

## 基于斑马鱼模型的药物毒性研究进展与中药毒性研究新策略

彭蕴茹<sup>1,2,3</sup>, 韦英杰<sup>1,2</sup>, 丁永芳<sup>1,2</sup>, 段金廛<sup>3\*</sup>

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210014

2. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028

3. 南京中医药大学 江苏省方剂高技术重点实验室/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

**摘要:** 斑马鱼是近年来用于药理学领域研究的热门模式生物, 其优势在于化合物的高通量活性筛选及毒性评价。斑马鱼毒性评价模型集成在体动物与体外细胞模型的优势, 具有高效、低成本的特点, 在国外已成为化合物早期安全性快速甄别的有效模型, 国内将斑马鱼模型用于中药毒性研究正日益兴起。综述了斑马鱼在药物毒性研究方面的进展, 提出斑马鱼模型在中药毒性研究中的新策略。

**关键词:** 斑马鱼; 斑马鱼毒性评价模型; 药物毒性; 中药毒性; 模式生物

中图分类号: R285.53 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)01-0017-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.002

## Development of drug toxicity and novel strategy for toxicity of Chinese materia medica based on zebrafish model

PENG Yun-ru<sup>1,2,3</sup>, WEI Ying-jie<sup>1,2</sup>, DING Yong-fang<sup>1,2</sup>, DUAN Jin-ao<sup>3</sup>

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210014, China

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

3. Jiangsu Province Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae and Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract:** With the advantages of high throughput activity screening and toxicity evaluation, zebrafish has become popular model organism in pharmaceutical research in recent years. Being integrated advantages both *in vivo* and *in vitro*, with high efficiency and low cost, evaluation using zebrafish has become an effective method in quick screening of early safety of compounds on abroad. In past years, studies on toxicity of traditional Chinese medicine (TCM) with zebrafish model have attracted more attention in China. The development in drug toxicity studies based on zebrafish model was reviewed, and novel strategy for toxicity of TCM using zebrafish was suggested in the paper.

**Key words:** zebrafish; toxicity assessment of zebrafish model; drug toxicity; toxicity of Chinese materia medica; model organism

斑马鱼 (zebrafish) 是一种器官、系统发育完善的良好实验模式鱼及模式材料。早在 20 世纪 70 年代末, Streisinger 等<sup>[1]</sup>开始以斑马鱼幼鱼作为模式系统用于脊椎动物的遗传筛选<sup>[2]</sup>; 20 世纪 80 年代后, 国际标准化组织和经济合作开发组织将斑马鱼

推荐为标准实验用鱼, 用于对环境卫生健康<sup>[3]</sup>和农药<sup>[4]</sup>的检测, 随后的 20 多年, 斑马鱼被广泛用于疾病模型及药理学研究<sup>[5-9]</sup>。近年来, 斑马鱼在药物毒性评价的应用日益盛行<sup>[10]</sup>, 斑马鱼在国内外已成为一种热门的药理学实验研究对象, 被用来建立各种疾病

收稿日期: 2016-07-12

**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划 (“973 计划”) 项目: 基于 “十八反” 的中药配伍禁忌理论基础研究 (2011CB505300); 国家重点基础研究发展计划 (“973 计划”) 项目: “藻戟蓬芫俱战草” 配伍关系与毒效表征的基础研究 (2011CB505303); 国家自然科学基金项目 (81573833); 基于三维 M-Act/Tox 协同评价的抗骨质疏松中药筛选新方法的建立与应用 (81573833); 基于肝脏炎症-肝纤维化-肝癌轴的白首乌生物学行为研究 (81373888); 江苏省方剂高技术重点实验室/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心资助项目: 海藻类中药与甘草配伍禁忌特征及其内在规律性的拓展研究 (FJGJS-2015-05)

**\*通信作者** 段金廛, 教授, 博士生导师, 国家 “973 计划” 项目首席科学家, 中国自然资源学会天然药物资源专业委员会主任委员, 主要研究方向为中药资源化学与方剂功效物质基础。Tel: (025)85811116 E-mail: dja@njutcm.edu.cn

模型进行药物活性、毒性的高通量筛选以及药物代谢等方面的研究<sup>[11]</sup>。国内学者已开始利用斑马鱼模型评价药物毒性,如许冰洁等<sup>[12]</sup>用斑马鱼胚胎评价 5 种已知对人类胚胎致畸药物的毒性与安全性,证实斑马鱼胚胎模型可用于初步评价药物的发育毒性和安全性;陈丽晓等<sup>[13]</sup>利用斑马鱼模型探讨了猪牙皂中 7 种三萜皂苷的毒性与结构之间的关系;杨雨婷等<sup>[14]</sup>以斑马鱼胚胎模型比较了广藿香油、广藿香醇和广藿香酮的毒性。目前,利用斑马鱼模型评价药物毒性已被国内学者广泛接受<sup>[15-17]</sup>。

斑马鱼引人注目的特点是快速、高通量、低成本筛选:用幼鱼可在 1 周内完成毒性快速检测;胚胎在母体外发育,体透明、易观察,可在 96 孔板中高通量进行;斑马鱼体小、生殖周期短、繁殖力强、易饲养、发育快、成本低,是大鼠的 1/1 000;对 DMSO 耐受,易通过皮肤和腔道吸收药物<sup>[18-19]</sup>;斑马鱼与人的基因高度相似,与人类基因相比,具有高达 87% 的同源性<sup>[20-21]</sup>,基因信号传导通路、生理结构及功能等均与哺乳动物高度相似<sup>[22]</sup>。斑马鱼测试体系具备细胞模型高通量的特点,并兼顾在体动物模型近似人的整体生物反应<sup>[23]</sup>。另外,斑马鱼具有药物代谢的相关酶系,包括 I 相代谢酶和 II 相代谢酶,Goldstone 等<sup>[24]</sup>研究发现,斑马鱼有 94 个细胞色素 P450 (CYP) 基因,根据氨基酸序列的同一性可分为 18 个基因家族,同人类及其他哺乳动物一致。CYP 基因中 5-51 家族有 32 个基因,其中大多数和人类的 CYP 基因直系同源,这些基因序列的高度相似预示着酶活性的一致性。Chung 等<sup>[25]</sup>克隆了斑马鱼的 Cyp1A 基因,发现其在核酸序列上与虹鳟鱼、小鼠、人类对应的基因分别具有 74%、57% 和 54% 的同源性。Huang 等<sup>[26]</sup>研究发现,斑马鱼有 45 个葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 基因,可分为 3 个家族:UGT1、UGT2、UGT5。由于斑马鱼具有完整的代谢器官系统和代谢酶系,以及与哺乳动物相似的系统及基因,这就为药物的安全性评价及代谢研究提供了理想的实验模型。在国外,斑马鱼毒性筛选已成为药物先导化合物发现过程的高内涵关键技术。在国内将斑马鱼用于药物毒性的研究已起步,将其用于中药毒性的研究正备受关注<sup>[27]</sup>。

## 1 斑马鱼模型用于药物毒性的研究

基于斑马鱼的生理、基因、发育及培养等优势,在国外,斑马鱼幼鱼和成体鱼被广泛用于小分子化合物的大规模新药筛选研究,特别是急性毒性及早

期毒性的高通量筛选研究,如神经、心脏、肾、消化道、生殖与发育毒性等。研究内容与方法可概括为 3 类:基于微观细胞、分子、基因水平;基于宏观组织、器官功能水平;基于多靶点、多指标水平的斑马鱼毒性研究(图 1)。

### 1.1 基于微观细胞、分子、基因水平的斑马鱼毒性研究

基于微观水平的斑马鱼毒性研究有助于阐释宏观靶器官、靶组织的毒性机制,研究内容主要概括为 3 类:基于靶细胞的毒性研究;基于生物标志酶、标志蛋白及蛋白质组学的研究;基于生物标志基因、基因组学的研究。

**1.1.1 基于细胞水平** Dong 等<sup>[28]</sup>以视网膜神经细胞的凋亡为指标,考察了三丁基锡(tributyltin, TBT)对斑马鱼早期阶段发育的影响。在致死浓度下,TBT 增加了视网膜细胞及三叉神经元附近细胞的凋亡数量,用末端转移酶介导的切口-末端标记染色法(terminal transferase-mediated nick-end-labeling staining)检测。结果表明,在斑马鱼发育中,TBT 首先诱导视网膜神经细胞凋亡,氧化应激可能参与了这一毒性反应。

Plachinta 等<sup>[29]</sup>研究了常见 6 种冷冻保护剂对斑马鱼卵母细胞的毒性。将不同发育阶段的卵母细胞与含有不同浓度冷冻保护剂的 Hanks 培养液共孵育 30 min,用台盼蓝(TB)染色、噻唑蓝(MTT)染色和生发泡破裂(GVBD)3 种测试法评价卵母细胞活力。结果表明,冷冻保护剂对卵母细胞的毒性作用总体上随着浓度的增加而增加。测试法的灵敏度按 MTT、TB、GVBD 依次增强。GVBD 与 TB 测试结果均显示冷冻保护剂的毒性按甲醇、丙二醇、二甲基亚砜、乙二醇、葡萄糖、蔗糖依次增强,卵母细胞对冷冻保护剂的敏感性似乎随发育成熟度增加而增强。Van der Ven 等<sup>[30]</sup>采用组织形态测定法观察卵巢中卵黄母细胞和睾丸中嗜酸细胞(精原细胞),进一步用免疫组织化学确证,研究雌二醇(E<sub>2</sub>)和加氢甲基睾酮(MDHT)对斑马鱼内分泌的影响。

