

## • 药理与临床 •

## 基于斑马鱼模型的补骨脂不同炮制品水提物急性毒性及肝毒性差异比较

赵竟成<sup>1</sup>, 李治建<sup>1,2\*</sup>, 霍仕霞<sup>1,2</sup>, 祖力皮卡尔·吾斯曼<sup>2</sup>, 钟雅韵<sup>3</sup>, 张数数<sup>1</sup>, 高姝燕<sup>2</sup>, 麦丽克姆·麦图如孜<sup>1</sup>, 张云<sup>3,4\*</sup>

1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011
2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 新疆 乌鲁木齐 830049
3. 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
4. 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

**摘要:** 目的 根据历代医籍和本草记载的炮制方法, 对比补骨脂 *Psoraleae Fructus* 不同炮制品水提物的急性毒性和肝毒性差异, 为补骨脂的炮制方法使用提供参考。方法 采用超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱和标准曲线法对补骨脂生品和补骨脂不同炮制品水提物进行补骨脂素和异补骨脂素的含量测定, 并以 AB 野生型斑马鱼、Tg (*lfabp*: EGFP) 肝脏细胞绿色荧光标记转基因斑马鱼和 Tg (*lysc*: DsRed2) 中性粒细胞红色荧光标记转基因斑马鱼为实验动物模型, 给予补骨脂生品和补骨脂不同炮制品的水提物通过观察补骨脂不同炮制品对斑马鱼的半数致死浓度 (median lethal concentration, LC<sub>50</sub>)、最小致死浓度 (minimum lethal concentration, LC<sub>1</sub>)、斑马鱼形态变化、畸形评分等的影响, 比较补骨脂不同炮制品的急性毒性差异。通过观察不同给药组对斑马鱼肝脏荧光强度、肝脏面积和体积、肝脏病理切片情况、肝脏区域中性粒细胞数量的影响, 以及检测炎症相关基因的 mRNA 水平变化情况, 综合评价补骨脂不同炮制品的肝毒性差异。结果 补骨脂不同炮制品水提物中补骨脂素和异补骨脂素含量存在差异, 补骨脂生品中补骨脂素和异补骨脂素含量最高, 雷公法制品中异补骨脂素含量最低, 清炒法制品中补骨脂素含量最低。补骨脂不同炮制品水提物急性毒性存在差异, 补骨脂生品水提物会导致斑马鱼出现严重的急性毒性, 表现为出现心包水肿、脊柱弯曲、鱼鳃消失、卵黄囊吸收延滞, 而不同炮制品中补骨脂雷公法制品的急性毒性减毒效果最优, 补骨脂酒炙法制品、补骨脂盐炙法制品和补骨脂清炒法制品急性毒性的减毒效果依次减弱。补骨脂生品水提物会导致斑马鱼出现严重的肝毒性, 包括肝脏结构缺失、肝脏荧光强度减弱、肝脏荧光面积和体积减少、肝脏细胞间出现空泡化, 并导致肝脏区域的中性粒细胞聚集, 上调炎症相关因子表达水平。基于斑马鱼模型不同炮制法中补骨脂雷公法的肝毒性减毒效果最优, 补骨脂酒炙法和补骨脂清炒法肝毒性的减毒效果依次减弱, 而补骨脂盐炙法则增强肝毒性毒效果。结论 不同炮制法对补骨脂急性毒性均有减毒作用, 这可能与补骨脂素和异补骨脂素含量的减少有关, 对肝毒性的影响存在差异。基于斑马鱼模型雷公法炮制对急性毒性和肝毒性的减毒效果最佳, 且通过减少肝脏区域炎症发生和中性粒细胞的聚集减轻了补骨脂的肝毒性, 而盐炙法则增加肝脏区域炎症发生和中性粒细胞聚集加重肝毒性。

**关键词:** 补骨脂; 炮制品; 水提物; 急性毒性; 肝毒性; 斑马鱼; 炎症; 补骨脂素; 异补骨脂素

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)01-0101-13

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.012

## Comparison of acute toxicity and hepatotoxicity of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* based on zebrafish model

ZHAO Jingcheng<sup>1</sup>, LI Zhijian<sup>1,2\*</sup>, HUO Shixia<sup>2</sup>, Zulipikaer Wusiman<sup>2</sup>, ZHONG Yayun<sup>3</sup>, ZHANG Shushu<sup>1</sup>, GAO Shuyan<sup>2</sup>, Malikam Maturzi<sup>1</sup>, ZHANG Yun<sup>3,4</sup>

收稿日期: 2023-07-11

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (82060782); 国家自然科学基金地区科学基金项目 (82160821); 天山英才项目 (2022TSYCLJ009, 2022TSYCCX0021); 自治区重点研发项目 (2022B03012-4); 中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)-青年岐黄学者, 国家岐黄学者; 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; 自治区自然科学基金资助项目(2022D01B191)

作者简介: 赵竟成, 男, 硕士研究生, 研究方向为药理学。Tel: 18268095165 E-mail: ZhaoAway@oulook.com

\*通信作者: 张云, 女, 研究员, 主要从事药理学研究。Tel: (0531)82605322 E-mail: xiaohan\_0818@163.com

李治建, 男, 博士生导师, 研究方向为药理毒理学。E-mail: lizhijian0220@sina.com

1. College of Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Uyghur Medical Hospital of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830049, China
3. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China
4. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Jinan 250103, China

**Abstract: Objective** To compare the acute toxicity and hepatotoxicity of water extracts from different processed products of Buguzhi (*Psoraleae Fructus*) according to the processing methods recorded in medical books and materia medica in past dynasties, and provide the reference for the use of processing methods of *Psoraleae Fructus*. **Methods** The contents of psoralen and isopsoralen in water extracts of raw and processed *Psoraleae Fructus* were determined by ultra performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry and standard curve method. Wild-type AB zebrafish, transgenic zebrafish Tg (*lfabp*: EGFP) with green fluorescent labeling of liver cells and transgenic zebrafish Tg (*lysc*: DsRed2) with red fluorescent labeling of neutrophils were taken as experimental research model. The water extracts of raw and processed *Psoraleae Fructus* were given. By observing the effects of different processed *Psoraleae Fructus* on the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and minimum lethal concentration (LC<sub>1</sub>), morphological changes and deformity scores of zebrafish, the acute toxicity differences of different processed *Psoraleae Fructus* were compared. By observing the effects of different drug groups on the fluorescence intensity, liver area and volume, liver pathological sections and the number of neutrophils in the liver area of zebrafish, and detecting the changes in mRNA levels of inflammation-related genes, the hepatotoxicity differences of different processed products of *Psoraleae Fructus* were comprehensively evaluated. **Results** The contents of psoralen and isopsoralen in different processed products of *Psoraleae Fructus* were different. The content of psoralen and isopsoralen in raw products of *Psoraleae Fructus* was the highest, the content of isopsoralen in Leigong products was the lowest, and the content of psoralen in stir-fried products was the lowest. The acute toxicity of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* was different. The water extracts from raw products of *Psoraleae Fructus* led to serious acute toxicity of zebrafish, such as pericardial edema, spinal curvature, the disappearance of the swim bladder and delayed absorption of the yolk sac. Among the products processed by different methods, the acute toxicity attenuation effect of *Psoraleae Fructus* by the Leigong method was the best, and the acute toxicity attenuation effects of *Psoraleae Fructus* by wine, *Psoraleae Fructus* by salt and *Psoraleae Fructus* by stir-frying method were weakened in turn. The water extract of *Psoraleae Fructus* could cause serious hepatotoxicity in zebrafish, including loss of liver structure, weakening of liver fluorescence intensity, reduction of liver fluorescence area and volume, vacuolation between liver cells, and aggregation of neutrophils in the liver area, which could promote the expression level of inflammation-related factors. Among the different processing methods, the Leigong method of *Psoraleae Fructus* had the best attenuation effect on liver toxicity, while the methods of frying *Psoraleae Fructus* with wine and frying *Psoraleae Fructus* had weakened the attenuation effect on liver toxicity in turn, while the method of roasting *Psoraleae Fructus* with salt had enhanced the attenuation effect on liver toxicity. **Conclusion** Different processing methods have attenuated the acute toxicity of *Psoraleae Fructus*, this may be related to the decrease of psoralen and isopsoralen content, but their effects on liver toxicity are different. The Leigong method has the best attenuation effect on acute toxicity and hepatotoxicity, and reduces the hepatotoxicity of *Psoraleae Fructus* by reducing inflammation and neutrophil aggregation in liver area, while the salt roasting method increases inflammation and neutrophil aggregation in liver area and aggravates hepatotoxicity.

