

· 论 著 ·

基于模式生物斑马鱼对口腔炎合剂的胚胎及肝肾发育的影响*

杨波^{1,2}, 崔建蓉¹, 王娅俐², 曹治兴³, 袁晓燕⁴

(1. 成都市第七人民医院, 四川 成都 610213; 2. 南充市中心医院, 四川 南充 637000; 3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 4. 攀枝花市中心医院, 四川 攀枝花 617067)

[摘要] **目的** 利用斑马鱼为动物模型, 初步分析口腔炎合剂对胚胎及肝肾发育的影响。**方法** 待斑马鱼发育至受精后 10 h(10 hpf) 时以简单随机方法分组并添加梯度浓度的口腔炎合剂。药物作用 72 h 后在显微镜下观察口腔炎合剂对胚胎及肝肾发育, 并记录图像数据。**结果** 当口腔炎合剂稀释浓度高于 1.625×10^{-5} g/mL 时对 10 hpf 斑马鱼开始出现胚胎发育毒性, 表现为发育迟缓、心腔狭窄等。当口腔炎合剂稀释浓度高于 6.500×10^{-5} g/mL 时对 36 hpf 斑马鱼产生肝肾发育毒性, 主要表现为肝脏与周边组织分界线不太明显, 肾脏和鱼鳃区域明显增大, 并伴有水肿瘀滞现象。**结论** 口腔炎合剂具有一定的胚胎及肝肾毒性, 孕妇和哺乳期妇女, 以及肝肾功能不全者原则上不得使用本品, 必须使用时应严格限量, 并在医生指导下谨慎使用。

[关键词] 口腔炎合剂; 模式生物; 斑马鱼; 肝肾毒性; 胚胎毒性

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.09.002 中图法分类号: R988.2

文章编号: 1009-5519(2024)09-1446-04

文献标识码: A

Study on the effect of zebrafish on embryo, liver and kidney development of stomatitis mixture based on model organism*

YANG Bo^{1,2}, CUI Jianrong¹, WANG Yali², CAO Zhixing³, YUAN Xiaoyan⁴

(1. Chengdu Seventh People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610213, China; 2. Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611137, China; 4. Panzhihua Central Hospital, Panzhihua, Sichuan 617067, China)

[Abstract] **Objective** To preliminarily analyze the effect of stomatitis mixture on embryo, liver and kidney development by using zebrafish as an animal model. **Methods** When zebrafish developed to 10 h after fertilization(10 hpf), they were grouped by simple random method and added with gradient concentration of stomatitis mixture. After 72 h of drug action, the toxicity of stomatitis mixture on embryonic development and hepatorenal toxicity were observed under microscope and the image data were recorded. **Results** When the dilution concentration of stomatitis mixture was higher than 1.625×10^{-5} g/mL, embryo developmental toxicity began to appear in 10hpf zebrafish, showing developmental delay and cardiac cavity stenosis. When the dilution concentration of stomatitis mixture was higher than 6.500×10^{-5} g/mL, it had hepatorenal toxicity to 36 hpf zebrafish. The main manifestations were that the boundary between liver and surrounding tissues was not obvious, and the kidney and swim bladder area increased significantly, accompanied by edema and stasis. **Conclusion** The stomatitis mixture has certain embryo and liver and kidney toxicity. Pregnant women, lactating women, and patients with liver and kidney dysfunction, are not allowed to use this product in principle. It must be used with strict limits and careful use under the guidance of doctors.

