

• 药理与临床 •

基于斑马鱼幼鱼模型士的宁肝毒性评价及机制探讨

王璇^{1,2}, 叶先文^{1,3#}, 任洪民¹, 范琦琦¹, 刘艺淇¹, 王煜杰¹, 姜水蓝¹, 杨超¹, 赵崇军^{1*}, 李向日^{1*}

1. 北京中医药大学 北京中医药大学中药炮制研究中心/中药品质评价北京重点实验室, 北京 102488

2. 长治医学院附属和济医院, 山西 长治 046011

3. 江西中医药大学药学院 药理学系, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 基于斑马鱼幼鱼模型探究士的宁的肝毒性及潜在作用机制。**方法** 通过急性毒性实验确定士的宁的 10%致死浓度 (10% lethal concentration, LC_{10}), 以 0.33、0.66 $\mu\text{g/mL}$ ($1/4 LC_{10}$ 、 $1/2 LC_{10}$) 2 个亚致死质量浓度干预斑马鱼幼鱼, 通过体视显微成像观察肝脏表型变化, 吖啶橙染色检测肝细胞凋亡, 组织病理学分析肝组织空泡化程度, 并测定丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性。进一步采用转录组测序技术筛选差异表达基因, 并通过 qRT-PCR 验证关键基因表达水平。**结果** 士的宁亚致死剂量暴露诱导斑马鱼幼鱼肝脏形态异常, 病理切片显示肝细胞空泡化, ALT 和 AST 活性均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。转录组分析发现脂质代谢通路被显著富集, 其中细胞死亡诱导 DFF45 样效应因子 B (cell death-inducing DFF45-like effector B, *CIDEB*)、细胞色素 P450 家族 7 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1, *CYP7A1*)、成纤维细胞生长因子 19 (fibroblast growth factor 19, *FGF19*) 等关键调控基因表达异常。**结论** 士的宁具有明显肝毒性, 其毒性作用机制可能涉及调控脂质代谢通路关键基因 (如 *CIDEB*、*CYP7A1*、*FGF19*) 的异常表达, 进而引发脂质代谢紊乱, 为马钱子及含士的宁相关药物制剂的临床安全合理用药提供理论参考。

关键词: 士的宁; 马钱子; 肝毒性; 斑马鱼; 脂质代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)15-5452-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.15.012

Evaluation and mechanism exploration of strychnine hepatotoxicity based on zebrafish larvae model

WANG Xuan^{1,2}, YE Xianwen^{1,3}, REN Hongmin¹, FAN Qiqi¹, LIU Yiqi¹, WANG Yujie¹, JIANG Shuilan¹, YANG Chao¹, ZHAO Chongjun¹, LI Xiangri¹

1. Research Center for Processing of Traditional Chinese Medicine/Beijing Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Heji Hospital Affiliated to Changzhi Medical College, Changzhi 046011, China

3. Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To investigate the hepatotoxicity and potential mechanism of strychnine based on zebrafish larvae model.

Methods The acute toxicity test was performed to determine the 10% lethal concentration (LC_{10}) of strychnine, and then the sub-lethal concentrations of 0.33, 0.66 $\mu\text{g/mL}$ ($1/4 LC_{10}$, $1/2 LC_{10}$) were given to zebrafish larvae, the liver phenotypic changes were observed by stereomicroscopic imaging, acridine orange staining was used to detect hepatocyte apoptosis, histopathological of liver tissue vacuolization degree was analyzed, the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were

收稿日期: 2025-04-03

基金项目: 国家中医药管理局课题 (GZY-KJS-2024-014)

作者简介: 王璇 (2000—), 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。E-mail: wangxuan9962@163.com

#共同第一作者: 叶先文 (1995—), 博士, 讲师, 研究方向为中药炮制、质量控制及药效物质基础。E-mail: xianwenye45@gmail.com

*通信作者: 赵崇军 (1988—), 博士, 助理研究员, 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。E-mail: 1014256537@qq.com

李向日 (1972—), 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药炮制、质量控制及药效物质基础。E-mail: lixiangri@sina.com

measured. Transcriptome sequencing technology was further used to screen differentially expressed genes, and the expression levels of key genes were verified by qRT-PCR. **Results** The liver morphology of larvae zebrafish was abnormal after exposure to sub-lethal doses of strychnine. The pathological sections showed hepatocyte void formation, and the activities of ALT and AST were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Transcriptomic analysis revealed significant enrichment of lipid metabolism pathway. Among them, key regulatory genes such as cell death-inducing DFF45-like effector B (*CIDEB*), cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 (*CYP7A1*), and fibroblast growth factor 19 (*FGF19*) showed abnormal expression. **Conclusion** Strychnine has obvious hepatotoxicity, and the mechanism of its hepatotoxicity may involve the abnormal expression of key genes regulating lipid metabolism pathway (such as *CIDEB*, *CYP7A1*, *FGF19*), and then lead to lipid metabolism disorders. This study provides theoretical reference for the safe and rational clinical use of *Strychnos nux-vomica* and related drug preparations containing strychnine.

Key words: strychnine; *Strychnos nux-vomica* L.; hepatotoxicity; zebrafish; lipid metabolism

马钱子 *Strychni Semen* 为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子, 始载于《本草纲目》, 归肝、脾经, 具有通络止痛、散结消肿之功, 为伤科中疗伤止痛的佳品^[1]。然而, 近年来关于马钱子引起的中毒案例报道屡见不鲜。对于此类不良反应的研究, 当前研究往往集中于中枢神经毒性, 缺乏对肝毒性的系统评价。“药以治病, 因毒为能”, 为保证马钱子在临床中的安全应用, 尽快找寻马钱子致肝毒性的物质基础及作用机制显得尤为重要。研究表明, 马钱子具有较大毒性, 易对肝脏造成严重损害, 其肝毒性可能由代谢紊乱途径引起, 包括参与能量、嘌呤、脂类和氨基酸代谢的小分子^[2]。土的宁是马钱子中含量最高的生物碱, 可能为马钱子引起毒性反应的关键物质基础。土的宁在胃肠道吸收快, 服用后短时间内即发生中毒现象, 如心悸、呼吸困难及头晕等^[3]。然而, 当前对于土的宁是否会对机体造成肝毒性尚未有统一论, 亟待深入探究。

斑马鱼作为一种新型模式生物, 因其繁殖周期短、具有光学透明性、与人类基因的高度相似性及高通量等特征^[4], 已广泛应用于毒性药物的快速筛选及毒理学评价中^[5-6]。因此, 本研究首先基于斑马鱼幼鱼模型, 从急性毒性、表型、体内凋亡、肝面积、病理切片及肝功能 6 个方面, 对土的宁的肝毒性进行初步评价。基于转录组学技术, 找寻该成分造成斑马鱼肝毒性的差异基因, 进一步筛选核心靶点, 富集关键的信号通路。最后, 运用 qRT-PCR 技术对肝毒性核心作用靶点进行验证, 初步探究土的宁致肝毒性的作用机制。以期为中药马钱子及含土的宁相关药物制剂, 在临床的安全合理利用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

