

香加皮水提取物对斑马鱼幼鱼肝脏毒性的初步研究

代一航 赵崇军 田敬欢 倪媛媛 李二文 杨冉冉 冯丹 刘雯雪 王昭懿
乔艺涵 马志强 林瑞超 邹迪新

【摘要】 目的 研究香加皮水提取物对斑马鱼幼鱼肝脏的毒性作用。**方法** 将受精后发育 4 天的斑马鱼幼鱼暴露于不同浓度的香加皮水提取物中,24 小时后,统计幼鱼的死亡率,计算量毒曲线;选取低于 LC_{10} 的三个药物暴露组和空白组,以幼鱼肝脏形态和面积变化、转基因幼鱼肝脏荧光面积和荧光强度以及幼鱼肝脏细胞凋亡、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸转氨酶(aspartic transaminase, AST)活性为毒性评价指标。**结果** 香加皮水提取物对幼鱼的量-毒回归曲线 $y = -1.0843 + 0.0014x$ ($R^2 = 0.9524, r = 0.97590, P < 0.001$), LC_{10} 为 $845.9286 \mu\text{g/mL}$;与空白组相比,幼鱼肝脏形态异常、透明度降低,肝脏面积随药物暴露浓度增加而剂量依赖性增加($P < 0.05$);转基因幼鱼肝脏荧光面积随暴露浓度增加而增大,但在高浓度组减小,荧光强度随暴露浓度的增加而减小($P < 0.05$);高浓度暴露组幼鱼肝脏区域显示了细胞凋亡;药物暴露组幼鱼 SOD、GSH-Px 活力显著下降,ALT、AST 活力显著上升($P < 0.05$)。**结论** 香加皮水提取物对斑马鱼幼鱼的肝脏毒性可能是通过破坏其体内氧化应激平衡,进而诱导肝脏细胞凋亡实现的。

【关键词】 香加皮; 水提取物; 斑马鱼模型; 肝脏毒性

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.10.001

Effects of waterextract from cortex periplocae on hepatotoxicity of zebrafish DAI Yihang, ZHAO Chongjun, TIAN Jinghuan, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: LIN Ruichao, E-mail:linrch307@sina.com; ZOU Dixin, Email:zoudixin@163.com

【Abstract】 Objective To study the toxic effect of waterextract from cortex periplocae on liver of zebrafish larval. **Methods** Zebrafish embryos of 4 days post-fertilization were exposed to 12-well plates with different concentrations of waterextract from cortex periplocae for 24 hours, and the mortality rate was calculated and the toxic curve was calculated. Three drug exposed groups less than LC_{10} and the blank group were selected. The changes of liver morphology and area, fluorescence area and fluorescence intensity of liver, apoptosis of liver cell, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, alanine aminotransferase, aspartic transaminase were used as indicator of toxicity assessment. **Results** The LC_{10} of

基金项目:北京市科委创新环境与平台建设专项(Z16111000500000)

作者单位:100102 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[代一航(硕士研究生)、赵崇军(博士研究生)、田敬欢(硕士研究生)、倪媛媛(硕士研究生)、李二文(硕士研究生)、杨冉冉(硕士研究生)、冯丹(博士研究生)、刘雯雪(硕士研究生)、王昭懿(博士研究生)、乔艺涵(硕士研究生)、马志强、林瑞超];内蒙古医科大学药学院(邹迪新)

作者简介:代一航(1991-),2015 级在读硕士研究生。研究方向:中药毒性成分与中药药理研究。E-mail:2449416672@qq.com

通信作者:林瑞超(1954-),博士,教授,博士生导师。研究方向:中药、民族药质量控制与品质评价研究。E-mail:linrch307@sina.com;邹迪新(1983-),女,博士,讲师。研究方向:中药药效物质基础及作用机制研究。Email:zoudixin@163.com

waterextract from cortex periplocae was $845.9286 \mu\text{g/mL}$, the mortality rate was dependent with the concentration, concentration-mortality curve was $y = -1.0843 + 0.0014x$ ($R^2 = 0.9524, P < 0.001$), and correlation coefficient was 0.97590 ($P < 0.001$). Compared with the control group, morphological abnormalities was more and transparency was decreased in liver, and liver area was increased with drug exposure concentration ($P < 0.05$); The fluorescence area was increased with the exposure concentration increased, but in the high concentration group, the fluorescence intensity was decreased with the exposure concentration increased ($P < 0.05$); The apoptosis was appeared in high concentration exposed group. The activity of SOD, GSH-Px was significantly decreased while the activity of AST, ALT was significantly increased. **Conclusion** Waterextract from cortex periplocae can induce hepatotoxicity in zebrafish larvae, and the mechanism may relate to destroy the balance of oxidative stress and induce apoptosis in liver cells.

