

基于斑马鱼毒/效同步评价的壮骨关节丸促骨骼发育作用与初步安全性研究

时克^{1,2}, 王茉³, 景莉君², 韦英杰^{1,2*} (1.南京中医药大学第三临床医学院, 南京 210028; 2.江苏省中医药研究院国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 南京 210028; 3.解放军 93318 部队医院, 辽宁 开原 112300)

摘要: 目的 用斑马鱼毒/效同步法评价壮骨关节丸的促骨骼发育作用及初步安全性。方法 将受精后 3 d(3 day post fertilization, 3 dpf)的斑马鱼幼鱼暴露于 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 泼尼松龙(prednisolone, PN), 壮骨关节丸溶液及含 PN 的壮骨关节丸溶液(12.5, 25, 50, 100, 200, 300 和 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)中, 0.5% DMSO 胚胎培养基为空白对照, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 8 dpf, 隔天换一半药液。采用茜素红对 8 dpf 的斑马鱼幼鱼头部骨骼染色, 定量分析骨骼染色区域; 给药期间每天同步观察鱼死亡及脏器中毒情况。结果 在 8 dpf 时, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及以上浓度的壮骨关节丸健康鱼组和含 PN 的壮骨关节丸模型鱼组斑马鱼死亡率>80%, 未进行骨骼染色。壮骨关节丸健康鱼组(12.5, 25, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的斑马鱼头骨矿化面积和累积光密度值 IOD 与 PN 组比较显著增加($P<0.01$ 或 <0.05), 而含 PN 的壮骨关节丸模型鱼组(12.5, 25, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)斑马鱼的头骨矿化面积或 IOD 结果显示阻止 PN 致骨丢失的趋势, 但均低于健康鱼组。给予壮骨关节丸后, PN 模型鱼的死亡速度和死亡率较健康鱼高, 鱼死亡率与给药浓度和时间呈依赖性; PN 模型鱼的 6 dpf 和 8 dpf 半数致死浓度值($63.92, 63.92 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)均低于健康鱼($94.66, 87.84 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。结论 斑马鱼毒/效同步法快速评价了壮骨关节丸对健康鱼和模型鱼的骨骼发育作用及初步安全性。壮骨关节丸对健康鱼和模型鱼的作用及毒性有差别。

关键词: 斑马鱼; 壮骨关节丸; 毒性; 骨质疏松

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)02-0164-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.007

引用本文: 时克, 王茉, 景莉君, 等. 基于斑马鱼毒/效同步评价的壮骨关节丸促骨骼发育作用与初步安全性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 164-167.

Research on Bone Development Promotion and Preliminary Safety of Zhuanggu Guanjie Pill based on Synchronous Evaluation of Toxicity and Efficacy Using Zebrafish

SHI Ke^{1,2}, WANG Mo³, JING Lijun², WEI Yingjie^{1,2*} (1.The Third Clinical School of Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2.Key Laboratory of New Drug Delivery System of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 3.The Liberation Army 93318 Army Hospital, Kaiyuan 112300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate bone development promotion and preliminary safety of Zhuanggu Guanjie pill based on synchronous evaluation of toxicity and efficacy using zebrafish. **METHODS** Zebrafish embryos at 3 day post fertilization (dpf) were exposed to prednisolone (PN) 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, different concentration of Zhuanggu Guanjie pill and its solution with PN(12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and embryonic medium(0.5% DMSO)as a blank control, all groups were incubated at 28 $^{\circ}\text{C}$ until 8 dpf. The medium/solution was changed half every other day. Zebrafish skeleton at 8 dpf were stained with alizarin red, and the stained area of bone was quantitative analyzed, at the same time, the death number and organ toxicity of zebrafish were also observed. **RESULTS** At 8 dpf, more than 80% of zebrafish which exposed in Zhuanggu Guanjie pill (healthy fish group) and its solution with PN (model fish group) at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and above concentration were died without bone staining. Compared with PN group, cumulative optical density value (IOD) and skull mineralization area of Zhuanggu Guanjie pill healthy fish group(12.5, 25, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) increased significantly($P<0.01$ or <0.05). However, the skull mineralization area or IOD of Zhuanggu Guanjie pill solution with PN(12.5, 25 and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) had tendency to prevent the bone loss induced by PN, while the effect on model fish were weaker than that of healthy fish. After dosed Zhuanggu Guanjie pill, mortality speed and mortality rate of PN-treated model zebrafish were higher than that of healthy fish, the mortality rate was correlation with both drug concentration and dosed time. The LC_{50} values at 6 dpf and 8 dpf of PN-treated model zebrafish (63.92 and 63.92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were lower than that of healthy fish(94.66 and 87.84 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). **CONCLUSION** The synchronous evaluation method of toxicity and efficacy using zebrafish is successfully used in evaluating bone development activity and preliminary safety of Zhuanggu Guanjie pill. And the effect and toxicity of Zhuanggu Guanjie pill on healthy fish and model fish are different.