**1.1.2 基于蛋白水平** Senger 等<sup>[31]</sup>以斑马鱼脑细胞膜中核苷酸双磷酸酶(nucleoside triphosphate-diphosphohydrolase, NTPDase)和细胞外 5'-核苷酸酶(ecto-5'-nucleotidase)的活性为指标,观察氯化汞和醋酸铅对三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)和腺嘌呤核糖核苷酸(AMP)水解作用的影响及机制。结果表明,Hg<sup>2+</sup>和 Pb<sup>2+</sup>影响细胞外 5'-

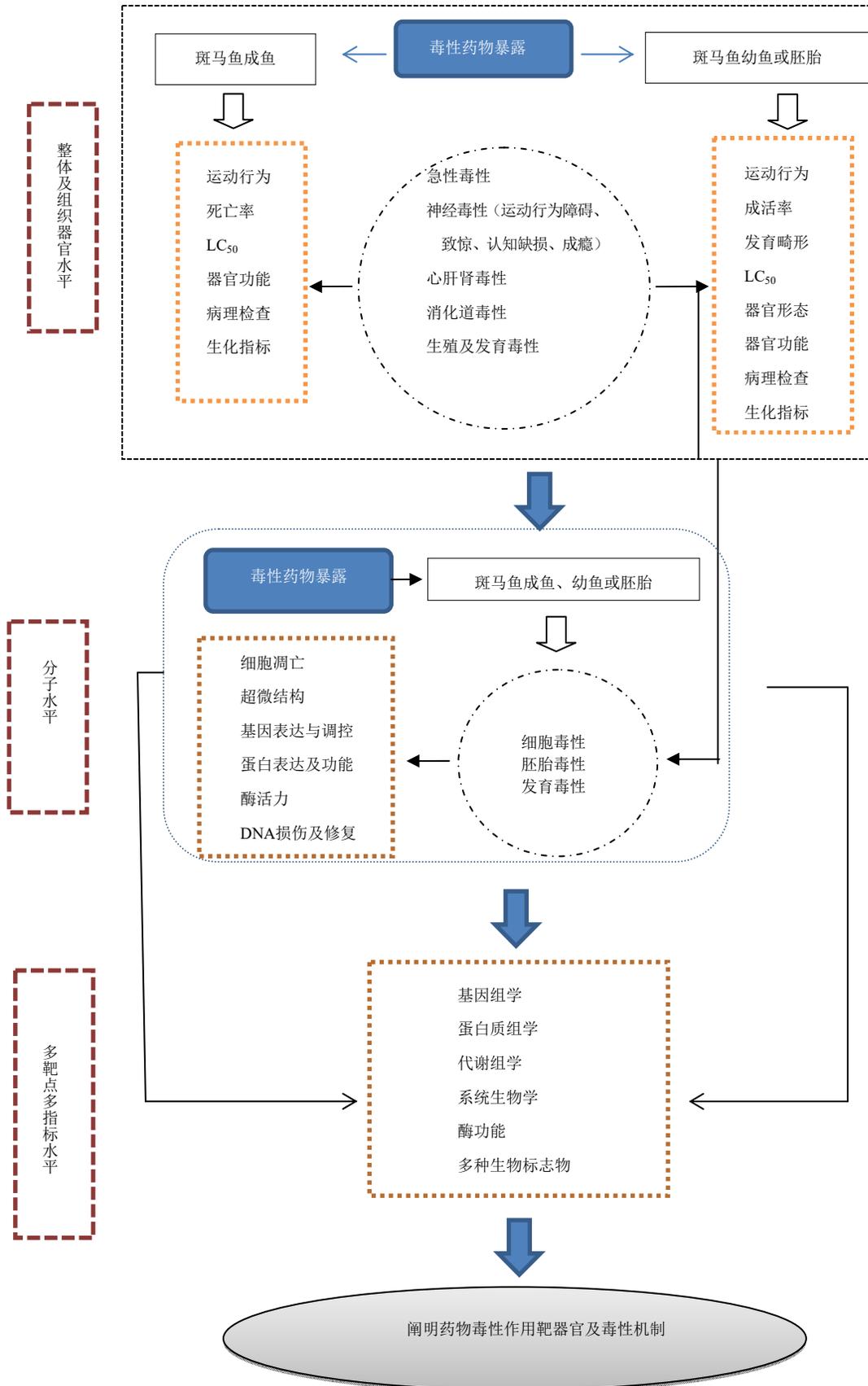


图 1 模式生物斑马鱼在药物毒性评价中的应用示意图

Fig. 1 Schemes of application of model organism zebrafish in drug toxicity evaluation

核苷酸酶的活性, 此酶是调控嘌呤信号通路的重要酶。Thompson 等<sup>[32]</sup>研究了亚砷酸盐暴露对斑马鱼肝脏 I 相代谢酶 (CYP1A) 和 II 相代谢酶 (EH、GSH) 活力的影响。结果表明亚砷酸盐可能通过影响 CYP1A 酶活力调控苯并芘生物转化通路, 其调控机制与翻译前、后均相关。

Goessling 等<sup>[33]</sup>以肝脏脂肪酸结合蛋白 (LFABP) 为生物标志物, 研究肝毒素对斑马鱼的肝损伤作用; Krone 等<sup>[34]</sup>以热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 为细胞应激和副反应的生物标志物, 观察到斑马鱼胚胎暴露于不同有毒物质中, HSP70 的表达在斑马鱼胚胎特异组织中被激活; Seok 等<sup>[35]</sup>以绿色荧光蛋白 (eGFP) 为环境污染物的标志物, eGFP 的表达与砷暴露引起的斑马鱼胚胎形态异常相关, 砷诱导的 eGFP 的表达模式与砷浓度相关。因此, 可在稳定的转基因斑马鱼中构建 HSP70/eGFP 报告基因系统, 用以准确而又快速地检测斑马鱼胚胎多细胞体系的特异细胞毒性 (cell-specific toxicity) 和发育毒性。

Shrader 等<sup>[36]</sup>研究了斑马鱼胚胎暴露于 17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol) 和 4-壬基酚 (estrogen mimic 4-nonylphenol, 4-NP) 后其蛋白质组学的变化。用双向电泳和数字成像检测胚胎组织匀浆中蛋白表达的改变。结果发现对应的每个化合物做出反应的特定蛋白质较多, 共同蛋白质却很少, 表明 2 种化合物的反应途径是不同的。Kling 等<sup>[37]</sup>研究斑马鱼暴露于六溴环十二烷 (hexabromocyclododecane, HBCD) 与四溴双酚 A (tetrabromobisphenol A, TBBPA) 2 种物质后的肝细胞蛋白质组学, 以双向电泳及 MALDI-TOF 和 FT-ICR 分析鉴定, 结果表明 2 种物质合用会产生意想不到的作用, 蛋白质组学可作为检测药物混合效应的灵敏工具。

**1.1.3 基于基因水平** 当代毒理学面临的挑战是作用机制阐释, 这需要快速的、生物集成的能在分子水平上检测多种效应的生物测试系统。Muncke 等<sup>[38]</sup>提出了基于斑马鱼致畸分子效应 (MolDarT) 的亚急性毒性测试法。卵黄蛋白原 1 基因 (vitellogenin 1 gene, vtg1) mRNA 水平可作为斑马鱼发育动情力的标志物。用逆转录实时聚合酶链反应检测斑马鱼受精卵暴露于 17 $\alpha$ -炔雌醇 (17 alpha-ethinylestradiol, EE<sub>2</sub>) 的 vtg1 mRNA 表达, 结果表明, vtg1 在发育的斑马鱼胚胎内的表达受 EE<sub>2</sub> 诱导, vtg1 有可能作为 MolDarT 研究中的分子靶点。

Villeneuve 等<sup>[39]</sup>用 22 000 个基因寡核苷酸微阵列检测了暴露于法偈唑的斑马鱼脑和卵巢组织的全面应答反应。在脑中转录水平的改变与分化、发育、DNA 复制和细胞周期功能相关, 在卵巢中转录水平的改变与细胞间黏附、细胞外基质、血管形成及发育功能相关。根据转录水平的改变推测斑马鱼通过放射状胶质细胞的增殖应对法偈唑引发的脑组织神经变性应激, 而卵巢中基因表达的改变导致了因卵黄生成受损引发的卵母细胞成熟及排卵障碍。此研究为阐明下丘脑-垂体-性腺 (HPG) 轴对内分泌活性化学物质 (EACs) 的应答反应提供了研究基础。