【Key words】 Cortex periplocae; Waterextract; Zebrafish model; Hepatotoxicity

香加皮为萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* Bge 的干燥根皮,始载于《神农本草经》,归为下品,其性温,味辛苦,有毒,归肝肾心经;具有利水消肿、祛风湿、强筋骨之功效;用于治疗心悸气短、风寒湿痹、腰膝酸软等症^[1]。现代药物化学和药理学研究发现,香加皮中含有多种化学成分,包括 C21 甾体类、三萜类、醛类等,具有强心、抗肿瘤、抗炎、免疫调节等多种作用^[2-3]。2015 版《中华人民共和国药典》记载含有香加皮的成方制剂有 8 种,其中口服药物有 3 种,主要用于强心、消肿;外用药物有 5 种,主要用于祛风除湿、活血止痛。但在临床运用时发现其具有一定的毒性,严重限制了它的广泛应用,并且现代研究对其毒性靶器官和毒性成分的研究较少,缺乏相关毒性评价的数据^[4]。目前文献报道的主要为其含有的杠柳毒苷和杠柳次苷等强心苷类成分所产生的心脏毒性作用^[5],但香加皮水提取物的肝脏毒性未见有详细明确的报道,其毒性成分的种类尚不明确,毒性作用与目前较为认同的功效与毒性成分——杠柳毒苷是否具有相关性,以及产生肝毒性时药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄过程和其肝脏损伤的机制,有待进一步深入研究。

斑马鱼作为近年来新颖的模式生物,在胚胎发育生物学、环境毒理学等领域展现出独特的优势^[6]。至今,斑马鱼在药物安全性评价中已有了较广泛的应用,从一般毒性评价到发育毒性、心脏毒性、肝脏毒性、神经毒性、视觉系统毒性的评价,甚至到耳毒性、软骨毒性、胃肠毒性评价^[7]。总之,斑马鱼模型弥补了体外细胞实验缺少药物代谢内环境、体内实验周期长、成本资源较高的缺陷,成为体外细胞实验和体内动物实验的桥梁,并且斑马鱼对药物的毒性反应与哺乳动物相似^[8];因此,运用斑马鱼模型进行中药毒性评价不失为一种新颖的评

价方法。

本文选取斑马鱼为模型,探讨香加皮水提取物对斑马鱼幼鱼的肝脏毒性作用,以期为建立以斑马鱼为模型的毒性快速评价体系提供参考数据,并为临床安全用药提供实验数据和文献参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 斑马鱼养殖与繁育 斑马鱼亲本购于中国科学院武汉水生生物研究所,实验所用野生 (wild-type) AB 系和肝脏荧光蛋白转基因斑马鱼 Tg (fabp10a; dsRed; ela31; EGFP) 幼鱼由本实验室斑马鱼养殖系统繁育。斑马鱼的养殖繁育参照 Zebrafish Book^[9]。实验的操作遵循 OECD 标准。养殖条件:水温 (28 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, pH 值 $7 \sim 7.2$,电导率 $450 \sim 550 \mu\text{S/cm}$,黑暗与光照周期为 $10 \text{ h}/14 \text{ h}$,成年斑马鱼每日喂食丰年虾幼虫 3 次。繁育:于暗周期开始时,选取成年斑马鱼雌鱼和雄鱼,按照 $1:1$ 的比例放入带隔板的产卵缸中,暗周期结束后,将隔板抽出,打开光源,在光照的刺激下,雄鱼开始追逐雌鱼,雌鱼开始产卵,待受精完成后,收集受精卵。在显微镜下将受精卵挑出并转入含有适量胚胎培养水的无菌培养皿中,清洗数次,放入生化培养箱中孵育 96 小时,每 24 小时更换一次胚胎培养水。