**Key words:** *Psoraleae Fructus*; processed products; water extract; acute toxicity; hepatotoxicity; zebrafish; inflammation; psoralen; isopsoralen

补骨脂是豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实,在我国被广泛用作补益中药,《中国药典》2020年版中有63种含补骨脂的成方制剂<sup>[1]</sup>。然而近年来,越来越多的研究报道了补骨脂的不良反应,尤其是肝损害<sup>[2-5]</sup>。国家药品监督管理局先后通报了补骨脂及部分制剂致肝损伤的风险。古代本草认为制补骨脂有毒,通过炮制可降低其毒性。历代医籍和本草记载了多种补骨脂炮制方法<sup>[6]</sup>。补骨脂的炮制方法始载于《雷公炮灸论》:“凡使,

性本大燥,毒,用酒浸一宿后,漉出,却用东流水浸三日夜,却,蒸,从巳至申,出,日干用”,宋代《证类本草》记载:“补骨脂一斤,酒浸一宿,放干,却用乌油麻一斤和炒,令麻子声绝,即播去,只取补骨脂,为末”<sup>[7]</sup>。又如宋代《圣济总录》记载:“炒令黄焦”<sup>[8]</sup>。另从古至今记载有药汁制、童便制、焙制等炮制方法<sup>[9]</sup>,《寿世保元》并参考《中国药典》盐炙法,维吾尔医也常用盐炙法炮制补骨脂<sup>[10]</sup>。不同炮制法对补骨脂减毒效果的影响尚缺少系统的比

较和研究<sup>[1]</sup>。斑马鱼近年来已成为用于药物活性筛选和安全性评价的新兴模式动物<sup>[12]</sup>。斑马鱼繁殖速度快、产卵数量高，胚胎和个体较小，通体透明且发育迅速，通常从受试物在斑马鱼上进行暴露到完成评价实验仅需3 d左右，可开展实验室条件下短周期低成本的多样本快速评价。转基因荧光标记斑马鱼可在对应激发光下显现标记位置，如本研究使用的肝脏细胞绿色荧光标记转基因斑马鱼 Tg (*lfabp*: EGFP)在激发光下可通过观察记录其清晰的荧光肝脏形态，定量分析斑马鱼肝脏荧光面积、荧光强度和荧光 3D 成像体积，为器官形态观察与指标测量提供方便。同时基因测序表明斑马鱼与人类基因同源性高达 87%，斑马鱼肝脏和机体免疫炎症细胞对外源性药物的反应与人类高度相似。斑马鱼属于非哺乳类脊椎动物，在实验动物伦理方面的限制小，符合实验动物福利保护的“3R”原则。

为此本研究选取历代医籍记载的炮制方法，利用斑马鱼为模型，系统比较不同炮制方法对补骨脂减毒效果的影响，为优选补骨脂炮制方法提供参考，为补骨脂安全的开发利用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

斑马鱼养殖系统（北京爱生科技有限公司）；XW-80A 型混合仪（上海沪西分析器厂）；HPG280BX 型光照培养箱（哈尔滨东联电子技术开发有限公司）；Agilent 1290 UPLC 仪（美国安捷伦有限公司）；API 4000 三重四级杆质谱（美国 SCIEX 公司）；FSX16 型体视荧光显微镜（日本 Olympus 公司）；RM2245 型切片机（德国 Leica 公司）；KD-BMII 型生物组织自动包埋机、KD-TS3D 型生物组织自动脱水机（浙江科迪仪器设备有限公司）；KZPG-1A 型摊片烤片机（天津天利航空机电有限公司）；PCRSCIENTZ-II D 型超声破碎机（浙江新芝生物科技股份有限公司）；Allegra X-30R Centrifuge 型离心机（美国 Beckman Coulter 公司）；CFX96 Touch C1000 Thermal Cycler 型实时荧光定量 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）；NANODROP ONEC 超微量紫外可见分光光度计（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

### 1.2 药材

补骨脂购自新奇康（新疆）药业股份有限公司，由新疆维吾尔自治区维吾尔医医院霍仕霞研究员鉴定为豆科植物补骨脂 *P. corylifolia* L. 的干燥成熟果实。

### 1.3 药品与试剂

补骨脂素（批号 10376，质量分数 99.8%）、异补骨脂素（批号 14592，质量分数 99.6%）购自诗丹德（上海）标准技术服务有限公司；乙腈（批号 I1133829105，质谱纯）、甲醇（批号 I1139035113，质谱纯）购自美国 Merck 公司；甲酸（批号 B2307725，质谱纯）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；三卡因（批号 A5040）、拍照用鱼体固定液羧甲基纤维素钠（sodium carboxy methyl cellulose, CMC-Na, 批号 419281）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；多聚甲醛（批号 CR2209049）购自塞维尔（武汉）生物科技有限公司；PBS 漂洗缓冲液（批号 SADKZ）、组织细胞 RNA 快速提取试剂盒（批号 DMQTQ）购自思科捷（山东）生物技术有限公司；99% 生物技术级聚山梨酯 20（批号 C13720975）购自麦克林（上海）生化科技有限公司；NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus（批号 05256502）购自近岸（上海）蛋白质科技有限公司；HiScript III RT DuperMix for qPCR（批号 R323-01）购自诺唯赞（南京）生物科技有限公司。

### 1.4 动物

AB 野生型斑马鱼、Tg (*lfabp*: EGFP) 型肝脏细胞绿色荧光标记转基因斑马鱼和 Tg (*lysc*: DsRed2) 型中性粒细胞红色荧光标记转基因斑马鱼品系为山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。

## 2 方法

### 2.1 斑马鱼的养殖与繁育

雌雄斑马鱼隔离喂养，交替照明 14 h/黑暗 10 h，每日按时投喂刚孵化的丰年虾幼体和人工饵料。采集受精卵时取性成熟的健康斑马鱼按雌雄 1:1 或 1:2 的比例放入带隔板的缸中，次日给予照明（8:00 时）同时去除隔板，9:00~11:00 时收获受精卵。对受精卵进行消毒和洗涤后移入斑马鱼胚胎培养用水中，28 °C 下控光培养。

### 2.2 补骨脂不同炮制品水提物制备、含量测定与斑马鱼给药溶液的制备

**2.2.1 补骨脂不同炮制品水提物制备** 炮制的方法参照各典籍，每次实验严格控制操作的温度和时间。本研究使用的是补骨脂不同炮制品的水提物。水提步骤为粉碎后经 10 倍量纯化水煮沸提取 3 次，3 次提取液混合后蒸发、回流、烘干。补骨脂干燥果实水提得补骨脂生品，记录出膏率；依据《雷公炮炙论》法

炮制得补骨脂雷公法制品<sup>[13]</sup>,水提后记录出膏率;据《太平圣惠方》法炮制得补骨脂清炒法制品<sup>[13]</sup>,水提后记录出膏率;依据《洪氏集验方》法<sup>[13]</sup>炮制得补骨脂酒炙法制品,水提后记录出膏率;依据《寿世保元》法和《中国药典》2020年版炮制得补骨脂盐炙法制品<sup>[14-15]</sup>,水提后记录出膏率。水提生品出膏率26.22%,雷公法出膏率11.75%,清炒法出膏率22.24%,酒炙法出膏率21.32%,盐炙法出膏率23.75%。

### 2.2.2 补骨脂不同炮制品水提物含量测定

(1) 对照品储备液的制备:取对照品补骨脂素和异补骨脂素各5 mg,精密称定,分别置5 mL量瓶中,加甲醇适量,超声(功率250 W、频率40 kHz)使溶解,加甲醇至刻度,摇匀,即得质量浓度为5 mg/mL的对照品储备液。

(2) 线性溶液的制备:分别精密移取对照品储备液适量,置于不同规格量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配制成一系列浓度的线性溶液,摇匀,即得。

(3) 样品制备:取补骨脂生品、补骨脂清炒法制品、补骨脂酒炙法制品、补骨脂盐炙法制品、补骨脂雷公法制品25 mg,精密称定,置25 mL量瓶

中,加50%甲醇适量,超声(功率250 W、频率40 kHz)处理30 min,放冷,加50%甲醇至刻度,摇匀,精密移取1 mL,置5 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度,摇匀,取2 mL,12 000 r/min离心5 min,取上清液,即得。

(4) 色谱条件:Agilent Poroshell SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.9 μm);柱温30 °C;体积流量0.3 mL/min;进样量2 μL;检测波长190~400 nm;流动相为0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~2 min,10%~15%A;2~5 min,15%~20%A;5~7 min,20%~40%A;7~10 min,40%A;10~15 min,40%~50%A;15~17 min,50%~70%A;17~19 min,70%~90%A;19~22 min,90%A。

(5) 质谱条件:电喷雾离子源(ESI);三重四级杆液质联用仪ESI正、负离子检测模式;离子源温度550 °C;喷雾气压力344.75 kPa;辅助加热气压力275.8 kPa;气帘气压力137.9 kPa;离子化电压5 500 V/-4 500V;各化合物质谱多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)参数见表1。

表1 MRM参数

Table 1 MRM parameters

成分	母离子 ( <i>m/z</i> )	碎片离子 ( <i>m/z</i> )	去簇电压/V	碰撞能量/V	摄入电压/V	碰撞室射出电压/V
补骨脂素	187.0	131.0*	90	36	3	9
		95.2	96	52	14	7
异补骨脂素	187.0	131.0*	90	36	3	9
		76.8	80	59	3	5

“\*”表示定量离子对。

“\*\*” indicates a quantitative ion pair.