[Key words] Stomatitis mixture; Model organism; Zebrafish; Hepatorenal toxicity; Embryo toxicity

复发性口腔溃疡(ROU)是指一类发病原因尚不明确、反复发作但又具有一定自愈性的口腔黏膜溃疡

* 基金项目: 四川省医学科研课题计划项目(S23074); 四川省自然科学基金项目(2022NSFSC1535)。

作者简介: 杨波(1988—), 硕士研究生, 主管药师, 主要从事临床药学工作。

性损伤疾病^[1]。ROU 是常见的口腔黏膜病变,发病率目前排在口腔类疾病的第 1 位。流行病学调查表明,一般人群中该病发病率为 10%~20%,但在特殊人群中可高达 55%。ROU 发病原因至今尚未有较确切的结论。目前,主流的病因学观点认为,ROU 的发生主要与病毒或细菌感染、胃肠消化功能紊乱、免疫功能异常、微循环障碍、内分泌紊乱、遗传因素、创伤、免疫缺陷病、变态反应、造血及神经功能异常,以及锌、铁、叶酸、B 族维生素缺乏等有关。现代口腔医学观点认为,ROU 是一种自身免疫性疾病,但易感人群在以上因素影响下机体内部发生自身免疫反应,进而诱导在口腔局部发生以黏膜细胞破损和炎症病变,且发生在一处或多出。由于其发病机制的不明确,导致 ROU 的根治较为困难,复发情况在易感者中时有发生。

口腔炎合剂为攀枝花市中心医院自制剂,在中医辨证和中药理论上选用白虎汤合导赤散加山慈菇拟定的口腔炎合剂,具有清热凉血、解毒生肌等功效,治疗复发性阿弗他溃疡及疱疹性口炎效果较好,临床疗效确切,达到减轻痛苦、促进恢复、减少复发的目标。目前,口腔炎合剂对胚胎和肝肾功能发育潜在毒性的数据尚不明确,限制了口腔炎合剂组方的进一步优化,以及在临床中的广泛使用。

药物研究专家常以模型动物作为药物研究工具,以此评价药物在疾病模型中的药理效果。其中小鼠、果蝇、斑马鱼在药理实验中被广泛使用^[2-5]。斑马鱼是一种重要的模型生物,具有较多优点,如胚胎发育同步性高、繁殖速度较快、胚胎透明度高。但斑马鱼最重要的优点是具有与人类基因高度相似性的特征,也造就了其在人类疾病的药物研究中具有举足轻重的地位^[6]。无论是在西药的药理毒理研究还是在中药的毒理评价中斑马鱼的应用均日渐增多,且发挥着不可替代的作用。近年来,诸多学者开展了基于斑马鱼的药理毒理研究^[7-8],如基于斑马鱼开展的麝香酮对胚胎的毒性研究^[9]或基于斑马鱼开展的乌头碱对心脏的毒性、发育衰老的研究^[10],以及基于斑马鱼的中药肝损伤的效果研究^[11-12]等,这些研究结果均证实了斑马鱼作为模型动物的重要优势。因此,本研究以斑马鱼作为模型生物开展了口腔炎合剂对胚胎及肝肾发育的初步探索,期望为口腔炎合剂的组方优化与改良,以及临床推广应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材来源 口腔炎合剂组方为山慈菇 100 g,知母 60 g,川木通 20 g,甘草 20 g,石膏 75 g,地黄 75 g,黄芩 20 g,梗米 75 g,淡竹叶 75 g。全部中药材来源于四川新绿色有限公司,且被成都中医药大学药

学院鉴定为合格品。制备过程为首先将药材加水浸泡,并经 2 次煎煮,然后过滤取汁,最后合并浓缩药物,最终制成 0.520 g/mL 生药的浓缩中药液体,保存于 4℃ 冰箱备用。

1.1.2 实验动物 斑马鱼为 AB 品系,由成都中医药大学药学院斑马鱼实验平台繁育提供。

1.1.3 仪器与试剂 斑马鱼繁育系统(北京爱生科技发展有限公司)、M165-FC 型体式荧光显微成像系统(Leica corporation, German)、MGC-100 型恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、羧甲基纤维素钠(批号为 M0202A,大连美仑生物公司)、中药煎药机(青岛华弘生物制药设备有限公司)、纯水系统-超纯水制备系统(Milli-Q Advantage)等。实验采用含 0.001 5% N-苯基硫脲(美国 Sigma Aldrich 公司,批号:BCBK8912V)的斑马鱼胚胎培养液将药物稀释至所需浓度。实验用水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼胚胎的饲养及获取 饲养斑马鱼条件为使用北京爱生斑马鱼繁育系统,全封闭循环,水温控制在 28℃,室温为 26℃,pH 为 7.2~7.5,电导率为 500~550 $\mu\text{S}/\text{cm}$,光照为 14 h 的黑暗加 10 h 白昼进行交替繁殖。挑选状态良好的斑马鱼以 1:1 雌雄比进行培养,用隔板将雌、雄鱼隔离,次日早晨将隔板抽去,并于 2 h 后收集斑马鱼胚胎,转移至恒温(28℃)培养箱进行孵育。

