

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)02-0144-08
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.02.030



斑马鱼模型在药源性肾损伤评价中的应用与展望*

陈长贤¹, 陈美琳¹, 蔡建峰¹, 杨真真¹, 于雪², 张淑静², 陶晓宇³, 陈林珍³, 王璇³, 戴胜云⁴,
李芝奇³, 陆珊³, 吴嘉瑞², 林瑞超³, 赵崇军^{3Δ}

(1. 福建省泉州市正骨医院, 福建 泉州 362000; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 3. 北京中医药大学中药品质评价北京市重点实验室, 北京 102488; 4. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要:目的 分析斑马鱼模型在药源性肾损伤评价中的应用价值。方法 检索 PubMed、Web of Science、中国知网(CNKI)数据库中斑马鱼模型在药物及化学品诱导肾毒性研究中的文献,检索时限为各数据库自建库起至2023年12月31日,归纳其方法学、评价指标、毒性机制及在中医药评价中的具体实践,展望其在新领域的应用潜力。结果 斑马鱼因与人类高度的遗传与生理相似性、早期胚胎透明、繁殖快速等特点,在肾毒性评价中展现出独特优势,可作为补充模型。斑马鱼模型肾损伤评价指标包括表型和组织病理形态学指标、滤过功能相关指标、细胞生物学过程和生化指标、肾损伤细胞标志物,涵盖从整体表型到分子标志物的多层次检测体系。化学品诱导斑马鱼模型肾毒性的主要机制包括细胞凋亡、细胞死亡、纤维化、炎症反应、氧化应激等。该模型已成功应用于马兜铃酸等中药毒性物质的评价及大黄酸、大豆苷等潜在肾保护成分的筛选,但未来仍需进一步明确斑马鱼模型在化学品毒性筛选中的地位,考察其对药物毒性动力学、实验操作及结果评价的重现性和标准,并加快高端配套设备的研发。结论 斑马鱼模型可作为衔接体外筛选与哺乳动物体内实验、进行药物肾毒性快速评价与机制研究的一种重要补充模型,且在复杂的中医药体系安全性评价中具有潜力。

关键词: 斑马鱼模型; 肾毒性; 药源性肾损伤; 药物安全性评价; 动物模型

Application and Prospect of Zebrafish Model in the Evaluation of Drug - Induced Renal Injury

CHEN Changxian¹, CHEN Meilin¹, CAI Jianfeng¹, YANG Zhenzhen¹, YU Xue², ZHANG Shujing², TAO Xiaoyu³, CHEN Linzhen³,
WANG Xuan³, DAI Shengyun⁴, LI Zhiqi³, LU Shan³, WU Jiarui², LIN Ruichao³, ZHAO Chongjun^{3Δ}

(1. Quanzhou Orthopedic - Traumatological Hospital, Quanzhou, Fujian 362000, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 3. Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 4. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: Objective To analyze the application value of the zebrafish model in the evaluation of drug - induced renal injury. **Methods** Relevant literatures on the application of zebrafish model in the study of drug - and chemical - induced renal toxicity were retrieved from PubMed, Web of Science and CNKI databases, with the retrieval time limit ranging from the establishment of each database to December 31, 2023. The methodology, evaluation indicators indicators, toxicity mechanism and specific practice in the evaluation of traditional Chinese medicine (TCM) were summarized, and the application potential of this model in new fields was prospected. **Results** Due to the characteristics of high genetic and physiological similarity to humans, transparent early embryos and rapid reproduction, the zebrafish model shows unique advantages in renal toxicity evaluation and can be used as a complementary model. The evaluation indicators indicators for renal injury in the zebrafish model include phenotype and histopathological morphological, filtration function - related indicators, cellular biological processes and biochemical indicators, as well as renal injury biomarkers, covering a multi - level detection system from overall phenotype to molecular markers. The main mechanisms of chemical - induced renal toxicity in the zebrafish model include apoptosis, cell death, fibrosis, inflammatory response and oxidative stress. This model has been successfully applied to the evaluation of nephrotoxic substances in TCM such as aristolochic acid, and the screening of potential nephroprotective components such as rhein and daidzin. However, it is necessary to further clarify the status of the zebrafish model in chemical toxicity screening, investigate the reproducibility and standards of its application in drug toxicokinetics, experimental operation and result evaluation, and accelerate the research and development of high - end supporting equipment in the future. **Conclusion** The zebrafish model can serve as an important complementary model connecting *in vitro* screening and mammalian *in vivo* experiments for rapid evaluation of drug - induced renal toxicity and mechanism research, and it has great potential in the safety evaluation of complex TCM systems.

Key words: zebrafish model; renal toxicity; drug - induced renal injury; drug safety evaluation; animal model

*基金项目:福建省泉州市科技计划项目[2022C026R]。

第一作者:陈长贤,男,硕士,副主任医师,研究方向为中医骨伤科学,(电子信箱)ccx6070@qq.com。

Δ通信作者:赵崇军,男,博士,助理研究员,研究方向为中药品质评价与安全性,(电子信箱)1014256537@qq.com。

肾脏是机体中维持体液平衡和废物排泄的重要器官,也是中草药的重要靶器官之一,而中药多途径、多靶点的特点,导致中药作用机制具有复杂性,目前的相关研究难以覆盖全面,仍需进一步探讨。药源性肾损伤的安全评价方法包括传统细胞模型(如永生化细胞系、人源原代肾近端小管细胞等)、动物模型等,但细胞模型无法完全模拟体内细胞环境及药物代谢过程,因此,体外细胞模型检测药物毒性的能力有限;动物模型实验结果稳定性较差,需进一步完善。药物、化学品的不当使用与肾损伤密切相关,因此,探寻可对人类接触样本进行快速安全筛选的新型可替代方法具有重要意义。在此背景下,斑马鱼作为一种新兴模式生物,在肾损伤评价中展现出独特价值^[1]。因其与人类生理系统的相似性及日益完善的组学研究数据,使其具备了用于器官发育和疾病模型研究的实验基础,可进一步应用于毒性药物的筛选,以及活性成分初步筛选的高通量实验,已成为药理学、毒理学研究中被广泛应用的新型动物模型。基于此,本研究中在文献回顾的基础上,归纳斑马鱼模型在化学品诱导的肾毒性和相关毒性模式研究中的方法、机制与应用,旨在为药源性肾损伤的安全性评价及中医药肾毒性研究提供模式参考。

