

基于斑马鱼模型的高良姜素安全性评价研究

张数数¹, 霍仕霞^{1,3*}, 李 滨², 李治建^{1,3}, 祖力皮卡尔·吾斯曼¹, 张 云^{2*}

1. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103

3. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 新疆 乌鲁木齐 830049

摘要: 目的 评价高良姜素(GA)对斑马鱼整体形态及心、肝、肾主要脏器的影响。方法 采用不同浓度(1、2、4、6、8、12、18、28、30、32、64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)高良姜素处理受精后48 h(48 hpf)的斑马鱼,给药24、48 h后(24、48 hpe),计算斑马鱼死亡率和畸形率;显微镜下观察高良姜素对斑马鱼形态、心率、心包面积、静脉窦-动脉球(SV-BA)距离、肝脏、卵黄囊吸收及眼部水肿情况的影响。结果 斑马鱼暴露在1、2、4、6、8、12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下的高良姜素均无死亡;24 hpe,高良姜素对斑马鱼的半数致死浓度(LC_{50})为30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;48 hpe的 LC_{50} 为28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与空白对照组比较,24 hpe,浓度 $\geq 8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高良姜素处理斑马鱼畸形率显著上升($P<0.05$);48 hpe,浓度 $\geq 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高良姜素处理斑马鱼畸形率显著升高($P<0.01$)。与空白对照组相比,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下浓度的高良姜素对斑马鱼形态及心、肝、肾无明显影响。与空白对照组相比,在24 hpe,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素组斑马鱼发育评分、相对体长显著降低($P<0.001$),心脏出现轻微的心包水肿、心包面积显著增加($P<0.05$)、心率及SV-BA距离无明显变化,肝脏面积和肝脏荧光强度显著减小($P<0.001$),卵黄囊面积显著增加($P<0.001$),肾脏无明显变化;在48 hpe,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度及以上高良姜素组发育评分显著降低($P<0.05$ 、 0.001),斑马鱼心脏出现轻微的心包水肿、心包面积显著增加($P<0.001$)、心率显著减小($P<0.01$)、SV-BA距离显著增加($P<0.01$),肝脏面积和肝脏荧光强度显著减小($P<0.01$ 、 0.001),卵黄囊面积显著增加($P<0.01$ 、 0.001),8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相对体长显著降低($P<0.001$)。结论 高良姜素在4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下对斑马鱼无毒性影响;6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度对斑马鱼有轻微的心脏毒性和肝脏毒性,在临床应用中要合理控制用量。

关键词: 高良姜素; 斑马鱼; 安全性评价; 心脏; 肝脏; 肾脏

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)09-1919-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.09.011

Safety evaluation of galangin based on zebrafish model

ZHANG Shushu¹, HUO Shixia^{1,3}, LI Bin², LI Zhijian^{1,3}, WUSIMAN Zulipikaer¹, ZHANG Yun²

1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

3. Uyghur Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830049, China

Abstract: Objective To evaluate the effects of Galangin (GA) on the overall morphology and major organs of heart, liver and kidney of zebrafish. **Methods** The zebrafish 48 h (48 hpf) after fertilization were treated with GA at different concentrations (1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 28, 30, 32, 64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). After 24 and 48 hours of experimental treatment (24 and 48 hpe), the mortality and malformation rates of zebrafish were calculated. The effects of GA on the overall morphology, heart rate, pericardial area, SV-BA distance, liver and yolk sac absorption and eye edema of zebrafish were observed. **Results** Zebrafish exposed to a concentration of 1, 2, 4, 6, 8, 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, there was no death of galangin. 24 hpe, the LC_{50} of galangin to zebrafish was 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The LC_{50} for 48 hpe was 28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the blank control group, 24 hpe, the deformity rate of zebrafish significantly increased with

收稿日期: 2023-03-20

基金项目: 自治区自然科学基金项目(2021D01A156); 国家自然科学地区科学基金项目(82160821); 天山英才项目(2022TSYCCX0021, 2022TSYCLJ009); 自治区重点研发项目(2022B03012-4); 2020年新疆维吾尔自治区高层次人才引进工程(柔性引进人才)项目资助

第一作者: 张数数(1997—), 女, 硕士, 研究方向为基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。E-mail: 1739879884@qq.com

*共同通信作者: 张 云(1982—), 女, 博士, 研究员, 主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。E-mail: xiaohan_0818@163.com
霍仕霞(1983—), 女, 硕士, 研究员, 研究方向为药物分析及中药药效学研究。E-mail: huoshixia1983@163.com

concentration $\geq 8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), 48 hpe the deformity rate of zebrafish was significantly increased ($P < 0.01$) when treated with high quality curcumin of $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the blank control group, the concentration of galangin at or below $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ had no significant effect on the morphology, heart, liver, and kidney of zebrafish. Compared with the blank control group, at 24 hpe, in the $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ galangin group, the development score and relative body length of zebrafish were significantly reduced ($P < 0.001$), with mild pericardial edema in the heart, significant increase in pericardial area ($P < 0.05$), no significant changes in heart rate and SV-BA distance, significant decrease in liver area and fluorescence intensity ($P < 0.001$), significant increase in yolk sac area ($P < 0.001$), and no significant changes in the kidneys. At 48 hpe, in the $\geq 8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ galangin group, the development score significantly decreased ($P < 0.05, 0.001$), and the heart of zebrafish showed slight pericardial edema, significant increase in pericardial area ($P < 0.001$), significant decrease in heart rate ($P < 0.01$), significant increase in SV-BA distance ($P < 0.01$), significant decrease in liver area and liver fluorescence intensity ($P < 0.01, 0.001$), and significant increase in yolk sac area ($P < 0.01, 0.001$). The relative body length of the $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group was significantly reduced ($P < 0.001$). Conclusion GA showed no toxicity on zebrafish at $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and below. The concentration of GA above $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ has slight cardiotoxicity and hepatotoxicity to zebrafish, so it is necessary to control the dosage reasonably in clinical application.

