

# 冰片对斑马鱼胚胎发育的安全性评价<sup>△</sup>

陈怡君<sup>1\*</sup>, 蒲韵竹<sup>2</sup>, 颜慧<sup>2</sup>, 钟玉绪<sup>2</sup>, 王卓<sup>2</sup>, 李春杰<sup>2</sup>, 查晓丹<sup>2</sup>, 赵宝全<sup>2#a</sup>, 刘萍<sup>1#b</sup> (1.解放军总医院药剂科, 北京 100853; 2.军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

中图分类号 R99 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1733-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.02

**摘要** 目的: 研究冰片对斑马鱼胚胎发育的影响。方法: 以斑马鱼胚胎为模型, 二甲亚砜为助溶剂, 制备冰片溶液(33.6、67.1、134.3、268.5、537.0、1 074.0 μmol/L, 即冰片①、②、③、④、⑤、⑥组), 并且设空白对照组, 以受精后小时(hpf)为时间段, 对3 hpf胚胎进行暴露染毒处理, 每24 h更换1次冰片溶液, 分别在8、24、48、72、96 hpf时间点以显微镜观察斑马鱼胚胎发育形态, 测定24 hpf斑马鱼胚胎自主抽动次数、48 hpf心率、孵化率、畸形率和死亡率。实时荧光定量聚合酶链反应法检测斑马鱼胚胎Sepn1基因表达的情况。结果: 与空白对照组比较, 冰片④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎48 hpf出现脊柱弯曲、心囊水肿、卵黄囊水肿、游泳异常的毒性症状; 冰片②、③、④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎24 hpf自动抽动次数减少; 冰片④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎24 hpf心率减少; 在48 hpf时, 冰片①、②、③、④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎孵化率降低; 在72 hpf时, 冰片②、③、④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎孵化率降低; 在96 hpf时, 冰片⑤、⑥组斑马鱼胚胎孵化率降低; 冰片④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎96 hpf畸形率增加; 24 hpf后, 冰片④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎死亡率降低; 冰片④组Sepn1 mRNA表达增强, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。结论: 高剂量冰片对斑马鱼胚胎发育有明显影响, 且呈现一定的时间依赖性。建议婴幼儿、孕妇和哺乳期的妇女长时间或大剂量使用含冰片的药物均应谨慎。

**关键词** 冰片; 斑马鱼; 胚胎发育; 婴幼儿用药

## Safety Evaluation of Borneol in the Development of Zebrafish Embryos

CHEN Yi-jun<sup>1</sup>, PU Yun-zhu<sup>2</sup>, YAN Hui<sup>2</sup>, ZHONG Yu-xu<sup>2</sup>, WANG Zhuo<sup>2</sup>, LI Chun-jie<sup>2</sup>, ZHA Xiao-dan<sup>2</sup>, ZHAO Bao-quan<sup>2</sup>, LIU Ping<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of borneol on the development of zebrafish embryos. METHODS: Dimethyl sulfoxide (DMSO) as solubilizing agent was used to prepare borneol solution (33.6, 67.1, 134.3, 268.5, 537.0, 1 074.0 μmol/L, borneol ①、②、③、④、⑤、⑥ group). Control group was established. With zebrafish embryos as a model, embryos were exposed to borneol solutions 3 hours post fertilization (hpf); the drug solution was replaced every 24 h. The morphology of embryos was observed under microscope at 8, 24, 48, 72 and 96 hpf. 24 hpf spontaneous movements, 48hpf heart rate, hatching rate, embryo deformity rate and mortality rate were detected. The expression of Sepn1 gene was detected with real-time quantitative PCR technique. RESULTS: The times of 24 hpf spontaneous movements was 0. Spinal curvature, pericardial edema, yolk sac edema, abnormal swimming were observed at 48hpf; there was statistical significance between 2 groups ( $P < 0.01$ ). 48hpf heart beats of zebrafish was decreased; there was statistical significance between 2 groups ( $P < 0.05$ ). When the concentration of borneol was 1 074 μmol/L, hatching rate of zebrafish decreased at 96 hpf; there was statistical significance ( $P < 0.01$ ). When the concentration of borneol was  $> 268.5$  μmol/L, deformity rate of zebrafish increased at 96 hpf; there was statistical significance ( $P < 0.01$ ). The mortality showed time-and concentration-dependent relationship. The expression of Sepn1 gene in borneol groups increased after expose to borneol; there was statistical significance between 2 groups ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: High-dose borneol has marked effect on the development of zebrafish embryos in a time-and concentration-dependent manner. It is forbidden for infants, pregnant and lactation women using borneol or the preparation of borneol for long periods or high-dose. Compared with normal control group, Spinal curvature, pericardial edema, yolk sac edema, abnormal swimming at 48 hpf were observed in borneol④、⑤、⑥group, heart beats of zebrafish was decreased at 24 hpf in borneol ④、⑤、⑥ group; hatching rate of zebrafish decreased at 96 hpf in borneol⑤、⑥group; deformity rate of zebrafish increased at 96 hpf in borneol ④、⑤、⑥group; after 24 hpf, rate of embryonic death decreased in borneol④、⑤、⑥ group, the expression of Sepn1 mRNA increased in borneol④group, here was statistical significance between 2 groups ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: Borneol had marked effect on the development of zebrafish embryos and present a time-and concentration-dependent relationship. It is forbidden for infants, pregnant and lactation women using borneol or the preparation of borneol for long periods of time or high dose.

