

愈伤灵胶囊药效的斑马鱼评价技术探讨*

彭 兰¹, 范能全², 周善靖³, 杨 柳², 詹宇杰², 王俊波²

(1. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331;

2. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121; 3. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715)

摘要:以斑马鱼(*Danio rerio*)为实验动物进行缺氧窒息及游泳能力实验,检测愈伤灵胶囊以及人参皂苷 Rb₁ 对斑马鱼的存活、耐受缺氧能力及游泳能力的影响。结果发现,愈伤灵溶液处理 1 d 后,实验鱼窒息时间随药物剂量呈现先增高后降低的趋势,在剂量为 0.01 mg · L⁻¹ 时达最大值;实验鱼最大绝对游泳速度呈现类似的变化趋势,不同药物剂量下的实验鱼最大相对游泳速度无显著差异。愈伤灵溶液处理 8 d 后,实验鱼窒息时间随药物剂量呈现降低的趋势,在剂量为 0.01 mg · L⁻¹ 时达最大值。人参皂苷 Rb₁ 处理 8 d 后,实验鱼窒息时间随药物剂量降低呈现跳跃式陡降。研究结果提示斑马鱼可作为药效评价的模式实验动物,用于中药评价新技术的开发。

关键词:愈伤灵胶囊;药效;筛选;斑马鱼

中图分类号:Q2-33;R977.2⁺6;R965.3

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2015)04-0128-03

斑马鱼(*Danio rerio*)是一种器官和系统发育完善的小型热带淡水鱼,常作为胚胎发育研究的重要模式生物,并用于建立疾病模型、进行药物活性成分筛选、安全性评价及药物代谢等方面的研究^[1]。目前,国内对斑马鱼的研究主要集中在发育遗传学方面,在中药药效评价研究方面尚不多见^[2-4]。愈伤灵胶囊是以三七、土鳖虫、红花、当归、自然铜(煅)、黄瓜子(炒)等 9 味中药加工而成的复方制剂,具有活血散瘀、消肿镇痛之功,用于跌打损伤、筋骨瘀血肿痛等的治疗^[5]。本研究以斑马鱼为实验动物,进行中药药效的初步筛选,通过缺氧窒息实验及游泳能力实验,研究愈伤灵胶囊以及人参皂苷 Rb₁ 对斑马鱼的存活、耐受缺氧能力及游泳能力的影响,探讨愈伤灵胶囊药效的斑马鱼评价技术。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验样品 愈伤灵胶囊(批号:130501,陕西白云制药有限公司);人参皂苷 Rb₁(批号:110704-201424,中国食品药品检测研究院)。

1.1.2 仪器设备 3 层单排鱼类养殖系统(自制);电子天平(FA2004A 型,上海精天电子仪器有限公司);可控式温度计(8002 型,乐清市奥特仪表有限公司);电压变频器(DFL-VF 型,深圳市丹富莱科技有限公司);窒息瓶(规格:25 mL);秒表(PC396 型,深圳市惠波工贸有限公司)、可控环形调速泳道(自制)。

1.2 方法

1.2.1 实验用鱼筛选研究 采集了长江中上游野生小型鱼类 9 种,人工养殖鱼类 6 种,并从广东地区购买鱼类 2 种。经过饲养观察发现,购自广东的斑马鱼为适宜的实验动物。该鱼体型较小,均一性较高,体长为(25±5) mm,体质量为(2.5±0.2) g,雌雄差异不大;而且养殖方便,存活率极高,饲养成本较低。另外,该鱼同源性较好,遗传背景较为清晰,易于获得大量形似个体。有研究表明该鱼的各项生理学特征均适用于药效研究^[6]。

