

山豆根黄酮类成分对斑马鱼的急性毒性研究

袁文琳¹, 黄峥蕊², 肖思佳¹, 张卫东^{1*}, 沈云亨^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)药学院, 上海 200433

2. 西安理工大学 应用化学系, 陕西 西安 710048

摘要:目的 利用体外细胞毒模型结合模式生物斑马鱼急性毒性模型, 筛选和评价山豆根提取物、组分及重要单体成分的细胞毒性及对斑马鱼的急性毒性, 以期发现山豆根潜在的毒性成分。方法 考察山豆根提取物、组分及主要单体成分对人心肌细胞 AC16、人正常肝细胞 L-02、人肾小管上皮细胞 HK-2 和人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 的毒性, 筛选山豆根中具有较强细胞毒性的组分及主要单体成分, 评价其对模式生物斑马鱼的急性毒性, 计算斑马鱼的最大非致死浓度(maximum non-lethal concentration, MNLC)、10%致死浓度(10% lethal concentration, LC₁₀)和半数致死浓度(half lethal concentration, LC₅₀)。给予山豆根酮(1/9 MNLC、1/3 MNLC、MNLC、LC₁₀)进行干预, 观察斑马鱼器官形态学结构的畸形变化、运动情况的异常变化和死亡数量等毒性表型, 计算畸形变化率, 并考察斑马鱼肝脏组织病理变化。结果 山豆根酮对 AC16、L-02、HK-2 和 SH-SY5Y 细胞均具有较强的细胞毒性; 在斑马鱼急性毒性模型中, 山豆根酮组斑马鱼毒性明显, 主要表现为肝毒性、神经毒性、心血管毒性、肾毒性等, 其中肝毒性在各剂量下均表现明显, 且肝脏组织病理切片显示山豆根酮可诱发斑马鱼肝脏损伤, 表明肝脏可能为山豆根酮的主要毒性靶器官。结论 山豆根酮为山豆根潜在的毒性成分之一。

关键词: 山豆根; 黄酮; 山豆根酮; 斑马鱼; 急性毒性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)10-2978-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.014

Acute toxicity study of flavonoids from *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* on zebrafish

YUAN Wen-lin¹, HUANG Zheng-rui², XIAO Si-jia¹, ZHANG Wei-dong¹, SHEN Yun-heng¹

1. Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Applied Chemistry, Xi'an University of Technology, Xi'an 710048, China

Abstract: Objective To screen and evaluate cytotoxicity of extracts, components and important monomer components of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* in cytotoxicity model and acute toxicity on model organism zebrafish acute toxicity model, to discover the potential toxic components of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*. **Methods** Toxicity of extracts, components and important monomer components of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* on human cardiomyocyte AC16, human normal hepatocyte L-02, human renal tubular epithelial cell HK-2 and human neuroblastoma cell SH-SY5Y were investigated. Strong cytotoxic components and main monomer components in *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* were screened, acute toxicity to the model organism zebrafish were evaluated, maximum non-lethal concentration (MNLC) of zebrafish, 10% lethal concentration (LC₁₀) and half lethal concentration (LC₅₀) were calculated. Sophoranone (1/9 MNLC, 1/3 MNLC, MNLC, LC₁₀) were used to intervene, abnormal changes in zebrafish organ morphology, abnormal changes in movement, and number of deaths and other toxic phenotypes were observed, abnormal changes rate and pathological changes of liver tissue were evaluated. **Results** Sophoranone had strong cytotoxicity to AC16 cells, L-02 cells, HK-2 cells and SH-SY5Y4 cells; Toxic phenotype of zebrafish in sophoranone

收稿日期: 2020-12-02

基金项目: 国家重点研发计划课题(2017YFC1702002)

作者简介: 袁文琳(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: yuanwenlin@163.com

*通信作者: 张卫东, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础和创新药物。Tel: (021)81871244 E-mail: wdzhangy@hotmail.com
沈云亨, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为天然药物化学。

group was obvious in acute toxicity model of zebrafish, mainly manifested as hepatotoxicity, neurotoxicity, cardiovascular toxicity, nephrotoxicity, among which hepatotoxicity was obvious at each dose, and histopathological slices of liver showed that sophoranone induced zebrafish liver damage, indicating that liver may be the main toxic target organs of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*.

Conclusion Sophoranone is one of the potential toxic components of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*.

Key words: *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*; flavonoid; sophoranone; zebrafish; acute toxicity

