

## 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

夏玉苹<sup>1,2</sup>, 何春花<sup>3</sup>, 柴子舒<sup>1</sup>, 覃文慧<sup>1</sup>, 巫文鑫<sup>1</sup>, 陈柳燕<sup>1</sup>, 刘佳莉<sup>1</sup>, 汝梅<sup>1\*</sup>, 李永华<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200;

2. 广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530200;

3. 广西仙莱中药科技有限公司, 南宁 530032)

**[摘要]** 目的:用斑马鱼模型对桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃6种寄主桑寄生水提物进行急性毒性及肝损伤研究,探索寄主对桑寄生毒性的影响,为桑寄生用药安全提供理论依据。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,根据毒性预实验结果,对不同寄主桑寄生水提物分别设置6个不同剂量浓度对斑马鱼进行处理,统计其72 h死亡率,采用GraphPad Prism 6.0软件绘制量-毒曲线,计算不同寄主桑寄生水提物的半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)和10%致死浓度(LC<sub>10</sub>)。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,将不同寄主桑寄生水提物分别设置低、中、高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)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性。结果:急性毒性实验结果显示,桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃寄主桑寄生水提物的LC<sub>50</sub>分别为1.24,0.94,0.51,0.38,0.11,0.09 g·L<sup>-1</sup>;LC<sub>10</sub>分别为0.70,0.60,0.35,0.28,0.08,0.07 g·L<sup>-1</sup>。肝损伤实验结果,与空白组比较,对乙酰氨基酚组的斑马鱼的肝脏形态变形和荧光面积减小( $P<0.01$ ),ALT和AST活性升高( $P<0.01$ ),结果表明对乙酰氨基酚对斑马鱼有肝毒。桑树寄主桑寄生水提物低、中、高3个剂量浓度组斑马鱼的肝脏形态和荧光面积均无变化,ALT和AST活性均降低;漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃5种寄主桑寄生水提物中、高剂量浓度组斑马鱼均不同程度地表现出肝脏形态变化和荧光面积减小( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),ALT和AST活性均明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结果表明桑树寄主桑寄生对斑马鱼没有肝脏毒性,漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃5种寄主桑寄生对斑马鱼表现出不同程度的肝损伤。结论:桑寄生毒性有无或强弱具有寄主依赖性,桑树寄主桑寄生无肝损伤,其他5种寄主桑寄生均不同程度地表现出一定的肝损伤,规范寄主来源可能是实现桑寄生用药安全的重要举措。

**[关键词]** 桑寄生; 寄主; 斑马鱼; 急性毒性; 肝损伤

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)21-0091-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20212125

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210908.1455.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-09-08 16:42

### Acute Toxicity and Hepatotoxicity of Aqueous Extracts of Taxilli Herba from Different Hosts in Zebrafish Model

XIA Yu-ping<sup>1,2</sup>, HE Chun-hua<sup>3</sup>, CHAI Zi-shu<sup>1</sup>, QIN Wen-hui<sup>1</sup>, WU Wen-xin<sup>1</sup>, CHEN Liu-yan<sup>1</sup>,  
LIU Jia-li<sup>1</sup>, RU Mei<sup>1\*</sup>, LI Yong-hua<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Nanning 530200, China;

3. Guangxi Xian Zhu Chinese Medicine Technology Co. Ltd., Nanning 530032, China)

**[收稿日期]** 20210719(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82160754,81960722);中药学广西一流学科建设项目重点课题项目(2018XK027,2019XK091,2019XK097);广西瑶药质量标准(第二卷)质量评价与标准研究项目(MZY20170001);广西中医药大学研究生创新课题项目(YCSW2021239)。

