

• 药理与临床 •

基于斑马鱼多模态评价杜仲配伍补骨脂对其香豆素成分的代谢及毒/效影响

高一波^{1,2,3}, 李佳妍^{1,3,4}, 石子琪^{1,2,3}, 宁青^{1,2,3*}, 韦英杰^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 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. 南京中医药大学第三临床医学院, 江苏 南京 210028
4. 烟台毓璜顶医院 药学部, 山东 烟台 264000

摘要:目的 用斑马鱼多模态评价杜仲配伍补骨脂对其香豆素糖苷的代谢及毒/效影响。方法 用受精后 1~6 d (day after fertilization, dpf) 的斑马鱼评价杜仲提取物 (lignan extract of *Eucommiae Cortex*, LEEC) 配伍补骨脂香豆素提取物 (coumarin extract of *Psoraleae Fructus*, CEPF) 以及代表成分松脂醇二葡萄糖苷 (pinoresinol diglucoside, PDG) 配伍补骨脂苷 (psoralenoside, PSS) 和异补骨脂苷 (isopsoralenoside, IPSS) 的安全性, 观察斑马鱼胚胎发育情况, 包括胚胎致畸、致死情况, 并计算斑马鱼半数死亡浓度 (half lethal concentration, LC₅₀); 用 1~6 dpf 斑马鱼暴露于上述配伍组合物, 分析 PSS 和/或 IPSS 及其代谢物补骨脂素 (psoralen, PS) 和/或异补骨脂素 (isopsoralen, IPS) 的动态变化; 用 25 μmol/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 的各给药组斑马鱼幼鱼骨骼染色, 进行显微观察、数码成像, 并用图像软件定量分析骨骼染色区域来评价上述配伍组合抗骨质疏松活性。**结果** LEEC 配伍 CEPF 及 PDG 分别配伍 PSS 和 IPSS, 可改善斑马鱼心包、卵黄囊等形态畸变, 减少鱼死亡率, 提高鱼致畸或致死浓度; 能明显减慢 PSS 和 IPSS 脱糖基转化为潜在肝损伤代谢产物 PS 和 IPS 的速率, 减慢毒性代谢物的产生是杜仲配伍补骨脂减毒的重要因素; LEEC 配伍 CEPF 以及 PDG 分别配伍 PSS 和 IPSS 可显著增加斑马鱼头骨累积光密度值, 提示具有一定增效作用。**结论** 采用斑马鱼多模态高效评价了杜仲配伍对 CEPF 及补骨脂香豆素代表成分的代谢与毒/效作用的影响, 为杜仲配伍补骨脂的减毒、增效作用研究提供高效的方法与思路。

关键词: 斑马鱼; 补骨脂; 杜仲; 毒性; 代谢; 骨质疏松; 补骨脂素; 异补骨脂素; 补骨脂苷; 异补骨脂苷; 松脂醇二葡萄糖苷
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)05-1449-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.011

Evaluation of effects of *Eucommiae Cortex* combined with *Psoraleae Fructus* on metabolism and toxicity/efficacy of coumarin components based on zebrafish multimodal analysis

GAO Yi-bo^{1,2,3}, LI Jia-yan^{1,3,4}, SHI Zi-qi^{1,2,3}, NING Qing^{1,2,3}, WEI Ying-jie^{1,2,3}

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
2. Key Laboratory of New Drug Delivery Systems of Chinese Materia Medica, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
3. The Third Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
4. Department of Pharmacy, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China

收稿日期: 2022-11-03

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2017ZX09301056); 国家中医药管理局 2022 年中央财政转移支付地方项目 (2022GJJZDYJS-01); 江苏省中医药科技发展计划项目 (ZD202225); 江苏省中医药科技发展计划项目 (YB2020022); 江苏省中医药科技发展计划项目 (QN202214); 江苏省医学创新团队项目 (CXTDB2017003)

作者简介: 高一波, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: 13482439556 E-mail: gyhbucm@163.com

*通信作者: 宁青, 女, 助理研究员, 研究方向为中药物质基础及中药药理学。E-mail: 80221255@qq.com

韦英杰, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药物质基础与质量控制。Tel: (025)52362109 E-mail: wyj970@163.com

Abstract: Objective To evaluate the effects of Duzhong (*Eucommiae Cortex*) combined with Buguzhi (*Psoraleae Fructus*) on its metabolism and toxicity/efficacy of coumarin components with zebrafish multimodal analysis. **Methods** Zebrafish 1–6 d after fertilization (1–6 dpf) was used to evaluate the safety of lignan extract of *Eucommiae Cortex* (LEEC) combined with coumarin extract of *Psoraleae Fructus* (CEPF) and the representative components of pinoresinol diglucoside (PDG) combined with psoralen (PS) and isopsoralen (IPSS), zebrafish embryonic development including embryonic teratogenicity and lethality were observed, and half death concentration (LC₅₀) of zebrafish was calculated; Zebrafish were exposed to the above compatible compositions at 1–6 dpf to analyze the dynamic changes of PS and/or IPSS and their metabolites psoralen (PS) and/or isopsoralen (IPS); The zebrafish osteoporosis model was induced with 25 μmol/L prednisolone, microscopic observation and digital imaging of zebrafish larvae of each treatment 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 the above compatibility combinations. **Results** LEEC combined with CEPF and PDG combined with PS and IPSS could alleviate zebrafish morphology distortion of heart, yolk sac, etc. and reduce fish mortality, and increase teratogenic or lethal concentrations of fish, significantly slowed down the conversion rate of PS and IPSS to potential liver injury metabolites PS and IPS, and slowed down the production of toxic metabolites was an important factor for the attenuating effect of *Eucommiae Cortex* combined with *Psoraleae Fructus*; LEEC combined with CEPF and PDG combined with PS and IPSS could increase the cumulative optical density of zebrafish skull, suggesting a certain synergistic effect. **Conclusion** The effects of *Eucommiae Cortex* compatibility on metabolism and toxicity/efficacy of CEPF and its representative components were high efficiently evaluated by zebrafish multimodal analysis, so as to provide efficient methods and ideas for indicating the attenuating and synergistic effects of *Eucommiae Cortex* compatibility with *Psoraleae Fructus*.

Key words: zebrafish; *Psoraleae Fructus*; *Eucommiae Cortex*; toxicity; metabolism; osteoporosis; psoralen; isopsoralen; psoralenoside; isopsoralenoside; pinoresinol diglucoside

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实,温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻,用于治疗肾阳不足、阳痿遗精、遗尿尿频、腰膝冷痛、肾虚作喘、五更泄泻;外用消风祛斑,治疗白癜风、斑秃^[1]。补骨脂始载于《雷公炮炙论》,临床应用历史悠久广泛,据药智数据库统计,含补骨脂的中成药方剂有 224 种,保健食品达 52 种。补骨脂常作为传统补益类中药,亦为骨伤科要药,但近年来含补骨脂的复方制剂如骨康胶囊、仙灵骨葆口服制剂等的肝损伤风险引起关注^[2-3]。合理配伍使用是其临床应用安全有效的重要手段。武文星等^[4]采用数据挖掘分析了补骨脂的配伍特点,杜仲是与补骨脂配伍的第 4 位高频药味,2 味药物配伍组合中支持度最高的为补骨脂-当归(28.61%)和补骨脂-杜仲(28.44%)。青娥丸为杜仲配伍补骨脂的代表补肾良方,首载于宋代《太平惠民和剂局方》,现收载于《中国药典》2020 年版一部,且未见临床肝损伤相关不良反应报道,探讨补骨脂-杜仲配伍减毒作用对临床安全用药具有意义。