1 肾损伤模型研究现状及斑马鱼模型的应用优势

流行病学证据表明,化学品与急/慢性肾病的发生和发展密切相关。在缺乏明确肾毒性提示的情况下,商业和日常化学品的大量使用已导致多起肾损伤事件的发生^[2-4]。一些含肾毒性成分的中草药也曾广泛用于多种疾病的治疗,甚至作为膳食补充剂使用,相关毒性事件暴发后引起全球重视,也促使多国对此类使用进行严格限制^[5-7]。然而在部分地区,这类中草药产品仍可合法流通,加之某些肾毒性物质在环境中稳定性高,可通过污染食品链等途径持续影响人类健康^[8-10],人类暴露于肾损伤物质的风险依然较高。

在肾损伤机制研究与毒性评价中,临床前模型发挥了重要作用。传统体外方法虽适用于高通量筛选,但其模拟体内复杂系统的能力有限;而基于啮齿类动物的体内实验则常因周期长、成本高、伦理约束及种属差异等问题,难以完全满足大规模肾毒性筛查及转化医学的需求^[11-12]。近年来,随着动物实验“3R”原则的推行,发展替代检测方法已成为趋势,类器官、多种动物急性肾损伤(AKI)模型等也取得一定进展,但仍存在各自的系统局限性,影响其对临床疗效预测的可靠性^[13]。

斑马鱼基因组与人类高度同源,约71%的基因相似,且肾脏发育和功能保守,其前肾在受精后约48 h开始形成,具备与人类相似的肾小球滤过和肾小管重吸收功能^[14-15]。得益于胚胎透明、发育快速的特点,斑马

鱼幼体的肾脏结构易于在体观察,为化学品肾毒性的快速评估提供了便利^[16]。成年斑马鱼的中肾结构更复杂,更适用于机制研究,其肾损伤相关通路(如细胞凋亡、氧化应激、炎症反应)与哺乳动物高度相似^[17-20],且具有体型小、繁殖快,便于遗传操作和高通量分析等优势,已在新药靶点发现与毒性筛选中得到应用^[21]。

值得关注的是,斑马鱼在揭示肾损伤分子机制方面也具有潜力。有研究发现,高温诱导的氧化应激可引起Yap1突变体斑马鱼出现肾小管纤毛紊乱与肾小球水肿,提示Yap1通过调控下游靶基因如肌红蛋白(MB)参与抗氧化应激应答,该机制在小鼠模型中也得到验证^[22]。这表明斑马鱼不仅能用于表型筛查,也可为深入解析保守的毒性通路提供依据。

总体而言,随着对替代测试方法需求的增加,斑马鱼模型被认为是一种能快速、可靠筛选肾毒性化合物并探讨其机制的补充模型,可为现有体外与体内体系提供重要的生物学信息,促进对药物及化学品肾损伤机制的全面理解。

2 斑马鱼模型的肾损伤评价指标

2.1 表型和组织病理形态

斑马鱼因小体积、光学透明性等特性,能满足直接在体观察评价的要求,用于肾毒性评价优势明显。斑马鱼肾脏的表型变化,包括肾小球、前肾小管和导管的变化及肾水肿的出现,已被普遍纳入肾损伤的评价指标^[23-24]。此外,斑马鱼早期活体胚胎中不同发育阶段的可视化极大地提高了对细胞阶段时间和空间相关的认识和理解,可用于各种高通量成像技术分析。

此外,通过转基因技术和高端影像观察技术对特定组织进行荧光标记的转基因斑马鱼进行观察已被广泛用于解释肾脏不同部分的表型变化。例如,在Tg[wt1b:绿色荧光蛋白(GFP)]斑马鱼模型中,用绿色荧光或GFP标记肾小球、前肾小管和导管,于早期阶段就能快速、直接观察肾脏结构的变化。目前,通过斑马鱼模型自身优势与新型自动化成像系统的有效结合,能对器官进行详细的、非侵入性的可视化观察,并有望联合探讨生成适用于评估亚急性至慢性毒理学效应的方法^[25]。除用于组织不良反应的形态学评估外,斑马鱼转基因品系允许通过荧光激活细胞分选及标记细胞的特性,有助于分离荧光标记的器官或靶细胞群,进而可对靶细胞进行特异性分析,包括单细胞基因表达分析。在此基础上,有研究重点建立了仅在特定条件下诱导荧光表达的转基因斑马鱼系,如在苦碱水污染物^[26-27]或CYP酶抑制剂^[28]诱导的荧光表达品系,能为基于靶标物质的器官毒性评价提供一种更有参考性的方法。

同时,组织病理形态学观察是药物脏器损伤的“金

标准”。目前,传统的染色或免疫组化染色也能用于评价药物对斑马鱼肾小球、小管或导管特异性组织病理形态学改变的影响,甚至将其作为化学品肾毒性的标志物,如肾小球中足细胞囊肿形成和组织学改变^[29];肾小管中的血液蓄积、扩张的管腔、溶酶体磷脂沉积以及其他肾小管、囊肿和间充质细胞异常或形状紊乱也可作为斑马鱼肾损伤的直接指征^[30]。

