

# 维甲酸对早期发育斑马鱼的心脏与骨骼毒性研究<sup>Δ</sup>

詹扬<sup>1,2\*</sup>, 王长梅<sup>2</sup>, 韦英杰<sup>2#</sup>, 贾晓斌<sup>2</sup>(1.江中药业股份有限技术中心,南昌 330096;2.江苏省中医药研究院/国家中医药管理局中药口服释药系统重点研究室,南京 210028)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2612-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.07

**摘要** 目的:研究维甲酸对早期发育斑马鱼心脏及骨骼的毒性。方法:将受精后24 h的斑马鱼胚胎作为毒性模型,分别暴露于含维甲酸0.1、1、10、25、100 μmol/L的培养基中,分别于培养24、48 h后观察胚胎和幼鱼心脏形态的变化,并计算半数致死浓度(LC<sub>50</sub>);将受精后4 d的斑马鱼幼鱼作为骨骼致畸模型,分别暴露于含维甲酸0.1、1、10、25、50 μmol/L的培养基中,5 d后处死,采用茜素红对各组斑马鱼骨骼染色,并以显微镜采集图像,观察骨骼染色区域差异。结果:维甲酸对斑马鱼胚胎的孵化能力造成了明显不利影响,且胚胎在维甲酸暴露过程中均产生了明显的心脏致畸现象。1~100 μmol/L维甲酸均对胚胎和幼鱼产生心脏致畸效应,胚胎和幼鱼表现出的主要畸形特征有心脏形态线性化、心包水肿、卵黄囊肿胀、血细胞在心区堆积。100 μmol/L维甲酸可抑制胚胎的孵化能力,且对胚胎和幼鱼造成致死效应,暴露24、48 h后LC<sub>50</sub>分别为36.44、23.69 μmol/L。0.1~50 μmol/L维甲酸均使斑马鱼幼鱼脊柱提前骨化,且骨化程度与维甲酸浓度呈正相关。结论:维甲酸对斑马鱼胚胎和幼鱼具有心脏和骨骼毒性,且与维甲酸的浓度呈正相关。

**关键词** 维甲酸;心脏毒性;骨骼致畸;斑马鱼;胚胎;幼鱼

## Study on Cardiac and Skeletal Toxicity of Retinoic Acid to *Danio rerio* at the Early Life Stage

ZHAN Yang<sup>1,2</sup>, WANG Changmei<sup>2</sup>, WEI Yingjie<sup>2</sup>, JIA Xiaobin<sup>2</sup>(1.Technology Center of Jiangzhong Pharmaceutical Incorporated Corporation, Nanchang 330096, China; 2.Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine/Key Lab of Oral Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the cardiac and skeletal toxicity of retinoic acid (RA) in *Danio rerio* at early life stage. METHODS: *Danio rerio* embryos of 24 hours post fertilization (hpf) were used as toxicity model and were exposed under medium with various concentrations of RA (0.1, 1, 10, 25, 100 μmol/L). The morphology of embryos and larvae hearts were observed 24, 48 h after exposed. LC<sub>50</sub> was calculated. *Danio rerio* larvae of 4 days post fertilization (dpf) were used as skeletal deformity model and were exposed with a series of RA at various concentration (0.1, 1, 10, 25, 50 μmol/L). They were sacrificed 5 d later, and then *Danio rerio* skeleton were fixed for staining with alizarin red. The microscopic was used to observe the difference of stained skeleton area. RESULTS: RA caused significant adverse effects on hatching capabilities of *Danio rerio* embryos, and the obvious malformation features were produced during the culture process. 1-100 μmol/L RA could cause heart malformation in *Danio rerio* embryos and larvae, and the main heart malformation characteristics included heart linearization, pericardial edema, yolksac edema, hemocytes accumulation in cardiac region. 100 μmol/L RA could inhibit the hatching capabilities of *Danio rerio* embryos, and caused lethal effects on embryos and larvae. The LC<sub>50</sub> were 36.44, 23.69 μmol/L after exposed for 24, 48 h. 0.1-50 μmol/L RA induced vertebral column sclerotization of *Danio rerio* embryos and larvae in advance, which was positively associated with the concentration of RA. CONCLUSIONS: RA can cause cardiac and skeletal toxicity in *Danio rerio* embryo and larvae, which is positively associated with the concentration of RA.