AB 系野生型斑马鱼、CZ16[gz15Tg, Tg (fabp10a: dsRed; ela3: EGFP)] 双色荧光转基因斑马

鱼, 均养殖于北京中药品质评价重点实验室。培养条件为水温 28.5 °C, pH 值 7.0~8.0, 14 h 光照/10 h 黑暗周期, 待斑马鱼交配产卵后, 收集受精卵于胚胎培养水 (0.137 mol/L NaCl、5.4 mol/L KCl、0.25 mol/L Na₂HPO₄、0.44 mol/L K₂HPO₄、1.3 mol/L CaCl₂、1.0 mol/L MgSO₄、4.2 mol/L NaHCO₃) 中, 置于恒温培养箱内培养, 在受精后 4 d (4 d post-fertilization, 4 dpf) 阶段前挑选健康的斑马鱼幼鱼用于后续给药。

1.2 药品与试剂

土的宁对照品 (批号 DSTDS002602, 质量分数为 98%) 购自成都乐美天医药科技有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 检测试剂盒 (批号 20231217)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 检测试剂盒 (批号 20230510) 均购自南京建成生物工程研究所有限公司; 一体化第一链合成 MasterMix (批号 2020082131)、Taq SYBR Green qPCR 预混料 (批号 202120631) 购自北京兰博立德生物技术有限公司; 吖啶橙染液 (批号 S47568) 购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 仪器

ESEN-AW-S 型斑马鱼养殖系统 (北京爱生生物科技有限公司); Stemi508 型体视显微镜 (卡尔·蔡司股份公司); TE-2000-S 型光学倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); NanoDrop 2000 型微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HPG-280BX 型光照培养箱 (哈尔滨市东联电子技术开发公司); Gene5 型酶标仪 (伯腾仪器有限公司); CFX96 Real-Time PCR System (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 土的宁对斑马鱼的急性毒性研究

精密称取 10 mg 土的宁对照品, 溶于二甲基亚

砒 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 配制得到质量浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的母液, 给药时将母液稀释成所需浓度。将 4 dpf 的斑马鱼置于不同质量浓度 (1、2、3、4、6、7、8 $\mu\text{g/mL}$) 的士的宁溶液中, 同时, 以 0.01% DMSO 的胚胎培养水作为溶剂对照, 暴露 24 h 后确定各组斑马鱼存活数量, 计算死亡率, 并绘制量毒曲线。

2.2 士的宁对斑马鱼的肝毒性评价

2.2.1 分组与给药 根据量毒曲线得到 10%致死浓度 (10% lethal concentration, LC_{10}), 分别取 1/4 LC_{10} 、1/2 LC_{10} 作为低、高剂量给药组, 将 4 dpf 的斑马鱼暴露于不同质量浓度的给药溶液中, 以 0.01% DMSO 的胚胎培养水作为溶剂对照, 暴露 24 h 后观察并测定各组肝毒性评价相关指标。

2.2.2 肝毒性评价方法 除肝脏荧光面积测定采用 CZ16 转基因斑马鱼, 其余指标均选用野生型 AB 系斑马鱼。

(1) 斑马鱼表型观察: 在实验暴露终点, 用胚胎培养水将各组斑马鱼冲洗 3 次, 每组随机选取 10 尾斑马鱼, 加入三卡因溶液麻醉后, 将其侧位摆放, 固定于含 3% 甲基纤维素的载玻片上, 于体式显微镜下观察肝脏变性情况并记录。

(2) 肝脏荧光面积测定: 在实验暴露终点, 用胚胎培养水将各组斑马鱼冲洗 3 次, 三卡因溶液麻醉, 固定于载玻片后, 于荧光显微镜下观察肝脏荧光并拍照, 用 Image pro plus 6.0 软件统计荧光面积, 实验重复 3 次。

(3) 体内凋亡评价: 在实验暴露终点, 用胚胎培养水将各组斑马鱼冲洗 3 次, 每组随机选取 10 尾斑马鱼, 向孔板中加入质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的吖啶橙染液 2 mL, 避光染色 30 min 后, 用胚胎培养水和 PBS 各冲洗 3 遍, 于荧光显微镜下观察各组斑马鱼幼鱼肝细胞凋亡情况, 并拍照记录。

(4) 肝脏组织病理学评价: 在实验暴露终点, 用胚胎培养水将各组斑马鱼冲洗 3 次, 每组随机选取 10 尾斑马鱼, 转移至含 4% 多聚甲醛的 1.5 mL 离心管中。用乙醇逐步脱水, 石蜡包埋, 切成 4~5 μm 的切片进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 在显微镜下观察肝组织病理变化。

(5) 肝脏生化指标评价: 在实验暴露终点, 收集斑马鱼样本, 称定质量后按 1:10 的比例加入生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照试剂盒说明书测定

ALT、AST 活性, 实验重复 3 次。

2.3 士的宁对斑马鱼肝毒性的转录组学研究

2.3.1 样本收集 选取野生型 AB 系斑马鱼进行药物暴露, 24 h 后用胚胎培养水和纯水分别清洗 3 次, 收集各组斑马鱼幼鱼各 80 尾置于离心管中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存, 用于后续分析。

2.3.2 RNA 的抽提及建库测序 使用 Trizol 试剂匀浆提取各组斑马鱼总 RNA。利用 Nanodrop 2000 型微量分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。连接 adaptor, 产物进行纯化和片段分选, 用分选产物进行 PCR 扩增, 构建 cDNA 文库, 最后利用 Illumina NovaSeq 6000 平台测序。

2.3.3 数据过滤 首先利用 tidyverse 包过滤掉包含零的基因, 然后通过 g:Profiler 将基因转成 Homo sapiens 的 Symbol, 对于有重复的基因, 保留行平均值大的基因。

2.3.4 差异表达基因分析 对原始数据进行 $\log_2$ 转换, 利用 Limma 函数包分别对士的宁低剂量组与对照组、士的宁高剂量组与对照组进行组间差异分析, 以 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC)| > 1 且 $P < 0.05$ 筛选差异表达基因。

2.3.5 基因注释分析 首先对各组基因进行主成分分析 (principal components analysis, PCA), 利用 Enhancedvolcano R 包绘制火山图, 使用 OmicShare 工具 (<https://www.omicshare.com/tools/>) 绘制组间基因差异热图, 直观地展示不同差异表达基因模块在各组的表达趋势; 接下来通过 Metascape (<https://metascape.org/>)、WebGestalt (<https://www.webgestalt.org/>) 和仙桃学术 (<https://www.xiantaozi.com>) 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能、基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。 $P < 0.05$ 的富集结果视为有统计学意义。

2.4 qRT-PCR 验证

按照试剂盒说明书提取各组斑马鱼总 RNA 后, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因表达量。细胞死亡诱导 DFF45 样效应因子 B (cell death-inducing DFF45-like effector B, CIDEB)、细胞色素 P450 家族 27 亚家族 C 成员 1 (cytochrome P450 family 27 subfamily C member 1, CYP27C1)、

细胞色素 P450 家族 2 亚家族 R 成员 1 (cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1, *CYP2R1*)、细胞色素 P450 家族 7 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1, *CYP7A1*)、成纤维细胞生长因子 19 (fibroblast growth factor 19, *FGF19*)、卵磷脂-胆固醇酰基转移酶 (lecithin-cholesterol acyltransferase, *LCAT*)、单酰甘油 O-酰基转移酶 3 (monoacylglycerol O-acyltransferase 3, *MOGAT3*)、NPC1 样细胞内胆固醇转运蛋白 1 (NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1, *NPC1L1*)、微粒体三酰甘油转移蛋白 (microsomal triglyceride transfer protein, *MTTP*)、磷脂酶 A2 第

