

• 药理与临床 •

基于斑马鱼 M-Act/Tox 联合评价箭叶淫羊藿的代谢-效/毒作用

葛 静^{1,2}, 凌 洁^{1,2}, 宁 青^{1,2}, 刘欣欣^{1,2}, 宋 捷^{1,2}, 韦英杰^{1,2*}, 贾晓斌^{1,3*}

1. 南京中医药大学第三临床医学院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院, 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028

3. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

摘要: 目的 基于斑马鱼代谢-效/毒 (M-Act/Tox) 联合评价箭叶淫羊藿代谢、抗骨质疏松效应及毒性。方法 用受精后 1~6 d (1~6 dpf) 斑马鱼评价箭叶淫羊藿 (生药质量浓度 200、500、1 000、1 500、2 000 $\mu\text{g/mL}$) 的安全性, 观察鱼脏器形态、计数死亡数并计算斑马鱼半数死亡浓度 (LC_{50}); 用 5 dpf 斑马鱼暴露于箭叶淫羊藿 (生药 250 $\mu\text{g/mL}$) 24 h, 分析 6 个代表性黄酮成分朝藿定 A (EA)、朝藿定 B (EB)、朝藿定 C (EC)、淫羊藿苷、箭藿苷 C (SC) 与宝藿苷 I (BI) 变化; 用 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松模型, 采用茜素红对培养至 8 dpf 的各组斑马鱼幼鱼骨骼染色, 进行显微检测、数码成像, 并用图像软件定量分析骨骼染色区域来评价箭叶淫羊藿抗骨质疏松活性。结果 箭叶淫羊藿在 500 $\mu\text{g/mL}$ 及以上质量浓度时致斑马鱼中毒 (脏器变形或死亡), 毒性与给药质量浓度和时间相关; 经斑马鱼作用后, EA、EB、EC 及淫羊藿苷几近全部转化, 代谢物以 SC 与 BI 为主; 箭叶淫羊藿在一定质量浓度 (6.25、12.5、25 $\mu\text{g/mL}$) 具显著的抗泼尼松龙诱导斑马鱼骨丢失作用。结论 用斑马鱼有效评价了箭叶淫羊藿的代谢、抗骨质疏松效应与毒性。斑马鱼 M-Act/Tox 联合法有机整合了斑马鱼代谢方法、骨质疏松模型及毒性评价法的优势, 实现基于体内过程的效应/毒性评价, 为抗骨质疏松中药筛选提供新思路与方法。

关键词: 箭叶淫羊藿; 斑马鱼; 骨质疏松; 毒性; 代谢; 药效

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)07-1614-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.018

Evaluation of metabolism-effect/toxicity of *Epimedium sagittatum* based on zebrafish M-Act/Tox integration methodGE Jing^{1,2}, LING Jie^{1,2}, NING Qing^{1,2}, LIU Xin-xin^{1,2}, SONG Jie^{1,2}, WEI Ying-jie^{1,2}, JIA Xiao-bin^{1,3}

1. School of Third Clinical Medicine of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. School of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: **Objective** To evaluate the metabolism, anti-osteoporosis efficacy and toxicity of *Epimedium sagittatum* based on zebrafish M-Act/Tox integration method. **Methods** The safety of *E. sagittatum* (crude drug 200, 500, 1 000, 1 500, and 2 000 $\mu\text{g/mL}$) was evaluated with 1—6 dpf zebrafish, the morphology of fish organs was observed and the number of deaths was counted and the half death concentration of zebrafish (LC_{50}) was calculated; The 5 dpf zebrafish were exposed to *E. sagittatum* (crude drug 250 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, six representative flavonoids, including epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, sagittatoside C, and baohuoside I, were analyzed; The zebrafish osteoporosis model was induced with 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone, microscopic detection and digital imaging of zebrafish larvae of each group cultured to 8 dpf were performed using alizarin red, and the bone staining area was quantitatively analyzed by image software to evaluate the anti-osteoporosis activity of *E. sagittatum*. **Results** *E. sagittatum* caused zebrafish

收稿日期: 2018-09-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573833); “重大新药创制”科技重大专项资助 (2017ZX 09301-056); 中医药行业科研专项资助 (201507004-10)

作者简介: 葛 静, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: 18305172252 E-mail: 1830517225@163.com

