

白藜芦醇对阿司咪唑诱导斑马鱼心脏损伤的保护作用

薛迪^{1,2}, 韩利文², 杨继芳³, 何秋霞², 王雪²,
侯海荣², 张爱平^{1*}, 刘可春^{2*}

(1. 山西医科大学药学院, 山西太原 030001; 2. 山东省科学院生物研究所, 山东省生物传感器重点实验室, 山东济南 250014; 3. 青岛开发区第一人民医院护理部, 山东青岛 266555)

摘要: 探讨不同浓度的白藜芦醇对阿司咪唑诱导斑马鱼胚胎心脏损伤的保护作用。采用发育正常的 48 hpf 斑马鱼胚胎作为实验模型, 加入阿司咪唑(4 $\mu\text{mol/L}$) 后再加入不同浓度的白藜芦醇处理上述胚胎, 于 72 hpf 观察胚胎心脏的形态、心率及静脉窦-动脉球(SV-BA) 的变化。结果发现阿司咪唑模型对照组在给药后出现心脏损伤现象, 包括心包水肿、心脏周围血细胞堆积、心率减慢和 SV-BA 间距的缩短, 白藜芦醇给药组对上述损伤情况改善明显, 并且随着给药浓度的增加, 阿司咪唑诱导的心脏毒性作用明显减小。研究认为白藜芦醇对阿司咪唑诱导的斑马鱼心脏毒性有一定的保护作用。

关键词: 斑马鱼; 心脏损伤; 心率; 阿司咪唑; 白藜芦醇; 保护作用

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-4026(2015)03-0029-05

Protection effect of resveratrol to astemizole-induced cardiac injury of zebrafish embryos

XUE Di^{1,2}, HAN Li-wen², YANG Ji-fang³, HE Qiu-xia², WANG Xue²,
HOU Hai-rong², ZHANG Ai-ping^{1*}, LIU Ke-chun^{2*}

(1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensors, Biology Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China; 3. Department of Nursing, The First Peoples Hospital of Qingdao Development Zone, Qingdao 266555, China)

Abstract: We explore the protection effect of different concentrations resveratrol to astemizole-induced cardiac injury of zebrafish embryos. We treat zebrafish embryos with 4 $\mu\text{mol/L}$ astemizole and different concentrations resveratrol with normal growth 48 hpf zebrafish embryo as an experimental model. We observe cardiac phenotypes, heart rates and the variation of SV-BA at 72 hpf. Astemizole group shows heart injury such as pericardium edema, blood cell accumulation around the heart, heart rate reduction and SV-BA interval shortening after drug feeding. However, astemizole-induced heart toxicity significantly decreases with the increase of resveratrol concentration for resveratrol group. We therefore think resveratrol can protect astemizole-induced cardiac injury of zebrafish embryos.

收稿日期: 2015-04-02

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81202584, 31400979); 山东省自主创新成果转化重大专项(2014ZZCX0215); 山东省中医药科学技术研究项目(2013-173)

作者简介: 薛迪(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。

* 通讯作者, 张爱平(1965-), 女, 博士, 教授, 研究方向为药物小分子与生物大分子的相互作用。Email: zhangap1@163.com。

刘可春(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为药物筛选。Email: hliukch@sdas.org

Key words: zebrafish; cardiac injury; heart rate; astemizole; resveratrol; protection

由于药物不良反应所造成的心脏毒性已成为药品撤市的主要原因和制药工业必须面对的首要安全问题,建立快速检测心脏毒性的筛选模型进行早期预测评价,对于降低新药研发风险以及上市药物的再评价都具有重要意义。

斑马鱼个体小,易于饲养,雄鱼体修长,雌鱼体肥大,可在有限的空间内繁殖相当的群体,满足样本需求量大的研究。其幼鱼通体透明,器官清晰可见,血细胞在心脏和血液循环系统的堆积非常容易观察到,并且应用于心脏损伤和逆转实验也极为方便^[1]。该模型由于经济、快速、预测性好和可比度高的特点,目前已被越来越多的药物研发机构应用在安全性评价中^[2-3]。

