

本文引用:吴梦华,董建勇.斑马鱼胚胎急性毒性实验法检测赶山鞭化学成分胚胎发育毒副作用[J].湖南中医药大学学报,2017,37(6):602-605.

斑马鱼胚胎急性毒性实验法检测赶山鞭化学成分 胚胎发育毒副作用

吴梦华¹,董建勇^{2*}

(1.浙江大学医学院附属儿童医院,浙江 杭州 310000;2.温州医科大学,浙江 温州 325000)

[摘要] 目的 利用斑马鱼胚胎急性毒性实验检测赶山鞭化学成分胚胎发育毒副作用。方法 以孵育6 h的斑马鱼胚胎为实验模型,设DMSO对照组和quercetin, rutin, hyperin, quercetin-3-O- α -L-arabinofuranoside, quercetin-3-O- β -D-glucoside五种赶山鞭单体化合物样品组,观察记录72 hpf(受精后72小时)时的致死率、致畸率、孵化率。结果 72 hpf,在各浓度梯度范围内,5种化合物对斑马鱼胚胎致死致畸抑制孵化效应明显($P < 0.05$),高浓度时愈加明显($P < 0.01$),且呈现一定的剂量依赖效应。畸形类型主要为心房囊水肿、体节弯曲。结论 上述5种化合物可能对胚胎发育有一定的毒性。

[关键词] 赶山鞭;斑马鱼胚胎;急性毒性

[中图分类号] R285.5;R994.39

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.06.006

Toxic and Side Effects of Chemical Constituents from *Hypericum attenuatum* on Embryonic Development of Zebrafish

WU Menghua¹, DONG Jianyong^{2*}

(1. Children's Hospital Affiliated to Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310000, China;

2. Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[Abstract] **Objective** To detect the toxic and side effects of chemical components from *Hypericum attenuatum* on embryonic development of zebrafish by acute toxicity test. **Methods** The 6 h post-fertilization zebrafish was used as experimental models, randomly divided into the control group with DMSO and the sample groups with quercetin, rutin, hyperin, quercetin-3-O- α -L-arabino furanoside, quercetin-3-O- β -D-glucoside of *Hypericum attenuatum*. The mortality, malformation, hatchability at 72 hpf (72 hours after fertilization) were observed. **Results** The five constituents show obvious inhibiting hatchability on embryonic development of zebrafish ($P < 0.05$), which show stronger inhibition at high concentration, with dose-dependent effect. **Conclusion** The five components may have a certain toxicity to embryonic development.

[Keywords] *Hypericum attenuatum*; embryos of zebrafish; acute toxicity

赶山鞭系藤黄科金丝桃属植物 *Hypericum attenuatum* 的全草。该属植物在我国分布广泛,有抑制血管、抗抑郁、抗病毒等药理作用^[1],有光敏性皮炎、眩晕、疲乏等毒副作用^[1]。关于该属植物的有效活性成分研究较多,但是关于其导致毒副作用的化学成分研究较少。传统毒理学研究多数是以小鼠为模型评估药物毒性^[2],但成本高、周期长、结果不易观察。近年来,因斑马鱼与人类各器官系统极其相似^[3]、周期短、胚胎透明易观察、对毒性物质反应灵敏^[4]等优

点,逐渐作为新模型应用于药物毒性评价^[5],本文通过对斑马鱼胚胎的急性毒性观察,初步检测赶山鞭导致胚胎发育毒副作用的化学成分。

1 材料与方法

1.1 实验动物

斑马鱼(无病原体 AB 品系,由美国 Oregon 州立大学提供),饲养在专用的循环系统中,水温 28 ℃,鱼室光周期设定为 14 h 光/10 h 暗。早晚各

[收稿日期] 2016-10-25

[作者简介] 吴梦华,男,药师,硕士,研究方向:中药活性成分提取。

[通讯作者] *董建勇,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:491195878@qq.com。

一次饲喂丰年虫(*Artemien*, *Salina*),中午辅以商品鱼饲料。实验前挑选健康性成熟的斑马鱼放入孵化箱中,每个孵化罐中的雌雄比例保持为2:1,次日亮灯后半个小时即可收集胚胎。使用系统水将胚胎冲洗干净,弃掉成鱼粪便等杂质,以及未受精和发育不良的胚胎(呈白色不透明状)。将剩余胚胎置于培养皿中加入胚胎培养液,放入28℃、光周期14h光/10h暗的光照培养箱中培养。

1.2 药品与试剂

赶山鞭(甘肃宕昌县,样本保存在浙南特色中药重点实验室);quercetin(化合物1),rutin(化合物2),hyperin(化合物3),quercetin-3-O- α -L-arabinofuranoside(化合物4),quercetin-3-O- β -D-glucoside(化合物5)(均从赶山鞭中分离得到,经温州医科大学药学院董建勇教授鉴定)。