Key words: galangin; zebrafish; safety evaluation; heart; liver; kidneys

高良姜为姜科植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 的干燥根茎, 品性热味辛, 具有温胃止呕、散寒止痛等功效, 收载于历版《中国药典》。现代医学研究发现, 高良姜化学成分复杂, 药理活性较强, 具有抗氧化、抗菌、抗溃疡、抗肿瘤、抗炎、镇痛和降血糖等药理作用^[1]。现已从高良姜中提取分离出二芳基庚烷类、挥发油、黄酮类、糖苷类、苯丙素类和各种微量元素等^[2]。高良姜中黄酮类化合物具有抗氧化、抗癌变、抗诱变及清除自由基等药理活性, 主要成分包括山柰素、槲皮素、高良姜素、山柰素-4'-甲醚及山柰酚及异鼠李素等^[3-4]。课题组前期研究发现高良姜中黄酮类化合物高良姜素具有治疗皮肤色素缺失的作用^[5-6]。但目前对高良姜素的安全性研究较少, 高良姜素对机体是否具有毒性反应并未见报道。

斑马鱼是一种新型模式生物, 其基因与人类的基因同源性高达 87%^[7], 且在进化上高度保守^[8]。斑马鱼的生理特性与哺乳动物高度相似, 具有繁殖能力强、发育快速、性成熟期短, 胚胎体外发育且透明等特点, 已被广泛应用于化合物的安全性评价, 尤其是化合物对心、肝、肾等主要脏器的影响^[9-11]。因此, 本研究选择新型模式生物斑马鱼进行高良姜素安全性评价, 重点考察对心脏、肝脏和肾脏的影响, 为临床合理用药提供理论参考。

1 材料

1.1 实验动物

采用的斑马鱼为野生型 AB 和肝脏标记绿色荧光的转基因斑马鱼 *Tg(L-FABP:EGFP)*, 由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。成熟雌、雄斑马鱼饲养于自动斑马鱼养殖系统, 每天 2 次

喂食丰年虾和草履虫, 处于黑暗/光照(10 h/14 h)条件下饲养, 温度(28.0 ± 0.5)°C。实验前 1 d 15:30 左右取健康性成熟的雌、雄斑马鱼, 按照雌、雄 1:1 或者 1:2 的比例放入产卵缸, 隔板分开。第 2 天 8:30 左右抽板, 11:00 收集受精卵。将收集的受精卵放到温度(28.0 ± 0.5)°C 的恒温培养箱中控光培养, 以备使用。

1.2 主要试剂

高良姜素(购自成都克洛玛生物科技有限公司, 生产批号 CHB180610, 质量分数 $\geq 99.9\%$); 二甲基亚砜(购自广州宇烽生物科技有限公司, 生产批号 2012365); 链霉蛋白酶 E(购自北京索莱宝科技有限公司, 生产批号 425B011); 斑马鱼培养用水(含 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 $0.17 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KCl}$ 、 $0.16 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4$)。

1.3 主要仪器

SZX16 型体视荧光显微镜、DP2-BSW 图像采集系统(日本奥林巴斯公司); 斑马鱼养殖饲养系统(中国北京爱生科技有限公司); SPX-280B-G 型光照培养箱(中国上海基星生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物分组

收集的斑马鱼胚胎在受精后 9 h(9 hpf)用链霉蛋白酶 E 进行脱膜, 用斑马鱼培养用水将多余的链霉蛋白酶 E 清洗, 并置于培养箱中培养。48 hpf, 在显微镜下挑选发育健康的斑马鱼, 移入 24 孔板的样板中, 每孔 10 条。根据预试验, 设置空白对照组(斑马鱼培养用水)、溶剂对照组(DMSO)、高良姜素($1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 28, 30, 32, 64 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组, 每组设置 3 个重复。随后置于光照培养箱中恒温(28.0 ± 0.5)°C 孵育, 持续给药 2 d, 每天换液。

2.2 高良姜素对斑马鱼死亡率和畸形率的影响

观察并记录给药24、48 h后(24、48 hpe)各组斑马鱼的死亡情况(以是否有心跳作为判断斑马鱼是否存活为标准),计算死亡率;在24、48 hpe记录斑马鱼的形态变化,如体形、脑、脊索、体节、尾、鱼鳍、心脏、卵黄囊、鱼鳔、色素沉着等,并计算畸形率。

2.3 高良姜素对斑马鱼形态的影响

考察高良姜素处理24、48 h对斑马鱼形态的影响。每组斑马鱼用0.3%三卡因麻醉1 min,吸至含有4%甲基纤维素的载玻片置于体视显微镜进行拍照,对斑马鱼体形、体节、脊索、尾巴、鱼鳍、卵黄囊、心脏、脑、鱼鳔、咽弓/颌骨等方面进行观察,评价斑马鱼的形态变化,每组取5~8条斑马鱼进行评分。依据参考文献报道^[12]对斑马鱼形态进行评分,5分为斑马鱼形态完全正常,4~3分为斑马鱼出现轻微的形态变化,2~1分为斑马鱼形态结构中度畸形,0.5分为斑马鱼形态结构严重畸形。

2.4 高良姜素对斑马鱼心脏的影响

高良姜素处理24、48 h,将斑马鱼吸至载玻片上待斑马鱼静止时置于体视显微镜下,用计时器记录每分钟斑马鱼的心跳,计算斑马鱼的心率。使用0.3%的三卡因麻醉斑马鱼1 min,置于体视显微镜下对心脏部位进行拍照,并测量心包面积、斑马鱼静脉窦(SV)和动脉球(BA)之间的距离。

2.5 高良姜素对斑马鱼肝脏的影响

高良姜素处理肝脏标记绿色荧光的转基因斑马鱼Tg(L-FABP:EGFP)24、48 h,使用0.3%三卡因麻醉斑马鱼1 min,将斑马鱼固定在含有4%甲基纤维素的载玻片上,对斑马鱼侧面体位(双眼重合)进行拍照。荧光显微镜下进行拍照记录肝脏荧光情况,测量斑马鱼肝脏荧光强度和肝脏面积。

相对肝脏面积=处理组斑马鱼肝脏面积/空白对照组肝脏面积

相对肝脏荧光强度=处理组斑马鱼肝脏荧光强度/空白对照组肝脏荧光强度

2.6 高良姜素对斑马鱼肾脏的影响

高良姜素处理24、48 h,使用0.3%三卡因麻醉斑马鱼1 min,将斑马鱼固定在含有4%甲基纤维素的载玻片上,对斑马鱼进行拍照。体视显微镜下观察各组斑马鱼是否有眼部水肿来判断高良姜素对斑马鱼肾脏的影响。

2.7 统计学分析

所有数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)和Dunnett's t检验分析组间差异的显著性。

3 结果

3.1 高良姜素对斑马鱼死亡率和畸形率的影响

如表1所示,斑马鱼暴露在1、2、4、6、8、12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下的高良姜素均无死亡。24 hpe,高良姜素对