阿司咪唑(Astemizole, Ast)属第二代无镇静作用的抗组胺 H1 受体阻断药,常用于过敏性鼻炎、过敏性结膜炎、慢性荨麻疹、皮肤划痕症及其他过敏性症状,可引起心脏 Q-T 间期延长、室性心律不齐,甚至发生尖端扭转性室性心动过速导致患者死亡^[4-5],主要抑制房室传导和窦房传导,减慢窦性心律^[6]。白藜芦醇(Resveratrol, Res)化学名为 3,5,4-三羟基-1,2-二苯乙烯,是含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物,分子式为 $C_{14}H_{12}O_3$ ^[7]。白藜芦醇广泛存在于松树、虎杖、藜芦、桑椹、决明子、葡萄和花生等天然植物或果实中,是一种天然的抗氧化剂,可降低血液粘稠度,抑制血小板凝结和血管舒张,保持血液畅通,预防癌症的发生及发展,对动脉粥样硬化和冠心病、缺血性心脏病和高血脂具有防治作用^[8]。许多研究表明,白藜芦醇具有通过模拟或激发机体内源性物质而诱导心肌保护作用的药物预适应作用,能减轻心肌缺血^[9]。Hattori 等^[10]在离体灌流大鼠心脏缺血再灌注模型上发现,白藜芦醇 10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理能显著降低心肌中的丙二醛含量,改善缺血后的心室功能,使用白藜芦醇和缺血后处理都可以对这种损伤起到修复和保护作用。本实验以斑马鱼为模型,观察白藜芦醇对阿司咪唑引起斑马鱼心脏毒性后的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

AB 系斑马鱼取自于山东省科学院斑马鱼药物筛选平台。阿司咪唑购自中国生物制品检定所,生产批号:100301-199901。白藜芦醇购自中国生物制品检定所,生产批号:111535-200502。苯硫脲(PTU)购自 Sigma 公司,配成浓度 0.003 g/L。

1.2 仪器与设备

SZX16 体视荧光显微镜(日本 Olympus 公司),DP2-BSW 图像采集系统(日本 Olympus 公司),IX51 奥林巴斯倒置显微镜,Micro Publisher 5.0 RTVCCD(日本 Olympus 公司),斑马鱼养殖饲养设备(北京爱生科技公司),光照培养箱(上海基星生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 斑马鱼胚胎的收集

雌雄斑马鱼分开饲养,按照光照/黑暗 14 h/10 h,实验时将雌雄鱼(2:1)放入交配缸,次日收集的胚胎,放置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,20~21 h 后在显微镜下观察及时挑出死亡或者畸形胚胎,24 h 后加入 0.003 g/L 苯硫脲^[11]处理胚胎。

1.3.2 加药处理对斑马鱼心脏形态及心率的影响

在体视显微镜下选取发育正常的 48 hpf(hour post fertilization)斑马鱼胚胎,设置含有 0.1% DMSO 的水溶液为空白对照组,4 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑^[12]模型对照组,以及浓度分别为 5、20、60 $\mu\text{g/mL}$ 白藜芦醇且分别加有 4 $\mu\text{mol/L}$ 阿司咪唑的 3 组实验组。将上述斑马鱼胚胎加入 24 孔板,每孔加入 10 条,置于恒温培养箱中,于次日观察。在 IX51 倒置显微镜下应用 Image-Pro Plus 中文版 6.0 软件观察斑马鱼心脏外观、血细胞是否

出现堆积等现象并拍照,使用 View Point AP plicationMan ager 软件测量心率。

1.3.3 斑马鱼静脉窦-动脉球(SV-BA)间距离的测量

静脉窦是血液进入心房的部位,动脉球是血液流出心室的部位。正常发育过程心房和心室从侧面观察部分重叠,若发育过程受阻,心房和心室的位置将发生改变,SV-BA 之间的距离也会相应改变。因此 SV-BA 间距能定量反映药物对斑马鱼心脏的影响程度^[13]。使用 IX51 倒置显微镜将斑马鱼胚胎拍照,通过 Imagepro-plus 软件测定 SV-BA 间距。