**KEYWORDS** Borneol; Zebrafish; Embryo development; Infant medication

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81173572)

\* 药师, 硕士研究生。研究方向: 药理学。E-mail: jinjing877726453@126.com

#a 通信作者: 副研究员。研究方向: 生化药理学。电话: 010-66874609。E-mail: baoquanzhao@126.com

#b 通信作者: 主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 临床药理学。电话: 0898-38830824。E-mail: liuping13601203271@163.com

开窍中药冰片临床广泛用于内、外、妇、儿、五官等各科, 尤其在中风、冠心病、心绞痛以及头疼、眩晕、失眠、昏迷等心脑血管疾病和中枢神经系统疾病中应用较多, 常单用或以中成药组方使用, 如安宫牛黄丸、复方丹参滴丸、牛黄降压丸。2010版《中国药典》(一部)将冰片列为“孕妇慎用”药物。国内有研究显示, 临床剂量的冰片对于围产期的仔鼠发育无影响, 而高剂量冰片有较明显的围产期毒性, 主要表现在新产仔鼠的

体质量和活产指数低于正常对照组( $P < 0.05$ ),提示冰片对胚胎发育有一定的影响<sup>[1-2]</sup>。为了更安全用药,有必要研究冰片的胚胎毒性。

由于伦理学原因,很少用婴幼儿进行药物观察,动物实验中多用恒河猴、小鼠、爪蟾进行胚胎毒性实验,但由于小鼠的胚胎深埋于母体子宫中无法进行动态观察,恒河猴、爪蟾繁殖太缓慢,而用斑马鱼胚胎进行此类实验较之哺乳动物表现出不可比拟的优势:(1)胚胎取材方便,样本量大。成鱼交配行为受光刺激的影响,可通过调节光周期或雌雄鱼的接触来控制交配行为,使取卵过程可控。每次产卵数百枚,实验可获大量样本。这是哺乳动物无法实现的,使得斑马鱼胚胎成为药物高通量筛选的合适模型。(2)胚胎发育迅速,大幅度缩短实验周期。(3)胚胎在体外发育、胚胎透明,利用显微镜可以直观、清晰地观察各系统的发育过程、内脏形态和活动以及活体状态下药物的作用状态。因此,斑马鱼作为一种新型模式生物,日益成为遗传和发育毒理学研究中备受关注的脊椎动物模型。

目前,国内外关于冰片对胚胎发育的影响尚未见报道。本研究利用斑马鱼研究冰片对胚胎发育的影响,以为合理应用冰片提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

微量移液器(德国Eppendorf公司);X221942H型光学显微镜(日本尼康公司);DP2-BSW型荧光显微镜(日本Olympus公司);斑马鱼循环水养殖系统(北京爱生科技公司);CFX96型实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)仪(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 药品与试剂

