

苗药了哥王提取物对斑马鱼的毒性作用[△]

何正艳^{1*}, 冯 果^{1,2#}, 郑传奇¹, 李 玮¹, 刘 文¹, 朱光林¹, 王文静¹, 苏红梅¹, 宋学丽¹, 张 菊¹ (1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550025)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)20-2443-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.20.03



摘要 目的 研究苗药了哥王提取物对斑马鱼的毒性作用。方法 以斑马鱼胚胎模型为对象,经10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 了哥王提取物暴露处理后,检测并记录1 min内自主抽动次数、10 s内心率及其畸形、死亡发生情况;以斑马鱼模型为对象,经10~100 $\mu\text{g/mL}$ 了哥王提取物暴露处理24、48、72 h后,计算各时间点了哥王提取物对斑马鱼的半数致死浓度(LC_{50});经低、中、高质量浓度(27、37、51 $\mu\text{g/mL}$)了哥王提取物暴露处理后,观察斑马鱼肝脏表型和细胞凋亡、脂质沉积情况,检测其肝组织中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)活性。结果 与空白组比较,了哥王提取物10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼胚胎的自主抽动次数、畸形率(10 $\mu\text{g/mL}$ 组除外)、死亡率均显著升高,胚胎心率(10、20 $\mu\text{g/mL}$ 组除外)均显著降低($P<0.05$);了哥王提取物干预24、48、72 h对斑马鱼的 LC_{50} 分别为39.850、28.300、21.490 $\mu\text{g/mL}$;了哥王提取物低、中、高质量浓度组斑马鱼的肝脏区域透明度降低、形态膨大,细胞凋亡和脂质沉积均有所增加,肝组织中ALT、AST、LDH活性均较空白组显著升高($P<0.05$)。结论 了哥王提取物对斑马鱼胚胎具有发育毒性,对斑马鱼具有肝损伤毒性。

关键词 苗药;了哥王提取物;斑马鱼;发育毒性;肝毒性

Study on the toxicity of the extract from Miao medicine *Wikstroemia indica* to zebrafish

HE Zhengyan¹, FENG Guo^{1,2}, ZHENG Chuanqi¹, LI Wei¹, LIU Wen¹, ZHU Guanglin¹, WANG Wenjing¹, SU Hongmei¹, SONG Xueli¹, ZHANG Ju¹ (1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. National Engineering and Technology Research Center of Miao Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the toxicity of the extract from Miao medicine *Wikstroemia indica* to zebrafish. **METHODS** Zebrafish embryo model was used as the object, after exposure to *W. indica* extract (10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$), the number of spontaneous twitching within 1 min, heart rate within 10 s, the occurrence of malformation and death were detected and recorded. Zebrafish was used as the object, after exposure to *W. indica* extract (10-100 $\mu\text{g/mL}$) for 24, 48 and 72 h, and the median lethal concentration (LC_{50}) of *W. indica* extract to zebrafish at different time points were calculated. After exposure to low, medium and high concentration (27, 37, 51 $\mu\text{g/mL}$) of *W. indica* extract, the liver phenotype, hepatocyte apoptosis and lipid deposition of zebrafish were observed, and the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) in liver tissue were detected. **RESULTS** Compared with blank group, the number of spontaneous twitching, malformation rate (except for 10 $\mu\text{g/mL}$ group) and mortality of embryos increased significantly in 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ groups of *W. indica* extract, and the heart rate (except for 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ group) of embryos decreased significantly ($P<0.05$). LC_{50} of *W. indica* extract to zebrafish at 24, 48 and 72 h were 39.850, 28.300 and 21.490 $\mu\text{g/mL}$, respectively. After drug treatment, the transparency of liver area of zebrafish in low, medium and high concentration groups of *W. indica* extract reduced and their shape were enlarged; apoptosis and lipid deposition increased; the activities of ALT, AST and LDH in liver tissue were significantly increased ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Miao medicine *W. indica* extract had developmental toxicity to zebrafish embryos and hepatotoxicity to zebrafish.

