千里光碱在斑马鱼体内的代谢研究

张兆兰[1,2], 王鑫茹[1], 余 婷[1], 裴文菡[1], 任 灿[3], 郭晓伟[4], 王鹤辰[1,2], 丁丽丽[1,2], 熊爱珍[1,2*], 杨 莉[1,2*], 王峥涛[1,2]

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203; 2. 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室, 上海 201203; 3. 浙江大学药学院药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058; 4. 上海中医药大学附属曙光医院心血管内科, 上海 201203)

摘要: 吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 造成的肝损伤引起了世界范围的广泛关注, 建立PAs毒性的快速评价模型对于PAs暴露的风险评估具有重要意义。因此本文以千里光碱为代表性成分, 探讨其在斑马鱼成鱼体内的代谢特征, 为斑马鱼模型用于PAs毒性快速筛选评价提供核心代谢学支撑。本文首先经口灌胃给予斑马鱼成鱼千里光碱 (0.6 mmol·kg^{-1}), 于给药后0.25、0.5、1、2、6、12、24 h采集肝脏组织; 联合超高效液相色谱−多级质谱联用技术 (LC-MS^n) 鉴定代谢产物, 并采用超高效液相色谱−串联质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 测定千里光碱原型及代谢产物的经时变化, 并拟合药代动力学参数。结果在斑马鱼肝脏内鉴定出5种千里光碱代谢产物, 包括氮氧化物、羟化产物、千里光碱的*N*-葡萄糖醛酸结合物及千里光碱羟化产物的葡萄糖醛酸结合物; 原型及I相代谢物快速达峰并清除, II相代谢物中羟化产物的葡萄糖醛酸结合物达峰最晚, 后期成为斑马鱼肝脏内的主要存在形式。本研究首次系统阐明千里光碱在斑马鱼成鱼体内的代谢图谱与动力学规律, 证实斑马鱼具备与人相似的葡萄糖醛酸化解毒能力, 为斑马鱼作为PAs代谢与毒性研究模型提供关键实验依据, 也为含PAs中药制剂的风险评估提供科学数据。本实验获得浙江大学动物伦理委员会的批准 (批准号: ZJU20250602)。

关键词: 吡咯里西啶生物碱; 肝毒性; 斑马鱼; 代谢; 药代动力学; 风险评估

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)06-2250-07

Metabolism study of senecionine in zebrafish

ZHANG Zhao-lan[1,2], WANG Xin-ru[1], YU Ting[1], PEI Wen-han[1], REN Can[3], GUO Xiao-wei[4], WANG He-chen[1,2], DING Li-li[1,2], XIONG Ai-zhen[1,2*], YANG Li[1,2*], WANG Zheng-tao[1,2]

(*1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. State Key Laboratory of Discovery and Utilization of Functional Components in Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Institute of Pharmaceutical Informatics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 4. Department of Cardiovascular Medicine, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China*)

Abstract: Hepatic injury caused by pyrrolizidine alkaloids (PAs) has attracted widespread global attention. Establishing a rapid evaluation model for PA toxicity is of great significance for risk assessment of PA exposure. Therefore, this study used senecionine as a representative component to investigate its metabolic characteristics in adult zebrafish, providing core metabolic support for the use of the zebrafish model in rapid screening and

收稿日期: 2025-12-30; 修回日期: 2026-03-10.
基金项目: 上海市自然科学基金资助项目 (23ZR1463200); 上海市人才发展资金 (2020099).
*通讯作者 Tel: 86-21-51322506, Fax: 86-21-51322519, E-mail: aizhenxiong@shutcm.edu.cn; yl7@shutcm.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1592

evaluation of PA toxicity. Adult zebrafish were orally gavaged with senecionine (0.6 mmol·kg^{-1}). Liver tissues were collected at 0.25, 0.5, 1, 2, 6, 12 and 24 hours post-administration. Metabolites were identified using ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS^n). Concentration-time profiles of major metabolites were determined using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and pharmacokinetic parameters were fitted. Five metabolites of senecionine were identified in the zebrafish liver, including *N*-oxide, hydroxylation products, *N*-glucuronide conjugate of senecionine, and glucuronide conjugate of senecionine hydroxylation product. The parent compound and phase I metabolites reached their peaks and were cleared rapidly. Among the phase II metabolites, the glucuronide conjugate of the hydroxylation product showed the latest peak and became the predominant form in the zebrafish liver at later time points. This study for the first time systematically elucidated the metabolic profile and kinetic patterns of senecionine in adult zebrafish, confirming that zebrafish possess glucuronidation detoxification capabilities similar to humans. These findings provide a crucial experimental basis for using zebrafish as a model for PA metabolism and toxicity studies, and also offer scientific data for the risk assessment of traditional Chinese medicine preparations containing PAs. This experiment was approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Zhejiang University (Grant No: ZJU20250602).