冰片(美国Sigma公司,纯度:97%);二甲亚砜(DMSO,北京国药集团化学试剂有限公司,批号:30072492);反转录设计盒(美国Promega公司);总RNA提取试剂盒、SYBR Premix Ex Taq[天根生化科技(北京)有限公司];引物合成由北京赛百盛基因技术有限公司完成。

### 1.3 动物

斑马鱼,♀♂兼用,体质量( $400 \pm 80$ )mg,由北京大学生命科学院提供。本实验室循环养殖系统驯养。水温:( $28 \pm 1$ )℃;pH:7.2;总硬度:62 mg/L(以CaCO<sub>3</sub>计);导率:485 μs/cm;光照/黑暗周期:14 h:10 h。成年斑马鱼每天喂食2次人工孵化的卤虫幼体。

## 2 方法

### 2.1 实验前准备

冰片以DMSO助溶,制备成5 400 mmol/L的母液于4℃贮藏,备用。将冰片母液用养殖水逐级稀释成33.6、67.1、134.3、268.5、537.0、1 074.0 μmol/L 6个浓度(即冰片①、②、③、④、⑤、⑥组),另设空白对照(0.1% DMSO溶液)组。在实验前一晚,将成年♀♂斑马鱼按1:1配对,放入产卵器中,并用隔板分开,第二天早晨给予光照,抽隔板完成交配产卵,用吸管将鱼卵收集于一次性培养皿中,用培养液清洗鱼卵数次以除去未受精卵、粪便等杂物,受精卵置于生化培养箱培养后分组。

### 2.2 冰片对斑马鱼胚胎发育的影响

待斑马鱼胚胎发育至受精3 h(3 hpf)时在显微镜下挑选

正常分裂的鱼卵。选用6孔细胞培养板,每孔分别放入25枚受精卵和相应溶液4 ml。将受试斑马鱼胚胎置于生化培养箱中暴露染毒孵育,过程中死亡斑马鱼胚胎应及时挑出,防止对其它斑马鱼胚胎产生影响。在8、24、48、72、96 hpf时间点于显微镜下观察斑马鱼胚胎发育情况。实验重复4次。

2.2.1 斑马鱼胚胎24 hpf自主抽动次数 斑马鱼胚胎发育至24 hpf时尾部表现出强烈的抽动。记录24 hpf时每个浓度下1 min内斑马鱼胚胎鱼尾的自主抽动次数。

2.2.2 斑马鱼胚胎48 hpf心率 斑马鱼胚胎发育至48 hpf时,即出现规律的心跳,心率是斑马鱼胚胎毒性测试实验中一个非常重要的亚致死毒理学终点,记录48 hpf斑马鱼胚胎10 s内心率。

2.2.3 斑马鱼胚胎孵化率 孵化率是斑马鱼胚胎毒性评价的重要指标之一。正常情况下,斑马鱼胚胎从48 hpf开始孵化,72 hpf大部分胚胎孵化出膜,到96 hpf孵化基本完成。根据公式统计应用冰片后斑马鱼胚胎的孵化率:孵化率=已经孵化的胚胎数/总胚胎数×100%。

2.2.4 斑马鱼胚胎畸形率 斑马鱼胚胎发育至48 hpf以后出现畸形特征,到96 hpf时胚胎的发育基本完成,所以统计胚胎96 hpf的畸形率。畸形率=畸形胚胎数/总胚胎数×100%。

2.2.5 斑马鱼胚胎死亡率 斑马鱼胚胎死亡的判断为肉眼观察早期胚胎不透明,卵凝结;后期胚胎无心脏跳动,发育停止。死亡率=死亡数/总胚胎数×100%。

### 2.3 RT-PCR法测定斑马鱼Sepn1基因的表达

2.3.1 引物设计与合成 根据GeneBank上斑马鱼Sepn1的基因序列(GeneID: 352914)和Beta1的基因序列(GeneID: 57934),应用Primer-premier 5软件设计引物。设计内参基因Beta1作为平衡不同cDNA模板之间浓度差异的基准物, Sepn1引物序列设计如下:上游引物P1: 5'-GGGACTCCA TCCAGCAGACG-3';下游引物: 5'-TGCAGGGTCAGCGTCTC TCC-3';扩增片段长度为317 bp<sup>[9]</sup>。Beta1引物序列设计如下:上游引物P3: 5'-CTCAGGATGCGGAACTGGC-3',下游引物P4: 5'-CATGGACGCCATTGTGAGG-3',基因扩增片段长度为137 bp。

