

ICS 11.120.10
CCS C10/29



团体标准

T/CACM ****—202*
代替 T/CACM ****—****

中药生物效应评价技术规程 斑马鱼模型

Technical procedures for assessing biological effects of Traditional Chinese Medicine
with zebrafish model

(征求意见稿)

(完成时间：2023 年 05 月)

20**-**-**发布

20**-**-**实施

中华中医药学会发布

目 次

前言.....	错误!未定义书签。
引言.....	错误!未定义书签。
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 基本流程.....	1
5 试验方案确认与准备.....	2
6 斑马鱼准备.....	3
7 试验程序.....	3
8 结果评价.....	错误!未定义书签。
9 试验报告撰写.....	错误!未定义书签。
附录 A	8
附录 B.....	9
附录 C.....	14
附录 D	177
参考文献.....	19

前 言

本文件参照GB/T1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由首都医科大学附属北京中医医院提出。

本文件由中华中医药学会归口。

本文件起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、首都医科大学附属北京中医医院、天津中医药大学中医药研究院、中国中医科学院中药研究所、中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室、北京中医药大学中药学院中药品质评价北京市重点实验室、广西壮族自治区亚热带作物研究所、浙江大学药学院、浙江省中药研究所有限公司、广西药学会、杭州胡庆余堂药业有限公司、天士力医药集团股份有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、云南云科特色植物提取实验室有限公司、金诃藏药（山东）健康产业有限公司、正大青春宝药业有限公司、江中药业股份有限公司、广西梧州制药（集团）股份有限公司、广西新桂环保科技集团有限公司、中国检验认证集团浙江公司、宁波海关技术中心、南京歆佳医药科技有限公司。

本文件主要起草人：刘清泉、张俊华、叶祖光、李萍、李春启。

本文件其它起草人：林瑞超、徐霄龙、赵海誉、杨华、赵崇军、庞新华、王毅、赵璐、王志安、刘华钢、陈炜、马晓慧、张正方、孙武兴、肖明红、王振、刘雳、李诒光、刘洋、李波、赵京霞、何莎莎、王雪蕊、崔煦然、岳慧珍、白云静、胡玲、刘汉伟、章胜乔、甘惠云、顾珊桦、张勇、曹兵兵、朱晓宇、徐懿乔、缪文钰、郭胜亚、周佳丽、夏波、张涛。

引 言

中药是我国的国粹，其在疾病防治过程中所体现的整体与系统观念，使其在临床中显示出明显的优势，日益得到国内外的高度重视。中药防病治病所发挥的整体药效是其多种成分作用于多个靶点，进而通过多靶点所形成的复杂网络，最终产生协同性、整合性预防与治疗作用。然而，由于中药成分的复杂性，现行的中药质控方法在控制和评价中药质量方面具有较大的局限性，例如存在一种有效成分对应多种药材和一种药材的质控成分并不一定是有效成分的现象，难以反映中药的有效性和安全性。

2020年12月17日，国家药品监督管理局药品审评中心发布了《中药生物效应检测研究技术指导原则（征求意见稿）》。文件指出：中药在中医药理论指导下使用，具有多成分、多靶点，发挥整体作用等特点。当以理化检测方法等质量控制手段难以充分反映中药质量时，有必要研究探索生物效应检测方法，以弥补现行质量控制方法的不足。中药成分复杂、药效物质基础研究薄弱，现行以化学成分检测为主的质量控制方法虽简单易行，但难以很好地反映中药的有效性、安全性；生物效应检测方法相对复杂，但可以较好地弥补现行质量控制方法的不足，有利于提高中药质量的可控性。鼓励开展中药生物效应检测研究，将成熟可行的方法列入标准。

生物效应检测是以药理学为基础，采用生物统计方法，运用特定的实验设计，通过药物对于生物整体、离体器官、细胞、酶或分子等所起的作用，严格控制实验条件，通过比较对照品和受试样品的生物体或离体器官与组织的特定生物效应，从而控制和评价受试样品质量、活性或作用强度。理想的中药生物效应测定方法应为整体动物实验，且具有试验周期短、试验费用低、试验效率高、相关性好、敏感性强、特异性高、重复性好等优势。斑马鱼是一种脊椎动物，与人类基因同源性高达87%，已获美国FDA、欧洲EMA、欧洲经合组织（OECD）和国际标准机构（ISO）等的认可，中国已发布实验鱼质量控制国家标准。斑马鱼模型具有可靠、快速、高效、高通量、结果与人体相关性高等优势，不仅用于研究与研发，也适于整体生物学检测，国内外已广泛应用于创新药物发现、中药与保健食品研发领域，也特别适合用于中药的药理学和毒理学研究以及中药的生物学质量控制。

为鼓励探索整体斑马鱼用于研究中药生物效应检测方法，弥补现行质量控制方法的不足，完善中药质量控制体系，同时从整体活性上体现中药的有效性与安全性，特制定本技术规程。

本标准拟利用斑马鱼模型评价中药的生物效应，即利用中药在斑马鱼体内的生物活性对中药的有效性或安全性进行快速定量评价与研究，进一步提升中药质量的稳定性与可靠性，推动中药标准化、现代化与国际化。

中药生物效应评价技术规程 斑马鱼模型

1 范围

本文件确立了斑马鱼用于中药生物效应评价的检测流程，规定了试验方案确认与准备、斑马鱼准备、预试验、正式试验、结果评价、数据分析、试验报告撰写/审核等阶段的操作指示，以及上述阶段之间的转换条件，描述了记录、标记、审核等追溯方法。

本文件适用于中药材/饮片、中间体、制剂等的活性成分筛选、药效研究、质量控制等方面。

2 规范性引用文件

下列文件对本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制

GB/T 21807 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验 术语和定义 试验溶液

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 斑马鱼 Zebrafish (*Danio rerio*)

