

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.

Wang ML, Ding YF, Yin X, et al. Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 390-396.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.015

斑马鱼在毒理学中的应用研究进展

王明亮^{1,2}, 丁永芳^{1,2}, 印鑫^{1,2}, 邵久针^{1,2}, 庄子锐^{1,2}, 张婷^{1,2}, 苏鹏亮^{1,2}, 彭蕴茹^{1,2*}

(1. 江苏省中医药研究院, 南京 210028; 2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 南京 210028)

【摘要】 药物毒性在很大程度上影响了新药的发现与应用, 模式生物斑马鱼被越来越广泛地应用于药物毒理学研究。本文对斑马鱼模型在药物毒性研究(心脏毒性、肝毒性、肾毒性、神经毒性、遗传和跨代毒性以及致畸毒性)中的应用进展进行综述, 并总结其相关优势及不足, 为斑马鱼模型进一步应用于药物毒性的发现提供依据。

【关键词】 斑马鱼; 药物毒性; 毒理学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 03-0390-07

Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology

WANG Mingliang^{1,2}, DING Yongfang^{1,2}, YIN Xin^{1,2}, SHAO Jiuzhen^{1,2}, ZHUANG Zirui^{1,2}, ZHANG Ting^{1,2},
SU Pengliang^{1,2}, PENG Yunru^{1,2*}

(1. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China.

2. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028)

Corresponding author: PENG Yunru. E-mail: pengyunru@126.com

【Abstract】 Drug toxicity has, in significant measure, affected the discovery and application of new pharmaceutical drugs. Zebrafish have been increasingly used as a biological model in drug toxicology research. Here, we reviewed the application of the zebrafish model in drug toxicity research in a number of fields (including cardiotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, neurotoxicity, genetic and intergenerational toxicity, and teratogenic toxicity). The relative advantages and disadvantages were summarized, thus providing a basis for further application of the zebrafish model in drug toxicity research.

【Keywords】 zebrafish; drug toxicity; toxicology

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

药物毒性是药物研发面临的主要问题之一,也是药物导致发病以及死亡的主要原因,在很大程度上限制了药物的发现与应用^[1]。在大多数常规临床前实验中,药物接触到的都是近亲繁殖的动物,数量可能还不到1000只,这限制了实验中独立基因型的数目,不利于发现许多基因依赖型的药物不良反应事件。而每条雌性斑马鱼1次能产生200~300个卵,可以将其放入96或384孔板中进行培

养,斑马鱼胚胎能够依靠卵黄囊中的营养存活,这使得即便是一个小的实验室也可以达到成千上万,甚至上千万的培养规模^[2]。斑马鱼实验与细胞实验均可以达到相近的数量规模,且斑马鱼作为一个完整的有机体,又能够对药物进行吸收、代谢、分布、排泄,可以用于研究器官间的相互作用以及免疫反应等。所以近年来斑马鱼的应用十分广泛,本文将对于斑马鱼在毒理学中的应用进行综述。

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81774178, 81373888, 81102884)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81774178, 81373888, 81102884).

【作者简介】 王明亮(1996—),男,在读研究生,研究方向为中药药理学。Email: 1812178867@qq.com

【通信作者】 彭蕴茹,女,研究员,硕士研究生导师,主要研究方向为中药作用机制与体内过程。Email: pengyunru@126.com

1 斑马鱼

斑马鱼是一种脊椎动物,斑马鱼基因与人类基因组相比同源性达 70%,人类疾病相关基因有 82% 能在斑马鱼中找到同源基因,全基因组相似性达 87%^[3]。斑马鱼本身对水质要求并不高,pH 在 6.5 ~ 7.5 之间,温度则在 28.5℃ 左右,水中含氧量 60% ~ 90% 饱和度;14 h 光照/10 h 黑暗循环对繁殖期的斑马鱼产卵有利。斑马鱼的胚胎在 72 h 左右除胃肠道之外的器官基本发育完成,96 h 左右全部器官发育完成,3 个月左右达到性成熟;由于斑马鱼生长发育周期比啮齿类动物短,缩短了进行动物实验需要的时间。成年鱼体约 3 ~ 4 cm,一条雌性斑马鱼一次可以产下 200 ~ 300 颗卵,斑马鱼的胚胎仅 1 mm 左右,在受精后的 72 h 内具有光学透明性,使得其可以在不用杀死动物的情况下对器官的形态功能进行连续的检测。鱼体小,数量大,可以活体观察,令实验可以连续的获取大量信息,并且花费没有啮齿类动物那么昂贵。此外斑马鱼胚胎容易从周围吸收小分子介质(酒精、尼古丁和布洛芬等化合物),对于微量小分子的毒性测试更为便捷^[2, 4]。当药物十分贵重或不易获得时,相对于细胞检测,斑马鱼作为一个完整的生命体对于药效或毒性的检测更具有说服力。在完成斑马鱼基因组计划后,斑马鱼的 cDNA 文库也均可以免费使用,这使得斑马鱼可提供大量的数据进行分析,尤其适用于高通量筛选作用靶点和药物毒性成分。斑马鱼本身也存在局限性,常用的斑马鱼给药是将药物溶解在水中,这对于研究水溶性差的药物则给药量可能达不到相应的暴露剂量,限制了对于药物筛选和毒性检测的范围;此外,由于斑马鱼生活在药物处理的水中,可能会产生一些独特的区别于哺乳类动物的反应^[5]。

