

# 昆布多糖对氯化镉诱导斑马鱼骨骼发育毒性的改善作用

彭维兵<sup>1</sup>, 韩建<sup>1</sup>, 陈维云<sup>1</sup>, 周玲晓<sup>1,2</sup>, 王荣春<sup>1</sup>, 付先军<sup>2</sup>, 王振国<sup>2</sup>, 刘可春<sup>1\*</sup>

(1. 山东省科学院生物研究所, 山东省生物传感器重点实验室, 山东 济南 250014;

2. 山东中医药大学, 中医药经典理论教育部重点实验室, 山东 济南 250399)

**摘要:**探讨不同浓度的昆布多糖对氯化镉诱导的斑马鱼骨骼发育毒性的改善作用。选用发育正常的72 hpf 斑马鱼胚胎, 加入100  $\mu\text{g/L}$ 浓度的氯化镉, 同时加入不同浓度(25、50、100  $\mu\text{g/L}$ )的昆布多糖。3 d后, 用钙黄绿素进行染色2 h, 在体视荧光显微镜下观察斑马鱼骨骼发育的情况, 拍照并计算硬骨部分的荧光染色面积。结果显示, 不同浓度的昆布多糖溶液对氯化镉诱导的骨骼发育毒性均呈现出一定的改善作用, 且呈剂量依赖关系, 100  $\mu\text{g/L}$ 浓度的昆布多糖溶液对斑马鱼骨骼发育的改善作用最显著, 25  $\mu\text{g/L}$ 浓度作用最弱。研究结果表明, 昆布多糖对氯化镉诱导的斑马鱼骨骼发育毒性具有明显的改善作用。

**关键词:**斑马鱼; 骨骼发育; 氯化镉; 昆布多糖; 毒性

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-4026(2015)05-0022-05

## Recovery effect of laminarin on cadmium chloride induced developmental toxicity of zebrafish skeleton

PENG Wei-bing<sup>1</sup>, HAN Jian<sup>1</sup>, CHEN Wei-yun<sup>1</sup>, ZHOU Ling-xiao<sup>1,2</sup>,  
WANG Rong-chun<sup>1</sup>, FU Xian-jun<sup>2</sup>, WANG Zhen-guo<sup>2</sup>, LIU Ke-chun<sup>1\*</sup>

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensors, Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China;

2. Ministry of Education Key Laboratory of Classical Theory of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250399, China)

**Abstract:** We addressed recovery effect of different concentrations of laminarin on developmental toxicity of zebrafish skeleton induced by cadmium chloride. We selected 72 hpf normal growth zebrafish embryos, and added 100  $\mu\text{g/L}$  of cadmium chloride and 25, 50, 100  $\mu\text{g/L}$  of laminarin. Three days later, they were dyed for 2 h by calcein. We observed skeletal growth of zebrafish on microscope, and calculated the fluorescent staining area of hard bone. Results show that different concentrations of laminarin can all reduce the toxicity of zebrafish skeletal growth induced by cadmium chloride, and dose-dependent relation exists. Laminarin of 100  $\mu\text{g/L}$  has significant recovery effect, but the effect is the worst for laminarin of 25  $\mu\text{g/L}$ . This shows that laminarin has significant recovery effect on cadmium chloride induced zebrafish skeletal developmental toxicity.

**Key words:** zebrafish; skeletal growth; cadmium chloride; laminarin; toxicity

收稿日期: 2015-08-04

基金项目: 山东省科技发展计划(2013GHY11516)

作者简介: 彭维兵(1980-), 男, 博士, 研究方向为药物筛选与评价。Email: weibingpeng@hotmail.com

\* 通讯作者, 刘可春(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为药物筛选。Email: hliukch@sdas.org

