DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.01.044

不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼模型的急性毒性及肝肾损伤

袁士雅,叶晨英,陈亿婷,何婷,王敏,农桂龙,周改莲
(广西中医药大学,广西 南宁 530200)

摘要:目的 用斑马鱼模型对生栀子及 6 种不同炮制程度栀子水提物进行急性毒性及肝肾毒性研究,探索炮制程度对栀子毒性的影响。方法 以受精后 3 d(3 dpf)发育正常的 AB 系斑马鱼为对象进行急性毒性研究,对生品(sp)及 6 种不同炮制程度栀子水提物(pz1、pz2、pz3、pz4、pz5、pz6)分别设置 6 个不同剂量浓度,统计斑马鱼 72 h 死亡率。用 GraphPad Prism 9.0 软件制作量-毒曲线,计算半数致死浓度(LC_{50})和 10% 致死浓度(LC_{10})。以受精后 4 d(4 dpf)发育正常的 gz15Tg/+(AB)肝脏荧光蛋白转基因斑马鱼为对象进行肝损伤研究。分别设置低(LC_0)、中(LC_{10})、高(LC_{20})3 个剂量浓度组,设对乙酰氨基酚组,以胚胎水为空白组。给药 72 h 后观察斑马鱼肝脏形态和荧光面积变化,检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)活性。结果 急性毒性实验结果显示,生品及 6 种不同炮制程度栀子水提物 LC_{50} 分别为 0.042、0.049、0.053、0.064、0.050、0.058、0.058 g·L^{-1};LC_{10} 分别为 0.024、0.025、0.033、0.038、0.036、0.036、0.039 g·L^{-1}。肝肾损伤实验结果表明,与空白组比较,对乙酰氨基酚组的斑马鱼肝脏形态变形和荧光面积减小($P<0.01$),ALT 和 AST 活性升高($P<0.01$),表明对乙酰氨基酚对斑马鱼有肝毒性。sp 低、中、高剂量组斑马鱼肝脏形态变化和荧光面积减少($P<0.01$),ALT 和 AST 活性升高($P<0.01$,$P<0.05$),BUN 和 Cr 活性升高($P<0.05$),表明生品对斑马鱼有肝肾毒性。pz1、pz2、pz3 中、高剂量浓度组斑马鱼肝脏形态变化和荧光面积减少($P<0.01$),pz1 的 ALT 和 AST 活性升高($P<0.01$),BUN 和 Cr 活性升高($P<0.01$,$P<0.05$),pz2、pz3 的 ALT 低、中、高剂量组活性升高($P<0.05$,$P<0.01$),AST 中、高剂量组活性升高($P<0.05$,$P<0.01$)。pz4、pz5、pz6 低、中剂量组斑马鱼肝脏形态变化和荧光面积无明显变化,高剂量组有变化($P<0.05$)。表明 pz4、pz5、pz6 低、中剂量组对斑马鱼肝脏无明显影响,高剂量组有肝损伤。pz4 中、高剂量组 ALT、AST 升高($P<0.05$,$P<0.01$);pz5、pz6 的 ALT 活性降低无显著影响,AST 高剂量组有肝损伤($P<0.01$,$P<0.05$)。pz3、pz5 高剂量组 BUN 和 Cr 活性升高($P<0.01$,$P<0.05$),pz4 高剂量组 BUN 和 Cr 活性升高($P<0.01$)。表明 sp 及 pz1~pz5 不同炮制程度不同剂量浓度对斑马鱼肝脏及肾脏均有不同程度的损伤。pz6 的 3 个剂量浓度组斑马鱼 ALT、BUN、Cr 及 AST 低、中剂量组均无肝肾损伤。结论 栀子肝肾损伤与炮制程度和给药剂量有关。生品与不同炮制程度栀子均不同程度地表现出一定的肝肾损伤,规范炮制条件可能是实现栀子用药安全的重要措施。

关键词:栀子;炮制;斑马鱼;急性毒性;肝肾损伤
中图分类号:R283 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)01-0247-07

Acute Toxicity and Hepatorenal Toxicity of Aqueous Extracts of Zhizi(Gardeniae Fructus) from Different Degrees of Processing in Zebrafish Model

YUAN Shiya, YE Chenying, CHEN Yiting, HE Ting, WANG Min, NONG Guilong, ZHOU Gailian
(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China)

Abstract: *Objective* To study the acute toxicity and liver and kidney toxicity of raw Zhizi(Gardeniae Fructus) and six water extracts with different processing degrees using zebrafish model and explore the effect of processing degree on Zhizi(Gardeniae Fructus) toxicity. *Methods* Acute toxicity studies were carried out on AB series zebrafish with normal development 3 days(3 dpf) after fertilization, and 6 different dose concentrations were set for raw products(sp) and six water extracts with different degrees of preparation(pz1, pz2, pz3, pz4, pz5, pz6). The mortality rate of zebrafish at 72 h was statistically calculated. Quantitation-toxic-

