

# 异烟肼对斑马鱼幼鱼发育毒性及运动行为学的影响

邹玉<sup>1,2</sup>, 张云<sup>1</sup>, 韩利文<sup>1</sup>, 何秋霞<sup>1</sup>, 李智平<sup>1,3</sup>, 侯海荣<sup>1</sup>, 韩建<sup>1</sup>,  
王希敏<sup>1</sup>, 李娟娟<sup>1,3</sup>, 岑娟<sup>2\*</sup>, 刘可春<sup>1\*</sup>

(1.山东省科学院生物研究所, 山东省生物检测技术工程实验室, 山东省生物传感器重点实验室, 山东省科学院药物筛选技术重点实验室, 山东 济南 250014; 2.河南大学, 河南省天然药物与免疫工程重点实验室, 河南 开封 475001; 3.山西医科大学, 山西 太原 030000)

**摘要:**以斑马鱼幼鱼为研究对象, 研究异烟肼对幼鱼发育毒性和行为学的影响。用不同浓度的异烟肼分别处理发育至72 hpf的斑马鱼幼鱼, 观察幼鱼的死亡率、畸形率及形态变化, 分析幼鱼行为学轨迹。异烟肼( $\geq 4$  mmol/L)对斑马鱼幼鱼有致死作用, 随着浓度的增加和作用时间延长而增强。异烟肼对斑马鱼幼鱼的发育过程有致畸作用, 表现为脊柱弯曲、卵黄囊吸收延滞、心包水肿、鱼鳃缺失、体长发育延迟和器官空泡化等。随着给药浓度的增加和作用时间的延长, 异烟肼组幼鱼行为学轨迹减少, 运动次数和运动速度显著降低。结果表明, 异烟肼( $\geq 4$  mmol/L)对斑马鱼幼鱼具有致死和致畸作用, 对幼鱼的运动行为有抑制作用, 并且呈现时间和剂量依赖性。

**关键词:**异烟肼; 斑马鱼; 发育毒性; 行为学

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-4026(2016)05-0047-07

## Impact of isoniazid on developmental toxicity and behavior of zebrafish larvae

ZOU Yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Yun<sup>1</sup>, HAN Li-wen<sup>1</sup>, HE Qiu-xia<sup>1</sup>, LI Zhi-ping<sup>1,3</sup>, HOU Hai-rong<sup>1</sup>,  
HAN Jian<sup>1</sup>, WANG Xi-min<sup>1</sup>, LI Juan-juan<sup>1,3</sup>, CEN Juan<sup>2\*</sup>, LIU Ke-chun<sup>1\*</sup>

(1. Shandong Provincial Engineering Laboratory for Biological Testing Technology, Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensors, Key Laboratory for Drug Screening Technology of Shandong Academy of Sciences, Biology Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China; 2. Henan Provincial Key Laboratory of Natural Medicine and Immune-Engineering, Henan University, Kaifeng 475001, China; 3. Shanxi Medical University, Shanxi 030000, China)

**Abstract:** We investigated the impact of isoniazid on developmental toxicity and behavior of zebrafish larvae. Zebrafish larvae of 72 hpf growth were processed with different concentrations isoniazid. We then observed their mortality, malformation rate, morphology variation and analyzed their behavior trajectory. Higher concentration isoniazid ( $\geq 4$  mmol/L)

收稿日期: 2016-07-13

基金项目: 山东省自然科学基金三院联合基金(ZR2015YL010); 山东省科学院青年科学基金项目(2013QN001); 山东省自主创新重大专项(2014ZZCX0215); 国家自然科学基金(U1204830); 河南省教育厅科学技术研究重点项目资助计划(13A310064)

作者简介: 邹玉(1991—), 女, 硕士, 研究方向为肿瘤药理学。Email: 15069177320@163.com

\* 通信作者, 岑娟, Email: cenjuan@henu.edu.cn; 刘可春, Email: hliukch@sdas.org

has lethal effect to zebrafish larvae, which is strengthened with the increase of isoniazid concentration and action time. Isoniazid has abnormal effect on their developmental process, including spinal curvature, increased yolk sac area, pericardial edema, swim bladder loss, developmental delay of body length and organ vacuolation. The larva of isoniazid group have less behavior trajectory, lower movement number and velocity with the increase of drug concentration and action time. Results demonstrate that isoniazid ( $\geq 4$  mmol/L) has lethal and abnormal effect on zebrafish larvae, and inhibiting effect on their movement behavior, dependent on dose and time.

