

# 去水卫矛醇对斑马鱼神经发育毒性评价

彭晓丽<sup>1</sup>, 曹雯<sup>1</sup>, 李澄<sup>1</sup>, 韦斯军<sup>1</sup>, 刘华钢<sup>2\*</sup> (1.广西中医药大学附属国际壮医医院药学部, 南宁 530200; 2.广西医科大学药学院, 南宁 530022)

**摘要:** 目的 探讨去水卫矛醇(dianhydrogalactitol, DAG)诱导斑马鱼胚胎及幼鱼神经发育毒性作用及其机制。方法 在一般毒性评价的基础上,对斑马鱼胚胎进行相应的分组暴露给药,采用幼鱼的自主运动反应、光照刺激反应等试验观察 DAG 对斑马鱼神经及行为的影响;通过脑部组织病理学检查、吖啶橙染色,观察 DAG 对斑马鱼脑部的组织影响;利用实时荧光定量 PCR 方法测定斑马鱼幼鱼体内多巴胺神经元相关基因(*DAT*、*TH*、*GCHI*)及神经抑/促凋亡相关基因(*Bax*、*Bcl-2*)的相对表达量。结果 DAG 在 20, 40, 75 mg·mL<sup>-1</sup> 下能明显抑制斑马鱼的自主运动,且自主运动抑制率呈现明显的浓度相关性;DAG 在 20, 40, 75 mg·mL<sup>-1</sup> 下对斑马鱼反应速度有较明显的抑制作用,反应能力下降率呈现浓度相关性;DAG 各浓度组斑马鱼脑组织形态变小,但组织结构均未见显著异常;采用吖啶橙染色检测斑马鱼整体胚胎细胞凋亡情况,发现给药组头部绿色荧光比对照明显,说明细胞凋亡增多,且细胞凋亡呈剂量依赖性增加,与表观一致;DAG 在 75, 150, 300, 425, 600 mg·L<sup>-1</sup> 下可导致斑马鱼幼鱼多巴胺神经元相关基因 *DAT*、*TH*、*GCHI* 的 mRNA 相对表达量下调,*Bax/Bcl-2* 的 RNA 相对表达量随着给药浓度增加而上升。结论 高浓度 DAG 对斑马鱼胚胎和幼鱼具有神经发育毒性作用,可能与多巴胺能神经元的抑制作用有关。

**关键词:** 去水卫矛醇; 斑马鱼; 神经发育; 多巴胺能神经元

中图分类号: R99 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)15-2093-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230751

引用本文: 彭晓丽, 曹雯, 李澄, 等. 去水卫矛醇对斑马鱼神经发育毒性评价[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(15): 2093-2099.

## Evaluation of Neurodevelopmental Toxicity of Dianhydrogalactitol in Zebrafish

PENG Xiaoli<sup>1</sup>, CAO Wen<sup>1</sup>, LI Cheng<sup>1</sup>, WEI Sijun<sup>1</sup>, LIU Huagang<sup>2\*</sup> (1.Department of Pharmacy, International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2.College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530022, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore dianhydrogalactitol(DAG)-induced neurodevelopmental toxicity and mechanisms in zebrafish embryos and larvae. **METHODS** On the basis of general toxicity evaluation, zebrafish embryos were exposed to DAG in groups, and the effects of DAG on zebrafish nerves and behaviors were observed by means of autonomic locomotor response and light stimulation response of juvenile fish; the effects of DAG on zebrafish brain tissues were observed by means of histopathological examination of brain and acridine orange staining. The relative expression of dopamine neuron-related genes(*DAT*, *TH*, *GCHI*) and neural inhibition/promotion of apoptosis-related genes(*Bax*, *Bcl-2*) was determined by real-time fluorescence quantitative PCR in zebrafish larvae. **RESULTS** DAG inhibited the voluntary movement of zebrafish under the 20, 40, 75 mg·L<sup>-1</sup>, and the inhibition rate of voluntary movement showed obvious concentration correlation; DAG inhibited the reaction speed of zebrafish under the 20, 40, 75 mg·L<sup>-1</sup>, and the rate of decrease of reaction ability showed concentration correlation; the brain tissue became smaller, but the tissue structure of zebrafish did not show any significant abnormality in the various concentration groups of DAG; acridine orange staining was used to detect the apoptosis of the overall embryonic cells of zebrafish, and it was found that the administration of DAG inhibited the apoptosis of zebrafish. Acridine orange staining was used to detect apoptosis in the whole embryonic cells of zebrafish, and it was found that the green fluorescence in the head of the administered group was more obvious than that in the control group, indicating that apoptosis increased, and apoptosis increased in a dose-dependent manner, which was in accordance with the apparent observation; DAG in 75, 150, 300, 425, 600 mg·L<sup>-1</sup> of the experimental condition could lead to a downward regulation of the relative expression of mRNA of the genes related to the zebrafish juvenile dopaminergic neuron, *DAT*, *TH* and *GCHI*. The *Bax/Bcl-2* relative mRNA expression was up-regulated with increasing drug concentration. **CONCLUSION** The neurodevelopmental toxicity of DAG in zebrafish embryos and juveniles may be related to the inhibition of dopaminergic neurons.