山豆根又名广豆根、越南槐根,是豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep.的干燥根和根茎,具有清热解毒、消肿利咽的功效,临床用于治疗火毒蕴结、乳蛾喉痹、咽喉肿痛、齿龈肿痛、口舌生疮等症状^[1-2]。山豆根入药的中药制剂如桂林西瓜霜、清咽润喉丸、清膈丸等均收录于《中国药典》,山豆根对肝炎、哮喘、慢性支气管炎和咽喉肿痛具有较好的治疗效果^[1-4]。然而山豆根临床不良反应报道时有发生^[5-7],《中国药典》1985年版首次记载山豆根有毒,山豆根毒性反应涉及体内多个系统-器官,可引起肝脏损伤、神经毒性、心血管系统损害、胃肠道反应、皮肤过敏反应等^[7-10]。山豆根含有生物碱类、黄酮类、三萜类、多糖、有机酸等多种化学成分,以生物碱和黄酮类成分为主,代表性成分包括苦参碱、氧化苦参碱、马卡因、山豆根酮等^[11-15]。对于山豆根毒性物质基础的研究,多集中于《中国药典》含量测定限定的苦参碱和氧化苦参碱^[16],及其他含量较高的生物碱类成分^[17-18],对黄酮类等非生物碱类成分毒性研究较少。上海中医药大学安全评价中心研究发现,不同活性组分可能具有不同毒性,山豆根乙醇提取物对斑马鱼模型具有肝毒性,正丁醇、二氯甲烷部位有心血管毒性和肝毒性,且对小鼠的毒性研究中观察到肝毒性^[19]。课题组前期研究发现,山豆根70%乙醇提取物中含有大量黄酮类成分,能够对SD大鼠产生明显肝脏损伤。山豆根毒性成分不仅包括生物碱类,黄酮类成分也可能是毒性成分之一,目前对于山豆根黄酮类单体成分的毒性报道极少,进一步探究山豆根毒性成分对其安全合理用药尤为重要。

本研究通过人心肌细胞 AC16、人正常肝细胞 L-02、人肾小管上皮细胞 HK-2 和人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 毒性实验,对山豆根提取物、组分及主要单体成分逐步进行筛选,确定山豆根提取物主要的细胞毒组分,鉴定细胞毒组分中主要的化学成分,评价细胞毒组分中主要成分的细胞毒性;再进一步利用斑马鱼急性毒性模型,对鉴定的细胞毒成分进行急性毒性评价。

1 材料

1.1 细胞

AC16、L-02、HK-2 和 SH-SY5Y 细胞购自美国 ATCC。

1.2 动物

野生 AB 品系斑马鱼购自杭州环特生物科技股份有限公司,动物许可证号 SYXK(浙)2012-0171。斑马鱼用(28±0.5)℃养鱼用水(每升反渗透水含 200 mg 速溶海盐、50~100 mg/L CaCO₃、pH 6.5~8.5、电导率 450~550 μs/cm),于(28±2)℃生化培养箱中培养。使用受精后 2 d(2 dpf)的斑马鱼进行实验,动物实验经动物实验管理委员会批准(批准号 001458)。

1.3 药材

山豆根(批号 20190305,产地为广西靖西县)购自广西宏程药业有限公司,经海军军医大学药学院沈云亨副教授鉴定为豆科植物越南槐 *S. tonkinensis* Gagnep.的干燥根,山豆根中苦参碱和氧化苦参碱总质量分数为 1.82%,符合《中国药典》2020年版规定^[1]。药材标本(20190305-SDG)保存于海军军医大学药学院天然药物化学教研室。

1.4 药品与试剂

对照品苦参碱(批号 drk-0448-930730)、氧化苦参碱(批号 drk-0453-930327)、马卡因(批号 drk-0341-940422)购自成都德锐可生物科技有限公司,质量分数均为 98%;山豆根酮对照品(批号 S0304AS,质量分数为 98%)购自大连美伦生物技术有限公司;二甲基亚砜(DMSO,批号 USP6F1S)购自德国 WAK-Chemie Medical GmbH 公司;甲基纤维素(批号 079K0054V)美国 Sigma 公司;分析纯无水乙醇、甲醇购自上海润捷化学试剂有限公司;DMEM 培养基(批号 C11995500CP)、PBS 缓冲液(批号 10010-023)、RPMI 1640(批号 C11995500BT)购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(批号 10099-141)购自美国 Hyclone 公司;牛血清白蛋白(批号 wxbc6759v)、0.05%胰酶-EDTA(批号 25300-054)购自美国 Life Technologies 公司;Cell Titer Glo 试

剂(批号 0000350448)购自美国 Promega 公司; 4% 多聚甲醛购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 二甲苯购自上海麦克林生化科技有限公司; 苏木素-伊红(HE)染色液购自上海依赫生物科技有限公司。

1.5 仪器

96 孔细胞培养板、细胞培养皿、75 cm² 细胞培养瓶(美国 Coning 公司); 6 孔板(无锡耐思生命科技股份有限公司); CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LDZX 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂); 多功能检测仪(美国 Bio Tek 公司); HFsafe-1200LC 型生物安全柜(上海力新仪器有限公司); Boxun 超净工作台、SPX-250B-Z 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); SZX7 型解剖显微镜(日本 Olympus 公司); CCD 相机(上海土森视觉科技有限公司); CP214 型精密电子天平(中国 OHAUS 公司)。

2 方法

2.1 山豆根提取物的制备

2.1.1 山豆根水提物(SDG-SJ)的制备 取 1 kg 干燥粉碎的山豆根药材, 加入 6 倍量水, 浸泡 30 min, 加热煮沸后, 煎煮 1 h, 滤过; 药渣加入 6 倍量水, 重复煎煮 1 次, 滤过, 合并 2 次滤液, 真空减压浓缩得到 0.47 kg 浸膏, 于低温真空干燥箱干燥得到 0.16 kg 干浸膏, 粉碎后得到 0.15 kg SDG-SJ。

2.1.2 山豆根醇提物(SDG-Et)的制备 取 1 kg 干燥粉碎的山豆根药材, 加入 70% 乙醇, 浸泡 30 min, 加热回流提取 1 h, 提取 2 次, 合并 2 次提取液, 真空减压浓缩后, 于真空低温干燥箱干燥得到浸膏, 粉碎后得到 0.14 kg SDG-Et。

