马鱼模型在肝脏毒性研究中显现出较大潜力的同时, 也面临评价标准难以统一的问题。在使用斑马鱼进行药物肝损伤检测和评价之前应先明确其在不同生长阶段的肝功能状态, 利用斑马鱼胚胎和幼鱼的通体透明的特点, 以胚胎的孵化率、死亡率、畸形率作出初步的发育毒性判断, 以幼鱼肝脏灰度值, 肝脏面积大小, 卵黄囊吸收程度作为药物是否具有肝脏毒性的判断标准, 利用成鱼肝脏容易分离的特点研究肝脏毒性的作用机制。检测时可根据这些指标判断斑马鱼肝脏发育阶段, 为其是否发生药物肝损伤提供依据, 从而进一步提高临床用药安全性。综述了不同发育时期斑马鱼评估中药肝毒性的研究方法, 以期后续中药的肝脏毒性评价提供参考。

关键词: 中药; 斑马鱼; 肝损伤; 肝毒性; 药物性肝损伤; 肝脏毒性检测

中图分类号: R965.3; R969.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2024) 05-0933-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.003

Research progress on evaluation of hepatotoxicity of traditional Chinese medicine based on zebrafish model

YUAN Yang^{1,2}, SHANG Yue², WANG Peng³, FAN Huirong², HOU Wenbin²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Institute of Radiology Medicine Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

3. Tianjin Hankang Medical Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300409, China

Abstract: The extensive use of Chinese medicine increases the risk of liver toxicity. While zebrafish model shows great potential in hepatotoxicity research, it also faces the problem that evaluation criteria are difficult to unify. Before using zebrafish for drug liver injury detection, the liver function status of zebrafish at different growth stages should be clearly defined. Given that the whole transparent characteristics of zebrafish embryos and juvenile fish, the preliminary developmental toxicity judgment can be made based on the hatching rate, mortality rate and deformity rate of embryos. The degree of yolk sac absorption is used as the criterion to judge whether the drug has hepatotoxicity. The mechanism of hepatotoxicity is studied by using the characteristics of easy separation of adult fish liver. These indicators can be used to determine the liver development stage of zebrafish and provide evidence for whether drug liver injury occurs, so as to further improve clinical drug safety. This paper reviewed the research methods and progress of evaluating hepatotoxicity of traditional Chinese medicine in zebrafish at different developmental stages, in order to provide reference for the subsequent detection of hepatotoxicity of traditional Chinese medicine.

Key words: traditional Chinese medicine; zebrafish; liver injury; hepatotoxicity; drug-induced liver injury; detection of hepatotoxicity

中药逐渐受到更多的认同和接纳,但是中药在广泛应用的同时也增加了药物性肝脏毒性的风险^[1]。研究显示,部分中药产生肝毒性的剂量恰好

是药物发挥药效的合理剂量^[2]。对中药的肝脏毒性进行安全性评价已成为合理用药必不可少的环节^[3]。然而,啮齿类动物和细胞已经难以满足检测

收稿日期: 2023-12-28

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项(2019ZD004);内蒙古自治区科技计划(2020GG0199)

第一作者: 原 杨(1996—),男,硕士硕士生,研究方向为中药药效物质基础。E-mail: yuanyanggyfd@163.com

*共同通信作者: 樊慧蓉,女,研究员,硕士生导师,研究方向为药理学。E-mail: fanhr99@163.com

侯文彬,男,研究员,硕士生导师,研究方向为中药药理研究。E-mail: houwenbin@irm-cams.ac.cn

需求,亟需寻找更为适用的肝毒性评价模型。在新药研发和临床应用领域,斑马鱼作为新的模式生物应用越来越广泛^[4]。

模式生物斑马鱼属于脊椎动物,和人类基因高度同源,肝脏发育与哺乳动物高度保守^[5],具有与人类高度相似的细胞色素P450(CYP)酶系统,可以模拟人体内的药物代谢过程,具有生长速度快,繁殖能力强,实验成本低的优点。斑马鱼应用于中药毒理学检测,既兼顾了中药在体内的循环分布,反映中药的整体生物活性,又极大提高了毒性检测的准确度^[6],实现高通量筛选的目的,这些优势使斑马鱼成为了沟通体外和体内毒性检测的桥梁。此外,斑马鱼的使用符合动物试验的减少、完善和替代原则^[7-8]。

斑马鱼从出生到成鱼可分为3个重要时期,胚胎期、幼鱼期和成鱼期^[9]。利用不同发展阶段的斑马鱼联合分析,可以建立一个快速筛查各种毒物的完整系统^[10],这也成为斑马鱼肝脏毒性评价的一大特色。本文综述了基于不同发育时期斑马鱼肝毒性评价中的方法和研究进展,旨在为有关中药及其相关化合物在肝脏损伤方面的评价提供参考。

