

北桑寄生总黄酮对硫代乙酰胺诱导斑马鱼急性肝损伤的保护作用

邓丹丹¹, 赵博荣¹, 颜丽涵¹, 周江韬¹, 王松松², 杨虹¹, 杨飞¹, 杨官娥^{1*}, 韩利文^{2*}

1. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

2. 山东第一医科大学药学院(药物研究所), 山东 济南 250117

摘要: **目的** 探讨北桑寄生总黄酮(total flavonoids of *Loranthus tanakae*, LTF)对硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)诱导的斑马鱼急性肝损伤(acute liver injury, ALI)的保护作用。**方法** 采用TAA诱导AB品系与转基因品系斑马鱼建立ALI模型,通过对斑马鱼的生长发育、肝脏形态、肝功能酶活性、脂质积累情况及氧化应激指标进行检测,考察LTF是否具有保肝活性。**结果** 25、50 $\mu\text{g/mL}$ LTF可以明显抑制TAA引起的斑马鱼发育毒性,促进幼鱼生长及减缓卵黄囊的吸收滞后现象($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,LTF可以明显增加斑马鱼幼鱼肝脏面积,提高肝脏的荧光强度($P < 0.05$ 、 0.01)。苏木素-伊红染色结果显示,LTF处理后斑马鱼肝脏病理状态得到缓解,空泡化现象明显减少。LTF显著降低TAA诱导的斑马鱼丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性($P < 0.05$ 、 0.01)。油红O染色结果显示,LTF显著降低幼鱼肝脏区域脂质积累程度($P < 0.05$ 、 0.01)。氧化应激指标测定结果显示,LTF处理后幼鱼体内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平明显降低($P < 0.05$ 、 0.01)。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(catalase, CAT)和还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)含量显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** LTF在防治ALI方面具有较大的潜力,其肝脏保护活性可能与抗氧化作用有关。

关键词: 北桑寄生; 急性肝损伤; 氧化应激; 黄酮类化合物; 斑马鱼

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4434-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.015

Protective effects of total flavonoids from *Loranthus tanakae* on thioacetamide-induced acute liver injury in zebrafish

DENG Dandan¹, ZHAO Borong¹, YAN Lihan¹, ZHOU Jiangtao¹, WANG Songsong², YANG Hong¹, YANG Fei¹, YANG Guane¹, HAN Liwen²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong First Medical University (Institute of Materia Medica), Jinan 250117, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of total flavonoids from *Loranthus tanakae* (LTF) on thioacetamide (TAA)-induced acute liver injury (ALI) in zebrafish. **Methods** TAA was used to induce ALI model in zebrafish of AB and transgenic strains. Whether LTF had hepatoprotective activity was assessed by examining the growth and development, liver morphology, liver function enzyme activities, lipid accumulation and oxidative stress indexes of zebrafish. **Results** 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ LTF significantly inhibited TAA-induced developmental toxicity in zebrafish, promoted growth and slowed down the absorption lag of the yolk sac ($P < 0.05$, 0.01). Compared with model group, LTF could significantly increase the liver area and improve the fluorescence intensity of the liver in zebrafish larvae ($P < 0.05$, 0.01). The results of hematoxylin eosin staining showed that the liver pathology of zebrafish was alleviated and vacuolization was significantly reduced after LTF treatment. LTF significantly reduced the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) induced by TAA in zebrafish ($P < 0.05$, 0.01). The oil red O staining results showed that LTF significantly reduced the degree of lipid accumulation in liver region of larvae ($P < 0.05$, 0.01). The measurement results of oxidative stress indicators showed that after LTF treatment, the levels of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA)

收稿日期: 2024-04-10

基金项目: 山东省中医药高层次人才培育项目; 济南市“新高校 20 条”资助项目(202333018); 山西省自然科学基金面上项目(202303021221125)

作者简介: 邓丹丹, 女, 硕士研究生, 研究方向为天然活性物质筛选。E-mail: ab1340739@163.com

*通信作者: 杨官娥, 女, 博士生导师, 教授, 从事天然产物药效物质基础及作用机制研究。E-mail: yangguane@aliyun.com

韩利文, 男, 博士生导师, 副研究员, 从事斑马鱼创新筛选模型构建及中药质量控制研究。E-mail: hanliwen08@126.com

in zebrafish larvae were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), while the levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH) were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** LTF has great potential in the prevention and treatment of ALI, and its liver protective activity may be related to antioxidant effects.

Key words: *Loranthus tanakae* Franch. et Sav.; acute liver injury; oxidative stress; flavonoids; zebrafish

急性肝损伤 (acute liver injury, ALI) 是由无肝病或患有肝病但处于稳定状态的人员在受到长期熬夜、大量酗酒、肝脏缺血缺氧及药物中毒等因素所致^[1-2]。随着医学技术的发展,越来越多的研究者发现 ALI 的发生发展与炎症反应、氧化与抵御氧化系统失衡及铁死亡等密切相关^[3-5]。肝脏损伤进一步恶化,会发展为更为严重的衰竭^[6-7],诱发机体免疫力下降、血糖含量异常、脂质代谢紊乱等异常现象累及其他器官损伤。目前,ALI 的临床防治主要采用保肝药物进行治疗,严重者会选择肝脏替代治疗^[8-10]。现代研究发现很多中药及有效成分在防治肝病领域表现出较好的前景^[11-14]。灯盏花素可以降低丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平,提高抗氧化剂超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性,有效调节核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路,减轻酒精引起的肝损伤^[15]。秦皮甲素能够降低四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 引起的小鼠肝脏中纤维沉积现象,减少 AST、ALT 及胆红素 (total bilirubin, TBil) 的含量,下调透明质酸酶 (hyaluronidase, HAase)、III 型前胶原 (procollagen type III, PCIII) 和层黏连蛋白 (laminin, LN) 的水平,并改善肝组织炎症与脂质空泡^[16]。因此,从天然药用植物探索抗 ALI 活性物质仍然是目前临床防治 ALI 的有效途径。

北桑寄生 *Loranthus tanakae* Franch. et Sav. 是桑寄生科桑寄生属落叶灌木^[17],寄生对象为栎属、桦属、李属等树木,在中国、日本、韩国、朝鲜等均有分布^[18]。现代研究表明北桑寄生中含有糖类、甾体皂苷类、黄酮类等次生代谢物^[19]。其中黄酮类化合物在北桑寄生药材中含量丰富 (约 10.58%^[20])。目前,北桑寄生的药理活性研究较少,还尚未见北桑寄生在治疗 ALI 方面的研究报道。课题组前期研究显示,北桑寄生总黄酮 (total flavonoids of *L. tanakae*, LTF) 具有良好的抗氧化作用,可以促进脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞中 Nrf2 转录活性,抑

制炎症反应的发生^[21]。因此,本研究利用硫代乙酰胺 (thioacetamide, TAA) 建立斑马鱼 ALI 模型,对北桑寄生中黄酮类化合物的保肝活性进行研究,以期在北桑寄生的药理研究提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