2.2.3 斑马鱼给药溶液的制备 精密称取补骨脂生品、补骨脂雷公法制品、补骨脂清炒法制品、补骨脂酒炙法制品和补骨脂盐炙法制品,分别置于1.5 mL EP管中,以1 mL纯净水溶解配得到各炮制品相当生药质量浓度200 mg/mL的母液,后各取100 μL母液于另一1.5 mL EP管中,加900 μL斑马鱼胚胎培养用水稀释至相当生药质量浓度20 mg/mL的分装药液用于后续实验给药,125、250、500 μg/mL生药质量浓度给药体系分别为取用各炮制品分装溶液12.5、25、50 μL于每孔总养鱼水2 mL的24孔板中配制所得。

斑马鱼胚胎培养水为1 L纯净水中加入0.633 g KCl、2.452 g CaCl<sub>2</sub>、14.658 g NaCl、4.06 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。麻醉剂为纯净水配制的0.16 mg/mL三卡因溶液。

### 2.3 斑马鱼急性毒性分析

AB野生型斑马鱼卵受精发育72 h后(hours post-fertilization, hpf),在体视显微镜下挑选正常的斑马鱼胚胎,移入24孔板中,每孔15条。以出膏率换算同等生药量设定各炮制品组给药质量浓度(125、250、500、600、700、800、1 000 μg/mL),除空白对照组外胚胎培养用水中给药补骨脂不同炮制品处理72 h。每次每组3个重复孔。每孔用胚胎培养用水加至总体积为2 mL。然后加盖,置于光照培养箱(28 °C)让胚胎继续发育。连续3 d记录各组死亡情况,药物处理72 h后,取10~15条于适量三卡因中麻醉,在体视显微镜下固定于甲基纤维素溶液中,使斑马鱼对眼侧卧于载玻片上,观察斑马鱼白光下全身情况并拍照,参考斑马鱼畸形评分标准<sup>[16]</sup>并运用软件统计各组斑马鱼全身毒性情况。

## 2.4 斑马鱼肝脏形态分析

利用 72 hpf Tg (*lfabp*: EGFP) 型肝脏细胞绿色荧光标记转基因斑马鱼, 同“2.3”项下方法给药造模 72 h 后, 取 10~15 条于适量三卡因中麻醉, 在体视显微镜下固定于甲基纤维素溶液中, 使斑马鱼对眼侧卧于载玻片上, 观察斑马鱼在激发光线下荧光肝脏情况并拍照, 统计补骨脂不同炮制品对荧光肝脏面积、荧光强度影响, 并进行高内涵成像分析肝脏 3D 形态差异。

## 2.5 斑马鱼肝脏组织病理切片分析

利用 72 hpf AB 野生型斑马鱼, 同“2.3”项下方法给药造模 72 h 后, 取 5~10 条于适量三卡因中麻醉, 再转入 4%多聚甲醛对斑马鱼进行固定 96 h 后用梯度乙醇、醇苯、二甲苯脱水, 在包埋机中以石蜡包埋后 4 μm 切片, 脱蜡至水, 纯净水冲洗后进行苏木素-伊红(HE)染色, 洗净切片放入梯度乙醇; 二甲苯中脱水至透明, 晾干, 用中性树胶封片, 于显微镜下观察并拍照。

## 2.6 斑马鱼炎症检测

**2.6.1 斑马鱼肝脏区域炎症统计** 利用 72 hpf Tg (*lysc*: DsRed2) 型中性粒细胞红色荧光标记转基因斑马鱼, 同“2.3”项下方法给药造模 72 h 后, 随机取 15~20 条于适量三卡因中麻醉, 在体视显微镜下固定于甲基纤维素溶液中, 使斑马鱼对眼侧卧于载玻片上, 观察斑马鱼白光下和激发光线下肝脏区域红色荧光中性粒细胞情况并拍照, 统计补骨脂不同炮制品对肝脏区域荧光中性粒细胞计数影响。

**2.6.2 斑马鱼炎症相关因子基因表达检测** 利用 72 hpf AB 野生型斑马鱼, 同“2.3”项下方法给药造模 72 h 后, 将各组斑马鱼取 20 条, 转移至 1.5 mL 无酶灭菌 EP 管中, 纯净水漂洗 2 次后去除水分, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	F: AGAGCTATGAGCTGCCTGACG R: CCGCAAGATTCCATACCCA
<i>TNF-α</i>	F: GCTGGATCTTCAAAGTCGGGTGTA R: TGTGAGTCTCAGCACACTTCCATC
<i>IL-1β</i>	F: ATGGCAGAAGTACCTAAGCTC R: TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGCTCAGT
<i>NF-κB</i>	F: ACAAGACGCAAGGAGCCAG R: AACTGTCTCTGCACAAAGGGCTCA
<i>IL-2</i>	F: AAACGGTTCCTTACGGAGT R: AACAGTTTCTCGCAGCCAAG
<i>IL-10</i>	F: CGGGATATGGTGAAATGCAAGA R: AGAGCAAATCAAGCTCCCC
<i>NLRP3</i>	F: TTGTCTGGCTGTATGGTG R: TGATTGCTCTGGGTGATT

## 2.7 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用统计软件进行统计绘图, 组间比较采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 补骨脂不同炮制品水提物含量测定

使用 UPLC-QqQ/MS 在 MRM 模式下, 测定补骨脂不同炮制品提取物中补骨脂素和异补骨脂素的含量(色谱图见图 1), 采用标准曲线法, 补骨脂素在 8.38~3 350.79 ng/mL 配制 5 个稀释质量浓度, 补骨脂素在 16.58~3 315.68 ng/mL 配制 5 个稀释质量浓度。以对照品质量浓度为横坐标 (*X*), 峰面积为纵坐标 (*Y*), 用最小二乘法进行线性回归分析, 绘制线性方程, 回归方程及线性范围结果见表 3, 含量测定结果见表 4。在相对生药量 500 μg/mL 的补骨脂生品、补骨脂雷公法制品、补骨脂清炒法制品、补骨脂酒炙法制品和补骨脂盐炙法制品溶液中, 补骨脂素浓度分别为 5.25、4.42、4.29、4.57、4.66 μmol/L, 异补骨脂素浓度分别为 4.19、2.01、3.37、3.55、3.69 μmol/L。

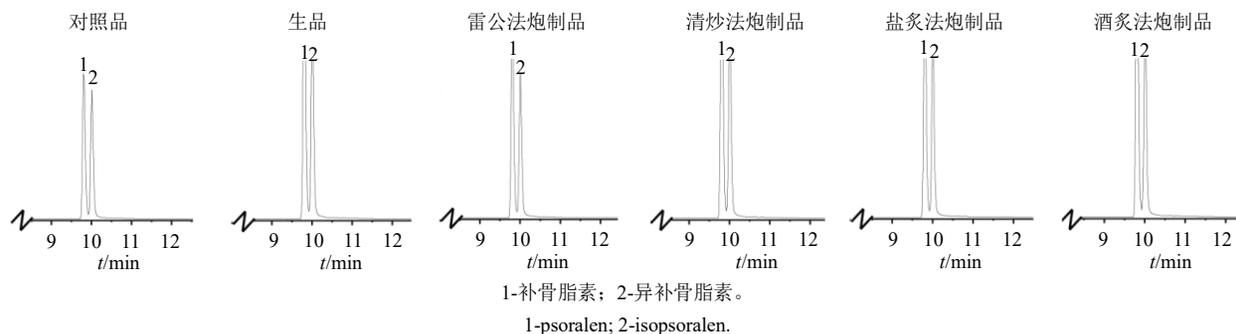


图 1 对照品与炮制品的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of reference substance and processed product

表 3 回归方程及线性范围

Table 3 Regression equation and linear range

化合物	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )
补骨脂素	Y=4 446.9 X+395 574	0.992 3	8.38~3 350.79
异补骨脂素	Y=4 306.7 X+400 753	0.995 7	16.58~3 315.68