通过 PubMed 检索“zebrafish”发现近 3 年,斑马鱼的文献数量年均 3000 左右,采用斑马鱼的研究主要集中在发育系统,肝以及神经系统方面,文献数量相比较于 2000 年已经翻了近 5 倍,这也间接表明了斑马鱼作为实验动物的潜力^[5]。

2 斑马鱼在毒理学中的应用

斑马鱼在药物毒性筛选方面具有显著的优势,在毒性检测中斑马鱼与哺乳动物的评价一致性达到 55% ~ 100%,在已知的胎儿毒性筛选中,大鼠检

测出 79%,小鼠检测出 75%,兔子检测出 75%,然而在大鼠,小鼠和兔子之间的一致性也只是 56%,这表明斑马鱼和哺乳动物的一致性大体相同,支持斑马鱼在毒理学中的应用^[6]。但是由于斑马鱼的鱼体小,单个斑马鱼样本无法进行检测,只能收集足够多的样本后进行集中处理检测,这是斑马鱼的不足同时也是其优势所在,体积小使得其可以达到相当于细胞培养的规模,又能提供完整的生物有机体代谢反应,使得斑马鱼检测毒性的结果是基于大量的动物体实验获得的,更加具备说服力。

值得注意的是斑马鱼胚胎对于药物毒性的敏感性还在一定程度上高于哺乳动物,Alzualde 等^[7]在分析阻燃剂毒性时,通过生物检测(人类血浆,乳液等)和高通量毒代动力学模型,预估阻燃剂(BDE47 等)在人类血浆中的浓度,对比得到斑马鱼体内最低有效水平(the lowest effective levels, LELs),发现阻燃剂在斑马鱼体内暴露水平(> 1 $\mu\text{mol/L}$)高于人体水平(< 1 $\mu\text{mol/L}$),进一步表明斑马鱼胚胎对于一些低毒或者毒性表现不明显的药物毒性检测具有显著意义。与直接对比斑马鱼培养液中的浓度相比,对比斑马鱼体内浓度与人类血浆浓度,结果更有说服力。但是 Alzualde 等^[7]对斑马鱼体内药物浓度进行检测时,是将斑马鱼幼体收集起来,集中采用 UPLC/MS 进行药物浓度的检测,以每个幼体(受精后 4 d 的斑马鱼幼体)0.4 μL 的体积来估算斑马鱼的体内浓度,这个方法解决了一部分斑马鱼用药剂量与人类血药浓度关联性的问题,但是完全忽略了个体差异以及药物在体内分布差异,获得的仅是药物体内浓度的平均数,所以在使用斑马鱼时需要更多地考虑到药物剂量与临床数据转化方面的问题,增加相关方面的研究,解决了这个问题将极大地扩展斑马鱼在药理毒理实验中的应用。

2.1 心脏毒性

心脏祖细胞在斑马鱼受精后 5 h 左右形成,48 h 左右形成瓣膜,胚胎心率每分钟 140 ~ 180,比起小鼠(每分钟 300 ~ 600 次)更接近于人类正常胎心率(每分钟 130 ~ 170 次)^[8]。在受精后 48 h 内,斑马鱼的心脏电生理和收缩生理与成年人相似,正常斑马鱼心脏电生理对钙电流的最初依赖在 1 ~ 2 d 内被一个更全面的系统(离子电流)所取代,而离子电流是成人心脏电生理的重要代表^[9-10],因此比起啮齿类动物,斑马鱼的心脏电生理与人类更为

接近。在受精后 48 h 内斑马鱼的心脏就具有复杂的离子通道和功能代谢^[2], 比起人类胎儿在 15 ~ 16 d 心脏祖细胞形成和 28 d 左右心脏形成瓣膜, 斑马鱼发育周期要明显比人类短, 但是早期发育情况及细胞形态与人类十分接近, 使斑马鱼进行心脏方面的研究更节约时间、更便捷^[4]。而斑马鱼心脏结构与人类不一致的是, 斑马鱼的心脏由瓣膜分隔为一个心房和一个心室, 而人类的心脏由瓣膜和隔膜分隔为四个腔室。虽然心脏结构不一致, 但是斑马鱼与人类心脏发育的细胞和分子机制均高度保守, 并且在 48 h 内可以直接通过光学显微镜对斑马鱼进行观察, 记录心脏的发育过程, 血液流动变化等情况^[4, 11]。心脏荧光转基因(*cmlc2:GFP*)斑马鱼的应用使得对于成年/较厚较老的鱼体的心脏形态和结构观察更清晰, 进一步扩大了斑马鱼的应用^[12]。

