

马兜铃酸对斑马鱼胚胎肾毒性作用

王 雪 刘可春* 王荣春 王希敏 韩利文 孙 晨
张 云 何秋霞 侯海荣

山东省科学院生物研究所 济南 250014

摘要: 选用肾发育完成(受精后 3 天)的斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎, 用马兜铃酸进行染毒处理, 观察胚胎的表型变化及死亡情况, 分析马兜铃酸对胚胎的毒性作用及规律; 利用肾荧光观察及肾组织切片, 观察马兜铃酸处理后胚胎肾形态和肾组织结构的改变情况; 利用 qPCR 检测马兜铃酸处理前后 nephrin 的表达变化, 初步探讨足细胞在马兜铃酸毒性作用中的功能状态。20 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸处理 24 h 后, 胚胎出现明显眼周水肿表现; 在马兜铃酸高浓度组 (40 ~ 80 $\mu\text{mol/L}$), 除眼周水肿外, 胚胎血液循环系统功能出现异常, 表现为心率降低、血流缓慢甚至停滞; 荧光显微镜下观察发现, 马兜铃酸处理组胚胎肾出现肾小球囊性膨胀、前肾管囊性扩张和形态异常; 切片显示马兜铃酸处理组胚胎肾组织结构受到损害, 表现为肾小球结构疏松、囊性扩张, 前肾管上皮细胞排列松散、紊乱及管腔扩张样改变; qPCR 结果, 马兜铃酸处理组斑马鱼胚胎 nephrin 的表达水平比对照组显著降低 ($P < 0.01$)。研究表明, 马兜铃酸能损害斑马鱼胚胎肾结构和功能, 其毒性作用与肾小球足细胞的功能改变有关。

关键词: 斑马鱼; 肾毒性; 马兜铃酸

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 05-773-07

Nephrotoxic Effects of Aristolochic Acid in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos

WANG Xue LIU Ke-Chun* WANG Rong-Chun WANG Xi-Min HAN Li-Wen
SUN Chen ZHANG Yun HE Qiu-Xia HOU Hai-Rong

Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

Abstract: The nephrotoxicity of aristolochic acid was studied using zebrafish as a model animal. Zebrafish (*Danio rerio*) embryos at 3 days post-fertilization were treated with various concentrations of aristolochic acid for 24 h. Morphological changes of embryos and kidney were observed under the microscope and the percentage of abnormal embryos was counted. Histological structure of kidney was further examined by tissue sections. The expression level of nephrin was tested by qPCR to explore the podocyte function in embryonic kidney treated with aristolochic acid (AA). Embryos treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ aristolochic acid for

基金项目 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 31400979, 81202584), 山东省自主创新重大专项 (No. 2014ZZCX02105);

* 通讯作者, E-mail: hliukch@sdas.org;

第一作者介绍 王雪, 女, 高级工程师; 研究方向: 药物毒性评价与活性筛选; E-mail: wangxue8809@163.com。

收稿日期: 2014-12-16, 修回日期: 2015-04-16 DOI: 10.13859/j.cjz.201505014

24 h exhibited periocular edema. As the exposure dosages of aristolochic acid increased to 40 - 80 $\mu\text{mol/L}$, besides periocular edema, a large number of embryos also displayed cardiovascular dysfunction characterized by decreased heart rate, slow blood flow and even blood stasis. Expansion of glomeruli and distortion of pronephric tubules were observed in embryos treated with aristolochic acid under a fluorescence microscope. Paraffin sections from AA-treated embryos displayed malformed histological structure of kidney, such as cystic glomeruli and disorganized epithelial cells of pronephric tubules. qPCR showed that aristolochic acid treatment down-regulated the expression of nephrin in half in comparison with mock-control siblings ($P < 0.01$). The results indicated that aristolochic acid caused profound nephrotoxicity in histological structure and biological function of zebrafish embryos. Dysfunction of podocyte may involve in the renal impairment.

