

基于模式生物斑马鱼的款冬叶肝肾毒性比较研究

段亚辉^{1,2}, 张云³, 王雪³, 韩利文^{3*}, 李震宇^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

摘要: **目的** 采用斑马鱼模型比较款冬叶、花的肝脏、肾脏毒性, 为款冬叶的资源利用提供实验依据。**方法** 取3 dpf (day post fertilization) 健康 AB 系及转基因系斑马鱼, 将款冬叶、款冬花以及款冬叶、花分别与紫菀配伍后的4个样品溶于斑马鱼培养用水, 分别以0.5、1.0、1.5 mg/mL 给药, 以培养用水为对照, 处理72 h 后观察各组样品对斑马鱼肝、肾形态及各指标的影响, 以斑马鱼肝脏的荧光面积和肝脏丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平评价药物对肝脏的毒性, 以斑马鱼表型变化结合培养液蛋白量评价药物的肾脏毒性。**结果** 与对照组比较, 各给药组对斑马鱼肝脏生化指标无显著影响, 但在1.5 mg/mL 剂量下, 款冬花及款冬花+紫菀组斑马鱼的肝脏荧光面积减小。各药物处理组斑马鱼表型及培养液蛋白量无显著差异。**结论** 款冬花及款冬花配伍紫菀在高剂量时对肝脏产生一定的毒性, 而款冬叶及款冬叶配伍紫菀未表现出明显的肝肾毒性, 即款冬叶入药的安全性风险不高于款冬花。研究结果为款冬叶的资源利用奠定了基础。

关键词: 款冬叶; 款冬花; 斑马鱼; 毒性; 资源利用

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)03-0669-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.020

Analysis on liver and renal toxicity of leaves of *Tussilago farfara* using zebrafish

DUAN Ya-hui^{1,2}, ZHANG Yun³, WANG Xue³, HAN Li-wen³, LI Zhen-yu¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

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

Abstract: Objective To compare the toxicity of the flower buds and leaves from *Tussilago farfara*, and provide scientific basis for the utilization of the leaves of *T. farfara*. **Methods** The 3 dpf (day post fertilization) healthy AB and transgene zebrafish were selected. The flowers, the leaves, the flowers coupled with *Aster tataricus*, and the leaves coupled with *A. tataricus* were prepared at the concentration of 0.5, 1.0, and 1.5 mg/mL. The fluorescent area of the liver and ALT and AST levels were measured after 72 h of drug treatment. For the renal toxicity assay, the morphology of zebrafish and the nutrient solution protein were also determined. **Results** Compared with the control group, there were no significant differences in liver biochemical indexes in the four drug treatment groups. However, the fluorescence area of liver decreased in the flowers and flowers coupled with *A. tataricus* group at the concentration of 1.5 mg/mL. No significant difference was observed in the four groups of the nephrotoxicity assay. **Conclusion** The flower and the flower coupled with *A. tataricus* showed minor hepatotoxicity at higher doses, and the leaves showed no stronger toxicity than the flower buds in comparison with the flower buds. It can provide references for the resource utilization of the leaves of *T. farfara*.

Key words: leaves of *Tussilago farfara*; *Farfarae Flos*; zebrafish; toxicity; resource utilization

款冬花 *Farfarae Flos* 为菊科植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 主要功能为润肺下气、止咳化痰。中医临床上, 款冬常用于治疗新久咳嗽、喘咳痰多、劳嗽

收稿日期: 2018-11-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270008); 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技创新重点团队(201605D131045-18); 地产中药药效物质研究与利用山西省重点实验室(201605D111004)

作者简介: 段亚辉(1994—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药活性成分。E-mail: duanyhsxu@163.com

*通信作者 李震宇, 男, 博士, 教授, 主要从事中药质量控制及活性成分研究。E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

韩利文, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为天然活性成分的发发现和制备。E-mail: hanliwen08@126.com