1.1.2 试验材料与仪器药材 香加皮(安国圣山药业有限公司)经北京中医药大学刘春生教授鉴定为萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* Bge 的干燥根皮。试剂:NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4 、 MgSO_4 、 NaHCO_3 (分析纯,北京化工), CaCl_2 、吡啶橙 (sigma)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、天门冬氨酸转氨酶 (alanine

aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶 (aspartic transaminase, ALT)、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒;南京建成生物工程研究所。仪器:斑马鱼循环水养殖系统(北京爱生科技公司);蔡司荧光显微镜(NIKON);1 mL、5 mL 移液器(eppendorf);恒温培养箱 LRH-250Z(广州瑞明仪器有限公司);DZF-6050B真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);R-1001-VN 旋蒸仪(郑州长城科工贸有限公司);15 cm 玻璃培养皿(北京百诺威生物科技有限公司);PHS-3C 酸度计(上海佑科, DDS-307);电导率仪(上海一恒科技有限公司), UV-2000 紫外-可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)。斑马鱼胚胎培养液:按照 Zebrafish Book 标准, 配制每升含有 0.137 mol NaCl、5.4 mol KCl、0.25 mol Na_2HPO_4 、0.44 mol K_2HPO_4 、1.3 mol CaCl_2 、1.0 mol MgSO_4 、4.2 mol NaHCO_3 的水溶液。

1.2 香加皮水提取物药液的配制

取香加皮饮片, 粉碎后过 40 目筛, 精密称取 50 g 香加皮粉末, 加入 10 倍量的蒸馏水回流提取 2 次, 每次 2 小时, 提取液抽滤后浓缩, 减压干燥, 研磨均匀后干燥保存。精密称取一定量的香加皮提取物粉末, 溶于一定量的胚胎培养水中, 超声助溶 30 分钟, 根据预实验结果, 配置成一定浓度的储存液, 实验前使用胚胎培养水稀释至所需浓度。

1.3 斑马鱼幼鱼 24 小时急性毒性试验

选取发育正常、无畸形的受精后 4 天(4 dpf)的 AB 系野生和转基因斑马鱼幼鱼, 分别随机放置于 12 孔细胞培养板中, 每孔 20 条, 并加入适量等体积胚胎培养水。

1.3.1 药物暴露浓度的选取 根据预实验结果, 设计不同暴露浓度的药液, 按照上述药液的配置原则, 配置成 700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500 $\mu\text{g/mL}$ 的药液。

1.3.2 给药方式 将装有幼鱼的 12 孔板中的培养水依次吸出, 并依次加入不同浓度的药液, 每孔 4 mL, 每个浓度两个复孔, 空白对照组加入等体积的新鲜胚胎培养水。加盖标记后, 将孔板置于可控温光照培养箱中(28.5℃)24 小时(黑暗与光照时间比为 5:7), 实验重复三次。

1.3.3 实验终点处理方法 在实验终点, 统计各个浓度组死亡的斑马鱼数目, 并计算死亡率, 运用统计软件 SAS 8.2 计算药物暴露浓度与死亡率相关性和线性回归方程。

1.4 AB 系野生斑马鱼幼鱼肝脏形态表型观察和肝脏面积测定

1.4.1 药物暴露浓度选取和暴露处理选取 低于 LC_{10} 的三个药物浓度, 分为高浓度组、中浓度组、低浓度组, 并设置空白对照组, 参照 1.3.2 项进行暴露处理。

1.4.2 表型观察 药物暴露结束后, 去除药液, 使用胚胎培养水清洗幼鱼 3 次后, 将幼鱼固定于涂布有 3% 的甲基纤维素凝胶的载玻片上, 并摆放成侧躺姿态(便于观察幼鱼肝脏的形态特征), 在显微镜下依次观察各个药物暴露组和空白组中幼鱼的肝脏表型, 并在相同光学条件下进行拍照。使用显微镜软件(ZEN lite)统计各组幼鱼的肝脏面积。

1.5 肝脏转基因斑马鱼幼鱼肝脏形态学观察、荧光面积和平均荧光强度的测定

1.5.1 药物暴露浓度选取和暴露处理药物 暴露浓度选取和暴露处理同 1.4.1 项。

1.5.2 表型观察 表型观察的处理方法同 1.4.2 项, 并使用显微镜软件(ZEN lite)统计各组幼鱼肝脏荧光面积和肝脏平均荧光强度。

1.6 AB 系野生斑马鱼幼鱼肝脏吖啶橙染色

1.6.1 吖啶橙染色液的配置方法 参照文献^[10]的配置方法, 精密称取一定量的吖啶橙粉末, 放入棕色容量瓶中, 加入斑马鱼胚胎培养水, 配置成 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的染色液, 4℃ 环境避光保存。