基金项目:国家中医药管理局中药炮制技术传承基地(广西)项目(2022);广西中药药效研究重点实验室运行补助项目(20-065-38);广西中药药效研究重点实验室系统性研究开放课题项目(19-245-1-A5);广西中医药大学自然科学研究杰出青年基金项目(2021JQ001);广西中医药大学岐黄工程高层次人才团队培育项目(202404);广西中医药大学研究生创新课题项目(YCSZ2022007);广西中医药大学大学生创新课题项目(S202210600046)

作者简介:袁士雅(1998-),女,四川成都人,硕士,研究方向:中药饮片质量标准与炮制机理。
通讯作者:周改莲(1981-),女,河南商水人,教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药饮片质量标准与炮制机理。E-mail:zhgllhw@126.com。

ity curves were created using GraphPad Prism 9.0 software to calculate half lethal concentration(LC_{50}) and 10% lethal concentration(LC_{10}). Liver and kidney injury studies were conducted on gz15Tg/+(AB) liver fluorescent protein transgenic zebrafish with normal development 4 days(4 dpf) after fertilization. Three dose concentration groups were set up as low(LC_0), medium (LC_{10}) and high(LC_{20}) groups, and the acetaminophen group was set up, with embryonic water as the blank group. After 72 h of administration, zebrafish liver morphology and fluorescence area changes were observed, and the activities of alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase(AST), creatinine(Cr) and urea nitrogen(BUN) were detected. *Results* The results of acute toxicity experiments showed that the values of LC_{50} of the raw product and six water extracts with different processing degrees were 0.042, 0.049, 0.053, 0.064, 0.050, 0.058 $g \cdot L^{-1}$ respectively. The values of LC_{10} were 0.024, 0.025, 0.033, 0.038, 0.036, 0.036, 0.039 $g \cdot L^{-1}$ respectively. The results of liver and kidney injury showed that compared with those in the blank group, the liver morphological deformation and fluorescence area of zebrafish in the acetaminophen group decreased($P < 0.01$) and the activities of ALT and AST increased($P < 0.01$), indicating that acetaminophen was hepatotoxic to zebrafish. The liver morphological changes and fluorescence area of zebrafish in the low, medium and high groups of sp decreased($P < 0.01$), the activities of ALT and AST increased($P < 0.01$, $P < 0.05$) and the activities of BUN and Cr rised($P < 0.05$), indicating the raw product had hepatic and renal toxicity to zebrafish. Liver morphology and fluorescence area of zebrafish decreased in the medium and high dose groups of pz1, pz2 and pz3($P < 0.01$), the activities of ALT and AST in pz1 group increased($P < 0.01$), the activities of BUN and Cr elevated($P < 0.01$, $P < 0.05$), the activity of ALT in the low, medium and high dose groups of pz2 and pz3 rised($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the activities of AST in the medium and high dose groups increased($P < 0.05$, $P < 0.01$). There were no significant changes of liver morphology or fluorescence area in the low and medium dose groups of pz4, pz5 and pz6, and there were changes in the high dose group($P < 0.05$). The results showed that the low and medium dose groups of pz4, pz5 and pz6 had no significant effect on the liver of zebrafish, and there was liver damage in the high dose group. ALT and AST were elevated in the medium and high dose groups of pz4($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no significant effect on the decrease in the activity of ALT of pz5 and pz6 and there was liver injury in the AST high dose group($P < 0.01$, $P < 0.05$). The activities of BUN and Cr were increased in the high dose groups of pz3 and pz5 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the activities were elevated in the high dose group of pz4($P < 0.01$). The results showed that sp and pz1 ~ pz5 had different degrees of damage to the liver and kidney of zebrafish with different degrees of preparation and different doses. There was no liver or kidney injury neither in the three dose concentration groups of pz6 nor in the ALT, BUN, Cr and AST low and medium dose groups of zebrafish. *Conclusion* The liver and kidney injury of Zhizi(Gardeniae Fructus) is related to the degree of processing and dosage. But raw and different processing degrees products showed certain liver and kidney damage to varying degrees. Standardizing the processing conditions may be an important measure to realize the medication safety of gardenia.

Keywords: Zhizi(Gardeniae Fructus); processing; zebrafish; acute toxicity; liver and kidney injury