QT 期延长是在新药开发过程中常见的一种心脏毒性, Milan 等^[9]研究了一种高通量检测药物导致心动过缓的方法, 检测了 100 种药物, 发现了 23 种药物(其中 22 种会导致人类 QT 期延长)导致了斑马鱼 QT 期延长; 此外该方法还能检测药物与药物间(红霉素和西沙必利, 西咪替丁和特非那定)相互作用产生的心脏毒性。在研究尼古丁暴露对心脏功能的影响时, 采用斑马鱼胚胎接触不同浓度(5 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$)的尼古丁后检测心率, 结果与小鼠及绵羊动物模型相似, 尼古丁暴露对心脏功能表现出剂量依赖效应, 低剂量时引起心动过速, 高剂量时引起心动过缓^[13-14]。Park 等^[15]发现暴露于 15 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ 氟虫脲的斑马鱼胚胎产生了畸形的眼和心脏, 卵黄囊水肿等病理情况, 进一步研究发现细胞周期调控基因 *cyclin D1* (*ccnd1*), *ccne1*, *cyclin-dependent kinase 2* (*cdk2*) 和 *cdk6*, 血管生成相关基因 *vascular endothelial growth factor Aa* (*vegfaa*), *vegfc*, *fms-related tyrosine kinase 1* (*flt1*) 和 *flt4* 均受到抑制, 证明氟虫脲有抑制发育和心血管生成的毒性作用, 并且这一结果得到了体外血管生成模型(人脐静脉内皮细胞, HUVECs)的进一步验证。证明斑马鱼无论在发育时间, 心脏的生理特性, 还是相关基因靶点的调控, 均与人类相似, 在药物心脏毒性及毒性机制的研究上均有很大的应用前景。

2.2 肝毒性

除肝中的常驻巨噬细胞(枯否细胞)外, 哺乳类动物肝中的所有细胞均能在斑马鱼中找到相对应的存在^[16]。斑马鱼肝在受精后 28 h 左右开始发育

时, 其生长因子以及基因表达与人类和啮齿类动物相似, 在 78 h 时肝发育基本完成, 并具有肝的基本功能^[17-18]。但是斑马鱼肝的结构与哺乳动物不一致, 斑马鱼的肝实质不是由胆总管、门静脉和肝动脉组成的, 而是随机分布的; 哺乳动物的肝细胞呈板状排列, 而斑马鱼的肝细胞呈小管状排列, 这些小管形成运输胆汁的通道, 形成肝内胆管^[19]。

在进行药物毒性检测时, 有些药物本身并没有毒性, 但是在肝代谢后产生的物质对于机体会产生毒性, 这使得用细胞检测这部分药物毒性时会出现假阴性的情况, 肝中的细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 则是肝中代谢的主要承担者^[19]。在斑马鱼体内的细胞色素体系与人类和啮齿类十分相似, 布洛芬在人体内是通过 CYP2C8/9 亚型催化代谢为羟化布洛芬, 在给予斑马鱼胚胎布洛芬后, 可在水体中以及胚胎体内提取到羟化布洛芬, 表明斑马鱼体内有类似于人体的 CYP2C8/9 体系^[19-20]。此外在镉(Cd^{2+})和 2,3,7,8-四氯二苯并对二噁英(TCDD)对水生生物毒性的研究中^[21], 发现 10% ~ 100% LC50 (LC50 = 126 μM) 浓度 Cd^{2+} 以及 3 ~ 30 nmol/L 浓度 TCDD 对斑马鱼的 CYP1A1 的表达有影响, 且雌性斑马鱼的 CYP1A1 基因表达量高于雄性斑马鱼。在使用已知的肝毒性药物时(如四环素, 阿司匹林, 红霉素, 环孢素 A, 胺碘酮, 对乙酰氨基酚等), 发现斑马鱼检测出的结果表现出与人类巨大的一致性; 研究表明对于外来的化学物质, 斑马鱼与人类一样具有酶诱导和氧化应激反应, 具有与哺乳类动物同系的脂质代谢酶, 包括 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A, PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 等^[5, 22-23]。总体而言, 斑马鱼对药物的代谢与人类十分相似, 可以作为一个良好的肝毒性检测模型, 斑马鱼的光学透明性还使其可以采取荧光染色观察脂质体的运动, 在进行一定的肝特异型诱导表达模型后, 也可以直观地观察到肝的发生、发育、肝毒性药物的作用动态情况或疾病的进展, 张力等^[24]用重组质粒 *pfabp10-rtTA* 联合 *pTRE-Tight-BI-AcGFP1* 构建了一个四环素诱导肝特异表达绿色荧光蛋白的斑马鱼模型, 可以在 30 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素诱导下在肝位置表达荧光蛋白, 为研究肝脏相关疾病提供了良好的斑马鱼模型。

