

• 药理 •

基于斑马鱼模型研究闹羊花肝损效应及其作用机制

陈美琳, 李芝奇, 范琦琦, 郭思敏, 蔡琼, 林瑞超*, 吴嘉瑞*, 赵崇军*

(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, 北京 102488)

摘要 采用斑马鱼幼鱼模型探讨闹羊花对肝脏的毒性作用,根据闹羊花不同浓度暴露处理下受精后 4 d 斑马鱼幼鱼的存活数计算死亡率,并拟合其量毒曲线初步评估闹羊花的毒性大小,从而通过苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法和吖啶橙 (acridine orange, AO) 染色法对比观察闹羊花提取物亚致死浓度处理组和阴性对照组的肝脏表型,并测定对比不同处理组谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 的活性以确认闹羊花的肝脏毒性,进一步采用实时定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 及蛋白质印迹法检测斑马鱼幼鱼体内基因及蛋白的表达水平,并通过气相色谱时间飞行质谱联用 (GC-TOF-MS) 进行非靶向代谢组学检测,以探讨其作用机制。结果显示,闹羊花对斑马鱼幼鱼的毒性大小呈剂量依赖性,全部致死浓度为 $1\ 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,亚致死浓度为 $448\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;在亚致死浓度下,闹羊花暴露处理能够引起斑马鱼幼鱼肝脏组织结构紊乱,肝细胞凋亡、变性;实验终点的斑马鱼幼鱼体内 ALT 和 AST 水平显著提高,且呈剂量依赖性,而闹羊花给药组的斑马鱼幼鱼体内凋亡相关基因及蛋白的表达水平与阴性对照组相比皆显著上升。通过非靶向代谢组学发现闹羊花致肝毒性相关的重要代谢物主要富集于丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等途径。综上推测闹羊花对斑马鱼幼鱼有一定肝毒性,其作用机制或与细胞凋亡相关。

关键词 闹羊花; 斑马鱼; 肝毒性; 细胞凋亡

Hepatotoxicity and mechanism of *Rhododendri Mollis Flos*
based on zebrafish model

CHEN Mei-lin, LI Zhi-qi, FAN Qi-qi, GUO Si-min, CAI Qiong, LIN Rui-chao*, WU Jia-rui*, ZHAO Chong-jun*

(Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Chinese Materia Medica,
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[Abstract] This study used the zebrafish model to explore the hepatotoxicity of *Rhododendri Mollis Flos* (RMF). The mortality was calculated according to the number of the survival of zebrafish larvae 4 days after fertilization under different concentration of RMF, and the dose-toxicity curve was fitted to preliminarily evaluate the toxicity of RMF. The liver phenotypes under the sublethal concentration of RMF in the treatment group and the blank control group were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and acridine orange (AO) staining. Meanwhile, the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined to confirm the hepatotoxicity of RMF. Real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR) and Western blot were used to determine the expressions of genes and proteins in zebrafish larvae. Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS) was used to conduct untargeted metabolomics testing to explore the mechanism. The results showed that the toxicity of RMF to zebrafish larvae was dose-dependent, with $1\ 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of the absolute lethal concentration and $448\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of sublethal concentration. The hepatocyte apoptosis and degeneration appeared in the zebrafish larvae under the sublethal concentration of RMF. The content of ALT

收稿日期 2022-04-21

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09735005); 国家中医药管理局公益性中医药行业科研专项(201507004); 北京中医药大学新教师基金项目(2020-JYB-XJSJJ-009); 国家中医药传承创新团队子项目(ZYYCXTD-C-202005-10)

通信作者 * 赵崇军, 博士, 助理研究员, 主要从事中药品质评价与安全性研究, E-mail: 1014256537@qq.com; * 林瑞超, 博士, 教授, 主要从事中药品质评价、中药及天然药物活性成分及安全性评价、中药标准及标准物质研究, E-mail: linrch307@sina.com; * 吴嘉瑞, 博士, 教授, 主要从事临床药物上市后再评价研究, E-mail: exogamy@163.com

作者简介 陈美琳, 硕士研究生, E-mail: erdongXD@163.com

and AST in zebrafish larvae at the end of the experiment was significantly increased in a dose-dependent manner. Under the sublethal concentration, the expressions of genes and proteins related to apoptosis in zebrafish larvae were significantly increased as compared with the blank control group. The results of untargeted metabolomics showed that the important metabolites related to the hepatotoxicity of RMF were mainly enriched in alanine, aspartic acid, glutamic acid, and other pathways. In conclusion, it is inferred that RMF has certain hepatotoxicity to zebrafish larvae, and its mechanism may be related to apoptosis.

