

· 药理 ·

斑马鱼模型筛选何首乌肝毒性的物质基础

全云云, 周忆梦, 刘美辰, 李芸霞*

(成都中医药大学药学院, 教育部中药材标准化重点实验室, 中药资源系统研究与
开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**用斑马鱼模型探索何首乌肝毒性物质基础,为何首乌肝毒性作用机制研究提供一定的理论依据。**方法:**将对实验前期所筛选出来的大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷(质量浓度分别为 0.000 73, 0.002 22, 0.015 05, 0.002 36, 0.198 95, 0.072 73 g·L⁻¹)这 6 种何首乌中的化学成分,继续使用肝脏荧光转基因斑马鱼为动物模型,对受精后 72 h 的幼鱼连续给药 3 d。分别测定给药后 1, 2, 3 d 的斑马鱼体内丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),谷胱甘肽(GSH)的活力和总胆红素(TBIL)的含量,分别对其进行切片分析,观察斑马鱼肝脏组织病理学改变。**结果:**大黄素、大黄酸、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷对斑马鱼体内 ALT, AST, GSH 的活力和 TBIL 的含量无明显影响,其斑马鱼肝组织显示正常;芦荟大黄素能显著降低斑马鱼体内 ALT, AST, GSH 的活力($P < 0.01$),显著升高 TBIL 含量($P < 0.01$);芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷能显著降低斑马鱼体内 ALT, GSH 的活力($P < 0.01$),明显升高 TBIL 含量($P < 0.05, P < 0.01$),对斑马鱼体内 AST 的活力无明显影响,同时此二者的斑马鱼肝组织均出现大片片状坏死,肝组织细胞发生明显形态改变,肝细胞排列不规则等。**结论:**何首乌中的芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷可对斑马鱼肝脏产生毒性作用,提示芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷可能是何首乌的肝毒性物质基础。

[关键词] 何首乌; 斑马鱼; 肝毒性; 物质基础

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0052-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190523

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181119.1156.013.html>

[网络出版时间] 2018-11-20 16:39

Hepatotoxic Material Basis of Polygoni Multiflori Radix with Zebrafish Model

QUAN Yun-yun, ZHOU Yi-meng, LIU Mei-chen, LI Yun-xia*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources Co-Founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the hepatotoxic material basis of Polygoni Multiflori Radix with zebrafish model, in order to provide a theoretical basis for the study on the mechanism of Polygoni Multiflori Radix hepatotoxicity. **Method:** Emodin, rhein, aloe emodin, emodin-1-*O*-glucoside, physcion-8-*O*-glucoside and aloe emodin-8-*O*-glucoside for three days (at the concentrations of 0.000 73, 0.002 22, 0.015 05, 0.002 36, 0.198 95, 0.072 73 g·L⁻¹) selected from the early stage of the experiment were continuously administered to zebrafish fertilized for 72 hours to establish the liver fluorescence transgenic larvae animal model. The activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutathione (GSH) and total bilirubin

[收稿日期] 20180828(010)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573583);四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项(2016TD0028, 2017TD0001)

[第一作者] 全云云,在读硕士,从事中药毒效物质基础及其作用机制研究, E-mail:1914379497@qq.com

[通信作者] *李芸霞,博士,研究员,从事中药安全性及有效性研究, E-mail:lyxcdutcm@126.com

(TBIL) in zebrafish at 1, 2, 3 day after administration were measured respectively, and the pathological changes of zebrafish liver tissue were analyzed. **Result:** Emodin, rhein, emodin-1-*O*-glucoside and physcion-8-*O*-glucoside had no significant effect on the activities of ALT, AST, GSH and content of TBIL ($P < 0.01$) in zebrafish, and the liver tissue of zebrafish was normal; aloe-emodin could significantly reduce the activities of ALT, AST, GSH ($P < 0.01$), whereas increase the content of TBIL in zebrafish; aloe-emodin-8-*O*-glucoside could significantly reduce the activities of ALT, GSH, whereas increased the content of TBIL ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in zebrafish, with no significant effect on the activity of AST, then both groups showed large flaky necrosis in zebrafish liver tissue, obvious morphologic changes in liver tissue cells, and irregular arrangement of hepatocytes. **Conclusion:** Aloe-emodin and aloe-emodin-8-*O*-glucoside in *Polygoni Multiflori Radix* have a toxic effect on zebrafish liver, suggesting that aloe-emodin and aloe-emodin-8-*O*-glucoside might be the hepatotoxic material basis of *Polygoni Multiflori Radix*.