脊椎动物，生物分类学上属于脊椎动物门、硬骨鱼纲、鲤鱼目、鲤科、斑马鱼属、斑马鱼种，可用于教学和科研的模式动物。

3.2 受精后小时数 Hour(s) post-fertilization, hpf

受精卵受精后的小时数。

3.3 受精后天数 Day(s) Post-fertilization, dpf

受精卵受精后的天数。

3.4 无可观察效应浓度 No Observed Toxic Effect Concentration, NOEC

与模型对照相比，对试验生物未产生显著毒性效应的最高受试样品浓度。

4 基本流程

斑马鱼用于中药生物效应评价的检测流程包括试验方案确认与准备、斑马鱼准备、预试验（受试样品处理、确定NOEC）、正式试验（分组、造模、受试样品处理、死亡判断、数据采集）、结果评价（统计学分析、结果判定、结果有效性分析）、数据分析、试验报告撰写/审核等阶段。程序流程图如图1所示。

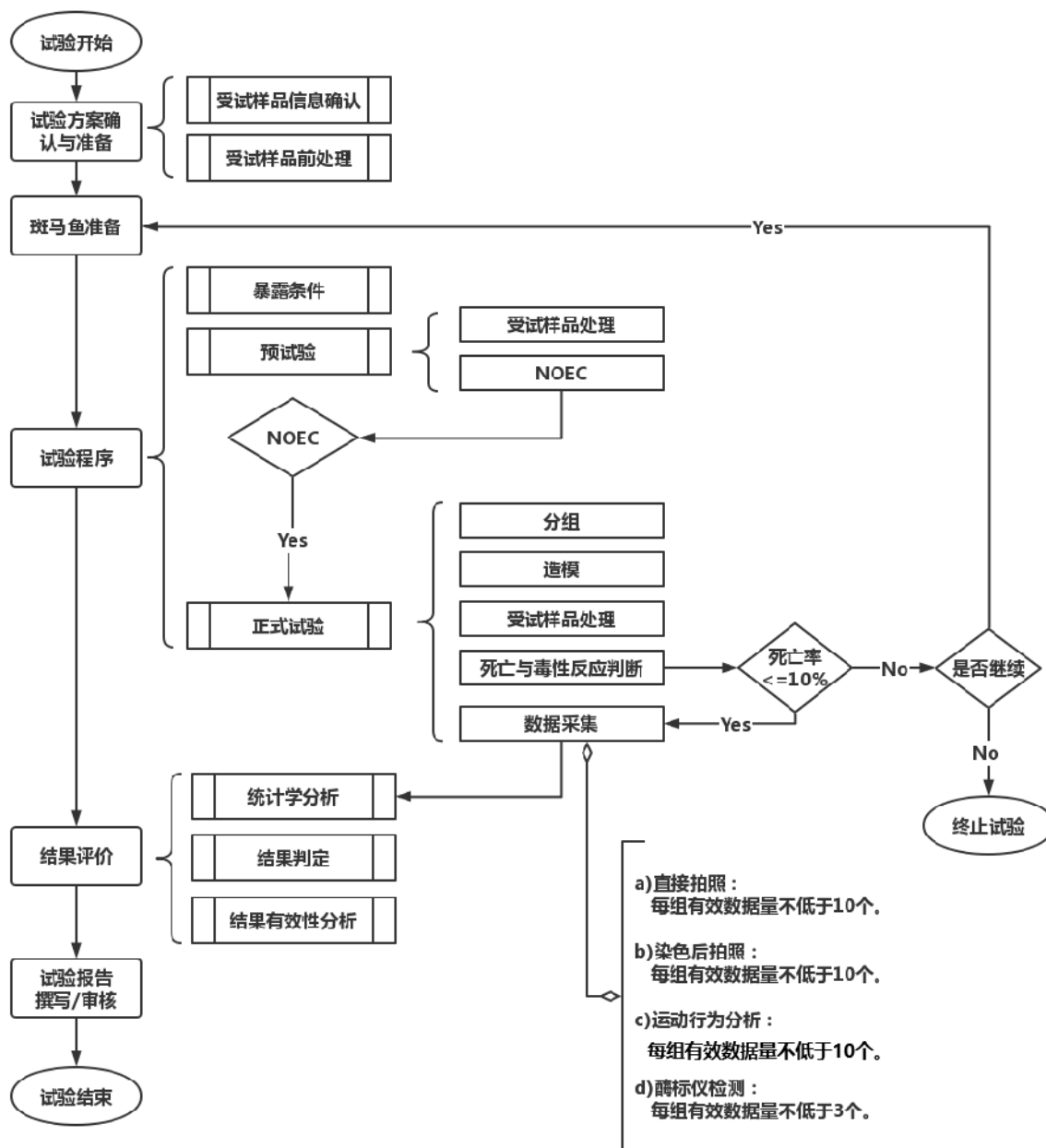


图1 斑马鱼用于中药生物效应评价检测流程图

5 试验方案确认与准备

5.1 受试样品信息确认

应从样品提供方获得如下样品信息：

受试样品的名称、批号、规格、数量、颜色性状、保存条件、保质期、申请单位名称、理化性质、功效、主治等信息。

- 受试样品为单体成分时，还应提供相应的化学信息，包括分子量等。
- 受试样品的溶剂信息，以及在溶剂中的溶解性，在水中、光中、实验条件下的稳定性。
- 整个周期所用受试样品批号应一致。

5.2 受试样品前处理

5.2.1 参考中国药典和表1的方法对不同类型受试样品进行前处理。

表1 不同类型受试样品前处理方法

样品类型		前处理方法
常规类别	生药	依次经过浸润、切片、一次抽提、二次抽提、混匀、过筛、旋蒸
	饮片	
特殊类别	矿石类、贝壳类、甲壳类	依次经过粉碎、浸润、一次抽提、二次抽提、混匀、过筛、旋蒸
	胶质类药物/蜜膏类	直接热水烺化
	逢子必捣	依次经过捣碎、浸润、一次抽提、二次抽提、混匀、过筛、旋蒸

