

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.23.001

白及主要活性成分 Militarine 对斑马鱼胚胎发育的安全性评价*

陈浩, 刘慧, 郑林, 李月婷, 李勇军, 巩仔鹏, 黄勇, 刘丽娜[△]

(贵州医科大学·贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室·民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 探讨白及主要活性成分 Militarine 对斑马鱼胚胎发育的影响。方法 以受精后小时(hpf)为时间段,将6 hpf的胚胎暴露在不同质量浓度(0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.800, 1.600, 3.200 g/L) Militarine 溶液中,且设置空白对照组,24 h 更换1次药液。分别于24, 48, 72, 96, 144 hpf 时通过显微镜观察斑马鱼胚胎的发育形态,测定24 hpf 胚胎尾部自主抽动频率,48 hpf 心率,48, 72, 96 hpf 孵化率,72, 96, 144 hpf 死亡率和畸形率。结果 除质量浓度为0.025, 0.050, 0.100 g/L 溶液中孵育的胚胎外,其余质量浓度溶液中孵育的胚胎24 hpf 尾部抽动数与空白对照组比较有显著差异($P < 0.05$),且随着质量浓度的增加,斑马鱼胚胎的尾部自主抽动次数减少;除质量浓度为0.025 g/L 和 0.05 g/L 溶液中孵育的胚胎外,其余质量浓度孵育的胚胎与空白对照组比较有显著差异($P < 0.01$),且随着质量浓度的增加,斑马鱼胚胎的心率变缓;各浓度组胚胎孵化率在不同时间段呈现不同趋势,中间浓度组胚胎的孵化率较高,与空白对照组比较有明显差异($P < 0.05$);斑马鱼胚胎的死亡率和畸形率均随时间的延长和浓度的增大而逐渐增大。结论 初步评价了白及有效成分 Militarine 对斑马鱼胚胎发育的安全性,为其创新药物研制和临床安全用药提供了参考。

关键词: 白及; Militarine; 斑马鱼; 胚胎发育; 安全性评价

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)23-0001-04

Safety Evaluation of *Bletilla Striata* and Its Main Active Ingredient Militarine on the Development of Zebrafish Embryo

CHEN Hao, LIU Hui, ZHENG Lin, LI Yueting, LI Yongjun, GONG Zipeng, HUANG Yong, LIU Lina

(Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM <Ministry of Education>, Guizhou Medicine University, Guiyang, Guizhou, China 550004)

Abstract: Objective To investigate the effects of *Bletilla striata* and its main active ingredient Militarine on the development of zebrafish embryo. **Methods** The hours post-fertilization(hpf) was taken as the time period, six hpf embryos were exposed to different concentrations(0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.800, 1.600, 3.200 g/L) in Militarine solution and a blank control group was set up, and the solution was changed once every 24 h. The development morphology of zebrafish embryo was observed by microscope at 24, 48, 72, 96 and 144 hpf points, and the spontaneous twitch frequency of 24 hpf embryos, 48 hpf heart rate, 48, 72, 96 hpf hatching rate, 72, 96, 144 hpf mortality and deformity rate were measured. **Results** Except for the embryos incubated at concentrations of 0.025, 0.050, 0.100 g/L, the 24 hpf tail twitches of the embryos incubated at the same concentration were significantly different from those in the blank control group, and the tail twitches of embryos autonomously decreased with the increase of the concentration. Except for the embryos incubated at concentrations of 0.025 and 0.050 g/L, the embryos incubated at the same concentration were significantly different from those in the blank control group($P < 0.01$), and the heart rate of zebrafish embryos slowed down with the increase of the concentration. The hatching rate of embryos in each concentration group showed different trends in different time periods, and the hatching rate of embryos in the middle concentration group was higher, which was significantly different from that in the blank control group($P < 0.05$). The mortality and deformity rate of zebrafish embryo increased with the increase of time and concentration($P < 0.01$). **Conclusion** The safety of active ingredient Militarine of *Bletilla striata* on the development of zebrafish embryo is preliminarily evaluated, which can provide a certain experimental basis for the development of innovative drugs and clinical safety drugs.