*通信作者 贾晓斌, 男, 博士生导师, 研究方向为中药组方制剂。E-mail: jiaxiaobin2015@163.com

韦英杰, 女, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药物质基础与质量控制。Tel: (025)52312109 E-mail: wyj970@163.com

poisoning at crude drug 500 $\mu\text{g/mL}$ and above concentration (organs deformation or death), and toxicity was related to drug concentration and exposing time; After the action of zebrafish, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and icariin were almost completely transformed, and sagittatoside C and baohuoside I were the main metabolites; *E. sagittatum* had significant anti-prednisolone-induced bone loss in zebrafish at a certain concentration (crude drug 6.25, 12.5, and 25 $\mu\text{g/mL}$). **Conclusion** The metabolism, anti-osteoporosis efficacy and toxicity of *E. sagittatum* are evaluated using zebrafish. The zebrafish M-Act/Tox integration method integrates the advantages of zebrafish metabolism, osteoporosis model and toxicity evaluation method, and realizes the effect/toxicity evaluation based on *in vivo* process, providing new ideas and method for screening anti-osteoporosis Chinese medicine.

Key words: *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.; zebrafish; osteoporosis; toxicity; metabolism; efficacy

壮骨中药治疗骨质疏松症疗效确切受到青睐,但其副作用正日益受到关注^[1-4],这为临床安全、合理用药带来极大挑战。兼顾有效性与安全性的快速评价与安全预警具有重要意义,中药的效应(action, Act)/毒性(toxicity, Tox)产生与其代谢转化(metabolism, M)密切相关,全面考虑代谢/毒(M-Act/Tox)联合的筛选具有意义^[5]。

针对现有体内、外模型无法进行 M-Act/Tox 联合的在体、高效筛选的技术瓶颈,本课题组依据斑马鱼的遗传发育与哺乳动物高度相似的特点及优势^[6],参考前期相关研究及国内外文献,提出斑马鱼代谢模型^[7]、骨质疏松模型^[8-9]及毒性评价法^[10-12]有机整合,可建立 M-Act/Tox 联合的抗骨质疏松中药高效筛选法。对实现兼顾有效性与安全性,实现条件简单、高效率、低成本、高灵敏地进行中药在体 M-Act/Tox 联合评价具有重要意义^[5]。

淫羊藿为壮骨关节丸和仙灵骨葆制剂的君药,其肝损伤风险受到重视。箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim. 是小檗科淫羊藿属植物的干燥叶,是淫羊藿的基原植物之一,为传统补益类中药,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效^[13],其抗骨质疏松活性受到广泛关注,活性相关的代表性黄酮成分主要有朝藿定 A (EA)、朝藿定 B (EB)、朝藿定 C (EC)、箭藿苷 C (SC)、宝藿苷 I (BI)、淫羊藿苷等,具有抗骨质疏松等作用,其他成分还有淫羊藿新苷 C、淫羊藿新苷 D、淫羊藿新苷 E、箭叶淫羊藿素 E 等^[14]。箭叶淫羊藿的安全性及黄酮组分的代谢特点尚缺乏相关研究。本研究采用提出的斑马鱼 M-Act/Tox 联合法,评价箭叶淫羊藿的安全性、抗骨质疏松有效性及代谢特性,以期深入研究其毒/效物质基础提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

斑马鱼成鱼(南京大学模式动物研究所),来

自德国 Tuebingen 品系。

1.2 药品与试剂

箭叶淫羊藿药材由贵州同济堂制药有限公司提供,经江苏省中医药研究院国家中医药管理局中药释药系统重点研究室韦英杰研究员鉴定为箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.; EA (质量分数 98%, 批号 JZ16042502)、EB (质量分数 98%, 批号 JZ15110905)、EC (质量分数 98%, 批号 JZ16042503)、SC (质量分数 98%, 批号 JZ16071606)、BI (质量分数 98%, 批号 JZ15070602),购自南京景竹生物科技有限公司;淫羊藿苷(质量分数 98%, 批号 110737-200415),购自中国食品药品检定研究院;培养基母液: 0.29% NaCl、0.012 58% KCl、0.048 51% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.081 18% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 依替磷酸二钠(上海源叶生物科技有限公司, 批号 20180412); 泼尼松龙(质量分数 98%, 批号 FD050193, 萨斯化学技术上海有限公司); 多聚甲醛(成都市科龙化工试剂厂, 批号 20140901); MS-222 (比利时 Acros Organics 公司, 批号 A0288328)。