**Key words** : isoniazid; zebrafish larvae; developmental toxicity; behavior

结核病是一种由结核杆菌引起的常见致命传染病,据世界卫生组织统计,全球每年结核病患者新增人数达到 900 万,已成为威胁人类健康的主要疾病之一,而且我国属于结核病高发地区<sup>[1-2]</sup>。1952 年首次合成的抗生素异烟肼(Isonicotinic acid hydrazide, INH),因其对结核分枝杆菌具有高度选择性,开始用于抗结核病的治疗。INH 的性质稳定,抗菌力强,疗效高、口服方便且价廉,已成为目前一线临床治疗结核病的药物<sup>[3-4]</sup>。

斑马鱼是一种小型热带脊椎动物,不仅具有与人类基因组约 87% 的同源性<sup>[5]</sup>,而且有个体小、产卵多、发育快、体外受精、胚胎透明、易于观察以及饲养简便等优点<sup>[6]</sup>。与传统的实验动物大、小鼠相比,斑马鱼实验操作简便、节省受试药物的用量、减少培养实验动物的时间和成本,从而有助于研究疾病的发生和药物的毒理机制<sup>[7]</sup>。斑马鱼作为一种体内实验模式动物,它的发育在心血管、体节、肌肉、骨骼和神经系统方面与哺乳动物具有高度相似性,现已广泛应用于药物的发育毒性筛选和机制研究中。

临床发现,INH 在持续使用过程中,具有一定的毒副作用<sup>[8]</sup>,可引起病人产生各种不良反应,如肝毒性、周围神经炎、胃肠道反应、内分泌失调、过敏和中枢神经系统并发症等<sup>[9-10]</sup>。INH 可通过胎盘使胎儿血药浓度高于母体,但 INH 对胎儿和新生儿的发育毒性并未见报道。因此,本研究以斑马鱼幼鱼为发育毒性评价模型,探讨 INH 对斑马鱼幼鱼发育和运动行为学的影响,科学评价 INH 对幼鱼的发育毒性,为指导孕产妇及新生儿临床合理用药提供科学依据。

## 1 实验材料与仪器

### 1.1 试剂

INH(Fluka 公司)使用斑马鱼养殖水溶解稀释。斑马鱼养殖水的配方为 5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl<sub>2</sub>和 0.16 mmol/L MgSO<sub>4</sub>。三卡因(Sigma 公司)使用纯净水配成质量分数 0.16% 的溶液,4℃ 冰箱保存备用。

### 1.2 实验仪器

zebrabox 斑马鱼行为分析仪(Viewpoint 公司);体视荧光显微镜 SZX16(Olympus 公司);DP2-BSW 图像软件(Olympus 公司);斑马鱼饲养养殖系统(北京爱生科技有限公司);Forma 3111 型水套式 CO<sub>2</sub> 培养箱(Forma 公司)。

### 1.3 实验动物

AB 野生型斑马鱼由山东省科学院斑马鱼药物筛选平台提供,斑马鱼的饲养和繁殖参照文献中已有的成熟方法<sup>[11]</sup>。斑马鱼的培养在光循环为 14 h 光照和 10 h 黑暗、pH 为 7.0 左右、温度为 28℃ 左右的环境中。实验前一天 16:00,将健康的斑马鱼放在缸内交配,雌雄比例为 1:1 或 1:2,次日 8:30 抽取隔板,0.5 h 后收集受精卵。用养殖水对受精卵清洗 3 遍,然后用亚甲基蓝溶液对受精卵进行消毒,后移入干净的斑马鱼养殖水中 28℃ 左右控光培养。