**[第一作者]** 夏玉苹,在读硕士,从事中药质量控制与中药资源开发的研究,E-mail:1114086161@qq.com

**[通信作者]** \* 汝梅,博士,讲师,从事药用植物次生代谢的研究,Tel:0771-4953513,E-mail:rumei2015@163.com;

\* 李永华,博士,研究员,从事中药质量控制与中药资源开发的研究 Tel:0771-4953513,E-mail:liyonghua185@126.com

**[Abstract] Objective:** To explore the acute toxicities and hepatotoxicities of aqueous extracts of Taxilli Herba from *Morus alba*, *Toxicodendron trichocarpum*, *Camellia oleifera*, *Salix babylonica*, *Melia azedarach*, and *Nerium indicum* against zebrafish model and the effect of different hosts on the toxicity of Taxilli Herba, hoping to provide a theoretical basis for the safe use of Taxilli Herba. **Method:** The normally developed AB zebrafish at 3-day post fertilization was selected for acute toxicity study. According to the results of preliminary toxicity experiments, the zebrafishes were treated with aqueous extracts of Taxilli Herba from different hosts at six doses, and their mortality was calculated 72 h later. GraphPad Prism 6.0 was used for plotting the dose-toxicity curve, followed by the calculation of their median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) and 10% lethal concentration ( $LC_{10}$ ). The gz15Tg/+ (AB) liver fluorescent protein transgenic zebrafish with normal development at 4-day post fertilization was applied for the hepatotoxicity study. The zebrafishes were divided into the low-, medium-, and high-dose groups of aqueous extracts of Taxilli Herba from six hosts, the positive control (acetaminophen) group, and the blank (embryo amniotic fluid) group, and then treated with the corresponding drugs. Seventy-two hours later, the liver morphology and fluorescent area changes in zebrafish were observed. And the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected. **Result:** The results of acute toxicity test demonstrated that the  $LC_{50}$  values of water extracts of Taxilli Herba from *M. alba*, *T. trichocarpum*, *C. oleifera*, *S. babylonica*, *M. azedarach*, and *N. indicum* were 1.24, 0.94, 0.51, 0.38, 0.11, 0.09  $g \cdot L^{-1}$ , respectively, and the  $LC_{10}$  values were 0.70, 0.60, 0.35, 0.28, 0.08, 0.07  $g \cdot L^{-1}$ , respectively. As revealed by hepatotoxicity test, compared with the blank group, the positive control group exhibited liver morphological changes, decreased fluorescent area ( $P < 0.01$ ), and elevated ALT and AST activities ( $P < 0.01$ ), suggesting that acetaminophen was hepatotoxic to zebrafish. However, there was no change in the liver morphology or fluorescent area of zebrafish in the low-, medium-, and high-dose groups of water extracts of Taxilli Herba from *M. alba*, and the ALT and AST activities were decreased. By contrast, the liver morphology and fluorescent areas in the medium- and high-dose groups of water extracts of Taxilli Herba from *T. trichocarpum*, *C. oleifera*, *S. babylonica*, *M. azedarach*, and *N. indicum* changed to varying degrees ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Besides, the activities of both ALT and AST were also enhanced. These indicated that Taxilli Herba from *M. alba* had no hepatotoxicity to zebrafish, while that from *T. trichocarpum*, *C. oleifera*, *S. babylonica*, *M. azedarach*, and *N. indicum* showed varying degrees of hepatotoxicity to zebrafish. **Conclusion:** The toxicity of Taxilli Herba is host-dependent. Taxilli Herba from *M. alba* has no hepatotoxicity, but that from the other five hosts shows varying degrees of hepatotoxicity. Standardizing the host source may be an important measure to realize the medication safety of Taxilli Herba.

**[Keywords]** Taxilli Herba; host; zebrafish; acute toxicity; hepatotoxicity

桑寄生为桑寄生科植物桑寄生 *Taxillus chinensis* 干燥的带叶茎枝,其味苦、甘,性平,归肝、肾经,具有祛风湿、补肝肾、强筋骨、安胎元功效,用于风湿痹痛,腰膝酸软,筋骨无力,崩漏经多,妊娠漏血,胎动不安,头晕目眩等<sup>[1]</sup>。桑寄生属于半寄生植物药材,其寄主种类具有复杂多样的生物学特征<sup>[2]</sup>。《中药大辞典》记载桑寄生寄主多达29科50多种<sup>[3]</sup>,朱开昕等<sup>[4]</sup>调查发现广西境内桑寄生寄主有35科150多种。本草考证发现,桑寄生本身无毒,但有毒寄主会对桑寄生带来毒性<sup>[5-6]</sup>。