1.3 仪器

Nikon Aphaphot-2 YS2 显微镜(日本 Nikon 公司); SPX-80 生化培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂); Olympus stylus TG-4 相机(日本 Olympus 公司); Agilent 1200 型系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Organomation N-EVAP TM 112 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司); KQ3200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Mettler Toledo AB135-S 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

2 方法

2.1 箭叶淫羊藿中代表性黄酮成分 HPLC 分析

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 和 C_{18} 预柱(12.5 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈;

梯度洗脱程序: 0~10 min, 10%~23% B; 10~35 min, 23%~26% B; 35~65 min, 26%~48% B; 65~80 min, 48%~80% B; 80~85 min, 80%~100% B; 85~90 min, 100% B; 柱温 25 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 270 nm; 运行时间 90 min; 进样量 20 μL。分析箭叶淫羊藿 50%乙醇提取物经斑马鱼作用前后的 6 个代表黄酮成分, 分别为 EA、EB、EC、淫羊藿苷、SC、BI。

2.1.2 混合对照品的制备及线性关系考察 分别精密称取适量对照品淫羊藿苷、EA、EB、EC、SC 和 BI, 用甲醇溶解分别配制成 135.3、167.8、80.9、164.6、198.2、102.9 μg/mL, 再分别吸取适量混合, 甲醇定容, 配制成混合对照品, 质量浓度分别为 9.02、11.18、10.78、10.97、7.93、6.86 μg/mL。将上述混合对照品溶液依次倍比稀释, 得到系列质量浓度的混合对照品溶液, 按照“2.1.1”项条件进样测定。以峰面积值为纵坐标 (Y), 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得到回归方程及线性范围: EA, $Y=12.084X-2.201$ ($r=0.9998$), 线性范围 7.93~126.85 μg/mL; EB, $Y=10.748X-4.328$ ($r=0.9999$), 线性范围 18.53~296.44 μg/mL; EC, $Y=14.328X-9.431$ ($r=0.9999$), 线性范围 13.75~220.00 μg/mL; SC, $Y=16.925X-2.549$ ($r=0.9999$), 线性范围 4.30~68.80 μg/mL; BI, $Y=26.892X-2.655$ ($r=0.9999$), 线性范围 4.40~70.42 μg/mL (进样 2 μL)^[15]; 淫羊藿苷, $Y=0.06275X+0.4572$ ($r=0.9999$), 线性范围 3.288~350.700 μg/mL (进样 20 μL)^[16]。

2.2 斑马鱼模型评价箭叶淫羊藿的安全性

2.2.1 供试液配制 称取适当粉碎的箭叶淫羊藿 10 g, 加 10 倍量 50%乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 取相当于 10 mg 箭叶淫羊藿的提取液, 吹干, 加培养基 10 mL 溶解, 即得母液 (生药 1 mg/mL)。取母液适量, 用斑马鱼培养基配制成生药质量浓度分别为 200、500、1 000、1 500、2 000 μg/mL 的供试药液, 供斑马鱼毒性研究用。

2.2.2 斑马鱼给药 胚胎由斑马鱼成鱼自然交配产生, 将胚胎放置高纯水中在 28 ℃培养箱中培养 24 h。取受精后 1 d (1 dpf) 斑马鱼胚胎, 置 24 孔板中, 每孔 8 个胚胎, 每组 16 个胚胎, 分别暴露于不同质量浓度的供试液中, 每孔 2.0 mL 溶液, 用培养基为对照组。每天计数幼鱼死亡数量, 显微镜观察幼鱼的行态/形态, 并于 3 dpf 时拍照, 一直记录

到 6 dpf。

2.2.3 数据分析 利用数据统计软件 SPSS 16.0 计算 2~6 dpf 的斑马鱼半数死亡浓度 (LC_{50})。

2.3 斑马鱼模型评价箭叶淫羊藿的体外代谢

2.3.1 斑马鱼幼鱼 24 h 体外代谢给药与取样方法 取斑马鱼幼鱼 (5 dpf), 分别置于 6 孔板中, 每孔 30 条, 每组 2 孔。加入生药质量浓度为 250 μg/mL 的箭叶淫羊藿供试液, 每孔加药液 3 mL; 未加鱼的剩余药液为空白药物组。药物组于斑马鱼幼鱼暴露溶液后 24 h (即 6 dpf), 吸净每孔药液, 共 6 mL; 空白药物亦于 24 h 吸取 6 mL, 于 -70 ℃冰箱放置。

