

## 基于斑马鱼模型的中药安全性评价研究进展

范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 赵崇军\*, 林瑞超\*

北京中医药大学中药学院 中药品质评价北京市重点实验室, 北京 102488

**摘要:** 毒性中药的临床使用是中医药的特色, 在慢性疾病和重大疾病的救治过程中应用广泛。但是毒性中药的毒性研究数据相对较少, 在一定程度上不能为系统阐述毒性中药的理论和临床安全使用提供充分的参考依据。中药配伍、炮制是中医药临床减毒增效的有效手段, 准确而系统阐释配伍、炮制原理对中医药安全有效性至关重要。近年来, 由于特定的生理学优势, 斑马鱼已经逐步成为药物(中药)毒性研究的模型生物, 逐步被用于各种有毒物质的筛选和评价。对近年来利用斑马鱼进行中药毒性评价、炮制减毒、配伍减毒及毒性机制研究等进行总结, 以期在斑马鱼在中药毒性评价中的广泛应用和相关毒性标准的建立提供参考。

**关键词:** 中药; 斑马鱼模型; 毒性; 安全性评价; 炮制; 配伍; 减毒

**中图分类号:** R285.51; R285.53 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)01-0278-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.032

## Research progress on safety evaluation of traditional Chinese medicine based on zebrafish model

FAN Qi-qi, LI Zhi-qi, CHEN Mei-lin, ZHAO Chong-jun, LIN Rui-chao

Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract:** The clinical use of toxic traditional Chinese medicine (TCM) is characteristic of TCM, and toxic TCM is used to treat various diseases with a wide application, especially for chronic diseases and serious diseases. However, the study data of toxic TCM are still insufficient, which can't provide sufficient reference basis for systematic elaboration of toxic theoretical basis and clinical safe use of TCM. Compatibility and processing of TCM are effective means of reducing toxicity and enhancing efficacy in clinical practice. It is vital to accurately and systematically explain the influence of processing compatibility on the safety and effectiveness of TCM. In recent years, zebrafish has gradually become a model organism for studying the toxicity of drugs (including TCM) due to its specific physiological advantages. Therefore, zebrafish has been used in the toxicity screening and evaluation of various toxic substances. Toxic screening and assessment, processing and compatibility, and related mechanism of TCM based on zebrafish model are reviewed in this paper, in order to provide reference for wide application of zebrafish in the toxicity study of TCM and establishment of related toxicity standards.

**Key words:** traditional Chinese medicine; zebrafish model; toxicity; safety evaluation; processing; compatibility; attenuation

长期以来, 中药一直被认为具有有效、安全、无不良反应的特点。然而, 随着中药的推广与应用, 其不良反应的报道逐渐增加, 从而引起了人们对临床用药的关注。毒性中药是中医药临床使用的一大

特色, 通常广泛应用于重大疾病的治疗。但是, 毒性中药缺乏中药安全性评价数据, 尤其是其毒性作用的靶器官和机制不明确, 在一定程度上阻碍了中药新药、中药现代化和国际化的发展。因此, 如何

收稿日期: 2021-07-14

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX09735005); 北京中医药大学新教师启动基金资助项目(2020-JYB-XJSJ-009); 北京中医药大学重点攻关项目(2020-JYB-ZDGG-035)

作者简介: 范琦琦(1998—), 女, 硕士, 主要研究方向为中药安全性评价及主要活性/毒性物质基础筛选。

Tel: 19801139715 E-mail: ki\_ki1998@163.com

\*通信作者: 赵崇军(1988—), 男, 助理研究员, 主要研究方向为中药安全性评价及主要活性/毒性物质基础筛选。

Tel: 15301127325 E-mail: 1014256537@qq.com

林瑞超(1954—), 教授, 主要研究方向为中药品质评价。E-mail: linrch307@sina.com

客观、正确、系统地评价中药安全性，降低和避免中成药的不良反应成为了研究热点。

生物评价是中药质量标准与临床功效和安全性评价的重要手段和途径，已成为现代中药研究发展的重要方向之一。选择合理的动物模型、建立和完善相应的评价方法和指标对于系统评价中药安全性至关重要。近年来，斑马鱼模型由于特殊的生理优势被逐渐应用于中药安全性评价<sup>[1]</sup>，与哺乳动物相比，实验成本相对较低，胚胎透明，体外发

育，繁殖力强，适合于大规模的遗传筛选；药物暴露（异种生物、激素、药物以及环境污染物）能够引起斑马鱼出现与哺乳动物类似的生理反应和病理响应。斑马鱼模型在中药安全性评价中的应用和意义见图1。因此，本文整理了斑马鱼在中药安全性评价方面的研究进展，以期完善基于斑马鱼模型的中药安全性评价技术与方法，为进一步促进和开发斑马鱼模型在中药安全性评价中广泛应用提供参考。