随着工业化进程的加速和“镉大米”事件的发生,人们日益重视镉污染问题。镉可以从消化道进入人体,通过血液流向全身器官,在器官中大量积累,产生多系统、多器官的毒性损害。调查显示,镉暴露可增高孕妇早产的发生<sup>[1]</sup>,导致新生儿出生体重下降<sup>[2]</sup>。镉在体内积累会对神经、造血、生殖、运动和泌尿等系统的功能造成不同程度的毒害作用。其中镉对骨骼的毒害也很强,镉中毒者会出现慢性中毒症状以及严重的骨质疏松。长期食用含镉的食物会引起一种慢性中毒的骨痛病。Brzoska<sup>[3-5]</sup>等开展了老鼠饮水镉暴露实验,发现长期暴露 1 mg/L 镉就可以导致老鼠腰椎骨质疏松症、骨质软化、硬度降低和骨骼代谢异常等。

昆布(*Thallus Laminariae*)为海带科植物海带 *Laminaria japonica* Aresch. 或翅藻科植物黑昆布 *Ecklonia kurome* Okam. 的叶状体,始载于《名医别录》,具有软坚散结、利水泄热等功效<sup>[6-9]</sup>,是一种药用与食用价值兼具的海生资源。《嘉祐本草》记载昆布能去瘦行水、下气化痰<sup>[10]</sup>。现代研究发现,昆布含多种活性成分,主要为多糖、天然蛋白质、脂肪、纤维素、矿物质和核酸等,其药理作用很大程度上与其含有的多糖关系密切。因此有必要对昆布多糖进行多角度的研究,拓展昆布在食品开发和临床领域的应用。

近几年,在骨骼研究领域已成功建立了许多动物骨骼模型,但与其他动物模型相比,斑马鱼的胚胎和幼鱼身体透明,易于观察骨骼的发育,并且斑马鱼重要器官即使出现畸形也能存活很长时间<sup>[11]</sup>。斑马鱼和人类在骨骼发育过程中的基因、信号通路有高度同源性。目前斑马鱼已被用于骨骼发育及相关疾病机制的研究与治疗<sup>[12-15]</sup>。

本文充分利用斑马鱼模型的优势,研究昆布多糖对氯化镉导致的斑马鱼骨骼发育毒性的改善作用,为临床防治及改善重金属镉对骨骼发育造成的毒性提供了科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

SZX16 型体视荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);HPG-280BX 光照培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)斑马鱼养殖饲养设备,(北京爱生科技公司)。

### 1.2 试剂及药品

氯化镉(cadmium chloride, CdCl<sub>2</sub>), AR 99% (阿拉丁试剂(上海)有限公司)钙黄绿素(美国 SIGMA 公司)昆布多糖,批号:co4177, BR 99% (西亚试剂)甲基纤维素(Methyl cellulose)(上海生物科技有限公司)。其余试剂均为分析纯。

### 1.3 实验动物

普通 AB 系斑马鱼,由山东省科学院斑马鱼药物筛选平台提供,其养殖和培育参照 Westerfield 的方法<sup>[8]</sup>。

## 2 方法

### 2.1 收集胚胎

收集受精卵前 16 h,取健康性成熟的雌雄斑马鱼各两条放于交配缸内,次日 10 时左右收集受精卵。收集后,移入 0.5% 亚甲基蓝溶液中(胚胎培养用水配制),清洗消毒胚胎,几分钟后将移入清洁的胚胎培养用水中,备用。

### 2.2 昆布多糖对氯化镉导致的斑马鱼骨骼发育毒性的改善作用

#### 2.2.1 氯化镉对斑马鱼骨骼发育的影响

取受精 3 d 的正常斑马鱼胚胎,放入 24 孔培养板中,根据急性毒性的实验结果,分别加入终浓度为 100、50、25、12.5、5 μg/L 的氯化镉,每个浓度 3 个孔,每个孔 10 个胚胎,并用胚胎水作空白对照组。放置于 28 °C 恒温光照培养箱中继续培养。3 d 后用钙黄绿素(0.2%)染色并在 SZX16 型体视荧光显微镜下观察斑马鱼骨骼发育的情况,拍照并计算硬骨部分的荧光染色面积。

