

斑马鱼幼鱼在中药单体毒性检测的研究进展

顾瑾¹, 李蕊¹, 孟研玉¹, 郑彦文², 仲兆民¹

(1. 苏州大学苏州医学院基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学附属第二医院, 江苏 苏州 215000)

摘要: 中药是多成分、多靶点的复杂体系, 是我国几千年文明积累下来的宝贵资源, 但由于中药的毒性研究缺乏, 导致其使用安全范围不明确, 限制了其广泛使用和推广, 故对每种中药单体的毒性评价尤为重要。斑马鱼是一种重要的脊椎动物模型, 用于低成本的体内全生物中通量药物筛选和毒理研究。综述了利用斑马鱼检测多种中药单体的心脏毒性、肝毒性、神经毒性和发育毒性的研究进展, 指出了其在中药单体毒性研究中存在的问题。斑马鱼是中药单体毒性及安全性评价的理想模式生物, 未来, 需建立标准规范和高通量测定方法对上千种中药单体进行安全性评价。

关键词: 中药单体; 斑马鱼; 心脏毒性; 肝毒性; 神经毒性

中图分类号: R285.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-8646(2024)10-0123-04

Research Progress on Toxicity Detection of Chinese Medicine Monomer in Zebrafish Larvae

Gu Jin¹, Li Rui¹, Meng Yanyu¹, Zheng Yanwen², Zhong Zhaomin¹

(1. School of Biology & Basic Medical Sciences, Soochow Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, China)

Abstract: Traditional Chinese medicine (TCM) is a complex system of multi-components and multi-targets, which is a precious resource accumulated by Chinese civilization for thousands of years. However, due to the lack of toxicity studies on TCM, the safe range of its use is unclear, which limits its wide use and promotion. Therefore, the toxicity evaluation of each TCM monomer is particularly important. Zebrafish is an important vertebrate model for low-cost in vivo whole-organism midthroughput drug screening and toxicology studies. The study reviews the research progress of the detection of cardiotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity and developmental toxicity of various TCM monomers by zebrafish; and points out the existing problems in the study of toxicity of TCM monomers. Zebrafish is an ideal model organism for toxicity and safety evaluation of traditional Chinese medicine monomers. In the future, standards and high-throughput determination methods should be established to evaluate the safety of thousands of traditional Chinese medicine monomers.

Key words: Monomer of Chinese traditional herbs; Zebrafish; Cardiotoxicity; Hepatotoxicity; Neurotoxicity

收稿日期: 2024-01-09

基金项目: 2022年苏州市科学技术局医疗卫生科技创新项目“谷氨酰胺脱羧酶1(GAD1)在胶质瘤发生发展中的作用及应用研究”(SKY2022164); 2023年苏州大学秦惠箬与李政道中国大学生见习进修基金“利用斑马鱼行为指纹图谱筛选致癫痫化合物及其机制研究”; 2023年苏州大学苏州医学院基础医学与生物科学学院生物技术专业课外科研项目“中药单体库对斑马鱼幼鱼的LC50检测及致畸作用机制研究”; 2023年苏州医学院本科生课外科研项目“化合物诱导的斑马鱼ADHD模型构建及诱导机制研究”

作者简介: 顾瑾(2004-), 女, 本科在读。研究方向: 斑马鱼毒理学;

李蕊(2003-), 女, 本科在读。研究方向: 斑马鱼神经行为学;

孟研玉(2003-), 女, 本科在读。研究方向: 斑马鱼神经行为学;

郑彦文(1984-), 女, 硕士研究生, 副研究员。研究方向: 胶质瘤的发生发展及机制研究。

通讯作者: 仲兆民(1984-), 男, 博士研究生, 副研究员。研究方向: 斑马鱼药物筛选及神经行为学。E-mail: zhongzhaomin@suda.edu.cn。

中药具有副作用少、作用疾病类型广等特点, 其由多种中药单体按不同比例混合而成, 不同单体、不同的混合比例及不同的煎制方法均有不同的功效, 这限制了通过科学手段对其作用机理及安全适用范围的研究。大多数中药毒性的数据有限, 毒性成分、毒性靶器官、安全剂量、剂量-时间-毒性-功效关系尚不清楚, 因此利用模式生物研究中药每种组成成分即中药单体的毒性特点具有重要意义。