[**Key words**] *Polygoni Multiflori Radix*; zebrafish; hepatotoxicity; material basis

何首乌是蓼科何首乌的干燥块根,生首乌具有解毒、消痈、截疟、润肠通便之功;制何首乌有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨、化浊降脂之功,同时具有复杂的化学成分^[1-2]。近年来何首乌常与肝毒性、肝损伤、肝损害、肝病、肝炎等术语一起出现在国内外的文献报道中^[3-6]。斑马鱼作为一种新型的模式生物,不仅可用于高通量化合物的初步检测,还能在生物整体水平上反映药物的作用。而传统的鼠、兔、狗、猴等模式动物存在着实验周期长,费用高,低通量等诸多弊端,细胞模型虽然可以做高通量筛选,但却只是在体外单细胞水平上做的药效或者毒性评价。因此本课题前期采用肝脏荧光转基因斑马鱼 *Tg(fabp10:EGFP)* 幼鱼为肝脏毒性评价模型,对何首乌中的 18 种主要成分进行了肝脏毒性研究,结果发现其中大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷能在不同程度上降低斑马鱼的肝脏面积和肝脏荧光强度^[7]。为了进一步确定斑马鱼肝脏是否确实存在损伤,即进一步验证斑马鱼肝脏荧光面积和荧光强度是否能够准确反映肝脏损伤程度。本实验将对前期所筛选出来的这 6 种何首乌中的化学成分,继续使用肝脏荧光转基因斑马鱼为动物模型,采用赖氏法,测定斑马鱼体内丙氨酸氨基转移酶 (ALT),天门冬氨酸氨基转移酶 (AST),谷胱甘肽 (GSH) 的活力和总胆红素 (TBIL) 的含量,同时分别对其进行肝脏切片分析,观察斑马鱼肝脏组织病理学改变,进一步地探索何首乌的肝毒性物质基础,从而为何首乌肝毒性的机制研究奠定基础。

1 材料

1.1 动物 此次实验使用 SPF 级的肝脏荧光转基因雌雄斑马鱼 *Tg(fabp10:EGFP)*, 体质量 (0.16 ± 0.03) g, 由成都中医药大学药学院斑马鱼实验室

培养繁殖,斑马鱼的饲养和繁育均依据文献[8]标准。斑马鱼的实验遵循成都中医药大学动物保护和使用委员会的要求。欲得实验用斑马鱼幼鱼,于实验开始前 1 d 下午,取健康性成熟的雌雄 *Tg* 斑马鱼,以 1:1 数量移入交配缸内,并用透明隔板将雌雄分开,次日清晨移去隔板,斑马鱼追逐交配产卵,1 h 左右便可收集受精卵。收集到的受精卵使用胚胎培养水处理,清洗干净,然后移入装有胚胎培养水的无菌培养皿中,放置于 28.5 °C 恒温培养箱中培养。养至受精后 72 h (72 hpf),挑选孵化出的健康个体进行后续实验。

1.2 试药及试剂 大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷(成都克洛玛生物科技有限公司,批号分别为 150422,140821,140827,141211,160412,141226,纯度均为 98%); ALT, AST, TBIL, GSH 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20171020,20171023,20171023,20171023); 苏木素-伊红染液(HE,武汉谷歌生物科技有限公司,批号 G1005)。

1.3 仪器 Multiskan Mk3 型酶标仪[美国赛默飞世尔(上海)仪器有限公司]; M165-FC 型体式荧光显微成像系统(德国 Lei-Ca 公司); Axio Ob-server A1 型荧光倒置显微成像系统(德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 斑马鱼幼鱼肝脏表型的观察 将收集得到的受精卵,于受精后 20 h (20 hpf) 时将培养水更换成含 0.000 2% 1-苯基-2-硫脲 (PTU) 的培养水,每日定时更换新鲜 PTU 培养水,并及时将死卵和卵壳清除,养至 72 hpf,将肝脏发育完成的 *Tg* 斑马鱼,移入 12 孔板中,每孔 10 尾幼鱼。根据前期毒效实验结果,分别将各药物的最大耐受浓度 (MTC) 设定为