**KEYWORDS:** dianhydrogalactitol; zebrafish; neurodevelopment; dopaminergic neuron

基金项目: 广西自然科学基金项目(2020GXNSFBA297110)

作者简介: 彭晓丽, 女, 硕士, 主管药师 E-mail: pengxiaoli87@qq.com

\*通信作者: 刘华钢, 女, 博士, 教授 E-mail: hgliu@263.net

去水卫矛醇(dianhydrogalactitol, DAG)在国内最早是由广西中医药研究所从当地生长的密花美登木(*Maytenus confertiflorus* J.Y.Luo.et X.X.Chen)中分离得到的抗肿瘤药物,其属于广谱型抗肿瘤药物,如今 DAG 在临床上用于治疗慢性粒细胞性白血病取得较好的效果。

脑肿瘤是神经系统常见疾病之一,其会压迫脑组织,导致中枢神经损害<sup>[1]</sup>。脑肿瘤之所以难治疗,其最重要的原因在于脑组织中存在血脑屏障,阻止了化疗药物到达脑肿瘤所在部位。有研究发现,DAG 能透过血脑屏障,其对脑肿瘤也有一定疗效<sup>[2-3]</sup>。梁乔芳等<sup>[4]</sup>使用 DAG 对人脑肿瘤细胞进行体外抑制作用的研究,发现 DAG 对胶质瘤细胞的抑制效果显著。Shih 等<sup>[5]</sup>使用 DAG 对多形性成胶质细胞瘤患者进行治疗,效果明显。

DAG 作为抗肿瘤药物,在具有抗肿瘤活性的同时,也可能会存在其他潜在的不良反应,对这些潜在的不良反应进行研究也很重要。因此在对 DAG 进行抗脑肿瘤疗效的同时,也应该关注药物对脑部神经的影响,寻找药物对中枢神经发育的潜在影响。本研究利用斑马鱼胚胎为研究对象,对给药后的斑马鱼胚胎/幼鱼进行表观形态观察,吖啶橙染色,幼鱼的自主运动反应,光照刺激反应等试验,观察 DAG 对斑马鱼神经及行为的影响;通过脑部组织病理学检查,观察 DAG 对斑马鱼脑部的组织影响;利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法检测斑马鱼幼鱼体内多巴胺神经元相关基因 *DAT*、*TH*、*GCHI* 及神经抑/促凋亡相关基因 *Bax/Bcl-2* 的 mRNA 相对表达量,分析 DAG 对斑马鱼神经发育影响的分子机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

野生型 AB 品系斑马鱼,养殖于广西医科大学斑马鱼实验室。

### 1.2 试剂

DAG(广西梧州制药股份有限公司,批号:20150204);Acridine Orange(Biosharp,货号:E201708);DEPC 原液(美国 Sigma-Aldrich 公司,货号:WXBB3108);RNAiso Plus 试剂(货号:AA1302-1)、PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit 试剂盒(货号:AK3001)、SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒(货号:AK6503)均购于日本 Takara 公司;PCR 扩增引物[宝生物工程(大连)有限公司];吖啶橙荧

光染色试剂(Biosharp,货号:MW370);NaCl、KCl、无水 CaCl<sub>2</sub>、无水 NaHCO<sub>3</sub> 均购自天津博迪化工股份有限公司;无水乙醇(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);三氯甲烷、异丙醇(分析纯,天津市致远化学试剂有限公司)。

### 1.3 仪器

Szx7 解剖显微镜、Ox31 生物显微镜、CKX-41 荧光倒置显微镜、CX31-DP73 正置显微镜均购自日本奥林巴斯株式会社;V3 行为分析仪(Viewpoint Life Sciences);S10 手提式匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HP250HS 恒温恒湿培养箱(武汉瑞华仪器设备有限公司);EL204 万分之一电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];TDL-5A 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);MicroCL17R 高速低温离心机(德国 THERMOIEC 公司);CD-CPH-11-20L 超纯水机(成都越纯科技有限公司);BL-50A 立式压力蒸汽灭菌器(上海博进实业有限公司医疗设备厂);SIM-F140AY65-PC 制冰机(日本松下电器产业株式会社);Mastercycle Nexusgradient 梯度 PCR 仪[艾本德(中国)有限公司];7300 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

## 2 方法

### 2.1 胚胎收集及药物配制

**2.1.1 胚胎收集** 实验前 1 d 傍晚喂食结束后,将雌雄成年斑马鱼按 1:1 放入底部带有隔离筛板的产卵缸中,并用垂直隔板将雌雄斑马鱼分开,次日清晨将隔板抽开,雄鱼追逐雌鱼约 30 min 后完成交配产卵,用密度高的筛网收集胚胎。新收集的胚胎放置于新的培养皿中,用养鱼水小心冲洗几遍,放入 28 °C 的生化培养箱中培养至受精后 6 h(6 hours post-fertilization, 6 hpf)。在体式显微镜下,挑选正常发育的胚胎进行毒性实验,为排除胚胎间的个体差异影响,每次实验尽量使用同一对斑马鱼所产胚胎。