为了探讨四氯二苯并-*p*-二噁英 (TCDD) 对鱼胚胎心血管毒性的分子机制, 发现与心血管功能相关的潜在基因, Handley-Goldstone 等<sup>[40]</sup>构建了 4 896 个由成体斑马鱼心脏 cDNA 克隆组成的 cDNA 微阵列, 已知 200 多个基因与发育、毒理和调控功能有关, 用于检测斑马鱼早期胚胎暴露于 TCDD 的基因表达谱。结果发现 TCDD 能剂量依赖性地强烈诱导 CYP1A 和 1B1, 以及芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) 基因组中的其他基因。重要的是, 心脏肌节构件 (包括心肌肌钙蛋白 T<sub>2</sub> 和多种球蛋白亚型) 基因表达的改变与 TCDD 引发扩张型心肌病的假设一致。线粒体能量传递基因表达的增加也可能与心肌病相关。其他 TCDD 敏感基因包括脂肪酸、类固醇代谢酶、核糖体和信号转导蛋白。该研究为阐明 TCDD 的毒性机制提供了重要思路。

Pomati 等<sup>[41]</sup>研究了混合药物对斑马鱼肝 (ZFL) 细胞的生长和转录调控作用。结果含 13 种成分的混合物明显抑制 ZFL 细胞的体外增殖。利用寡核苷酸的 DNA 芯片锁定 14 000 个斑马鱼转录体, 获得了混合药物作用后的 ZFL 细胞基因表达谱。结果发现混合药物对 ZFL 细胞的作用涉及主要的代谢和细胞周期调控相关的转录抑制, 同时还观察到用于识别蛋白激酶信号通路和 DNA 修复机制的相关基因表达上调, 一些已鉴定的转录体可能与这些药物的全身毒性有关, 而另一些则可能与药物的特定效应相关。这些药物也造成雌二醇受体  $\beta$  和雌二醇反应蛋白 GREB1 的超表达。此研究为这些药物的潜在毒性风险的发现提供了参考。

## 1.2 基于宏观组织、器官功能水平的斑马鱼毒性研究

斑马鱼筛选技术为化合物对中枢神经系统、心脏、肠道功能等潜在脱靶效应提供非常早的预测, 还可以用于早期一般药理学评价。

**1.2.1 中枢神经系统 (CNS) 评价** 斑马鱼近年来成为中枢神经系统研究的重要模式生物。斑马鱼脑的整体组织与其他脊椎动物相似, 有明确的定义域如下丘脑和嗅球、侧脑皮层的包围结构, 看似与哺乳动物海马状突起同源<sup>[42]</sup>。此外, 存在主要神经递质如胆碱能、5-羟色胺、多巴胺和去甲肾上腺素系统通路, 并分布在整个大脑<sup>[43-44]</sup>。斑马鱼幼鱼最近已成为神经行为研究的焦点, 如学习、睡觉、药物成瘾等<sup>[45-49]</sup>。发育正常的斑马鱼血脑屏障在受精后 10 d 起作用<sup>[50]</sup>。此外, P-糖蛋白转运体在受精后 8 d 出现于中枢神经系统内皮微血管中, 这与 P-糖蛋白底物从斑马鱼脑中外排的结果一致。这些研究显示可用斑马鱼建立研究药物神经活性的相关模型。

(1) 运动行为 (locomotor activity): 改进的活动测量实验可适于追踪斑马鱼的运动行为。斑马鱼幼鱼从受精后 96 h 开始能自由游泳, 可测试其在含有待测化合物基质中的运动行为<sup>[51]</sup>。

镇静类化合物氯氮平 (clozapine, 12.5~50 mmol/L)、氟西汀 (fluoxetine, 4.6 mmol/L)、褪黑激素 (melatonin, 0.01~100 mmol/L)、地西洋 (diazepam, 0.01~100 mmol/L) 和戊巴比妥 (pentobarbital, 0.01~100 mmol/L) 可引起斑马鱼幼鱼运动障碍<sup>[45,52-53]</sup>。1%~2%乙醇可引起斑马鱼活动过度, 但在高质量分数 (4%) 时则抑制自发活动并引起毒性<sup>[54-55]</sup>。

(2) 致惊厥、抽搐 (convulsant and proconvulsant liability): 斑马鱼幼鱼在受精后 7 d 对戊四唑 (pentylenetetrazole, PTZ) 的反应呈浓度依赖, 从增加游泳活动到快速“漩涡般”行为乃至全身性的强直阵挛发作。3 阶段现象开始的潜伏期取决于惊厥剂的浓度。斑马鱼癫痫模型已得到验证<sup>[56]</sup>。此外, 癫痫发作都伴随着中枢神经系统中 C-fos 基因的快速增量调节。利用视频跟踪系统, 证实了 13 个已知抗癫痫药物能缓解并抑制 PTZ 诱导的癫痫发作<sup>[57]</sup>。用双盲试验对 17 种致癫痫化合物和 8 个阴性化合物进行测定, 预测准确性达 72%<sup>[58]</sup>。此法亦可用于潜在的抽搐剂筛查<sup>[59]</sup>。因此, 斑马鱼用于化合物的致惊厥和致抽搐的早期预测是非常可能的。

(3) 认知缺损 (cognitive impairment): 目前已经建立了许多斑马鱼学习和认知模型, 经过完善和验证, 可用于测试中枢神经系统活性药物的潜在安全性。通过检测听觉刺激所致的受惊反应减少程度来研究斑马鱼幼鱼受精后 7 d 的非联想学习<sup>[60]</sup>。具

有增强认知能力的药物如多奈哌齐 (donepezil, 3 mmol/L)、美金刚 (memantine, 30 mmol/L) 和磷酸二酯酶-4 抑制剂咯利普兰 (rolipram, 3 mmol/L) 能调节斑马鱼适应听觉刺激。如用损害记忆的化合物如莨菪碱, 可直接评测该系统是否可用于认知障碍和认知改善的检测。已有研究表明斑马鱼具有快速和可靠的学习能力, 它们会游到池塘里的某些位置以避免诸如电击<sup>[61]</sup>或移动网<sup>[62]</sup>的不良刺激。

(4) 依赖性 (dependence liability): 条件性位置偏爱实验是目前评价药物精神依赖性的经典实验模型, 也是广泛应用于寻找抗觅药行为的有效工具, 已成为研究啮齿类动物和鱼类药物强化性的首选方法。遵循原理相同: 允许动物在测试盒中随心所欲地探索, 确定其在盒子的偏爱隔间, 随后, 将其暴露于最差偏爱隔间的药物中, 然后评价动物的偏爱变化<sup>[47]</sup>。用此方法证实了可卡因 (cocaine, 5~15 mg/L) 和右旋苯丙胺 (damphetamine, 40 mg/g) 能引起成体斑马鱼的条件性位置偏爱反应<sup>[49,63]</sup>。

另一种箱式实验是用受精后 14 d 的斑马鱼幼鱼研究吗啡 (morphine, 0.8 mmol/L) 的强化性。在实验中, 斑马鱼幼鱼可以有时间选择呆在含水或含吗啡的隔间中。实验前幼鱼已在含有吗啡的隔间中呆更长时间。用阿片受体拮抗剂纳洛酮 (naloxone, 0.5 mmol/L) 或多巴胺受体 D1 的拮抗剂 SCH 23390 (9 mmol/L) 预处理可减弱此种行为<sup>[64]</sup>。故成体斑马鱼和幼鱼都可用于行为学研究以评价药物作用。

**1.2.2 视觉功能 (visual function)** 由于斑马鱼视网膜与人类的非常类似, 其视觉系统可用于评价视觉功能<sup>[65]</sup>。斑马鱼和人类一样具有丰富的彩色视觉, 为测试啮齿动物的夜间活动提供了优势。斑马鱼胚胎的视觉系统发育非常快速, 使其能够进食和回避捕食者, 因此, 幼鱼表现的视觉介导的行为可以用于视觉评价<sup>[66]</sup>。最早的可量化的视觉行为是视觉惊吓反应, 表现在受精后 68 h, 幼鱼对光强度的突然减少而产生的快速移动<sup>[67]</sup>。这种行为反应自视网膜的光感受器和突触带形成时开始<sup>[68]</sup>。根据电生理学、形态学和行为标准, 幼鱼在受精后 5 d 时视网膜系统发育完善<sup>[69]</sup>。

评价斑马鱼视觉功能的方法是利用其先天视反射的优势, 例如已建立的光动反应和视动反应 (optokinetic response and optomotor response, OMR) 检测方法<sup>[70]</sup>。OMR 测试可高通量评价化合物对斑马鱼视觉的影响, 可能会成为首要的筛选法。斑马

鱼 OMR 的验证试验正确地预见 8 个化合物中 6 个化合物 [氯喹 (chloroquine, 100 mmol/L)、氯丙嗪 (chlorpromazine, 10 mmol/L)、地西洋 (diazepam, 10 mmol/L)、尼古丁 (nicotine, 6.2 mmol/L)、哇巴因 (ouabain, 50 mmol/L) 和苯妥英 (phenytoin, 100 mmol/L)] 对斑马鱼视觉功能的影响, 并以阿司匹林 (aspirin) 为阴性对照药物<sup>[71]</sup>。

**1.2.3 听觉功能 (auditory function)** 虽然鱼和哺乳动物的耳朵总体解剖学存在明显的差异, 但它们的毛细胞结构与功能是高度保守的<sup>[72]</sup>。耳石内和斑马鱼侧线中的毛细胞在听觉方面发挥了至关重要的作用<sup>[73]</sup>。