表 4 5 批样品的含量测定

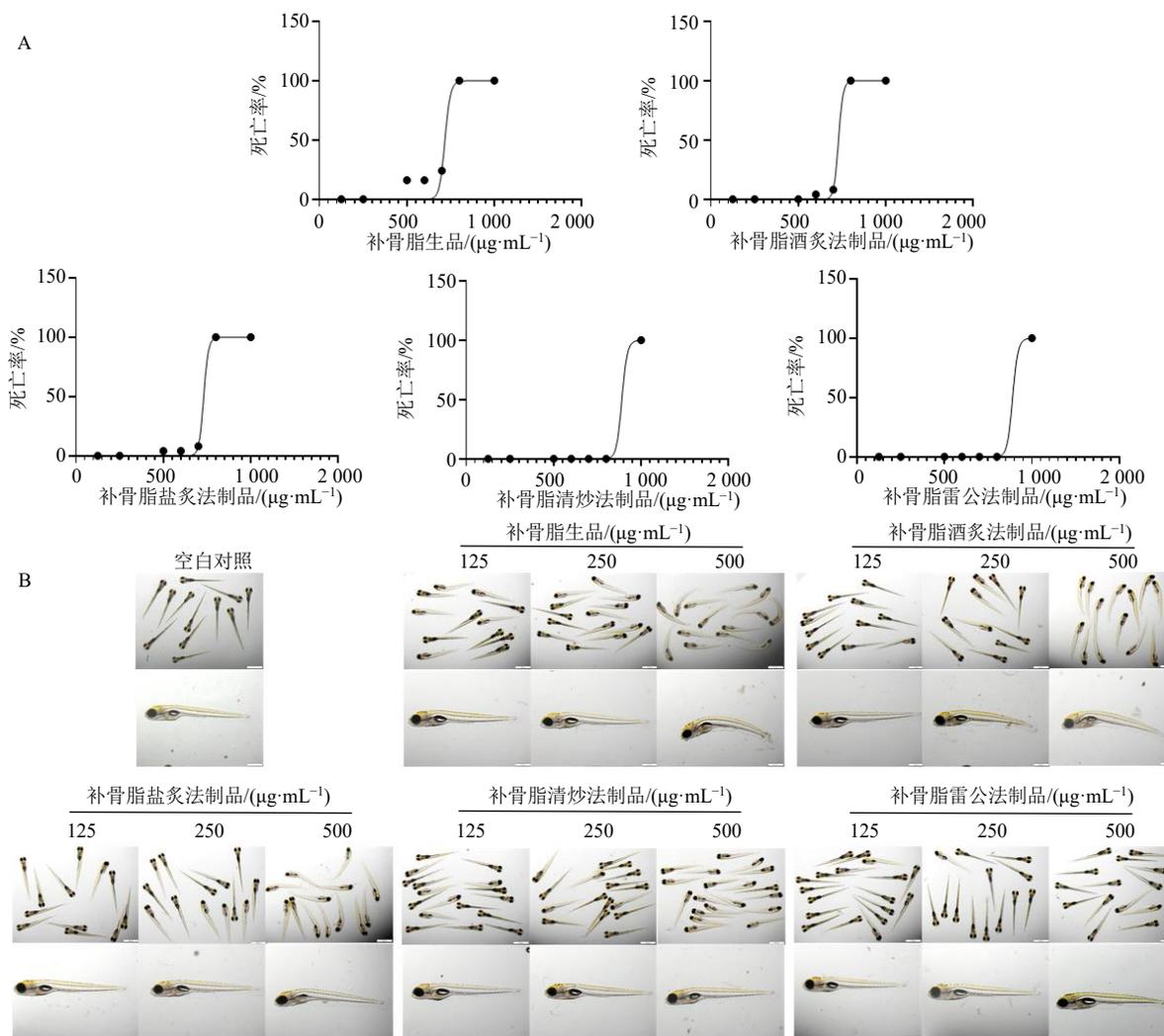
Table 4 Content determination of five batches of samples

样品	补骨脂素/%	RSD/%	异补骨脂素/%	RSD/%
补骨脂生品	0.746 1	2.6	0.594 5	3.2
补骨脂雷公法制品	1.400 1	1.3	0.637 4	0.9
补骨脂清炒法制品	0.718 5	2.2	0.564 4	2.4
补骨脂酒炙法制品	0.797 5	0.8	0.620 9	1.4
补骨脂盐炙法制品	0.730 3	1.1	0.578 9	1.9

### 3.2 补骨脂不同炮制品水提取物对斑马鱼急性毒性差异

如图 2 所示, 空白对照组无死亡; 补骨脂生品

的半数致死浓度 (median lethal concentration, LC<sub>50</sub>) 为 718.0 μg/mL, 最小致死浓度 (minimum lethal concentration, LC<sub>1</sub>) 为 425.1 μg/mL; 补骨脂酒炙法



A-死亡曲线图; B-补骨脂不同炮制品水提取物处理斑马鱼 72 h 的群像和单鱼全身图像。

A-death curve chart; B-group images and full body images of a single zebrafish treated with water extracts of different processed products of *Psoraleae Fructus*.

图 2 补骨脂不同炮制品水提取物对斑马鱼急性毒性

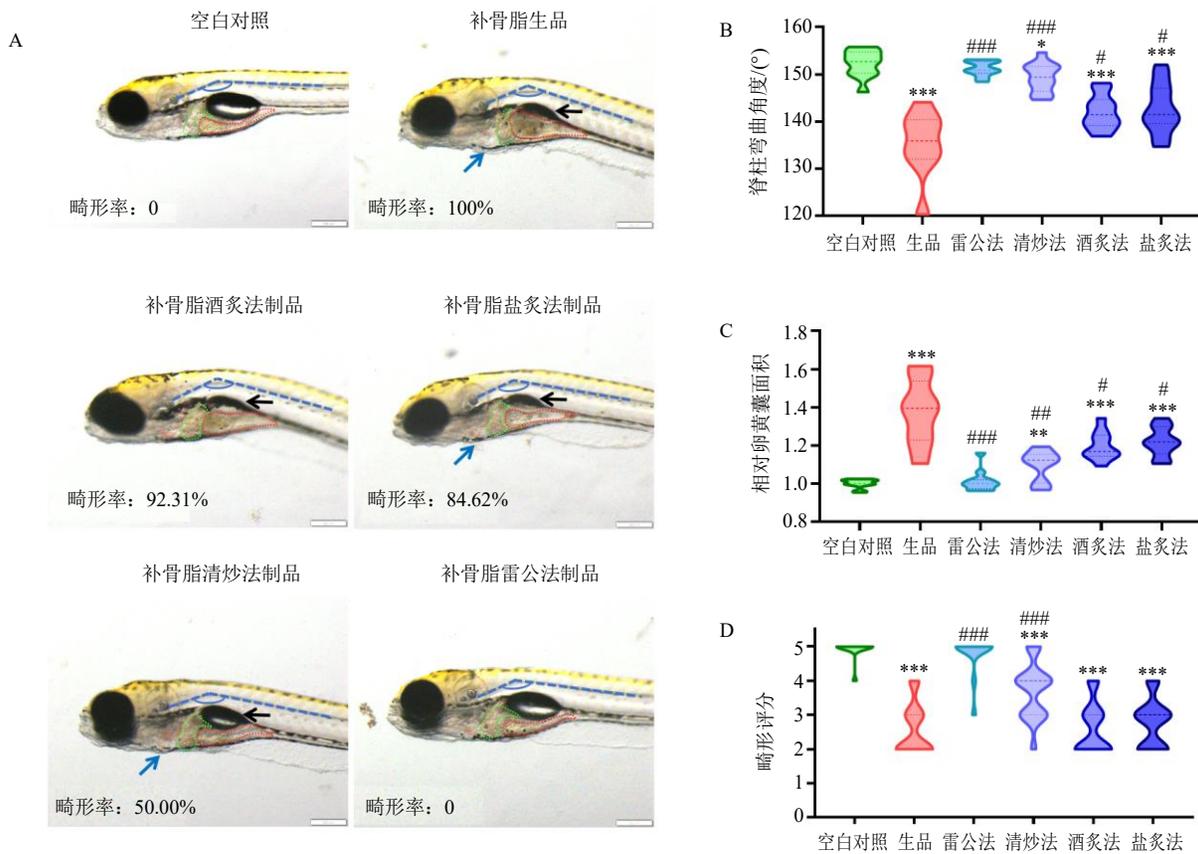
Fig. 2 Acute toxicity of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* to zebrafish

制品的  $LC_{50}$  为  $730.1 \mu\text{g/mL}$ ,  $LC_1$  为  $520.8 \mu\text{g/mL}$ , 补骨脂盐炙法制品的  $LC_{50}$  为  $731.0 \mu\text{g/mL}$ ,  $LC_1$  为  $563.5 \mu\text{g/mL}$ ; 补骨脂清炒法制品和补骨脂雷公法制品的  $LC_{50}$  为  $890.4 \mu\text{g/mL}$ ,  $LC_1$  为  $723.0 \mu\text{g/mL}$ 。补骨脂不同炮制品水提物的  $LC_{50}$  和  $LC_1$  由大到小排序为补骨脂雷公法制品 = 补骨脂清炒法制品 > 补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂酒炙法制品 > 补骨脂生品。