△基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.82060767);贵州省科技计划项目(No.黔科合基础-ZK[2022]一般461);全国中医药创新骨干人才培养项目(No.国中医药人教函[2019]128号);贵州省高层次人才项目(No.黔人领发[2020]4号)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药及民族药药物新技术及新剂型。E-mail:1833730812@qq.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中药新制剂新技术、药动学。E-mail:453989352@qq.com

KEYWORDS Miao medicine; extract form *Wikstroemia indica*; zebrafish; development toxicity; hepatotoxicity

了哥王始载于《岭南采药录》,来源于瑞香科植物南岭茺花 *Wikstroemia indica* (Linn.) C. A. Mey. 的根及根皮,是贵州地区常用苗药之一。了哥王味苦、微辛,性寒,有毒,归肺、肝经,具有清热解毒、消肿散结、止痛的

功效,常用于癰癤、痈腫、跌打損傷、急性扁桃體炎、慢性支氣管炎、乳腺癌、惡性淋巴瘤、肺癌等疾病的臨床治療^[1-5]。現代研究發現,了哥王具有抗肿瘤、鎮痛、抗菌、抗炎、鎮咳祛痰等藥理作用^[6-7]。該藥療效確切,臨床應用價值和市場潛力較大,但因毒性作用較強,使得其進一步開發和利用受限。《生草藥性備要》《湖南藥物志》中均有了哥王“大毒”或“有毒”的毒性記載^[8-9]。目前,國內外有關了哥王的毒性研究大多基於大鼠和小鼠模型^[10-12],具有成本高、周期長、不便于觀察等缺點。斑馬魚作為一種新的模式生物,其幼魚及胚胎通體透明,且繁殖率高、生長發育周期短,加之其與人類基因的相似度高達87%,故在篩選和評價藥物毒性方面具有獨特優勢^[13]。基於此,本文擬利用斑馬魚模型,探討了哥王提取物對斑馬魚胚胎、斑馬魚的毒性作用,以期為其毒性的深入研究提供實驗參考。

1 材料

1.1 主要儀器

本研究所用主要儀器有MULTISKAN SKY 1530型全自動酶標儀[賽默飛世爾科技(中國)有限公司]、SMZ18型體視熒光顯微鏡(日本Nikon公司)、CKX53型倒置相差顯微鏡(上海蠻吉光電科技有限公司)、PCO-1500型立體顯微鏡及成像系統(武漢鑫力鈞生物科技股份有限公司)、ESENAWS1型斑馬魚養殖系統(北京愛生科技發展有限公司)、SLI700型生化培養箱(天津信睿生物科技股份有限公司)等。

1.2 主要藥品與試劑

了哥王藥材購自廣西壯族自治區玉林市玉州區玉林銀豐國際中藥港,經貴州中醫藥大學藥學院李瑋教授鑑定為瑞香科堯花屬植物了哥王 *W. indica* (Linn.) C.A. Mey. 的干燥根或根皮。

吡啶橙(批號325E043)、油紅O染液(批號20190910)、PBS(批號20190517)、DMSO(批號821D0311)均購自北京索萊寶科技有限公司;4%多聚甲醛(批號190620)購自上海尚寶生物科技有限公司;乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)、天冬氨酸轉氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸轉氨酶(alanine aminotransferase, ALT)檢測试剂盒(批號均為20191118)均購自南京建成生物工程研究所;NaCl、KCl、 K_2HPO_4 、 Na_2HPO_4 、 $NaHCO_3$ 、 $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 等試劑均為分析純,水為純淨水。