各药物的给药浓度,何首乌中大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 MTC 分别为 0.000 73, 0.002 22, 0.015 05, 0.002 36, 0.198 95, 0.072 73 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时设置空白组, 每个浓度设置 3 个重复孔。随后于培养箱中恒温孵育, 每 24 h 换液 1 次, 连续给药 72 h。分别于给药后 24, 48, 72 hpe 收集各组的斑马鱼, 先用三卡因麻醉 3 min, 然后移入羧甲基纤维素钠中固定, 调整斑马鱼为侧卧位, 用荧光显微镜观察斑马鱼幼鱼肝脏表型, 拍照记录。

2.2 斑马鱼幼鱼生化指标测定 将肝脏发育完成的斑马鱼, 移入 12 孔板中, 每孔 30 尾幼鱼。分别将各药物的 MTC 设定为各药物的给药浓度, 设空白组, 每个浓度设置 3 个重复孔。随后于培养箱中恒温孵育, 每 24 h 换液 1 次, 连续给药 72 h。分别于施药后 24, 48, 72 hpe 收集空白组、给药组的斑马鱼, 尽可能的吸出里面的水, 然后用生理盐水清洗 3 次, 转入 1.5 mL 预先称质量的离心管中, 进行称质量, 以 1:9 质量比加 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水。将 30 mg 幼鱼 (90 条) 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水 270 μL , 在冰浴环境下用超声波细胞破碎仪破碎, 制备成 10% 的组织匀浆液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液备用。同时分别进行平行实验, 用 BCA 蛋白测定试剂盒测定各组蛋白浓度。随后按照 ALT, AST, GSH, TBIL 试剂盒的相关步骤进行酶活性和含量水平测定。组织 AST, ALT, GSH 活力 ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, 以蛋白量计) = 通过标准曲线得匀浆液 AST 活力 ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$) / 待测匀浆液蛋白 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。实验重复 3 次。

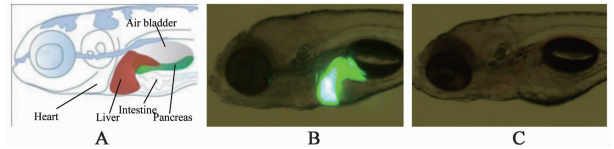
2.3 肝脏切片分析 分别将 24, 48, 72 hpe 的空白组和给药组斑马鱼用 4% 多聚甲醛固定 96 h, 脱水, 65 $^{\circ}\text{C}$ 石蜡包埋制备石蜡标本, 石蜡切片机切取石蜡切片, HE 染色, 显微镜下观察并拍照。观察空白组与给药组斑马鱼肝脏组织病理学改变, 以评估肝脏组织结构完整性, 肝细胞变性、坏死及炎性细胞浸润等炎症改变情况。

2.4 数据统计与分析 使用 microsoft excel 2013 进行数据计算和线性回归, 运用 SPSS 21.0 统计软件处理数据, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组之间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用最小显著性差异法, 采用 GraphPad Prism 进行绘图, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 何首乌中 6 种成分对斑马鱼肝脏表型的影响 采用肝脏荧光转基因斑马鱼^[9-10], 可以从肝脏面