[Key words] Rhododendri Mollis Flos; zebrafish; hepatotoxicity; apoptosis

DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20220914.401

闹羊花为杜鹃花科羊躑躅 *Rhododendron molle* 的干燥花,能祛风除湿,散瘀止痛,是治疗类风湿性关节炎的良药,现代临床广泛应用于疼痛、炎症、麻醉、高血压病等^[1]。闹羊花毒性峻烈,在《神农本草经》中首次被以“羊躑躅”之名收载于下品,《本草新编》曰其“断不可频用以眩暈”,《有毒中草药大全》将其归为有毒麻醉药,其毒性被2020年版《中国药典》分级为有大毒,能产生心、肝、肾及神经毒性,临床常见不良反应报道表现为呼吸障碍、呕吐腹泻、血压异常等^[2],近年已有研究通过血清代谢组学和网络药理学揭示了其潜在的神经、心脏、肝脏毒性^[3]。

斑马鱼是一种在药理学、毒理学研究中被广泛应用的新型脊椎动物模式系统,繁殖速度快,发育周期短,因此常用于活性成分初步筛选的高通量实验。斑马鱼与人类生理系统的高度相似性及日益完善的组学研究数据,使其具备了器官发育和疾病模型研究的实验基础,可进一步进行毒性药物的筛选^[4]。肝脏是药物代谢过程中的核心节点,药物常常在此累积作用产生肝毒性,而闹羊花作为强毒性药物,其潜在肝毒性的成分和毒性机制尚不明确,相关研究较匮乏。斑马鱼模型因其肝脏在细胞组成、功能、信号传导、对损伤的反应以及介导肝脏疾病的细胞过程等方面与人类的相似性,已经被逐渐地用于肝脏疾病、相关药物筛选和评价等方面的研究^[5-7]。因此,本研究以闹羊花为研究对象,利用斑马鱼模型从肝脏组织形态、肝功能生化指标、相关基因和蛋白表达水平及代谢组学评价其对肝脏的毒性作用,初步探讨其作用机制,为闹羊花的临床安全应用提供依据。

1 材料

1.1 药材与试剂 闹羊花由北京中医药大学刘春生教授鉴定为正品药材,购于安国圣山药业有限公司;磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)(批号 21-040-CVR)购于 Corning 公司;谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(批号 C010-

2)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号 C009-2)购于南京建成科技有限公司;M3-氨基苯甲酰胺(批号 MESAB-22)购于美国密苏里州圣路易斯西格玛奥德里奇公司;4%多聚甲醛(批号 p1110)、吡啶橙(批号 s47568-5g)、甲基纤维素(批号 M112865)购于北京拜尔迪生物技术有限公司;caspase-3 抗体(批号 ab13847, Abcam 公司);PMSF(批号 W044)、WB 封闭液(批号 W108)、RIPA 裂解液(批号 W062)、BCA(批号 A045-3)、山羊抗兔 IgG(H+L)-Alexa-Fluor(批号 DE0635)、彩虹 180 广谱蛋白 marker(批号 DEM001)、10% SDS 溶液(批号 DE0176)、过硫酸氢(批号 DE0179)均购于 Bioneer 公司;PAGE 胶促凝剂(批号 T22500, Sigma 公司);5×蛋白上样缓冲液(批号 P1040, Solarbio 公司);10×丽春红染液(批号 P0012, Solao 公司);TransZol Up Plus RNA Kit(批号 Code#ER501)、Fast King cDNA 第一链合成试剂盒(批号 KR116)购于兰博利德生物技术有限公司;TransStart Top Green qPCR SuperMix、Trans2K Plus DNA Maker、Trans2K® Plus II DNA Maker 购于北京全式金生物技术有限公司;硫酸镁(MgSO₄, 批号 Z13011Y127224)、氯化钙(CaCl₂, 批号 Z05N11Y130022)、三氯甲烷(CHCl₃, 批号 20181107)、氯化钠(NaCl, 批号 20201201)、磷酸氢二钾(K₂HPO₄, 批号 20200320)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄, 批号 20130117)、碳酸氢钠(NaHCO₃, 批号 20200818)为分析纯,购于上海源叶生物科技有限公司及北京化工厂有限责任公司;丰年虾购于天津丰年虾水产养殖有限公司。

1.2 动物 AB 系野生型斑马鱼购于中国科学院水生生物研究所,饲养于本实验室集中式斑马鱼养殖系统。养殖条件:水温(28±0.5)℃, pH 7.0~7.4, 保持 14 h 光照/10 h 黑暗的光照周期,每日喂食 3 次活体丰年虾。排卵前日的暗周期前将斑马鱼成鱼以 1:2 的雌雄比放入产卵缸内,中间插入隔板分开雌雄以保证排孵时间一致,并于次日光周期前抽取

隔板,光周期开始 0.5 h 后收集鱼卵,将其用培养水冲洗 3 遍放入新培养水中,于 28.5 °C 相同光照条件下发育至受精后 4 d (4 day post fertilization, 4 dpf)。

1.3 仪器 体式荧光显微镜(卡尔·蔡司股份公司,德国,型号 ZeissAxioZoomV16);体式显微镜(卡尔·蔡司股份公司,德国,型号 Stemi508);斑马鱼养殖系统(北京爱生生物科技有限公司);恒温生化培养箱(广州瑞明仪器有限公司,型号 LRH-250Z);酶标仪(伯腾仪器有限公司,美国,型号 gene5);灭菌锅(Panasonic 公司,日本,型号 mLS-3751L);荧光成像系统(Bio-Rad 公司,美国,型号 ChemiDoc MP);real-time PCR 系统(Bio-Rad 公司,美国,型号 CFX96);全自动组织匀浆器(Next Advance, Inc., 美国,型号 BBX24BW-CE);自动进样玻璃器(Agilent Technologies 公司,美国,型号 Agilent 7650A);移液器(Eppendorf 公司,德国);12 孔板(Corning 公司,美国);96 孔低位 PCR 板(Axygen 公司,美国)。