1.2.2 斑马鱼肝肾发育毒性测定 将受精后 10 h (10 hpf)发育正常的斑马鱼胚胎置于 24 孔板,密度为 10 枚/孔,同时,弃原胚胎培养液,并立即加入 1.5 mL 浓度梯度分别为 1.300×10^{-4} g/mL 生药(原药稀释 4 000 倍)、 6.500×10^{-5} g/mL 生药(原药稀释 8 000 倍)、 3.250×10^{-5} g/mL 生药(原药稀释 16 000 倍)的口腔炎合剂培养液,用无任何添加的胚胎培养液作空白对照组,并转移至恒温箱中培养,于给药 72 h 后在显微镜下观察并拍照记录染毒后幼鱼的肝肾区图像。

1.2.3 斑马鱼胚胎发育毒性测定 将 10 hpf 后且正常发育的斑马鱼胚胎置于 24 孔板中,密度为 10 枚/孔,同时,弃原胚胎培养液,并立即加入 2 mL 浓度梯度分别为 6.500×10^{-5} g/mL 生药(原药稀释 8 000 倍)、 3.250×10^{-5} g/mL 生药(原药稀释 16 000 倍)、 1.625×10^{-5} g/mL 生药(原药稀释 32 000 倍)、 8.125×10^{-6} g/mL 生药(原药稀释 64 000 倍)的口腔炎合剂培养液,以无任何添加的胚胎培养液作空白对照组,并转移至恒温箱中培养,于给药 72 h 后在显微镜下观察并拍照记录染毒后幼鱼的胚胎形态变化。斑马鱼胚胎由透明变为白色或在显微镜下观察胚胎

开始变模糊判定为有胚胎发育毒性。

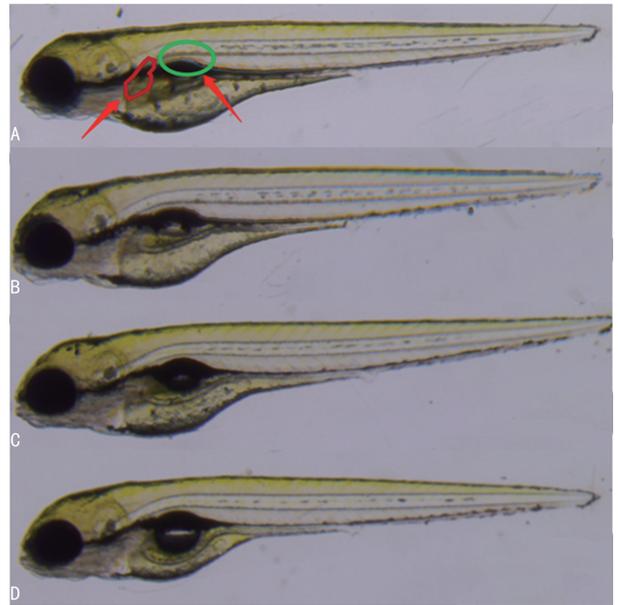
1.3 统计学处理 应用 Excel2019 进行数据分析,采用描述性统计分析。

