

• 药理与临床 •

基于斑马鱼模型的吴茱萸提取物肝毒性评价

范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 魏 静, 于啊香, 宋若兰, 董 英, 姚鉴玲, 折改梅*, 赵崇军*
北京中医药大学 中药品质评价北京市重点实验室, 北京 102488

摘要:目的 基于斑马鱼模型, 通过生化指标、病理组织学、体内细胞凋亡检测和分子生物学技术整合评价模式对吴茱萸提取物肝毒性进行综合评价。方法 给予亚致死剂量 ($<LC_{10}$) 下的吴茱萸提取物 24 h, 测定丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (aspartic aminotransaminase, AST) 活性, 观察斑马鱼肝脏病理组织, 吖啶橙 (acridine orange, AO) 染色观察肝脏细胞凋亡状态, 结合蛋白质印迹法 Western blotting、实时定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 和代谢组学初步探究吴茱萸毒性机制。结果 给予吴茱萸提取物后, 斑马鱼 AST、ALT 活性均显著升高, 肝脏病理组织苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色及 AO 染色观察提示斑马鱼肝脏受损, 细胞凋亡增加, 相关凋亡基因和蛋白表达水平显著上升, 非靶向代谢组学结果表明吴茱萸提取物影响斑马鱼氨基酸代谢。结论 通过斑马鱼模型整合评价方法从多水平、多角度、多指标实现吴茱萸诱导肝毒性的综合评价, 为斑马鱼在中药肝毒性评价的适用性提供了支撑。

关键词: 吴茱萸; 肝毒性; 整合评价; 斑马鱼; 代谢组学

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)06-1768-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.019

Hepatotoxicity evaluation of *Euodiae Fructus* extract based on zebrafish model

FAN Qi-qi, LI Zhi-qi, CHEN Mei-lin, WEI Jing, YU A-xiang, SONG Ruo-lan, DONG Ying, YAO Jian-ling, SHE Gai-mei, ZHAO Chong-jun

Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Evaluation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective Based on the zebrafish model, the hepatotoxicity of extract of Wuzhuyu (*Euodiae Fructus*) was comprehensively evaluated by biochemical index evaluation, histopathological evaluation, cell apoptosis *in vivo*, and integrated evaluation model of molecular biology techniques. **Methods** The sublethal dose ($<LC_{10}$) of *Euodiae Fructus* extract was administered for 24 h, the activity indexes of alanine aminotransferase (ALT) and aspartic aminotransaminase (AST) were determined, the liver pathological tissues of zebrafish were observed, and the apoptosis status of liver cells was observed by acridine orange (AO) staining. Western blotting (WB), real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and metabolomics were combined to preliminarily explore the toxicity mechanism of *Euodiae Fructus*, and comprehensively evaluate the liver injury zebrafish model induced by *Euodiae Fructus* extract. **Results** The transaminase level of zebrafish was significantly increased, HE staining and AO staining observation of liver pathological tissue showed that zebrafish liver was damaged, cell apoptosis was increased, and the expression levels of related apoptotic genes and proteins were significantly increased. The results of untargeted metabolomics technique showed that the extract of *Euodiae Fructus* affected amino acid metabolism of zebrafish. **Conclusion** Zebrafish model integrated evaluation method was used to achieve comprehensive

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX09735005); 北京中医药大学新教师启动基金项目 (2020-JYB-XJSJ-009); 北京中医药大学重点攻关项目 (2020-JYB-ZDGG-035)

作者简介: 范琦琦 (1998—), 女, 硕士, 研究方向为中药安全性评价及主要活性/毒性物质基础筛选。

Tel: 19801139715 E-mail: ki_ki1998@163.com

*通信作者: 折改梅 (1976—), 博士生导师, 研究员, 研究方向为中 (民族) 药药效成分和新药创制研究。

Tel: (010)53912129 E-mail: shegaimei@126.com

赵崇军 (1988—), 男, 助理研究员, 主要研究方向为中药安全性评价及主要活性/毒性物质基础筛选。

Tel: 15301127325 E-mail: 1014256537@qq.com

evaluation of liver toxicity induced by *Euodiae Fructus* from multiple levels, multiple perspectives and multiple indicators, providing support for the applicability of zebrafish in liver toxicity evaluation of traditional Chinese medicine.

Key words: *Euodiae Fructus*; hepatotoxicity; integrated evaluation method; zebrafish; metabolomics

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实^[1], 有小毒。现代药理研究表明, 吴茱萸具有肝脏毒性, 给予小鼠 60 g/kg 以上剂量的吴茱萸水煎剂可引起肝脏指标异常, 血清中转氨酶活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平显著升高, 组织病理学观察肝脏可见明显的肝组织肿胀和脂肪变性^[2], 大鼠单次给予吴茱萸 70%乙醇提取物生药量 60 g/kg, 可引起血清中转氨酶活性和肝脏指数增加, 组织病理学观察到大鼠中央静脉周围肝细胞变性、坏死^[3]。以上均提示吴茱萸提取物单次大剂量给药可造成肝损伤。此外, 也有吴茱萸与其他药物配伍应用造成肝毒性的报道^[4]。目前, 用于研究肝毒性中药的动物模型主要是大鼠和小鼠, 成本高、周期长, 难以进行规模化筛选, 而斑马鱼模型兼具体外细胞高通量优势以及体内动物模型的生物复杂性特点, 在筛选和评价药物毒性方面具有独特的优势。本研究以肝毒性中药吴茱萸为例, 结合表型、病理生化指标、分子生物学水平及代谢组学综合评价斑马鱼作为高通量动物模型用于快速筛选肝毒性药物的适用性。