**KEYWORDS** Retinoic acid; Cardiac toxicity; Skeletal deformities; *Danio rerio*; Embryo; Larvae

近年来,维甲酸类药物治疗皮肤病的研究取得显著进展,研究发现该类药物可用于多种皮肤病的治疗,包括寻常型银

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573833);江苏省自然科学基金资助项目(No.BK20141507, BK2011866);江苏省第十批“六大人才高峰”高层次人才选拔培养项目(No.2013-YY006);江苏省第四期“333工程”科研资助项目(No.BRA2014348)

\* 助理研究员,硕士。研究方向:中药物质基础。E-mail: zy20071101@163.com

# 通信作者:研究员,博士。研究方向:中药化学、中药分析、中药代谢及中药新药的研究与开发。电话:025-85637809。E-mail: wjy970@163.com

屑病、脓疱型银屑病、痤疮、口腔扁平苔藓、皮肤T细胞淋巴瘤、顽固性扁平疣等<sup>[1]</sup>。此外,维甲酸在恶性肿瘤的发生与治疗方面同样具有重要的作用<sup>[2-3]</sup>。基于维甲酸类药物的广泛应用,其药物的临床安全性至关重要。动物灌胃和外用维甲酸后的致胚胎毒性和致畸性研究较多,但传统动物实验昂贵、耗时,且体外模型缺乏生物体的生理复杂性,评价不够准确。故采用快捷、灵敏、高效且在体的方法进行药物安全性评价具有重要意义。

模式生物斑马鱼(*Danio rerio*)是近年来进行药物毒性研究的理想、热门模型。斑马鱼发育速度快,在1周内即可形成

主要的脏器及代谢酶系,且斑马鱼与人类基因的相似度达到87%,这意味着在斑马鱼身上实验的结果,在大多数情况下也适用于人体<sup>[4]</sup>。斑马鱼胚胎透明,发育速度快,在受精后6~72 h期间经历了原肠胚期、器官形成期、成熟期、孵化期等胚胎发育的重要阶段;对外界药物刺激敏感,借助显微镜可动态、直观地观察药物对脏器的毒性<sup>[5-6]</sup>。故在本研究中,笔者用斑马鱼为模型动物,观察了维甲酸对早期发育斑马鱼心脏及骨骼的毒副作用,为其临床合理应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ZEISS 荧光倒置显微镜(蔡司光学仪器国际贸易有限公司);XW-80A 微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);Nikon Aphot-2 YS2 显微镜(日本株式会社尼康公司);Image Pro Plus 6.0 专业图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司);SPX-80 生化培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);AB135-S 分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

### 1.2 药品与试剂

维甲酸原料药(上海晨易生物科技有限公司,批号:R6728,纯度:≥98%);多聚甲醛(成都市科龙化工试剂厂,批号:20100504);间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(美国 Acros Organics 公司,批号:A0288328);茜素红(郑州四季化工产品有限公司);水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

斑马鱼成鱼(德国 Tuebingen 品系)来源于南京大学模式动物研究所。

## 2 方法

### 2.1 斑马鱼胚胎的收集和培养

控制斑马鱼成鱼日夜节律,昼夜时间控制在 14 h:10 h,饵料为丰年虾,每日中午饲喂 1 次。当天开灯后立即将收卵皿置于鱼缸中,收集受精卵,用巴斯特吸管将受精卵收集于干净培养皿中,用新鲜的超纯水清洗数次以除去未受精鱼卵、粪便等残留物,然后放入培养基(含 5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.33 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、0.33 mmol/L CaCl<sub>2</sub>)中并转移至生化培养箱中培养,培养箱温度为(28.5±0.5)℃。