1 斑马鱼幼鱼模型的特点与优势

斑马鱼是用于药物筛选、功效评价及毒性检测的良好工具。斑马鱼与人类基因的同源性高, 在人类的1318个药物靶点中85%被鉴定为斑马鱼的同源基因^[1], 斑马鱼暴露于小分子化合物中的信号通路反应与人类的毒理反应十分相似。受精5 d(5 dpf)后的斑马鱼幼鱼是典型的脊椎动物, 分化了大部分器官, 如眼、脑、心、肠等。由于其光学透明, 可在活体情况下进行行为学检测和在显微镜下进行动态分析。利用斑马鱼幼鱼进行中药单体毒性筛选, 有利于了解中药单体

的生物特性,减少临床治疗过程中的不良反应。研究数据表明,药物对斑马鱼的发育毒性与致畸性、心血管毒性、肝脏毒性、胃肠道毒性、神经毒性和听觉毒性的评价结果与人体实验结果的一致性平均达到了80%以上(图1)^[2]。通过分析 TargetMol 公司中药单体库(L6810)中随机的100个化合物在斑马鱼中的毒性检测文献(PubMed)发现,有14个化合物报道了某些毒性,占比14%,其中7个中药单体具有心脏毒性、3个具有神经毒性、3个具有肝脏毒性、7个具有发育毒性。

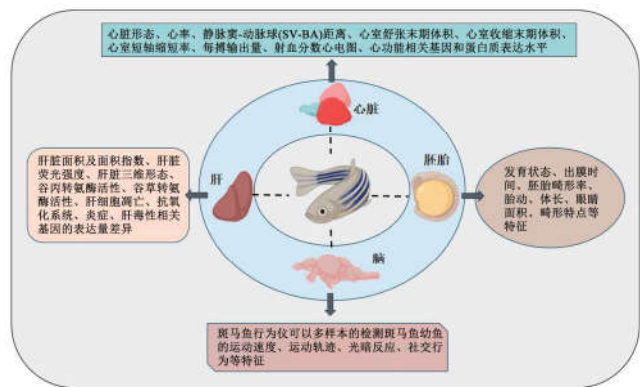


图1 通过斑马鱼检测中药单体对多个靶器官毒性的主要指标
Fig. 1 Main indexes of the detection of toxicity of TCM monomer to multiple target organs by zebrafish

2 中药单体对斑马鱼幼鱼毒性靶器官的研究

2.1 心脏毒性研究

利用斑马鱼体外发育且幼鱼透明的特点可以快速、简便地完成药物对心脏的毒性研究^[3]。斑马鱼的心脏由源自中胚层的原代心脏中胚层祖细胞融合形成的线性心血管发育而来^[4],是最早发育阶段形成的器官。斑马鱼的心脏由静脉窦、心房、心室和动脉球组成,位于胸膜和胸廓之间的胸腔前腹。斑马鱼心功能评价指标包括心脏形态、心率、静脉窦-动脉球(SV-BA)距离、心室舒张末期容积、心室收缩末期体积、心室短轴缩短率、每搏输出量、射血分数等。还可通过检测心电图、心功能相关基因和蛋白表达水平等评价心功能。

吴茱萸碱(Evodiamine,来源于吴茱萸)是一种生物碱,具有缓解腹痛、头痛、痛经、呕吐和腹泻等功效。Yang等^[5]发现,354 ng/mL吴茱萸碱可使斑马鱼出现心包水肿、心率和血液循环改变、心脏发育受到影响。樟脑(Camphor,来源于肉桂)是一种具有芳香性和挥发性的萜烯酮,具有抗炎、抗病毒及抗癌功效。Du等^[6]发现,528 μg/mL樟脑暴露下的斑马鱼出现心包水肿及心排血量下降、心律不齐,原因可能与细胞凋亡升高和氧化应激有关。Bangeppagari等^[7]研究散沫花100 μM、200 μM、275 μM浓度下处理的斑马鱼胚胎及幼鱼,发现其出现了全身血液循环消失、心脏血液循环减慢、心包囊水肿、心率减慢等。松萝酸(Usnic acid)是一种天然存在于地衣中的二苯并呋喃衍生物,具有抗菌、抗肿