1.6.2 细胞凋亡评价 按照上述 1.4.1 项方法进行药物暴露, 在实验终点, 用胚胎培养水、PBS 依次清洗各个浓度药物暴露组幼鱼三次, 去除 PBS 后每孔加入 2 mL 的吖啶橙染液, 28℃ 避光处理 20 分钟进行染色。随后加入 PBS 反复清洗幼鱼 3 次, 将幼鱼侧位放置于含有 3% 甲基纤维素的载玻片上, 于荧光显微镜下观察斑马鱼肝脏细胞凋亡的情况。

1.7 斑马鱼幼鱼 SOD、GSH-Px、AST 和 ALT 活力测定

按照上述 1.4.1 项下方法进行药物暴露, 在实验终点, 将 12 孔板中的斑马鱼幼鱼用斑马鱼胚胎培养水清洗 3 次, 转入 1.5 mL 预先称重的离心管中, 每个浓度 80 条幼鱼, PBS 清洗 3 次, 移除 PBS, 迅速称重并冷冻(-20℃)处理, 随后按照试剂盒的相关步骤进行酶活性测定。

1.8 统计学处理

使用统计分析软件 SAS 8.2 进行数据分析, 所有计量资料均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)形式, 各组正

态性和方差齐性检验结果显示符合正态分布且方差齐,因此运用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 LSD 法进行组间多重比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 斑马鱼幼鱼 24 小时急性毒性实验结果

经 SAS 8.2 统计软件的相关回归分析,在一定范围内,药液浓度与幼鱼的死亡率成正相关关系,回归方程为 $y = -1.0843 + 0.0014x$ ($R^2 = 0.9524$, $P<0.05$),相关性较好,相关系数为 0.9759 ($P<0.05$)。由线性回归方程计算出 $LC_{50} = 1131.6427 \mu\text{g/mL}$, $LC_{10} = 845.9286 \mu\text{g/mL}$, $LC_{0} = 774.5 \mu\text{g/mL}$ 。

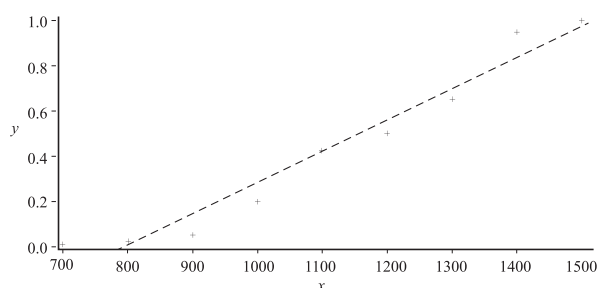


图1 斑马鱼幼鱼经香加皮水提取物不同浓度药物处理 24 小时后浓度-死亡率线性回归曲线

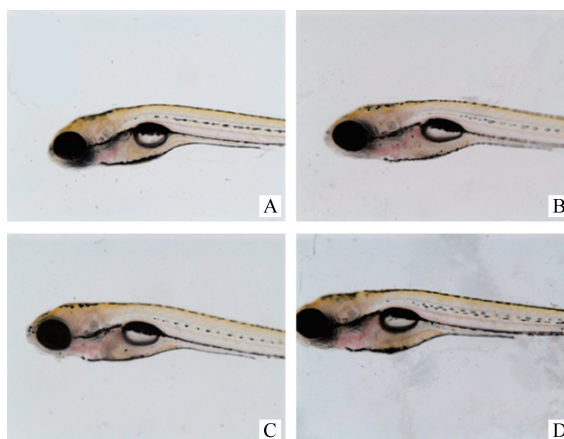
2.2 香加皮水提取物暴露处理对野生斑马鱼幼鱼肝脏表型和肝脏面积的影响

结果显示,空白组斑马鱼肝脏成透明状,无畸形,肝脏形态完整清晰,而药物暴露组斑马鱼肝脏透明度降低,形态膨大,并且随暴露浓度增加,肝脏进一步膨大,成暗灰色状,肝脏区域边缘逐渐模糊;其中,600 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组肝脏透明度降低,700 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组中斑马鱼肝脏区域成整体灰暗状,800 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组除肝脏成灰暗状外,卵黄囊发育迟缓,表明肝脏损伤进一步扩大。肝脏面积统计结果显示,各浓度药物暴露处理组中斑马鱼的肝脏面积呈剂量依赖性增加,并与空白组均具有显著性差异 ($P<0.05$)。如图 2 所示。

