

苦参碱和氧化苦参碱体内外模型的肝毒性比较研究

郭秋平¹, 陈贵英¹, 周 泉¹, 金若敏^{2*}

(1. 广州医药研究总院有限公司药物非临床评价研究中心, 广州 510240;

2. 上海中医药大学药物安全性评价中心, 上海 201203)

【摘要】 目的 比较苦参碱(matrine, MT)和氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)的肝毒性,以探索其毒性严重程度和特征,并初步阐明毒性机制。**方法** 用对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)、苦参碱和氧化苦参碱处理肝细胞,24 h后,检测IC₅₀、肝细胞酶含量、病理形态、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量,并检测凋亡率。用对乙酰氨基酚、苦参碱和氧化苦参碱处理斑马鱼,96 h后,检测LC₅₀、肝细胞病理形态、丙二醛和谷胱甘肽含量,并检测凋亡率,同时检测氧化应激相关基因zgc: 136383、凋亡相关基因EIF4EBP3和zgc: 123120的表达。**结果** 苦参碱和氧化苦参碱对肝细胞有毒性作用,苦参碱IC₅₀为5.3 mmol/L,氧化苦参碱为>19 mmol/L。苦参碱和氧化苦参碱处理肝细胞的谷丙转氨酶、碱性磷酸酶、谷草转氨酶和乳酸脱氢酶含量升高,肝细胞肿胀,丙二醛含量升高,谷胱甘肽含量降低,凋亡率增加($P < 0.05$)。苦参碱和氧化苦参碱对斑马鱼有毒性作用,苦参碱的LC₅₀为0.41 mmol/L,氧化苦参碱为>3.8 mmol/L。苦参碱和氧化苦参碱处理的斑马鱼肝细胞呈现轻度至中度空泡化,丙二醛含量和凋亡率增加,谷胱甘肽含量降低($P < 0.05$)。苦参碱下调氧化应激相关基因zgc: 136383($P < 0.05$),下调抗凋亡基因EIF4EBP3,上调促凋亡基因zgc: 123120($P < 0.05$)。**结论** 体内外模型结果一致,苦参碱和氧化苦参碱具有肝毒性,其毒性特征相似,苦参碱的毒性大于氧化苦参碱。肝毒性机制与氧化应激和细胞凋亡有关:苦参碱下调基因zgc: 136383减少脂质转运,并激活氧化应激反应;苦参碱上调促凋亡基因zgc: 123120,下调抗凋亡基因EIF4EBP3并诱导肝细胞凋亡。

【关键词】 苦参碱;氧化苦参碱;肝毒性;毒性机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 01-0044-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.01.008

Comparison of hepatotoxicity and toxic mechanisms of matrine and oxymatrine using *in vivo* and *in vitro* models

GUO Qiuping¹, CHEN Guiying¹, ZHOU Quan¹, JIN Ruomin^{2*}

(1. Center of Non-clinical Evaluation and Research of Drugs, Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 510240, China; 2. Drug Safety Evaluation Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To compare the hepatotoxicity of matrine (MT) and oxymatrine (OMT) and explore the severity and characteristics of their toxicity, and to preliminarily elucidate their toxic mechanisms. **Methods** Liver cell line LO-2 cells were treated with acetaminophen (APAP), matrine and oxymatrine for 24 h, and the IC₅₀ values, the contents of enzymes in the liver cells, the pathological changes, the contents of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) and the

【基金项目】 广州市科信局市科研条件建设(编号:穗科条[2013]5-11,穗科条[2009]277-1);广州市科信局生物产业重大专项(编号:201300000053)。