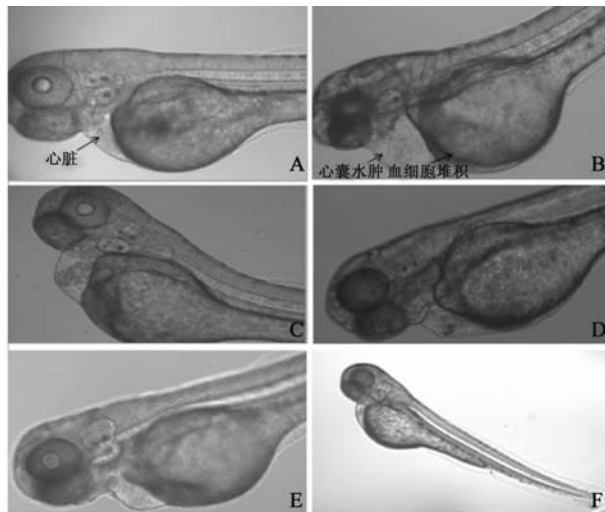
1.3.4 统计学分析

采用 SPSS18.0 对实验数据进行统计,数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素 ANOVA 分析,与对照组比较, $P \leq 0.05$ 表示有显著性差异, $P \leq 0.01$ 表示有极其显著性差异。

2 结果

2.1 斑马鱼心脏形态的变化

由图 1A 可知,空白对照组斑马鱼发育正常,脱膜孵化为幼鱼,心血管系统无形态学改变。阿司咪唑模型对照组加药处理 24 h 后出现心囊水肿、血细胞堆积、卵黄囊凹陷、血流缓慢或无血流循环等现象(图 1B),阿司咪唑对心脏损伤造模成功。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇待试药组与阿司咪唑模型对照组相比未见明显改善,心脏形态改变不明显(图 1C)。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇待试药组显示心囊水肿减少,出血症状得到缓解(图 1D,E),并且这种改善与白藜芦醇浓度正相关。60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇处理后斑马鱼整体形态未见改变(图 1F)。



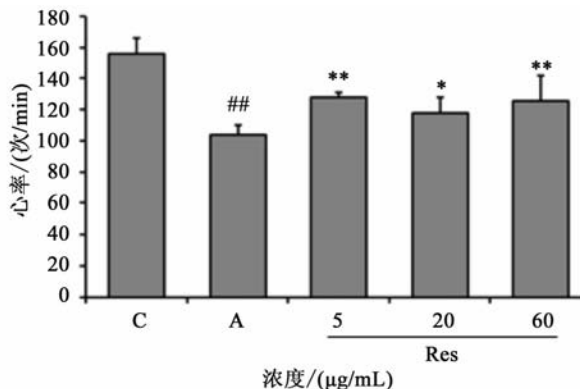
A 空白对照组 B 阿司咪唑模型组 C 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇组 D 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇组;
E 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇组 F 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白藜芦醇处理后的斑马鱼整体形态

图 1 白藜芦醇对阿司咪唑引起的斑马鱼心脏形态的变化

Fig. 1 Resveratrol variation for astemizole-induced zebrafish

2.2 斑马鱼心率的变化

图 2 结果显示,阿司咪唑模型组心率较空白对照组明显降低,心房、心室跳动不一致,心室停止跳动。加入白藜芦醇后房室跳动趋于一致,心率逐渐恢复。阿司咪唑组与空白组对比出现了明显的改变 ($P \leq 0.01$),3 个浓度的白藜芦醇组与阿司咪唑组相比具有显著性差异,说明白藜芦醇对阿司咪唑诱导的心率降低有逆转作用。



C 为空白组, A 为阿司咪唑对照组。与空白组比较, ## $P \leq 0.01$;

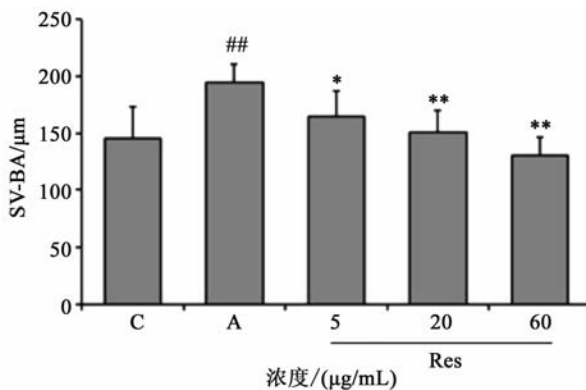
与阿司咪唑对照组比较, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, $n = 3$ 。