表1 斑马鱼幼鱼(4dpf)经香加皮水提取物不同浓度药物处理 24 小时后肝脏面积变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝脏面积 (μm^2)
空白组	20	11417.16 \pm 126.65
600 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组	20	12264.42 \pm 484.22 ^a
700 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组	20	13943.16 \pm 389.68 ^a
800 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组	20	16165.84 \pm 1203.58 ^a

注:与空白组相比,^a $P<0.05$ 。

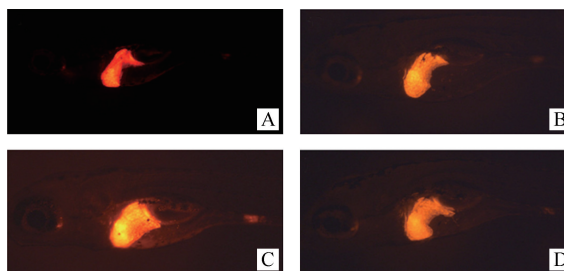


注:A 对照组;B 低浓度(600 $\mu\text{g/mL}$)暴露组; C 中浓度(700 $\mu\text{g/mL}$)暴露组;D 高浓度(800 $\mu\text{g/mL}$)暴露组

图2 斑马鱼幼鱼(4dpf)经香加皮水提取物不同浓度药物处理 24 小时后肝脏形态学变化

2.3 香加皮水提取物暴露处理对转基因斑马鱼肝脏形态、荧光面积和平均荧光强度的影响

形态观察结果表明,空白组斑马鱼肝脏形态完整,产生了强烈的红色荧光;而给药组斑马鱼肝脏形态异常,肝脏荧光面积增大,荧光强度有下降的趋势;其中,600 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组斑马鱼肝脏荧光面积增大,荧光强度减弱,700 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组中斑马鱼肝脏荧光面积进一步增加,800 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组肝脏荧光面积较 700 $\mu\text{g/mL}$ 组减小,但与空白组斑马鱼肝脏相比,仍显示增大的趋势。肝脏面积统计结果显示,斑马鱼的肝脏荧光面积随药物暴露浓度的增加而增大,但在高浓度组有下降的趋势,并与空白组均具有显著性差异 ($P<0.05$)。肝脏平均荧光强度结果统计显示,斑马鱼肝脏荧光强度呈剂量依赖性降低,并与空白组比较具有显著性差异 ($P<0.05$)。如图 3 所示。



注:A 空白对照组;B 低浓度(600 $\mu\text{g/mL}$)暴露组; C 中浓度(700 $\mu\text{g/mL}$)暴露组;D 高浓度(800 $\mu\text{g/mL}$)暴露组

图3 肝脏荧光蛋白转基因斑马鱼幼鱼经香加皮水提取物不同浓度药物处理 24 小时肝脏表型结果

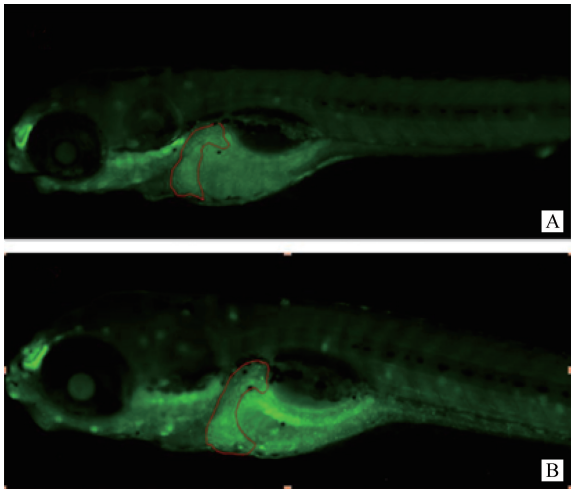
表 2 幼鱼肝脏荧光面积和平均荧光强度统计表($\bar{x}\pm s$)

组别	n	荧光面积(μm^2)	平均荧光强度
空白组	20	24414.33±583.64	6261.09±232.95
600 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组	20	26801.25±672.97 ^a	5922.93±233.56 ^a
700 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组	20	27283.54±986.45 ^a	5701.39±227.21 ^a
800 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组	20	26110.75±686.87 ^a	5664.94±178.90 ^a