## 2 实验方法

### 2.1 INH 与斑马鱼幼鱼共孵育

将受精后 72 hpf (hours post fertilization) 的斑马鱼放在培养皿中,在显微镜下挑选发育正常的幼鱼于 6 孔板中,每孔 30 尾幼鱼。实验中 INH 的浓度分别设置为 1、2、4、6、8、16 mmol/L (养殖水配制) 和空白对照组 (养殖水),每孔给予不同浓度的 INH 暴露液 5 mL,每个浓度组分别设置 3 个重复孔,给药后放在 28 °C 恒温培养箱中继续控光培养。连续药液暴露 3 d,每 24 h 更换药液,并去除死亡幼鱼。

### 2.2 斑马鱼幼鱼发育观察和记录

分别在给药 24、48、72 hpe (hours post exposure) 时记录斑马鱼死亡数和畸形数,然后计算其死亡率、畸形率。使用三卡因麻醉幼鱼后,在体视荧光显微镜下拍照观察,并记录斑马鱼形态变化。

### 2.3 行为学实验

斑马鱼幼鱼行为学实验操作参考文献[12],将 INH (1、2、4、6、8、16 mmol/L) 不同浓度组和空白对照组,分别放在 48 孔板中,每孔一尾发育至 72 hpf 的幼鱼,每孔加入相应浓度药液和养殖水 500  $\mu$ L,每个实验组设置 6 尾幼鱼,将 48 孔板放入培养箱中继续控光培养,于 24、48、72 hpe 放入斑马鱼行为学分析系统的暗箱中,使用 zeblab 软件分别采集 10 min 内各组幼鱼的运动轨迹,利用软件导出总游行距离和游行时间,然后计算每组鱼游行平均速度、平均距离、快中慢运动对应时间和次数,各数值分别计入统计。

### 2.4 数据分析

采用数据统计软件 SPSS 16.0 对实验数据进行处理,所有实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,统计学差异通过 ANOVA 进行分析,组间比较通过 Tukey 检验。 $P < 0.05$  为有显著性差异, $P < 0.01$  为有极显著性差异。

## 3 结果与分析

### 3.1 INH 对斑马鱼幼鱼死亡率的影响

观察斑马鱼幼鱼的死亡情况,空白对照组和 1 mmol/L 组在给药 3 d 内均无死亡现象。给药 24 h 后,各给药组与对照组相比,死亡率未见显著性差异 ( $P > 0.05$ );给药 48 h 后,6、8、16 mmol/L 组死亡率开始明显升高;给药 72 h 后,6、8、16 mmol/L 组幼鱼发生显著性死亡,16 mmol/L 组死亡率达到 80% 以上,见图 1。

### 3.2 INH 对斑马鱼幼鱼发育畸形的影响

给药 24 h 后,与空白对照组相比,6、8、16 mmol/L 组均出现畸形;给药 48 h 后,较高浓度 ( $\geq 4$  mmol/L) 组畸形率升高明显;给药 72 h 后,2 mmol/L 组幼鱼也出现畸形,8、16 mmol/L 组的致畸作用显著,见图 2。