表1 暴露于不同浓度的高良姜素对斑马鱼累计死亡率和畸形率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effects of exposure to different concentrations of GA on cumulative mortality rate and deformity rate of zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	累计死亡率/%		畸形率/%	
		24 hpe	48 hpe	24 hpe	48 hpe
空白对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
溶剂对照	—	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
高良姜素	1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	2	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	45.80±4.20 ^{**}
	8	0.00±0.00	0.00±0.00	33.30±8.30 [*]	58.35±8.35 ^{***}
	12	0.00±0.00	0.00±0.00	50.00±0.00 ^{**}	83.30±0.00 ^{***}
	18	0.00±0.00	16.67±8.34 [*]	70.85±4.15 ^{***}	100.00±0.00 ^{***}
	28	37.50±4.20 ^{**}	54.15±4.15 ^{***}	75.00±8.30 ^{***}	100.00±0.00 ^{***}
	30	66.65±8.35 ^{***}	79.15±4.15 ^{***}	83.30±0.00 ^{***}	100.00±0.00 ^{***}
	32	79.15±4.15 ^{***}	100.00±0.00 ^{***}	87.50±4.20 ^{***}	—
	64	100.00±0.00 ^{***}	100.00±0.00 ^{***}	—	—

与空白对照组比较:^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 ^{***}P<0.001

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs blank control group

斑马鱼的半数致死浓度(LC_{50})为 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;48 hpe,高良姜素对斑马鱼的 LC_{50} 为 $28\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $64\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理24和48 h斑马鱼全部死亡。与空白对照组比较,24 hpe,浓度 $\geq 8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高良姜素处理斑马鱼畸形率显著上升($P<0.05, 0.01, 0.001$);48 hpe,浓度 $\geq 6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高良姜素处理斑马鱼畸形率显著升高($P<0.01, 0.001$)。 $4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下浓度未导致斑马鱼发生畸形。

3.2 高良姜素对斑马鱼形态的影响

结果如图1-A所示,与空白对照组斑马鱼比较,给药组斑马鱼出现的畸形类型有:心包水肿、肝脏脂肪堆积、肝缘模糊、卵黄囊吸收延迟、体躯变短及色素异常等。斑马鱼经高良姜素处理24、48 h后的整体形态变化如图1-B所示,在24和48 hpe,斑马鱼暴露在 $1, 2, 4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高良姜素中,形态无显著差异;24 hpe, $8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素对斑马鱼形态

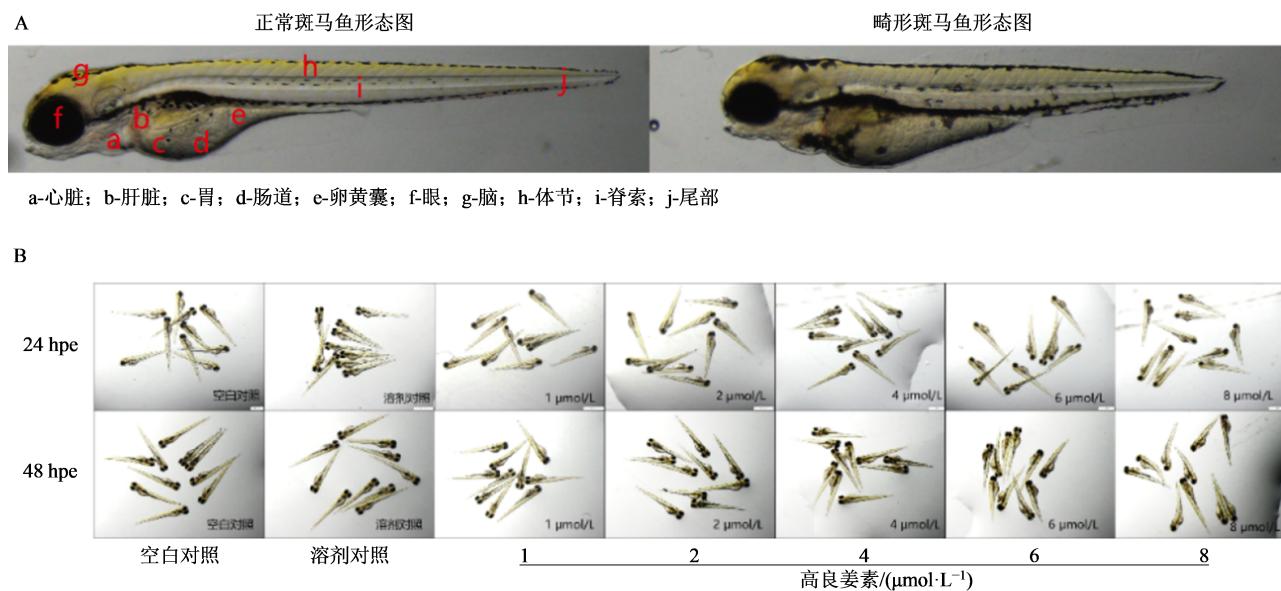


图1 斑马鱼经高良姜素处理24、48 h后的形态(A)及整体形态变化(B)

Fig. 1 Morphological (A) and overall morphological changes (B) of zebrafish embryos treated with GA for 24 and 48 h

有影响,如斑马鱼体长减小;48 hpe, $6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度开始导致斑马鱼出现轻微的心包水肿。

在24和48 hpe,空白对照组斑马鱼器官清晰可见、色素分布均匀、体节明显可见,发育评分为5分;与空白对照组比较,24 hpe的高良姜素 $8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和48 hpe的高良姜素 $6, 8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组发育评分显著降低($P<0.05, 0.001$),结果见图2。

在24和48 hpe, $1, 2, 4, 6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素对斑马鱼形态、体长无显著影响。与空白对照组比较,在24和48 hpe, $8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素组斑马鱼相对体长均显著减小($P<0.05, 0.001$)。结果见图2。

观察高良姜素在24和48 hpe对斑马鱼卵黄囊形态及面积大小的影响。结果如图3-A、B所示,1、 $2, 4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素对斑马鱼卵黄囊形态及面积大小无显著影响; $8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理24 h导致斑马鱼卵黄囊吸收延迟、卵黄囊面积显著增加($P<0.001$);暴露于 $6, 8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下处理48 h导致斑马鱼卵黄囊吸收延迟、卵黄囊面积显著增加($P<0.05, 0.001$)。