胚胎培养液(称取0.8g NaCl、0.04g KCl、0.00358g Na₂HPO₄、0.006g KH₂PO₄、0.144g CaCl₂、0.246g MgSO₄·7H₂O、0.35g NaHCO₃、800mL超纯水置于1L烧杯中,搅拌至完全溶解,再用超纯水定容至1L,滴加1M NaOH调pH至7.2)。化合物母液配制见表1。

表1 化合物母液配制及浓度

试剂	分子量(g/mol)	称取量(mg)	DMSO(mL)	浓度(mg/mL)
化合物1	610	64	4	16
化合物2	302	64	4	16
化合物3	464	128	4	32
化合物4	434	128	4	32
化合物5	464	128	4	32

1.3 主要仪器

全封闭斑马鱼循环系统(AHAB),体式显微镜(Nikon SMZ 1500),光照恒温培养箱(RXZ智能型,宁波江南仪器厂)。

1.4 胚胎急性毒性实验^[6]

通过预实验设定浓度梯度:化合物1~2为0、1、2、4、8、16 μ g/ μ L;化合物3~5为:0、1、2、4、8、16、32 μ g/ μ L。同时设DMSO对照组。配制化合物工作液:取最高浓度化合物母液,边振荡边加入胚胎培养液中,稀释1000倍,配制成最高浓度工作液,溶液中DMSO浓度为0.1%;低浓度工作液用高浓度工作液逐级稀释。将DMSO边振荡边加入胚胎培养液中,配制含0.1% DMSO的对照溶液。各溶液于实验

前现配现用。挑选胚胎:收集胚胎6h左右,在体式显微镜下从收集到的胚胎中挑选发育正常、已进入半包期的受精胚胎。暴毒:取96孔培养板,DMSO组每孔加入200 μ L胚胎培养液,占16个孔。各实验组分别加入200 μ L不同浓度的工作液,每个浓度的溶液均占16个孔,将挑选出来的胚胎随机放入96孔培养板中,每孔1枚胚胎。将培养板放回光照培养箱培养,不能叠放,以防各组胚胎发育不均衡。实验重复3次。观察:分别在胚胎受精后24、48、72、96h时,于体式显微镜下进行观察、记录各组胚胎孵化、畸形、死亡等状况,并使用CCD拍照。畸形:心房囊水肿,卵黄囊水肿,下颌异常,体节异常,尾部形态异常,黑色素细胞形成异常,心跳缓慢,活动能力差等与正常斑马鱼明显不同的发育状态。死亡:15s内没有观察到心跳,即判定为死亡。孵化率=(胚胎孵化数/胚胎原数) \times 100%;死亡率=1-(胚胎死亡个数/胚胎原数) \times 100%;畸形率=(胚胎畸形个数/胚胎原数) \times 100%+死亡率。

1.5 统计学分析^[6]

使用SPSS 22.0软件通过one-way ANOVA对不同处理组数据进行统计分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,使用origin 8.0软件进行非线性拟合计算LC₅₀值。