1 仪器与材料

1.1 试剂与药材

本实验中质谱甲醇 (批号 L-21104) 和正己烷 (批号 L-18419) 购自 Thermo Fisher 公司; MSTFA 衍生化试剂 (批号 24589-78-4) 购自 Merck 公司; 实验用超纯水 (18.2M) 由装备有液质联用的过滤专用头 (LC-MS Pak) 的 Millipore Reference 超纯水系统 (美国 Billerica 公司) 制备; TRIzol Universal Reagent (批号 S7130)、FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 (批号 Lot#R7026) 均购自于北京天根生化科技有限公司; TransStart Top Green qPCR SuperMix (批号 Lot#O11120) 购自于全式金生物技术有限公司; 天冬氨酸氨基转移酶 (aspartic aminotransaminase, AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒均购自于南京建成科技有限公司, 批号分别为 20201029、20201103; 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 蛋白酶抑制剂、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、10%

SDS 溶液、5 × Tris-甘氨酸电泳缓冲液 (Lot:204M040611)、10 × TBST 缓冲液、5 × 蛋白上样缓冲液、10 × 丽春红染液、山羊抗兔 IgG (H+L) - Alexa. Fluor (DE0635) 均购自于拜尔迪生物技术有限公司; Caspase-3 抗体 (ab13847, Abcam 公司); CHCl₃ (批号 20181107)、NaCl (批号 20201201)、K₂HPO₄ (批号 20200320)、KH₂PO₄ (批号 20130117)、NaHCO₃ (批号 20200818), 均为分析纯, 购于北京化工厂; MgSO₄ (批号 Z13O11Y127224)、CaCl₂ (批号 Z05N11Y130022) 均为分析纯, 购于上海源叶生物科技有限公司。吴茱萸药材购于安国圣山药业有限公司, 由北京中医药大学刘春生教授鉴定为芸香科植物吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实。

1.2 仪器

气相色谱-飞行时间质谱联用仪 (GC-TOF/MS, 美国 LECO Corp. 公司); V16 体式荧光显微镜 (卡尔·蔡司股份公司); Stemi508 体式显微镜 (卡尔·蔡司股份公司); 斑马鱼养殖系统 (北京爱生生物科技有限公司); 酶标仪 (gene5, Gene 公司); TGL-16M 型高速台式冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); GTR10-2 型低速冷冻离心机 (北京时代北利离心机有限公司); WH-90A 微型漩涡混悬器 (上海振荣科学仪器有限公司); ChemiDoc MP 荧光成像系统、CFX96 real-time PCR System (Bio-Rad 公司); 全自动组织匀浆器 (Next Advance, Inc., Averill Park 公司); 自动进样玻璃瓶 (美国 Agilent Technologies 公司); Scientz-10N 型超低温冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.3 实验动物

正常野生 AB 型斑马鱼, 鱼龄约 3 个月, 雌雄各半, 亲本购于中国科学院水生生物研究所, 由本实验室饲养繁殖。

2 方法

2.1 吴茱萸提取物“量-毒”曲线的建立

2.1.1 吴茱萸提取物的制备 吴茱萸药材粉碎后过 40 目筛, 称取适量粉末, 加入 10 倍量蒸馏水提取 2 次, 每次提取 2 h, 滤过, 滤液合并后 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 浓缩, 真空干燥, 得到吴茱萸提取物粉末, 并按照《中国药典》2020 年版方法进

行质控。取用时,称取一定量的吴茱萸提取物粉末进行研磨,溶于 50 mL 胚胎培养水中,超声 30 min。

2.1.2 吴茱萸提取物“量-毒”曲线的建立 随机选取受精后 4 d (4 days after fertilization, 4 dpf) 的斑马鱼幼鱼置于 12 孔板中,每孔 20 尾,分别暴露于一系列不同浓度的吴茱萸提取物中,以斑马鱼培养水为对照组,每组设置 4 孔重复。暴露过程于 28 °C 恒温培养箱中进行,每隔 8 h 统计各组的斑马鱼死亡数量并及时移除死亡幼鱼。24 h 后统计每组的死亡率,绘制吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼的“量-毒”曲线,计算 10%致死浓度 (LC₁₀)。

2.2 肝功指标评价

随机选取 4 dpf 斑马鱼幼鱼暴露在亚致死浓度 (<LC₁₀, 600、700、800 μg/mL) 下的吴茱萸提取物溶液中 24 h,同时设置对照组(斑马鱼培养水),到达暴露终点时,用斑马鱼培养水清洗 3 次后每组收集 80 尾幼鱼样本,于 PBS (1:9) 中匀浆,2500 r/min 离心 10 min,取上清液按照试剂盒说明书操作,测定 ALT 和 AST 的活性。

2.3 肝脏病理组织学评价

随机选取 4 dpf 斑马鱼幼鱼暴露在亚致死浓度 (840 μg/mL) 下的吴茱萸提取物溶液中 24 h,同时设置对照组 (斑马鱼培养水),到达暴露终点时,将斑