1 基于胚胎模型的中药肝脏毒性评价

斑马鱼胚胎模型,是指在斑马鱼出生后至受精后72 h,斑马鱼未发育出完整的肝脏,以绒毛膜包裹的形式存在。肝细胞和胚胎组织发育不成熟,药物的毒性体现为胚胎毒作用,一旦检测出,停药后就很难恢复^[11]。可以从形态和功能方面进行胚胎毒作用初步评价。胚胎周围的卵膜(绒毛膜)和胚胎组织的透明性使得观察整个胚胎时期的发育成为可能,斑马鱼胚胎在母体外部发育,并且通体透明使发育畸形和胚胎毒性效应容易进行评分^[12],同时能较好地观测斑马鱼发育形成完整器官的过程。孵化率和形态畸形在斑马鱼胚胎发育过程中起重要作用,特别是孵化率,是评价胚胎毒作用的重要指标。统计了文献中引起斑马鱼胚胎毒性作用的中药及其有效成分,以及引起胚胎的改变。

1.1 斑马鱼胚胎毒作用评价方法

目前为止,仍然缺乏中药给予斑马鱼胚胎、幼鱼和人体或哺乳类动物之间的剂量换算数据,因此中药成分给药浓度以半数致死剂量(LC₅₀)为参考^[11],一般表达两个含义,首先半致死剂量,可以保证实验的样本充足;其次,如果药物达到半致死剂量,仍未影响发育,或者仍未表现出显著的致畸性,则一定程度上说明药物不具有发育毒性^[12]。有研

究显示,对于不同的药物,半数致死量不是必要的限定条件,一些情况下,LC₁₀^[13](亚致死浓度)或者LC₂₅^[14](1/4致死浓度)足以定义毒性浓度,因为它所需的实验材料更少,更加实用。孵化是斑马鱼胚胎发生的关键过程,以孵化率作为评价斑马鱼胚胎发育毒性的指标。虽然胚胎死亡是一种发育毒性终点,但斑马鱼胚胎或幼鱼的死亡也可能是测试浓度下一般毒性的指标。在早期斑马鱼致畸性模型开发中,以胚胎完全凝固、缺乏体节形成、缺乏心跳和尾巴没有分离作为胚胎的死亡界定。

药物对幼鱼在正常胚胎中自发运动、心跳、孵化率和致畸作用如心包水肿、卵黄囊肿、发育停滞、缺乏黑色素以及脊柱变形产生影响都可作为药物胚胎毒作用的评价方式^[15]。有研究者选择了60种具有足够体内发育毒性数据的化合物^[16],检测斑马鱼胚胎致畸模型的准确性和稳定性,对幼鱼的存活率进行评估,并对其形态和功能发育进行评分。除了定义致死性,这些指标可用于畸形表型的评价,以协助鉴定中药所引起的鱼类胚胎毒性。然而评价方式的多样导致某些评价指标,比如幼鱼长度、胃形态、色素积累、鱼鳔大小、眼睛畸形等随着药物差异,形成假阳性的实验结果,从最终数据分析中剔除。相比于同一畸形体态不同评分,例如脊柱弯曲,眼睛畸形根据严重程度打分,倾向于表达不良反应水平(LOAEL)和无明显损害作用水平(NOALE),而Selderslaghs^[17]认为利用二项式评分减少了测评人的主观意识,例如脊柱发生弯曲,无论程度大小,均以1来表示,反之则为0,则更加关注判定本身。

1.2 中药成分暴露时间的影响

研究报告了斑马鱼胚胎的自发死亡率为5%~25%,通过延长胚胎出生后开始给药的时间避免这种自然的早期死亡率对实验的影响^[18]。延长的时间一般在2~6 h,通过体视显微镜观察,挑选出死亡胚胎^[19]。研究显示,一种特定的药物有1个狭窄的时间窗口或“关键时期”的影响^[20]。通常采用的慢性暴露制度,从受精后24 h开始,到受精后144 h结束,有研究者对于暴露的时间选择进行了不同的评价。受精后24 h统计胚胎自由抽动,受精后48 h统计心率,受精后72 h统计致畸率,因此涵盖了器官发育的主要阶段^[21]。

1.3 胚胎暴露屏障的影响

斑马鱼胚胎在绒毛膜内至少持续到受精后48 h。因此,绒毛膜可能是化合物扩散的屏障。由于绒毛

膜在孵化时脱落,是一个界限模糊和可变的屏障,因此必须考虑胚胎“受保护”和“非受保护”生命阶段^[22]。研究显示,幼鱼的 LC_{50} 低于胚胎的 LC_{50} ,也就是说绒毛膜作为天然的屏障对给药效果存在影响。然而无法确定到达胚胎本身的化合物的确切剂量,因为胚胎的绒毛膜可以作为生物保护屏障降低胚胎对化合物的实际摄取。

目前的研究围绕这2个方向,一种是对绒毛膜进行剥离。为了确保胚胎充分暴露于每种化合物,通过温和的酶降解从卵子中去除绒毛膜,必要时手工去除,以便在原肠形成、器官发生和早期幼鱼发育的整个过程中暴露于测试化合物^[23]。事实证明,这一步骤在技术上很简单,也不会太耗时。另一种是不破坏绒毛膜,应用于幼体本身比较脆弱,直接剥离幼体,在缺乏屏障的情况下,幼鱼无法存活,更无法应用于后续的观测。这样的测试多集中于单一成分的化学污染物毒性检测,而中药多以提取物溶解于胚胎培养液形式给药,且成分复杂,提取物水溶液的酸碱度变化,色素均会对幼体产生影响,多应用不破坏绒毛膜的胚胎^[24]。