2 结 果

2.1 口腔炎合剂对肝肾发育毒性的影响 空白对照组斑马鱼幼鱼实验结束后肝脏(红色线条区域)和肾脏(绿色线条区域)发育正常,口腔炎合剂在大于或等于 6.500×10^{-5} g/mL 剂量下作用 72 h 可明显导致 10 hpf 斑马鱼胚胎的肝肾发育不良,表现为肝脏发育缓慢和肾脏水肿,并随浓度升高毒性升高。见图 1。与空白对照组比较,口腔炎合剂对 10 hpf 斑马鱼作用 72 h 后 6.500×10^{-5} g/mL 时幼鱼肝脏形态基本正常,但肝脏区域面积减小。此外,当口腔炎合剂浓度为 6.500×10^{-5} g/mL、 1.300×10^{-4} g/mL 时胚胎、肝脏与周边组织分界线不太明显,具有更加明显的肝脏毒性。且在这 2 个浓度下斑马鱼肾脏和鱼鳔区域明显增大,开始出现水肿瘀滞现象,显现一定的肾毒性。

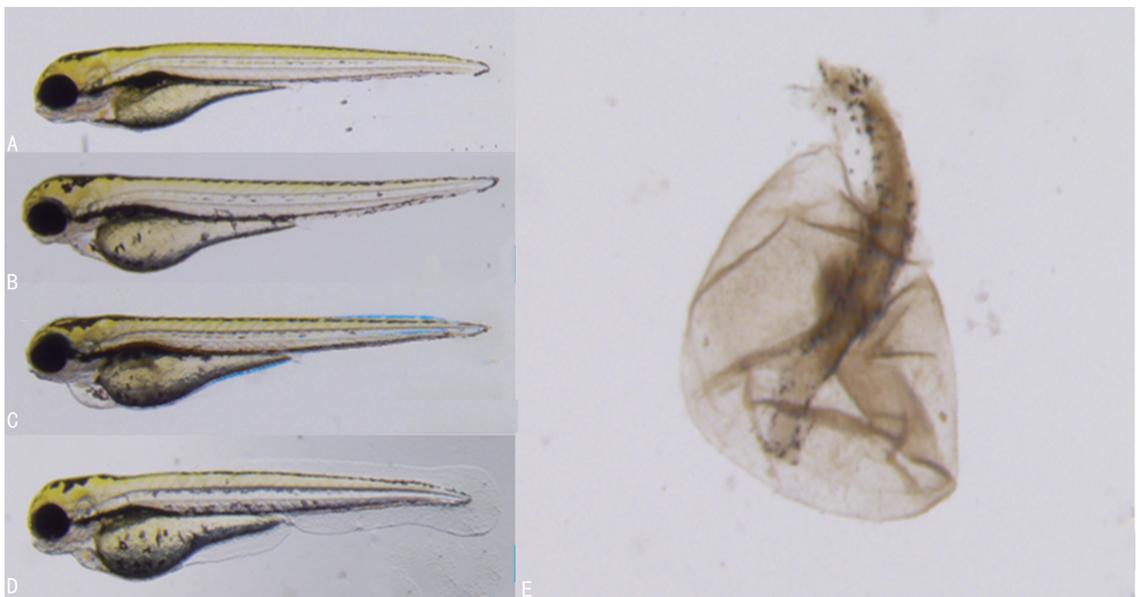
2.2 口腔炎合剂对胚胎发育毒性的影响 对照组斑马鱼幼鱼在实验过程中全部存活,口腔炎合剂在大于或等于 1.625×10^{-5} g/mL 剂量下作用 10 hpf 斑马鱼 72 h 后可明显导致胚胎产生毒性,表现为发育缓慢、身体畸形和心包囊肿,并随浓度升高而毒性升高。见图 2。与空白对照组比较,口腔炎合剂对 10 hpf 斑马鱼胚胎作用 72 h 后 8.125×10^{-6} g/mL 时个别幼鱼体形发生略微变化,心包与卵黄囊肿大,且肿大程度

呈剂量依赖性。此外,当口腔炎合剂浓度为 1.625×10^{-5} g/mL 时胚胎心包开始出现水肿瘀滞现象(红色箭头指示部位),当口腔炎合剂浓度为 3.250×10^{-5} g/mL 时表现为严重的身体畸形、心腔狭窄。见图 3。当口腔炎合剂浓度为 6.500×10^{-5} g/mL 时大部分鱼卵发白,无成形鱼胎出现,表现出严重的胚胎细胞毒性,见图 2E。