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。原名卮子,始载于《神农本草经》,列为木部中品。主产于江西、湖北、福建[1]、河南[2]等地。其味苦,性寒。归心、肺、三焦经,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒,外用消肿止痛的功效[3]。明末《医宗必读》指出:“栀子大苦大寒,能损胃伐气,虚者忌之”[4],近 30 年来一直有文献报道栀子及其主要活性成分具有一定的肝肾毒性,更有学者建议将其从《既是食品又是药品的物品名单》中移除[5],使得栀子的应用受到了限制。2020 年版《中华人民共和国药典》一部收录的 109 种含栀子中成药中有 26 种存在不良反应,其中栀子入药形式以生品为主,约占 70.64%[6],如清肺抑火片、龙胆泻肝丸、安宫牛黄丸、清开灵系列制剂等。栀子化学成分及其代谢产物中被认为具有肝肾毒性的物质主要包括栀子苷、京尼平、栀子蓝等。杨洪军等[7]研究发现,大剂量应用栀子水提物和醇提物具有明显的肝毒性,并证实京尼平苷是导致肝毒性的主要物质基础。而京尼平苷主要分布于大鼠肾中,京尼平于肝中。随着剂量增大,二者集中分布于肾或肝的特点更加明显。且推测京尼平大量分布于肝脏可能是大剂量下京尼平苷所致肝毒性的重要原因[8]。而急性肝毒性研究表明,京尼平苷剂量为 574 $mg \cdot kg^{-1}$或更高时,肝损伤与剂量之间存在依赖关系[9]。同时,不同的给药方式对毒性也有一定的影响。通过比较栀子苷给药方式,认为口服给药毒性最大,推测因口服生物利用度极低,与肝首过效应和肝胆循环有关。另外京尼平苷在肠道内代谢产生京尼平与其他物质结合,可能是导致肝脏颜色深黑及肝毒性大的原因[10]。从代谢组学角度分析,给药栀子溶液后从大鼠肾组织中鉴定出 4 个差异代谢物,上调甜菜碱、烟酰胺,下调氨基戊酸、天冬氨酸盐。认为栀子具有一定的肾脏毒性,会干扰代谢产物的表达。观察京尼平苷的肾脏病理学特征后发现,大鼠连续 3 d 给予高剂量京尼平苷,显微镜下可见肾曲管肿胀变性,管腔内蛋白管型沉积,间质炎症细胞浸润,表明栀子可导致肾脏的病变,具有肾毒性[11]。京尼平也可通过斑马鱼的氧化应激和细胞凋亡诱导发育毒性,还发现京尼平对斑马鱼幼鱼具有心脏毒性、肝毒性和肾毒性[12]。

炮制作为中医用药的两大特色之一,可以调整药性,降低不良反应,引导药力直达病所,达到安全有效的治疗效果,是中医药保证临床用药安全的重要方法[13]。实验项目基于前期对

桂栀助眠颗粒中成药小鼠 14 d 急性毒性研究、大鼠 12 周长期毒性研究、一般药理研究等，发现部分小鼠的肝脏存在少量肝细胞点状或小灶状坏死伴少量淋巴细胞浸润，肝窦扩张等。局部肾小管轻微扩张，间质内血管充血等变化。认为以栀子生品入药所得的中成药具有一定的肝肾毒性。因此，进行炮制减毒研究具有一定的实验基础及现实意义。

1 材料

1.1 动物

AB 系野生型斑马鱼，gz15Tg/ +（AB）斑马鱼均由广西中医药大学斑马鱼联合实验室提供，用专业斑马鱼养殖系统正规饲养。水 pH 6.50 ~ 7.50，水温 28.5 ℃，溶氧量 ≥ 6.00 mg · L^{-1}，每天喂食 3 次（丰年虾 2 次，辅助饲料 1 次），光照周期为昼夜（14 h/10 h）交替循环驯化，采用的动物实验符合广西中医药大学实验动物伦理委员会的相关规定。

1.2 药材与试剂

栀子采购于江西，经广西中医药大学周改莲副教授鉴定，其药材基原为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实；总蛋白量试剂盒（BCA），丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、肌酐（Cr）、尿素氮（BUN）试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号分别为 20230512，20230413，20230511，20230512，20230512）；羧甲基纤维素钠（上海麦克林生化科技有限公司，CN/C421307）；鱼安定（常州卓医药化工材料有限公司，212 - 956 - 8）。

1.3 仪器

斑马鱼养殖系统（上海海圣生物实验设备有限公司，Z - A - D5），电子分析天平（梅特勒 - 托利公司，EP64C），体视显微镜（日本 OLYMPUS 株式会社，SZX2 - ILLT），荧光立体显微镜（德国徕卡仪器有限公司，M165FC），光照培养箱（上海博讯实业有限公司医疗设备厂，BXG - 250），全波长功能酶标仪（Thermo Fisher Scientific，Multiskan Sky），冷冻干燥机（CHRIST，ALPHA1 - 4 LDplus）。

2 方法

2.1 栀子水提物的提取与制备

6 种不同炮制程度的栀子按 2020 年版《中华人民共和国药典》方法于实验室自制，炮制时长为 10、13、16、19、22、25 min。取药材各 50 g，加 8 倍量水浸泡 30 min，第 1 次煎煮保持微沸状态 60 min，趁热过滤。药渣加 4 倍量水继续提取 30 min，趁热过滤，合并两次滤液，浓缩成为浸膏，冷冻干燥，分别得到生品及 6 种不同炮制程度栀子水提物冻干粉末 14.45、14.82、14.85、14.34、13.37、13.91、13.47 g。

分别准确称取生品（sp）及 6 种不同炮制程度栀子水提物（pz1、pz2、pz3、pz4、pz5、pz6）冻干粉末 0.29、0.30、0.30、0.29、0.27、0.28、0.27 g（相当于生药材 1.00 g），加入胚胎水，超声溶解，转移至 100 mL 量瓶中，定容，得生药质量浓度为 10 g · L^{-1} 水提物母液，冻存备用。精密称取对乙酰氨基酚 2.5 mg，加入胚胎水，超声溶解，转移至 10 mL 量瓶，定容，得到对乙酰氨基酚质量浓度为 0.25 g · L^{-1}，作为对乙酰氨基酚组。

2.2 不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼半数致死浓度（LC_{50}）与 10% 致死浓度（LC_{10}）的测定