瘤、抗氧化、镇痛、抗炎和防紫外线活性。Draut等^[8]发现250 nM的松萝酸可抗血管生成,但会导致斑马鱼脊柱弯曲、心包水肿和血流障碍等副作用。异甘草素(Isoliquiritigenin)是一种在甘草根中发现的新型天然类黄酮,具有抗氧化、抗癌、抗炎、抗过敏、保护心脏、保护肝脏和保护神经等特性。Song等^[9]利用1.24 mM、4.12 mM、12.37 mM、16.31 mM的异甘草素处理绿色荧光标记心脏的转基因斑马鱼,结果发现,异甘草素高浓度组导致斑马鱼胚胎出现心包水肿,其中12.37 mM、16.31 mM组最为严重。心率、心包面积和舒张末期SV-BA距离与对照组相比呈浓度相关性增加,射血分数和每搏输出量显著降低,其机制为活性氧水平和脂质过氧化含量升高,降低了抗氧化酶活性。

2.2 肝毒性研究

斑马鱼幼鱼的肝脏结构和功能发育完全,在肝细胞组成、功能、信号转导、损伤反应和介导肝脏疾病的细胞过程方面与哺乳动物肝脏相似,具有广泛的P450酶,可进行各种代谢反应,包括羟基化、偶联、氧化、去甲基化和去甲基,肝脏面积及面积指数、肝脏荧光强度、肝脏三维形态、谷丙转氨酶活性、谷草转氨酶活性、肝细胞凋亡、抗氧化系统、炎症、肝毒性相关基因的表达量差异是斑马鱼肝毒性的常见指标。

芦荟大黄素(Aloe-emodin)是从大黄棕榈、芦荟及何首乌等天然植物中分离得到的一种蒽醌多酚类物质,具有抗菌、抗病毒、抗癌和抗肿瘤效应。Quan等^[10]报道15.05 μg/mL芦荟大黄素使斑马鱼肝脏面积变小、肝脏病变,原因是芦荟大黄素激活了NF-κB炎症通路和P53凋亡通路。异补骨脂素(Isopsoralen)又称补骨脂,是豆科植物补骨脂的成熟果实,具有抗肿瘤、治疗骨质疏松和白癜风、抗抑郁剂和抗菌剂功效,可作为激素类药物和免疫增强剂。Zhang等^[11]发现,随着异补骨脂素的增加,斑马鱼的谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性逐渐增加,肝脏转基因斑马鱼的荧光面积和强度减少,100 μM处理组肝脏中存在大量的液泡结构,其机制为抑制药物转运蛋白的表达导致异补骨脂素在体内积累,抗氧化能力下降。郭胜亚等^[12]研究了中药壮骨关节丸中毒性物质含乳香、没药和补骨脂3种情况,在156 μg/mL和158 μg/mL浓度条件下可诱发斑马鱼肝脏毒性出现肝脏面积增加、肝脏变性和卵黄囊吸收延迟等,其肝毒性主要与诱导免疫损伤及影响肝脏代谢有关。牛黄解毒片中雄黄含砷对肝脏产生毒性,在14.3 mg/mL、43 mg/mL和49.1 mg/mL浓度条件下可诱发斑马鱼肝萎缩和卵黄囊吸收延迟,但不引起肝变性。因此斑马鱼模型可作为广泛筛选中药肝毒性、鉴定肝毒性成分及基于全动物模型的肝毒性机制研究。

2.3 神经毒性研究

神经毒性是中药治疗心血管疾病的常见副作用。斑马鱼具有敏感的脑神经系统,其头部整体组织与脊椎动物相似,神经递质系统具有相似功能,血脑屏障结

构与哺乳动物相似^[13]。斑马鱼具有学习、睡眠-觉醒、药物成瘾等神经行为表型特征,这些与人类具有相似性。通过斑马鱼行为仪可以多样本地检测斑马鱼幼鱼的运动速度、运动轨迹、光暗反应、社交行为等特征,反映出类似抑郁、注意缺陷多动障碍、癫痫、帕金森等疾病特点。利用斑马鱼胚胎透明的特点及多种神经元特异的转基因鱼也可反映出药物处理对多种神经元的动态影响。