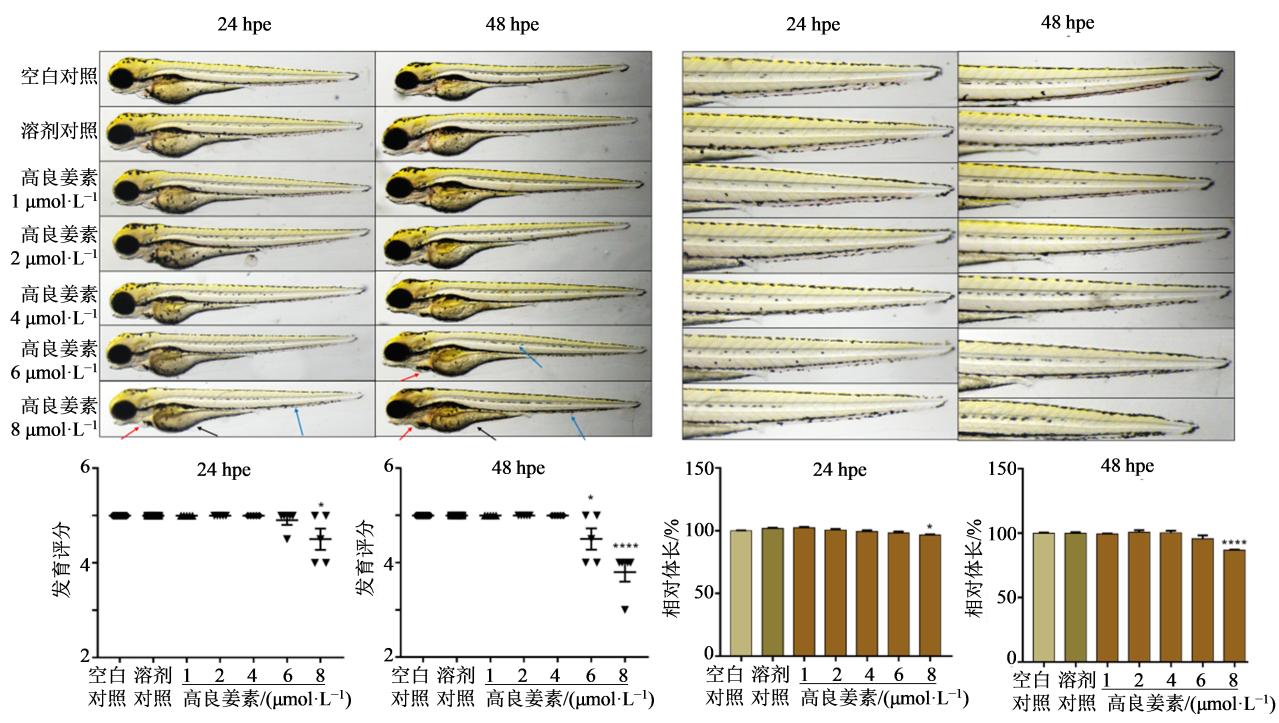
3.3 高良姜素对斑马鱼心脏的影响

3.3.1 高良姜素对斑马鱼心脏形态的影响 在24和48 hpe,与空白对照组比较, $1, 2, 4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素斑马鱼心脏形态正常,无心包水肿。与空白对照组比较, $8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理24 h后斑马鱼形态出现轻微的心包水肿,心包面积增加($P<0.05$); $6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理48 h后斑马鱼出现心包水肿,心包面积增加($P<0.001$)。结果见图4。

3.3.2 高良姜素对斑马鱼心率、SV-BA距离的影响 在24 hpe,与空白对照组比较, $1, 2, 4, 6, 8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 斑马鱼心率及SV-BA距离均无显著差异。在48 hpe,与空白对照组比较,从 $6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度开始斑马鱼心率显著减小、SV-BA距离显著增加($P<0.01, 0.001$)。结果见图5。

3.4 高良姜素对斑马鱼肝脏形态的影响

采用体视显微镜观察明场下高良姜素对斑马鱼肝脏形态的影响。结果如图6显示,24、48 hpe,与空白对照组比较, $1, 2, 4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素组斑马鱼的肝脏透明、结构正常。 $6, 8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别处理24、

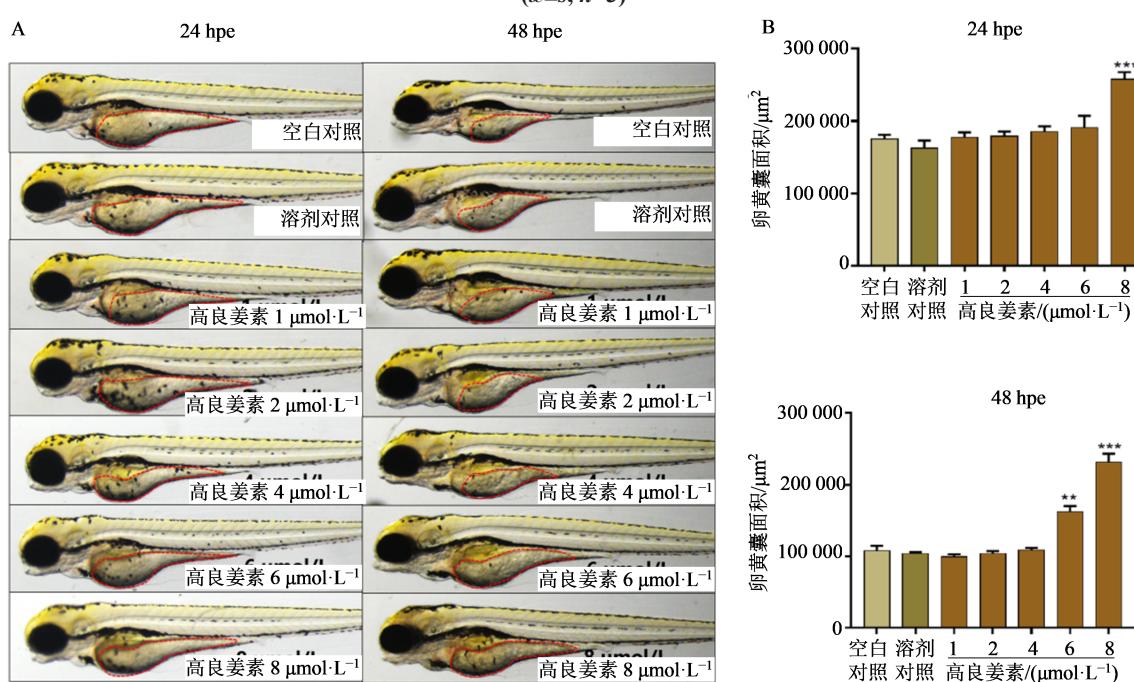


红色箭头指示心包水肿；黑色箭头指示卵黄囊吸收延迟；蓝色箭头指示体躯变形；与空白对照比较： $*P < 0.05$ $***P < 0.001$

Red arrow indicates pericardial edema; black arrow indicates delayed yolk sac absorption; blue arrows indicate body deformation; $*P < 0.05$ $***P < 0.001$ vs blank control group

图2 暴露于不同浓度的高良姜素 24 和 48 h 的斑马鱼形态变化、评分及体长($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Morphological changes, scores, and body length of zebrafish exposed to different concentrations of GA for 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)