咳血等症。与我国使用花蕾入药不同, 欧洲国家用款冬叶治疗咳嗽^[1]。中医药中款冬的药用部位为花蕾, 导致采挖困难、产量小、价格高, 不能满足市场需求^[2]。而款冬叶产量高、易采收。因此, 能否将款冬叶开发为新的药用部位对促进款冬资源有效利用具有实际意义。本课题组前期研究^[3-4]证实款冬花、叶均有止咳化痰作用, 且化学组成接近, 叶的止咳化痰作用还略优于花。

我国传统中医理论认为将 2 味或 2 味以上药物配合使用, 既可以适应复杂病情, 又可以减毒增效, 发挥治疗作用。《本草纲目》记载: “款冬花, 杏仁为之使。得紫菀良”。中医临床上也常将款冬花与紫菀配伍使用^[5]。安全性是资源开发利用的前提, 鉴于款冬花和叶含有肝毒性物质吡咯里西丁生物碱^[6]。因此, 本研究从中医药临床用药实际出发, 将款冬花、叶分别配伍紫菀后进行安全性比较, 为款冬叶的资源利用奠定基础。

在药物研究中, 线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠等是常用的模式生物。其中, 斑马鱼具有胚胎发育同步、繁殖速度快、胚体透明易标记、与人类基因相似度高的特点, 是研究人类疾病的一种重要模式生物。斑马鱼胚胎透明, 选用斑马鱼作为实验动物可以直观地观察到药物对机体器官的影响。目前, 斑马鱼在中药毒性评价实验中应用逐渐增多, 且发挥着越来越重要的作用^[7-8]。陈怡君等^[9]利用斑马鱼研究麝香酮对胚胎的毒性, 夏广清等^[10]研究发现高剂量的灵芝多糖可导致野生型斑马鱼幼胚发育畸形和死亡。方芳等^[11]利用斑马鱼研究乌头碱的心脏毒性, 发现其心脏毒性与剂量呈正相关。因此, 本研究采用斑马鱼作为动物模型, 比较款冬花、叶配伍紫菀后对肝脏、肾脏的影响。

1 材料

1.1 样品

款冬叶和花蕾分别于 2014 年 8、12 月采自山西省长治市沁县, 紫菀购于山西维康堂中药饮片有限公司 (批号 20150101), 并经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为菊科款冬属植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥叶子及干燥花蕾、菊科植物紫菀 *Aster tataricus* L. f. 的干燥根及根茎, 保存在山西大学药材库中。

1.2 实验动物

AB 系野生型斑马鱼、肝脏荧光转基因 T3 斑马鱼均由山东省科学院生物研究所药物筛选平台提供。

1.3 试剂及仪器

斑马鱼胚胎培养用水 (自制, 含 5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl₂、0.16 mmol/L MgSO₄); SZX16 型体视荧光显微镜、DP2-BSW 图像采集系统 (美国 Olympus 公司); 斑马鱼养殖饲养系统 (北京爱生科技有限公司); 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 检测试剂盒购自南京建成生物科技有限公司。牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Genview 公司。

2 方法

2.1 样品制备

取款冬花、叶各 300 g 以及花、叶 300 g 各加入等量紫菀, 10 倍量水浸泡 30~40 min 后, 分别用 10、8、8 倍量水回流提取 3 次, 每次分别对应提取 2.0、1.5、1.5 h。滤过, 合并滤液后冻干。冻干粉存于 -20 °C 冰箱备用。使用时用斑马鱼培养水溶解配制所需质量浓度。本课题组前期研究显示^[12-13]款冬花、叶主要含有芦丁、金丝桃苷、山奈酚、槲皮素、绿原酸、异绿原酸、款冬酮以及款冬素酯等, 其化学组成相似, 含量具有一定的差异, 其中倍半萜类物质款冬酮和款冬素酯, 黄酮类物质芦和山奈酚在花中含量高于叶, 而苯丙素类物质绿原酸、异绿原酸在叶中含量较高。