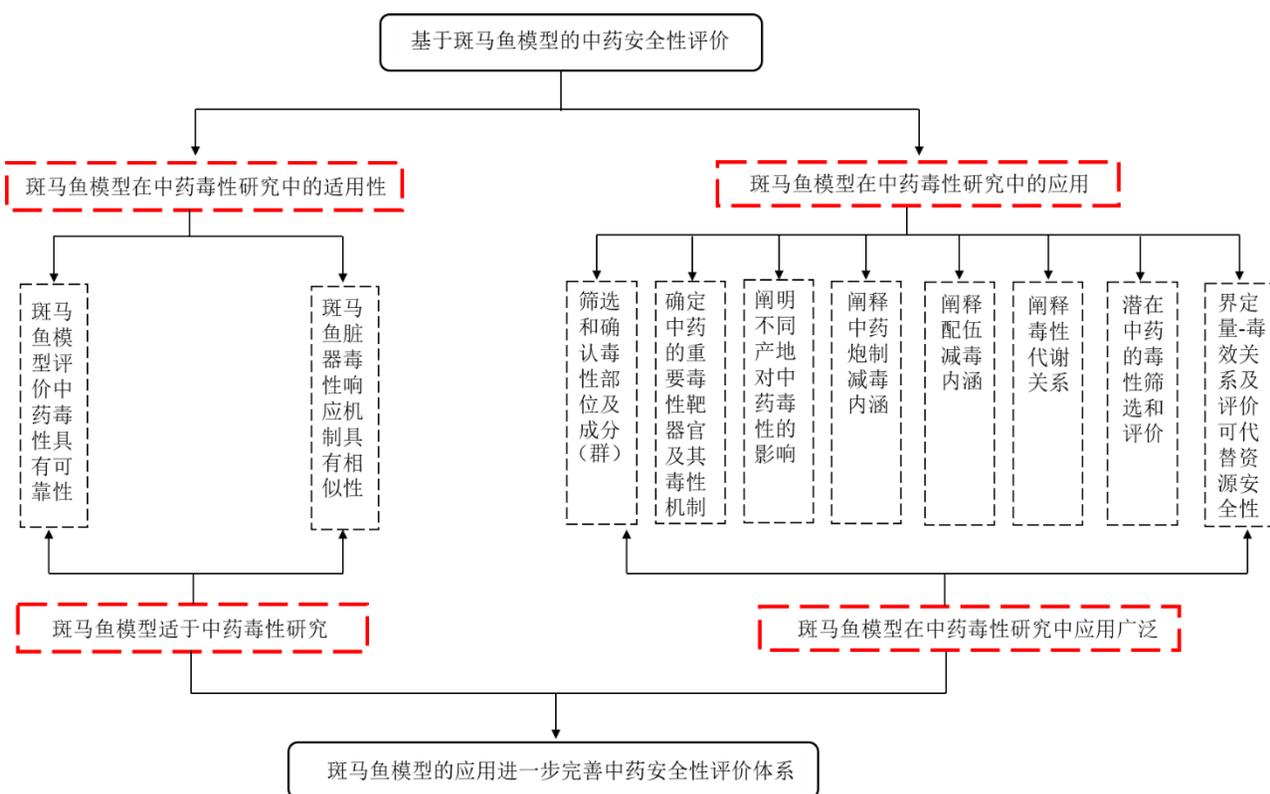


图1 斑马鱼模型在中药安全性评价中的应用和意义

Fig. 1 Application and significance of zebrafish model in safety evaluation of traditional Chinese medicine

### 1 斑马鱼模型在中药毒性研究中的适用性

斑马鱼作为一种新型的动物模型，早期主要是用于基础研究和环境评价，近10年才被广泛用于药物研究，包括中药的安全性评价。而作为一种新的模式生物，在被研究者和制药行业广泛接受和应用之前，必须要对该模型的一些基本性质进行考察和评价，如可靠性、相似性等。因此，针对斑马鱼模型的适用性进行讨论。

#### 1.1 斑马鱼模型评价中药毒性具有可靠性

前期本课题组利用斑马鱼模型，采用客观的量化指标体系对《中国药典》中明确记载有毒性的19种中药进行毒性评价，实验结果具有明显的

可重复性，表明斑马鱼模型对于筛选毒性中药具有一定的可靠性<sup>[2]</sup>。发现暴露于肝毒性中药与非肝毒性中药中的斑马鱼在肝脏表型、细胞组织结构、肝细胞凋亡及其相关基因、蛋白的表达水平呈现显著性差异，斑马鱼模型能够准确地将肝毒性中药与非肝毒性中药进行区分。对于中成药来说，郭胜亚等<sup>[3]</sup>选择已上市且报道有肝毒性的5种中成药（壮骨关节丸、益肾乌发口服液、牛黄解毒片和雷公藤多苷等）为评价样本，以斑马鱼肝脏形态学变化、肝变性程度和卵黄囊吸收情况为指标，快速评价中成药的肝毒性。结果表明5种药物均能够引起斑马鱼肝脏组织表型发生显著变化，影响卵黄囊吸收，对斑马鱼

幼鱼具有不同程度的肝脏毒性。也进一步表明斑马鱼模型评价中药肝脏毒性具有较好的可靠性。

## 1.2 斑马鱼脏器毒性响应机制具有相似性

陈影等<sup>[4]</sup>基于斑马鱼急性毒性实验和体外细胞实验评价山豆根生物碱部位和非生物碱部位的毒性大小。结果发现非生物碱部位对斑马鱼模型致死性最强,抑制肝癌 HepG2 细胞活力的作用也是最强的,表明斑马鱼模型与体外细胞模型在药物肝毒性评价中具有相似性。韩沁等<sup>[5]</sup>同时以斑马鱼及 SD 大鼠为模型评价芫花的肝脏毒性,结果发现在一定条件下,斑马鱼和 SD 大鼠肝脏组织均出现显著的结构改变,包括细胞结构松散、紊乱和细胞空泡化等,表明斑马鱼与 SD 大鼠在芫花肝毒性反应中表现出较强的一致性。

为了从转录水平验证斑马鱼模型与传统评价模型在肝毒性药物评价中的相似性,Zhao 等<sup>[6]</sup>选取重楼提取物为样本,同时对体外正常肝 L02 细胞、体内斑马鱼和 SD 大鼠模型进行暴露处理,以肝细胞表型、斑马鱼和 SD 大鼠肝脏组织结构、生化指标为评价指标进行相似性评价,发现重楼提取物能够抑制 L02 细胞的细胞活性,引起细胞表型变化、斑马鱼和 SD 大鼠模型的肝脏组织结构紊乱、三者肝功酶发生显著变化,意味着重楼提取物对 3 种评价模型均有显著的肝毒性。同时,现代分子生物技术(如系统组学技术、Western blotting 和实时荧光定量-聚合酶链式反应)实验结果表明,经重楼给药处理后,3 种模型在脂质代谢、能量代谢等相关基因的表达水平方面呈现高度一致性,进一步从分子水平证实了斑马鱼模型与传统评价模型在中药肝毒性评价中具有极强的相似性<sup>[7-8]</sup>,为斑马鱼在中药肝毒性筛选和评价中的应用提供了有力支撑。

## 2 斑马鱼模型在中药毒性研究中的应用

### 2.1 筛选和确认毒性部位及成分(群)

中药化学成分复杂,现有安全性评价研究主要优先靶向选择毒性中药中的主要毒性成分进行筛选和评价,其余大多数成分的安全性尚不明确。因此,如何从复杂体系中快速辨识毒性部位以及相关成分重点是难点问题。传统方法常用化学分离结合毒性评价追踪毒性成分,但是化学分离纯化获得的化合物量少,尤其是许多微量成分,常不能满足安全性评价所需样本量。现有的毒性评价模型如哺乳动物模型具有耗时长、工作强度大、样品用量大等缺点,不适合进行规模化筛选;体外细胞模型作用环