**2.1.2 药物配制** 参照 ZebrafishBook<sup>[6]</sup>标准配制斑马鱼培养液。DAG 极易溶于水,将其用斑马鱼培养液配制成 10 g·L<sup>-1</sup> 的 DAG 母液,备用。

### 2.2 斑马鱼行为学分析

实验随机选取 6 hpf 斑马鱼胚胎 180 枚于 6 孔板中,每孔 30 枚胚胎,分别水浴给予 5, 10, 20, 40, 75 mg·L<sup>-1</sup> 5 个 DAG 药物浓度;每孔药液容量为 3 mL,同时设置不含任何药物的斑马鱼培养液为对照组,每 24 h 更换药液 1 次。DAG 处理至

120 hpf 时, 分别随机选择 10 尾斑马鱼幼鱼应用行为分析仪定量检测斑马鱼自主运动距离和斑马鱼对光暗刺激时反应速度的改变( $SA$ ), 评价 DAG 对斑马鱼自主运动和反应能力的影响; 其中斑马鱼自主运动抑制率(%)和反应能力下降率(%)计算公式: 自主运动抑制率(%)= $[D_{\text{对照组}}-D_{\text{供试品组}}]/D_{\text{对照组}}\times 100\%$ ; 反应能力下降率(%)= $[SA_{\text{对照组}}-SA_{\text{供试品组}}]/SA_{\text{对照组}}\times 100\%$ 。

### 2.3 脑部表型观察及病理学检查

实验随机选取 6 hpf 斑马鱼胚胎 180 枚于 6 孔板中, 每孔 30 枚胚胎, 分别水溶给予 5, 10, 20, 40, 75  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  5 个 DAG 药物浓度; 每孔药液容量为 3 mL, 同时设置不含任何药物的斑马鱼培养液为对照组, 每 24 h 更换药液 1 次。DAG 处理至 120 hpf 时, 在解剖显微镜下观察斑马鱼脑部是否有异常; 将斑马鱼用 4%多聚甲醛固定, 固定后将斑马鱼转移到 70%乙醇中, 组织经 70%, 80%, 90%, 95%, 100%不同浓度的乙醇溶液进行逐级脱水, 各级乙醇 40 min, 后将组织依次浸泡于二甲苯中透明, 制作石蜡切片后进行 HE 染色, 进行脑部病理学检查。

### 2.4 吖啶橙染色

吖啶橙染色用于检测细胞凋亡。根据前期 DAG 安全性评价, 斑马鱼胚胎 72 hpf 时的最小致死浓度为 662.46  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 按照等对数浓度, 将 DAG 母液稀释成 75, 150, 300, 425, 600  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  5 个浓度组, 并设置不含任何药物的斑马鱼培养液为对照组, 选用 6 孔板, 每孔分别放入 30 枚挑选好的胚胎和 3 mL 药液对胚胎进行培养, 选取各组发育至 48 hpf 已脱膜的斑马鱼胚胎, 每个给药组选取 10 枚。吖啶橙染液配制: 称取一定量的吖啶橙染料粉末, 将其溶于 PBS 中, 制成终浓度 2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的吖啶橙染液。将选好胚胎用 PBS 清洗 3 遍去除药物, 随后转移至 2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的吖啶橙染液中染色, 28  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min; 孵育结束后, 弃去染料, 用 PBS 将胚胎体表的染料清洗干净, 随后将胚胎转移至 0.16  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Tricaine(PBS 溶解)中处理 10 min 麻醉胚胎, 于荧光显微镜下选择蓝光激发光波长拍照, 观察胚胎脑部细胞凋亡情况, 绿色荧光标记的细胞则为吖啶橙染色的阳性凋亡细胞。

### 2.5 多巴胺神经元相关基因 qRT-PCR 反应

将 DAG 母液稀释成 75, 150, 300, 425, 600  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  5 个浓度组, 并设置不含任何药物的斑

马鱼培养液为对照组, 选用 6 孔板, 每孔分别放入 60 枚挑选好的胚胎和 5 mL 药液对胚胎进行培养至 72 hpf。采用 SYBR Green I 嵌合荧光法, 应用 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪, 对各给药组 cDNA 的神经表达相关基因 *DAT*、*TH*、*GCHI*、*Bcl-2*、*Bax* 进行 qRT-PCR 检测, 以  $\beta$ -actin 做内参对照, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算相应基因 mRNA 的相对表达量。