【作者简介】 郭秋平,女,高级工程师,研究方向:新药安全性评价。E-mail: vipvivenguoguo@126.com

【通信作者】 金若敏,女,教授,研究方向:新药安全性评价。E-mail: rmj801@126.com

cell apoptosis rate were detected. In addition, adult zebrafish were treated with APAP, matrine and oxymatrine for 96 h, and the LC_{50} values, the pathological morphology of the liver cells, the contents of MDA and GSH and the apoptosis rate were detected. Meanwhile, the expression of oxidative stress-related gene, *zgc: 136383*, and the apoptosis-related genes, *EIF4EBP3* and *zgc: 123120*, was also detected. **Results** Matrine and oxymatrine had toxic effects on liver cells *in vitro*. The IC_{50} value of matrine was 5.3 mmol/L, and that of oxymatrine was > 19 mmol/L. The contents of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) in the liver cells treated with matrine or oxymatrine were increased, and the cells appeared swollen, with an increase in the MDA level and a decrease in the GSH level. The cell apoptosis rate was also increased ($P < 0.05$). Furthermore, matrine and oxymatrine had toxic effects on the zebrafish. The LC_{50} value of matrine was 0.41 mmol/L, and that of oxymatrine was > 3.8 mmol/L. The hepatocytes of zebrafish treated with matrine and oxymatrine appeared vacuolization in a mild to moderate degree, with an increase of the MDA content and a decrease of the GSH content. The cell apoptosis rate was increased ($P < 0.05$ for all). Expression of the oxidative stress-related gene *zgc: 136383* ($P < 0.05$) and the apoptosis-resistant gene *EIF4EBP3* ($P < 0.05$) was down-regulated by matrine, but that of the apoptosis-promoting gene *zgc: 123120* was up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusions** Results of the experiments using liver cells *in vitro* are consistent with those using the *in vivo* zebrafish model. Matrine (MT) and oxymatrine (OMT) both have hepatotoxicity, with similar toxic characteristics, and the toxicity of matrine is greater than oxymatrine. The mechanism of their hepatotoxicity is related with oxidative stress and cell apoptosis. Matrine reduces lipid transportation and activates oxidative stress reactions through down-regulation of gene *zgc: 136383*. In addition, matrine induces apoptosis in the liver cells via up-regulation of the apoptosis-promoting gene *zgc: 123120* and down-regulation of the apoptosis-resistant gene *EIF4EBP3*.

【Key words】 matrine, MT; oxymatrine, OMT; hepatotoxicity; toxic mechanism

苦参碱 (matrine, MT) 和氧化苦参碱 (oxymatrine, OMT) 是中药苦参和山豆根主要成分和质量标准^[1]。苦参碱和氧化苦参碱具有抗肿瘤、抗炎、抗乙肝病毒和抗肝纤维化作用以及镇痛和镇静作用^[2-6], 氧化苦参碱还表现出对心肌的保护作用^[7-8], 临床用于治疗癌症、慢性肝炎、肝纤维化和心肌病。苦参碱和氧化苦参碱药效比较已有报道^[9-10], 苦参碱的镇痛作用优于氧化苦参碱; 苦参碱的抗炎作用小于氧化苦参碱。然而, 关注苦参碱和氧化苦参碱毒性的研究很少, 只有少数报道表明苦参碱和氧化苦参碱具有毒性^[11-12], 但其毒性的比较、毒性特征和机制仍不清楚。

本研究首次使用体内斑马鱼模型比较苦参碱和氧化苦参碱的肝脏毒性, 并通过体外肝细胞模型进行验证。本研究的目的是探索这些化合物的肝毒性严重程度、特征和初步毒性机制, 为临床使用和安全使用含苦参碱和氧化苦参碱的中药提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验细胞与实验动物

L-02 肝细胞: 香港大学馈赠; AB-line 斑马鱼: 南方医科大学提供。

1.2 主要试剂与仪器

苦参碱 (纯度 99.1%, 批号 130622) 和氧化苦参

碱 (纯度 99.3%, 批号 130610), 上海荣和制药有限公司提供; 对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP), 广州白云山药业有限公司提供; MTT: 美国 Amersco; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒: 南京建成生物工程公司; 威廉姆斯培养基 (WME): 美国 Sigma。

酶标仪 (ELX800, Biotek, 美国), 生化分析仪 (7100, Hitachi, 日本), 荧光显微镜 (BX51, Olympus, 日本), ABI7900HT 序列检测系统 (AB 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 体外肝细胞模型毒性比较研究

(1) 细胞培养与处理: 将肝细胞以每平方厘米 1×10^5 个细胞接种在 24 孔板上进行培养。培养液为威廉姆斯培养基, 含 10% 胎牛血清 (FBS), 10 U/L 胰岛素铁硒传递蛋白 (ITS), 10 U/L 地塞米松, 4×10^7 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素, 5% CO_2 培养箱 37℃ 培养 48 h。 IC_{50} 检测中, 48 h 后除对照孔外, 加入对乙酰氨基酚 32 mmol/L, 苦参碱 1、3、8、20 mmol/L, 氧化苦参碱 3、8、19 mmol/L, 设 5 个复孔。其余试验中, 加入对乙酰氨基酚 32 mmol/L, 苦参碱 3、8、20 mmol/L, 氧化苦参碱 3、8、19 mmol/L, 设 5 个复孔。

(2) IC_{50} 检测: 24 h 后, 加入 100 μ L MTT 孵育 4 h 后加入 150 μ L 二甲基亚砜 (DMSO), 振荡孵育

10 min, 630 nm 和 490 nm 检测吸光度。计算抑制百分比: $(D_{490} - D_{630}) / (D_{490} - D_{630}) \times 100\%$, 并计算 IC_{50} 值。

(3) 肝细胞酶检测: 24 h 后, 收集培养基, 检测谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT), 谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST), 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)。