#### 2.2.2 昆布多糖改善氯化镉诱导斑马鱼骨骼发育毒性的作用

选用受精3 d的正常斑马鱼胚胎,放入24孔培养板,加入浓度为100  $\mu\text{g/L}$ 的氯化镉溶液和不同浓度(25、50、100  $\mu\text{g/L}$ )的昆布多糖溶液;同时设立氯化镉对照组(100  $\mu\text{g/L}$ ),每个浓度3个孔,每个孔10个胚胎。3 d后,用钙黄绿素(0.2%)对昆布多糖干预的斑马鱼进行染色,按照2.2.1中的方法评价昆布多糖对氯化镉导致的斑马鱼骨骼发育毒性的改善作用。

### 3 数据处理

利用数据统计分析软件(SPSS17.0)处理实验数据,分析受试物组与对照组的差异性, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 4 实验结果

### 4.1 氯化镉对斑马鱼骨骼发育的毒性作用

结果显示,不同浓度的氯化镉溶液对斑马鱼骨骼的发育均呈现出一定的抑制作用,如图1所示。且低浓度5  $\mu\text{g/L}$ 到高浓度100  $\mu\text{g/L}$ 呈骨骼发育毒性的剂量依赖性关系,其中100  $\mu\text{g/L}$ 高剂量组与正常组相比,具有显著性差异(图2),本实验100  $\mu\text{g/L}$ 浓度的氯化镉对斑马鱼骨骼发育的毒性最强。

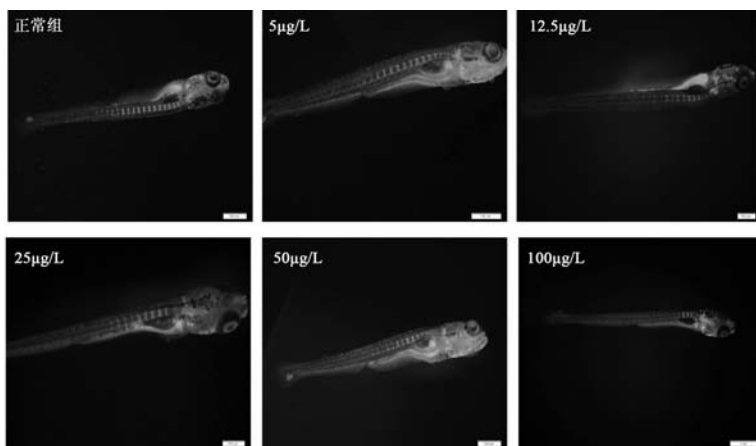
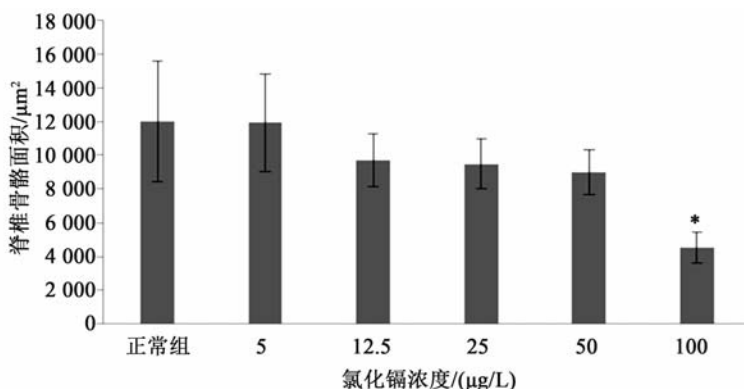


图1 不同浓度的氯化镉对斑马鱼椎骨发育的影响

Fig. 1 Impact of different concentrations of  $\text{CdCl}_2$  on vertebrae growth of zebrafish