Key words: pyrrolizidine alkaloid; hepatotoxicity; zebrafish; metabolism; pharmacokinetics; risk assessment

吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 是一类广泛存在于全球3%有花植物中的天然肝毒性成分[1], 是诱发临床肝窦阻塞综合征 (hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS) 的主要原因之一。PAs可通过传统草药、茶剂、谷物、功能性食品及动植物源性食品等多种途径进入人体, 全球已报道超过15 000例PA中毒病例, 涉及阿富汗、英、德等多个国家[2]。在我国, PAs存在于菊三七、千里光等50多种中草药中, 由菊三七造成的HSOS病例占我国已报道HSOS病例的50%～89%[3]。含PAs中草药的安全性问题已成为中药及天然产物安全性评价领域的重点关注问题。

进入人体后, 大部分PAs经人肝脏细胞色素P450酶3A4 (CYP3A4) 代谢活化生成具有强亲电活性的脱氢吡咯酯 (dehydropyrrolizidine alkaloids, DHPAs), DHPAs易与体内生物大分子结合形成加合物, 如与蛋白质结合形成吡咯−蛋白加合物 (pyrrole-protein adducts, PPAs) 进而诱导肝损伤等毒性反应[4,5]。近年来, 解毒代谢途径的研究为PAs毒性调控提供了新视角。课题组前期已通过体外实验发现葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 1A4可介导千里光碱等PAs发生*N*-葡萄糖醛酸化反应[6]; 且该代谢途径存在显著的种属差异−人类、兔、牛等哺乳动物肝脏微粒体对PAs的葡萄糖醛酸生成活性显著高于豚鼠、犬, 小鼠和大鼠则完全缺乏该代谢能力[7]。UGT1A4作为UGT1亚家族核心解毒酶, 广泛参与丙胺、阿米替林等叔胺类药物的*N*-葡萄糖醛酸结合代谢[8,9], 但其在大鼠、小鼠体内为不表达的假基因。因此, 本课题组构建了人源化UGT1A4小鼠模型并证实UGT1A4小鼠对千里光碱诱导的肝毒性明显耐受[10], 进一步证实葡萄糖醛酸化代谢是重要的PAs代谢解毒途径, 也提示传统啮齿类模型因缺乏UGT1A4介导的代谢解毒途径, 可能导致PAs毒性评价结果偏离临床实际。因此, 亟需建立更贴合人类代谢特征的PAs毒性快速评估模型。

斑马鱼作为脊椎动物模型, 在人类疾病建模、药物研发及毒理学评价领域已展现出独特优势[11,12]。其基因组与人相似度高达71.4%, 免疫系统及生理过程与哺乳动物高度保守[13]; 此外, 由于药物代谢过程的高度相似性和独特的三叶肝结构, 斑马鱼模型已广泛用于研究药物性肝损伤[14,15]。更重要的是, 斑马鱼体内同时表达PAs致毒关键酶CYP3A4及解毒关键酶UGT1A4[16,17], 为其用于PAs代谢与毒性评价提供了核心基础。

本研究以代表性PAs成分千里光碱为研究对象, 采用斑马鱼成鱼模型, 联合LC-MS^{n}定性与UPLC-MS/MS定量技术系统解析其体内代谢途径、产物特征及动力学规律, 为斑马鱼模型在PAs肝毒性快速评价中的适用性提供核心代谢学支撑, 也为含PAs中药制剂的毒性风险筛查、安全合理使用及质量控制提供关键科学数据。

材料与方法

仪器 代谢物的鉴定采用SHIMADZU Nexera高效液相色谱系统 (日本岛津公司) 连接ABSCIEX TripleTOF™ 5600质谱系统 (美国AB Sciex公司); 代谢物的定量分析采用Shimadzu CBM-30A高效液相色谱系统 (日本岛津公司) 连接ABSCIEX QTRAP6500质谱系统 (美国AB Sciex公司); Acquity UPLC HSS T3柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm, 美国Waters公司)。

材料与试剂 千里光碱标准品 (CAS No. 130-01-8,

批号PRF10071724, 纯度95%)、野百合碱标准品 (CAS No. 315-22-0, 批号PRF23021403, 纯度95%) 均购自成都普瑞法科技开发有限公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯) 购自美国Fisher Scientific公司; 甲酸 (色谱纯) 购自美国Acros公司; 超纯水由美国Millipore公司Milli-Q超纯水仪制备; 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐 (CAS No. 886-86-2, 批号P1494859, 纯度98%) 购自上海泰坦科技股份有限公司; 其余试剂均为分析纯。