1.3 實驗動物

AB系野生型斑馬魚,雌雄各半,購自國家斑馬魚資源中心,4~6月齡(繁育、培養方法參照 *The Zebrafish Book*),其相關質量控制項(微生物學等級及監測、寄生蟲學等級及監測、遺傳質量控制、病理診斷、配合飼料、環境條件)均符合北京市實驗用魚質量控制地方標準。所有斑馬魚均飼養於貴州中醫藥大學第一附屬醫院斑

馬魚飼養中心的養殖房[光照14 h、黑暗10 h交替,水溫 $(28.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,水pH6.8~7.5,室溫 26°C]內。

2 方法

2.1 斑馬魚胚胎培養液的配制

按照 *The Zebrafish Book* 標準配制斑馬魚胚胎培養液,其中NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4 、 $CaCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、 $NaHCO_3$ 的濃度分別為0.14、5.40、0.25、0.44、1.30、1.00、4.20 mol/L。

2.2 了哥王提取物的制备

參照課題組前期研究方法製備了哥王提取物並進行相關分析:取了哥王藥材粗粉5 kg,以14倍量的70%乙醇按5 mL/(min·kg)的速度進行滲漉提取;收集滲漉提取液,回收乙醇至提取液無醇味,採用低壓真空濃縮干燥法(溫度 60°C ,真空度0.07~0.08 MPa)進行濃縮、干燥後,粉碎成細粉,得了哥王提取物粉末(傘形花內酯和西瑞香素的含量分別為0.067、2.263 mg/g,浸膏得率為10.08%,每1 g了哥王提取物相當於生藥9.92 g)^[14]。

2.3 了哥王提取物藥液的配制

精密稱取“2.2”項下了哥王提取物粉末適量,溶於一定量的DMSO中,渦旋溶解後,再加入胚胎培養液配製成1 mg/mL的母液,於實驗前加胚胎培養液稀釋至所需濃度。

2.4 了哥王提取物對斑馬魚胚胎發育的影響

於實驗前一天晚上,將健康成年的斑馬魚按雌雄比例1:1放入產卵缸中,使其自然受精產卵。隨機選取受精後6~8 h(6-8 hours post fertilization, 6~8 hpf)、發育正常且無畸形的斑馬魚胚胎,轉移至12孔細胞培養板中(每孔20枚胚胎),並加入適量胚胎培養液培養24 h,培養溫度為 $(28.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

2.4.1 藥物暴露質量濃度的選取與藥液的配制 設置暴露質量濃度為10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ (質量濃度參考課題組前期預實驗結果設置),並按照“2.3”項下方法配製質量濃度分別為10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的了哥王提取物藥液。

2.4.2 暴露處理 設置了哥王提取物10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 組和空白組(每孔20枚胚胎,每組設置2個復孔),緩慢吸出各孔中的胚胎培養液,各藥物組分別按4 mL/孔加入“2.4.1”項下不同質量濃度的了哥王提取物藥液進行暴露,空白組加入等體積的胚胎培養液和等量的DMSO作為對照。加蓋標記後,將培養板置於生化培養箱中孵育72 h,每24 h更換藥液1次。

2.4.3 斑馬魚胚胎自主抽動次數、心率及其畸形率、死亡率的測定 暴露24 h後,使用立體顯微鏡及成像系統觀察各組斑馬魚1 min內的胚胎自主抽動次數(每組選取10枚胚胎);暴露48 h後,使用立體顯微鏡及成像系統觀察各組斑馬魚10 s內的胚胎心率(每組選取10枚胚胎);暴露72 h後,計算各組斑馬魚胚胎的畸形率和死亡率;畸形率(%) = 某一時間點幼魚的畸形數/某一時間點