注:A.空白对照组;B. 3.250×10^{-5} g/mL 组;C. 6.500×10^{-5} g/mL 组;D. 1.300×10^{-4} g/mL 组。

图 1 口腔炎合剂作用于 10 hpf 斑马鱼 72 h 后对胚胎肝肾发育毒性的影响(50×)



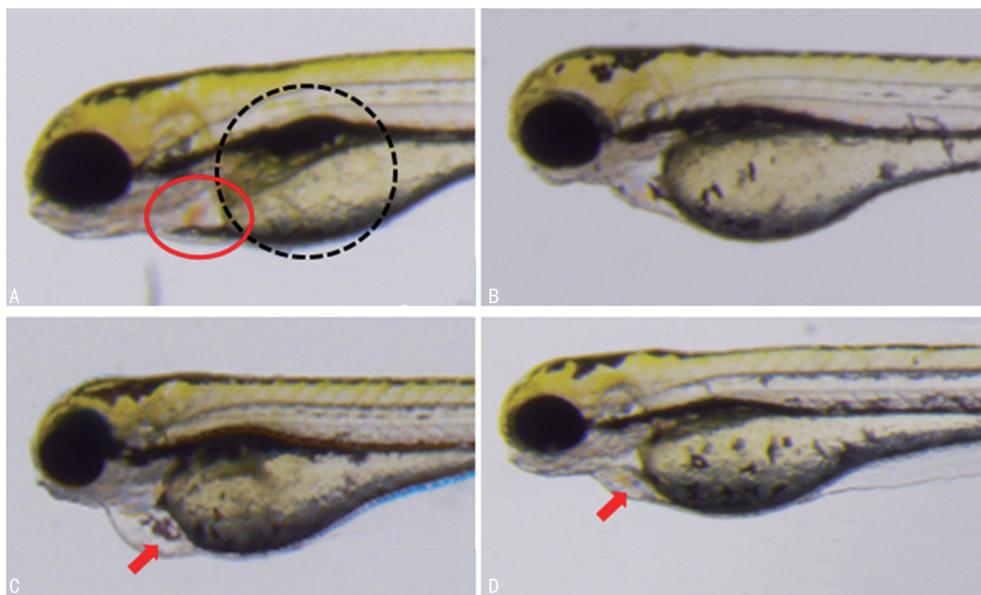
注:A.空白对照组;B. 8.125×10^{-6} g/mL 组;C. 1.625×10^{-5} g/mL 组;D. 3.250×10^{-5} g/mL 组;E. 6.500×10^{-5} g/mL 生药组。

图 2 口腔炎合剂作用于 10 hpf 斑马鱼胚胎 72 h 对胚胎发育的影响(50×)

2.3 不同浓度口腔炎合剂对斑马鱼胚胎及肝肾发育毒性的影响 口腔炎合剂对斑马鱼的肝肾发育毒性在原药稀释 8 000 倍开始能较明显观察出异样,表明

6.500×10^{-5} g/mL 生药的浓度下具有一定的肝肾发育毒性,且有浓度依赖性。此外,口腔炎合剂在各浓度下均能观察到胚胎的形体发育变化,表现出一定的

胚胎发育毒性。见表 1。



注:A. 空白对照组;B. 8.125×10^{-6} g/mL 组;C. 1.625×10^{-5} g/mL 组;D. 3.250×10^{-5} g/mL 组。

图 3 口腔炎合剂作用于 10 hpf 斑马鱼胚胎 72 h 对心脏周边形态的影响(50×)

表 1 不同浓度口腔炎合剂对斑马鱼胚胎及肝肾发育毒性的影响

序号	药物浓度 (g/mL)	原药稀释倍数	肝肾	胚胎
1	8.125×10^{-6}	64 000	0	1
2	1.625×10^{-5}	32 000	0	1
3	3.250×10^{-5}	16 000	0	1
4	6.500×10^{-5}	8 000	1	1
5	1.300×10^{-4}	4 000	1	1