(4) 肝细胞形态学检查: 采用细胞爬片技术制片。HE 染色检查肝细胞形态。肝细胞病理分级如下: ①正常肝细胞具有完整的结构: “-”, 0 级; ②肝细胞轻度肿胀: “+”, 1 级; ③肝细胞中度肿胀: “++”, 2 级; ④肝细胞严重肿胀和破裂: “+++”, 3 级; ⑤肝细胞坏死: “++++”, 4 级。

(5) 丙二醛和谷胱甘肽含量测定: 24 h 后, 用 1.8 g/L 胰蛋白酶消化, 收集细胞并悬浮于低渗 Tris 缓冲液中, 4000 r/min 离心 10 min。收集上清液, 检测丙二醛和谷胱甘肽含量。

(6) 肝细胞凋亡检测: 细胞爬片后, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 5 min, 然后用 DAPI 染色 20 min, 检测细胞凋亡。每个样本随机选 5 个区域计数凋亡细胞数, 计算凋亡百分比: 凋亡细胞数/细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3.2 体内斑马鱼模型毒性比较研究

(1) 斑马鱼饲养与处理: 水温为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 为 (7.8 ± 1) , 硬度 250 mg/L, 光照时间为 12 h。实验方案符合广州医药研究总院有限公司动物福利与伦理委员会 (EX-EL2012005-01) 的要求。LC₅₀ 试验中, 对乙酰氨基酚 8 mmol/L, 苦参碱 0.26、0.32、0.40、0.50、0.63 mmol/L, 氧化苦参碱 3.8 mmol/L; 其余试验中, 对乙酰氨基酚 8 mmol/L, 苦参碱 0.26、0.40、0.63 mmol/L, 氧化苦参碱 3.8 mmol/L。

(2) LC₅₀ 检测: 药物处理后观察动物的日常外观、行为和采食情况。96 h 后, 快速冷冻将动物进行安乐死, 计算 LC₅₀ 值。

(3) 肝细胞形态学检查: 96 h 后动物安乐死。取肝脏, 石蜡切片, HE 染色。检查肝细胞形态。肝细胞病理分级如下: ①正常肝细胞具有完整的结构: “-”, 0 级; ②肝细胞轻度空泡化: “+”, 1 级; ③肝细胞中度空泡化: “++”, 2 级; ④肝细胞严重空泡化: “+++”, 3 级; ⑤肝细胞坏死: “++++”, 4 级。

(4) 丙二醛和谷胱甘肽含量测定: 取斑马鱼肝脏匀浆, 3000 r/min 离心 10 min。收集上清液检测丙二醛和谷胱甘肽含量。

(5) 肝细胞凋亡检测: 取肝脏石蜡切片, 将切片脱蜡后, PBS 中洗涤 5 min, DAPI 染色 20 min, 检测肝细胞凋亡。检测方法同体外肝细胞。

(6) 氧化应激和凋亡相关基因检测: 取对照组和苦参碱 (0.40 mmol/L) 组斑马鱼肝脏。检测基因 zgc: 136383, zgc: 123120 和 *EIF4EBP3* 的表达。PCR 条件如下: 95°C , 5 min; 95°C , 10 s; 60°C , 30 s; 使用 $2 \times$ QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 进行 40 个循环。引物设计如下 (5' → 3'): GAPDH-F: GTGACCCCTTTGCTGTTTCTTT, GAPDH-R: GGCACGTGGTGCAAACATT; zgc136383-F: GTTCCCATCAA TCCAGACGGT, zgc136383-R: TGACAGTTCTGCATC AACACATC; EIF4EBP3-F: AAGAAAGCACATCAGAA CATAAA, EIF4EBP3-R: GAAATCCAGGCAAACGAA A; zgc123120-F: CCAGACACCTCCCCTCATT, zgc123120-R: CTCTCCAGCACAACTTCCC。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 进行数据分析, 实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。对于正态分布的数据, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA); 对于非正态分布的数据, 组间比较采用 U 检验。肝细胞病理形态采用半定量 Radit 法进行统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 体外肝细胞模型毒性比较研究

2.1.1 IC_{50} 检测

结果显示, 对乙酰氨基酚 (32 mmol/L) 对肝细胞具有明显的抑制作用, 苦参碱和氧化苦参碱也具有明显的抑制作用; 苦参碱和氧化苦参碱的 IC_{50} 值分别为 5.3 mmol/L 和 > 19 mmol/L。因此, 苦参碱对肝细胞的抑制作用明显大于氧化苦参碱。

2.1.2 肝细胞酶检测

结果显示 (表 1), 对乙酰氨基酚 (32 mmol/L) 组细胞的 ALT、AST、ALP 和 LDH 含量增加 ($P < 0.01$); 苦参碱 (20 mmol/L) 组细胞 ALT、AST、ALP 和 LDH 含量均升高 ($P < 0.01$), 而苦参碱 (8 mmol/L) 组细胞仅 ALP、LDH 含量增加 ($P < 0.01$); 氧化苦参碱 (19 mmol/L) 组细胞的 AST、ALP 和 LDH 含量增加 ($P < 0.01$)。与氧化苦参碱 (19 mmol/L) 相比, 苦参碱 (20 mmol/L) 组细胞 ALT、AST、ALP 和 LDH 含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 苦参碱和氧化苦参碱对肝细胞酶的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, U/L)
Tab. 1 Effects of matrine and oxymatrine on enzyme contents in the cultured liver cells