节相对单一,不能体现在体实验的综合效果。近年来,斑马鱼模型以其快速筛选的优势主要被应用于中药毒性部位的确认以及主要毒性成分的筛选。

罗隽等<sup>[9]</sup>和梅雪等<sup>[10]</sup>利用斑马鱼模型探讨了非致死剂量下甘遂及其醋制品不同溶剂提取物对斑马鱼幼鱼的毒性及毒性可逆性,结果发现,甘遂不同溶剂提取物对斑马鱼的毒性大小与醋甘遂相同,依次为石油醚提取物>二氯甲烷提取物>醋酸乙酯提取物>乙醇提取物。石油醚提取物对斑马鱼的主要靶器官为肝脏和胃肠道。此外,张桥<sup>[11]</sup>将萃取、减压硅胶柱色谱法、制备液相等现代分离技术与斑马鱼高通量筛选技术相结合,对甘遂中的不同提取部位及单体成分进行筛选和评价,发现醋甘遂各成分群的半数致死量明显大于生品,主要毒性成分为萜类化合物,而醋炙后能够降低萜类成分的含量进而降低甘遂的毒性作用。

何首乌所含化学成分主要有蒽醌类、芪类、鞣质类、黄酮类、磷脂类等,然而何首乌致肝毒性作用部位及其物质基础尚无定论。逐渐有研究者利用斑马鱼模型对何首乌肝毒性物质基础进行筛选和评价。郑海洋等<sup>[12]</sup>制备何首乌氯仿部位、醋酸乙酯部位及剩余水相部位固体提取物进行何首乌毒性部位的筛选,结果发现氯仿和醋酸乙酯提取部位能够引起斑马鱼幼鱼肝脏颜色变为暗灰色,透明度降低,面积变大;肝细胞数量降低,空泡变性且排列不规则;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartic transaminase, AST)活性显著上升,出现明显肝损伤。提示何首乌氯仿部位和醋酸乙酯部位可能是何首乌中诱导肝毒性的主要毒性部位。全云云等<sup>[13-14]</sup>利用肝脏荧光转基因斑马鱼,对何首乌 18 种成分进行肝毒性初步筛选,发现何首乌中芦荟大黄素能降低斑马鱼的肝脏面积和肝脏荧光强度,降低斑马鱼体内 ALT、AST 和谷胱甘肽的活力以及升高总胆红素的含量,引起斑马鱼肝组织出现大片片状坏死,肝组织细胞发生明显形态改变,肝细胞排列不规则等。Li 等<sup>[15]</sup>利用斑马鱼模型对何首乌 70%乙醇部位以及 19 个化合物进行肝毒性筛选和评价,发现大黄素、大黄酚、大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖、*cis*-emodin-emodin dianthrones 和 *trans*-emodin-emodin dianthrones 的肝毒性较强,而多酚类化合物的毒性较弱,这也是首次报道 dianthrones 有明显的肝毒性。目前对何首乌肝毒性的物质基础依旧无明确定论,仍需要找到合

适的评价指标对何首乌中的主要物质如蒽醌类、芪类及鞣质类进行系统比较。

为了克服传统分离方法耗时、费力的缺点,研究者尝试通过斑马鱼高效评价毒性与分析技术相结合,建立一种高效辨识毒性成分群的技术与方法,以期克服传统评价方法导致的毒性追踪低效、高成本的缺陷。林青华等<sup>[16]</sup>采用溶剂萃取法和明胶沉淀法分别制备生槟榔的总生物碱、总鞣质部位并对其进行含量测定及斑马鱼急性毒性评价。结果表明溶剂萃取法和明胶沉淀法制得总生物碱、总鞣质的质量浓度分别为 6.67 mg/mL、53.74%;二者对斑马鱼幼鱼的半数致死浓度 (median lethal concentration, LC<sub>50</sub>) 值分别为 136.14、21.52 μg/mL,进而确定生槟榔中鞣质类成分是生槟榔的主要毒性成分。李佳妍等<sup>[17]</sup>以不同批次补骨脂为评价样本,将现代分析方法与毒性评价相结合,同时测定 18 批补骨脂中香豆素、黄酮和补骨脂酚的含量以及对斑马鱼急性毒性和脏器损伤,并通过建立各类成分含量与斑马鱼 LC<sub>50</sub> 值之间的相关分析进而来辨识补骨脂的毒性成分群。结果表明不同产地补骨脂水煎液对斑马鱼的毒性差异较大,但斑马鱼毒性与不同产地补骨脂中所含黄酮类成分、补骨脂酚具有一定的相关性,同时研究结果提示补骨脂酚、补骨脂甲素、新补骨脂异黄酮、补骨脂乙素可能是补骨脂的主要毒性成分。

## 2.2 确定中药的毒性靶器官及其毒性机制

斑马鱼主要脏器(肝脏、心脏、肾脏和神经系统)的结构和功能与传统哺乳动物具有高度保守性<sup>[18]</sup>,斑马鱼脏器发育较快且具有显著的光学透明性,因此被广泛用于中药潜在脏器损伤评价和机制探讨。

Quan 等<sup>[19]</sup>发现芦荟大黄素能够降低斑马鱼肝脏的荧光面积和强度,苏丹黑 B 处理能够使斑马鱼肝脏和卵黄囊变黑,其肝毒性机制与核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 炎症通路和 p53 凋亡通路的激活有关,增加 p65 的表达,促进肿瘤坏死因子-α 释放,上调氨基末端激酶表达,抑制抗凋亡基因 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*) 表达,激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, *Caspase-3*)、凋亡相关因子 Bcl-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2/ Bcl-2 associated X protein, *Bax*) 等促凋亡基因表达水平,表明芦荟大黄素对斑马鱼具有一定的肝毒性。付晓春等<sup>[20]</sup>发现雷公藤多苷亚致死浓度给药 48 h 后能诱导斑马鱼肝细胞凋亡,上调凋亡蛋白 *Caspase-3* 和促凋亡分子 *Bax* 的表