课题组前期用斑马鱼高效筛选验证杜仲为补骨脂配伍减毒的较优药味,并探讨了代表成分桃叶珊瑚苷对补骨脂素(psoralen, PS)的减毒作用^[5]。补骨脂化学成分复杂,主要含香豆素类、黄酮类和单萜酚类,其中香豆素类包括昔元[以 PS 和异补骨脂素

(isopsoralen, IPS) 为代表]及其糖苷[补骨脂苷(psoralenoside, PSS)和异补骨脂苷(isopsoralenoside, IPSS) 为代表],是抗骨质疏松的主要活性成分^[6-7],也是补骨脂水煎液中主要成分(约为香豆素类、黄酮类和单萜酚类 3 类成分含量之和的 90%以上),其中糖苷含量约是昔元的 8.2 倍^[8]。近年研究表明,香豆素是补骨脂潜在肝损伤风险成分之一,PS 和 IPS 都能对大鼠的肝脏系数造成一定负面影响且会引起丙氨酸代谢、甘氨酸代谢、尿素循环等通路的混乱,还可能通过抑制胆汁酸在肝脏中的排泄,使得毒素大量堆积在肝细胞中,引发肝损伤^[9-11]。体内代谢转化至关键药物的效/毒产生,补骨脂糖苷成分可脱糖基转化成昔元使毒性增加^[12]。因此,关注杜仲配伍后补骨脂香豆素类特别是糖苷成分的代谢及效/毒的多模态变化,对揭示杜仲补骨脂配伍特性与机制具有意义。

中药成分特别是量微成分的抗骨质疏松活性、毒性和代谢的在体、高效评价一直是哺乳动物试验难以克服的瓶颈。新兴的模式动物斑马鱼遗传生物特性与人类高度保守,并几乎具备人体所有主要的器官和系统,体型小,繁殖能力较强且易于饲养,适合大规模筛选^[13]。课题组前期建立斑马鱼骨质疏松模型和代谢等方法,实现多种壮骨中药及其量微成分的代谢与效/毒的多模态高效评价^[14-15]。本研究采用斑马鱼进行代谢、毒性、抗骨质疏松活性的多

模态评价, 探讨杜仲富含木脂素提取物 (lignan extract of *Eucommiae Cortex*, LEEC) 与补骨脂香豆素提取物 (coumarin extract of *Psoraleae Fructus*, CEPF) 配伍以及各自代表成分配伍, 对香豆素提取物及代表糖苷的代谢转化及效/毒影响, 以揭示二药配伍的特性。

1 材料

1.1 动物

斑马鱼成鱼购自南京尧顺禹生物科技有限公司, 为德国 Tuebingen 品系。

1.2 药品与试剂

盐补骨脂 (产地为四川, 批号 201019, 南京松龄中药饮片有限公司)、盐杜仲 (产地为贵州, 批号 20210902-01, 贵州同德药业有限公司) 由江苏省中西医结合医院采购, 以上药材经江苏省中医药研究院韦英杰研究员分别鉴定为豆科植物补骨脂 *P. corylifolia* L. 的干燥成熟果实、杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮; 对照品 PSS (批号 210306, 质量分数 > 98%)、IPSS (批号 200930, 质量分数 > 98%) 购自上海融禾医药科技有限公司; 对照品 PS (批号 110739-201918, 质量分数为 99.6%)、IPS (批号 110738-202016, 质量分数为 99.4%) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品松脂醇二葡萄糖苷 (pinoresinol diglucoside, PDG, 批号 20011401, 质量分数为 98.64%) 购自成都普菲德生物技术有限公司; LEEC 为课题组自制, PDG 质量分数为 4.02%; CEPF (批号 D191021-3) 为课题组自制, PS、IPS、PSS、IPSS 质量分数之和为 68.17%; 茜素红 (批号 K08J9C63243)、依替磷酸二钠 (批号 K22A8M34493) 购自上海源叶生物科技有限公司; 色谱级乙腈 (批号 20095191、22035238) 购自阿拉丁试剂有限公司、美国天地试剂公司; 色谱级甲酸 (批号 G1826012) 购自阿拉丁试剂有限公司; 泼尼松龙 (批号 FD050193, 质量分数为 98%) 购自萨恩化学技术上海有限公司; 多聚甲醛 (批号 20140901) 购自上海展云化工有限公司。

1.3 仪器

SMZ800N 型显微镜 (日本 Nikon 公司); SPX-80 型生化培养箱 (宁波海曙赛福实验仪器厂); 1260 型系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); N-NEVAP™ 112 型氮吹仪 (美国 Origanomation Associates 公司); KQ3200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); MS105DU 型分析天平 (瑞

士 Mettler Toledo 公司)。

2 方法

2.1 HPLC 分析补骨脂代表香豆素成分

Agilent Zorbax Extend C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0 min, 10% A; 0~30 min, 10%~50% A; 30~40 min, 50%~60% A。柱温 25 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 246 nm; 运行时间 40 min; 进样量 20 μL。分析 CEPF 配伍 LEEC 以及 PSS、IPSS 分别配伍 PDG (杜仲木脂素代表成分) 经斑马鱼作用前后的 4 个代表香豆素成分 (PSS、IPSS、PS、IPS)。

2.2 用斑马鱼评价杜仲对补骨脂香豆素类成分安全性的影响

2.2.1 供试液配制 精密称取 CEPF 和 LEEC 适量, 分别用培养基 (2.9% NaCl、0.125 8% KCl、0.485 1% CaCl₂·2H₂O、0.811 8% MgSO₄·7H₂O) 配制成质量浓度分别为 100、200、400、600、800 μg/mL (以 CEPF 计) 的 CEPF、LEEC、CEPF-LEEC (1:4)、CEPF-LEEC (1:2)、CEPF-LEEC (1:1) 和 CEPF-LEEC (2:1) 供试液。

精密称取 PSS、IPSS 以及 PDG 适量, 分别用培养基配制成 1 mg/mL 的母液, 将 PSS、IPSS 的母液分别稀释成质量浓度为 100、200、300、400、500 μg/mL 的溶液, PDG 的母液稀释成质量浓度为 100、200、400、600、800 μg/mL 的溶液, PSS、IPSS 的母液分别与 PDG 的母液按 5:2 的比例稀释成质量浓度为 100、200、300、400、500 μg/mL 的溶液 (分别以 PSS 或 IPSS 计)。

2.2.2 斑马鱼给药 胚胎由斑马鱼成鱼自由交配产生, 将胚胎放置培养基中, 在 28.5 °C 培养箱中培养 24 h。取受精后 1 d (one day after fertilization, 1 dpf) 的斑马鱼胚胎置 24 孔板中, 每孔 10 个胚胎, 30 个胚胎/组, 分别暴露于不同质量浓度的供试液中, 每孔 2 mL 溶液, 用培养基作空白对照。每天记录死亡鱼数, 于显微镜下观察鱼的形态, 并于 3 dpf 或 3~6 dpf 时于显微镜下拍照, 一直记录到 6 dpf。

2.2.3 数据分析 利用 SPSS 16.0 软件计算 6 dpf 的斑马鱼亚致死浓度 (20% lethal concentration, LC₂₀) 和半数死亡浓度 (LC₅₀)。