2.2 滤过功能

肾小球滤过是肾脏的重要功能,目前可通过直接法和间接法测定斑马鱼肾脏的过滤功能,进而评估肾脏功能损伤。直接法是将标记物微注射入斑马鱼幼鱼循环系统中,并通过荧光显微镜来实时观察和量化肾脏标志物(如荧光标记右旋糖酐或菊粉)的清除率^[31-32],减小提示过滤功能受损^[33]。目前该方法已被证实与组织病理形态学结果一致,为嘌呤霉素、顺铂、庆大霉素和马兜铃诱导肾毒性提供了直接证据^[34-35]。而间接方法则主要基于斑马鱼暴露溶液中蛋白定量测定实现,正常状态下,尿液中排泄的过量蛋白质会被重新利用,而肾损伤状态下肾小球无法发挥过滤和维持循环中大分子的功能。然而,间接法的有效性可能受培养基潜在外部污染如饲料或排泄物影响。随着技术的发展,有研究尝试在转基因斑马鱼中检测特定的GFP,如检测蛋白尿和维生素的间接示踪剂D-结合蛋白等^[36]。

2.3 细胞生物学过程和生化指标

在细胞水平,化学品暴露引起的明显肾毒性通常伴随着肾脏细胞凋亡或坏死。目前,吖啶橙染色(AO)和缺口末端标记(TUNEL)法检测是显示肾小球或肾小管细胞的凋亡的基本方法。此外,多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)的活化检测或细胞死亡检测试剂盒也常用于检测肾细胞凋亡。同时,一些常见的生物过程或生化指标的变化也可用于表明肾脏损伤。如氧化应激损伤过程中相关的抗氧化酶(如过氧化氢酶、谷胱甘肽转移酶、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽过氧化物酶)及活性氧变化均可进行指标量化,从而评价斑马鱼肾脏损伤。此外,脂质过氧化的副产物(如硫代巴比妥酸反应物质)也可作为氧化应激的生物标志物,研究表明,幼体斑马鱼模型中嘌呤、谷胱甘肽和氨基酸的代谢产物(如腺苷、肌酸、谷氨酰胺、谷胱甘肽、鸟苷、次黄嘌呤、酪氨酸、黄嘌呤等)均与药物暴露引起的肾小管损伤相关^[37]。

2.4 肾损伤细胞标志物

近些年,研究者对斑马鱼肾损伤过程相关的分子标志物进行了广泛研究,以期通过测定肾毒性相关基因的转录变化来筛选肾毒性机制和相关标志物。然而,许多标志物并非仅在肾脏中特异性表达,因此,通常还需通过免疫染色来定量评价离体肾组织中标志物的水

平,以反映肾毒性。此外,肾毒性外源物质同样影响斑马鱼肾脏正常发育和正常功能维持所需基因表达,如阿霉素的肾毒性作用与Wilms肿瘤蛋白(Wt1a)和Wt1b异常表达相关^[38];马兜铃酸(AA)、氯化镉和赭曲霉毒素A的肾毒性与钙黏附蛋白17(CDH17)基因下调相关^[39];庆大霉素的肾毒性与肾脏损伤分子(KIM-1)上调相关^[40]。不同化学品对肾脏损伤标志基因的调控类型和模式不同,提示这些标志基因调控的变化可能用于阐明或区分不同化学品的肾毒性模式;且成年斑马鱼肾脏组织更易被剥离和检测,因此,可同时测量其终点与胚胎幼鱼观察结果,以支持肾毒性的可能性^[41-42]。

目前,多数研究均通过观察斑马鱼肾脏表型变化的来快速筛选化学品的潜在肾毒性,但该方法较烦琐,耗费人力;已有研究开始尝试基于斑马鱼肾脏损伤表型、肾脏功能、生化指标和作用机制等指标综合进行肾损伤药物的大规模筛选,但目前对斑马鱼不同层次指标在肾损伤之间的联系及不同指标对临床药物研发和临床应用的意義尚缺乏系统评价。

3 化学品诱导斑马鱼肾毒性的主要机制

化学品诱导斑马鱼肾毒性的主要机制包括细胞凋亡、细胞死亡、纤维化、炎症、氧化应激等。这些机制已在多个生物组织水平包括基因、蛋白质和细胞中被提出或证明。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,是生物体维持的重要机制,同时也能导致急性和慢性毒性,细胞过度凋亡会导致细胞萎缩和肾脏纤维化,最终引起肾脏功能障碍。因此,细胞凋亡被认为是肾脏损伤的重要机制之一。成年雌性斑马鱼暴露于肾毒素微囊藻毒素60 d后会引发肾脏中肿瘤蛋白p53呈剂量依赖性增加,B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白降低,造成细胞凋亡调控因子Bcl-2相关X蛋白(Bax)/Bcl-2比值增加,进而导致细胞凋亡^[43]。肾脏细胞死亡可引起肾功能损失和肾脏损害,顺铂暴露能引起斑马鱼肾脏中细胞死亡标志物PARP修复酶和DNA损伤标志物异常表达^[17]。

炎症主要是由固有免疫细胞介导的一种正常生理过程,可清除受损或坏死细胞,异常时也会引起器官衰竭。因此,在肾脏中观察到的炎症相关指标如环氧合酶(COX-1、COX-2)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)等皆可提示化学品诱导的急性肾损伤。促炎标志物及其相关基因往往被用于评估斑马鱼胚胎的炎症反应,然而在斑马鱼幼鱼模型中,炎症标志物一般分布在斑马鱼整个身体区域,不能准确反映药物肾脏损伤的特异性^[44],因此,部分特定实验要求剖离成年斑马鱼的肾脏组织。

