

芦荟大黄素对斑马鱼胚胎发育及运动行为学的毒性研究

何秋霞¹,董贞兰^{1,2},楚杰¹,孙桂金²,韩利文¹,韩健¹,刘可春^{1*}

(1. 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;2. 齐鲁工业大学,山东 济南 250353)

摘要:以斑马鱼胚胎为模型,研究芦荟大黄素对胚胎发育和行为学的影响。结果显示,1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上浓度的芦荟大黄素对斑马鱼胚胎有致死作用,随着浓度的增加和作用时间延长而增强。芦荟大黄素对斑马鱼胚胎的孵化过程有阻滞作用,1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上浓度的芦荟大黄素使斑马鱼胚胎出现了卵黄延伸异常、发育迟缓和身体弯曲等畸形现象,但是对斑马鱼仔鱼的运动行为学无明显影响。本实验结果提示,临床应用芦荟大黄素治疗如孕妇这类特殊病人时,应充分考虑药物的剂量和用药时间。

关键词:芦荟大黄素;斑马鱼;发育毒性;行为学

中图分类号:R965.1;R285 文献标识码:A 文章编号:1002-4026(2015)03-0023-06

Toxicity of aloe-emodin to embryos growth and behavior of zebrafish

HE Qiu-xia¹, DONG Zhen-lan^{1,2}, CHU Jie¹, SUN Gui-jin²,
HAN Li-wen¹, HAN Jian¹, LIU Ke-chun^{1*}

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensors, Biology Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China; 2. Qilu University of Technology, Jinan 250353, China)

Abstract: We addressed the impact of aloe-emodin on embryos growth and behavior of zebrafish with zebrafish embryo as a model. Experimental results show that aloe-emodin of more than 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration has lethal effect to zebrafish embryos. This effect is strengthened with the increase of concentration and action time. Aloe-emodin has obstruction effect to the incubation of zebrafish embryos. Aloe-emodin of more than 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration makes zebrafish embryos to exhibit such malformation as yolk abnormal extension, growth retardation and body bending. However, Aloe-emodin has no obvious effect on the behavior of zebrafish larvae. Experimental results demonstrate that we should fully consider aloe-emodin dosage and medication time when we clinically apply aloe-emodin to the treatment for such special patients as pregnant women.

Key words: aloe-emodin; zebrafish; developmental toxicity; behavior

芦荟大黄素是一种蒽醌衍生物的单体,存在于多种植物的根和树皮中,是芦荟的重要有效成分。芦荟大黄素不但具有抗菌、免疫抑制、泻下和降脂减肥等作用,还能够抑制肿瘤细胞的生长,可以通过抑制癌细胞的DNA、RNA和蛋白质的生物合成来抑制P388白血病细胞,延长生存期^[1-3]。芦荟大黄素泻下作用较强,通

过刺激肠壁蠕动,同时由于渗透压的改变,有利于肠道内废物的排除,从而达到刺激性缓泻,这种刺激泻下作用对便秘和痔疮有特殊疗效。

芦荟大黄素和大黄素都是中药大黄的游离蒽醌类化合物(图1)。药理研究发现,大黄蒽醌衍生物、大黄酸、大黄素和芦荟大黄素均有明显的抗癌作用^[4-7]。有研究表明大黄素能够引起孕鼠子宫内膜微细结构损害,使得受孕率降低和胚胎死亡率升高,胎儿的性别比例和形态发展也受到明显影响^[8]。小鼠属于哺乳动物胚胎在母体体内发育,母体的解毒系统会减小大黄素对胚胎的影响,因此应排除母体影响。

