

采用斑马鱼模型评价对乙酰氨基酚的肝脏毒性

张云¹, 彭维兵¹, 王希敏¹, 王雪¹, 萧崇德², 刘可春^{1*}

1. 山东省科学院生物研究所 山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014

2. 中原大学 生物技术系, 台湾 台北 32023

摘要: **目的** 研究对乙酰氨基酚 (APAP) 对斑马鱼幼鱼的肝脏毒性, 并验证斑马鱼模型用于药物肝毒性快速评价的实用性。**方法** 以发育 72 hpf 的肝脏荧光转基因斑马鱼幼鱼 (L-FABP: EGFP) 为实验对象, 不同浓度的 APAP 分别处理斑马鱼幼鱼, 于处理后 24、48、72 h, 体视显微镜下观察幼鱼的死亡率、肝脏形态学变化和卵黄囊吸收情况, 荧光显微镜下观察 APAP 对幼鱼肝脏荧光的影响。**结果** APAP 对斑马鱼幼鱼存活率的影响呈剂量和时间相关性。APAP 处理后的幼鱼肝脏形态出现异常、肝脏颜色变暗, 卵黄囊肿。与空白对照组相比, APAP 处理后的幼鱼肝组织 L-FABP 荧光表达明显下降, 肝脏明显萎缩退化。**结论** APAP 对斑马鱼幼鱼具有肝脏毒性。肝脏荧光转基因斑马鱼模型快速评价药物的肝脏毒性具有较好的应用前景。

关键词: 对乙酰氨基酚; 肝脏荧光转基因斑马鱼; 肝脏毒性

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)05-0351-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.05.007

Hepatotoxicity evaluation of acetaminophen using zebrafish model

ZHANG Yun¹, PENG Wei-bing¹, WANG Xi-min¹, WANG Xue¹, XIAO Chong-de², LIU Ke-chun¹

1. Key Laboratory for Biosensors of Shandong Province, Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

2. Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taipei, 32023, China

Abstract: Objective To determine the hepatotoxicity of acetaminophen (APAP) in larval zebrafish and to validate the practicability of zebrafish model for rapid assessment of drug hepatotoxicity. **Methods** 72 hpf liver fluorescence transgenic zebrafish larvae (L-FABP: EGFP) were administered with APAP at four dosage series for 24, 48, and 72 h, respectively. Larval zebrafish mortality, liver morphology, yolk sac retention, and changes in liver fluorescence were evaluated to study the hepatotoxic effects of APAP. **Results** The effect of APAP on mortality of larval zebrafish was dose- and time-dependent. Larval zebrafish treated with APAP exhibited liver malformation, discoloration, hepatatrophia, and vitelline cyst. Compared with the control group, the liver fluorescence intensity significantly decreased in the larval zebrafish treated with APAP. **Conclusion** APAP could induce the liver damage in larval zebrafish. And using zebrafish as a reliable mammal model for screening hepatotoxic agents has good application prospects.

Key words: acetaminophen; liver fluorescence transgenic zebrafish larvae; hepatotoxicity

药物肝脏毒性问题是医药行业发展的关键问题,肝毒性研究位于所有药物不良反应研究的首位。对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 是临床上常用的解热镇痛药物,但其肝损伤副作用严重,是导致急性肝功能衰竭的首要原因^[1]。斑马鱼是构建人类疾病模型和药物高通量筛选研究的重要模式生物。本实验利用新型模式生物斑马鱼,通过对肝脏荧光转基因斑马鱼的死亡率、肝脏形态学和卵黄囊

吸收情况的观察,快速评价 APAP 的肝毒性,为利用斑马鱼进行药物早期肝脏毒性的快速评价与预测提供科学参考依据。

1 材料与方法

1.1 动物

本实验采用肝脏荧光转基因斑马鱼 T3(L-FABP: EGFP)。斑马鱼的养殖和繁殖参照 Zebrafish Book^[2]的方法。雌雄斑马鱼在照明 14 h/黑暗 10 h、28 °C