2 方法

2.1 闹羊花供试品溶液的制备 将闹羊花样品粉碎后过 40 目筛,精确称取 50.0 g 过筛所得粉末,以 10 倍量蒸馏水加热回流提取 2 次,每次 2 h,并过滤合并 2 次水提液,分装后 5 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,过滤,浓缩上清液,真空干燥,研磨后得到闹羊花提取物干燥粉末。配制供试品溶液时,精确称取 200 mg 提取物粉末,溶于 50 mL 胚胎培养水的离心管中,超声 30 min,得 4 000 μg·mL⁻¹ 的母液,并将其分别稀释至实验所需浓度。

2.2 斑马鱼急性毒性实验 根据预实验所得闹羊花对斑马鱼胚胎(4 dpf)的 24 h 全部致死浓度(absolute lethal concentration, LC₁₀₀)和最大非致死浓度(maximum non-lethal concentration, MNLC),设置 400、500、600、700、800、900、1 000、1 100 μg·mL⁻¹ 8 个质量浓度梯度。于斑马鱼 3 dpf 阶段前,在体式显微镜下挑选健康正常的斑马鱼幼鱼,置于 12 孔板中,每孔 20 条,发育至 4 dpf 后快速吸取胚胎培养水,加入 4 mL 不同浓度闹羊花提取物溶液,并以 4 mL 胚胎培养水为阴性对照,在 28 °C 恒温培养箱中以相同培养条件暴露 24 h,每组设置 4 孔重复。在暴露过程中,每隔 8 h 统计各组斑马鱼死亡数量并移除死亡幼鱼,在暴露终点统计各组死亡率,通过 SPSS 17.0 软件建立致死曲线,用 Logistic 回归分析计算其亚致死浓度(sublethal concentration, LC₁₀),

实验重复 3 次。

2.3 斑马鱼肝脏组织形态学的观察 挑选发育至 4 dpf 健康正常的斑马鱼置于 12 孔板中,每孔 20 条,将其随机平均分为 2 组,分别为闹羊花 LC₁₀ 下的闹羊花处理组(448 μg·mL⁻¹)及以胚胎培养水处理的阴性对照组,给药 24 h,在实验暴露终点,使用胚胎培养水将不同处理组中的斑马鱼幼鱼冲洗 3 次,转移到 1.5 mL 干净离心管中,用 4% 多聚甲醛缓冲液室温保存,在乙醇中逐步脱水、透明处理,石蜡包埋,切成 4~5 μm 的薄片后进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,置于显微镜下观察其肝脏组织病理学的改变。

2.4 斑马鱼肝功能生化指标的测定 动物体内肝、心、肾、肌肉等器官和组织内都含有 ALT 及 AST,其在肝细胞中活性较高,是肝细胞受损时最敏感的指标之一^[8]。因此在除肝脏外器官未有明显病理变化时,可不考虑其他器官对斑马鱼幼鱼体内 ALT、AST 的变化影响,从而本实验以 ALT、AST 为肝功能指标确认闹羊花对斑马鱼幼鱼的毒性。根据闹羊花 LC₁₀ 将 4 dpf 的斑马鱼幼鱼随机平均分为 4 组(胚胎培养水处理的阴性对照组以及 200、300、400 μg·mL⁻¹ 闹羊花组),给药 24 h,在暴露终点抽取不同处理组各 80 条斑马鱼幼鱼,使用胚胎培养水冲洗 3 次后转移至 1.5 mL 干净离心管中,以冰水安乐死后于 PBS(1:9)中冰浴匀浆,2 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液,根据相应试剂盒的操作说明测定 ALT 和 AST 的活性水平,实验重复 3 次。

2.5 吖啶橙染色观察斑马鱼凋亡细胞 吖啶橙具有膜通透性,是一种能与核酸选择性结合的荧光染料,可用于区分斑马鱼幼鱼中的正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞^[8-9]。按 2.3 项下分组给药处理 24 h,在实验暴露终点,将斑马鱼幼鱼用胚胎培养水冲洗 3 遍,在孔板中快速加入 2 mL 含 5 μg·mL⁻¹ 吖啶橙的胚胎培养水,避光处理 20 min 后胚胎培养水冲洗 3 遍,用 3% 的甲基纤维素固定置于荧光显微镜下观察肝细胞凋亡情况。

2.6 实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测斑马鱼基因表达 按 2.4 项下分组处理给药 24 h,各处理组随机挑选 80 条斑马鱼幼鱼,用胚胎培养水冲洗 3 遍后置于 1.5 mL 干净离心管中,运用 Tranzol Up 一步法提取斑马鱼幼鱼总 RNA,并用凝胶电泳和紫外分

光光度计测定其纯度和浓度。cDNA 的合成按照 FastKing cDNA 合成试剂盒说明合成。以 β -actin 作为内参,引物由博迈德生物有限公司合成,引物序列见表 1。将反转录产物进行荧光定量 PCR 反应,选择 20 μ L 的反应体系,分别为 TransStart Top Green qPCR Super Mix (2 $\times$) 10 μ L,cDNA 模板 1 μ L,上下游引物各 0.4 μ L 共 0.8 μ L,DEPC 水 8.2 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预热 3 min,95 $^{\circ}$ C 变性 3 s;退火温度 60 $^{\circ}$ C 20 s,扩增 40 个循环;最后 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,95 $^{\circ}$ C 15 s 延伸;每组重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组的基因和内参照 β -actin 的相对表达量。