2.2 给药剂量的确定

健康雌、雄 AB 系野生型斑马鱼成鱼在 28 °C、光照 14 h/黑暗 10 h 条件下分开饲养, 定时喂以颗粒状饵料和卤虫。用卵时, 取健康性成熟斑马鱼, 按雌雄 1:1 或 1:2 放入交配缸内, 次日 9:00~10:00 时获得受精卵。对受精卵进行消毒和清洗后放于 28 °C 光照培养箱内, 继续孵育至受精后第 3 天 (3 dpf) 大小备用。

样品用斑马鱼培养水配制成 0.000 1~3.000 0 mg/mL 的溶液作为实验组, 以培养水为对照组, 加入 6 孔板内, 每孔终体积 6 mL; 将 3 dpf 斑马鱼移入各孔中, 每孔 30 枚; 每 24 小时更换孔中 1/2 的药液, 并去除死亡斑马鱼, 在 6 dpf 时观察记录各孔斑马鱼死亡数, 实验重复 3~5 次, 确定在给药 72 h 后各样品的四分之一致死剂量 (LD₂₅)。

2.3 斑马鱼肝脏毒性研究

采用肝脏荧光转基因 T3 斑马鱼, 受精卵获取方法同“2.2”项下。待斑马鱼胚胎发育至 3 dpf 时, 挑选发育正常的斑马鱼幼鱼, 移入 6 孔板中, 每孔 10 尾, 加入用斑马鱼培养水配制的 0.5、1.0、1.5

mg/mL 样品溶液 5 mL, 每个质量浓度设 3 个复孔, 以培养水作为对照组。随后于光照培养箱中恒温 (28 °C) 孵育, 连续给药 72 h, 每天换液。于给药 72 h 后, 将斑马鱼用质量分数为 0.03% 的三卡因麻醉, 然后用 3% 甲基纤维素固定于载玻片上, 侧面体位拍照; 荧光显微镜下拍照记录斑马鱼肝脏荧光强度; 利用图像处理软件 Image-Pro plus 计算肝脏面积。给药结束后, 将斑马鱼幼鱼组织匀浆, 测定组织中 ALT、AST 水平。

2.4 斑马鱼肾脏毒性研究

采用 AB 型野生型斑马鱼, 受精卵获取方法同“2.2”项下, 孵育至 3 dpf 备用。将 3 dpf 斑马鱼移入 6 孔板内, 每孔 20 枚; 加入用斑马鱼培养水配制的 0.5、1.0、2.0 mg/mL 样品溶液 6 mL, 每个质量浓度设 3 个复孔, 以培养水作为对照组, 每 24 小时更换孔中 1/2 的药液, 处理 72 h。取出斑马鱼麻醉, 放入 0.8% 低熔点琼脂溶液内, 显微镜下调整斑马鱼体位, 观察表型有无异常变化, 观察有无局部或全身水肿, 并拍照。

从每组孔内吸取等体积溶液, 离心去除杂质后, 加入 TCA 沉淀收集溶液中的蛋白, 将蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色法检测样品中的总蛋白。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行组间方差分析 (ANOVA)。各组死亡率以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 给药剂量的确定

将发育 3 dpf 的斑马鱼用受试样品进行处理, 每个样品检测了 12 个质量浓度。镜下观察, 所有处理组中存活斑马鱼的形态与对照组比较均无畸形改变。处理 72 h 后, 各组斑马鱼的死亡率见表 1。计算得各样品 LD₂₅ 为款冬花 1.50 mg/mL, 款冬花+紫菀 1.35 mg/mL, 款冬叶 2.311 mg/mL, 款冬叶+紫菀 1.81 mg/mL。结合各给药组药物溶解情况及 LD₂₅ 值, 选择 1.0 mg/mL 为最佳剂量, 并在最佳剂量上下各增加 1 个质量浓度, 即 0.5、1.5 mg/mL, 作为后续实验的 3 个剂量。