Key words: Zebrafish (*Danio rerio*); Nephrotoxicity; Aristolochic acid

马兜铃酸 (aristolochic acids, AAs) 又被称为马兜铃总酸、增噬力酸或木通甲素, 是多种具有类似结构的马兜铃酸分子的总称, 马兜铃酸 I (马兜铃酸 A) 是其中最重要且最常见的一种。马兜铃酸是硝基菲羧酸, 存在于马兜铃属 (*Aristolochia*) 及细辛属 (*Asarum*) 等马兜铃科植物中, 这些植物曾作为中草药被广泛应用, 后来因发现会引起严重的肾功能损害而被禁用。马兜铃酸对多种动物均具有肾毒性和致癌性, 能损伤肾小管上皮细胞, 导致肾间质纤维化及肾萎缩, 并出现低分子蛋白尿、严重贫血症状, 被称为“马兜铃酸肾病”。目前, 马兜铃酸肾病的确切发病机制仍不明确。

肾滤过屏障由上皮细胞 (足细胞)、基底膜和内皮细胞三层组成。在足细胞表面有多种与肾功能相关的蛋白质分子特异表达, 如 nephrin、CD2AP (CD2-associated protein, CD2 相关蛋白) 和 podocin 等。在肾病理状态下, 这些分子在足细胞表面的表达量及表达位置会发生改变, 而且这种改变往往在蛋白尿或肾形态改变出现之前更早发生。如 nephrin, 是在肾小球足细胞膜上表达的一种跨膜蛋白, 其胞外部分是构成裂孔隔膜的主要组件, 对裂孔隔膜的完整和功能至关重要 (Mundel et al. 2002)。nephrin 缺陷的人 (*Homo sapiens*) 或鼠 (*Mus musculus*) 表现为严重肾功能异常, 其编码基因 *Nphs1* 是引起先天性 (芬兰型) 肾病综合征

(congenital nephrotic syndrome of the Finnish type) 的突变基因 (Salant et al. 2003)。

斑马鱼 (*Danio rerio*) 是进行器官发育和疾病模型研究的理想模式生物, 具有发育周期短的特点, 斑马鱼肾在受精后 14 h (14 hpf, 14 hours post fertilization) 开始发育, 在 72 hpf 内, 肾发育完成 (Kubota et al. 2007), 具备滤过功能。胚胎期斑马鱼的肾在进化阶段上属于前肾, 仅由一对肾单位组成, 前肾解剖结构虽然简单, 但表现出与高等脊椎动物肾相似的生物功能 (Ebarasi et al. 2011), 而且对毒性物质的反应表现与人类相似。本文利用受精后 3 d (3 dpf, 3 days post fertilization) 以上的斑马鱼胚胎研究马兜铃酸对肾的毒性作用, 初步探讨了马兜铃酸处理后肾功能相关因子 nephrin 的表达变化, 为进一步掌握马兜铃酸的肾毒性作用机制, 更好地预防和治疗马兜铃酸肾病提供有价值的参考。

1 实验材料

1.1 实验动物

实验所用为 Tg (*wt1b*: GFP) 转基因斑马鱼, 由德国莱布尼茨老年病研究所惠赠, 在 Tg (*wt1b*: GFP) 斑马鱼胚胎绿色荧光蛋白报告基因表达于前肾的肾小球、前肾管及近端前肾弓区域。养殖条件, 水温 28.5 $^{\circ}\text{C}$, 保持 14 h 光照/10 h 黑暗的光照周期, 每日于 9:00 时和

15:00 时两次喂食颗粒饲料。排卵前日将斑马鱼成鱼按雌雄比 2 : 1 放入产卵缸内, 每缸中共 6 尾, 为保证排孵时间一致, 中间放隔板隔开雌雄成鱼, 次日亮灯前抽去隔板, 在光照刺激下排卵, 亮灯后半小时内收集鱼卵, 将卵用培养水冲洗 3 遍, 然后放入新培养水中, 在 28.5℃ 相同光照条件下发育至 3 dpf。

1.2 试剂和仪器

马兜铃酸 A, 购自中国食品药品检定研究院, 分子量 341.27, 纯度高于 99.0%。用二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解配制成 5 mmol/L 储液, 4℃ 保存。Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), PrimeScript™ 1st Strand cDNA 合成试剂盒 (大连宝生物工程有限公司), iTaq Universal SYBR Green Supermix (美国 Bio-Rad 公司), 苏木素和水溶性伊红染料 (Sigma 公司), MS-222 (Sigma 公司)。其余试剂均为国产分析纯。