XIIB 组 (phospholipase A2 group XIIB, *PLA2G12B*)、跨膜蛋白 86B (transmembrane protein 86B, *TMEM86B*)、溶质载体家族 5 成员 8 (solute carrier family 5 member 8, *SLC5A8*)、利钠肽 A (natriuretic peptide A, *NPPA*)、GATA 结合蛋白 5 (GATA binding protein 5, *GATA5*)、RUNX 家族转录因子 3 (RUNX family transcription factor 3, *RUNX3*)、酸性鞘磷脂酶样 3B (sphingomyelin phosphodiesterase acid like 3B, *SMPDL3B*)、氨基乙酰丙酸合酶 2 (aminolevulinate synthase 2, *ALAS2*) 和 GATA 结合蛋白 1 (GATA binding protein 1, *GATA1*) 的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	AATCCCAAAGCCAACAGAGAGAAG	CATCACCAGAGTCCATCACAATACC
<i>CIDEB</i>	TGAGGAGGACGGGACAGAGG	CTCGGTTTACTATCGCCTGGTTTG
<i>CYP27C1</i>	AAGGCGGCGAGAGTCAAGAG	CCATACTTCTTAGCGTGTCCATC
<i>CYP2R1</i>	GCTGTGAAGTCTTCCGCTAC	TTGCCTTGGTGCTGGTCAATG
<i>CYP7A1</i>	CGTCGCTATACTTTGGGCTTCAC	TTCGCCTCACCTCCTCACTTG
<i>FGF19</i>	CTGCGTAGCCATTAAGGGAGTTG	TGTAGCCGCTCTGGAAGGATGC
<i>LCAT</i>	TTACAACAGAACCACTCGCAAGAC	GCTGACCAGATGCTGAACCATAG
<i>MOGAT3</i>	CGTTCGTGCTGCTGTGTCTC	CCACTGTGACCTCCGACCTC
<i>NPC1L1</i>	GTCATCTTCTCTACATCGCAGTG	AGCAGCCGACTACCAGAATCC
<i>MTTP</i>	GCATACAGCACCATCGCCATC	GCCGCACGCACGTTCTTC
<i>PLA2G12B</i>	CCTGCTCCTGCTGTGTATCTCTG	GCTCTGCCTGATTCTCCTGATTAAC
<i>TMEM86B</i>	CTCAGTGACCTTCCTGTCTCTC	GTAGATGCCAACGCCGAACAC
<i>SLC5A8</i>	ACAGGCGGCTTTCAGTATTTTCAG	CCCACAATGACAGTCCCAAACC
<i>NPPA</i>	AGCCGTAGATTATGAAGACAGCAAC	TTTCTCTGTGTGTCAAATCCATCCG
<i>GATA5</i>	TGGCGGCATGATCGGTCTTC	CACAGCGGCGTTGAGATTGAG
<i>RUNX3</i>	CACGGACAGCCCAAACCTTTCTC	GAACATCACCAAGAGCCACCAC
<i>SMPDL3B</i>	AATCGGCAACCTCACTAACATCATC	GGTTTGCTGTTTGCTCGTAAATGG
<i>ALAS2</i>	CGAGTGTTGAAGAGCGATGAAGG	CAGGCAGTCCAGCGTCCAG
<i>GATA1</i>	CAGATGAGCATGTAGGAGCGTATTC	GTAAGGTGGAAGTTGGCAGTAGATG

2.5 统计学分析

实验结果采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析,所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

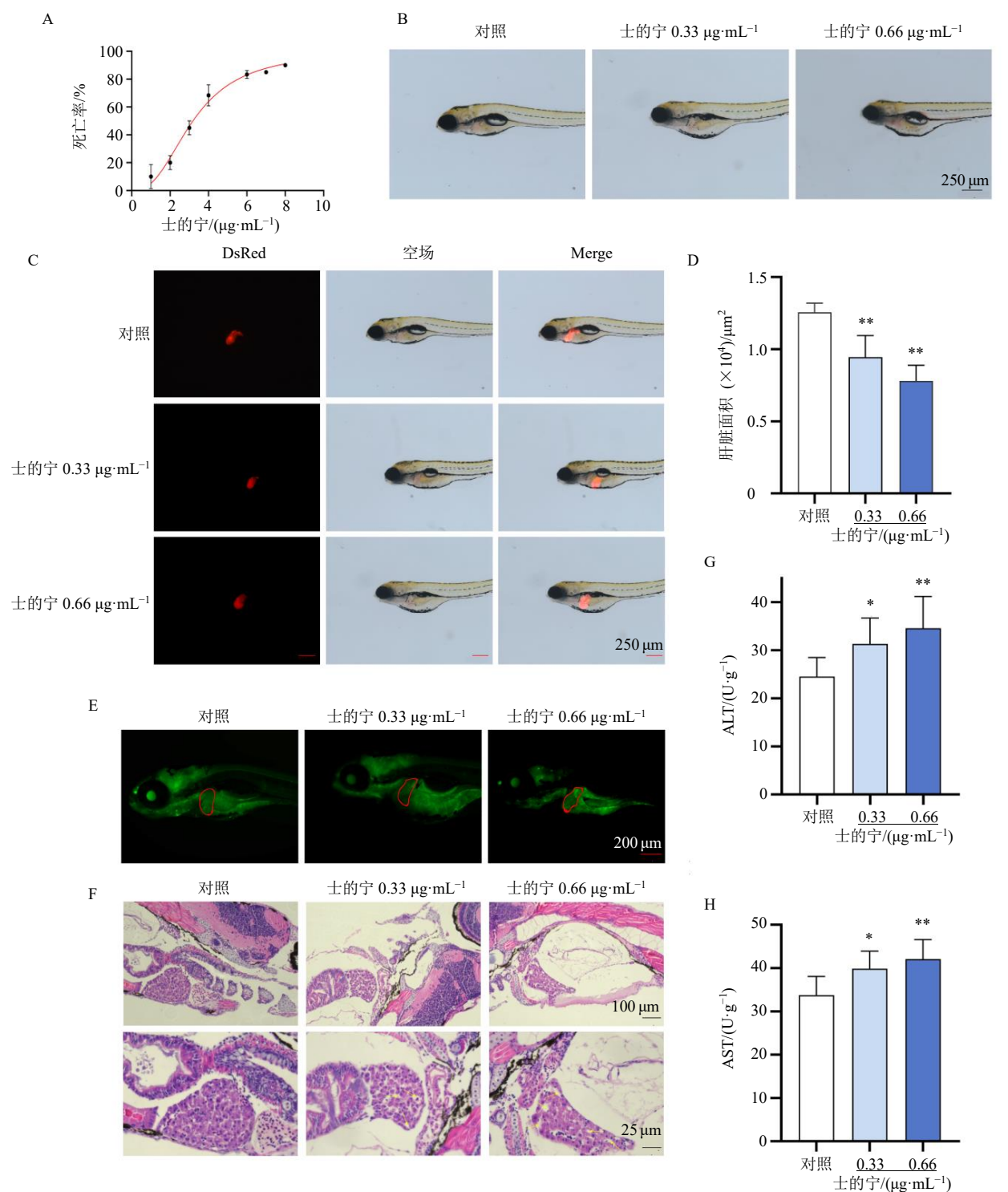
3.1 土的宁对斑马鱼的急性毒性研究

在不同质量浓度的药物暴露终点,统计幼鱼死亡数目并计算死亡率,结果显示,土的宁致斑马鱼幼鱼急性毒性的 LC_{10} 及 LC_{50} 分别为 1.33、3.19 $\mu\text{g/mL}$ 。因此,采用 0.33、0.66 $\mu\text{g/mL}$ ($1/4 LC_{10}$ 、 $1/2 LC_{10}$) 的土的宁进行后续实验 (图 1-A)。

