

文章编号: 1001-8689(2020)09-0953-07

## 基于斑马鱼模型的抗结核药物肝脏毒性比较研究

马瑞娇<sup>1,2</sup> 贾智莉<sup>1,2</sup> 王学芳<sup>3</sup> 邬芳艳<sup>1,2</sup> 朱成悦<sup>1,2</sup> 萧崇德<sup>4</sup> 张云<sup>1,2,\*</sup> 刘可春<sup>1,2,\*</sup>

(1 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 济南 250103; 2 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 济南 250103; 3 济南市济钢医院耳鼻喉科, 济南 250132; 4 中原大学生物科技系, 台湾中坻 32023)

**摘要:** **目的** 以肝脏绿色荧光转基因斑马鱼Tg(L-FABP:EGFP)为模型, 研究一线抗结核药物异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇对斑马鱼肝脏的影响以及比较其肝毒性大小。**方法** 用不同浓度的异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇分别处理发育至72h的斑马鱼, 于加药后24、48和72hpe(hour post-exposure)观察斑马鱼的死亡率、畸形率和肝脏形态变化情况, 荧光显微镜下观察药物对斑马鱼肝脏荧光面积和荧光强度的影响。**结果** 随着给药浓度的增加和给药时间的延长, 异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇导致斑马鱼死亡率、畸形率升高。在72hpe, 与空白对照组相比, 1、2.5和5mmol/L吡嗪酰胺组斑马鱼肝脏荧光面积显著下降, 5mmol/L异烟肼组斑马鱼肝脏荧光面积显著下降, 10、20和30mmol/L乙胺丁醇组斑马鱼肝脏荧光面积显著下降。5mmol/L浓度下, 异烟肼导致斑马鱼肝脏荧光面积降低程度高于吡嗪酰胺。**结论** 异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇均有肝脏毒性, 乙胺丁醇肝毒性最小。1和2.5mmol/L浓度下吡嗪酰胺导致斑马鱼发生肝损伤程度强于异烟肼, 但5mmol/L下异烟肼肝脏损伤程度强于吡嗪酰胺, 其有关机制需进一步研究。

**关键词:** 异烟肼; 吡嗪酰胺; 乙胺丁醇; 斑马鱼; 肝脏毒性**中图分类号:** R996.3 **文献标志码:** A

## Comparative study on liver toxicity of anti-tuberculosis drugs based on the zebrafish model

Ma Rui-jiao<sup>1,2</sup>, Jia Zhi-li<sup>1,2</sup>, Wang Xue-fang<sup>3</sup>, Wu Fang-yan<sup>1,2</sup>, Zhu Cheng-yue<sup>1,2</sup>, Hsiao Chung-der<sup>4</sup>, Zhang Yun<sup>1,2</sup> and Liu Ke-chun<sup>1,2</sup>

(1 Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103; 2 Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Jinan 250103; 3 Jinan Jigang Hospital, Jinan 250132; 4 Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taiwan Zhongli 32023)

**Abstract Objective** To research hepatotoxicity of the first-line anti-tuberculosis drugs (isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol) using the transgenic zebrafish line Tg (L-FABP: EGFP). **Methods** Thirty zebrafish larvae were treated with different concentrations of isoniazid, pyrimidine, and ethambutol. The mortality, malformation rate, and liver morphology changes in zebrafish larvae were measured at 24, 48 and 72hpe(hour post-exposure). The effects of the drugs on the fluorescence area and intensity of the zebrafish liver were observed using fluorescence microscope. **Results** Isoniazid, pyrazinamide and ethambutol led to the increase of mortality and malformation rate of zebrafish with the increase of drug concentration and duration. At 72hpe, the liver area of zebrafish in the

收稿日期: 2019-09-02

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81703624); 国家重点研发计划(No. 2018YFC1707300)

作者简介: 马瑞娇, 女, 生于1996年, 在读硕士研究生, 主要从事基于斑马鱼的药物活性筛选与安全性评价工作, E-mail: mrj17863662233@163.com

\*通讯作者, 张云, E-mail: xiaohan\_0818@163.com; 刘可春, E-mail: hliukch@sds.org



1, 2.5 and 5mmol/L pyrazinamide group, 5mmol/L isoniazid group and 10, 20 and 30mmol/L ethambutol group significantly decreased compared with the control group. Isoniazid reduced the liver area of zebrafish more serious than pyrazinamide at the concentration of 5mmol/L. **Conclusion** Isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol had liver toxicity, and ethambutol had the least hepatotoxicity. At 1 and 2.5mmol/L concentration, pyrazinamide caused higher liver damage than isoniazid, but isoniazid was more toxic than pyrazinamide at 5mmol/L. The relevant mechanism needs further study.