筛选斑马鱼听觉缺陷的一个简单的方法是寻找异常的游泳模式。成年野生鱼维持一个正常直立位置, 从上面几乎看不见他们的背腹轴和横向条纹。听觉系统突变鱼的特点是游泳兜圈子或成环, 休息时横躺或上下颠倒<sup>[74]</sup>。

Bang 等<sup>[75]</sup>设计了一个自动化、高通量的评价成体斑马鱼听力的筛选法, 主要是靠观察触发听觉引起的惊吓反应。对于无反应的则进一步用放射分析法评价听觉系统的形态缺陷。而且这种方法已被应用于斑马鱼幼体。斑马鱼幼鱼受精后 7 d 受到听觉刺激后引起急剧的、可量化的自主活动增加<sup>[76]</sup>。

研究证明斑马鱼幼鱼经一些药物作用后其侧线毛细胞消失, 如庆大霉素 (gentamicin, 5 mmol/L)、新霉素 (neomycin, 10 mmol/L) 和顺铂 (cisplatin, 50 mmol/L), 另外还报道了谷胱甘肽 (glutathione, 100 mmol/L) 和其他抗氧化剂对经顺铂处理的斑马鱼听力有保护作用<sup>[77-79]</sup>。Tilton 等<sup>[80]</sup>研究表明暴露铜、毒死蜱或其混合物后, 斑马鱼出现游泳功能障碍。

**1.2.4 心脏功能 (cardiac function)** 人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH) 指南 (FDA, 2005) 要求任何候选药物在人体评价之前要进行体外实验测试其对 hERG 通道表达的作用及体内实验评价其对 QT 间期延长的影响。斑马鱼模型能够反映化合物通过多种机制影响 QT 间期延长的作用。斑马鱼幼鱼透明, 不需要物理干预就可观察其心率、脉管系统和循环系统。斑马鱼胚胎心脏在受精后 26 h 开始跳动<sup>[81]</sup>, 在受精后 2 d 成环<sup>[82]</sup>, 在受精后 3 d 形成完整功能的血管树<sup>[83]</sup>, 在受精后 4 d 心肌细胞增殖使心室壁增厚<sup>[84]</sup>, 到受精后 5 d 心脏瓣膜发育<sup>[85]</sup>。人 hERG 和斑马鱼 zERG 具有较高的相似性, zERG

仅在斑马鱼心脏的两房表达, 具有 99% 人类同源基因的保守氨基酸序列。

敲除 zERG 基因导致典型的心律失常, 2 次心房跳动耦合 1 次心室跳动。用具有延长 QT 间期作用的药物测试, 可使鱼胚胎 (受精后 3 d) 引起这种特殊的呈浓度依赖性的心律失常: 较低浓度药物诱导心动过缓, 较高浓度导致退耦 (2:1), 有时呈更显著的去耦 (3:1 和 4:1)、不规则性心律失常、纤维性颤动或完全心室阻滞<sup>[86-87]</sup>。该法能够筛选出已知阻止 hERG 的 QT 间期延长的药物如特非那丁 (terfenadine)、西沙必利 (cisapride) 和匹莫齐特 (pimozide), 以及不影响 hERG 通道的化合物如 YS-035、L-型钙通道阻滞剂。

Burns 等<sup>[88]</sup>培育出在心肌表达绿色荧光蛋白的胚胎, 使用显微镜扫描 96 孔板, 同时用软件检测荧光心脏和像素强度变化, 从而能读出 95% 幼鱼的心率。此法能够检测出已知延长 QT 间期的药物引起的心动过缓, 有助于更早期检测斑马鱼心率。由此可见, 斑马鱼模型具有早期心脏安全性评价的实用性和适用性<sup>[89]</sup>。

**1.2.5 消化道功能 (gastrointestinal function)** 斑马鱼胚胎在受精后 36 h 开始肠道发育, 在 72 和 96 h 时分别形成明显的前、后部消化道<sup>[90]</sup>。斑马鱼消化道早在受精后 4 d 肛门畅通和管腔开启后, 开始滋生细菌<sup>[91-92]</sup>。与肠道同时形成的肝脏和胰腺也在 4 d 内发育<sup>[90]</sup>。因此, 在受精后 4~5 d 的斑马鱼消化道形态已发育良好, 外源性喂养在 5 d 时开始。由于幼鱼体透明, 体内消化道的收缩可在显微镜下观察和定量<sup>[93]</sup>。

斑马鱼的肠道蠕动受肠神经系统的控制<sup>[94]</sup>。Berghmans 等<sup>[57]</sup>测试了 10 个化合物对斑马鱼幼鱼受精后 7 d 的肠道蠕动影响, 结果其中 8 个化合物表现出预期的收缩次数减少作用; 此外, 2 种平滑肌松弛剂去甲肾上腺素和氯丙嗪会造成肠腔扩张。

一些药物对斑马鱼的作用与来自其他体内外模型或临床现有数据呈现出正相关。斑马鱼的肠道收缩便于观察和量化, 意味着可用于评价临床最常见的不良反应 (ADR) 恶心呕吐<sup>[95]</sup>。

**1.2.6 肾功能 (renal function)** 硬骨鱼类前肾是一个简单的肾器官, 由一对肾单位和在中线融合的 2 对肾小球组成, 前肾小管通过颈状节和一对双向原肾管直接与肾小球相连, 血液经原肾管直接滤出。斑马鱼胚胎在受精后 40 h 时肾开始过滤血液。肾小

球结构虽然简单,但其具有在高等脊椎动物肾脏中的许多类型细胞,包括有孔毛细血管内皮细胞、足细胞和分化的肾小管上皮细胞<sup>[96]</sup>。

肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 是评价肾功能的最好参数,菊糖清除率是测定滤过率的黄金标准。尽管斑马鱼肾脏结构简单,但庆大霉素对哺乳动物肾功能的不良作用也可在斑马鱼前肾中观察到。庆大霉素是一种具有哺乳动物肾毒性的氨基糖苷类抗生素。在斑马鱼胚胎受精后 50~54 h 时给心脏的静脉窦注射庆大霉素 (10 mg/mL),可引起鱼的一些形态变化:心包和硬脑膜水肿,碎片累积于管腔内,肾小管和肾小球膨胀,以及肾小管受到泄殖腔挤压。此外,白细胞在肾小管周积聚,偶尔渗入肾小球。Drummond 等<sup>[96]</sup>给鱼注射葡聚糖和菊糖,通过心脏荧光面积的变化来量化清除率。斑马鱼经庆大霉素处理后,其对葡聚糖和菊糖的清除率分别减少 75%和 67%;用另一种肾毒性药顺铂 (1.5 mg/mL) 处理,也显示肾小球滤过率发生变化。因此,尽管斑马鱼的简单前肾和复杂的人类肾脏不同,但对肾损伤的反应是保守的<sup>[97]</sup>。王雪等<sup>[98]</sup>研究发现大黄酸对马兜铃酸引起的斑马鱼肾脏损伤有一定的减轻作用。综上,评价药物影响斑马鱼肾功能的参数为形态学变化、炎症反应和肾清除率测定。

**1.2.7 骨密度 (bone density)** 斑马鱼的骨骼和哺乳动物相似,其形成也包括软骨内骨化和膜内骨化<sup>[99-100]</sup>。斑马鱼骨含成骨细胞和破骨细胞,前者负责骨架形成和骨矿化<sup>[101]</sup>,后者负责骨吸收<sup>[102]</sup>。Fleming 等<sup>[103]</sup>建立了影响骨密度化合物的斑马鱼体内高通量筛选模型,实验用斑马鱼幼鱼 (受精后 5~10 d) 在 96 孔板中进行,利用斑马鱼幼鱼的体积小和快速发育的优势,以茜素红染色来量化骨矿化。在幼鱼基质中加入类固醇泼尼松龙 (25 mmol/L) 造模后,则幼鱼骨矿化面积减少 50%<sup>[104]</sup>。目前,国内实验室已成功利用斑马鱼骨质疏松模型开展了骨质疏松中药的相关研究<sup>[105-107]</sup>。

### 1.3 基于多靶点、多指标水平的斑马鱼毒性研究

为了较全面、系统认识化合物的毒性,采用多靶点、多层次指标、多检测方法有机整合的研究方式正在成为斑马鱼模型应用于毒性研究的重要方向。特别是基因组学、蛋白质组学和代谢组学等技术的应用,为识别药物作用的详尽模式提供了巨大支撑。

#### 1.3.1 对多种生物标志物和组织超微结构的检测,

有助认识化合物对斑马鱼的毒性 Hoffmann 等<sup>[108]</sup>以性腺超微结构和内分泌生物标记物如血浆卵黄蛋白原、睾酮 (testosterone)、11-酮基睾酮 (11-ketotestosterone)、17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol) 为指标,采用组织病理学和 RT-PCR 技术检测,通过基因本体论 (gene ontology, GO) 分析,结果表明雌激素暴露能影响激素和维生素 A 代谢、类固醇结合、固醇类代谢及细胞生长等多种生物过程的基因,可作为检测雌激素暴露的生物标志物。