表 1 药物处理 72 h 各组斑马鱼死亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Mortality of zebrafish larvae treated in 72 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	死亡率/%	组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	死亡率/%
款冬花	0	8.35 ± 3.70	款冬花+紫菀	0	6.33 ± 3.33
	0.000 1	6.50 ± 2.40		0.000 1	7.78 ± 5.09
	0.000 5	7.30 ± 3.70		0.000 5	13.33 ± 3.33
	0.001 0	9.70 ± 5.25		0.001 0	8.14 ± 2.53
	0.005 0	8.40 ± 3.50		0.005 0	9.42 ± 4.51
	0.010 0	11.10 ± 2.24		0.010 0	10.21 ± 5.01
	0.050 0	7.10 ± 4.05		0.050 0	7.86 ± 2.54
	0.100 0	10.30 ± 2.50		0.100 0	6.87 ± 2.11
	0.500 0	9.83 ± 4.30		0.500 0	10.10 ± 4.35
	1.000 0	6.79 ± 2.61		1.000 0	8.51 ± 4.08
	2.000 0	68.51 ± 12.61*		2.000 0	71.21 ± 9.57*
3.000 0	85.12 ± 8.78*	3.000 0	80.32 ± 12.61*		
款冬叶	0	10.00 ± 10.00	款冬叶+紫菀	0	5.22 ± 1.92
	0.000 1	7.00 ± 1.55		0.000 1	6.67 ± 3.33
	0.000 5	8.05 ± 4.77		0.000 5	6.22 ± 3.85
	0.001 0	13.00 ± 5.17		0.001 0	11.02 ± 4.75
	0.005 0	11.00 ± 3.50		0.005 0	12.22 ± 3.85
	0.010 0	7.70 ± 3.55		0.010 0	4.37 ± 1.92
	0.050 0	8.05 ± 5.73		0.050 0	8.17 ± 2.87
	0.100 0	13.00 ± 4.43		0.100 0	7.54 ± 4.45
	0.500 0	8.50 ± 3.40		0.500 0	9.03 ± 3.32
	1.000 0	9.65 ± 3.83		1.000 0	8.32 ± 3.54
	2.000 0	28.62 ± 7.65*		2.000 0	34.56 ± 7.85*
3.000 0	52.78 ± 8.54*	3.000 0	64.78 ± 11.54*		

与 0 mg·mL⁻¹ 组比较: *P < 0.05

*P < 0.05 vs 0 mg·mL⁻¹ group

3.2 对斑马鱼肝脏的影响

利用荧光显微镜观察不同质量浓度样品对斑马鱼肝脏的影响。如图 1 和表 2 所示, 与对照组比较, 0.5 mg/mL 质量浓度下各给药组斑马鱼肝脏荧光面积无显著性差异, 未产生肝脏毒性; 1.0 mg/mL 质量浓度下, 各给药组斑马鱼肝脏荧光面积均减小, 产生肝脏毒性, 但各组间差异不显著; 1.5 mg/mL 质量浓度下, 各给药组斑马鱼肝脏荧光面积均减小, 各组均有肝脏毒性, 款冬花及款冬花+紫菀组斑马鱼肝脏荧光面积减小较款冬叶及款冬叶+紫菀组更显著, 说明该剂量下花及花配伍紫菀的毒性略强。

如表 2 所示, 样品处理斑马鱼 72 h 后, 与对照组比较, 1.5 mg/mL 质量浓度下款冬花及款冬花+

紫菀组斑马鱼肝脏面积显著减小 ($P < 0.05$ 、 0.01)。其他各给药组斑马鱼的肝脏面积与对照组比较差异均无显著性。说明 1.5 mg/mL 质量浓度下, 款冬花及款冬花+紫菀毒性略大。样品处理斑马鱼 72 h 后, 各给药组斑马鱼的 ALT、AST 与对照组相比均无显著差异。

