

## 基于斑马鱼毒/代同步进程法分析巴戟天配伍淫羊藿减毒作用

凌洁<sup>1,2</sup>, 王茉<sup>3</sup>, 陈颖<sup>1,2</sup>, 宋捷<sup>1,2</sup>, 孙娥<sup>1,2</sup>, 石子琪<sup>1,2</sup>,  
封亮<sup>1,2</sup>, 贾晓斌<sup>1,2</sup>, 韦英杰<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学第三临床医学院, 江苏 南京 210028; 2. 江苏省中医药研究院, 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028; 3. 解放军 93318 部队医院, 辽宁 开原 112300)

**摘要:** 基于体内转化的毒性研究至关重要, 但难以实时动态观察, 本文提出斑马鱼毒/代 (毒性/代谢) 同步进程法, 并用于揭示淫羊藿中毒及其配伍巴戟天后的减毒作用。将受精后 1 天 (1 dpf) 的健康斑马鱼胚胎置于不同浓度淫羊藿水煎液 (YYH)、淫羊藿黄酮组分 (YTF)、代表黄酮成分 (朝藿定 C 和淫羊藿苷) 及分别配伍巴戟天水煎液 (BJT) 的供试液中, 同时设置空白溶媒 (0.4% DMSO) 对照组, 观察记录给药后 1~5 天 (2~6 dpf) 的鱼中毒和死亡情况, 显微镜观察 3 dpf 斑马鱼幼鱼形态, 用 SPSS16.0 计算不同供试液在 2~6 dpf 的鱼半数致死浓度 (LC<sub>50</sub>); 同时, 分别选取各样品的一个相对安全浓度, 每天同步取药液分析淫羊藿代表黄酮成分动态代谢变化。结果表明: 淫羊藿中主要黄酮成分朝藿定 A/B/C 和淫羊藿苷经斑马鱼作用后动态转化为以箭藿苷 C 和宝藿苷 I 为主的代谢物, 其中宝藿苷 I 主要来自朝藿定 A/B 和淫羊藿苷, 原形和代谢物均不会致鱼中毒; 而箭藿苷 C 主要来自朝藿定 C, 箭藿苷 C 的动态增加与 YYH、YTF 及朝藿定 C 的毒性产生密切相关; 配伍 BJT 后, 淫羊藿主要黄酮成分 (如朝藿定 C) 代谢速度减慢, 伴随产生的毒性也减缓。斑马鱼毒/代同步进程法揭示淫羊藿中朝藿定 C 代谢转化为箭藿苷 C 后增加毒性, 是淫羊藿潜在致毒关键黄酮成分, 巴戟天通过减缓朝藿定 C 代谢速度而减毒。研究为中药毒性物质发现及配伍减毒提供新思路与方法。

**关键词:** 斑马鱼; 淫羊藿; 巴戟天; 毒性; 代谢

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 01-0074-10

## Analysis of Folium Epimedium toxicity in combination with Radix Morindae Officinalis based on zebrafish toxicity/metabolism synchronization

LING Jie<sup>1,2</sup>, WANG Mo<sup>3</sup>, CHEN Ying<sup>1,2</sup>, SONG Jie<sup>1,2</sup>, SUN E<sup>1,2</sup>, SHI Zi-qi<sup>1,2</sup>,  
FENG Liang<sup>1,2</sup>, JIA Xiao-bin<sup>1,2</sup>, WEI Ying-jie<sup>1,2\*</sup>

(1. The Third Clinical School of Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 3. The Liberation Army 93318 Army Hospital, Kaiyuan 112300, China)

**Abstract:** Metabolic transformation *in vivo* is a critical approach in the study of toxicity, but real-time dynamic observation of the transformation is difficult. We proposed that zebrafish toxicity/metabolism synchronization may be used in the analysis of toxicity of Folium Epimedium (Yinyanghuo for Chinese, YYH)

收稿日期: 2017-07-31; 修回日期: 2017-09-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573833, 81603500, 81503253); “重大新药创制”科技重大专项 (2017ZX 09301-056, 2017ZX 09301-051); 2015 年度中医药行业科研专项 (201507004-10); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20141507); 江苏省六大人才高峰资助项目 (2013-YY006); 2014 年度江苏省第四期“333 工程”科研资助项目 (BRA2014348).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85637809, E-mail: wyj970@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0756

and the toxicity may be reduced by *Radix Morindae Officinalis* (Bajitian for Chinese, BJT). Healthy zebrafish embryos 1 day post fertilization (1 dpf) were exposed to different concentrations of YYH, total flavonoids of YYH (YTF), representative flavonoids (epimedin C and icariin) and their respective in combination with BJT. Death numbers of the embryos or larvae were counted during 1–5 days after dosing (2–6 dpf); embryonic micro-morphology of zebrafish (3 dpf) was observed and pictures were taken. The blank vehicle (0.4% DMSO) was used in the control group, and  $LC_{50}$  value of 2 to 6 dpf was calculated by SPSS16.0. A relative safe concentration was sampled every day to analyze the dynamic metabolites changes of major flavonoids of YYH. The results showed that epimedin A/B/C (EA/EB/EC) and icariin, the major flavonoids of YYH, were dynamically transformed into major metabolites of sagittoside C (SC) and baohuoside I (BI) by zebrafish. BI was mainly derived from EA, EB and icariin. Neither original form nor their metabolite BI can cause zebrafish poisoning. SC was mainly derived from EC, and its accumulation was closely related to the toxicity of YYH, YTF and EC. After combination with BJT, the metabolism of EC was slowed down and the toxicity was alleviated. Zebrafish toxicity/metabolism synchronization revealed that the toxicity of EC of YYH was increased after metabolism into SC, which maybe the key potential poisonous factor of YYH, and BJT can reduce the toxicity by slowing down the metabolism rate of EC. The data provides new ideas and methods in the study of toxic substances in Chinese medicine and mechanism of detoxicity by combination.