马鱼样本转移至 4%多聚甲醛缓冲液中,室温保存。然后在乙醇中逐步脱水,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,置于显微镜下观察吴茱萸提取物暴露处理后的斑马鱼肝脏组织病理状态。

2.4 体内细胞凋亡评价

随机选取 4 dpf 斑马鱼幼鱼暴露在亚致死浓度 (840 μg/mL) 下的吴茱萸提取物溶液中 24 h,同时设置对照组 (斑马鱼培养水),到达暴露终点时,移除吴茱萸提取物药液,快速加入 5 μg/mL AO 2 mL,避光染色 20 min 后,收集斑马鱼样本,固定,在荧光显微镜下观察和拍照,评价吴茱萸提取物对肝细胞凋亡的影响。

2.5 RT-qPCR 检测细胞凋亡因子表达水平

随机选取 4 dpf 斑马鱼幼鱼暴露在亚致死浓度 (<LC₁₀, 600、700、800 μg/mL) 下的吴茱萸提取物溶液中 24 h,同时设置对照组 (斑马鱼培养水),到达暴露终点时,以每组 80 尾斑马鱼进行取样,TRIZOL 法提取斑马鱼总 RNA。按照反转录和定量试剂盒中的操作说明分别进行反转录和荧光定量 PCR 反应,采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、Caspase-8 和 Caspase-9 的基因转录水平。引物序列见表 1。

表 1 细胞凋亡因子引物序列

Table 1 Primer sequence of apoptosis factor

基因	前引 (5'→3')	后引 (5'→3')
<i>β-actin</i>	GGCTGTGCTGTCCCTGTAT	GGGCGTAACCCTCGTAGAT
<i>Caspase-3</i>	TCAGGCTTGTCGAGGAAC	CTGCCATACTTTGTATCATTT
<i>Caspase-8</i>	AAGACCTGATTCTGCGACTG	TAGGCTGAGACACCTTTACG
<i>Caspase-9</i>	TTCATCGCCCTCCTGTC	CTGGCATCCATCTTGTAGC

2.6 Western blotting 测定凋亡蛋白 Caspase-3 表达水平

预冷 RIPA 蛋白抽提试剂,加入蛋白酶抑制剂,蛋白抽提开始前加入适量 0.1 mol/L PMSF 母液以保证最终的 PMSF 浓度为 1 mmol/L。准确称取定量的样本组织 (同“2.5”项) 并置于冰水混合物中,按照 1:9 比例加入裂解液,电动组织匀浆器进行匀浆。孵育 20 min 后,4 °C、3000 r/min 离心 20 min,取上清。按照 BCA 法进行蛋白定量,通过 RIPA 调整蛋白浓度,煮沸变性 5 min。取 20 μg 总蛋白上样进行凝胶电泳,湿法转膜,3% BSA-TBST 封闭 30 min。

3% BSA-TBST 分别与 Caspase-3、β-actin 抗体以 1:50 比例进行稀释,4 °C 孵育过夜;5%脱脂奶粉-TBST 稀释二抗山羊抗兔 IgG (H+L) HRP (1:10 000),室温孵育 40 min,添加 ECL 后反应 3~5 min,依次曝光、显影、定影。

2.7 数据处理及分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2.8 GC-TOF/MS 代谢组学评价

2.8.1 样品处理 随机选取 4 dpf 斑马鱼幼鱼暴露在

亚致死浓度 (840 $\mu\text{g/mL}$) 下的吴茱萸提取物溶液中 24 h 作为实验组, 设置对照组 (斑马鱼培养水)。到达暴露终点时, 精确称量 25 mg 待测斑马鱼样品, 研磨混匀后加入 80 μL 预冷的 50% 甲醇溶液, 置于全自动组织匀浆器进行匀浆。匀浆后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 500 r/min 离心 20 min, 转移上清液。在残余蛋白沉淀物中精密加入 200 μL 预冷的甲醇-氯仿 (3:1) 混合溶液再次匀浆。合并 2 部分上清液, 再次离心 20 min。精密移取 200 μL 上清液置于真空离心浓缩仪中除去溶剂, 最后将样品冻干; 恢复室温后, 充入高纯度氮气保护, 自动压盖保存; 通过加样臂自动加入 20 mg/mL 甲氧胺吡啶溶液 50 μL , 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 2 h; 加入 50 μL MSTFA 于 37.5 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

2.8.2 GC-TOF/MS 检测条件 采用 GC-TOF-MS 进行非靶向代谢组学检测。Rxi-5MS 气相色谱柱 (30 m $\times$ 250 μm , 0.25 μm); 升温程序 (80 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min 后以 12 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 300 $^{\circ}\text{C}$, 保持 4.5 min, 后以 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 320 $^{\circ}\text{C}$ 并保持 1 min); 前进样口温度 270 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 1.0 μL ; 传输接口温度 270 $^{\circ}\text{C}$; 离子源温度 220 $^{\circ}\text{C}$; 电离电压 -70 $^{\circ}\text{C}$; 扫描速率为 25 每秒光谱; 质量范围 m/z 50~550。

2.8.3 数据分析和统计 由 GC-TOF/MS 产生的原始数据通过 Chroma-TOF 软件自动输出到非靶向代谢组学软件 XploreMET 中, 进行基线平滑和矫正、去卷积、原始色谱峰信号提取和对齐、保留指数矫正、代谢物鉴定、数据预处理。采用正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 统计方法区分对照组和实验组组间代谢谱差异。