氧化应激、内质网应激和肾纤维化也可能是斑马鱼中一种重要的化学诱导肾毒性机制^[45-48]。氧化磷酸化是一个重要的生物过程,其能代谢影响细胞的活性、增殖、分化及凋亡,因此,当氧化磷酸化呼吸链中关键酶的表达发生异常,细胞代谢往往也发生紊乱,功能出现异常;COX、ATP酶为氧化磷酸化反应体系的2个重要环节,表达水平紊乱时,细胞能量代谢则出现异常,有研究证明,肾脏受损的斑马鱼模型体内COX5b、COX6b、ATP5m、ATP6v的基因表达水平大多呈显著的上升趋势^[49]。

虽然纤维化和内质网应激是肾毒性发生的常见表现,但目前尚无研究明确指出斑马鱼肾脏内质网应激和纤维化与肾损伤相关,原因可能为目前尚无研究对该生物过程进行系统描述。

化学品诱导斑马鱼模型肾毒性相关机制见图1。

4 斑马鱼肾损伤模型在中医药评价中的应用

近年来,随着中药的多元化使用,中药药源性肾损伤的病例逐年增加。临床使用的肾毒性药物可通过一种或多种机制导致不同程度的肾损伤,且多以慢性肾衰竭为终点,而此时患者的生命质量已明显降低。为此,建立一种快速的中药肾毒性检验体系具有重要意义。

目前,斑马鱼模型主要用于AA诱发的肾损伤评价及相关治疗药物的筛选。王雪等^[50]研究发现,斑马鱼模型暴露于AA中会引起眼周水肿,并表现出肾小球囊性膨胀、前肾管囊性扩张等肾组织结构的形态异常改变,分子水平上,AA组斑马鱼胚胎肾小球足细胞膜上跨膜蛋白Nephrin的表达水平较对照组显著降低($P < 0.01$)。

基于斑马鱼的高灵敏度,有研究探讨AA与马兜铃酸内酰胺对模型斑马鱼肾毒性药物筛选的适用性,结果马兜铃酸内酰胺对斑马鱼胚胎有更强的致畸和致死毒性,且呈一定时间和剂量依赖性,证明了斑马鱼模型评价药物肾毒性的可行性^[51]。

同时,为应对临床出现的药物性肾损伤,有研究尝试对中药及其中具有潜在保护作用的活性成分进行筛选,发现知柏地黄丸可减轻AA诱导的斑马鱼模型肾脏畸形,而该保护作用主要是通过降低TNF- α 和髓过氧化物酶(MPO)表达水平来实现的^[52]。此外,中草药中广泛存在的大豆苷能缓解庆大霉素对斑马鱼的肾损伤状态,改善肾脏组织结构的损伤程度,抑制氧化应激标志物(如超氧化物歧化酶和谷胱甘肽还原酶)水平,而促进脂质过氧化、一氧化氮和炎症细胞因子(如COX-2、TNF- α 和IL-1 β)及相关基因的上调。这些结果表明,大豆苷可能通过抑制促炎细胞因子和其抗氧化特性来预防斑马鱼肾毒性^[53]。与此相似,大黄酸能降低AA诱导肾损伤斑马鱼模型中肌酐的含量,下调COX-2A的表达水平,进而发挥肾脏保护作用^[54]。此外,小檗碱和AA在一定条件下能够通过自组装形成的超分子结构阻断AA的体内代谢水平,保护机体肠道菌群的稳态,进而显著降低斑马鱼AKI发生率^[55]。

然而,中药复方通常是多成分、多靶点、多途径及相互作用而产生疗效,其成分较化学品更复杂^[56],因此,已有研究在斑马鱼模型中引入同样具有“高通量”特点的转录组学等技术,探讨AA类成分对斑马鱼体内转录代谢水平的影响,弥补以斑马鱼进行评价时存在