**Key words** Isoniazid; Pyrazinamide; Ethambutol; Zebrafish; Liver toxicity

结核病是一种慢性呼吸道疾病, 严重危害人类健康, 现已成为重大的公共卫生问题和社会问题。我国最新疾控报告显示, 结核病疫情有明显加重的趋势。异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇都是不可替代的抗结核病和预防结核病复发的一线药物, 在肺结核化疗中占有极重要的位置<sup>[1-2]</sup>。异烟肼可以杀死细胞内外生长代谢旺盛和几乎静止的结核菌, 是一种全效杀菌剂<sup>[3]</sup>。吡嗪酰胺在pH≤5.6有抗菌活性, 为半效杀菌剂<sup>[4-6]</sup>。与异烟肼一样, 乙胺丁醇只对繁殖期的结核菌有效<sup>[7-8]</sup>。在治疗结核病过程中采用多种抗结核药物联合使用, 治疗的结果是令人满意的。但是在治疗过程中药物的副反应是明显的, 其中排在第一位的是药物性肝损伤, 严重者可导致治疗过程的中断, 极大降低治疗效果<sup>[9]</sup>。

斑马鱼是一种小型热带脊椎动物, 它的基因组与人类基因组的同源性高约87%<sup>[10]</sup>。与传统的实验动物相比, 它具有发育快、个体小、繁殖多、胚胎透明、易于观察以及饲养简便等优点<sup>[11]</sup>。斑马鱼实验操作简便、快捷, 不仅可以节省试验药物的用量, 还可以降低培养实验动物花费的时间和成本等。斑马鱼在肝脏结构和功能方面与哺乳动物具有极高的相似性, 现已广泛应用于药物的肝脏毒性评价和机制研究中<sup>[12]</sup>。

本论文首次应用模式生物斑马鱼进行一线抗结核药物的肝毒性研究。用3种不同的一线抗结核药物(异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇)处理斑马鱼后, 观察不同药物对斑马鱼肝脏的影响并进行其肝毒性大小比较。本研究结果可为一线抗结核药物的临床用药和不良反应检测提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 斑马鱼及饲养条件

本实验采用肝脏绿色荧光转基因斑马鱼Tg(L-FABP:EGFP), 由山东省科学院生物研究所药物筛选重点实验室提供。实验使用的斑马鱼在黑暗培养/光照培养(10h/14h)进行, 28℃条件下饲养。在

实验前一天取健康性成熟的雌雄斑马鱼, 按雌雄1:1或者1:2的比例放入产卵缸, 隔板分开。次日8:30抽板, 10:00左右收集受精卵。将收集好的胚胎放到28℃恒温培养箱中控光培养, 以备使用。

#### 1.1.2 仪器与试剂

仪器: SPX-280B-G型光照培养箱(上海基星生物科技有限公司)、斑马鱼饲养养殖系统(北京爱生科技有限公司)、体视荧光显微镜SZX16(Olympus公司)、体视荧光显微镜FSX100(Olympus公司)、XW-80A微型旋涡混合仪(上海沪西分析器厂有限公司)、IE204E型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

试剂: 异烟肼(生产于: Fluka公司, 产品编号: MKBQ8553V, 纯度≥99%)、吡嗪酰胺(生产于: Sigma公司, 产品编号: 050M1891V, 纯度≥99%)、盐酸乙胺丁醇(生产于上海麦克林生化科技有限公司, 产品编号: E832916, 纯度≥98%)、斑马鱼胚胎培养用水(4%CaCl<sub>2</sub>, 10%NaCl, 0.3%KCl, 1.63%MgSO<sub>4</sub>)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 处理斑马鱼幼鱼的方法

在斑马鱼发育至72h, 挑选发育正常的斑马鱼幼鱼, 移入12孔板的样孔中, 每孔30尾斑马鱼幼鱼。根据预实验设置空白对照组(胚胎培养用水), 异烟肼1、2.5和5mmol/L浓度组, 吡嗪酰胺1、2.5和5mmol/L浓度组, 乙胺丁醇1、2.5、5、10、20、30和40mmol/L浓度组。每个浓度组设3个重复孔。随后置于光照培养箱中恒温(28℃)孵育, 连续给药3d, 每天换液。

#### 1.2.2 斑马鱼形态变化

分别在给药后24、48和72hpe(hour post exposure)记录斑马鱼死亡数和畸形数, 计算死亡率和畸形率。体视荧光显微镜下观察斑马鱼的形态变化情况(有无肝脏形态变化、卵黄囊吸收延滞、心房水肿、脊柱弯曲、鱼唇不发育、体节形成迟滞等形态畸形)。