2.1.3 SDG-Et 洗脱组分的制备 取 100 g SDG-Et, 以 70% 乙醇溶解, 分批加入 400 g MCI 凝胶树脂中拌样, 挥干溶剂后, 装入上样柱。取 2 kg MCI 凝胶树脂, 甲醇浸泡 1 h, 搅拌均匀, 加入 460 mm×70 mm 中压柱, 待 MCI 树脂沉降均匀后, 以超纯水替换树脂中的甲醇溶剂, 和上样柱连接, 以 Buchi 中压液相色谱仪进行中压柱色谱, 分别以 10 倍柱体积水、40% 甲醇、70% 甲醇、100% 甲醇进行柱色谱, 分别收集各部位洗脱液, 以旋转蒸发器真空浓缩干燥, 分别得到 82.88 g 水洗脱组分(SDG-SX)、30.83 g 40% 甲醇洗脱组分(SDG-40X)、14.24 g 70% 甲醇洗脱组分(SDG-70X)和 12.44 g 甲醇洗脱组分(SDG-100X)。

2.2 山豆根提取物对 AC16、L-02、HK-2 和 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 分别取处于对数生长期的 AC16、L-02、HK-2 和 SH-SY5Y 细胞, 以 2×10^3 /孔接种于 96 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。分别精密称取 SDG-SJ 和 SDG-Et, 以 DMSO 溶解配制成质量浓度为 100 μg/mL 的溶液, 分别精密称取 SDG-SX、SDG-40X、SDG-70X 和 SDG-100X, 以 DMSO 溶解配制成质量浓度为 50 μg/mL 的溶液。设置对照组、SDG-SJ 组、SDG-Et 组、SDG-SX 组、SDG-40X 组、SDG-70X 组和 SDG-100X 组, 各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 72 h, 加入 100 μL Cell Titer Glo 试剂, 37 °C 避光振荡 10 min, 采用多功能检测仪于 490 nm 检测吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 SDG-100X 主要化学成分的鉴定

精密称取马卡因 2.84 mg 和山豆根酮 4.60 mg, 加入 1 mL DMSO 超声溶解, 混匀, 配制成混合对照品溶液。采用高效液相色谱(HPLC)对 SDG-100X 的主要化学成分进行表征^[20]。

2.4 苦参碱、氧化苦参碱、马卡因和山豆根酮对 AC16、L-02、HK-2 和 SH-SY5Y 细胞活力的影响

分别精密称取苦参碱 2.48 mg、氧化苦参碱 2.64 mg、马卡因 2.84 mg、山豆根酮 4.60 mg, 加入 1 mL DMSO 超声溶解, 摇匀, 配制成 10 mmol/L 储备液, 于 -20 °C 保存, 使用前以 DMEM 稀释。按“2.2”项下方法处理细胞, 检测 A 值, 计算细胞存活率。

2.5 山豆根酮对斑马鱼的急性毒性评价

2.5.1 最大非致死浓度(maximum non-lethal concentration, MNLC)、10%致死浓度(10% lethal concentration, LC₁₀)和半数致死浓度(half lethal concentration, LC₅₀)的测定 随机选取 240 尾 2 dpf 斑马鱼于 6 孔板中, 设置对照组、溶媒组和山豆根酮(2.32、6.95、20.85、33.25、108.55、217.10 μmol/L)组, 每组 30 尾。精密称取山豆根酮 4.60 mg, 加入 1 mL DMSO 超声使溶解, 摇匀, 配制成 10 mmol/L 储备液, 于 -20 °C 保存, 使用时以标准稀释水(含 1% DMSO)稀释。各给药组加入 3 mL 相应药物, 对照组加入标准稀释水, 溶媒组加入 1% DMSO 溶液, 于 (28±2) °C 生化培养箱中培养 72 h。每天统计并及时移除死亡斑马鱼, 记录各组斑马鱼死亡数

量和毒性情况,采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件绘制斑马鱼“浓度-死亡率”效应曲线,计算山豆根酮对斑马鱼的 MNLC、LC₁₀ 和 LC₅₀。

2.5.2 急性毒性实验 随机选取 180 尾 2 dpf 斑马鱼于 6 孔板中,设置对照组、溶媒组和山豆根酮(1/9 MNLC、1/3 MNLC、LC₁₀、LC₅₀) 组,每组 30 尾。各给药组加入 3 mL 相应药物,对照组加入标准稀释水,溶媒组加入 1% DMSO 溶液,于 (28±2) °C 生化培养箱中培养 72 h。每天于显微镜下观察并记录斑马鱼毒性发生情况,移除死亡斑马鱼。给药结束后,于显微镜下拍照并记录斑马鱼器官与组织情况,计算心脏、脑部、眼、肝脏、肾脏、躯干/尾/脊索、运动能力等毒性发生率。

2.5.3 斑马鱼肝脏组织病理变化 给药结束后,斑马鱼麻醉,用 4% 多聚甲醛处死,固定过夜,进行脱水、石蜡包埋、切片,采用 HE 染色,于显微镜

下观察斑马鱼肝脏组织病理变化。

2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.1 和 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,两组比较采用非配对 *t* 检验或单因素方差分析。

3 结果

3.1 山豆根提取物对 AC16、L-02、HK-2 和 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