组别 Groups	剂量 (mmol/L) Dose	谷丙转氨酶 Alanine transaminase (ALT)	谷草转氨酶 Aspartate aminotransferase (AST)	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase (ALP)	乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase (LDH)
对照组 Control group		1.2 ± 0.5	7.2 ± 0.5	17.6 ± 0.6	80.2 ± 1.1
对乙酰氨基酚组 APAP group	32	3.7 ± 0.6 **	122.3 ± 6.7 **	69.7 ± 4.0 **	853.0 ± 47.6 **
苦参碱组 MT group	20	3.2 ± 0.5 * * ▲	36.6 ± 0.9 * * ▲	30.0 ± 1.6 * * ▲	639.0 ± 17.6 * * ▲▲
	8	1.6 ± 0.6	7.8 ± 0.8	19.2 ± 0.5 **	100.4 ± 2.1 **
	3	1.0 ± 0.7	6.6 ± 0.6 *	17.8 ± 0.8	78.6 ± 6.5
氧化苦参碱组 OMT group	19	1.4 ± 0.6	11.4 ± 1.1 **	21.1 ± 0.5 **	135.0 ± 7.2 **
	8	1.2 ± 0.5	7.0 ± 1.0	17.0 ± 0.7	89.2 ± 4.5
	3	1.0 ± 0.7	6.8 ± 0.8	16.8 ± 0.8	89.4 ± 3.4

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与氧化苦参碱组相比, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the OMT group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$.

2.1.3 肝细胞形态学检查

结果显示(图 1),对乙酰氨基酚(32 mmol/L)组肝细胞数减少,肝细胞出现严重肿胀,有些细胞核消失($P < 0.05$);苦参碱(20 mmol/L)组肝细胞数减少,肝细胞呈轻度至中度肿胀($P < 0.05$);苦参碱(8 mmol/L)和氧化苦参碱(19 mmol/L)组的肝细胞轻度肿胀($P > 0.05$)。与氧化苦参碱(19 mmol/L)相比,苦参碱(20 mmol/L)组肝细胞形态变化更严重($P < 0.05$)。

2.1.4 肝细胞丙二醛和谷胱甘肽含量测定

结果显示,对乙酰氨基酚(32 mmol/L)组肝细胞丙二醛含量增加,谷胱甘肽含量降低($P < 0.05$);苦参碱(20 mmol/L)组肝细胞丙二醛含量增加($P < 0.05$),谷胱甘肽含量降低($P < 0.01$);苦参碱(8 mmol/L)($P < 0.05$)和氧化苦参碱(19 mmol/L)($P < 0.01$)组肝细胞谷胱甘肽含量也降低。与氧化苦参碱(19 mmol/L)相比,苦参碱(20 mmol/L)组肝细胞的谷胱甘肽含量显著降低($P < 0.01$)。

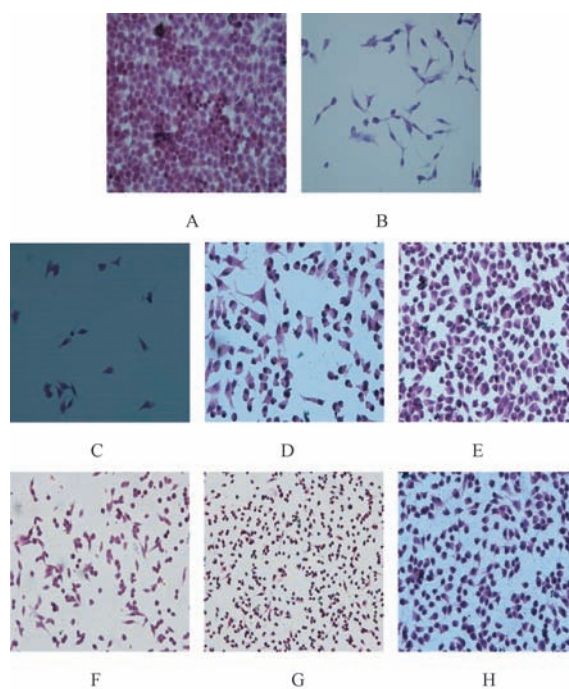
2.1.5 肝细胞凋亡检测

结果显示(图 2),对乙酰氨基酚(32 mmol/L)组肝细胞核的荧光密度增加,肝细胞凋亡百分比显著增加($P < 0.05$);苦参碱(20、8 mmol/L)和氧化苦参碱(19 mmol/L)组部分肝细胞凋亡,凋亡百分比增加($P < 0.05$)。与氧化苦参碱(19 mmol/L)相比,苦参碱(20 mmol/L)组肝细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$)。