达水平。Zhao 等<sup>[21]</sup>发现甘遂提取物能够引起斑马鱼肝脏组织结构紊乱,提高斑马鱼凋亡相关蛋白 *Caspase-3* 及其基因的转录水平,斑马鱼整体代谢组学结果发现甘遂的肝毒性与机体的氨基酸代谢和能量代谢紊乱相关。

在神经毒性评价方面,李梦婷等<sup>[22]</sup>利用斑马鱼模型,以附子脂溶性总生物碱为评价样本,通过斑马鱼幼鱼 *Noldus* 行为学系统、细胞凋亡检测和乙酰胆碱酯酶活力测定来分析不同给药时间样本对斑马鱼的神经毒性。发现附子脂溶性总生物碱会先促进,然后抑制斑马鱼幼鱼的行为活动,且其神经毒性可能与促进细胞凋亡和影响乙酰胆碱酯酶活力有关。在心脏毒性方面,Liu 等<sup>[23]</sup>利用斑马鱼模型探究乌头碱和新乌头碱诱导的心脏毒性及其机制,结果发现,乌头碱和新乌头碱均能引起斑马鱼早期心脏功能障碍,并能够通过影响 T-box 转录因子-5、GATA 结合蛋白 4 和其中 NK2 同源异型框 5 的表达诱导斑马鱼胚胎心脏毒性。

此外,斑马鱼主要脏器的形成时间不同,研究者可以利用不同鱼龄的斑马鱼考察药物作用的主要敏感靶器官。如冯娅茹等<sup>[24]</sup>选定不同发育阶段 [受精后 48、72、96 h (hours post fertilization, hpf)] 的斑马鱼于香加皮水提取物中急性暴露 24 h,发现香加皮对 48、96 hpf 斑马鱼的毒性大小相似,说明 48 hpf 斑马鱼已经适合作为心脏毒性研究,但是 72 hpf 斑马鱼对香加皮较为敏感,这可能是由于香加皮影响了斑马鱼的某一脏器的发育或其功能,如肝脏。代一航等<sup>[25]</sup>发现在亚致死浓度条件下,香加皮水提取物能够引起幼鱼肝脏形态异常、肝脏面积呈剂量相关性增加和肝细胞凋亡;能够降低斑马鱼超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活力,升高 ALT、AST 活力,进一步表明香加皮水提取物能够同时引起斑马鱼心脏和肝脏损伤,而且可能是通过破坏其体内氧化应激平衡,诱导肝脏细胞凋亡导致的。

## 2.3 阐明不同产地对中药毒性的影响

“土地之所宜者,则药力具”。众所周知,中药材的品质(质量、药效和毒性)与生长环境因素密切相关<sup>[26]</sup>。传统研究往往是通过化学成分种类与含量的角度来评价不同产地之间中药的质量,忽略了生物活性评价与药材产地之间关系。因此,加强活性评价、成分分析和区域性之间的关系对于阐释、补充和完善药材道地性内涵是至关重要的。附子的

毒性成分为双酯型生物碱，有效成分为单酯型生物碱<sup>[27-28]</sup>，刘雨诗等<sup>[29]</sup>经分析发现单酯型生物碱的含量以江油产者较高，云南产者较低；双酯型生物碱含量以云南产者较高，江油产者较低。王晓雅等<sup>[30]</sup>以斑马鱼心率变化、畸形率和致死浓度为评价指标，发现江油产黑顺片醇提物畸形率最小，存活率最高；云南组样本对斑马鱼的毒性最大；布拖组各项指标位于两产地之间。因此，通过斑马鱼整体动物模型和化学成分分析相互结合，确认江油产黑顺片具有低毒的特点，这对临床用药具有重要的指导意义。

另外，张勇等<sup>[31]</sup>以斑马鱼肝脏组织病理学变化为评价指标，比较不同产地山豆根的肝毒性，发现不同产地和批次的山豆根及其水煎液不同有效部位的肝脏毒性大小存在差异<sup>[32]</sup>。广西产山豆根浸膏粉能引起斑马鱼肝脏组织坏死，其肝脏呈网状、蜂窝状，细胞核松散、肿大；而四川产山豆根肝毒性较轻，仅能引起肝脏细胞核松散、肿大。这些研究结果能够为山豆根在临床应用上的安全性、有效性等综合评价以及其道地产区的辨别提供参考。

#### 2.4 阐释中药炮制减毒内涵

中药炮制是数千年临床实践中形成的以中医理论为理论基础、以临床辨证论治为要求、以研发过程中药物质量稳定可控为约束而发展的实践和技术，其核心为改善中药性味，增强中药功效，降低不良反应<sup>[33]</sup>，但中药炮制的科学内涵并不清晰和完善。伴随着各种分析仪器和方法的研发，从化学成分变化的角度出发，中药炮制复杂系统分析有了更强大、更精确的技术支撑手段<sup>[34]</sup>。然而，由于中药成分的复杂性，从药理作用变化的角度来阐述中药炮制的机制研究报道较少<sup>[35]</sup>，本文通过总结近年来斑马鱼在中药炮制方法和机制研究中的进展，为阐明中药炮制方法的机制提供理论支持和科学依据。

研究表明，槟榔中生物碱含量在炮制前后会发生显著变化<sup>[36]</sup>。炮制过程中，槟榔生物碱的总量随着炒制温度的升高而降低。将槟榔及其炮制品应用于斑马鱼模型发现，生槟榔、炒槟榔和焦槟榔水提物的 $LC_{50}$ 值依次增加，且在 $LC_{50}$ 条件下，生槟榔、炒槟榔、焦槟榔中总生物碱的质量浓度分别为0.964、0.831、0.829  $\mu\text{g/mL}$ ，提示槟榔毒性与生物碱含量呈正相关<sup>[37]</sup>。

为探究醋制甘遂减毒作用的物质基础，Zhang等<sup>[38]</sup>建立了一种超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法同时测定醋炙前后甘遂醋酸乙酯提取物中

12种化合物的种类与含量，并研究它们对于斑马鱼的毒性作用，研究通过比较甘遂醋酸乙酯提取物(KS-1)和醋炙甘遂醋酸乙酯提取物(KS-2)中萜类化合物的含量，揭示醋炙甘遂减毒的物质基础。结果表明，醋炙甘遂毒性降低可能是由于KS-2中5-O-苯甲酰基-20-脱氧辛醇含量增加，剩余萜类化合物含量降低所致。