5.2.2 受试样品储备液宜用标准稀释水配制（配制方法见附录A），受试样品难以用水溶解时可考虑使用低毒的助溶剂或分散剂。推荐的溶剂：丙酮、乙醇、甲醇、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、三甘醇。适合的分散剂：聚氧乙烯化脂肪酸甘油酯、吐温80、0.01%的纤维素甲醚、聚氧乙烯化氢化蓖麻油。

5.2.3 储备液配制完成的受试样品应做标识，包括受试样品名称、受试样品浓度、溶剂名称、配制日期、配制人。

5.2.4 经前处理且做好标识的受试样品进入斑马鱼准备阶段。

6 斑马鱼准备

6.1 按照《GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制》的规定执行斑马鱼质量控制。

6.2 根据中药的功效主治选择斑马鱼疾病模型（见附录B），不同发育阶段斑马鱼表型特征见附录C。

6.3 选择出发育状况一致的斑马鱼进入试验程序阶段。

7 试验程序

7.1 暴露条件

7.1.1 造模

选择受精后一定天数的斑马鱼，用诱导剂处理一段时间，建立斑马鱼疾病模型。根据中药的功效主治选择合适的斑马鱼模型（见附录B）。

7.1.2 给药

根据试验需求，预先筛选好足够数量且发育状况一致的斑马鱼胚胎，并随机分配到试验容器中，每孔斑马鱼数量至少为10尾（饲养密度宜为1尾/100 μL ）。模型诱导剂和受试样品加入试验容器后，充分混匀后，用铝箔纸包裹，在28 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中避光孵育至暴露结束。

给药顺序有三种：

- 先用模型诱导剂建立斑马鱼疾病模型，然后向试验容器中加入受试样品。
- 先向试验容器中加入受试样品，然后再用模型诱导剂建立斑马鱼疾病模型。

c) 用模型诱导剂建立斑马鱼疾病模型的同时, 加入受试样品。

7.1.3 光照

暴露期间避光处理, 避免光照对受试样品稳定性的影响。

7.1.4 温度

26~28.5 °C。

7.1.5 溶解氧

6 mg/L 饱和溶解氧。

7.1.6 pH

6.8~7.5。

7.2 预实验

7.2.1 试验分组

a) 正常对照组: 用标准稀释水处理的正常斑马鱼。

b) 模型对照组: 用模型诱导剂处理的斑马鱼。根据中药的功效主治选择合适的斑马鱼疾病模型。

c) 受试样品处理组: 含有受试样品和模型诱导剂的斑马鱼, 受试样品根据需要设置多个不同浓度组。

d) 溶剂对照组: 含有溶剂和模型诱导剂的斑马鱼。如果受试样品配制过程中使用了本文件以外的助溶剂或分散剂, 则应设置该组。

7.2.2 受试样品组别设置

将受试样品储备液用标准稀释水以几何级数稀释成一组适宜的浓度系列, 备用。宜设置3~5个浓度组, 以几何级数浓度系列设置受试样品浓度梯度, 浓度的间隔系数 ≤ 3.2 , 宜设为2。

7.2.3 确定 NOEC

a) 死亡判断标准: 静止不动、无心脏跳动、躯干呈不透明颜色、对机械刺激无反应。

b) 异常表型: 心包水肿、静脉瘀血、血流缺失/减少、出血、脑变性/萎缩/水肿、下颌畸形、眼畸形/水肿、肝脏变性/肿大/萎缩、卵黄囊吸收延迟、肠道发育异常、躯干弯曲/缩短/水肿、肌肉变性、鳔未充气。表型典型图见附录 D。

c) 异常行为学指标: 身体侧翻、游动不协调、游动剧烈和反常的静止。

7.3 正式试验

7.3.1 试验分组

a) 正常对照组: 用标准稀释水处理的正常斑马鱼。

b) 模型对照组: 用模型诱导剂处理的斑马鱼。根据中药的功效主治选择合适的斑马鱼

疾病模型。

c) 阳性对照组：含有阳性对照样品和模型诱导剂的斑马鱼，每次试验设置一个阳性对照组即可。

d) 受试样品处理组：含有受试样品和模型诱导剂的斑马鱼，受试样品根据需要设置多个不同浓度组。

e) 溶剂对照组：含有溶剂和喂食高糖高脂饲料的斑马鱼。如果受试样品配制过程中使用了本文件以外的的助溶剂或分散剂，则应设置该组。

7.3.2 受试样品浓度设置

根据预试验的结果，确定正式试验的浓度范围，试验最高浓度组不得高于 NOEC 值或该类受试样品的最大溶解度。以几何级数浓度系列设置至少 3 个不同的受试样品浓度组，浓度的间隔系数不大于 3.2。浓度设置少于 3 个时需说明理由。