现代研究发现寄主对桑寄生从药材成分到药材功效都有不同程度的影响<sup>[7-9]</sup>,而现行《中华人民

共和国药典》对桑寄生仅要求对强心苷进行排除性检查,即凡是不含强心苷的桑寄生都可以作为桑寄生药材使用。伍朝箴等<sup>[10]</sup>对寄生在马桑树上的马桑寄生 *Loranthus parasiticus* 研究发现,马桑寄生茎、叶中均含有毒物质马桑毒素、羟基马桑毒素及马桑亭等有毒成分。周汉华等<sup>[11]</sup>对来源于沙梨、漆树、夹竹桃等6种寄主的四川寄生 *T. sutchuenensis* 进行毒性研究,发现来源于沙梨、李树、白杨、柞木寄主的四川寄生无毒,而来源于漆树和夹竹桃寄主的四川寄生则具有毒性。马桑寄生和漆树寄生都是不含强心苷成分的,因此不能仅仅通过做强心苷的排除性检查来规避桑寄生药材可能存在的毒性,

依据《中华人民共和国药典》标准,桑寄生用药可能存在安全隐患。斑马鱼的基因组与人类基因组的同源性可达70%,且人类84%的疾病相关基因可在斑马鱼中找出同源基因<sup>[12]</sup>。近年来,人们使用斑马鱼模型开展药物毒性及药效评价研究<sup>[13-15]</sup>。基于寄主影响的桑寄生药材毒性研究目前尚未见相关报道。本文以斑马鱼为模型,研究桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃6种寄主桑寄生水提物对斑马鱼的急性毒性与肝损伤,为桑寄生用药安全提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** AB系野生型斑马鱼, gz15Tg/(AB)肝脏荧光蛋白转基因斑马鱼均由广西中医药大学-加斑马鱼中药筛选联合实验室提供。采用专业的斑马鱼养殖系统正规饲养,水pH 6.50~7.50,水温28.5℃,溶氧量 $\geq 6.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,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** 桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃6种寄主桑寄生,经广西中医药大学李永华研究员鉴定,其药材基原为桑寄生科植物桑寄生 *T. chinensis* 干燥的带叶茎枝;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)试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号分别为20200804,20200928,20200927);羧甲基纤维素钠(天津市大茂化学试剂厂,批号20181113);RIPA裂解液(塞默飞世尔科技有限公司,批号UG286842);鱼安定(常州桌桑医药化工材料有限公司,批号212-956-8)。

**1.3 仪器** Z-A-D5x型斑马鱼养殖系统(上海海圣生物实验设备有限公司),EP64C型1/10万电子分析天平(梅特勒-托利多公司),SZX2-ILLT型体视显微镜(日本Olympus株式会社),M165FC型荧光立体显微镜(德国徕卡仪器有限公司),BXG-250型层照培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),SpectraMax M5e型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司),ST16R型低温高速离心机(美国Thermo Fisher公司),Alpha1-4LDplus型冷冻干燥机(上海博登生物科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 桑寄生水提物的提取与制备** 不同寄主桑寄生提取物提取方法参考周汉华等<sup>[11]</sup>的方法,分别称取桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃6种寄主桑

寄生各75 g,分别加10,8,6倍量水煎煮保持微沸状态45 min,合并3次滤液,浓缩成为浸膏,冷冻干燥,分别得到桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃寄主桑寄生水提物冻干粉末11.80,13.31,12.60,14.81,16.65,14.85 g。

分别准确称取桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃6种寄主桑寄生水提物冻干粉末0.16,0.18,0.17,0.20,0.22,0.20 g(相当于生药材1.00 g),分别加入胚胎水,超声溶解,转移至100 mL量瓶中,定容,得生药质量浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水提物贮备液的母液,分装,冻存,备用。

精密称取对乙酰氨基酚0.01 g,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 $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,作为对乙酰氨基酚组。

**2.2 不同寄主桑寄生对斑马鱼半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)与10%致死浓度(LC<sub>10</sub>)的测定**

**2.2.1 斑马鱼毒性预实验** 显微镜下选取受精后3 d(3 dpf)正常发育的AB系斑马鱼,并将其随机转移到含有不同浓度的桑寄生水提物胚胎水的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,得出6种寄主桑寄生水提物的最小全致死浓度(LC<sub>100</sub>)和最大非致死浓度(LC<sub>0</sub>)。