注:0 表示无影响或不明显,1 表示有影响。

3 讨 论

ROU 患病率高达 20% 左右^[13], 发病率较高, 常发于舌部、唇部、颊部黏膜等。溃疡处的局部疼痛是常见的临床症状, 经常影响患者说话、进食和心情, 大大降低了生活质量。ROU 分为轻型、重型和疱疹型, 其病因复杂, 存在明显的个体差异。免疫、遗传、环境因素均可诱发 ROU 的发生^[14], 因此, ROU 的治疗方式也比较多样, 但尚无特效药和治疗方案。

口腔炎合剂为本院自制剂, 前期研究发现其对 ROU 及疱疹性口炎效果较好, 临床疗效确切, 可达到减轻痛苦、促进恢复、减少复发的目标。但口腔炎合剂对胚胎和肝肾发育的潜在毒性目前尚不明确, 限制了其在临床的广泛使用^[10]。为进一步掌握本院自制的口腔炎合剂对妊娠期和哺乳期妇女的影响, 本研究探讨了以模式生物斑马鱼为研究对象的口腔炎合剂, 对斑马鱼胚胎及肝肾发育毒性的影响, 结果显示, 口腔炎合剂具有一定的胚胎及肝肾发育毒性。

前期研究表明, 口腔炎合剂成人常规剂量为每次 1 袋(200 mL), 浓度为 0.52 g/mL, 每天 3 次给药, 连

续服用 3 d 为 1 个疗程, 在该剂量下安全性尚可, 但孕妇和哺乳期妇女, 以及肝肾功能不全者使用口腔炎合剂的剂量和安全性尚未知晓^[5]。本研究基于斑马鱼开展的胚胎及肝肾发育毒性结果显示, 妇女、儿童及肝肾功能不全等特殊人群尽量避免使用, 特殊情况下必须使用时务必在医生指导下按恰当的剂量服用。本研究结果促进了口腔炎合剂的处方优化和进一步临床推广使用, 同时, 对患者的用药安全提供了极为关键的证据, 具有一定的参考价值。下一步将进一步优化本院自制的口腔炎合剂的组方比例和内容, 进一步完善斑马鱼在胚胎及肝肾发育毒性研究中的内容, 争取获得更优的口腔炎合剂。

参考文献

- [1] CUI J J, LIN W, MA X N, et al. Clinical evaluation and therapeutic effects of combination treatment with mecobalamin + Vitamin E in recurrent oral ulcer[J]. Clin Ther, 2022, 44(1):123-129.
- [2] SHEN C, HE J, ZHU K, et al. Mepanipyrim induces cardiotoxicity of zebrafish (Danio rerio) larvae via promoting AhR-regulated COX expression pathway[J]. J Environ Sci (China), 2023, 125:650-661.
- [3] ZHANG Q Q, LI Q, DONG L, et al. Genotoxicity and embryotoxicity study of bicyclol methyl ether, main impurity in bicyclol[J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(10):743-749.

(下转第 1455 页)

参考文献

- [1] 林自立, 王瑀, 陈露, 等. 基于 Nrf2-NQO1/ γ -GCS 信号通路探讨续断种子方对少弱精子症模型大鼠附睾氧化损伤的保护机制[J]. 海南医学院学报, 2022, 28(11): 815-820.
- [2] 陆海旺, 宾彬, 林思伟, 等. 强精煎介导 PI3K/Akt/mTOR 通路调控少精子症大鼠精子发生的实验研究[J]. 中医药信息, 2022, 39(7): 33-40.
- [3] 宾彬, 姚重华. 强精煎治疗少弱精子症 62 例疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(11): 1586-1587.
- [4] 宾彬, 王杰, 陈定雄, 等. 强精煎治疗少弱精子症临床疗效及安全性研究[J]. 西部中医药, 2012, 25(4): 5-7.
- [5] 郭静, 玄振玉, 谢燕. 中药复方新药药学研究中的问题与思考[J]. 中草药, 2020, 51(8): 2267-2272.
- [6] 刘金花, 黄敏, 马家宝, 等. 参杞强精颗粒制备工艺优化及质量标准的建立[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(4): 141-144.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020 年版): 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 7-11.
- [8] 赵毛香, 吴雪茹, 周艳, 等. 筋骨疗伤贴膏中药提

取工艺筛选优化及制剂成型工艺研究[J]. 中药材, 2021, 44(12): 2904-2907.