氰苷(cyanoside)存在于蔷薇科种子、高粱属、野豌豆属、菜豆、木薯中,具有抗氧化、免疫调节和保护心血管的作用。但氰苷具有神经毒性,药物处理后会呈现活动能力减弱、懒动、抽搐等症状,甚至死亡。长春新碱(Vincristine)是夹竹桃科植物长春花中提取出的生物碱,因抗肿瘤作用良好,其制剂已作为临床抗肿瘤药物。胡占英等^[14]采用表型观察、触及逃避、幼鱼的自主运动、强光刺激惊恐反射能力等实验及RT-PCR、整体免疫荧光等手段研究了长春新碱对斑马鱼神经发育和行为的影响,发现长春新碱具有幼体神经毒性,能引起幼鱼呈浓度依赖性的侧卧体位,降低常规转弯能力,干扰运动轨迹,降低平均运动速度,增加不活跃运动的持续时间,在高剂量(30 μg/mL、40 μg/mL)组中,幼鱼被刺激后应激反应能力和学习记忆能力下降,且呈浓度依赖性,主要原因是具有多巴胺能神经元毒性,导致下丘脑多巴胺能神经元细胞丢失。鱼藤酮(rotenone)存在于地瓜子、苦檀子、昆明鸡血藤根中,可用作农用杀虫剂。Wang等^[15]使用2 μg/L鱼藤酮处理5—7个月的野生型雄性斑马鱼4周后发现,实验组相比于对照组在游动距离和时间上减少70%,表现出抑郁、焦虑样行为。对比测量实验组和对照组斑马鱼的几种神经递质水平发现,实验组的多巴胺水平明显下降,经过鱼藤酮处理的斑马鱼成为一种帕金森病的疾病模型。槐果碱(sophocarpine)与苦参碱(Matrine)是苦参的两个主要活性成分,具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤和抗心律失常作用,但其也被证实具有神经毒性。Lu等^[16]发现以不同浓度的苦参碱(12.5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L和100 mg/L)或槐果碱(7.5 mg/L、15 mg/L、30 mg/L和60 mg/L)溶液处理斑马鱼胚胎,两种药物对斑马鱼胚胎均表现为尾部左右收缩频率的改变,游动时间、距离、速度均有所下降,表明这两种中药单体对于斑马鱼胚胎具有神经毒性。

研究认为,神经毒性中药主要通过诱导氧化应激影响离子通道、能量代谢及促发炎症等方式导致神经毒性的产生。何海等^[17]认为,药物发挥作用的靶标不同,其神经毒性所攻击的位点亦不同,其中神经细胞、髓鞘细胞、轴索和神经递质系统是最常见的靶标。但现存的中药神经毒性检测研究较少,而斑马鱼模型是研究该毒性的良好模型。

2.4 发育毒性研究

中药在怀孕期间及青少年儿童使用禁忌多以临床

经验为主,缺乏严谨的系统研究。斑马鱼体外发育及胚胎透明的特点十分适合进行发育毒理学研究。在斑马鱼胚胎发育阶段加入化合物,一段时间后检测其发育状态、出膜时间、胚胎畸形率、胎动、体长、眼睛面积、畸形特点等特征,可判断药物对斑马鱼胚胎是否具有发育毒性。