胚胎培养水成分为: NaCl 5 mmol/L, KCl 0.17 mmol/L, CaCl₂ 0.4 mmol/L, MgSO₄ 0.16 mmol/L, 用去离子水配制。

荧光定量 PCR 仪 CFX96 为美国 Bio-Rad 产品; 倒置显微镜 IX51 和激光共聚焦显微镜为日本 Olympus 产品; Shandon Histocentre 2 型石蜡包埋机和 Shandon Finesse 325 型切片机为美国 Thermo 产品。

2 方法

2.1 胚胎分组及给药处理

根据预实验中得到的马兜铃酸 A 对斑马鱼胚胎 (3 dpf) 的 24 h 半致死浓度, 设 20、40、80 μmol/L 3 个马兜铃酸 A 浓度组, 用 6 孔细胞培养板进行实验, 以含 DMSO 的培养水 (DMSO 含量 ≤ 0.8%, 体积比) 作为空白对照组, 每孔内溶液终体积为 6 ml。随机吸取发育 3 dpf 的斑马鱼胚胎, 移入各孔内, 每孔胚胎数量为 30 枚, 每浓度组设 3 个平行, 加盖后放于恒温控光培养箱内孵育 24 h。药物处理结束后, 取出胚胎在倒置显微镜下观察胚胎形态, 记录胚

胎异常情况并计数, 拍照。

2.2 激光共聚焦显微镜拍照

收集马兜铃酸 A 处理组和对照组的斑马鱼胚胎, 先用 0.02% 三卡因 (tricaine, MS-222) 麻醉 1 min, 然后移入含 0.02% (质量体积比) MS-222 和 0.8% (质量体积比) 低熔点琼脂糖的培养液中, 调整胚胎为俯卧位, 用激光共聚焦显微镜观察肾荧光, 并拍照。

2.3 斑马鱼胚胎肾组织切片

收集对照组和处理组的胚胎用 0.15% (质量体积比) MS-222 麻醉后, 放入 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 中, 4℃ 过夜固定, 次日用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗后, 依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋, 然后进行切片, 切片厚度为 5 μm, 最后进行苏木精-伊红 (H.E) 染色, 在显微镜下观察胚胎肾组织结构变化并拍照。

2.4 qPCR 检测胚胎 nephrin 表达水平

收集对照组和处理组的胚胎用灭菌水冲洗后, 分别加入 Trizol 试剂提取胚胎组织的总 RNA, 逆转录成 cDNA, 取 1 μl cDNA 产物进行 qPCR, 以 *β-actin* 作为内参基因。扩增引物序列分别为, nephrin 上游引物 5'-GAC CAG ACC TCC GTT ACT C-3', 下游引物 5'-AGG ATC ACC ACC ACA TAG AC-3'; *β-actin* 上游引物 5'-TCC CCT TGT TCA CAA TAA CC-3', 下游引物 5'-TCT GTG GCT TTG GGA TTC A-3'。qPCR 反应体系为 20 μl, 反应条件为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 5 s、60℃ 40 s 共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔC_q} 法分析基因的相对表达量, $\Delta C_q (\text{处理组}) = C_q (\text{处理组目的基因}) - C_q (\text{处理组内参基因})$, $\Delta C_q (\text{对照组}) = C_q (\text{对照组目的基因}) - C_q (\text{对照组内参基因})$, $\Delta\Delta C_q = \Delta C_q (\text{处理组}) - \Delta C_q (\text{对照组})$, 以 2^{-ΔΔC_q} 表示处理组目的基因的表达倍数。C_q 指 PCR 扩增过程中, 扩增产物的荧光信号达到设定阈值时所经过的扩增循环次数。

2.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 对实验数据进行分析, 各组数据用平均值 ± 标准误 (Mean ± SE) 表示,

采用单因素方差分析法 (one way analysis of variance, ANOVA) 比较组间均值的差异, 并用 LSD 法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 马兜铃酸 A 对斑马鱼胚胎的毒性作用