2.3 肾毒性

胚胎期的斑马鱼肾与人类有很高的同源性, 并且发育周期短, 斑马鱼的肾在受精后 14 h 开始发

育,在 72 h 内肾发育完成,许多在人体中能产生肾毒性的药物在斑马鱼中都能得到相似的结果^[25]。Gorgulho 等^[26]利用庆大霉素、扑热息痛和替诺福韦 10%致死浓度来评价斑马鱼肾小管毒性模型有效性,结果表明扑热息痛的代谢是通过与谷胱甘肽结合和氧化来完成的。庆大霉素和扑热息痛可降低肾清除率,扑热息痛和替诺福韦会扩大近端小管,这三个药物都会引起线粒体改变,包括畸形形状、线粒体肿胀、嵴破坏和/或基质颗粒丢失。这些结果与庆大霉素、扑热息痛和替诺福韦对人的管状效应一致,表明斑马鱼幼鱼可能是评估与药物性肾损伤相关的功能和结构损伤的良好模型。此外,Judith 等^[1]利用扑热息痛、替诺福韦和替诺福韦酯 10%致死浓度处理斑马鱼胚胎,分析其代谢产物发现腺苷和色氨酸与对乙酰氨基酚毒性作用有关,黄嘌呤和氧化谷胱甘肽与替诺福韦的毒性作用相关,可能是这些代谢产物影响了线粒体,诱导了肾小管损伤。王雪等^[25]采用 Tg(*wt1b*:GFP)转基因斑马鱼(即在前肾的肾小球、前肾管及近端前肾弓区域表达绿色荧光蛋白)研究马兜铃酸 A 的肾毒性,发现 40 ~ 80 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸 A 处理后斑马鱼的肾小球及前肾管上皮细胞结构紊乱,排列疏松;qPCR 检测发现 20 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸 A 处理 24 h 后 *nephrin* (*nephrin* 蛋白表达于肾小球足细胞,与裂孔隔膜的形成相关)表达显著降低,表明马兜铃酸 A 造成蛋白尿的原因可能是由于损伤了肾小球足细胞。证实斑马鱼是研究药物对于肾毒性作用的良好模型,并可以利用斑马鱼模型进一步研究药物肾毒性的作用机制。

2.4 神经毒性

神经毒物的基本作用可以通过破坏神经分化、增殖、迁移、生长、突触形成和神经回路发育来实现^[27]。用斑马鱼研究神经毒性时,除了观察捕食、游泳、刺激活动等常规活动之外,还可以检测成瘾、焦虑、攻击性、学习/记忆、运动、社会反应、反掠夺性行为 and 配偶选择等行为特征^[27]。例如 ASD (Autism spectrum disorder, ASD) 患者模型,各种斑马鱼基因修饰模型(单基因突变模型如 *MECP2*, *AUTS2*, *CHD8* 等)均能够表现出与 ASD 患者相似的社交障碍及刻板行为^[28]。胎儿酒精综合征会产生对于身体以及认知的特异性异常,包括注意力不集中,记忆力和认知缺陷等,这点在人类^[29]、啮齿类动物^[30]以及斑马鱼^[31]身上均得到验证,并且胚胎酒精暴露处理后,在很低的剂量下就会对大脑发育

