本版责编：许奉彦 见习编辑：张蕊
美编：张雨萌
电话：010-58302828-6866
E-mail:xufengyan521@163.com
医师报
2016 年 12 月 8 日

基金项目：国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目（2013ZX09402202）

从斑马鱼神经元损伤模型分析

养血清脑颗粒质量控制与品质评价

▲ 沈阳药科大学药学院 李晓稳 孙国祥 天士力制药集团股份有限公司 佟玲 李东翔 杭州环特生物科技有限公司 朱桃桃 李春启

中药质量控制的最终目的是保证中药的安全性和有效性；而现行质量控制方法主要用于评价其表观成分的一致性，不仅无法关联药效或毒副作用，且存在被勾兑的风险。同时，表观化学成分的重现，也可能导致对样品质量合格与否的误判，潜在风险更大。

生物活性测定法因具有整体可控、药效相关等技术优势，作为符合中医药特点的适用质量控制模式及方法，已成为中药质量控制和评价的重要发展方向之一。国家药典委员会已明确表示，中药质量标准逐步由单一指标成分定性定量测定开始向活性有效成分及生物检定的综合检测过渡。美国植物药指南中关于药材、提取物、制剂的质量标准制定中也一直强调增加生物测试项目。说明生物活性测定方法可有效弥补现行化学成分层面难以全面监控中药复方质量的局限性。

本课题组前期研究已成功将斑马鱼模型应用于药物药效学、毒理学及药物代谢研究中。养血清脑颗粒是在四物汤的基础上，以当归、川芎、钩藤等 11 味中药组方而成，具有养血平肝、活络止痛的功效，主要用于血虚肝旺所致头痛、眩晕眼花、心烦易怒及失眠多梦。

本实验以斑马鱼神经元损伤模型作为生物模型载体，对不同批次的养血清脑颗粒的生物活性进行检测，初步探索中药复方质量标准中建立生物活性测定项目的可行性，为其他药效物质不明的中药复方生物活性质量控制研究提供参考。

材料和方法 >>>>

材料的选取

养血清脑颗粒为天津天士力制药集团有限公司生产的有效期内制剂 6 批，批号 130225，130226，130175，130565，130601，130606，编号 S1~S6；过期制剂 3 批，批号 090829，091134，091211，编号 S7~S9；特殊处理制剂 3 批，批号 130225，编号 S10~S12。

选用受精后 24 h 野生型 AB 系斑马鱼胚胎。斑马鱼麻醉处死操作步骤符合美国兽医协会对动物麻醉处死的规范要求。

供试品溶液的制备

取不同批次的养血清脑颗粒 2.0 g，用水溶解至 20 g/L 母液，置 4 ℃冰箱备用；用水稀释到相应浓度进行药效活性检测。

养血清脑颗粒的神经细胞保护药效测试

将受精 24 h 野生型 AB 系斑马鱼胚胎放入 6 孔板中，加入培养基 3 ml，每孔加入幼鱼胚胎 30 条，吗替麦考酚酯（MMF）造模但无药物治疗组为模型组，0.1% 二甲基亚砜（DMSO）为空白组，0.5 mol/L 还原型谷胱甘肽（GSH）为阳性组，选择 S1 养血制剂样品用于方法建立；配制不同浓度的 S1 样品作为受试组，造模同时分别加入不同浓度 S1 样品处理 24 h 后，使用 0.64 mmol/L 三卡因甲磺酸对斑马鱼进行过度暴露处死；用吖啶橙（AO）染料对斑马鱼胚胎活体染色 1 h；染色结束后，荧光显微镜观察、拍照、统计斑马鱼凋亡细胞荧光强度（F），定量评价养血清脑颗粒神经细胞保护率效果。

参照生物检定的要求，检测不同批次养血清脑颗粒制剂的神经细胞保护药效。利用 GraphPad 5.0 软件统计试验结果，通过方差分析和 Dunnett's T- 检验进行统计学分析。

相对荧光强度 $=F_{养血清脑颗粒组}/F_{模型组}\times 100\%$

神经细胞保护率 $=(F_{模型组}-F_{养血清脑颗粒组})/(F_{模型组}-F_{空白组})\times 100\%$

结果 >>>>

斑马鱼神经元损伤模型建立

用 0.25 mol/mL MMF 对受精 1 d 野生型 AB 系胚胎斑马鱼处理 24 h，诱导斑马鱼中枢神经损伤模型；AO 染料染色，荧光显微镜观察神经凋亡细胞荧光强度来判断造模成功率（造模成功率 95%）。