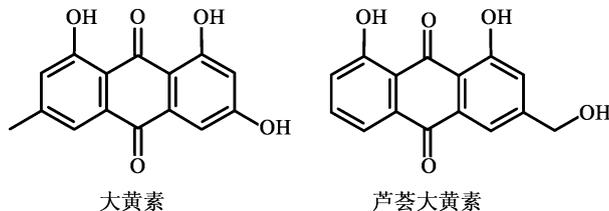


图1 大黄素和芦荟大黄素的结构式

Fig. 1 Structure of emodin and aloe-emodin

何秋霞等^[9]研究发现大黄素对斑马鱼胚胎发育具有毒性作用。斑马鱼是近年来药物安全研究方面普遍使用的新型模式生物,在基因水平上87%与人类同源,因其具有个体小、产卵多、发育快、体外受精、胚胎透明、易于观察以及饲养简便等优点,很快成为分子发育生物学、遗传学、环境毒理学和免疫学等学科的模式生物,同时在药物毒性研究方面发挥了越来越重要的作用^[10-13]。本文以斑马鱼胚胎为模型研究不同浓度的芦荟大黄素对胚胎发育和运动行为学的影响。

1 实验材料与仪器

1.1 主要试剂及其配制

芦荟大黄素购自山东省食品药品检验研究院,纯度为99%以上。芦荟大黄素用二甲基亚砜配置成5.0、1.0、0.5、0.1 mg/mL的母液备用,使用时用培养用水稀释成工作液使用。

1.2 实验动物

实验用鱼为AB品系野生型和转基因型(VEGFR2:EGFP)斑马鱼,鱼种取自山东省科学院斑马鱼药物筛选平台。斑马鱼在14 h光照和10 h黑暗的光周期28℃左右的条件下培养。采卵时取健康性成熟的斑马鱼按♀♂1:1的比例放入交配缸内,次日9~10 h获得受精卵。对受精卵进行消毒和洗涤后移入斑马鱼胚胎培养用水(含5.0 mmol/L NaCl,0.17 mmol/L KCl,0.4 mmol/L CaCl₂,0.16 mmol/L MgSO₄)中,28℃下控光培养。

1.3 实验仪器

Viewpoint zebra box 斑马鱼行为分析仪,奥林巴斯SZX16立体荧光显微镜,奥林巴斯X51倒置相差显微镜。

2 实验方法

2.1 化合物与胚胎共孵育

实验中芦荟大黄素的浓度分别设置为0、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 μg/mL,空白对照组根据工作液的稀释情况,加入相应的二甲基亚砜,工作液中二甲基亚砜的含量小于0.5%(V/V)。有研究表明,1.0%(V/V)以下的二甲基亚砜对斑马鱼胚胎没有明显毒性作用^[12]。实验中使用24孔和6孔细胞培养板,每孔分别加培养水2 mL和10 mL,胚胎(幼鱼)7个和25个,振动孔板使溶液混合均匀。

2.2 胚胎发育观察和记录

受精后1 h左右的胚胎与不同浓度的芦荟大黄素共同孵育。每隔24 h观察记录一次胚胎的死亡量和孵

化量,是否死亡通过心跳来判断,每天清除死胚胎和碎屑。使用奥林巴斯 SZX16 立体荧光显微镜观察和记录斑马鱼形态异常。

2.3 行为学实验

斑马鱼幼鱼行为学分析方法参考文献[13]进行,设定芦荟大黄素 0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组和空白对照组,24孔板每孔一只 72 hpf (hours post fertilization) 胚胎,每个实验组 8 个胚胎,将 24 孔板放入培养箱孵育 48 h,然后将 24 孔板放入斑马鱼行为学分析系统的暗箱中,使用 zeb lab 软件分别采集 10、20 min 内各组总游行距离和游行时间,本次实验的运动参数临界值设定是 1.8~4.3,其中游行速度由总距离/游行时间得到,各数值分别计入统计。

2.4 数据分析

采用数据统计软件 SPSS 16.0 对实验数据求均值,并进行样本均数间多重比较。

3 结果及分析

3.1 芦荟大黄素对斑马鱼胚胎死亡的影响

通过图 2 可以看出在胚胎发育 24 h 之前,芦荟大黄素在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下浓度不会引起胚胎死亡,1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上浓度导致 30% 以上的胚胎死亡。芦荟大黄素的致死作用随着浓度的增加和作用时间延长而增强。