7.3.3 数据采集

应根据不同斑马鱼疾病模型的具体评价指标选择合适的数据采集方式，数据采集具体方式如下：

a) 直接拍照：繁育结束后，从表型正常的斑马鱼中随机选取至少 10 尾斑马鱼，用三卡因麻醉后，将斑马鱼用 3% 甲基纤维素固定（甲基纤维素应提前在室温放置至少 30 分钟），在体视显微镜或荧光显微镜（转基因荧光斑马鱼品系相关的试验）下观察、拍照并保存。所有试验组斑马鱼拍照应在相同的仪器和环境条件下完成，且斑马鱼体位保持一致。利用图像处理软件测量光密度（体视显微镜）或荧光强度（荧光显微镜），每组的有效数据量不低于 10 个。

b) 染色后拍照：繁育结束后，试验容器中的斑马鱼用标准稀释水清洗 3 次，采用特异性荧光染料或组织化学染料对各组斑马鱼进行染色。染色后每组随机选取至少 10 尾斑马鱼，用 3% 甲基纤维素固定。特异性荧光染料染色的斑马鱼用荧光显微镜观察、拍照并保存，组织化学染料染色的斑马鱼用体视显微镜观察、拍照并保存。利用图像处理软件对图像进行分析，测量光密度（体视显微镜）或荧光强度（荧光显微镜），每组的有效数据量不低于 10 个。

c) 运动行为分析：繁育结束后，试验容器中的斑马鱼用标准稀释水清洗 3 次，每组随机选取至少 10 尾斑马鱼转移至 96 孔板中，每孔 1 尾，利用行为分析仪记录斑马鱼的运动轨迹，记录时间宜为 20 min~1 h，每组的有效数据量不低于 10 个。

d) 酶标仪检测：繁育结束后，试验容器中的斑马鱼用标准稀释水清洗 3 次，每个试验组随机选择斑马鱼转移至 96 孔板中，每孔 1~3 尾，按照试剂盒检测说明书进行试验操作，利用酶标仪测定 OD 值、荧光值或化学发光值。选择符合检测试剂要求的参数，每组的有效数据量不低于 3 个。

e) 心血管功能分析：繁育结束后，试验容器中的斑马鱼用标准稀释水清洗 3 次，每组随机选择至少 10 尾斑马鱼，用 3% 甲基纤维素固定（甲基纤维素应提前在室温放置至少 30 分钟），置于心跳血流分析系统下采集斑马鱼心输出量、血流速度等数据，每组的有效数据量不低于 10 个。

8 数据处理与结果判定

8.1 统计分析

利用统计分析软件进行相关图表制作与统计学分析。计算各组试验的平均值（Mean）及标准误差（Standard Error, SE），统计学处理结果用 $\text{Mean} \pm \text{SE}$ 表示。宜采用方差分析，按方差分析的程序先进行正态性检验（P 值）和方差齐性检验（F 值）。当 $F < 0.05$, $P < 0.05$ 时，各组均数间组间至少有一组有显著性差异，宜采用非参数检验。当 $F \geq 0.05$, $P \geq 0.05$ 时，采用单因素方差分析，选择事后两两比较的结果进行统计。对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计。若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

8.2 结果判定

8.2.1 试验有效性

a) 正常对照组（如果使用了助溶剂，也包括溶剂对照组）斑马鱼的死亡率或异常率不得超过 10%，超过 10% 则该次试验视为失败。

b) 正式试验中，阳性对照组与模型对照组之间存在统计学上的显著性差异，且平均值之差必须大于 2 倍的模型对照组内标准偏差（SD）；或阳性对照组与模型对照组之间存在统计学上的显著性差异，且平均值之差大于模型对照组平均值的 20%，否则该次试验结果视为无效。

c) 正式试验中，如果使用了助溶剂，溶剂对照组与模型对照组之间不能存在统计学上的显著性差异，如果溶剂对照组与模型对照组之间存在统计学上的显著性差异，则该次试验视为无效。

8.2.2 中药生物效应计算

$$\text{药效}(\%) = \frac{S(\text{受试样品组}) - S(\text{模型对照组})}{S(\text{模型对照组})} \times 100\% \quad \text{或}$$

$$\text{药效}(\%) = \frac{S(\text{模型对照组}) - S(\text{受试样品组})}{S(\text{模型对照组})} \times 100\%$$

注：中药的功效主治不同，所用模型和评价指标不一样，计算公式也有差别，S 为每个模型指标的原始数据。

8.2.3 判定标准

使用统计分析软件对数据进行方差分析，比较受试样品各浓度组与模型对照组原始数据的统计学差异， $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

将参照物（阳性对照组）的生物效应作为 1，比较受试样品各浓度组的生物效应与阳性对照组生物效应的比值，以此作为标定生物效价的依据。

9 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容：

- a) 检测依据；
- b) 样品和阳性对照的信息，包括与试验操作相关的理化性状；
- c) 斑马鱼来源和品系等相关信息；
- d) 试验条件和方法；
- e) 数据处理与统计方法；
- f) 试验开始和完成的日期；
- g) 试验结果
- h) 结论。

附录 A
(规范性)
标准稀释水配制方法

A.1 分别称取以下试剂:

- a) 碳酸氢钠: 称取 2.52 g NaHCO_3 ;
- b) 氯化钾: 称取 0.22 g KCl ;
- c) 氯化钙: 称取 11.76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- d) 硫酸镁: 称取 4.932 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

A.2 将 A.1 称取的试剂混合后用去离子水定容至 1 L。用于配制标准稀释水的试剂均为分析纯试剂, 去离子水电导率应小于或等于 $10 \mu\text{S}/\text{cm}$ 。

A.3 将 A.2 用去离子水稀释 40 倍得到标准稀释水。

最终浓度为: $63.0 \text{ mg}/\text{L}$ NaHCO_3 , $5.5 \text{ mg}/\text{L}$ KCl , $294.0 \text{ mg}/\text{L}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $123.3 \text{ mg}/\text{L}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