五味子乙素(Schisandrin B)是五味子的主要活性成分之一。五味子是一种具有数千年历史的中药,用于治疗一些神经行为障碍,包括失眠和烦躁不安。实验研究证实,五味子乙素具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤特性。Nieoczym等^[18]报道了五味子乙素在斑马鱼中具有抗惊厥作用,但伴有严重的发育毒性,如鱼鳃未膨胀、卵黄囊异常、心脏水肿、肝脏周围出血,在96 hpf时,鱼体弯曲且色素沉着。橙皮素(Hesperetin)是橙子、葡萄柚、西红柿和樱桃中富含的一种黄酮类化合物,通过影响MAPK信号通路而具有抗炎、抗氧化、抗癌、神经保护作用。Rajasekar^[19]报道了橙皮素会引起斑马鱼卵黄囊水肿、心跳缓慢、尾巴上翘、心包水肿、体轴弯曲、心腔膨大等毒性。指甲花醌(Lawsone)是散沫花叶子、果实及种子中的一种红橙色的染料分子,指甲花醌与蛋白质有很好的亲和力,常被用作皮肤、头发、指甲、皮革、丝与羊毛的染料使用,具有杀霉菌、止血及治疗灰指甲的功效。Bangeppagari等^[7]报道了200 μM指甲花醌会降低斑马鱼胚胎的出膜率,且死亡率增加、血液循环缓慢、心包囊水肿、卵黄囊水肿、身体轴异常、扭曲的脊索、尾巴变形、心跳微弱和生长迟缓,表明指甲花醌具有明显的发育毒性。隐丹参酮(Cryptotanshinone)是丹参的一种有效成分,广泛用于临床治疗心血管、脑血管和神经退行性疾病,在亚洲许多国家已有数百年的应用历史。Wang等^[20]报道1 μM隐丹参酮即可造成斑马鱼胚胎心包水肿及生长迟缓、出膜率减慢、活动量降低,5 μM隐丹参酮导致斑马鱼凋亡细胞增多,表明隐丹参酮的发育毒性较大。

3 讨论

根据文献搜索可知,目前对中药单体的毒性研究较为匮乏,多数的毒性研究来自临床治疗。为了提高中药在现代临床治疗中的应用,拓展中药新的配方,需使用模式动物对中药有效成分即中药单体进行毒性研究。斑马鱼具有与人类基因同源性高、实验成本低、周期短、容易实现高通量毒性筛选、在动物伦理角度考虑更易实施等特点,是建立中药安全性评价技术的理想模型,在毒性成分筛选配伍降毒、药物研制降毒、毒性作用机制等方面也有应用,为利用动物模型评估中药安全性提供了新思路。中药单体有数千个,而对所有的中药单体毒性进行系统性、大批量分析的文献较少,未来可通过斑马鱼进行大规模的中药单体毒性检测,建立每种中药单体的半致死浓度、致畸特点、毒性靶器官等数据库,通过不同的靶点、信号通路、不同中药单

体所属类别分析找出影响靶器官毒性的普适规律,这对中药单体的科学性评价具有重要意义。

参考文献:

[1] Gunnarsson L, Jauhainen A, Kristiansson E, et al. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(15): 5807-5813.

[2] 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.

[3] Zakaria ZZ, Benslimane FM, Nasrallah GK, et al. Using zebrafish for investigating the molecular mechanisms of drug-induced cardiotoxicity[J]. *Biomed Research International*, 2018, 2018: 1642684.

[4] Yelon D, Stainier DY. Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 1999, 10(01): 93-98.

[5] Yang W, Ma L, Li S, et al. Evaluation of the cardiotoxicity of evodiamine in vitro and in vivo[J]. *Molecules*, 2017, 22(06): 943.

[6] Du ZC, Xia ZS, Zhang MZ, et al. Sub-lethal camphor exposure triggers oxidative stress, cardiotoxicity, and cardiac physiology alterations in zebrafish embryos[J]. *Cardiovascular Toxicology*, 2021, 21(11): 901-913.

[7] Manjunatha B, Weibing P, Keechun L, et al. The effects of henna (hair dye) on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(17): 10361-10367.

[8] Draut H, Rehm T, Begemann G, et al. Antiangiogenic and toxic effects of genistein, usnic acid, and their copper complexes in zebrafish embryos at different developmental stages [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2017, 14(03): 302.

[9] 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.

[10] Quan Y, Gong L, He J, et al. Aloe emodin induces hepatotoxicity by activating NF-kappaB inflammatory pathway and P53 apoptosis pathway in zebrafish[J]. *Toxicology Letters*, 2019, 306: 66-79.

[11] 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 & Experimental Toxicology*, 2019, 38(01): 36-44.