1.2.2 驯养及检测技术 进行了为期 28 d 的驯养实验,以小型颗粒饲料为饵料。水温控制为 25 ℃,水体每升溶氧量大于 6.5 mg,光照周期为 12 h 光照:12 h 黑暗。进行了缺氧窒息技术的研究,在 25 ℃ 水温下,采用规格为 25 mL 的小口玻璃瓶为窒息室,测定实验鱼耐受缺氧的窒息时间(精确到 1 s)。进行了游泳速度测定技术的研究,以国际通用技术为参考,设计制作了半径为 14 cm 的可控温环形泳道,采用交流变频器(精确到 0.01 Hz)以调控水流速度,采用染料及悬浮小颗粒技术进行绝对水流速度标定^[7]。相关速度曲线如图 1 所示。

* 收稿日期:2014-10-26

修回日期:2015-03-16

网络出版时间:2015-5-15 10:55

资助项目:重庆市高等教育教学改革项目(No. 133272);重庆医药高等专科学校校级教研教改项目(No. ygzjg201304)

作者简介:彭兰,女,讲师,研究方向为药物生物活性研究,E-mail:pl2007pl@sohu.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20150515.1055.005.html>

1.2.3 药物对斑马鱼影响的研究 配制 0,0.01,0.02,0.04,0.08,0.16 mg · L⁻¹ 等不同剂量梯度的愈伤灵水溶液,设计了 1 d 和 8 d 两种不同的处理时间,各处理实验鱼数量为 20 尾,其中 10 尾用于缺氧窒息观测,10 尾用于游泳速度测定。实验前,斑马鱼禁食 24 h 以排除消化过程差异,然后随机选取平均体质量 0.2 g 左右的实验鱼分配到各处理组。人参皂苷 Rb₁ 的实验剂量梯度与愈伤灵胶囊相同,处理时间为 8 d。

药物水溶液置于 1 L 玻璃烧杯中,然后于 25 ℃ 恒温水浴中,采用小型气石充氧,水体中放入实验鱼后即以塑料筛网罩住烧杯杯口。药物处理结束后,小心移出斑马鱼。用以缺氧窒息处理的个体逐个放入预先注满 25 ℃ 恒温养殖水 25 mL 小口玻璃瓶中,再将瓶放入 25 ℃ 恒温水浴中,以塑料管充氧 10 min,使实验鱼恢复平静,然后盖紧橡胶塞,并以秒表开始计时——直至实验鱼身体失去平衡时所记录的时间为窒息时间。为消除个体大小对实验结果的影响,对体质量差异用以下公式进行了校正:

$$ts=ti\times\left(\frac{m}{0.2}\right)\times0.75\times\frac{25}{(25-m)}$$

其中,ts 为校正后时间(单位:min),ti 为校正前时间(单位:min),m 为体质量(单位:g)。

将用于测定游泳速度的实验鱼放入环形泳道,在 0.15 m · s⁻¹ 低速水流下适应 15 min,然后每 15 min 增加 0.3 m · s⁻¹ 的水流速度,直至实验鱼不能维持游泳。当实验鱼连续倒退 3 圈或贴壁不动时,视为力竭疲劳,记录时间,采用如下公式计算最大游泳速度:

$$V_{\max}=V_1+(V_2-V_1)\times(t/15)$$

其中,V_{max} 为最大游泳速度的绝对值(单位:m · s⁻¹),V₁ 为增速方案中倒数第二的速度(单位:m · s⁻¹),V₂ 为增速方案中最后一个速度(单位:m · s⁻¹),t 为在 V₂ 下持续的时间(单位:min)。采用最大游泳速度绝对值与体长(单位:m)的比值作为最大相对游泳速度(单位:BL · s⁻¹,BL 意为体长)。

1.2.4 统计分析 数据采用 Excel 2003 软件进行运算,以“平均值±标准误”表示;采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及多重比较(LSD 法)分析不同药物剂量处理造成的差异,显著性水平为 p<0.05。