动物实验 AB野生型斑马鱼雄鱼 (n = 49, 3～6个月, 体重0.2～0.4 g) 购自国家斑马鱼资源中心。饲养条件: 25尾/3.5 L水箱, 循环水处理系统 (水温28 ± 0.5 ℃, 盐度400～600 μS·cm^{-1}, pH 7.0～8.0), 每天黑暗/光照周期为10 h/14 h, 每日喂食丰年虾幼虫3次。所有动物研究操作均按照《实验动物福利伦理审查指南》进行, 并已获得浙江大学动物伦理委员会的批准 (ZJU20250602)。适应性饲养2周后, 实验前禁食18 h。将斑马鱼随机分为7组 (每组7尾), 经160 mg·L^{-1}间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐麻醉后, 采用24G软导管经口灌胃给予千里光碱 (0.6 mmol·kg^{-1})[18]。分别于给药后0.25、0.5、1、2、6、12、24 h, 采用过量麻醉法处死斑马鱼, 快速解剖分离肝脏组织, 置于−80 ℃冰箱冷冻保存备用。

样本制备 取冷冻肝脏组织约10 mg, 加入1颗小钢珠及100 μL预冷的生理盐水匀浆; 取匀浆液加入乙腈沉淀蛋白, 涡旋振荡后于4 ℃、15 000 ×g离心10 min; 取上清液经N_2吹干, 残渣用含50 nmol·L^{-1}野百合碱 (内标化合物) 的5%乙腈水溶液复溶, 上清液用于LC-MS分析。

代谢物鉴定 参照本课题组前期报道方法[10]处理样品并利用ABSCIEX TripleTOF™5600进行LC-MS^{n}分析。色谱条件: Acquity UPLC HSS T3柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为0.1%甲酸水溶液 (A)−乙腈 (B) 梯度洗脱, 程序: 0～0.5 min 2% B, 0.5～3 min 2%～20% B, 3～5 min 20% B, 5～5.5 min 20%～95% B, 5.5～7 min 95% B, 7～7.5 min 95%～2% B, 7.5～9 min 2% B平衡色谱柱; 流速0.4 mL·min^{-1}, 进样量5 μL。质谱条件: 采用信息依赖性采集 (IDA) 模式进行一级全扫和二级质谱裂解分析, 正离子扫描; 喷雾电压5 500 V, 离子源温度550 ℃, 气帘气35 psi, 去簇电压160 V, 碰撞能45～65 V。

定量分析 参照本课题组前期报道方法[10,19], 采用ABSCIEX QTRAP6500进行UPLC-MS/MS定量检测。色谱条件同前。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI) 正离子模式, 喷雾电压5 500 V, 离子源温度550 ℃, 气帘气35 psi, 去簇电压160 V, 碰撞能46 V; 采用多级反应检测 (MRM) 模式, 定量离子通道: 336 > 120 (千里光碱)、352 > 120 (氮氧化物/羟化产物)、512 > 336 (葡萄糖醛酸结合物)、528 > 352 (羟化产物葡萄糖醛酸结合物); 定性离子通道: 336 > 138 (千里光碱)、352 > 138 (氮氧化物/羟化产物)、512 > 120 (葡萄糖醛酸结合物)、528 > 120 (羟化产物葡萄糖醛酸结合物)。野百合碱为内标, 其检测通道为: 326 > 120 (定量离子通道)、326 > 138 (定性离子通道)。

统计学分析 实验数据采用均数±标准误 (mean ± SEM) 表示, GraphPad Prism 10.1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA) 软件用于统计分析, 组间比较用单因素方差或双因素方差分析, 若P < 0.05则表示差异有统计学意义。定性数据用AB SCIEX Peakview软件处理分析。药代动力学参数通过WinNonlin 8.1 (Pharsight Corporation, USA) 软件非房室模型拟合计算。

结果

1 斑马鱼给药千里光碱后肝脏内的代谢产物鉴定

通过比较斑马鱼肝脏空白样本和给药样本的谱图, 寻找代谢产物母离子, 根据精确分子量推断其分子式, 并对其进行多级质谱裂解, 通过与对照品及文献[20]报道比对推定其结构, 共检测到5个代谢产物, 结果见表1。

各代谢物具体解析过程如下:

M0: 所有给药样品中均检出该化合物, 保留时间

Table 1 Identification of metabolites of senecionine in zebrafish liver. The fragment in underlined text type is the characteristic ions for the compound. Compound labeled with star means that the compound is identified with chemical reference standard