红色虚线圈指示卵黄囊；与空白对照组比较： $**P < 0.01$ $***P < 0.001$

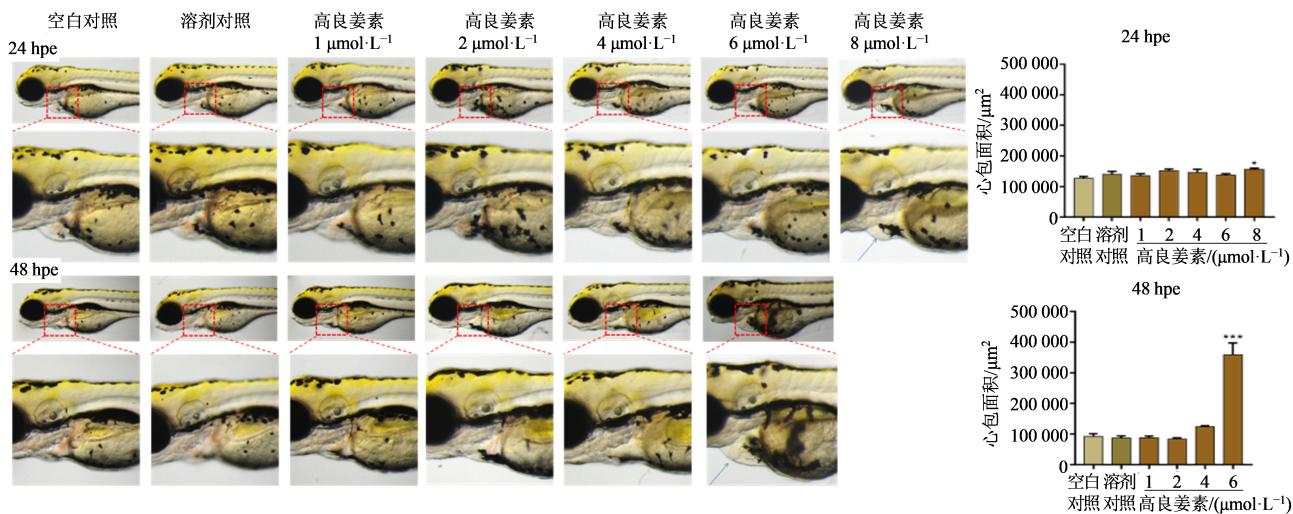
red dotted circle indicates the yolk sac; $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs blank control group

图3 暴露于不同浓度的高良姜素 24 和 48 h 的斑马鱼卵黄囊形态(A)及面积大小(B)($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Morphology (A) and size of yolk sac (B) of zebrafish exposed to different concentrations of GA for 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

48 h 后斑马鱼肝脏形态颜色变暗，肝脏结构变小，边缘模糊。

结果如7所示，24 hpe，与空白对照组比较，1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素对斑马鱼肝脏荧光面积及荧光

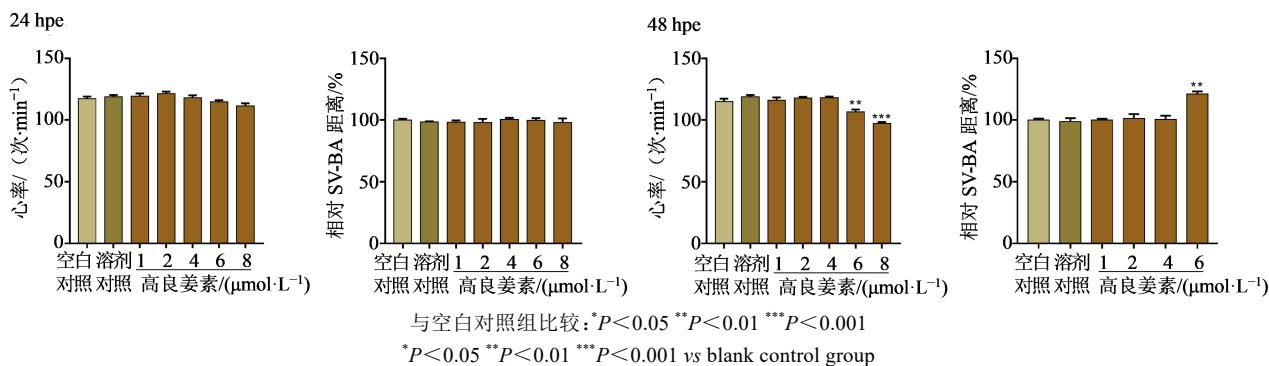


红色虚线矩形心脏区域指示放大图像;蓝色箭头指示心包水肿;与空白对照组比较: $^*P<0.05$ $^{***}P<0.001$

Red dotted rectangular heart area indicates enlarged image; blue arrow indicates pericardial edema; $^*P < 0.05$ $^{***}P < 0.001$ vs blank control group

图 4 斑马鱼经高良姜素处理 24、48 h 后的心脏形态学变化 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 4 Morphological changes of zebrafish heart treated with GA for 24 and 48 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

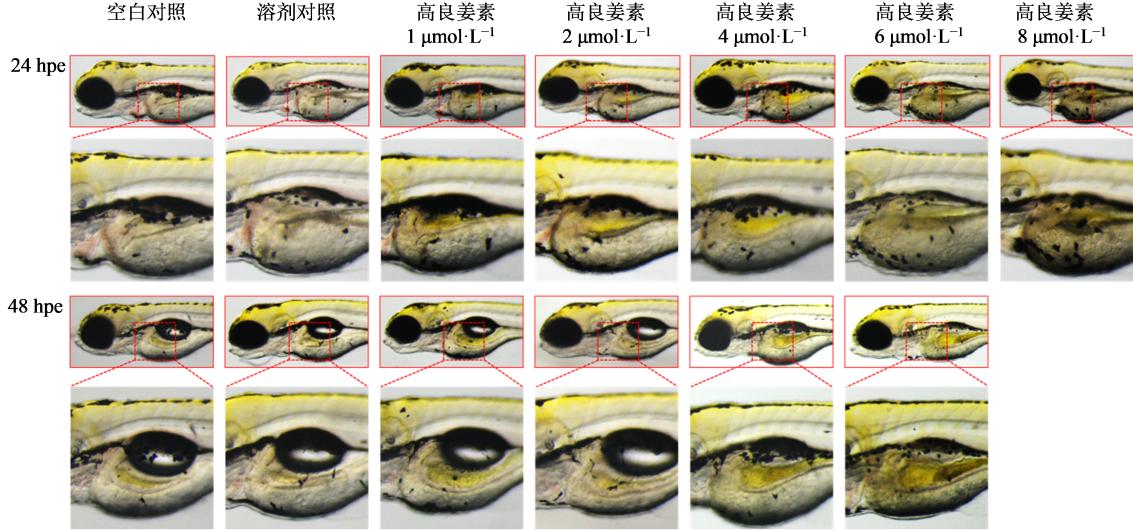


与空白对照组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$

$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ vs blank control group

图 5 斑马鱼经高良姜素处理 24、48 h 后心率、SV-BA 距离的变化 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 5 Changes of heart rate and SV-BA distance in zebrafish treated with GA for 24 and 48 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)