表 1 PCR 基因引物序列

Table 1 PCR gene primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
β -actin	F: GGCTGTGCTGTCCCTGTAT R: GGGCGTAACCTCGTAGAT
caspase-3	F: TCAGGCTTGTGCGAGGAAC R: CTGCCATACTTTGTCATCATTT
caspase-8	F: AAGACCTGATTCTGCGACTG R: TAGGCTGAGACACCTTTACG
caspase-9	F: TTCATCGCCCTCCTGTC R: CTGGCATCCATCTTGTAGC

2.7 Western blot 法检测斑马鱼蛋白表达 在预冷的 RIPA 蛋白抽提试剂中加入蛋白酶抑制剂,并加入适量 0.1 mol $\cdot$ L $^{-1}$ PMSF 母液使 PMSF 浓度为 1 mmol $\cdot$ L $^{-1}$,准确称取定量样本组织(按 2.6 项分组给药收样)于冰水混合物中,于裂解液中用电动组织匀浆器匀浆(15 000 r $\cdot$ min $^{-1}$,10 s),重复 3 次,孵育 20 min,离心(13 000 r $\cdot$ min $^{-1}$,20 min,4 $^{\circ}$ C),取上清,按照 BCA 试剂盒说明书对蛋白定量,通过 RIPA 调整蛋白浓度,加入 5 $\times$ 样品缓冲液,使样品质量浓度为 2.5 mg $\cdot$ mL $^{-1}$,将其煮沸变性,然后进行电泳分离。设置浓缩胶电压 90 V,时间 20 min,设置分离胶电压 160 V,时间根据预染蛋白 marker 确定,按恒流 300 mA 通电转印 1 h。将膜浸没在 3% BSA-TBST 中于室温封闭 30 min,以 1:50 的比例稀释 3% BSA-TBST 和一抗,室温摇荡孵育 10 min,4 $^{\circ}$ C 过夜,再于室温孵育 30 min 并用 TBST 在脱色摇床上洗 5 次,每次 3 min。用 5%脱脂奶粉-TBST 以 1:10 000 的比例稀释二抗,山羊抗兔 IgG(H+L) HRP,室温摇荡孵育 40 min,4 $^{\circ}$ C 过夜,用 TBST 在脱色摇床上洗 6 次,每次 3 min。调节曝光时间,直到出现

最佳条带进行显影,洗像。用各组蛋白的表达量和内参照 β -actin 的比值作为相对表达量。

2.8 代谢组学评价 通过气相色谱时间飞行质谱联用(GC-TOF-MS)进行非靶向代谢组学检测。在 25 mg 待测斑马鱼样本(448 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 闹羊花提取液、胚胎培养水处理的阴性对照组)中加入氧化铬研磨珠和 10 μ L 内标水溶液,混匀后加入 80 μ L 50%甲醇水溶液于全自动组织匀浆器中匀浆,继以 13 500 r $\cdot$ min $^{-1}$,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清液,在沉淀中加入 200 μ L 甲醇-氯仿混合剂(3:1),13 500 r $\cdot$ min $^{-1}$,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,合并上清液,于相同条件下再次离心 20 min,取 200 μ L 上清液于 1.5 mL 自动进样玻璃瓶,转至真空离心浓缩仪去除氯仿,冷冻干燥至完全冻干。干燥后通过两步衍生法进行衍生,先加入 50 μ L 以吡啶溶解的甲氧胺(20 mg $\cdot$ mL $^{-1}$) 30 $^{\circ}$ C 反应 2 h,再加入 50 μ L MSTFA 37.5 $^{\circ}$ C 反应 1 h。

气相色谱条件: Rxi-5MS 色谱柱(250 μ m $\times$ 30 m,0.25 μ m);进样口温度 270 $^{\circ}$ C;载气高纯氮气,流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。质谱条件:质谱分析采用 TOF-MS,电离方式 EI;电子能量 70 eV;离子源温度 220 $^{\circ}$ C;扫描范围 m/z 50~550。

2.9 数据处理 GC-TOF-MS 原始数据由 Chroma-TOF 软件输出到 XploreMET 软件中进行处理,并采用质量归一化矫正误差,进行主成分分析(principal component analysis,PCA)、偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis,PLS-DA)、正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis,OPLS-DA)、随机森林(random forest,RF)等多维统计方法分析变量权重,并进一步采用 student t -test、ANOVA 等单维统计方法。最后,采用 Hypergeometric 对变量投影重要性(variable importance in the projection,VIP)>1、 P <0.05 的差异代谢物进行代谢通路富集分析。

3 结果

3.1 闹羊花对斑马鱼幼鱼死亡率的影响 在实验暴露终点,通过在显微镜下统计不同处理组中存活的斑马鱼数目来计算其死亡率,进而使用 SPSS 17.0 绘制闹羊花对斑马鱼幼鱼的量-毒曲线,见图 1。结果表明斑马鱼幼鱼暴露于 400 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 及以下浓度的闹羊花提取物 24 h 后死亡率接近 0,暴露于 1 100 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 及以上浓度的闹羊花提取物中 24 h 后全部死亡,斑马鱼幼鱼的死亡率呈浓度依赖性

增加,因此根据死亡率曲线计算得闹羊花对斑马鱼幼鱼的 LC_{10} 为 $448 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