全部存活的幼鱼数 $\times 100\%$,死亡率($\%$)=死亡胚胎数/总胚胎数 $\times 100\%$ 。

2.5 了哥王提取物对斑马鱼的急性毒性作用

参照文献方法^[15]繁育斑马鱼,于实验前一天晚上,将健康成年的斑马鱼按雌雄比例1:1放入产卵缸中,使其自然受精。取受精卵,经清洗消毒后放入生化培养箱中孵育96 h。随机选取96 hpf、发育正常且无畸形的斑马鱼,转移至12孔细胞培养板中(每孔20尾斑马鱼),并加入适量的胚胎培养液培养24 h,培养温度为(28.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5.1 药物暴露质量浓度的选取与药液的配制 根据课题组前期预实验结果,设置10、20、27、37、51、72、90、100 $\mu\text{g/mL}$ 药物暴露浓度组,并按照“2.3”项下方法配制质量浓度分别为10、20、27、37、51、72、90、100 $\mu\text{g/mL}$ 的了哥王提取物药液。

2.5.2 暴露处理 慢慢吸出各孔中的胚胎培养液,分别加入“2.5.1”项下不同质量浓度的了哥王提取物药液进行暴露,其余操作同“2.4.2”项下。

2.5.3 半数致死浓度的计算 当暴露24、48、72 h时,统计各个药物暴露浓度组死亡的斑马鱼数量,按“2.4.3”项下方法计算死亡率,并运用SPSS 26.0软件绘制其急性毒性线性回归方程并计算半数致死浓度(LC_{50})。

2.6 了哥王提取物对斑马鱼肝脏的毒性作用

2.6.1 药物暴露质量浓度的选取和暴露处理 根据“2.5”项下急性毒性实验结果,设置药物低、中、高质量浓度组,并设置含等体积胚胎培养液的空白组作为对照(每组设置2个复孔)。随机选取96 hpf、发育正常且无畸形的斑马鱼,转移至12孔细胞培养板中(每孔20尾斑马鱼)。经培养后,各药物组分别按4 mL/孔加入不同质量浓度的了哥王提取物药液,空白组加入等体积的胚胎培养液和等量的DMSO,置于(28.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 恒温生化培养箱中培养24 h。

2.6.2 斑马鱼肝脏表型的观察 按“2.6.1”项下方法暴露处理后,吸去药液,每组选取10尾幼鱼进行表型观察:将斑马鱼用胚胎培养液清洗3次,以侧躺姿态固定于涂布有3%甲基纤维素凝胶的载玻片上,在体视荧光显微镜下依次观察各组斑马鱼的肝脏表型变化并拍照记录。

2.6.3 斑马鱼肝脏细胞凋亡的评价 按“2.6.1”项下方法暴露处理后,吸去药液,每组选取10尾幼鱼进行细胞凋亡评价:将各孔斑马鱼用胚胎培养液清洗后,于避光条件下按2 mL/孔加入2.5 $\mu\text{g/mL}$ 吖啶橙染色液(以胚胎培养液配制^[16])进行染色;染色完成后,将斑马鱼用PBS反复清洗,以侧躺姿态固定于涂布有3%甲基纤维素凝胶的载玻片上,在体视荧光显微镜下观察斑马鱼肝脏细胞的凋亡情况,并拍照记录。

2.6.4 斑马鱼肝脏脂质沉积的评价 按“2.6.1”项下方法暴露处理后,吸去药液,每组选取10尾幼鱼进行脂质

沉积评价:将各孔斑马鱼用胚胎培养液清洗,再以4%多聚甲醛固定过夜,依次用PBS和漂白液清洗3次;分别用85%、100%丙二醇脱水,用0.5%油红O染液染色3 h;染色完成后,依次用100%、85%丙二醇脱色30 min,用PBS清洗后于显微镜下观察油红O染液的染色情况,以评价斑马鱼的肝脏脂质沉积情况。

2.6.5 斑马鱼ALT、AST、LDH活性的测定 按“2.6.1”项下方法暴露处理后,吸去药液,每组选取10尾幼鱼进行ALT、AST、LDH活性测定:将各孔斑马鱼用生理盐水清洗,以滤纸吸干水分后称定质量;加入9倍量的生理盐水,于冰浴中充分研磨,所得匀浆产物于4 $^{\circ}\text{C}$ 下以3 500 r/min离心10 min,取上清液,采用酶联免疫吸附测定法检测各组上清液中ALT、AST、LDH活性。