2.2.1 斑马鱼毒性预实验 显微镜下选取受精后 3 dpf 发育正常的 AB 系斑马鱼，并随机转移到含有不同浓度的栀子水提物胚胎水的 12 孔板中，每孔 10 枚，设置 3 个复孔。置 28 ℃恒温培养箱中培养，给药后每 24 h 更换含相应药物剂量浓度的胚胎水，培养至 72 h，得到生品及 6 种炮制程度栀子水提物的最小全致死浓度（LC_{100}）和最大非致死浓度（LC_0）。

2.2.2 斑马鱼急性毒性实验 根据预实验结果，在不同栀子水提物的 LC_{100} 和 LC_0 范围内设置 6 个含不同药物剂量浓度的胚胎水组进行毒性实验，其中 sp 的 6 个药物质量浓度组分别为 0.012、0.024、0.036、0.048、0.060、0.072 g · L^{-1}，pz1 为 0.014、0.026、0.038、0.050、0.062、0.074 g · L^{-1}，pz2 为 0.015、0.030、0.045、0.060、0.075、0.090 g · L^{-1}，pz3 为 0.016、0.032、0.048、0.064、0.080、0.096 g · L^{-1}，pz4 为 0.024、0.034、0.044、0.054、0.064、0.074 g · L^{-1}，pz5 为 0.024、0.038、0.052、0.066、0.080、0.094 g · L^{-1}，pz6 为 0.025、0.037、0.049、0.061、0.073、0.085 g · L^{-1}，以不含任何药物的胚胎水为空白组。每个浓度设 3 个复孔，给药后每 24 h 更换含相应药物剂量浓度的胚胎水，观察记录斑马鱼幼鱼死亡情况，重复 3 次实验，统计其 72 h 死亡率。通过 GraphPad Prism 9.0 软件绘制量 - 毒曲线，计算得到生品及 6 种不同炮制程度栀子水提物的 LC_{50} 和 LC_{10}。

2.3 不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼肝肾脏毒性

2.3.1 斑马鱼肝脏形态观察 根据 2.2 项实验结果，将生品及不同炮制程度栀子水提物分别设置低（LC_0）、中（LC_{10}）、高（LC_{20}）剂量浓度组，以对乙酰氨基酚（0.25 g · L^{-1}）作为对乙酰氨基酚组，不含任何药物胚胎水为空白组。用 gz15 Tg/ +（AB）肝脏荧光蛋白转基因斑马鱼为研究对象。待斑马鱼胚胎发育至 4 dpf 时，挑选发育正常且有荧光的斑马鱼，随机分组放入 12 孔板中，每孔 10 枚，设置 3 个复孔，给药后每 24 h 更换含相应药物剂量浓度的胚胎水，给药 72 h 后，移除含药胚胎水，鱼安定麻醉，至含 3% 甲基纤维素钠水溶液的培养皿中，在荧光显微镜下拍照记录斑马鱼肝脏荧光强度，用 Image J 计算肝脏面积。

2.3.2 斑马鱼 ALT、AST、Cr 和 BUN 活性测定 在显微镜下选取正常发育受精后 3 dpf AB 系斑马鱼，随机转移到含有胚胎水和生品及 6 种炮制程度栀子水提物低（LC_0）、中（LC_{10}）、高（LC_{20}）剂量浓度组，对乙酰氨基酚（0.25 g · L^{-1}）作为对乙酰氨基酚组，不含任何药物胚胎水为空白组。分别放置 6 孔板中，每孔 30 枚，设置 3 个复孔。于 28 ℃恒温培养箱中培养，给药后每 24 h 更换含相应药物剂量浓度的胚胎水。给药 72 h 后，收集斑马鱼，研磨仪匀浆，离心取上清液，检测斑马鱼体内 ALT、AST、Cr 和 BUN 活性。

2.4 统计学方法

用 SPSS 进行统计学分析，结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 生品及不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼 LC_{50} 和 LC_{10} 的影响

根据各组死亡率，用 GraphPad Prism 9.0 软件绘制量 - 毒曲线，计算 LC_{50} 和 LC_{10}。生品及不同炮制程度栀子水提物的 LC_{50} 分别为 0.042、0.049、0.053、0.064、0.050、0.058、0.058

$g \cdot L^{-1}$，LC_{10}分别为 0.024、0.025、0.033、0.038、0.036、0.036、0.039 $g \cdot L^{-1}$。依据 LC_{50}和 LC_{10}由大到小顺序排列，LC_{50}的顺序为：pz3 > pz5 = pz6 > pz2 > pz4 > pz1 > sp，LC_{10}的顺序为：pz6 > pz3 > pz5 = pz4 > pz2 > pz1 > sp。实验结果表明，pz3、pz5、pz6 的 LC_{50}和 LC_{10}值较大，毒性在一定程度上有所降低，炮制时间较优。见图 1。