KEYWORDS: zebrafish; Zhuanggu Guanjie pill; toxicity; osteoporosis

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573833); “重大新药创制”国家科技重大专项(2017ZX09301056)

作者简介: 时克, 女, 硕士 Tel: (025)85637809 E-mail: 28908732@qq.com *通信作者: 韦英杰, 女, 博士, 研究员 Tel: (025)85637809 E-mail: wyj970@163.com

中药治疗骨质疏松症已应用较广,随之而来的是其肝毒性被引起重视,有些疗效确切、临床用药广、关注度高的知名中药如壮骨关节丸、仙灵骨葆胶囊等有肝损伤不良反应,且均已在《药品不良反应信息通报》公开,这给临床安全、合理用药带来极大挑战^[1-4]。因此抗骨质疏松中药筛选与评价有必要既重视有效性,又重视安全性。

基于体内过程的中草药/毒研究的新思路、新方法不断涌现^[4-6],但现有体内外模型难以实现兼顾有效性与安全性的在体、高效评价,已成为制约中药抗骨质疏松毒/效物质研究的难点和瓶颈。体外实验具快速、高效和经济等优点,但难以体现整体实验的综合效果;体内实验能提供可比性较高的评价结果,但实验周期较长、成本高,化合物用量大,效率较低。

模式生物斑马鱼是近年来进行药物在体高通量筛选、毒理研究等的理想、热门模型。斑马鱼发育速度快,在1周内即可形成主要的脏器及代谢酶系,斑马鱼与人类的基因相似度达到87%,这意味着在斑马鱼上进行试验的结果,在大多数情况下也适用于人体^[7]。与哺乳动物类似,药物经鱼作用后发生代谢转化,产生药效或毒性,是个整体过程,此外幼鱼体小,试验可在微板中高效进行。笔者创建糖皮质激素诱导的斑马鱼骨质疏松模型,突破微量成分难以进行在体壮骨活性评价的技术瓶颈^[8-9]。在用斑马幼鱼进行中药抗骨质疏松评价过程中,发现壮骨关节丸在较低浓度($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)即致鱼大量死亡,故推测给药后,评价抗骨质疏松活性的同时可同步观察毒性。

本研究选择壮骨作用明确且有肝损伤不良反应的壮骨关节丸为代表,用斑马鱼毒/效同步法高效评价其对健康鱼和骨质疏松模型鱼的促进骨骼发育作用和初步安全性,为壮骨中药的药效评价及早期安全预警提供参考。

1 材料与仪器

1.1 动物

斑马鱼成鱼由南京大学模式动物研究所提供,为德国Tubingen品系。

1.2 仪器与试剂

生化培养箱 SPX-80(宁波海曙赛福实验仪器厂);KQ3200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XW-80A微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);AB135-S分析天平(瑞士

Mettler Toledo公司);Image pro plus 6.0专业图像分析软件(美国Media Cybernetics公司);Nikon Aphaphot-2 YS2显微镜(日本Nikon公司)。

壮骨关节丸(华润三九医药股份有限公司,批号:1212003S,规格:每瓶60g);泼尼松龙(苏州亚科化学试剂股份有限公司,批号:YK2012020101);二甲亚砜(国药集团化学试剂有限公司,批号:20120331);多聚甲醛(成都市科龙化工试剂厂,批号:20100504);MS-222(Acros Organics,批号:A0288328);茜素红S(郑州四季化工产品有限公司,批号:Sj20110806);水为Milli-Q system高纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 给药及斑马鱼固定、骨骼染色方法