发育 3 dpf 的斑马鱼胚胎经 20 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸 A 处理 24 h 后, 部分胚胎出现明显眼周水肿表现 (图 1), 但心率及循环血流速度与对照组比无明显改变。随着马兜铃酸 A 浓度升高, 形态异常的胚胎所占比例逐渐升高, 除眼周水肿外, 胚胎同时出现了血循环系统的异常, 表现为心率降低、血流缓慢等 (图 2)。在 40 ~ 80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组, 可以看到部分胚胎心跳微弱、主干血流缓慢, 尾部主动脉及体节间血管出现血流停滞、血细胞淤积现象, 但并无明显的眼周或其他部位水肿表现。处理时间为 24 h 时, 所有处理组胚胎的死亡率与对照组均无明显差异。

3.2 马兜铃酸 A 处理后肾表型变化

在激光共聚焦显微镜下观察 Tg (*wt1b*: GFP) 斑马鱼胚胎 (4 dpf) 的肾形态, 可见正常胚胎肾小球在中线处融合, 前肾管结构居于两侧, 马兜铃酸 A 处理组胚胎肾小球呈囊性膨

胀, 前肾管出现囊性扩张和形态异常改变 (图 3)。

3.3 斑马鱼胚胎肾组织结构变化

为进一步确认肾损伤情况, 将各组胚胎进行固定、包埋后, 切片观察。对照组斑马鱼胚胎的肾小球结构致密、轮廓清晰, 前肾管上皮细胞排列整齐, 而马兜铃酸 A 处理组胚胎肾小球出现结构疏松和囊性扩张, 前肾管上皮细胞排列松散、紊乱, 并有管腔扩张样改变 (图 4), 表明肾组织结构受到损害。

3.4 马兜铃酸 A 对斑马鱼胚胎 nephrin 表达水平的影响

用 qPCR 对各处理组及对照组斑马鱼胚胎的 nephrin 表达情况进行检测, 20 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸 A 处理 24 h 后, 斑马鱼胚胎 nephrin 的表达水平比对照组显著降低 ($P < 0.01$), 仅为对照组的 0.578 ± 0.08 (图 5)。

4 讨论

服用含马兜铃酸成分的中药材会导致人体发生不可逆肾损伤和癌变, 其肾损伤机制随剂量不同而不同, 大剂量马兜铃酸直接引起急性肾小管上皮细胞坏死, 并进而发生肾间质纤维化, 长期小剂量摄入马兜铃酸则通过与细胞 DNA 形成 AA-DNA 加合物导致肾小管损伤和

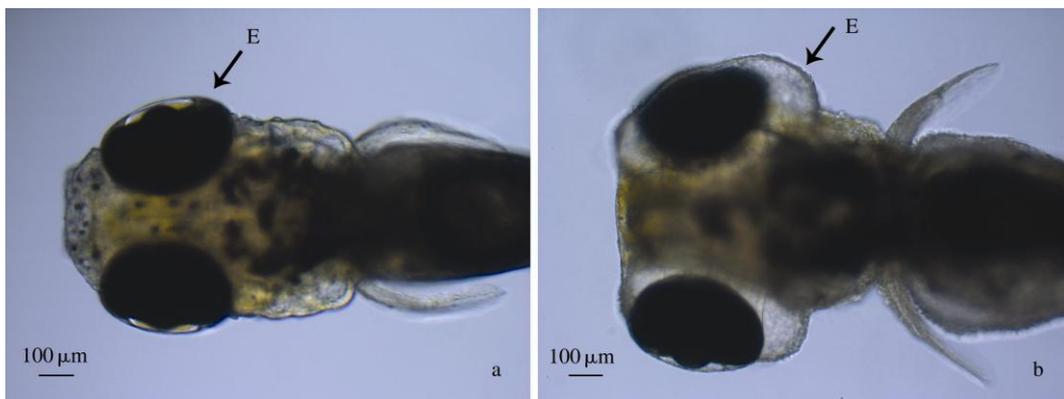


图 1 马兜铃酸 A 处理 24 h 后斑马鱼胚胎的表型变化

Fig. 1 Defective phenotypes of zebrafish embryos after aristolochic acid treatment for 24 h

a. 对照组斑马鱼胚胎 (4 dpf); b. 马兜铃酸 A (20 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后斑马鱼胚胎出现眼周水肿。E. 眼。

a. Control group (4 dpf); b. 20 $\mu\text{mol/L}$ AA-treated embryos displayed periorbital edema. E. Eye.