胚胎期发育毒性试验能有效地检测药物对斑马鱼体内器官结构和功能所产生影响而得到较好结果。研究显示,斑马鱼胚胎对于化学药品的肝脏毒性检测准确度特异性为89%,敏感性为68%,准确性为78%,并且其结果与哺乳动物和人实际情况相符^[25],可作为肝毒性定性评价标准之一。

2 基于幼鱼模型的中药肝脏毒性评价

在斑马鱼中发现了类似于人类和啮齿动物的生长因子和基因表达。斑马鱼肝脏在受精后28 h开始发育,受精后2 d完成原发性肝脏形态发生,受精后3 d肝脏基本形成,肝脏被血液灌注并发挥功能^[26]。在受精后5 d,斑马鱼寻找食物,卵黄囊储备已经耗尽。到这个时候,幼鱼已经有了1个功能齐全的肝脏。幼鱼时期是基于中药对肝细胞和组织器官发育成熟和功能所产生影响来进行评价研究。由于斑马鱼幼鱼几乎是透明的,研究目的集中在创建基于形态毒性终点的中等通量测定,可以使用透射光学显微镜进行评估。因此,当暴露于中药成分中时,可以直观地评估肝脏形态的变化。通常肝肝变性^[27]、肝脏大小改变^[28]和卵黄囊滞留^[29]3种肝脏毒性的视觉筛查作为特异性终点,使用基于图像的形态计量分析进行量化。本文统计了文献中引起斑马鱼肝脏毒性的中药,以及这些药物引起幼鱼肝脏的改变情况。

2.1 斑马鱼幼鱼期发育毒性的研究方法

对于斑马鱼肝脏毒性的视觉筛查主要采用肝脏变性、肝脏大小改变和卵黄囊滞留3种肝脏毒性的特异性终点,肝脏变性直接评价标准是肝脏灰度值的变化,有研究显示,发生肝脏变性的斑马鱼幼鱼,肝脏灰度值加重,Wang等^[27]发现中药白鲜皮成分给药导致肝脏灰度值呈浓度相关性降低,肝组织结构紊乱,颜色变黑,表明肝脏病变。肝脏大小的改变和卵黄囊滞留分别使用软件圈定肝脏和卵黄囊范围,并使用相关统计软件,如Image J定量。

Zhang等^[29]实验证明异补骨脂给药组引起幼鱼肝脏萎缩,面积缩小,卵黄囊吸收延迟。对肝脏大小的表征也会应用到转基因的肝脏荧光斑马鱼,这种鱼的特征是肝脏散发荧光,因此对荧光面积和荧光强度进行定量,显示中、高浓度异补骨脂素引起幼鱼肝脏荧光面积减小,荧光强度减弱。

Xia等^[30]研究显示海风藤提取物处理,使幼鱼肝脏面积和荧光强度呈现剂量相关性降低。随着技术的发展,对于肝脏形态有了更加出色的评估方式,如Huo等^[31]用激光共聚焦分子器件(HCIS)可以直接显示出肝脏的形态和结构。他们把斑马鱼幼鱼的肝脏扫描并塑造成立体的模型,直观清晰,结果表明对于中药雷公藤处理组肝脏的体积随着浓度的增加而显著减小。肝脏切片染色,斑马鱼幼鱼发育出完整的肝脏,因此可以进行幼鱼的切片染色。

通过对组织病理学考察,并结合幼鱼的肝脏体视,做出中药肝毒性程度的判断,Zhao等^[32]进行幼鱼苏木精-伊红(HE)染色表明甘遂提取物给药组的肝细胞出现空泡化,细胞结构发生改变,同时伴随肝脏面积变小和肝脏灰度值显著降低。斑马鱼幼鱼的实验成功实现了对肝毒性程度的定量,并且建立胚胎发育毒性的联系,随着幼鱼的长大, LC_{50} 逐渐降低,幼鱼的毒性耐受相比胚胎逐渐降低。行为学改变,有明显肝脏毒性的中药通常会损害幼鱼的身体发育,进而导致幼鱼精神的改变,幼鱼的行为通常受到精神的影响,并且与发育状态有密切关系。Tian等^[33]研究表明冬凌草甲素低浓度给药组对幼鱼的游动速度有所促进,高浓度处理组则出现显著抑制。Li等^[34]研究表明厚朴酚给药中高浓度组幼鱼的游动距离显著减少,明暗交替活动量有减少的趋势。总的来说,幼鱼行为学评价指标一般分为游动速度、游动总距离、明暗交替的昼夜节律变化。