张楷承等<sup>[39]</sup>采用模式生物斑马鱼模型发现京大戟醋制后各提取物对斑马鱼胚胎的急性毒性显著降低，Qin等<sup>[40]</sup>探讨了京大戟中4种化合物对斑马鱼胚胎的毒性机制以及醋炙后的减毒机制，研究发现，醋炙京大戟中4种化合物含量明显下降，斑马鱼暴露于化合物后心率、肝脏面积和胃肠蠕动减少，并观察到心包水肿、卵黄囊水肿等明显的病理信号。此外，这些化合物还能通过抑制SOD的活性来增加丙二醛和GSH-Px的含量，通过上调p53、Bax、Bcl-2的表达水平和激活Caspase-3、Caspase-9的活性来诱导细胞凋亡。同时，曹雨诞等<sup>[41]</sup>发现京大戟醋炙前后不同极性部位对斑马鱼胚胎均具有心脏、肝脏和肠道毒性，其中石油醚和二氯甲烷提取部位毒性最强，主要的毒性表现为心包水肿、心率降低、心脏细胞凋亡、肝面积变小、肝脏变性发黑、卵黄囊吸收延迟、出血、胃肠道蠕动减缓、胃肠道杯状细胞分泌功能异常等<sup>[42]</sup>。但是，与生品相比，相近剂量的京大戟醋炙品同一极性部位的心脏、肝脏和肠道毒性都有所下降。

方成鑫<sup>[43]</sup>采用心脏标记荧光斑马鱼对附子不同炮制品的心脏毒性进行研究，以心率变化、心包出血、静脉窦-动脉球间距为评价指标，发现附子不同炮制品水煎液的心脏毒性大小依次为：白附片>熟附片>生附片>生附片(去皮)>蒸附片>黑顺片>炒附片，且附子不同炮制品水煎液中总生物碱毒性与含量呈现一定的相关性。综上，斑马鱼模型的研究结果与中药炮制减毒的基本理论一致，斑马鱼模型的应用有利于从药理角度阐释中药炮制减毒机制与内涵。

#### 2.5 阐释配伍减毒内涵

中药临床使用的另一个特色优势在于中药配伍，它是保证中药，尤其是毒性中药安全有效的重要方式之一，是中医基础理论、国家中医药现代化发展战略的重要研究内容<sup>[44]</sup>。中药尤其是中药复方中存在的复杂成分以其成分含量差异变化在一定程度上与中药不良反应的发生密切相关，因此，如何

建立合理的评价体系科学阐释配伍减毒原理进而指导临床使用是目前关注的问题。

四逆汤是由附子、干姜和甘草组成的回阳救逆的经典方剂,方中包含的附子-干姜、附子-甘草均是配伍的典范。附子中所含的主要活性成分乌头碱、中乌头碱和次乌头碱均为附子毒性成分<sup>[45]</sup>。研究表明乌头碱能够引起斑马鱼心脏中氧化应激损伤,进而引起斑马鱼出现明显心脏毒性。而干姜中的6-姜酚、甘草中的甘草酸对乌头碱诱导的氧化应激反应有明显的抑制作用,进而减弱乌头碱导致的斑马鱼心肌细胞凋亡<sup>[46]</sup>。此外,补骨脂及其中药制剂在临床上能够诱发明显的肝毒性损伤。吴茱萸与毒性较小的杜仲、桑寄生、女贞子提取液配伍后可缓解吴茱萸的肝毒性,降低吴茱萸诱导的斑马鱼死亡率,改善吴茱萸对斑马鱼脏器的影响,其中以杜仲-吴茱萸配伍的结果最优<sup>[47]</sup>。综上,斑马鱼模型可应用于方剂配伍规律研究,筛选方剂活性成分,分析方剂组方配伍特点,探讨方剂最佳药物组成配比等。

## 2.6 阐释毒性-代谢关系

药物毒性往往与其在体内的代谢转化过程密切相关,中药中所含无毒原型成分经过体内代谢过程可能会转化成强毒性成分。如前所述,传统的药物代谢体内实验设计需要大量的评价样本,而天然产物往往难以满足体内动物实验所需用量,而且无法实现整体动态观察;体外细胞实验难以完整体现整体动物对药物的整体代谢情况,无法进行微量成分在体评价。而斑马鱼具有与哺乳动物类似的完整器官、系统及代谢酶系,能够对药物进行完整的代谢反应,并且可实现微量成分的在体、高效筛选及代谢研究<sup>[48-50]</sup>。

刘欣欣等<sup>[51]</sup>将1 dpf健康斑马鱼胚胎置于不同浓度补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂苷和异补骨脂苷的供试液中,分析各成分的动态代谢变化以及他们对斑马鱼的毒性效果。结果表明补骨脂素和异补骨脂素的原型成分均可诱导3 dpf斑马鱼出现明显毒性;补骨脂苷和异补骨脂苷的原型成分对3 dpf斑马鱼主要脏器没有明显影响,但经4~6 dpf斑马鱼代谢之后动态转化成补骨脂素和异补骨脂素后会导致明显毒性。表明补骨脂素和异补骨脂素既是药材中的原型成分,也是在体内转化的代谢成分,是补骨脂致毒的相关成分。

葛静等<sup>[52]</sup>和凌洁等<sup>[53]</sup>基于斑马鱼代谢-效/毒联合评价箭叶淫羊藿不同组分(水煎液和黄酮组分)、

主要代表性成分(朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、箭藿苷C与宝藿苷I)代谢变化过程及其相关毒性。结果发现箭叶淫羊藿的质量浓度和暴露时间与斑马鱼脏器损伤或死亡相关;而且朝藿定C的主要代谢产物箭藿苷C的动态增加与淫羊藿水煎液、淫羊藿黄酮组分及朝藿定C的毒性产生密切相关;而其他化合物及其代谢产物与淫羊藿的毒性作用没有表现出明显的直接关系。巴戟天与淫羊藿配伍能够减缓朝藿定C代谢速度,进而缓解其毒性作用。