Key words: *Bletilla striata*; Militarine; zebrafish; embryonic development; safety evaluation

白及为兰科植物白及 *Bletilla striata*(Thunb.) Reiehb. f. 的干燥块茎,又名连及草、紫兰等,最早见于《神农本草经》,1963年后收藏于各个版本的《中药药典》,野生品主产于贵州、四川等地^[1]。白及具有收敛止

血、消肿生肌之功效,临床主治咯血、吐血、肺结核咳血、外伤出血、溃疡疼痛、汤火灼伤、皮肤皲裂和疮疡肿毒等,疗效显著^[2]。Militarine 为白及中含量较高的活性成分,在白及药材中的含量为 1.45%~3.32%^[3]。Mili-

*基金项目:国家自然科学基金[U1812403/81460630];贵州省科技计划项目[黔科合平台人才[2019]5641,黔科合平台人才[2017]5601];贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划[黔教合 KY[2018]050];贵阳市科技计划项目[筑科合同[2017]30-29]。

第一作者:陈浩,男,硕士研究生,研究方向为中药药代动力学及药物新剂型、新技术,(电子信箱)ch627715822@126.com。

[△]通信作者:刘丽娜,女,副教授,研究方向为中药活性物质基础及药代动力学与药物新剂型、新技术,(电子信箱)mailofzl@126.com。

tarine 能改善慢性脑缺血大鼠的认知功能障碍,减轻脑白质缺血性损伤,舒张血管^[4]。模式生物斑马鱼近年来成为药物评价和毒性筛选的首选模型^[5-6]。作为一种脊椎动物模型,斑马鱼与人类基因相似度高达 87%^[7-8],且具有完整的组织器官,其胚胎及幼鱼对大多数药物的反应与人类临床反应相似^[9-10]。斑马鱼胚胎在母体外发育,发育时间短,数量大,早期胚胎透明,可直接在显微镜下观察各组织脏器的形态变化及血液流动情况,能极大地弥补体内试验与体外试验之间的间隙^[11]。本研究中选择以斑马鱼胚胎为模型,研究白及主要活性成分 Militarine 对斑马鱼胚胎发育的毒性作用,为 Militarine 的创新药物研发、临床安全用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:奥林巴斯 CX41RF 型电子显微镜(奥林巴斯株式会社);DH6000B II 型电热恒温培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司);AE240 电子天平(十万分之一,梅特勒-托利多仪器上海有限公司);超纯水机(四川沃特科技发展有限公司);超声波清洗器(功率为 250W,频率为 27~34 kHz,北京医疗设备二厂);微量移液器(德国 Eppendorf 股份公司)。

试剂与动物:Militarine 对照品(批号为 ps171128-04,含量≥98%,成都普思生物科技股份有限公司);德国 Tübingen 野生型斑马鱼胚胎,由贵州医科大学基础医学院斑马鱼平台提供。

1.2 方法

1.2.1 溶液制备

Militarine 贮备液:称取 Militarine 适量,溶于斑马鱼培养液(0.06 g/L 海盐、亚甲基蓝)中,超声溶解,配成 5 g/L 的贮备液,置 4℃ 冰箱中储存。

Militarine 样品溶液:根据预试验结果,用培养液将贮备液稀释至 0.025,0.050,0.100,0.200,0.400,0.800,1.600,3.200 g/L,作为 Militarine 溶液组。

Militarine 样品溶液处理斑马鱼胚胎:除去未受精卵、粪便、死胎等杂物,置 28℃ 恒温培养箱中孵育至受精后 6 h,选取正常发育的胚胎,转入含有 2.5 mL 不同质量浓度(0.025,0.050,0.100,0.200,0.400,0.800,1.600,3.200 g/L)的 Militarine 溶液(12 孔板),每孔分别放入 24 枚受精卵,每个质量浓度设置 3 个平行组且设空白对照组。将挑选好的胚胎放入 28℃ 恒温培养箱中培养,每隔 24 h 更换 1 次溶液,试验过程中应及时将死亡的胚胎挑出,以防对其余胚胎产生影响。

1.2.2 检测指标

Militarine 对斑马鱼胚胎发育的影响:以斑马鱼胚胎培养液中发育的胚胎为空白对照组,通过电子显微镜

分别于 24,48,72,96,144 受精后小时(hpf)时间点观察各胚胎的形态变化与发育情况,并详细记录,统计不同时间终点的死亡数、畸形数,并拍照记录状态。

斑马鱼胚胎 48 hpf 心率^[12]:记录 48 hpf 胚胎 10 s 内心率,每一质量浓度下随机取 6 枚胚胎进行统计。

斑马鱼胚胎孵化率^[12]:分别选择 48,72,96 hpf 统计胚胎的孵化率。统计应用 Militarine 后斑马鱼胚胎的孵化率。孵化率(%) = 每孔已孵化胚胎/每孔总胚胎个数 × 100%。

斑马鱼死亡率和畸形率^[13]:分别于 72,96,144 hpf 时统计胚胎的畸形和死亡情况。畸形率(%) = (畸形数 + 死亡数)/胚胎总数 × 100%,死亡率(%) = 死亡数/胚胎总数 × 100%。