3.3 对斑马鱼幼鱼肾脏的影响

镜下观察, 样品处理 72 h 后, 与对照组比较, 各给药组斑马鱼形态没有明显改变, 未发现全身或局部水肿现象 (图 2)。

Western blotting 结果 (图 3) 表明各组斑马鱼培养液上清中均未检测到蛋白, 说明斑马鱼肾小球滤过功能正常, 没有蛋白渗漏发生, 各组均未产生肾毒性。

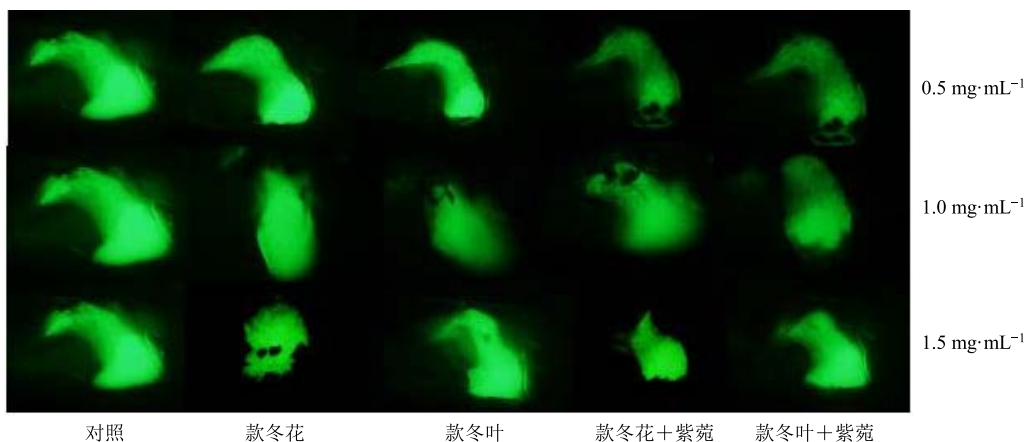


图 1 样品对斑马鱼肝脏的影响

Fig. 1 Effects of samples on zebrafish liver

表 2 样品对斑马鱼幼鱼 ALT、AST 及肝脏面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 50$)

Table 2 Effects of samples on ALT, AST, and liver areas of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 50$)

组别	ρ /(mg·mL ⁻¹)	肝脏面积/ μm^2	ALT/(U·mg ⁻¹)	AST/(U·mg ⁻¹)
对照	—	40 788.64 ± 4 652.61	4.89 ± 0.21	6.58 ± 0.37
款冬花	0.5	33 631.35 ± 2 346.31	4.57 ± 1.20	6.38 ± 0.95
	1.0	34 124.04 ± 5 617.09	4.96 ± 0.93	7.01 ± 2.10
	1.5	27 952.78 ± 1 640.60*	4.72 ± 1.04	5.86 ± 0.95
款冬叶	0.5	35 361.71 ± 652.88	5.92 ± 0.37	5.94 ± 0.31
	1.0	36 944.43 ± 6 440.27	5.67 ± 1.69	5.24 ± 1.09
	1.5	38 559.83 ± 2 809.78	4.39 ± 0.74	7.62 ± 1.04
款冬花+紫菀	0.5	37 062.02 ± 2 196.83	6.92 ± 1.53	6.98 ± 1.10
	1.0	35 715.78 ± 4 293.22	6.38 ± 2.01	6.74 ± 1.05
	1.5	25 904.94 ± 2 113.32**	5.64 ± 0.39	6.71 ± 0.93
款冬叶+紫菀	0.5	34 906.95 ± 972.71	6.14 ± 1.97	5.47 ± 1.37
	1.0	35 443.40 ± 6 175.49	5.18 ± 0.97	4.97 ± 1.34
	1.5	41 620.70 ± 1 782.91	4.85 ± 0.34	5.62 ± 1.17