2.3.2 斑马鱼胚胎总RNA的提取及逆转录 总RNA样品从96 hpf冰片④组和空白对照组胚胎中分别提取。总RNA提取按试剂盒说明书进行,重复4次。以总RNA为模板,逆转录合成cDNA,按照试剂盒的操作说明书进行。

2.3.3 RT-PCR的测定 PCR反应体系中以5 μl cDNA作为模板,12.5 μl SYBR Premix Ex TaqTM, 7 μl无核酸酶水,0.25 μl上游引物,0.25 μl下游引物。PCR设定条件为:94℃预变性1 min,94℃变性45 s,62℃退火和延伸1 min,40个循环。PCR反应在RT-qPCR检测系统上进行,用CFX Manager软件进行结果分析。

### 2.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 冰片对斑马鱼胚胎发育的影响

从3 hpf开始染毒后,连续观察了8~96 hpf期间5个时间点冰片各组斑马鱼胚胎不同发育阶段的形态变化。空白对照

组斑马鱼胚胎已能够自由游动。冰片浓度在134.3 μmol/L以下时,胚胎在整个发育进程中的畸形表征不明显。在24 hpf时,冰片各组斑马鱼胚胎未见明显异常。在48 hpf时,冰片④、⑤组斑马鱼胚胎出现脊柱弯曲,冰片⑥组斑马鱼胚胎出现明显的心囊水肿、卵黄囊水肿、脊柱弯曲以及卵黄囊色素沉积。在72 hpf以后,冰片④、⑤组斑马鱼胚胎游泳缓慢;冰片⑥组斑马鱼胚胎全部静止于容器底部。在96 hpf时间点,冰片④、⑤组斑马鱼胚胎出现心囊水肿;冰片⑥组斑马鱼胚胎整体表现出发育缓慢。冰片对斑马鱼胚胎发育的影响见图1。

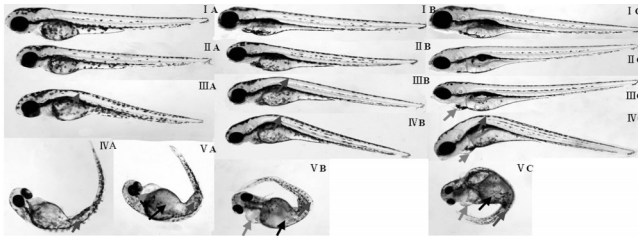


图1 冰片对斑马鱼胚胎发育的影响

I A.空白对照组,48 hpf; I B.空白对照组,72 hpf; I C.空白对照组,96 hpf; II A.冰片③组,48 hpf; II B.冰片③组,72 hpf; II C.冰片③组,96 hpf; III A.冰片④组,48 hpf; III B.冰片④组,72 hpf; III C.冰片④组,96 hpf; IV A.冰片⑤组,48 hpf; IV B.冰片⑤组,72 hpf; IV C.冰片⑤组,96 hpf; V A.冰片⑥组,48 hpf; V B.冰片⑥组,72 hpf; V C.冰片⑥组,96 hpf

Fig 1 Effects of borneol on morphological development of zebrafish embryos

I A.blank control group,48 hpf; I B.blank control group,72 hpf; I C.blank control group,96 hpf; II A.borneol ③ group,48 hpf; II B.borneol ③ group,72 hpf; II C.borneol ③ group,96 hpf; III A.borneol ④ group,48 hpf; III B.borneol ④ group,72 hpf; III C.borneol ④ group,96 hpf; IV A.borneol ⑤ group,48 hpf; IV B.borneol ⑤ group,72 hpf; IV C.borneol ⑤ group,96 hpf; V A.borneol ⑥ group,48 hpf; V B.borneol ⑥ group,72 hpf; V C.borneol ⑥ group,96 hpf

### 3.2 冰片对斑马鱼胚胎24 hpf自主抽动次数的影响

与空白对照组比较,冰片②、③、④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎24 hpf自主抽动次数减少,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。冰片对斑马鱼胚胎24 hpf自主抽动次数的影响见表1。