3.2 土的宁对斑马鱼的肝毒性评价结果

在土的宁对斑马鱼的肝脏形态研究中发现,土

的宁暴露 24 h 后对斑马鱼肝脏造成明显影响。与对照组比较,土的宁低、高剂量组斑马鱼幼鱼均出现明显的卵黄囊吸收延迟,同时肝脏透明度降低,颜色趋于晦暗 (图 1-B)。采用 CZ16 转基因斑马鱼,统计各组肝脏荧光面积的变化,结果显示,与对照组比较,土的宁低、高剂量组斑马鱼幼鱼肝面积均显著降低 ($P < 0.01$, 图 1-C、D),且呈剂量相关性。体内凋亡评价实验结果显示,与对照组比较,土的宁低、高剂量组斑马鱼的肝脏区域均观察到致密浓染的黄绿色荧光小点,且荧光小点数目随剂量的增长而增多 (图 1-E),提示土的宁造成斑马鱼幼鱼的肝细胞凋亡。肝脏组织病理评价结果显示,与对照组比较,土的宁低、高剂量组斑马鱼肝细胞数目减



A-士的宁的质量浓度-死亡率曲线; B-斑马鱼肝脏表型变化 ($\times 40$); C-转基因斑马鱼肝脏荧光染色区域 ($\times 40$); D-转基因斑马鱼肝脏荧光染色面积统计; E-斑马鱼肝脏吖啶橙染色情况 ($\times 50$), 红色区域为肝脏; F-斑马鱼肝脏病理组织切片 HE 染色情况 ($\times 10$, $\times 40$), 黄色箭头指向为空泡化; G、H-斑马鱼 ALT 和 AST 活性; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 5 同。

A-concentration-mortality curve of strychnine; B-liver phenotypic changes of zebrafish ($\times 40$); C-fluorescent stained areas of liver of transgenic zebrafish ($\times 40$); D-liver fluorescence staining area statistics of transgenic zebrafish; E-liver acridine orange staining of zebrafish ($\times 50$), red area is the liver; F-HE staining of liver pathology sections of zebrafish ($\times 10$, $\times 40$), yellow arrow points to vacuolization; G, H-activities of ALT and AST of zebrafish; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as Fig. 5.

图 1 士的宁对斑马鱼的急性毒性及肝毒性研究 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Study on acute toxicity and hepatotoxicity of strychnine to zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

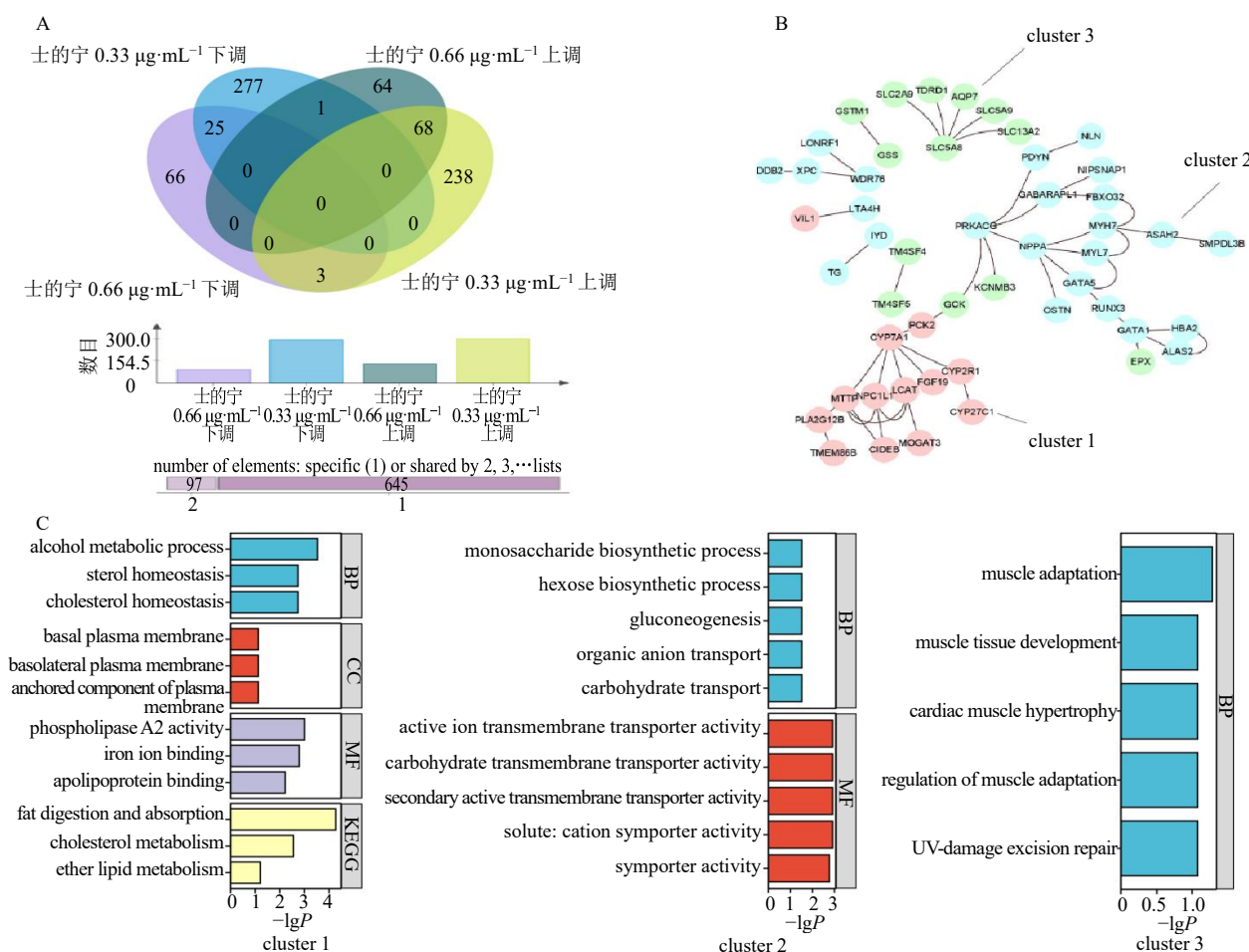
少，排列松散，细胞核萎缩，组织间隙萎缩呈空泡化（图 1-F）。ALT 和 AST 活性是评价药物肝损伤的“金指标”。如图 1-G、H 所示，与对照组比较，士的宁低、高剂量组 ALT 及 AST 活性均显著升高（ $P < 0.05$ 、 0.01 ），且呈剂量相关性。