### 2.2 溶液的制备与给药

2.2.1 维甲酸溶液的制备 分别精密称取维甲酸 3.06、7.511 mg,加入适量二甲基亚砜(DMSO)溶解并定容至 10 ml 量瓶中,再用培养基稀释制备成含 0.4% DMSO 的维甲酸浓度分别为 0.1、1、10、25、50、100 μmol/L 的系列溶液。

2.2.2 给药 将斑马鱼胚胎放入盛有培养基的 24 孔板中,继续置于恒温培养箱中培养。将斑马鱼暴露于维甲酸浓度分别为 0.1、1、10、25、100 μmol/L 的培养基中(斑马鱼易通过皮肤和腔道吸收药物,且斑马鱼幼鱼对 DMSO 有一定的耐受性<sup>[7]</sup>,难溶性药物可用 DMSO 配制,控制各组培养基含 DMSO 不超过 0.4%)。

### 2.3 维甲酸对斑马鱼胚胎和幼鱼心脏的毒性作用

将受精后 24 h 的斑马鱼胚胎暴露于含药的培养基中,根据预试验结果,设定维甲酸不同浓度组(0.1、1、10、25、100 μmol/L)、溶剂对照组(含 0.4% DMSO 的培养基)和空白培养

基组。在 96 孔板中预先加入各试验组相应溶液 200 μl,再挑选受精后 24 h 的胚胎,随机放入 96 孔板中,每孔放入 20 个胚胎。随后于培养箱中恒温(28℃)培养,并分别于培养 24、48 h 后观察并记录各实验组斑马鱼胚胎和幼鱼的心脏形态、孵化率等指标。试验重复 3 次。采用 SPSS 16.0 软件计算斑马鱼的半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)。

### 2.4 维甲酸对斑马鱼幼鱼骨骼的毒性作用

将受精后 4 d 的斑马鱼幼鱼放入盛有培养基的 24 孔板中,加入培养基 1 ml,分为溶剂对照组(含 0.4% DMSO 的培养基)和维甲酸不同浓度组(0.1、1、10、25、50 μmol/L),每组平行设 4 孔,每孔放 6 条幼鱼。将 24 孔板密封放入恒温培养箱(28.5℃)中培养。每天将每个孔里的培养液用移液枪吸出一半,加入等体积新鲜培养液,培养过程中斑马鱼幼鱼不喂食。连续培养 5 d 后处死,将斑马鱼幼鱼用 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液(PBS)固定 24 h,去除多聚甲醛后将斑马鱼幼鱼置于 50% 乙醇溶液中 10 min,去除乙醇,加 PBS 润洗 3 遍。然后加入用 0.5% KOH 配制的茜素红染色液,放置过夜,去除染色液,PBS 洗去多余的染液后加入新鲜配制的漂白剂(含 1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.5% KOH),放置 2 h,去除漂白剂后,再加入 PBS 润洗 3 遍。分别置于体积比为 3:1、1:1、1:3 的 0.5% KOH-甘油混合液中各 8 h,最后保存于纯甘油中<sup>[8]</sup>。用荧光倒置显微镜采集图像,并比较各组斑马鱼幼鱼骨骼染色面积差异,以考察维甲酸的骨骼毒性。

## 3 结果

### 3.1 维甲酸对斑马鱼胚胎和幼鱼的心脏毒性考察结果

3.1.1 维甲酸对斑马鱼胚胎及幼鱼心脏形态的影响 1、10、25、100 μmol/L 维甲酸对斑马鱼胚胎和幼鱼心脏形态均产生了致畸效应,胚胎和幼鱼表现出的主要畸形特征有心包水肿、卵黄囊肿胀、血细胞在心区堆积、心脏形态线性化等。显微镜下可见,1、10、25 μmol/L 维甲酸组中,暴露 24 h 后斑马鱼胚胎出现心包水肿症状,血细胞在心区堆积;随着维甲酸作用时间持续 48 h,中毒症状更明显。0.1 μmol/L 维甲酸组斑马鱼胚胎及幼鱼未出现上述中毒症状,与溶剂对照组基本一致。维甲酸对斑马鱼胚胎及幼鱼心脏形态的影响见表 1。