表1 冰片对斑马鱼胚胎24 hpf自主抽动次数的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Effects of borneol on the rate of spontaneous movements of zebrafish embryos at 24 hpf( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	浓度, μmol/L	自主抽动次数, min
空白对照组		4.50±0.84
冰片①组	33.6	4.33±0.52
冰片②组	67.1	3.67±0.82*
冰片③组	134.3	3.17±0.75**
冰片④组	268.5	2.00±0.89**
冰片⑤组	537.0	0**
冰片⑥组	1074.0	0**

与空白对照组比较: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

vs.blank control group: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

### 3.3 冰片对斑马鱼胚胎48 hpf心率的影响

与空白对照组比较,冰片④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎24 hpf心

率减少,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。冰片对斑马鱼胚胎24 hpf心率的影响见表2。

表2 冰片对斑马鱼胚胎48 hpf心率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Effects of borneol on heart rate of zebrafish embryos at 48 hpf( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	浓度, μmol/L	心率(10 s)
空白对照组		23±1.41
冰片①组	33.6	22.83±0.98
冰片②组	67.1	21.83±0.75
冰片③组	134.3	21.67±1.51
冰片④组	268.5	21.33±1.21*
冰片⑤组	537.0	21.00±1.41**
冰片⑥组	1074.0	17.83±1.47**

与空白对照组比较: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

vs.blank control group: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

### 3.4 冰片对斑马鱼胚胎48、72、96 hpf孵化率的影响

与空白对照组比较,在48 hpf时,冰片①、②、③、④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎孵化率降低;在72 hpf时,冰片②、③、④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎孵化率降低;在96 hpf时,冰片⑤、⑥组斑马鱼胚胎孵化率降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。冰片对斑马鱼胚胎48、72、96 hpf孵化率的影响见表3。

表3 冰片对斑马鱼胚胎48、72、96 hpf孵化率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 3 Effects of borneol on hatching rate of zebrafish embryos at 48, 72 and 96 hpf( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	浓度, μmol/L	孵化率, %		
		48 hpf	72 hpf	96 hpf
空白对照组		9.2±4.93	76.00±8.77	100±0
冰片①组	33.6	5.05±1.97*	71.68±7.56	100±0
冰片②组	67.1	4.1±3.27**	68.2±9.17*	100±0
冰片③组	134.3	2.1±2.42**	47.88±5.10**	100±0
冰片④组	268.5	1.05±2.1**	42.58±4.12**	97.62±4.75
冰片⑤组	537.0	0**	24.25±6.75**	87.02±5.67**
冰片⑥组	1074.0	0**	0**	6.08±7.23**

与空白对照组比较: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

vs.blank control group: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

### 3.5 冰片对斑马鱼胚胎96 hpf畸形率的影响

与空白对照组比较,冰片④、⑤、⑥组斑马鱼胚胎畸形率增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。冰片对斑马鱼胚胎96 hpf畸形率的影响见表4。

表4 冰片对斑马鱼胚胎96 hpf畸形率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 4 Effects of borneol on deformity rate of zebrafish embryos at 96 hpf( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	浓度, μmol/L	畸形率, %
空白对照组		0
冰片①组	33.6	0
冰片②组	67.1	0
冰片③组	134.3	2.12±2.45
冰片④组	268.5	14.52±5.27*
冰片⑤组	537.0	51.82±12.31*
冰片⑥组	1074.0	100±0*

与空白对照组比较: \* $P<0.05$

vs.blank control group: \* $P<0.05$

### 3.6 冰片对斑马鱼胚胎死亡率的影响

在整个发育过程中,当134.3  $\mu\text{mol/L}$ 以下浓度时斑马鱼胚胎死亡率与空白对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。在24、48、72、96 hpf时冰片④、⑤、⑥组的死亡率与空白对照组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。冰片对斑马鱼胚胎8、24、48、72、96 hpf死亡率的影响见表5。