2.3 用斑马鱼评价杜仲配伍补骨脂对其香豆素类成分代谢的影响

2.3.1 斑马鱼分组与给药 将 1 dpf 的斑马鱼胚胎

置于 24 孔板中,设置 CEPF(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组、1CEPF : 2LEEC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 CEPF 计)组、LEEC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组、PSS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组、IPSS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组、5PSS : 2PDG (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 PSS 计)组、5IPSS : 2PDG (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 IPSS 计)组,另设置未加鱼的相应空白药物组。每孔 10 个胚胎,各质量浓度设 2 个平行组,每孔给药液 2 mL,置于 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养至 6 dpf。分别于斑马鱼暴露药液后 0、1、2、3、4、5 d 时吸取药液 2 mL,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.3.2 样品处理 将上述给药后 0~5 d 代谢液、空白药液,室温空气吹干,加 80% 甲醇 1 mL 溶解,进样 20 μL ,进行 HPLC 分析。

2.4 用斑马鱼评价杜仲配伍补骨脂对其香豆素类成分抗骨质疏松活性的影响

2.4.1 溶液配制

(1) 泼尼松龙溶液配制:精密称取泼尼松龙 9 mg,加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 1 mL 溶解,配制成 25 mmol/L 泼尼松龙储备液。取泼尼松龙储备液适量,稀释 1000 倍得到 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 溶液。

(2) 依替磷酸二钠溶液配制:精密称取依替磷酸二钠 6 mg,加入培养基 1 mL 溶解,得 6 mg/mL 依替磷酸二钠储备液。取依替磷酸二钠储备液和泼尼松龙储备液适量,用培养基稀释得含 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 泼尼松龙的 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 依替磷酸二钠溶液。

(3) 供试液的配制:分别取 CEPF、LEEC 和 25 mmol/L 泼尼松龙储备液适量,配制成含 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 泼尼松龙的 CEPF (0.1、0.5、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、LEEC (0.1、0.5、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及 1CEPF : 2LEEC (0.1、0.5、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 CEPF 计),供抗斑马鱼骨质疏松作用研究。分别取 PSS、IPSS、PDG 和 25 mmol/L 泼尼松龙储备液适量,配制成含 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 泼尼松龙的 PSS (0.08、0.4、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、IPSS (0.08、0.4、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、PDG (0.08、0.4、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、5PSS : 2PDG (0.08、0.4、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 PSS 计)及 5IPSS : 2PDG (0.08、0.4、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 IPSS 计),供抗斑马鱼骨质疏松作用研究。

2.4.2 斑马鱼分组与给药 将 3 dpf 的斑马鱼胚胎放入 24 孔板中,每孔 10 个胚胎,每组 20 个胚胎,设置 0.4% DMSO 溶媒对照组、模型组(25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 泼尼松龙)、阳性药物组(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 依替磷酸二钠)及各供试液组,每孔加入各质量浓度溶液 2 mL。将 24 孔板放入 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 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 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 配制的含 1.5% H_2O_2 漂白剂将鱼体漂白后,用茜素红对斑马鱼幼鱼头部骨骼染色,最后用 1% KOH-甘油(1:1)的透明液清洗,去除多余的染色剂。用 Image pro plus 6.0 软件计算头骨染色矿化面积和累积吸光度值。

2.4.4 数据分析 用 Excel 软件统计分析头骨染色矿化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($n=15\sim 20$),以 *t*-test 比较两组间的结果差异;运用 SPSS 16.0 软件以单因素方差分析多组间结果比较,方差齐性时用最小显著性差异法(LSD)进行组间两两比较,方差非齐性时用 Dunnett's *T3* 法进行组间两两比较。

3 结果

3.1 杜仲配伍补骨脂对其香豆素提取物/成分的安全性影响

3.1.1 LEEC 配伍 CEPF 及二者代表成分配伍对斑马鱼致畸作用的影响 斑马鱼受精 3 dpf 后孵化成幼鱼,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晰、直观。对 3 dpf 或 3~6 dpf 斑马鱼幼鱼进行动态检视并拍照,如图 1 所示,与对照组比较,CEPF (600、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组鱼出现心包肿大,卵黄囊肿大、变黑;LEEC (100~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组鱼未见明显心包、卵黄囊等形态畸变;二者不同比例(CEPF : LEEC 为 1 : 4~2 : 1)配伍后,鱼主要器官心包、卵黄囊畸变与 CEPF 的剂量相关,当 CEPF : LEEC 为 1 : 4 和 1 : 2 时,100~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 给药组鱼未见明显心包、卵黄囊等形态畸变;当 CEPF 所占比例增加,CEPF : LEEC 为 1 : 1 和 2 : 1 时,600、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 给药组鱼出现心包肿大、卵黄囊肿大或变黑,有时鱼体弯曲。提示 LEEC 在适当质量浓度时可改善 CEPF 引起的斑马鱼主要器官畸变。

补骨脂香豆素代表成分 PSS、IPSS,杜仲木脂素代表成分 PDG 及配伍各质量浓度组 3 dpf 斑马鱼心包、卵黄囊等形态未见明显变化(图 2),提示此时各药物尚未使鱼明显致畸,与此时无鱼死亡结果相对应。随着给药时间增加到 5~6 dpf 时,400~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSS、IPSS 及配伍组鱼出现死亡,且 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSS 或 IPSS 组鱼产生明显畸变,如鱼身体弯曲,鱼鳃消失;配伍 PDG 后,鱼形态均明显改善,与培养基组鱼相当。



图1 CEPF、LEEC及二者配伍组3 dpf斑马鱼幼鱼显微检视图

Fig. 1 Micrograph of zebrafish larvae exposed to CEPF, LEEC and their compatibility groups at 3 dpf

3.1.2 LEEC 配伍 CEPF 及二者代表成分配伍对斑马鱼死亡率的影响 LEEC 配伍 CEPF 致斑马鱼的死亡率与给药质量浓度和时间基本呈相关性，其给药时间-剂量-死亡率关系见图 3。根据死亡率曲线得出 6 dpf 斑马鱼死亡率为 20% 时各给药组的 LC_{20} ^[16]， LC_{20} 从小到大依次为 CEPF (159.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < 2CEPF : 1LEEC (222.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < 1CEPF : 1LEEC (552.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < 1CEPF : 2LEEC (650.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < 1CEPF : 4LEEC (696.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < LEEC (726.4

$\mu\text{g}/\text{mL}$)。 LC_{20} 越高，安全性越好，可见 LEEC 安全性最好，CEPF 安全性最差，二者配伍后，随着 CEPF 所占比例增加，安全性相应变差。

如图 3 所示，CEPF 单独给药 48 h 后，各质量浓度组鱼在 2 dpf 和 3 dpf 死亡率都小于 20%，在 72~120 h 后，200~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组鱼死亡率随着给药时间增加而增加，于 6 dpf 达 43.3%~100.0%，100.0% 死亡最低质量浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；LEEC 单独给药，除 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 6 dpf 鱼死亡率达 33.3%，

