

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.01.016

清热活血方对斑马鱼胚胎血管新生的影响及安全性

王海霞¹, 智恺², 马志强³, 武子英¹, 刘立玲¹, 燕美彤³, 果彤³, 曹炜^{2*}

1. 中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁 5 号, 100053; 2. 中国中医科学院; 3. 北京中医药大学

摘要 目的 观察清热活血方对斑马鱼胚胎血管新生的抑制作用并探讨其安全性。方法 选取受精后 2 天的斑马鱼胚胎 120 个, 置于 12 孔板中, 每孔 10 个。分为空白组、阳性药组和清热活血方 50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、150 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 组, 阳性药组给予浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 瓦他拉尼 (PTK787) 3 ml, 清热活血方各浓度组给予相应浓度清热活血方 3 ml, 各组连续给药 72 h, 每 24 h 更换暴露液, 在体式显微镜下观察统计斑马鱼胚胎体节间血管指数及镜下荧光点数。通过预实验确定清热活血方最大非致死浓度 (MNLD) 为 802 $\mu\text{g/ml}$ 和最小全致死浓度 (MTLD) 为 2560 $\mu\text{g/ml}$, 在此区间设定 8 个药物浓度, 建立致死曲线, 计算半数致死浓度 (LD50)。选用 1/10 MNLD (80 $\mu\text{g/ml}$)、1/3 MNLD (267 $\mu\text{g/ml}$)、MNLD 3 个浓度作为毒性指标观察的给药浓度, 给予药物暴露液 3 ml, 连续给药 72 h, 显微镜下计数斑马鱼胚胎心率, 并记录各浓度清热活血方对各个脏器系统及其他表型指标产生的影响, 包括斑马鱼胚胎卵黄、肠腔、肠褶皱、尾鳍等。结果 与空白组比较, 阳性药组及清热活血方 100 $\mu\text{g/ml}$ 、150 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 组斑马鱼胚胎体节间血管指数及镜下荧光点数均降低 ($P < 0.01$)。清热活血方 100 $\mu\text{g/ml}$ 组、150 $\mu\text{g/ml}$ 组、200 $\mu\text{g/ml}$ 组之间比较, 随着中药浓度的增加斑马鱼胚胎体节间血管指数显著降低 ($P < 0.05$), 而各组斑马鱼胚胎镜下荧光点数仅有减少趋势而差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。根据清热活血方致死曲线可得 LD50 为 1200 $\mu\text{g/ml}$, 安全指数为 5.1。与空白浓度比较, 清热活血方 267 $\mu\text{g/ml}$ 、802 $\mu\text{g/ml}$ 浓度干预时斑马鱼胚胎心率显著增快 ($P < 0.01$), 80 $\mu\text{g/ml}$ 浓度对斑马鱼胚胎心率影响不明显 ($P > 0.05$), 267 $\mu\text{g/ml}$ 浓度与 802 $\mu\text{g/ml}$ 浓度对斑马鱼胚胎心率增快的程度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。当浓度高于 267 $\mu\text{g/ml}$ 时, 清热活血方对斑马鱼胚胎的发育表现出实质性的毒性作用, 如肠褶皱消失、肠变性等。结论 浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的清热活血方对斑马鱼胚胎有较强的抑制血管新生的作用, 且具有安全性。

关键词 类风湿关节炎; 清热活血方; 血管新生; 胚胎毒性; 斑马鱼

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种自身免疫性疾病, 主要表现为关节滑膜的慢性炎症, 其主要病理特点之一是病理性关节滑膜血管新生, 大量新生的滑膜血管形成血管翳, 进而侵蚀骨关节, 导致关节损毁、畸形等严重后果^[1]。因此, 抑制关节滑膜血管新生对延缓 RA 的发展具有重要作用。中医理论认为, 活动期 RA 的关键病机是湿热瘀阻, 国医大师路志正教授在长期实践中确立了以清热活血利湿为主的中医治疗原则, 且以据此拟定的清热活血方治疗活动期 RA 取得了显著疗