2.3.2 样品处理 将代谢药液、空白药物各 6 mL, 空气室温吹干, 残渣加 80%甲醇 0.5 mL 溶解, 15 000 r/min 离心 10 min, 上清进样 20 μL 进行 HPLC 分析。

2.4 斑马鱼模型评价箭叶淫羊藿抗骨质疏松活性

2.4.1 药物溶液的配制

(1) 泼尼松龙溶液配制: 精密称取泼尼松龙 9 mg, 加入 DMSO 1 mL, 混匀即得 25 mmol/L 泼尼松龙储备液, 取泼尼松龙储备液 10 μL, 用培养基稀释并定容至 10 mL, 即得。

(2) 含 25 μmol/L 泼尼松龙的 30 μg/mL 依替磷酸二钠溶液配制: 精密称取依替磷酸二钠 6 mg, 加入 1 mL 培养基混匀, 即得 6 mg/mL 依替磷酸二钠储备液。取 6 mg/mL 依替磷酸二钠储备液 50 μL 和 25 mmol/L 泼尼松龙储备液 10 μL, 用培养基稀释并定容至 10 mL, 即得。

(3) 箭叶淫羊藿供试液配制: 分别取箭叶淫羊藿 (生药 500 μg/mL) 供试液和 25 mmol/L 泼尼松龙储备液适量, 配制成含 25 μmol/L 泼尼松龙的箭叶淫羊藿 (生药 6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL) 溶液, 供斑马鱼药效实验研究。

2.4.2 斑马鱼分组与给药方法 将 3 dpf 的斑马鱼胚胎放入 24 孔板中, 每孔 8 个胚胎, 每组 16 个胚胎, 实验分组为 0.4% DMSO 溶媒对照组、模型组 (25 μmol/L 泼尼松龙)、阳性药物组 (30 μg/mL 依替磷酸二钠)、箭叶淫羊藿各质量浓度供试液组, 每孔加入药液 2 mL。将 24 孔板放入 28.5 ℃恒温培养箱中培养。培养周期 5 d, 隔天换 1 mL 新溶液, 培养至 8 dpf。

2.4.3 斑马鱼幼鱼的固定、骨骼染色与分析方法 斑马鱼幼鱼培养至 8 dpf, 用 4%多聚甲醛处死固定过夜后, 采用 1% KOH 配制含 1.5% H_2O_2 漂白剂, 将鱼体漂白后, 采用茜素红对斑马鱼幼鱼头部骨骼

染色, 最后用 1:1 的 1% KOH 和甘油的透明液透明, 去除多余的染色剂。用专业的图像分析软件 Image pro plus 6.0 计算头部骨骼染色面积和累积吸光度值。

2.4.4 数据分析 用 Excel 软件统计分析头部骨骼染色面积和累积吸光度值数据, 计算各组数据的平均值、标准偏差以及变异系数 ($n=5\sim6$), 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 箭叶淫羊藿的安全性评价

3.1.1 显微镜观察结果 3 dpf 时胚胎孵化成幼鱼, 各脏器发育基本完全, 鱼体透明, 在载玻片上易侧卧, 显微镜下检视脏器形态清楚、直观。本实验观察到箭叶淫羊藿对斑马鱼的毒性基本呈时间和浓度依赖性。对 3 dpf 斑马鱼胚胎及幼鱼进行动态检视, 并拍照。与对照组比较, 箭叶淫羊藿 200 $\mu\text{g/mL}$ 组部分幼鱼 (3 dpf) 卵黄囊略肿大, 500 $\mu\text{g/mL}$ 组幼鱼 (3 dpf) 卵黄囊明显肿大, 头颈弯曲, 眼睛变小, 呈明显中毒表现。结果见图 1。

3.1.2 死亡率结果 箭叶淫羊藿致斑马鱼的死亡数量与给药质量浓度和时间基本呈依赖性, 其给药

时间-剂量-死亡率关系见图 2。箭叶淫羊藿各质量浓度组中, 给药后 24 h, 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼幼鱼全部死亡; 给药 48 h, 1 000、1 500 $\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼幼鱼也全部死亡, 500 $\mu\text{g/mL}$ 组 50% 的斑马鱼幼鱼 (3 dpf) 死亡; 给药 72 h, 500 $\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼幼鱼全部死亡, 给药 96、120 h, 200 $\mu\text{g/mL}$ 组 25% 的斑马鱼幼鱼 (5、6 dpf) 死亡。