AB 野生型斑马鱼品系、CZ320 肝脏荧光标记斑马鱼 Tg (-1.7apoa2:GFP) 和 CZ59 中性粒细胞荧光标记斑马鱼 Tg (lyz:DsRED2) 由山东第一医科大学斑马鱼中心提供。斑马鱼养殖在昼夜交替周期为 14 h/10 h 的循环系统中,水温控制在 (28±1) °C, pH 值与盐浓度分别维持在 7.4、0.004% 左右,每日饲喂 2 次丰年虾,1 次普通饲料。

1.2 药品与试剂

LTF 为本实验室自制^[22]; 芦丁对照品 (质量分数 ≥98%, 批号 153-18-4) 购自西安瑞林生物科技有限公司; *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC, 质量分数 ≥98%, 批号 616-91-1)、油红 O 粉末 (批号 1320-06-5) 购自上海源叶生物有限公司; TAA (批号 62-55-5) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; ALT 试剂盒 (批号 C009-2-1)、AST 试剂盒 (批号 C010-2-1)、MDA 试剂盒 (批号 A003-1-1)、SOD 试剂盒 (批号 A001-3-2)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒 (批号 A007-2-1) 购自南京建成生物工程研究所; 还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 BC1175)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒 (批号 CA1410) 购自北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 P0012) 购自碧云天生物技术有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液套装 (批号 G1003) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 其他试剂均为分析级别。

1.3 仪器

BO-IR 型组织研磨破碎仪 (山东百欧医疗科技有限公司); HC-2518R 型高速冷冻离心机 (中佳有限公司); DK-98-II 型电热恒温水锅 (天津市泰斯特仪器有限公司); SpectraMax ABS 型酶标仪 (CMax Plus Molecular Devices 公司); HPG-280BX

型恒温培养箱(东联电子技术开发有限公司);IX83 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);GL224I-ISCN 型万分之一天平(德国 Sartorius 公司);斑马鱼养殖设备(上海海圣生物实验设备有限公司);JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);CRYOSTAR NX50 型冰冻切片机(赛默飞世尔科技有限公司)。

2 方法

2.1 LTF 含量检测

配制芦丁对照品溶液,绘制回归方程。称取实验室自制的 LTF,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,使用三氯化铝-醋酸钠溶液显色,利用回归方程计算 LTF 的含量^[22-23]。

2.2 LTF 耐受浓度筛选

将成熟健康的 6 月龄斑马鱼以 1:2 或 2:2 的雌雄比放入产卵缸中,待自然产卵后,收集透明胚胎,用循环系统中的养鱼水清洗 2 次,洗去粪便与杂质,转移至干净的培养皿,添加含有少量亚甲基蓝溶液的养鱼水,放置于 28 °C 恒温培养箱内孵育 3 d。将受精后 3 d (3 d post fertilization, 3 dpf) 健康 AB 幼鱼转移到 12 孔板中,每孔放入 30 尾幼鱼,设置对照组和 LTF (25、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$) 组,各孔为 4 mL 体系,对照组加入含 0.1% 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的养鱼水,给药组加入不同质量浓度的 LTF 药液,记录各组幼鱼生存情况,绘制生存曲线。

2.3 LTF 对 TAA 诱导的斑马鱼肝损伤的影响

2.3.1 斑马鱼荧光肝脏分析 选取具有荧光标记的 3 dpf Tg(-1.7apoa2:GFP)转基因斑马鱼幼鱼于 6 孔板内,设置对照组、模型组、阳性药 NAC(10 $\mu\text{mol/L}$) 组和 LTF (12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$) 组,每孔 15 尾。对照组给予斑马鱼养殖水,模型组加入 7 mmol/L TAA 溶液,各给药组给予 7 mmol/L TAA 和相应药物,给药处理 72 h。给药结束后,斑马鱼用三卡因麻醉,置于载玻片上,使幼鱼两眼重叠,用荧光显微镜采集同一部位图像,使用 Image J 软件统计幼鱼的荧光肝脏面积。

2.3.2 斑马鱼体长与卵黄囊吸收延迟的面积统计 按“2.3.1”项下方法分组和给药,给药结束后,使用 Image J 软件测量幼鱼的体长与卵黄囊吸收面积。

2.3.3 HE 染色 按“2.3.1”项下方法分组和给药,给药结束后,将幼鱼固定后用石蜡包埋,制作切片,进行 HE 染色,最后用中性树胶封片。在光学显微

镜下采集图像,分析各组斑马鱼幼鱼肝脏组织病理状况。

2.3.4 油红 O 染色 按“2.3.1”项下方法分组和给药,给药结束后,各组随机选取 10 尾幼鱼,三卡因麻醉后,用 4%组织固定液于 4 °C 固定 12 h。用 PBS 洗净固定液,在摇床上分别以 20%、40%、80%、100%的 1,2-丙二醇梯度脱水 10 min。然后,用 0.5% 油红 O 染液在水浴中避光染色 1 h,再用 100%、80%、40%、20%的 1,2-丙二醇依次脱水 15 min,最后用 PBS 清洗,在显微镜下采集肝脏区域图像,利用 Image J 软件测定肝脏处的平均光密度。

2.3.5 斑马鱼匀浆蛋白浓度测定 按“2.3.1”项下方法分组和给药,给药结束后,各选取 45 尾幼鱼,吸净水分,准确称定质量,按质量与体积 1:9 的比例加入 0.9% NaCl 水溶液,利用冷冻匀浆机进行研磨,离心后吸取上清,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

2.3.6 斑马鱼肝功能指标测定 按“2.3.1”项下方法分组和给药,给药结束后,按“2.3.5”项下方法制备 10%斑马鱼匀浆上清液,按试剂盒说明书测定 AST 和 ALT 活力。

2.3.7 斑马鱼体内 ROS 水平检测 按“2.3.1”项下方法分组和给药,给药结束后,每组收集 15 尾幼鱼,采用终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 荧光探针,室温避光染色 20 min,在荧光显微镜下观察并进行拍照,用 Image J 软件统计平均荧光强度以指示 ROS 水平。

2.3.8 斑马鱼体内氧化应激相关酶的测定 按“2.3.1”项下方法分组和给药,给药结束后,按“2.3.5”项下方法制备 10%斑马鱼匀浆上清液,用上清液的蛋白质浓度进行归一化处理,测定 CAT、SOD、MDA、GSH 的含量。

2.3.9 中性粒细胞迁移数目统计 按“2.3.1”项下方法分组和给药,给药 72 h 后,观察斑马鱼幼鱼中性粒细胞迁移情况,统计卵黄囊附近的中性粒细胞迁移数目。

2.4 数据学分析

使用 SPSS 数据编辑器与 Graphpad Prism 8.0.1 软件进行数据分析及制图,多组数据之间比较采用单因素方差分析(One way-ANOVA)和 Duncan 法,各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 LTF 含量测定