高质量浓度下补骨脂生品、补骨脂酒炙法制品和补骨脂盐炙法制品的水提物导致了斑马鱼明显的脊柱弯曲和鱼鳔丢失。

如图 3-A 所示, 补骨脂生品对斑马鱼有明显的致畸毒性, 在高质量浓度下斑马鱼卵黄囊吸收显著迟缓且肝脏和卵黄囊区域明显发黑、脊柱明显弯曲、鱼鳔完全缺失、出现明显心包水肿; 补骨脂盐炙法

制品高质量浓度组和补骨脂酒炙法制品高质量浓度组有显著的致畸毒性, 脊柱出现明显弯曲, 卵黄囊吸收明显减缓且肝脏和卵黄囊区域轻微发黑, 鱼鳔几乎缺失, 同时盐炙法制品高质量浓度组还伴有轻微心包水肿; 清炒法制品高质量浓度组有较明显的致畸毒性, 卵黄囊吸收较明显减缓, 出现轻微脊柱弯曲, 伴有鱼鳔减小和轻微心包水肿; 雷公法制品高质量浓度对全身无明显毒性。补骨脂不同炮制品水提物鱼鳔缺失毒性由强到弱排序为补骨脂生品 > 补骨脂酒炙法制品 > 补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂清炒法制品 > 补骨脂雷公法制品。补骨脂不同炮制品水提物心包水肿毒性由强到弱排序为补骨脂生品 > 补骨脂酒炙法制品 > 补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂清炒法制品 > 补骨脂雷公法制品。



A-单鱼胸腹部图, 红色虚线为卵黄囊区域轮廓, 蓝色虚线夹角为脊柱弯曲角度, 黑色箭头指向鱼鳔减小或消失情况, 蓝色箭头指向心包水肿, 绿色虚线为肝脏区域轮廓; B-脊柱弯曲角度统计图; C-卵黄囊面积统计图; D-畸形评分统计图; 与空白对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与补骨脂生品组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ , 下同。

A-single fish chest and abdomen diagram, blue dotted angles show the bending angle of spine, black arrows point to the decrease or disappearance of swim bladder, blue arrows point to pericardial edema, red dashed lines show the outline of yolk sac area, and green dashed lines show the outline of liver area; B-statistical chart of yolk sac area; C-statistical chart of spinal curvature; D-statistical chart of deformity score; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs raw *Psoraleae Fructus* group, same as below figures.

图 3 补骨脂不同炮制品水提物 ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 对斑马鱼致畸毒性

Fig. 3 Teratogenic toxicity of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) to zebrafish

如图 3-B 所示, 与空白对照组的脊柱弯曲角度相比, 补骨脂生品、清炒法制品、酒炙法制品和盐炙法制品对斑马鱼有显著的脊椎弯曲毒性 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ), 补骨脂雷公法制品脊椎无显著性差异。与补骨脂生品组比较, 雷公法、清炒法、酒炙法和盐炙法均显著降低了补骨脂对斑马鱼的脊柱弯曲毒性 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ), 补骨脂补骨脂不同炮制品水提物脊柱弯曲毒性由强到弱排序为补骨脂生品 > 补骨脂酒炙法制品 = 补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂清炒法制品 > 补骨脂雷公法制品。

如图 3-C 所示, 与空白对照组的卵黄囊面积相比, 补骨脂生品、清炒法制品、酒炙法制品和盐炙法制品对斑马鱼有显著的卵黄囊吸收减缓毒性 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 补骨脂雷公法制品卵黄囊面积无显著性差异。相比于补骨脂生品, 雷公法、清炒法、酒炙法和盐炙法均显著降低了补骨脂对斑马鱼的卵黄囊吸收减缓毒性 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 补骨脂不同炮制品水提物卵黄囊吸收减缓毒性由强到弱排序为补骨脂生品 > 补骨脂酒炙法制品 = 补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂清炒法制品 > 补骨脂雷公法制品。

如图 3-D 所示, 与空白对照组的全身畸形情况相比, 补骨脂生品、酒炙法制品、盐炙法制品和清炒法制品对斑马鱼有显著的致畸毒性 ( $P < 0.001$ ), 补骨脂雷公法制品整体体态无显著差异。相比于补骨脂生品, 雷公法和清炒法显著降低了补骨脂对斑

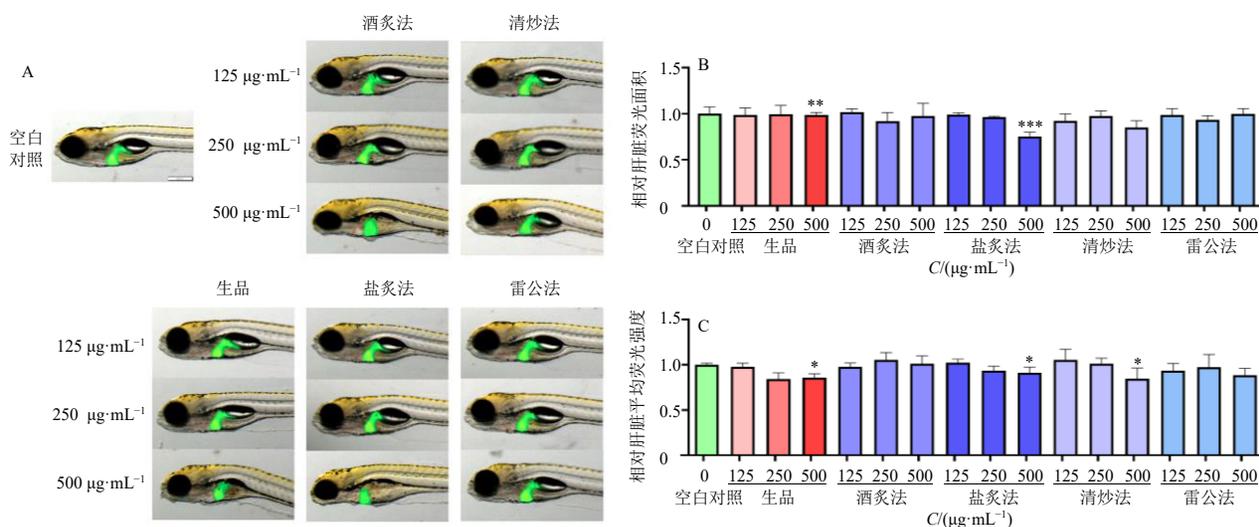
马鱼的致畸毒性 ( $P < 0.001$ ), 酒炙法和盐炙法对补骨脂致畸毒性的影响无显著性差异, 补骨脂不同炮制品水提物畸形评分由大到小排序为补骨脂生品 > 补骨脂酒炙法制品 = 补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂清炒法制品 > 补骨脂雷公法制品。

### 3.3 补骨脂不同炮制品水提物对斑马鱼肝脏形态影响差异

如图 4-A 所示, 与空白对照组比较, 补骨脂生品、酒炙法制品和盐炙法制品高浓度组斑马鱼肝脏形态有明显缺失而清炒法和雷公法高浓度组对斑马鱼肝脏形态无明显改变。

如图 4-B 所示, 对斑马鱼肝脏荧光面积影响最大的炮制品是补骨脂盐炙法制品, 其显著降低了斑马鱼肝脏荧光面积大小 ( $P < 0.001$ ), 甚至影响程度大于补骨脂生品组, 这表明发生了强烈肝损伤; 补骨脂清炒法制品对肝脏荧光面积有影响趋势, 肝脏荧光面积影响排序为补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂生品 > 清炒法 > 补骨脂酒炙法制品 = 补骨脂雷公法制品。

如图 4-C 所示, 对斑马鱼肝脏荧光强度影响较大的炮制品是补骨脂清炒法制品, 其明显降低了肝脏的荧光强度 ( $P < 0.05$ ), 其次为补骨脂生品和补骨脂盐炙法制品 ( $P < 0.05$ ), 这表明肝细胞密度明显减小, 肝脏荧光强度影响排序为补骨脂清炒法制品 > 补骨脂生品 > 补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂酒炙法制品 = 补骨脂雷公法制品。



A-荧光显微镜下肝脏荧光图; B-肝脏荧光面积统计图 ( $n \geq 6$ ); C-肝脏荧光强度统计图 ( $n \geq 6$ )。

A-fluorescence diagram of liver under fluorescence microscope; B-statistical chart of liver fluorescence area ( $n \geq 6$ ); C-statistical chart of liver fluorescence intensity ( $n \geq 6$ ).