Compound	t_R /min	m/z (ESI^+)	Formula	Mass error/ppm	Major fragment ions	Identification
M0	5.2	336.178 0	$C_{18}H_{25}NO_5$	1.4	308.183 9, 220.129 9, 156.088 0, 138.089 2, 120.078 8	Senecionine*
M1	5.4	352.174 9	$C_{18}H_{25}NO_6$	5.2	324.181 7, 220.132 2, 138.092 1, 136.078 6, 120.080 3, 118.064 7	Senecionine N-oxide*
M2	4.0	352.178 1	$C_{18}H_{25}NO_6$	2.0	324.181 7, 242.137 4, 156.101 3, 138.090 9, 120.080 0,	Hydroxylated senecionine
M3	3.7	352.174 7	$C_{18}H_{25}NO_6$	−0.2	324.182 6, 242.047 9, 156.103 5, 138.091 4, 120.079 6	Hydroxylated senecionine
M4	5.0	512.220 1	$C_{24}H_{33}NO_{11}$	−0.1	336.180 0, 308.185 8, 138.085 5, 120.079 2	Senecionine glucuronide
M5	3.3	528.190 4	$C_{24}H_{33}NO_{12}$	5.7	352.177 4, 324.192 1, 138.090 6, 120.081 6, 242.147 8	Hydroxylated senecionine glucuronide

(t_R) 为 5.2 min, *m/z* 为 336.178 0 ([M+H]$^+$) (图 1A), 通过精确分子量计算其元素组成为 $C_{18}H_{25}NO_5$ (mass error: 1.4 ppm); 二级碎片中出现特征离子 *m/z* 138 和 *m/z* 120 (图 1B), 推测其为 RET 型 PA; 经与千里光碱对照品比对, 推定其为千里光碱原型药物。

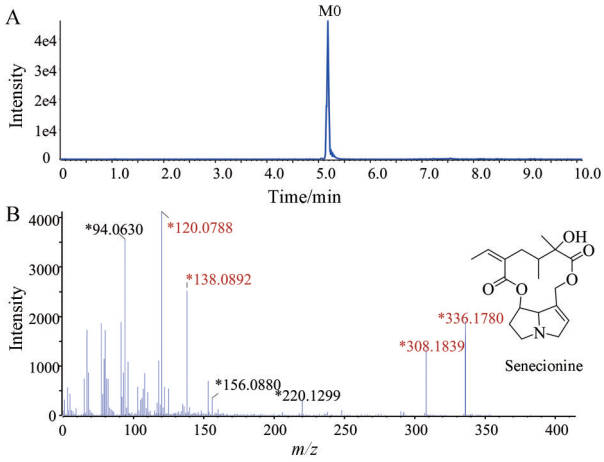


Figure 1 UPLC-MS/MS analysis of senecionine (M0) in positive ion mode. A: Extracted ion chromatogram (EIC) of senecionine (*m/z* 336.2); B: Fragmentation mass spectrum of senecionine

代谢物 M1～M3: t_R 分别为 5.4、4.0、3.7 min, 一级质谱 *m/z* 约为 352.2 (图 2A), 较原型药物增加 16 Da, 通过精确分子量计算其元素组成均为 $C_{18}H_{25}NO_6$ (mass error 分别为: 5.2、2.0、−0.2 ppm), 提示其为千里光碱氮氧化物或羟化产物。代谢产物 M1 二级质谱产生 *m/z* 118、120、136、138 特征簇峰 (图 2B), 提示其为千里光碱氮氧化物; 经与千里光碱氮氧化物对照品比对, 推定其为千里光碱氮氧化物。M2、M3 二级质谱仅产生了特征碎片 *m/z* 138, 120 (图 2C、D), 推定为千里光碱羟化产物。

代谢物 M4: t_R 为 5.03 min, 一级质谱 *m/z* 512.221 0 (图 3A), 较原型药物增加 176 Da, 通过精确分子量计算其元素组成为 $C_{24}H_{33}NO_{11}$ (mass error 为: −0.1 ppm)。二级质谱碎片产生 *m/z* 336 (中性丢失 176 Da), 且产生了特征碎片 *m/z* 138、120 (图 3B), 与课题组前期研究比较, 推测其为千里光碱葡萄糖醛酸结合物。

代谢物 M5: t_R 为 3.3 min, 一级质谱 *m/z* 528.190 4 (图 4A), 较千里光碱氮氧化物/羟化产物增加 176 Da, 通过精确分子量计算其元素组成为 $C_{24}H_{33}NO_{12}$ (mass error 为: 5.7 ppm)。二级质谱碎片产生 *m/z* 352 (中性丢失 176 Da), 且产生了特征碎片 *m/z* 138、120、324、242 (图 4B), 故推测其为千里光碱羟化产物葡萄糖醛酸结合物。