**Key words:** zebrafish; *Folium Epimedium*; *Radix Morindae Officinalis*; toxicity; metabolism

壮骨中药肝毒性受到关注, 仙灵骨葆口服制剂引起的肝损伤风险于2016年12月药品不良反应信息通报发布, 该制剂处方中重用君药淫羊藿 (占整个组方的70%), 其潜在肝毒性风险逐渐显现, 为临床应用带来巨大挑战<sup>[1,2]</sup>。

药物的毒性产生与其在体内的代谢转化密切相关, 但现有体内、外模型难以进行毒性与代谢的实时、动态同步观察, 是制约中药毒性物质发现的难点、瓶颈: 体内毒性实验周期较长、成本高、化合物用量大, 不适于高效的毒性筛选及代谢动态检测; 体外实验不能体现在体代谢的综合效果, 无法进行毒/代同步分析。

斑马鱼 (zebrafish) 是近年来进行药物在体高通量筛选、毒性和代谢研究等热门模式生物<sup>[3-5]</sup>。斑马鱼发育速度快, 在1周内形成主要的脏器及代谢酶系, 幼鱼体小透明, 实验可在微板中进行并实时动态观察<sup>[6]</sup>。课题组前期建立了斑马鱼代谢模型, 实现微量 (微克至毫克级) 成分的在体、高效代谢研究<sup>[7,8]</sup>, 斑马鱼毒性评价法已在国内、外广泛用于药物的安全性评价<sup>[9,10]</sup>。与哺乳动物类似, 药物经斑马鱼作用后发生代谢转化, 产生药效或毒性, 故采用斑马鱼进行毒性动态评价的同时可同步分析代谢物, 即实现斑马鱼毒/代 (毒性/代谢) 同步进程分析。

中药淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 (*Epimedium brevicornum* Maxim.)、箭叶淫羊藿 [*Epimedium sagittatum* (Sieb.et Zucc.) Maxim.]、柔毛淫羊藿 (*Epimedium pubescens* Maxim.) 或朝鲜淫羊藿 (*Epimedium*

*koreanum* Nakai) 的干燥地上部分。具补肾阳, 强筋骨, 祛风湿之功效<sup>[11]</sup>, 虽然淫羊藿的潜在毒性引起重视, 国家药品不良反应监测中心通报“警惕壮骨关节丸引起的肝损害”中公开: “淫羊藿给药3天, 小鼠即出现呕吐、纳少、活动减少, 给药15天处死, 可见肝脏脂肪变性”<sup>[12]</sup>, 但受评价模型及化合物数据等制约, 淫羊藿毒性相关研究相对薄弱且进展缓慢, 何种物质有毒 (是原形成分还是代谢物?) 亟待明晰。淫羊藿成分复杂, 主含黄酮类、多糖、有机酸及生物碱等成分, 其中淫羊藿黄酮成分是抗骨质疏松的主要活性成分, 其安全性对淫羊藿临床合理应用至关重要。虽然已有淫羊藿总黄酮大鼠长期毒性和急性毒性研究报道未发现明显毒性<sup>[13,14]</sup>, 但本课题组用斑马鱼毒性评价发现, 淫羊藿提取物和黄酮组分在一定剂量时会致斑马鱼中毒, 出现活动减少, 脏器变形等现象, 且配伍巴戟天后毒性减弱。何种黄酮成分是致毒关键? 配伍巴戟天如何减毒? 对阐明淫羊藿的毒性之谜及其配伍减毒合理应用具有意义。

本研究拟采用斑马鱼毒/代 (毒性/代谢) 同步进程分析法分析淫羊藿提取物、黄酮组分、代表黄酮成分及分别配伍巴戟天后的毒性及主要黄酮成分同步动态变化, 以期发现淫羊藿致毒关键黄酮成分及配伍巴戟天的减毒作用。

## 材料与方法

**实验动物** 斑马鱼成鱼 (南京大学模式动物研究所), 来自德国 Tuebingen 品系。

**试剂与仪器** 培养基母液: 2.9% NaCl、0.125 8% KCl、0.485 1% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.811 8% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 巴戟天药材 (产地广东, 亳州中药饮片厂, 批号: 1404018038); 淫羊藿药材 (产地陕西, 南通三越中药饮片有限公司, 批号: 161203); 淫羊藿总黄酮/黄酮组分 (YTF, 自制<sup>[15]</sup>, 含朝藿定 A/B/C 和淫羊藿苷 (icariin) 的含量分别为 3.0%、7.1%、9.9% 和 29.0%); 朝藿定 A (epimedin A, EA, 纯度 98%, 批号: JZ16042502)、朝藿定 B (epimedin B, EB, 纯度 98%, 批号: JZ15110905)、箭藿苷 C (sagittatoside C, SC, 又名 2"-鼠李糖基淫羊藿次苷 II, 2"-O-rhamnosylcariside II, 纯度 98%, 批号: JZ16071606)、朝藿定 C (epimedin C, EC, 纯度 98%, 批号 JZ16042503)、宝藿苷 I (baohuoside I, BI, 纯度 98%, 批号 JZ15070602) 购自南京景竹生物科技有限公司; 淫羊藿苷 (纯度 98%, 批号: 110737-200415) 购自中国食品药品检定研究院。Nikon Aphaphot-2 YS2 显微镜 (日本 Nikon 尼康公司); 生化培养箱 SPX-80 (宁波海曙赛福实验仪器厂), Olympus stylus TG-4 相机 (日本 Olympus 公司); Agilent 1200 型系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Organomation N-EVAP TM 112 氮吹仪 (美国 Organomation Associates 公司); KQ3200B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); METTLER TOLEDO AB135-S 分析天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

**高效液相色谱分析** 液相条件 1: 色谱柱为 Agilent Zorbax C18 色谱柱 (5 μm, 150 mm×4.6 mm) 和 C18 预柱 (4.6 mm×12.5 mm ID, 5 μm); 流动相, A 为 0.1% 甲酸水; B 为乙腈; A+B=100%, 采用梯度洗脱: 10% B (0~5 min); 10%~25% B (5~15 min); 25%~90% B (15~40 min); 90% B (40~45 min)。柱温: 30 °C; 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>。

液相条件 2: 色谱柱为 Agilent Zorbax C18 色谱柱 (5 μm, 250 mm×4.6 mm) 和 C18 预柱 (4.6 mm×12.5 mm ID, 5 μm); 流动相, A 为 0.1% 甲酸水; B 为乙腈; A+B=100%, 采用梯度洗脱 B 相比比例随时间的变化: 10%~23% (0~10 min); 23%~26% (10~35 min); 26%~48% (35~65 min); 48%~80% (65~80 min); 80%~100% (80~85 min); 100%~100% (85~90 min)。柱温: 25 °C; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 270、272、325 和 353 nm; 运行时间: 90 min。进样量: 20 μL。

采用上述液相条件, 分析淫羊藿水煎液 (YYH)、YTF、EC、淫羊藿苷及分别配伍巴戟天水煎液 (BJT)

经斑马鱼作用前后的 6 个代表黄酮成分, 分别为 EA、EB、EC、淫羊藿苷、SC 及 BI。YYH 及 BJT 提取方法: 取淫羊藿或巴戟天药材, 适当粉碎, 称取 10 g, 加水 200 mL 浸泡半小时, 煎煮 2 次, 每次 30 min, 滤过, 合并滤液, 分别加纯水适量定容, 即得 YYH (10 mg·mL<sup>-1</sup>) 或 BJT (20 mg·mL<sup>-1</sup>) 贮备液 (YYH 和 BJT 的含量均以生药量计)。