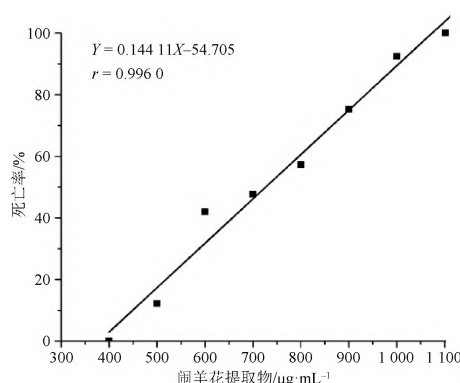
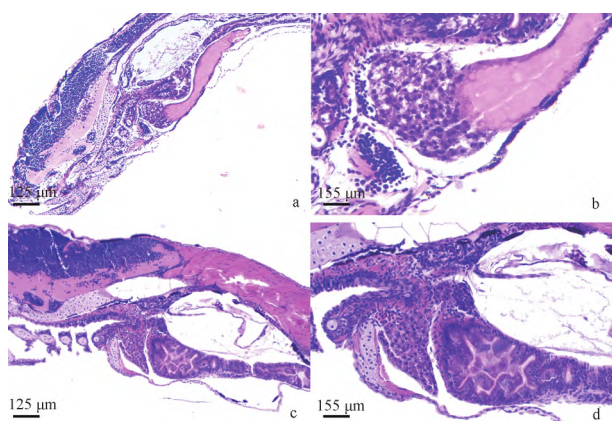


图 1 斑马鱼幼鱼暴露于不同浓度闹羊花提取物的量-毒曲线
Fig.1 Dose-toxicity curve of zebrafish larvae exposed to different concentrations of Rhododendri Mollis Flos extract

3.2 闹羊花对斑马鱼幼鱼肝脏组织结构的影响

斑马鱼幼鱼 HE 染色结果显示,给药 24 h 后,阴性对照组中斑马鱼幼鱼肝脏组织结构完整且具清晰轮廓,未见坏死细胞,而闹羊花提取物组 ($448 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 斑马鱼幼鱼肝脏组织结构紊乱,轮廓模糊或萎缩变形,空泡化严重,部分区域可见肝细胞变性、坏死^[14],见图 2。阴性对照组与闹羊花提取物组的其他器官组织均未见明显病理变化。

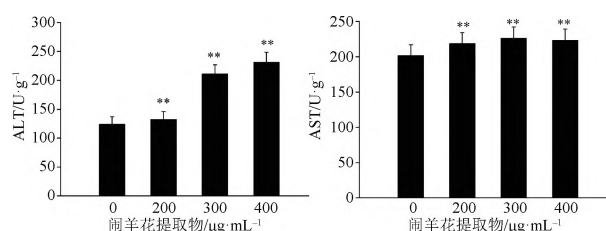


a、b.闹羊花提取物组 ($448 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ; c、d.阴性对照组。
图 2 闹羊花提取物对斑马鱼幼鱼肝脏组织结构的影响 (HE 染色)
Fig.2 Effect of Rhododendri Mollis Flos extract on liver tissue structure of zebrafish larvae (HE staining)

3.3 闹羊花对斑马鱼幼鱼肝功能生化指标水平的影响

实验结果表明,闹羊花提取物给药后 (200、

300 、 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 斑马鱼幼鱼体内 ALT 和 AST 水平与阴性对照组相比显著提高 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性,见图 3。其中,ALT 活性评价相对 AST 更敏感。

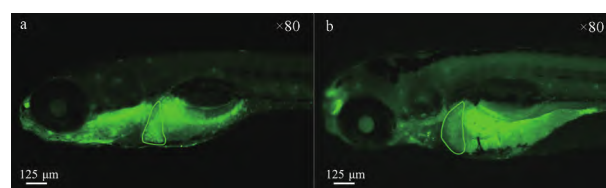


与阴性对照组 ($0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (图 5、6 同)。
图 3 不同浓度闹羊花提取物对斑马鱼幼鱼中 ALT、AST 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 80$)

Fig.3 Effects of different concentrations of Rhododendri Mollis Flos extract on the levels of ALT and AST in zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s$, $n = 80$)

3.4 闹羊花对斑马鱼幼鱼肝脏细胞凋亡的影响

吖啶橙可与凋亡细胞中的 DNA 结合形成绿色荧光,其染色结果见图 4,图中以线条圈起的区域为斑马鱼幼鱼的肝脏,可见闹羊花提取物组 ($448 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的荧光图像与阴性对照组存在显著差异,闹羊花给药组中荧光较强的荧光点即为吖啶橙与凋亡细胞中的 DNA 结合形成的,揭示闹羊花提取物处理可引起斑马鱼幼鱼肝细胞凋亡。



a. 闹羊花提取物组 ($448 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ; b. 阴性对照组。
图 4 闹羊花提取物对斑马鱼幼鱼肝脏细胞凋亡的影响 (吖啶橙染色)

Fig.4 Effect of Rhododendri Mollis Flos extract on apoptosis of liver cells in zebrafish larvae (acridine orange staining)

3.5 闹羊花对斑马鱼幼鱼中 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 mRNA 表达的影响

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cysteine-requiring aspartate protease, caspase) 家族基因在促细胞凋亡机制网络中起核心作用^[15],其中包括启动型 caspase 如 caspase-8、caspase-9 等,执行型 caspase 如 caspase-3 等,共同调