如图 1 所示,与对照组比较,各给药组 AC16、HK-2 细胞存活率均显著降低 ($P < 0.001$),SDG-SJ、SDG-40X、SDG-70X 和 SDG-100X 组 SH-SY5Y 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05、0.01、0.001$),SDG-SJ 和 SDG-40X 组 L-02 细胞存活率显著升高 ($P < 0.001$),SDG-SX 和 SDG-100X 组 L-02 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05、0.001$),表明 SDG-100X 对细胞的毒性最强。

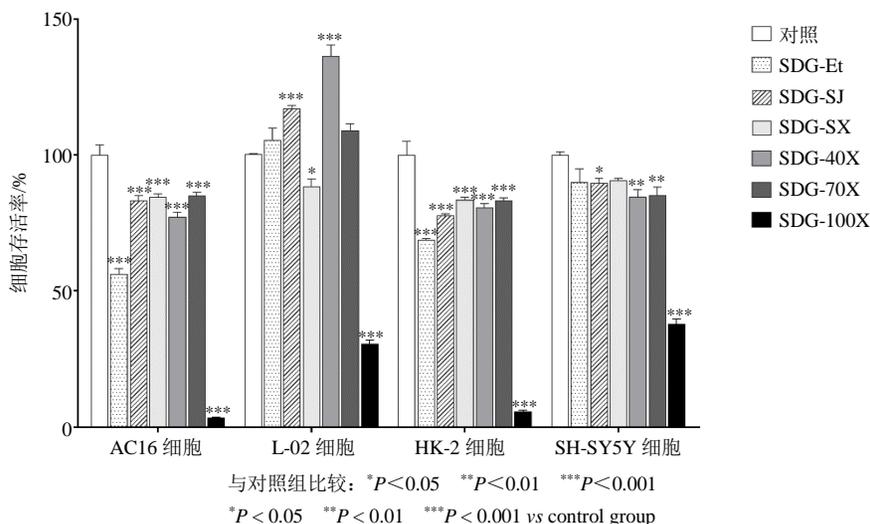


图 1 山豆根提取物对 AC16、L-02、HK-2 和 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of extracts of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* on survival rate on AC16, L-02, HK-2, and SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 SDG-100X 主要化学成分鉴定

如图 2 所示,SDG-Et 无生物碱成分,马卡因和山豆根酮 2 个黄酮类成分质量分数最高,分别为 5.46%、8.03%,是山豆根主要的黄酮类成分。苦参碱和氧化苦参碱为山豆根药材药典规定的质量控制成分,且为潜在的毒性成分。因此,选择苦参碱、氧化苦参碱、马卡因和山豆根酮 4 个成分作为山豆根代表性成分进行细胞毒性筛选。

3.3 苦参碱、氧化苦参碱、马卡因和山豆根酮对 AC16、L-02、HK-2 和 SH-SY5Y 细胞活力的影响

如图 3 所示,苦参碱、氧化苦参碱、马卡因和

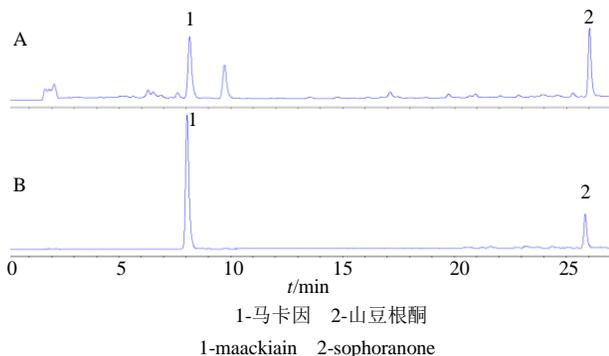


图 2 SDG-100X (A) 和混合对照品溶液 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of SDG-100X (A) and mixed standards solution (B)

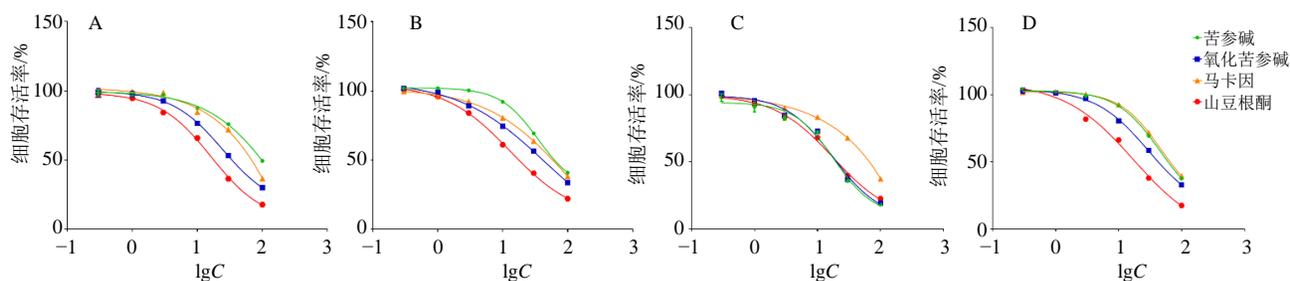


图 3 苦参碱、氧化苦参碱、马卡因和山豆根酮对 AC16 (A)、L-02 (B)、HK-2 (B) 和 SH-SY5Y (D) 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of matrine, oxymatrine, maackiain, and sophoranone on cell viability of AC16 (A), L-02 (B), HK-2 (C), and SH-SY5Y (D) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