效^[2-3]。前期动物实验研究^[6-9]已证实, 清热活血方对胶原诱导型关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠的关节滑膜血管新生有明显抑制作用。斑马鱼是研究胚胎发育早期微血管发生的极佳动物模型, 可用于抑制血管发生药物筛选, 其模型对药物心血管毒性、发育毒性和胃肠道毒性等的评价结果与人体实验结果的一致性平均达到了 80% 以上, 已被越来越多地用于药物毒性和安全性评价^[10-11]。本研究旨在通过观察清热活血方对斑马鱼胚胎血管新生的影响及安全性, 进一步阐释清热活血方的抗血管新生作用, 为清热活血方在临床上的应用提供实验依据。

基金项目: 国家自然科学基金 (81373592)

* 通讯作者: caowei6636@126.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生型 AB 品系 VEGF-R2 (Flk1) 转基因斑马鱼, 购自国家斑马鱼资源中心, 由北京中医药大学中药学院循环养殖系统饲养。选用 30~35 周龄成年斑马鱼 15 尾, 全长 40~50 mm, 雌雄比例为 1:2。本实验通过北京中医药大学伦理委员会审核 (无编号)。

1.2 药物

清热活血方组成: 金银花 30 g, 土茯苓 30 g, 麸炒苍术 15 g, 黄柏 9 g, 赤芍 15 g, 丹参 15 g, 绵萆薢 15 g, 青风藤 15 g, 莪术 9 g, 蜈蚣 2 条, 蜂房 6 g 等, 饮片由中国中医科学院广安门医院中药房提供。按清热活血方处方称取饮片, 用超声波打成药粉, 采用水加热回流方法提取 2 次, 每次 1.5 h, 双层滤纸过滤, 蒸干, 真空干燥 48 h 后取出粉碎研磨放在干燥器中待用。实验时用养殖水将中药稀释到所需浓度。

1.3 主要试剂及仪器

瓦他拉尼 (PTK787, 货号 S1101), 购自 Selleck Chem 公司; 无水乙醇 (货号 B0301002)、氢氧化钠 (货号 A1060009)、氯化钾 (货号 A1049003)、硫酸镁 (货号 A1037009)、磷酸二氢钠 (货号 A1060057)、磷酸二氢钾 (货号 A1049020)、碳酸氢钠 (货号 A1060001)、氯化钠 (货号 A1060005) 均为分析纯, 购自北京化工厂; 氯化钙 (货号 V900266)、甲基纤维素 (货号 M0512)、三卡因 (货号 MS222), 购自 Sigma 公司。

斑马鱼循环水养殖系统 (ESEN-AW-S1 型), 北京爱生科技公司; 恒温培养箱 (LRH-250Z 型), 广州瑞明仪器有限公司; 体式荧光显微镜 (ZOOMV16 型), ZEISS 公司; 电热套 (ZDHW 型), 北京中兴伟业仪器有限公司; 旋转蒸发器 (OSB-2100 型), 上海爱朗仪器有限公司。

1.4 斑马鱼幼鱼的繁育

斑马鱼循环养殖水根据 Brand 等^[2]提出的方法配制, 水温控制在 $(28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, pH 值 7.0~7.2, 电导率 450~550 nS/cm, 光照/黑暗周期为 14 h/10 h。将成年雌雄斑马鱼按 1:2 配对产卵, 随后用吸管将鱼卵收集于含有孵化水的干净无菌培养皿中, 用培养液清洗鱼卵数次以除去未受精卵、粪便等杂物, 再用幼鱼养殖水清洗 3 次, 将发育完整的受精卵置于 28.5°C 光照培养箱中培养, 光照/

黑暗周期为 14 h/10 h。

1.5 血管新生实验

选取受精后 2 天的斑马鱼胚胎 120 个, 置于 12 孔板中, 每孔 10 个。根据预实验测出各给药组适宜的浓度, 实验分为空白组、阳性药组和清热活血方 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组, 阳性药组给予浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PTK787 3 ml, 清热活血方各浓度组给予相应药物 3 ml, 各组连续给药 72 h, 每 24 h 更换暴露液。在体式显微镜下观察统计斑马鱼胚胎体节间血管指数, 体节间血管指数 = 完整血管数 $\times$ 1 + 不完整血管数 $\times$ 0.5; 斑马鱼胚胎镜下荧光点数即镜下转基因荧光蛋白 Flk1 的量。