将受精后3 d(3 day post fertilization, 3 dpf)的斑马鱼胚胎放入盛有胚胎培养基的24孔板中,加入培养基1 mL,每组2孔,16个胚胎,分为空白培养基组、0.5% DMSO溶媒阴性对照组、模型药物组($25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 泼尼松龙)、7个剂量的壮骨关节丸溶液组(12.5, 25, 50, 100, 200, 300, $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和7个剂量含 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 泼尼松龙的壮骨关节丸溶液组(12.5, 25, 50, 100, 200, 300, $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。从3 dpf开始加入用培养基配制的各组药物(含0.5% DMSO),吸净24孔板里的培养基后迅速加入药液并用药液润洗2遍,最终使每孔含药液2 mL,将24孔板放入 $28.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养。培养周期为5 d,每天换液并加入等体积新溶液,培养至8 dpf,斑马鱼幼鱼体内卵黄囊含丰富的营养可供培养9~10 dpf无需喂食。用MS-222麻醉处死,再用4%多聚甲醛固定后,采用1% KOH配置的含1.5% H_2O_2 漂白剂将鱼体漂白后,采用茜素红对斑马鱼幼鱼头部骨骼染色,最后用梯度比3:1, 1:1, 1:3的1% KOH和甘油的透明液透明,去除多余的染色剂。用图像分析软件Image pro plus 6.0计算斑马鱼头部骨骼染色面积和累积光密度(integrated optic density, IOD)。

对斑马鱼毒性的同步观察:在观察壮骨关节丸对斑马鱼骨骼发育影响施药过程中,每天同步观察药物对斑马鱼的毒性,记录4~8 dpf斑马鱼的死亡数。

2.2 数据分析

用Excel软件对数据进行统计分析,计算各组数据的平均值、标准偏差及变异系数($n=5\sim7$), t -test

比较各组差异;利用数据统计软件 SPSS 16.0 计算壮骨关节丸对斑马鱼半数致死浓度(half lethal concentration, LC_{50})。

3 结果

3.1 壮骨关节丸对健康斑马鱼和泼尼松龙模型斑马鱼的骨骼发育作用

与泼尼松龙组比较,壮骨关节丸各浓度溶液组 8 dpf 的斑马鱼头骨矿化面积都相对增加,矿化面积及 IOD 值随浓度增加而递减, $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壮骨关节丸溶液组增加的最为明显。由结果可见,与泼尼松龙组比较,壮骨关节丸溶液浓度为 12.5 , $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,斑马鱼头骨染色面积之和与 IOD 值有极显著性差异($P<0.01$),当壮骨关节丸溶液浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,斑马鱼头骨染色面积和 IOD 与泼尼松龙组比有显著性差异($P<0.05$)。结果提示 $12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 壮骨关节丸溶液均可促进斑马鱼骨生成。结果可见含 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 泼尼松龙的 $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壮骨关节丸溶液组斑马鱼头骨矿化面积与泼尼松龙组比较相对增加,矿化面积随浓度增加而递减;含 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 泼尼松龙的 12.5 , 25 , $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壮骨关节丸溶液组的 IOD 值相与泼尼松龙组比较相对增加,均无显著性差异,结果见图 1~2。

3.2 壮骨关节丸对健康斑马鱼和泼尼松龙模型斑马鱼的毒性实验结果

对健康幼鱼的毒性:给药 24 h (4 dpf)后, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试液有部分死亡。给药 48 h 后 (5 dpf), 100 , 200 , 300 , 400 , $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试液毒性随给药时间延长,死亡鱼数增多。

对泼尼松龙模型幼鱼的毒性:给药 24 h (4 dpf)后, 100 , $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试液有部分死亡。给药 48 h 后 (5 dpf), 200 , 300 , $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试液中的幼鱼全部死亡, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试液随给药时间延长,死亡鱼数增多,结果见图 3。

12.5 , 25 , $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 壮骨关节丸于给药期间均未致健康鱼和模型鱼死亡。

用 SPSS 18.0 软件计算鱼在 6 dpf 和 8 dpf 的 LC_{50} , 壮骨关节丸对健康鱼的 LC_{50} 值分别为 $94.66 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $87.84 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 对泼尼松龙模型鱼的 LC_{50} 值均为 $63.92 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。提示壮骨关节丸致模型鱼中毒较健康鱼快,且毒性大。