3.2 生品及不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼肝脏形态和肝脏荧光面积的影响

空白组斑马鱼肝脏形态完整，肝脏荧光呈马蹄形。与空白组比较，对乙酰氨基酚组斑马鱼肝脏形态变化和荧光面积减小（$P < 0.01$），表明对乙酰氨基酚对斑马鱼有肝毒性。sp 低、中、高剂量组斑马鱼肝脏形态变化和荧光面积减少（$P < 0.01$），pz1、pz2 低、中、高剂量浓度组斑马鱼肝脏形态变化和荧光面积减少（$P < 0.05$，$P < 0.01$），pz3 中、高剂量组斑马鱼肝脏形态变化和荧光面积减少（$P < 0.01$），表明 sp 及 pz1、pz2、pz3 不同剂量浓度对斑马鱼肝脏均有不同程度的损伤。pz4、pz5、pz6 低、中剂量组斑马鱼肝脏形态变化和荧光面积无明显变化，高剂量组有变化（$P < 0.05$）。表明 pz4、pz5、pz6 低、中剂

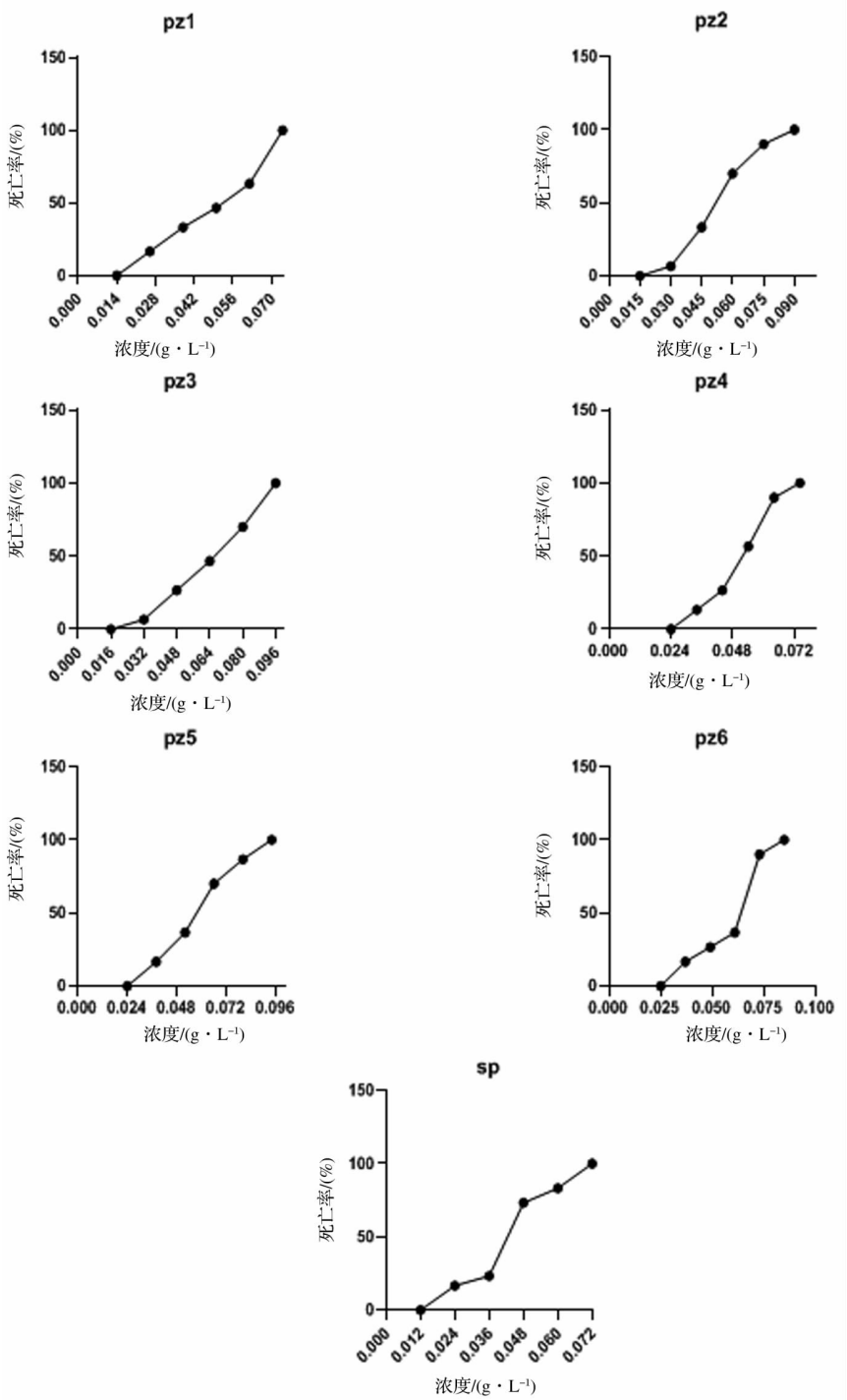


图 1 不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼的量－毒曲线（$n = 3$，$\bar{x} \pm s$）