2.8.4 差异代谢物筛选及代谢通路富集分析 采用 hypergeometric 算法将代谢物进行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, 以变量投影重要性指标 (variable importance in projection, VIP) > 1, $P < 0.05$ 的代谢物作为差异代谢物进行通路富集分析, 加强代谢物的贡献, 寻找关键代谢网络。

3 结果

3.1 “量-毒”曲线评价

通过 SPSS 17.0 软件绘制吴茱萸提取物对斑马鱼的“量-毒”曲线, 如图 1 所示。经计算, 吴茱萸提取物 LC_{10} 为 846.12 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 斑马鱼肝脏组织结构评价

观察斑马鱼病理切片可知, 吴茱萸提取物对斑

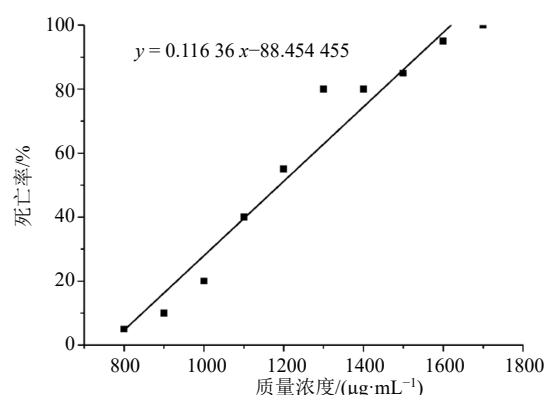


图 1 吴茱萸提取物“死亡率-浓度”效应曲线

Fig. 1 “Mortality-dose” curve of *Euodiae Fructus* extract

马鱼肝脏造成明显损伤, 其他脏器未见异常。表型图如图 2-B 所示, 对照组斑马鱼肝脏组织、细胞完整, 细胞质均匀, 细胞核呈规则圆形, 而经吴茱萸提取物暴露处理后的斑马鱼肝脏组织结构紊乱, 细胞质减少, 排列松散, 空泡化严重。

3.3 斑马鱼体内细胞凋亡评价

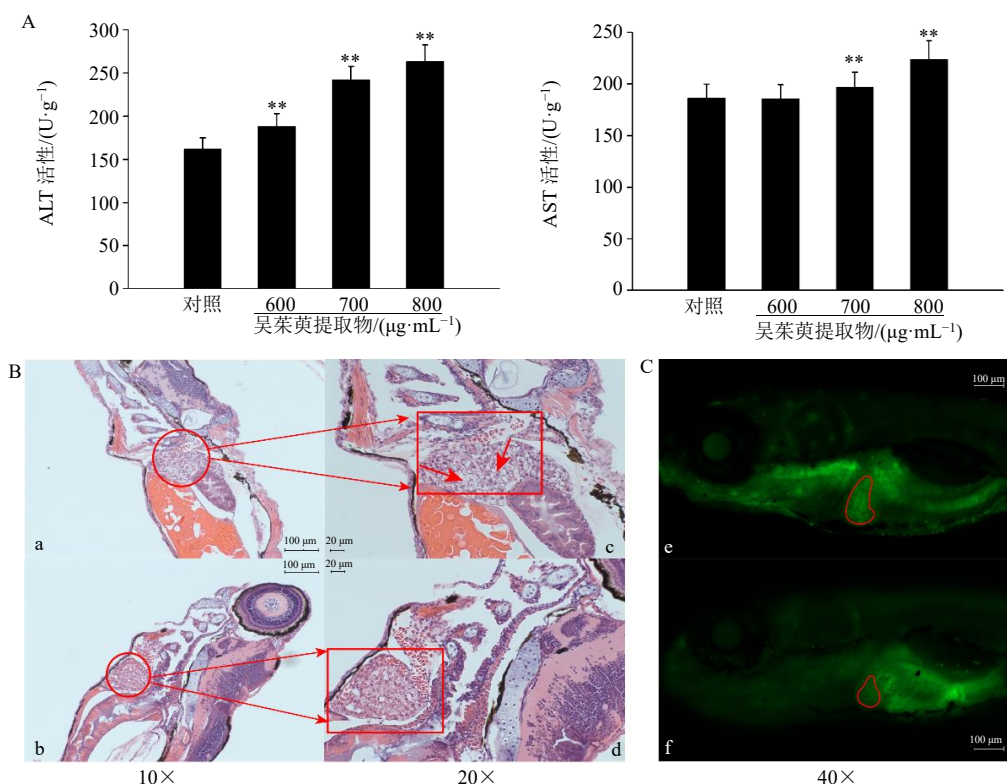
AO 具有膜通透性, 使细胞核中 DNA 和 RNA 着色。在凋亡细胞中, 染色质固缩或断裂形成凋亡小体, 经 AO 染色后, 荧光显微镜下呈绿色荧光^[5]。染色结果如图 2-C 所示, 与对照组相比, 吴茱萸提取物组斑马鱼肝脏区域荧光明显增强, 细胞凋亡增多, 表明吴茱萸提取物能够诱导斑马鱼肝脏损伤, 显著引起肝细胞凋亡 (图 2-C), 其他脏器未见明显的细胞凋亡。