2.2 斑马鱼幼鱼暴露时间的影响

斑马鱼幼鱼的毒性暴露一般分为2个时期,分别是胚胎期开始暴露和形成幼鱼再开始暴露。胚胎期给药,一般指幼鱼出生2~6 h,经过人工筛选死卵之后进行给药。这个阶段给药的特点是给药时间长,因此可以模拟胚胎至幼鱼的各个发展阶段^[35-36],中药成分或者中药提取物对幼鱼的影响,有2个不可控因素,一是斑马鱼胚胎发育至幼鱼阶段的自然死亡率,影响药物评价;另外,受到胚胎绒毛囊的影响,绒毛囊是药物的一道天然屏障,影响药物吸收,这种影响目前为止无法量化。孵化后立即药物暴露的幼鱼比胚胎阶段鱼类更加脆弱,缺乏抵抗,因此,胚胎期给药用于肝脏毒性判定的 LC_{50} 根据胚胎发育的天数不同而不同,难以统一药物剂量。幼鱼期给药,通常给药时间为3~5 dpf^[37],幼鱼由初步肝脏的血液灌注到肝脏基本发育完成,给药剂量较为恒定,不发生明显改变,适合肝脏毒性模型建立。斑马鱼幼鱼比胚胎给药时间短,通常诱导时间可以缩短为1~2 d^[35,38-39]。

3 基于成鱼模型的中药肝脏毒性评价

斑马鱼能够模拟动物在其自然生态系统中的条件,是一种环境生物指示物,用于毒理学和生态毒理学研究。相比斑马鱼胚胎和幼鱼时期,成鱼丧失了透明的优势,然而鱼体发育的成熟和肝脏功能的完备使其获得了更大的药物剂量耐受^[40],更大的鱼体不仅适应浸没给药,而且使显微注射成为可能,这也实现了定量给药的目的。成年斑马鱼肝脏解剖结构清晰,可以单独剥离,进行转录组、代谢组和蛋白质组学^[41]分析;也可以同内脏器官一起剥离,切片染色,进行酶指标的研究。

3.1 斑马鱼成鱼期毒性评价方法

斑马鱼成鱼使用芫花水提取物给药后进行组织病理学观察,成鱼肝组织肝细胞排列松散,萎缩变形,细胞内的胞质溶解,空泡化严重,部分区域可见细胞坏死,韩沁等^[40]研究表明,芫花水提取物低、中、高浓度暴露组中成鱼肝脏的超氧化物歧化酶(SOD)、琥珀酸脱氢酶(SDH)及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的酶活力降低。Jia等^[41]研究发现重楼提取物诱导成年斑马鱼1周,处理组的肝脏质量和肝脏/体质量都降低;组织病理学表明肝细胞坏死并出现空泡化,重楼处理组相比于对照组肝组织丙二醛(MDA)显著升高,并且肝组织SOD活性显著降低。Zhong等^[42]研究表明,淫羊藿黄酮主要成分奥沙米苷(SC)使成年斑马鱼肝脏表现为严重的

肝细胞空泡化、肝细胞轻度变性、水肿、轻度炎性浸润;箭毒苷(SB)可引起一定程度的肝细胞坏死、中度水肿、轻度空泡化、细胞间接触疏松、淋巴细胞和单核细胞浸润。总之,成鱼时期肝脏毒性评价一般从以下几个方面进行:斑马鱼成鱼组织病理学,斑马鱼成鱼肝脏系数变化,成鱼酶指标变化。

3.2 斑马鱼成鱼药物递送方式研究

斑马鱼药物递送方法包括:一是将药物直接加入水中,浸没幼鱼或成鱼;二是成鱼通过腹膜内注射或口服管饲给药^[43]。与浸没法相比,成鱼口服管饲或腹膜内注射给药可以严格控制剂量,可通过质谱法评估血浆样品的药理学参数变化;管饲和腹膜内注射可有效递送低溶解度的小分子和抗体。人、小鼠和斑马鱼之间的药理学具有差异,根据实验研究,已确定出部分单体成分口服管饲和浸没法间的剂量转换计算方式^[44-47]。斑马鱼作为低级别的脊椎动物与人类的构造及生理、病理仍有很大差异,中药成分组成复杂,需要结合特定的药效,药性理论综合分析,因此斑马鱼与人体之间中药成分药物剂量换算的公式仍然无法确定,还需进一步在小鼠、大鼠等动物模型上进行验证。

4 结语

中药是我国宝贵的文化遗产,其发展和应用对人民群众的健康产生了巨大影响,随着中药临床应用逐渐增多的肝毒性实例,获取一种剂量-结果对应准确,检测速率高的肝脏毒性检测方式成为了当务之急^[47]。过去30年的实验证明斑马鱼是非常具有前景的模型。这一模型的优势在于可将中药毒性检测与斑马鱼各个时期的不同特点结合起来,能够建立一个快速筛查各种毒物的完整系统,笔者课题组进行归纳和总结,见图1。其主要内容包括斑马鱼发育的3个重要时期的肝毒性检测应用:(1)胚胎期根据胚胎自主抽动、心率^[48],脊柱变形^[49],发育状态^[50]等判断中药是否存在发育毒性;(2)幼鱼期根据肝脏灰度值,肝脏面积大小,卵黄囊吸收程度,幼鱼游动轨迹、总运动时间^[51]判断中药是否存在肝脏毒性;(3)成鱼期根据酶含量的变化,病理变化^[51]以及后续的多组学联合分析研究^[29,52-53],进一步探索中药导致肝脏毒性的作用机制问题。