产生影响。在一项研究中^[31]发现暴露于 3 ~ 300 mmol/L 酒精中的斑马鱼胚胎,在成年后进行的交替实验(动物在给予刺激后作出交替反应,是一种用于检测动物学习能力的实验)中,与未暴露于酒精的斑马鱼相比,即便是暴露于低剂量酒精(10 mmol/L)的斑马鱼犯错也明显增多,酒精浓度越高斑马鱼在空间交替实验中犯错越多,呈剂量依赖性。Nam 等^[32]研究红参对感觉神经损伤时,用四氧嘧啶(浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 300 $\mu\text{mol/L}$, 500 $\mu\text{mol/L}$)处理斑马鱼胚胎,造成糖尿病神经肥大斑马鱼模型(Alloxan-induced diabetic neuromast, AIDN),其中 O1 (Otic 1 hair cell, O1), L1 (Lateral neuromast 1, L1), L4 及终端神经丘随时间和剂量呈下降趋势,用红参治疗后可能通过增加 *trkA*、TRPV1 和 p-MAPK 的表达促进神经生长因子(NGF)通路改善 AIDN 造成的损伤。Leung 等^[33]通过无偏倚的、全脑范围的活动记录,结合对眼球运动、肌肉动态和心率的评估,证明斑马鱼至少有两种主要的睡眠特征,与哺乳类动物的快波睡眠及慢波睡眠相近,表明人类可能在 4.5 亿年前就出现了睡眠神经信号;Oikonomou 等^[34]发现斑马鱼和小鼠睡眠的开始与维持均与中缝对 5-羟色胺产生的基因消除相关,解决了 5-羟色胺对睡眠影响的争议。转基因斑马鱼模型还可以应用于抑郁症、焦虑症、帕金森氏病、阿尔兹海默症、亨廷顿氏舞蹈病等相关精神疾病的研究^[35-36],表明斑马鱼十分适用对神经毒性及其毒性机制的研究,并且已经有许多成熟的测试神经方面行为特征的方法。

2.5 多代和跨代毒性

多代和跨代毒性研究是指生物对外源物质接触后对该生物后代(在后代没有接触该外源物质的情况下)的影响,表观遗传改变被认为是遗传毒性的主要机制,遗传细胞 DNA 甲基化被认为是主要原因,而许多涉及多代和跨代毒性的物质并不是基因毒性的^[6]。多代毒性研究观察最初接触外源物质的几代人,是否可以观察到毒性效应,无论其是否成年;在跨代毒性研究中,则是在这几代人(初代接触后)中并没有接触到该外源物质的情况下,观察是否产生毒性效应^[6]。在表观遗传学研究中,斑马鱼是一种合适的脊椎动物模型,因为与哺乳动物具有相似的 DNA 甲基化模式,并且表现出 DNA 甲基化和其他表观遗传途径的保守性^[37]。斑马鱼可进行体外受精,并且性成熟仅需 3 ~ 4 个月左右,可以

进行相对较短时间的“传代”,又可大规模地进行观察,且斑马鱼属于体外受精,受精后直接暴露于斑马鱼胚胎意味着 F0 代直接暴露,同时直接发育的胚胎即为 F1 代,则 F2 代是第一个完全没有暴露的后代,与哺乳类动物 F3 代(完全未暴露)有一定的差异^[38]。对于多代和跨代毒性研究十分适用。在将受精后 6 ~ 120 h 的斑马鱼胚胎暴露于 5 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 苯并芘中,在无化学物质的水中培养直至成年,研究苯并芘暴露对斑马鱼 3 代的影响^[39],F0 和 F2 幼体表现为运动功能亢进、心跳减慢和线粒体功能减退;F2 代的斑马鱼性别特异性体重指数(BMI)增加、耗氧量增加和过度回避行为,表明暴露于苯并芘会导致神经行为和生理缺陷的跨代遗传。此外在发育过程中苯并芘暴露导致野生型斑马鱼的整体 DNA 甲基化水平降低,DNA 甲基化转移酶的表达普遍降低,而后者作用在 AHR2^{null}背景下基本逆转。赵维超等^[40]在研究 γ 射线辐照对人体的影响时,采用 0.01 ~ 1.0 Gy 的 γ 射线辐照受精后 5 h 的斑马鱼胚胎,发现大于 0.1 Gy 的辐照剂量时胚胎的存活率,孵化率都显著低于对照组,致畸率则显著升高,呈剂量依赖性;在 0.01 Gy 时 DNA 出现损伤,剂量增大时损伤也加剧。Kamstra 等^[41]发现在受精后 0 ~ 6 d 斑马鱼胚胎直接接触 5-氮杂胞苷(5-AC),对后代的幼体长度有影响,并且在 F1 和 F2 代斑马鱼成年精子样本中检测发现 6 个位点存在甲基化差异;对于 MEHP (Mono (2-ethylhexyl) phthalate, MEHP)则发现在 F1 和 F2 代中有两个甲基化位点存在差异,证实了 5-AC 与 MEHP 的 DNA 甲基化跨代影响。这证明斑马鱼模型在多代和跨代遗传毒性及机制研究中的应用价值。

2.6 致畸毒性

斑马鱼从受精到各个器官发育基本完成只需要 96 h 左右,再到出生成为幼鱼,只需要几天就基本完成胚胎发育,相比较于啮齿类动物妊娠 21 d 左右,缩短了观察时间,此外在一系列模型中对致畸性的小规模研究表明,斑马鱼的致畸效果与包括人类在内的其他模型中观察到的效果之间存在良好的相关性^[2]。并且斑马鱼胚胎的体外发育,光学透明性以及体积小,使得观察斑马鱼胚胎发育十分简便。但是与之相对应的是斑马鱼胚胎的发育离开了雌性斑马鱼的子宫,也就是失去了胎盘作为子代与母亲的联系,使得一些本可以通过母体进入子代的抗体等免疫物质不能进入,这也是一个影响因