根据吸光度(A)值,计算得芦丁的回归方程为

$y = 10.676x + 0.0395$, $R^2 = 0.9992$; 线性范围为 $0.0008 \sim 0.0560 \text{ mg/mL}$ 。以芦丁为对照品,测得 LTF 质量分数为 98.06% 。

3.2 LTF 对斑马鱼的耐受性考察

将 3 dpf AB 斑马鱼暴露在不同质量浓度的 LTF 溶液中,每 24 小时观察记录幼鱼的存活情况。如图 1 所示,当 LTF 质量浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$ 及以下时,幼鱼未出现明显的发育、形态、行为异常。随着 LTF 质量浓度增大至 $100 \mu\text{g/mL}$,有 3.3% 幼鱼开始死亡。LTF 质量浓度大于 $200 \mu\text{g/mL}$,少量幼鱼出现脊背弯曲与游泳转圈等异常行为,死亡现象较为明显。斑马鱼给予 200 、 400 、 $800 \mu\text{g/mL}$ LTF 处理 24 h 的生存率分别达到 83.3% 、 20.0% 、 0 。 400 、 $800 \mu\text{g/mL}$ LTF 处理幼鱼 48 h ,幼鱼大量死亡。因此将后续实验 LTF 剂量控制在 $50 \mu\text{g/mL}$ 及以下。

3.3 LTF 对 TAA 引起斑马鱼体长与卵黄囊发育的影响

在评估药物对斑马鱼的肝脏毒性时,会将卵黄囊的吸收现象作为测试指标^[24]。如图 2 所示,TAA

可引起斑马鱼幼鱼发育迟缓,鱼鳔发育肿大或缺失,体长显著减小 ($P < 0.01$),卵黄囊吸收明显滞后 ($P <$

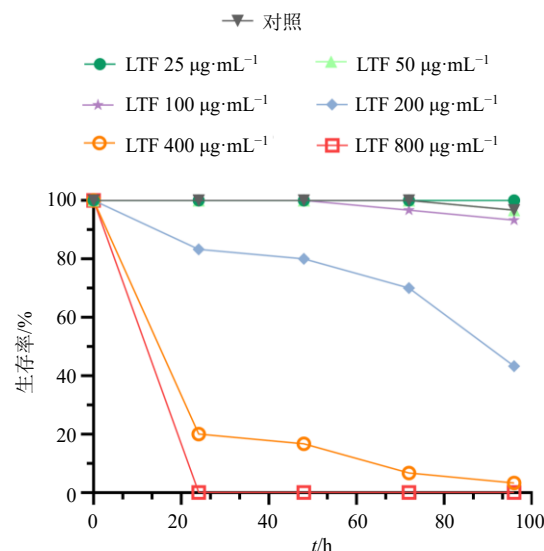
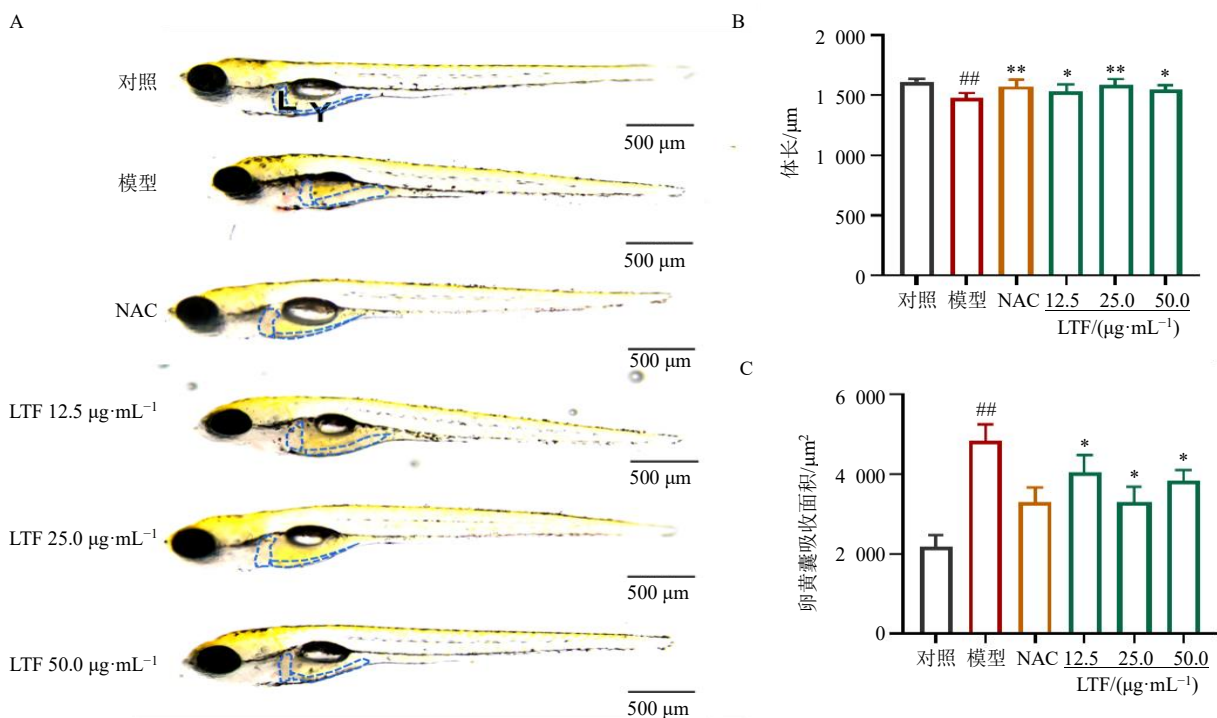


图 1 LTF 对 3 dpf 斑马鱼幼鱼在 96 h 内生存率的影响
Fig. 1 Effect of LTF on survival of 3 dpf zebrafish larvae over 96 h



A-斑马鱼体长与卵黄囊示意图 ($\times 10$), 蓝色方框表示肝脏与卵黄囊位置, L-肝脏, Y-卵黄囊; B-斑马鱼体长量化结果; C-斑马鱼卵黄囊吸收延迟面积的量化结果; 与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$, 下图同。

A-schematic representation of body length and yolk sac of zebrafish ($\times 10$), blue box indicates location of liver and yolk sac, L-liver, Y-yolk sac; B-results of zebrafish body length quantification; C-quantitative results on area of delayed absorption in zebrafish yolk sac; $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 2 LTF 对 TAA 引起斑马鱼体长改变与卵黄囊吸收延迟的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 2 Effect of LTF on TAA-induced changes in body length and delayed yolk sac absorption in zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

0.01)。阳性药物 NAC 处理后, 幼鱼的体长有所恢复 ($P<0.01$), 卵黄囊吸收延迟面积逐渐减小 ($P<0.05$)。LTF 处理后均能促进幼鱼的生长, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ LTF 可以增加幼鱼的体长发育 ($P<0.05$); 当 LTF 的剂量继续增大, 幼鱼的体长、卵黄囊的吸收滞后现象均得到明显改善 ($P<0.05$ 、0.01)。