3.1.3 箭叶淫羊藿的 LC_{50} 用统计学软件 SPSS 16.0 计算出箭叶淫羊藿给药后 1~5 d (2~6 dpf) 的 LC_{50} (图 3)。从图中可以看出, 在斑马鱼 2 dpf 时 LC_{50} 值最高 (1 247.0 $\mu\text{g/mL}$), 随着给药时间的延长, LC_{50} 值逐渐降低, 提示毒性渐增, 在 5~6 dpf 时 LC_{50} 趋向稳定 (260.4 $\mu\text{g/mL}$)。

3.2 箭叶淫羊藿体外代谢的评价

箭叶淫羊藿作用斑马鱼 24 h 前后的 HPLC 图见图 4。以外标法计算 6 个主要淫羊藿黄酮成分质量分数, 并以每个成分占 6 个黄酮成分总质量分数的百分比计为相对百分含量, 结果见图 5。结果发现经斑马鱼代谢前 EA、EB、EC、淫羊藿苷、SC 和 BI 的相对百分含量分别为 25.6%、1.0%、8.5%、9.2%、26.9%、28.7%, 代谢后多糖苷 EA、EB、EC

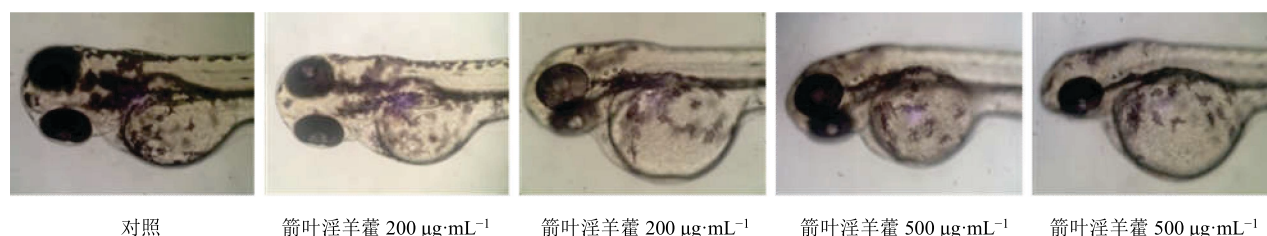


图 1 3 dpf 的斑马鱼幼鱼显微图 ($\times 100$)

Fig. 1 Micrograph of zebrafish larvae at 3 dpf ($\times 100$)

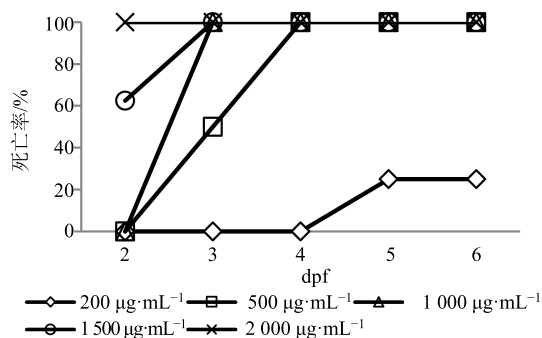


图 2 箭叶淫羊藿作用斑马鱼的给药时间-剂量-死亡率关系
Fig. 2 Effect of *E. sagittatum* on zebrafish mortality at different concentrations and time points

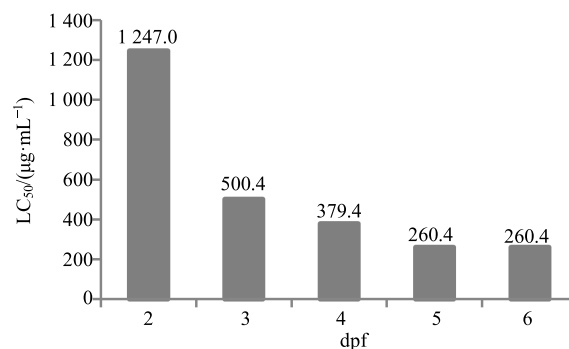


图 3 箭叶淫羊藿暴露斑马鱼后 6 dpf 的 LC_{50} 值
Fig. 3 Median lethal concentration of 6 dpf of zebrafish after exposure to *E. sagittatum*