#### 1.2.3 斑马鱼幼鱼肝脏荧光形态变化

分别于24、48和72hpe, 将斑马鱼用质量浓度为



0.3%的三卡因麻醉1min，将斑马鱼固定侧面体位(两眼重合)进行拍照。荧光显微镜下拍照记录斑马鱼肝脏荧光情况。利用Image-Pro Plus 5.1 Chinese软件计算肝脏荧光面积和荧光强度。

相对肝脏面积=处理组斑马鱼肝脏面积/空白对照组肝脏面积×100%；相对肝脏荧光强度=处理组斑马鱼肝脏荧光强度/空白对照组肝脏荧光强度×100%。

1.2.4 数据分析

数据统计使用( $\bar{x}\pm s$ )表示方法，统计学差异通过SPSS 13.0 *t*检验来检测分析。 $P<0.05$ 为具有统计学差异， $P<0.01$ 为具有显著统计学差异。

2 结果

2.1 不同抗结核药物对斑马鱼死亡率的影响

观察斑马鱼幼鱼在不同浓度的异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇暴露下的死亡情况。斑马鱼幼鱼在异烟肼暴露浓度为1、2.5和5mmol/L时均无死亡。斑马鱼幼鱼在吡嗪酰胺暴露浓度为1和2.5mmol/L时无死亡，5mmol/L剂量下48和72hpe斑马鱼出现死亡。乙胺丁醇低于20mmol/L的给药组斑马鱼无死亡现象，30和40mmol/L浓度组在72hpe死亡率显著上升。实验结果见表1。

2.2 不同抗结核药物对斑马鱼畸形率的影响

与空白对照组相比，5mmol/L异烟肼处理斑马鱼48和72hpe后，畸形率显著上升。5mmol/L吡嗪酰胺在24hpe即导致斑马鱼畸形率显著升高。乙胺丁醇30和40mmol/L浓度组在48和72hpe畸形率显著上升。1

和2.5mmol/L剂量下的异烟肼和吡嗪酰胺未导致斑马鱼发生畸形，1、2.5和5mmol/L剂量下的乙胺丁醇未导致斑马鱼发生畸形。实验结果见表2。

2.3 不同抗结核药物对斑马鱼形态的影响

在48hpe，5mmol/L异烟肼组斑马鱼出现心包水肿、鱼鳔缺失和卵黄囊吸收延滞现象。在48hpe，5mmol/L吡嗪酰胺组斑马鱼幼鱼发生鱼鳔缺失现象，在72hpe后，5mmol/L吡嗪酰胺组斑马鱼幼鱼发生心

表1 不同浓度药物暴露对斑马鱼死亡率的影响( $\bar{x}\pm s$ )  
Tab.1 Effects of different concentrations of drug on mortality of zebrafish ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	死亡率/%		
	24hpe	48hpe	72hpe
空白对照组	0±0	0±0	0±0
异烟肼	1mmol/L	0±0	0±0
	2.5mmol/L	0±0	0±0
	5mmol/L	0±0	0±0
吡嗪酰胺	1mmol/L	0±0	0±0
	2.5mmol/L	0±0	0±0
	5mmol/L	0±0	22.22±18.98*
乙胺丁醇	1mmol/L	0±0	0±0
	2.5mmol/L	0±0	0±0
	5mmol/L	0±0	0±0
	10mmol/L	0±0	0±0
	20mmol/L	0±0	0±0
	30mmol/L	0±0	6.66±3.84
	40mmol/L	0±0	55.55±9.68**
		17.77±10.18*	86.66±10.18**

注：“\*”表示 $P<0.05$ ；“\*\*”表示 $P<0.01$ ，与空白对照组相比

表2 不同浓度药物暴露对斑马鱼畸形率的情况( $\bar{x}\pm s$ )