Sancho 等<sup>[109]</sup>研究了斑马鱼暴露于戊唑醇时代谢、解毒及内分泌功能等多重生理性的变化,检测斑马鱼组织匀浆中 3 类指标:(1) 代谢指标:葡萄糖、胆固醇、三酰甘油、乳酸、蛋白质;(2) 解毒酶: $\gamma$ -谷氨酰转氨酶、丙氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶;(3) 内分泌功能指标:卵黄蛋白原。另测定半数致死浓度 (LC<sub>50</sub>) 和肥胖因子。结果表明戊唑醇对斑马鱼产生多重生理破坏作用。

**1.3.2 对多组织基因谱的分析有助于提高对药物效应的认识** Martyniuk 等<sup>[110]</sup>用微阵列芯片和实时 RT-PCR 技术分析雄性斑马鱼暴露于 EE<sub>2</sub> 后的肝脏及终脑中基因组反应。结果发现将斑马鱼暴露于 EE<sub>2</sub> (10 ng/L) 21 d,肝脏中与雌激素暴露相关的生物标志物有 vtg1、vtg3、雌激素受体  $\alpha$  (esr1) 和载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, apoA1),其 mRNA 水平有不同程度上调,而 ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>1a (atp1b1a) mRNA 水平下调。GO 分析表明,肝、脑 2 个组织存在 EE<sub>2</sub> 调控的共同生物过程和分子调控功能 (如电子传递和细胞交流),但基因分类却有组织特异性改变。

Gonzalez 等<sup>[111]</sup>研究镉对斑马鱼的 4 个器官 (鳃、肝、骨骼肌和脑) 基因表达的影响。成年雄性斑马鱼在 3 中不同镉污染水中生长 7 和 21 d。共选择了 14 个基因,它们涉及抗氧化防御系统、金属螯合、有机化合物主动外排、线粒体代谢、DNA 修复、细胞凋亡,用实时 RT-PCR 技术进行基因定量分析。结果表明不同组织基因表达与调控具有差异性。

**1.3.3 宏观与微观多重指标的有机结合有助于揭示药物的多重效应与机制** Lancieri 等<sup>[112]</sup>从死亡率、形态/组织学改变和钙调蛋白基因表达的变化研究氟甲喹对斑马鱼的胚胎毒性。将斑马鱼胚胎暴露于不同浓度氟甲喹中 35 d,所有浓度药物均显著提高鱼胚胎病死率,而且还导致鱼躯干变化和不对称鳍生成,特别是躯干的背腹侧和中横轴变薄,鱼软骨、

肌肉和神经结构出现发育缺陷,肌节不规则、肌束不连续等肌肉组织的改变发生在鱼尾。以钙调蛋白信使 RNA 为探针的原位杂交分析发现,给药组鱼胚胎的躯干和背侧支脊神经信号强度显著降低。说明药物可能存在多重效应。Jin 等<sup>[113-114]</sup>以细胞凋亡、氧化应激酶活性及基因表达为多层次指标,研究了阿特拉嗪、氯氰菊酯对斑马鱼肝脏、卵巢的毒性作用,揭示了氧化应激反应机制。

## 2 斑马鱼在中药毒性研究的思路与策略

### 2.1 中药毒性研究方法有待完善与丰富

长期受中药有效和副作用小的思想影响,中药毒性的现代研究一直是比较薄弱的环节,当前中药毒性研究主要借鉴现代毒理学的技术和方法。近年来,中药毒性的研究正日益受到重视,体现传统中医理论的基于系统生物学、代谢组学等新思路、新方法的涌现使中草药的毒性研究迈上了一个新的高度。但也存在不足,主要表现在(1)体内毒性方面:体内毒性研究方法虽然经典、规范,但由于中药成分复杂,用量较大,有时超过实验动物的胃容量,甚至引起动物死亡;中药毒性较低,有时甚至测不出半数致死量等数据,不能客观反映中药毒性实质;体内毒性研究劳动强度相对较大,难以实现高通量、快速毒性筛选。(2)体外毒性方面:体外毒性筛选方法缺陷在于实验体系无器官和组织的相互作用、无完整免疫系统和无血液循环,因此不能精确模拟体内环境;体外实验条件要求相对较高,成本高、耗时长,一般实验室难以进行;体外毒性研究缺乏中医理论的指导,难以体现中药作用整体观,其结果或结论具有较大的局限性和片面性,难以客观、科学地阐释中药毒性的实质。中药毒性研究方法有待丰富。

中药特别是复方为一个复杂的科学体系,化学成分复杂,通过多途径、多环节作用于多靶点产生的整体调节作用,从中药作用的整体观出发,研究中药在完整活体体系下的整体毒性作用,建立能兼容体内、体外毒性实验方法的优点,弥补它们不足的毒性研究模型将会是一个较理想的中药早期毒性筛选模型。采用器官、系统发育完善的模式生物斑马鱼进行中药毒性研究有望实现这一目标。

斑马鱼特有的生物学特性决定了其具有作为成本-效益(cost-effective)毒理模型的独特优势,斑马鱼毒性评价方法已相对成熟并日臻完善,评价化合物数量由单一成分发展到多个成分同时进行,评

价靶标由单一组织、器官发展成多个组织、器官同时进行,评价指标由宏观到微观多个层次表征,特别是近年来的代谢组学、蛋白质组学及基因组学的融入,揭开了斑马鱼毒性评价新篇章<sup>[115]</sup>。斑马鱼毒性评价多成分、多靶点的新理念正契合中医药作用整体观的特点,国内的相关研究在近 5 年开始探索<sup>[116-119]</sup>和快速模仿<sup>[120-125]</sup>,如何充分借鉴斑马鱼毒性研究的最新成果,建立符合中医药特点的斑马鱼毒性评价技术体系,有益丰富中药毒性评价方法,是亟待深入、系统研究的课题。

### 2.2 斑马鱼模型在中药毒性评价中的研究思路与策略

根据本团队在中药毒性研究的积累,以及将斑马鱼用于中药毒性研究的初步探索,结合中药整体观思想,借鉴国外最新研究成果,建议该模型的建立可从以下几方面着手:研究对象的选择、给药与取样方法的研究、药物剂量选择、指标选择与检测、重现性试验、斑马鱼模型与小鼠急性毒性相关性(图 2)。

**2.2.1 研究对象的选择** 建议选择毒性及机制相对明确的中药为模式药,遵循由点到面,由简单到复杂的原则,依次选择单一成分、有效部位及中药提取物进行研究。

**2.2.2 给药与取样方法的研究** 国外常用的给药方式为暴露于基质或注射。斑马鱼易通过皮肤和腔道吸收药物,对 DMSO 耐受,复杂中药成分更适于暴露给药方式,成体鱼和幼鱼均可,简单、易操作。斑马鱼在中药毒性评价中,通常采用将待测药物按一定浓度溶解在斑马鱼的培养池中,以暴露给药的方式进行实验。由于中药的特点,中药提取物常常会用不同溶剂(水、乙醇、醋酸乙酯、正丁醇等)提取,在暴露给药时溶剂可能会对实验结果产生影响,可以尽量将提取物真空干燥或冷冻干燥,再溶解稀释,水溶性提取物直接用培养液稀释,极性小的样品先用 DMSO 助溶后,再用培养液稀释,空白对照组选用相应溶剂对照。

**2.2.3 药物剂量的选择** 取斑马鱼(或胚胎)数 10 个,分别置于含有不同浓度有毒中药提取液中,随机分组,每组含斑马鱼(或胚胎)10 个,药物浓度按 10 倍量稀释。观察 24、48 h 内受试鱼的反应情况,以确定正式实验的浓度范围,一般药物浓度( $C_{max}/C_{min}$ )在 5~50。