2.7 统计学方法

应用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验(方差齐)或非参数秩和检验(方差不齐)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 了哥王提取物对斑马鱼胚胎发育影响的测定结果

当斑马鱼的运动神经未发育完全时,会不受控制地发生胚胎自主抽动;随着运动神经的逐渐发育,这种自主抽动的次数将会减少^[17]。与空白组比较,各药物组斑马鱼胚胎的自主抽动次数均显著增加,了哥王提取物40 $\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼胚胎的心率显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

表1 不同质量浓度的了哥王提取物对斑马鱼胚胎自主抽动次数、胚胎心率、畸形率、死亡率影响的测定结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	1 min内自主抽动/次	暴露48 h后10 s内胚胎心率/次	畸形率/%	死亡率/%
空白组	4.28 $\pm$ 0.38	21.60 $\pm$ 0.87	0	0
了哥王提取物10 $\mu\text{g/mL}$ 组	5.37 $\pm$ 0.32 ^a	20.80 $\pm$ 0.44	0	7.66 $\pm$ 2.51 ^a
了哥王提取物20 $\mu\text{g/mL}$ 组	8.28 $\pm$ 0.45 ^a	20.60 $\pm$ 0.54	31.25 $\pm$ 6.25 ^a	28.33 $\pm$ 2.88 ^a
了哥王提取物40 $\mu\text{g/mL}$ 组	8.78 $\pm$ 0.15 ^a	19.20 $\pm$ 0.92 ^a	99.00 $\pm$ 1.00 ^a	76.66 $\pm$ 2.88 ^a

a:与空白组比较, $P<0.05$

空白组斑马鱼胚胎发育正常,未见发育畸形和死亡。与空白组比较,了哥王提取物10 $\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼的胚胎形态相似且无明显变化,了哥王提取物20、40 $\mu\text{g/mL}$ 组斑马鱼胚胎可见畸形(表现为心包肿大、卵黄囊畸形、体长变短等);各药物组斑马鱼胚胎畸形率(了哥王提取物10 $\mu\text{g/mL}$ 组除外)和死亡率均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

3.2 了哥王提取物对斑马鱼急性毒性作用的测定结果

空白组斑马鱼发育正常,72 h内无死亡;药物暴露24、48、72 h后, LC_{50} 分别为39.850、28.300、21.490 $\mu\text{g/mL}$ 。24、48、72 h的线性回归方程(式中, y 为死亡率, x 为药物质量浓度)和 LC_{50} 见表2。根据 LC_{50} 检测结果,本文以27、37、51 $\mu\text{g/mL}$ 作为了哥王提取物低、中、高质量浓度进行后续实验。

表2 不同时间点了哥王提取物对斑马鱼急性毒性作用的线性回归方程和LC₅₀

时间点	线性回归方程	LC ₅₀ /(μg/mL)
24 h	$y=-8.209+5.129x$	39.850
48 h	$y=-5.811+4.001x$	28.300
72 h	$y=-5.693+4.273x$	21.490

3.3 了哥王提取物对斑马鱼肝脏毒性影响的测定结果

3.3.1 肝脏表型 空白组斑马鱼肝脏表型正常,肝脏形态完整、清晰,卵黄囊基本吸收完全,不存在肝脏变性。与空白组比较,了哥王提取物低、中、高质量浓度组斑马鱼的肝脏区域均有不同程度的透明度降低、形态膨大现象,且有随药物暴露质量浓度增加而肝脏区域逐渐模糊的趋势;当药物暴露质量浓度为51 μg/mL时,斑马鱼卵黄囊吸收不完全,且部分鱼体肝脏轮廓模糊。结果见图1。