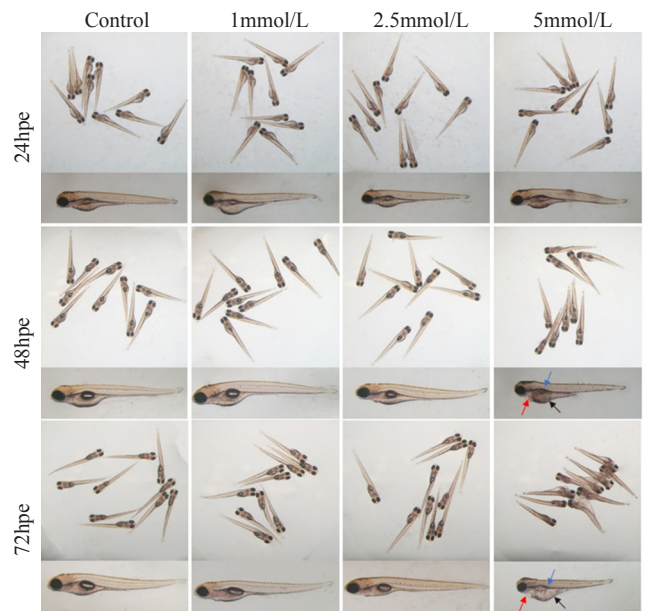
Tab. 2 Malformation rate of different concentrations of drug exposure of zebrafish ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	畸形率/%		
	24hpe	48hpe	72hpe
空白对照组	0±0	0±0	0±0
异烟肼	1mmol/L	0±0	0±0
	2.5mmol/L	0±0	0±0
	5mmol/L	0±0	6.98±4.12*
吡嗪酰胺	1mmol/L	0±0	68.88±16.02**
	2.5mmol/L	0±0	0±0
	5mmol/L	0±0	0±0
乙胺丁醇	1mmol/L	23.01±10.52*	24.44±11.87*
	2.5mmol/L	24.44±11.87*	25.5±12.82*
	5mmol/L	0±0	0±0
	10mmol/L	0±0	0±0
	20mmol/L	0±0	2.22±2.22
	30mmol/L	0±0	2.25±2.22
	40mmol/L	0±0	6.66±3.84*
		17.77±17.77*	100.00±0**

注：“\*”表示 $P<0.05$ ；“\*\*”表示 $P<0.01$ ，与空白对照组相比

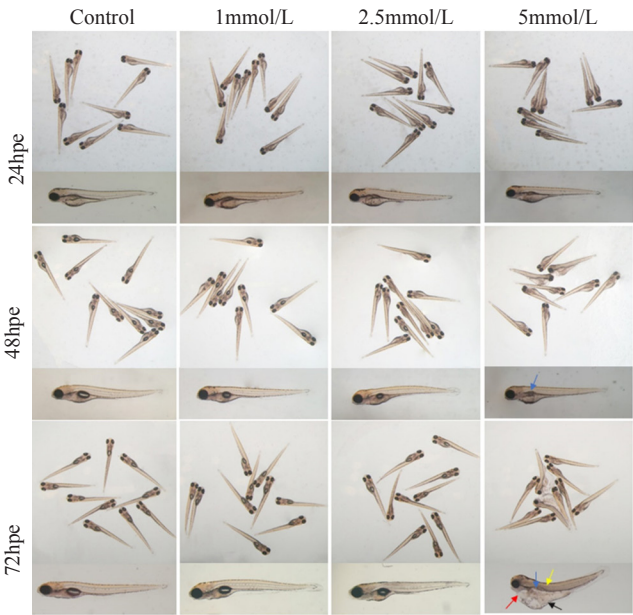


包水肿、鱼鳔缺失和卵黄囊吸收延滞现象，斑马鱼形态畸形更加严重并发生脊柱弯曲。在48和72hpe，30和40mmol/L乙胺丁醇导致斑马鱼鱼鳔缺失。实验结果见图1~3。



红色箭头指示心包水肿；蓝色箭头指示鱼鳔缺失或减小；黑色箭头指示卵黄囊吸收延滞

图1 不同浓度异烟肼给药组的斑马鱼幼鱼形态图  
Fig. 1 Morphology of zebrafish larvae with different concentrations of isoniazid