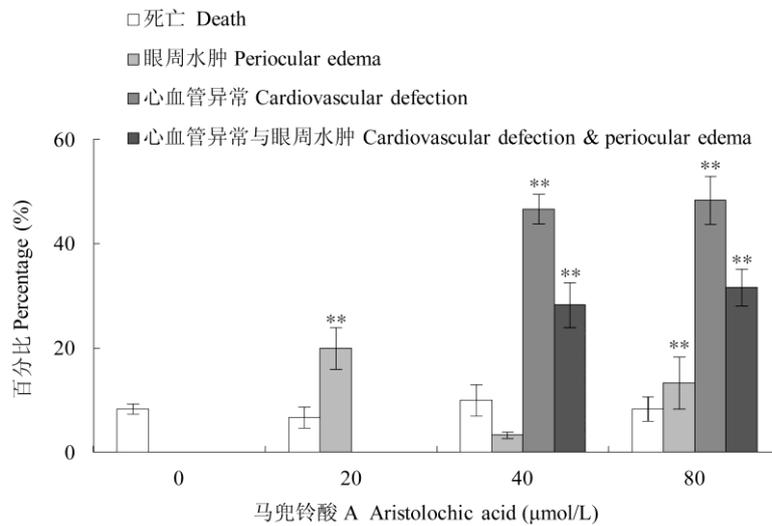


图 2 马兜铃酸 A 对斑马鱼胚胎 (3 dpf) 的毒性作用

Fig. 2 Toxic effects of aristolochic acid on 3 dpf zebrafish embryos

与对照组相比, **: $P < 0.01$. ** $P < 0.01$, compared with control group.

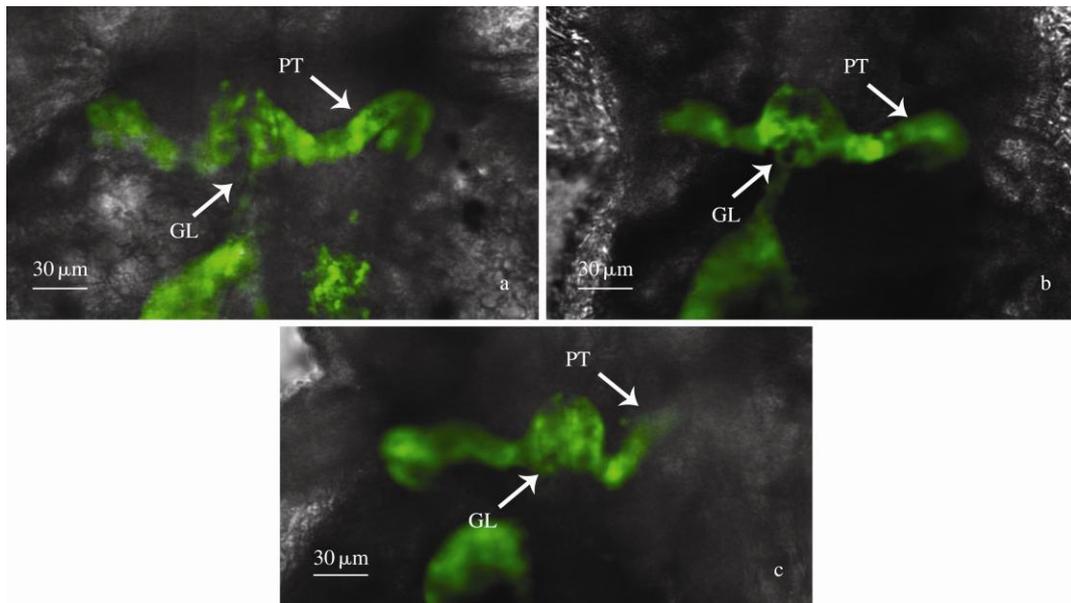


图 3 马兜铃酸 A 处理 24 h 后斑马鱼 (*wt1b*:GFP) 胚胎肾形态

Fig. 3 Pronephric phenotype of transgenic line (*wt1b*:GFP) after exposure to aristolochic acid for 24 h

a. 对照组斑马鱼胚胎 (4 dpf); b. 40 μmol/L 马兜铃酸 A 处理 24 h 后斑马鱼胚胎 (4 dpf); c. 80 μmol/L 马兜铃酸 A 处理 24 h 后斑马鱼胚胎 (4 dpf)。

Embryos treated with 40 μmol/L (b) and 80 μmol/L aristolochic acid (c) exhibited cystic glomeruli and warping pronephric tubules compared with the control group (a).