2 千里光碱在斑马鱼体内的主要代谢途径

根据代谢产物鉴定结果, 千里光碱在斑马鱼体内代谢涉及 I 相和 II 相代谢, 具体途径如下: ① 原型药物 (M0) 经 I 相代谢生成氮氧化物 (M1) 和羟化产物 (M2、M3); ② 原型药物直接经 II 相代谢生成 *N*-葡萄糖醛酸结合物 (M4); ③ 羟化产物 (M2 或 M3) 进一步经 II 相代谢生成葡萄糖醛酸结合物 (M5)。千里光碱在斑马鱼体内的主要代谢途径总结于图 5。

3 千里光碱在斑马鱼肝脏的药代动力学特征

测定给药后不同时间点斑马鱼肝脏中千里光碱原型及 5 种主要代谢产物的浓度, 绘制浓度−时间曲线 (图 6), 基于非房室模型计算药代动力学参数 (表 2)。结果显示, 灌胃给予千里光碱 (0.6 mmol·kg^{-1}) 后, 原型药物快速被吸收, 肝脏中浓度迅速升高, 达峰后逐渐消

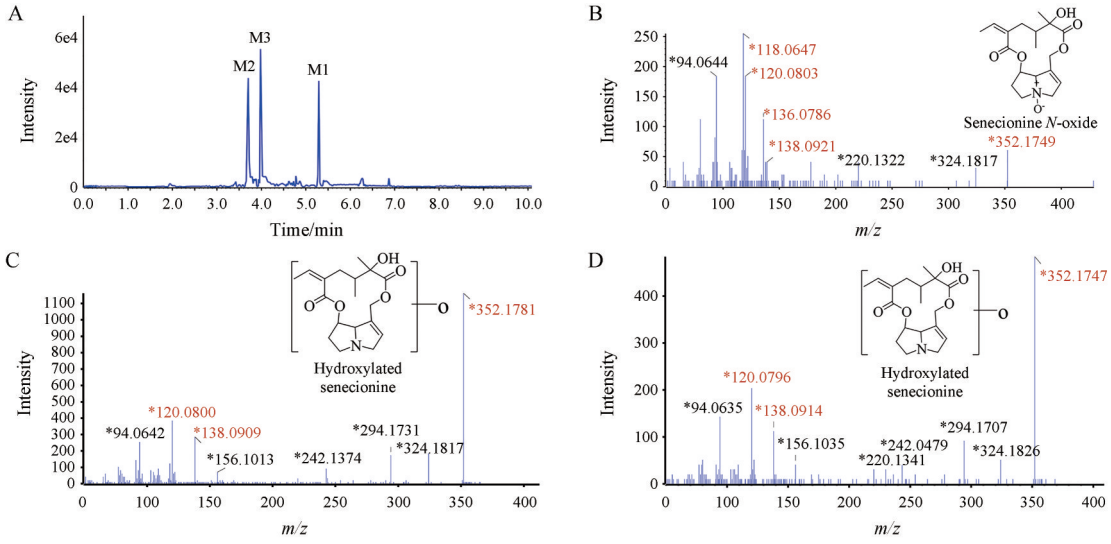


Figure 2 UPLC-MS/MS analysis of M1−M3 in positive ion mode. A: EIC of M1−M3 (*m/z* 352.2); B: Fragmentation mass spectrum of M1; C: Fragmentation mass spectrum of M2; D: Fragmentation mass spectrum of M3

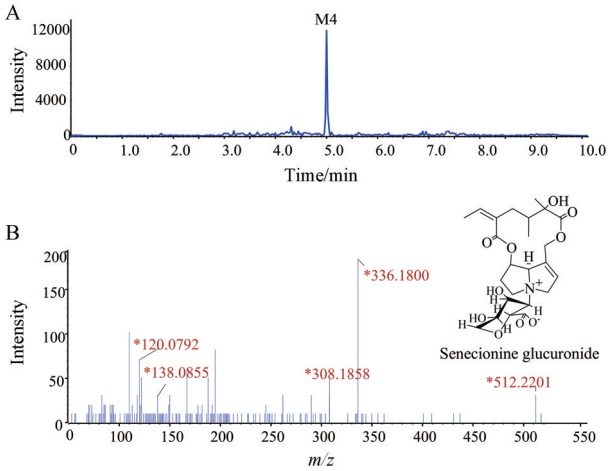


Figure 3 UPLC-MS/MS analysis of M4 in positive ion mode. A: EIC of M4 (*m/z* 512.2); B: Fragmentation mass spectrum of M4