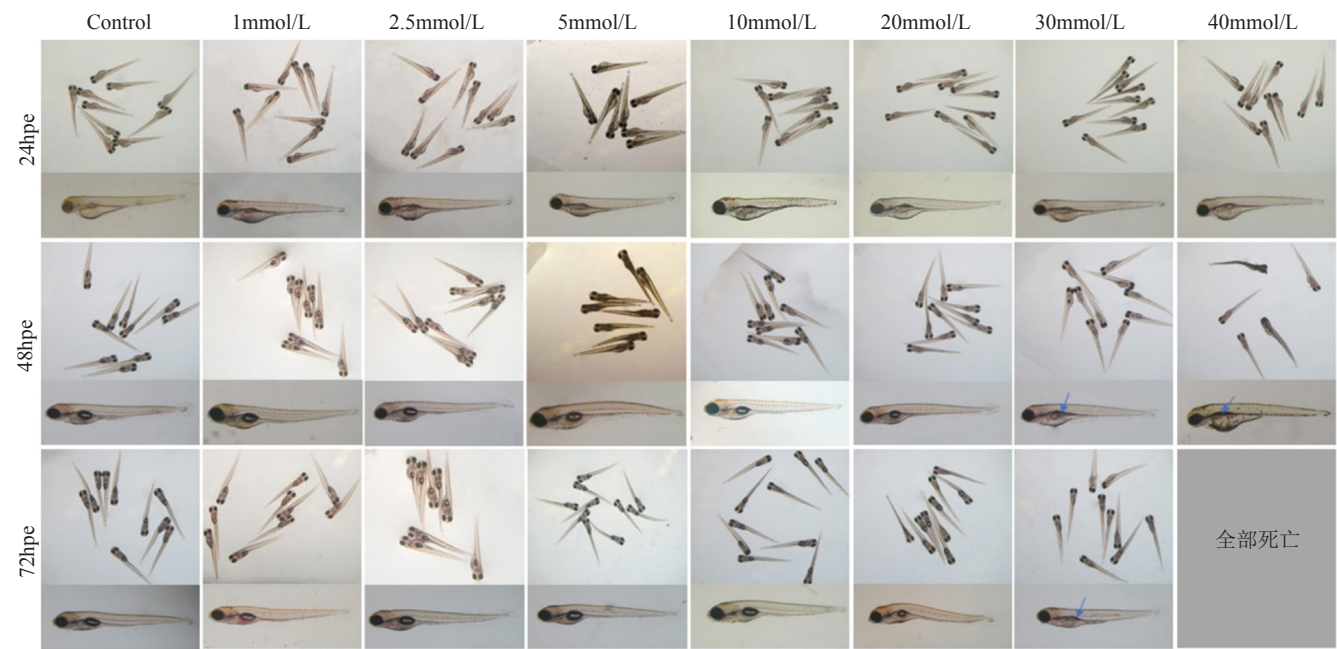


红色箭头指示心包水肿，蓝色箭头指示鱼鳔缺失或减小，黑色箭头指示卵黄囊吸收延滞，黄色箭头指示脊柱弯曲

图2 不同浓度吡嗪酰胺给药组的斑马鱼幼鱼形态图  
Fig. 2 Morphology of zebrafish larvae with different concentrations of pyrazinamide

#### 2.4 异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇对斑马鱼幼鱼肝脏毒性的影响

与对照组相比，5mmol/L异烟肼肝脏荧光面积显著下降，1、2.5和5mmol/L吡嗪酰胺肝脏荧光面积显著下降，10、20和30mmol/L乙胺丁醇肝脏荧光面积



蓝色箭头代表鱼鳔缺失或减小

图3 不同浓度乙胺丁醇给药组的斑马鱼幼鱼形态图  
Fig. 3 Morphology of zebrafish larvae with different concentrations of ethambutol



显著下降。5mmol/L异烟肼和吡嗪酰胺，10、20和30mmol/L乙胺丁醇组斑马鱼肝脏荧光强度与空白对照组相比显著降低(图4~6)。

3 讨论

斑马鱼肝脏发育快速，在发育至48h已经形成，而在发育至60~72h肝脏迅速生长到适当大小<sup>[13]</sup>，因此本实验采用发育72h的肝脏荧光转基因斑马鱼作为肝脏毒性评价模型。张云等<sup>[14]</sup>以发育72h的肝脏荧光转基因斑马鱼Tg(L-FABP:EGFP)为模型，研究了对乙酰氨基酚对斑马鱼肝脏的毒性。端正花等<sup>[15]</sup>利用肝脏转基因斑马鱼Tg(lfabp10a:ds Red; ela A:EGFP)快速评价环境污染物对斑马鱼的肝脏毒性效应。Zhang等<sup>[16]</sup>发现对乙酰氨基酚、利福平和阿司匹林等肝脏细胞损伤毒性物质的暴露与肝脏荧光转基因斑马鱼肝脏荧光量表达的降低存在显著的剂量-效应关系。利用肝脏荧光转基因斑马鱼，可通过比较肝脏荧光面积和荧光强度的变化快速评价化合物的肝脏毒性。

本实验结果表明随着异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇给药浓度的增加，斑马鱼畸形率增加，主要表

现为脊柱弯曲、鱼鳔缺失、尾部弯曲和卵黄囊吸收延滞。卵黄囊能够提供斑马鱼发育所需的营养物质，卵黄囊中70%为中性脂质，主要在肝脏中代谢，卵黄囊吸收延滞表明肝脏代谢紊乱，卵黄囊大小是反应肝功能的重要指标之一<sup>[17-18]</sup>。本实验中异烟肼和吡嗪酰胺组斑马鱼卵黄囊发生吸收延迟现象，是抗结核药物异烟肼和吡嗪酰胺导致幼鱼肝脏受损的毒性表现。