红色虚线勾画指示肝脏放大形态

Red dashed lines indicate enlarged liver morphology

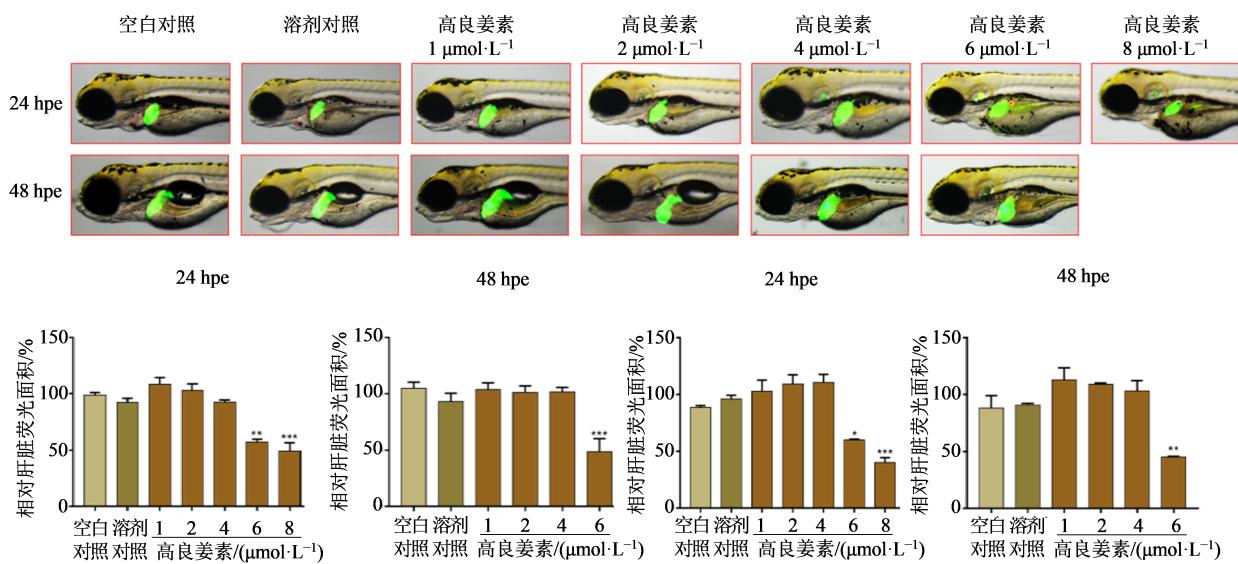
图 6 斑马鱼经高良姜素处理 24、48 h 后的肝脏形态学变化

Fig. 6 Morphological changes of liver of zebrafish treated with GA for 24 and 48 h

强度无明显影响;6、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 使斑马鱼肝脏荧光面积和肝脏荧光强度显著减小($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。48 hpe,与空白对照组比较,1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高良姜素对斑马鱼肝脏荧光面积及荧光强度无明显影响;6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 使斑马鱼肝脏荧光面积和肝脏荧光强度显著减小($P<0.01$ 、 0.001)。

3.5 高良姜素对斑马鱼肾脏的影响

考察给药24、48 h后高良姜素对斑马鱼体侧形态的变化和斑马鱼眼球面积的影响来判断高良姜素对斑马鱼肾脏的毒性。与空白对照组比较,高良姜素对斑马鱼眼球面积无明显影响,未导致斑马鱼眼部水肿,形态正常。结果图8。



绿色荧光表示斑马鱼肝脏的荧光形态;与空白对照组比较:^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$

Green fluorescence represents the fluorescence morphology of zebrafish liver; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs blank control group

图7 斑马鱼经高良姜素处理24、48 h后的肝脏荧光面积和荧光强度($x\pm s, n=3$)

Fig. 7 Liver fluorescence intensity and fluorescence area of zebrafish treated with GA for 24 and 48 h ($x\pm s, n=3$)

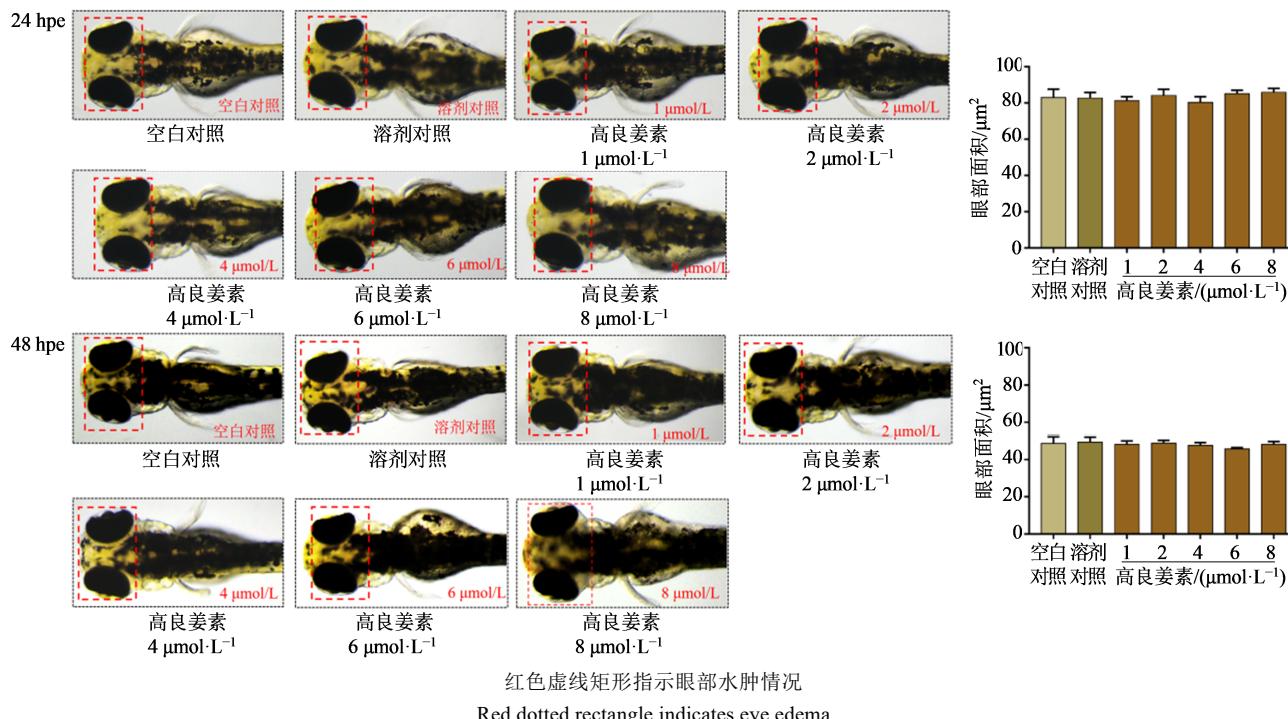


图8 斑马鱼幼鱼经高良姜素处理24、48 h后的体侧形态学变化

Fig. 8 Somatic morphological changes of zebrafish treated with GA for 24 and 48 h