#### 2.5.1 目的基因引物序列 引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of target genes

| 目的基因           | 位置   | 引物序列                     | 片段长度/bp |
|----------------|------|--------------------------|---------|
| <i>DAT</i>     | 上游引物 | TCATCTTCTCCTTCCTGGGATA   | 104     |
|                | 下游引物 | GGCTTCTGGGTAAATGATGAAC   |         |
| <i>TH</i>      | 上游引物 | TTTGACCCAGATATGTGCTG     | 118     |
|                | 下游引物 | TGCGGGTCACATATGTTCTTAG   |         |
| <i>GCHI</i>    | 上游引物 | CGGAAAGAGGAGGAGGATGAG    | 116     |
|                | 下游引物 | CGGAGAGGGGTTTTGAGGA      |         |
| <i>Bcl-2</i>   | 上游引物 | GATAGCCCGGGTCACTCGTTCAGA | 317     |
|                | 下游引物 | CCAGTGGCCCGTTCAGGTAGTCAG |         |
| <i>Bax</i>     | 上游引物 | CAGAGTGGCCCGTGAGAT       | 226     |
|                | 下游引物 | GGGGGTGCCAAAATAACTG      |         |
| $\beta$ -actin | 上游引物 | TGGCAAAGGAGGTAGTTGTCT    | 108     |
|                | 下游引物 | TGTGAGGAGGGCAAAGTGG      |         |

#### 2.5.2 反应条件 使用两步法 qPCR 扩增程序进行:

Stage1: 95.0  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 预变性;

Stage2: 95.0  $^{\circ}\text{C}$ , 5 s, 变性, 60.0  $^{\circ}\text{C}$ , 40 s, 退火延伸, 40 cycles;

溶解曲线: 95  $^{\circ}\text{C}$ , 15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ , 15 s, 1 cycle。

### 2.6 统计学方法

实验数据采用 SPSS 17.0 软件处理分析, 结果以  $\bar{x}\pm s$  表示, 采用单因素方差分析法检验各 DAG 组及对照组之间的差异,  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 DAG 对斑马鱼神经发育毒性表现

3.1.1 120 hpf 幼鱼自主运动 5, 10, 20, 40 和 75  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  DAG 组斑马鱼自主运动距离分别为 11 483, 12 076, 9 715, 6 469 和 2 719 mm, 其自主运动抑制率分别为 0.1%, -5.0%, 15.5%, 43.7% 和 76.4%, 与对照组比较, 除 5 和 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  DAG

组差异无统计学意义外, 其余各组均有明显差异 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。表明 DAG 在 20, 40 和  $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度条件下能明显抑制斑马鱼的自主运动, 且自主运动抑制率呈现明显的浓度相关性, 结果见表 2 和图 1。

表 2 去水卫矛醇对斑马鱼自主运动距离的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Tab. 2 Effect of dianhydrogalactitol on zebrafish voluntary movement distance ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别     | 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 自主运动距离/mm                 | 自主运动抑制率/%          |
|--------|-----------------------------------|---------------------------|--------------------|
| 对照组    | —                                 | 11 497±509.6              | —                  |
| 去水卫矛醇组 | 5                                 | 11 483±698.8              | 0.1                |
|        | 10                                | 12 076±403.6              | -5.0               |
|        | 20                                | 9 715±369.6 <sup>1)</sup> | 15.5 <sup>1)</sup> |
|        | 40                                | 6 469±391.8 <sup>2)</sup> | 43.7 <sup>2)</sup> |
|        | 75                                | 2 719±393.0 <sup>2)</sup> | 76.4 <sup>2)</sup> |

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .



图 1 自主运动反应轨迹图

Fig. 1 Trajectory diagram of autonomic movement response

**3.1.2 120 hpf 幼鱼光照刺激反应** 5, 10, 20, 40 和  $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  DAG 组斑马鱼的反应速度改变分别为 2.62, 2.67, 2.09, 1.24 和  $0.05 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ , 其反应能力下降率分别为 0.0%, -1.9%, 20.25%, 52.77% 和 98.14%, 与对照组比较, 除 5 和  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  DAG 组外, 其余各组均有明显差异 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。表明 DAG 在 20, 40 和  $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度条件下对斑马鱼反应速度有较明显的抑制作用, 反应能力下降率呈现浓度相关性。结果见表 3。

### 3.2 DAG 对斑马鱼神经发育毒性作用机制初步研究

**3.2.1 脑部表型观察及病理学检查** DAG 处理至 120 hpf 时, 20, 40 和  $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  DAG 组斑马鱼的脑部明显变小, 而 5 和  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  DAG 组未见明显异常, 结果见图 2。提示 DAG 作用后, 药物对机体脑部产生一定影响; 但病理学切片 HE 染色检

表 3 去水卫矛醇对斑马鱼反应能力的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Tab. 3 Effect of dianhydrogalactitol on zebrafish response ability ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别     | 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 反应速度改变/ $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ | 反应能力下降率/%          |
|--------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| 对照组    | —                                 | 2.62±0.109                            | —                  |
| 去水卫矛醇组 | 5                                 | 2.62±0.169                            | 0.0                |
|        | 10                                | 2.67±0.174                            | -1.9               |
|        | 20                                | 2.09±0.126 <sup>1)</sup>              | 20.2 <sup>1)</sup> |
|        | 40                                | 1.24±0.160 <sup>2)</sup>              | 52.7 <sup>2)</sup> |
|        | 75                                | 0.05±0.033 <sup>2)</sup>              | 98.1 <sup>2)</sup> |