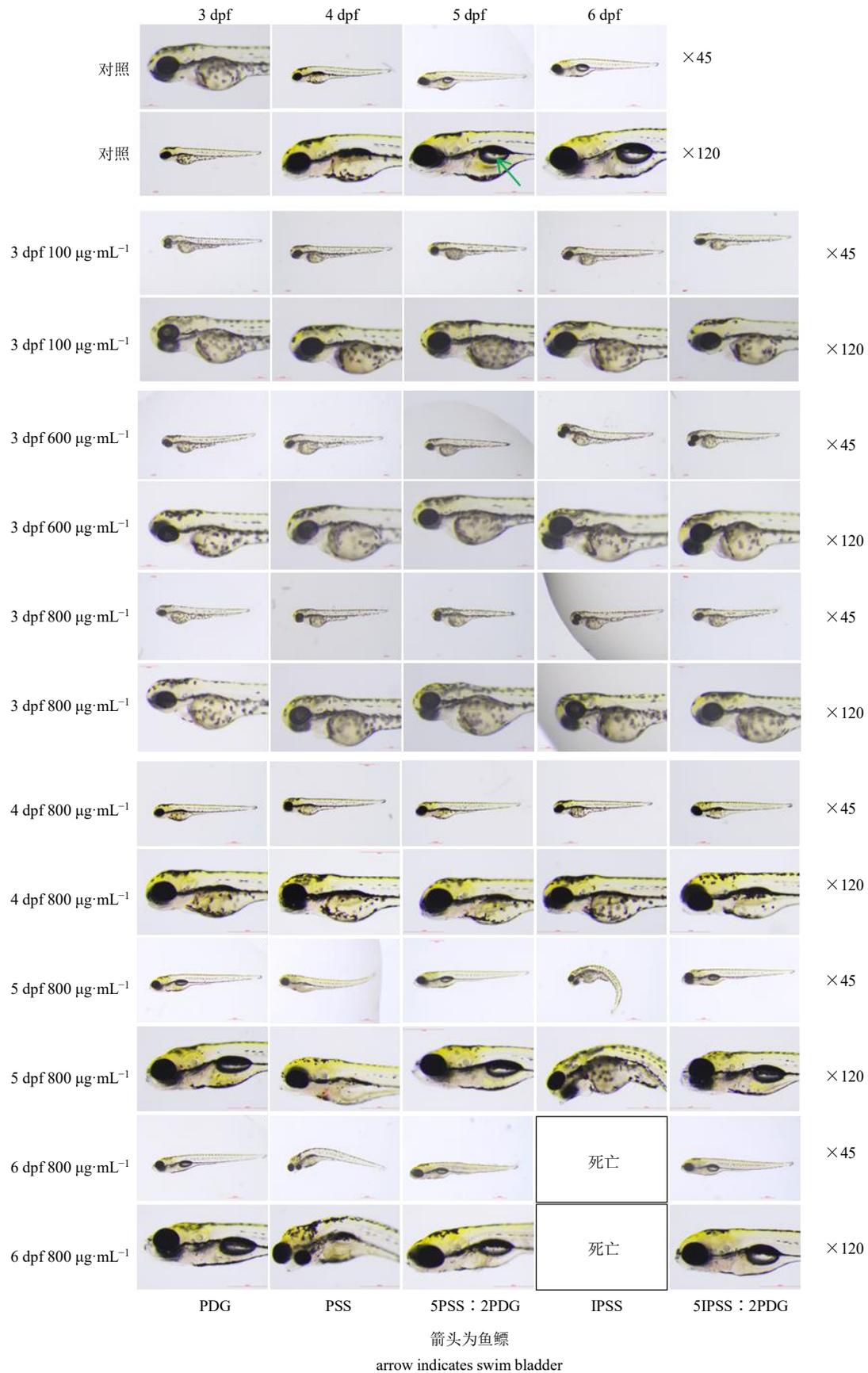


图 2 PSS、IPSS、PDG 及配伍组 3~6 dpf 斑马鱼幼鱼显微检视图

Fig. 2 Micrograph of zebrafish larvae exposed to PSS, IPSS, PDG and their respective compatibility groups at 3~6 dpf

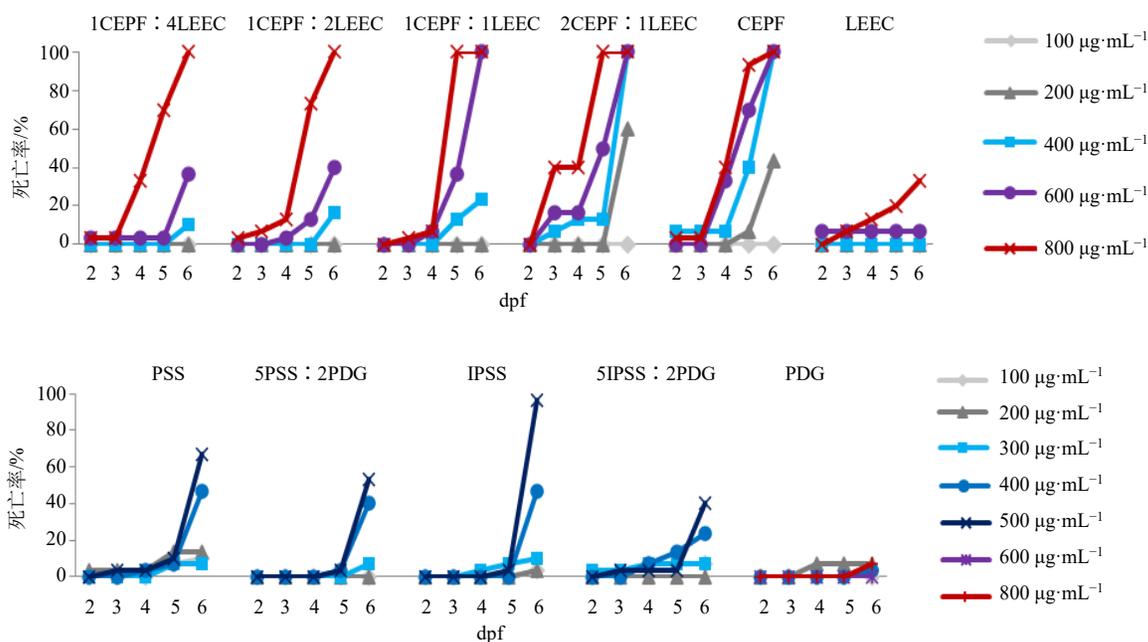


图3 LEEC 配伍 CEPF 及二者代表成分配伍致鱼死亡的时间-剂量-死亡率

Fig. 3 Time-dose-mortality of zebrafish death caused by compatibility of LEEC with CEPF and coumarin representative components of *Psoraleae Fructus*

其他各质量浓度组鱼给药期间死亡率均低于 20%；二者配伍（CEPF：LEEC 为 1：4~1：1）给药 72 h（4 dpf）后，除 1CEPF：4LEEC（800 µg/mL）组鱼死亡率为 33.3%，其他各质量浓度组鱼死亡率均小于 20%，在 120 h 后，600~800 µg/mL 给药组鱼死亡率增加大于 20%，100.0%死亡最低质量浓度为 600 µg/mL，但当 CEPF：LEEC 为 2：1 时，鱼死亡的时间-剂量关系与 CEPF 单独给药基本相当。提示二者配伍在一定比例（CEPF：LEEC 为 1：4~1：1）时，致鱼死亡质量浓度提高，死亡时间延迟，具有减毒作用。

补骨脂香豆素代表成分 PSS 和 IPSS 与杜仲木脂素代表成分 PDG 分别配伍的 6 dpf 斑马鱼 LC₂₀ 从小到大依次为：PSS（268.8 µg/mL）<IPSS（304.7 µg/mL）<5PSS：2PDG（512.3 µg/mL）<5IPSS：2PDG（538.6 µg/mL）。PDG 各质量浓度组鱼给药期间几乎无死亡（死亡率<6.7%）。可见 PSS 和 IPSS 配伍 PDG 后，LC₂₀ 值增加近 1 倍。

PSS、IPSS 及分别配伍 PDG，给药 96 h（5 dpf）后，各质量浓度组斑马鱼死亡率均低于 20%；给药 120 h 后，PSS（400、500 µg/mL）组死亡率上升为 46.7%、66.7%，分别比配伍 PDG 组高 6.7%、13.4%；IPSS（400、500 µg/mL）组死亡率上升为 46.7%、