**2.2.2 斑马鱼急性毒性实验** 根据预实验得到的结果,分别在不同寄主桑寄生水提物的LC<sub>100</sub>和LC<sub>0</sub>范围内设置6个含有不同药物剂量浓度的胚胎水组进行毒性实验,其中桑树寄主桑寄生水提物的6个药物质量浓度组分别为3.00,2.50,2.00,1.50,1.00,0.50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,漆树寄主桑寄生水提物的6个药物质量浓度组分别为2.00,1.70,1.40,1.10,0.80,0.50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,油茶寄主桑寄生水提物的6个药物质量浓度组分别为2.00,1.70,1.40,1.10,0.80,0.50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,柳树寄主桑寄生水提物的6个药物质量浓度组分别为0.70,0.60,0.50,0.40,0.30,0.20  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,苦楝寄主桑寄生水提物的6个药物质量浓度组分别为0.16,0.14,0.12,0.10,0.08,0.06  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,夹竹桃寄主桑寄生水提物的6个药物质量浓度组分别为0.13,0.11,0.10,0.08,0.07,0.05  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,以不含任何药物的胚胎水为空白组。每个浓度设置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,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 6.0软件绘制量-毒曲线,分别计算出6种寄主桑寄生水提物的LC<sub>50</sub>和LC<sub>10</sub>。

### 2.3 不同寄主桑寄生对斑马鱼肝脏毒性

**2.3.1 斑马鱼肝脏形态观察** 根据2.2项实验结果,将桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃寄主桑寄生水提取物分别设置低( $1/2 LC_{10}$ ),中( $LC_0$ ),高( $LC_{10}$ )剂量浓度组,以对乙酰氨基酚( $1.00 g \cdot L^{-1}$ )作为对乙酰氨基酚组和不含任何药物胚胎水作为空白组。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更换含相应药物质量浓度的胚胎水,给药72 h后,移除含药胚胎水,用鱼安定麻醉斑马鱼,至含有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和AST活性的测定** 在显微镜下选取正常发育受精后3 dpf AB系斑马鱼,并随机转移到含有胚胎水和桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃寄主桑寄生水提取物低( $1/2 LC_{10}$ ),中( $LC_0$ ),高( $LC_{10}$ )剂量浓度组,以对乙酰氨基酚( $1.00 g \cdot L^{-1}$ )作为对乙酰氨基酚组和不含任何药物胚胎水作为空白组,分别放置6孔板中,每孔30枚,设置3个复孔。于28 °C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,加入裂解液将斑马鱼匀浆,离心取上清液,检测斑马鱼体内ALT和AST的活性。

**2.4 数据分析** 用GraphPad Prism 6.0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 不同寄主桑寄生对斑马鱼 $LC_{50}$ 和 $LC_{10}$**  根据各组死亡率,用GraphPad Prism 6.0软件绘制量-毒曲线,计算不同寄主桑寄生的 $LC_{50}$ 和 $LC_{10}$ 。桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃6种寄主桑寄生水提取物的 $LC_{50}$ 分别为1.24, 0.94, 0.51, 0.38, 0.11, 0.09  $g \cdot L^{-1}$ ,  $LC_{10}$ 分别为0.70, 0.60, 0.35, 0.28, 0.08, 0.07  $g \cdot L^{-1}$ 。实验结果表明,寄主不同,桑寄生 $LC_{50}$ 和 $LC_{10}$ 不同,依据 $LC_{50}$ 和 $LC_{10}$ 由大到小顺序排列,6种寄主桑寄生依次为桑树寄主桑寄生、漆树寄主桑寄生、油茶寄主桑寄生、柳树寄主桑寄生、苦楝寄主桑寄生和夹竹桃寄主桑寄生。见图1。