随着异烟肼、吡嗪酰胺和乙胺丁醇给药浓度的增加，斑马鱼肝脏面积和荧光强度显著减小。在72hpe后，1和2.5mmol/L浓度下吡嗪酰胺造成斑马鱼肝脏荧光面积降低程度强于异烟肼，但在5mmol/L浓度下异烟肼造成肝脏损伤程度强于吡嗪酰胺。1、2.5和5mmol/L乙胺丁醇组荧光面积和荧光强度无显著变化，在10、20和30mmol/L斑马鱼荧光肝脏面积和荧光强度显著降低。本实验应用模式生物斑马鱼进行一线抗结核药物的肝脏毒性比较，研究结果可为一线抗结核药物的临床用药和不良反应检测提供参考依据，其肝脏毒性作用机制仍需进一步研究。

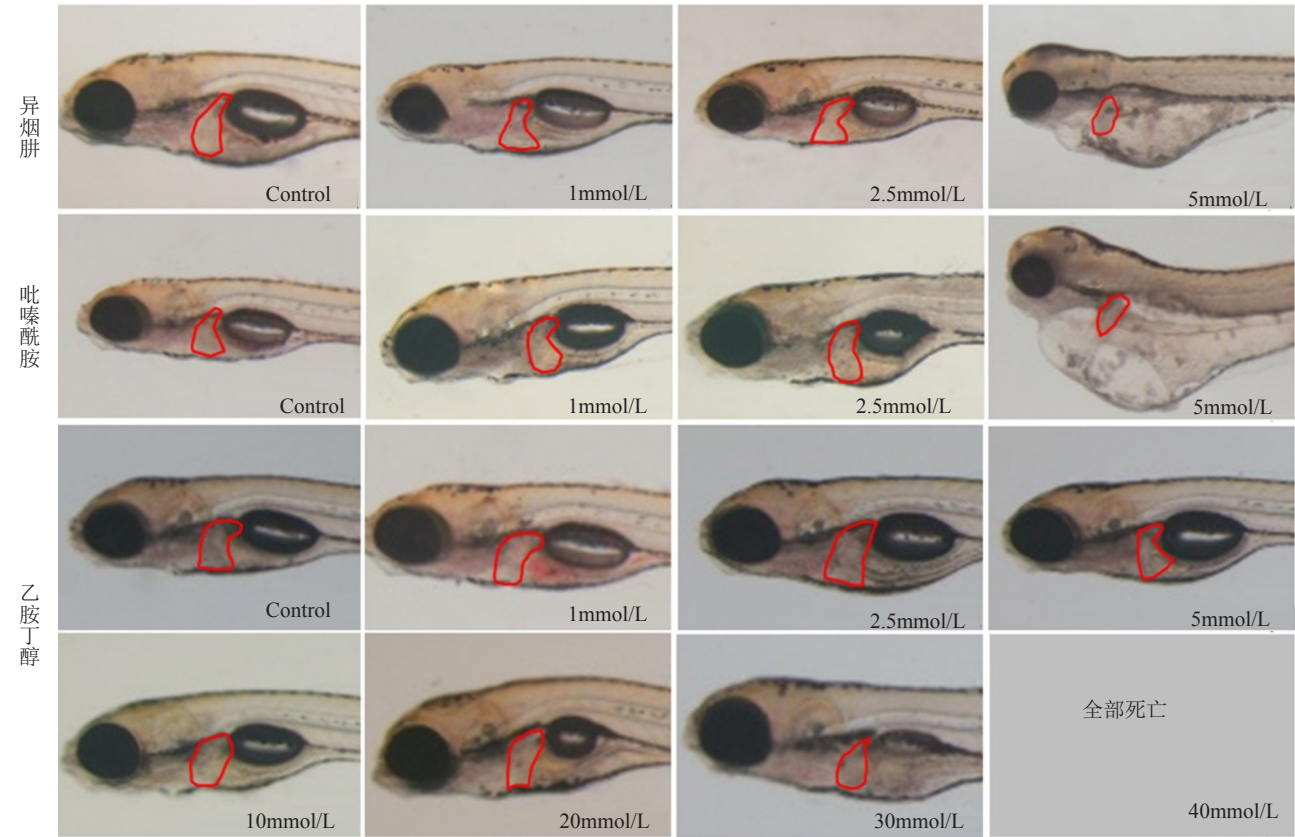


图4 在72hpe，不同药物浓度组斑马鱼幼鱼肝脏形态情况  
Fig. 4 Effects of drugs on liver morphology of zebrafish larvae at 72hpe