图 4 补骨脂不同炮制品水提物 ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 对斑马鱼肝脏形态的影响 (2D)

Fig. 4 Effect of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) on liver morphology of zebrafish (2D)

如图 5-A 所示,用高内涵成像系统捕获空白对照组和补骨脂不同炮制品高质量浓度 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组 3D 肝脏形态。与空白对照组比较,在补骨脂生品、补骨脂酒炙法制品和补骨脂盐炙法制品影响下斑马鱼的肝叶出现缺失情况。

如图 5-B 所示,与空白对照组比较,补骨脂生品、酒炙法制品、盐炙法制品、清炒法和雷公法显著减小了斑马鱼肝脏荧光体积 ( $P < 0.05, 0.001$ )。相比于补骨脂生品组,补骨脂盐炙法、清炒法和雷公法制品组肝脏荧光体积有明显的回升 ( $P < 0.05, 0.001$ )。肝脏荧光体积影响排序为补骨脂生品 > 补骨脂酒炙法制品 > 补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂清炒法制品 > 补骨脂雷公法制品。

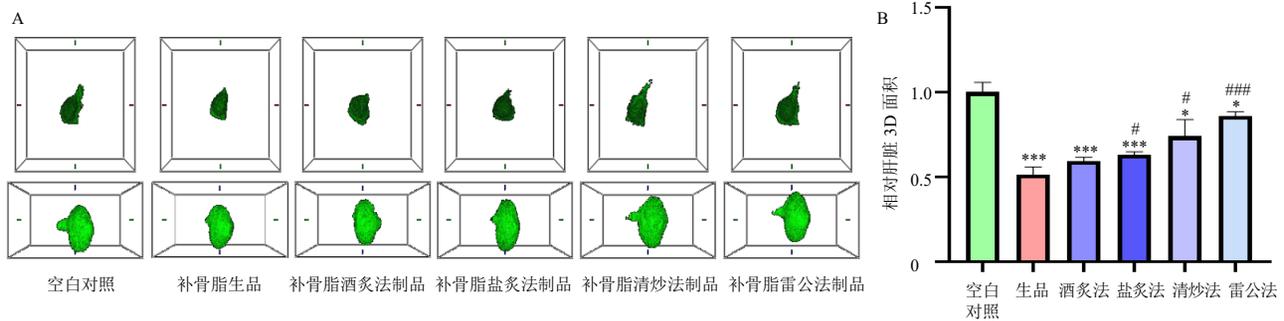
### 3.4 补骨脂不同炮制品水提取物对斑马鱼肝脏组织病理切片的影响

如图 6 所示,与空白对照组比较,补骨脂雷公

法制品对肝脏病理切片影响无显著差异,而在补骨脂生品、补骨脂盐炙法制品、补骨脂清炒法制品和补骨脂酒炙法制品的影响下斑马鱼肝脏细胞间出现明显空泡,表明肝脏结构存在严重缺陷,且肝脏细胞边界不清晰,细胞结构受损。肝脏组织病理结构影响排序为补骨脂生品 > 补骨脂盐炙法制品 > 补骨脂清炒法制品 > 补骨脂酒炙法制品 > 补骨脂雷公法制品。

### 3.5 补骨脂不同炮制品对斑马鱼机体炎症的影响

**3.5.1 补骨脂不同炮制品对斑马鱼肝脏区域炎症的影响** 如图 7-A 所示,与空白对照组比较,补骨脂生品、盐炙法制品、酒炙法制品和清炒法制品导致了斑马鱼肝脏区域中性粒细胞的大量聚集,补骨脂雷公法制品对斑马鱼肝脏区域的中性粒细胞有轻微聚集作用。如图 7-B 所示,与空白对照组比较,补骨脂生品、盐炙法制品、酒炙法制品、清炒法制品



A-肝脏荧光 3D 图, 上图是侧视图, 下图是仰视图; B-肝脏荧光体积统计图 ( $n=3$ )。

A-3D picture of liver fluorescence, top picture is a side view, bottom picture is a bottom view, and white arrow points to the liver lobe; B-statistical chart of liver fluorescence volume ( $n=3$ ).

图 5 补骨脂不同炮制品水提取物 ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 对斑马鱼肝脏形态的影响 (3D)

Fig. 5 Effect of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) on liver morphology of zebrafish (3D)

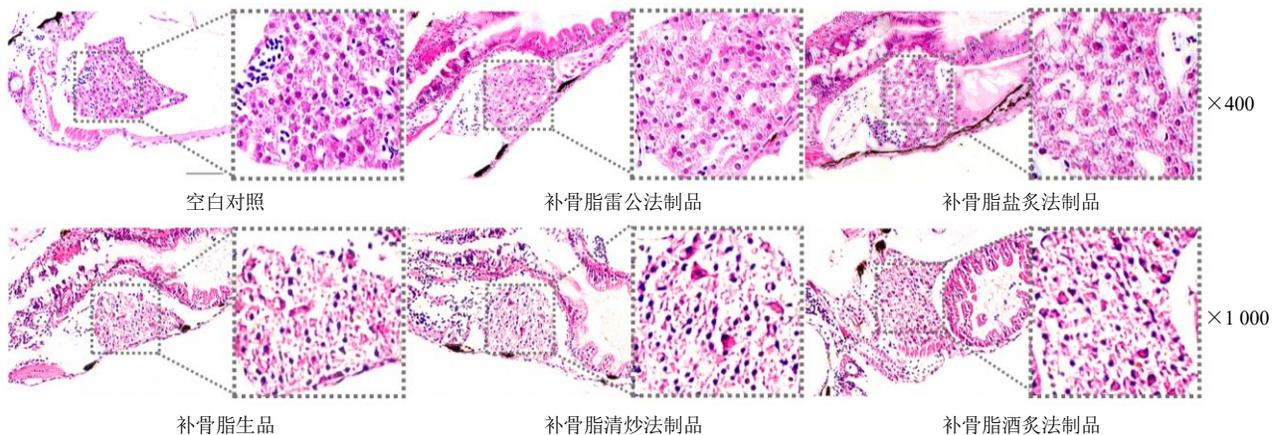
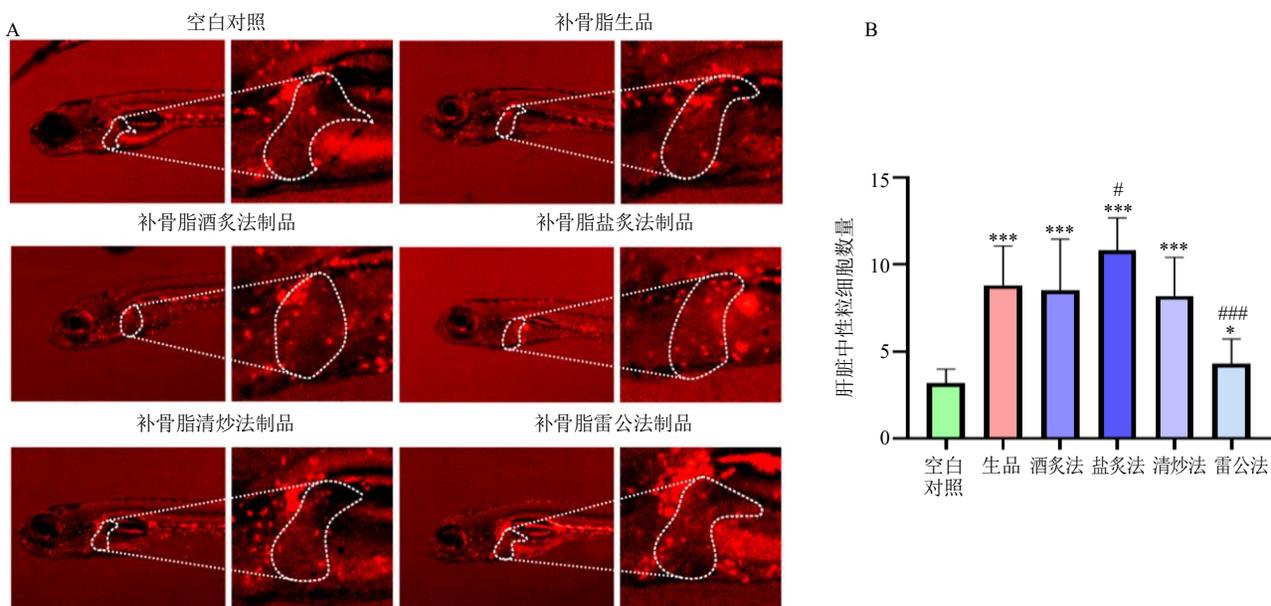


图 6 补骨脂不同炮制品水提取物 ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 对斑马鱼肝脏组织病理结构的影响

Fig. 6 Effect of water extract of different processed products of *Psoraleae Fructus* ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) on pathological structure of liver tissue of zebrafish



A-荧光显微镜下肝脏荧光图; B-肝脏区域中性粒细胞计数统计图 (n=10)。

A-fluorescence diagram of liver under fluorescence microscope; B-statistical diagram of neutrophil count in liver area (n = 10).