3.4 斑马鱼肝脏生化指标评价

ALT 和 AST 活性是传统评价肝毒性的标志物, 且 ALT 被视为肝脏损伤临床生化检测的“黄金标准”^[6], 本实验以 ALT、AST 为指标对斑马鱼幼鱼整体转氨酶水平进行评价。如图 2-A 所示, 与对照组相比, 经吴茱萸提取物暴露处理 24 h 后, 各剂量组斑马鱼幼鱼整体 AST 和 ALT 活性均显著升高 ($P < 0.01$), 并呈现剂量依赖性, 且 ALT 指标检测比 AST 更加敏感, 与现有研究报道一致^[7]。

3.5 RT-qPCR 测定斑马鱼凋亡相关基因转录水平

本实验通过评价凋亡相关基因 *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Caspase-9* 的转录水平以考察吴茱萸提取物引起的肝细胞凋亡是否与 *Caspase* 途径有关。如图 3-A 所示, 经吴茱萸提取物处理后, *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Caspase-9* 基因表达水平均呈现显著上升趋势 ($P < 0.01$)。



A-吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼整体肝功酶 ALT、AST 活性的影响 (与对照组比较: ** $P < 0.01$, $n = 80$) B-吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼肝脏 HE 染色结果 (a、c 代表吴茱萸提取物 840 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组, b、d 代表对照组) C-AO 染色评价吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼肝脏细胞凋亡的影响 (e 代表吴茱萸提取物 840 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组, f 代表对照组)

A-activities of ALT and AST in zebrafish (** $P < 0.01$ vs control group, $n = 80$) B-histopathology of zebrafish liver in both control group and *Euodiae Fructus* extract-treated group (a and c represented 840 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Euodiae Fructus* extract-treated group, b and d represented control group) C-in vivo cell death and apoptosis results (e represented 840 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Euodiae Fructus* extract-treated group, f represented control group)

图 2 吴茱萸提取物对斑马鱼的肝毒性评价

Fig. 2 Hepatotoxicity evaluation of of *Euodiae Fructus* extract on zebrafish

3.6 Western blotting 检测斑马鱼 Caspase-3 蛋白表达水平

如图 3-B 所示, 与对照组相比, 经吴茱萸提取物处理后, 各剂量组斑马鱼 Caspase-3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。

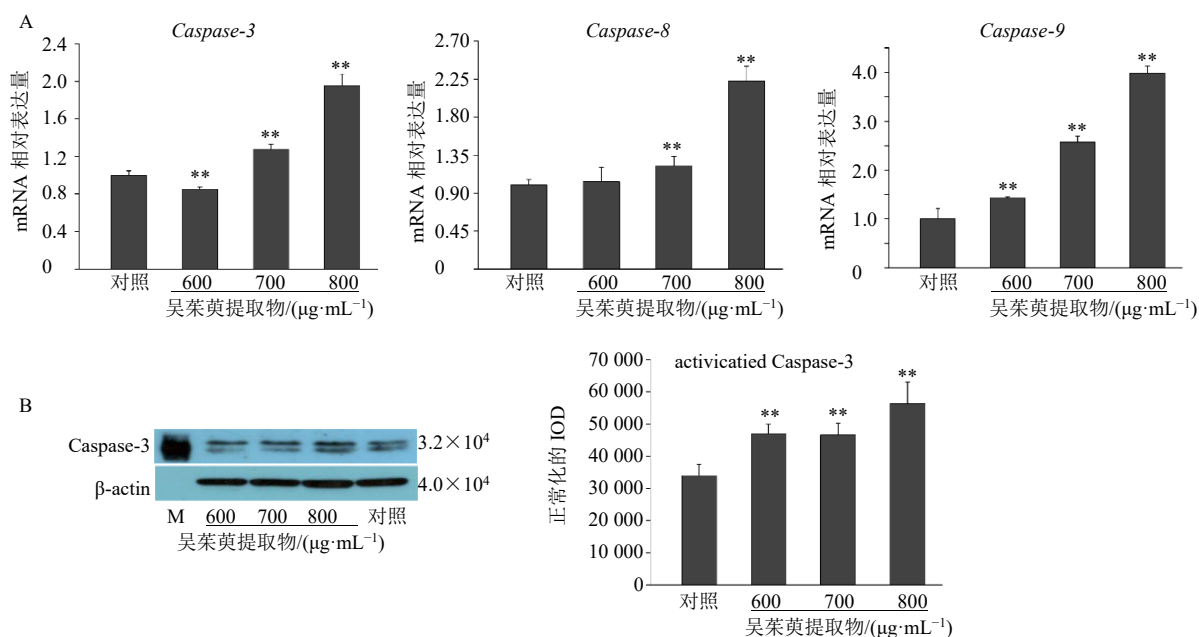
3.7 代谢组学评价

将吴茱萸提取物组与对照组数据进行有监督的 OPLS-DA 分析, 2 组区分明显, 表明代谢轮廓存在差异 (图 4-A.a), 随机置换测试 ($n = 100$) 结果见图 4-A.b, 以 $Q^2 < 0$ 为评价标准, 证明该评价模型具有良好的可信性和预测性。以 $\text{VIP} \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 为评判标准来寻找吴茱萸提取物组与对照组之间的差异代谢物 (图 4-A.c), 基于共筛选得到的差异代谢物, 通过 KEGG 代谢通路富集分析来寻找吴茱萸的关键代谢通路 (图 4-B), 并将不同代谢通路中所涉及到的差异代谢物分别归纳整理 (表 2)。