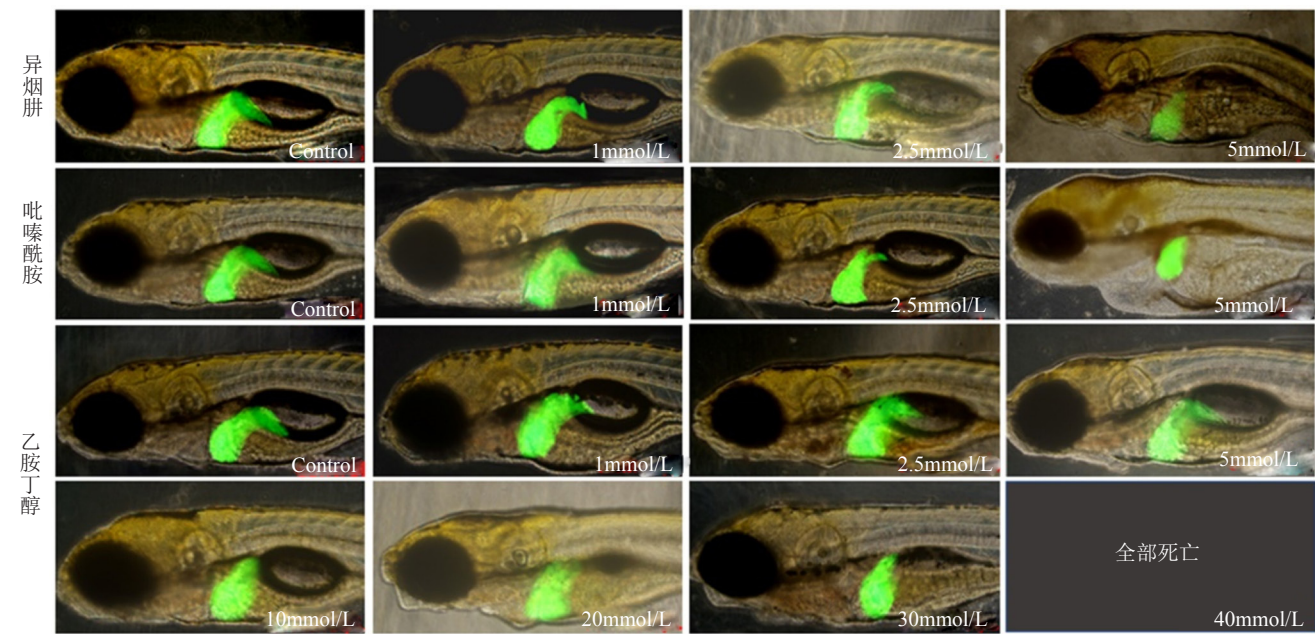


图5 在72hpe, 不同药物浓度组斑马鱼肝脏荧光情况  
Fig. 5 Effects of drugs on fluorescent-labelled zebrafish liver at 72hpe