以上研究说明基于斑马鱼模型能够融合传统体内和体外评价模型的优势,突破体内、外模型在药物代谢研究领域的技术瓶颈,实现药物毒性和代谢动态同步进程分析,而且展现出样品需求量少、高效省时省力、满足在体化要求等优点,为高效辨识中药毒性物质,实现微量成分体内动态转化的毒性评价,甚至能为微量成分在体毒性与代谢评价提供优势平台。

## 2.7 潜在中药的毒性筛选和评价

中药在重大疾病治疗的优势逐渐被世界接受,其临床使用量显著增加。因此,在临床前研究阶段对常用中药及复方的安全性进行筛选和评价,确认潜在的毒性作用、毒性药物以及毒性靶器官,对于保证临床用药安全至关重要。陈颖等<sup>[54]</sup>用斑马鱼对壮骨关节丸及该方中12味药水煎液及醇提物的安全性进行评价,验证了壮骨关节丸及其所含一些已报道毒性成分(如补骨脂、乳香等)的不良反应,同时也发现一些传统认为相对安全的药味(如续断)也能诱导斑马鱼出现明显毒性,而续断的毒性研究在传统动物评价模型中尚未见报道。此外,陈颖等<sup>[55]</sup>利用斑马鱼毒性模型对26种常见伤科中药材的安全性进行快速评价,发现13种药味(续断、知母、乳香、没药、补骨脂、独活、牛膝、制何首乌、蛇床子、木香、土鳖虫、淫羊藿和五加皮)对斑马鱼的急性毒性较大,且水煎液对斑马鱼幼鱼不同脏器表型具有显著影响。综上,斑马鱼模型在潜在毒性中药快速筛选和评价中具有简单、高效、实时动态的优势,尤其适用于中药复方安全性评价研究中通过拆方来进行毒性物质筛选和评价。

## 2.8 其他

中药化学成分的复杂性以及与不同机体状态之间的相互作用导致难以对中药是否有毒以及毒性强弱进行准确评价。大多数情况下,中药中的活性成分与毒性成分不能区分,很难有效指导临床的安全使

用,究其原因主要在于中药毒性物质的构-量-毒-效关系不明确,如柴胡及其所含的柴胡皂苷既有保肝作用又有肝毒性。夏青等<sup>[56]</sup>以柴胡皂苷 a 为例,从健康生理和病理模型的角度分别考察柴胡皂苷对斑马鱼的毒性差异,实验结果表明,柴胡皂苷 1.77  $\mu\text{mol/L}$  对病理性酒精性脂肪肝具有保护作用,且无毒性作用;随着质量浓度的升高,柴胡皂苷对健康状态的肝损伤作用开始出现,从柴胡皂苷 a “量-毒-效”关系研究的角度证实了中医药临床“有故无殒”理论,为柴胡及柴胡皂苷 a 的临床用药安全提供参考。

目前,资源匮乏已经成为限制中药快速发展的主要障碍,寻找可替代资源已经是解决行业困境的主要措施和手段,但是确保替代资源的安全性是首要问题。段亚辉等<sup>[57]</sup>采用斑马鱼模型比较款冬叶、花的肝脏、肾脏毒性,结果发现款冬花及款冬花配伍紫菀在高剂量(1.5 mg/mL)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,表明款冬叶优先于款冬花入药,为款冬叶的资源利用奠定了基础。利用斑马鱼模型能够快速筛选安全、有效的可替代中药资源,有助于实现中药资源利用最大化。

### 3 结语

近年来,中药在重大疾病防治中展现出巨大的优势,在世界范围内逐渐被认可和接受。随着中药的广泛使用,中药不良反应事件的报道也引起众多学者的关注。目前现代研究主要关注于中药的活性及其作用机制,而毒性中药缺乏对机体不良反应的系统研究,在一定程度上已经成为限制其临床广泛应用和药品研发的阻碍。因此,深入而系统研究中药,尤其是毒性中药不良反应的物质基础和毒性机制尤为重要。在此过程中,现代化分析技术的发展能够为中药毒性物质的定性和定量提供有力支持,寻找和建立一种合适的动物模型也必不可少,尤其是确立一种适合于复杂化学成分体系安全性评价的动物模型显得更为重要。

中药安全性评价常用模型包括体外细胞和体内动物模型,体外细胞具有高通量优势,能够对中药复杂化学成分体系进行快速筛选,但是体外细胞模型没有整体动物完整的代谢和调节系统,作用环节单一,不能完整反映在体实验的综合效果以及机体对药物的响应过程。体内动物模型如啮齿类动物模型是药物安全评价的黄金标准,其评价结果也具有较高的灵敏性和准确性,能够较真实的反映药物对

机体的不良反应,但该方法具有耗时长、工作强度大、样品用量大等缺点,难以进行规模化筛选。此外,中药复方是中药临床使用的常见方式,多种药味在炮制、配伍等过程中相互影响和变化,造成其所含化学成分更加复杂和多变。因此,基于体内啮齿类动物模型进行复方中潜在毒性物质的筛选和确认更加困难。特别是中药的一些微量成分根本不能满足体内动物实验的需要。寻找一种兼具体外细胞和体内动物模型双重优势的动物模型,能够在体高效快速锁定毒性目标成分群尤为重要。

斑马鱼作为一种整体动物模型,由于其具有的一些独特优势,最早被用于遗传发育和环境毒理学研究,近年来才被药学研究工作者所接受和认可<sup>[58]</sup>,并用于评价中成药的疗效与安全性<sup>[59]</sup>。首先,斑马鱼的高产卵率能够为中药安全性评价和毒性物质筛选提供足量的样本,能够弥补传统体内动物模型个体差异对实验结果的影响,同时能够在同一实验设计中对多个影响因素同时进行考察和评价;其次,斑马鱼幼鱼具有显著的光学透明性,通过显微镜就可以对不同脏器的形成过程、药物对多个主要脏器结构和功能的影响实现动态、实时的观察,更容易确定中药毒性实验暴露终点,获得多角度实验资料<sup>[60]</sup>,尤其是现代转基因技术的发展更容易构建特定荧光标记的转基因品系斑马鱼,通过特定脏器中荧光表达位置以及水平的考察,能够轻易实现药物潜在器官毒性的确定。