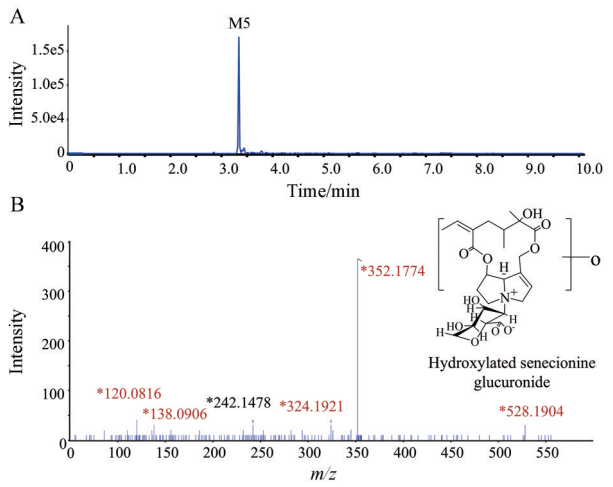


Figure 4 UPLC-MS/MS analysis of M5 in positive ion mode. A: EIC of M5 (*m/z* 528.2); B: Fragmentation mass spectrum of M5

除, 消除相呈平缓下降趋势; I相代谢产物浓度随原型药物吸收快速升高, 浓度−时间曲线趋势与原型药物基本一致, 均呈“先升后降”特征。II相代谢产物浓度变化滞后于原型及I相代谢产物: 随原型药物消除及I相代谢产物累积, II相代谢产物浓度逐渐升高达峰后缓慢下降, 其达峰时间显著晚于原型及I相代谢产物; 其中千里光碱羟化产物的葡萄糖醛酸结合物 (M5) 后期成为肝脏中主要存在形式, 12 和 24 h时其含量占原型及代谢物总量的55.9%、26.2%。

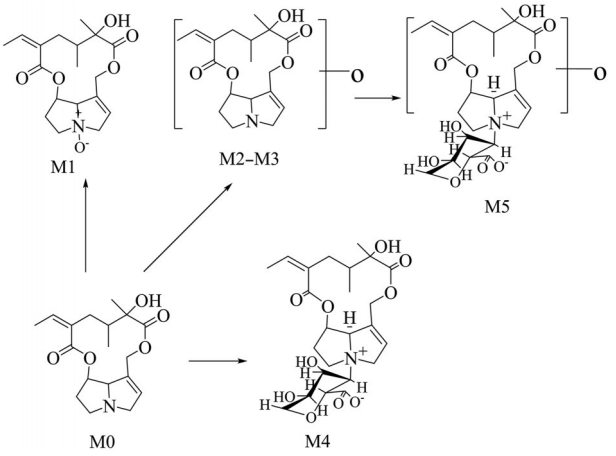


Figure 5 *In vivo* metabolic profile of senecionine in zebrafish

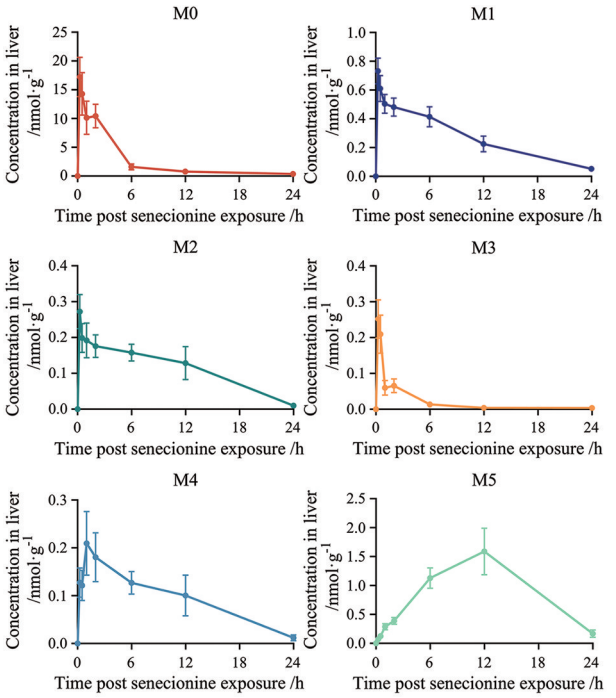


Figure 6 Concentration-time profiles of senecionine and its major metabolites in zebrafish liver

讨论

斑马鱼模型已被广泛应用于药物毒性与安全性评价研究, 也有少数研究借助该模型开展PAs的毒性筛查与安全性评价工作[21-23], 但目前尚未见关于PAs在斑马鱼体内代谢特征的相关研究报道。本研究首次利用

Table 2 Pharmacokinetic parameters of senecionine and its metabolites in zebrafish (n = 7, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	M0	M1	M2	M3	M4	M5
t_{max}/h	0.38 ± 0.25	0.35 ± 0.23	0.45 ± 0.31	0.42 ± 0.28	1.62 ± 1.18	7.85 ± 4.62
C_{max}/nmol·g^{-1}	17.22 ± 3.41	0.38 ± 0.34	0.62 ± 0.18	0.28 ± 0.06	0.18 ± 0.09	1.48 ± 1.14
$t_{1/2}$/h	5.42 ± 0.85	4.56 ± 0.71	7.29 ± 1.03	6.73 ± 0.92	8.89 ± 1.25	8.45 ± 1.18
AUC_{0-t}/nmol·g^{-1}·h	59.36 ± 7.84	2.56 ± 0.38	7.84 ± 1.08	3.62 ± 0.49	3.45 ± 0.48	25.63 ± 3.45
MRT /h	7.85 ± 1.02	6.28 ± 0.89	10.32 ± 1.36	9.47 ± 1.21	12.56 ± 1.58	14.23 ± 1.87