GL. 肾小球; PT. 前肾管。GL. Glomeruli; PT. Pronephric tubule.

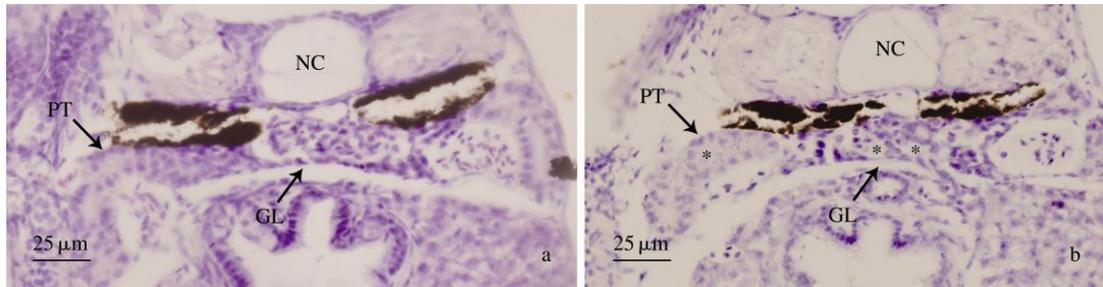


图 4 马兜铃酸 A 对斑马鱼胚胎肾组织结构的影响

Fig. 4 Transverse histological sections of glomeruli and pronephric tubule of zebrafish embryos

a. 正常组斑马鱼胚胎 (96 hpf) 肾组织切片 (横断面, H.E 染色); b. 40 μmol/L 马兜铃酸处理 24 h 后斑马鱼胚胎 (96 hpf) 肾组织切片 (横断面, H.E 染色)。

Transverse histological sections (5 μm) were obtained from 96 hpf zebrafish embryos after exposure to solvent (a) and 40 μmol/L aristolochic acid (b) for 24 h, respectively.

NC. 脊索; GL. 肾小球; PT. 前肾管; * 囊性扩张。

NC. Notochord; GL. Glomeruli; PT. Pronephric tubule; * Indicate the location of cyst.

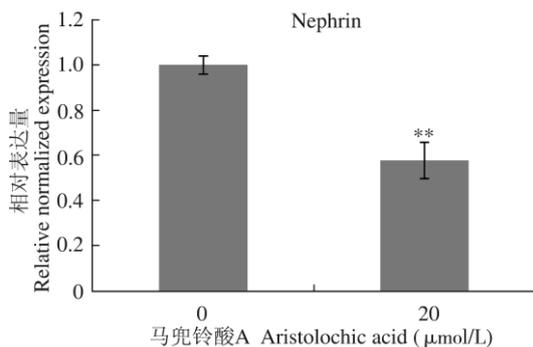


图 5 马兜铃酸 A 对斑马鱼胚胎 nephrin 表达水平的影响

Fig. 5 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis for the expression levels of nephrin in mock and AA-treated embryos

** : 与对照组比, $P < 0.01$. ** $P < 0.01$, compared with control group.

肾间质纤维化(商朴等 2008)。在 Ding 等(2012) 研究中, 用马兜铃酸处理处于肾发育期的斑马鱼胚胎 (16 hpf 以上), 导致肾形态出现畸形, 肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 比正常胚胎显著下降, 显示马兜铃酸对肾发育产生毒性影响。在本文中, 用 3 dpf 肾发育完成的斑马鱼胚胎研究马兜铃酸的肾毒性作用, 经 20 μmol/L 马兜铃酸 A 处理 24 h 后, 胚胎出现了明显的眼周水肿表现, 心率及血流速度未

见异常, 提示胚胎肾功能可能出现异常。荧光显微镜下观察, 40 ~ 80 μmol/L 马兜铃酸 A 处理组胚胎肾出现肾小球囊性膨胀、前肾管囊性扩张和形态异常。肾组织切片发现处理组胚胎肾小球出现结构疏松和囊性扩张, 前肾管上皮细胞排列松散、紊乱, 并有管腔扩张样改变, 说明肾结构受到损害, 从而导致局部水肿的发生。