3.3 士的宁对斑马鱼肝毒性的转录组学评价

经转录组学相关分析，发现与对照组比较，士的宁低剂量组显著上调基因 309 个，下调基因 303 个；士的宁高剂量组显著上调基因 133 个，下调基因 94 个；士的宁低剂量组和士的宁高剂量组共有的上调基因为 25 个，下调基因为 68 个（图 2-A）。利用 String 对士的宁低剂量组和士的宁高剂量组共有基因进行二次筛选，共筛选得到 50 个关键靶点，对靶点进行归类，同样的颜色归为一类，共归为 3

类（图 2-B）。对 3 类基因进行 GO 功能富集，结果表明不同类别参与不同的生物过程（biological process, BP），如 cluster 1 主要参与酒精代谢、固醇稳态、胆固醇稳态等；cluster 2 主要参与单糖生物合成过程、己糖生物合成、糖异生等；cluster 3 主要参与肌肉适应、肌肉组织发育等。值得注意的是，cluster 1 主要包含细胞组分（cellular component, CC）有基质膜等，具有磷脂酶 A2 活性、铁离子结合等分子功能（molecular function, MF），KEGG 富集得到胆固醇代谢、乙醚脂质代谢等信号通路（图 2-C）。

与对照组比较，士的宁低剂量组呈现出显著的生物学效应（图 3-A）。从基因表达层面来看，士的宁低剂量组显著上调基因 309 个，下调基因 303 个



A-士的宁低剂量组与士的宁高剂量组共有差异表达基因及差异表达基因表达情况；B-士的宁低剂量组与士的宁高剂量组共有差异表达基因分类情况；C-各类差异表达基因的 GO 功能富集分析。

A-common differentially expressed genes and their expressions between strychnine low-dose group and strychnine high-dose group; B-classification of common differentially expressed genes between strychnine low-dose group and strychnine high-dose group; C-GO functional enrichment analysis of various differentially expressed genes.