1.6 急性毒性实验

1.6.1 清热活血方安全范围 选取受精后 2 天的斑马鱼胚胎 240 个置于 12 孔板中, 每孔 20 个。通过预实验确定清热活血方最大非致死浓度 (MNLD) 和最小全致死浓度 (MTLD), 在此区间设定 6~8 个药物浓度, 建立致死曲线, 计算半数致死浓度 (LD50)^[3]。预实验结果显示, 清热活血方 MNLD 为 802 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MTLD 为 2560 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在此区间取 8 个药物浓度建立致死曲线。

1.6.2 斑马鱼胚胎心率及部分表型指标变化 以幼鱼养殖水为空白对照, 选用 1/10 MNLD (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、1/3 MNLD (267 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、MNLD 3 个浓度作为毒性指标观察给药浓度。给予药物暴露液 3 ml, 连续给药 72 h, 每 24 h 更换暴露液。72 h 后将斑马鱼胚胎置于显微镜下, 检测斑马鱼心率, 并记录暴露液对各个脏器系统及其他表型指标产生的影响, 包括斑马鱼胚胎卵黄、肠腔、肠褶皱、尾鳍等表型的变化, 记录数据的同时拍照。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 计量数据均符合正态分布, 用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组斑马鱼胚胎体节间血管指数及镜下荧光点数比较

表 1 示, 与空白组比较, 阳性药组及清热活血方 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组斑马鱼胚胎体节间血管指数及镜下荧光点数均降低 ($P < 0.01$), 清热活血方 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与阳性药组比较, 清热活血方 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、

表 1 各组斑马鱼胚胎体节间血管指数及镜下荧光点数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	胚胎数	体节间血管指数	镜下荧光点数
空白组	10	26.90 ± 0.99	112275.90 ± 3972.21
阳性药组	10	16.00 ± 1.23*	90504.88 ± 14820.27*
清热活血方 50 μg/ml 组	10	26.05 ± 1.01	96705.75 ± 17495.43
清热活血方 100 μg/ml 组	10	17.11 ± 0.90*	88931.50 ± 22233.78*
清热活血方 150 μg/ml 组	10	11.40 ± 1.17*△▲	78654.38 ± 18459.11*
清热活血方 200 μg/ml 组	10	9.40 ± 1.52*△△▲#	69312.25 ± 14751.69*△

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与阳性药组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与清热活血方 100 μg/ml 组比较, ▲ $P < 0.05$; 与清热活血方 150 μg/ml 组比较, # $P < 0.05$

200 μg/ml 组斑马鱼胚胎体节间血管指数降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 清热活血方 200 μg/ml 组斑马鱼胚胎镜下荧光点数减少 ($P < 0.05$)。清热活血方 100 μg/ml 组、150 μg/ml 组、200 μg/ml 组之间比较, 随着中药浓度的增加斑马鱼胚胎体节间血管指数显著降低 ($P < 0.05$), 而各组斑马鱼胚胎镜下荧光点数仅有减少趋势而差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 清热活血方安全范围

根据清热活血方致死曲线 (图 1), 可得 5% 致死量 (LD₅) 为 954 μg/ml, 95% 有效量 (ED₉₅) 为 187 μg/ml, LD₅₀ 为 1200 μg/ml。安全指数为 LD₅/ED₉₅ 的比值, 因此可得清热活血方的安全指数为 5.1。