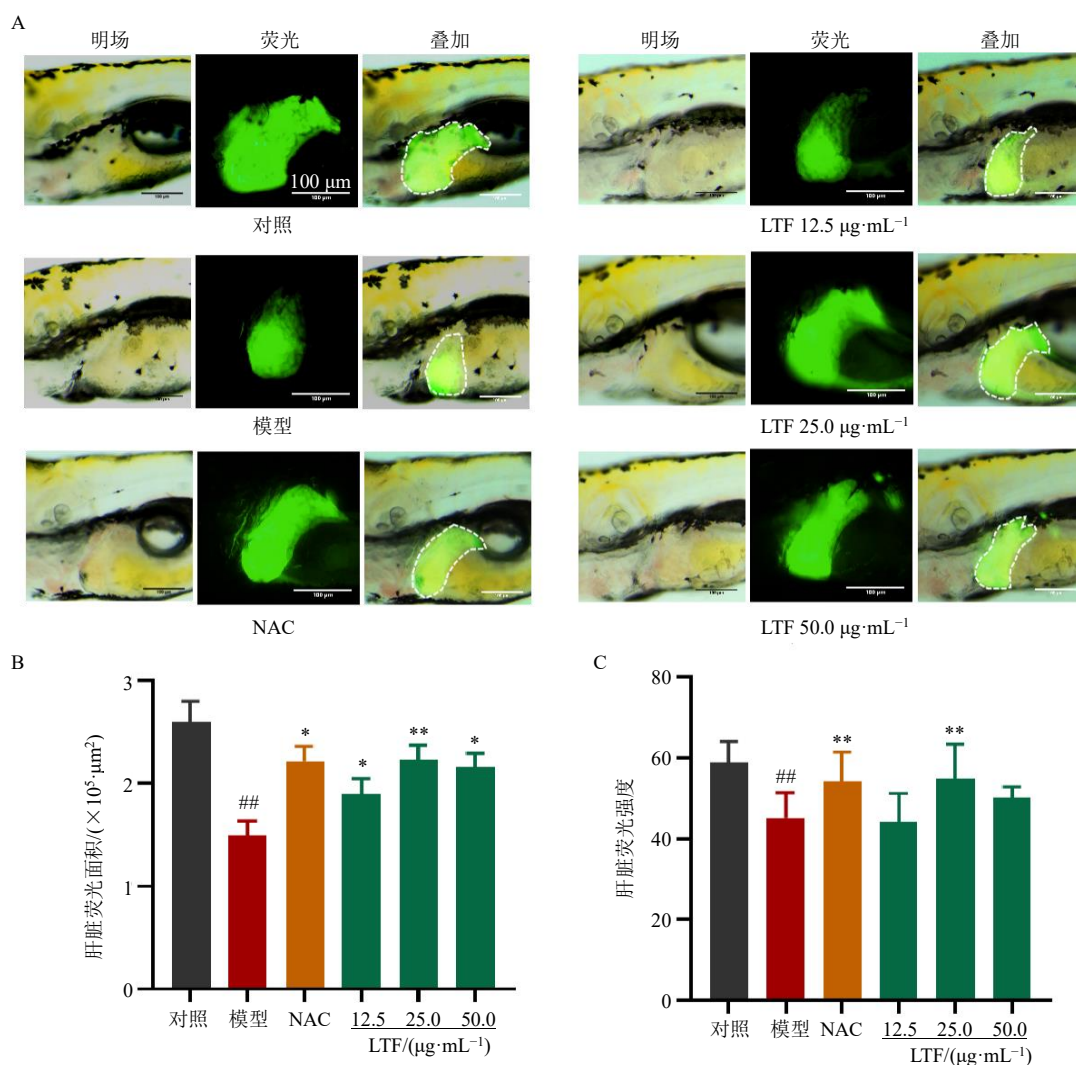
3.4 LTF 对 TAA 诱导的斑马鱼肝脏损伤的影响

利用肝脏荧光标记斑马鱼 Tg (*-1.7apoa2:GFP*) 测定斑马鱼的荧光肝脏面积与荧光强度, 考察 LTF 能否改善 TAA 诱导的斑马鱼肝损伤。如图 3 所示, 与对照组比较, 经过 TAA 处理的斑马鱼幼鱼, 其绿色荧光肝脏面积明显减少 ($P<0.01$), 绿色平均荧

光强度下降 ($P<0.01$), 肝脏形态发生改变。与模型组比较, NAC 显著增加幼鱼的荧光肝脏面积和荧光强度 ($P<0.05$ 、0.01); 12.5~50.0 $\mu\text{g/mL}$ LTF 可以有效逆转 TAA 诱导的肝脏面积萎缩 ($P<0.05$ 、0.01), 25.0 $\mu\text{g/mL}$ LTF 也可显著逆转肝脏荧光强度 ($P<0.01$)。

3.5 HE 染色结果

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼幼鱼的肝细胞排列不紧密, 胞质稀疏, 某些位置出现空泡化现象。与模型组比较, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ LTF 干预后, 斑马鱼幼鱼肝细胞排列紧凑, 胞质更紧密, 空泡化现象明显减少。



A-转基因幼鱼绿色荧光标记的肝脏 ($\times 40$); B-转基因幼鱼的绿色荧光肝脏面积统计; C-转基因幼鱼肝脏的绿色荧光强度统计。

A-green fluorescently labeled livers from transgenic larvae ($\times 40$); B-green fluorescent liver area statistics in transgenic larvae; C-green fluorescent intensity statistics of transgenic larvae liver.

图 3 LTF 对 TAA 诱导的斑马鱼肝脏发育的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 3 Effect of LTF on TAA-induced liver growth in zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

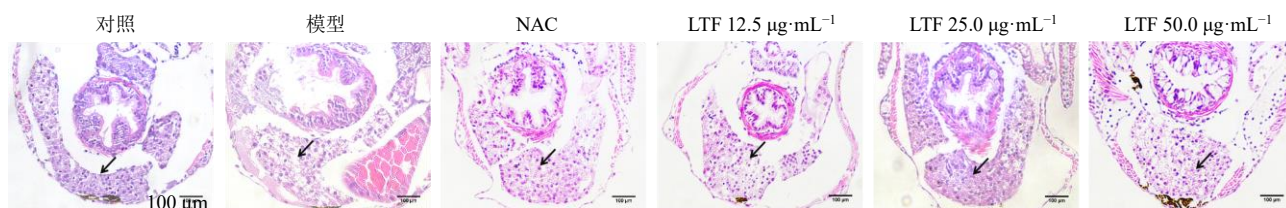


图 4 各组斑马鱼幼鱼 HE 染色结果 (×100)

Fig. 4 Results of HE staining of zebrafish larvae in each group (× 100)