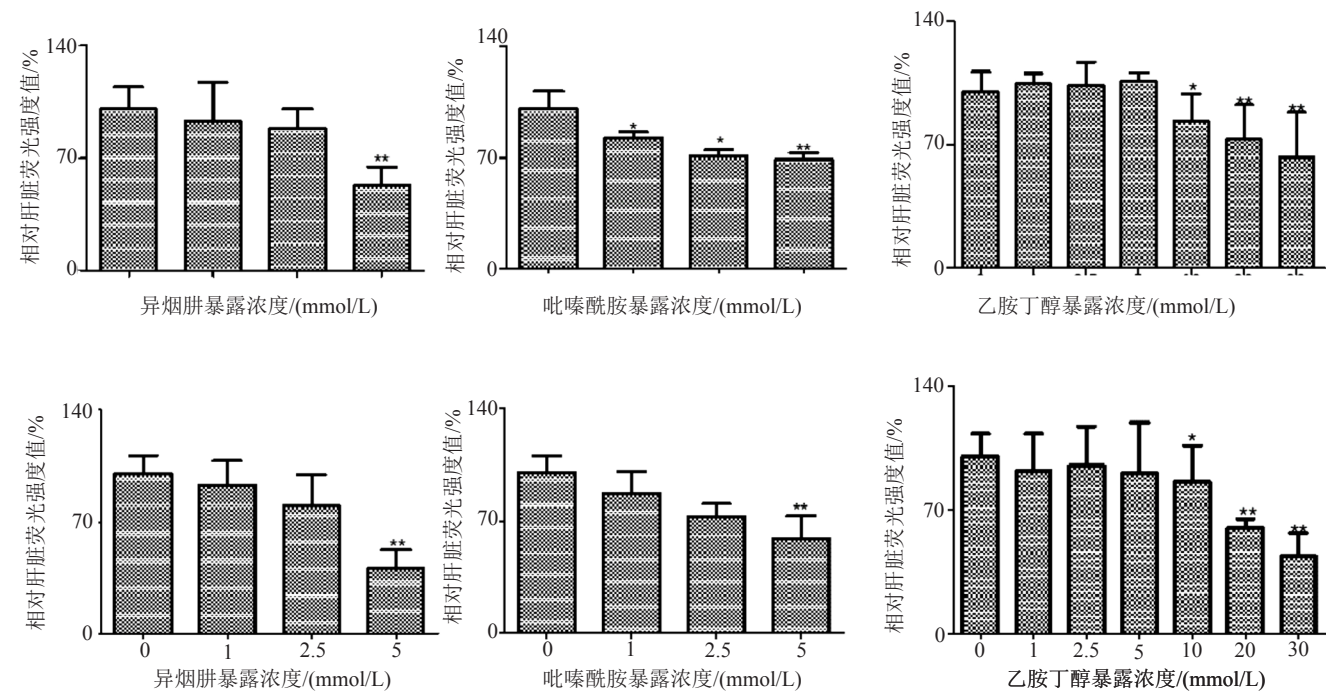


图6 在72hpe, 不同药物浓度组斑马鱼肝脏荧光面积和荧光强度  
Fig. 6 Fluorescence area and intensity of zebrafish liver exposed to different drug concentrations at 72hpe

参考文献

[1] 贾忠, 吴晶, 马建军, 等. 一线抗结核药物肝损害的研究现状[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(6): 468-471.

[2] 袁苗. 异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、盐酸乙胺丁醇联合治疗结核分枝杆菌的疗效评价[J]. 北方药学, 2014, 11(10): 22-23.

[3] 张姝, 徐志, 徐磊, 等. 异烟肼衍生物及其抗结核活性[J]. 国外医药抗生素分册, 2017, 38(5): 210-221.

[4] 胡严杰. 结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药诊断方法的建立及可靠性评估[D]. 北京: 北京市结核病胸部肿瘤研究所, 2017.

[5] 李娟娟, 韩利文, 邱昌辉, 等. 吡嗪酰胺对斑马鱼胚胎发育和氧化应激效应的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(11): 1419-1425.

[6] 刘伟, 孙峰, 张文宏, 等. 基于吡嗪酰胺药物敏感性改善耐药药结核病治疗结局的研究进展[J]. 结核病与肺部健康杂志, 2014, 3(2): 77-78.



- [7] 马明红, 李男. 0.25g盐酸乙胺丁醇片的工艺改进[J]. 北方药学, 2014, 11(3): 48-50.
- [8] 戴学虎, 许玉芬, 刘春辉. 乙胺丁醇的少见不良反应[J]. 医药导报, 2000, 19(1): 21.
- [9] Sahota T, Della P O. Feasibility of a fixed-dose regimen of pyrazinamide and its impact on systemic drug exposure and liver safety in patients with tuberculosis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(11): 5442-5449.
- [10] 邹玉, 张云, 韩利文, 等. 异烟肼对斑马鱼幼鱼发育毒性及运动行为学的影响[J]. 山东科学, 2016, 29(5): 47-53.
- [11] Qiang L, Cheng J, Yi J, *et al*. Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior[J]. *Ecotoxicology*, 2016, 25(7): 1426-1437.
- [12] de Esch C, Sliker R, Wolterbeek A, *et al*. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2012, 34(6): 545-553.
- [13] Chu J, Sadler K C. New school in liver development: Lessons from zebrafish[J]. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1656-1663.
- [14] 张云, 彭维兵, 王希敏, 等. 采用斑马鱼模型评价对乙酰氨基酚的肝脏毒性[J]. 药物评价研究, 2013, 36(5): 351-354.
- [15] 端正花, 陈晓欧, 刘灵丽, 等. 苯并三唑和镉对斑马鱼肝脏的联合毒性效应[J]. 中国环境科学, 2015, 35(6): 1872-1876.
- [16] Zhang X, Li C, Gong Z. Development of a convenient in vivo hepatotoxin assay using a transgenic zebrafish line with liver-specific DsRed expression[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91874.
- [17] McGrath P, Li C Q. Zebrafish: A predictive model for assessing drug-induced toxicity[J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(9-10): 394-401.
- [18] Hill A. Hepatotoxicity Testing in Larval Zebrafish[M]// Patricia Mc Grath. Zebrafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity. USA: John Wiley & Sons, Inc, 2011: 89-102.