图 2 士的宁对斑马鱼基因转录的影响

Fig. 2 Effect of strychnine on gene transcription in zebrafish

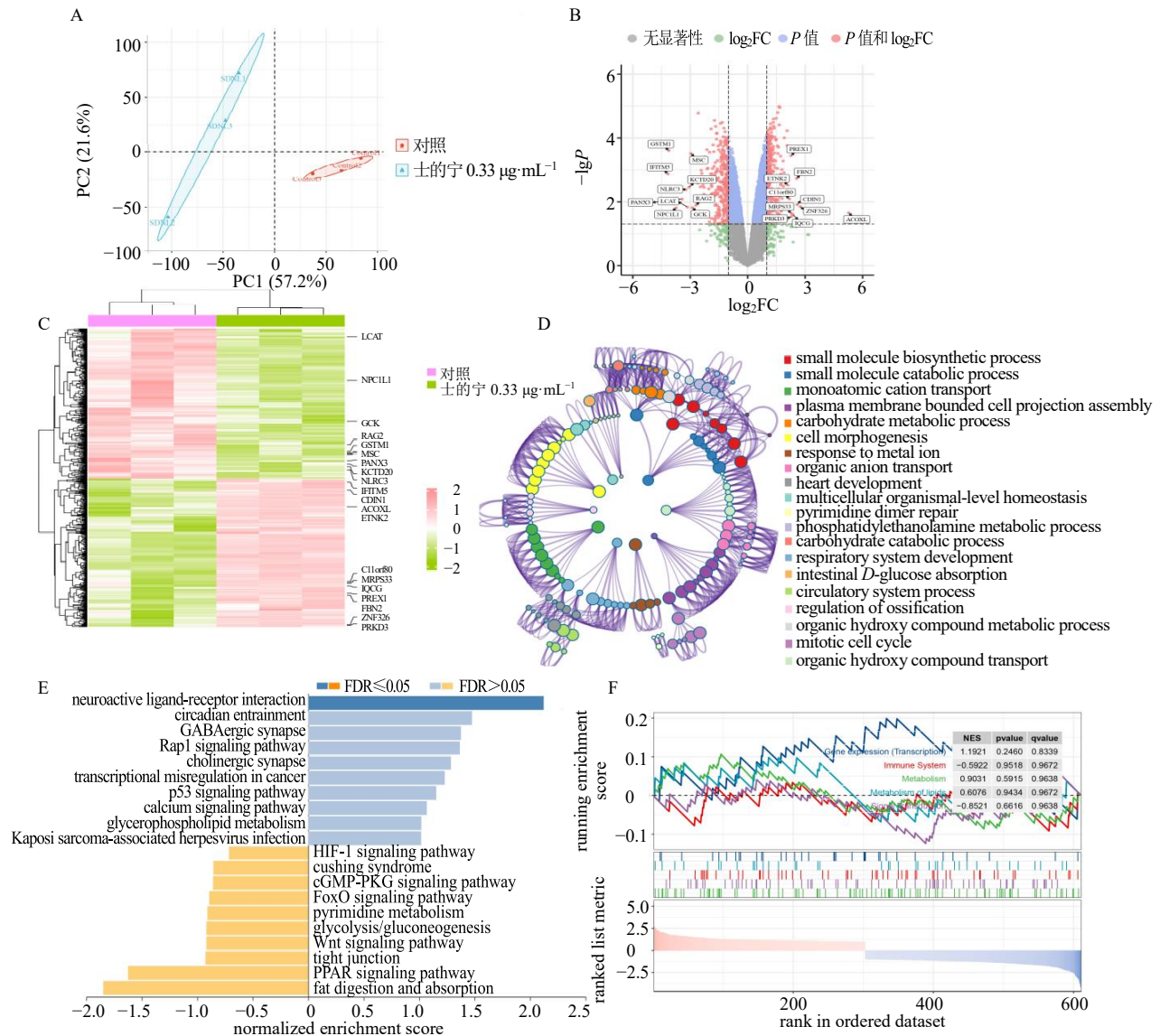


图 3 低剂量士的宁对斑马鱼基因表达的影响

Fig. 3 Effect of low-dose strychnine on gene expressions in zebrafish

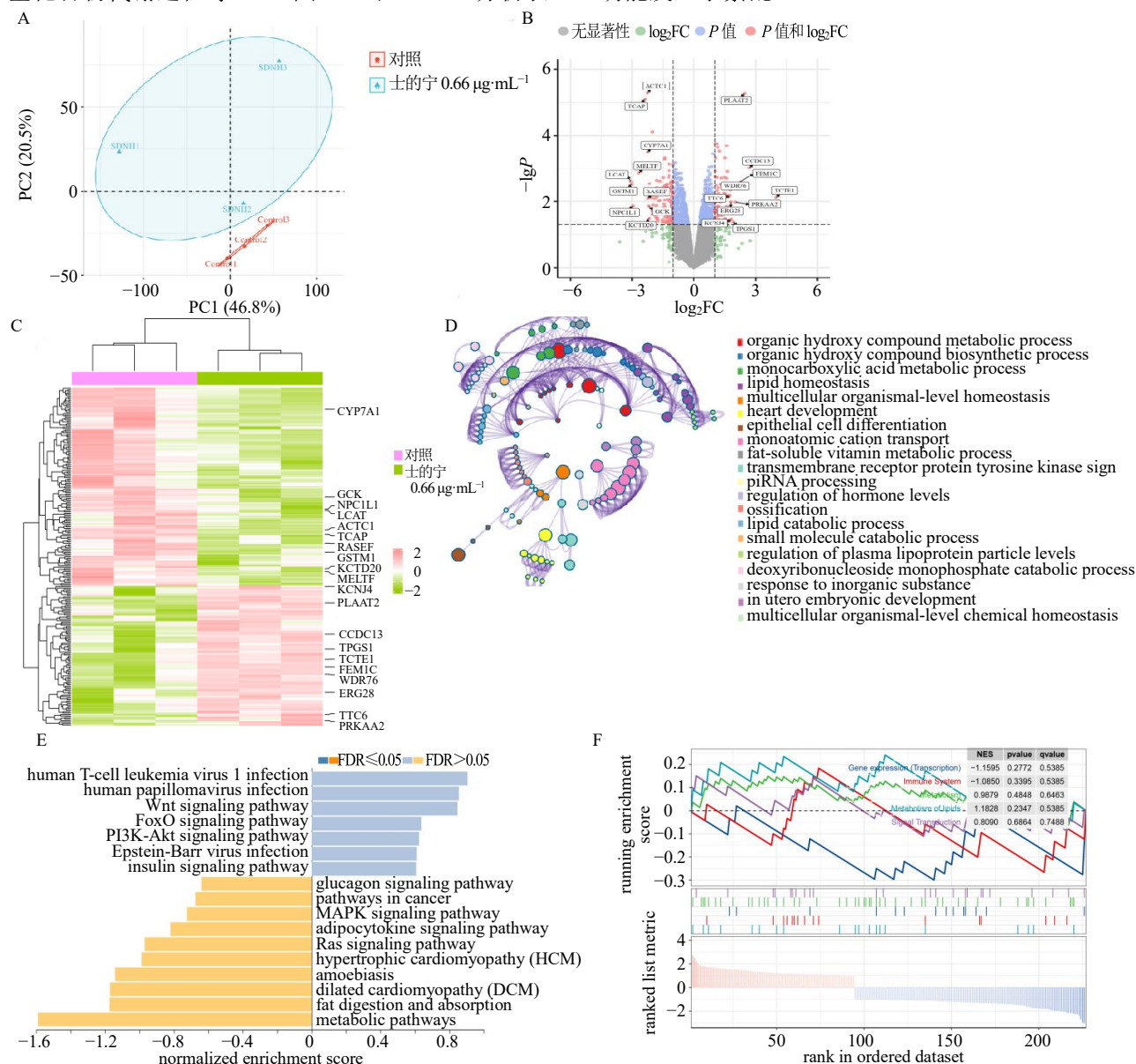
(图 3-B), 在火山图中, 这些显著变化的基因以红色点清晰呈现, 且热图显示各差异基因在对照组与士的宁低剂量组中分布均匀, 样本重复性稳定 (图 3-C)。在功能分析方面, GO 功能分析表明士的宁低剂量组主要参与小分子生物合成过程、心脏发育、碳水化合物代谢过程等 BP (图 3-D); KEGG 分析发现, 其显著上调了脂肪消化吸收与 PPAR 信号

通路, 显著下调了神经活性配体-受体相互作用信号通路 (图 3-E); GSEA 结果进一步显示, 士的宁低剂量组肌肉收缩功能被显著激活, 而神经元系统、DNA 修复被显著抑制, 磷脂代谢和脂质代谢在给药后也受到抑制 (图 3-F), 表明低剂量士的宁不仅造成神经系统损伤, 还扰乱了脂质代谢功能。

与对照组相比, 士的宁高剂量组同样产生了明

显的生物学效应(图 4-A)。在基因表达上,士的宁高剂量组显著上调基因 133 个,下调基因 94 个(图 4-B),基因分布与样本重复性在热图中表现良好(图 4-C)。功能分析结果显示,GO 功能分析中士的宁高剂量组主要参与脂质稳态、心脏发育、有机羧基化合物代谢过程等 BP(图 4-D);KEGG 分析表

明士的宁高剂量组显著上调了代谢途径信号通路(图 4-E);GSEA 结果显示,士的宁高剂量组的代谢功能如脂质代谢受到抑制,蛋白质代谢却被激活,先天免疫系统和信号转导功能也均被抑制(图 4-F),进一步证实给予士的宁干预后斑马鱼脂质代谢功能发生了紊乱。



A-士的宁高剂量组 vs 对照组差异表达基因 PCA 图; B-士的宁高剂量组 vs 对照组差异表达基因火山图; C-士的宁高剂量组 vs 对照组差异表达基因聚类分析热图; D-士的宁高剂量组 vs 对照组差异表达基因 GO 富集分析; E-士的宁高剂量组 vs 对照组差异表达基因 KEGG 富集分析; F-士的宁高剂量组 vs 对照组肝毒性潜在靶点的 GSEA。

A-PCA diagram of differentially expressed genes between strychnine high-dose group vs control group; B-volcano plot of differentially expressed genes between strychnine high-dose group vs control group; C-heatmap of differentially expressed genes between strychnine high-dose group vs control group; D-GO enrichment analysis of differentially expressed genes between strychnine high-dose group vs control group; E-KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes between strychnine high-dose group vs control group; F-GSEA of potential hepatotoxicity targets between strychnine high-dose group vs control group.

图 4 高剂量士的宁对斑马鱼基因表达的影响

Fig. 4 Effect of high-dose strychnine on gene expressions in zebrafish

3.4 qRT-PCR 验证土的宁对斑马鱼相对基因表达水平的影响

基于转录组学的关键靶点筛选结果, 分别从中选取 3 个类别中的关键靶点共 18 个, 通过 qRT-PCR 检测土的宁对斑马鱼相关基因表达的扰动情况。结果如图 5 所示, 与对照组比较, 土的宁低、高剂量组斑马鱼 *CYP27C1*、*CYP2R1*、*LCAT*、*MOGAT3*、

TMEM86B、*GATA5*、*RUNX3* 的基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), *CIDEB*、*NPC1L1*、*PLA2G12B*、*NPPA*、*GATA1* 的基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 土的宁高剂量组斑马鱼 *CYP7A1*、*SMPDL3B*、*ALAS2* 的基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), *MTTP*、*SLC5A8* 的基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