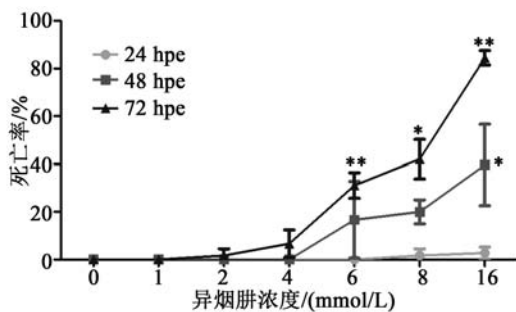


图 1 INH 对斑马鱼幼鱼剂量-时间-死亡率的影响。

Fig.1 Impact of INH on dose-time-death rate of zebrafish larvae

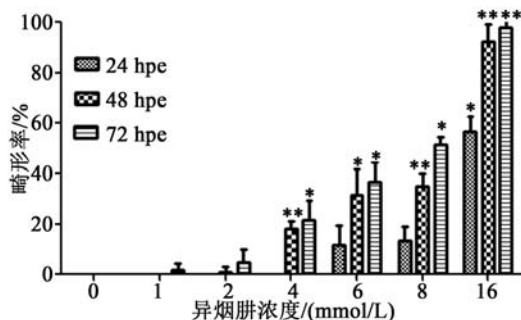
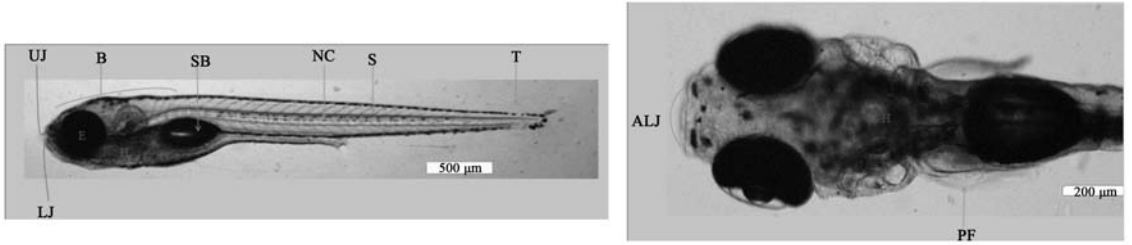


图 2 INH 对斑马鱼幼鱼剂量-时间-畸形率的影响。

Fig.2 Impact of INH on dose-time-malformation rate of zebrafish larvae

### 3.3 各暴露阶段的斑马鱼图像记录

显微镜下记录各个剂量、各个时间段 INH 对斑马鱼幼鱼形态的影响。正常发育斑马鱼幼鱼如图 3 所示,静止状态下,从头至尾呈现一条直线,各脏器形状完整,鱼鳃发育正常,体节清晰可见,色素沉淀均匀。



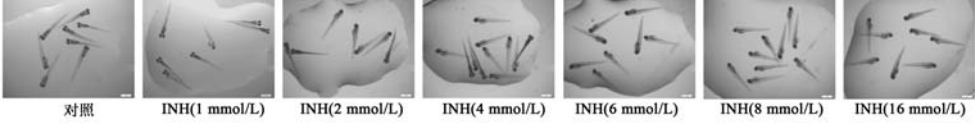
UJ 前颌; B 脑; SB 鱼鳃; NC 脊索; S 体节; T 尾; LJ 下颌; H 心脏; L 肝脏;  
ST 胃; Y 卵黄; I 肠; E 眼; ALJ 前端下颌; H 心脏; PF 胸鳍

图3 正常斑马鱼侧面和腹面形态图(5 dpf)。

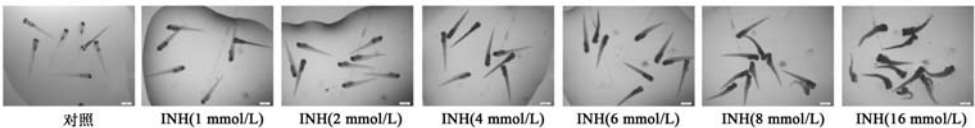
Fig.3 Lateral and ventral view of a normal 5 dpf zebrafish.

如图4所示,暴露至24 hpe时,与空白对照组相比,6、8、16 mmol/L组均出现畸形,表现大多为心包水肿、身体脊柱弯曲、尾部变形、身体侧倾和发育迟缓,且随着给药剂量增加,致畸作用更加明显。暴露至48 hpe时,对照组斑马鱼形态正常,游动活跃;较高浓度组( $\geq 6$  mmol/L)畸形现象加剧,斑马鱼较不活跃,多侧躺于培养板底部,尤其是16 mmol/L组斑马鱼不游动,沉于板底; $\geq 6$  mmol/L组幼鱼发育畸形主要表现为心腹水肿、鱼鳃未发育、体轴不对称、和脊柱弯曲严重,体长与对照组相比也较短。暴露至72 hpe时,对照组斑马鱼形态正常,游动活跃;2 mmol/L组也出现水肿现象,4 mmol/L组斑马鱼出现脊柱弯曲、水肿现象,鱼鳃缩小,16 mmol/L组甚至出现尾巴畸形、鱼唇和鳍不发育以及体节形成迟滞等,且随着给药剂量增加,斑马鱼身体扭曲程度加剧,心腹水肿加剧,见图5。