节机体细胞形态和生化水平从而促使细胞凋亡^[13]。本实验为探讨闹羊花引起的斑马鱼幼鱼肝细胞凋亡与 caspase 途径的相关性,研究了暴露于闹羊花提取物 24 h 的斑马鱼幼鱼中 caspase-3、caspase-8 和

caspase-9 等基因的转录水平,结果见图 5。与阴性对照组相比,给药 24 h 后,300、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 闹羊花提取物组中 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。

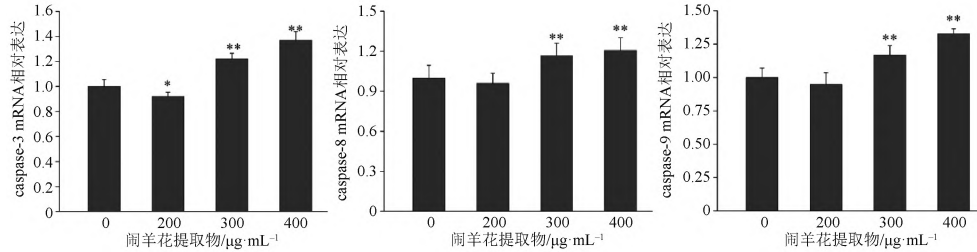
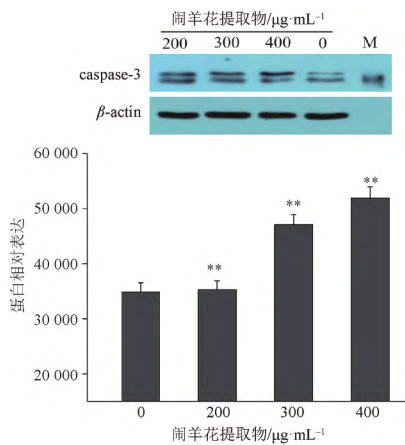


图 5 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 mRNA 的表达水平($\bar{x}\pm s, n=80$)

Fig.5 The mRNA expression levels of caspase-3, caspase-8, and caspase-9($\bar{x}\pm s, n=80$)

3.6 闹羊花对斑马鱼幼鱼中 caspase-3 蛋白表达的影响 本实验通过 Western blot 技术从蛋白水平进一步验证闹羊花肝毒性与 caspase-3 的相关性,结果见图 6。闹羊花提取物组(200、300、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)中 caspase-3 蛋白的表达水平与阴性对照组相比显著提高($P<0.01$),呈剂量依赖性,与 caspase 家族基因的转录水平存在一致性。



M.marker 条带。

图 6 Western blot 检测 caspase-3 蛋白表达水平($\bar{x}\pm s, n=80$)

Fig.6 Protein expression levels of caspase-3 detected by Western blot ($\bar{x}\pm s, n=80$)

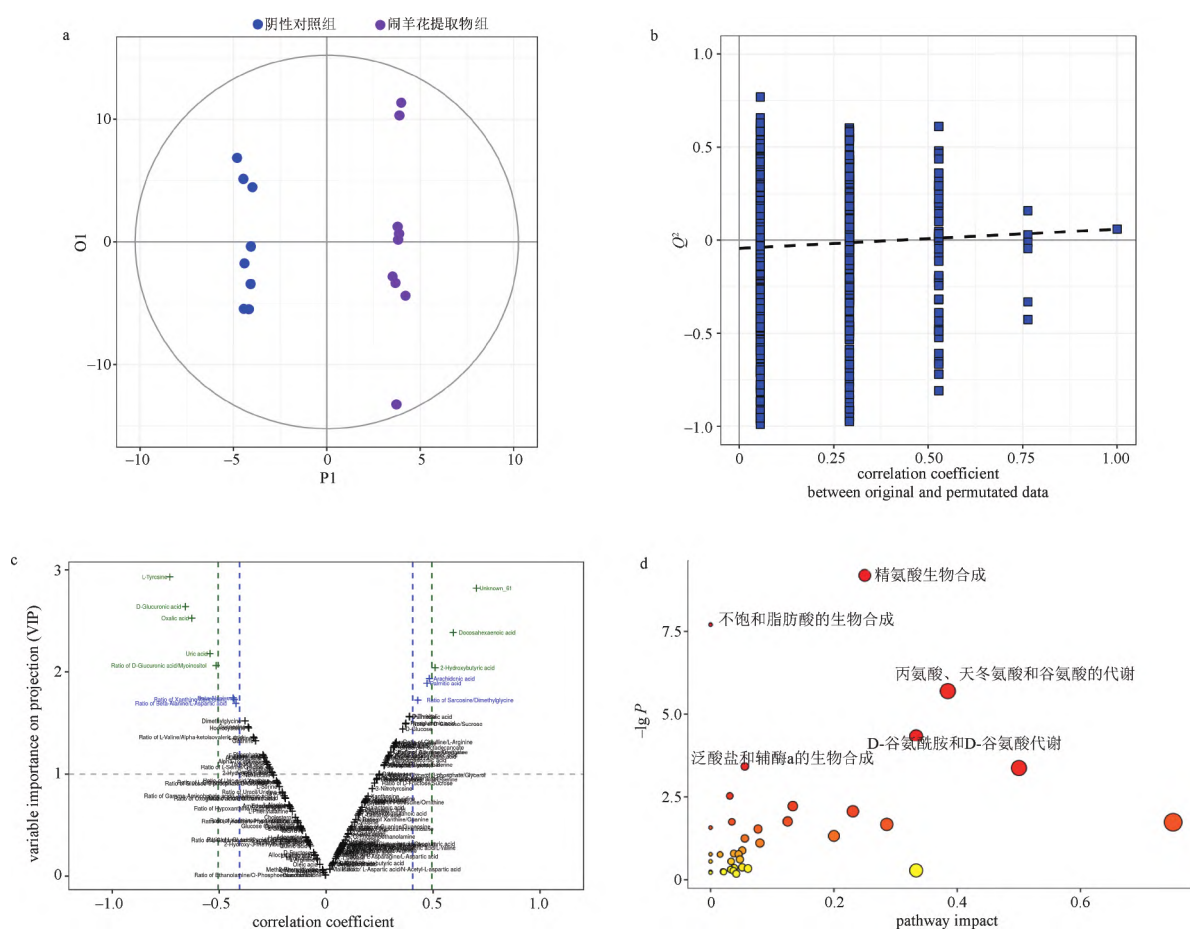
3.7 斑马鱼幼鱼的代谢组学分析 分析原始数据从而确定斑马鱼幼鱼样品的代谢物谱,并运用 OPLS-DA 说明代谢谱的不同,结果表明,阴性对照组和闹羊花提取物组(448 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)能够完全分