4 讨论

斑马鱼自身肝脏具有的一些优势特征, 促使斑马鱼模型在肝毒性药物的高通量筛选中脱颖而出。斑马鱼的肝脏发育较快, 同哺乳动物模型相比, 具有高度遗传保守性, 在肝脏组织结构和功能上与哺乳动物具有相似性^[8-10], 因此, 斑马鱼替代传统哺乳动物模型广泛用于药物诱导肝损伤的研究。此外, 斑马鱼胚胎具有光学透明性的特点, 相关转基因技术的发展也促进了斑马鱼在药物肝毒性高通量筛选中的应用^[11-12]。斑马鱼幼鱼在确定肝毒性方面表现出了能与传统模型相媲美的能力, 而且能够预先筛选具有潜在肝毒性效果的化合物^[13-14]。

本实验基于斑马鱼模型, 从病理组织学、生物化学和分子生物学等多方面技术整合评价吴茱萸提取物的肝毒性, 发现吴茱萸毒性大小与暴露浓度呈现明显的剂量正相关性。通过建立吴茱萸提取物“量-毒”曲线, 明确毒性剂量, 并控制在亚致死量

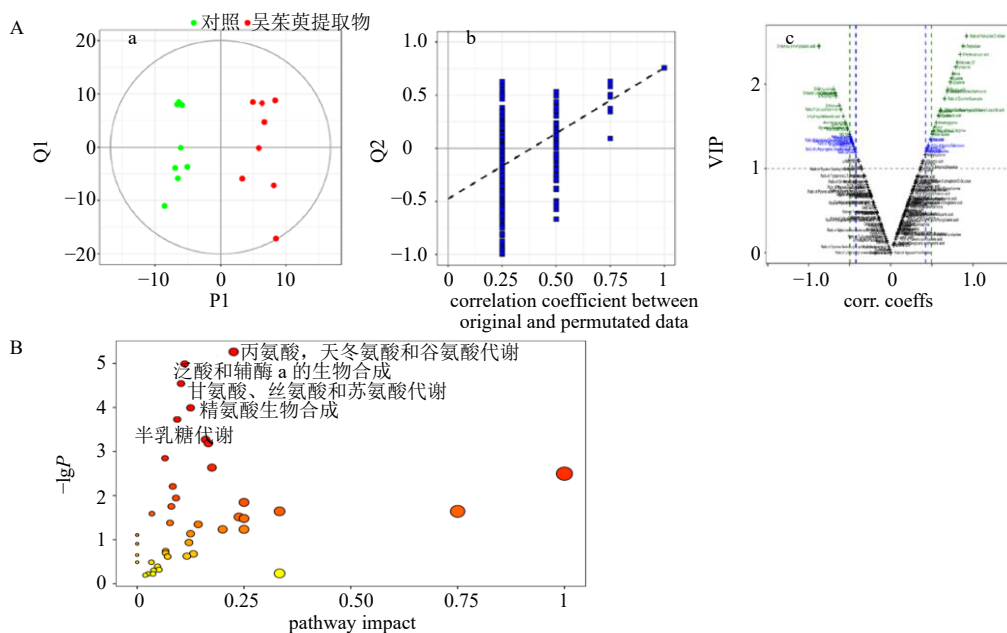


与对照组比较: ** $P < 0.01$ A-RT-qPCR 评价吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼整体 *Caspase-3*、*Caspase-8*、*Caspase-9* 表达的影响 B-Western blotting 评价吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼整体 *Caspase-3* 表达水平的影响 M-marker

** $P < 0.01$ vs control group A-gene expression of *Caspase-3*, *Caspase-8*, and *Caspase-9* in zebrafish larvae treated with *Euodiae Fructus* extract were examined by RT-qPCR B-protein expression of *Caspase-3* in zebrafish larvae treated with *Euodiae Fructus* extract was examined by Western blotting M-marker

图 3 细胞凋亡因子分子生物学水平评价 ($\bar{x} \pm s, n = 80$)

Fig. 3 Molecular biological evaluation of apoptosis factor ($\bar{x} \pm s, n = 80$)



A-吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼整体代谢轮廓和差异代谢物的影响 [a-对照组和吴茱萸提取物组 OPLS-DA, b-OPLS-DA 模型随机置换测试 ($n = 100$), c-差异代谢物分析] B-吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼整体代谢途径的影响

A-effects of *Euodiae Fructus* extract on overall metabolic profile and differential metabolites of zebrafish [a-OPLS-DA analysis of sample from the treated groups and control, b-permutation testing of OPLS-DA ($n = 100$), c-differential metabolism selection] B-metabolism pathway enrichment analysis

图 4 吴茱萸提取物对斑马鱼体内代谢的影响

Fig. 4 Metabolic effects of *Euodiae Fructus* extract on zebrafish

表 2 差异代谢途径及相关的差异代谢物 (吴茱萸提取物组 vs 对照组)

Table 2 Differential metabolic pathways and related differential metabolites between *Euodiae Fructus* extract group and control group