A 给药24 h后幼鱼发育形态图



B 给药48 h后幼鱼发育形态图



C 给药72 h后幼鱼发育形态图

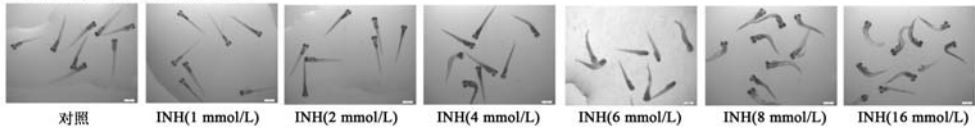


图4 INH对斑马鱼幼鱼发育形态学的影响

Fig.4 Impact of INH on morphology variation of zebrafish larvae

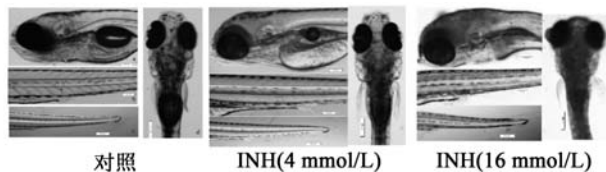


图5 暴露于不同浓度 INH 的斑马鱼幼鱼形态图(72 hpe)。

Fig.5 Morphology variation of zebrafish larvae exposed to different concentrations of isonizid (72 hpe)

### 3.4 INH对斑马鱼运动行为的影响

连续暴露 INH 3 d,实验记录斑马鱼幼鱼的行为轨迹,轨迹时间设定为 10 min。结果如图6所示,低剂量

(1~4 mmol/L)暴露组幼鱼与空白对照组幼鱼相比,自发运动轨迹无显著性差异。随着给药浓度的增加和给药时间的延长,高剂量组( $\geq 6$  mmol/L)幼鱼越来越不活泼,触壁反射活动减少,行为轨迹变短,说明高剂量INH组对斑马鱼幼鱼的运动行为有明显的抑制作用。

行为学实验研究参数包括每条鱼自发运动总距离,每组鱼平均自发运动总距离和平均速度,快速、中速、慢速运动次数以及快速、中速、慢速运动时间,自发运动参数分析(10 min)如图7所示。与空白对照组比,1 mmol/L组在暴露时间内,各研究参数无差异性,幼鱼运动活泼,主要以慢速和快速游动;2 mmol/L组主要以慢速游动,慢速运动时间和频率无差异性,中速运动时间和次数稍微减少;4 mmol/L组在给药48 h内行为学参数无差异性,在给药72 h时,运动总距离和平均速度、慢速运动速度和次数都有显著差异;6 mmol/L组在给药24 h内行为学参数无差异性,48 h、72 h时,运动参数出现差异性;高剂量组( $\geq 8$  mmol/L)低速运动,运动距离、运动时间和运动次数显著降低,说明幼鱼活动减少,行为受抑制。

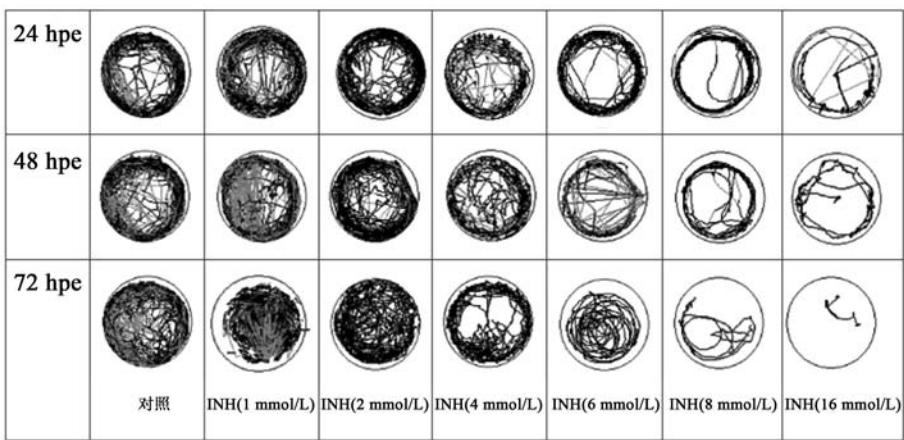


图 6 暴露于不同浓度 INH 的斑马鱼行为轨迹图

Fig.6 Behavior trajectory of zebrafish larvae exposed to different concentrations of isonizid.