**3.2 不同寄主桑寄生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,肝脏荧光呈现马蹄形。与空白组比较,对乙酰氨基酚组的斑马鱼肝脏形态有明显变形,肝脏荧光面积减小

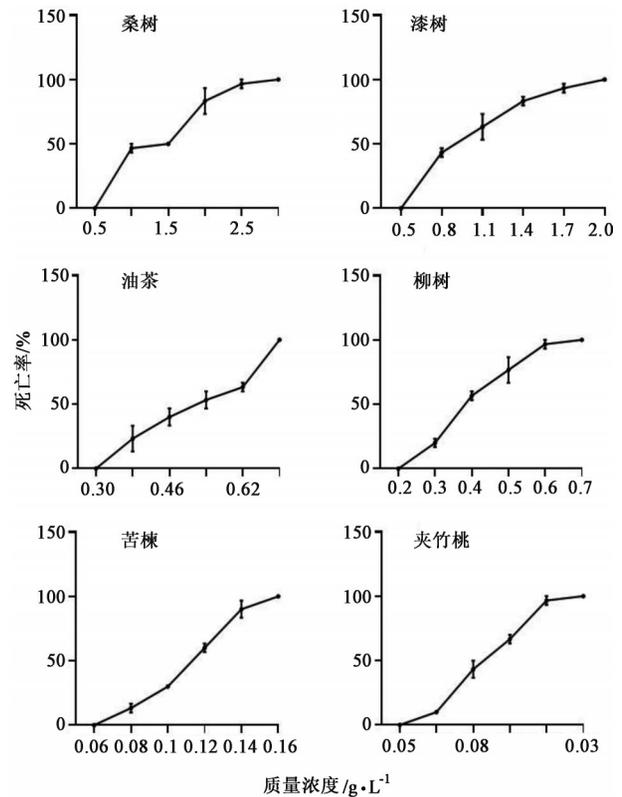


图1 不同寄主桑寄生水提取物对斑马鱼的量-毒曲线( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 1 Volume-toxicity curve of aqueous extracts of Taxilli Herba from different of host trees to zebrafish ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

( $P < 0.01$ ),表明对乙酰氨基酚对斑马鱼肝脏影响显著,有肝损伤。与空白组比较,桑树寄主桑寄生水提取物低、中、高剂量浓度组的斑马鱼肝脏形态和荧光面积均无明显变化,表明桑树寄主桑寄生水提取物低、中、高浓度对斑马鱼肝脏均无影响;漆树、油茶和夹竹桃寄主桑寄生水提取物中、高剂量浓度组的斑马鱼肝脏形态有明显变化,肝脏荧光面荧光面积减小( $P < 0.05, P < 0.01$ ),而低剂量浓度组的斑马鱼肝脏形态及肝脏荧光面荧光面积均无明显变化,表明漆树、油茶和夹竹桃寄主桑寄生水提取物中、高浓度对斑马鱼影响明显,低浓度对斑马鱼无影响;柳树和苦楝寄主桑寄生水提取物低、中、高剂量浓度组的斑马鱼肝脏形态有明显变形,肝脏荧光面积均减小( $P < 0.05, P < 0.01$ ),表明柳树和苦楝寄主桑寄生水提取物低、中、高浓度对斑马鱼肝脏影响显著。结果表明,除桑树寄主桑寄生外,其他5种寄主桑寄生水提取物的斑马鱼均发生了不同程度肝脏损伤,有一定的肝损伤。见表1,图2。

**3.3 不同寄主桑寄生对斑马鱼ALT和AST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,桑树桑寄

表1 不同寄主桑寄生水提物对斑马鱼肝脏荧光面积的影响  
( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of aqueous extracts Taxilli Herba from different of host trees on zebrafish liver fluorescence area ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	肝脏荧光面积/μm <sup>2</sup>
空白		20 371.41±602.45
对乙酰氨基酚	1.00	13 340.74±2 371.04 <sup>2)</sup>
桑树寄主桑寄生	0.35	20 895.77±1 729.24
	0.50	19 668.15±1 558.13
	0.70	21 044.35±781.43
漆树寄主桑寄生	0.30	19 992.91±824.19
	0.50	16 305.67±2 722.83 <sup>2)</sup>
	0.60	14 289.49±1 387.55 <sup>2)</sup>
油茶寄主桑寄生	0.18	20 065.93±1 446.39
	0.30	16 802.08±1 600.89 <sup>2)</sup>
	0.35	16 071.19±2 255.04 <sup>2)</sup>
柳树寄主桑寄生	0.14	18 061.58±3 466.59 <sup>2)</sup>
	0.20	16 770.08±2 463.76 <sup>2)</sup>
	0.28	16 090.12±2 921.27 <sup>2)</sup>
苦楝寄主桑寄生	0.04	18 341.93±1 797.11 <sup>2)</sup>
	0.06	17 667.47±1 864.14 <sup>2)</sup>
	0.08	14 421.97±2 636.92 <sup>2)</sup>
夹竹桃寄主桑寄生	0.04	21 502.88±2 191.46
	0.05	16 350.05±2 415.87 <sup>1)</sup>
	0.07	15 280.26±3 099.35 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表2同)。