3.6 LTF 对 TAA 引起的斑马鱼肝功能酶的影响

AST 和 ALT 活性是反映肝脏损伤的重要因素, 肝脏遭受某些刺激或损伤时, AST 与 ALT 活性异常上调^[25]。如图 5 所示, 将斑马鱼暴露在 TAA 溶液中连续处理 72 h, 幼鱼体内 AST 与 ALT 活性显著升高 ($P < 0.01$), 说明幼鱼肝脏出现损伤。与模

型组比较, NAC 组和 LTF (25.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组 AST 与 ALT 活力显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.7 油红 O 染色结果

利用油红 O 染色检测斑马鱼肝脏区域的脂质积累程度, 使用 Image J 软件统计幼鱼肝脏区域染色的平均光密度。如图 6 所示, 与对照组比较, 模型

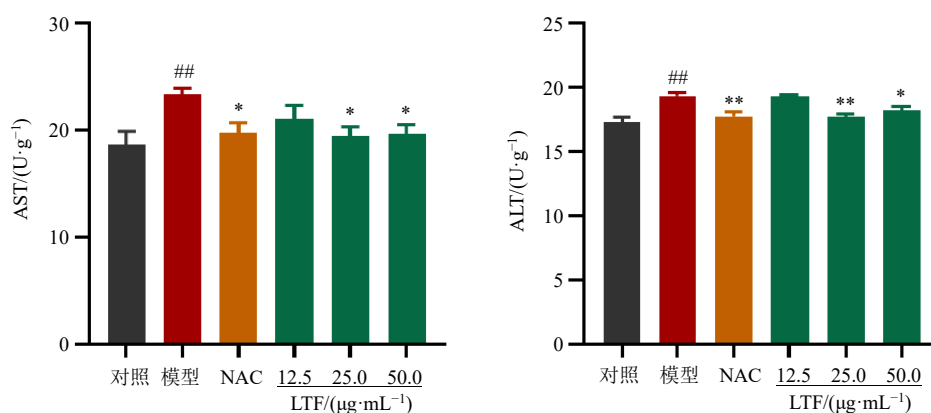
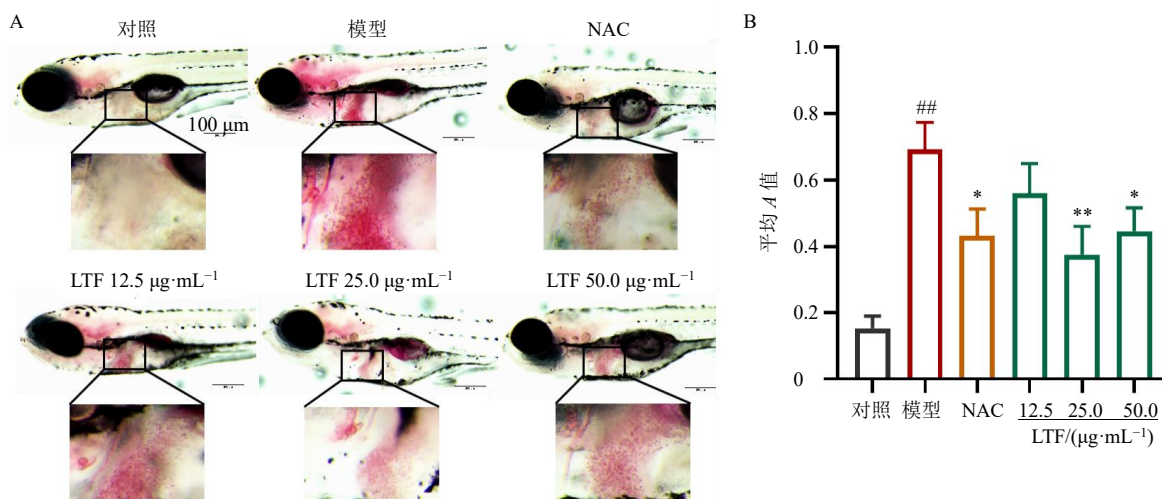


图 5 LTF 对 TAA 诱导的斑马鱼肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of LTF on TAA-induced liver function in zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-斑马鱼油红 O 染色示意图 (×20); B-斑马鱼肝脏区域的平均 A 值统计结果。

A-schematic of oil red O staining of zebrafish (× 20); B-statistical results of average A value in liver region of zebrafish.

图 6 斑马鱼油红 O 染色 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

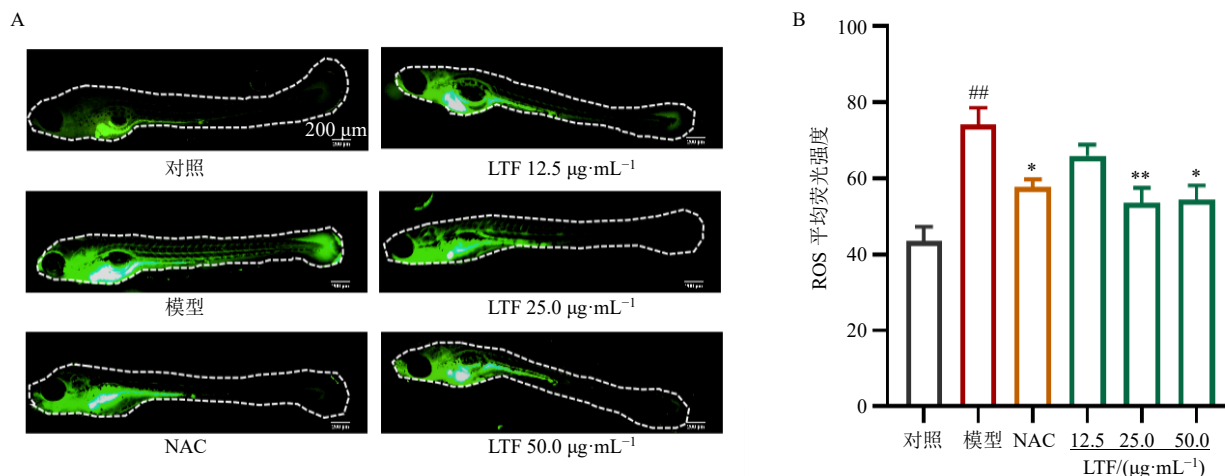
Fig. 6 Oil red O staining of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组斑马鱼肝脏区域的平均 A 值明显升高 ($P < 0.01$), 说明幼鱼肝组织中有大量脂滴的堆积。与模型组比较, NAC 组和 LTF (25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$) 组幼鱼肝脏处的脂质积累程度显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明 LTF 可以通过降低肝脏组织中的脂质堆积, 进一步减轻 TAA 引起的肝脏损伤。

3.8 LTF 对 TAA 引起 ROS 积累的影响

在受到外界刺激时, ROS 产生过多, 导致氧

化程度超出氧化物质的清除, 引起体内发生氧化应激^[26]。使用 DCFH-DA 荧光探针对 ROS 水平进行量化处理, 如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组幼鱼的整体绿色荧光强度明显增加, 表示 ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, NAC 组和 LTF (25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$) 组 ROS 水平明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 说明 LTF 可以减少 TAA 引起幼鱼体内 ROS 的积累。



A-ROS 染色 ($\times 10$); B-ROS 平均荧光强度。
A-ROS staining ($\times 10$); B-ROS mean fluorescence intensity.