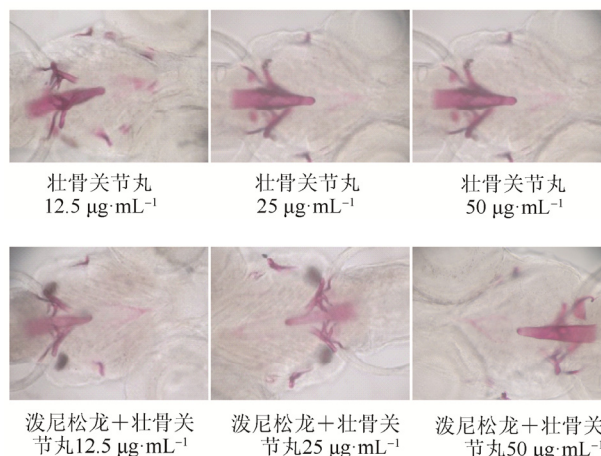
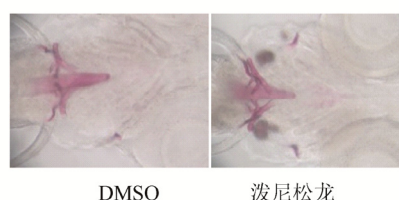


图 1 受精后 8 d 的斑马鱼幼鱼头骨茜素红染色的显微成像图(100×)

Fig. 1 Microscopic imaging of skull bone of zebrafish larval staining with alizarin red at 8 dpf(100×)

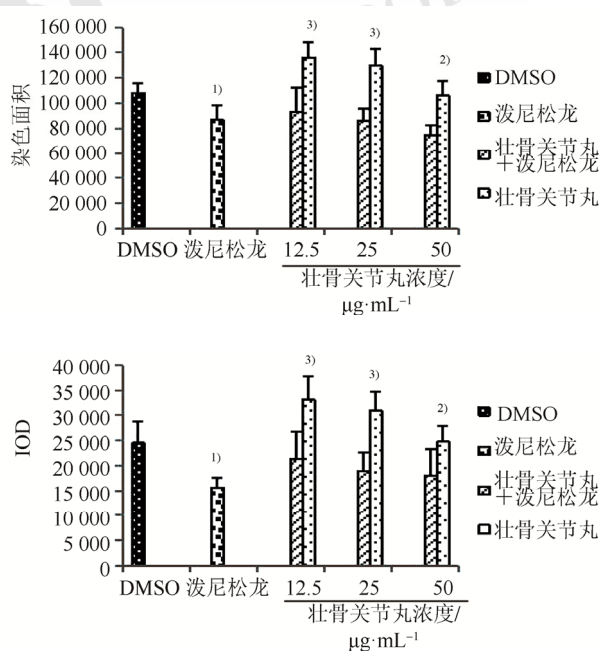


图 2 斑马鱼幼鱼头骨茜素红染色面积和累积光密度(IOD)结果

与 0.5% DMSO 溶媒对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与泼尼松龙组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Results of Zhuanggu Guanjie pill on mineralized area and IOD of zebrafish larval

Compared with vehicle(0.5% DMSO) control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with prednisolone group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

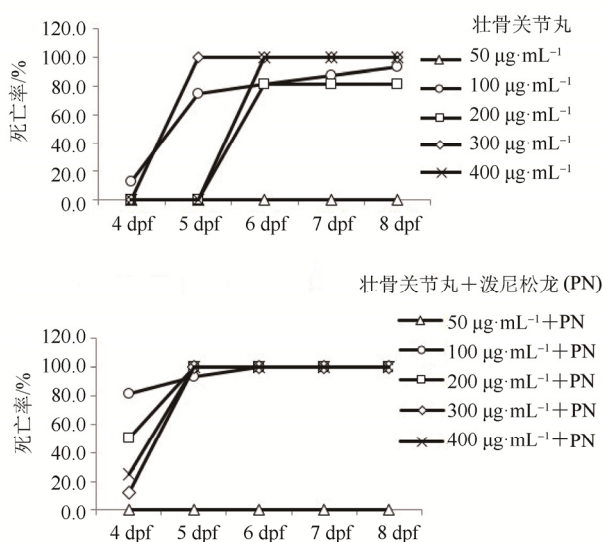


图3 壮骨关节丸对健康鱼和泼尼松龙模型鱼死亡的影响
Fig. 3 Effects of Zhuanggu Guanjie pill on the mortality of healthy zebrafish and prednisolone model zebrafish