表5 冰片对斑马鱼胚胎8、24、48、72、96 hpf死亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 5 Effects of borneol on the mortality of zebrafish embryos at 8, 24, 48, 72 and 96 hpf ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	死亡率, %				
	8 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf
空白对照组	2.00 $\pm$ 2.31	3.00 $\pm$ 2.00	3.00 $\pm$ 2.00	3.00 $\pm$ 2.00	3.00 $\pm$ 2.00
冰片④组	4.00 $\pm$ 3.27	7.00 $\pm$ 3.83*	11.00 $\pm$ 3.83*	12.00 $\pm$ 3.27*	12.00 $\pm$ 3.27*
冰片⑤组	13.00 $\pm$ 3.83**	17.00 $\pm$ 3.83**	30.00 $\pm$ 5.16**	31.00 $\pm$ 3.83**	31.00 $\pm$ 3.83**
冰片⑥组	26.00 $\pm$ 5.16**	34.00 $\pm$ 5.16**	72.00 $\pm$ 8.64**	77.00 $\pm$ 8.87**	77.00 $\pm$ 8.87**

与空白对照组比较: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

vs. blank control group: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

### 3.7 冰片对Sepn1 mRNA表达的影响

与空白对照组比较,冰片④组Sepn1 mRNA表达增强,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。冰片对Sepn1 mRNA表达的影响见表6。

表6 冰片对Sepn1 mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Tab 6 Effect of borneol on the expression of Sepn1 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	浓度, $\mu\text{mol/L}$	相对表达量
空白对照组		1 $\pm$ 0.075
冰片④组	268.5	1.49 $\pm$ 0.178*

与空白对照组比较: \* $P<0.05$

vs. blank control group: \* $P<0.05$

## 4 讨论

本研究以发育3 hpf的斑马鱼胚胎为模型,以斑马鱼胚胎自主抽动次数、心率、孵化率、畸形率、畸形特征、死亡率为指标,考察不同浓度下的冰片对斑马鱼胚胎发育的影响及与肌肉发育和心脏疾病密切相关的Sepn1基因的表达情况。

冰片以DMSO为助溶剂,在最高剂量1 074.0  $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内能够完全溶解,且能引起斑马鱼胚胎致死而确立冰片实验浓度。

研究表明,在24 hpf之前,高浓度冰片组胚胎发育在形态上与空白对照组比较没有很大区别,但随后胚胎的死亡率和自主抽动次数与空白对照组比较差异具有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。自主抽动是斑马鱼胚胎最初的运动特征,主要由脊柱运动神经元支配肌肉系统而发生<sup>[4]</sup>。空白对照组在24 hpf时自主抽动次数平均每分钟(4.50 $\pm$ 0.84)次,与Saint-Amant L的报道一致<sup>[5]</sup>,冰片各组胚胎活动远弱于空白对照组,表明24 hpf时,冰片虽未对胚胎的形态发育造成影响,但脊柱神经系统或运动系统的发育受到损害,已影响到组织器官的功能。

有研究显示,冰片能够透过血脑屏障,且能够影响去甲肾上腺素、肾上腺素、5-羟色胺和多巴胺等神经递质的含量从而发挥调节神经系统的作用<sup>[6-7]</sup>。本课题组已发现冰片能影响血脑屏障紧密连接蛋白ZO和Claudin5a的表达(待发表),因此,可以推断冰片毒性主要表现在神经系统,其次为运动系统。

冰片的药理作用之一是抗心肌缺血,使冠状窦血流量回升、心率减慢,心肌耗氧量降低<sup>[8]</sup>。说明心脏是冰片的作用靶器官之一。结果表明,48 hpf时各冰片组斑马鱼胚胎心率与空白对照组比较均降低,且浓度越高,降低越明显;浓度为268.5、537  $\mu\text{mol/L}$ 时斑马鱼胚胎在96 hpf时出现心囊水肿,浓度为1 074.0  $\mu\text{mol/L}$ 时斑马鱼胚胎在48 hpf时即出现明显的心囊水肿,说明冰片高浓度时会对胚胎产生心脏毒性。