2.2 体内斑马鱼模型的毒性比较研究

2.2.1 LC₅₀检测

结果显示,对乙酰氨基酚(8 mmol/L)对斑马鱼

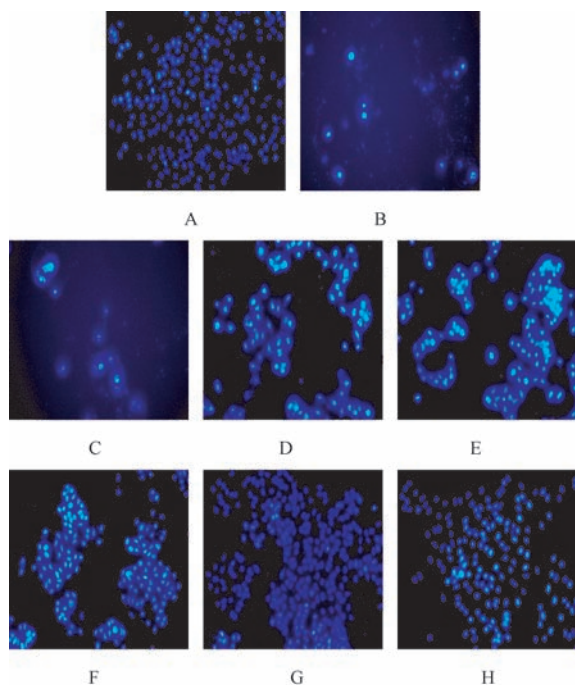


注:A:对照组(-);B:对乙酰氨基酚组(32 mmol/L)(+++);C:苦参碱组(20 mmol/L)(-);D:苦参碱组(8 mmol/L)(+++);E:苦参碱组(3 mmol/L)(+);F:氧化苦参碱组(19 mmol/L)(+);G:氧化苦参碱组(8 mmol/L)(-);H:氧化苦参碱组(3 mmol/L)(-)。

图 1 苦参碱和氧化苦参碱对肝细胞形态的影响(HE染色, × 400)

Note. A: Control group (-); B: APAP group (32 mmol/L) (+++); C: MT group (20 mmol/L) (-); D: MT group (8 mmol/L) (+++); E: MT group (3 mmol/L) (+); F: OMT group (19 mmol/L) (+); G: OMT group (8 mmol/L) (-); H: OMT group (3 mmol/L) (-).

Fig. 1 Effects of matrine and oxymatrine on morphology of the cultured liver cells. HE staining



注:A:对照组(-);B:对乙酰氨基酚组(32 mmol/L)(+++);C:苦参碱组(20 mmol/L)(-);D:苦参碱组(8 mmol/L)(+++);E:苦参碱组(3 mmol/L)(+);F:氧化苦参碱组(19 mmol/L)(+);G:氧化苦参碱组(8 mmol/L)(-);H:氧化苦参碱组(3 mmol/L)(-)。

图 2 苦参碱和氧化苦参碱对肝细胞凋亡的影响(DAPI 染色, $\times 400$)

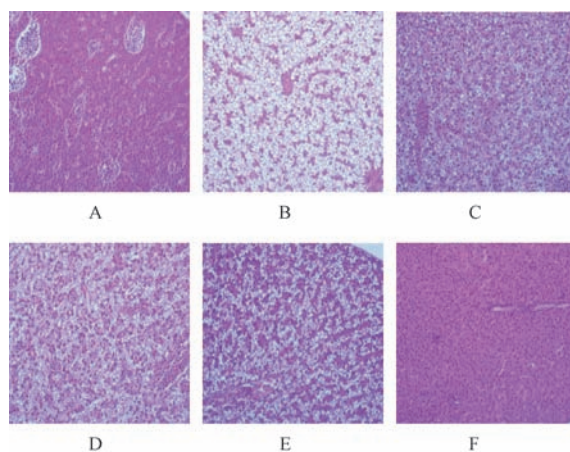
Note. A: Control group (-); B: APAP group (32 mmol/L) (+++); C: MT group (20 mmol/L) (-); D: MT group (8 mmol/L) (+++); E: MT group (3 mmol/L) (+); F: OMT group (19 mmol/L) (+); G: OMT group (8 mmol/L) (-); H: OMT group (3 mmol/L) (-).