山豆根酮抑制 AC16、L-02、HK-2 和 SH-SY5Y 细胞活力，呈剂量相关性，山豆根酮对 4 种细胞毒性均较强，因此后续选择山豆根酮进行斑马鱼急性毒性研究。

3.4 山豆根酮对斑马鱼的 MNLC、LC₁₀ 和 LC₅₀

如表 1 所示，给予山豆根酮(2.32、6.95 μmol/L) 72 h，无斑马鱼死亡；给予山豆根酮(20.85、33.25、108.55、217.10 μmol/L) 72 h，分别有 12、27、30、30 尾斑马鱼死亡。采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件拟合，如图 4 所示，山豆根酮对斑马鱼的 MNLC、LC₁₀ 和 LC₅₀ 分别为 11.59、15.57、22.45 μmol/L。

表 1 山豆根酮对斑马鱼的死亡率

Table 1 Mortality rate of sophoranone on zebrafish

组别	浓度/ (μmol·L ⁻¹)	死亡数/尾			死亡率/%
		24 h	48 h	72 h	
对照	—	0	0	0	0
溶媒	—	0	0	0	0
山豆根酮	2.32	0	0	0	0
	6.95	0	0	0	0
	20.85	0	0	12	40
	33.25	0	0	27	90
	108.55	0	8	22	100
	217.10	0	28	2	100

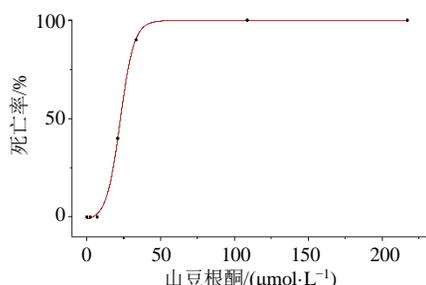


图 4 山豆根酮对斑马鱼的“浓度-死亡率”曲线

Fig. 4 “Concentration-mortality rate” curve of sophoranone on zebrafish

3.5 山豆根酮对斑马鱼的急性毒性

如表 2 和图 5 所示，对照组和溶媒组斑马鱼卵黄囊基本吸收完全，各脏器均未出现明显毒性表型，运动无明显异常；山豆根酮(1/9 MNLC、1/3 MNLC、LC₁₀) 组斑马鱼均未出现死亡，山豆根酮(LC₅₀) 组 2 尾斑马鱼死亡；各剂量山豆根酮组均表现出肝毒性；山豆根酮(1/9 MNLC) 组 4 尾斑马鱼卵黄囊吸收延迟；山豆根酮(1/3 MNLC) 组 3 尾斑马鱼肝脏肿大，6 尾斑马鱼卵黄囊吸收延迟；山豆根酮(LC₁₀) 组 10 尾斑马鱼肝脏肿大，1 尾斑马鱼肝变性，17 尾斑马鱼卵黄囊吸收；山豆根酮(LC₅₀) 组 15 尾斑马鱼肝脏肿大，2 尾斑马鱼肝变性，28 尾斑马鱼卵黄囊吸收延迟；山豆根酮(LC₁₀、LC₅₀) 组均出现心脏毒性，山豆根酮(LC₁₀) 组 4 尾斑马鱼心跳减慢，山豆根酮(LC₅₀) 组 8 尾斑马鱼心包水肿、27 尾斑马鱼心跳减慢；山豆根酮(LC₁₀、LC₅₀) 组斑马鱼躯干弯曲，可见运动频率加快、运动轨迹异常等行为异常，表现出神经毒性。

综上，山豆根酮致斑马鱼神经毒性表型中行为异常出现浓度为 11.59 μmol/L；肝脏毒性表型中卵黄囊吸收延迟出现浓度为 1.29 μmol/L，肝肿大出现浓度为 3.86 μmol/L；心血管毒性表型中心跳减慢、血流减慢和循环缺失均为 11.59 μmol/L，心包水肿为 15.57 μmol/L；肾脏水肿表型出现浓度为 15.57 μmol/L；肠道发育异常出现浓度均为 1.29 μmol/L。除上述毒性表型外，各剂量山豆根酮组对斑马鱼其他组织器官均未观察到毒性反应。以上数据表明山豆根酮可能具有潜在肝毒性、心脏毒性、肾毒性、神经性和其他毒性。