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

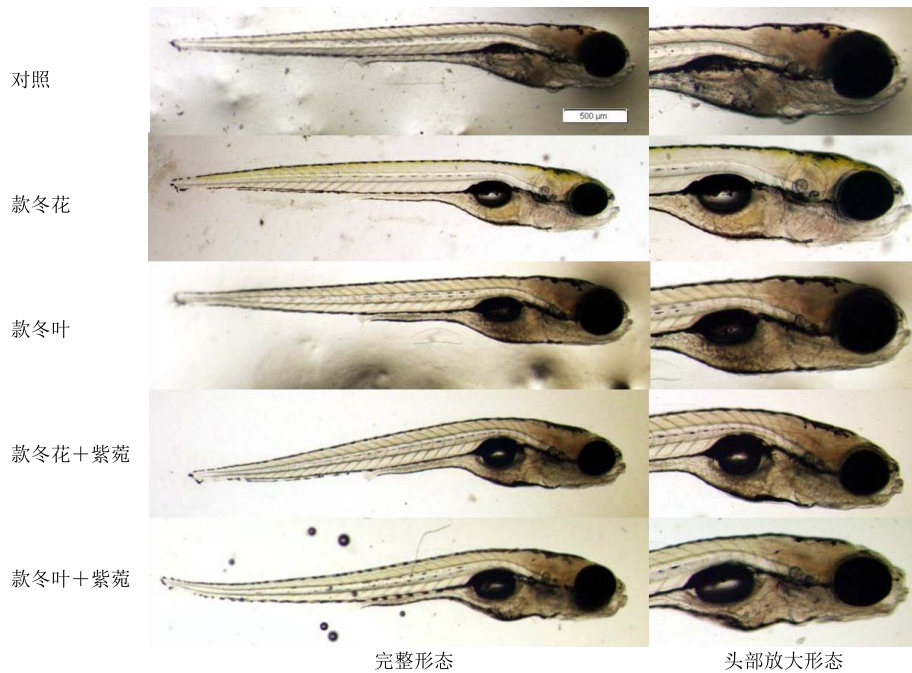


图 2 各组斑马鱼形态

Fig. 2 Morphology of zebrafish in each group

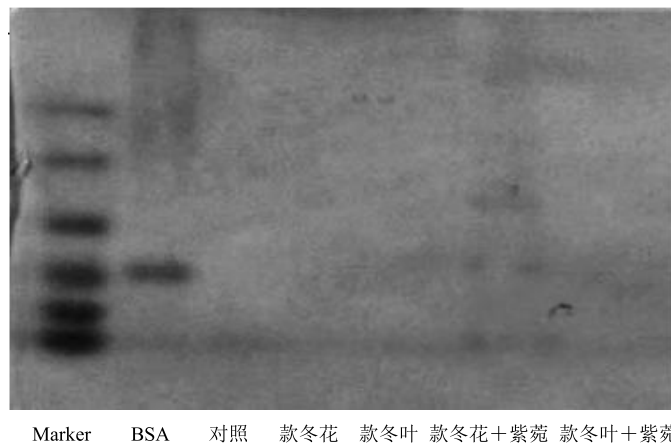


图 3 斑马鱼培养液上清 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis of supernatant solution of zebrafish

4 讨论

本研究采用模式生物斑马鱼,以肝脏荧光面积、生化指标、培养液蛋白为指标对款冬花、叶及款冬花、叶配伍紫菀后的肝、肾毒性进行分析和比较。结果显示,各样品在 0.5、1.0 mg/L 质量浓度下,斑马鱼的肝脏面积及 AST、ALT 水平与对照组比较均无显著差异,但在 1.5 mg/L 时,款冬花及款冬花配伍紫菀组斑马鱼肝脏荧光减小程度均较款冬叶及款冬叶配伍紫菀明显,说明在高剂量下,款冬花的肝脏毒性略大于款冬叶。此外,在 3 个给药剂量下,

