

抗坏血酸联合全反式维甲酸建立斑马鱼新药早期评价模型的研究

高绪聪^{1,2}, 孙程颖^{1,2}, 张云³, 何秋霞³, 申秀萍^{1,2*} (1.天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301; 2.天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301; 3.山东省科学院生物研究所, 济南 250014)

摘要: 目的 以抗坏血酸和全反式维甲酸为工具药, 建立斑马鱼药物早期评价模型, 为药物毒性的早期筛查提供实验方法。方法 以斑马鱼胚胎培养用水为空白对照, 二甲基亚砜为助溶剂, 抗坏血酸为阴性药物, 全反式维甲酸为阳性药物, 对脱膜斑马鱼受精卵连续染毒 5 d 后, 检测受精卵和幼鱼的死亡率, 及幼鱼自由活动度、全身组织器官形态发育和骨骼发育情况。结果 0.5%二甲基亚砜和 10 mg·L⁻¹ 抗坏血酸对斑马鱼致死作用较弱, 且无明显发育毒性作用, 可分别用作常规助溶剂和质量控制标志药; 全反式维甲酸随给药浓度升高, 致畸效应加强, 很好地呈现了自主活动缓慢到丧失、形态发育轻微异常到全身各组织器官严重畸形、骨骼矿化正常到抑制的全效应谱, 为药物毒性的评价提供了很好的参照, 其中 7.5 μg·L⁻¹ 可作为药物评价中阳性对照选用浓度。结论 用抗坏血酸和全反式维甲酸建立的斑马鱼模型设计合理, 可用于药物毒性的早期评价。

关键词: 抗坏血酸; 全反式维甲酸; 斑马鱼; 药物毒性检测

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)12-1761-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.12.002

引用本文: 高绪聪, 孙程颖, 张云, 等. 抗坏血酸联合全反式维甲酸建立斑马鱼新药早期评价模型的研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(12): 1761-1764.

Zebrafish Model of New Drug Early Evaluation Established by Ascorbic Acid and All-trans Retinoic Acid

GAO Xucong^{1,2}, SUN Chengying^{1,2}, ZHANG Yun³, HE Qiuxia³, SHEN Xiuping^{1,2*} (1.Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China; 2.Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China; 3.Shandong Province Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a zebrafish model of drug early evaluation, using ascorbic acid and all-trans retinoic acid as tools, so as to provide a test method for early screening of drug toxicity. **METHODS** The zebrafish embryos were incubated for 5 days with water as the blank control, dimethyl sulfoxide as solvent, ascorbic acid(AA) as negative drug, all-trans retinoic acid(ATRA) as positive drug. Detected the mortality, movement, organs and skeleton morphogenesis of fertilized eggs and juveniles. **RESULTS** 0.5% DMSO and 10 mg·L⁻¹ AA had weak lethal effect on zebrafish, and no obvious developmental toxicity, which could be used as cosolvent and quality control drug, respectively. ATRA had a strengthened teratogenic effect with the concentration increased, and showed a full-effect spectrum as follows: normal, slow and losed spontaneous activities, slight to severe tissues and organs malformations, vertebra mineralization inhibition. It provided a good reference for the evaluation of drug toxicity, and ATRA 7.5 μg·L⁻¹ could be selected as the positive control drug evaluated concentration. **CONCLUSION** The zebrafish model designed with AA and ATRA reasonably can be used for early evaluation of drug toxicity.

KEYWORDS: ascorbic acid; all-trans retinoic acid; zebrafish; drug evaluation

斑马鱼是属于辐鳍鱼纲鲤科短担尼鱼属的一种硬骨鱼, 由于个体小、生殖周期短、繁殖能力强、易于饲养、体外受精、胚胎透明易于观察、发育迅速、同窝发育同步等优点, 近年被广泛应

用于药物筛选、毒性检测、发育研究等领域^[1]。抗坏血酸(ascorbic acid, AA)为机体必需营养元素, 具有抗氧化、抗肿瘤等功效, 目前尚未见明显致畸作用报道^[2]。全反式维甲酸(all-trans retinoic

基金项目: 国家科技重大专项(2015ZX09501004); 天津市科技计划项目(16PTGCCX00090)

作者简介: 高绪聪, 女, 硕士生, 副研究员 Tel: (022)84845264 E-mail: gaorc@tjipr.com *通信作者: 申秀萍, 女, 研究员 Tel: (022)84845266 E-mail: shenxp@tjipr.com

acid, ATRA)是维生素 A 的代谢中间产物,能影响上皮代谢和骨的生成,使胚胎发育异常,导致多种畸形的发生^[3]。本试验探讨使用 AA 和 ATRA 为工具药物,采用发育评分方法,建立斑马鱼新药毒性早期评价模型。