开,见图 7a、7b,即给药后的斑马鱼幼鱼机体代谢已发生改变^[13],并通过 VIP>1 及 $P<0.05$ 筛选出阴性对照组 vs 给药组的差异代谢物,见图 7c。阴性对照组和给药组的差异代谢物及其京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)代谢通路富集分析结果显示,斑马鱼幼鱼的丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径,D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢,精氨酸、缬氨酸和亮氨酸的生物合成途径受到影响,见图 7d。

4 讨论

闹羊花用药历史悠久,主要含闹羊花毒素Ⅱ、闹羊花毒素Ⅲ等二萜类化合物,二氢查耳酮、杜荊素等黄酮类成分,齐墩果烷型、乌苏烷型等三萜类成分以及香豆素类、木质素类等化学成分^[14-15]。现代药理研究表明闹羊花中闹羊花毒素Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ等成分具有抗炎镇痛作用,其作用机制或与转化生长因子有关;闹羊花毒素Ⅲ等具有降血压作用,其作用机制与肾上腺素能受体有关;此外,闹羊花毒素Ⅱ以及 se-corhomollolides B、D 等具有镇静麻醉作用,闹羊花毒素Ⅰ、Ⅲ的细胞毒性使闹羊花被广泛应用于害虫防治,还有部分研究阐述了闹羊花的抗病毒、抗肿瘤等作用^[16]。同时,闹羊花的毒性极大,自使用起便存在记载,其多脏器毒性严重时可致死亡,因此被限制于临床应用。然而有关闹羊花肝毒性的毒-效系统研究尚不完善,其肝毒性毒理学及药代动力学亟需考察,以保障闹羊花的临床用药安全。

斑马鱼肝脏发育成熟周期短,肝脏组织结构和



a. 阴性对照组和闹羊花提取物组 OPLS-DA; b. OPLS-DA 模型随机置换测试; c. 差异代谢物分析; d. 闹羊花提取物对斑马鱼幼鱼整体代谢途径的影响。

图 7 闹羊花提取物对斑马鱼幼鱼整体代谢途径的影响及相关差异代谢物

Fig.7 Effect of Rhododendri Mollis Flos extract on the whole metabolic pathway of zebrafish larvae and related differential metabolites

哺乳类动物类似,且与人类基因具有高度同源性^[17-18]。本研究首次利用斑马鱼模型评估了闹羊花的急性毒性,2020 年版《中国药典》中,闹羊花建议用量为 0.6~1.5 g^[19],本实验结果表明,闹羊花对斑马鱼幼鱼有一定毒性,其毒性大小呈剂量依赖性,全部致死浓度为 1 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;而在 LC_{10} 下,HE 和吖啶橙染色结果显示闹羊花暴露处理能够引起斑马鱼幼鱼肝细胞凋亡、变性;同时,实验终点的斑马鱼幼鱼体内 ALT 和 AST 水平显著提高,当肝细胞有炎症或受损时,其完整性被破坏,ALT 和 AST 便会大量地释放到血液中,从而使血浆内转氨酶浓度升高^[20],即说明本实验中暴露于闹羊花的幼鱼体内肝细胞大量受损;为进一步探讨闹羊花致肝损的作用机制,以促细胞凋亡相关的 caspase 家族为研究对象,对闹羊花处理组和阴性对照组斑马鱼幼鱼的

caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 基因及 caspase-3 蛋白的表达水平进行对比研究,结果表明,闹羊花给药组的斑马鱼幼鱼体内这 3 个凋亡基因及 caspase-3 蛋白的表达水平与阴性对照组相比显著上升,印证了吖啶橙染色结果,揭示闹羊花的肝毒性可能与诱导肝脏细胞凋亡的过程有关^[21]。

此外,本实验通过 GC-TOF-MS 进行非靶向代谢组学检测,发现闹羊花致肝毒性相关的重要代谢物包括氨基酸、碳水化合物、小分子酸、烷烃和含氮分子等,主要富集于丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径,D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢途径,精氨酸、缬氨酸和亮氨酸的生物合成途径。氨基酸是斑马鱼的主要能源物质,当肝脏脂肪代谢紊乱时,氨基酸的代谢水平也随之发生改变^[22],如丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸都能被肝酶酶解,若肝细胞受损肝酶外流,其代