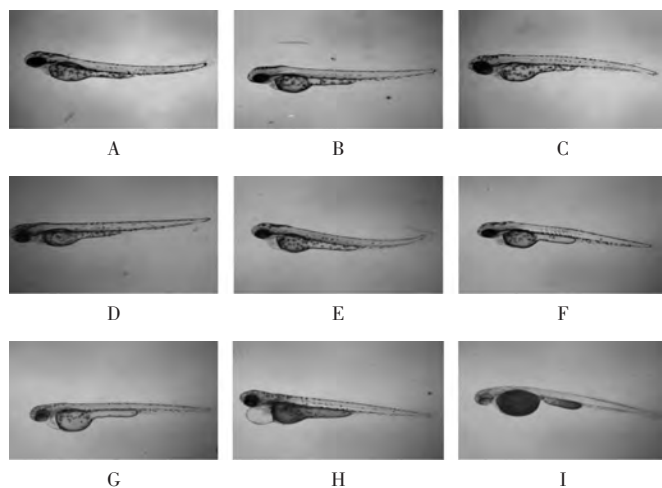
1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析。试验结果用 $\bar{X} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对斑马鱼胚胎发育的影响

6 hpf 开始用含不同质量浓度的 Militarine 溶液孵育斑马鱼胚胎后,观察了 24~144 hpf 期间 5 个时间点不同质量浓度 Militarine 溶液组及空白对照组斑马鱼胚胎不同发育阶段的形态变化。Militarine 各组斑马鱼胚胎出现不同程度的畸形。同一时间点,剂量越大畸形情况越严重;同一浓度下,随着时间的延长畸形情况越严重。畸形主要表现为心包囊水肿、尾部和脊柱弯曲、卵黄囊水肿及色素沉积、头部和眼部发育不良。Militarine 对斑马鱼胚胎 72 hpf 形态发育的影响见图 1。



A. 空白对照组 B~I. Militarine 溶液组(0.025,0.050,0.100,0.200,0.400,0.800,1.600,3.200 g/L)

图 1 Militarine 对斑马鱼胚胎 72 hpf 形态发育的影响

2.2 对斑马鱼胚胎检测指标的影响

结果见表 1。随着溶液浓度的增加,斑马鱼胚胎

的尾部自主抽动次数越少,在 Militarine 质量浓度为 3.2 g/L 组中,斑马鱼胚胎未出现尾部自主抽动情况。随着质量浓度的增加,斑马鱼胚胎的心率变缓。

表 1 Militarine 对斑马鱼胚胎检测指标的影响($\bar{X} \pm s, n=6$)

质量浓度 (g/L)	24 hpf 尾部自主 抽动次数(次/分)	48 hpf 心率 (次/10 s)	孵化率(%)		
			48 hpf	72 hpf	96 hpf
0(空白对照组)	14.67±1.21	13.67±0.52	5.56±2.44	62.50±4.17	98.61±2.41
0.025	14.00±0.89	12.67±1.03	9.72±2.41	63.89±8.67	97.22±2.41
0.050	13.17±1.17	12.00±1.41	13.89±2.41*	72.22±6.37*	94.44±6.36
0.100	12.33±0.82	9.17±0.75**	26.39±6.37**	76.39±2.41**	97.22±2.41
0.200	11.00±1.41*	8.67±0.52**	34.72±4.81**	80.56±6.36**	91.67±4.17
0.400	9.50±0.55**	8.00±0.89**	26.39±2.41**	75.00±4.17*	83.33±8.33**
0.800	9.17±1.17**	7.67±1.03**	22.22±6.37**	69.44±6.36	79.17±4.17**
1.600	5.67±1.03**	7.33±0.82**	12.50±4.17	61.11±4.81	75.00±8.33**
3.200	0.00±0.00**	5.67±1.03**	6.94±2.40	51.39±2.41*	65.28±6.36**

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。表 2 同。

2.3 对斑马鱼胚胎不同时间段死亡率和畸形率的影响 结果见表 2。

表 2 Militarine 对斑马鱼胚胎死亡率和畸形率的影响
($\bar{X} \pm s, \%, n=3$)

质量浓度 (g/L)	死亡率			畸形率		
	72 hpf	96 hpf	144 hpf	72 hpf	96 hpf	144 hpf
0(空白对照组)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
0.025	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	6.94±2.40**	34.72±2.41**	52.78±6.37**
0.050	0.00±0.00	8.33±4.17**	11.11±2.41**	13.89±2.41**	50.00±4.17**	75.00±4.17**
0.100	5.56±2.40**	13.89±2.41**	16.67±4.17**	26.42±4.84**	63.89±6.36**	88.89±2.41**
0.200	9.72±2.41**	25.00±4.17**	30.56±2.41**	48.61±2.41**	77.78±2.41**	100.00±0.00**
0.400	23.64±4.81**	38.89±4.81**	65.28±4.81**	59.72±6.37**	81.94±6.36**	100.00±0.00**
0.800	37.50±4.17**	59.72±4.17**	98.61±4.17**	100.00±0.00**	100.00±0.00**	100.00±0.00**
1.600	63.89±4.81**	83.22±7.22**	100.00±0.00**	100.00±0.00**	100.00±0.00**	100.00±0.00**
3.200	73.61±8.76**	100.00±0.00**	100.00±0.00**	100.00±0.00**	100.00±0.00**	100.00±0.00**