1 材料与方

1.1 仪器和试剂

SZX16 型体视荧光显微镜、DP2-BSW 图像采集系统均来自美国 Olympus 公司,斑马鱼养殖饲养系统(北京爱生科技有限公司)。

ATRA(HPLC 纯度 $\geq 98\%$, Sigma 公司,批号: R2625-5G); 抗坏血酸(分析纯,含量 $\geq 99.7\%$,规格:每瓶 5 g;天津市化学试剂供销公司); 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 生工生物工程(上海)股份有限公司); DMSO 配制成储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用,使用前用斑马鱼胚胎培养用水($5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$, $0.17\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$, $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$, $0.16\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgSO}_4$)稀释为 0.5% 用于试验。

1.2 鱼卵制备

AB 系健康性成熟的斑马鱼, $\text{♀}\text{♂}$ 各半,放入交配缸内,次日 9~10 时获得受精卵。受精 2 h,使用 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 链酶蛋白酶 E 溶液处理受精卵 1 min,随后再放入 $28.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培育 3 h,待卵膜软化后,手工剥离卵膜获得脱膜受精卵用于试验。

1.3 组别设置

实验设空白对照组(胚胎培养用水)、溶剂对照组(DMSO, 0.5%)、阴性药物组(AA, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、ATRA 组(阳性药物, $0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。在体视显微镜下挑选受精 6 h 的健康脱膜斑马鱼胚胎,移入 6 孔培养板中,每孔 30 枚,每组 3 个重复孔。各组连续给药 5 d(120 h),每 24 h 更换孔中 4/5 的药液。

1.4 死亡率计算

每天计数死亡受精卵和幼鱼数,计算给药 5 d 的各组累积死亡率。对照组死亡率应 $\leq 10\%$ 。

1.5 自主活动观察

给药 5 d 后,显微镜下观察存活幼鱼自主活动情况。

1.6 形态发育观察和评分

给药 5 d 后,利用 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三卡因麻醉幼鱼,

固定焦距对侧面、背面照相。首先对每条存活幼鱼的形态发育进行镜下观察,随后每组选择 6 条幼鱼对以下器官和组织的发育进行评分:体节、脊索、尾、鳍(胸鳍、背鳍、腹鳍、尾鳍)、脑、上面部结构(眼、耳囊、嗅区)、下面部结构(上下颌)、心脏、体形、肝、鳃。评分原则:5 分,结构正常;4 分,正常结构的轻度变异,提示有一定的发育延迟或改变可恢复;3 分,轻微结构异常,通常仅 1 种畸形发生;2 分,中等的结构畸形,通常有 2 种或多种畸形发生;1 分,严重的结构畸形,通常有多种畸形同时发生;0.5 分,结构缺失^[4]。根据各组织器官评分情况,对每条斑马鱼进行总体评分。

1.7 骨骼发育评价

将清洗、麻醉的幼鱼用 0.2% 的钙黄绿素染色后,荧光显微镜下对鱼体中具有荧光染色的脊椎骨(矿化椎骨)计数并拍照。

1.8 统计学方法

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 SPSS 20.0 进行统计分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。因各组间方差不齐,因此进行非参数 Kruskal-Wallis 检验。

2 结果

2.1 药物对斑马鱼死亡率的影响

空白对照组、溶剂对照组和阴性药物组死亡率均 $<10\%$; ATRA 各剂量组死亡率较低,可保证有足够数量的幼鱼用于形态发育评价,结果见表 1。

表 1 各组斑马鱼的累积死亡率($\bar{x}\pm s, n=30\times 3$)

Tab. 1 Cumulative mortality of zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=30\times 3$)

组别	累积死亡率/%
空白对照组	2.22 \pm 1.92
溶剂对照组	3.33 \pm 3.34
阴性药物组	3.33 \pm 5.77
ATRA-0.625 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.00 \pm 0.00
ATRA-1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	6.67 \pm 5.77
ATRA-2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	10.00 \pm 0.00
ATRA-5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	6.67 \pm 5.77
ATRA-7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	3.33 \pm 5.77
ATRA-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	3.33 \pm 5.77

注:各组间无统计学差异。

Note: no significance.

2.2 药物对斑马鱼自主活动的影响

空白对照组、溶剂对照组和阴性药物组存活斑马鱼给药 5 d 后均能自由游动。ATRA 组中 $0.625, 1.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组部分个体能自由游动,

但部分个体游动迟缓；2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组部分个体因轻微尾部畸形而游动迟缓，部分个体鳔充气异常而无法游动；5.0, 7.5, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组斑马鱼因水肿而无法游动。