2 结果

2.1 各化合物对斑马鱼胚胎生长发育的影响

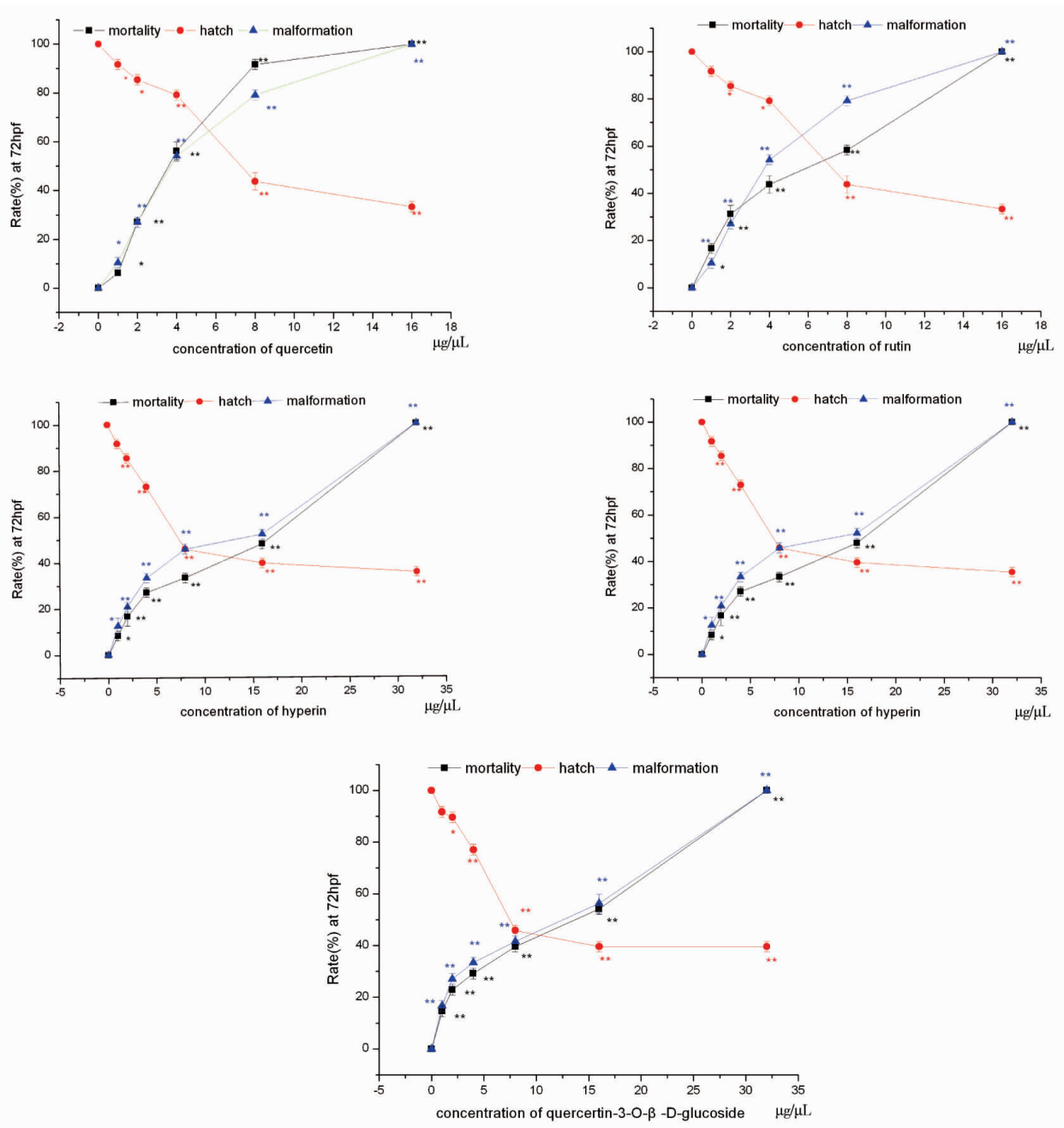
选取胚胎受精72 hpf的实验结果进行分析,从图1结合表2可以看出:空白和DMSO对照组胚胎孵化、畸形和死亡率无差异($P>0.05$)。在浓度梯度范围内,五种化合物对斑马鱼胚胎致死致畸抑制孵化效应明显($P<0.05$),随着浓度递增,致死致畸抑制孵化效应愈加明显($P<0.01$),呈现良好的剂量效应。

2.2 各个化合物的LC₅₀值

化合物1~5 LC₅₀值大小分别为:4.14、6.07、15.08、13.61、13.37 μ g/ μ L。

2.3 化合物的胚胎畸形类型

高浓度(8~16 μ g/ μ L)样品对胚胎的72 hpf致死率较高,畸形率主要来源于死亡率,存活下来的幼鱼中畸形个体少。低浓度(1~4 μ g/ μ L)样品对胚胎致死率不高,存活下来的幼鱼畸形类型主要有心房囊水肿和体节弯曲,参见图2^[7]。



注：与对照组比较：*P<0.05,**P<0.01。

图1 化合物1~5对斑马鱼胚胎的致死率(mortality)、孵化率(hatch)、致畸率(malformation)

表2 5个化合物对斑马鱼胚胎的致死率(mor)、孵化率(hat)、致畸率(mal) ($\bar{x}\pm s, n=3$)

C(μg/μL)	化合物 1(%)			化合物 2(%)			化合物 3(%)		
	mor	hat	mal	mor	hat	mal	mor	hat	mal
0	0.00±0.00	100.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00±0.00	0.00±0.00
1	6.25±0.00*	91.67±3.61*	10.42±3.61**	16.67±3.61**	91.67±6.25	10.42±3.61**	8.33±3.61*	91.67±3.61**	12.50±6.25**
2	27.08±3.61**	85.42±3.61**	27.08±3.61**	31.25±6.25**	85.42±6.25*	27.08±3.61**	16.67±7.22**	85.42±3.61**	20.83±3.61**
4	56.25±6.25**	79.17±3.61**	54.17±3.61**	43.75±6.25**	79.17±6.25**	54.17±12.5**	27.08±3.61**	72.92±3.61**	33.33±3.61**
8	91.67±3.61**	43.75±6.25**	79.17±3.61**	58.33±3.61**	43.75±6.25**	79.17±3.61**	33.33±3.61**	45.83±3.61**	45.83±3.61**
16	100.0±0.00**	33.33±3.61**	100.0±0.00**	100.0±0.00**	33.33±3.61**	100.0±0.00**	47.92±3.61**	39.58±3.61**	52.08±3.61**
32	-	-	-	-	-	-	100.0±0.00**	35.42±3.61**	100.0±0.00**