注: 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

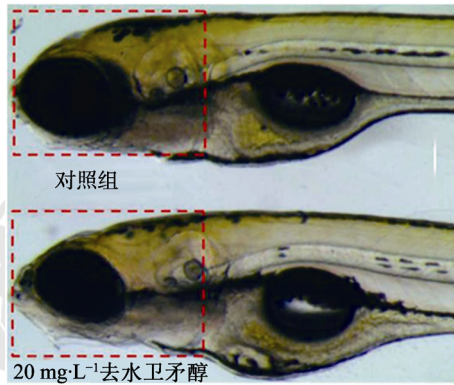


图 2 去水卫矛醇对斑马鱼脑(表型)影响

Fig. 2 Effect of dianhydrogalactitol on brain (phenotype) of zebrafish

查发现, 除 20, 40 和  $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  DAG 组脑部变小之外, DAG 各浓度组斑马鱼脑组织结构均未见显著异常, 结果见图 3。

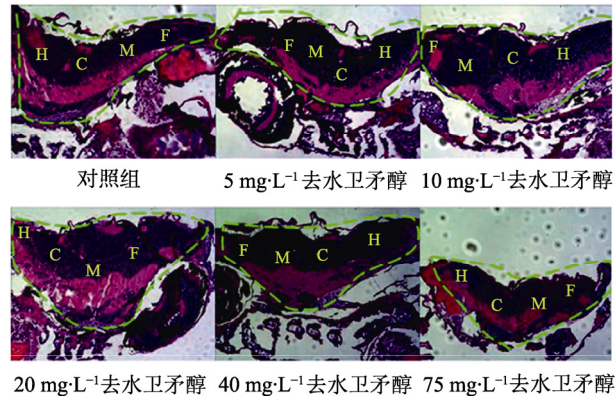


图 3 斑马鱼脑组织病理切片结果(100×)

F—前脑; M—中脑; C—小脑; H—后脑。

Fig. 3 Pathological section results of zebrafish brain tissue (100×)

F—forebrain; M—midbrain; C—cerebellum; H—hindbrain.

**3.2.2 细胞凋亡检测-吖啶橙染色** 通过对 48 hpf 整体胚胎吖啶橙染色, 在荧光显微镜下观察发现,

对照组斑马鱼胚胎脑部几乎未检测到细胞凋亡,随着给药浓度的增加,斑马鱼胚胎脑部凋亡细胞逐渐增多,75 mg·L<sup>-1</sup> DAG 组凋亡细胞极少,150 mg·L<sup>-1</sup> DAG 组中多数胚胎的间脑处分布有少量凋亡细胞,300, 425 mg·L<sup>-1</sup> DAG 组中多数胚胎除了间脑处有凋亡细胞,端脑处也有明显的细胞凋亡;600 mg·L<sup>-1</sup> 暴露组头部整体缩小,与对照组相比头部细胞凋亡明显,结果见图 4。

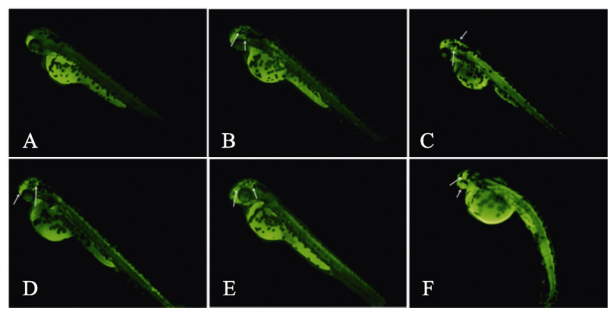


图 4 斑马鱼胚胎去水卫矛醇暴露后脑部凋亡细胞分布  
A-对照组; B-75 mg·L<sup>-1</sup> 去水卫矛醇; C-150 mg·L<sup>-1</sup> 去水卫矛醇;  
D-300 mg·L<sup>-1</sup> 去水卫矛醇; E-425 mg·L<sup>-1</sup> 去水卫矛醇; F-600 mg·L<sup>-1</sup> 去水卫矛醇。

Fig. 4 Distribution of apoptotic cells in brain of zebrafish embryos exposed to dianhydrogalactitol  
A-control group; B-75 mg·L<sup>-1</sup> dianhydrogalactitol; C-150 mg·L<sup>-1</sup> dianhydrogalactitol; D-300 mg·L<sup>-1</sup> dianhydrogalactitol; E-425 mg·L<sup>-1</sup> dianhydrogalactitol; F-600 mg·L<sup>-1</sup> dianhydrogalactitol.