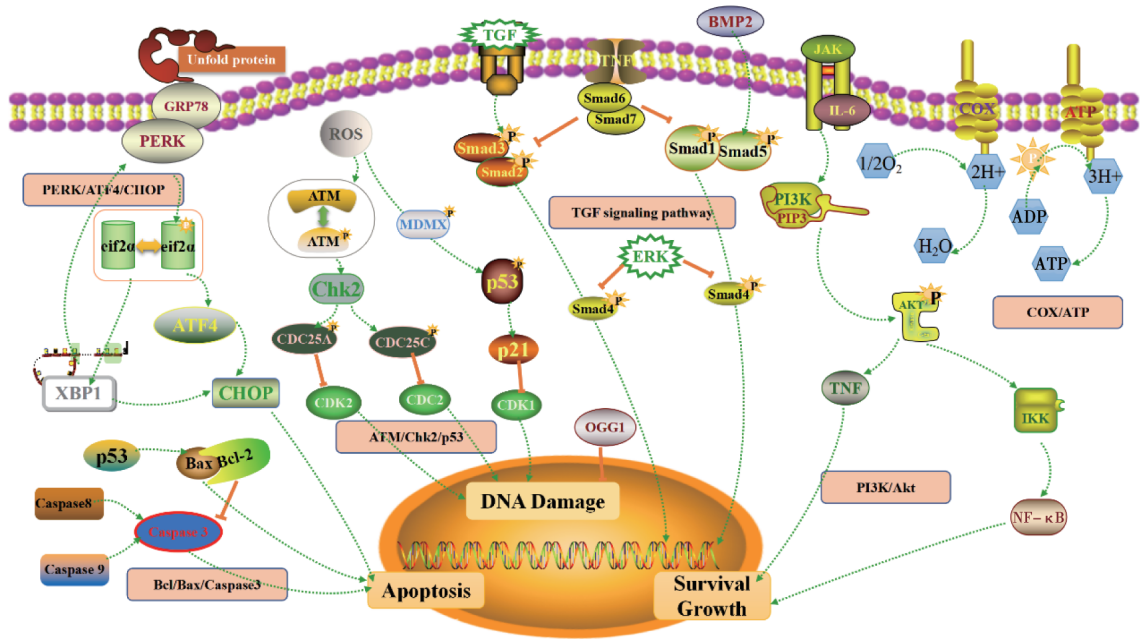


图1 化学品诱导斑马鱼肾毒性的相关机制

Fig.1 Related - mechanisms of chemical - induced nephrotoxicity in zebrafish

的一定局限性^[49]。

5 总结与展望

5.1 总结

斑马鱼作为实验模型前景广阔,在研究化学品致肾脏损伤方面显示了巨大的实用性和优势,包括斑马鱼幼鱼模型可提供高效、快速的肾毒性化学品筛查,成年斑马鱼模型可用于测量肾损伤特异性标志物,确定化学品肾毒性机制。然而,目前斑马鱼模型在药物肾毒性评估中仍处于起步阶段,其如何与新型的评价技术、测量方法、统计分析、高端实验设置技术的融合,建立先进的标准化方法,对基于斑马鱼模型的毒理学筛选有重大影响,未来可促进跨物种的比较研究和确定基本的分子机制,进一步促进斑马鱼替代毒理学模型的完善^[57]。

5.2 研究方向展望

明确斑马鱼模型在化学品毒性筛选中的地位:目前斑马鱼模型进行毒性测试参照的是国际公认的经济合作与发展组织(OECD)指南来评估鱼类的全身毒性,即采用鱼类急性毒性测试的化学品测试(OECD 203)和鱼类胚胎急性毒性测试(OECD 236)^[58]。此规定允许在鱼的生命早期阶段进行毒理学实验,且不作为动物实验进行监管。即斑马鱼模型主要是作为其他脊椎动物如啮齿动物的补充替代模型,研究范围主要集中于发育和急性毒性作用,并不能完全取代传统动物模型。即便如此,在毒理学实验中都应严格执行“3R”原则,在研究中优先考虑使用如细胞培养、3D组织模型或类器官培养来替代使用动物,必要条件下可将斑马鱼幼鱼模型与体外模型联合使用,以引导临床前毒性试验中新药候选药物的鉴定和优化。总之,斑马鱼模型的使用是用于弥补传统体外模型和哺乳动物模型的空隙,以便研究者基于简单的实验设计和较少动物中获得更多的信息,且减少实验结果变异性。值得注意的是,将斑马鱼模型的观察结果外推或转化为人类临床结果前,应考虑斑马鱼与哺乳动物肾脏之间的结构差异、斑马鱼肾脏自我修复性等导致的功能差异,建议收集更多的证据将斑马鱼观察结果与哺乳动物潜在肾脏结局联系起来,必要时结合哺乳动物进行多层次验证。因此,在利用斑马鱼进行肾损伤评价之前,须考虑鱼类模型是否适合特定的科学假说和拟开展的试验。

考察斑马鱼模型对药物毒性动力学:基于斑马鱼模型进行化合物毒性评估的最终目的,是与传统模型结合建立准确的人类健康风险评估体系。建议研究者务必确认斑马鱼模型评估中使用剂量和浓度转化为人类使用剂量的参数值,详细了解潜在毒性化合物的代谢动力学。虽然斑马鱼与传统哺乳动物中代谢酶具有

一定的保守性,但不同器官之间代谢酶含量及其表达谱的时空差异性均可能影响药物的代谢过程^[28,59],如不同鱼龄段,生理障碍,表皮、胃肠道上皮层和血脑屏障对化合物吸收方式和吸收含量等^[60-64],导致外来化合物的体内吸收水平不同,进而可能引起相应的假阴性结果^[65-66]。因此,建议基于不同实验目的,采用现代分析技术,如通过液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法、荧光染料、放射或最新的基质辅助激光解吸/电离(MALDI)法对全身匀浆、血液等样本进行生物分析以考察、验证体内暴露结果^[67]。

实验操作与结果评价重现性和标准化:目前,斑马鱼模型肾损伤实验方案标准化缺乏和由此导致的实验数据可重复性差阻碍了斑马鱼模型毒性测试的广泛使用,因此,斑马鱼实验中的一些关键实验问题受到毒理学界广泛关注。传统的培养介质暴露给药过程中,首先需要明确实验中关键实验设置、pH和缓冲条件^[68]、胚胎培养基的种类、培养板规格^[69]、暴露条件(温度、照明)^[70]。此外,详细记录和比较胚胎和幼鱼繁殖情况的标准化数据,如正常状态下的孵化率和畸形率,成鱼稳定的维持条件如水质、光/暗循环、水箱大小、密度等、营养如摄食计划、时间、食物成分、健康水平如产卵率,确保实验结果的重现性和可靠性^[71-73]。常规方法为将斑马鱼饲养于实验室集中养殖系统。将斑马鱼成鱼放入产卵缸内,中间插入隔板分开雌雄,光周期开始半小时后收集鱼卵,将其用培养水冲洗3遍放入新培养水中,28.5℃相同光照条件下发育至受精后≤4d^[68-70]。关于毒性评价结果,建议尽快确立脏器损伤的“金指标”及程度分级数据。此外,为保证实验结果的准确性,研究者应选择特定的目标成分或多种肾损伤物质,评价斑马鱼模型在不同复杂化学环境中对肾损伤化合物的敏感性及其评价结果的准确性、可传递性^[74]。如有研究表明,四君子汤、六君子汤、参苓白术散作为临床常用复方,在一定条件下却能引起转基因斑马鱼系Tg(Wt1b:EGFP)的肾脏出现轻微缺陷^[75],而临床无相关复方的不良反应记录。提示须尽快建立基于临床肾损伤指标的斑马鱼模型肾损伤标准。

加快高端配套设备的研发:高产卵量是斑马鱼模型可用于毒理学筛选的最大优势,但大量斑马鱼胚胎和幼鱼日常加工和处理、实验数据获取及数据的定量分析是半/高通量毒理学筛选的瓶颈。虽然越来越多斑马鱼自动化处理系统和基于计算机的表型定量自动化系统如自动斑马鱼卵分选、自动去除绒毛膜、自动成像系统和自动显微注射逐步被用于斑马鱼毒理学研究^[76-78]。但是这些“定制化”技术在实验设置、测量参数和评分值等方面往往存在较大差异,故建议进一步