续表 2 5个化合物对斑马鱼胚胎的致死率(mor)、孵化率(hat)、致畸率(mal) ($\bar{x}\pm s, n=3$)

C($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	化合物 4(%)			化合物 5(%)		
	mor	hat	mal	mor	hat	mal
0	0.00±0.00	100.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00±0.00	0.00±0.00
1	10.42±3.61**	91.67±3.61*	10.42±3.61**	14.58±3.61**	91.67±3.61**	16.67±3.61**
2	20.83±3.61**	89.58±3.61*	22.92±3.61**	22.92±3.61**	89.58±3.61**	27.08±3.61**
4	29.17±3.61**	75.00±6.25**	33.33±3.61**	29.17±3.61**	77.08±3.61**	33.33±3.61**
8	35.42±3.61**	43.75±6.25**	47.92±3.61**	39.58±3.61**	45.83±3.61**	41.67±3.61**
16	54.17±3.61**	39.58±3.61**	54.17±3.61**	54.17±3.61**	39.58±3.61**	56.25±6.25**
32	100.0±0.00**	33.33±3.61**	100.0±0.00**	100.0±0.00**	39.58±3.61**	100.0±0.00**

注:与对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。



图2 各化合物致 AB 品系斑马鱼胚胎 72 hpf 时的主要畸形表型

3 讨论

实验表明 hyperin 在高浓度(16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)时,对斑马鱼胚胎基本致死致畸且显著抑制孵化 ($P<0.01$),据文献报道,hyperin 对胎鼠生长发育有一定影响,建议怀孕妇女慎用^[8]。其它几种化合物均对斑马鱼胚胎致死致畸抑制孵化效应明显,建议怀孕妇女慎用。

据各化合物 LC_{50} ,提示毒副作用:化合物 3<化合物 4<化合物 5<化合物 2<化合物 1。畸形类型有心房囊水肿和脊柱弯曲,前者是心脏血管功能障碍引起^[9],斑马鱼心脏的发育需要细胞增殖、迁移、分化和不同起源的细胞之间的相互作用,与多种基因的表达有关^[10],具体作用机制待进一步研究;斑马鱼体脊柱弯曲可能与胚胎 *sepn1* 基因表达有关^[11],机制待进一步研究。此 5 种化合物均为黄酮类化合物,提示黄酮类化合物可能是造成赶山鞭胚胎发育毒副作用的主要成分。

参考文献:

- [1] 李勇,熊元君,刘军,等.金丝桃属植物的研究进展[J].新疆中医药,2006,24(1):55-56.
- [2] 曾薇,古桂花,李建新,等.槟榔碱的肾毒性实验研究[J].湖南中医药大学学报,2015,35(6):6-8.
- [3] Yan H, Su RB, Gong ZH. Adult zebrafish as a model organism for assessing the effects of hallucinogenic drugs on behaviors[J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(10): 1464-1468.
- [4] 陈亨宇,付爱玲,赵宝金.应用斑马鱼模型评价纳米粒子毒性机制的研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2012,26(2):251-254.
- [5] 端正花,陈晓欧,刘灵丽,等.苯并三唑和镉对斑马鱼肝脏的联合毒性效应[J].中国环境科学,2015,35(6):1872-1876.
- [6] 许冰洁,张立将,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.
- [7] 车宝光. β -双酮类抗生素复合污染对斑马鱼的毒理学研究 [D].温州:温州医学院,2013.
- [8] 艾国,黄正明,王德文,等.金丝桃苷的大鼠胚胎-胎仔发育毒性研究[J].中国中药杂志,2012,37(16):2452-2455.
- [9] 尤宏,吕丽娜,赵雪松,等.几种纳米材料对斑马鱼孵化和致畸效应的影响[J].哈尔滨工业大学学报,2013,45(12):48-52.
- [10] 田丽莉,董建勇,黄长江.莪术醇对斑马鱼胚胎发育的影响[J].温州医学院学报,2010,40(6):557-559+563.
- [11] 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.

(本文编辑 杨瑛)