**2.2.4 指标选择与检测** 根据中药多成分、多靶点

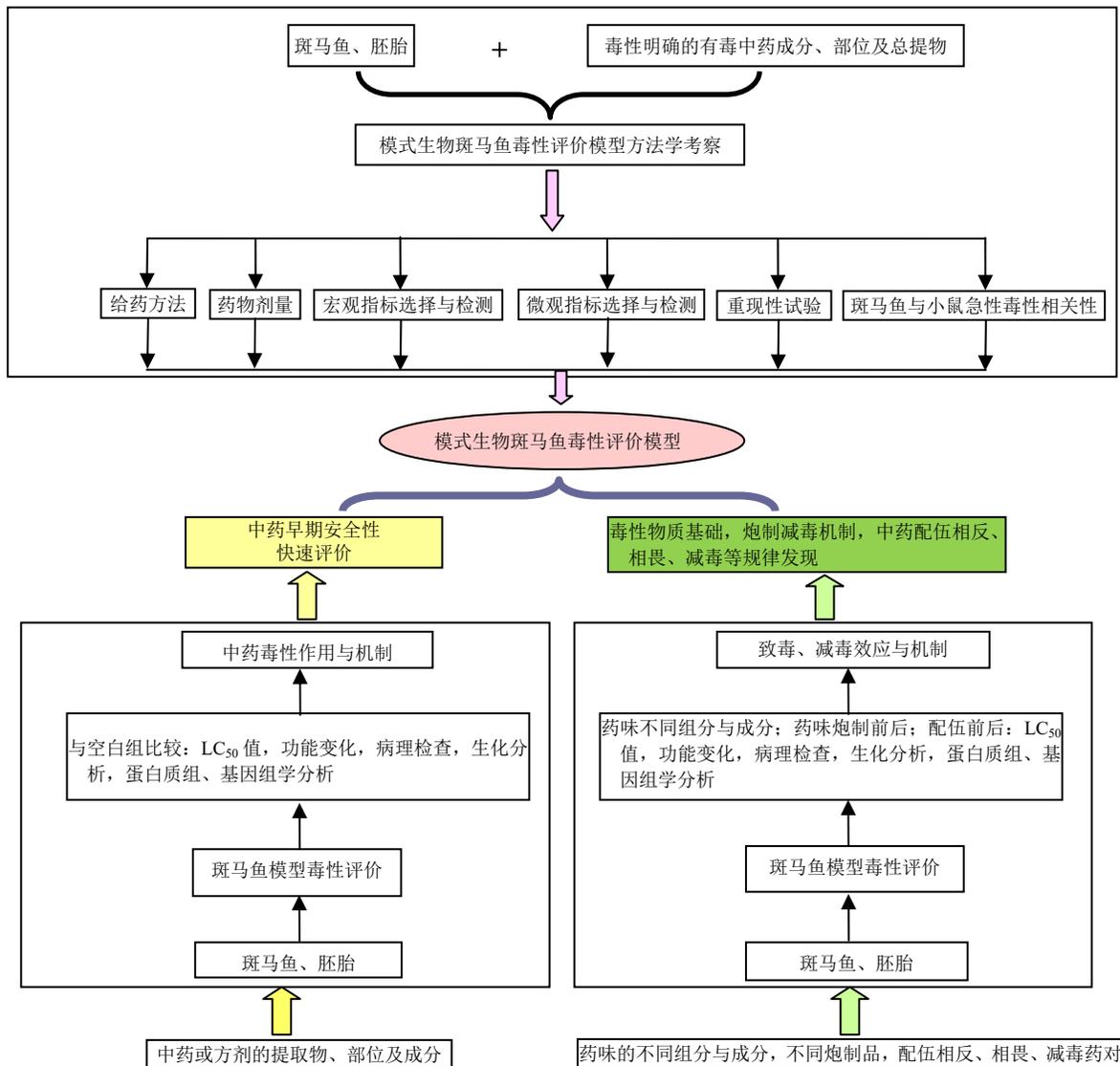


图 2 模式生物斑马鱼中药毒性模型的建立与应用策略示意图

Fig. 2 Strategy map of model establishment and application of model organism zebrafish in Chinese materia medica toxicity

的整体作用特点, 建议遵循由面到点, 由宏观到微观的原则选择检测指标。

(1) 宏观指标选择与检测: 以致死率、 $LC_{50}$  值初步分析药物的毒性大小; 以行为、功能变化判断毒性靶组织、器官; 以鱼体及主要脏器心、肝、肾的病理检查判断组织病理学病变。

(2) 微观指标选择与检测: 选择生物标志内源性成分进行生化分析; 进行生物标志蛋白、蛋白质组表达; 生物标志基因、基因组表达的差异分析。根据研究内容选择检测方法, 如双向电泳、数字成像、免疫组织化学、微阵列芯片和实时 RT-PCR 等技术, 以期从微观层面揭示毒性机制。

2.2.5 重现性试验 选取有毒成分、部位及提取物

各一种样品为代表, 进行重现性考察, 平行 3~5 次实验。

2.2.6 斑马鱼模型与小鼠急性毒性相关性 将斑马鱼与小鼠急毒模型的  $LC_{50}$  值, 行为、功能变化, 病理组织学, 内源性标志物, 生物标志蛋白、基因等检测结果进行比对, 探讨两者相关性, 明确斑马鱼毒性模型表征中药毒性的合理性。

### 2.3 斑马鱼中药毒性评价模型的应用思路与策略

斑马鱼中药毒性模型可有力辅助现有模型, 用于中药安全性早期快速评价及毒性机制发现, 进而用于与中药毒性相关的毒性物质基础、炮制减毒、以及配伍相反、相畏等规律研究 (图 2)。

2.3.1 用于中药早期安全性快速评价 常嘉等<sup>[126]</sup>

研究发现建立的斑马鱼胚胎发育模型稳定,可应用于药物的早期毒性筛选。可考虑以《中国药典》收录的、临床常用的中药、名方中成药及有毒成分为代表。先期可选择毒性明确的研究对象,如有毒中药成分(如雷公藤甲素、马钱子碱、马兜铃酸)、有毒部位(雷公藤总苷、马钱子总碱)、有毒中药及复方(马钱子、雷公藤、木通、大戟及龙胆泄肝汤)等,采用所建立的斑马鱼模型进行毒性研究,主要检测致死率、 $LC_{50}$ ,行为功能及组织病理学,以发现早期毒性。进而对内源性成分、生物标志蛋白质(组)、基因(组)表达等指标进行差异分析,以探求毒性机制。这有助于验证斑马鱼毒性模型合理性与可靠性。在此基础上可将斑马鱼模型进一步用于毒性不明确的中药早期安全性评价,探索该模型的适用性。

**2.3.2** 用于与中药毒性相关的毒性物质、炮制减毒、以及配伍相反、相畏等规律研究 以药味的不同组分与成分,不同炮制品,配伍相反、相畏、减毒药对等为研究对象,用斑马鱼模型进行毒性评价,以致死率、 $LC_{50}$ 、功能、病理检查、生化分析、蛋白质(组)、基因(组)等为检测指标,进行差异比较分析,判断致毒、减毒效应与机制。以深入探索斑马鱼毒性评价模型的效用。

### 3 模式生物斑马鱼中药毒性评价模型的展望

用模式生物斑马鱼进行中药及其复杂体系的安全性快速检测研究,从而建立一种能体现中药作用整体观的中药毒性早期快速筛选新平台。与经典的在体急性毒性方法相比,模式生物斑马鱼最大限度地保留了在体活体的系统性,克服了在体动物实验强度大、周期较长的缺陷,同时克服了给药容积、浓度的限制,易于获得 $LC_{50}$ 值及生理、发育内源性生物标志物,生物标志蛋白、基因等指标变化,使中药毒性高通量快速筛选及毒性机制发现成为可能。与体外毒性研究相比,模式生物斑马鱼能有效地模拟在体的完整活体体系,克服了体外实验结果片面性、难以体现中药作用整体观的缺陷;克服体外实验条件要求高、成本高、耗时长、一般实验室难以进行的缺陷。模式生物斑马鱼代谢模型为中药复杂体系的安全性快速检测及毒性相关研究提供了一种简单的、模式的、生物的、系统的、高效的新方法。

#### 参考文献

[1] Streisinger G, Walker C, Dower N, *et al.* Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio*

*rerio*) [J]. *Nature*, 1981, 291(2813): 293-296.

- [2] Grunwald D J, Eisen J S. Headwaters of the zebrafish-emergence of a new model vertebrate [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(9): 717-724.
- [3] Tomasiewicz H G, Renee H, Michael John C, *et al.* Zebrafish as a model system for environmental health studies in the grade 9-12 classroom [J]. *Zebrafish*, 2014, 11(4): 384-395.
- [4] Tiedeken J A, Ramsdell J S. DDT exposure of zebrafish embryos enhances seizure susceptibility: relationship to fetal p, p'-DDE burden and domoic acid exposure of California sea lions [J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(1): 68-73.
- [5] Ellegood J, Anagnostou E, Babineau B A, *et al.* Clustering autism: using neuroanatomical differences in 26 mouse models to gain insight into the heterogeneity [J]. *Mol Psychiatry*, 2015, 20(1): 118-125.
- [6] Kalueff A V, Adam Michael S, Robert G. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(2): 63-75.
- [7] Wilkins B J, Pack M. Zebrafish models of human liver development and disease [J]. *Compre Physiol*, 2013, 3(3): 1213-1230.
- [8] Kroeger P T, Wingert R A. Using zebrafish to study podocyte genesis during kidney development and regeneration [J]. *Genesis*, 2014, 52(9): 771-792.
- [9] Lu J W, Ho Y J, Yang Y J, *et al.* Zebrafish as a disease model for studying human hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(42): 12042-12058.
- [10] Hill A J, Teraoka H, Heideman W, *et al.* Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 86(1): 6-19.
- [11] Huang C C, Monte A, Cook J M, *et al.* Zebrafish heart failure models for the evaluation of chemical probes and drugs [J]. *ASSAY Drug Dev Technol*, 2013, 11(9/10): 561-572.
- [12] 许冰洁, 张立将, 李春启, 等. 斑马鱼胚胎评价 5 种药物的发育毒性与模型验证 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(1): 74-79.
- [13] 陈丽晓, 何明芳, 高晓平, 等. 基于斑马鱼模型探讨猪牙皂苷类药物急性毒性与结构的关系 [J]. *药学服务与研究*, 2015, 15(6): 466-468.
- [14] 杨雨婷, 何育霖, 张 雪, 等. 广藿香油及其主要成分对斑马鱼胚胎发育毒性的比较研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2015, 24(21): 14-16.
- [15] 陈锡强, 侯海荣, 刘可春, 等. 苍耳子提取物对斑马鱼的发育及运动行为的毒性研究 [J]. *山东科学*, 2014, 27(5): 9-13.
- [16] 陈云祥, 张城达, 张丽丽, 等. 基于斑马鱼模型进行马兜铃酸心血管毒性的评价 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(8): 1891-1894.