附录 B
(规范性)
用于评价中药生物效应评价的斑马鱼模型的推荐参数

系统	疾病模型	推荐指标	推荐斑马鱼品系	推荐阶段	推荐诱导剂	推荐数据采集方式
肿瘤系统	肿瘤异种移植	肿瘤细胞荧光强度	野生型 AB 品系	2-5 dpf	人类肿瘤细胞	CM-DiI 标记肿瘤细胞 (荧光显微镜)、图像分析软件
		肿瘤细胞转移距离				
		凋亡细胞荧光强度	野生型 AB 品系	2-4 dpf		吖啶橙染色(荧光显微镜)、图像分析软件
		肠下血管新生	转基因血管荧光斑马鱼			直接拍照(荧光显微镜)、图像分析软件
心脑血管系统	心衰	心包水肿面积	野生型 AB 品系	2 dpf	盐酸维拉帕米	直接拍照(体视显微镜)、图像分析软件
		静脉淤血面积				
		心输出量				心跳血流分析系统
		血流速度				
	促进微循环	肠下血管面积	转基因血管荧光斑马鱼	1-3 dpf	辛伐他汀	直接拍照(荧光显微镜)、图像分析软件
	血管内皮损伤性血栓	节间血管直径	野生型 AB 品系	5-6 dpf	普纳替尼	邻联茴香胺染色(体视显微镜)、图像分析软件
		心脏红细胞染色强度				
		心输出量				心跳血流分析系统
		血流速度				
	血小板聚集性血栓	心脏红细胞染色强度	黑色素等位基因突变 Albino 品系	3 dpf	花生四烯酸	邻联茴香胺染色(体视显微镜)、图像分析软件
		心输出量				
		血流速度				心跳血流分析系统
	红细胞性血栓	心脏红细胞染色强度	野生型 AB 品系	4-5 dpf	苯肼	邻联茴香胺染色(体视显微镜)、图像分析软件
		心输出量				
血流速度		心跳血流分析系统				
气虚血瘀型血栓	运动行为	野生型 AB 品系	4-6 dpf	无水亚硫酸钠+异丙肾上腺素	行为分析仪	
	ATP 含量				ATP 试剂盒(酶标仪)	
	乳酸含量				乳酸试剂盒(酶标仪)	
心肌损伤	心肌凋亡细胞荧光强度	野生型 AB 品系	2 dpf	异丙肾上腺素	吖啶橙染色(荧光显微镜)、图像分析软件	
	心输出量					

		血流速度				心跳血流分析系统
	心脏出血	心脏出血发生率	野生型 AB 品系	2 dpf	辛伐他汀	直接拍照（体视显微镜）、图像分析软件
	脑出血	脑出血发生率	野生型 AB 品系	1-2 dpf	辛伐他汀	直接拍照（体视显微镜）、图像分析软件
心输出量		心跳血流分析系统				
血流速度						
	脑缺血	脑缺血面积	野生型 AB 品系	2-3 dpf	普纳替尼	直接拍照（体视显微镜）、图像分析软件
脑凋亡细胞染色强度		吖啶橙染色(荧光显微镜)、图像分析软件				
ROS 水平		ROS 荧光试剂盒（酶标仪）、图像分析软件				
脑部炎症		转基因中性粒细胞荧光斑马鱼	直接拍照（荧光显微镜）、图像分析软件			
心输出量		野生型 AB 品系	心跳血流分析系统			
血流速度						
代谢系统疾病	高血脂	血甘油三酯含量	黑色素等位基因突变斑马鱼	5-7 dpf	葡萄糖+蛋黄粉	油红 O 染色（体视显微镜）、图像分析软件
		血胆固醇含量	野生型 AB 品系			胆固醇荧光探针(荧光显微镜)、图像分析软件
	高血糖	血糖水平	野生型 AB 品系			血糖仪
	肥胖	卵黄囊荧光强度	黑色素等位基因突变 Albino 品系	2-4 dpf	-	尼罗红染色(荧光显微镜)、图像分析软件
	胃肠动力	肠道荧光强度	野生型 AB 品系	5-6 dpf	-	尼罗红染色(荧光显微镜)、图像分析软件
	醉酒	运动行为	野生型 AB 品系	5-6 dpf	无水乙醇	行为分析仪
	高尿酸	尿酸荧光值	野生型 AB 品系	5-6 dpf	氧嗪酸钾+黄嘌呤钠盐	尿酸试剂盒（酶标仪）
	脾阳虚	肠道荧光强度	野生型 AB 品系	4-6 dpf	番泻叶	尼罗红染色(荧光显微镜)、图像分析软件
		肠腔面积				直接拍照（体视显微镜）、图像分析软件
		运动行为				行为分析仪
		肠道中性粒细胞数量	转基因中性粒细胞荧光斑马鱼			直接拍照（荧光显微镜）、图像分析软件
	肠道菌群	肠道益生菌荧光强度	野生型 AB 品系	5-6 dpf	益生菌	CM-DiI 标记益生菌（荧光显微镜）、图像

						分析软件
		肠道菌群				16S 测序
神经系统疾病	阿尔茨海默症	运动能力、反应能力		4-5 dpf	三氯化铝	行为分析仪
		乙酰胆碱酯酶活性		4-6 dpf		乙酰胆碱酯酶试剂盒(酶标仪)
	帕金森氏综合征	运动行为		4-6 dpf	6 羟基多巴胺	行为分析仪
		多巴胺神经元面积		1-3 dpf		多巴胺抗体染色(荧光显微镜)、图像分析软件
	失眠	觉醒活动量、觉醒活动时间		5-6 dpf	戊四唑	行为分析仪
	中枢神经损伤	中枢神经凋亡细胞荧光强度		1-2 dpf	霉酚酸吗啉乙酯	吖啶橙染色(荧光显微镜)、图像分析软件
	周围神经损伤	周围运动神经长度	转基因运动神经荧光斑马鱼	6 hpf-3 dpf	无水乙醇	直接拍照(荧光显微镜)、图像分析软件
	抑郁症	运动行为		5-6 dpf	利血平	行为分析仪
焦虑症	运动行为	野生型 AB 品系	5 dpf	1-(3-氯苯基)哌嗪盐酸盐		
肝肾疾病	酒精性肝损伤	ALT、AST 活力		3-5 dpf	无水乙醇	ALT、AST 试剂盒(酶标仪)
		肝脏甘油三酯染色强度				油红 O 染色(体视显微镜)、图像分析软件
	非酒精性肝损伤	ALT、AST 活力		3-6 dpf	硫代乙酰胺	ALT、AST 试剂盒(酶标仪)
		肝脏组织病理学				HE 染色(生物光学显微镜)
	酒精性脂肪肝	肝脏甘油三酯染色强度		5-6 dpf	无水乙醇	油红 O 染色(体视显微镜)、图像分析软件
		肝脏组织病理学				HE 染色(生物光学显微镜)
	非酒精性脂肪肝	肝脏甘油三酯染色强度		3~6 dpf	硫代乙酰胺	油红 O 染色(体视显微镜)、图像分析软件
		肝脏组织病理学				HE 染色(生物光学显微镜)
肾脏损伤	肾性水肿发生率	野生型 AB 品系	2-4 dpf	马兜铃酸	直接拍照(体视显微镜)	