代谢通路名称	<i>P</i> 值	呈上升趋势的代谢物 (与对照组相比)	呈下降趋势的代谢物 (与对照组相比)
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (alanine, aspartate and glutamate metabolism)	5.19×10^{-3}	富马酸、 <i>L</i> -谷氨酸	柠檬酸、 <i>L</i> -天冬酰胺、 <i>N</i> -乙酰- <i>L</i> -天门冬氨酸
泛酸和辅酶 a 的生物合成 (pantothenate and CoA biosynthesis)	6.83×10^{-3}	β -丙氨酸、泛酸、尿嘧啶、 <i>L</i> -半胱氨酸	
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (glycine, serine and threonine metabolism)	0.010 7	肌酸、二甲基甘氨酸、甘油酸、肌氨酸、 <i>L</i> -半胱氨酸	
精氨酸生物合成 (arginine biosynthesis)	0.018 5	富马酸、 <i>L</i> -谷氨酸、尿素	
半乳糖代谢 (galactose metabolism)	0.024 0	肌醇	<i>D</i> -葡萄糖、 <i>D</i> -半乳糖、 α -乳糖
乙醛酸和二羧酸代谢 (glyoxylate and dicarboxylate metabolism)	0.038 0	甘油酸、 <i>L</i> -谷氨酸	柠檬酸、果酸
牛磺酸、亚磺酸代谢 (taurine and hypotaurine metabolism)	0.041 3	<i>L</i> -半胱氨酸	亚牛磺酸
嘌呤代谢 (purine metabolism)	0.058 0	鸟嘌呤、鸟苷、黄嘌呤、尿素	尿酸、黄嘌呤核苷
精氨酸和脯氨酸代谢 (arginine and proline metabolism)	0.072 0	鸟嘌呤、 <i>L</i> -谷氨酸、腐胺	<i>L</i> -脯氨酸
新霉素、卡那霉素和庆大霉素的生物合成 (neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis)	0.082 0		<i>D</i> -葡萄糖

暴露条件下, 通过病理组织切片和整体 AO 染色观察到毒性表型。结果表明, 吴茱萸提取物对斑马鱼肝脏造成明显肝损伤, 未见其他脏器损伤。与对照组相比, 经吴茱萸提取物暴露处理后的斑马鱼幼鱼肝脏区域的荧光强度增强, 提示斑马鱼幼鱼的肝脏组织出现明显的细胞凋亡; 病理组织结果同样表明吴茱萸提取物暴露处理能够破坏斑马鱼肝脏组织结构, 造成组织结构松散, 肝细胞空泡化。同时评价了 AST 和 ALT 肝功酶活性, 结果表明吴茱萸提取物处理能使斑马鱼整体肝功酶活性显著增加。作为肝毒性评价的黄金标准, ALT 和 AST 通常在肝脏中蓄积, 而在血液中的水平较低。本实验中吴茱萸提取物处理仍会显著增加斑马鱼幼鱼整体的肝功酶活性, 因此, 即使存在不同组织干扰的情况下, 斑马鱼幼鱼的整体肝功酶评价仍可以作为斑马鱼幼鱼肝毒性评价的通用方法。

细胞凋亡是经一系列基因活化及调控细胞有序的、自主的主动死亡过程, 通常由蛋白酶 Caspases 介导蛋白裂解引起细胞凋亡^[15]。Caspase 家族蛋白是一种直接诱导细胞转化解体的蛋白酶系统, 内源性指向途径主要在由线粒体介导的细胞色素 C 中, 细胞色素 C 被释放后立即与胞质中的 Caspase-9 联合形成转化体, 启动 Caspase-3 在细胞凋亡过程中

发挥调控作用。高转录水平的 *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Caspase-9* 是引起细胞凋亡的重要指示。RT-qPCR 结果显示, 斑马鱼幼鱼中 3 个凋亡基因的转录水平对吴茱萸提取物处理均表现出较强响应, 呈现显著的上升趋势 ($P < 0.01$)。Western blotting 也进一步验证了 *Caspase-3* 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.01$), 结合 AO 染色后观察到的凋亡细胞增多, 表明吴茱萸提取物能够诱导肝脏细胞凋亡的发生。

本实验采用非靶向代谢组技术探讨吴茱萸提取物暴露处理对斑马鱼整体代谢轮廓和代谢途径的影响, 利用 OPLS-DA 分析方法研究吴茱萸提取物对斑马鱼整体代谢轮廓的影响, 确认与肝毒性相关的重要代谢物。结果表明吴茱萸提取物组和对照组之间存在显著的分离趋势。在此基础上, 通过火山图来表示吴茱萸提取物组与对照组之间的差异代谢物, 最终确定的差异代谢物主要包括氨基酸、碳水化合物及小分子酸、烷烃和含氮分子等小分子化合物, 并逐个分析差异代谢物以探讨其潜在的毒性机制。最后, 通过 KEGG 途径分析确认吴茱萸提取物影响的代谢途径。

氨基酸是斑马鱼主要的能量基质, 在斑马鱼不同的组织器官, 尤其在肝脏中发挥着重要的生理功能^[16]。细胞坏死、肝脏的吸收和内源性蛋白的降解

都会影响氨基酸水平的变化^[17-18]。实验结果显示, 吴茱萸提取物处理后, 斑马鱼幼鱼体内的氨基酸代谢水平发生显著变化, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 牛磺酸和次牛磺酸代谢途径受到显著影响。亚牛磺酸是牛磺酸合成的中间产物, 在肝脏中胆汁酸与牛磺酸或甘氨酸结合, 形成胆酸盐。因此, 亚牛磺酸和甘氨酸的同时增加能够加速胆汁酸的分泌^[19]。此外, 在本实验研究中发现给药组斑马鱼核酸代谢发生紊乱, 嘌呤作为核苷酸的重要组成部分, 是储存能量的主要生物分子。黄嘌呤作为氧化应激损伤的重要生物标志物, 也是嘌呤代谢的中间产物^[20]。黄嘌呤的变化可能与三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 含量降低有关, 并且其最终会在脱氢酶的作用下转化成尿酸^[21]。尿酸是细胞外液中一种有力的抗氧化物质, 因此, 黄嘌呤的增加和尿酸的降低意味着 ATP 的产生受到干扰。