表 1 不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼肝脏荧光面积的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	质量浓度/($g \cdot L^{-1}$)	肝脏荧光面积/(μm^2)
空白组	10		8 413.7 ± 1 517.1
对乙酰氨基酚组	10	0.250	5 807.5 ± 773.1[2)]
sp 低剂量组	10	0.012	5 863.1 ± 662.8[2)]
sp 中剂量组	10	0.024	5 543.8 ± 473.4[2)]
sp 高剂量组	10	0.030	4 330.8 ± 886.8[2)]
pz1 低剂量组	10	0.014	7 135.3 ± 454.9[1)]
pz1 中剂量组	10	0.025	5 543.7 ± 778.2[2)]
pz1 高剂量组	10	0.033	5 026.3 ± 625.6[2)]
pz2 低剂量组	10	0.015	7 118.1 ± 1 101.1[1)]
pz2 中剂量组	10	0.033	5 383.6 ± 566.2[2)]
pz2 高剂量组	10	0.040	5 582.2 ± 1 394.7[2)]
pz3 低剂量组	10	0.016	7 321.0 ± 1 160.1
pz3 中剂量组	10	0.038	5 890.9 ± 801.7[2)]
pz3 高剂量组	10	0.047	5 174.6 ± 621.2[2)]
pz4 低剂量组	10	0.024	8 973.7 ± 588.2
pz4 中剂量组	10	0.036	7 526.4 ± 946.6
pz4 高剂量组	10	0.041	6 570.4 ± 1 688.0[1)]
pz5 低剂量组	10	0.024	8 710.9 ± 1 856.1
pz5 中剂量组	10	0.036	8 091.9 ± 2 594.1
pz5 高剂量组	10	0.043	6 990.3 ± 1 446.1[1)]
pz6 低剂量组	10	0.025	8 064.8 ± 1 051.6
pz6 中剂量组	10	0.039	7 267.9 ± 884.0
pz6 高剂量组	10	0.046	6 786.6 ± 1 253.0[1)]

注：1）与空白组比较，$P < 0.05$；2）与空白组比较，$P < 0.01$。

量组对斑马鱼肝脏无明显影响，高剂量组有肝损伤。见表1、插页Ⅻ图2。

3.3 不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼 ALT、AST、BUN 和 Cr 活性的影响

与空白组比较，对乙酰氨基酚组斑马鱼体内的 ALT 和 AST 活性升高（$P < 0.01$），表明对乙酰氨基酚对斑马鱼肝脏有损伤。与空白组比较，sp 低、中、高剂量组斑马鱼 ALT 和 AST 活性均升高（$P < 0.01$，$P < 0.05$），BUN 和 Cr 活性升高（$P < 0.05$）。pz1 的 ALT 和 AST 活性升高（$P < 0.01$），BUN 和 Cr 活性升高（$P < 0.01$，$P < 0.05$）；pz2、pz3 的 ALT 低、中、高剂量组活性升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$），AST 中、高剂量组活性升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；pz4 中、高剂量组 ALT、AST 升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；pz5、pz6 的 ALT 活性降低无显著影响，AST 高剂量组有肝损伤（$P < 0.01$，$P < 0.05$）。pz3、pz5 高剂量组 BUN 和 Cr 活性升高（$P < 0.01$，$P < 0.05$），pz4 高剂量组 BUN 和 Cr 活性升高（$P < 0.01$）。表明 sp 及 pz1 ~ pz5 不同炮制程度不同剂量浓度对斑马鱼肝脏及肾脏均有不同程度的损伤。pz6 的 3 个剂量浓度组斑马鱼 ALT、BUN、Cr 及 AST 低、中剂量组均无肝肾损伤。见表 2。

4 讨论

斑马鱼具有易养殖、成本低、产卵量大、发育迅速，多种组织器官可再生，基因组与人类同源性高等特点。现已成为研究人类疾病的理想新型动物[14-16]，被广泛用于毒理学[17-19]、遗传学、生物学、疾病模型和药物筛选等科研领域。