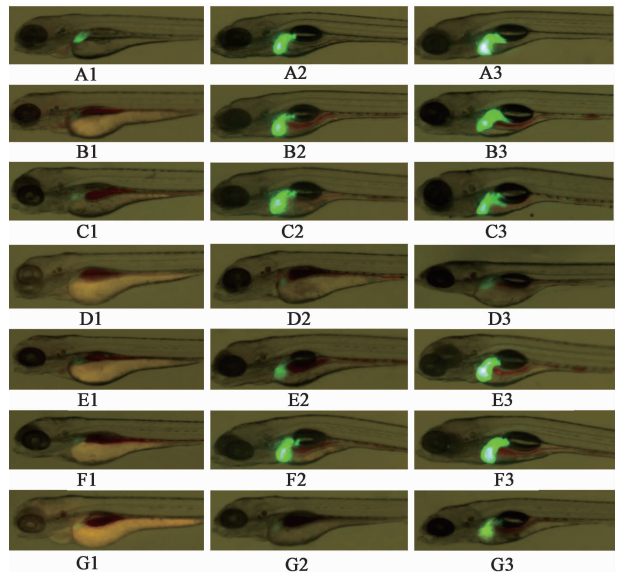
积和肝脏荧光强度直接观察得到给药后斑马鱼肝脏变化情况, 较采用非转基因斑马鱼更方便准确。与非转基因 AB 型斑马鱼比较, *Tg (fabp10:EGFP)* 转基因斑马鱼的肝脏荧光让斑马鱼的肝脏和身体的其他部位很好的区分, 肝脏变化情况一目了然。随着时间的延长斑马鱼肝脏荧光面积和强度逐渐增加, 斑马鱼的肝脏在不断发育成熟 (图 1)。与空白组比较, 大黄素、大黄酸和大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷组在 24 hpe 时其肝脏面积和肝脏荧光强度明显降低; 大黄素-1-*O*-葡萄糖苷组在 24, 48 hpe 时肝脏面积和肝脏荧光强度明显降低; 芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷组的斑马鱼幼鱼在 72 hpe 内肝脏面积和肝脏荧光强度均明显降低 (图 2)。



A. 斑马鱼脏器分布^[11]; B. *Tg (fabp10:EGFP)* 型转基因斑马鱼; C. AB 型非转基因斑马鱼

图 1 转基因与非转基因斑马鱼脏器分布

Fig. 1 Zebrafish viscera distribution, transgenic and non-transgenic zebrafish



绿色. 肝脏; 红色. 葱醌类在肠道的积累。A1 ~ A3. 空白 24, 48, 72 hpe 组; B1 ~ B3 大黄素 24, 48, 72 hpe 组; C1 ~ C3. 大黄酸 24, 48, 72 hpe 组; D1 ~ D3. 芦荟大黄素 24, 48, 72 hpe 组; E1 ~ E3. 大黄素-1-*O*-葡萄糖苷 24, 48, 72 hpe 组; F1 ~ F3. 大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷 24, 48, 72 hpe 组; G1 ~ G3. 芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 24, 48, 72 hpe 组

图 2 何首乌中 6 种成分对斑马鱼肝脏表型的影响
Fig. 2 Effect of 6 components of Polygoni Multiflori Radix on liver phenotype of zebrafish

3.2 何首乌中 6 种成分对斑马鱼肝功能的影响
与空白组比较,其中芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷分别在 24,48,72 hpe 时能明显升高斑马鱼体内 TBIL 水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 大黄素、大黄酸、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄

糖苷组差异无统计学意义。与空白组比较,芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷能分别在给药 24,48,72 hpe 时显著降低斑马鱼体内的 GSH,ALT 活力 ($P < 0.01$); 芦荟大黄素分别在 24,48,72 hpe 时能显著降低斑马鱼体内的 AST 活力 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 何首乌中 6 种成分对斑马鱼 TBIL, GSH, AST, ALT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of 6 components of Polygoni Multiflori Radix on TBIL, GSH, AST, ALT of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	给药时间/h	质量浓度 /g·L ⁻¹	TBIL /μmol·L ⁻¹	GSH /μmol·g ⁻¹	AST /U·g ⁻¹	ALT /U·g ⁻¹
空白	24	-	1.58 ± 0.55	72.90 ± 3.10	43.54 ± 0.70	3.55 ± 0.61
	48	-	1.80 ± 0.31	76.46 ± 5.93	42.49 ± 2.79	3.74 ± 0.64
	72	-	1.35 ± 0.63	69.86 ± 5.68	42.52 ± 0.83	3.66 ± 0.80
大黄素	24	0.000 73	1.58 ± 0.55	65.97 ± 2.06	39.78 ± 3.97	4.28 ± 0.49
	48		2.02 ± 0.63	67.48 ± 10.21	38.49 ± 3.85	3.46 ± 0.81
	72		1.80 ± 0.63	65.25 ± 5.28	40.02 ± 2.65	3.29 ± 0.76
大黄酸	24	0.002 22	1.80 ± 0.31	70.00 ± 4.90	38.12 ± 0.74	3.51 ± 0.43
	48		1.58 ± 0.55	61.65 ± 7.66	39.93 ± 3.24	3.40 ± 0.52
	72		2.02 ± 0.31	62.89 ± 0.64	38.41 ± 4.65	3.40 ± 0.23
芦荟大黄素	24	0.015 05	3.80 ± 0.31 ²⁾	28.99 ± 7.95 ²⁾	17.33 ± 2.30 ²⁾	1.09 ± 0.42 ²⁾
	48		3.58 ± 0.55 ²⁾	20.78 ± 5.42 ²⁾	16.29 ± 2.29 ²⁾	0.80 ± 0.36 ²⁾
	72		3.80 ± 0.31 ²⁾	24.80 ± 4.49 ²⁾	16.65 ± 1.16 ²⁾	1.35 ± 0.63 ²⁾
大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	24	0.002 36	2.02 ± 0.31	72.21 ± 11.78	39.05 ± 0.89	3.82 ± 0.65
	48		1.58 ± 0.55	70.37 ± 10.03	39.67 ± 1.04	3.63 ± 0.37
	72		1.80 ± 0.31	69.33 ± 4.23	40.53 ± 1.92	3.61 ± 0.23
大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	24	0.198 95	1.58 ± 0.55	63.38 ± 2.87	38.43 ± 1.39	4.17 ± 0.32
	48		1.80 ± 0.31	65.64 ± 9.55	39.48 ± 2.89	3.57 ± 0.13
	72		1.80 ± 0.63	59.40 ± 7.32	40.29 ± 1.54	3.34 ± 0.22
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	24	0.072 73	2.91 ± 0.55 ¹⁾	35.23 ± 5.47 ²⁾	38.05 ± 6.24	1.03 ± 0.68 ²⁾
	48		3.36 ± 0.31 ¹⁾	34.65 ± 12.87 ²⁾	38.67 ± 4.71	1.09 ± 0.45 ²⁾
	72		3.13 ± 0.31 ²⁾	29.72 ± 0.82 ²⁾	39.93 ± 1.25	1.50 ± 0.33 ²⁾

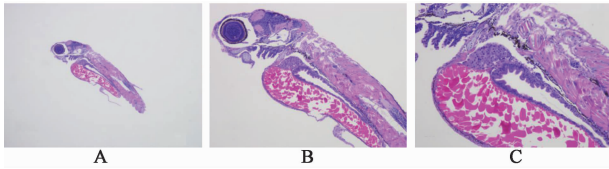
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 何首乌中 6 种成分对斑马鱼肝脏组织形态学的影响 采用整条小鱼进行包埋切片,选取 200 倍镜下拍照。为了再进一步确定各组斑马鱼肝脏的损伤情况,分别将肝脏荧光强度降低的各组及 24,48,72 hpe 空白组进行肝脏切片。24,48,72 hpe 空白组的斑马鱼肝组织显示正常,肝细胞完整,排列紧密规则。在毒效学研究中,24,48 hpe 肝脏荧光强度明显降低的大黄素、大黄酸、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷组的斑马鱼肝组织与空白组的肝组织一样,肝细胞完整,排列紧密规则,显示正常。芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷组的