**斑马鱼毒/代同步进程法分析 YYH、YTF、EC 和淫羊藿及其配伍 BJT 的安全性及代谢物** 将收集到的受精卵移入培养基中, 28.5 °C 培养箱中继续培养 24 h 待用。将 1 dpf 的健康胚胎置于 24 孔板中给药, 每孔 8 个胚胎, 每个实验组 16 个胚胎。包括 0.4% DMSO 培养基组、YYH 及其配伍 BJT (1 μg·mL<sup>-1</sup> YYH: 1 μg·mL<sup>-1</sup> BJT)<sup>[16]</sup> (200、500、1000、1500 和 2000 μg·mL<sup>-1</sup>, 以 YYH 计); BJT (200、500、1000、2 000 和 3 000 μg·mL<sup>-1</sup>)、YTF 及其配伍 BJT (1 μg·mL<sup>-1</sup> YTF: 10 μg·mL<sup>-1</sup> BJT) (10、25、50、100 和 200 μg·mL<sup>-1</sup>, 以 YTF 计)、代表黄酮成分淫羊藿苷、EC 及分别配伍 BJT (1 μmol·L<sup>-1</sup> 淫羊藿苷或 EC: 20 μg·mL<sup>-1</sup> BJT) (10、25、50、100 和 200 μmol·L<sup>-1</sup>, 以淫羊藿苷或 EC 计), 具体给药浓度见表 1。每孔给药液 2 mL, 将 24 孔板放入 28.5 °C 恒温培养箱中培养, 培养至 6 dpf。并于 3 dpf 在显微镜下观察各实验组斑马鱼的主要脏器形态, 观察并记录 2~6 dpf 斑马鱼的死亡数。

上述斑马鱼 1~6 dpf 毒性观察同步, 各组分别选取代表浓度 (表 2), 增加幼鱼数量供代谢取样 (增设 6~12 孔, 每孔 8 个胚胎): YYH 及其配伍 BJT (500 μg·mL<sup>-1</sup>)、YTF 及其配伍 BJT (50 μg·mL<sup>-1</sup>)、代表黄酮成分淫羊藿苷、EC 及分别配伍 BJT (25 μmol·L<sup>-1</sup>)。分别于斑马鱼暴露溶液后 0、1、2、3、4 及 5 天时吸取药液适量 (表 2), 于 -20 °C 冰箱放置。

**斑马鱼代谢样品处理** 将上述各组 1~6 dpf (给药后 0~5 天) 代谢药液分别于室温空气吹干, 加 80% 甲醇适量溶解, 同时将各组斑马鱼鱼体 (给药后第 5 天, 即 6 dpf) 吸干药液, 用生理盐水洗涤 3 次, 鱼体加入 80% 甲醇 0.5 mL 匀浆, YYH 及其配伍 BJT (3 000 μg·mL<sup>-1</sup>)、YTF 及其配伍 BJT (50 μg·mL<sup>-1</sup>)、代表黄酮成分淫羊藿苷、EC 及分别配伍 BJT (25 μmol·L<sup>-1</sup>), 15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 上清进样 20 μL 进行 HPLC 分析。

**数据分析** 利用数据统计软件 SPSS16.0 计算各供试液对斑马鱼半数致死浓度 (LC<sub>50</sub>)。

**Table 1** Concentration of different groups for zebrafish toxicity experiment. The concentration of YYH and BJT was calculated by the amount of the crude drug in the full text. YYH:BJT: 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  YYH: 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BJT; YTF:BJT: 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  YTF: 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BJT; Icariin:BJT: 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  icariin: 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BJT; EC:BJT: 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EC: 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BJT. YYH: Water decoction of Folium Epimedium; BJT: Water decoction of Radix Morindae Officinalis; YTF: Total flavonoids of Folium Epimedium; EC: Epimedin C

Group	Concentration					Unit
0.4% DMSO						
YYH	200	500	1 000	1 500	2 000	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
YYH:BJT	200	500	1 000	1 500	2 000	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (YYH)
BJT	200	500	1 000	2 000	3 000	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
YTF	10	25	50	100	200	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
YTF:BJT	10	25	50	100	200	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (YTF)
Icariin	10	25	50	100	200	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Icariin:BJT	10	25	50	100	200	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Icariin)
EC	10	25	50	100	200	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
EC:BJT	10	25	50	100	200	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (EC)

**Table 2** Concentration of different groups for zebrafish metabolic experiment

Group	Concentration for zebrafish	Concentration for HPLC	Unit	Sampling volume/mL
YYH	500	3 000	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	3
YYH:BJT	500	3 000	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (YYH)	3
YTF	50	100	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2
YTF:BJT	50	100	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (YTF)	2
Icariin	25	25	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1
Icariin:BJT	25	25	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Icariin)	1
EC	25	25	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1
EC:BJT	25	25	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (EC)	1