收稿日期: 2013-06-17

基金项目: 国家自然科学基金 (81202584), 山东省科学院青年科学基金项目 (鲁科院字 2012 第 100 号) 资助

作者简介: 张云 (1982—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为药物筛选和药物分子毒理学, E-mail: xiaohan_0818@163.com

*通信作者 刘可春 Tel: (0531)82605352 E-mail: hliukch@sdaas.org

标准条件下分开饲养,定时喂以颗粒状饵料和卤虫。用卵时,取健康性成熟的斑马鱼,按雌雄 1:1 或 1:2 的比例放入交配缸内,次日 9:00~10:00 获得受精卵。对受精卵进行消毒和清洗后,移入斑马鱼胚胎培养用水中,28℃下控光培养。实验中 APAP 处理组仔鱼定义为在 72 hpf (hours post fertilization) 应用含不同浓度 APAP 的胚胎培养液进行处理。

1.2 试剂及仪器

APAP 购自盈芯生物科技(上海)有限公司,分子式 $C_8H_9NO_2$, 质量分数 $\geq 98\%$,用斑马鱼胚胎培养用水(5 mmol/L NaCl, 0.17 mmol/L KCl, 0.4 mmol/L $CaCl_2$, 0.16 mmol/L $MgSO_4$)稀释获得实验所需浓度;IX51 体视显微镜(美国 Olympus 公司);SZX16 型荧光显微镜、DP2-BSW 图像采集系统(美国 Olympus 公司);斑马鱼养殖饲养系统(北京爱生科技有限公司)。

1.3 处理斑马鱼仔鱼的方法

在斑马鱼发育至 72 hpf,挑选发育正常的斑马鱼仔鱼,移入 6 孔板的样孔中,每孔 10 尾仔鱼。根据预实验,设定 APAP 2、4、8、16 mmol/L 浓度组和对照组(胚胎培养用水),每个浓度组设 3 个重复孔。随后于光照培养箱中恒温(28℃)孵育,连续给药 3 d,每天换液(换液一半)。分别于施药后 24、48、72 hpe (hour post exposure) 观察并记录各实验组仔鱼的死亡情况、肝脏损伤情况和卵黄囊吸收情况。实验重复 3 次。

1.4 统计学分析

采用 SPSS16.0 统计软件进行组间方差分析(ANOVA),以 t 检验作组间比较。

2 结果

2.1 APAP 对斑马鱼仔鱼死亡率的影响

将不同浓度的 APAP 处理幼鱼 24、48、72 h 后,

观察幼鱼的存活情况。如表 1 所示,给药后 24 h 和 48 h,与对照组相比,2 mmol/L APAP 对幼鱼死亡率无显著性影响。4 mmol/L APAP 在各给药时间段均引起幼鱼较轻程度的死亡。8、16 mmol/L APAP 在给药 24 h 后即引起幼鱼发生显著性死亡,尤其是 16 mmol/L APAP 在给药后 72 h 导致幼鱼全部死亡。可见 APAP 对斑马鱼幼鱼存活率的影响呈剂量和时间相关性。

2.2 APAP 对斑马鱼仔鱼的肝脏毒性

体式显微镜下观察,对照组幼鱼肝脏透明,结构正常;APAP 处理后的幼鱼肝脏形态异常、颜色变暗,卵黄囊肿。随着给药时间的延长,肝脏中毒现象更加明显。图 1 为 8 mmol/L APAP 处理 72 h 后斑马鱼幼鱼肝脏的形态学变化。

实验中,所用斑马鱼为肝脏标记荧光的转基因斑马鱼幼鱼(L-FABP:EGFP),利用荧光显微镜观察 APAP 对斑马鱼肝脏荧光的影响。与对照组相比,APAP 处理后的幼鱼肝组织 L-FABP 荧光强度明显下降,肝脏明显萎缩退化,见图 2。