注：与空白组相比，^a $P<0.05$ 。

2.4 斑马鱼幼鱼经香加皮水提取物暴露处理后肝脏吖啶橙染色结果

吖啶橙是一种核酸插入式染料,能透过胞膜完整的细胞,与凋亡的细胞中的双链 DNA 结合后,产生绿色荧光。吖啶橙染色处理后,与空白组相比,高浓度药物处理组斑马鱼肝脏区域显示了显著的黄绿色荧光,意味着有细胞凋亡现象,结果如图 4 所示。



注：A 空白对照组;B 高浓度(800 $\mu\text{g/mL}$)暴露组,红色曲线内表示肝脏区域

图 4 斑马鱼肝脏吖啶橙染色荧光情况

2.5 斑马鱼幼鱼经香加皮水提取物暴露处理后, T-SOD、GSH-Px、AST 和 ALT 活力测定

结果表明,与空白组相比,香加皮水提取物暴露处理组能够降低斑马鱼 T-SOD 及 GSH-Px 活性,并

具有显著性差异($P<0.05$),提高斑马鱼体内 ALT 和 AST 活性,并具有显著性差异($P<0.05$),并呈现剂量相关性,见表 3。

3 讨论

香加皮在临床使用时,常常伴随着一些毒性和不良反应,早期表现为恶心、呕吐、腹泻等,严重时出现心率下降、房室传导阻滞、心律失常甚至引起机体死亡^[11],严重限制了对其深入的开发和运用,需要进一步评价其毒性作用机制。

斑马鱼基因与人类具有高度同源性,组织和器官发育具有相似的形态和分子基础,其中,生长因子、基因表达以及肝脏中脂质、蛋白、维生素和碳水化合物代谢的相似性就是很好的例子^[12]。有研究表明斑马鱼对外源化学物质的抵御机制与哺乳动物类似,包含酶活性诱导和氧化应激,其中,斑马鱼肝脏中具有许多与哺乳动物同源的脂质代谢酶,包括 HMG-CoA 合成与裂解酶、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)^[13-14]。有学者通过斑马鱼表型分析,对已知的哺乳动物肝脏毒性药物和阴性化合物进行了准确的区别^[15];还有学者进一步完善并建立了基于基因表达生物标记物和表型分析的斑马鱼肝脏毒性评价方法,具有很好的适用性^[16]。这些数据和技术手段都支持了斑马鱼模型对于药物肝脏毒性的预测和评价具有可行性并展现出独特的优势,即基于斑马鱼模型的药物肝脏毒性筛选具有明显的高通量、低成本、实验周期短以及可以活体评价等优点。

本文利用斑马鱼模型在药物毒理学评价中的优势来探讨香加皮水提取物对斑马鱼肝脏的潜在毒性作用。机体内氧自由基生成-清除的动态平衡是机体自我保护的重要机制,自由基生成过多或清除能力减弱时,机体会受到自由基的攻击,造成细胞结构和功能上的损害^[17]。抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 是机体通过酶系途径抗氧化的主要物质,其

表 3 香加皮水提取物不同浓度暴露组处理 24 小时后对幼鱼酶活力影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	ALT (U/gprot)	AST (U/gprot)	GSH-Px	T-SOD(U/mgprot)
空白组	41.03±2.19	19.07±1.16	15.40±0.44	4.20±0.08
600 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组	44.30±3.30 ^a	26.92±3.24 ^a	13.80±0.95 ^a	3.80±0.06 ^a
700 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组	49.25±4.31 ^a	51.50±2.78 ^a	11.38±0.99 ^a	3.76±0.01 ^a
800 $\mu\text{g/mL}$ 暴露组	58.60±5.51 ^a	55.89±5.94 ^a	8.47±0.68 ^a	3.29±0.02 ^a

注：与空白组相比，^a $P<0.05$ 。

活性的变化直接影响细胞内氧自由基和其终末产物的量,并反应了机体氧化应激的水平。本研究通过测定斑马鱼体内总超氧化物歧化酶的含量和谷胱甘肽过氧化物酶的含量来探讨香加皮水提取物对斑马鱼体内以上两种酶活性的影响,结果显示,与空白组相比,各药物浓度组 SOD、GSH-Px 值具有显著性差异,均小于空白组,并随暴露浓度的升高而下降。SOD、GSH-Px 活力的高低间接反应了机体清除自由基的能力,因此,香加皮水提取物可能通过抑制斑马鱼肝脏 SOD、GSH-Px 的活性,造成斑马鱼氧化应激损伤,进而造成肝脏细胞的过氧化损伤。