图 7 幼鱼体内 ROS 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 7 ROS level in zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

3.9 LTF 对 TAA 诱导斑马鱼氧化应激相关酶活力的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼幼鱼体内脂质过氧化产物 MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$), 而抗氧化剂 SOD、CAT 活性及 GSH 含量显著降低 ($P < 0.01$), 说明斑马鱼体内的氧化与抗氧化系统之间失去平衡, 抗氧化物质不能及时清除氧化产物, 导致幼鱼体内发生氧化应激。与模型组比较, 各给药组斑马鱼幼鱼体内 SOD、CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), MDA 含量明显降低 ($P < 0.01$); NAC 组和 LTF (25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$) 组斑马鱼幼鱼体内 GSH 含量明显升高 ($P < 0.01$)。这可能是由于 NAC 在体内可以转化成谷胱甘肽^[27], 增加了抗氧化物质 GSH 的含量, 清除氧化产物的能力得到提升所致。实验结果说明 LTF 能够及时调控 MDA、SOD、CAT 与 GSH 水平, 提高机体清除氧化产物的能力, 降低氧化应激的水平, 进一步缓解了肝组织损伤。

3.10 LTF 对 TAA 诱导中性粒细胞迁移的影响

使用中性粒细胞荧光标记斑马鱼 Tg (*lyz:DsRED2*) 来检测中性粒细胞的迁移情况, 指示炎症的发生^[28], 以此考察 LTF 能否减少 TAA 诱导中性粒细胞的迁移。如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼幼鱼的鱼鳃和卵黄囊附近大量的中性粒细胞聚集 ($P < 0.01$), 提示附近有局部炎症发生。与模型组比较, NAC 组和 LTF (25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$) 组卵黄囊与鱼鳃附近的中性粒细胞聚集现象明显减少 ($P < 0.05$ 、0.01)。表明 LTF 可能通过减少中性粒细胞的聚集, 减轻 TAA 引起的局部炎症。

4 讨论

斑马鱼是一种繁殖速率快、发育周期短、产卵量大的脊椎动物, 其肝脏的发育与人体高度相似, 已广泛应用于肝脏疾病的发病机制、药物筛选等领域^[29-31]。斑马鱼幼鱼在个体发育阶段呈现透明状态, 无需解剖, 便可以清楚直接地观察疾病的发展与药物干预的效果^[32]。TAA 常被应用于肝损伤与纤维化

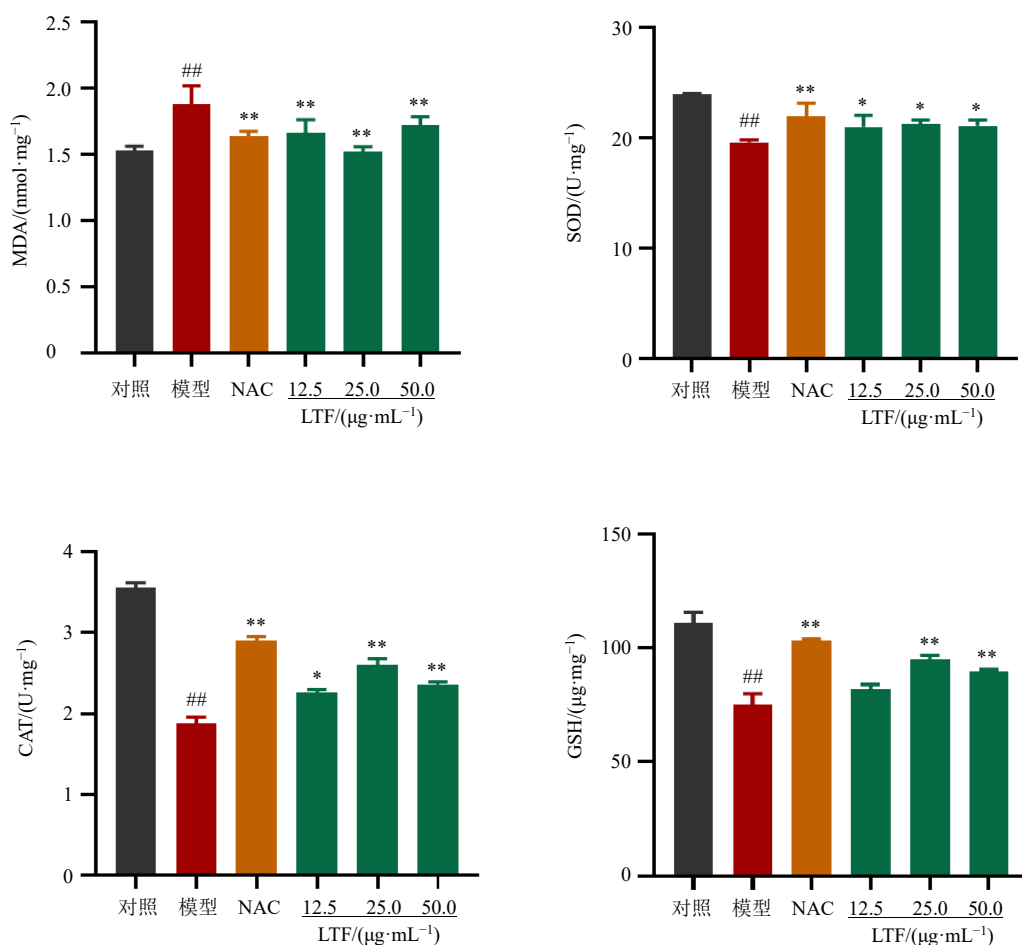
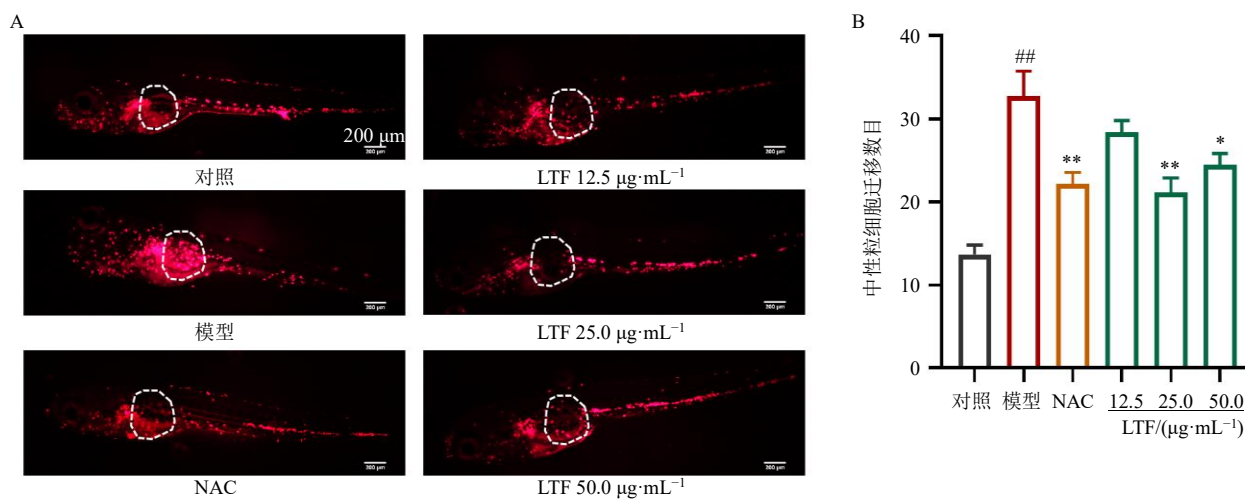