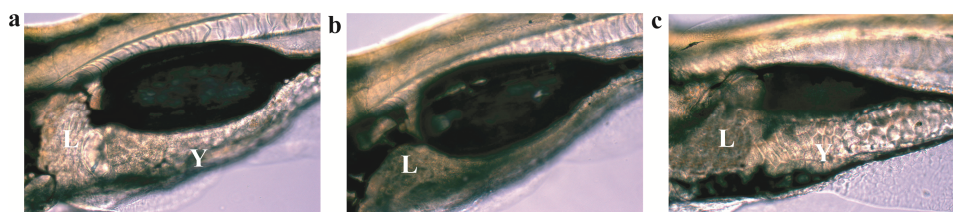
表 1 给药后 24、48、72 h 各浓度组幼鱼累积死亡率
($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 1 Cumulative mortality of zebrafish larvae in each group after administration of 24, 48, and 72 h
($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	剂量/ (mmol·L ⁻¹)	死亡率/%		
		24 hpe	48 hpe	72 hpe
对照	—	0	0	0
APAP	2	3.33±3.33	1.11±1.92	4.44±1.92*
	4	4.44±1.92*	5.56±3.85	11.11±3.85**
	8	8.89±1.92**	56.67±6.67**	61.11±12.62**
	16	35.56±6.94**	75.56±12.62**	100±0.00**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group



a-对照组; b 和 c-8 mmol·L⁻¹ APAP 组; L-肝脏; Y-卵黄囊

a- control group; b and c- 8 mmol·L⁻¹ APAP group; L- liver; Y- yolk sac

图 1 斑马鱼幼鱼经 APAP 处理 72 h 后肝脏的形态学变化。

Fig. 1 Morphology of liver in zebrafish larvae after exposure to APAP for 72 h

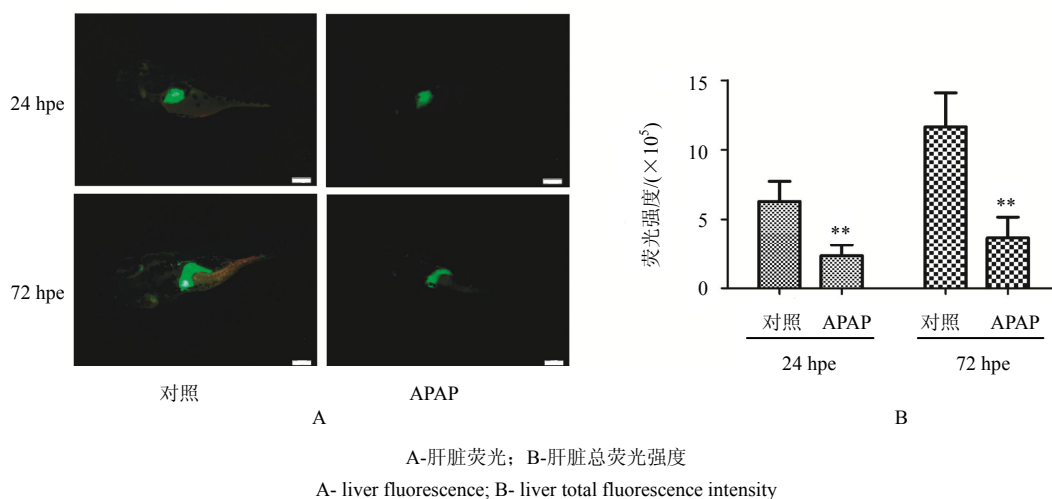


图2 8 mmol·L⁻¹ APAP (分别处理 24 hpe 和 72 hpe) 对斑马鱼幼鱼的肝脏生长的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of APAP (8 mmol·L⁻¹) on liver growth (at 24 hpe and 72 hpe) in L-FABP: EGFP zebrafish larvae