ALT 和 AST 是主要分布在肝细胞内的氨基酸转移酶,是表征肝脏受到外源性物质损伤的常用信号检测物质,当肝细胞被损伤时,肝细胞的结构遭到破坏,其转氨酶将释放进入血液循环,从而导致血浆内二者含量升高;二者在药物暴露组中均表现出了含量上升的趋势,并与对照组具有显著性差异,这些结果说明斑马鱼肝脏受到了药物的毒性损伤。有文献^[18-19]报道连续给予小鼠香加皮水提取物后,小鼠肝脏 AST、ALT 水平显著升高,同时导致小鼠肝脏细胞的凋亡,进而造成小鼠的肝脏损伤。这些研究结果与本实验所得结论相一致,相互印证,也为证实斑马鱼在药物肝脏毒性研究的适用性提供了数据支持,其毒性作用机制可能为破坏了斑马鱼体内氧化应激平衡,造成斑马鱼肝脏细胞的损伤和凋亡。

肝脏毒性在药物毒性评价中往往处于首要的位置,近年来关于中药肝脏毒副作用的报道受到了大众的广泛的关注,这些负面影响严重地损害了中药的声誉,建立快速准确的中药肝脏毒性评价体系迫在眉睫,本文基于斑马鱼模型初步探讨香加皮水提取物的肝脏毒性作用,以期对香加皮的临床应用和合理开发提供一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社,2015:257-268.
- [2] 王利萍,刘建利. 香加皮的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药,2009,(3):493-496.
- [3] Li Y, Li J, Zhou K, et al. A Review on Phytochemistry and Pharmacology of Cortex Periplocae [J]. Molecules, 2016, 21(12):1702.
- [4] 王芦笛,杨维,李鹏飞,等. 香加皮的化学成分及主要毒性研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2016,(6):1067-1075.
- [5] 毕波,周昆,胡利民. 香加皮及其主要毒性成分的研究进展[J]. 毒理学杂志,2010,(1):73-75.
- [6] Hill A J, Teraoka H, Heideman W, et al. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity[J]. Toxicological Sciences, 2005, 86(1):6-19.
- [7] Berghmans S, Butler P, Goldsmith P, et al. Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function—potential safety screens for early drug discovery [J]. Journal of Pharmacological & Toxicological Methods, 2008, 58(1):59-68.
- [8] McGrath P, Li C Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J]. Drug Discovery Today, 2008, 13(9-10):394-401.
- [9] Westerfield M. The Zebrafish Book[M]. Eugene: University of Oregon Press, 1995.
- [10] Tucker B, Lardelli M. A rapid apoptosis assay measuring relative acridine orange fluorescence in zebrafish embryos[J]. Zebrafish, 2007, 4(2):113-116.
- [11] 郑慧宁. 香加皮临床不良反应分析及对策[J]. 内蒙古中医药, 2014,(30):71.
- [12] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496(7446):498-503.
- [13] Ibabe A, Grabenbauer M, Baumgart E, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (Danio rerio) [J]. Histochemistry and Cell Biology, 2002, 118(3):231-239.
- [14] Chu J, Sadler KC. New school in liver development: lessons from zebrafish[J]. Hepatology, 2009, 50(5):1656-1663.
- [15] He J H, Guo S Y, Zhu F, et al. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2013, 67(1):25.
- [16] Verstraeten S, Peers B, Maho W, et al. Phenotypic and biomarker evaluation of zebrafish larvae as an alternative model to predict mammalian hepatotoxicity[J]. Journal of Applied Toxicology, 2016, 36(9):1194-1206.
- [17] Robertson G., Leclercq I., Farrell G. C. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis; II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281:G1135-G1139.
- [18] 孙蓉,黄伟,鲍志烨,等. 香加皮不同组分致小鼠肝毒性与氧化损伤相关性研究[J]. 中国药物警戒, 2012,(1):23-25.
- [19] 鲍志烨,黄伟,张亚囡,等. 香加皮不同组分多次给药对小鼠肝毒性“量-时-毒”关系研究[J]. 中国药物警戒, 2012,(1):16-19.

(收稿日期: 2017-07-05)

(本文编辑: 董历华)