96.7%，分别比配伍 PDG 组高 23.4%、56.7%。

3.1.3 LEEC 配伍 CEPF 及二者代表成分配伍对斑马鱼 LC₅₀ 的影响 测试药对斑马鱼的 LC₅₀ 越小，表明其致鱼死亡的给药质量浓度越低，毒性越大。如图 4 所示，LC₅₀ 以给药总量计，CEPF 的 LC₅₀ 值（209.3 µg/mL）最小，毒性最大，配伍 LEEC 后，组合物的 LC₅₀ 值随着 CEPF 的比例减小而增加，其中 1CEPF：2LEEC 和 1CEPF：4LEEC 组合物的 LC₅₀ 值大于二药单用，是 CEPF 的 LC₅₀ 值的 8.3、14.3 倍，提示 LEEC 可明显降低 CEPF 的毒性。

补骨脂香豆素代表成分 PSS 与 IPSS 单用至 6 dpf 鱼的 LC₅₀ 值分别为 441.7、387.5 µg/mL，配伍杜仲代表木脂素成分 PDG 后，LC₅₀ 值均增加，分别为 654.9、809.1 µg/mL，提示配伍 PDG 后毒性减小。PDG 单用安全性好，各质量浓度致斑马鱼死亡率低（小于 10%），未能计算出 LC₅₀ 值。

3.2 LEEC 配伍 CEPF 及二者代表成分配伍对斑马鱼代谢的影响

LEEC 与 CEPF 及代表成分配伍经斑马鱼作用后 0~5 d 的 HPLC 图见图 5。以补骨脂香豆素糖苷（PSS、IPSS）及其代谢物（PS、IPS）为指标，计算各自占 4 种香豆素成分含量总和的百分比计为相对质量分数^[12]，结果见图 6。

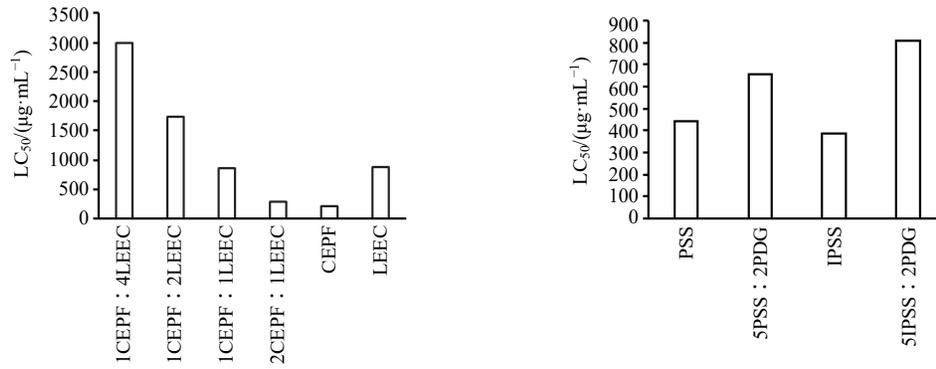


图 4 LEEC 配伍 CEPF 及二者代表成分配伍对斑马鱼 LC₅₀ 的影响

Fig. 4 Effect of compatibility of LEEC with CEPF and coumarin representative components of *Psoraleae Fructus* on LC₅₀ of zebrafish (6 dpf)

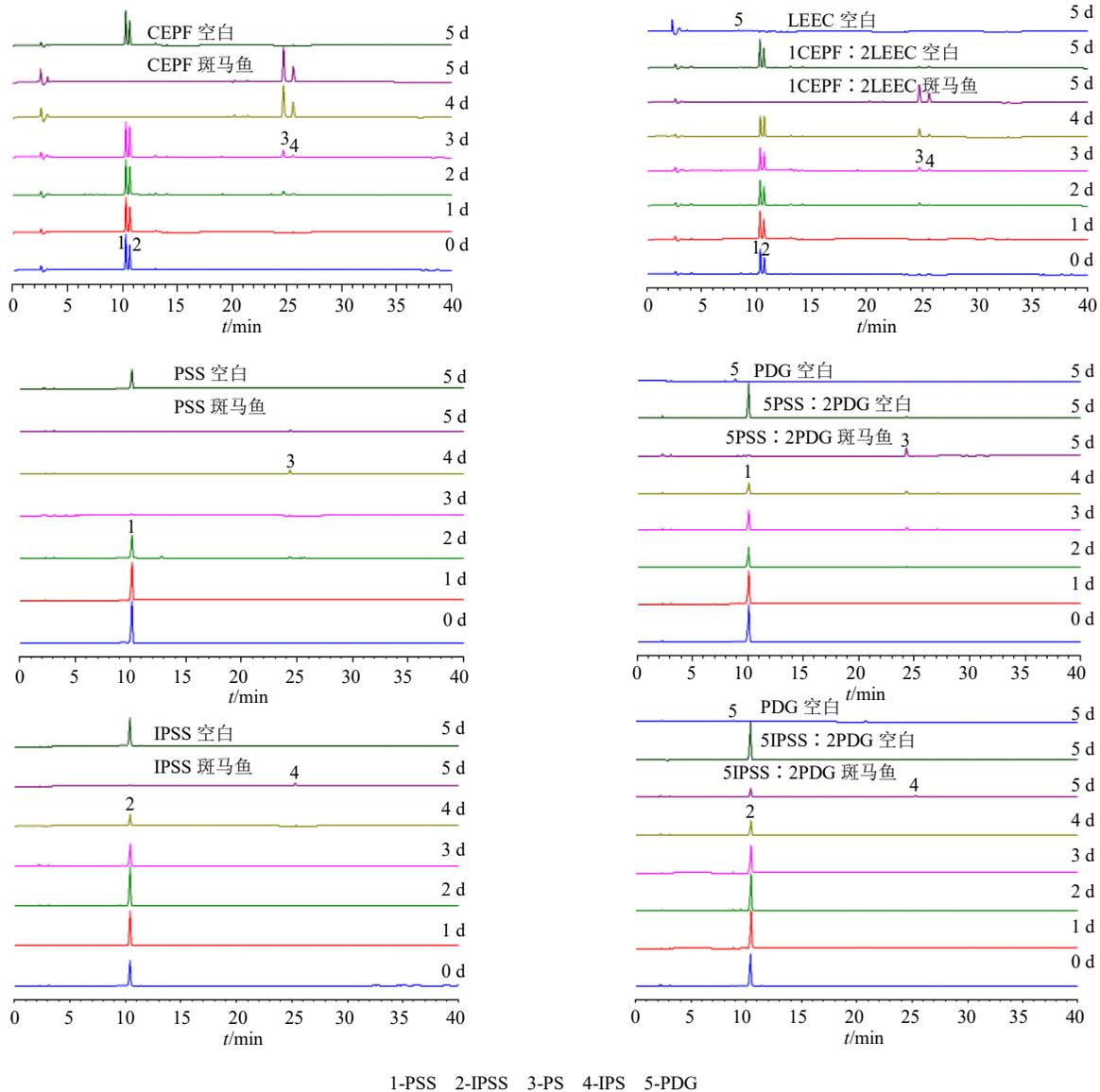


图 5 LEEC 配伍 CEPF 及二者代表成分配伍经斑马鱼作用 0~5 d 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC chromatogram of LEEC, CEPF, representative components and their respective combination after exposing to zebrafish for 0—5 d