斑马鱼肝组织的病理切片显示,病例组织大片片状坏死,肝组织细胞发生明显形态的改变,肝细胞排列不规则,严重空泡变性,局部坏死,见图 3,4。

4 讨论

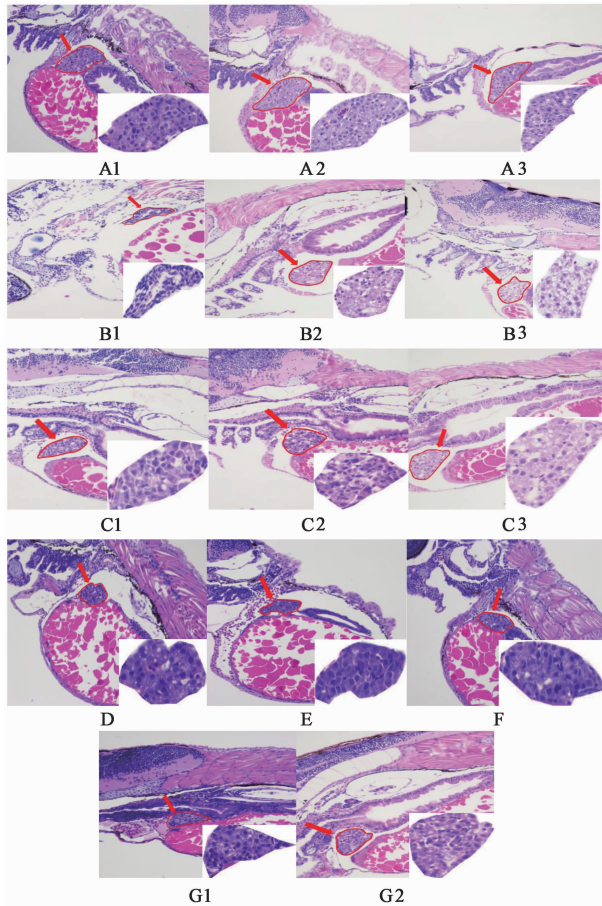
正常时 TBIL 经机体代谢后排出,血液中的含量甚微,但当肝脏发生毒性损害时会引起 TBIL 升高^[12]。Armstrong 等^[13]发现,GSH 含量的降低是一种潜在的凋亡早期激活信号。本研究测得芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷能使斑马鱼体内 TBIL 升高,GSH 活力降低,同时肝脏组织病理结果显示,芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷可以



A. ×40; B. ×100; C. ×200

图 3 何首乌对斑马鱼整体形态的影响 (HE)

Fig. 3 Effect of Polygoni Multiflori Radix on overall morphology of zebrafish (HE)



红色标示为肝脏。A1 ~ A3. 空白 24, 48, 72 hpe 组; B1 ~ B3. 芦荟大黄素 24, 48, 72 hpe 组; C1 ~ C3. 芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷 24, 48, 72 hpe 组; D. 大黄素 24 hpe 组; E. 大黄酸 24 hpe 组; F. 大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷 24 hpe 组; G1, G2. 大黄素-1-O-葡萄糖苷 24, 48 hpe 组

图 4 何首乌中 6 种成分对斑马鱼肝脏组织形态学的影响 (HE, ×200)

Fig. 4 Effect of 6 components of Polygoni Multiflori Radix on liver tissue morphology of zebrafish (HE, ×200)

明显造成斑马鱼肝组织病变,提示芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷对斑马鱼存在一定的肝毒性作用。文献报道何首乌肝毒性的临床表现多以肝炎为主^[14-16],推测其肝毒性作用机制可能与炎症反应和肝细胞凋亡有关。

ALT, AST 是评估肝功能常用的血清生化指标,

当肝细胞病变或损伤后,细胞膜的通透性增加, ALT, AST 迅速释放进入血液,导致血液中的含量升高,因此药物造成机体肝损伤后,血清中的 ALT, AST 水平会显著升高^[17-19]。本研究中,给予芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷后,斑马鱼体内 ALT 或 AST 显著降低,与以往肝毒性实验研究结果比较,出现了相反的变化。分析其原因可能是以往的研究实验是测定血清中 ALT 和 AST 的活性,而本实验是测定斑马鱼幼鱼整体组织匀浆中的 ALT, AST 活性。从整体动物的角度来看,肝脏损伤后肝细胞合成 ALT 和 AST 的能力下降,因此 ALT, AST 的总活力可能会出现降低。所以本实验的结果与以往报道并不矛盾,而是从不同的角度说明了芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷对 ALT, AST 的影响。同时芦荟大黄素可明显降低斑马鱼体内 ALT, AST 的活力,但芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷却只影响了 ALT 活力,对 AST 无明显影响,推测原因可能是由于 ALT 肝脏含量最多,AST 心脏含量最多,反映肝细胞损害方面,ALT 优于 AST,因此芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷组的 ALT 活力均显著降低,可能另一个原因是由于芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷的肝毒性作用不如芦荟大黄素强。