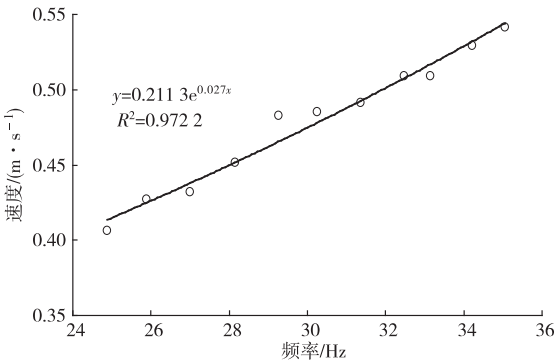


图 1 电流频率和水流速度的关系曲线

2 结果

处理 1 d 后,实验鱼窒息时间随愈伤灵剂量呈先增高后降低的趋势,在剂量为 0.01 mg · L⁻¹ 时达最大值;最大绝对游泳速度也呈现出类似的趋势,而最大相对游泳速度无显著差异(表 1)。处理 8 d 后,实验鱼窒息时间随愈伤灵剂量呈降低的趋势,在剂量为 0.08 mg · L⁻¹ 时达最大值;而人参皂苷 Rb₁ 处理降低为跳跃式陡降(表 2)。

表 1 不同剂量愈伤灵溶液处理 1 d 对斑马鱼窒息时间和游泳速度的影响

剂量/(mg · L ⁻¹)	样本量	窒息时间/min	最大绝对游泳速度/(m · s ⁻¹)	最大相对游泳速度/(BL · s ⁻¹)
0.00	10	117.13±6.25 ^{abc}	0.30±0.01 ^{ab}	9.52±0.27 ^a
0.01	10	130.71±12.75 ^a	0.29±0.01 ^b	9.44±0.19 ^a
0.02	10	83.81±7.70 ^{cd}	0.32±0.01 ^a	10.10±0.44 ^a
0.04	10	119.05±9.28 ^{ab}	0.30±0.00 ^{ab}	9.72±0.28 ^a
0.08	10	101.32±8.24 ^{bc}	0.30±0.00 ^{ab}	9.70±0.26 ^a
0.16	10	93.07±8.68 ^c	0.31±0.02 ^{ab}	9.79±0.53 ^a

注:同一列中不同字母上标表示差异显著(P<0.05),下同。

3 讨论

愈伤灵为活血化瘀的中成药,具延缓疲劳、增强无氧代谢能力^[5]。本研究中,低剂量的愈伤灵溶液处理 1 d 后,斑马鱼耐受缺氧的能力增强,运动性能也有一定程度增高,在一定程度上反映出了愈伤灵的药效。本研究也探讨了人参皂苷 Rb₁ 对实验鱼耐受缺氧能力的影响,结果发现它对提高实验鱼的该项能力无显著影响。这可能是因为

表 2 愈伤灵溶液和人参皂苷 Rb₁ 处理 8 d 对斑马鱼窒息时间的影响

剂量/(mg · L ⁻¹)	样本量	窒息时间/min	
		愈伤灵	人参皂苷 Rb ₁
0.00	10	138.47±5.52 ^a	104.17±5.61 ^a
0.01	10	117.82±7.61 ^{abc}	104.54±6.75 ^a
0.02	10	111.43±3.79 ^{bc}	93.51±6.63 ^{ab}
0.04	10	120.67±10.58 ^{abc}	85.74±5.48 ^b
0.08	10	123.82±8.13 ^{ab}	—
0.16	10	101.53±6.54 ^c	—

人参皂苷 Rb_1 对哺乳动物和鱼类的有关影响存在差异,它的作用途径并不一定是提高耐低氧能力;而且人参皂苷 Rb_1 药效强于愈伤灵,因此不能进行相同剂量比较。

本研究结果表明,采用斑马鱼作为药效评价的实验动物是一种值得深入研究的技术途径。本研究发现,较高剂量药物处理后,斑马鱼各项指标均降低,这可能与中成药中杂质成分的副作用有关^[4],相似的情况也表现在经较长处理时间(8 d)后,实验鱼的耐受低氧指标均降低。因此采用斑马鱼作中药评价时,摸索合适的剂量和处理时间是重要的关键环节^[8]。