4 讨论

现有体内外毒性模型不适于在体、高效筛选：传统动物毒性评价模型耗时长、成本高、不适于早期高效筛选；体外细胞毒模型不能体现在体试验的综合效果。近年来热门的模式生物斑马鱼具有在体、高效的优势，可弥补现有体内外毒性模型的不足。本研究针对现有体内外模型难以实现壮骨中药兼顾有效性与安全性的在体、高效评价，采用斑马鱼毒/效同步法突破技术瓶颈。

本研究采用健康斑马鱼和泼尼松龙诱导的骨质疏松斑马鱼评价壮骨关节丸的抗骨质疏松作用，并在给药期间同步观察安全性。结果表明壮骨关节丸(12.5, 25, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)可显著促进健康斑马鱼的头部骨骼矿化面积和 IOD，显著促进骨骼增长；壮骨关节丸具有一定阻止泼尼松龙诱导斑马鱼骨丢失的作用，但均弱于对健康斑马鱼的作用。给药期间，发现 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及以上浓度的健康鱼和泼尼松龙模型鱼的死亡率>80%，但模型鱼的死亡速度和死亡率均较健康鱼高，壮骨关节丸对模型鱼的 LC_{50} 值亦低于健康鱼。

本研究将斑马幼鱼置于 24 孔板中，对壮骨关节丸较宽剂量范围多个浓度(12.5~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 7 个浓度)样品进行效/毒同步评价，实验周期短(约 1 周)、样品用量小、劳动强度小、效率高，实现在体化、微板化，能兼顾健康鱼和模型鱼，也能兼顾有效性与安全性，可为壮骨中药的毒/效评价提供有力支撑。

REFERENCES

- [1] WANG J B, XIAO X H, DU X X, et al. Identification and early diagnosis for traditional Chinese medicine-induced liver injury based on translational toxicology [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(1): 5-9.
- [2] 国家食品药品监督管理总局. 警惕壮骨关节丸引起的肝损害[J]. 中国社区医师, 2009(8): 21.
- [3] 国家食品药品监督管理总局. 警惕仙灵骨葆口服制剂引起的肝损伤风险[J]. 中国乡村医药, 2017, 24(6): 68.
- [4] PENG C, XIAO X H, LI Q, et al. Research progress and frontier integrated analysis of "toxicity" and "effect" of traditional Chinese medicine [J]. Bull Natl Nat Sci Found Chin(中国科学基金), 2017(2): 176-183.
- [5] ZHANG A H, SUN H, YAN G L, et al. Establishment of three-dimensional integrated "serum pharmacokinetics-pharmacodynamics (pharmacodynamics)-systems biology" for research of traditional Chinese medicine prescription and its application in Yinchenghao Tang [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(21): 3786-3789.
- [6] XU F, YANG D H, SHANG M Y, et al. Effective forms, additive effect, and toxicities scattering effect of pharmacodynamic substances of tcms some reflections evoked by the study on the metabolic disposition of traditional Chinese medicines (TCM) [J]. World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med(世界科学技术-中医药现代化), 2014, 16(4): 688-703.
- [7] CHAKRABORTY C, HSU C H, WEN Z H, et al. Zebrafish: a complete animal model for *in vivo* drug discovery and development [J]. Curr Drug Metab, 10(2): 116-124.
- [8] WEI Y J, WANG C M, CAI X T, et al. Establishment of zebrafish osteopenia model induced by dexamethasone [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2013(2): 255-260.
- [9] LING J, WANG M, CHEN Y, et al. Analysis of Folium Epimedii toxicity in combination with Radix Morindae Officinalis based on zebrafish toxicity/metabolism synchronization [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2018, 53(1): 74-83.

收稿日期: 2018-03-13

(本文责编: 李艳芳)