- [17] 何秋霞, 董贞兰, 楚杰, 等. 芦荟大黄素对斑马鱼胚胎发育及运动行为学的毒性研究 [J]. 山东科学, 2015, 28(3): 23-28.
- [18] Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* [M]. 3rd ed. Eugene: University of Oregon Press, 1995.
- [19] Rombough P. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O<sub>2</sub> uptake in developing zebrafish, *Danio rerio* [J]. *J Exp Biol*, 2002, 205(12): 1787-1794.
- [20] 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.
- [21] Kettleborough R N, Busch-Nentwich E M, Harvey S A, *et al.* A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 494-497.
- [22] Postlethwait J H, Woods I G, Ngo-Hazelett P, *et al.* Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes [J]. *Genome Res*, 2000, 10(12): 1890-1902.
- [23] Sukardi H, Chng H T, Chan E C, *et al.* Zebrafish for drug toxicity screening: bridging the *in vitro* cell-based models and *in vivo* mammalian models [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2011, 7(5): 579-589.
- [24] Goldstone J V, McArthur A G, Kubota A, *et al.* Identification and developmental expression of full complement of cytochrome P450 genes in zebrafish [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 643-663.
- [25] Chung W G, Sen A, Wang-Buhler J L, *et al.* cDNA-directed expression of a functional zebrafish CYP1A in yeast [J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 70(2): 111-121.
- [26] Huang H Y, Wu Q. Cloning and comparative analyses of the zebrafish Ugt repertoire reveal its evolutionary diversity [J]. *PLoS One*, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0009144.
- [27] 梁爱华. 斑马鱼——一种可用于中药药效和毒性筛选的鱼类模型 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2839-2842.
- [28] Dong W, Muramoto W, Nagai Y, *et al.* Retinal neuronal cell is a toxicological target of tributyltin in developing zebrafish [J]. *J Vet Med Sci*, 2006, 68(6): 573-579.
- [29] Plachinta M, Zhang T, Rawson D M. Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) oocytes [J]. *Cryo Lett*, 2004, 25(6): 415-424.
- [30] Van der Ven L T, Wester P W, Vos J G. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2003, 22(4): 908-913.
- [31] Senger M R, Rico E P, de Bem Arizi M, *et al.* Exposure to Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Toxicology*, 2006, 226(2/3): 229-237.
- [32] Thompson E D, Burwinkel K E, Chava A K, *et al.* Activity of phase I and phase II enzymes of the benzo[a]pyrene transformation pathway in zebrafish (*Danio rerio*) following waterborne exposure to arsenite [J]. *Comp Biochem Physiol Part C*, 2010, 152(3): 371-378.
- [33] Goessling W, North T E, Lord A M, *et al.* APC mutant zebrafish uncover a changing temporal requirement for wnt signaling in liver development [J]. *Dev Biol*, 2008, 320(1): 161-174.
- [34] Krone P H, Blechinger S R, Evans T G, *et al.* Use of fish liver PLHC-1 cells and zebrafish embryos in cytotoxicity assays [J]. *Methods*, 2005, 35(2): 176-187.
- [35] Seok S H, Baek M W, Lee H Y, *et al.* Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line [J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21(5): 870-877.
- [36] Shrader E A, Henry T R, Greeley M S J, *et al.* Proteomics in zebrafish exposed to endocrine disrupting chemicals [J]. *Ecotoxicology*, 2003, 12(6): 485-488.
- [37] Kling P, Forlin L. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009, 72(7): 1985-1993.
- [38] Muncke J, Eggen R I. Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2006, 25(10): 2734-2741.
- [39] Villeneuve L, Wang R L, Bencic D C, *et al.* Altered gene expression in the brain and ovaries of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the aromatase inhibitor fadrozole: microarray analysis and hypothesis generation [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2009, 28(8): 1767-1782.
- [40] Handley-Goldstone H M, Grow M W, Stegeman J J. Cardiovascular gene expression profiles of dioxin exposure in zebrafish embryos [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 85(1): 683-693.
- [41] Pomati F, Cotsapas C J, Castiglioni S, *et al.* Gene expression profiles in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to a mixture of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations [J]. *Chemosphere*, 2007, 70(1): 65-73.
- [42] Tropepe V, Sive H L. Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism [J]. *Genes Brain Behav*, 2003, 2(5): 268-281.
- [43] Rink E, Wullimann M F. Connections of the ventral tele-encephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Brain Res*, 2004, 1011(2): 206-220.
- [44] Wullimann M F, Mueller T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior [J]. *J Comp Neurol*, 2004, 475(2): 143-162.
- [45] Zhdanova I V, Wang S Y, Leclair O U, *et al.* Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish [J]. *Brain Res*,

- 2001, 903(1/2): 263-268.
- [46] Cahill G M. Clock mechanisms in zebrafish [J]. *Cell Tissue Res*, 2002, 309(1): 27-34.
- [47] Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish [J]. *Genes Brain Behav*, 2004, 3(2): 63-74.
- [48] Orger M B, Gahtan E, Muto A, *et al.* Behavioral screening assays in zebrafish [J]. *Methods Cell Biol*, 2004, 77(1): 53-68.
- [49] Ninkovic J, Folchert A, Makhankov Y V, *et al.* Genetic identification of AChE as a positive modulator of addiction to the psychostimulant D-amphetamine in zebrafish [J]. *J Neurobiol*, 2006, 66(5): 463-475.
- [50] Goldsmith P, Fleming A. Screening methods employing zebrafish and the blood brain barrier: European Patent, EP1644733(A1) [P]. 2006-04-12 .
- [51] Drapeau P, Saint-Amant L, Buss R R, *et al.* Development of the locomotor network in zebrafish [J]. *Prog Neurobiol*, 2002, 68(2): 85-111.
- [52] Airhart M J, Lee D H, Wilson T D, *et al.* Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC) [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2007, 29(6): 652-664.
- [53] Boehmler W, Carr T, Thisse C, *et al.* D4 dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behavior [J]. *Genes Brain Behav*, 2007, 6(2): 155-166.
- [54] Lockwood B, Bjerke S, Kobayashi K, *et al.* Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004, 77(3): 647-654.
- [55] Parnig C, Roy N M, Ton C, *et al.* Neurotoxicity assessment using zebrafish [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007, 55(1): 103-112.
- [56] Baraban S C, Taylor M R, Castro P A, *et al.* Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression [J]. *Neuroscience*, 2005, 131(3): 759-768.
- [57] Berghmans S, Hunt J, Roach A, *et al.* Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants [J]. *Epilepsy Res*, 2005, 75(1): 18-28.
- [58] Winter M J, Redfern W S, Hayfield A J, *et al.* Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2008, 57(3): 176-187.
- [59] Tiedeken J A, Ramsdell J S. Embryonic exposure to domoic acid increases the susceptibility of zebrafish larvae to the chemical convulsant pentylentetrazole [J]. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(11): 1547-1552.
- [60] Berghmans S, Butler B, 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.
- [61] Xu X, Scott-Scheiern T, Kempker L, *et al.* Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2007, 87(1): 72-77.
- [62] Arthur D, Levin E D. Spatial and non-spatial visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Anim Cogn*, 2001, 4(2): 125-131.
- [63] Darland T, Dowling J E. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20): 11691-11696.
- [64] Bretaud S, Li Q, Lockwood B L, *et al.* A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish [J]. *Neuroscience*, 2007, 146(3): 1109-1116.
- [65] Goldsmith P, Harris W A. The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(1): 11-18.
- [66] Fleisch V C, Neuhauss S C. Visual behavior in zebrafish [J]. *Zebrafish*, 2006, 3(2): 191-201.
- [67] Kimmel C B, Patterson J, Kimmel R O. The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish [J]. *Dev Psychobiol*, 1974, 7(1): 47-60.
- [68] Neuhauss S C. Behavioral genetic approaches to visual system development and function in zebrafish [J]. *J Neurobiol*, 2003, 54(1): 148-160.
- [69] Bilotta J, Saszik S. The zebrafish as a model visual system [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2001, 19(7): 621-629.
- [70] Neuhauss S C, Biehlmaier O, Seeliger M W, *et al.* Genetic disorders of vision revealed by a behavioral screen of 400 essential loci in zebrafish [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(9): 8603-8615.
- [71] Richards F M, Kimber G, Butler P, *et al.* Prediction of ophthalmic effects in man by screening drugs for the optokinetic and optomotor responses in zebrafish [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(3): 2622.
- [72] Fekete D M. Developmental biology. Rocks that roll zebrafish [J]. *Science*, 2003, 302(5643): 241-242.
- [73] Whitfield T T. Zebrafish as a model for hearing and deafness [J]. *J Neurobiol*, 2002, 53(2): 157-171.
- [74] Nicolson T, Rusch A, Friedrich R W, *et al.* Genetic analysis of vertebrate sensory hair cell mechanosensation: the zebrafish circler mutants [J]. *Neuron*, 1998, 20(2): 271-283.
- [75] Bang P I, Yelick P C, Malicki J J, *et al.* High-throughput behavioral screening method for detecting auditory response defects in zebrafish [J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 118(2): 177-187.
- [76] Best J D, Berghmans S, Hunt J J, *et al.* Non-associative