斑马鱼评价中药的肝脏毒性,最大的优势在于发育早期,如胚胎期和幼鱼期,因为在这两个发育期的斑马鱼相比于啮齿类动物和细胞,可以直接进行表型观测,而不需要借助更多的检测指标。斑马鱼胚胎和幼鱼确定中药的肝脏毒性作用,斑马鱼成

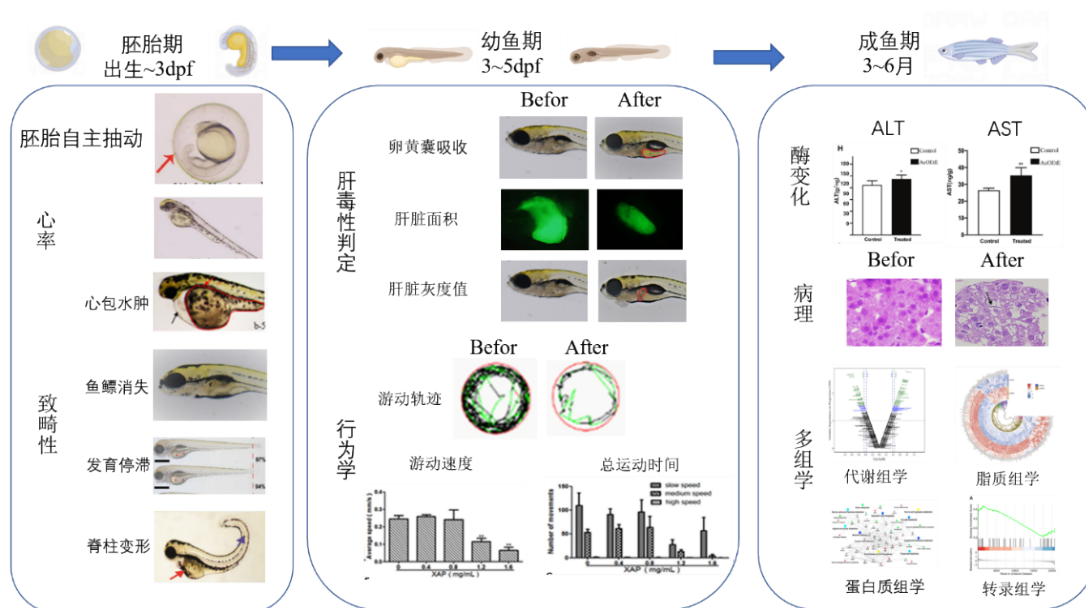


图1 不同发育时期斑马鱼在中药毒性研究中的应用

Fig. 1 Application of zebrafish at different developmental stages in study of toxicity of traditional Chinese medicine

鱼可探究更深层次的肝毒性作用机制,由此形成了基于不同时期斑马鱼检测中药肝脏毒性的基本步骤和流程。

斑马鱼肝脏毒性检测依赖显微镜观测,不同实验室的评价标准不一,肝脏毒性终点的判定偏差,实验规格不同。针对上述这些问题,对文献进行整理,做出以下的改善建议:(1)针对中药给药方式的优化,一方面中药提取过程进行优化,减少沉淀产生,保证溶液澄清,另一方面控制二甲基亚砜(DMSO)的使用剂量小于0.01%,即不对药物本身产生影响。同时溶液每天进行更换,保证给药溶液的均一性。(2)培养容器的选择,较长的培养时间和较小的活动空间容易导致幼鱼畸形,实验时采用24孔或更大孔板。(3)斑马鱼幼鱼观测标准,采用眼睛对齐法,麻醉并固定幼鱼,统一朝向和体位,保证鱼的2只眼睛完全对齐,1只眼睛完全重叠放在另1只眼睛的上方,确保肝脏轮廓清晰可见。

与此同时,斑马鱼也可用于评价中药的保肝作用,先使用有明确毒性的药物进行模型诱导,这些药物为常见的单一化合物,包括但不限于对四溴双酚A^[54]、黄曲霉毒素^[55]、硫代乙酰胺^[56]、乙醇^[57]、对乙酰氨基酚^[58]等。再使用中药进行干预,根据斑马鱼幼鱼的肝脏显微镜观测,酶含量变化,肝脏切片染色,基因表达改变来评价这些中药的肝脏保护作用。然而囿于中药提取物给药、色素、pH值、沉淀等对幼鱼的影响,以及斑马鱼剂量和人体以及啮齿类动物之间的换算研究缺乏,这种保肝作用研究仍然