		肾小球滤过率				注射葡聚糖(荧光显微镜)、图像分析软件
抗炎	细菌感染性炎症	中性粒细胞数量	转基因中性粒细胞荧光斑马鱼	3 dpf	脂多糖(LPS)	直接拍照(荧光显微镜)、图像分析软件
	神经损伤性炎症				硫酸铜	
	机械损伤性炎症				机械损伤	
	细菌性肺炎	鱼鳃中性粒细胞数量		5 dpf	脂多糖(LPS)	
	病毒性肺炎	鱼鳃中性粒细胞数量			聚肌胞苷酸(Poly(I:C))	
	肠炎	胃肠道中性粒细胞数量		胃肠道面积	3-7 dpf	
胃肠道面积						
免疫系统	免疫低下	中性粒细胞数量	转基因中性粒细胞荧光斑马鱼	3-5 dpf	长春瑞滨	
		巨噬细胞数量	转基因巨噬细胞荧光斑马鱼			
		T 细胞数量	转基因 T 细胞荧光斑马鱼			
		巨噬细胞吞噬功能	野生型 AB 品系	3-7 dpf		
骨骼肌肉	软骨损伤	软骨荧光强度	转基因软骨荧光斑马鱼	2-5 dpf	乙酸地塞米松	茜素红染色(荧光显微镜)、图像分析软件
	骨质疏松	骨密度		3-7 dpf		
	骨骼发育	脊椎骨数目		3-7 dpf	-	
血液系统	贫血	红细胞染色强度	野生型 AB 品系	4-5 dpf	苯肼	邻联茴香胺染色(体视显微镜)、图像分析软件
眼	眼部细胞凋亡	眼部凋亡细胞荧光强度	野生型 AB 品系	1-2 dpf	霉酚酸吗啉乙酯	吖啶橙染色(荧光显微镜)、图像分析软件
		眼组织病理学				HE 染色(生物光学显微镜)
	缺氧	运动行为		4-5 dpf	无水亚硫酸钠	行为分析仪
		乳酸含量				乳酸试剂盒(酶标仪)
		ATP 含量				ATP 试剂盒(酶标仪)
氧化应激	卵黄囊荧光强度	黑色素等位基因突变型 Albino 品	3-4 dpf	甲萘醌	ROS 荧光染料染色(荧光显微镜)、图像	

			系			分析软件
--	--	--	---	--	--	------

附录 C
(规范性)
不同发育阶段斑马鱼表型特征

C.1 2.25 hpf: 始于 128 个细胞排列成高的细胞堆叠, 位于卵黄细胞之上, 呈紧密半球形, 见图 C.1。

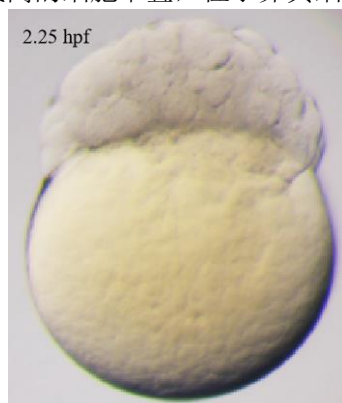


图 C.1 2.25 hpf 斑马鱼典型图

C.2 6 hpf: 受精卵达到 50%外包后的数分钟内出现了一个增厚的外围区域, 称作胚环 (germ ring), 几乎与此同时完全包围了囊胚边缘。此时, 可去除未受精的卵或死卵、发育迟缓以及其他各种畸形的鱼卵, 并且挑选出发育阶段一致的鱼卵, 见图 C.2。



图 C.2 6 hpf 斑马鱼典型图

C.3 24 hpf: 斑马鱼心脏开始跳动, 黑色素开始形成。死亡胚胎包括无心跳、卵凝结 (图 A)、体节未形成 (图 B)、尾部未分离 (图 C, 红色箭头指向尾部未分离)。此时, 去除死亡胚胎, 挑选体节形成、尾部分离、出现黑色素的斑马鱼, 并可根据脑部、眼部发育的情况进一步筛选发育阶段一致的胚胎, 见图 C.3。