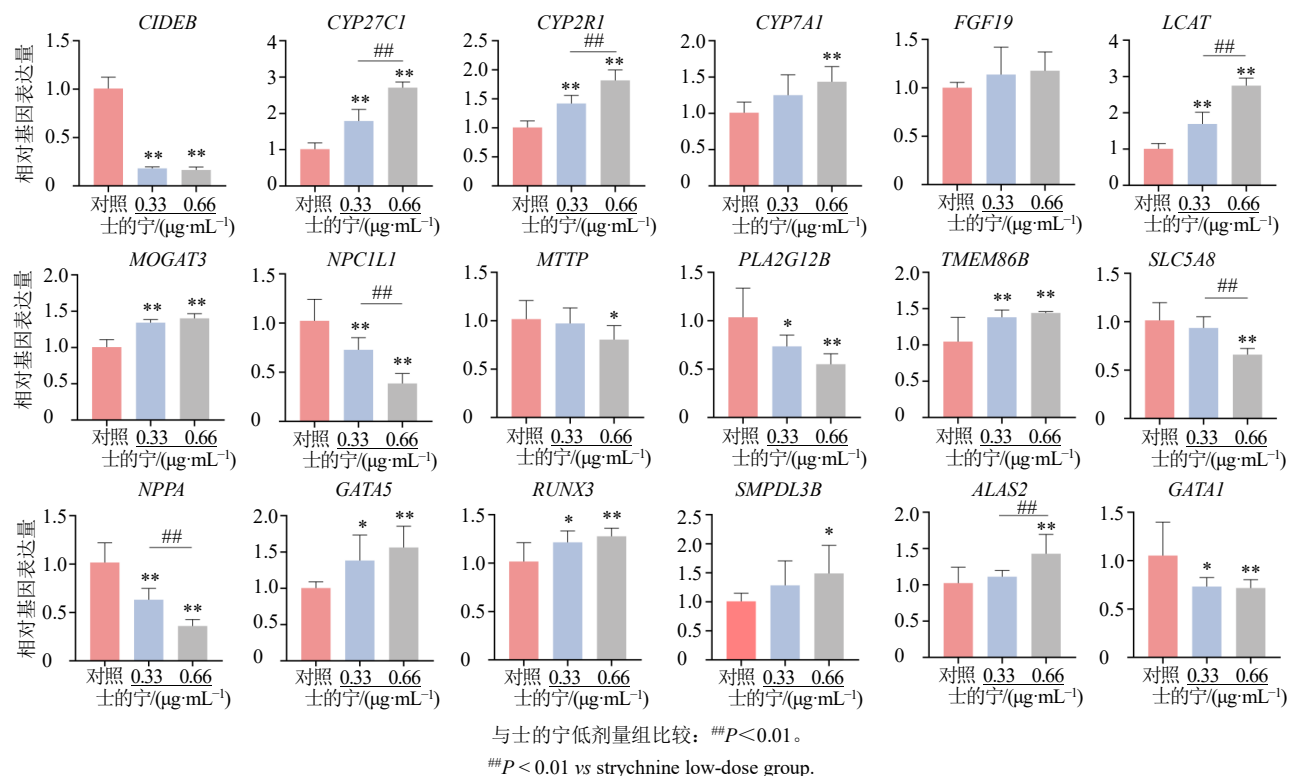


图 5 qRT-PCR 验证土的宁对斑马鱼相对基因表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of strychnine on relative gene expression levels in zebrafish validated by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

马钱子具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、免疫调节等作用, 对神经系统疾病、慢性风湿病等具有较好的治疗效果^[7]。然而, 其剧烈的毒性同样广为人知。肝脏是药物代谢的主要场所, 毒性药物易对肝功能造成较大损害。当前研究表明, 马钱子粗提物及马钱子碱易造成明显肝毒性。而土的宁作为其中主要的生物碱类成分是否具有确切的肝毒性, 尚且缺乏理论支撑。

斑马鱼因其自身具备生物复杂性和高通量特性, 已成为药物发现和安全性评估的理想模型^[8], 尤其在研究药物对肝脏功能的影响中应用广泛^[9]。斑马鱼和人类的基因组有较高的相似性, 约 70% 的人类基因在斑马鱼基因组中存在同源基因。在肝脏发育和功能相关的基因方面, 两者也具有高度的保

守性。CZ16 系斑马鱼的 *fabp10a* 基因标记红色荧光, 利用其荧光特性, 通过荧光显微镜观察肝脏荧光并统计荧光面积, 是评估土的宁对斑马鱼肝脏影响的有效途径。本研究立足于探究土的宁是否具有肝毒性, 选取斑马鱼幼鱼模型展开实验。首先, 以斑马鱼急性实验结果确定给药剂量。接下来, 以体内凋亡、病理切片及肝功能等 5 项指标结果, 发现土的宁促使斑马鱼出现肝细胞凋亡、组织空泡化及 ALT 和 AST 活性异常升高等现象, 进而初步确定土的宁具有明显的肝毒性。基于肝毒性评价结果, 采用转录组学技术进一步探究土的宁潜在的作用机制。研究发现, 与对照组比较, 土的宁给药会引起斑马鱼基因的异常变化。对变化显著的差异基因进一步进行筛选分类, 并利用生信分析工具, 对 3 类基因簇进行 GO 功能分析及 KEGG 通路富集。在

cluster 1 中富集得到与胆固醇及脂质代谢相关的信号通路。将士的宁低、高剂量组分别于对照组比较,同样发现各组发生扰动的基因多参与脂质稳态的生物过程。此外,GSEA 结果表明,士的宁给药后脂质代谢功能确实发生了明显紊乱。

肝脏是脂质代谢的中心器官,脂肪酸除部分从血浆中摄取外,其余在肝脏中生物合成,经细胞内氧化或在血浆中被消除。正常情况下,仅少部分脂肪酸以三酰甘油形式储存于肝脏中^[10-11]。当肝脏中脂质代谢功能出现障碍,脂质出现变性或过度积累,容易演变为非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)^[12]。通过对核心差异基因相关生物活性进行文献查阅,发现多数基因与肝脏脂质代谢功能密切相关。因此,采取 qRT-PCR 技术测定士的宁暴露后相关基因表达水平,结果表明士的宁对斑马鱼基因表达有明显干扰,且部分呈剂量相关性变化。其中,CIDEB 是一种主要在肝脏中表达的脂滴相关蛋白^[13],是脂肪酸合成的重要调控因子^[14],其表达缺失会造成脂肪酸氧化和能量的过度消耗。细胞色素 P450 酶参与肝脏中多种物质的代谢^[15],尤其在药物代谢中发挥重要作用。胆固醇在肝脏中被转化为胆酸,这个经典的途径由 CYP7A1 启动^[16],CYP7A1 失调易导致肝细胞的炎症浸润和损伤,即胆汁淤积^[17]。CYP2R1 参与肝脏发育过程中肝母细胞的分化^[15]。FGFs 是各种恶性肿瘤的致癌基因,FGF19 为 FGF 亚家族的一员,在葡萄糖、脂质、胆汁酸代谢等多种生理过程中发挥着重要作用,在肝脏中具有很强的抗胆汁淤积和抗纤维化活性^[18]。LCAT 在肝细胞表达,可以促进高密度脂蛋白的成熟,减少胆固醇的生物合成,对血浆转运和肝脏摄取胆固醇至关重要^[19-20]。单酰基甘油酰基转移酶(monoacylglycerol acyltransferase, MGAT)通路为肝脏脂质合成的重要途径,MOGAT3 为编码 MGAT 的关键基因,研究表明,MOGAT3 在 NAFLD 受试者中过表达,为药物干预的重要靶点^[21]。NPC1L1 是胆固醇运输的关键蛋白,多分布于肝脏的胆小导管膜中,在维持体内脂质及胆固醇代谢的平衡中发挥重要作用,然而 NPC1L1 在脂质代谢紊乱导致肝脏疾病中的分子机制尚未完全阐明^[22]。MTTP 是一种内质网驻留蛋白,主要参与脂质的转运^[23-24]。PLA2G12B 是肝脏中一种新型三酰甘油代谢介质,该基因缺失会造成介导肝脏极低密度脂蛋白-三酰甘油的分泌功能受损,血浆三酰甘油、总胆