Fig. 2 Effects of matrine and oxymatrine on apoptosis in the cultured liver cells. DAPI staining

具有明显的毒性。苦参碱(0.26 ~ 0.63 mmol/L)处理 3 h 后,斑马鱼出现游泳失衡和活动减少;浓度 > 0.32 mmol/L 引起死亡,LC₅₀ 为 0.41 mmol/L。氧化苦参碱(3.8 mmol/L)处理斑马鱼 6 h 后,斑马鱼出现游泳失衡和活动减少,但大多数在 24 h 后恢复;氧化苦参碱的 LC₅₀ 为 > 3.8 mmol/L。

2.2.2 肝细胞形态学检查

结果显示(图 3),对乙酰氨基酚(8 mmol/L)引起斑马鱼肝细胞轻度至严重空泡化($P < 0.05$);苦参碱(0.63 mmol/L)引起斑马鱼肝细胞轻度至严重空泡化($P < 0.05$)。与氧化苦参碱(3.8 mmol/L)组相比,苦参碱(0.63 mmol/L)组肝细胞形态学变化更为严重($P < 0.05$)。

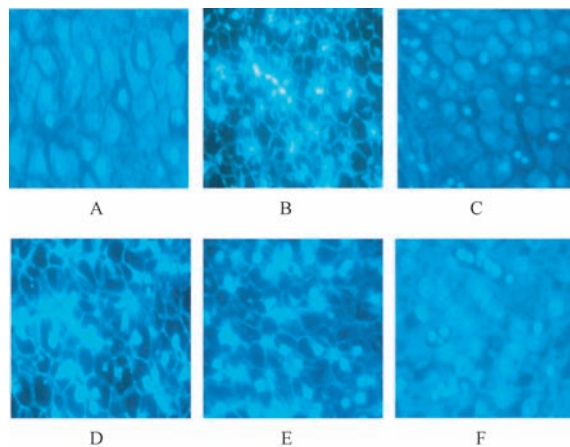


注:A:对照组;B:对乙酰氨基酚组(8 mmol/L)(+++);C:氧化苦参碱组(3.8 mmol/L)(+);D:苦参碱组(0.63 mmol/L)(+++);E:苦参碱组(0.40 mmol/L)(+);F:苦参碱组(0.26 mmol/L)(-)。

图 3 苦参碱和氧化苦参碱对斑马鱼肝细胞形态的影响(HE 染色, $\times 400$)

Note. A: Control group (-); B: APAP group (8 mmol/L) (+++); C: OMT group (3.8 mmol/L) (+); D: MT group (0.63 mmol/L) (+++); E: MT group (0.40 mmol/L) (+); F: MT group (0.26 mmol/L) (-).

Fig. 3 Effects of matrine and oxymatrine on morphology of the liver cells in zebrafish. HE staining



注:A:对照组;B:对乙酰氨基酚组(8 mmol/L);C:氧化苦参碱组(3.8 mmol/L);D:苦参碱组(0.63 mmol/L);E:苦参碱组(0.40 mmol/L);F:苦参碱组(0.26 mmol/L)。

图 4 苦参碱和氧化苦参碱对斑马鱼肝细胞凋亡的影响(DAPI 染色, $\times 400$)

Note. A: Control group; B: APAP group (8 mmol/L); C: OMT group (3.8 mmol/L); D: MT group (0.63 mmol/L); E: MT group (0.40 mmol/L); F: MT group (0.26 mmol/L).

Fig. 4 Effects of matrine and oxymatrine on apoptosis in the liver cells of zebrafish. DAPI staining

2.2.3 丙二醛和谷胱甘肽含量测定

结果显示,对乙酰氨基酚(8 mmol/L)组肝细胞丙二醛含量明显升高($P < 0.05$);苦参碱(0.63、0.40 mmol/L)组的丙二醛含量增加,而谷胱甘肽含量降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与氧化苦参碱(3.8 mmol/L)相比,苦参碱(0.63 mmol/L)组肝细胞丙二醛含量明显升高($P < 0.01$),谷胱甘肽含量明显降低($P < 0.05$)。

2.2.4 肝细胞凋亡检测

结果显示(图4),对乙酰氨基酚(8 mmol/L)组斑马鱼肝细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$);苦参碱(0.63、0.40 mmol/L)组斑马鱼肝细胞凋亡率升高($P < 0.01$)。与氧化苦参碱(3.8 mmol/L)组相比,苦参碱(0.63、0.40 mmol/L)组斑马鱼肝细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$)。

2.2.5 氧化应激和凋亡相关基因检测

结果显示(表2),苦参碱(0.40 mmol/L)组基因 *zgc: 136383* 下调至 0.001($P < 0.05$),表明苦参碱诱导的氧化应激与 *zgc: 136383* 的下调相关。基因 *zgc: 123120* 上调至 1.22($P < 0.05$),*EIF4EBP3* 基因下调至 0.02($P < 0.05$),说明苦参碱诱导的细胞凋亡与 *EIF4EBP3* 的下调和 *zgc: 123120* 的上调有关。