开发斑马鱼模型毒理学检测配套的设备和软件,以适用于评价参数快速确定,为评价结果的再现性和标准化提供可能。此外,建议将自动化技术与新一代的遗传、分子生物技术如单细胞转录测序结合,尽可能实现表型-器官-细胞-分子不同层次靶蛋白、基因特异性表达变化和细胞类型的定量分析^[79-80]。

参考文献

- [1] BIKBOV B, PERICO N, REMUZZI G. Disparities in Chronic Kidney Disease Prevalence among Males and Females in 195 Countries: Analysis of the Global Burden of Disease 2016 Study[J]. *Nephron*, 2018, 139(4): 313-318.
- [2] SHEELA S, JOSEPH TF, MARY JM, et al. Melamine and cyanuric acid exposure and kidney injury in US children[J]. *Environ Res*, 2019, 171: 18-23.
- [3] KANG H, LEE J, LEE JP, et al. Urinary metabolites of organophosphate esters (OPEs) are associated with chronic kidney disease in the general US population, NHANES 2013-2014[J]. *Environ Int*, 2019, 131: 105034.
- [4] KANG H, KIM S, CEE G, et al. Urinary metabolites of dibutyl phthalate and benzophenone-3 are potential chemical risk factors of chronic kidney function markers among healthy women[J]. *Environ Int*, 2019, 124: 354-360.
- [5] ZHANG HM, ZHAO XH, SUN ZH, et al. Recognition of the toxicity of aristolochic acid[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2018, 44(2): 157-162.
- [6] LIU SH, CHUANG WC, LAM W, et al. Safety surveillance of traditional Chinese medicine: current and future[J]. *Drug Saf*, 2015, 38(2): 117-128.
- [7] JADOT I, DECLÈVES AE, NORTIER J, et al. An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy: Update of the Literature[J]. *Int J Mol Sci*. 2017, 18(2): 297.
- [8] ABDULLAH R, DIAZ LN, WESSELING S, et al. Risk assessment of plant food supplements and other herbal products containing aristolochic acids using the margin of exposure (MOE) approach[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2017, 34(2): 135-144.
- [9] CHAN W, PAVLOVIĆ NM, LI WW, et al. Quantitation of Aristolochic Acids in Corn, Wheat Grain, and Soil Samples Collected in Serbia: Identifying a Novel Exposure Pathway in the Etiology of Balkan Endemic Nephropathy[J]. *J Agr Food Chem*, 2016, 64(29): 5928-5934.
- [10] CHAN CK, LIU YH, NIKOLA MP, et al. Aristolochic Acids: Newly Identified Exposure Pathways of this Class of Environmental and Food-Borne Contaminants and its Potential Link to Chronic Kidney Diseases[J]. *Toxics*, 2019, 7(1): 14.
- [11] 刘强强. 实验动物福利立法研究[D]. 天津: 天津大学, 2014.
- [12] 程树军. 《3R和仁慈准则》中文版出版[J]. *实验动物科学*, 2014, 31(2): 24.
- [13] HUKRIEDE NA, SORANNO DE, SANDER V, et al. Experimental models of acute kidney injury for translational research[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(5): 277-293.
- [14] HOWE K, CLARK MD, TORROJA CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(4): 498-503.
- [15] WESTHOFF JH, STEENBERGEN PJ, THOMAS LS, et al. *In vivo* high-content screening in zebrafish for developmental nephrotoxicity of approved drugs[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 583.
- [16] BAUER B, LIEDTKE D, JARZINA S, et al. Exploration of zebrafish larvae as an alternative whole-animal model for nephrotoxicity testing[J]. *Toxicol Lett*, 2021, 344: 69-81.
- [17] KIM MJ, MOON D, JUNG S, et al. Cisplatin nephrotoxicity is induced via poly (ADP-ribose) polymerase activation in adult zebrafish and mice[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2020, 318: R843-R854.
- [18] ZHANG HJ, SHEN LL, FANG WD, et al. Perfluorooctanoic acid induced immunotoxicity via NF- κ B pathway in zebrafish (*Danio rerio*) kidney[J]. *Fish Shellfish Immun*, 2021, 113(2): 9-19.
- [19] WANG ZK, LI GY, WU Q, et al. Microcystin-LR exposure induced nephrotoxicity by triggering apoptosis in female zebrafish[J]. *Chemosphere*, 2019, 214: 598-605.
- [20] LU PH, LEE HY, LIOU YL, et al. Nephroprotective role of zhibai dihuang wan in aristolochic acid-intoxicated zebrafish[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1-8.
- [21] PATTON EE, ZON LI, LANGENAU DM. Zebrafish disease models in drug discovery: From preclinical modelling to clinical trials[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 611-628.
- [22] 罗帅. Yap1调控珠蛋白应对斑马鱼前肾氧化应激的机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- [23] XIA ZS, HAO EW, WEI YT, et al. Genipin induces developmental toxicity through oxidative stress and apoptosis in zebrafish[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol*, 2021, 241(2): 108951.
- [24] ZHAO CJ, TIAN JH, WANG JF, et al. Zebrafish model for assessing induced organ toxicity by *Strychnos nux-vomica*[J]. *J Tradit Chin Med*, 2016, 36(4): 522-529.
- [25] KOTH J, MAGUIRE ML, MCCLYMONT D, et al. High-resolution magnetic resonance imaging of the regenerating adult zebrafish heart[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 2917.
- [26] JIA H, LUO KQ. Fluorescence resonance energy transfer-based sensor zebrafish for detecting toxic agents with single-cell sensitivity[J]. *J Hazard Mater*, 2021, 408: 124826.
- [27] MALEK A, BERA K, BISWAS S, et al. Development of a next-generation fluorescent turn-on sensor to simultaneously detect and detoxify mercury in living samples[J]. *Anal Chem*, 2019, 91: 3533-3538.