- [9] 张建伟, 马静雅, 刘力. 中药个性化给药口服固体剂型剂型选择与制备探讨[J]. 中医药导报, 2020, 26(12): 36-39.
- [10] 王萍, 许刚, 王宇鹤, 等. 通脉无蔗糖颗粒成型工艺的优化[J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(3): 74-78.
- [11] 赵文聪. 替格瑞洛片的制备及其工艺稳定性研究[J]. 食品与药品, 2019, 21(1): 65-70.
- [12] 谢谭芳, 程哲, 覃春捷. 层次分析-熵权法结合星点设计-响应面法优选艾纳香配方颗粒成型工艺[J]. 中国药业, 2023, 32(13): 50-55.
- [13] 覃新华, 戴薇萍, 胡传义. 星点设计-效应面法优选复方益肾利石颗粒的成型工艺[J]. 中国医药导刊, 2022, 24(3): 222-228.
- [14] 张东元, 张青铃, 罗友华, 等. 复方板蓝根利咽颗粒防潮制粒工艺优化[J]. 中成药, 2023, 45(2): 545-549.
- [15] 应力健, 陈宁姿, 樊丽, 等. 养血清脑颗粒成型工艺研究[J]. 中药材, 2022, 45(10): 2457-2459.

(收稿日期: 2023-10-08 修回日期: 2023-12-11)

(上接第 1444 页)

- [4] BRANAS CASAS R, ZUPPARDO A, RISATO G, et al. Zebrafish *polg2* knock-out recapitulates human POLG-disorders; implications for drug treatment[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(4): 281.
- [5] ZHENG N, YAN J, QIAN W, et al. Comparison of developmental toxicity of different surface modified CdSe/ZnS QDs in zebrafish embryos[J]. J Environ Sci(China), 2021, 100: 240-249.
- [6] AI F, HUANG X, WU Y, et al. Alleviative effects of a novel strain *Bacillus coagulans* XY2 on copper-induced toxicity in zebrafish larvae[J]. J Environ Sci(China), 2023, 125: 750-760.
- [7] 邱钺姿, 王传森, 徐风华, 等. 基于斑马鱼模型和代谢组学技术的西洋参抗骨质疏松作用机制研究[J]. 药学学报, 2023, 58(7): 1894-1903.
- [8] 任玉平, 张变红. 斑马鱼模型在炎症性肠病研究中的应用[J]. 生物学教学, 2023, 48(4): 2-4.
- [9] 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.

- [10] 夏广清, 姚慧敏, 董丽红, 等. 灵芝多糖对斑马鱼存活、发育和衰老的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(4): 491-496.
- [11] 陈美琳, 李芝奇, 范琦琦, 等. 基于斑马鱼模型研究闹羊花肝损效应及其作用机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(1): 140-147.
- [12] 何俊霖, 于思, 曹治兴, 等. 异甘草素对斑马鱼胚胎发育、血管生成和心脏的影响[J]. 四川动物, 2018, 37(6): 672-677.
- [13] BO Z, XIANG Q, SHAN-MING R, et al. Investigation on molecular mechanism of fibroblast regulation and the treatment of recurrent oral ulcer by *shuizhongcao* granule-containing serum[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 324091.
- [14] ZHOU H R, LIN X P. Oral mucosal diseases and psychosocial factors: Progress in related neurobiological mechanisms [J]. J Int Med Res, 2023, 51(12): 3000605231218619.

(收稿日期: 2023-08-17 修回日期: 2023-12-20)