表 1 维甲酸对斑马鱼胚胎及幼鱼心脏形态的影响

Tab 1 Effects of RA on the cardiac morphological of *Danio rerio* embryos and larvae

组别	维甲酸浓度, μmol/L	暴露 24 h 后心脏畸形特征	暴露 48 h 后心脏畸形特征
空白培养基组	0		
维甲酸组	0.1		A
	1	A,D	A,B,C,D
	10	A,D	A,B,C,D
	25	A,D	A,B,C,D
	100	A,D	A,B,C,D
溶剂对照组	0		

注:A表示心包水肿;B表示心脏形态线性化;C表示卵黄囊肿胀;D表示血细胞在心区堆积

Note: A means pericardial edema; B means heart linearization; C means yolksac edema; D means hemocytes accumulation in cardiac region

3.1.2 维甲酸对斑马鱼胚胎孵化率的影响 斑马鱼胚胎暴露

于药液 24 h 后,对照组和 0.1、1  $\mu\text{mol/L}$  维甲酸组胚胎开始孵化,但 10  $\mu\text{mol/L}$  及以上维甲酸浓度组的胚胎没有孵化。暴露 36 h 后,25  $\mu\text{mol/L}$  维甲酸组的胚胎也开始孵化,但孵化率仅为 22%,显著低于对照组和其余低浓度维甲酸组。暴露 48 h 后,对照组和低浓度维甲酸组的斑马鱼胚胎已全部出膜,但暴露在 100  $\mu\text{mol/L}$  组的胚胎完全丧失了孵化能力,且全部死亡。维甲酸对胚胎孵化率的影响为:高浓度完全抑制;较高浓度使孵化率降低、孵化时间延长;低浓度对孵化率的影响不大。由此可见,维甲酸对胚胎孵化率的影响具有一定的量效关系。25、100  $\mu\text{mol/L}$  维甲酸可抑制胚胎的孵化能力,且对胚胎和幼鱼造成致死效应:维甲酸暴露 24 h 的  $\text{LC}_{50}$  为 36.44  $\mu\text{mol/L}$ ,95% 置信区间为 27.64~53.15  $\mu\text{mol/L}$ ;暴露 48 h 的  $\text{LC}_{50}$  为 23.69  $\mu\text{mol/L}$ ,95% 置信区间为 18.51~33.41  $\mu\text{mol/L}$ 。受精后 24 h 胚胎在不同浓度维甲酸中暴露不同时间对孵化率的影响结果见图 1。

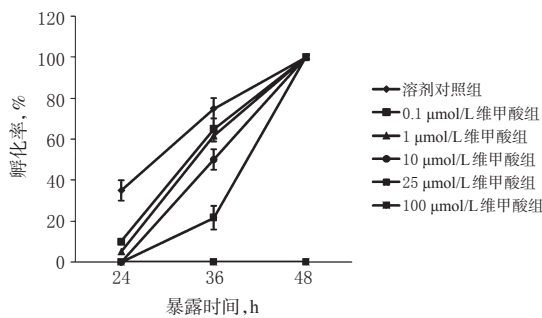


图 1 受精后 24 h 胚胎在不同浓度维甲酸中暴露不同时间对孵化率的影响

Fig 1 Effects of different concentrations of RA at different exposure time on hatchability of the embryos which embryos were at 24 hpf