实验中发现, 经 40 ~ 80 μmol/L 马兜铃酸 A 处理 24 h 后的斑马鱼胚胎, 除出现眼周水肿改变外, 还出现心率降低、血流缓慢甚至停滞表现, 说明马兜铃酸 A 处理引起胚胎血液循环系统功能发生异常。已有研究认为, 马兜铃酸对斑马鱼胚胎的心发育具有毒性作用, 在 Huang 等 (2007) 的研究中, 用马兜铃酸处理发育早期 (6 hpf 以上) 的斑马鱼胚胎, 会引起胚胎心结构发育异常和心功能障碍。Ding 等 (2012) 研究中发现马兜铃酸对斑马鱼胚胎的心和肾发育均有毒性影响, 并通过进一步研究比较, 认为肾对马兜铃酸的毒性作用比心更为敏感。作为机体的两大重要器官, 心与肾之间通过复杂网络系统和多种介质在功能上密切相关、相互影响, 一方的功能改变会严重影响另一器官的功能, 两者在病程上往往产生协同促进作用。

本文中马兜铃酸 A 处理组胚胎出现的心血管系统功能的异常改变, 是源于马兜铃酸对心的直接毒性作用, 还是继发于肾功能的严重损伤, 还需要进一步研究确认。

本文中, 处理时间为 24 h 时, 20 ~ 80 $\mu\text{mol/L}$ 各处理组胚胎均出现形态异常, 但死亡率与对照组无明显差异。在实验中, 将马兜铃酸 A 处理 24 h 后的各组胚胎用培养水进行冲洗后, 转移入空白培养水中继续孵育 24 h, 发现包括 20 $\mu\text{mol/L}$ 组在内的各处理组胚胎仍全部死亡, 这说明马兜铃酸对胚胎造成的肾损伤是一个进行性发展、不可逆的过程, 这也符合临床肾疾病持续进展的病程特点。

Nephrin 为一分子量为 180 ku 的跨膜蛋白, 在肾特异表达于肾小球足细胞, 与足细胞膜上同时表达的 CD2AP 和 podocin 形成蛋白复合体, 一端锚定足细胞膜的磷脂双分子层区, 另一端与相临足细胞上蛋白复合体相互作用, 形成裂孔隔膜。Nephrin 对裂孔隔膜的完整和功能具有重要作用, 与蛋白尿发生密切相关, 在肾功能异常时, nephrin 的表达量及足细胞上的表达位置往往会发生变化。在本文中, 20 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸 A 处理 24 h 后, 仅有 20% 胚胎出现眼周水肿改变, qPCR 结果显示, 胚胎 nephrin 的相对表达量已明显降低, 仅为对照组的 1/2, 说明马兜铃酸不仅损伤肾小管上皮细胞, 对肾小球足细胞也有影响, 进而破坏了肾

小球滤过屏障功能, 这可能也是马兜铃酸肾病中出现蛋白尿症状的原因之一。

参 考 文 献

- Ding Y J, Chen Y H. 2012. Developmental nephrotoxicity of aristolochic acid in a zebrafish model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(1): 59–65.
- Ebarasi L, Oddsson A, Hulthenby K, et al. 2011. Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(4): 416–424.
- Huang C C, Chen P C, Huang C W, et al. 2007. Aristolochic Acid induces heart failure in zebrafish embryos that is mediated by inflammation. *Toxicological Sciences*, 100(2): 486–494.
- Kubota F, Murakami T, Mogi K, et al. 2007. Cadherin-6 is required for zebrafish nephrogenesis during early development. *The International Journal of Developmental Biology*, 51(2): 123–129.
- Mundel P, Shankland S J. 2002. Podocyte biology and response to injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(12): 3005–3015.
- Salant D J, Topham P S. 2003. Role of nephrin in proteinuric renal diseases. *Springer Seminars in Immunopathology*, 24(4): 423–439.
- 商朴, 王璇, 李晓玫, 等. 2008. 马兜铃内酰胺-I 进入人肾小管上皮细胞及细胞内分布和蓄积的观察. *中国中药杂志*, 33(7): 793–797.