3.6 山豆根酮对斑马鱼的肝脏毒性

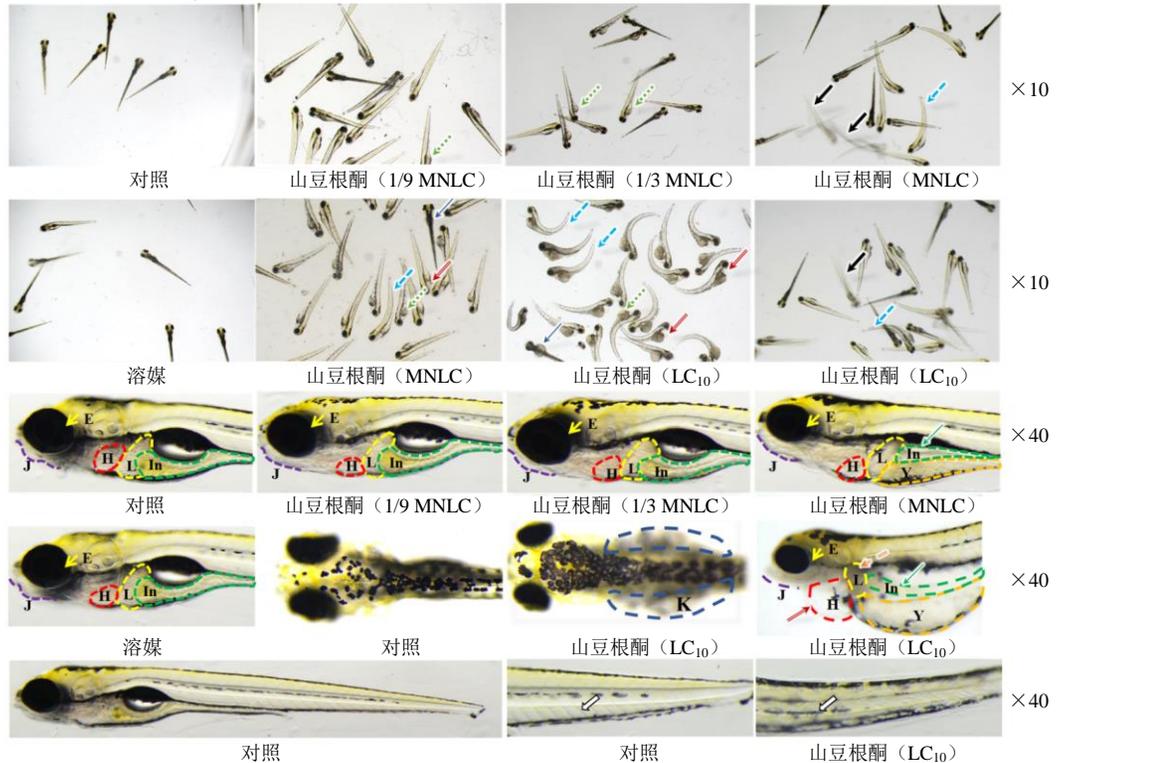
如图 6 所示，对照组斑马鱼肝脏细胞轮廓清晰，未见肝脏肿大和空泡，细胞质分布均匀，细胞核大

表 2 山豆根酮对斑马鱼的急性毒性发生率
Table 2 Acute toxicity rate of sophoranone on zebrafish

毒性表型类别		毒性发生率/%					
		对照	溶媒	山豆根酮 (1/9 MNLC)	山豆根酮 (1/3 MNLC)	山豆根酮 (LC ₁₀)	山豆根酮 (LC ₅₀)
心脏	心包水肿	—	—	—	—	—	28.6
	心律异常	—	—	—	—	13.3	96.4
循环系统	血流减慢	—	—	—	—	6.7	14.3
	循环缺失	—	—	—	—	13.3	14.3
出血及血栓		—	—	—	—	—	—
脑	畸形	—	—	—	—	—	—
下颌	异常	—	—	—	—	—	—
眼睛	眼变小	—	—	—	—	—	—
肝脏	缺失	—	—	—	—	—	—
	肝肿大	—	—	—	10.0	33.3	53.6
	肝变性	—	—	—	—	3.3	7.1
	卵黄囊吸收延迟	—	—	13.3	20.0	56.7	100.0
肾脏	水肿	—	—	—	—	—	17.9
肠道	肠腔异常	—	—	13.3	26.7	43.3	100.0
躯干/尾/脊索	弯曲	—	—	—	—	10.0	21.4
肌肉/体节	肌肉变性	—	—	—	—	—	7.1
身体着色	异常	—	—	—	—	—	—
运动能力	侧翻	—	—	—	—	—	—
	行为异常	—	—	—	—	100.0	100.0
体长变短		—	—	—	—	—	—
死亡		—	—	—	—	—	6.7

“—”表示未见异常

“—” means there is no abnormality



J-下颌 E-眼睛 H-心脏 L-肝脏 Y-卵黄囊 In-肠道 K-肾包膜水肿 → 心包水肿 → 卵黄囊 → 肝变性 → 肾包膜水肿 → 躯干弯曲 → 运动异常 → 肠腔异常 ⇨ 肌肉变性
J-mandible E-eyes H-heart L-liver Y-yolk sac In-intestine K-renal capsule edema → pericardial edema → yolk sac → hepatic degeneration → renal capsule edema → torso bent → abnormal movement → abnormal intestinal cavity ⇨ muscle degeneration

图 5 山豆根酮对斑马鱼的毒性典型表型图

Fig. 5 Typical toxicity phenotype of sophoranone on zebrafish

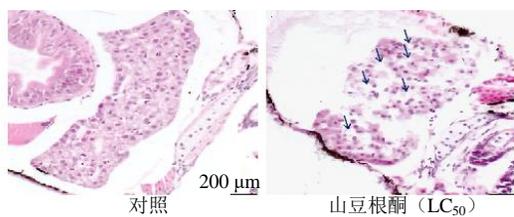


图6 山豆根酮对斑马鱼肝脏病理变化的影响 (HE, ×200)
Fig. 6 Effect of sophoranone on liver histological change in zebrafish (HE, ×200)

小形态规则、相互交错；与对照组相比，山豆根酮 (LC₅₀) 组肝脏细胞肿大，可见明显脂肪样空泡，但无明显炎症浸润，表明山豆根酮 (LC₅₀) 可诱发斑马鱼肝毒性。