然而斑马鱼模型也存在以下不足:(1)许多斑马鱼实验技术与方法尚未形成统一的标准,如不同实验目的中鱼龄的选择、药物的给药方式和时间、评价指标及其变化水平的不统一造成不同团队实验结果的不一致性、差异性和不可传递性。如在肝毒性评价中,全正扬等<sup>[61]</sup>同样以斑马鱼死亡率、肝脏形态、肝脏及卵黄囊的尺寸比为评价指标发现何首乌中大黄素的毒性最大,芦荟大黄素却没有明显的毒性效果,这与全云云<sup>[13]</sup>的实验结果存在一定差异。此外,在以肝脏面积为评价指标时,其变化水平与肝损伤没有建立明确的联系,即脏器表型变化是否能够代表脏器损伤及损伤程度并不明确。(2)传统体内 ig 给药与斑马鱼暴露给药途径不同,对药物体内代谢过程以及药物的安全性评价结果的影响也不确定。

综上所述,斑马鱼模型以其高通量优势及体内动物模型的生物复杂性,成为传统体内外模型之间

的沟通桥梁,可用于药物研发早期阶段准确筛选和评价药物的潜在毒性成分以及主要靶器官,降低药物研发风险<sup>[62]</sup>。同时,通过斑马鱼高效评价毒性与成分含量进行相关分析,以高效辨识毒性成分群,在一定程度上能够克服单体成分-单味药-复方安全性评价中毒性追踪低效、高成本的缺陷。不可忽视的是,斑马鱼安全性评价体系的准确性、评价方法的规范性、评价指标的灵敏性仍有待进一步利用大量样本进行验证,规范并确立以斑马鱼模型为基础的评价标准、探究斑马鱼体内药物代谢过程也是日后中药安全性评价体系的发展方向,同时也为中药安全性研究提供了新思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Xu N, Sun R, Shi Y, *et al.* Discovery and identification of quality markers of *Sparganii Rhizoma* based on zebrafish thrombosis model [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(3): 389-395.
- [2] 赵崇军. 部分中药对斑马鱼的发育毒性及其靶器官的初步研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [3] 郭胜亚, 朱晓宇, 廖文瀚, 等. 斑马鱼模型评价 5 种中药肝脏毒性 [J]. *实验动物科学*, 2016, 33(5): 21-27.
- [4] 陈影, 张倩, 韩淑娴, 等. 山豆根不同提取部位的毒性作用研究 [J]. *中国药物警戒*, 2017, 14(10): 582-586.
- [5] 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.
- [6] Zhao C, Wang M, Jia Z, *et al.* Similar hepatotoxicity response induced by *Rhizoma Paridis* in zebrafish larvae, cell and rat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112440.
- [7] Jia Z, Zhao C, Wang M, *et al.* Hepatotoxicity assessment of *Rhizoma Paridis* in adult zebrafish through proteomes and metabolome [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109558.
- [8] Zhao C, Wang M, Huang J, *et al.* Integrative analysis of proteomic and metabolomics data for identification of pathways related to *Rhizoma Paridis*-induced hepatotoxicity [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6540.
- [9] 罗隽, 梅雪, 夏青, 等. 醋甘遂不同提取物对斑马鱼幼鱼的毒性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4): 160-166.
- [10] 梅雪, 罗隽, 夏青, 等. 基于斑马鱼幼鱼模型的甘遂毒性评价 [J]. *天津中医药*, 2018, 35(1): 51-55.
- [11] 张桥. 甘遂醋炙减毒物质基础研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [12] 郑海洋, 杨晓歌, 赵崇军, 等. 何首乌不同萃取部位对斑马鱼幼鱼的肝脏毒性观察 [J]. *山东医药*, 2019, 59(12): 5-9.
- [13] 全云云. 基于斑马鱼模型的何首乌肝毒性物质基础及其作用机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [14] 全云云, 周忆梦, 刘美辰, 等. 斑马鱼模型评价何首乌中 18 种成分的肝脏毒性 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(5): 744-752.
- [15] 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.
- [16] 林青华, 屈文佳, 贾哲, 等. 生槟榔中生物碱与鞣质类成分对斑马鱼急性毒性的比较研究 [J]. *中医药学报*, 2019, 47(5): 43-46.
- [17] 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.
- [18] Clark M D, Hennig S, Herwig R, *et al.* An oligonucleotide fingerprint normalized and expressed sequence tag characterized zebrafish cDNA library [J]. *Genome Res*, 2001, 11(9): 1594-1602.
- [19] Quan Y, Gong L, He J, *et al.* *Aloe emodin* induces hepatotoxicity by activating NF- $\kappa$ B inflammatory pathway and P53 apoptosis pathway in zebrafish [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 306: 66-79.
- [20] 付晓春, 沈小莉, 俞航萍, 等. 雷公藤多苷促进斑马鱼肝细胞凋亡的实验研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(10): 1032-1038.
- [21] Zhao C, Jia Z, Li E, *et al.* Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2019, 62: 152959.
- [22] 李梦婷, 张慧琼, 文瑞琪, 等. 基于斑马鱼研究附子脂溶性总生物碱的神经毒性 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(6): 63-66.
- [23] Liu F, Han X, Li N, *et al.* *Aconitum* alkaloids induce cardiotoxicity and apoptosis in embryonic zebrafish by influencing the expression of cardiovascular relative genes [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 305: 10-18.
- [24] 冯娅茹, 赵崇军, 倪媛媛, 等. 香加皮对斑马鱼发育毒性及心脏毒性的影响 [J]. *环球中医药*, 2017, 10(5): 536-540.
- [25] 代一航, 赵崇军, 田敬欢, 等. 香加皮水提取物对斑马鱼幼鱼肝脏毒性的初步研究 [J]. *环球中医药*, 2017, 10(10): 1161-1166.
- [26] 党珏, 赵梦杰, 袁岸, 等. 附子道地性的影响因素 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(11): 2744-2746.
- [27] Yue H, Pi Z, Song F, *et al.* Studies on the aconitine-type