胚胎孵化过程需要消化绒毛膜的酶和机械力的共同作用<sup>[9]</sup>。经酶作用后,胚胎躯体的扭曲冲破卵膜完成孵化过程。因此,对孵化酶或运动系统的毒害作用都会降低孵化率和延迟孵化。斑马鱼毒性检测实验中常见反应的脊柱弯曲,主要是由于肌肉组织损坏,包括肌肉细胞坏死以及肌纤维受损,此外还与钙离子通道紊乱、脊柱骨原件自身发生畸形有关<sup>[10-11]</sup>。冰片有以非竞争方式与乙酰胆碱(ACh)受体结合,抑制ACh介导的效应<sup>[12]</sup>,比如抑制骨骼肌收缩等的作用机制。推测冰片降低斑马鱼48 hpf孵化率的原因之一是骨骼肌收缩减弱造成的胚胎运动障碍。对于冰片对孵化酶影响的深入作用机制有待进一步验证。

微量元素硒在脊椎动物生长、发育、抗氧化、免疫中是所必须的。它以硒代半胱氨酸的形式存在于硒蛋白中,哺乳动物中已发现至少35种硒蛋白,在斑马鱼和人类早期发育过程中对于肌肉组织的构建,运动能力的调节以及心脏组织的形成发挥重要作用<sup>[13]</sup>。但是,机体对硒需求的浓度和其对机体产生毒性的浓度间范围很窄,在对哺乳动物的研究中发现,过量的硒会导致机体氧化损伤<sup>[14-15]</sup>。在鱼类硒中毒的研究中发现,过量的硒诱导细胞凋亡而发生组织病理学变化<sup>[16]</sup>,使胚胎游动能力和生长率下降<sup>[17]</sup>。硒蛋白Sepn1是含有一个硒半胱氨酸残基的65 kD的蛋白质。出现脊柱弯曲常与Sepn1等硒蛋白的过表达有关,本研究中冰片能引起斑马鱼胚胎的Sepn1表达上调,过量的硒蛋白导致肌肉和肌纤维细胞发生氧化损伤,因而出现了脊柱弯曲、游泳异常等发育异常的现象。基因表达上调后对内质网第二信使Ca<sup>2+</sup>产生干预<sup>[6]</sup>,导致内质网应激,诱导细胞凋亡,从而使鱼体肌肉组织出现损伤,心脏组织发育异常,生理上的运动能力丧失、心功能不全以及神经系统的损害,并呈现明显的浓度依赖性。

对于孕妇使用冰片会引起流产早有报道,如果于小鼠妊娠早期、中期和晚期分别一次性ip冰片乳剂1/8剂量的半数致死量(LD<sub>50</sub>),对早期妊娠无明显引产作用,对中、晚期妊娠终止率分别达到100%及91%<sup>[18]</sup>,提示冰片可能对生殖功能有影响<sup>[19]</sup>。虽然国内外有研究者欲从致突变性、遗传毒性的角度探讨冰片影响生殖功能的机制,但结果都为阴性<sup>[20-21]</sup>。本研究利用斑马鱼胚胎对药物敏感性的特点,从冰片对胚胎发育的影

响的角度探讨冰片对胚胎发育的影响机制,得到阳性结果,初步揭示了本品影响妊娠的分子生物学机制。鉴于以上结果,有必要重视冰片对胚胎发育的影响,建议孕妇和哺乳期的妇女应慎用含冰片的药物,也不应给婴幼儿长期大量使用含有冰片的药物。

### 参考文献

- [1] 姜民.冰片对肝脏CYP<sub>450</sub>的影响及生殖毒性研究[D].天津:天津中医学院硕士论文,2005.
- [2] 胡利民,姜民,凌霜,等.天然冰片与合成冰片对小鼠的一般生殖毒性[J].毒理学杂志,2006,20(4):275.
- [3] Wang K, Ma J, He M, *et al.* Toxicity Assessments of near-infrared upconversion luminescent LaF<sub>3</sub>: Yb, Er in Early development of zebrafish embryos[J]. *Theranostics*, 2013,3(4):258.
- [4] Drapeau P, Saint-Amant L, Buss RR, *et al.* Development of the locomotor network in zebrafish[J]. *Prog Neurobiol*,2002, 68(2):85.
- [5] Saint-Amant L, Drapeau P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo[J]. *J Neurobiol*,1998, 37(4):622.
- [6] 魏楚蓉,伍赶球.冰片的药理作用及其机制研究进展[J].国际病理科学与临床杂志,2010,30(4):447.
- [7] 张瑞涛,王晖,陈丽,等.冰片滴鼻对豚鼠鼻黏膜血管和脑血管通透性的影响研究[J].中国药房,2005,16(17):1 291.
- [8] 姜建昌,曹雷,姚瑜洁,等.冰片的临床应用研究概况[J].现代中西医结合杂志,2013,22(2):221.
- [9] Fraysse B, Mons R, Garric J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*,2006,63(2):253.
- [10] Cheng SH, Wing KWA, Hung SC, *et al.* Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos[J]. *Environ Toxicol Chem*,2000,19(12):3 024.
- [11] Juryne MJ, Xia R, Mackrill JJ, *et al.* Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel

activity in human and zebrafish muscle[J]. *Proc Natl Acad Sci*,2008,105(34): 12 485.

- [12] Tae JP, Yong SP, Tae GL. Inhibition of acetylcholine-mediated effects by borneol[J]. *Biochem Pharmacol*,2003,65(1):83.
- [13] Deniziak M, Rederstorff M, Hindelang C, *et al.* Loss of selenoprotein N function causes disruption of muscle architecture in the zebrafish embryo[J]. *Exp Cell Res*,2007, 313(1):156.
- [14] Wycherly BJ, Moak MA, Christensen MJ. High dietary intake of sodium selenite induces oxidative DNA damage in rat liver[J]. *Nutr Cancer*,2004,48(1):78.
- [15] Kaushal N, Bansal MP. Diminished reproductive potential of male mice in response to selenium-induced oxidative stress: involvement of HSP70, HSP70-2 and MSJ-1[J]. *J Biochem Mol Toxicol*,2009,23(2):125.
- [16] Misra S, Niyogi S. Selenite causes cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by inducing oxidative stress[J]. *Toxicol in vitro*,2009,23(7):1 249.
- [17] Tashjian DH, Teh SJ, Sogomonyan A, *et al.* Bioaccumulation and chronic toxicity of dietary l-selenomethionine in juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) [J]. *Aquat Toxicol*,2006,79(4):401.
- [18] 徐连英,陶建生,冯怡.冰片抗生育作用及剂型研究[J].中成藥研究,1986(3):1.
- [19] 胡利民,姜民,凌霜,等.天然冰片与合成冰片对小鼠的一般生殖毒性[J].毒理学杂志,2006,20(4):275.
- [20] Bhatia SP, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on borneol[J]. *Food Chem Toxicol*,2008,46(11):77.
- [21] 刘洋,胡利民,李怡岚,等.一种新来源天然冰片与合成冰片的致突变性比较研究[J].中药新药与临床药理,2004, 15(4):232.

(收稿日期:2014-01-08 修回日期:2014-03-10)

## 中国人体器官捐献与移植委员会成立

**本刊讯** 2014年3月1日,中国人体器官捐献与移植委员会成立会议在北京召开。第十一届全国人大常委会副委员长、中国红十字会会长华建敏,第十一届全国政协副主席、中国红十字会名誉副会长李金华,国家卫生计生委主任李斌及全体委员参加了会议。会议由国家卫生计生委副主任马晓伟主持。

会议宣布成立中国人体器官捐献与移植委员会,秘书处设在中国国家卫生计生委医政医管局。华建敏、李金华、李斌等3位同志担任名誉主任委员,黄洁夫同志担任主任委员,马晓伟、赵白鸽、李清杰等3位同志担任副主任委员,王羽、郝林娜等17人担任委员。

中国人体器官捐献与移植委员会由国家卫生计生委主导,在国家卫生计生委和中国红十字会总会领导下,对全国人体器官捐献和移植的管理工作进行顶层设计并拟定有关政策措施。该委员会按照国家人体器官捐献和移植的五个工作体系(人体器官捐献体系、人体器官获取和分配体系、人体器官移植临床服务体系、人体器官移植术后登记体系、人体器官移植监管体系)进行统一协调和指导;组织开展法规、政策、技术等方面的培训;评估审核医疗机构人体器官移植临床技术能力及管理水平,并将评估结果上报卫生计生行政部门进行依法管理。