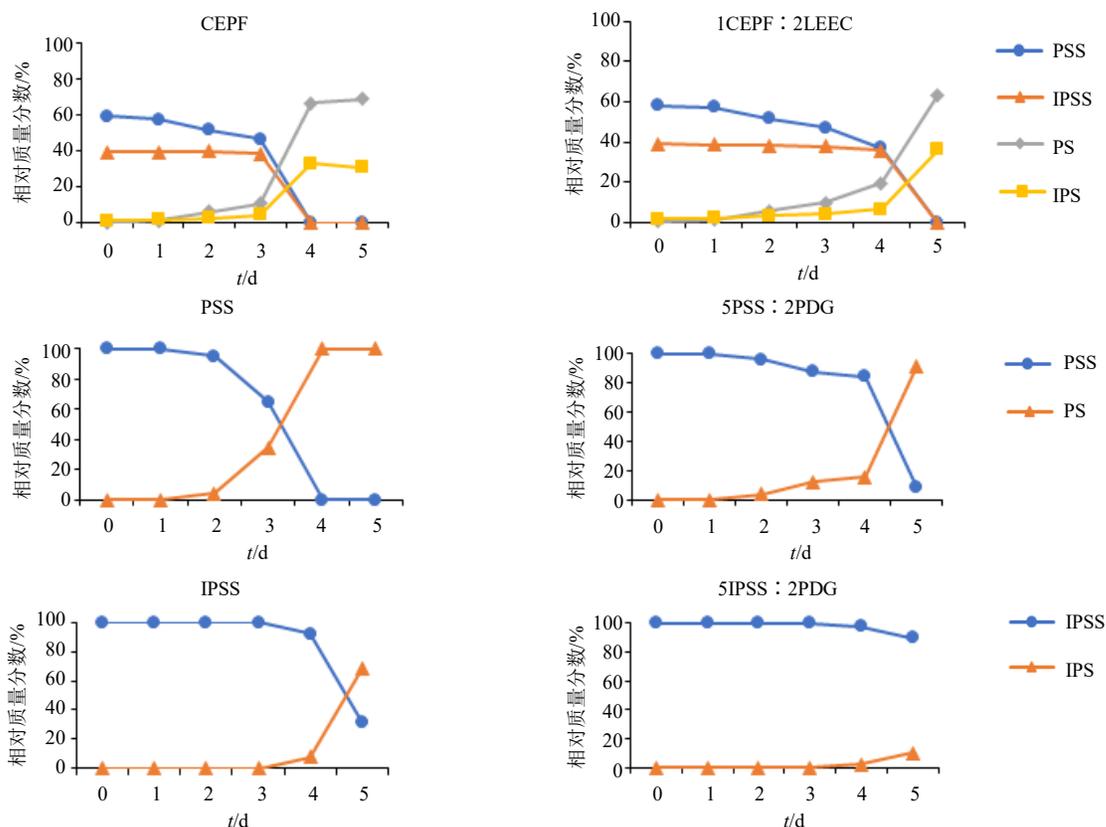


图6 斑马鱼作用后补骨脂香豆素代表成分 (PSS、IPSS、PS、IPS) 含量变化

Fig. 6 Changes in contents of representative components of *Psoraleae Fructus* coumarin (PSS, IPSS, PS, IPS) after zebrafish treatment

CEPF 单独给予 1 dpf 斑马鱼 1~3 d (2~4 dpf) 后, 少部分 PSS (约 12.9%) 和 IPSS (约 1.0%) 缓慢脱糖基分别转化为 PS 和 IPS, 至给药后 4 d (5 dpf) 后代谢速率明显增加, PSS 和 IPSS 全部转化为 PS 和 IPS, 其相对质量分数分别为 67.0% 和 33.0%; 至给药后 5 d (6 dpf), PS、IPS 含量相对稳定不变。配伍 LEEC 后, PSS 和 IPSS 代谢速率明显减慢, 至给药后 4 d (5 dpf), 仅少部分 PSS (约 20.9%) 和 IPSS (约 2.9%) 转化为 PS 和 IPS, 直至给药后 5 d (6 dpf) 才全部转化为 PS 和 IPS。

补骨脂香豆素糖苷代表成分 PSS 和 IPSS, 分别单独给予 1 dpf 斑马鱼 2 d (3 dpf) 或 3 d (4 dpf) 后均相对稳定, 相应代谢物 PS 或 IPS 检测不到或很少 (小于 5.0%)。PSS 在给药后 3~4 d (4~5 dpf) 代谢速率加快, 相对质量分数分别降至 65.1% 和 0.0%, 其代谢物 PS 的相对质量分数相应增加至 34.9% 和 100.0%, 配伍 PDG 后, PSS 代谢速率减慢, 在给药后 4 d 的相对质量分数仍为 84.0%, 直至给药后 5 d (6 dpf) 才降至 8.3%; IPSS 在给药后 5 d (6 dpf) 代谢速率加快, 相对质量分数由 4 d (5

dpf) 的 92.3% 降至 32.1%, 其代谢物 IPS 的相对质量分数由 7.7% 增加至 67.9%, 配伍 PDG 后, IPSS 代谢速率亦减慢, 给药后 5 d (6 dpf) 相对质量分数仅降至 89.9%, 较单独给药高出 57.8%。

3.3 杜仲配伍补骨脂对其香豆素提取物/成分的骨质疏松活性影响

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 7, 图像分析软件所得结果见图 8。与溶媒对照组比较, 模型组的斑马鱼头骨染色矿化面积和累积吸光度值明显降低 ($P < 0.05, 0.001$), 表明 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙造模成功; 与模型组比较, 依替膦酸二钠组矿化面积或累积吸光度值显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), CEPF (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 组、LEEC (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 组以及二者配伍 (0.5、2.5 $\mu\text{g/mL}$) 组矿化面积显著增加 ($P < 0.05$), CEPF、LEEC 及二者配伍 1CEPF:2LEEC 各质量浓度 (0.1、0.5、2.5 $\mu\text{g/mL}$) 组累积吸光度值均显著增加 ($P < 0.01, 0.001$), CEPF 配伍 LEEC (0.5、2.5 $\mu\text{g/mL}$) 组的矿化面积和累积吸光度值高于相同质量浓度 CEPF、LEEC 单独给药, 其中 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 配伍组的累积吸