2.3 药物对斑马鱼形态发育的影响

空白对照组、溶剂对照组和阴性药物组存活斑马鱼形态正常，未见明显畸形。经 ATRA 梯度浓度暴露后，随着浓度升高，致畸效应加强，呈现正相关的剂量-效应关系：0.625, 1.25, 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组斑马鱼鳍条有轻微的边缘不规则，尾部轻微弯曲，头部形态轻微异常，如脑部比例的微小变化；5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组脊索和体节不规则，靠近尾部的体节发育受阻，尾部严重弯曲，鳍条发育不全，头部嗅区发育受阻，脑部发育尺寸异常，心脏、肝脏部位发育异常，鳔发育不全或不充气，个别个体出现水肿；7.5, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组严重畸形，水肿严重，脊索和体节不规则、不清晰，部分体节缺失，尾部扭曲，鳍条发育不全，两侧胸鳍严重异常、变小、不规则，眼睛小，上下颌、嗅区、耳蜗、脑部严重变形，各部位尺寸和比例失调，心脏、肝脏部位难以辨清，10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组畸形程度略严重。结果见图 1。各组斑马鱼总体评分，空白对照、溶剂对照和阴性药物组均为 5 分；ATRA 各组评分降低，0.625, 1.25 和 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组总体评分 3 分，5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组总体评分 1.2 分，7.5 和 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组总体评分 1 分。结果见图 2。

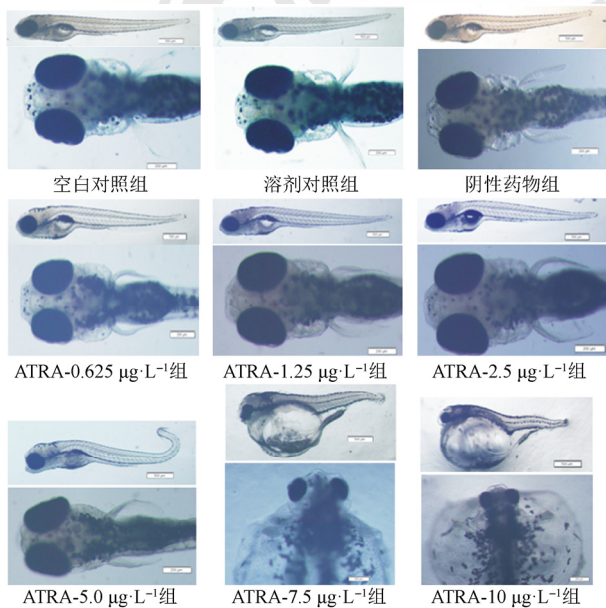


图 1 斑马鱼形态学发育照片

Fig. 1 Pictures of zebrafish morphogenesis

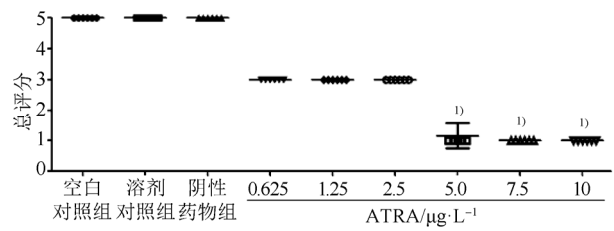


图 2 各组斑马鱼形态学发育的评分(n=6)

与阴性药物组比较, ¹⁾P<0.01。

Fig. 2 Score of zebrafish morphogenesis(n=6)

Compared with the AA group, ¹⁾P<0.01.

2.4 药物对斑马鱼骨骼发育的影响

溶剂对照组、阴性药物组与空白对照组矿化椎骨数无显著差异；ATRA 各剂量组斑马鱼的矿化椎骨数均降为零，ATRA 抑制斑马鱼的骨骼矿化结果见图 3 和表 2。

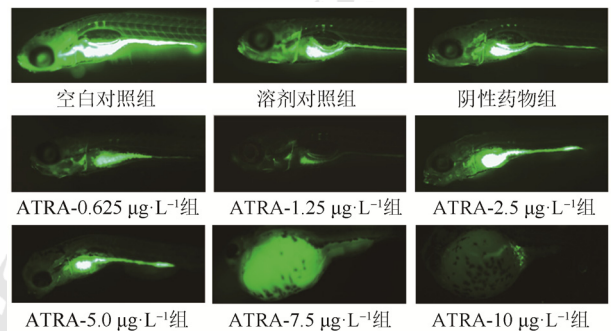


图 3 斑马鱼骨骼矿化照片

Fig. 3 Pictures of zebrafish vertebra mineralization

表 2 各组斑马鱼的矿化椎骨数($\bar{x} \pm s$, n=6)

Tab. 2 The number of zebrafish vertebra mineralization ($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	矿化椎骨数
空白对照组	1.2±1.5
溶剂对照组	0.8±1.0
阴性药物组	2.0±0.9
ATRA-0.625 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.0±0.0 ¹⁾
ATRA-1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.0±0.0 ¹⁾
ATRA-2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.0±0.0 ¹⁾
ATRA-5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.0±0.0 ¹⁾
ATRA-7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.0±0.0 ¹⁾
ATRA-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.0±0.0 ¹⁾

注：与空白对照组、溶剂对照组和阴性药物组比较, ¹⁾P<0.01。

Note: Compared with the control, DMSO, and AA groups, ¹⁾P<0.01.