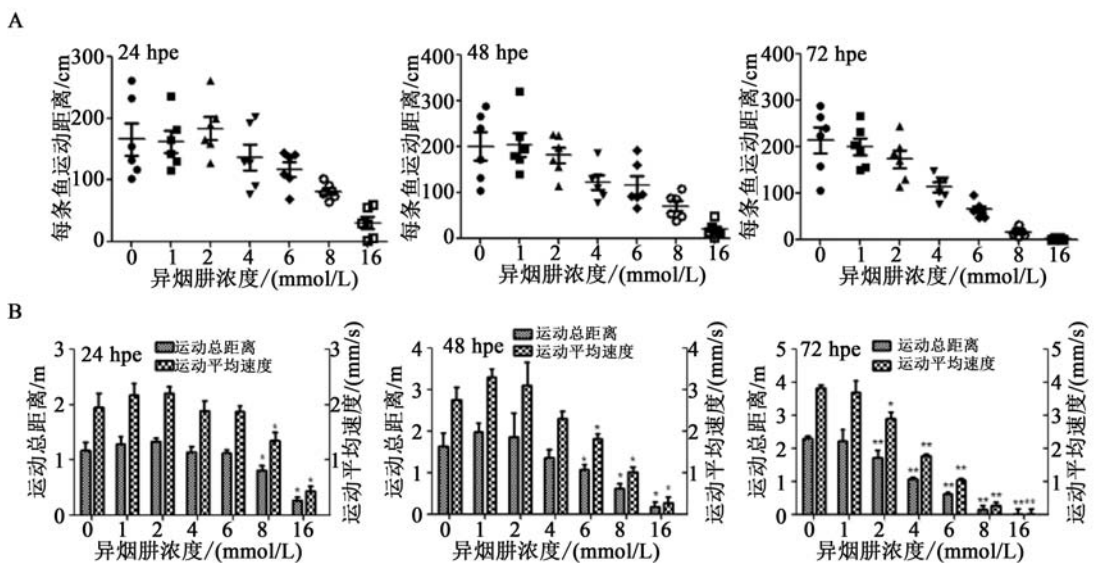


图 7-1 INH 对斑马鱼行为学的影响。

Fig.7-1 Impact of isonizid on the behavior of zebrafish larvae

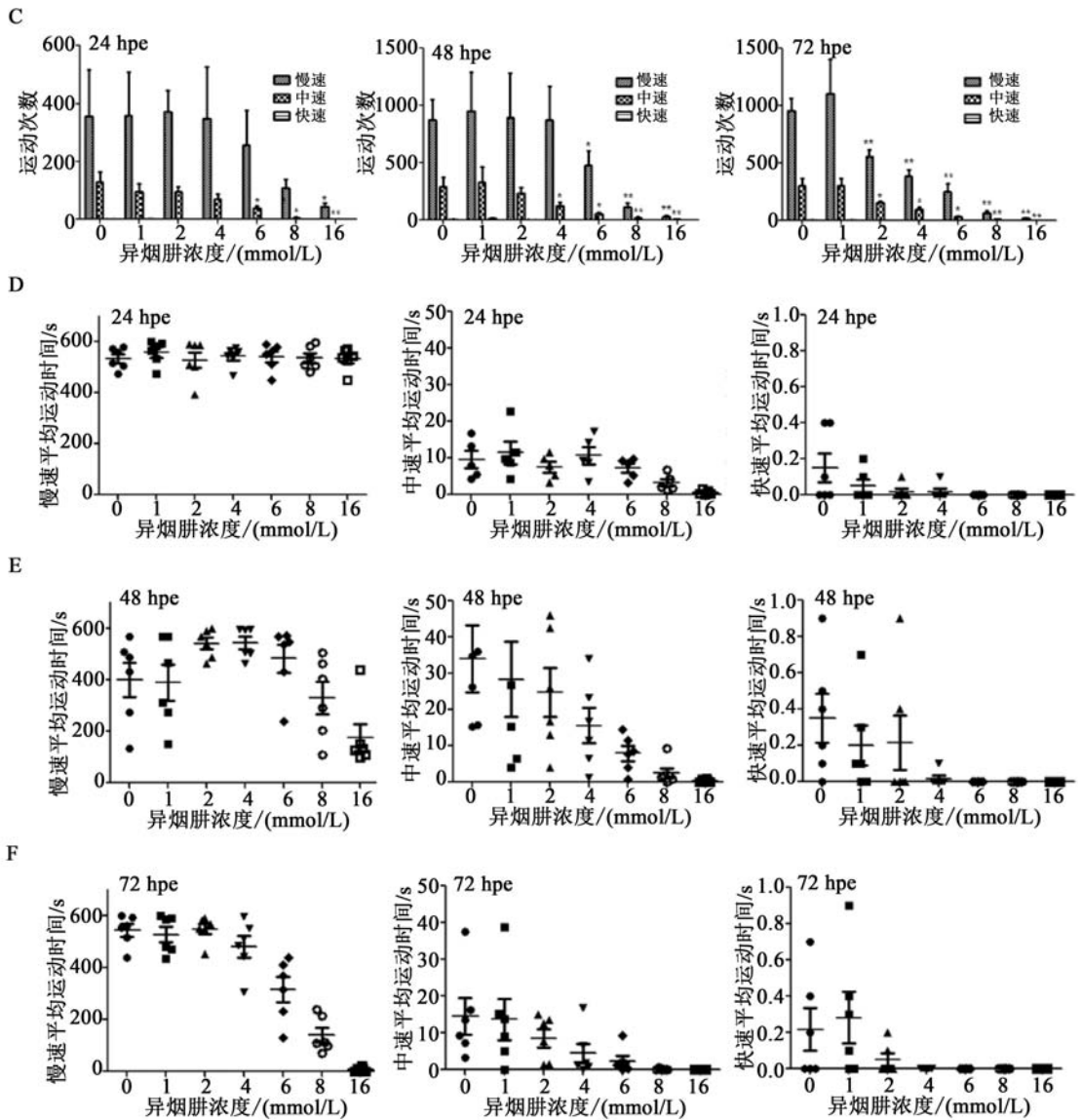


图 7-2 INH 对斑马鱼行为学的影响。

Fig.7-2 Impact of isonizid on the behavior of zebrafish larvae

## 4 讨论

INH 作为重要的一线抗结核药,对细胞内外的结核分枝杆菌都有显著的抑制作用,但是,在结核病的治疗过程中,患者易出现 INH 造成的不良反应或者耐药性,从而影响了结核病的治疗<sup>[13]</sup>。INH 的毒性作用机制至今尚不明确,有研究认为 INH 导致机体损伤的机理可能与线粒体氧化损伤有关,其代谢产物形成氧化应激反应,引起线粒体中的酶失活,造成线粒体损伤,进而影响细胞的正常能量代谢,造成细胞的大量凋亡,形成机体损伤<sup>[14]</sup>。

斑马鱼胚胎及其幼鱼用于研究药物的发育毒性具有独特优势,其具有体外受精、繁殖周期快、易于饲养和前期胚胎整体透明等优点<sup>[15-16]</sup>。斑马鱼幼鱼运动行为测定方便、快捷和经济,比起器官质变后病理学的检查,能更直观地反应幼鱼的行为状态和发育的健康程度,行为活动是评价药物毒性最敏感的指标<sup>[17-18]</sup>。