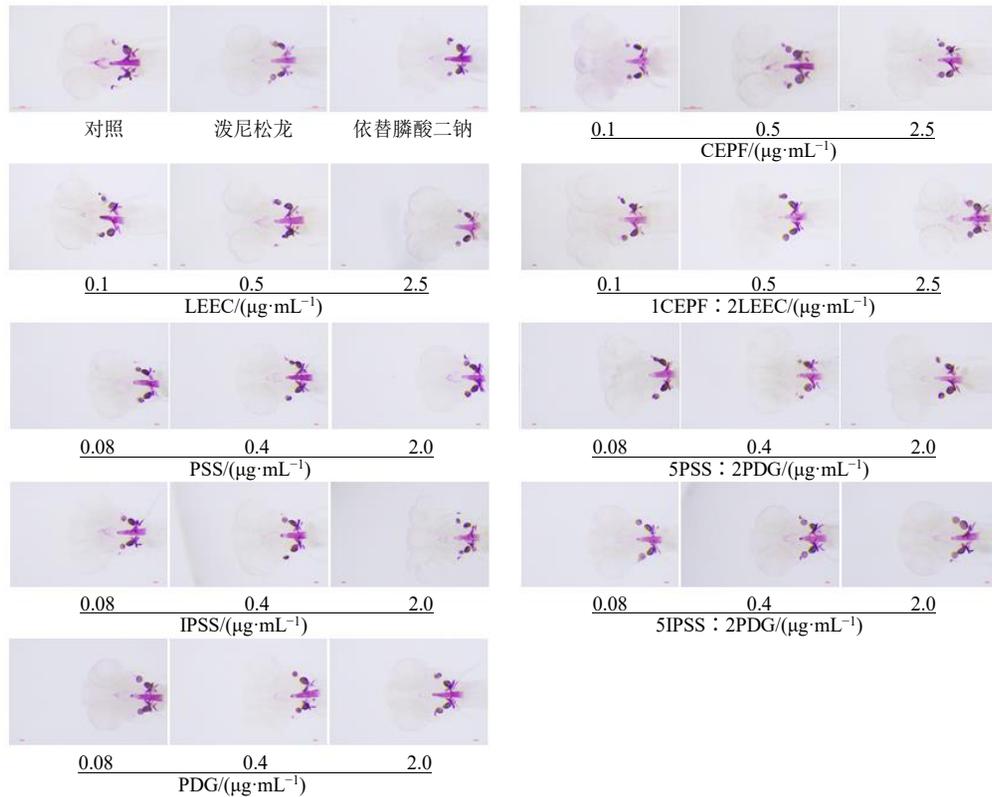
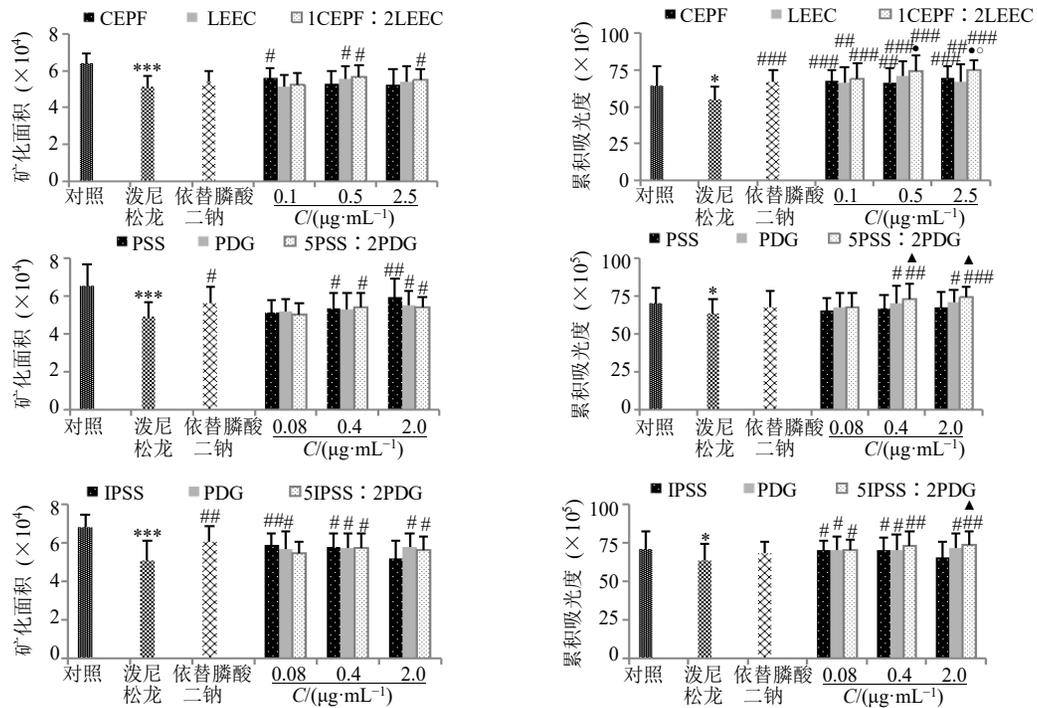


图 7 斑马鱼幼鱼头骨 (8 dpf) 茜素红染色显微成像图 (×120)

Fig. 7 Ventral view of alizarin red whole-mount preparations of juvenile zebrafish cranium (8 dpf, × 120)



与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 CEPF 组比较: * $P < 0.05$; 与 LEEC 组比较: ° $P < 0.05$; 与 PSS 或 IPSS 组比较: ▲ $P < 0.05$
 * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs solvent control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group; * $P < 0.05$ vs CEPF group; ° $P < 0.05$ vs LEEC group; ▲ $P < 0.05$ vs PSS or IPSS group

图 8 斑马鱼幼鱼 (8 dpf) 头骨茜素红染色面积和累积吸光度值 ($\bar{x} \pm s, n = 15 \sim 20$)

Fig. 8 Stained area and cumulative optical density of alizarin red in zebrafish cranium (8 dpf) ($\bar{x} \pm s, n = 15 \sim 20$)

光度值显著高于 CEPF 或 LEEC 单独给药 ($P < 0.05$), 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 配伍组的累积吸光度值显著高于 CEPF 单独给药 ($P < 0.05$)。

PSS (0.4、2.0 $\mu\text{g/mL}$) 组、PDG (2.0 $\mu\text{g/mL}$) 组以及 0.4、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 二者配伍 (5PSS : 2PDG) 组矿化面积较模型组显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01), PDG 及其与 PSS 配伍 (0.4、2.0 $\mu\text{g/mL}$) 组累积吸光度值均显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且配伍组累积吸光度值高于二者相同质量浓度单独给药, 其中 0.4、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 配伍组累积吸光度值显著高于 PSS 单独给药 ($P < 0.05$)。

IPSS (0.08、0.4 $\mu\text{g/mL}$) 组、PDG 各质量浓度组以及 0.4、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 二者配伍 (5IPSS : 2PDG) 组矿化面积较模型组均显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01), 除 IPSS (2.0 $\mu\text{g/mL}$) 组外, 各质量浓度 (0.08、0.4、2.0 $\mu\text{g/mL}$) 的 IPSS、PDG 及二者配伍组累积吸光度值均显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01), 且配伍组累积吸光度值高于二者相同质量浓度单独给药, 其中 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 配伍组累积吸光度值显著高于 IPSS 单独给药 ($P < 0.05$)。

4 讨论

近年来, 含补骨脂相关制剂引起的肝损伤不良反应受到关注, 配伍减毒是其临床安全用药的有效手段。源于宋代《太平惠民和剂局方》的青娥丸以杜仲-补骨脂药对为君药和臣药, 临床用药安全有效, 故研究杜仲配伍补骨脂的减毒作用具有代表性, 为补骨脂临床安全配伍用药提供参考。

药物的毒/效产生与其在体内的代谢转化紧密相关, 故综合考虑代谢-效/毒的变化能更好体现药物配伍的整合作用。而采用活体动物实验是确定药物的有效性与安全性的必需环节。如何实现高效、规模化的评价至关重要, 近年来斑马鱼因遗传特性与人类高度保守等优点而被广泛用于探索药物药理、毒理及代谢等研究, 此外斑马鱼易于饲养, 繁殖能力较强, 体外受精卵发育迅速, 主要器官在受精后 5 d 均已基本形成, 头骨在受精后 8~9 d 也已发育完整, 幼鱼全身透明, 适合显微镜下实时动态观察, 体小适合微板中实验, 实现大规模筛选^[17-18]。

广义上讲, 模态是指通过不同渠道和媒介获得的模式数据或符号系统, 包括文字、图像、视频、声音甚至知识图谱。而 2 种以上模态的交叉或者一种模态下多类测量指标的融合均可称为多模态。多模态在药物筛选、多模态影像、多模态单细胞组学

等方兴未艾^[19]。张伯礼院士团队^[19]从中医药整体观出发, 提出中药药效物质多模态辨识, 指综合运用化学分析、影像学、多组学以及信息学等学科技术, 在微观、介观、宏观等多个尺度辨析中药化学组成与生物效应间的相关性, 并运用模式识别、机器学习等智能计算方式融合多模态信息, 从而辨识中药药效物质及其整合调节作用。斑马鱼模型具有活体成像优势, 对 1 个或多个图像指标进行观测, 结合分子生物学变化, 越来越多地用于多模态水平开展中药药效物质研究^[20]。本研究整合斑马鱼活体成像, 头骨染色图像、致死量、成分转化等多指标分析, 实现反应代谢-毒/效的多模态评价。