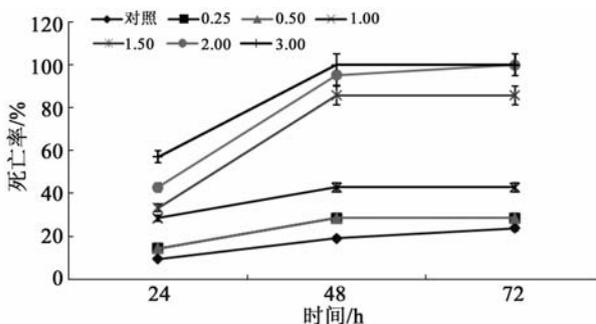


图 2 不同浓度芦荟大黄素对斑马鱼胚胎死亡率的影响

Fig.2 Impact of different concentrations aloë-emodin on mortality of zebrafish embryos

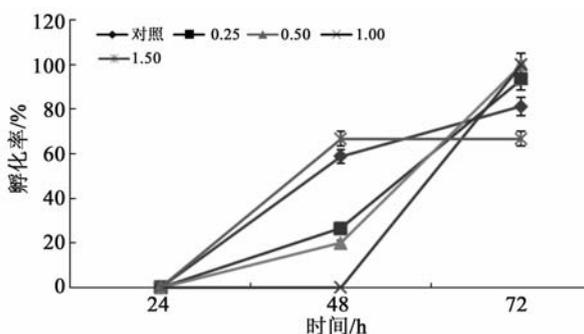


图 3 斑马鱼胚胎在不同浓度芦荟大黄素的孵化率

Fig.3 Hatch rate of zebrafish embryos in different concentrations aloë-emodin

3.2 芦荟大黄素对斑马鱼胚胎孵化率的影响

斑马鱼胚胎在 48 h 开始孵出,因此记录由 48 h 开始。受精后 48 h 的统计结果显示对照组和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素组的孵化率较高。这可能是 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素处理组胚胎死亡数量较多引起的。受精后 48~72 h,1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下浓度处理组的孵化率明显上升,和对照组无显著性差异。图 3 结果说明 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下浓度芦荟大黄素处理组对斑马鱼胚胎发育的孵化有阻滞作用,但是随着时间延长,芦荟大黄素对整组的孵化率并无显著影响。

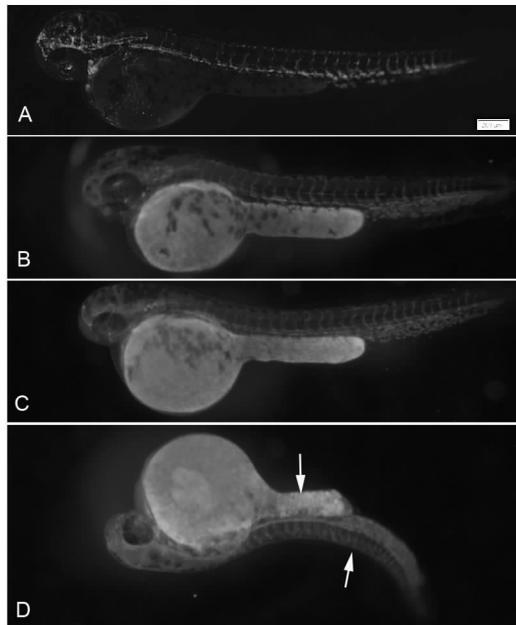
3.3 不同浓度的芦荟大黄素对斑马鱼胚胎发育的形态影响

由图 4~5 可以看出,1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上浓度的芦荟大黄素使斑马鱼胚胎出现了卵黄延伸异常、发育迟缓和身体弯曲畸形等症状(图中箭头所示),说明一定剂量的芦荟大黄素能延缓胚胎发育,对斑马鱼胚胎发育有致畸的作用。图 5 所用的斑马鱼为转基因 TG (VEGFR2:EGFP) 品系,荧光标记了血管,从图 5 可以看出,芦荟大黄素对斑马鱼的血管生成没有明显影响。