## 结果

### 1 淫羊藿黄酮成分经斑马鱼作用前后的高效液相色谱动态分析

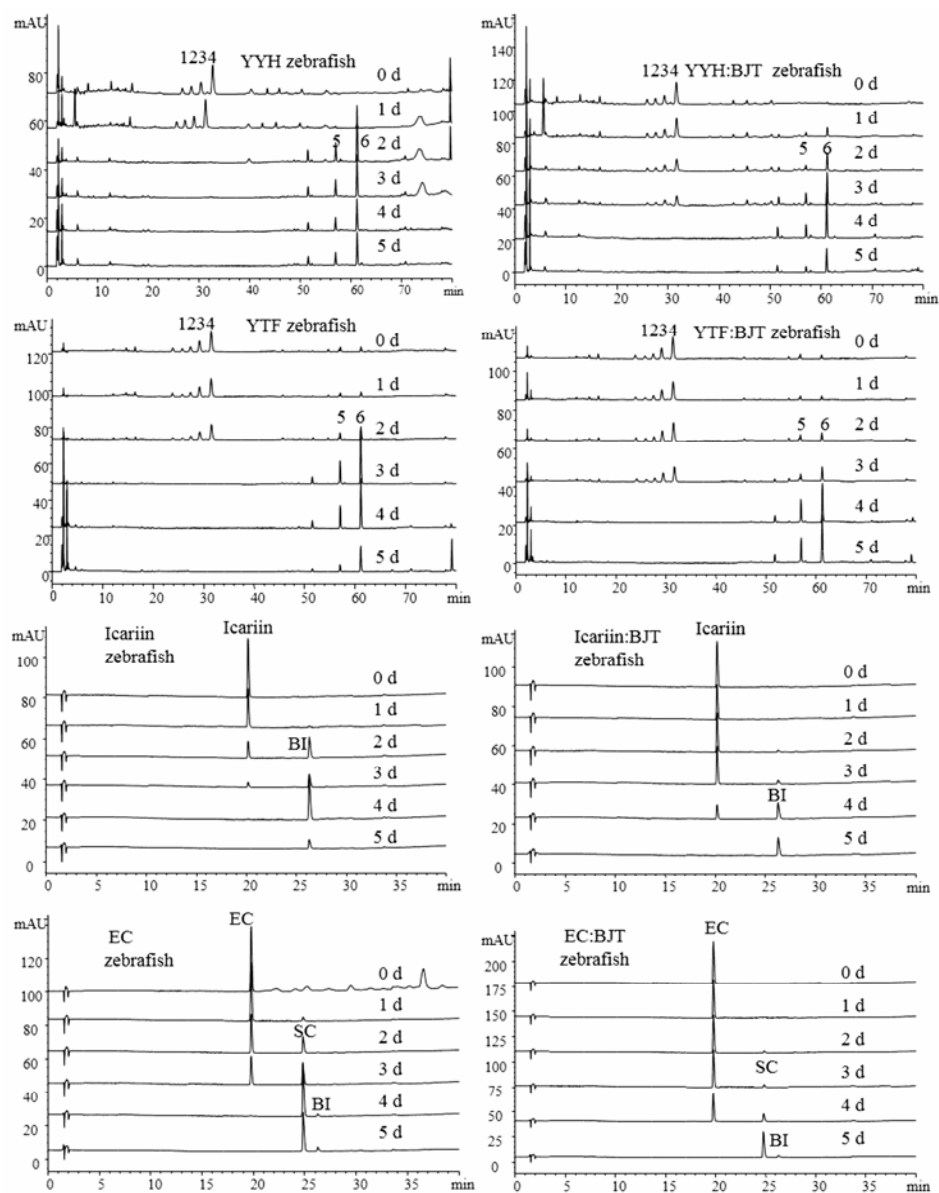
YYH、YTF、EC、淫羊藿苷及分别配伍 BJT 经斑马鱼作用 1~6 dpf 的高效液相色谱见图 1, 经与文献<sup>[17, 18]</sup>和用对照品对照, 色谱峰 1、2、3、4、5 和 6 为淫羊藿 6 个主要黄酮成分, 分别为 EA、EB、EC、淫羊藿苷、SC 和 BI。

以外标法计算上述 6 个主要淫羊藿黄酮成分含量, 并以每个成分占 6 个黄酮含量和的百分比计为相对百分含量 (图 2), 可见 YYH 和 YTF 中以 EA、EB、EC 和淫羊藿苷为主, 约占 6 个黄酮成分的 93.7%~100%, 经斑马鱼代谢脱糖基后, 全部动态转化为 SC 和 BI。斑马鱼代谢研究表明, EA、EB 和淫羊藿苷均转化为共同代谢物 BI<sup>[19]</sup>, 而 EC 则产生 SC。

YYH 单独给予 1 dpf 斑马鱼 2 天后 (3 dpf), EA、EB、EC 和淫羊藿苷全部代谢, 伴随代谢物 SC 和 BI 相对含量显著升高至 19.8% 和 80.2%; 但是, 配伍 BJT 后, EA、EB、EC 和淫羊藿苷的代谢速度减慢, 于给药 4 天后 (5 dpf) 代谢完全, SC 和 BI 相对含量动态上升至最高值, 分别为 24.1% 和 75.9%。

YTF 单独给予斑马鱼 3 天后 (4 dpf), EA、EB、EC 和淫羊藿苷全部代谢, SC 和 BI 含量显著升高至 24.0% 和 76.0%; 但在给药 5 天后 (6 dpf), SC 含量下降至 16.8%, BI 含量上升至 83.2%, 系 SC 脱鼠李糖基转变为 BI 所致。与 YYH 相似, YTF 配伍巴戟天后, EA、EB、EC 和淫羊藿苷的代谢速度减慢, 于给药 4 天后 (5 dpf) 代谢完全。

淫羊藿代表黄酮成分淫羊藿苷和 EC 分别单独给予斑马鱼后 1 天内 (2 dpf) 均相对稳定, 未见相应代谢物 BI 和 SC; 给药后 2~4 天 (3~5 dpf), 淫羊藿苷和 EC 均动态代谢完全, 淫羊藿苷的代谢物 BI 相对含量上升至 100%; EC 的主要代谢物为 SC (相对含量为 92.3%), 另一次要代谢物为 BI (相对百分含量为 7.7%)。淫羊藿苷和 EC 分别配伍 BJT 给予斑马鱼后, 代谢速度均减慢, 给药后 3 天内 (4 dpf), 淫羊藿苷和 EC 相对百分含量均未明显改变, 相应代谢物 BI 和 SC 未见明显产生; 直至给药后 4 天 (5 dpf), 淫羊藿苷和 EC 量分别开始显著降至 44.9% 和 73.2%, 相应代谢物 BI 和 SC 量分别显著上升至 55.1% 和 26.8%; 至 6 dpf, 淫羊藿苷和 EC 均全部代谢, 淫羊藿苷的代谢物 BI 含量上升至 100%; EC 的主要代谢物 SC 含量显



**Figure 1** HPLC chromatogram for YYH, YTF, EC, icariin and their combination with BJT after exposing to zebrafish from 1–6 dpf (0–5 day after dose). Peak 1: Epimedidin A, EA; Peak 2: Epimedidin B, EB; Peak 3: Epimedidin C, EC; Peak 4: Icarin; Peak 5: Sagittatoside C, SC; Peak 6: Baohuoside I, BI

著上升至 88.7%，并开始产生次要代谢物 BI (11.3%)。

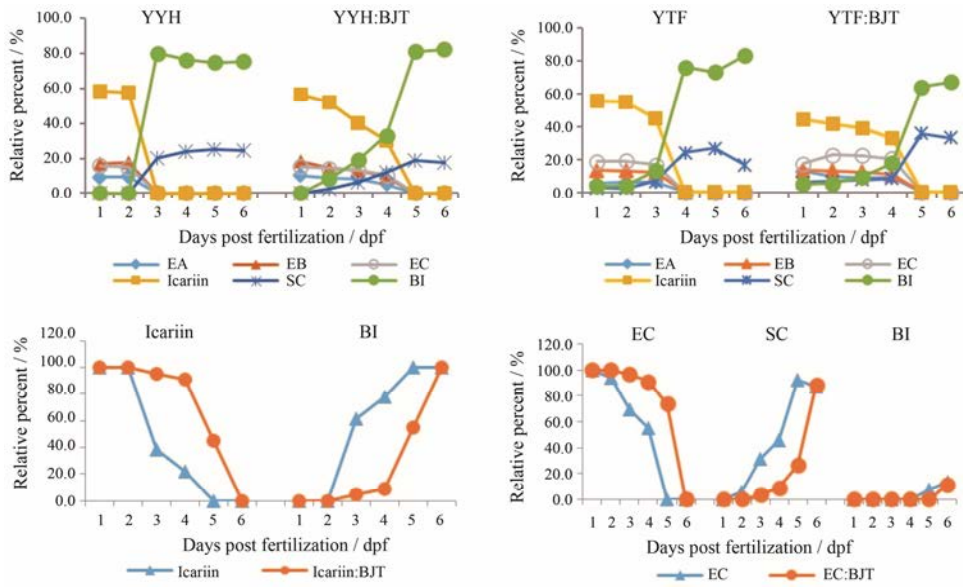
YYH、YTF、EC、淫羊藿苷及分别配伍 BJT 经斑马鱼作用 5 天 (6 dpf) 后的斑马鱼体内吸收高效液相色谱见图 3，与 0.4% DMSO 空白组比较，除了 YTF 配伍 BJT 斑马鱼组可检测到代谢物 BI 及 SC，但信噪比较小，SC 和 BI 的信噪比分别为 1.2 和 4.8；其他各组斑马鱼色谱峰均未见与空白组明显差异。结果提示，淫羊藿黄酮成分或其代谢物可吸收入斑马幼鱼体内，但含量很低，有时难以检测到。