3 讨论

目前在临床前研究中, 主要使用大鼠、小鼠体内实验和肝细胞体外实验检测药物肝脏毒性。这些方法有一定的局限性: 细胞实验不能准确反映药物在体内微环境下的活性, 现有的动物模型虽然具有结果可靠、综合全面的优点, 但是耗时、耗资、耗力。因此, 建立早期肝毒性评价预测且经济有效的动物模型已成为国内外高度关注的热点问题^[3]。

近十多年来, 国外的研究发现斑马鱼可用于建立多种人类疾病模型并用于药物毒性研究。斑马鱼的优势在于: (1) 斑马鱼全基因组测序于 2009 年完成, 与人类基因的相似度达 87%。两者在基因和蛋白质的序列和功能上表现很高的保守性, 意味着在斑马鱼上进行药物毒性试验所得结果在多数情况下也适用于人体^[4]; (2) 胚胎体外发育, 受精后 24 h, 主要器官原基已形成, 相当于 28 d 的人类, 实验周期短; (3) 胚胎透明, 可在显微镜下直接观察胚胎发育过程, 全程、完整观察药物对其体内器官的毒性作用, 避免处死或解剖动物; (4) 物种稳定, 个体差异小, 繁殖周期短, 饲养方便, 费用低。斑马鱼拥有其他动物所无法相比的优点, 其复制出的疾病与人类疾病有高度相似性, 具有可靠性、可控性、易行性和经济性等特点。采用斑马鱼进行药物肝毒性评价不仅可减少受试药物的用量, 同时可在短期内进行化合物的毒性机制研究, 明显缩短研究周期, 降低研究成本, 有助于在细胞和分子水平阐明药物肝脏毒性作用机制。

研究发现斑马鱼在 48 hpf 时肝脏形态已初步形

成, 而在 60~72 hpf 肝脏迅速生长直至达到合适大小^[5], 因此本实验采用已发育 72 hpf 的肝脏荧光转基因斑马鱼幼鱼为肝脏毒性评价模型, 动态观测 APAP 对肝脏形态、L-FABP 表达以及卵黄囊吸收情况的影响。APAP 处理后的斑马鱼幼鱼出现肝损伤现象, 表现为肝脏颜色明显变暗、肝组织萎缩。斑马鱼卵黄囊成分的 70% 为中性脂质, 主要在肝脏中代谢, 因此卵黄囊大小可作为反映肝功能的指标之一^[6]。本实验中斑马鱼卵黄囊发生吸收延迟现象, 也是 APAP 导致幼鱼肝脏受损的毒性表现。L-FABP 即肝型脂肪酸结合蛋白, 是肝脏细胞内长链和支链脂肪酸的转运载体, 专一性分布于肝脏, 负责脂肪酸的转运, 可作为早期监测肝细胞损伤的生物标志物^[7]。实验中发现 APAP 导致肝脏荧光转基因斑马鱼幼鱼肝脏的荧光强度明显减弱, 提示 APAP 抑制 L-FABP 表达或导致肝脏细胞发生凋亡。APAP 引起斑马鱼肝脏毒性的分子机制以及信号通路还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Abdelmegeed M A, Jang S, Banerjee A, *et al.* Robust protein nitration contributes to acetaminophen-induced mitochondrial dysfunction and acute liver injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60: 211-222.
- [2] Westerfield M. *The Zebrafish Book* [M]. Eugene: University of Oregon Press, 1995.
- [3] Howarth D L, Yin C, Yeh K, *et al.* Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae [J]. *Zebrafish*, 2013, 10(2):

- 199-210.
- [4] Joyce P I, Fratta P, Fisher E M, *et al.* SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments [J]. *Mamm Genome*, 2011, 22(7-8): 420-448.
- [5] Chu J, Sadler K C. New school in liver development: lessons from zebrafish [J]. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1656-1663.
- [6] Hill A. *Zebrafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity* [M]. John Wiley & Sons, 2011: 89-102.
- [7] Rajaraman G, Wang G, Yan J, *et al.* Role of cytosolic liver fatty acid binding protein in hepatocellular oxidative stress: effect of dexamethasone and clofibrate treatment [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 295(1-2): 27-34.