素,不过这不影响斑马鱼作为一个研究致畸毒性的良好模型。Kawada 等^[42]用浸泡过羽毛和羽绒材料的无菌水培养正常斑马鱼胚胎(受精 5 h 后),72 h 后发现斑马鱼出现尾部的弯曲,短缺以及心包水肿的现象,通过转基因斑马鱼 Tg(*mpeg1*:EGFP,巨噬细胞 EGFP)发现羽毛和羽绒材料能够使得斑马鱼尾鳍中巨噬细胞的含量增加,表明这些样本在人类中使用可能会导致炎症。这证明斑马鱼胚胎毒性检测是一个合适的致畸实验的替代模型,具有足够高的灵敏性以及实施的方便性,此外实验斑马鱼的费用可能只有啮齿类动物的 1/500~1/1000,有足够的经济效益,使用荧光蛋白标记的斑马鱼还能够检测一些低毒性药物,能够显示出具体的表型。

2.7 其他

在斑马鱼受精后的第 4 ~ 5 天左右,肠道收缩能力开始显现,可用于定量估计药物对于肠道运动的影响^[2, 43]。斑马鱼还可以用少量的二乙基亚硝胺(DEN)等物质诱导癌症的发生,作为研究癌症的模型;斑马鱼的基因组已经测序完成,并且有许多基因工具可以进行使用;相比于啮齿类动物用药需要几克几十克,斑马鱼的用药量可以控制在微克或毫克级别,用量十分小,可以用于研究一些珍贵或不易获得的药物的吸收、分布、代谢、排泄等。此外斑马鱼作为水生生物还可以用于研究水体环境的污染程度等,应用范围十分的宽广。

3 斑马鱼应用于新药研发的思路

生活质量的提高,使得药物的不良反应事件受到越来越多的关注,而高通量筛选药物的同时,对药物进行有效的毒理学研究,选择毒性较小的药物进行研究可以减少后期药物研发的风险,缩短药物投入应用的周期。根据报告显示^[44-45],40% ~ 80% 的药物由于安全问题停止了研发,如果在药物开发前就对药物的毒性进行系统有效的检测,这也能在很大程度上降低研发的风险。不幸的是进入了临床的药物依然有不良反应事件的发生,而临床前的毒性检测结果表明特异性良好(> 80%),这显示了临床前毒性检测的假阴性以及低灵敏度,也意味着在后续使用时将对人类的健康和经济方面造成很大的损失^[5]。在新药的研发中,Velozo-Sá 等^[46]用细胞实验验证了 4 种新钌化合物([Ru(N-S)(dppm)₂]PF₆(1),[Ru(N-S)(dppe)₂]PF₆(2),[Ru(N-S)₂(dppp)](3)和[Ru(N-S)₂(PPh₃)₂]

(4)) 对乳腺癌的治疗作用,发现浓度 0.0375 ~ 0.075 $\mu\text{mol/L}$ 化合物(1)或 0.125 ~ 0.21 $\mu\text{mol/L}$ 化合物(2)对三阴性 MDA-Mb-231 细胞(乳腺癌细胞)具有明显细胞毒作用,而采用 0.5 ~ 100 mg/L 的化合物(1)或(2)对 Hacat 细胞(人类永生表皮细胞,非癌细胞)却无毒性作用,后续采用了斑马鱼对化合物(1)和(2)进行体内毒理学评估(浓度分别为可达到的最高浓度 88.8 $\mu\text{mol/L}$ 和 86.6 $\mu\text{mol/L}$),未发现在胚胎和幼体发育期间有胚胎致死毒性或者其他毒性作用,表明了该化合物可能成为更有效,更安全的三阴性乳腺癌治疗药物新原型。在新药的研发时应用斑马鱼进行了相应毒理学研究,验证了 Velozo-Sá 等^[46]所研发的新药的有效性及其安全性,更加能够预见该药物的应用前景,这也可以作为斑马鱼应用及新药研发的一种思路。