4 讨论

高良姜收载于《名医别录》中,味辛性温热,可用作为药食两用植物资源,被广泛用于治疗肿瘤、糖尿病、皮肤保护等疾病,其化学成分复杂,药理作用广泛^[13-14]。高良姜中富含黄酮类化合物,高良姜素是高良姜中黄酮类化合物活性成分之一,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、皮肤保护及清除自由基等能力^[13]。霍仕霞等^[15]研究高良姜素对 700 μmol·L⁻¹过氧化氢诱导 A375 黑色素瘤细胞氧化损伤后细胞内 Nrf2、γ-GCS 基因表达的影响,发现高良姜素是通过上调细胞 Nrf2 和 γ-GCS 的表达,从而激活 Nrf2 信号通路,发挥对 A375 黑色素瘤细胞氧化损伤的保护作用。但目前尚未有对高良姜素用药剂量的安全性评价报道,对其进行安全性评价尤为重要。

本实验采用斑马鱼对高良姜素进行安全性评价。斑马鱼模型是一种新型模式生物,在神经系统^[16-17]、肾脏^[18-19]、肝脏系统^[20]及心血管系统^[21]等方面都与人类对应的组织具有极其相似的发育机制与特点。目前诸多国家已广泛应用斑马鱼模型进行化合物的安全性评价与活性筛选^[22]。以斑马鱼模型进行安全性评价的指标主要是化合物对斑马鱼的孵化率、畸形率及死亡率的影响,以及心、肝、肾等脏器的影响^[23]。因此本实验采用斑马鱼模型对高良姜素进行安全性评价,为高良姜的综合开发利用提供参考。

本实验采用不同浓度的高良姜素暴露于 48 hpf 的斑马鱼,结果显示,高良姜素在 4 μmol·L⁻¹ 及以下浓度对斑马鱼的死亡率、畸形率、形态及心、肝、肾等无明显影响。6 μmol·L⁻¹ 浓度处理斑马鱼 48 h 导致斑马鱼体长减小。8 μmol·L⁻¹ 浓度处理 24 h 后导致斑马鱼出现轻微的心包水肿、肝脏形态变化,但对肾脏无影响;在 48 hpe, 6 μmol·L⁻¹ 导致斑马鱼心包水肿和肝脏形态的变化。

斑马鱼胚胎全身透明,便于在体视显微镜下直接观察心率变化和心脏形态及血液循环等变化^[24]。斑马鱼的心率反映了心脏的泵血功能^[25]。实验中斑马鱼的 SV-BA 分别代表斑马鱼的血液进入心房的部位和血液流出心室的部位,其距离的变化可反映心脏损伤程度^[26]。本实验采用心率、SV-BA 距离和心包面积的变化为指标来判断高良姜素对斑马鱼心脏的毒性影响。24 hpe, 与空白对照组比较, 1、2、4、6、8 μmol·L⁻¹ 的高良姜素对斑马鱼心率和 SV-BA 距离无明显影响,但在 8 μmol·L⁻¹ 时斑马鱼心包面积增加。48 hpe, 与空白对照组比较, 6、8 μmol·L⁻¹ 对

斑马鱼心率减小、SV-BA 距离增加、心包面积增加,提示高浓度的高良姜素对心脏有毒性。

在 72 hpf 斑马鱼肝脏发育功能完全^[27-28]。本实验利用肝脏荧光转基因斑马鱼品系 *Tg(L-FABP: EGFP)*, 通过检测斑马鱼肝脏形态、肝脏荧光强度和肝脏荧光面积大小进行定量评价高良姜素对斑马鱼肝脏的毒性。卵黄囊中 70% 为中性脂质, 主要在肝脏中代谢, 卵黄囊吸收延迟表明肝脏代谢紊乱, 卵黄囊大小是反映肝功能的重要指标之一^[29]。在 24 和 48 hpe, 1、2、4 μmol·L⁻¹ 高良姜素处理后肝脏形态与空白对照组斑马鱼无显著差异。24 和 48 hpe, 6、8 μmol·L⁻¹ 高良姜素导致斑马鱼肝脏形态无透明、颜色明显变暗、肝脏荧光面积及肝脏荧光强度显著减小。除此之外, 上述实验结果中, 在 24 和 48 hpe, 8 μmol·L⁻¹ 高良姜素均造成斑马鱼卵黄囊面积显著增加, 提示高浓度的高良姜素对肝脏具有毒性。

肾脏是动物主要的排泄器官, 当机体发生代谢紊乱时, 会引起水分堆积造成局部水肿现象, 包括脑部水肿和眼部水肿等^[30-31]。本实验观察到所用浓度下斑马鱼眼部、脑部形态没有变化, 初步表明高良姜素对斑马鱼肾脏没有毒性。

本实验结果显示高良姜素对斑马鱼毒性较小, 在 1、2、4 μmol·L⁻¹ 浓度下对斑马鱼形态及心、肝、肾无显著差异。在高浓度下会影响斑马鱼的形态, 致畸的表现为心包轻微水肿、卵黄囊吸收延迟、肝脏荧光面积和肝脏荧光强度减小, 但致畸毒性较小。本实验结果证明高良姜素在应用中较安全, 毒副作用较小, 但要合理控制用量。本研究为高良姜素的安全使用提供了数据支撑和理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李洪福, 李永辉, 王勇, 等. 高良姜化学成分及药理活性的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 236-244.
Li H F, Li Y H, Wang Y, et al. Study on chemical constituents and pharmacological activities of *Alpinia officinarum* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2014, 20(7): 236-244.
- [2] 吕玮, 蒋伶活. 高良姜的化学成分及药理作用 [J]. 中国药业, 2006, 15(3): 19-21.
Lu W, Jiang L H. Chemical constituents and pharmacological activities of *Alpinia officinarum* hance [J]. China Pharm, 2006, 15(3): 19-21.
- [3] 安宁, 杨世林, 邹忠梅, 等. 高良姜黄酮类化学成分的研