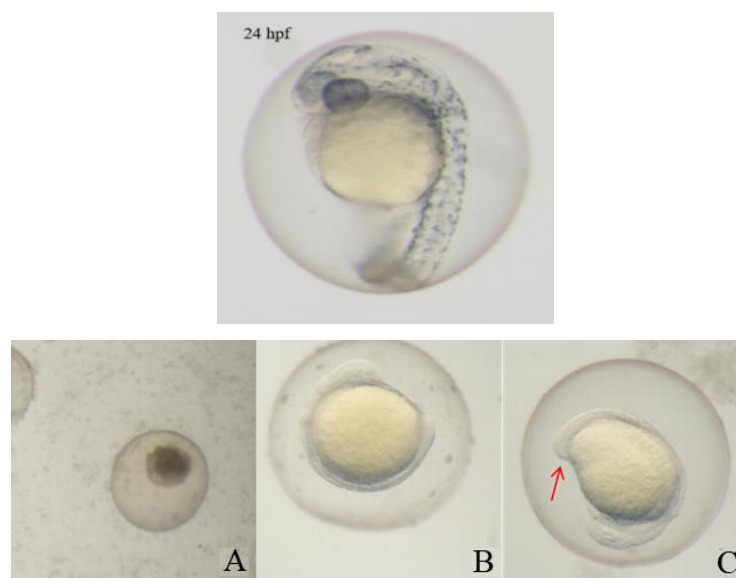


图 C.3 24 hpf 斑马鱼典型图

C.4 2 dpf (dpf, 受精后数天)：背部黑素条纹此时很明确且密集，见图 C.4。此时，去除死亡胚胎，镜下挑选无心包水肿、瘀血，卵黄囊大小一致的斑马鱼。



图 C.4 2 dpf 斑马鱼典型图

C.5 3 dpf：整个背部的黄色色调加深，卵黄囊逐渐萎缩呈椭圆形，肠道开始发育，全身无出血或淤血，体长无短小、畸形的斑马鱼，见图 C.5。此时，去除死亡胚胎、未出膜胚胎并及时去除标准稀释水中的绒膜。

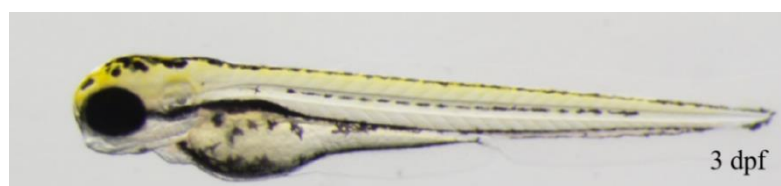


图 C.5 3 dpf 斑马鱼典型图

C.6 4 dpf：挑选鱼鳔开始充气，卵黄囊未完全吸收的斑马鱼，见图 C.6。



图 C.6 4 dpf 斑马鱼典型图

C.7 5-7 dpf: 挑选鱼鳔充气充分，卵黄囊基本吸收完全的斑马鱼，见图 C.7。



图 C.7 5-7 dpf 斑马鱼典型图

附录 D
(规范性)
斑马鱼表型典型图

D.1 斑马鱼整体特征见图 D.1。

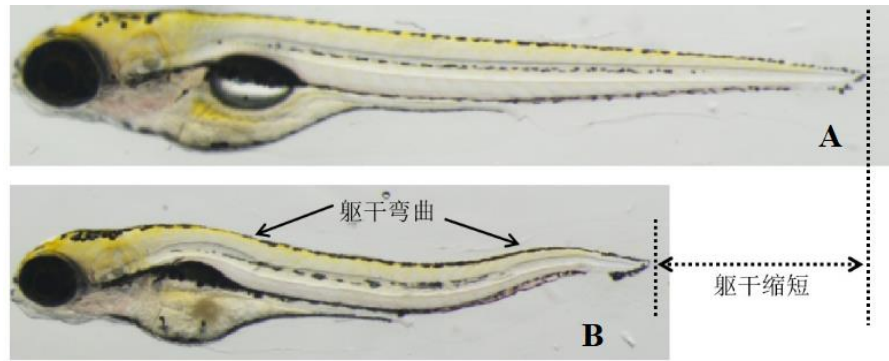


图 D.1 斑马鱼整体图

注：图 A 为正常斑马鱼，图 B 的斑马鱼出现躯干缩短和弯曲。

D.2 斑马鱼主要器官特征见图 D.2。

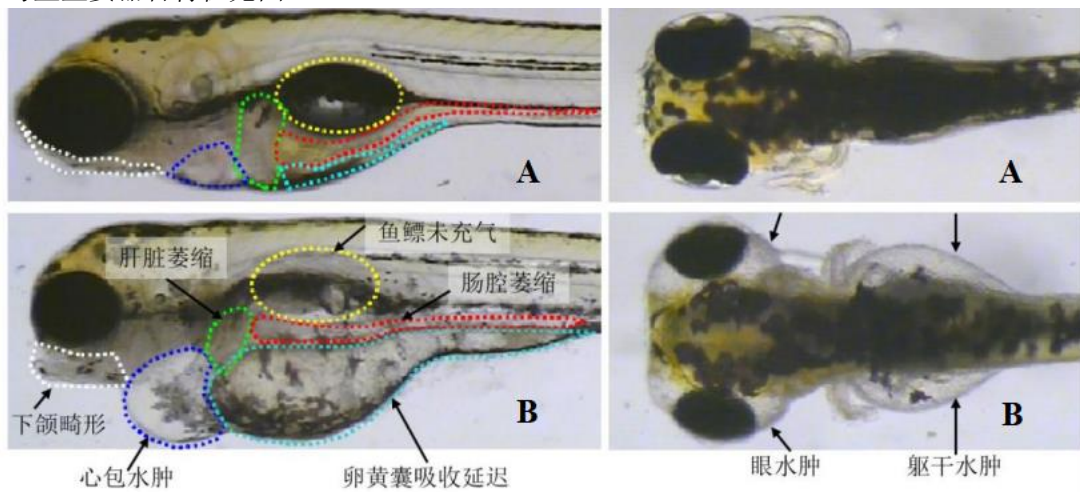


图 D.2 斑马鱼主要组织器官示意图

注：图 A 为正常斑马鱼，图 B 为表型异常斑马鱼。白色虚线所示为下颌，蓝色虚线所示为心脏，浅绿色虚线所示为肝脏，深绿色虚线所示为卵黄囊，红色虚线所示为肠道，黄色虚线所示为鱼鳔。