4 讨论

山豆根为常用有毒中药材，其生物碱类成分如苦参碱和氧化苦参碱是山豆根的有效成分和潜在的毒性成分。然而，近年来研究表明山豆根的非生物碱类成分，尤其是黄酮类成分，有可能也是其潜在的毒性成分之一。山豆根中含有大量的黄酮类成分，尤其黄酮类的代表性成分如马卡因、山豆根酮在山豆根中含量较高，因此筛选并评价黄酮类成分的毒性尤为重要。目前对于药物毒性评价研究，主要有以细胞为代表的体外模型和以哺乳动物为代表的体内评价模型。体外细胞模型用于毒性成分快速、高效的初步筛选，已被广泛认可，但由于毒性作用的复杂性，体外筛选的结果需要进一步的体内毒性研究验证。斑马鱼作为一种新型模式动物，其与人类87%的基因组序列高度相似^[21]，相比哺乳动物，斑马鱼具有体透明易观察、用药少、易操作、周期短等特有优势，逐渐被广泛应用^[22-23]。近年来模式生物斑马鱼对药物在体内肝毒性^[22,24]、肾毒性^[25]、神经毒性^[26-27]、心脏毒性^[27-28]等早期毒理学评价中应用较广，因其具备细胞模型高通量筛选的优势，且兼顾体内动物模型近似人的整体生物反应特点，日益被认可^[29-30]。基于斑马鱼模型的中药毒性研究有助于快速得到宏观毒性靶器官、靶组织，便捷地阐明毒性机制^[23-24,30-32]。

为追踪鉴定山豆根潜在的毒性成分，本研究从提取物-组分入手，进行体外细胞毒性模型初步筛选，发现SDG-SJ和SDG-Et均可提高L-02细胞存活率，表明SDG-SJ和SDG-Et具有一定的肝保护作用；SDG-Et对AC16、HK-2和SH-SY5Y细胞存活率的抑制作用比SDG-SJ强。前期研究发现，70%乙醇对山豆根药材中的化学成分提取较完全，包括

水溶性大极性成分和脂溶性小极性成分，而水煎煮提取物中的化学成分主要为水溶性大极性成分，脂溶性小极性成分较少。结合本研究结果，推测山豆根中的毒性成分可能为脂溶性小极性成分，表明了传统中药采用水煎的合理性。SDG-Et的4个组分对AC16、L-02、HK-2和SH-SY5Y细胞毒性实验中，SDG-100X对L-02细胞存活率的抑制作用大于SDG-SX，SDG-40X和SDG-70X可提高L-02细胞存活率，表明SDG-40X和SDG-70X具有一定的肝保护作用，且前期研究发现山豆根生物碱类成分主要集中于SDG-40X，与文献报道中的山豆根药材生物碱类为治疗肝炎的主要活性成分相符^[33-34]。各组分对AC16、HK-2和SH-SY5Y细胞存活率均具有一定的抑制作用，表明山豆根生物碱部位和非生物碱部位均可能是潜在的毒性部位，其中SDG-100X对4种细胞存活率的抑制作用最强，推测其可能为主要的毒性部位，表明山豆根中的脂溶性小极性成分可能是山豆根潜在的毒性成分。分析SDG-100X的化学成分，发现黄酮类成分马卡因和山豆根酮是其含量最高的成分。

苦参碱和氧化苦参碱是山豆根的主要有效成分，也是山豆根可能的毒性成分。本研究选择SDG-100X中的主要成分马卡因、山豆根酮以及山豆根主要生物碱类成分苦参碱、氧化苦参碱，考察其细胞毒性，结果显示，山豆根酮对HK-2细胞活力的抑制作用与苦参碱、氧化苦参碱相近，对AC16、L-02和SH-SY5Y细胞活力的抑制作用强于苦参碱和氧化苦参碱，表明山豆根酮也可能是山豆根的潜在毒性成分。基于山豆根4个主要成分的细胞毒性筛选结果，选择山豆根酮展开斑马鱼体内急性毒性研究，发现山豆根酮组斑马鱼毒性表型明显，主要表现为神经毒性（行为异常、躯干弯曲）、肝脏毒性（卵黄囊吸收延迟、肝脏细胞肿大及脂肪样空泡、肝肿大）、心血管毒性（心包水肿、心跳减慢、血流减慢、循环缺失）、肾脏毒性（肾脏水肿）和肠道发育异常。