实验用斑马鱼模型对生品及 6 种不同炮制程度栀子进行急性毒性和肝肾损伤研究，探讨炮制程度对栀子毒性的影响。

表 2 不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼 ALT、AST、BUN、Cr 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	质量浓度/($g \cdot L^{-1}$)	ALT/($U \cdot g^{-1}$)	AST/($U \cdot g^{-1}$)	BUN/($mmol \cdot L^{-1}$)	Cr/($\mu mol \cdot L^{-1}$)
空白组	3		33.327 ± 1.445	35.033 ± 0.905	3.009 ± 0.331	6.295 ± 3.426
对乙酰氨基酚组	3	0.250	45.056 ± 1.591[2)]	51.131 ± 1.453[2)]	10.949 ± 0.200[2)]	20.005 ± 1.115[2)]
sp 低剂量组	3	0.012	56.190 ± 1.670[2)]	63.690 ± 5.842[2)]	3.715 ± 0.211[1)]	15.560 ± 4.457[1)]
sp 中剂量组	3	0.024	63.443 ± 0.940[2)]	63.824 ± 1.099[2)]	3.741 ± 0.144[1)]	17.238 ± 2.619[1)]
sp 高剂量组	3	0.030	66.606 ± 4.442[2)]	69.185 ± 12.979[1)]	3.869 ± 0.501	19.699 ± 6.114[1)]
pz1 低剂量组	3	0.014	47.817 ± 1.538[2)]	45.565 ± 4.497	3.923 ± 0.262[1)]	15.860 ± 4.374[1)]
pz1 中剂量组	3	0.025	48.591 ± 1.916[2)]	51.985 ± 3.324[2)]	4.182 ± 0.320[1)]	17.411 ± 1.732[2)]
pz1 高剂量组	3	0.033	50.698 ± 1.782[2)]	55.809 ± 1.669[2)]	4.233 ± 0.178[2)]	18.146 ± 5.017[1)]
pz2 低剂量组	3	0.015	40.610 ± 2.632[1)]	34.888 ± 1.640	3.319 ± 0.248	11.196 ± 5.936
pz2 中剂量组	3	0.033	42.070 ± 2.038[2)]	37.036 ± 0.789[1)]	3.743 ± 0.029	14.307 ± 3.918
pz2 高剂量组	3	0.040	47.281 ± 1.340[2)]	44.784 ± 9.755	4.445 ± 0.881	19.295 ± 5.576[1)]
pz3 低剂量组	3	0.016	38.038 ± 1.469[1)]	40.646 ± 2.173[1)]	2.652 ± 0.549	11.865 ± 2.475
pz3 中剂量组	3	0.038	39.073 ± 0.906[2)]	41.421 ± 0.449[2)]	3.476 ± 0.456	11.969 ± 8.351
pz3 高剂量组	3	0.047	40.987 ± 1.047[2)]	41.683 ± 4.839	4.556 ± 0.010[1)]	26.011 ± 5.634[2)]
pz4 低剂量组	3	0.024	33.241 ± 0.905	40.260 ± 12.081	3.421 ± 0.331	7.995 ± 2.699
pz4 中剂量组	3	0.036	38.126 ± 1.617[1)]	40.346 ± 1.897[1)]	3.667 ± 0.250	20.966 ± 4.559[1)]
pz4 高剂量组	3	0.041	40.746 ± 2.035[2)]	45.600 ± 1.193[2)]	4.625 ± 0.127[2)]	25.033 ± 4.592[2)]
pz5 低剂量组	3	0.024	33.586 ± 1.492	34.318 ± 2.728[1)]	3.176 ± 0.078	8.795 ± 6.581
pz5 中剂量组	3	0.036	34.630 ± 1.765	36.530 ± 5.060	3.697 ± 0.190[1)]	12.729 ± 10.533
pz5 高剂量组	3	0.043	34.754 ± 2.716	38.055 ± 2.204[2)]	3.818 ± 0.059[1)]	25.477 ± 12.554[2)]
pz6 低剂量组	3	0.025	31.909 ± 2.603	36.293 ± 2.318	3.368 ± 0.916	5.747 ± 1.675
pz6 中剂量组	3	0.039	32.843 ± 1.808	36.412 ± 0.304	3.587 ± 0.439	10.389 ± 6.707
pz6 高剂量组	3	0.046	33.058 ± 3.112	37.078 ± 0.203[1)]	4.579 ± 2.169	13.543 ± 3.8766

注：1）与空白组比较，$P < 0.05$；2）与空白组比较，$P < 0.01$。

通过分析其 LC_{50} 发现，随着炮制程度增加，栀子毒性在一定程度上有所降低。LC_{50} 较大为 pz3、pz5、pz6，最小为生品，可见栀子急性毒性与炮制程度和剂量浓度密切相关。ALT 和 AST 是反映肝功能的重要指标，分布于肝细胞质和肝细胞线粒体。肝脏受损会使肝细胞中的转氨酶进入血液，导致 ALT 和 AST 活性升高[20-21]。因此，大多数情况下 ALT 和 AST 升高程度与肝细胞受损程度相关。BUN 和 Cr 则在一定程度上反映肾功能的损害程度[22-23]。通过对生品及不同炮制程度栀子水提物的肝肾毒性研究发现，sp 及 pz1 ~ pz5 不同剂量浓度均对斑马鱼的肝肾脏产生不同程度的损伤，pz6 对斑马鱼肝脏及肾脏无损伤。由此可见，栀子的肝肾毒性与炮制程度和剂量浓度密切相关。其中 pz6 肝肾损伤较小，可以看出，随着炮制程度增加，栀子肝肾毒性在一定程度上有所降低，其他炮制程度栀子在不同剂量浓度下都表现出一定程度的肝肾损伤。

中药炮制减毒方法源远流长，迄今已累积丰富。常用的方法有净制、炒制、水制、加辅料共制以及祛油制霜等[24]。栀子炮制方法多种多样，最早为汉代《伤寒论》记载的“擘破”[25]，即掰破。后又发展出炒炭、姜汁炒焦黄、微炒、蜜制、炒焦等十几种炮制方法。现主要有炒黄、炒焦、炒碳、姜炙等。大量研究表明栀子经炒黄、炒焦、炒炭后，栀子苷、绿原酸、西红花苷Ⅰ、西红花苷Ⅱ等成分含量下降，京尼平苷酸经炒制后含量升高[26]。表明炒制对栀子中的化学成分影响显著，或与其毒性降低有直接关联。后续研究将对栀子生品及不同炮制程度栀子进行 HPLC 含量测定等实验，分析主要化学成分变化与肝肾毒指标的关联性分析，初步确定栀子炮制减毒的物质基础。因此，科学、合理、可控的炮制方法是实现栀子用药安全、有效的重要举措[27]。