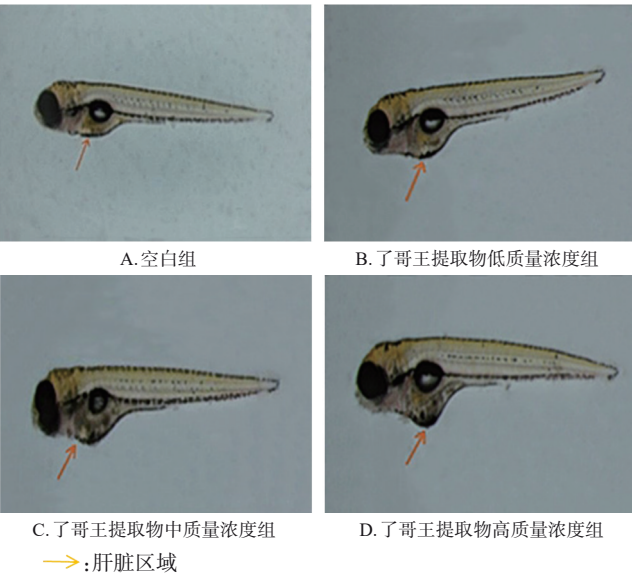


图1 不同质量浓度了哥王提取物对斑马鱼肝脏表型的影响(×3.2)

3.3.2 肝脏区域细胞凋亡情况 吖啶橙染色结果显示,空白组斑马鱼肝脏区域未出现黄绿色亮点,提示空白组斑马鱼肝脏基本无细胞凋亡;而了哥王提取物中、高质量浓度组斑马鱼的肝脏区域均可见致密透亮的黄绿色亮点,且有药物暴露质量浓度越高、荧光强度越强的趋势。结果见图2。

3.3.3 肝脏脂质沉积 经油红O染液染色后,空白组斑马鱼肝脏区域橘红色较浅;而了哥王提取物高质量浓度组斑马鱼肝脏区域的颜色明显加深,提示其肝脏存在脂质沉积。结果见图3(了哥王提取物低、中质量浓度组经油O染液染色后,与空白组比较无明显差异,故图略)。

3.3.4 肝组织中ALT、AST、LDH活性 与空白组比较,了哥王提取物低、中、高质量浓度组斑马鱼肝组织中ALT、AST、LDH活性均显著升高($P<0.05$),且有随药物暴露质量浓度增加而增强的趋势。结果见表3。

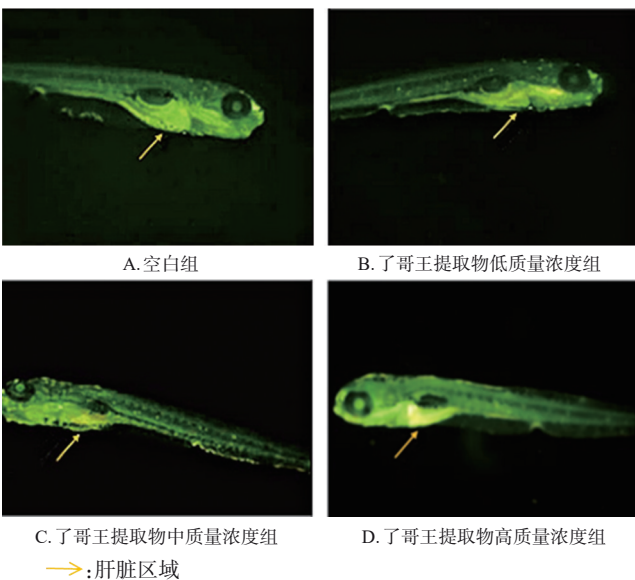


图2 不同质量浓度了哥王提取物对斑马鱼肝脏区域细胞凋亡的影响(吖啶橙染色,×3.2)