### 3.2 维甲酸对斑马鱼幼鱼的骨骼致畸作用

不同浓度的维甲酸均能使斑马鱼幼鱼骨骼产生致畸作用,且随药物浓度增大致畸作用增强,严重时可使幼鱼死亡。与溶剂对照组比较,低浓度维甲酸(0.1、1  $\mu\text{mol/L}$ )对斑马鱼幼鱼的致畸作用较弱,但高浓度维甲酸(10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ )对斑马鱼幼鱼骨骼致畸作用较为严重。从茜素红染色区域可以看出,维甲酸作用过后的斑马鱼幼鱼脊柱提前骨化,结果见图 2。

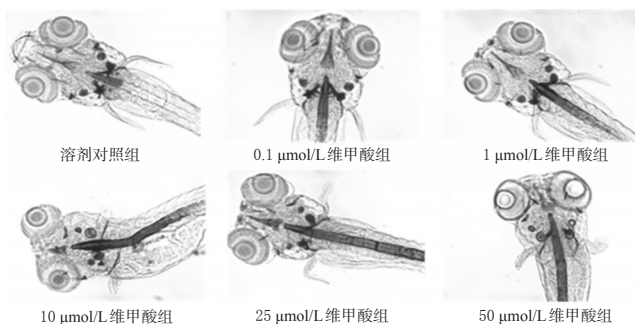


图 2 维甲酸对斑马鱼骨骼产生的致畸作用

Fig 2 Effects of RA on the skeleton of *Danio rerio*

## 4 讨论

本试验选取受精后 48、72 h 的斑马鱼胚胎及幼鱼,观察了维甲酸对斑马鱼胚胎及幼鱼心脏形态方面的毒性。结果显示,维甲酸浓度越高、作用时间越长,斑马鱼中毒症状越明显。另采用前期建立的斑马鱼骨质疏松模型相同的处理方法<sup>[9]</sup>,以茜素红染色区域反映维甲酸作用后的斑马鱼幼鱼脊柱骨化畸形。与现有体内、外模型比较,斑马鱼胚胎毒性评价模型在体化、动态、可视,具有简单、方便、样品用量少、灵敏度高、优势,为药物研发早期临床前毒性评价提供了新思路与新方法。

实验结果表明,维甲酸具有强烈的斑马鱼心脏毒性和骨骼致畸毒性,和现有维甲酸致大鼠骨质疏松的研究结果<sup>[10]</sup>一致。这提示维甲酸治疗肿瘤,特别是用于青少年各类皮肤病治疗时应密切关注其不良反应。

## 参考文献

- [1] 韦惠琴,钟卫一.全反式维甲酸的临床应用及研究进展[J].医学综述,2014,6(20):1 088.
- [2] 张萍,卢金森,李智平.全反式维甲酸在儿童急性早幼粒性白血病中的应用[J].儿科药学杂志,2014,20(12):55.
- [3] 唐露笑,陈宏辉.维甲酸类药物在肝癌治疗中的应用[J].现代医药卫生,2012,28(3):416.
- [4] 刘晨,陈斌,徐又佳.斑马鱼疾病模型[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2014,7(3):277.
- [5] Sukardi H, Chng HT, Chan EC, 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.
- [6] Ali S, Champagne DL, Alia A, et al. Large-scale analysis of acute ethanol exposure in zebrafish development: a critical time window and resilience[J]. *PLoS One*,2011,6(5):e20 037.
- [7] Lantz-McPeak S, Guo X, Cuevas E, et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos[J]. *J Appl Toxicol*,2015,35(3):261.
- [8] Walker MB, Kimmel CB. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae[J]. *Biotech Histochem*,2007,82(1):23.
- [9] 韦英杰,王长梅,蔡雪婷,等.地塞米松影响骨骼发育的斑马鱼模型的建立[J].药学学报,2013,48(2):255.
- [10] 路其康,顾正位,毕云生,等.复方葛根片对维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的治疗作用[J].中国药房,2015,26(34):4 804.

(收稿日期:2015-09-29 修回日期:2016-05-03)

(编辑:林 静)