3 讨论

药物评价模型的建立，需在排除系统干扰因素，实现良好的质量控制的同时，建立有效的评价标准。本模型使用 DMSO 为助溶剂，并设置溶剂对照组，通过实验摸索，DMSO 实验浓度确定

为 0.5%，在保证检测药物充分溶解的同时，受精卵和幼鱼死亡率需 $\leq 10\%$ 且不能发生明显致畸作用。结果显示，0.5%浓度的 DMSO 对鱼卵和幼鱼的致死率仅为 3.33%，低于试验标准，且与胚胎培养用水设置的空白对照组无统计学差异；幼鱼自主活动、形态发育和骨骼矿化均无异常。

模型选用 AA 为阴性对照药物，一方面，AA 是公认的、日常生活中广泛接触的基本无毒物质，其安全剂量范围较宽，试验采用浓度不致引起明显毒性作用；其次，AA 对机体发育没有明显的促进作用^[5]，可以排除对照药物对结果的正向干扰。AA 试验浓度的设置主要考虑其在胚胎培养用水中的溶解度，并结合致死率情况。经预试验摸索，最终试验浓度确定为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，其对斑马鱼卵和幼鱼的致死率 3.33%，低于实验标准(10%)，且与空白对照组和溶剂对照组无统计学差异；除个别幼鱼体形、尾、胸鳍轻微异常，稍有发育延迟外，无活动、形态、骨骼发育异常，可作为合格的质量控制标志药。

ATRA 作为阳性药物，各给药浓度下斑马鱼有一定死亡率，但死亡数较少，保证有足够数量的幼鱼用于发育情况观察和评价；随给药浓度升高，幼鱼自主活动从活动自如、迟缓至不能游动，形态发育从轻微异常到全身多组织器官的严重畸形，骨骼发育可见椎骨矿化抑制，呈现出了发育情况的全效应谱。 $7.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ATRA 染毒斑马鱼可见严重水肿及脊索、体节、尾部、鳍、眼睛、上下颌、嗅区、耳蜗、脑部、心脏、肝脏的明显畸形，同时椎骨矿化抑制，活动受限明显，可作为药物评价中阳性对照选用浓度。 $5.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下染毒斑马鱼，虽然多个组织器官均可见畸形发生，但多为发育不全或尺寸异常，畸形程度较低、不够典型； $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ATRA 虽较 $7.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 致畸作用更明显，但仅为畸形程度上的小幅增加，与 $7.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的不良反应无实质性差别，因此选择

$7.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为阳性对照组选用浓度更加合理。

本模型采用形态发育评分方法，首先对幼鱼各组织器官分别评分，然后对总体发育进行综合评分，结合骨骼发育的矿化椎骨计数，对斑马鱼的发育情况进行定量评价。该定量评价方法可以量化药物在不同浓度下的致畸作用，摸索药物的未观察到损害作用的剂量(NOEL)等毒作用参数，为药物毒性的定性和种属间比较提供可能。

此外，模型所用斑马鱼胚胎为脱膜受精卵，避免了卵膜对药物的屏障作用，可实现药物与胚胎的直接接触。但脱膜后胚胎更加脆弱，一定程度上增加了出现假阳性结果的概率，也加大了操作难度和结果分析难度。

综上所述，本实验所建斑马鱼药物评价模型，质控良好，指标明确，为新药研发中毒性的早期筛查提供了新的方法。

REFERENCES

- [1] HAN L W, HE Q X, ZHAO L, et al. Study of structure-angiogenic activity relationship of indirubin and its derivatives using zebrafish model [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(5): 457-460.
- [2] XIANG Q Q, XU B F, DING Y L, et al. Oxidative stress response induced by butachlor in zebrafish embryo/larvae: the protective effect of vitamin C [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2018, 100(2): 208-215.
- [3] DING H, ZHOU X H, CAI A L. Basic fibroblast growth factor expression in serum and amniotic fluid of all-trans retinoic acid induced bone deformity [J]. *BME Clin Med*(生物医学工程与临床), 2014, 18(2): 178-180.
- [4] BRANNEN K C, PANZICA-KELLY J M, DANBERRY T L, et al. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2010, 89(1): 66-77.
- [5] NOHALEZ A, MARTINEZ C A, PARRILLA I, et al. Exogenous ascorbic acid enhances vitrification survival of porcine *in vitro*-developed blastocysts but fails to improve the *in vitro* embryo production outcomes [J]. *Theriogenology*, 2018, 113: 113-119.

收稿日期: 2018-03-20

(本文责编: 曹粤锋)