## 2 YYH、YTF、EC、淫羊藿苷及其配伍 BJT 对斑马鱼的毒性作用

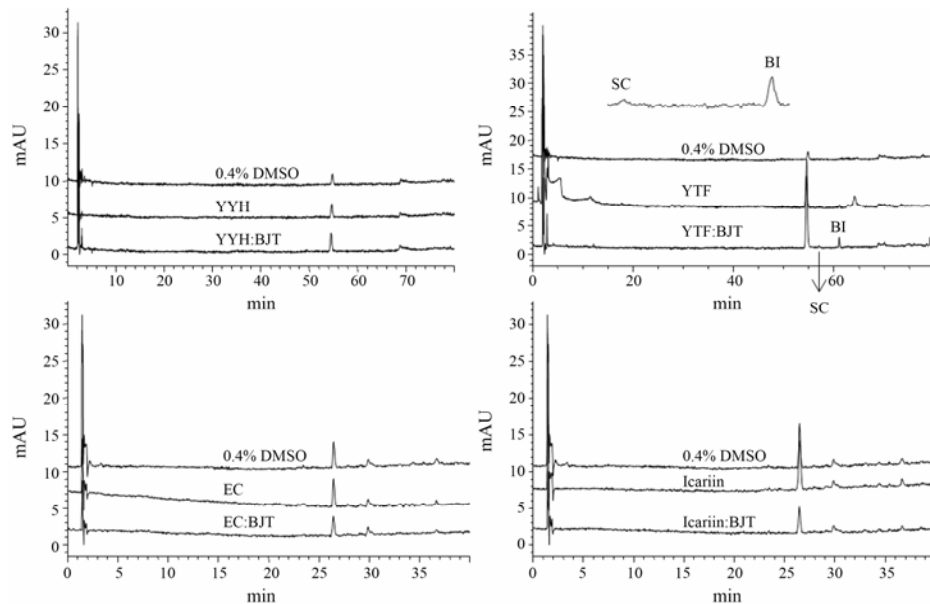
以光学显微镜检视斑马鱼脏器形态和死亡率为

主要指标考查毒性。在显微镜下观察结果：斑马鱼受精 3 dpf 后孵化成幼鱼，各脏器发育基本完全，鱼体透明，在载薄片上易侧卧，显微镜下检视脏器形态清楚、直观。0.4% DMSO 培养基组为空白对照组，在给药期间未见死亡，亦未见致鱼脏器产生毒性。各供试液均与培养基组比，3 dpf 斑马鱼显微检视结果见图 4。

YYH 在  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及以下浓度对斑马幼鱼 (3 dpf) 脏器未见明显改变，鱼存活最大浓度  $1\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  致斑马幼鱼肠道<sup>[20, 21]</sup>略肿大；BJT 在  $2\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及以下浓度对斑马幼鱼 (3 dpf) 脏器未见明显改变，在  $3\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时致斑马鱼肠道略肿大、围心囊肿大，脑部和眼部变小，眼部色素变浅；YYH



**Figure 2** Relative percent of EA, EB, EC, icariin, SC or BI for YYH, YTF, EC, icariin and their combination with BJT after exposing to zebrafish from 1-6 dpf



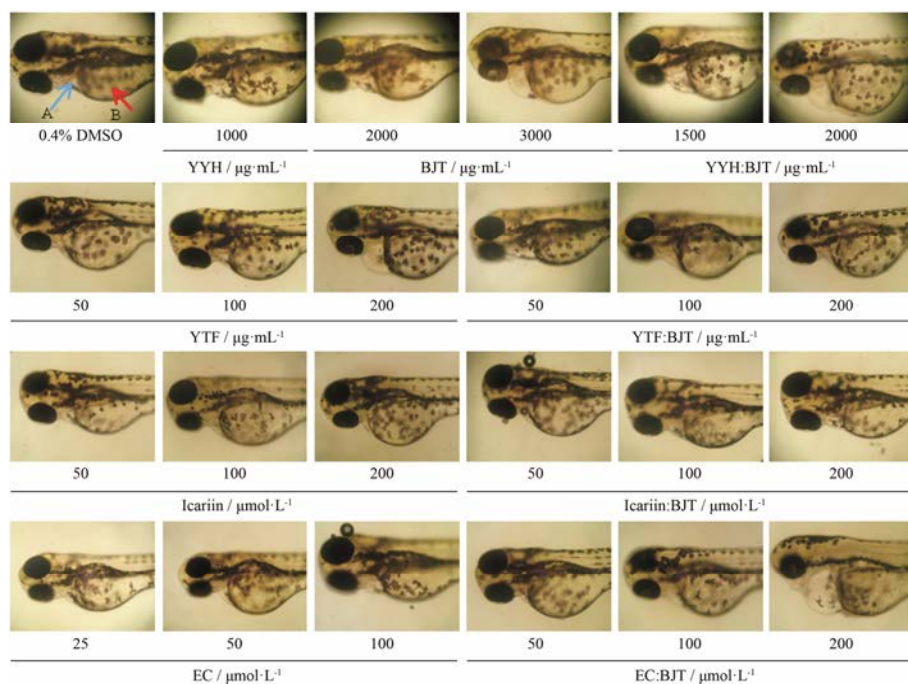
**Figure 3** HPLC chromatogram for zebrafish (5 day after dose) of YYH, YTF, EC, icariin and their combination with BJT after exposing to zebrafish

配伍 BJT 后, 在  $2\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时致斑马鱼肠道肿大、围心囊肿大, 脑部和眼部变小, 眼部色素变浅。