注:与正常组相比 \* $P < 0.05$ 。

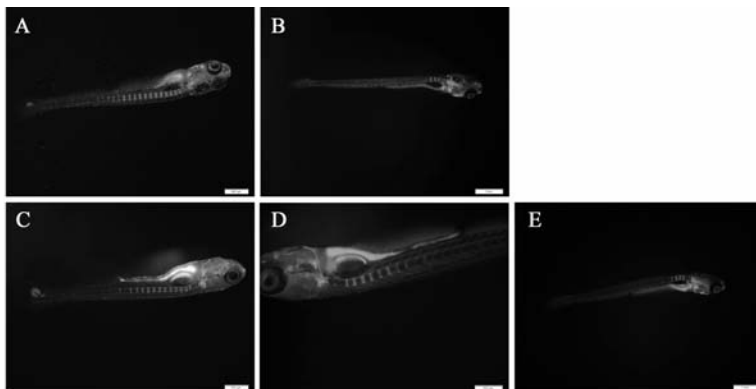
图2 不同浓度的氯化镉对斑马鱼脊椎骨面积的影响

Fig. 2 Impact of different concentrations of  $\text{CdCl}_2$  on Spinal bone area of zebrafish

### 4.2 昆布多糖改善氯化镉诱导斑马鱼骨骼发育毒性的作用

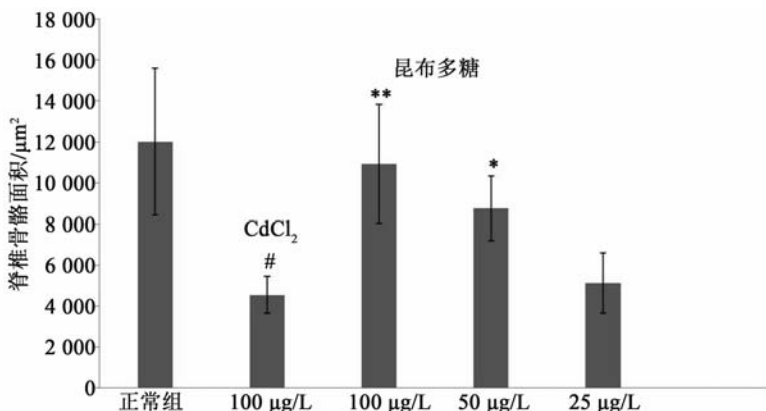
实验结果显示,昆布多糖对氯化镉诱导的斑马鱼骨骼发育毒性均有不同程度的改善作用,且呈现一定的剂量依赖关系,100  $\mu\text{g/L}$ 浓度的昆布多糖溶液对斑马鱼骨骼发育的改善作用最显著,25  $\mu\text{g/L}$ 浓度时作用最

弱,如图 3 所示。图 4 显示,与正常组比较,氯化镉组具有显著性差异;与氯化镉组相比,昆布多糖组在 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  时,具有极显著性差异,50  $\mu\text{g}/\text{L}$  的昆布多糖具有显著性差异。



A 正常对照组 B 氯化镉 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  C 昆布多糖 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  + 氯化镉 100  $\mu\text{g}/\text{L}$   
 D 昆布多糖 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  + 氯化镉 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  E 昆布多糖 25  $\mu\text{g}/\text{L}$  + 氯化镉 100  $\mu\text{g}/\text{L}$   
 图 3 不同浓度的昆布多糖改善氯化镉诱导斑马鱼椎骨发育毒性的作用

Fig. 3 Effect of different concentrations of laminarin on  $\text{CdCl}_2$  induced growth toxicity reduction of zebrafish vertebrae



注:与正常组相比# $P < 0.05$ ;与加入氯化镉组相比\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ 。

图 4 不同浓度的昆布多糖改善氯化镉诱导的斑马鱼脊椎骨骼面积的作用

Fig. 4 Impact of different concentrations of laminarin on  $\text{CdCl}_2$  induced spinal bone area recovery

## 5 讨论

斑马鱼骨骼检测常用的方法是组织染色,染色方法包括活体荧光染色和固定染色。斑马鱼幼鱼身体透明,经过 10 ~ 15 min 荧光染色后即可观察早期发育的骨骼,因此我们选择活体荧光染色。常用的荧光染色试剂有茜素红、钙黄绿素,钙黄绿素染液既可以对幼鱼也可以对成鱼染色。为了更好地研究骨骼发育影响,我们采用钙黄绿素对斑马鱼骨骼进行染色,并在实验过程中对染色方法进行了优化。