图 7 补骨脂不同炮制品水提取物 (500 µg·mL<sup>-1</sup>) 对斑马鱼肝脏区域中性粒细胞计数的影响

Fig. 7 Effect of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* (500 µg·mL<sup>-1</sup>) on neutrophil count in liver region of zebrafish

和雷公法制品显著增加了斑马鱼肝脏区域中性粒细胞的数量 ( $P < 0.05$ ,  $0.001$ ); 相比补骨脂生品组, 补骨脂盐炙法制品明显增加肝脏区域中性粒细胞数量 ( $P < 0.05$ ), 补骨脂雷公法制品显著减少了斑马鱼肝脏区域中性粒细胞的数量 ( $P < 0.001$ )。肝脏区域中性粒细胞数量由高到底排序为补骨脂盐炙法制

品 > 补骨脂生品 > 补骨脂酒炙法制品 > 补骨脂清炒法制品 > 补骨脂雷公法制品。

3.5.2 补骨脂不同炮制品水提取物对斑马鱼炎症相关因子 mRNA 表达的影响 如图 8 所示, 与空白对照组比较, 补骨脂生品显著提高了斑马鱼体内炎症相关基因 *IL-1β*、*NLRP3*、*TNF-α*、*NF-κB* mRNA 表达

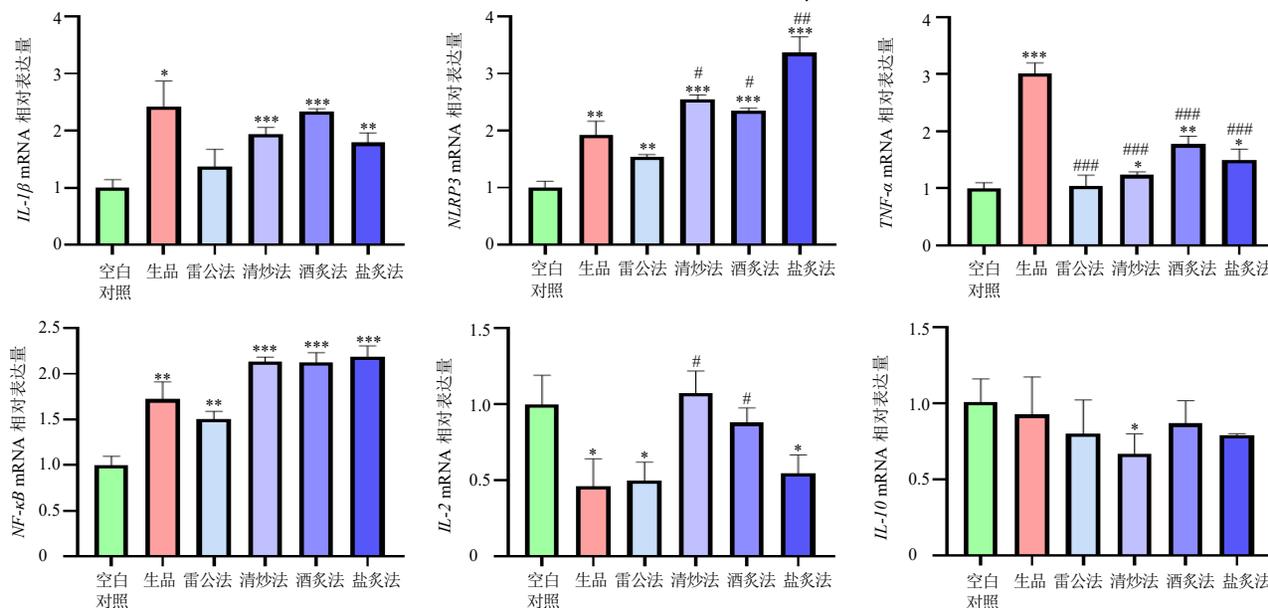


图 8 补骨脂不同炮制品水提取物 (500 µg·mL<sup>-1</sup>) 对斑马鱼炎症相关因子 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

Fig. 8 Effects of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* (500 µg·mL<sup>-1</sup>) on mRNA expressions of inflammation-related factors of zebrafish ( $\bar{x} \pm s$ , n = 3)

水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )，显著降低了斑马鱼体内抗炎相关基因 *IL-2* mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ )。与补骨脂生品组比较，补骨脂雷公法制品显著逆转了 *TNF- $\alpha$*  mRNA 改变并恢复正常水平 ( $P < 0.001$ )，同时对 *IL-1 $\beta$* 、*NLRP3*、*NF- $\kappa$ B* mRNA 表达有逆转趋势。清炒法、酒炙法及盐炙法相比空白对照组显著提升了 *IL-1 $\beta$*  mRNA 水平 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )，且相对补骨脂生品进一步提高了 *NLRP3* 和 *NF- $\kappa$ B* mRNA 水平，但清炒法和酒炙法明显逆转了补骨脂生品对 *IL-2* mRNA 水平的下降 ( $P < 0.05$ )，且只有清炒法制品降低了 *IL-10* mRNA 水平 ( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

古籍中记载着丰富且复杂的补骨脂“炮制减毒”<sup>[17]</sup>方法，如酒炙法、雷公法、清炒法、盐炙法等，但不同炮制法的减毒效果及其科学内涵尚未进行系统研究。本研究根据历代本草记载的炮制方法，对比补骨脂不同炮制方法的减毒效果差异，为优选减毒炮制提供参考。

本研究前期通过 HPLC 明确各补骨脂炮制品的主要成分补骨脂素和异补骨脂素含量，符合《中国药典》2020 年版补骨脂含补骨脂素和异补骨脂素的总量不得少于 0.70% 的规定，并以出膏率换算同等炮制前生药量 500  $\mu$ g/mL，同等生药量下，补骨脂生品的补骨脂素和异补骨脂素含量最高，雷公法制品的异补骨脂素含量最低，清炒法制品的补骨脂素含量最低。

本研究通过统计给药后斑马鱼脊椎弯曲程度、卵黄囊面积、鱼鳔缺失情况、心包水肿情况<sup>[18]</sup>以获得畸形评分<sup>[19]</sup>评价急性毒性强弱，发现基于斑马鱼模型补骨脂不同的炮制品水提物急性毒性存在差异，补骨脂生品急性毒性最强，与补骨脂不同炮制品相比同等生药量给药下补骨脂生品更易导致斑马鱼出现急性中毒死亡与严重的全身器官畸形，而不同炮制法可减轻急性毒性强度，其中雷公法的急性毒性减毒效果最佳。

本研究通过统计给药后转基因肝脏细胞绿色荧光标记斑马鱼肝脏荧光的强度、面积、体积<sup>[20]</sup>，肝脏病理切片情况和转基因中性粒细胞红色荧光标记斑马鱼肝脏荧光中性粒细胞数量<sup>[21-22]</sup>来评价补骨脂不同炮制品的肝毒性强度，发现补骨脂不同的炮制品水提物肝脏毒性存在差异，补骨脂雷公法制品肝脏形态毒性、肝脏病理结构毒性、肝脏区域促炎毒性减毒效果均最为优异<sup>[23-24]</sup>，这可能与雷公法导致

补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚的含量明显减少和（异）补骨脂苷转化为活性成分（异）补骨脂素有关<sup>[25-26]</sup>。而相较于补骨脂生品，补骨脂盐炙法制品则进一步减弱了斑马鱼的肝脏荧光面积，加剧了肝细胞间空泡化并在补骨脂生品的肝脏促炎毒性基础上加重了肝脏区域中性粒细胞的积累，这与其他学者所得“与补骨脂生品相比补骨脂盐炙法制品肝毒性更强且补骨脂生品和盐炙法制品导致炎症升高”的实验结果<sup>[26]</sup>一致，这可能与盐炙法使补骨脂素、补骨脂二氢黄酮、补骨脂异黄酮、异补骨脂查耳酮、补骨脂查耳酮含量增加有关<sup>[15, 27-29]</sup>。补骨脂清炒法制品则显著降低了斑马鱼的肝脏荧光强度，这可能与清炒法导致补骨脂苷、异补骨脂苷的总含量提高有关<sup>[30]</sup>。