**3.2.3 DAG 对神经相关基因 mRNA 表达量的影响**  
采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法对结果进行数据分析,得出 mRNA 相对表达量。结果显示,DAG 暴露后 72 hpf 斑马鱼胚胎基因 DAT-mRNA 的相对表达量中,与对照组相比,75, 150, 300 mg·L<sup>-1</sup> DAG 组表达量差异无统计学意义,未呈现剂量依赖性;425, 600 mg·L<sup>-1</sup> DAG 组 DAT-mRNA 的相对表达量出现下降趋势,并表现出剂量依赖性,与对照组相比,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。基因 TH-mRNA 的相对表达量中,与对照组相比,75, 150 mg·L<sup>-1</sup> DAG 组表达量略微

升高,但差异无统计学意义,当给药浓度达到 300 mg·L<sup>-1</sup> 时,基因相对表达量开始下降,并随着给药浓度增加呈下降趋势,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。从基因 GCHI 各给药组的 mRNA 的相对表达量可看出,与对照组相比,150, 300 mg·L<sup>-1</sup> DAG 组表达量有所下降,但差异无统计学意义,无剂量依赖性,425, 600 mg·L<sup>-1</sup> DAG 组 DAT-mRNA 的相对表达量出现下降趋势,并表现出剂量依赖性,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。与对照组相比,DAG 各剂量组(除 75 mg·L<sup>-1</sup> DAG 组外),Bax/Bcl-2-mRNA 相对表达量呈明显上升趋势,且有一定剂量依赖关系,具有统计学意义( $P<0.01$ )。结果见表 4。研究结果提示,DAG 可透过脑部血脑屏障,当药物低浓度作用时,药物对机体神经相关基因未出现较大影响,随着药物作用浓度升高,药物可影响神经发育相关的基因的调控,从而对机体产生影响,该结果与行为学出现的结果相符,当低浓度作用时,药物行为未见异常,当作用浓度增大后,出现原地转圈,震颤、抽搐等行为。

#### 4 讨论

据报道,在药物发现与临床前研究阶段,有 40%左右的药物由于毒性和安全性等问题被淘汰;在药物临床试验阶段,又有约 60%左右的药物因肝脏或是神经毒性被终止临床试验。斑马鱼模型在药物安全性评价中应用越来越广泛,Parng 等<sup>[7]</sup>研究发现,药物治疗对人神经毒性产生影响的化合物在斑马鱼身上也会产生相似的神经毒性反应,可用斑马鱼模型作为评价神经毒性的预测模型。Selderslaghs 等<sup>[8]</sup>用 10 种已知有神经毒性和无神经毒性药物对斑马鱼神经行为进行观察,分析得到的数据与哺乳动物有 90%相似性。因此,利用斑马鱼模型研究神经系统发育及病变是较好的模型<sup>[9-10]</sup>。斑马鱼作为研究神经系统的脊椎动

表 4 不同浓度去水卫矛醇对斑马鱼幼鱼 DAT、TH、GCHI、Bax/Bcl-2-mRNA 的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 4 Effects of different concentrations of dianhydrogalactitol on DAT, TH, GCHI, Bax/Bcl-2-mRNA expressions in zebrafish larvae( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别     | 浓度/mg·L <sup>-1</sup> | mRNA 相对表达量              |                         |                         |                         |
|--------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|        |                       | DAT                     | TH                      | GCHI                    | Bax/Bcl-2               |
| 对照组    | —                     | 1.00±0.00               | 1.00±0.00               | 1.00±0.00               | 1.00±0.00               |
| 去水卫矛醇组 | 75                    | 1.08±0.53               | 1.08±0.23               | 1.07±0.22               | 2.01±0.14               |
|        | 150                   | 0.95±0.16               | 1.05±0.52               | 0.96±0.32               | 2.52±0.27 <sup>1)</sup> |
|        | 300                   | 0.87±0.58               | 0.78±0.16 <sup>1)</sup> | 0.96±0.08               | 2.81±0.33 <sup>1)</sup> |
|        | 425                   | 0.74±0.07 <sup>1)</sup> | 0.61±0.60 <sup>1)</sup> | 0.86±0.10 <sup>1)</sup> | 3.16±0.16 <sup>1)</sup> |
|        | 600                   | 0.61±0.05 <sup>1)</sup> | 0.33±0.10 <sup>1)</sup> | 0.63±0.07 <sup>1)</sup> | 5.61±0.44 <sup>1)</sup> |

注:与对照组比较,<sup>1)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ .

物模型具有独特的优势：①在发育早期，斑马鱼躯体透明，用染料或荧光染料能够在活体或完整的固定标本中直观地观察毒物引起的器质性变化；②斑马鱼脑部具有典型脊椎动物脑部形态学特征；③可放入孔板中，使用幼鱼运动行为分析仪和相关软件对幼鱼进行图像跟踪，观察其运动的实时变化；④斑马鱼神经系统的相关抗体和神经基因序列被广泛地应用。