参考文献:

- [1] 李洁斐,李卫华,王强毅,等. 斑马鱼应用于毒理学研究的现状[J]. 实验动物与比较医学,2005,25(4):24-252.
Li J F, Li W H, Wang Q Y, et al. Application of zebrafish in toxicology research[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2005, 25(4): 24-252.
- [2] 梁爱华. 斑马鱼——一种可用于中药药效和毒性筛选的鱼类模型[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2839-2842.
Liang A H. Zebrafish—useful model for pharmacodynamics and toxicity screening of traditional Chinese medicine[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 34(22): 2839-2842.
- [3] 韦英杰,宁青,贾晓斌,等. 基于斑马鱼模型的中药代谢研究思路与方法[J]. 中草药, 2009, 40(7): 1009-1011.
Wei Y J, Ning Q, Jia X B, et al. Thoughts and methods for metabolic study of Chinese materia medica based on zebrafish model[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2009, 40(7): 1009-1011.
- [4] 舒斌,韦英杰,张陆勇,等. 采用模式生物斑马鱼评价三种中药成分的急性毒性[J]. 云南中医学院学报, 2011, 33(1): 35-37.
Shu B, Wei Y J, Zhang L Y, et al. Acute toxicity of triptolide, matrine and emodin on zebrafish[J]. Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2011, 33(1): 35-37.
- [5] 雷建林,李芳,车晓侠,等. 愈伤灵胶囊的质量控制[J]. 医药导报, 2006, 25(10): 1071-1073.
Lei J L, Li F, Che X X, et al. The quality control of Yushangling capsule[J]. Herald of Medicine, 2006, 25(10): 1071-1073.
- [6] 张京佑,殷浩文,赵华清,等. 实验用斑马鱼的质量控制研究—不同健康状况实验鱼的毒性实验比较[J]. 实验动物科学, 2009, 26(4): 28-31.
Zhang J J, Yin H W, Zhao H Q, et al. Quality control of the laboratory zebrafish and acute toxicity test on the zebrafish in different health conditions[J]. Laboratory Animal Science, 2009, 26(4): 28-31.
- [7] 李乙根,黄文瑾,黄诚,等. 斑马鱼在新药发现中的应用[J]. 生命科学, 2011, 23(3): 273-278.
Li Y G, Huang W J, Huang C, et al. Zebrafish in drug discovery[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(3): 273-278.
- [8] 常嘉,陆亮,王庆利,等. 斑马鱼在药物早期毒性筛选中的应用进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(13): 1500-1504.
Chang J, Lu L, Wang Q L, et al. Progress of application of zebrafish in early drug toxicology screening[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2013, 22(13): 1500-1504.

Efficacy Evaluation of Yushangling Capsule by Using Zebrafish as Experimental Animal

PENG Lan¹, FAN Nengquan², ZHOU Shanjing³, YANG Liu², ZHAN Yujie², WANG Junbo²

(1. Chongqing Pharmaceutical College, Chongqing 401331;

2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 400021;

3. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: This study aimed to obtain the technology to evaluate the efficacy of Yushangling capsule by using zebrafish as the experimental animal. The zebrafish was treated by Yushangling and ginsenosides Rb_1 solution respectively. Then the fish was used to assay the hypoxia tolerance and swimming performance. The results showed that the suffocation duration increased firstly and then decreased with the increasing medicine concentration after 24 h of treatment. The maximal suffocation duration was found at $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The maximal absolute swimming speed showed similar tendency as hypoxia tolerance, but the relative speed did not changed significantly. After 8 days of treatment, the suffocation duration was maximal at $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and decreased with the increasing medicine concentration. The suffocation duration of the fish treated by ginsenosides Rb_1 showed a shock drop with the increasing concentration. It suggests that the zebrafish could be used to judge the efficacy of medicines, which could contribute to the new evaluating technology of Chinese medicines in further study.

Key words: Yushangling capsule; efficacy; selection; zebrafish