只停留在单体化合物。

综上所述,使用斑马鱼模型评价中药的肝脏毒性是非常具有前景的,并可能在高等哺乳动物中测试之前,在药物发现的早期阶段做出更好的决策。近年来,有关如何提高中成药不良反应发生率和疗效的研究越来越受到关注。动物实验研究结果表明,某些中药成分可以引起斑马鱼肝脏损伤或肝细胞凋亡。但是这些毒性物质是否能通过斑马鱼肝细胞毒性实验得到有效评价仍需要进一步论证。此外,由于斑马鱼毒性实验方法的限制,现有动物实验结果还存在一定争议。例如在使用不同来源动物肝脏作为实验对象时对不同毒性物质敏感程度差异较大(可能是由于基因背景存在差异),也会影响其检测结果;此外有报道将斑马鱼暴露于多种物质后产生明显毒性反应以及暴露于具有不同化学结构的化学物质后毒性发生变化可能与此有关等。斑马鱼作为特定中药肝脏毒性的检测工具还需要进一步研究。在该模型能在更大范围内应用之前,还需要更多的验证,包括测试已确定的人类肝毒性和非肝毒性化合物,比较鱼和人之间的剂量反应,以及开发在鱼、啮齿动物和人之间架起桥梁的翻译生物标志物。此外,药物性肝损伤在人类中观察到的免疫反应必须在斑马鱼中进行研究,以确认机制相似性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 葛肖肖, 张盼盼, 仵琼, 等. 基于肝损伤的黄药子配伍减

- 毒及其作用机制研究[J]. 现代中医药, 2023, 43(3): 1-5.
- Ge X X, Zhang P P, Wu Q, et al. Study on the toxic reduction and mechanism of Huangyaozi compatibility based on liver injury [J]. Mod Chin Med, 2023, 43(3): 1-5.
- [2] 杨倩. 柴胡挥发油肝毒性"量-时-毒"关系研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- Yang Q. Study on the dose-time-toxicity relationship of Radix bupleurum volatile oil in liver toxicity [D]. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [3] 许帆, 朱磊, 沈洪. 疑似仙鹤草致药物性肝损伤1例报告[J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(3): 85-87, 106.
- Xu F, Zhu L, Shen H. Suspected of herba agrimoniae cause drug-induced liver injury in 1 report [J]. J Hunan Chin Med J, 2023, 39(3): 85-87, 106.
- [4] 任玉平, 张变红. 斑马鱼模型在炎症性肠病研究中的应用[J]. 生物学教学, 2023, 48(4): 2-4.
- Ren Y P, Zhang B H. Application of zebrafish model in the study of inflammatory bowel disease [J]. Biol Teach, 2023, 48(4): 2-4.
- [5] 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.
- [6] 李春杰, 赵建, 张世勇, 等. 细胞色素P450CYP3A65斑马鱼模型建立及对环境污染物的生物响应[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(6): 870-877.
- Li C J, Zhao J, Zhang S Y, et al. Establishment of cytochrome P450CYP3A65 zebrafish model and its biological response to environmental pollutants [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2014, 28(6): 870-877.
- [7] Balls M. The three Rs: Looking back and forward [J]. ALTEX: Alternat Tierexper, 2006, 23(Suppl 4): 29-32.
- [8] Hellfeld R V, Brotzmann K, Baumann L A, et al. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: A catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Environ Sci Eur, 2020, 32: 122.
- [9] Patton E E, Zon L I, Langenau D M. Zebrafish disease models in drug discovery: From preclinical modelling to clinical trials [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, doi: 10.1038/s41573-021-00210-8.
- [10] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. Develop Dynamics, 1995, doi:10.1002/aja.1002030302.
- [11] 戴明珠, 黄燕烽, 彭逸, 等. 斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 137-142.
- Dai M Z, Huang Y F, Peng Y, et al. Advances in experimental research on developmental toxicity and teratogenicity of zebrafish [J]. Chin J Lab Zool, 2020, 28(1): 137-142.
- [12] 王明亮, 丁永芳, 印鑫, 等. 斑马鱼在毒理学中的应用研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 137-142.
- Wang M L, Ding Y F, Yin X, et al. Advances in the application of zebrafish in toxicology [J]. Chin J Lab Zool, 2020, 28(1): 137-142.
- [13] Xia Z, Hao E, Chen Z, et al. Roots and stems of *Kadsura coccinea* extract induced developmental toxicity in zebrafish embryos/larvae through apoptosis and oxidative stress [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 1294-1301.
- [14] Huo J, Yu Q, Zhang Y, et al. Triptolide - induced hepatotoxicity via apoptosis and autophagy in zebrafish [J]. J Appl Toxicol, 2019, 39(11): 1532-1540.
- [15] Skeletal biology and disease modeling in zebrafish [J]. J Bone Miner Res, 2021, doi: 10.1002/jbmr.4256.
- [16] Ali S, Champagne D L, Richardson M K. Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds [J]. Behav Brain Res, 2012, 228(2): 272-283.
- [17] Selderslaghs I W T, Blust R, Witters H E. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds [J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(2): 142-154.
- [18] Hellfeld R V, Brotzmann K, Baumann L A, et al. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: A catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Environ Sci Eur, 2020, doi: 10.1186/s12302-020-00398-3.
- [19] Yumnamcha T, Devi M D, Roy D, et al. Evaluation of developmental toxicity and genotoxicity of aqueous seed extract of *Croton tiglium* L. using zebrafish [J]. Drug Chem Toxicol, doi:10.1080/01480545.2019.1708094.
- [20] Dallmann R, Okyar A, Francis L. Dosing-time makes the poison: Circadian regulation and pharmacotherapy [J]. Trends Mol Med, 2016, doi: 10.1016/j.molmed.2016.03.004.
- [21] 赵崇军, 田敬欢, 倪媛媛, 等. 马钱子对斑马鱼胚胎发育的影响[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(11): 2773-2775.
- Zhao C J, Tian J H, Ni Y Y, et al. Nux vomica effect on zebrafish embryo development [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2016, 34(11): 2773-2775.
- [22] 闫一芳, 王强. 斑马鱼胚胎背腹轴建立的分子机制[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 242-247.