参考文献

[1] 付小梅，葛菲，赖学文，等. 栀子的本草考证[J]. 江西中医学院学报，2000(2)：68 - 69.
[2] 吕选民，常钰曼. 柴草瓜果篇第 62 讲栀子[J]. 中国乡村医药，2020，27(17)：55 - 56.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020.
[4] 张学兰，程合丽，李慧芬. 栀子炮制的历史沿革研究[J]. 中成药，2005，27(11)：1281 - 1283.
[5] 田婧卓，梁爱华，易艳，等. 栀子及其复方栀子豉汤长期用药潜在安全风险研究及建议[J]. 中国食品药品监管，2018(10)：25 - 34.
[6] 李会芳，宋海波，王伽伯，等. 2020 年版《中国药典》一部中含栀子中成药的不良反应回顾性分析[J]. 中成药，2022，44(7)：2391 - 2395.
[7] 杨洪军，付梅红，吴子伦，等. 栀子对大鼠肝毒性的实验研究[J]. 中国中药杂志，2006，31(13)：1091 - 1093.
[8] 佘丹. 京尼平苷在大鼠体内的毒代动力学研究[D]. 广州：广州中医药大学，2015.
[9] 丁越，张彤，项乐源，等. 栀子苷致大鼠肝毒性时 - 量关系及其机理研究[C]//药用植物化学与中药资源可持续发展学术研讨会. 青海：中华中医药学会，2012.
[10] 王智勇，张海燕，杨明，等. 京尼平苷四种不同给药途径的肝毒性初步研究[J]. 现代生物医学进展，2013，13(5)：824 - 827.
[11] 丽丽，乌日汉，毕力格，等. 栀子对正常大鼠肾脏毒性代谢产物的影响[J]. 湖北科技学院学报(医学版)，2022，36(5)：389 - 392.
[12] XIA Z S，HAO E W，WEI Y T，et al. Genipin induces developmental toxicity through oxidative stress and apoptosis in zebrafish[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol，2021，241：108951.
[13] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 3 版. 北京：中国中医药出版社，2012：143.
[14] MOHAMAD NAJIB N H，YAHAYA M F，DAS S，et al. The effects of metallothionein in paraquat - induced Parkinson disease model of zebrafish[J]. Int J Neurosci，2023，133(8)：822 - 833.
[15] WANG W，YU Y，CHEN H，et al. Anti - arrhythmia potential of honey - processed licorice in zebrafish model：Antioxidant，histopathological and tissue distribution[J]. J Ethnopharmacol，2023，316：116724.
[16] DENG S，GUO A，HUANG Z，et al. The exploration of neuroinflammatory mechanism by which CRHR2 deficiency induced anxiety disorder[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry，2024，128：110844.
[17] LI M，LI M，LIU J，et al. Naringin attenuates cisplatin - and aminoglycoside - induced hair cell injury in the zebrafish lateral line via multiple pathways[J]. J Cell Mol Med，2021，25(2)：975 - 989.
[18] 刘佳莉，夏玉苹，陈柳燕，等. 不同寄主植物桑寄生水提物对斑马鱼胚胎心脏发育毒性及机制研究[J]. 中草药，2023，54(1)：160 - 171.
[19] XUAN R，QIU X，WANG J，et al. Hepatotoxic response of perfluorooctane sulfonamide (PFOSA) in early life stage zebrafish (*Danio rerio*) is greater than perfluorooctane sulfonate (PFOS)[J]. J Hazard Mater，2024，461：132552.
[20] LIU R，SU B，HUANG F，et al. Identification and analysis of cardiac glycosides in Loranthaceae parasites *Taxillus chinensis* (DC.) Danser and *Scurrula parasitica* Linn. and their host *Nerium indicum* Mill[J]. J Pharm Biomed Anal，2019，174：450 - 459.
[21] 夏玉苹，何春花，柴子舒，等. 不同寄主桑寄生水提物对斑马鱼模型的急性毒性及肝损伤[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(21)：91 - 97.
[22] 王雪，韩利文，彭维兵，等. 肌酐检测在以斑马鱼为模型评价化合物肾脏毒性中的应用[C]//中国毒理学会中药与天然药物毒理专业委员会第一次(2016 年)学术交流大会论文集. 中国毒理学会中药与天然药物毒理专业委员会，2016：80 - 81.
[23] 吴倩. 血清胱抑素 C、肌酐、尿素氮联合检测在肾功能损害诊断中的应用价值[J]. 临床医学，2022，42(10)：68 - 69.
[24] 何佳，金艳，赵玉洋，等. 有毒中草药炮制减毒方法研究进展[J]. 中国药物警戒，2023，20(9)：1064 - 1070.
[25] 张仲景. 上海中医学院伤寒温病教研组，校注. 伤寒论[M]. 上海：上海科学技术出版社，1983：58，65.
[26] 楚越，李烨，雷婧萱，等. 栀子炒焦前后 HPLC 多成分含量测定及性味数字化关联分析[J]. 中华中医药杂志，2022，37(6)：3416 - 3422.
[27] 周小波. 浅析中药炮制减毒的方法和机理[J]. 北方药学，2023，20(4)：194 - 196.