A 对照 B 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素 C 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素
D 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素 E 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素 F 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素

图 4 斑马鱼胚胎发育的形态学观察结果(24 hpf)

Fig. 4 Growth morphology of zebrafish embryos (24 hpf)



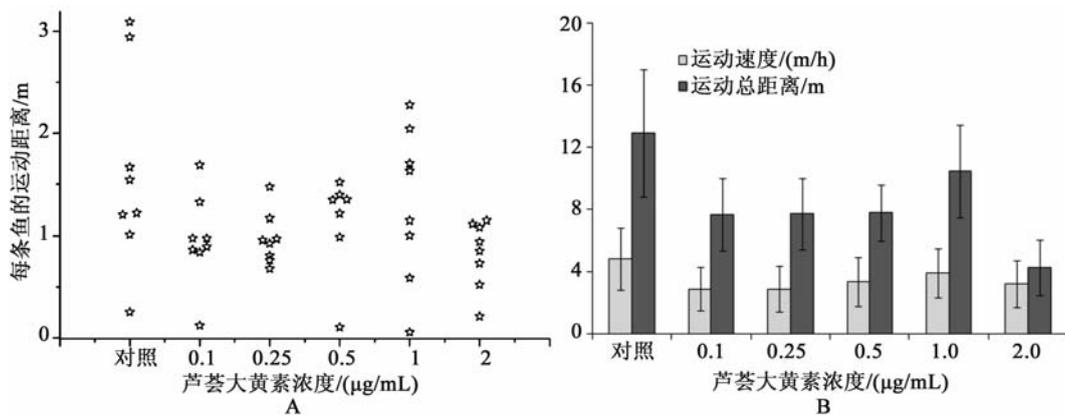
A 对照 B 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素 C 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素 D 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素

图 5 斑马鱼胚胎发育的形态学观察结果(48 hpf)

Fig. 5 Growth morphology of zebrafish embryos (48 hpf)

3.4 芦荟大黄素对斑马鱼运动行为的影响

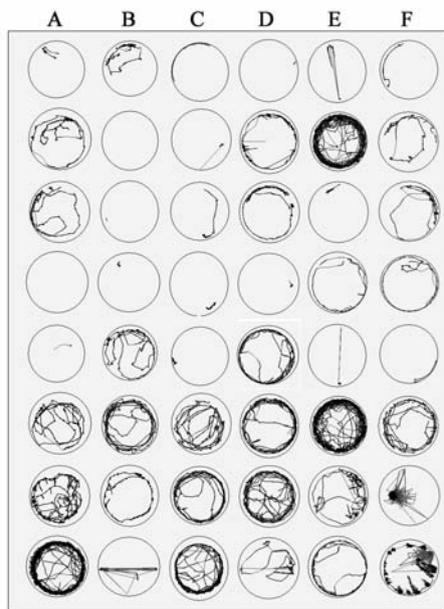
20 min 运动轨迹结果显示,2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芦荟大黄素组的运动距离、运动平均速度和每个斑马鱼的运动距离与对照组无明显差异(图 6~7)。说明芦荟大黄素对斑马鱼仔鱼(5 dpf)的运动行为无明显影响。



A 每个斑马鱼 20 min 内的运动距离 B 每个实验组中所有受试斑马鱼仔鱼,在 20 min 内的运动总距离和平均运动速度。

图6 芦荟大黄素对斑马鱼行为学的影响

Fig. 6 Impact of aloe-emodin on the behavior of zebrafish embryos



A 对照组 B 0.1 μg/mL 芦荟大黄素 C 0.25 μg/mL 芦荟大黄素; D 0.5 μg/mL 芦荟大黄素 E 1.0 μg/mL 芦荟大黄素 F 2.0 μg/mL 芦荟大黄素