- Yan Y F, Wang Q. Molecular mechanism of the establishment of dorsoventral axis in zebrafish embryos [J]. Chin J Lab Anim Sci, 2019, 27(2): 242-247.
- [23] Brannen K C, Panzica-Kelly J M, Danberry T L, et al. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model [J]. Birth Def Res Part B: Develop Reprod Toxicol, 2010, 89(1): 66-77.
- [24] 史永平, 张友刚, 孔浩天, 等. 中药乳香对斑马鱼胚胎发育毒性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(9): 4606-4609.
- Shi Y P, Zhang Y G, Kong H T, et al. Research on the toxicity of Chinese medicine frankincense to zebrafish embryonic development [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2020, 35(9): 4606-4609.
- [25] Carles C, Simone C, Rafael M P, et al. ZeGlobalTox: An innovative approach to address organ drug toxicity using zebrafish [J]. Int J Mol Sci, 2017, doi: 10.3390/ijms18040864.
- [26] Song Z, Zhang Y, Zhang H, et al. Isoliquiritigenin triggers developmental toxicity and oxidative stress - mediated apoptosis in zebrafish embryos/larvae via Nrf2-HO1/JNK-ERK/mitochondrion pathway [J]. Chemosphere, 2020, 246: 125727.
- [27] Wang S, Bao J, Li J, et al. Fraxinellone induces hepatotoxicity in zebrafish through oxidative stress and the transporters pathway [J]. Molecules, 2022, 27(9): 2647.
- [28] Li H Y, Yang J B, Li W F, et al. In vivo hepatotoxicity screening of different extracts, components, and constituents of *Polygoni multiflori* Thunb. in zebrafish (*Danio rerio*) larvae [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110524.
- [29] Zhang Y, Zhang Y, Li J, et al. The role of hepatic antioxidant capacity and hepatobiliary transporter in liver injury induced by isopsoralen in zebrafish larvae [J]. Human Exp Toxicol, 2019, 38(1): 36-44.
- [30] Xia Z, Hao E, Chen Z, et al. Roots and stems of *Kadsura coccinea* extract induced developmental toxicity in zebrafish embryos/larvae through apoptosis and oxidative stress [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 1294-1301.
- [31] Huo J, Yu Q, Zhang Y, et al. Triptolide - induced hepatotoxicity via apoptosis and autophagy in zebrafish [J]. J Appl Toxicol, 2019, 39(11): 1532-1540.
- [32] Zhao C, Jia Z, Li E, et al. Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae *in vivo* [J]. Phytomedicine, 2019, 62: 152959.
- [33] Tian L, Sheng D, Li Q, et al. Preliminary safety assessment of oridonin in zebrafish [J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 632-640.
- [34] Li H, Zhang Q, Li W, et al. Role of Nrf2 in the antioxidation and oxidative stress induced developmental toxicity of honokiol in zebrafish [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 373: 48-61.
- [35] Cao D, Zhao C, Li Z, et al. Combined metabolomics and network toxicology to explore the molecular mechanism of *Phytolacca acinose* Roxb-induced hepatotoxicity in zebrafish larvae *in vivo* [J]. Hindawi Limit, 2021, doi: 10.1155/2021/3303014.
- [36] Vliegenthart B, Adriaan D, Wei C, et al. Characterization of triptolide-induced hepatotoxicity by imaging and transcriptomics in a novel zebrafish model [J]. Toxicol Sci, 2017, doi: 10.1093/toxsci/kfx144.
- [37] Zhao C, Li E, Wang Z, et al. Nux vomica exposure triggered liver injury and metabolic disturbance in zebrafish larvae [J]. Zebrafish, 2018, 15(6): 610-628.
- [38] Hu M, Lin L, Liu J, et al. Aurantio-obtusin induces hepatotoxicity through activation of NLRP3 inflammasome signaling [J]. Toxicol Lett, 2022, 354: 1-13.
- [39] 刘艺, 王瑞昕, 游龙泰, 等. 芦荟大黄素诱导斑马鱼肝毒性及作用机制研究 [J]. 环球中医药, 2020, 13(1): 18-22.
- Liu Y, Wang R X, You L T, et al. Study on aloe emodin induced hepatotoxicity in zebrafish and its mechanism [J]. Glob Chin Med, 2020, 13(1): 18-22.
- [40] 韩沁, 邹迪新, 李二文, 等. 芫花水提取物对斑马鱼成鱼及SD大鼠肝毒性的相似性评价及作用机制初探 [J]. 世界中医药, 2020, 15(13): 1872-1878.
- Han Q, Zou D X, Li E, et al. Evaluation of the similarity of water extract of *Daphne genkwa* on the hepatotoxicity of adult zebrafish and SD rats and preliminary study on its mechanism [J]. World J Tradit Chin Med, 2020, 15(13): 1872-1878.
- [41] Jia Z, Zhao C, Wang M, et al. Hepatotoxicity assessment of *Rhizoma Paridis* in adult zebrafish through proteomes and metabolome [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 121: 109558.
- [42] Zhong R, Chen Y, Ling J, et al. The toxicity and metabolism properties of *Herba Epimedii* flavonoids on larval and adult zebrafish [J]. Evid-Based Compl Altern Med, 2019, 2019(1): 1-9.
- [43] Yan C, Brunson D C, Tang Q, et al. Visualizing engrafted human cancer and therapy responses in immunodeficient zebrafish [J]. Cell, 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019. 04.004.
- [44] Fior R, Vanda P, Mendes R V, et al. Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 2017, doi:10.1073/pnas.1618389114.
- [45] Smith A C H, Raimondi A R, Salthouse C D, et al. High-throughput cell transplantation establishes that tumor-