3 讨论

本实验采用人肝细胞作为体外模型保留人类的特征,保持肝细胞的生理和代谢特征,可以直接反映药物的肝毒性。 IC_{50} 值是衡量肝毒性的重要参数。与体外模型相比,斑马鱼模型可更准确地预测药物毒性;此外,与哺乳动物模型相比,斑马鱼模型测试周期短,成本低和用药量少,更符合动物福利

伦理。因此,斑马鱼模型对于预测肝脏毒性是准确可靠的^[13-14]。 LC_{50} 是衡量化学物质在水中的毒性的重要参数。本研究预测试结果显示,氧化苦参碱(3.8 mmol/L)处理并未引起斑马鱼死亡。根据 ISO734561-3“物质对淡水鱼的急性毒性的水质测定”,氧化苦参碱的毒性非常小;因此,正式试验中氧化苦参碱的浓度为 3.8 mmol/L。

本研究中,阳性对照药对乙酰氨基酚对肝细胞和斑马鱼具有明显的毒性作用。体外模型结果与体内模型结果一致,表明本研究使用的系统稳定可靠,可用于药物评价。

本研究中,体外肝细胞模型表明苦参碱的毒性明显大于氧化苦参碱。苦参碱和氧化苦参碱导致斑马鱼游泳不平衡,这可能与神经毒性有关^[15],苦参碱对斑马鱼的毒性明显大于氧化苦参碱。体内外模型结果一致。

苦参碱($C_{15}H_{24}N_2O$)与氧化苦参碱($C_{15}H_{24}N_2O_2$)结构相似。苦参碱是氧化苦参碱体内的代谢产物之一。苦参碱注射后转化率约为 30%,氧化苦参碱仅为 6%^[16]。苦参碱在肝脏中的分布明显高于氧化苦参碱^[17]。这可能是苦参碱毒性明显大于氧化苦参碱的原因。

本研究进一步探讨了苦参碱和氧化苦参碱的初步肝毒性机制。大量研究表明肝毒性的主要机制是氧化应激和细胞凋亡^[18-20]。因此,本研究中检测到氧化应激和凋亡相关指标。丙二醛含量可反映身体脂质过氧化程度,间接反映细胞损伤程度^[21-22]。谷胱甘肽含量反映身体抗氧化能力的重要因素^[23]。本研究表明其肝脏毒性机制与氧化应激相关。基因 *zgc: 136383* 的功能是参与脂质转运调

表 2 苦参碱对斑马鱼氧化应激和凋亡基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Tab. 2 Effects of matrine on the expression of oxidative stress-related and apoptosis-related genes in the zebrafish

目标基因 Target genes	组别 Groups	表达差($\Delta\Delta Ct$) Subtraction of gene expression levels ($\Delta\Delta Ct$)	相对于对照组的表达倍数 Relative folds to the control group
<i>zgc: 136383</i>	苦参碱组 MT group	9.27 ± 1.36	$0.002 \pm 0.002^*$
<i>EIF4EBP3</i>	苦参碱组 MT group	5.31 ± 0.60	$0.02 \pm 0.01^*$
<i>zgc: 123120</i>	苦参碱组 MT group	-0.30 ± 0.09	$1.23 \pm 0.09^*$

注:以对照组表达水平为 1,分别对苦参碱组各目标基因的表达倍数进行校正。具体计算公式为:表达差($\Delta\Delta Ct$) = 苦参碱组 Ct 差-对照组 Ct 差,其中,Ct 差(ΔCt) = 目标基因 Ct 值-内参(*GAPDH*) Ct 值,Ct 值为实验测得 qPCR 的循环数;表达倍数 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

Note. The expression level of each target gene in the control group was set as 1, and the expression fold in the MT group was normalized respectively. The specific formulas are as follows: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ of the MT group - ΔCt of the control group; $\Delta Ct = Ct$ value of the target gene - Ct value of *GAPDH* (as the internal control); Ct value refers to the qPCR cycles detected in this experiment. Relative folds to the control group = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

控,苦参碱使该基因表达下调,使脂质转运功能受损,增加了细胞脂质积累,激活了氧化应激。

凋亡是一种细胞死亡形式^[24]。DAPI 可以通过细胞膜,与双链 DNA 结合标记细胞核。凋亡发生时,染色质收缩聚集或进一步收缩形成颗粒,或细胞核分解形成碎片^[25]。本研究表明肝毒性机制与细胞凋亡相关。基因 *zgc: 123120* 编码一种 Bcl-2 家族/腺病毒相互作用蛋白,其与促凋亡基因结合以促进凋亡。基因 *EIF4EBP3* 编码的蛋白是 EIF4EBP 家族的成员,作为蛋白激酶 B 的 mTOR,激活蛋白激酶 B 并对线粒体凋亡途径具有抗凋亡作用。苦参碱使基因 *EIF4EBP3* 表达下调,*zgc: 123120* 表达上调,抗凋亡能力减弱,促凋亡能力增强,使肝细胞发生凋亡。