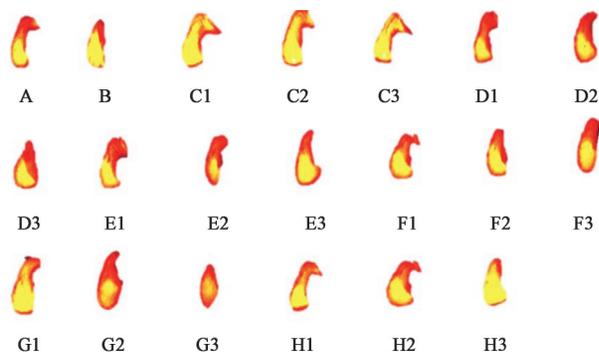


图2 不同寄主桑寄生水提物对斑马鱼肝脏形态的影响  
A. 空白组; B. 对乙酰氨基酚组; C1~C3. 桑树寄主桑寄生(0.35, 0.50, 0.70 g·L<sup>-1</sup>)组; D1~D3. 漆树寄主桑寄生(0.30, 0.50, 0.60 g·L<sup>-1</sup>)组; E1~E3. 油茶寄主桑寄生(0.18, 0.30, 0.35 g·L<sup>-1</sup>)组; F1~F3. 柳树寄主桑寄生(0.14, 0.20, 0.28 g·L<sup>-1</sup>)组; G1~G3. 苦楝寄主桑寄生(0.04, 0.06, 0.08 g·L<sup>-1</sup>)组; H1~H3. 夹竹桃寄主桑寄生低(0.04, 0.05, 0.07 g·L<sup>-1</sup>)组

Fig. 2 Effect of aqueous extracts Taxilli Herba from different of host trees on zebrafish liver morphology

生桑寄水提物低、中、高剂量浓度组的斑马鱼体内的ALT活性均降低( $P<0.05, P<0.01$ ),表明桑树寄主桑寄生水提物低、中、高浓度对斑马鱼肝脏均无损伤;漆树、柳树、和夹竹桃寄主桑寄生水提物低剂量浓度组的斑马鱼体内的ALT,AST活性降低( $P<0.05, P<0.01$ ),漆树、油茶、柳树和夹竹桃寄主桑寄生水提物中、高剂量浓度组的斑马鱼体内的ALT,AST升高( $P<0.05, P<0.01$ ),表明漆树、油茶、柳树和夹竹桃寄主桑寄生水提物中、高浓度对斑马鱼肝脏均有损伤,低浓度对斑马鱼肝脏均无损伤;苦楝寄主桑寄生水提物低、中、高剂量浓度组的斑马鱼体内的ALT,AST活性升高( $P<0.01$ ),表明苦楝寄主桑寄生水提物低、中、高浓度对斑马鱼肝脏均有损伤。结果表明,除了桑树寄主桑寄生没有出现肝脏毒性反应外,漆树、油茶、柳树、苦楝和夹竹桃寄主桑寄生随着药物浓度的提升,都不同程度地对斑马鱼产生肝损伤反应,其中苦楝寄主桑寄生引起肝损伤最为明显。见表2。

表2 不同寄主桑寄生水提物对斑马鱼ALT,AST的活性影响  
( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effects of aqueous extracts of Taxilli Herba from different of host trees on ALT and AST activity in zebrafish ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	ALT /U·g <sup>-1</sup>	AST /U·g <sup>-1</sup>
空白		34.98±1.65	33.12±1.07
对乙酰氨基酚	1.00	58.85±1.22 <sup>2)</sup>	56.61±1.38 <sup>2)</sup>
桑树寄主桑寄生	0.35	27.16±1.27 <sup>2)</sup>	28.88±0.45 <sup>2)</sup>
	0.50	28.62±2.36 <sup>1)</sup>	32.97±1.72
	0.70	30.53±0.83 <sup>1)</sup>	32.50±0.63
漆树寄主桑寄生	0.30	19.92±0.87 <sup>2)</sup>	19.79±0.27 <sup>2)</sup>
	0.50	39.44±1.09 <sup>1)</sup>	35.14±0.79 <sup>1)</sup>
	0.60	45.36±1.77 <sup>2)</sup>	41.09±1.06 <sup>2)</sup>
油茶寄主桑寄生	0.18	29.07±0.77 <sup>1)</sup>	30.26±2.17
	0.30	39.23±2.51	36.33±0.49 <sup>1)</sup>
	0.35	40.33±1.35 <sup>1)</sup>	38.53±1.83 <sup>1)</sup>
柳树寄主桑寄生	0.14	27.52±1.34 <sup>2)</sup>	26.13±0.55 <sup>2)</sup>
	0.20	39.95±1.07 <sup>1)</sup>	40.14±1.23 <sup>2)</sup>
	0.28	62.55±0.59 <sup>2)</sup>	50.26±1.27 <sup>2)</sup>
苦楝寄主桑寄生	0.04	49.14±0.79 <sup>2)</sup>	43.40±1.92 <sup>2)</sup>
	0.06	57.81±2.09 <sup>2)</sup>	53.17±1.39 <sup>2)</sup>
	0.08	68.99±4.48 <sup>2)</sup>	59.51±5.09 <sup>2)</sup>
夹竹桃寄主桑寄生	0.04	30.49±1.55 <sup>1)</sup>	25.17±3.54 <sup>1)</sup>
	0.05	44.83±1.01 <sup>2)</sup>	35.15±1.00
	0.07	51.19±1.12 <sup>2)</sup>	49.24±6.56 <sup>1)</sup>