- initiating cells are abundant in zebrafish T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2010, 115(16): 3296-3303.
- [46] Ablain J, Xu M, Rothschild H, et al. Human tumor genomics and zebrafish modeling identify SPRED1 loss as a driver of mucosal melanoma [J]. *Science*, 2018, 362(6418): 1055-1060.
- [47] 彭朋, 元唯安. 中药药源性肝毒性的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1783-1792.
- Peng P, Yuan W A. Research progress on drug-induced hepatotoxicity of Chinese materia medica [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(8): 1783-1792.
- [48] 周飞, 何育霖, 熊亮, 等. 益母草挥发油对斑马鱼胚胎发育毒性研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2019, 42(4): 24-28.
- Zhou F, He Y L, Xiong L, et al. Motherwort volatile oil of zebrafish embryo toxicity studies [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med*, 2019, 42(4): 24-28.
- [49] 陈怡君, 钟玉绪, 董武, 等. 麝香酮对斑马鱼胚胎的发育毒性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(2): 267-273.
- Chen Y J, Zhong Y X, Dong W, et al. Developmental toxicity of muscone on zebrafish embryos [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2014, 28(2): 267-273.
- [50] Zhang J, Deng Y, Cheng B, et al. Protective effects and molecular mechanisms of baicalein on thioacetamide-induced toxicity in zebrafish larvae [J]. *Chemosphere*, 2020, 256: 127038.
- [51] Li J, Zhang Y, Liu K, et al. Xiaoaiping induces developmental toxicity in zebrafish embryos through activation of ER stress, apoptosis and the Wnt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar. 2018. 01250.
- [52] Vliegenthart A D B, Wei C, Buckley C, et al. Characterization of triptolide-induced hepatotoxicity by imaging and transcriptomics in a novel zebrafish model [J]. *Toxicol Sci*, 2017, 159(2): 380-391.
- [53] Li C, Wang M, Fu T, et al. Lipidomics indicates the hepatotoxicity effects of EtOAc extract of *Rhizoma Paridis* [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 799512.
- [54] 金位栋, 杨苏文, 孙丰超, 等. 山核桃叶总黄酮抑制 TBBPA 诱导斑马鱼胚胎发育毒性的研究 [J]. 生命科学, 2017, 21(5): 405-411.
- Jin W D, Yang S W, Sun F C, et al. Study on the effect of total flavonoids of pecan leaves on the developmental toxicity of zebrafish embryos induced by TBBPA [J]. *Life Sci Res*, 2017, 21(5): 405-411.
- [55] Wu T, Fan T, Xie Y. Antagonism of cyanamide-3-O-glucoside and protocatechuic acid on aflatoxin B1-induced toxicity in zebrafish larva (*Danio rerio*) [J]. *Toxicon*, 2022, 216: 139-147.
- [56] Zhang J, Deng Y, Cheng B, et al. Protective effects and molecular mechanisms of baicalein on thioacetamide-induced toxicity in zebrafish larvae [J]. *Chemosphere*, 2020, 256: 127038.
- [57] Zhao X T, Gong L H, Wang C, et al. Quercetin mitigates ethanol-induced hepatic steatosis in zebrafish via P2X7R-mediated PI3K/Keap1/Nrf2 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268(1): 113569.
- [58] Wang L, Cui X, He J, et al. Hydroxysafflor yellows alleviate thrombosis and acetaminophen-induced toxicity *in vivo* by enhancing blood circulation and poison excretion [J]. *Phytomedicine*, 2021, doi: 10.1016/j.phymed.2021.153579.

[责任编辑 李红珠]