苦参碱是中药山豆根和苦参的药效和毒性物质基础。本研究表明高剂量的苦参碱对肝脏有毒性,临床使用大剂量的中药苦参和山豆根时应考虑药物的安全性。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 第一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 19.
- [2] Liu YQ, Li Y, Qin J, et al. Matrine reduces proliferation of human lung cancer cells by inducing apoptosis and changing miRNA expression profiles [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(5): 2169–2177.
- [3] Liu Y, Xu Y, Ji W, et al. Anti-tumor activities of matrine and oxymatrine: literature review [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5111–5119.
- [4] Huang WC, Chan CC, Wu SJ, et al. Matrine attenuates allergic airway inflammation and eosinophil infiltration by suppressing eotaxin and Th2 cytokine production in asthmatic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 470–477.
- [5] Ma ZJ, Li Q, Wang JB, et al. Combining oxymatrine or matrine with lamivudine increased its antireplication effect against the hepatitis B virus *in vitro* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 186573.
- [6] Wang H, Li Y, Dun L, et al. Antinociceptive effects of matrine on neuropathic pain induced by chronic constriction injury [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(7): 844–850.
- [7] Xiao TT, Wang YY, Zhang Y, et al. Similar to spironolactone, oxymatrine is protective in aldosterone-induced cardiomyocyte injury via inhibition of calpain and apoptosis-inducing factor signaling [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88856.
- [8] Chai NL, Fu Q, Shi H, et al. Oxymatrine liposome attenuates hepatic fibrosis via targeting hepatic stellate cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(31): 4199–4206.
- [9] 钱利武, 戴五好, 周国勤, 等. 苦参及山豆根主要生物碱镇痛抗炎作用研究 [J]. *中成药*, 2012, 34(8): 1593–1596.
- [10] 聂红明, 陈建杰, 高月求, 等. 苦参碱与氧化苦参碱体外抗乙肝病毒的比较 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(36): 4046–4050.
- [11] 王晓燕, 梁磊, 常建兰, 等. 苦参碱对小鼠的毒性研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(9): 2154–2155.
- [12] 张茜, 李峰杰, 金若敏, 等. 苦参碱和氧化苦参碱致 HL7702 细胞毒性研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(6): 1222–1225.
- [13] Haldi M, Ton C, Seng WL, et al. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish [J]. *Angiogenesis*, 2006, 9(3): 139–151.
- [14] Wiegand C, Pflugmacher S, Giese M, et al. Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2000, 45(2): 122–131.
- [15] Wang XP, Yang RM. Movement disorders possibly induced by traditional Chinese herbs [J]. *Eur Neurol*, 2003, 50(3): 153–159.
- [16] 王素军, 杨本坤, 曾洁, 等. 液相-串联质谱法研究氧化苦参碱在食蟹猴体内的代谢. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(20): 1659–1663.
- [17] 刘继平, 黄鑫, 薛梅, 等. 复方苦参注射液 4 种生物碱在大鼠体内组织分布研究. *中药药理与临床*, 2011, 27(4): 74–78.
- [18] Solhi H, Malekiran A, Kazemifar AM, et al. Oxidative stress and lipid peroxidation in prolonged users of methamphetamine [J]. *Drug Metab Lett*, 2014, 7(2): 79–82.
- [19] Wu YH, Hu SQ, Liu J, et al. Nature and mechanisms of hepatocyte apoptosis induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide challenge in mice [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6): 1498–1506.
- [20] Wang K. Molecular mechanisms of liver injury: apoptosis or necrosis [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2014, 66(8): 351–356.
- [21] Vuppalanchi R, Juluri R, Bell LN, et al. Oxidative stress in chronic liver disease: relationship between peripheral and hepatic measurements [J]. *Am J Med Sci*, 2011, 342(4): 314–317.
- [22] Carvalho AN, Lim JL, Nijland PG, et al. Glutathione in multiple sclerosis: more than just an antioxidant? [J]. *Mult Scler*, 2014, 20(11): 1425–1431.
- [23] EI Batsh MM, Zakaria SS, Gaballah HH. Protective effects of alpha-lipoic acid against benzene induced toxicity in experimental rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(14): 2717–2724.
- [24] Seager AL, Shah UK, Brüsehafer K, et al. Recommendations, evaluation and validation of a semi-automated, fluorescent-based scoring protocol for micronucleus testing in human cells [J]. *Mutagenesis*, 2014, 29(3): 155–164.
- [25] Gomes FM, Ramos IB, Wendt C, et al. New insights into the *in situ* microscopic visualization and quantification of inorganic polyphosphate stores by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-staining [J]. *Eur J Histochem*, 2013, 57(4): e34.

[收稿日期] 2017–06–12