- 究 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 663-664.
- An N, Yang S L, Zou Z M, et al. Flavonoids of *Alpinia officinarum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2006, 37(5): 663-664.
- [4] 黄慧珍, 杨丹. 高良姜的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 广东化工, 2009, 36(1): 77-80.
- Huang H Z, Yang D. Research on development of the chemical composition and pharmacological activity of *Alpinia officinarum* [J]. Guangdong Chem Ind, 2009, 36 (1): 77-80.
- [5] 高莉, 霍仕霞, 彭晓明, 等. 高良姜素对氢醌诱导的白癜风小鼠模型的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2358-2363.
- Gao L, Huo S X, Peng X M, et al. Effects of galangin with different purity on vitiligo mouse model induced by hydroquinone [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(16): 2358-2363.
- [6] 霍仕霞, 彭晓明, 高莉, 等. 不同质量分数高良姜素对人黑色素瘤A375细胞黑素合成及相关基因表达的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 244-249.
- Huo S X, Peng X M, Gao L, et al. Effects of galangin with different purity on melanin synthesis and related gene expression in human melanoma A375 cells [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(2): 244-249.
- [7] Howe K, Clark M, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503.
- Lieschke G J, Currie P D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(5): 353-367.
- [9] 康桂英. 对乙酰氨基酚在斑马鱼体内的毒性研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- Kang G Y. Study on toxicity of acetaminophen in zebrafish [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.
- [10] 冯娅茹, 赵崇军, 倪媛媛, 等. 香加皮对斑马鱼发育毒性及心脏毒性的影响 [J]. 环球中医药, 2017, 10(5): 536-540.
- Feng Y R, Zhao C J, Ni Y Y, et al. Effects of Cortex Periplocae on zebrafish developmental toxicity and cardiac toxicity [J]. Glob Tradit Chin Med, 2017, 10(5): 536-540.
- [11] 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): 278-287.
- Fan Q Q, Li Z Q, Chen M L, et al. Research progress on safety evaluation of traditional Chinese medicine based on zebrafish model [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53 (1): 278-287.
- [12] Panzica-Kelly J M, Zhang C X, Danberry T L, et al. Morphological score assignment guidelines for the dechorionated zebrafish teratogenicity assay [J]. Birth Defects Res B Dev Reproductive Toxicol, 2010, 89(5): 382-395.
- [13] 王晓晴, 孙允红, 赵方舒, 等. 高良姜素的药理作用及机制研究进展 [J/OL]. 中药药理与临床, (2022-04-25) [2023-03-07]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1188.R.20220424.1519.002.html>.
- Wang X Q, Sun Y H, Zhao F S, et al. Research progress of pharmacological action and mechanism of galangin [J/OL]. Pharmacol Clin Tradit Chin Med, (2022-04-25) [2023-03-07]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1188.R.20220424.1519.002.html>.
- [14] Tang X X, Xu C M, Yagiz Y, et al. Phytochemical profiles, and antimicrobial and antioxidant activities of greater galangal [*Alpinia galanga* (Linn.) Swartz.] flowers [J]. Food Chem, 2018, 255: 300-308.
- [15] 霍仕霞, 彭晓明, 高莉, 等. 高良姜素对过氧化氢诱导的A375细胞氧化损伤后Nrf2、 γ -GCS基因表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(11): 69-72.
- Huo S X, Peng X M, Gao L, et al. Effects of galangin on gene expressions of Nrf2 and γ -GCS in oxidative damage of A375 cell induced by H_2O_2 [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2015, 22(11): 69-72.
- [16] Nelson J C, Granato M. Zebrafish behavior as a gateway to nervous system assembly and plasticity [J]. Development, 2022, 149(9): 1-11.
- [17] Fichi G, Naef V, Barca A, et al. Fishing in the cell powerhouse: Zebrafish as a tool for exploration of mitochondrial defects affecting the nervous system [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): 2409.
- [18] Outtandy P, Russell C, Kleta R, et al. Zebrafish as a model for kidney function and disease [J]. Pediatr Nephrol, 2019, 34(5): 751-762.
- [19] Fatma S, Nayak U, Swain R K. Methods to generate and evaluate zebrafish models of human kidney diseases [J]. Int J Dev Biol, 2021, 65(7/8/9): 475-485.
- [20] Goessling W, Sadler K C. Zebrafish: An important tool for liver disease research [J]. Gastroenterology, 2015, 149 (6): 1361-1377.
- [21] Ping S W, Lin W T, Ming R L, et al. Toxic effects of four cardiovascular drugs on the development and epigenetics of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Sci Total Environ, 2022, 846: 157360.
- [22] Lam P Y, Peterson R T. Developing zebrafish disease models for *in vivo* small molecule screens [J]. Curr Opin Chem Biol, 2019, 50: 37-44.
- [23] 王明亮, 丁永芳, 印鑫, 等. 斑马鱼在毒理学中的应用研

- 究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 390-396.
- Wang M L, Ding Y F, Yin X, et al. Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2020, 28(3): 390-396.
- [24] Lin S H, Mo C L, Yan L Y, et al. Protective effects of salvianolic acid A on clozapine-induced cardiotoxicity in zebrafish [J]. J Appl Toxicol, 2022, 42(12): 1978-1985.
- [25] 薛迪. 斑马鱼血管抑制和心脏损伤模型的构建及研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2016.
- Xue D. Construction and study of zebrafish vascular inhibition and heart injury model [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2016.
- [26] 吕婧, 李晨, 杨龙飞, 等. 基于斑马鱼模型的西洋参提取物心脏保护作用研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(3): 308-313.
- Lyu J, Li C, Yang L F, et al. Study on the heart protective effect of *Panax quinquefolium* extract based on Zebra fish model [J]. China Pharm, 2020, 31(3): 308-313.
- [27] Chu J, Sadler K C. New school in liver development: Lessons from zebrafish [J]. Hepatology, 2009, 50(5): 1656-1663.
- [28] 张云, 彭维兵, 王希敏, 等. 采用斑马鱼模型评价对乙酰氨基酚的肝脏毒性 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(5): 351-354.
- Zhang Y, Peng W B, Wang X M, et al. Hepatotoxicity evaluation of acetaminophen using zebrafish model [J]. Drug Eval Res, 2013, 36(5): 351-354.
- [29] Zhang Y, Liu K C, Hassan H M, et al. Liver fatty acid binding protein deficiency provokes oxidative stress, inflammation, and apoptosis-mediated hepatotoxicity induced by pyrazinamide in zebrafish larvae [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(12): 7347-7356.
- [30] Hentschel D M, Park K M, Cilenti L, et al. Acute renal failure in zebrafish: A novel system to study a complex disease [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 288(5): F923-F929.
- [31] Berman N, Lectura M, Thurman J, et al. A zebrafish model for uremic toxicity: Role of the complement pathway [J]. Blood Purif, 2013, 35(4): 265-269.

【责任编辑 兰新新】