图7 斑马鱼行为轨迹图

Fig. 7 Behavior trajectory of zebrafish larva

4 讨论

美国学者诺尔曼泰勒将大黄列为“有全球影响”的十几种传统药物之一,目前对大黄有效成分的药理作用研究主要集中在蒽醌类化合物。中药大黄广泛用于保肝利胆、消炎、抗菌、抗病毒、抗凝血、降血脂、抗衰老和抗癌等,常用于便秘、胆囊炎、肝炎、糖尿病肾病和慢性肾功能衰竭等疾病的治疗^[14]。有研究发现大黄使用中有肝肾毒性和致癌性等副作用,但是此方面的研究有很多矛盾的地方,尚无明确的定论。笔者在研究中发现大黄素具有发育毒性,但对于芦荟大黄素的毒性报道较少。

本实验结果说明,芦荟大黄素对心血管系统的发育毒性不明显,但是高于一定剂量的芦荟大黄素对斑马鱼胚胎发育具有致死和致畸作用。行为学实验是在动态与整体水平上研究生命活动的本质^[15]。以各器官形态已经发育完成的斑马鱼为模型,评价芦荟大黄素对其行为学的影响,结果表明芦荟大黄素对斑马鱼仔鱼无明显毒性。说明芦荟大黄素对于相对发育成熟的胚胎无严重毒性。本实验结果提示,临床应用芦荟大

黄素治疗如孕妇这类特殊病人时,应充分考虑药物的剂量和用药时间。

参考文献:

- [1]朱淑珍,李银保,陈缙光,等.不同酒制大黄对斑马鱼胚胎发育的影响研究[J].时珍国医国药,2014,25(4):796-798.
- [2]路铭,陈琼华.中药大黄的生化学研究 XXIX.蒽醌衍生物对小鼠 P388 白血病的抑制作用[J].中国药科大学学报,1989,20(3):155-157.
- [3]何振辉,黄越群,翁闪凡,等.芦荟大黄素对高转移乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭与转移的影响[J].中药材,2013,36(9):1481-1485.
- [4]傅兴圣,陈菲,刘训红,等.大黄化学成分与药理作用研究新进展[J].中国新药杂志,2011,20(16):1534-1538.
- [5]阮志燕,商玲,邓向亮,等.大黄素对 CT26 结肠癌小鼠调节性 T 细胞功能的影响[J].实用医学杂志,2014,30(15):2377-2380.
- [6]陈云龙,侯华新,莫春燕,等.激光共聚焦显微镜实时动态观察不同微环境中鼻咽癌细胞摄取大黄素差异研究[J].药物分析杂志,2014,34(3):485-489.
- [7]胡永淑.大黄炮制前后物质基础变化研究[J].中国药房,2014,25(11):1016-1018.
- [8]JAHNKE G D, PRICE C J, MARR M C, et al. Developmental toxicity evaluation of emodin in rats and mice[J]. Birth Defects Res (Part B), 2004, 71(2): 89 - 101.
- [9]HE Q X, LIU K C, WANG S F, et al. Toxicity induced by emodin on zebrafish embryos[J]. Drug and Chemical Toxicology, 2012, 35(2): 149 - 154.
- [10]RALD ÚA D, PIÑA B. In vivo zebrafish assays for analyzing drug toxicity[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2014, 10(5): 685 - 697.
- [11]陈维云,何秋霞,彭维兵,等.利用斑马鱼模型评价 Vc 和异 Vc-Na 抑制黑色素的生物活性[J].山东科学,2014,27(6):31-37.
- [12]HALLARE A, NAGEL K, KOHLER H R, et al. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (Danio rerio) embryos[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2006, 63(3):378-388.
- [13]陈锡强,侯海荣,刘可春,等.苍耳子提取物对斑马鱼的发育及运动行为的毒性研究[J].山东科学,2014,27(5):9-13.
- [14]王清秀,吴纯启,廖明阳.大黄及其主要成分的毒性毒理研究[J].毒理学杂志,2007,21(4):301-302.
- [15]DAMICO D, ESTIVILL X, TERRIENTE J. Switching to zebrafish neurobehavioral models: The obsessive-compulsive disorder paradigm [J]. Eur J Pharmacol, 2015, S0014-2999(15):242-243.