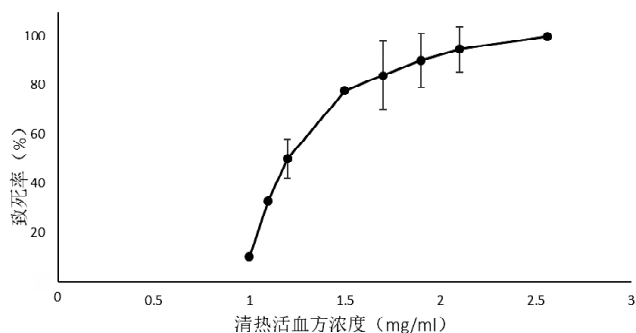


图 1 清热活血方致死曲线

2.3 不同浓度清热活血方干预斑马鱼胚胎部分表型发生率比较

表 2 示, 与空白浓度比较, 清热活血方浓度低于 267 μg/ml 时, 对斑马鱼胚胎的发育有轻微不良影响, 如斑马鱼胚胎卵黄吸收延迟、血流过慢、肠

腔变大、肠褶皱变少等, 当清热活血方浓度高于 267 μg/ml 时, 清热活血方对斑马鱼胚胎的发育表现出实质性的毒性作用, 如肠褶皱缺失、肠变性等。

2.4 不同浓度清热活血方干预斑马鱼胚胎心率比较

表 3 示, 与空白浓度比较, 清热活血方 267、802 μg/ml 浓度干预时斑马鱼心率显著增快 ($P < 0.01$), 80 μg/ml 浓度对斑马鱼心率影响不明显 ($P > 0.05$)。267 μg/ml 浓度与 802 μg/ml 浓度对斑马鱼心率增快的程度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 不同浓度清热活血方干预斑马鱼胚胎心率比较 ($\bar{x} \pm s$)

浓度	胚胎数	心率 (次/min)
空白浓度	20	21.10 ± 1.79
80 μg/ml	20	19.40 ± 3.66
267 μg/ml	20	23.10 ± 2.28*
802 μg/ml	20	23.50 ± 1.96*

注: 与空白浓度比较, * $P < 0.01$

3 讨论

血管的异常增多是 RA 关节滑膜组织最具代表性的变化之一, 大量研究^[14-17]证明, 抑制血管新生即可减缓 RA 的进程。清热活血方以金银花、土茯苓为君, 清热解毒利湿; 苍术、黄柏、赤芍、丹参、莪术、蜈蚣、蜂房为臣, 苍术、黄柏清热燥湿, 赤芍、丹参活血祛瘀, 莪术、蜈蚣、蜂房祛瘀通络止痛; 佐以萆薢、青风藤清热利湿, 通经除痹。诸药合用共奏清热、活血、通络之功。既往药理研究^[18-22]显示, 清热活血方中各成分具有抗炎、镇痛、改善血流动力学和血管通透性以及调节机体

表 2 不同浓度清热活血方干预斑马鱼胚胎部分表型发生率比较 (%)

浓度	胚胎数	卵黄吸收延迟	血流过慢	肠腔变大	肠褶皱变少	肠褶皱缺失	肠变性	尾鳍变小
空白浓度	20	0	0	0	0	0	0	0
80 μg/ml	20	10	20	20	10	0	0	0
267 μg/ml	20	0	0	10	30	0	0	0
802 μg/ml	20	10	0	0	40	40	20	0

免疫的作用。

本实验动物为 VEGF-R2 (Flk1) 转基因斑马鱼,即将 RFP 标记插入到 VEGF-R2 基因的启动子序列中,使血管被荧光标记,即可在荧光显微镜下呈现带有荧光的血管,能够直观地观察斑马鱼血管发育情况,因此斑马鱼模型在血管生成抑制剂筛选中应用广泛^[23]。本研究结果发现,清热活血方在 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度时对斑马鱼血管有明显的抑制作用。

RA 患者发病高峰在 30~50 岁,且女性多于男性,部分有妊娠倾向的女性与 RA 患者重叠^[24],故本实验观察清热活血方对斑马鱼胚胎的毒性作用。本研究结果显示,清热活血方在 267 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时使斑马鱼胚胎心率加快,对斑马鱼表型和部分脏器也有一定影响,如斑马鱼肠腔变大、肠褶皱变少,说明出现毒性作用。因此,在临床用药时注意在妊娠期 RA 患者应禁用或慎用清热活血方。同时,清热活血方在一定浓度范围内具有明显的胃肠道刺激作用,提示该药宜饭后服用,且勿持续长久服用,以减轻对肠道的不良影响。