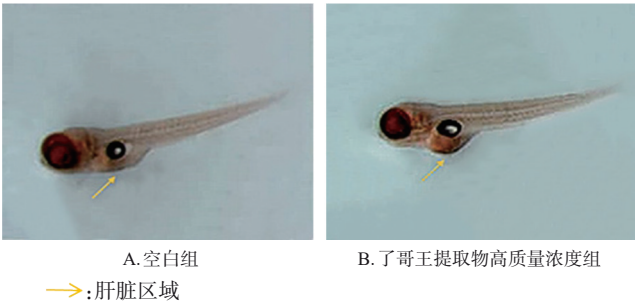


图3 不同质量浓度了哥王提取物对斑马鱼肝脏脂质沉积的影响(油红O染色,×3.2)

表3 不同质量浓度了哥王提取物对斑马鱼肝组织中ALT、AST、LDH活性影响的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	ALT/(U/g prot)	AST/(U/g prot)	LDH/(U/g prot)
空白组	14.98 ± 3.11	37.28 ± 1.98	37.67 ± 3.37
了哥王提取物低质量浓度组	32.51 ± 5.45 ^a	55.41 ± 3.78 ^a	48.40 ± 2.47 ^a
了哥王提取物中质量浓度组	36.17 ± 4.73 ^a	66.17 ± 4.68 ^a	52.31 ± 3.86 ^a
了哥王提取物高质量浓度组	49.89 ± 4.72 ^a	90.56 ± 4.60 ^a	71.18 ± 6.75 ^a

a: 与空白组比较, $P<0.05$

4 讨论

了哥王作为一种民族药,具有较大的临床应用价值,但其毒性限制了该药的后续开发及利用。有研究表明,了哥王的不同提取物对正常大鼠具有明显的肝毒性,其中了哥王乙醇提取物的毒性作用较为明显^[10]。斑马鱼的每个发育时间段都有不同的生理生化指标,且易于体外观察,适用于药物毒性评价^[16]。因此,本实验利用斑马鱼模型,对了哥王提取物的毒性作用进行了初步评价。

为探究了哥王提取物对斑马鱼胚胎发育的毒性作用,本研究以6~8 hpf斑马鱼胚胎为对象,记录了其1 min内自主抽动次数、10 s内心率及畸形、死亡发生情

况。结果表明,与空白组比较,经了哥王提取物暴露后,斑马鱼胚胎在发育过程中的自主抽动次数增加、心率减慢,且出现心包肿大、卵黄囊肿大、体长变短等畸形现象和死亡;同时,随着药物质量浓度的增加,斑马鱼胚胎畸形和死亡的现象逐渐明显,与文献报道一致^[17],提示了哥王提取物对斑马鱼胚胎具有一定的致畸和致死作用。

为探究了哥王提取物对斑马鱼肝脏的毒性作用,本研究在急性毒性实验的基础上,采用显微镜观察了低、中、高质量浓度药物对斑马鱼肝脏表型及相关指标的影响。结果表明,与空白组比较,了哥王提取物低、中、高质量浓度组斑马鱼的肝脏均有不同程度的透明度降低、形态膨大现象,且有随药物暴露质量浓度增加而肝脏区域逐渐模糊的趋势。吖啶橙染色结果显示,与空白组比较,中、高质量浓度的了哥王提取物均能够诱导斑马鱼肝脏细胞凋亡,与文献报道一致^[16]。油红O染色结果显示,与空白组相比较,了哥王提取物高质量浓度组斑马鱼的肝脏中存在脂质沉积。这提示该提取物可诱导肝脏细胞凋亡,并可促进肝脏脂质沉积。

ALT、AST、LDH 常用以评价肝脏受到外源性物质损伤的严重程度,当肝细胞受损时,其活性会升高^[18]。本研究采用酶联免疫吸附测定法检测了斑马鱼中 ALT、AST、LDH 的活性,结果表明,与空白组比较,了哥王提取物低、中、高质量浓度组斑马鱼肝组织中 ALT、AST、LDH 活性均显著升高,提示该提取物对斑马鱼肝脏具有损伤作用。有文献报道,连续给予了哥王提取物后,大鼠血清中 ALT、AST 水平显著升高,其肝细胞凋亡增加,从而造成肝脏损伤^[10,19],与本实验研究结果基本一致。