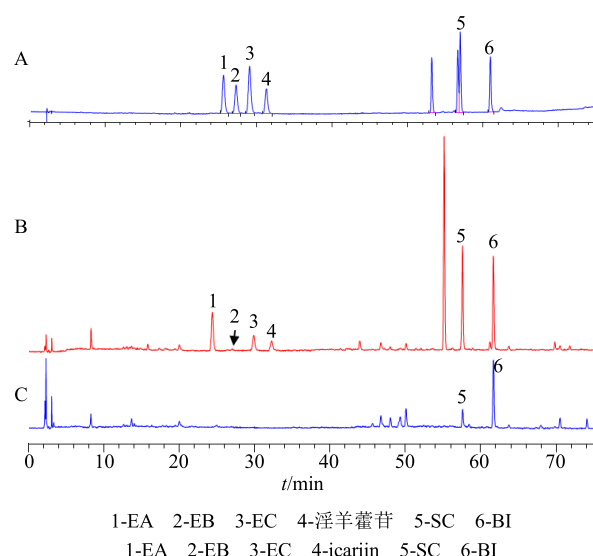


图4 6个黄酮混合对照品(A)及箭叶淫羊藿经斑马鱼作用24 h前(B)、后(C) HPLC图

Fig. 4 HPLC chromatogram of six flavonoids mixed standard (A) and *E. sagittatum* before (B) and after (C) exposing to zebrafish for 24 h

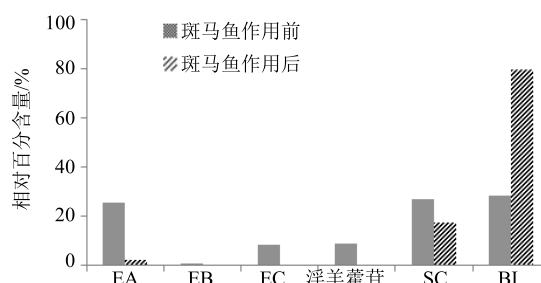
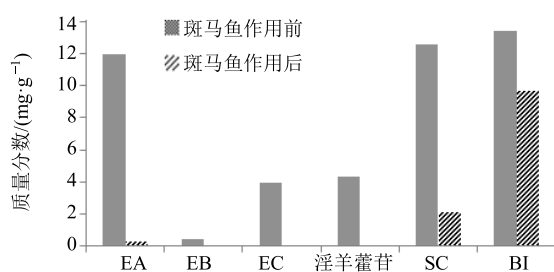


图5 箭叶淫羊藿经斑马鱼作用24 h前后6个黄酮成分测定结果

Fig. 5 Content of six flavonoids in *E. sagittatum* before and after exposing to zebrafish for 24 h

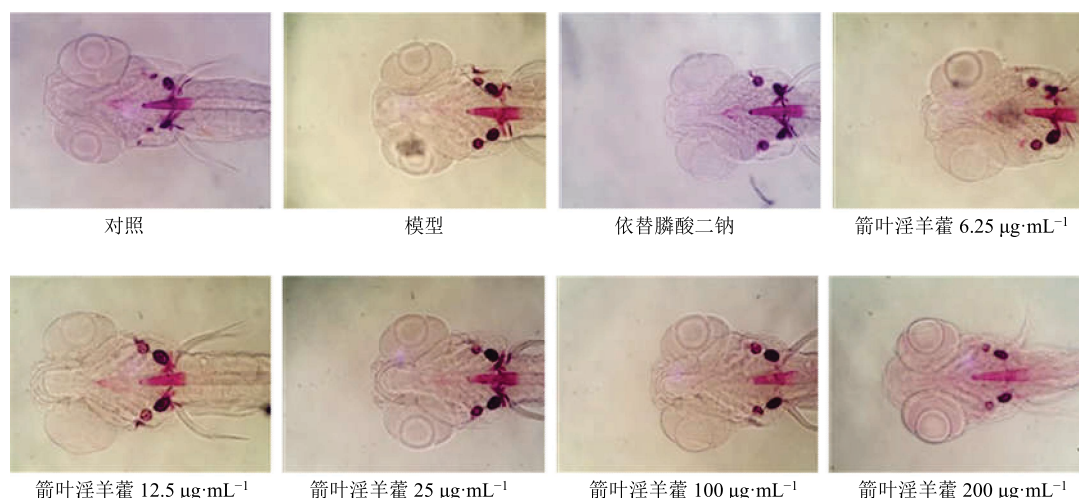


图6 斑马鱼幼鱼(8 dpf)头骨茜素红染色显微成像图(×100)