图 8 幼鱼体内氧化与抗氧化系统中相关酶的水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Levels of enzyme in oxidative and antioxidant system in zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-幼鱼中性粒细胞迁移情况 ($\times 10$), 白色圈表示中性粒细胞统计区域; B-卵黄囊附近中性粒细胞统计结果。

A-neutrophil migration of larvae ($\times 10$), white circles indicate areas of neutrophil counts; B-results of neutrophil counts in vicinity of yolk sac.

图 9 LTF 对 TAA 诱导中性粒细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 9 Effect of LTF on TAA-induced neutrophil migration ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

动物模型的建立^[33-34]。Fitzhugh 等^[35]用 TAA 处理大鼠,发现 TAA 能引起大鼠肝脏肿大、肝功能下降及纤维化的现象,首次证明了 TAA 的肝毒性作用。王洁^[36]研究发现 0.06% TAA 处理 48 hpf 斑马鱼,幼鱼出现肝脏面积变小、肝组织结构紊乱等异常现象。因此,本研究使用 TAA 建立斑马鱼 ALI 模型,结果显示,TAA 可明显引起肝脏萎缩与肝功能损伤、诱发炎症以及引起氧化应激损伤等,与文献报道一致^[36-37],可用于 LTF 的肝保护活性研究。

LTF 在斑马鱼模型上显示了肝保护作用。在本研究中,LTF 可以明显逆转 TAA 诱导的斑马鱼生长发育迟缓、卵黄囊吸收滞后,在一定程度恢复了肝脏病理结构,增加了肝脏面积及荧光强度,改善了肝功能酶活性。LTF (25.0 $\mu\text{g/mL}$) 组的效果比较明显,当剂量增加至 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,个别指标(如组织病理、肝脏荧光强度)并未显示出显著性差异,可能是由于 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 接近毒性剂量,引起了斑马鱼发育的异常,这也提示在后续的研究中,将深入探究 LTF 的量效关系以及潜在的毒性。本研究首次揭示了 LTF 对 ALI 具有明显改善作用,为后续深入研究提供了有益探索。

LTF 可通过减少氧化应激水平减轻肝损伤程度。TAA 被肝脏吸收后,经过一系列作用,形成有毒的硫氧化物 TASO₂,促进氧化应激、细胞凋亡等,影响肝功能运转^[38],诱发机体产生肿瘤、系统性红斑狼疮、肝炎等疾病^[39-40]。氧化应激还可影响肝脏的脂质代谢,进一步引起脂质过氧化^[41-42]。庞敏等^[43]研究发现,小鼠 ip TAA (100 mg/kg) 后,小鼠肝组织内谷胱甘肽过氧化物酶与 GSH 的水平下调,脂质过氧化产物 MDA 增多,Nrf2 表达减少,而 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 表达水平上调。本研究结果显示,TAA 处理后斑马鱼体内 ROS 过度积累,抗氧化剂 SOD、CAT 与 GSH 含量显著下降,脂质过氧化产物 MDA 水平升高。25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ LTF 干预后能够显著减少 ROS 和 MDA 水平,增加 SOD、CAT 与 GSH 的活性,提升了机体的抗氧化能力,减轻了 TAA 诱导的斑马鱼肝毒性。

LTF 通过降低中性粒细胞的迁移现象缓解肝损伤。现代研究表明 TAA 在诱发氧化应激反应后,进一步促进炎症介质肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等释放,激活炎症^[44-45]。在本研究中,TAA 处理

幼鱼后,幼鱼卵黄囊附近出现大量中性粒细胞聚集,提示局部的炎症发生。25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ LTF 干预后,中性粒细胞迁移现象减少。研究结果进一步说明 LTF 可能通过减少中性粒细胞的聚集现象来改善 TAA 引起斑马鱼的局部炎症。

综上,本研究首次发现 LTF 对 TAA 引起的肝毒性具有抑制作用,并通过维持氧化与抗氧化系统的平衡来减轻肝脏损伤,为后续深入探讨其作用机制奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bai P, Ye H F, Xie M Q, *et al.* A synthetic biology-based device prevents liver injury in mice [J]. *J Hepatol*, 2016, 65(1): 84-94.
- [2] Zhang Y, Wang C, Yu B, *et al.* Gastrodin protects against ethanol-induced liver injury and apoptosis in HepG2 cells and animal models of alcoholic liver disease [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(5): 670-679.
- [3] 吴广阳, 宋添力, 唐浪, 等. 竹节参总皂苷缓解 CCl₄ 诱导的大鼠急性肝损伤: 基于调控 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路 [J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(2): 244-251.
- [4] 孙立群. 紫堇灵调控 Nrf2/GPX4 抑制铁死亡改善玉米赤霉烯酮诱导肝损伤的机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- [5] 张志宏, 周俊发, 秦安琪, 等. 中药单体抗急性肝损伤的作用机制研究进展 [J]. 中医药信息, 2023, 40(12): 70-74.
- [6] Hryniewicz R, Niedzwiedzka-Rystwej P. Etiology of viral induced acute liver failure and defensins as potential therapeutic agents in ALF treatment [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1153528.
- [7] 韩才均, 朴美花, 黄媛, 等. 肠脂肪酸结合蛋白在慢加急性肝衰竭发生发展中的预测价值 [J/OL]. 临床肝胆病杂志, (2024-03-21) [2024-05-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1108.r.20240319.0928.002.html>.
- [8] Crismale J F, Friedman S L. Acute liver injury and decompensated cirrhosis [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(4): 647-662.
- [9] Cocolini F, Coimbra R, Ordonez C, *et al.* Liver trauma: WSES 2020 guidelines [J]. *World J Emerg Surg*, 2020, 15(1): 24.
- [10] Li H X, Hao K, Wu J Y, *et al.* A facile theragnostic nano-platform for the effective treatment and real-time imaging of acute liver injury [J]. *Biomater Sci*, 2023, 11(13): 4664-4674.
- [11] Sanjay S, Girish C, Toi P C, *et al.* Quercetin modulates