综上所述，本研究结合山豆根提取物-组分-单体成分的体外细胞模型毒性筛选结果，利用斑马鱼模型对山豆根黄酮类成分山豆根酮的急性毒性进行评价，发现山豆根酮能够诱导斑马鱼肝毒性的发生，并伴有神经毒性、心血管毒性等表现，为山豆根毒性物质基础的进一步明确提供了数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 28-29.
- [2] 周思雨, 陈金鹏, 刘志东, 等. 山豆根的化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1510-1521.
- [3] Jang S M, Bae S H, Choi W K, *et al.* Pharmacokinetic properties of trifolirhizin, (-)-maackiain, (-)-sophoranone and 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran after intravenous and oral administration of *Sophora tonkinensis* extract in rats [J]. *Xenobiotica*, 2015, 45(12): 1092-1104.
- [4] Sasajima M, Nakane S, Saziki R, *et al.* Studies on the anti-ulcer effects of isoprenyl flavonoids (1). The anti-ulcer effects of isoprenyl chalcone extracted from *Sophora subprostrata* (author's transl) [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 1978, 74(8): 897-905.
- [5] 张明武. 山豆根毒性的临床观察—附中毒病例 34 例 [J]. 新中医, 1988, 20(5): 55.
- [6] 王兴远, 张维明. 群体性急性山豆根中毒的救治体会 (附 56 例报告) [J]. 华西医学, 2009, 24(8): 2036-2038.
- [7] 杨雪, 夏东胜, 高建超, 等. 578 例山豆根不良反应文献分析 [J]. 中国药物警戒, 2017, 14(4): 235-241.
- [8] 王晓平, 陈聚涛, 肖倩, 等. 中药山豆根的神经毒性: 从人到动物 [J]. 自然杂志, 2002, 24(5): 286-289.
- [9] 吕美玲, 黄智锋, 陈琳婧, 等. 某院 495 张含山豆根饮片处方的用药分析 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(9): 1238-1240.
- [10] 张良, 唐敏, 何洁. 某院 2017 年山豆根中药处方用药及配伍合理性分析 [J]. 中国药业, 2020, 29(6): 97-99.
- [11] 李秋萍, 缪剑华, 宋志军, 等. 山豆根非生物碱化学成分研究进展 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(9): 1169-1178.
- [12] Ding P L, Yu Y Q, Chen D F. Determination of quinolizidine alkaloids in *Sophora tonkinensis* by HPCE [J]. *Phytochem Anal*, 2005, 16(4): 257-263.
- [13] Pan Q M, Li Y H, Hua J, *et al.* Antiviral matrine-type alkaloids from the rhizomes of *Sophora tonkinensis* [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(7): 1683-1688.
- [14] He C M, Cheng Z H, Chen D F. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in *Sophora tonkinensis* by LC/MS and HPLC [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(6): 690-698.
- [15] Pan Q M, Zhang G J, Huang R Z, *et al.* Cytisine-type alkaloids and flavonoids from the rhizomes of *Sophora tonkinensis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18(5): 429-435.
- [16] Gu Y M, Lu J Y, Sun W, *et al.* Oxymatrine and its metabolite matrine contribute to the hepatotoxicity induced by *Radix Sophorae tonkinensis* in mice [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4): 2519-2528.
- [17] Lu Z G, Li M H, Wang J S, *et al.* Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae [J]. *Reprod Toxicol*, 2014, 47: 33-41.
- [18] Wang L P, Lu J Y, Sun W, *et al.* Hepatotoxicity induced by *Radix Sophorae tonkinensis* in mice and increased serum cholinesterase as a potential supplemental biomarker for liver injury [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2017, 69(4): 193-202.
- [19] Liu H C, Zhu X Y, Chen J H, *et al.* Toxicity comparison of different active fractions extracted from *Radix Sophorae tonkinensis* in zebrafish [J]. *J Zhejiang Univ: Sci B*, 2017, 18(9): 757-769.
- [20] 程钱. 山豆根指纹图谱、含量测定及成分分析研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [21] 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.
- [22] Goessling W, Sadler K C. Zebrafish: an important tool for liver disease research [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(6): 1361-1377.
- [23] 王成, 龚莉虹, 郭朝成, 等. 模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选中的应用进展 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6125-6134.
- [24] Zhao C J, Jia Z, Li E W, *et al.* Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae *in vivo* [J]. *Phytomed*, 2019, 62: 152959.
- [25] Westhoff J H, Steenbergen P J, Thomas L S V, *et al.* *In vivo* high-content screening in zebrafish for developmental nephrotoxicity of approved drugs [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 583.
- [26] Faria M, Valls A, Prats E, *et al.* Further characterization of the zebrafish model of acrylamide acute neurotoxicity: Gait abnormalities and oxidative stress [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7075.
- [27] Li H, Zhao F, Cao F J, *et al.* Mitochondrial dysfunction-based cardiotoxicity and neurotoxicity induced by pyraclostrobin in zebrafish larvae [J]. *Environ Pollut*, 2019, 251: 203-211.

- [28] Liu F, Han X, Li N, *et al.* Aconitum alkaloids induce cardiotoxicity and apoptosis in embryonic zebrafish by influencing the expression of cardiovascular relative genes [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 305: 10-18.
- [29] Sukardi H, Chng H T, Chan E C, *et al.* Zebrafish for drug toxicity screening: Bridging the *in vitro* cell-based models and *in vivo* mammalian models [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2011, 7(5): 579-589.
- [30] 彭蕴茹, 韦英杰, 丁永芳, 等. 基于斑马鱼模型的药物毒性研究进展与中药毒性研究新策略 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 17-30.
- [31] 段亚辉, 张云, 王雪, 等. 基于模式生物斑马鱼的款冬叶肝肾毒性比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 669-674.
- [32] 葛静, 凌洁, 宁青, 等. 基于斑马鱼 M-Act/Tox 联合评价箭叶淫羊藿的代谢-效/毒作用 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1614-1620.
- [33] 陈影, 陈两绵, 仝燕, 等. 山豆根药理毒理研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(13): 2439-2442.
- [34] 沙静姝, 毛洪奎. 山豆根注射液 (肝炎灵注射液) [J]. 中国药学杂志, 1983, 18(10): 37.

[责任编辑 李亚楠]