养血清脑颗粒对斑马鱼神经细胞保护的量效关系考察

将 20 g/L 养血清脑颗粒工作参照物 S1 用水分别稀释至 1.00、0.75、0.50、0.25、0.10 g/L，各 5 ml，按养血清脑颗粒的神经细胞保护药效测试下方法测定养血清脑颗粒处理斑马鱼凋亡细胞 F，计算神经细胞保护率（P）。

结果显示，空白组斑马鱼中枢神经细胞凋亡较少，凋亡细胞荧光信号弱；模型组斑马鱼中枢神经凋亡细胞非常明显（见图 1）。阳性组与模型组相比，斑马鱼中枢神经凋亡细胞显著减少。以药物质量浓度（C）为横坐标，P 为纵坐标，按照试验数据进行线性回归和计算，得回归方程 P=0.082C+4.439（r=0.995），表明在 0.10~1.00 g/L 内养血清脑颗粒与 P 成良好线性关系。利用 GraphPad 5.0 软件拟合量－效曲线，计算并选择给药质量浓度 522 mg/L。

方法学考察

精密度试验 分别平行制备 3 批养血清脑颗粒（S1，S2，S3）样品 3 份，按养血清脑颗粒的神经细胞保护药效测试下方法分别进行日内精密度考察，重复 6 次。结果不同批次制剂的 P 平均值分别为 62.9%，62.3%，63.5%，无明显差异，RSD 2.2%~3.7% 日间精密度考察采用同一批养血清脑颗粒对 3 个不同批次斑马鱼 P 测定，结果 RSD 1.2%。

重复性试验 平行制备养血清脑颗粒（S1）6 份，分别处理同一批次的斑马鱼 24 h，不同样品处理后均有明显的神经细胞保护药效，且 6 个样品处理组斑马鱼的 P 均无显著性差异，RSD 8.4%。

稳定性考察 分别于 0、3、6、12、24 h 将室温放置的同一供试品溶液进行生物药效活性检测，计算 RSD 4.9%，说明室温放置 24 h 内稳定。

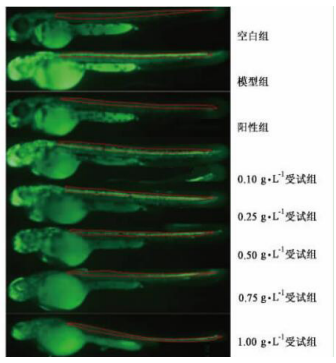

图 1 养血清脑颗粒神经保护作用表型

神经细胞保护药效的测定

按养血清脑颗粒的神经细胞保护药效测试下方法测定不同批次的养血清脑颗粒的神经细胞保护药效。

结果发现，不同条件下的样品对斑马鱼神经细胞保护药效有明显差异，样品 S1~S6 具有显著的神经细胞保护作用；样品 S7~S9 的 P 较低；样品 S10~S12 的 P 差异较大；提示通过斑马鱼神经细胞保护药效活性测定可定性表征养血清脑颗粒质量的优劣。

讨论 >>>>

前期药理研究表明，养血清脑颗粒通过选择性地抑制谷氨酸和 Caspase-3 表达，并通过谷氨酸盐合成酶选择性抑制兴奋性氨基酸谷氨酸的神经毒性作用，减少神经细胞的死亡，从而发挥神经保护作用。研究选择同样作用机制的 GSH 为阳性药。

斑马鱼具有典型的脊椎动物脑部特征，神经行为遵循顺序发育原则。与啮齿动物模型相比，斑马鱼具有饲养经济、产卵量大、发育快速、胚胎透明、易于观察、动物应激少及实验结果较客观等优点。目前模式动物斑马鱼已广泛用于神经发育、损伤等神经科学研究。

因此，本文采用标准化的斑马鱼神经元损伤药效模型，利用 AO 染色与凋亡细胞荧光强度定量分析，对药物的体内神经细胞保护效率进行评价。斑马鱼神经损伤模型作为心脑血管药物生物学内控检测方法，具有较好的精密度、重复性、关联药效、可测可评的特点。研究发现，合格制剂均具有显著的神经保护率，过期及破坏性样品的神经保护效率则大大降低，表明此方法可初步区分合格与不合格样品。

中药成分复杂，效仿化学药基于成分论的质量控制模式，很难控制临床的有效性和安全性。因此，将生物测定引入到中药质量控制与品质评价中是未来的重要发展方向。本文建立的斑马鱼神经损伤模型可为养血清脑颗粒的质量控制及品质评价提供新思路和技术支持。