炎症在药物性肝损伤等肝脏疾病发生发展中发挥关键作用<sup>[31]</sup>。*IL-1 $\beta$*  是一种重要的促炎细胞因子，除补骨脂雷公法制品外，各炮制品组 *IL-1 $\beta$*  mRNA 表达水平均明显升高，提示补骨脂生品、补骨脂盐炙法制品、补骨脂酒炙法制品和补骨脂清炒法制品导致斑马鱼机体发生炎症反应。*NLRP3* 炎症小体是一种胞质多蛋白复合物，其异常激活与各种炎症性疾病的发病机制有关<sup>[32]</sup>，除补骨脂雷公法制品外，各炮制品组 *NLRP3* mRNA 表达水平均显著升高，补骨脂盐炙法制品组与补骨脂生品组斑马鱼相比炎症水平更高。*TNF- $\alpha$*  是一种在炎症反应中起关键作用的细胞因子<sup>[33]</sup>，补骨脂生品组显著上调了 *TNF- $\alpha$*  的 mRNA 表达水平，而不同炮制品显著逆转了炎症的发生，其中雷公法制品与空白对照组无显著差别。*NF- $\kappa$ B* 是炎症介质的转录激活剂<sup>[34-35]</sup>，各补骨脂炮制品均显著上调了 *NF- $\kappa$ B* 的 mRNA 表达水平，与生品相比，雷公法制品逆转了炎症水平的上升，而盐炙法、酒炙法、清炒法制品则加剧了炎症水平的上升。*IL-2* 是一种细胞因子，主要参与  $CD4^+$  T 辅助亚群和  $CD4^+$  T 调节细胞的分化和存活以及细胞毒性效应淋巴细胞的活化<sup>[36]</sup>，补骨脂生品、雷公法制品、盐炙法制品组 *IL-2* 的 mRNA 表达水平明显下降，提示免疫能力下降。*IL-10* 是一种抗炎细胞因子，在大多数免疫过程中都具有有效的抗炎和调节活性<sup>[37]</sup>，提示只有清炒法明显下调了抗炎能力。不同炮制品给药组斑马鱼幼体内炎症相关因子 *IL-1 $\beta$* 、*NLRP3*、*TNF- $\alpha$* 、*NF- $\kappa$ B* mRNA 水平与肝脏区域中性粒细胞数量结果趋势相符，提示基于斑马鱼模型补骨脂生品可能通过引起肝脏部位炎症反应导致肝

损伤<sup>[38]</sup>，而盐炙法可加重炎症的发生，雷公法则可减轻炎症的发生。

综上，补骨脂水提物对斑马鱼的急性毒性可通过炮制而减弱，而其肝毒性通过不同炮制除减毒外也存在增毒的情况。其中雷公法炮制对急性毒性和肝毒性的减毒效果最佳。本研究为补骨脂炮制减毒提供斑马鱼模型实验依据，表明采用合理的炮制方法可降低补骨脂急性毒性和肝脏毒性，推测补骨脂通过炮制对肝毒性的减毒机制与炎症有关。但仍需通过进一步研究揭示补骨脂炮制减毒的物质基础与作用机制，为补骨脂炮制方法的选择提供理论依据，从而达到降低补骨脂用药过程中的不良反应提升其药用价值的目的。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 颜冬梅, 陈家辉, 卢文滢, 等. 基于2020年版《中国药典》的含补骨脂成方制剂分析 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18(11): 33-38.
- [2] 陈超, 朱兰, 刘丽红, 等. 文献来源的补骨脂及其制剂引起药物性肝损伤特点探析 [J]. 中国药物警戒, 2023, 20(4): 449-453.
- [3] 吴育, 许妍, 吴丽, 等. 补骨脂临床不良反应报道、毒性研究及减毒思考 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 207-213.
- [4] 张婧茜, 曲晓琳, 殷佳, 等. 补骨脂致肝损伤的研究进展 [J]. 山东中医杂志, 2022, 41(5): 576-582.
- [5] 熊殷, 吴嘉瑞, 张程亮. 壮骨关节丸致肝损伤的研究进展 [J]. 中南药学, 2019, 17(12): 2084-2087.
- [6] 刘想晴, 赵宝林, 钱枫, 等. 补骨脂炮制的历史沿革考证 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(19): 29-36.
- [7] 宋·唐慎微. 重修政和经史证类备用本草 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 552.
- [8] 宋·太医院. 圣济总录 (第1册) [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018: 212.
- [9] 姚三桃, 杨滨. 中药补骨脂炮制沿革的研究 [J]. 基层中药杂志, 1996, 10(1): 17-19.
- [10] 易沙克江·马合穆德. 中国医学百科全书: 维吾尔医学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 407.
- [11] 徐博, 肖涟波. 补骨脂肝毒性及减毒研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(1): 159-161.
- [12] MacRae C A, Peterson R T. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(10): 721-731.
- [13] 宋潇, 戚爱棣, 王跃飞, 等. 不同炮制方法对补骨脂中4类化学成分的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2071-2075.
- [14] 励娜, 张小梅, 姚媛媛, 等. D-最优设计响应面法结合UHPLC 优选补骨脂药材炮制工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 233-239.
- [15] 符映均, 吴育, 梅春梅, 等. 补骨脂炮制前后水煎液致雌性 ICR 小鼠胆汁淤积性肝损伤作用比较 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1434-1441.
- [16] Raghunath A, Perumal E. Analysis of lethality and malformations during zebrafish (*Danio rerio*) development [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1797: 337-363.
- [17] 王静宜, 吕明月, 殷佳, 等. 补骨脂炮制历史沿革和机制研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5759-5772.
- [18] 李萍萍, 闫晓涛, 张金花, 等. 铅暴露对斑马鱼胚胎心脏和脊柱发育的影响 [J]. 环境与职业医学, 2023, 40(2): 196-201.
- [19] 刘笑楠, 吴昊, 郑丽利, 等. 全氟辛酸磺酸对斑马鱼胚胎的急性毒性与致畸效应 [J]. 水产科学, 2023, 42(1): 11-20.
- [20] Parlak V. Evaluation of apoptosis, oxidative stress responses, AChE activity and body malformations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to deltamethrin [J]. *Chemosphere*, 2018, 207: 397-403.
- [21] Zhang C Q, Li C, Liu K C, et al. Characterization of Zearalenone-induced hepatotoxicity and its mechanisms by transcriptomics in zebrafish model [J]. *Chemosphere*, 2022, 309(Pt 1): 136637.
- [22] Hsu A Y, Wang T Q, Syahirah R, et al. Rora regulates neutrophil migration and activation in zebrafish [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 756034.
- [23] Khan R S, Lalor P F, Thursz M, et al. The role of neutrophils in alcohol-related hepatitis [J]. *J Hepatol*, 2023, 79(4): 1037-1048.
- [24] 李卓柯, 孙婷婷, 刘洋, 等. 基于潜在肝毒性成分分析的补骨脂炮制减毒机制 [J]. 中药材, 2021, 44(9): 2085-2088.
- [25] 洪丽, 王哲, 汤小涵, 等. 基于雷公法结合盐炙法对补骨脂的炮制及肝毒性评价 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6983-6989.
- [26] 吕彬, 谭旺晓, 刘潇, 等. 补骨脂“雷公炮制法”减毒的科学内涵 [J]. 天津中医药, 2020, 37(9): 976-983.
- [27] 王增绘, 付娟, 武拉斌, 等. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术的补骨脂盐炙前后化学成分变化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 51-55.
- [28] 张志宇, 龚又明. 高效液相色谱法测定盐炙补骨脂炮制前后三种主要成分的变化 [J]. 北方药学, 2013, 10(8): 61-62.
- [29] 陈一龙, 郭延垒, 励娜, 等. 补骨脂不同炮制饮片炮制前后化学成分定性定量分析 [J]. 天然产物研究与开

- 发, 2019, 31(12): 2113-2122.
- [30] 赵根华, 刘玲, 王恒, 等. 3种补骨脂炮制品水煎液中4种成分含量的比较 [J]. 中成药, 2017, 39(9): 1896-1899.
- [31] 王智磊. 基于NLRP3炎症小体的淫羊藿致免疫特异质肝损伤易感成分及作用机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [32] Yeung K, Mraz V, Geisler C, *et al.* The role of interleukin-1 $\beta$  in the immune response to contact allergens [J]. *Contact Dermat*, 2021, 85(4): 387-397.
- [33] Huang Y, Xu W, Zhou R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [34] McAdoo S P, Pusey C D. Is there a role for TNF $\alpha$  blockade in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis? [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(Suppl\_1): i80-i88.
- [35] Nennig S E, Schank J R. The role of NF $\kappa$ B in drug addiction: Beyond inflammation [J]. *Alcohol Alcohol*, 2017, 52(2): 172-179.
- [36] Wang T H, Hu Y, Wangkahart E, *et al.* Interleukin (IL)-2 is a key regulator of T helper 1 and T helper 2 cytokine expression in fish: Functional characterization of two divergent IL2 paralogs in salmonids [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1683.
- [37] Piazzon M C, Lutfalla G, Forlenza M. IL10, A tale of an evolutionarily conserved cytokine across vertebrates [J]. *Crit Rev Immunol*, 2016, 36(2): 99-129.
- [38] Xiang S H, Chen K, Xu L, *et al.* Bergenin exerts hepatoprotective effects by inhibiting the release of inflammatory factors, apoptosis and autophagy via the PPAR- $\gamma$  pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 129-143.

[责任编辑 李亚楠]