4 展望

斑马鱼作为一种相对于啮齿类动物比较低等的动物,可以替代啮齿类动物进行实验,符合动物福利的“3R(减少,替代和优化)”理论;并且斑马鱼体积小,数量大,具有高通量筛选所需要的特点,相比啮齿类动物低通量和/或近亲繁殖,显得更有优势。斑马鱼胚胎的体外养殖,可作为体内(哺乳类动物体内实验)和体外(细胞实验)实验的补充,斑马鱼胚胎的光学透明性还使得实验可以进行无创的连续观察,获取长期的动态的发育数据。这些数据可为后期采用哺乳类动物实验时提供依据,达到减少实验动物数量的结果。相比较于啮齿类,斑马鱼没有那么的贴近于人类,但是有时经济、易于操作比起贴和影响更大。斑马鱼易于养殖,给药方便,给药量小,经济方便,这是斑马鱼的又一优势。斑马鱼的行为、外观、病理等观察以及实验操作等方面近年来得到快速发展,这也进一步推动了斑马鱼的应用。在高通量发现药物的同时,可以对于药物的毒性等进行同步检测,提前了解药物的治疗窗,应用前景等,使得后期可以少走许多弯路,减少大量的经济损失。因此,模式生物斑马鱼在药物研究尤其是药物毒性研究中的应用会越来越广泛。

参 考 文 献(References)

- [1] Morello J, Derks RJE, Lopes SS, et al. Zebrafish larvae are a suitable model to investigate the metabolic phenotype of drug-induced renal tubular injury [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1193.
- [2] Peterson RT, Macrae CA. Systematic approaches to toxicology in the zebrafish [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52:433-453.
- [3] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446):498-503.
- [4] Stainier DY, Fishman MC. The zebrafish as a model system to study cardiovascular development [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 1994, 4(5):207-212.
- [5] Cassar S, Adatto I, Freeman JL, et al. Use of zebrafish in drug discovery toxicology [J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 1-56.
- [6] Horzmann KA, Freeman JL. Making waves: new developments in toxicology with the zebrafish [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 163(1):5-12.
- [7] Alzualde A, Behl M, Sipes NS, et al. Toxicity profiling of flame retardants in zebrafish embryos using a battery of assays for developmental toxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity toward human relevance [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2018, 70:40-50.
- [8] Swapnalee S, James M. Zebrafish as a vertebrate model system to evaluate effects of environmental toxicants on cardiac development and function [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): pii: E2123.
- [9] Milan DJ, Peterson TA, Ruskin JN, et al. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish [J]. *Circulation*, 2003, 107(10):1355-1358.
- [10] Milan DJ, Giokas AC, Serluca FC, et al. Notch1b and neuregulin are required for specification of central cardiac conduction tissue [J]. *Development*, 2006, 133(6):1125-1132.
- [11] 赵崇军, 田敬欢, 王金凤, 等. 斑马鱼在中药研究中的应用进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(17):2635-2648.
Zhao CJ, Tian JH, Wang JF, et al. Application advances on zebra-fish model in study on Chinese materia medica [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 2015, 46(17):2635-2648.
- [12] 石亚楠, 姚磊, 王佑华, 等. 氯化钡对斑马鱼心脏毒性的初步研究 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(01):157-158.
Shi YN, Yao L, Wang YH, et al. Preliminary study of barium chloride's cardiotoxicity to zebrafish [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2019, 35(1):157-158.
- [13] Feng Y, Caiping M, Li C, et al. Fetal and offspring arrhythmia following exposure to nicotine during pregnancy [J]. *J Appl Toxicol*, 2010, 30(1):53-58.
- [14] Yoo MH, Rah YC, Park S, et al. Impact of nicotine exposure on hair cell toxicity and embryotoxicity during zebrafish development [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2018, 11(2):109-117.
- [15] Park S, Lee JY, Park H, et al. Toxic effects of flufenoxuron on development and vascular formation during zebrafish embryogenesis [J]. *Aquat Toxicol*, 2019, 216:105307.
- [16] Pham DH, Zhang C, Yin C. Using Zebrafish to model liver diseases-where do we stand? [J]. *Curr Pathobiol Rep*, 2017, 5(2):207-221.
- [17] Tao T, Peng J. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Genet Genomics*, 2009, 36(6):325-334.
- [18] Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The vascular anatomy of