本实验采用不同浓度组 INH(0、1、2、4、6、8、16 mmol/L),对斑马鱼幼鱼持续暴露 72 h,并记录幼鱼的死亡率、畸形率和运动行为学轨迹。结果表明,本实验条件下,INH 的最大无毒性剂量为 2 mmol/L,低剂量(1~4 mmol/L)的 INH 对斑马鱼幼鱼发育毒性较低,随着给药剂量的增加和给药时间的延迟,幼鱼的死亡率

和畸形率呈现剂量和时间依赖性,造成脊柱弯曲和心腹水肿等多种毒性效应。本实验分析了 10 min 斑马鱼幼鱼行为轨迹,根据行为轨迹的运动速度划分为 3 个速度范围:低速( $<1.0$  cm/s)、中速( $1.0 \sim 6.0$  cm/s)和高速( $>6.0$  cm/s),结果发现,随着 INH 浓度的增高,斑马鱼幼鱼的运动轨迹、运动速度和运动次数逐渐减少,高剂量( $\geq 6$  mmol/L)INH 对斑马鱼幼鱼的运动行为有明显抑制作用。

目前,关于 INH 的发育毒性及其作用机制研究仍处于初步探索阶段。本研究初步探讨了 INH 对斑马鱼幼鱼发育和运动行为学的影响,为进一步阐明其发育毒性作用机制奠定了基础,为指导临床合理用药、促进其发挥疾病治疗作用起着重要作用。

## 参考文献:

- [1] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-508.
- [2] NEGIN J, ABIMBOLA S, MARAIS B J. Tuberculosis among older adults-time to take notice[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2015, 32: 135-137.
- [3] BERNARDES-GÉNISSON V, DERAËVE C, CHOLLET A, et al. Isoniazid: An update on the multiple mechanisms for a singular action[J]. Current medicinal chemistry, 2013, 20(35): 4370-4385.
- [4] COMSTOCK G W. How much isoniazid is needed for prevention of tuberculosis among immunocompetent adults? [J] The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2000, 4(5): 485-487.
- [5] WANG S F, LIU K C, WANG X M, et al. Toxic effects of celastrol on embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Drug and chemical toxicology, 2010, 34(1): 61-65.
- [6] ZHANG Q, CHENG J P, XIN Q. Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. Ecotoxicology, 2015, 24(4): 707-719.
- [7] HAENDEL M A, TILTON F, BAILEY G S, et al. Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish[J]. Toxicological Sciences, 2004, 81(2): 390-400.
- [8] 李月芳,陈季荣,王金锁. 海东市乐都区 2008—2012 年结核病患者治疗效果分析[J]. 医学动物防制, 2015, 31(4): 404-406.
- [9] 任晓菲,徐建明. 急性药物性肝损伤住院病例调研分析[J]. 安徽医学大学学报, 2007, 42(4): 458-461.
- [10] HASILOGLU Z I, ALBAYRAM S, ASIK M, et al. MRI findings of isoniazid-induced central nervous system toxicity in a child [J]. Clinical radiology, 2012, 67(9): 932-935.
- [11] 张云,吴媛,陈维云,等. 异烟肼对斑马鱼胚胎发育量-毒关系的研究[J]. 山东科学, 2015, 28(5): 14-21.
- [12] 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.
- [13] BOELSTERLI U A, LEE K K. Mechanisms of isoniazid-induced idiosyncratic liver injury: Emerging role of mitochondrial stress [J]. Journal of gastroenterology and hepatology, 2014, 29(4): 678-687.
- [14] 郭瑶雪,邓晔,李春,等. 异烟肼致线粒体损伤引起药物性肝损伤研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(3): 356-360.
- [15] 孙智慧,贾顺姬,孟安明. 斑马鱼:在生命科学中畅游[J]. 生命科学, 2006, 18(5): 431-436.
- [16] DESHMUKH V A, TARDIF V, LYSSIOTIS C A, et al. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis [J]. Nature, 2013, 502(7471): 327-332.
- [17] LIESCHKE G J, CURRIE P D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view [J]. Nature Reviews Genetics, 2007, 8(5): 353-367.
- [18] RIEHL R, KYZAR E, ALLAIN A, et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish[J]. Neurotoxicology and teratology, 2011, 33(6): 658-667.