谢水平便被影响; D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢途径能够增强体内谷胱甘肽合成从而调节细胞衰老^[23]; 而支链氨基酸是一组主要在骨骼肌内代谢的特殊氨基酸, 其中便包括亮氨酸、缬氨酸, 有研究表明支链氨基酸参与了刺激肝细胞生长因子产生、减少细胞凋亡、代谢生成谷氨酰胺等多种途径, 能促进肝组织的生长^[24]; 且 caspase-3 能特异地在底物的 N-末端识别天冬氨酸酶解位点并进行酶解^[25], 符合本实验结果中 caspase-3 的表达趋势。

综上所述, 闹羊花能够致使斑马鱼幼鱼肝脏受损, 其潜在作用机制与诱导细胞凋亡有关, 涉及多条氨基酸代谢途径。同时, 本实验结果也验证了斑马鱼幼鱼模型在中药肝毒性评价中的适用性, 且表明了该模型筛选肝毒性时高通量的优势, 为斑马鱼幼鱼模型在中药安全性评价领域的进一步应用提供实验基础。

参考文献

- [1] 郭小红, 冯靖雯, 王耀登, 等. 闹羊花的本草考证及炮制历史沿革分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22) : 172.
- [2] 刘艾林, 张莉, 杜冠华. 闹羊花毒之历史认识与评价 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(5) : 161.
- [3] 郭小红, 黄孟军, 王立娟, 等. 基于血清代谢组学和网络毒理学研究闹羊花毒性作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(7) : 1932.
- [4] LI Z Q, TANG Y, LIU Z Q, et al. Hepatotoxicity induced by PP VI and PP VII in zebrafish were related to the cholesterol disorder [J]. Phytomedicine, 2022, 95: 153787.
- [5] 李芝奇, 徐玥, 赵霞, 等. 斑马鱼作为一种重要的工具进行肝脏疾病研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2) : 320.
- [6] LI C F, WANG M S, FU T T, et al. Lipidomics indicates the hepatotoxicity effects of EtOAc extract of Rhizoma Paridis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 799512.
- [7] ROMAN P, BUDZINSKI G, SUSZKA-SWITEK A, et al. Caspase-3 expression and ALT, AST, and GGT activity after 24 hours of porcine liver cold storage, depending on the type of transgenesis [J]. Transplant Proc, 2016, 48(5) : 1829.
- [8] AMADO A M, PAZIN W M, ITO A S, et al. Acridine orange interaction with DNA: effect of ionic strength [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017, 1861(4) : 900.
- [9] 陈姗姗, 朱华甦, 董娜, 等. 丹参新酮对白血病 THP-1 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9) : 2541.
- [10] 王宁军, 赵燕, 刘娟. 斑马鱼器官石蜡组织切片制作与观察 [J]. 解剖学研究, 2019, 41(3) : 240.
- [11] KESAVARDHANA S, MALIREDDI R, KANNEGANTI T D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis [J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38(1) : 567.
- [12] 杨涛, 费振海, 钟兴明. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展 [J]. 浙江医学, 2018, 40(18) : 2083.
- [13] 闫宇涵, 王占黎, 胡海, 等. 基于气相色谱-飞行时间质谱联用技术的肾性高血压大鼠模型粪便代谢组学分析 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(7) : 92.
- [14] 薛秋雯, 梁爽. 羊蹄葜化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(5) : 1350.
- [15] 冯靖雯, 郭小红, 张砚, 等. 不同花期闹羊花中挥发性成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10) : 85.
- [16] 郭小红, 冯靖雯, 尤强, 等. 有毒中药闹羊花的现代研究进展 [J]. 中国药业, 2020, 29(23) : 96.
- [17] GOESSLING W, SADLER K C. Zebrafish: an important tool for liver disease research [J]. Gastroenterology, 2015, 149(6) : 1361.
- [18] 秦小妹, 郭帅杰, 李悦, 等. 斑马鱼模型在中药心血管药理学研究中的应用 [J]. 世界中医药, 2021, 16(15) : 2358.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1088.
- [20] 郑红琴, 魏慧聪. 血清 ALT、AST 和 GGT 水平检测在肝脏疾病诊断中的应用价值 [J]. 河南医学研究, 2018, 27(24) : 4467.
- [21] CHOUDHARY G S, AL-HARBI S, ALMASAN A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1219: 1.
- [22] 李心雨, 刘亚平, 杜新路, 等. 四种氨基酸神经递质对斑马鱼胚胎发育和成体组织再生的双重影响 [J]. 淡水渔业, 2017, 47(5) : 58.
- [23] 杨琳琳. 黄芩叶对 D-gal 衰老大鼠肝脏谷氨酰胺-谷氨酸代谢及谷胱甘肽合成的靶向调控研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [24] 林建华, 洪重, 周斌. 亮氨酸对大鼠肝部分切除术后肝再生的影响 [J]. 温州医科大学学报, 2019, 49(10) : 753.
- [25] 李绍强, 梁力建, 黄洁夫. 依赖天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 的肝细胞凋亡在肝硬化大鼠肝缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(6) : 519.

责任编辑 马超一