参考文献

- [1] 林果为,王吉耀,葛均波. 实用内科学 [M]. 15 版. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 2610.
- [2] 周新尧,王雷,余卫,等. 清热活血方药治疗类风湿关节炎 1 年后双手 X 线变化临床观察 [J]. 中国骨伤, 2011, 24(12): 992-996.
- [3] 姜泉,冯兴华,王承德,等. 清热活血方治疗类风湿关节炎患者 71 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2012, 53(6): 488-491.
- [4] 姜泉,曹炜,唐晓颇,等. 清热活血方药治疗活动期类风湿关节炎的临床疗效观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(7): 588-592.
- [5] 李光耀,姜泉. 从痰瘀痹阻论治类风湿关节炎 [J]. 中医杂志, 2018, 59(12): 1063-1065, 1068.
- [6] 刘鹏霄,曹炜,姜泉,等. 清热活血方抑制 II 型胶原诱导型关节炎大鼠滑膜组织血管新生的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(10): 686-690.
- [7] 智恺. 清热活血方抗类风湿关节炎滑膜血管新生相关因子的研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2016.
- [8] 王海霞,曹炜,张聪,等. 清热活血方对 II 型胶原诱导型关节炎大鼠相关指标的影响研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(8): 1071-1073.
- [9] 智恺,刘春芳,曹炜,等. 清热活血方对肿瘤坏死因子 α 诱导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞迁移和黏附的影响 [J]. 中医杂志, 2016, 57(20): 1777-1781.
- [10] SCHOLZ S. Zebrafish embryos as an alternative model for screening of drug-induced organ toxicity [J]. Arch Toxicol, 2013, 87(5): 767-769.
- [11] 田丽莉,朱国福. 斑马鱼在中药研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 822-827.
- [12] BRAND M, GRANATO M, NUSSLEIN-VOLHARD C. Keeping and raising zebra fish [M]. Oxford: Oxford Miversity Press, 2002: 7-37.
- [13] 顾兵,张政,李玉萍,等. 半数致死量及其计算方法概述 [J]. 中国职业医学, 2009, 36(6): 507-508.
- [14] WANG Y, LIU Z, LI T, et al. Enhanced therapeutic effect of rgd-modified polymeric micelles loaded with low-dose methotrexate and nimesulide on rheumatoid arthritis [J]. Theranostics, 2019, 9(3): 708-720.
- [15] YAMAGUCHI K, SUDO H, IMAI K. Vascular endothelial growth factor signaling in VE-cadherin expression and tube-like formation by rheumatoid arthritic synovial fibroblast-like cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(2): 405-409.
- [16] AZIZI G, BOGHOZIAN R, MIRSHAFIEY A. The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis [J]. Int J Rheum Dis, 2014, 17(4): 369-383.
- [17] ZHAO X, YUE Y, CHENG W, et al. Hypoxia-inducible factor: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis [J]. Curr Drug Targets, 2013, 14(6): 700-707.
- [18] 王建平,张海燕,傅旭春. 土茯苓的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 海峡药学, 2013, 25(1): 42-44.
- [19] 雷玲,李兴平,白筱璐,等. 金银花抗内毒素、解热、抗炎作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 115-117.
- [20] 陆小华,马骁,王建,等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 595-602.
- [21] 杨志霞,林谦,马利,等. 丹参对心血管疾病药理作用的文献研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(2): 93-96.
- [22] 刘端勇,赵海梅,左志琴,等. 全蝎蜈蚣对胶原免疫性关节炎大鼠的关节损伤改善作用 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(4): 73-76.
- [23] 冯康虎,方鹏飞,张文贤,等. 斑马鱼模型及其在血管生成抑制剂筛选中的应用 [J]. 西部中医药, 2014, 27(12): 141-144.
- [24] 栗占国,张奉春,曾小峰. 风湿免疫学高级教程 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2015: 81.