- NRF2 and NF- κ B/TLR-4 pathways to protect against isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity *in vivo* [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99(9): 952-963.
- [12] Yuan R S, Tao X, Liang S, *et al.* Protective effect of acidic polysaccharide from *Schisandra chinensis* on acute ethanol-induced liver injury through reducing CYP2E1-dependent oxidative stress [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 537-542.
- [13] 唐浪, 宋添力, 吴广阳, 等. 土家药竹节参多糖通过 Nrf2-ARE 信号通路对四氯化碳致大鼠急性肝损伤的抗氧化保护作用 [J]. *中草药*, 2023, 54(15): 4866-4873.
- [14] Luo J Y, Liao J B, Wang Y M, *et al.* Advances in traditional Chinese medicine for liver disease therapy in 2021 [J]. *Tradit Med Res*, 2022, 7(6): 58.
- [15] 陈羽, 张清秀, 谷仕艳, 等. 灯盏花素通过 Nrf2 信号通路改善 HepG2 细胞急性酒精性肝损伤 [J]. *中南农业科技*, 2024, 45(3): 43-49.
- [16] Xu S X, Chen Y E, Miao J D, *et al.* Esculin inhibits hepatic stellate cell activation and CCl₄-induced liver fibrosis by activating the Nrf2/GPX4 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155465.
- [17] 郑紫云, 柴书彤, 陈婕, 等. 北桑寄生产黄酮内生菌的分离鉴定及其抗氧化和抑菌活性评价 [J]. *微生物学通报*, 2022, 49(9): 3798-3812.
- [18] 欧阳浩楠, 王孝安, 郭华. 陕西子午岭地区北桑寄生宿主选择和寄生特性研究 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(5): 2090-2095.
- [19] 许宁宁, 白云娥, 薛强强, 等. 北桑寄生化学成分系统预实验 [J]. *中国药物与临床*, 2012, 12(6): 762-763.
- [20] 颜丽涵, 赵博荣, 杨虹, 等. 北桑寄生内生真菌 *Penicillium* sp. ZS108 原生质体的制备与紫外诱变 [J]. *菌物学报*, 2024, 43(1): 70-81.
- [21] Zhou J T, Ren K D, Hou J, *et al.* α -Rhamnrtin-3- α -rhamnoside exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells by abrogating NF- κ B and activating the Nrf2 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5): 799.
- [22] 胡嘉琳, 胡超男, 杨飞, 等. 北桑寄生总黄酮提取方法的优化 [J]. *中国医药指南*, 2019, 17(11): 1-2.
- [23] 邓晓颜, 王小兰, 李孟, 等. 怀菊花总黄酮富集纯化工艺优化及其抗炎活性、成分组成研究 [J]. *中成药*, 2023, 45(9): 2815-2821.
- [24] Liu Y, Guo J, Zhang J E, *et al.* Chlorogenic acid alleviates thioacetamide-induced toxicity and promotes liver development in zebrafish (*Danio rerio*) through the Wnt signaling pathway [J]. *Aquat Toxicol*, 2022, 242: 106039.
- [25] Hussein R M, Sawy D M, Kandeil M A, *et al.* Chlorogenic acid, quercetin, coenzyme Q10 and silymarin modulate Keap1-Nrf2/heme oxygenase-1 signaling in thioacetamide-induced acute liver toxicity [J]. *Life Sci*, 2021, 277: 119460.
- [26] Jia Z L, Cen J, Wang J B, *et al.* Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity in zebrafish larvae: Activation of ROS-mediated ERS, apoptosis and the Nrf2 pathway [J]. *Chemosphere*, 2019, 227: 541-550.
- [27] 钟艾琪, 王奇, 莫友胜. 葛根素通过抑制铁死亡改善对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤的作用及机制研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(12): 1729-1735.
- [28] Wang H Y, Sun Y, Xie Y H, *et al.* Identification of key anti-inflammatory components of green prickly ash fruit based on zebrafish model and activity tracking strategy [J]. *J Funct Foods*, 2023, 107: 105656.
- [29] White R M, Sessa A, Burke C, *et al.* Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 183-189.
- [30] Goessling W, Sadler K C. Zebrafish: An important tool for liver disease research [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(6): 1361-1377.
- [31] Fazio M, Ablain J, Chuan Y, *et al.* Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(5): 263-273.
- [32] 陈福海, 蒋林, 曹建斌, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统制备斑马鱼 cbsb 敲除模型 [J]. *浙江医学*, 2024, 46(4): 377-383.
- [33] Ezhilarasan D. Molecular mechanisms in thioacetamide-induced acute and chronic liver injury models [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2023, 99: 104093.
- [34] 张浩东, 张婷, 许健. 硫代乙酰胺多器官毒性研究进展 [J]. *毒理学杂志*, 2023, 37(3): 269-274.
- [35] Fitzhugh O G, Nelson A A. Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide [J]. *Science*, 1948, 108(2814): 626-628.
- [36] 王洁. TAA 影响 PPAR/RXR 传导路径诱导斑马鱼肝脏纤维化的研究 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2023.
- [37] Zhang J E, Deng Y Y, Cheng B, *et al.* Protective effects and molecular mechanisms of baicalein on thioacetamide-induced toxicity in zebrafish larvae [J]. *Chemosphere*, 2020, 256: 127038.
- [38] Ghosh S, Sarkar A, Bhattacharyya S, *et al.* Silymarin protects mouse liver and kidney from thioacetamide induced toxicity by scavenging reactive oxygen species and activating PI3K-Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 481.
- [39] Ganesan K, Sukalingam K, Xu B J. *Solanum trilobatum* L.

- ameliorate thioacetamide-induced oxidative stress and hepatic damage in albino rats [J]. *Antioxidants*, 2017, 6(3): 68.
- [40] 刘志勇, 褚爱春. 姜黄素对系统性红斑狼疮小鼠氧化应激的影响及其保护作用 [J]. 临床内科杂志, 2022, 39(11): 764-766.
- [41] Zhang Q Q, Chen Q, Cao P, *et al.* AGK2 pre-treatment protects against thioacetamide-induced acute liver failure via regulating the MFN2-PERK axis and ferroptosis signaling pathway [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2024, 23(1): 43-51.
- [42] 谢燕, 李贵平, 段月阳, 等. 泽泻提取物改善游离脂肪酸诱导的 HepG2 脂肪变性细胞模型的脂质代谢及氧化应激异常 [J]. 中草药, 2024, 55(6): 2002-2012.
- [43] 庞敏, 单宇, 王菲菲, 等. 诸葛菜种子水提物对硫代乙酰胺诱导小鼠急性肝损伤的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1399-1405.
- [44] Forrester S J, Kikuchi D S, Hernandez M S, *et al.* Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling [J]. *Circ Res*, 2018, 122(6): 877-902.
- [45] ElBaset M A, Salem R S, Ayman F, *et al.* Effect of empagliflozin on thioacetamide-induced liver injury in rats: role of AMPK/SIRT-1/HIF-1 α pathway in halting liver fibrosis [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(11): 2152.

[责任编辑 李亚楠]