本研究结果发现,大黄素、大黄酸、大黄素-1-O-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷可以分别在不同程度上对斑马鱼的肝脏荧光强度和荧光面积造成一定的影响,但其血清指标和肝组织病理结果却均显示正常,分析原因,大黄素、大黄酸、大黄素-1-O-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷的肝毒性作用较小,只能短时间影响斑马鱼的肝脏表型,使得斑马鱼还具有一定的自愈作用,因此其对斑马鱼幼鱼造成的肝损伤可逆,所以并未深入地对斑马鱼体内的生化指标产生影响,也未对斑马鱼肝组织造成任何病变。因此整体而言,大黄素、大黄酸、大黄素-1-O-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷对斑马鱼肝脏的影响较温和,而芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷对斑马鱼肝脏的影响较为显著,具有较强的肝毒性作用,使得其对斑马鱼幼鱼造成的肝损伤不可逆转,从而影响了斑马鱼体内与肝损伤相关的生化指标,同时对斑马鱼肝组织造成病变。

综上,本研究从毒效学层面阐述了芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷对斑马鱼的肝毒性作用,在一定程度上揭示了何首乌的肝毒性物质基础,得到了何首乌的肝毒性物质基础可能主要是芦荟大黄素和芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷,为临床上对

何首乌的合理应用提供了一定的参考。

[参考文献]

- [1] 袁炜. 何首乌的化学成分研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [2] YI T, Leung K S, LU G H, et al. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal plant *Polygonum multiflorum* Thunb by HPLC coupled with PAD and ESI/MS [J]. *Phytochem Anal*, 2007, 18(3):181-187.
- [3] LEI X, CHEN J, REN JT, et al. Liver damage associated with *Polygonum multiflorum* Thunb.: a systematic review of case reports and case series [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015 (5):459749.
- [4] DONG H H, Slain D, CHENG J C, et al. Eighteen cases of liver injury following ingestion of *Polygonum multiflorum* [J]. *Complement Ther Med*, 2014, 22(1): 70-74.
- [5] 赖潇潇, 吴俊标, 陈设, 赖平, 汪小惠, 王颖彦, 罗懿妮, 林华. 基于回顾性研究的何首乌风险因素分析与安全应用建议 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(15): 3205-3210.
- [6] Min H J, Jung K A, Kim H J, et al. 951 twelve cases of toxic hepatitis related to the root of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *J Hepatol*, 2008, 48 (Suppl 2):S356-S356.
- [7] 全云云, 周忆梦, 刘美辰, 等. 斑马鱼模型评价何首乌中18种成分的肝脏毒性 [J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(05), 744-752.
- [8] Westerfield M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Danio (Brachydanio) rerio* [M]. Eugene: Institute of Neuroscience, University of Oregon, 2000:1-342.
- [9] CarloAlberto R. *Transgenesis techniques-Principles and protocols* [M]. Clifton: Humana Press, 2010:1-331.
- [10] Her G M, Chiang C C, CHEN W Y, et al. *In vivo* studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Febs Letters*, 2003, 538 (1/3): 125-133.
- [11] Chu J, Sadler K C. New school in liver development: lessons from zebrafish [J]. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1656-1663.
- [12] 王立媛. 正常人群血清总蛋白、总胆红素、血红蛋白测定值升高及原因探讨 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2003, 2(2):128-129.
- [13] Armstrong J S, Steinauer K K, Hornung B, et al. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(3):252-263.
- [14] Mazzanti G, Battinelli L, Daniele C, et al. New case of acute hepatitis following the consumption of Shou Wu Pian, a Chinese herbal product derived from *Polygonum multiflorum* [J]. *Ann Intern Med*, 2004, 140 (7): W30.
- [15] Panis B, Wong D R, Hooymans P M, et al. Recurrent toxic hepatitis in a Caucasian girl related to the use of Shou-Wu-Pian, a Chinese herbal preparation [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005, 41(2): 256-258.
- [16] Cárdenas A, Restrepo J C, Sierra F, et al. Acute hepatitis due to shen-min: a herbal product derived from *Polygonum multiflorum* [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2006, 40 (7):629-632.
- [17] 程生辉, 张妍妍, 李会芳, 等. 基于黄疸模型大鼠的栀子苷急性肝肾毒性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (4):174-178.
- [18] 程生辉, 唐超, 李会芳, 等. 栀子苷对正常大鼠急性肝、肾毒性的时-毒关系分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(1):162-165.
- [19] 张海虹, 卫璐戈, 李会芳. 栀子苷对正常和黄疸模型大鼠的亚急性肝肾毒性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20):140-144.

[责任编辑 张丰丰]