综上所述,了哥王提取物对斑马鱼胚胎的发育毒性表现为自主抽动次数增加,心率减慢,畸形率、死亡率升高等;同时,了哥王提取物可通过诱导肝细胞凋亡、促进肝脏脂质沉积而诱发肝脏损伤。

参考文献

- [1] 任海,彭少麟,戴志明,等.了哥王(*Wikstroemia indica*)的生态生物学特征[J].应用生态学报,2002,13(12):1529-1532.
- [2] 张庆荣,夏光成.有毒中草药彩色图鉴[M].2版.天津:天津科技翻译出版公司,2006:131.
- [3] 周志容,冯果,李玮,等.“汗渍法”炮制对了哥王中黄酮含量及其抗氧化能力的影响[J].中国药房,2020,31(19):2320-2325.
- [4] 姜洪芳,白雪,牛慧彦,等.西瑞香素对肺癌A549细胞侵袭及迁移能力的影响[J].实用药物与临床,2016,19(2):131-135.
- [5] WEI L, WANG X B, MU S X, et al. Ultra high perfor-

mance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with hierarchical cluster analysis to evaluate *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey. from different geographical regions[J]. J Sep Sci, 2015,38(12):2093-2100.

- [6] HUANG W H, ZHOU G X, WANG G C, et al. A new biflavonoid with antiviral activity from the roots of *Wikstroemia indica*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2012, 14 (4): 401-406.
- [7] 徐骏军,王国伟,熊友香,等.了哥王抗炎有效部位研究[J].江西中医药大学学报,2014,26(6):40-41.
- [8] 郑传奇,冯果,李伟,等.了哥王生物活性及抗肿瘤作用研究进展[J].微量元素与健康研究,2020,37(3):46-48.
- [9] 郑传奇,冯果.了哥王化学成分及毒性研究进展[J].贵州医药,2019,43(10):1536-1538.
- [10] 冯果,李玮,何新,等.苗族药了哥王不同提取物对正常大鼠肝毒性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):96-102.
- [11] 任晨晨,冯果,李玮,等.苗药了哥王不同部位提取物的肾毒性研究[J].中国药房,2022,33(4):419-424.
- [12] 冯果,李玮,何新,等.苗药了哥王不同炮制品乙醇提取物对小鼠的急性毒性作用比较[J].中国药房,2017,28(25):3536-3540.
- [13] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496 (7446): 498-503.
- [14] 冯果,李玮,何新,等.正交试验结合综合评分法优化苗药了哥王的提取工艺[J].中国药房,2017,28(16):2216-2219.
- [15] 代一航,赵崇军,田敬欢,等.香加皮水提取物对斑马鱼幼鱼肝脏毒性的初步研究[J].环球中医药,2017,10(10):1161-1166.
- [16] 史永平,张友刚,孔浩天,等.中药乳香对斑马鱼胚胎发育毒性研究[J].中华中医药杂志,2020,35(9):4606-4609.
- [17] 倪媛媛.两面针质量控制及基于斑马鱼模型评价两面针和苍耳子初步毒性研究[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [18] 赵晓秋.乙烯利对小鼠肝脏的毒性作用[D].长春:吉林大学,2022.
- [19] FENG G, CHEN Y L, LI W, et al. Exploring the Q-marker of “sweat soaking method” processed radix *Wikstroemia indica*: based on the “effect-toxicity-chemicals” study[J]. Phytomedicine, 2018, 45: 49-58.

(收稿日期:2022-05-09 修回日期:2022-08-21)

(编辑:曾海蓉)