以糖苷 (PSS 和 IPSS) 为代表的补骨脂香豆素类成分是其传统水煎液的主要成分, 故本研究探讨 LEEC 配伍 CEPF 及二者代表成分配伍后的代谢、毒性及抗骨质疏松活性变化, 以期揭示二药配伍的机制。斑马鱼毒性评价发现, CEPF 单独用药致斑马鱼的死亡率和致心包、卵黄囊等形态畸变均大于 LEEC, 200~800 $\mu\text{g/mL}$ CEPF 致鱼死亡主要在给药 72~120 h (4~6 dpf) 逐渐增加, 二者不同比例组合后, 随着 LEEC 的占比增加 (50%~80%), 致鱼死亡质量浓度 (600~800 $\mu\text{g/mL}$) 较 CEPF 单用提高, 死亡时间延迟约 24 h, 死亡率也相应降低, 且 6 dpf 斑马鱼的 LC_{50} 值相应逐步提高, 提示具减毒作用。杜仲木脂素代表成分 PDG 配伍补骨脂香豆素代表糖苷 PSS 和 IPSS 致斑马鱼死亡具有相似减毒结果, 给药 120 h 后, 明显降低 PSS 或 IPSS (400、500 $\mu\text{g/mL}$) 组鱼死亡率 (最高降低 56.7%), 6 dpf 的 LC_{50} 值也分别增加。

斑马鱼代谢研究发现, CEPF 单独给予 1 dpf 斑马鱼, 主要成分 PSS 和 IPSS 在给药后 4 d (5 dpf) 代谢速率明显增加, 分别全部脱糖基转化为 PS 和 IPS, 配伍 LEEC 后, PSS 和 IPSS 代谢速率明显减慢, 直至给药后 5 d (6 dpf) 才全部转化为 PS 和 IPS。同样杜仲木脂素成分 PDG 配伍可减慢 PSS 和 IPSS 的代谢速度。PS 和 IPS 是补骨脂肝损伤相关成分^[21-23], 补骨脂 CEPF 及 PSS 和 IPSS 致鱼死亡或畸变与代谢物 PS 和 IPS 的产生密切相关, 杜仲 LEEC 及 PDG 配伍使 PS 和 IPS 产生减慢, 是减毒的重要因素。

用泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松模型评价, 以 8 dpf 斑马鱼头骨矿化面积和累积吸光度值为指标, 结果表明, LEEC 配伍 CEPF (0.5、2.5 $\mu\text{g/mL}$) 组

的累积吸光度值显著高于相同质量浓度 CEPF 和/或 LEEC 单独给药。PDG 配伍 PSS 或 IPSS (0.4、2.0 $\mu\text{g/mL}$) 组累积吸光度值显著高于 PSS 或 IPSS 单独给药。斑马鱼头骨累积吸光度值相当于骨质疏松评价金指标“骨密度”,可见上述配伍组合有一定增强抗骨质疏松活性的作用。

综上,用斑马鱼评价发现杜仲配伍对补骨脂香豆素类成分的代谢、毒性及抗骨质疏松活性的多模态变化,发现配伍使糖苷转化为毒性苷元的速度减慢与减毒作用相关,配伍尚能增强抗骨质疏松活性。该方法对中药配伍的效/毒作用起到了快速与精准的辨识,为评价壮骨中药配伍组合的减毒增效作用提供了有意义的方法与构想。

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: 195.
- [2] 国家食品药品监督管理总局网. 警惕仙灵骨葆口服制剂引起的肝损伤风险 [J]. 中国乡村医药, 2017, 24(6): 68.
- [3] 吴晓燕, 赫俊杰, 阎星旭, 等. 基于“有故无殒”的补骨脂对不同肾虚证模型大鼠肝脏功能的影响 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 434-441.
- [4] 武文星, 郭盛, 尚尔鑫, 等. 基于数据挖掘的补骨脂药用源流及其配伍用药特点分析 [J]. 世界中医药, 2022, 17(10): 1405-1414.
- [5] 宁青, 刘中秋, 韦英杰, 等. 基于斑马鱼在体模型高效筛选补骨脂配伍减毒研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 54-61.
- [6] 杨阔, 高茸, 马亚中, 等. 补骨脂素药理作用及肝毒性机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 289-298.
- [7] Ge L N, Cui Y Z, Cheng K, *et al.* Isopsoralen enhanced osteogenesis by targeting AhR/ER α [J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2600.
- [8] 李佳妍, 刘欣欣, 宁青, 等. 基于斑马鱼模型的补骨脂毒性相关成分群的高效辨识研究 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 129-136.
- [9] 王宇. 补骨脂毒性成分发现及其抗抑郁有效部位制备方法研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [10] Yu Y L, Wang P L, Yu R L, *et al.* Long-term exposure of psoralen and isopsoralen induced hepatotoxicity and serum metabolites profiles changes in female rats [J]. *Metabolites*, 2019, 9(11): 263.
- [11] Wang Y, Zhang H, Jiang J M, *et al.* Hepatotoxicity induced by psoralen and isopsoralen from *Fructus Psoraleae*: Wistar rats are more vulnerable than ICR mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 125: 133-140.
- [12] 刘欣欣, 宁青, 王荣, 等. 斑马鱼毒性-代谢关联分析法评价补骨脂香豆素及其糖苷成分安全性 [J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(24): 2000-2005.
- [13] Barbazuk W B, Korf I, Kadavi C, *et al.* The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes [J]. *Genome Res*, 2000, 10(9): 1351-1358.
- [14] 王长梅, 韦英杰, 贾晓斌, 等. 泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松模型的建立 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 509-514.
- [15] 宁青, 韦英杰, 王丹丹, 等. 斑马鱼药物代谢模型的适用性研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1231-1236.
- [16] Majewski M, Majewski M, Kasica N, *et al.* Fresh garlic juice versus aged garlic extract. Determination of lethal concentration (LC₂₀ and LC₅₀) values on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae [J]. *J Elem*, 2017, 22(4): 1495-1505.
- [17] 李懿, 刘夏进, 宿树兰, 等. 模式生物斑马鱼在中药活性筛选和毒性评价中的应用进展与展望 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(5): 715-720.
- [18] Zhang Y, Xia Q, Wang J B, *et al.* Progress in using zebrafish as a toxicological model for traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114638.
- [19] 武雨含, 李敏, 刘豪, 等. 中药药效物质辨析技术: 现状与未来 [J]. 中国科学: 生命科学, 2022, 52(6): 943-956.
- [20] 陈静, 赵璐, 王毅. 模式生物斑马鱼在中药药效物质多模态辨识中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3387-3394.
- [21] Zhang C, Zhao J Q, Sun J X, *et al.* Psoralen and isopsoralen from *Psoraleae Fructus* aroused hepatotoxicity via induction of aryl hydrocarbon receptor-mediated CYP1A2 expression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 297: 115577.
- [22] Huang J Y, Wang Q, Chen M Y, *et al.* Effects of psoralen on hepatic bile acid transporters in rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40(6): 1012-1021.
- [23] Yu Y, Yu R, Men W, *et al.* Psoralen induces hepatic toxicity through PERK and ATF6 related ER stress pathways in HepG2 cells [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2020, 30(1): 39-47.

[责任编辑 李亚楠]