本研究结合斑马鱼幼鱼肝功酶活性、肝脏结构和细胞状态、凋亡基因和凋亡蛋白的表达水平等多指标整体评价了吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼肝脏的影响。结果发现, 吴茱萸提取物损害斑马鱼幼鱼肝脏组织结构, 肝功酶表达水平显著升高, 上调凋亡相关基因和蛋白表达水平, 诱导肝细胞凋亡, 表明斑马鱼模型在中药肝毒性评价中具有适用性。通过 GC-MS 比较分析吴茱萸提取物对斑马鱼幼鱼整体代谢轮廓, 结果发现, 吴茱萸提取物扰乱斑马鱼幼鱼内源性代谢物水平, 主要影响主要能源物质-氨基酸的代谢, 最终造成斑马鱼幼鱼整体能量代谢紊乱, 评价斑马鱼体内的氨基酸代谢水平, 亦是未来斑马鱼模型评价药物肝毒性研究可以参考的思路和方法。本研究为支持斑马鱼模型作为一种新的工具来进行肝毒性中药筛选和预测提供支撑。

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: 178.
- [2] 祝靓靓, 杨东旭, 刘昕, 等. 吴茱萸果实的肝脏毒性研究及毒性部位初步探索 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 1810-1813.
- [3] 李波, 李莉, 赵军宁, 等. 吴茱萸乙醇提取物对大鼠急性毒性及肝毒性的影响 [J]. 中药药理学与临床, 2013, 29(2): 120-124.
- [4] Cohen S, Heywood E, Pillai A, *et al.* Hepatotoxicity associated with the use of white flood, a nutritional supplement [J]. *Pract Gastroenterol*, 2012, 36: 45-47.

- [5] 孙琦, 范咏梅, 赖柯华, 等. 呋虫胺对斑马鱼胚胎-幼鱼生长发育及细胞凋亡的影响 [J]. 生态毒理学报, 2016, 11(3): 356-364.
- [6] Ozer J, Ratner M, Shaw M, *et al.* The Current state of serum biomarkers of hepatotoxicity [J]. *Toxicology*, 2008, 245(3): 194-205.
- [7] 侯衍豹, 黄妍, 马莉, 等. 肝毒性生物标志物研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(12): 1804-1810.
- [8] 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.
- [9] Zhang Y, Han L W, He Q X, *et al.* A rapid assessment for predicting drug-induced hepatotoxicity using zebrafish [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2017, 84: 102-110.
- [10] Zhang X Y, Li C X, Gong Z Y. Development of a convenient *in vivo* hepatotoxin assay using a transgenic zebrafish line with liver-specific DsRed expression [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91874.
- [11] Driessen M, Kienhuis A S, Pennings J L A, *et al.* Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(5): 807-823.
- [12] Driessen M, Kienhuis A S, Vitins A P, *et al.* Gene expression markers in the zebrafish embryo reflect a hepatotoxic response in animal models and humans [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 230(1): 48-56.
- [13] Zhao C J, Li E W, Wang Z Y, *et al.* Nux vomica exposure triggered liver injury and metabolic disturbance in zebrafish larvae [J]. *Zebrafish*, 2018, 15(6): 610-628.
- [14] Zhao C J, Tian J H, Wang J F, *et al.* Zebrafish model for assessing induced organ toxicity by *Strychnos nux-vomica* [J]. *J Tradit Chin Med*, 2016, 36(4): 522-529.
- [15] 张勤丽, 牛侨. 细胞凋亡机制概述 [J]. 环境与职业医学, 2007, 24(1): 102-107.
- [16] Jia S C, Li X Y, Zheng S X, *et al.* Amino acids are major energy substrates for tissues of hybrid striped bass and zebrafish [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(12): 2053-2063.
- [17] Feng B, Wu S M, Lv S, *et al.* Metabolic profiling analysis of a D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced mouse model of fulminant hepatic failure [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(6): 2161-2167.
- [18] Yu K, Sheng G P, Sheng J F, *et al.* A metabonomic investigation on the biochemical perturbation in liver failure patients caused by hepatitis B virus [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(7): 2413-2419.
- [19] Li C X, Li P, Tan Y M, *et al.* Metabolomic characterizations of liver injury caused by acute arsenic toxicity in zebrafish [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151225.
- [20] Ojani R, Alinezhad A, Abedi Z. A highly sensitive electrochemical sensor for simultaneous detection of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly(l-methionine) modified glassy carbon electrode [J]. *Sens Actuat B Chem*, 2013, 188: 621-630.
- [21] 王文强, 李忠信, 孙萌, 等. 黄嘌呤代谢在肿瘤发展治疗中的研究进展 [J]. 按摩与康复医学, 2021, 12(18): 95-97.

[责任编辑 潘明佳]