斑马鱼模型进行了PAs代谢研究, 鉴定出5种千里光碱代谢产物, 涵盖I相代谢的氮氧化、羟化产物及II相代谢的葡萄糖醛酸结合产物 (包括千里光碱原型的葡萄糖醛酸结合物及其羟化产物的葡萄糖醛酸结合物)。该结果与前期人肝微粒体体外代谢[6]及人源化UGT1A4小鼠体内代谢[10]的研究结论高度吻合, 证实斑马鱼具备与人类相似的PAs核心解毒代谢特征。传统啮齿类模型 (大鼠、小鼠) 因肝脏缺乏UGT1A4介导的葡萄糖醛酸化代谢能力[9], 难以真实模拟人类PAs的解毒过程, 其毒性评价结果易出现物种偏倚, 使用传统的啮齿类模型可能高估了PAs的固有毒性。而本研究证实斑马鱼存在该关键解毒途径, 这从代谢层面为利用斑马鱼进行PAs毒性评价提供了关键证据。

药代动力学数据显示, 千里光碱原型及I相代谢物在斑马鱼肝脏中快速达峰并消除, 这一结果与PAs的肝脏代谢活化致毒机制高度契合[24], 提示斑马鱼可有效模拟PAs的致毒代谢启动过程。与此同时, II相葡萄糖醛酸化解毒反应快速启动, 其中原型药物葡萄糖醛酸化产物 (M4) 达峰时间 (1.62 ± 1.18 h) 相对较早, 提示该途径可与毒性活化途径形成直接竞争, 通过加速原型药物的代谢清除减少毒性中间体的生成与蓄积, 这一发现与本课题组前期在人源化UGT1A4小鼠中的研究结论一致[10], 进一步佐证了斑马鱼代谢与人的同源性。值得关注的是, 千里光碱羟化物葡萄糖醛酸结合物 (M5) 达峰时间 (7.85 ± 4.62 h) 最晚, 且后期成为肝脏中主要存在形式, 其药代动力学参数显示AUC达25.63 ± 3.45 nmol·g^{-1}·h, 显著高于其他代谢产物, 提示该结合物可能参与肝肠循环或排泄速率较慢[25]。其具体毒理学效应值得后续深入探究, 为完善PAs毒性评价体系提供了新的研究方向。

本研究将斑马鱼模型在PAs毒性研究中的应用, 从表型毒效观察层面推进至药物代谢研究维度, 证实斑马鱼不仅在组织病理层面适用于药物性肝损伤研究, 其药物代谢酶系统 (如CYP3A4、UGT1A4) 与人类亦存在高度的功能同源性[16,17]。值得注意的是, 斑马鱼存在特有的细胞色素P450酶, 其整体代谢酶谱与人类并非完全一致。针对含PAs的中药及其中药复方制剂, 该模型可同时整合代谢过程解析与毒性效应研究, 构建高效的“代谢–毒性”联动评价体系, 有望成为衔接体外高通量筛选与哺乳动物长期毒性试验的关键桥梁, 提升中药安全性评价的效率、精准度及临床预测价值, 对推动含PAs中药的安全研发与临床合理应用具有重要的实践意义。

综上所述, 本研究系统阐明了千里光碱在斑马鱼成鱼体内的代谢图谱、核心路径及药代动力学特征, 成功鉴定出5种主要代谢产物, 证实斑马鱼具备与人类相似的PAs关键解毒代谢能力, 从代谢同源性层面为斑马鱼作为PAs毒性评价的适宜模型提供了关键实验依据, 同时为含PAs中药制剂的毒性风险评估、安全研发及合理用药提供了重要科学数据支撑。

作者贡献: 张兆兰、熊爱珍负责实验设计、实验操作、数据整理及文章撰写; 王鑫茹、余婷、裴文菡协助完成动物实验; 任灿、郭晓伟、王鹤辰、丁丽丽提供技术指导; 杨莉、王峥涛提供学术指导; 熊爱珍、杨莉提供基金支持。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

[1] Lu YS, Qiu J, Mu XY, et al. Levels, toxic effects, and risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in foods: A review [J]. Foods, 2024, 13: 536.