- the developing zebrafish; an atlas of embryonic and early larval development [J]. *Dev Biol*, 2001, 230(2): 278–301.
- [19] Vliegthart ADB, Tucker CS, Del Pozo J, et al. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 78(6): 1217–1227.
- [20] Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN. Cytochromes P450: A structure-based summary of biotransformations using representative substrates [J]. *Drug Metab Rev*, 2008, 40(1): 1–100.
- [21] Ying CY, Ming CK. Modulations of TCDD-mediated induction of zebrafish *cyp1a1* and the AHR pathway by administering Cd²⁺ in vivo [J]. *Chemosphere*, 2018, 210: 577–587.
- [22] Mcgrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(9–10): 394–401.
- [23] Raldúa D, Piña B. In vivo zebrafish assays for analyzing drug toxicity [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014, 10(5): 685–697.
- [24] 张力, 刘超, 周昕, 等. 四环素诱导肝脏特异表达绿色荧光蛋白转基因斑马鱼模型建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(1): 81–85.
- Zhan L, Liu C, Zhou X, et al. Establishment of a transgenic zebrafish model with tetracycline-induced GFP expression in the liver [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(1): 81–85.
- [25] 王雪, 刘可春, 王荣春, 等. 马兜铃酸对斑马鱼胚胎肾毒性作用 [J]. *动物学杂志*, 2015(5): 773–779.
- Wang X, Liu KC, Wang RC, et al. Nephrotoxic effects of aristolochic acid in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Chin J Zool*, 2015(5): 773–779.
- [26] Gorgulho R, Jacinto R, Lopes SS, et al. Usefulness of zebrafish larvae to evaluate drug-induced functional and morphological renal tubular alterations [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92: 411–423.
- [27] Bailey J, Oliveri A, Levin ED. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2013, 99(1): 14–23.
- [28] 王怡, 刘春雪, 徐秀. 孤独症谱系障碍斑马鱼模型的研究进展 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2019, 27(1): 52–56.
- Wang Y, Liu CX, Xu X. Research progress on zebrafish models of autism spectrum disorder [J]. *Chin J Child Health Care*, 2019, 27(1): 52–56.
- [29] Streissguth AP, Barr HM, Bookstein FL, et al. The long-term neurocognitive consequences of prenatal alcohol exposure: a 14-year study [J]. *Psychol Sci*, 1999, 10(3): 186–190.
- [30] Schneider ML, Moore CF, Adkins MM. The effects of prenatal alcohol exposure on behavior: rodent and primate studies [J]. *Neuropsychol Rev*, 2011, 21(2): 186–203.
- [31] Carvan MJ, Loucks E, Weber DN, et al. Ethanol effects on the developing zebrafish; neurobehavior and skeletal morphogenesis [J]. *Neurotoxicol Teratol*. 2004, 26(6): 757–768.
- [32] Nam YH, Moon HW, Lee YR, et al. Panax ginseng (Korea Red Ginseng) repairs diabetic sensorineural damage through promotion of the NGF pathway in diabetic zebrafish [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 43(2): 272–281.
- [33] Leung LC, Wang GX, Madelaine R, et al. Neural signatures of sleep in zebrafish [J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 198–204.
- [34] Oikonomou G, Altermatt M, Zhang RW, et al. The serotonergic raphe promote sleep in zebrafish and mice [J]. *Neuron*, 2019, 103(4): 686–701.
- [35] Kacprzak V, Patel NA, Riley E, et al. Dopaminergic control of anxiety in young and aged zebrafish [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2017, 157: 1–8.
- [36] 黄春念, 张晶晶. 模式动物斑马鱼在中枢神经系统疾病研究中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 131–136.
- Huang CN, Zhang JJ. Research progress on the application of zebrafish in central nervous system diseases [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(3): 131–136.
- [37] Kamstra JH, Aleström P, Kooter JM, et al. Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22(21): 16262–16276.
- [38] Nilsson EE, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease susceptibility [J]. *Transl Res*, 2015, 165: 12–17.
- [39] Knecht AL, Truong L, Marvel SW, et al. Transgenerational inheritance of neurobehavioral and physiological deficits from developmental exposure to benzo[a]pyrene in zebrafish [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 329: 148–157.
- [40] 赵维超, 胡南, 龙鼎新, 等. 低剂量 γ 射线辐照对斑马鱼胚胎的发育和遗传毒性效应 [J]. *原子能科学技术*, 2018, 52(09): 1695–1703.
- Zhao WC, Hu N, Long DX, et al. Development and genetic toxicity in zebrafish embryo induced by low dose γ-ray irradiation [J]. *Atom Energy Sci Tech*, 2018, 52(09): 1695–1703.
- [41] Kamstra JH, Sales LB, Alestr MP, et al. Differential DNA methylation at conserved non-genic elements and evidence for transgenerational inheritance following developmental exposure to mono(2-ethylhexyl) phthalate and 5-azacytidine in zebrafish [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2017, 10(1): 20.
- [42] Kawada T, Kuroyanagi J, Okazaki F, et al. An integrative evaluation method for the biological safety of down and feather materials [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): pii: E1434.
- [43] Berghmans S, Butler P, Goldsmith P, et al. Zebrafish-based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function-potential safety screens for early drug discovery [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2008, 58(1): 59–68.
- [44] Cook D, Brown D, Alexander R, et al. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(6): 419–431.
- [45] Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(7): 475–486.
- [46] Velozo-Sá, Vivianne de Souza, Pereira LR, et al. In vitro cytotoxicity and in vivo zebrafish toxicity evaluation of Ru(II)/2-mercaptopyrimidine complexes [J]. *Dalton Trans*, 2019, 48(18): 6026–6039.

[收稿日期] 2019-10-29