Study on Effects of *Qingre Huoxue Recipe* (清热活血方) on Angiogenesis in Zebrafish Embryos and Its Safety
WANG Haixia¹, ZHI Kai², MA Zhiqiang³, WU Ziyang¹, LIU Liling¹, YAN Meitong³, GUO Tong³, CAO Wei²

1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences; 3. Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To observe the inhibitory effect of *Qingre Huoxue Recipe* (清热活血方) on angiogenesis of zebrafish embryos and to explore its safety. **Methods** A total of 120 zebrafish embryos 2 days after fertilization were selected and placed in 12-well plates with 10 in each well. They were divided into a blank group, a positive drug group and a *Qingre Huoxue Recipe* 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ group. The positive drug group was given Vatarani (PTK787) 3 ml at concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$. Each concentration group of *Qingre Huoxue Recipe* was given 3 ml of the corresponding drug. All groups were continuously administered for 72 h, and the exposure solution was changed every 24 h. The zebrafish embryonic intersegmental vascular index and the number of fluorescence points under the microscope were observed and counted under a stereomicroscope. The maximum non-lethal concentration (MNLD) of *Qingre Huoxue Recipe* was determined to be 802 $\mu\text{g/ml}$ and the minimum total lethal concentration (MTLD) was 2560 $\mu\text{g/ml}$ through pre-experiments, and 8 drug concentrations were set in this interval to establish a lethal curve and calculate the half-lethal concentration (LD50). Three concentrations of 1/10 MNLD (80 $\mu\text{g/ml}$), 1/3 MNLD (267 $\mu\text{g/ml}$), and MNLD were selected as the drug concentration for observation of toxicity indicators. Drug exposure solution 3 ml was administered for 72 h. The embryo heart rate of zebrafish was counted under microscope, and the effects of *Qingre Huoxue Recipe* on various organ systems and other phenotypic indicators were recorded, including zebrafish embryo yolk, intestinal cavity, intestinal folds, and tail fins. **Results** Compared with the blank group, the intersegmental vascular index and microscopic fluorescence points of the zebrafish embryos in the positive drug group and *Qingre Huoxue Recipe* 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, and 200 $\mu\text{g/ml}$ groups were decreased ($P < 0.01$). Comparing among *Qingre Huoxue Recipe* 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, and 200 $\mu\text{g/ml}$ groups, the intersegmental vascular index of the zebrafish embryonic body decreased significantly with the increase of the concentration of traditional Chinese medicine ($P < 0.05$). There was only a decreasing trend of fluorescence points under the microscope of zebrafish embryos in each group, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). According to the lethal curve of *Qingre Huoxue Recipe*, the LD50 was 1200 $\mu\text{g/ml}$, and the safety range was 5.1. Compared with the blank concentration, the heart rate of zebrafish embryos significantly increased when *Qingre Huoxue Recipe* was administered at a concentration of 267 $\mu\text{g/ml}$ and 802 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.01$), and the concentration of 80 $\mu\text{g/ml}$ had no significant effects on the heart rate of zebrafish embryos ($P > 0.05$). There was no significant difference in the rate of increase in heart rate of zebrafish embryos between the concentration of 267 $\mu\text{g/ml}$ and 802 $\mu\text{g/ml}$ ($P > 0.05$). When the concentration was higher than 267 $\mu\text{g/ml}$, *Qingre Huoxue Recipe* showed substantial toxic effects on the development of zebrafish embryos, such as disappearance of intestinal folds and intestinal degeneration. **Conclusion** *Qingre Huoxue Recipe* with a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ has a strong antiangiogenic effect on zebrafish embryos and is safe.

Keywords rheumatoid arthritis; *Qingre Huoxue Recipe* (清热活血方); angiogenesis; embryo toxicity; zebrafish

(收稿日期: 2019-03-25; 修回日期: 2019-09-09)

编辑: 邓媛