- [28] LOERRACHER AK, GRETHLEIN M, BRAUNBECK T. *In vivo* fluorescence – based characterization of cytochrome p450 activity during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 192: 110330.
- [29] SARKAR S, MUKHERJEE S, CHATTOPADHYAY A, et al. Differential modulation of cellular antioxidant status in zebrafish liver and kidney exposed to low dose arsenic trioxide [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2017, 135: 173 – 182.
- [30] KATO Y, TONOMURA Y, HANAFUSA H, et al. Adult zebrafish model for screening drug – induced kidney injury [J]. *Toxicol Sci*, 2020, 174: 241 – 253.
- [31] SHAO WH, ZHONG D, JIANG HW. et al. A new aminoglycoside etimicin shows low nephrotoxicity and ototoxicity in zebrafish embryos [J]. *J Appl Toxicol*, 2021, 41(7): 1063 – 1075.
- [32] STEENBERGEN PJ, HEIGWER J, PANDEY G, et al. A multiparametric assay platform for simultaneous *in vivo* assessment of pronephric morphology, renal function and heart rate in larval zebrafish [J]. *Cells*, 2020, 9: 1269.
- [33] ZHOU W, HILDEBRANDT F. Inducible podocyte injury and proteinuria in transgenic zebrafish [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23: 1039 – 1047.
- [34] HENTSCHEL DM, MENGEL M, BOEHME L, et al. Rapid screening of glomerular slit diaphragm integrity in larval zebrafish [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293: F1746 – F1750.
- [35] GORGULHO R, JACINTO R, LOPES SS. et al. Usefulness of zebrafish larvae to evaluate drug – induced functional and morphological renal tubular alterations [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92: 411 – 423.
- [36] WANG XX, GIUSTI A, NY A, et al. Nephrotoxic effects in zebrafish after prolonged exposure to aristolochic acid [J]. *Toxins*, 2020, 12: 217.
- [37] MORELLO J, DERKS RJ, LOPES SS, et al. Zebrafish larvae are a suitable model to investigate the metabolic phenotype of drug – induced renal tubular injury [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(2): 1193.
- [38] CHU S, KWON BR, LEE YM, et al. Effects of 2 – ethylhexyl – 4methoxycinnamate (EHMC) on thyroid hormones and genes associated with thyroid, neurotoxic, and nephrotoxic responses in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128176.
- [39] CHEN J, KONG A, SHELTON D, et al. Early life stage transient aristolochic acid exposure induces behavioral hyperactivity but not nephrotoxicity in larval zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 2021, 238(2): 105916.
- [40] YIN W, NAINI SM, CHEN G, et al. Mammalian target of rapamycin mediates kidney injury molecule 1 – dependent tubule injury in a surrogate model [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27: 1943 – 1957.
- [41] MORALES FÉNERO C, PADOVANI BN, DO AMARAL MA, et al. Acute Kidney Injury Model Induced by Cisplatin in Adult Zebrafish [J]. *J Vis Exp*, 2021, 171: e61575.
- [42] ZHAO Y, LIU YY, SUN J, et al. Acute toxic responses of embryo – larval zebrafish to zinc pyrithione (ZPT) reveal embryological and developmental toxicity [J]. *Chemosphere*, 2018, 205: 62 – 70.
- [43] WU Q, YAN W, LIU CS, et al. Co – exposure with titanium dioxide nanoparticles exacerbates MCLR – induced brain injury in zebrafish [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 693: 133540.
- [44] DING YJ, CHEN YH. Developmental nephrotoxicity of aristolochic acid in a zebrafish model [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 261(1): 59 – 65.
- [45] GURU A, SUDHAKARAN G, VELAYUTHAM M, et al. Daidzein normalized gentamicin – induced nephrotoxicity and associated pro – inflammatory cytokines in MDCK and zebrafish: Possible mechanism of nephroprotection [J]. *Comp Biochem Physiol, C Toxicol Pharmacol*, 2022, 258: 109364.
- [46] LI PC, LI XN, DU ZH, et al. Di (2 – ethyl hexyl) phthalate (DEHP) – induced kidney injury in quail (*Coturnix japonica*) via inhibiting HSF1 / HSF3 – dependent heat shock response [J]. *Chemosphere*, 2018, 209: 981 – 988.
- [47] TANG PWH, WU PH, LIN YT, et al. Zebrafish Model – Based Assessment of Indoxyl Sulfate – Induced Oxidative Stress and Its Impact on Renal and Cardiac Development [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 400.
- [48] ANGER EE, YU F, LI J. Aristolochic Acid – Induced Nephrotoxicity: Molecular Mechanisms and Potential Protective Approaches [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 1157.
- [49] CHEN ML, ZHAO CJ, LI ZQ, et al. Investigation of the applicability of the zebrafish model for the evaluation of aristolochic acid – related nephrotoxicity [J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155092.
- [50] 王雪, 刘可春, 王荣春, 等. 马兜铃酸对斑马鱼胚胎肾毒性作用 [J]. *动物学杂志*, 2015, 50(5): 773 – 779.
- [51] 刘杰, 张超文, 张蝶, 等. 马兜铃酸和马兜铃内酰胺对斑马鱼胚胎毒性的比较研究 [J]. *湖北理工学院学报*, 2018, 34(6): 58 – 63.
- [52] DING YJ, SUN CY, WEN CC, et al. Nephroprotective role of resveratrol and ursolic acid in aristolochic acid intoxicated zebrafish [J]. *Toxins*, 2015, 7(1): 97 – 109.
- [53] GURU A, SUDHAKARAN G, NAMASIVAYAM SKR, et al. Serine threonine – protein kinase – derived IW13 improves lipid metabolism via C / EBP – α / SREBP1 / FAS signaling pathways in hfd – induced zebrafish *in vivo* larval model [J].

- Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 195 (8) : 4851 – 4863.
- [54] 王 雪, 刘可春, 王希敏, 等. 大黄酸对马兜铃酸 A 引起的斑马鱼肾脏损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(3): 361 – 365.
- [55] WANG PL, GUO WB, HUANG GR, et al. Berberine – Based Heterogeneous Linear Supramolecules Neutralized the Acute Nephrotoxicity of Aristolochic Acid by the Self – Assembly Strategy [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13 (28) : 32729 – 32742.
- [56] 聂 斌. 中药复方药效物质及效应的偏最小二乘结构方程模型解析方法研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2024.
- [57] BAUER B, MALLY A, LIEDTKE D. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22: 24.
- [58] OECD. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test[EB/OL]. (2019 – 06 – 22) [2025 – 03 – 07]. <https://cdnmedia.eurofins.com/apac/media/10786/fish-acute-toxicity-test.pdf>.
- [59] SAAD M, MATHEEUSSEN A, BIJTTEBIER S, et al. *In vitro* cyp – mediated drug metabolism in the zebrafish (embryo) using human reference compounds[J]. Toxicol In Vitro, 2017, 42: 329 – 336.
- [60] PELKA KE, HENN K, KECK A, et al. Size does matter – determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. Aquat Toxicol, 2017, 185: 1 – 10.
- [61] KRISTOFKO LA, HADDAD SP, CHAMBLISS CK, et al. Differential uptake of and sensitivity to diphenhydramine in embryonic and larval zebrafish [J]. Environ Toxicol Chem, 2018, 37(2): 1175 – 1181.
- [62] SOUDER JP, GORELICK DA. Quantification of estradiol uptake in zebrafish embryos and larvae[J]. Toxicol Sci, 2017, 158: 465 – 474.
- [63] VAN POMEREN M, BRUN NR, PEIJNENBURG WJGM, et al. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano) particles in zebrafish embryos at different developmental stages[J]. Aquat Toxicol, 2017, 190: 40 – 45.
- [64] LI ZQ, TANG Y, LIU ZQ, et al. Hepatotoxicity induced by PP VI and PP VII in zebrafish were related to the Cholesterol disorder[J]. Phytomedicine, 2021, 95: 153787.
- [65] DACH K, YAGHOUBI B, SCHMUCK MR, et al. Teratological and behavioral screening of the national toxicology program 91 – compound library in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Toxicol Sci, 2019, 167: 77 – 91.
- [66] ALZUALDE A, BEHL M, SIPES NS, et al. Toxicity profiling of flame retardants in zebrafish embryos using a battery of assays for developmental toxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity toward human relevance[J]. Neurotoxicol Teratol, 2018, 70: 40 – 50.
- [67] VAN WIJK RC, KREKELS EHJ, KANTAE V, et al. Mechanistic and quantitative understanding of pharmacokinetics in zebrafish larvae through nanoscale blood sampling and metabolite modeling of paracetamol [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 371: 15 – 24.
- [68] ESCHER BI, ABAGYAN R, EMBRY M, et al. Recommendations for improving methods and models for aquatic hazard assessment of ionizable organic chemicals[J]. Environ Toxicol Chem, 2020, 39(3): 269 – 286.
- [69] DRIESSEN M, KIENHUIS AS, PENNING JLA, et al. Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling[J]. Toxicol, 2013, 87(5): 807 – 823.
- [70] DE SOUZA ANSELMO C, SARDELA VF, DE SOUSA VP, et al. Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2018, 212: 34 – 46.
- [71] ALESTRÖM P, D'ANGELO L, MIDTLYNG PJ, et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations [J]. Lab Anim, 2020, 54: 213 – 224.
- [72] SCHOLZ S, SELA E, BLAHA L, et al. A european perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2013, 67: 506 – 530.
- [73] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 等. 基于斑马鱼模型的吴茱萸提取物肝毒性评价[J]. 中草药, 2022, 53(6): 1768 – 1775.
- [74] WANG X, LIU KC, SUN GJ, et al. Evaluation of nephrotoxic effects of aristolochic acid on zebrafish (*Danio rerio*) larvae[J]. Human & Experimental Toxicology, 2016, 35(9): 974 – 982.
- [75] DING YJ, WANG BC, WEN CC, et al. Evaluation of the teratogenic effects of three traditional Chinese medicines, Si Jun Zi Tang, Liu Jun Zi Tang and Shenling Baizhu San, during zebrafish pronephros development[J]. J Toxicol Pathol, 2015, 28(3): 141 – 149.
- [76] ASPATWAR A, HAMMAREN MM, PARIKKA M, et al. Rapid evaluation of toxicity of chemical compounds using zebrafish embryos[J]. J Vis Exp, 2019, 150(2): 59315.
- [77] AUGUSTINE – RAUCH K, ZHANG CX, PANZICA – KELLY JM. A developmental toxicology assay platform for screening teratogenic liability of pharmaceutical compounds [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2016, 107(5): 4 – 20.
- [78] PANZICA – KELLY JM, ZHANG CX, AUGUSTINE – RAUCH KA. Optimization and performance assessment of the chorion – off [dechorinated] zebrafish developmental toxicity assay[J]. Toxicol Sci, 2015, 146: 127 – 134.
- [79] FARRELL JA., WANG YQ, RIESENFELD KSJ, et al. Single – cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis[J]. Science, 2018, 360: 113 – 115.
- [80] FARNSWORTH DR, SAUNDERS LM, MILLER AC. A single – cell transcriptome atlas for zebrafish development [J]. Dev Biol, 2020, 459: 100 – 108.

(收稿日期: 2025 – 03 – 07; 修回日期: 2025 – 10 – 24)