斑马鱼大脑整体构造和血脑屏障的结构与功能均与哺乳动物相似<sup>[11-12]</sup>，前期研究表明，DAG能透过血脑屏障，对神经胶质瘤细胞具有良好的抑制作用，但在作用于胶质瘤细胞的同时，是否对正常神经胶质细胞产生影响研究尚未明确。胶质细胞存在于中枢神经系统中，具有支持和引导神经元的迁移，参与神经系统修复和再生等功能。胶质细胞中存在多巴胺受体，也是脑内多巴胺作用的重要靶细胞，其在神经系统疾病的发生中发挥重要作用<sup>[13]</sup>，因此判断药物对多巴胺系统的影响，可间接反映出药物对胶质细胞的影响。多巴胺神经系统是中枢很重要的神经系统之一，斑马鱼胚胎的多巴胺能神经元定位在间脑、嗅球、视网膜和后脑上。中枢神经抑制药氯丙嗪主要是通过阻断脑内多巴胺受体而产生镇静作用，在其对斑马鱼的神经毒性研究中发现<sup>[14]</sup>，氯丙嗪会抑制幼鱼的自发运动，出现僵直不动、震颤或快速刻板式转圈运动等类似锥体外系反应表现，这与实验中发现高浓度 DAG 给药后，72 hpf 斑马鱼出现头部变小，原地快速旋转，抽搐震颤等行为相似，提示高浓度 DAG 对神经系统影响可能与多巴胺神经系统受影响相关。动物对外界刺激的应激是由中枢神经系统控制的，为进一步观察药物对神经系统的影响，本实验对 120 hpf 斑马鱼幼鱼的行为学进行分析，高浓度 DAG 给药对斑马鱼造成自主运动减弱，光照刺激反应抑制等行为学现象，且抑制结果呈剂量依赖性，这与抗肿瘤药长春新碱对斑马鱼的自主运动，光照刺激反应等行为呈现抑制作用，存在神经发育毒性结果一致，长春新碱引起幼鱼中脑多巴胺能神经元丢失可能是导致幼鱼对光照刺激反应失调的原因<sup>[15]</sup>；但低浓度 DAG 给药组 72 hpf 斑马鱼未见明显的旋转震颤等现象，120 hpf 斑马鱼自主运动及光照刺激反应较对照组高，分析其原因可能为药物对神经出现了小剂量先兴奋的现象，但无统计学差异，提示 DAG

对中枢神经多巴胺的影响在低剂量时无明显影响。吖啶橙整体染色中，斑马鱼脑部凋亡细胞数随着 DAG 给药浓度增加而增多，脑部凋亡细胞主要集中在间脑，高剂量甚至整个头部均出现荧光凋亡细胞；病理切片检测发现，120 hpf 斑马鱼幼鱼高剂量脑发育不良，相对正常组体积减小，但各组脑组织结构均未见显著异常，该结果提示脑部体积变小是由于脑部神经发育受影响，从而导致整体发育缓慢，但 DAG 对脑部结构细胞未见明显不良影响。

酪氨酸是多巴胺合成的底物，其被转运至多巴胺神经元内，被细胞内的酪氨酸羟化酶催化变成左旋多巴，继而经多巴胺脱羧酶脱羧生成多巴胺。在整个合成过程中，酪氨酸羟化酶是多巴胺生物合成的关键酶<sup>[16]</sup>，多巴胺脱羧酶需要辅酶辅助因子 BH<sub>4</sub> 参与，GTP 环化水解酶(GTP cyclization hydrolase, GCH1)是将 GTP 转化为 BH<sub>4</sub> 的关键限速酶。多巴胺能神经元是产生多巴胺等生物胺的重要部位，该部位的神经细胞受到损害时，必然会影响多巴胺的生物合成。多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)是中枢多巴胺能神经元前膜的一种膜蛋白，属于 Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>依赖性膜转运体基因家族，DAT 主要功能为当多巴胺能神经元发放冲动后再摄取突触间隙的 DA 终止神经细胞间的信息传递，在终止递质的作用及维持递质体内平衡中起到关键作用，当 DA 神经元受损，可使 DAT 功能和数量下降，因此 DAT 可间接反映脑内多巴胺能神经元的数量和功能<sup>[17]</sup>。因此本实验选择了多巴胺能神经元相应基因 *TH*、*DAT*、*GCH1* 分析药物对给药后斑马鱼的中枢神经的影响可能机制。结果显示，斑马鱼多巴胺神经元相关基因 *TH*、*DAT* 和 *GCH1* 在 300~600 mg·L<sup>-1</sup> DAG 作用下，mRNA 转录水平均呈现下调趋势，但 75、150 mg·L<sup>-1</sup> DAG 作用时，基因表达量与对照组相比无明显差异，该结果提示高剂量 DAG 可能使斑马鱼的多巴胺能神经元受到抑制，引起斑马鱼幼鱼运动行为受到抑制，但控制剂量使用则不会对多巴胺能神经元造成影响。

*Bcl-2* 基因家族是细胞凋亡信号传导途中影响和调控细胞凋亡的关键基因，根据调控细胞凋亡的不同作用，其分为两大类，即抗凋亡基因(*Bcl-2*、*Bcl-xl*、*Bal-w* 等)和促凋亡基因(*Bax*、*Bak*、*Bok* 等)，*Bcl-2* 和 *Bax* 是基因家族中经典的一对作用相反的