[2] Ma J, Ruan J, Chen X, et al. Pyrrole-hemoglobin adducts, a more feasible potential biomarker of pyrrolizidine alkaloid exposure [J]. Chem Res Toxicol, 2019, 32: 1027-1039.

[3] Zhu L, Zhang CY, Li DP, et al. Tu-San-Qi (*Gynura japonica*): The culprit behind pyrrolizidine alkaloid-induced liver injury in China [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42: 1212-1222.

[4] Abdelfatah S, Naß J, Knorz C, et al. Pyrrolizidine alkaloids cause cell cycle and DNA damage repair defects as analyzed by transcriptomics in cytochrome P450 3A4-overexpressing HepG2 clone 9 cells [J]. Cell Biol Toxicol, 2022, 38: 325-345.

[5] He Y, Lian W, Ding L, et al. Lung injury induced by pyrrolizidine alkaloids depends on metabolism by hepatic cytochrome P450s and blood transport of reactive metabolites [J]. Arch Toxicol, 2021, 95: 103-116.

[6] He YQ, Liu Y, Zhang BF, et al. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isozyme involved in senecionine glucuronidation in human liver microsomes [J]. Drug Metab Dispos, 2010, 38: 626-634.

[7] He YQ, Yang L, Liu HX, et al. Glucuronidation, a new metabolic pathway for pyrrolizidine alkaloids [J]. Chem Res Toxicol, 2010, 23: 591-599.

[8] Green MD, Tephly TR. Glucuronidation of amines and hydroxylated xenobiotics and endobiotics catalyzed by expressed human UGT1.4 protein [J]. Drug Metab Dispos, 1996, 24: 356-363.

[9] Kaku T, Ogura K, Nishiyama T, et al. Quaternary ammonium-linked glucuronidation of tamoxifen by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4 [J]. Biochem Pharmacol, 2004, 67: 2093-2102.

[10] Chen Y, Wang WQ, Jia XL, et al. Firm evidence for the detoxification of senecionine-induced hepatotoxicity *via N*-glucuronidation in UGT1A4-humanized transgenic mice [J]. Food Chem Toxicol, 2022, 165: 113185.

[11] Qiu YZ, Wang CS, Xu FH, et al. Anti-osteoporosis mechanism

of *Panax quiquefolium* L. based on zebrafish model and metabonomics [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 1894-1903.

[12] Huang LJ, Zhao CY, Feng XH, et al. Exploration of nonclinical pharmacodynamics evaluation system of Alzheimer's disease [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2020, 55: 789-805.

[13] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496: 498-503.

[14] Shimizu N, Shiraishi H, Hanada T. Zebrafish as a useful model system for human liver disease [J]. Cells, 2023, 12: 2246.

[15] Chen Y, Song W, Ge W, et al. Metabolic competency of larval zebrafish in drug-induced liver injury: A case study of acetaminophen poisoning [J]. Toxicol Sci, 2022, 189: 175-185.

[16] Robinson BL, Dumas M, Ali SF, et al. Cyclosporine exacerbates ketamine toxicity in zebrafish: Mechanistic studies on drug-drug interaction [J]. J Appl Toxicol, 2017, 37: 1438-1447.

[17] Goldstone JV, McArthur AG, Kubota A, et al. Identification and developmental expression of the full complement of cytochrome P450 genes in zebrafish [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 643.

[18] Dang M, Henderson RE, Garraway LA, et al. Long-term drug administration in the adult zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies [J]. Dis Model Mech, 2016, 9: 811-820.

[19] Chen Y, Tang Y, Liu P, et al. Species difference in toxicokinetics and safety assessment of senecionine *N*-oxide in a UDP-glucuronosyltransferase 1A4 humanized mouse model [J]. Chem Biol Interact, 2023, 380: 110505.

[20] Xiong AZ, Yang L, Zhang F, et al. Identification of metabolites of senecionine, a hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid, by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2012, 47: 54-60.

[21] Pan Y, Ma J, Zhao H, et al. Hepatotoxicity screening and ranking of structurally different pyrrolizidine alkaloids in zebrafish [J]. Food Chem Toxicol, 2023, 178: 113903.

[22] Lin T, Chen S, Ren Y, et al. Developmental exposure to echimidine induces locomotor hyperactivity in zebrafish larvae *via* inhibiting acetylcholinesterase activity [J]. J Environ Sci (China), 2025, 156: 882-893.

[23] Lin T, Zhou L, Chen Z, et al. Exposure to echimidine impairs the heart development and function of zebrafish larvae [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 266: 115574.

[24] Geburek I, Rutz L, Gao L, et al. Metabolic pattern of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in liver cells [J]. Chem Res Toxicol, 2021, 34: 1101-1113.

[25] He Y, Ma J, Fan X, et al. The key role of gut-liver axis in pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity and enterotoxicity [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11: 3820-3835.