图 2 不同浓度白藜芦醇对 72 hpf 斑马鱼心率的影响

Fig. 2 Impact of different concentrations resveratrol on the heart rate of 72 hpf zebrafish

2.3 斑马鱼 SV-BA 间距的变化

通过测量斑马鱼的 SV-BA 间距,可以反映化合物对斑马鱼的心脏毒性作用。阿司咪唑组与空白对照组相比 SV-BA 间距增长,具有显著性差异($P \leq 0.01$),白藜芦醇组与阿司咪唑组比较均体现了显著性差异,且随着白藜芦醇浓度的增加,呈现明显的剂量依赖性(图 3)。



C 为空白组, A 为阿司咪唑对照组。与空白组比较, ## $P \leq 0.01$;

与阿司咪唑对照组比较, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, $n = 3$ 。

图 3 不同浓度白藜芦醇对 72 hpf 斑马鱼 SV-BA 间距的影响

Fig. 3 Impact of different concentrations resveratrol on SV-BA interval of 72 hpf zebrafish

3 讨论

本实验以斑马鱼心脏外观形态、心率和 SV-BA 间距作为评价心脏的指标,反映出药物对斑马鱼心脏功能的影响。实验中加入阿司咪唑的斑马鱼对照组除出现心率降低、房室传导阻滞外,在心脏周围还存在血细胞堆积、心脏缺血的异常现象。实验结果表明,白藜芦醇对阿司咪唑诱导斑马鱼心脏损伤模型有明显的保护修复作用,白藜芦醇加药后,斑马鱼房室传导逐渐恢复,SV-BA 间距比阿司咪唑组缩短,趋于接近正常组,有明显改善心脏功能的作用,该效应与给药剂量呈正相关,有必要在此基础上进一步深入探讨其作用机制及作用靶点。综上所述,白藜芦醇对阿司咪唑诱导的心脏损伤具有修复和保护作用,但是具体机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1]朱俊靖,陈汝家,张勇,等. 斑马鱼模型在药物毒性与安全性评价中的应用[C]// 华东地区第十二届实验动物科学学术交流会. 宁波,2012.
- [2]HE J H, GAO J M, HUANG C J, et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2014, 42: 35 – 42.
- [3]PARNG C. In vivo zebrafish assays for toxicity testing[J]. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2005, 8(1): 100 – 106.
- [4]LEE E H, OH J H, PARK H J, et al. Simultaneous gene expression signature of heart and peripheral blood mononuclear cells in astemizole-treated rats[J]. *Archives of Toxicology*, 2010, 84(8): 609 – 618.
- [5]王君,胡霞敏,曾繁典,等. 阿司咪唑上市后心脏毒性安全性评价文献调研[J]. *药物流行病学杂志*, 2009, 18(2): 85 – 87.
- [6]郑卫红,明章银,胡本容,等. 阿司咪唑对大鼠离体心脏心电图的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(6): 682 – 685.
- [7]李亚静,王保玉. 白藜芦醇的研究进展[J]. *云南化工*,2010,37(5): 70 – 74.
- [8]熊小春,安春妹. 白藜芦醇抗肿瘤的研究进展[J]. *黑龙江医药*,2010,23(1):59 – 61.
- [9]DAS S, CORDIS G A, MAULIK N, et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol: Role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2005, 288(1): H328 – H335.
- [10]HATTORI R, OTANI H, MAULIK N, et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol:Role of nitric oxide[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2002, 282(6): H1988 – H1995.
- [11]孙桂金,潘杰,刘可春,等. 苯硫脲对斑马鱼黑色素生成及早期发育的影响[J]. *水产科学*, 2011, 30(7): 387 – 390.
- [12]吴晓敏,何秋霞,韩利文,等. 阿司咪唑对斑马鱼心脏毒性的初步研究[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(9): 1251 – 1254.
- [13]MITTELSTADT S W, HEMENWAY C L, CRAIG M P, et al. Evaluation of zebrafish embryos as a model for assessing inhibition of hERG[J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2008, 57(2): 100 – 105.