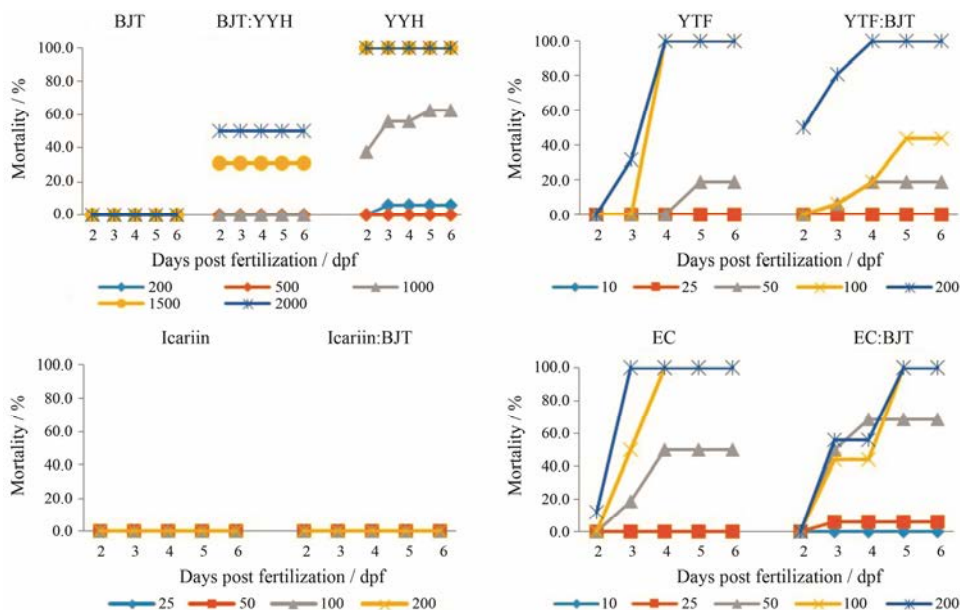
与培养基组比, YTF 在  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  致斑马鱼围心囊水肿、肠道肿大, 脑部和眼部变小, 眼部色素变浅, 但配伍巴戟天后, 相同浓度组幼鱼 (3 dpf) 脏器均未见明显改变; 淫羊藿及其配伍 BJT 各浓度组斑马鱼 (3 dpf) 脏器均未见明显改变; EC 在  $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时致斑马鱼 (3 dpf) 全部死亡, 配伍巴戟天后则全部存活, 但见斑马鱼围心囊水肿、肠道肿大, 脑部和眼部变小, 眼部色素变浅。

YYH、YTF、EC、淫羊藿及各自配伍 BJT 对斑马鱼的死亡率与给药浓度和时间基本呈依赖性, 其时间-给药剂量-毒性关系见图 5。

YYH 给药后 24 h,  $1\,500$  和  $2\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组鱼全部死亡;  $1\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度组鱼死亡 37.5%, 在给药后 48 h, 死亡率上升至 56.25%, 并至 6 dpf 保持不变;  $200$  和  $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组给药期间鱼的死亡率小于 6.25%。巴戟天各浓度组鱼在给药期间无死亡。淫羊藿配伍巴戟天后, 给药后 24 h,  $1\,500$  和  $2\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  鱼死亡率分别降低至 31.3% 和 50%, 并至 6 dpf 保持



**Figure 4** Pictures of zebrafish embryo exposed to solutions of water decoction of YYH, YTF, EC, icariin and their combination with BJT and control group at 3 dpf, which show different intoxicating phenomenon of different concentration. Magnification,  $\times 100$ . A: Pericardium; B: Intestine



**Figure 5** Effect on zebrafish mortality (2–6 dpf) of YYH, YTF, EC, icariin and their combination with BJT. Unit for YYH and BJT, YTF, EC and icariin is  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively

不变; 其他各浓度组鱼给药期间未见死亡。

YTF 给药后 48 h, 仅见  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度组斑马马幼鱼 (3 dpf) 死亡 31.25%; 给药后 72 h, 100 和  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度组斑马马幼鱼均全部死亡; 配伍巴戟天给药后 72 h,  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度组斑马马幼鱼全部死亡,  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度组斑马马幼鱼仅死亡 18.75%, 给药后 96 h,  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组斑马马幼鱼死亡率达 43.75% (5

dpf), 并至 6 dpf 保持不变; YTF 及其配伍巴戟天, 低于  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度组鱼给药期间不死亡或少量死亡 (小于 20%)。

淫羊藿昔及其配伍巴戟天各浓度组鱼在给药期间均无死亡。

$200$  和  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EC 致斑马马幼鱼全部死亡的时间分别是给药后 48 h 和 72 h, EC 配伍巴戟天

后, 均推迟至给药后 96 h 全部死亡。其他低浓度 EC 及其配伍巴戟天对鱼毒性相当 (部分死亡或不死亡)。

### 3 代谢物 SC 的动态变化与斑马鱼动态毒性 (LC<sub>50</sub>) 的相关分析

淫羊藿黄酮成分按代谢特征主要分为两类, 一类是 EA、EB 和淫羊藿苷, 其共同主要代谢物为含一个鼠李糖基的 BI; 另一类是 EC, 其主要代谢物为含两个鼠李糖基的 SC。EA、EB、EC 和淫羊藿苷是淫羊藿中主要黄酮成分。EA、EB 和淫羊藿苷对斑马鱼的毒性小, 本实验以淫羊藿苷为代表, 发现其给予斑马鱼后动态转化为 BI, 但未见斑马鱼产生毒性, 提示代谢转化不会增加淫羊藿苷毒性。而 EC 给予斑马鱼后, 发现动态转化为 SC 后毒性增加, 提示代谢转化增加 EC 毒性。本实验发现, YYH、YTF 和 EC 及各自配伍巴戟天的斑马鱼代谢物 SC 主要来源于 EC, 二者的相对含量呈明显的负相关 ( $R^2 > 0.9$ ) (图 6)。

SPSS16.0 计算各样品给药后的动态斑马鱼半数致死浓度 LC<sub>50</sub> (2 dpf 或 3~6 dpf), 并与 SC 的相对含量动态变化进行相关分析 (图 7)。发现斑马鱼产

生毒性 (死亡) 至毒性达到高峰稳定期间, LC<sub>50</sub> 值的降低 (即毒性增加) 与 SC 的增加密切相关 ( $R^2 > 0.9$ ), 提示淫羊藿中黄酮的毒性主要来自 EC 的代谢物 SC。YYH、YTF 和 EC 配伍 BJT 后, 代谢物 SC 的产生速度减慢, 相应致鱼的毒性也减缓, 特别是 YYH 与 BJT 配伍后, 给药期间未见斑马鱼畸形。