[12] 郭胜亚, 戴明珠, 周佳丽, 等. 壮骨关节丸对斑马鱼肝毒性评价及其毒性机制研究[C]. 中国毒理学会中药与天然药物毒理与安全性评价第四次(2019年)学术年会, 2019, 228-229.

[13] 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, 2020.

[14] 胡占英, 张靖溥. 长春新碱对斑马鱼神经发育和行为的影响[J]. *毒理学杂志*, 2014, 28(02): 98-103.

[15] Wang Y, Liu W, Yang J, et al. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish[J]. *Neurotoxicology*, 2017, 58: 103-109.

[16] Lu ZG, Li MH, Wang JS, et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae [J]. *Reproductive Toxicology*, 2014, 47: 33-41.

[17] 何海, 赵沙沙, 邢耀莹, 等. 中药致神经毒性的物质基础与作用机制研究进展[J]. *中国药房*, 2023, 34(02): 251-256.

[18] Nieoczym D, Banono NS, Stepnik K, et al. In silico analysis, anticonvulsant activity, and toxicity evaluation of schisandrin b in zebrafish larvae and mice [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(16): 1103-1110.

[19] Rajasekar M. Synthesis and characterization of hesperetin derivatives and toxicity level of the zebrafish model [J]. *Heliyon*, 2021, 7(01): 6066.

[20] Wang C, Wang T, Lian BW, et al. Developmental toxicity of cryptotanshinone on the early-life stage of zebrafish development [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2021, 40(Suppl. 12): 278-289.

(上接第 122 页)

矩,最大正弯矩距桩顶约 0.5 m,单宽弯矩为 12.4 kN·m/m。最大负弯矩距墙顶约 1.4 m,单宽弯矩为 -4.1 kN·m/m。弯矩分布见图 2。护岸土层剪应力为 6 kPa ~ 12 kPa,剪应力不大,说明护岸整体稳定性良好。

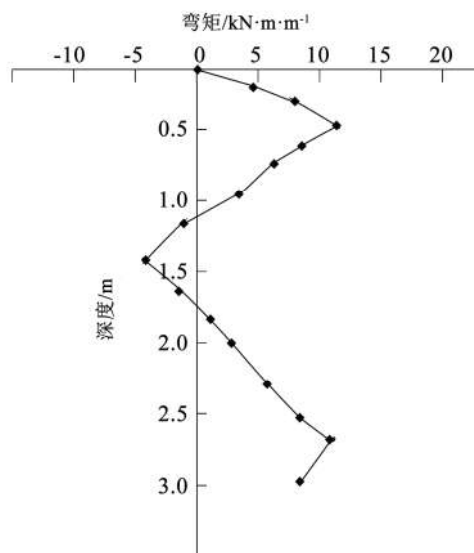


图 2 塑钢板桩弯矩分布

Fig. 2 Distribution of bending moment of plastic sheet pile

4 结束语

在小流域河道综合治理中,塑钢板桩护岸要比插板桩护岸及生态仿木桩施工效率高,质量、安全性、环保性更有保障。但塑钢板桩护岸施工对技术有着较高要求,为了保障施工达到预期效果,需根据塑钢板桩设计要求严格规范施工过程,针对实际施工中遇到的问题及时采取有效措施进行改进及优化,保障塑钢板桩护岸高效优质,为小流域河道综合治理提供保障。

参考文献:

[1] 顾靖超,周跃华,陆立国,等. 高强度塑钢板桩在黄河护岸工程中的应用[J]. *人民黄河*, 2019, 41(11): 22-25, 64.

[2] 沈旭鸿. 钢板桩在内河航道护岸工程中的应用[J]. *中国水运*, 2021(10): 136-138.

[3] 沈旭鸿. 平原地区内河航道钢板桩护岸结构适用性分析[J]. *中国水运*, 2021(09): 97-99.

[4] 张家得. 塑钢板桩在河道整治工程中的应用分析[J]. *城市道桥与防洪*, 2023(06): 131-134, 150, 19-20.

[5] 李钰. 塑钢板桩在河流沟道治理中的设计应用[J]. *工程机械与维修*, 2023(06): 64-66.