固醇和脂肪酸含量下降,造成肝骨病^[25-26]。SLC5A8 属于 Na⁺/葡萄糖共转运蛋白家族成员,可能为一种新的肿瘤抑制因子,治疗肝细胞癌^[27]。GATA5 是激活肝脂肪酸结合蛋白的关键基因^[28],是早期肝脏发育的剂量敏感性调节因子^[29]。肝脏的发育受到 RUNX3 的控制,在肝脏中强烈表达,而 RUNX3 的缺失可诱导肝细胞癌^[30],易发生肝内皮功能障碍,甚至发展为肝纤维化^[31]。SMPDL3B 作为一种水解酶和鞘磷脂磷酸二酯酶,调节鞘脂代谢,促进肝癌细胞的生长、侵袭和迁移^[32],鞘脂代谢的改变对 NAFLD 有重要影响^[33]。综上,这些关键基因的异常表达可能影响肝脏正常的脂质代谢功能。

本研究发现,士的宁具有明显的肝毒性效应,且呈剂量相关性。士的宁可能通过扰乱 CIDEB、CYP7A1、FGF19 和 LCAT 等基因的正常表达,进而影响脂质代谢信号通路,导致脂质代谢紊乱,最终造成肝毒性。

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: 52-53.
- [2] 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.
- [3] Tong H F, Chan C Y, Ng S W, *et al.* Strychnine poisoning due to traditional Chinese medicine: A case series [J]. *F1000Res*, 2021, 10: 924.
- [4] Elizabeth Patton E, Zon L I, Langenau D M. Zebrafish disease models in drug discovery: From preclinical modelling to clinical trials [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(8): 611-628.
- [5] 赵竟成, 李治建, 霍仕霞, 等. 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 [J]. *中草药*, 2024, 55(1): 101-113.
- [6] 原杨, 尚悦, 王鹏, 等. 基于斑马鱼模型的中药致肝脏毒性评价的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(5): 933-940.
- [7] Guo R X, Wang T, Zhou G H, *et al.* Botany, phytochemistry, pharmacology and toxicity of *Strychnos nux-vomica* L.: A review [J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(1): 1-23.
- [8] Fan Q Q, Liang R Q, Chen M L, *et al.* Metabolic characteristics of evodiamine were associated with its hepatotoxicity via PPAR/PI3K/AKT/NF- κ B/tight junction pathway-mediated apoptosis in zebrafish [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 279: 116448.
- [9] Han T, Xu W J, Wang X, *et al.* Emodin-8-O- β -D-

- glucopyranoside-induced hepatotoxicity and gender differences in zebrafish as revealed by integration of metabolomics and transcriptomics [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155411.
- [10] Alves-Bezerra M, Cohen D E. Triglyceride metabolism in the liver [J]. *Compr Physiol*, 2017, 8(1): 1-8.
- [11] Badmus O O, Hillhouse S A, Anderson C D, *et al.* Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): Functional analysis of lipid metabolism pathways [J]. *Clin Sci*, 2022, 136(18): 1347-1366.
- [12] Guo X Y, Yin X Z, Liu Z J, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis and natural products for prevention and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15489.
- [13] Ye J, Li J Z, Liu Y, *et al.* Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B [J]. *Cell Metab*, 2009, 9(2): 177-190.
- [14] Li J Z, Ye J, Xue B F, *et al.* Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation [J]. *Diabetes*, 2007, 56(10): 2523-2532.
- [15] Hirose A, Ochiai W, Yamamoto Y, *et al.* Analysis of CYP2R1 and CYP26A1 expression patterns in regeneration in mice with liver injury [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(12): 1955-1960.
- [16] Chiang J Y L, Ferrell J M. Discovery of farnesoid X receptor and its role in bile acid metabolism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 548: 111618.
- [17] Messner C J, Mauch L, Suter-Dick L. Bile salts regulate CYP7A1 expression and elicit a fibrotic response and abnormal lipid production in 3D liver microtissues [J]. *Toxicol Vitro*, 2019, 60: 261-271.
- [18] Li C, Chen T L, Liu J L, *et al.* FGF19-induced inflammatory CAF promoted neutrophil extracellular trap formation in the liver metastasis of colorectal cancer [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(24): 2302613.
- [19] He W Z, Wang M, Zhang X C, *et al.* Estrogen induces LCAT to maintain cholesterol homeostasis and suppress hepatocellular carcinoma development [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(15): 2417-2431.
- [20] Yang K X, Wang J M, Xiang H J, *et al.* LCAT- targeted therapies: Progress, failures and future [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 147: 112677.
- [21] Hall A M, Kou K, Chen Z J, *et al.* Evidence for regulated monoacylglycerol acyltransferase expression and activity in human liver [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(5): 990-999.
- [22] Xu C L, Fu F Y, She Y H, *et al.* NPC1L1 plays a novel role in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *ACS Omega*, 2023, 8(51): 48586-48589.
- [23] Hehl L, Schneider C V, Rader D J. Editorial: MTTP, hepatic steatosis, and plasma lipids-still more questions than answers. Authors' reply [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2023, 58(3): 370-371.
- [24] Wang X X, Cao Y, Guo J, *et al.* Association between MTTP genotype (-493G/T) polymorphism and hepatic steatosis in hepatitis C: A systematic review and meta-analysis [J]. *Lipids Health Dis*, 2023, 22(1): 154.
- [25] Guan M, Qu L B, Tan W J, *et al.* Hepatocyte nuclear factor-4 alpha regulates liver triglyceride metabolism in part through secreted phospholipase A₂ GXIIB [J]. *Hepatology*, 2011, 53(2): 458-466.
- [26] Chen L H, Wu M, Zhang S N, *et al.* Estrogen-related receptor γ regulates hepatic triglyceride metabolism through phospholipase A₂ G12B [J]. *FASEB J*, 2019, 33(7): 7942-7952.
- [27] Hu B S, Xiong S M, Li G, *et al.* Downregulation of SLC5A8 inhibits hepatocellular carcinoma progression through regulation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10): 13445-13453.
- [28] Divine J K, Staloch L J, Haveri H, *et al.* GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1alpha [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287(5): G1086-G1099.
- [29] Haworth K E, Kotecha S, Mohun T J, *et al.* GATA4 and GATA5 are essential for heart and liver development in *Xenopus* embryos [J]. *BMC Dev Biol*, 2008, 8: 74.
- [30] Lee J M, Lee D J, Bae S C, *et al.* Abnormal liver differentiation and excessive angiogenesis in mice lacking Runx3 [J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, 139(5): 751-758.
- [31] Ojha U, Kim S, Rhee C Y, *et al.* Endothelial RUNX3 controls LSEC dysfunction and angiocrine LRG1 signaling to prevent liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2025, 81(4): 1228-1243.
- [32] Liu B G, Xiao J, Dong M J, *et al.* Human alkaline ceramidase 2 promotes the growth, invasion, and migration of hepatocellular carcinoma cells via sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3B [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(7): 2259-2274.
- [33] Gwag T, Reddy Mooli R G, Li D, *et al.* Macrophage-derived thrombospondin 1 promotes obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease [J]. *JHEP Rep*, 2020, 3(1): 100193.