### 讨论

本实验提出并采用斑马鱼毒/代 (毒性/代谢) 同步进程分析法, 即用斑马鱼评价毒性的过程中同步动态分析代谢物的变化, 用于分析 YYH、YTF、EC、淫羊藿苷及其配伍巴戟天经斑马鱼作用后的毒性与代谢动态变化, 发现淫羊藿致毒关键黄酮成分及配伍巴戟天后的减毒作用。

采用 1 dpf 斑马鱼胚胎实验, 于 3 dpf 时孵化成幼鱼, 至 5 dpf 各种脏器基本发育完全, 鱼体小且透明, 实验可在微板中进行, 在显微镜下检视脏器形态。以鱼的脏器形态变化和死亡率为指标评价毒性, 具有可视、动态、实时等优势。斑马幼鱼即具有较完善的代谢酶系和肠道菌群, 也是进行药物代谢研究的理想模式动物。可见, 本实验选择 1~6 dpf 斑马鱼可实

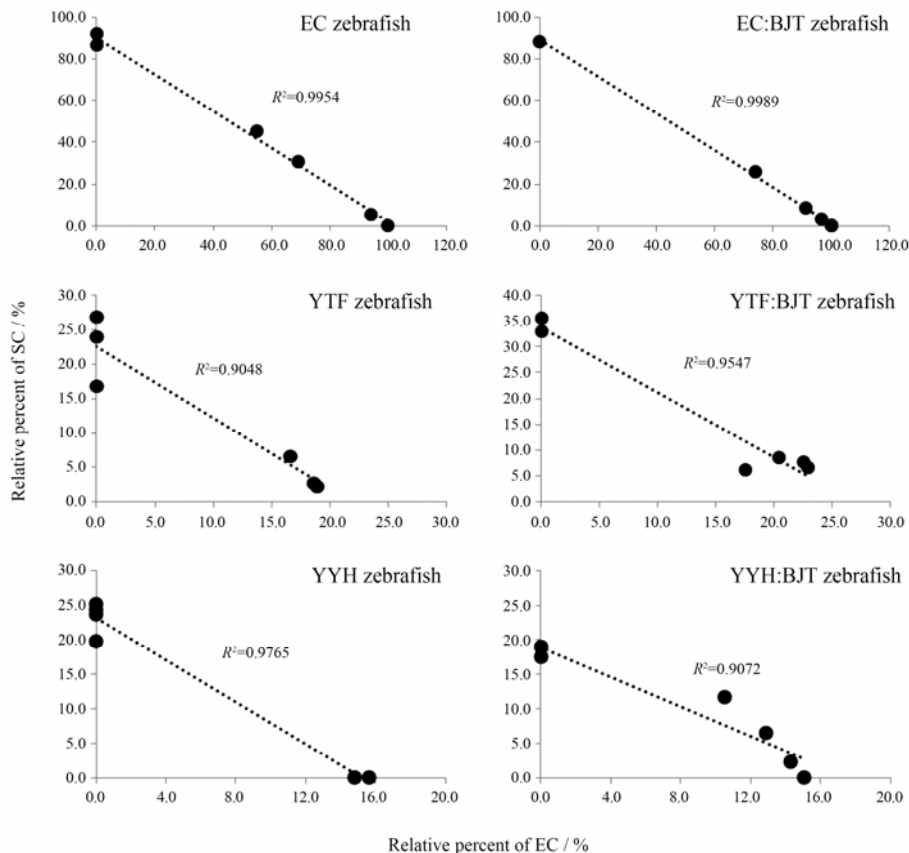
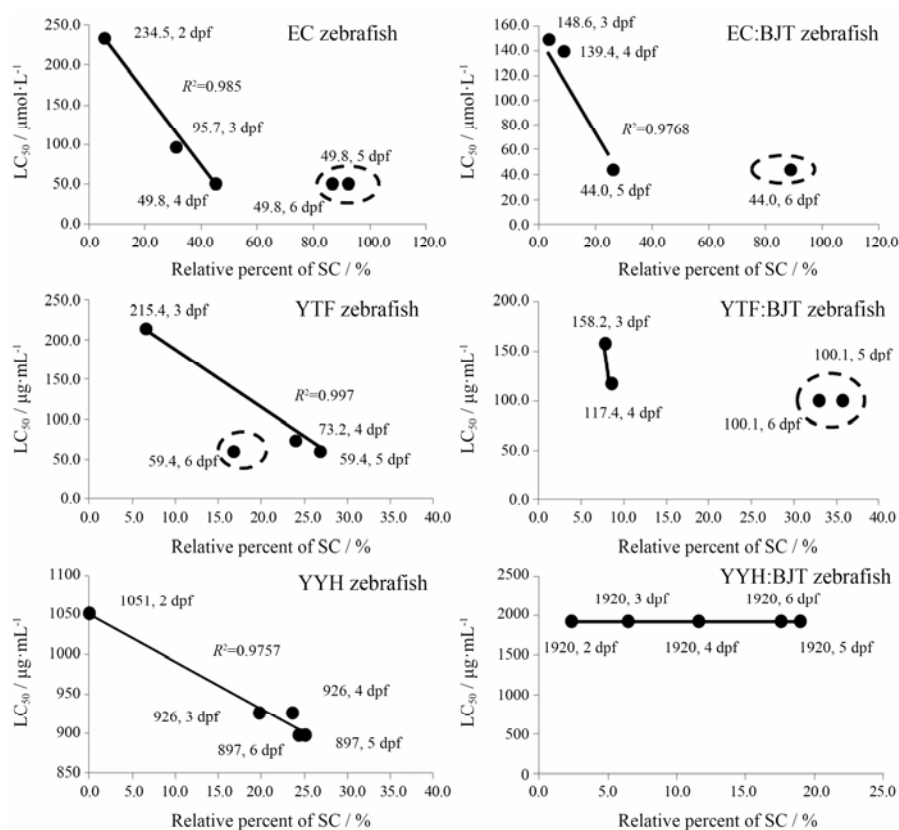


Figure 6 Correlation analysis of dynamic changes of relative content between EC and its metabolite SC



**Figure 7** Correlation analysis of dynamic changes between relative content of SC and zebrafish  $LC_{50}$  from 2 or 3 dpf to 4, 5 or 6 dpf. Data with circle of EC and YTF and their combination with BJT is excluded, the reason is that  $LC_{50}$  at 5 dpf and/or 6 dpf didn't decrease anymore (that is toxicity increase became stable)

现药物毒性与代谢的同步动态分析。

近年来淫羊藿的潜在毒性风险受到重视,其抗骨质疏松主要活性成分黄酮<sup>[22, 23]</sup>的安全性至关重要,此外寻找配伍减毒药,对临床安全有效使用淫羊藿具有意义。故本研究以 YYH、TFY、代表黄酮成分(淫羊藿苷和 EC)及其配伍 BJT 为研究对象,用斑马鱼评价毒性同时分析淫羊藿黄酮类成分的代谢变化,一方面揭示淫羊藿致毒相关物质及其与代谢转化的关系,另一方面探讨 BJT 配伍 YYH 的减毒作用。