#### 4 讨论

斑马鱼为鲤科短担尼属的一种热带硬骨鱼,其基因与人类具有高度的同源性,且对药物的反应与人的临床反应类似,并具有个体小、繁殖量大、实验周期短等优势,已成为毒理学评价的重要模型动物<sup>[16-18]</sup>。克服了体外实验方法不能准确预测中药在体内生物学特性与传统的哺乳动物模型成本高、时间长、灵敏度有限等问题,斑马鱼被越来越多地用于单味中药或复方中药的毒理学评价研究工作<sup>[19-21]</sup>。

桑寄生属于半寄生植物药材,其基源植物广寄生具有叶绿素,能光合作用合成有机物,但需要从寄主获取水分和无机盐等<sup>[22]</sup>,在自然条件下其寄主植物种类具有复杂的生物学特征。大量研究表明,寄主不仅通过影响水分和无机盐供应来影响桑寄生的生长发育,而且会通过向桑寄生转移寄主的特征性成分影响药材质量<sup>[23]</sup>,特别是有毒寄主的有毒成分向桑寄生转移对药材安全性造成影响,在古代人们往往通过寄主命名方式来规避不同寄主桑寄生的误采误用<sup>[24]</sup>。2020年版《中华人民共和国药典》记载桑寄生为多寄主来源药材,要求对桑寄生进行强心苷排除性检查,以实现对药材的安全性控制,而自然界还有许多含非强心苷类有毒物质的植物可能成为桑寄生寄主,影响桑寄生的用药安全。因此,加强对不同寄主桑寄生的安全性评价具有重要的现实意义。

本研究用斑马鱼模型对桑树、柳树、油茶、漆树、苦楝及夹竹桃6种不同寄主桑寄生进行急性毒性和肝损伤研究,探讨寄主对桑寄生毒性影响。对6种寄主桑寄生水提物的半数致死浓度 $LC_{50}$ 研究发现,寄主不同,桑寄生的 $LC_{50}$ 存在明显差异, $LC_{50}$ 由高到低依次为桑树、漆树、油茶、柳树、苦楝及夹竹桃寄主桑寄生, $LC_{50}$ 最大为桑树寄主桑寄生, $LC_{50}$ 最小为夹竹桃寄主桑寄生,最大值是最小值的14倍,从 $LC_{50}$ 可以看出,桑寄生的毒性与寄主密切相关。

ALT和AST是反映肝脏功能重要指标,ALT和AST主要分布在肝细胞浆和肝细胞线粒体中,当肝脏损伤时,氨基转移酶流入血液导致血液中的ALT和AST活性升高<sup>[25]</sup>。对6种寄主桑寄生水提物的肝脏毒性研究发现除桑树寄主之外,其他5种寄主桑寄生均对斑马鱼的肝脏产生不同程度肝损伤。与空白组比较,桑树寄主桑寄生水提物低、中、高剂量浓度组对斑马鱼的肝脏形态和荧光面积无明显变化,ALT和AST活性没有升高,表明桑树寄主桑

寄生无肝损伤;漆树、油茶和夹竹桃寄主桑寄生水提物中、高剂量浓度组对斑马鱼的肝脏形态改变,荧光面积减小,ALT和AST活性升高,低剂量浓度组斑马鱼的肝脏形态和荧光面积无明显变化,ALT和AST活性也没有升高,表明漆树、油茶和夹竹桃寄主桑寄生水提物中、高剂量浓度会有一定的肝损伤,低浓度无肝损伤;柳树寄主桑寄生低、中、高剂量浓度组对斑马鱼的肝脏形态改变,荧光面积减小,中、高剂量浓度组ALT和AST活性升高,而低剂量浓度组的ALT和AST没有升高,表明柳树寄主桑寄生中、高浓度有肝损伤,低浓度肝可能有一定的肝损伤;苦楝寄主桑寄生水提物低、中、高剂量组对斑马鱼的肝脏形态改变,荧光面积减小,ALT和AST活性升高,表明苦楝寄主桑寄生有较强的肝损伤。