D.3 斑马鱼肝脏特征见图 D.3。

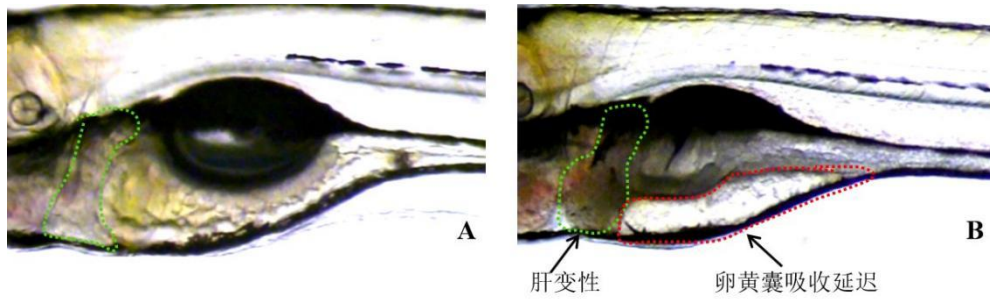


图 D.3 斑马鱼肝脏局部图

注：A 图为正常斑马鱼，B 图斑马鱼出现肝脏发黑（变性）和卵黄囊吸收延迟。绿色虚线所示为肝脏，红色虚线所示为卵黄囊。

D.4 斑马鱼肌肉特征见图 D.4。

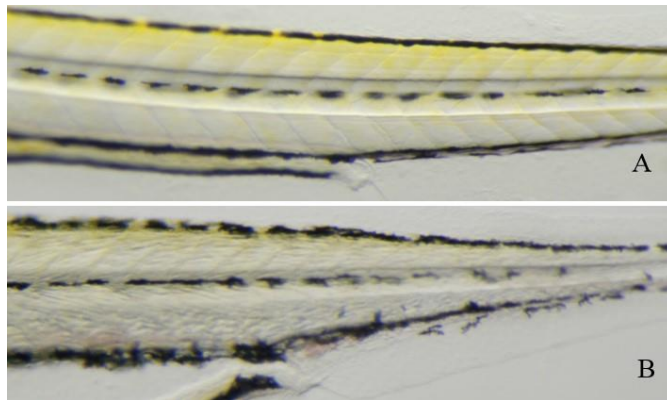


图 D.4 斑马鱼肌肉变性典型图

注：A 图为正常斑马鱼，B 图斑马鱼出现肌肉变性（肌肉纹理不清晰、表面不平整、颜色偏暗）。

参 考 文 献

- [1] 张旭, 任晓航, 王慧,等. 生物效应评价在中药质量控制研究中的应用进展[J]. 中草药, 2018, 49(11): 2686-2691
- [2] Wang D, Hu G, Wang J, et al. Studying CNS effects of Traditional Chinese Medicine using zebrafish models[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 267: 113383.
- [3] Zhang Y, Xia Q, Wang J, et al. Progress in using zebrafish as a toxicological model for traditional Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 282: 114638.
- [4] Chico TJ, Ingham PW, Crossman DC. Modeling cardiovascular disease in the zebrafish[J]. Trends Cardiovasc Med. 2008, 18(4): 150-155.
- [5] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳,等. 基于斑马鱼模型的中药安全性评价研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(1): 278-289.
- [6] 史建伟. 斑马鱼模型在中医药领域的研究与应用[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019(3): 189-190.
- [7] 陈静, 赵璐, 王毅. 模式生物斑马鱼在中药药效物质多模态辨识中的应用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3387-3394.
- [8] 李懿, 刘夏进, 宿树兰,等. 模式生物斑马鱼在中药活性筛选和毒性评价中的应用进展与展望[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(5): 715-720.
- [9] 韩利文, 孔浩天, 史永平,等. 基于模式生物斑马鱼模型的中药药效物质筛选技术及应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 708.
- [10] 王成, 龚莉虹, 郭朝成,等. 模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选中的应用进展[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6125-6134.
- [11] 李晓稳, 佟玲, 李东翔,等. 斑马鱼神经元损伤模型在养血清脑颗粒质量控制中的应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 1-4.
- [12] 李德坤, 原景, 许泽乾,等. 基于斑马鱼模型评价注射用益气复脉(冻干)的心血管和肝脏安全性研究[J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2398-2402.
- [13] 郭殿武, 周娟, 唐礼可,等. 斑马鱼高血脂模型在山青之片质量控制中的应用研究[J]. 中国药品标准, 2013(4): 255-259.
- [14] Qi Y, Zhao X, Liu H, et al. Identification of a Quality Marker (Q-Marker) of Danhong Injection by the Zebrafish Thrombosis Model[J]. Molecules, 2017, 22(9): 1443.
- [15] Wei Y, Nie L, Gao L, et al. An Integrated Strategy to Identify and Quantify the Quality Markers of Xinkeshu Tablets Based on Spectrum-Effect Relationship, Network Pharmacology, Plasma Pharmacochimistry, and Pharmacodynamics of Zebrafish[J]. Front Pharmacol. 2022, 13:899038.
- [16] 李煌, 乔丽菲, 张玉琴,等. 基于化学成分和生物效应的栝楼桂枝汤质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10):1877-1882.

- [17] Fu RJ, Wang WX, Tao HJ, et al. Quantitative evaluation of Danqi tablet by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry integrated with bioassay[J]. *J Sep Sci.* 2021, 44(7):1552-1563.
- [18] 杨冉冉. 中药鸡血藤的质量控制及对斑马鱼抗血栓作用的初步研究[D].北京: 北京中医药大学, 2018.
- [19] 姬蕾. 中药决明子和钩藤的质量控制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [20] Eimon PM, Rubinstein AL. The use of in vivo zebrafish assays in drug toxicity screening[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009, 5(4): 393-401.