凋亡基因，其可形成特定的蛋白二聚体，它们形成了凋亡的正负调控，比例决定了细胞的凋亡与否。当 *Bax/Bax* 二聚体的比例大于 *Bax/Bcl-2* 时，促进细胞凋亡，反之凋亡被抑制<sup>[18]</sup>。在中枢神经系统中，神经促/抑凋亡基因 *Bax/Bcl-2* 在神经元的生长，发育及突触可塑性中具有重要作用，本实验中，qRT-PCR 结果提示，与对照组相比，*Bax/Bcl-2* 的 mRNA 表达量比例随着给药浓度增加而上升，说明细胞处于凋亡状态，提示药物抑制神经突触形成，对高级神经行为发育障碍具有一定相关性<sup>[19]</sup>。

综上所述，本实验利用斑马鱼模型，在低于最小致死浓度基础上进行 DAG 药物暴露给药，检测了 DAG 暴露后幼鱼的自主运动，光照刺激的反射活动等神经功能性障碍，以及 DAG 对斑马鱼脑部神经细胞凋亡、器官畸形、组织病理学及多巴胺神经元发育的影响，结果表现出 DAG 剂量依赖性现象，即低剂量 DAG 对 72 hpf 斑马鱼神经发育影响不大，高剂量 DAG 对 72 hpf 斑马鱼神经发育有抑制作用，该结果为 DAG 对中枢神经所产生的不良反应提供参考，为探讨 DAG 对神经发育毒性提供线索。

## REFERENCES

- [1] 廖子君. 现代肿瘤治疗药物学[M]. 北京: 世界图书出版公司北京分公司, 2002.
- [2] STEHMAN F B, BLOM J, BLESSING J A, et al. Phase II trial of galactitol 1, 2: 5, 6-dianhydro(NSC 132313) in the treatment of advanced gynecologic malignancies: A gynecologic oncology group study[J]. *Gynecol Oncol*, 1983, 15(3): 381-390.
- [3] EAGAN R T, INGLE J N, FRYTAK S, et al. Platinum-based polychemotherapy versus dianhydrogalactitol in advanced non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Treat Rep*, 1977, 61(7): 1339-1345.
- [4] LIANG Q F, LIU H G, TAN Q, et al. Inhibitory effect of 1, 2: 5, 6-dianhydrogalactitol on human brain tumor cells *in vitro*[J]. *Guangxi Sci*(广西科学), 2015, 22(4): 454-456.
- [5] SHIH K, PATEL M, BUTOWSKI N, et al. At-53phase i/ii study of dianhydrogalactitol in patients with recurrent malignant glioblastoma multiforme (gbm)[J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(suppl\_5): v20.
- [6] WESTERFIELD M. The zebrafish book[M]. Eugene: University of Oregon Press, 1995: 16-21.
- [7] PARNG C, ROY N M, TON C, et al. Neurotoxicity assessment using zebrafish[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007, 55(1): 103-112.
- [8] SELDERSLAGHS I W T, HOOYBERGHS J, BLUST R, et al. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae[J]. *Neurotoxicology Teratol*, 2013(37): 44-56.
- [9] HU Z Y, ZHANG J P, ZHANG Q Y. Expression pattern and functions of autophagy-related gene atg5 in zebrafish organogenesis[J]. *Autophagy*, 2011, 7(12): 1514-1527.
- [10] REN Q Y, ZHANG S S, LIU K C, et al. Study on anti-epileptic activity of *Trifolium repens* L. extracted by different methods on zebrafish model[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2022, 31(12): 1215-1222.
- [11] JEONG J Y, KWON H B, AHN J C, et al. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish[J]. *Brain Res Bull*, 2008, 75(5): 619-628.
- [12] XIE J, FARAGE E, SUGIMOTO M, et al. A novel transgenic zebrafish model for blood-brain and blood-retinal barrier development[J]. *BMC Dev Biol*, 2010(10): 76.
- [13] LI W H. Study of embryo toxicity evaluation and targets by deguelin[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013.
- [14] SHI H Q, ZHANG L J, PENG H, et al. Developmental neurotoxicity effect of chlorpromazine on zebrafish embryo and larvae[J]. *Chin J Comp Med*(中国比较医学杂志), 2011, 21(Z1): 150-156, 175.
- [15] HU Z Y, ZHANG J P. Effects of vincristine on zebrafish neurodevelopment and behavior[J]. *J Toxicol*(毒理学杂志), 2014, 28(2): 98-103.
- [16] LIU Y H, WANG S X, CHENG D Y, et al. Mechanism and metabolism of dopamine[J]. *Qianwei J Med*(实用医药杂志), 2003, 20(6): 473-474.
- [17] WANG S, QI X J, HAN D. Effect of electroacupuncture scalp point-through-point therapy on the expression of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter mRNAs in substantia nigra of Parkinson's disease model rats[J]. *Chin Acupunct Moxibustion*(中国针灸), 2009, 29(5): 391-394.
- [18] CHENG J. Modern molecular biology of apoptosis[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2012.
- [19] 史慧勤. 药物神经毒性评价斑马鱼模型的建立及氯胺酮神经发育毒性机制研究[D]. 北京: 军事医学科学院疾病预防控制中心, 2012, 74.

收稿日期: 2023-03-22

(本文责编: 李艳芳)