综上,桑寄生的毒性与寄主密切相关,其毒性的有无或强弱具有寄主依赖性,其中桑树寄主桑寄生无肝损伤,漆树、油茶、柳树、苦楝及夹竹桃5种不同寄主桑寄生都不同程度表现出一定的肝损伤,规范寄主来源将可能成为实现桑寄生用药安全的重要举措。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:312.
- [2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:24卷[M]. 北京:科学出版社,1988:131.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:1970,1973.
- [4] 朱开听,卢栋,裴河欢,等. 桑寄生在广西的分布及其寄主状况调查[J]. 广西中医药,2010,33(2):59-61.
- [5] 李时珍. 本草纲目(下册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:2158-2159.
- [6] 唐慎微. 证类本草[M]. 尚志钧,校点. 北京:华夏出版社,1993:359-360.
- [7] 黄蜚颖,刘人源,苏本伟,等. GC-MS分析来自不同药性寄主的桑寄生挥发性成分[J]. 亚太传统医药,2019,15(10):61-66.
- [8] LIU R Y, SU B W, HUANG F Y, 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.

- [9] 赵明惠,李静,苏本伟,等.四种不同寄主植物对桑寄生毒性影响的规律性分析[J].临床合理用药杂志,2017,10(27):84-85.
- [10] 伍朝箐,章观德.马桑寄生及马桑子中内酯成分分析方法的研究[J].药学学报,1984,19(1):56-61.
- [11] 周汉华,刘晓龙,钱海兵,等.不同寄主上的桑寄生药材毒性的比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(24):274-277.
- [12] 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.
- [13] 袁文琳,黄峥蕊,肖思佳,等.山豆根黄酮类成分对斑马鱼的急性毒性研究[J].中草药,2021,52(10):2978-2986.
- [14] 刘艺,王瑞昕,游龙泰,等.芦荟大黄素诱导斑马鱼肝毒性及作用机制研究[J].环球中医药,2020,13(1):18-22.
- [15] 庄开颜,高硕,柳晴,等.基于斑马鱼模型和网络药理学的甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性作用与机制研究[J].药物评价研究,2021,44(7):1368-1376.
- [16] KIM Y C, LEE S R, JEOH H J, et al. Acute toxicities of fluorene, fluorene-1-carboxylic acid, and fluorene-9-carboxylic acid on zebrafish embryos (Danio rerio): molecular mechanisms of developmental toxicities of fluorene-1-carboxylic acid[J]. Chem, 2020, 260: 127622.
- [17] LI M, LIU J, LIU D, 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] 王明亮,丁永芳,印鑫,等.斑马鱼在毒理学中的应用研究进展[J].中国实验动物学报,2020,28(3):390-396.
- [19] 张明哲,陈章美,邓家刚,等.基于斑马鱼模型的交泰丸安全性评价[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(18):51-57.
- [20] 李佳妍,刘欣欣,宁青,等.基于斑马鱼模型的补骨脂毒性相关成分群的高效辨识研究[J].中草药,2021,52(1):129-136.
- [21] 袁文琳,黄峥蕊,肖思佳,等.山豆根黄酮类成分对斑马鱼的急性毒性研究[J].中草药,2021,52(10):2978-2986.
- [22] 李振双,杨富成,王胜坤,等.半寄生植物寄生机理及其应用研究[J].温带林业研究,2018,1(1):30-36.
- [23] 刘人源,黄蜚颖,郭敏,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的夹竹桃寄主及其桑寄生强心甘成分相关性研究[J].中国中药杂志,2019,44(11):2283-2291.
- [24] 柴子舒,刘人源,李立章,等.中药桑寄生使用与存在问题及对策研究[J].中华中医药杂志,2020,35(4):2066-2069.
- [25] 安晓敏,凯赛尔·托呼提,张翠丽,等.二烯丙基二硫对D-氨基半乳糖/脂多糖所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].毒理学杂志,2021,35(2):135-139.

[责任编辑 张丰丰]