从斑马鱼表型及培养液蛋白可以看出款冬花、叶及花、叶配伍紫菀后的样品均未体现出肾脏毒性。以款冬花为参照,款冬叶无论单独使用还是配伍紫菀后均未表现出更强的毒性,即款冬叶入药的安全性风险不会高于款冬花。已有研究证实款冬花可能的肝脏毒性与其所含的吡咯里西丁生物碱有关^[14-15]。款冬叶中也含有吡咯里西丁生物碱,下一步本课题组将对款冬叶中的吡咯里西丁生物碱进行深入分析,为其安全性研究奠定基础。

中药材新药用部位的研究是充分开发利用中药

资源的有效手段,可以解决传统用药部位资源不足难以满足市场需求的问题。款冬叶在欧洲具有悠久的药用历史,课题组前期工作也证实款冬叶具有显著的止咳化痰作用。本研究通过模式生物斑马鱼证明款冬叶未表现出比花蕾更强的毒性。但是按照我国现行的《药品注册管理办法》,药材新的药用部位及其制剂需要按照中药四类新药进行申报,款冬叶能否获得法定的使用许可,还需要进行大量系统的研究。下一步将按照国家相关技术要求,对款冬叶的药理毒理(药效学、急性毒性、长期毒性)进行深入研究,为款冬叶的资源利用奠定基础。

斑马鱼是近年来广泛用于药物毒性评价的一种模式生物,其具有繁殖速度快、养殖成本低廉的特点。利用斑马鱼可以快速、高效的完成药物毒性检测。许多国内外学者利用斑马鱼模型对药物毒性进行了评价^[16]。但斑马鱼作为一种模式生物,其实验结果仍然存在假阳性、假阴性^[17],因此实验结果还需进一步采用大、小鼠等其他实验动物进行验证。同时,对于新的药用资源毒性评价还需要进行一些经典的毒理学实验。

参考文献

- [1] Jerzy T, Aleksandra S, Justyna L, *et al.* A botanical and pharmacological description of petasites species [J]. *Curr Issues Pharm Med Sci*, 2015, 28(3): 151-154.
- [2] 吕培霖,李成义,郑明霞. 甘肃款冬花资源调查报告 [J]. *中国现代中药*, 2008, 10(4): 42-43.
- [3] 支海娟. 基于NMR款冬植物代谢组学研究 [D]. 太原: 山西大学, 2012.
- [4] Li Z Y, Zhi H J, Zhang F S, *et al.* Metabolomic profiling of the antitussive and expectorant plant *Tussilago farfara* L. by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2012.11.023.
- [5] 刘可越. 紫菀散药效物质基础的研究及新药研制 [D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [6] 陈雪园,张如松,杨苏蓓. 款冬花化学成分及药理毒理研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2012, 8(1): 173-174.
- [7] 赵崇军,田敬欢,王金凤,等. 斑马鱼在中药研究中的应用进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(17): 2635-2648.
- [8] 陈磊,刘怡,梁生旺. 模式生物斑马鱼在中药研究中的应用 [J]. *药学学报*, 2012, 47(4): 434-439.
- [9] 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.
- [10] 夏广清,姚慧敏,董丽红,等. 灵芝多糖对斑马鱼存活、发育和衰老的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(4): 491-496.
- [11] 方芳,赵杰,余林中,等. 乌头碱对斑马鱼心脏毒性的初步研究 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(2): 31-33.
- [12] Zhi H J, Qin X M, Sun H F, *et al.* Metabolic fingerprinting of *Tussilago farfara* L. using ¹H NMR spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(5): 492-501.
- [13] 李静,李娟,贾金萍,等. 基于UHPLC-Q Extractive 轨道阱高分辨质谱的款冬花、叶的化学比较 [J]. *药学学报*, 2018, 53(3): 444-452.
- [14] 刘可越,张铁军,高文远,等. 款冬花的化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(22): 1837-1841.
- [15] 吴琪珍,张朝凤,许翔鸿,等. 款冬花化学成分和药理活性研究进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2015, 34(2): 33-36.
- [16] 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.
- [17] 常嘉,陆亮,王庆利,等. 斑马鱼在药物早期毒性筛选中的应用进展 [J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(13): 1500-1504.