本研究采用模式生物斑马鱼,研究昆布多糖对氯化镉导致的斑马鱼骨骼发育毒性的改善作用。研究结果显示,不同浓度的的昆布多糖对氯化镉导致的斑马鱼骨骼发育毒性均有不同程度的可逆性/改善作用,该作用与剂量呈正相关,100  $\mu\text{g}/\text{L}$  的浓度改善斑马鱼骨骼发育的作用最显著,但其作用机制目前尚不清楚,有待后续进一步研究。

我国具有丰富的中药资源,在中医药理论指导下,利用现代医学的先进技术,研制调整机体整体功能、治疗骨骼发育疾病的中药单体制剂或复方合剂已成为一种趋势。因此,相关领域研究者应加强中药基础研究,从分子生物学和细胞生物学的角度,研究中药的作用机制,并使基础研究与临床研究相结合,以期开发安全

高效、物美价廉的改善骨骼发育毒性的新药。

### 参考文献:

- [1] NISHIJO M, NAKAGAWA H, HONDA R, et al. Effects of maternal exposure to cadmium on pregnancy outcome and breast milk [J]. *Occup Environ Med*, 2002, 59( 6 ) : 394 – 397.
- [2] ZHAI Q Z, LI X L, YANG Y Z, et al. Antitumor activity of a polysaccharide fraction from *Laminaria japonica* on U14 cervical carcinoma-bearing mice [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(1) : 117 – 122.
- [3] BRZÓSKA M M, MONIUSZKO-JAKONIUK J. Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: studies on a rat model of human environmental exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 82:468 – 477.
- [4] BRZÓSKA M M, MONIUSZKO-JAKONIUK J. Low-level lifetime exposure to cadmium decreases skeletal mineralization and enhances bone loss in aged rats [J]. *Bone*, 2004, 35(5) : 1180 – 1191.
- [5] LI J, WANG S Y, YANG X M, et al. Effect of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* on vascular endothelial cells in psychological stress rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 151 ( 1 ) : 601 – 608.
- [6] MAKARENKOVA I D, SEMENOVA I B, AKHMATOVA N K, et al. Effect of sulfated polysaccharides from brown algae on proliferative and cytotoxic activity of mice splenocytes [J]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 2012 ( 6 ) : 68 – 75.
- [7] SALPIETRO C D, GANGEMI S, MINCIULLO P L, et al. Cadmium concentration in maternal and cord blood and infant birth weight: a study on healthy non-smoking women [J]. *J Perin at Med*, 2002, 30( 5 ) : 395 – 399.
- [8] LI X D, YU Z Q, LONG S H, et al. Hypoglycemic effect of *Laminaria japonica* polysaccharide in a type 2 diabetes mellitus mouse model [J/OL]. *ISRN Endocrinol*, 2012, 507462. <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/507462/>.
- [9] ZENG F, ZHAO C, PANG J, et al. Chemical properties of a polysaccharide purified from solid-state fermentation of *auricularia auricular* and its biological activity as a hypolipidemic agent [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78 ( 9 ) : 1470 – 1475.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2000 年版一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 168.
- [11] JURKOVIC N, KOLB N, COLIC I. Nutritive value of marine algae *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida* [ J ] . *Food/ Nahrung*, 1995, 39(1) : 63 – 66.
- [12] 鞠黎. 胚胎期多氯联苯暴露对斑马鱼骨骼发育的影响 [D]. 南京: 南京医科大学, 2012.
- [13] 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 – 280.
- [14] SICCARDI A J III, PADGETT-VASQUEZ S, GARRIS H W, et al. Dietary strontium increases bone mineral density in intact zebrafish ( *Danio rerio* ) : a potential model system for bone research [J]. *Zebrafish*, 2010, 7(3) : 267 – 273.
- [15] JOBGEN W S, JOBGEN S C, LI H, et al. Analysis of nitrite and nitrate biological samples using high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 851(1/2) : 71 – 82.