Fig. 6 Ventral view of alizarin red whole-mount preparations of zebrafish cranium (8 dpf, ×100)

和淫羊藿苷几乎全部转化成SC与BI,二者的相对百分含量分别为17.8%、79.8%,占代谢物的97.6%。

3.3 箭叶淫羊藿抗骨质疏松活性评价

各组斑马鱼幼鱼(8 dpf)头骨茜素红染色的显微成像结果见图6,图像分析软件分析结果见图7。与对照组相比,模型组的骨染色矿化面积和累积吸光度值明显降低,差异显著($P<0.05$ 、 0.01),表明泼尼松龙 $25\text{ }\mu\text{mol/L}$ 能够成功诱导斑马鱼骨量减少;与模型组比较,依替膦酸二钠 $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ 组矿化面积和累积吸光度值显著升高($P<0.01$)。箭叶淫羊藿 6.25 、 12.5 、 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼头骨矿化面积和累积吸光度值较模型组显著增加($P<0.05$ 、 0.001),但随着箭叶淫羊藿质量浓度进一步提高到 100 、 $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,斑马鱼的头骨矿化面积和累积吸光度值却呈下降趋势。

4 讨论

药物的效应/毒性产生与其在体内的代谢转化密切相关。斑马鱼幼鱼体小、透明,发育快速,于

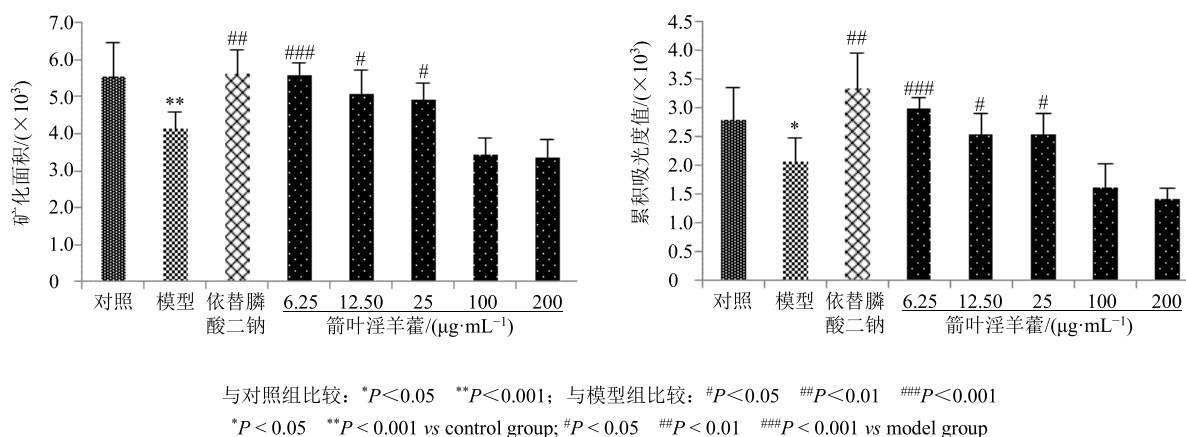


图 7 斑马鱼幼鱼 (8 dpf) 头骨茜素红染色面积和累积吸光度值 ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 7$)

Fig. 7 Stained area and cumulative optical density of alizarin red in zebrafish cranium (8 dpf, $\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 7$)

3 dpf 时孵化成幼鱼, 至 5 dpf 各种脏器基本发育完全, 具有较完善的代谢酶系和肠道菌群, 于 8~9 dpf 时头骨基本发育完全。可见, 本实验选择 1~8 dpf 斑马鱼可在微板中进行 M-Act/Tox 联合评价。