- learning in larval zebrafish [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(5): 1206-1215.
- [77] Harris J A, Cheng A G, Cunningham L L, et al. Neomycin-induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2003, 4(2): 219-234.
- [78] Ton C, Parnig C. The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents [J]. *Hear Res*, 2005, 208(1/2): 79-88.
- [79] Santos F, MacDonald G, Rubel E W, et al. Lateral line hair cell maturation is a determinant of aminoglycoside susceptibility in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Hear Res*, 2006, 213(1/2): 25-33.
- [80] Tilton F A, Bammler T K., Gallagher E P. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures [J]. *Comp Biochem Physiol Part C*, 2011, 153(1): 9-16.
- [81] Baker K, Warren K S, Yellen G, et al. Defective 'pacemaker' current (I<sub>h</sub>) in a zebrafish mutant with a slow heart rate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 4554-4559.
- [82] Stainier D Y, Fouquet B, Chen J N, et al. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo [J]. *Development*, 1996, 123(3): 285-292.
- [83] Sehnert A J, Stainier D Y. A window to the heart: can zebrafish mutants help us understand heart disease in humans [J]. *Trends Genet*, 2002, 18(10): 491-494.
- [84] Antkiewicz D S, Burns C G, Carney S A, et al. Heideman W. Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 84(2): 368-377.
- [85] Forouhar A S, Hove J R, Calvert C, et al. Electrocardiographic characterization of embryonic zebrafish [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2004, 5: 3615-3617.
- [86] Langheinrich U, Vacun G, Wagner T. Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 193(3): 370-382.
- [87] Berghmans S. Zebrafish: validation of a pro-arrhythmia *in vivo* model [A] // Predictive Safety Assessment in Non-Clinical and Clinical Studies [C]. Amsterdam: IIR's 4th Annual QT Prolongation and Safety Pharmacology Conference, 2006-02-28.
- [88] Burns C G, Milan D J, Grande E J, et al. High-throughput assay for small molecules that modulate zebrafish embryonic heart rate [J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(5): 263-264.
- [89] Scott J A, Incardona J P, Pelkki K, et al. AhR2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to retene [J]. *Aquat Toxicol*, 2011, 101(1): 165-174.
- [90] Pack M, Solnica-Krezel L, Malicki J, et al. Mutations affecting development of zebrafish digestive organs [J]. *Development*, 1996, 123(6): 321-328.
- [91] Bates J M, Mittge E, Kuhlman J, et al. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation [J]. *Dev Biol*, 2006, 297(2): 374-386.
- [92] Rawls J F, Mahowald M A, Goodman A L, et al. *In vivo* imaging and genetic analysis link bacterial motility and symbiosis in the zebrafish gut [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(18): 7622-7627.
- [93] Holmberg A, Schwerte T, Fritsche R, et al. Ontogeny of intestinal motility in correlation to neuronal development in zebrafish embryos and larvae [J]. *J Fish Biol*, 2003, 63(2): 318-331.
- [94] Holmberg A, Schwerte T, Pelster B, et al. Ontogeny of the gut motility control system in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae [J]. *J Exp Biol*, 2004, 207(23): 4085-4094.
- [95] Andrews P L, Horn C C. Signals for nausea and emesis: implications for models of upper gastrointestinal diseases [J]. *Auton Neurosci*, 2006, 125(1/2): 100-115.
- [96] Drummond I A, Majumdar A, Hentschel H, et al. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function [J]. *Development*, 1998, 125(23): 4655-4667.
- [97] Hentschel D M, Park K M, Cilenti L, et al. Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288(5): F923-F929.
- [98] 王雪, 刘可春, 王希敏, 等. 大黄酸对马兜铃酸 A 引起的斑马鱼肾脏损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(3): 361-365.
- [99] Cabbage C C, Mabee P M. Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, cyprinidae) [J]. *J Morphol*, 1996, 229(2): 121-160.
- [100] Fleming A, Keynes R, Tannahill D. A central role for the notochord in vertebral patterning [J]. *Development*, 2004, 131(4): 873-880.
- [101] Inohaya K, Takano Y, Kudo A. The teleost intervertebral region acts as a growth center of the centrum: *in vivo* visualization of osteoblasts and their progenitors in transgenic fish [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(11): 3031-3046.
- [102] Witten P E, Hansen A, Hall B K. Features of mono- and multinucleated bone resorbing cells of the zebrafish *Danio rerio* and their contribution to skeletal development, remodeling, and growth [J]. *J Morphol*,

- 2001, 250(3): 197-207.
- [103] Fleming A, Sato M, Goldsmith P. High-throughput in vivo screening for bone anabolic compounds with zebrafish [J]. *J Biomol Screen*, 2005, 10(8): 823-831.
- [104] Barrett R, Chappell C, Quick M, et al. A rapid, high content, in vivo model of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Biotechnol J*, 2006, 1(6): 651-655.
- [105] 詹 扬, 韦英杰, 孙 娥, 等. 二维斑马鱼模型联合色谱技术评价朝藿定 A 及其代谢物宝藿昔 I 抗骨质疏松活性 [J]. *药学学报*, 2014, 49(6): 932-937.
- [106] 詹 扬, 韦英杰, 王长梅, 等. 基于斑马鱼模型评价量微淫羊藿昔和朝藿定 B 的抗骨质疏松活性 [J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49(1): 30-35.
- [107] 詹 扬, 韦英杰, 孙 娥, 等. 基于斑马鱼模型的朝鲜淫羊藿抗骨质疏松活性部位筛选 [J]. *中草药*, 2014, 45(14): 2036-2041.
- [108] Hoffmann J L, Torontali S P, Homason R G, et al. Hepatic gene expression profiling using genechips in zebrafish exposed to 17 alpha-ethynylestradiol [J]. *Aquat Toxicol*, 2006, 79(3): 233-246.
- [109] Sancho E, Villarreal M J, Ferna'ndez C, et al. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induce sphysiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2010, 73(3): 370-376.
- [110] Martyniuk C J, Gerrie E R, Popesku J T, et al. Microarray analysis in the zebrafish (*Danio rerio*) liver and telencephalon after exposure to low concentration of 17alpha-ethynylestradiol [J]. *Aquat Toxicol*, 2007, 84(1): 38-49.
- [111] Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A, et al. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Biometals*, 2006, 19(3): 225-235.
- [112] Lancieri M, Aniello F, Esposito D, et al. Embryotoxicity of flumequine on *Danio rerio*: mortality, morphological/histological alterations and changes in calmodulin gene expression [J]. *Fresenius Environ Bull*, 2004, 13(12a): 1415-1419.
- [113] Jin Y X, Zhang X X, Shu L J, et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2010, 78(7): 846-852.
- [114] Jin Y X, Zheng S S, Pu Y, et al. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2011, 82(3): 398-404.
- [115] Sukardi H, Ung C Y, Gong Z, et al. Incorporating zebrafish omics into chemical biology and toxicology [J]. *Zebrafish*, 2010, 7(1): 41-52.
- [116] 刘曦薇, 吴玲玲. 氯霉素对斑马鱼早期发育的毒性效应 [J]. *环境科学学报*, 2010, 30(8): 1649-1657.
- [117] 王思锋, 刘可春, 王希敏, 等. 雷公藤红素对斑马鱼胚胎心脏毒性的初步研究 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(2): 634-636.
- [118] 董永新, 王跃祥, 钱 林, 等. 桔梗皂苷对斑马鱼心功能及胚胎发育的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2006, 15(5): 299-303.
- [119] 舒 斌, 韦英杰, 张陆勇, 等. 采用模式生物斑马鱼评价三种中药成分的急性毒性 [J]. *云南中医学院学报*, 2010, 33(1): 35-37.
- [120] 端正花, 朱 琳, 冯鸣凤, 等. 斑马鱼基因芯片技术在双酚 A 毒性机制研究中的应用 [J]. *环境科学*, 2010, 31(3): 808-814.
- [121] 王稼农, 黄 健, 黄仁彬, 等. 秋水仙碱对斑马鱼肝脏和鳃组织 SOD 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(14): 1247-1251.
- [122] 张孝敏, 陈柳红, 郑润凯, 等. 飞机草提取物对斑马鱼心、脑毒性的病理组织学影响 [J]. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(1): 27-31.
- [123] 朱爱华, 张雨梅, 毛 伟. 洛克沙肿暴露对斑马鱼的急性毒性及其组织中 HSP70 的表达定位 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(5): 2351-2353.
- [124] 曹 娜, 魏 华, 吴陵广, 等. 双酚 A 对斑马鱼肝脏和性腺的作用 [J]. *生态学杂志*, 2010, 29(11): 2192-2198.
- [125] 王 言, 杨中林. 续断总皂苷对斑马鱼空间认知能力的影响研究 [J]. *中医药学报*, 2010, 38(2): 22-24.
- [126] 常 嘉, 陆 亮, 常 艳. 斑马鱼胚胎发育毒性模型评价方法的验证 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(2): 290-295.