斑马鱼毒性评价发现,淫羊藿苷各浓度(10~200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )及其配伍 BJT 给药期间(1~6 dpf)均未致斑马鱼脏器变形,也未致斑马鱼死亡,且不受淫羊藿苷动态转化为主要代谢物 BI 的影响,提示代谢转化及配伍 BJT 均不会影响淫羊藿苷的安全性。YYH(1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及以上浓度)、YTF(50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 及以上浓度)和 EC(50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度)致斑马鱼中毒(斑马鱼畸形或死亡),毒性 with 给药浓度和时间相关,配伍 BJT 后,毒性均减弱,主要表现为致鱼中毒浓度提高、鱼出现死亡时间延迟、死亡率降低等。

经斑马鱼作用后同步分析黄酮成分动态变化发现,YYH 和 YTF 中主要黄酮成分 EA、EB、EC 和淫

羊藿苷分别于斑马鱼 3 和 4 dpf 全部代谢转化为 SC 和 BI; EC 于 3~5 dpf 逐步转化为 SC,各组斑马鱼死亡率也相应随代谢物的增加而增加,提示代谢物是潜在致毒因素,其中 EA、EB 和淫羊藿苷的共同代谢物为 BI,安全性相对较好,推测 EC 的代谢物 SC 可能是致毒的关键成分。并用斑马鱼毒性评价验证了 SC 有毒而 BI 相对安全(另文发表)。

YYH、YTF、EC 及各自配伍 BJT 组经斑马鱼作用后,EC 和代谢物 SC 的相对含量动态变化呈明显负相关( $R^2 > 0.90$ ),提示 SC 主要来源于 EC。进一步对 SC 的动态变化与斑马鱼动态半数致死浓度  $LC_{50}$  进行相关分析,发现 SC 动态增加至稳定过程中,斑马鱼  $LC_{50}$  也相应动态线性降低( $R^2 > 0.97$ ),提示鱼毒性随着 SC 的增加而增加。BJT 配伍 YYH、YTF 和 EC 后,SC 产生时间延迟,对斑马鱼的毒性也相应减弱,提示 BJT 可能通过减慢 EC 代谢而减毒。

斑马鱼毒/代同步进程分析法突破了现有体内、外模型无法同步进行毒性与代谢动态分析的技术瓶颈,具有样品用量小、劳动强度小、高效率、高实验在体化、微板化等优点,为高效辨识中药毒性物质及发现配伍减毒作用提供思路与方法。

## References

- [1] National Center for ADR Monitoring. Be vigilant against liver injury caused by oral preparations of Xianlinggubao [EB/OL]. China Food and Drug Administration, 2016 [2016-12-08]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0078/167184.html>.
- [2] Wang JB, Xiao XH, Du XX, et al. Identification and early diagnosis for traditional Chinese medicine-induced liver injury based on translational toxicology [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 5-9.
- [3] Krupp E. Screening of developmental toxicity-validation and productivity of the zebrafish embryotoxicity assay (ZETA) and strategies to optimize de-risking developmental toxicity of drug candidates [J]. Toxicol Lett, 2016, 258: S39.
- [4] Sarvaiya VN, Sadariya KA, Rana MP, et al. Zebrafish as model organism for drug discovery and toxicity testing [J]. Veter Clin Sci, 2014, 2: 31-38.
- [5] Ying HJ, Yatinesh K, Farooq SM, et al. Zebrafish: a versatile animal model for fertility research [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 1-20.
- [6] Sun HY, Qin XL, Mei CY, et al. Metabolism study of the gallic acid and protocatechuic acid of effective fractions of *Polygonum capitatum* by model organism zebrafish [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2017, 33: 388-393.
- [7] Mei CY, Xiang WY, Hua Y, et al. Metabolism of three components of effective fractions of *Polygonum capitatum* in zebrafish [J]. Chin New Drugs J (中国新药杂志), 2016, 25: 2007-2013.
- [8] Zhao Q, Wang XJ, Ma J. Application of zebrafish in non-clinical drug toxicokinetics research [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2015, 29: 621-625.
- [9] Shen ZH, Yang LQ, Wu DS, et al. Method of chemical toxicity assessment based on zebrafish embryos [J]. Chin Tropical Med (中国热带医学), 2016, 16: 1159-1162.
- [10] Lantz-Mcpeak S, Guo X, Cuevas E, et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos [J]. J Appl Toxicol, 2015, 35: 261-272.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic 2015 (I) (中华人民共和国药典, 2015年版, 一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 327-328.
- [12] National Center for ADR Monitoring. Be vigilant against liver injury caused by oral preparations of Zhuangguoguanjie Pill [EB/OL]. China Food and Drug Administration, 2008 [2008-08-09]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0078/32614.html>.
- [13] Li DM, Yin XF, Liu JH, et al. Experimental study on long-term toxicity with total flavonoids of epimedium in mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2008, 14: 60-62.
- [14] Li DM, Yin XF, Cai DW. Experimental study on acute toxicity with total flavonoids of epimedium in mice [J]. China Pharm (中国药师), 2007, 10: 1011-1012.
- [15] Jiang YR, Zhang ZH, Sun E, et al. Preparation of baohuoside I by enzymolysis of Epimedium flavonoids with  $\beta$ -glucosidase [J]. Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志), 2013, 4: 260-263.
- [16] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic 2015 (I) (中华人民共和国药典, 2015年版, 一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 81-82.
- [17] Wang LJ, Sheng MY. The cytology, isozyme, HPLC fingerprint, and interspecific hybridization studies of genus epimedium (berberidaceae) [J]. ISRN Pharm, 2013, 2013: 271578.
- [18] Huang MN, Zhou YN, Liu Q, et al. HPLC in simultaneous determination of seven main flavonoids in *Epimedium* of different places of origin [J]. Acad J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2015, 36: 1352-1355.
- [19] Wei YJ, Li P, Fan HW, et al. Metabolite profiling of four major flavonoids of herba epimidi in zebrafish [J]. Molecules, 2012, 17: 420-432.
- [20] Mcrath P. Zafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity [M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011: 22, 44, 49.
- [21] Xu BJ, Zhang LJ, Li QC, et al. Model validation and evaluation of developmental toxicity do five drugs using zebrafish embryos [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2016, 1: 74-79.
- [22] Xu SJ, Zhu YL, Yu JQ, et al. Simultaneous determination of 4 prenylflavonoids of Chuankezhi injection in rat plasma by RRLC-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 637-641.
- [23] Feng QR, Yu JQ, Zhan JJ, et al. *In vivo* metabolism study of Chuankezhi injection in rat [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 449-455.