近年来淫羊藿的潜在毒性风险受到重视, 其抗骨质疏松主要活性成分黄酮的安全性及代谢至关重要。

斑马鱼毒性评价发现, 箭叶淫羊藿在 500 $\mu\text{g/mL}$ 及以上质量浓度时致斑马鱼中毒 (脏器变形或死亡), 毒性与给药质量浓度和时间相关。泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型评价发现, 低质量浓度箭叶淫羊藿 (6.25、12.50、25.00 $\mu\text{g/mL}$) 具有明显的抗泼尼松龙诱导斑马鱼骨丢失作用, 而在较高质量浓度 (100、200 $\mu\text{g/mL}$) 时抗骨质疏松作用则受到抑制, 这为安全、有效地使用淫羊藿提供参考。斑马鱼代谢实验发现, 箭叶淫羊藿中主要多糖基黄酮成分 EA、EB、EC 和淫羊藿苷经斑马鱼作用 24 h 后, 全部脱糖基转化为含有 2 个鼠李糖基的 SC 和 1 个鼠李糖基的 BI, 而 SC 和 BI 相对稳定, 提示代谢物可能是潜在致毒/致效的关键因素, 在前期研究中发现多糖苷 EA、EB 和淫羊藿苷对斑马鱼的毒性小, 以淫羊藿苷为代表, 发现其给予斑马鱼后动态转化为 BI, 但未见斑马鱼产生毒性; 而 EC 给予斑马鱼后, 动态转化为箭藿苷 C 后毒性增加^[6]。本研究亦提示斑马鱼的效应/毒性评价是基于代谢转化的在体过程。

斑马鱼 M-Act/Tox 联合评价法突破了现有体内、外模型无法兼顾三者与高效评价的技术瓶

颈, 具有样品用量小、劳动强度小、高效率、低成本、在体化、微板化等优点, 为高效辨识壮骨中药的 M-Act/Tox 提供思路与方法。

参考文献

- [1] 王伽伯, 肖小河, 杜晓曦, 等. 基于转化毒理学的中药肝损害客观辨识与早期诊断 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 5-9.
- [2] 唐进法, 王晓艳, 李伟霞, 等. 基于相关可视化的壮骨关节丸特异质肝损伤与 27 种细胞因子的相关性分析 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1624-1633.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 警惕壮骨关节丸引起的肝损害 [J]. 中国社区医师, 2009(8): 21.
- [4] CFDA. 警惕仙灵骨葆口服制剂引起的肝损伤风险 [J]. 上海医药, 2017, 38(1): 80.
- [5] 王 莱, 凌 洁, 陈 颖, 等. 基于斑马鱼 M-Act/Tox 一体化评价的抗骨质疏松中药高效筛选思路与方法 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4246-4250.
- [6] Li N, Felber K, Elks P, et al. Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation [J]. *Dev Dyn*, 2009, 238(2): 459-466.
- [7] 凌 洁, 王 莱, 陈 颖, 等. 基于斑马鱼毒/代同步进程法分析巴戟天配伍淫羊藿减毒作用 [J]. 药学报, 2018, 53(1): 74-83.
- [8] Fleming A, Sato M, Goldsmith P. High-throughput *in vivo* screening for bone anabolic compounds with zebrafish [J]. *J Biomol Screen*, 2005, 10(8): 823-831.
- [9] 赵冰洁, 章 丽, 袁嘉瑞, 等. 淫羊藿低糖苷组分对 UMR-106 细胞及骨质疏松斑马鱼作用的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3441-3446.
- [10] Bai H, Kong W W, Shao C L, et al. Zebrafish embryo

- toxicity microscale model for ichthyotoxicity evaluation of marine natural products [J]. *Mar Biotechnol*, 2016, 4(18): 264-270.
- [11] 陈颖, 王 茉, 景莉君, 等. 基于斑马鱼模型的壮骨关节丸毒性药味高效筛选 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(1): 133-141.
- [12] 刘 静, 张靖溥, 孟 杰, 等. 骨刺片对斑马鱼胚胎发育的急性毒性研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(10): 1804-1809.
- [13] 韩 惠, 单 淇, 周福军, 等. 箭叶淫羊藿中化学成分及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 269-273.
- [14] 王焕珍, 柴艺汇, 陈云志, 等. 淫羊藿化学成分与药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(7): 63-65.
- [15] 徐忠坤, 殷洪梅, 李 芳, 等. 淫羊藿总黄酮胶囊中黄酮类成分含量测定及抗骨质疏松活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(15): 3140-3144.
- [16] 夏爱军, 黄河舟, 高 岗, 等. HPLC 法同时测定淫羊藿药材中的 5 个黄酮类成分 [J]. 药学实践杂志, 2009, 27(4): 284-285.