- alkaloids in the roots of *Aconitum carmichaeli* Debx. by HPLC/ESIMS/MS(n) [J]. *Talanta*, 2009, 77(5): 1800-1807.
- [28] Sun H, Ni B, Zhang A, *et al.* Metabolomics study on Fuzi and its processed products using ultra-performance liquid-chromatography/electrospray-ionization synapt high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition analysis [J]. *Analyst*, 2012, 137(1): 170-185.
- [29] 刘雨诗, 刘红梅, 叶强, 等. 胆巴炮制对附子生物碱类成分的影响研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(4): 472-477.
- [30] 王晓雅, 缪璐琳, 熊亮, 等. 不同产地黑顺片醇提取物对斑马鱼毒性和心率的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1): 172-174.
- [31] 张勇, 郭胜亚, 邓中平, 等. 斑马鱼在中药毒性靶器官研究中的进展 [J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(12): 1343-1347.
- [32] Liu H C, Zhu X Y, Chen J H, *et al.* Toxicity comparison of different active fractions extracted from *Radix Sophorae tonkinensis* in zebrafish [J]. *J Zhejiang Univ Science B: Biomed Biotechnol*, 2017, 18(9): 757-769.
- [33] 孙嘉辰, 李霞, 王莹, 等. 中药加工炮制过程中质量标志物的研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2593-2602.
- [34] Zhou L, Xu J D, Zhou S S, *et al.* Chemomics-based marker compounds mining and mimetic processing for exploring chemical mechanisms in traditional processing of herbal medicines, a continuous study on *Rehmanniae Radix* [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1530: 232-240.
- [35] Zhong Y, Zhu J, Yang Z, *et al.* Q-marker based strategy for CMC research of Chinese medicine: A case study of *Panax Notoginseng* saponins [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 129-137.
- [36] Liu Y J, Peng W, Hu M B, *et al.* The pharmacology, toxicology and potential applications of arecoline: A review [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(11): 2753-2760.
- [37] 林青华, 屈文佳, 秦华珍, 等. 槟榔不同炮制品对斑马鱼急性毒性比较研究 [J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(2): 9-11.
- [38] Zhang Q, Zhang K C, Lou J W, *et al.* Simultaneous quantification of twelve compounds in ethyl acetate extracts of *Euphorbia kansui* before and after fry-baked with vinegar by UPLC-MS/MS and its toxic effect on zebrafish [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 155: 169-176.
- [39] 张楷承, 曹雨诞, 姚芳, 等. 京大戟醋制前后对斑马鱼胚胎的急性毒性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(12): 2291-2297.
- [40] Qin W N, Zhang K C, Geng T, *et al.* The toxicity mechanism of toxic compounds from *Euphorbiae Pekinensis Radix* on zebrafish embryos [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111521.
- [41] 曹雨诞, 张楷承, 姚芳, 等. 京大戟醋制前后对斑马鱼胚胎心脏的毒性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(24): 73-77.
- [42] 姚芳, 张楷承, 曹雨诞, 等. 京大戟醋制前后对斑马鱼胚胎肝、胃肠毒性的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(6): 1179-1185.
- [43] 方成鑫. 附子水溶性化学成分及其心脏毒性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [44] 周婧, 何溶溶, 蒋洁君, 等. 中药配伍减毒研究思路与方法: 以蟾酥、牛黄为例 [J]. *南京中医药大学学报*, 2018, 34(4): 330-333.
- [45] Zhang M, Peng Y, Wang M, *et al.* Compatibility and its metabolism by intestinal bacteria altered the transport of toxic diterpenoid alkaloids from processed aconite root (lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debx.) in traditional Chinese formula Si-Ni Decoction across Caco-2 monolayers [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 228: 164-178.
- [46] 宋臻臻. 基于中药化学生物学四逆汤组方配伍减毒作用研究 [D]. 保定: 河北大学, 2020.
- [47] 宁青, 刘中秋, 韦英杰, 等. 基于斑马鱼在体模型高效筛选补骨脂配伍减毒研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2021, 37(1): 54-61.
- [48] 凌洁, 王茉, 陈颖, 等. 基于斑马鱼毒/代同步进程法分析巴戟天配伍淫羊藿减毒作用 [J]. *药学学报*, 2018, 53(1): 74-83.
- [49] Shi W, Ling J, Jiang L L, *et al.* Metabolism of five diterpenoid lactones from *Dioscorea bulbifera* tubers in zebrafish [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(14): 7765-7773.
- [50] Zhong R L, Chen Y, Ling J, *et al.* The toxicity and metabolism properties of *Herba Epimedii* flavonoids on larval and adult zebrafish [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2019, 2019: 1-9.
- [51] 刘欣欣, 宁青, 王茉, 等. 斑马鱼毒性-代谢关联分析法评价补骨脂香豆素及其糖苷成分安全性 [J]. *中国药学杂志*, 2020, 55(24): 2000-2005.
- [52] 葛静, 凌洁, 宁青, 等. 基于斑马鱼 M-Act/Tox 联合评价箭叶淫羊藿的代谢-效/毒作用 [J]. *中草药*, 2019, 50(7): 1614-1620.
- [53] 凌洁, 王茉, 陈颖, 等. 基于斑马鱼毒/代同步进程法分析巴戟天配伍淫羊藿减毒作用 [J]. *药学学报*, 2018, 53(1): 74-83.
- [54] 陈颖, 王茉, 景莉君, 等. 基于斑马鱼模型筛选壮骨关节丸毒性药味高效筛选 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2017, 19(1): 133-141.
- [55] 陈颖, 汪晶, 陈书芹, 等. 基于斑马鱼模型的26种常见骨伤科中药材的毒性筛选 [J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(5): 465-469.

- [56] 夏青, 韩利文, 张云, 等. 基于斑马鱼模型的柴胡皂苷a保肝作用与肝毒性研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13): 2662-2666.
- [57] 段亚辉, 张云, 王雪, 等. 基于模式生物斑马鱼的款冬叶肝肾毒性比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 669-674.
- [58] 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.
- [59] 李德坤, 原景, 许泽乾, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2398-2402.
- [60] Zhao C J, Tian J H, Wang J F, *et al.* Zebrafish model for assessing induced organ toxicity by *Strychnos nux-vomica* [J]. *J Tradit Chin Med*, 2016, 36(4): 522-529.
- [61] 全正扬, 孙震晓. 基于斑马鱼模型的何首乌水提物及其主要成分的肝毒性研究 [J]. 中国药物警戒, 2018, 15(1): 1-5.
- [62] 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.

[责任编辑 崔艳丽]