3 讨论

斑马鱼早期胚胎透明,在显微镜下可清晰观察整体动物多个主要器官的发育情况^[14],具备整体评价药效学及药动学、代谢活性等优势,斑马鱼生物模型便于检测分析中药毒性^[15]。

本研究结果表明,在 24 hpf 前,Militarine 溶液组胚胎发育在形态上与空白对照组比较无明显差异,但随着时间的推移,除质量浓度为 0.025,0.050,0.100 g/L 外,其他质量浓度组胚胎的尾部自主抽动次数与空白对照组比较有明显差异($P<0.05$)。自主抽动是斑马鱼胚胎最初的运动特征,主要由脊柱运动神经元支配肌肉系统而发生^[16]。随着质量浓度的增加,斑马鱼胚胎的尾部自主抽动次数越少。在 Militarine 浓度 3.2 g/L 组中,斑马鱼胚胎未出现尾部自主抽动情况,表明在 24 hpf 时 Militarine 对斑马鱼胚胎脊柱神经系统或运动系统造成了一定影响。

心脏是胚胎发育过程中最早发育并发挥功能的器

官,心率是体现心脏功能的一个重要指标,胚胎发育 48 h 后心率基本趋于稳定^[17-18]。故选择在此时测定其心率。结果表明,Militarine 能使斑马鱼胚胎的心率明显降低,且质量浓度越高,心率降低越明显,说明高质量浓度的 Militarine 溶液会对胚胎发育产生心脏毒性。

孵化率是斑马鱼胚胎毒性评价的重要指标。本研究结果显示,48 hpf 时,Militarine 各质量浓度组能促进胚胎出膜;72 hpf 时,0.050,0.100,0.200,0.400 g/L 质量浓度能促进斑马鱼胚胎出膜,3.2 g/L 质量浓度能抑制斑马鱼胚胎出膜;96 hpf 时,0.400,0.800,1.600,3.200 g/L 质量浓度能抑制斑马鱼胚胎出膜。给药后,斑马鱼胚胎中质量浓度出膜较快可能是由于胚胎神经受到药物的影响,产生兴奋行为,较空白对照组出膜快,而高质量浓度由于浓度过高,神经由兴奋变为抑制,因而出现出膜延迟或不出膜现象^[19]。

结果表明,在同一时间点,随着给药质量浓度的增加(除 0.025 g/L 和 0.05 g/L 在 72 hpf 时未出现死亡),斑马鱼胚胎的死亡率和畸形率逐渐增加,与空白对照组比较有显著差异($P<0.01$);在同一质量浓度,随着给药时间的延长(除 0.025 g/L 未出现死亡),斑马鱼胚胎的死亡率和畸形率逐渐增加,与空白对照组比较具有显著差异($P<0.01$)。1.600 g/L,3.200 g/L 的斑马鱼胚胎在 72 hpf 出现心包水肿、色素沉积,且随着时间的延长和浓度的增大,胚胎死亡率和畸形率呈现递增趋势,表明死亡和畸形情况与给药时间和给药浓度均相关。

综上所述,Militarine 溶液的浓度对斑马鱼胚胎发育的毒性存在量效关系,其作用时间长短对胚胎发育毒性也存在明显的剂量效应,高浓度(1.600 g/L 和 3.200 g/L)Militarine 溶液对斑马鱼胚胎发育影响显著,主要表现在使神经、系统损害、心脏组织发育异常,生理上的运动功能丧失。虽然斑马鱼胚胎及幼鱼对大多数药物反应与人类临床反应相似^[20],通过该试验能为以后临床用药提供初步的数据参考,后续研究中将会用不同种属的动物对 Militarine 的安全性进行全面的系统研究。

参考文献:

- [1] 饶文龙,张浩,张熹玮,等.白及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2015,49(8):91-93.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010:95.
- [3] 何迅,王爱民,李勇军,等.HPLC 测定白及中 militarine 含量[J].中国中药杂志,2009,34(16):2076-2078.
- [4] 王耀,赵香玉,李新娅,等.Militarine 改善慢性脑缺血大鼠认知功能障碍及白质损伤的研究[J].药理学通报,2016,51(5):738-742.
- [5] 许冰洁,张立江,李春启,等.斑马鱼胚胎评价 5 种药物的发育毒性与模型验证[J].中国药理学通报,2016,32(1):74-79.