

王雪,夏青,王荣春,等. 斑马鱼幼鱼模型在急性肾损伤研究中的适用性 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 857-860.
Wang X, Xia Q, Wang RC, et al. Applicability of zebrafish larvae in the research of acute kidney injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 857-860.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.06.016

斑马鱼幼鱼模型在急性肾损伤研究中的适用性

王雪,夏青,王荣春,王西新,张云*,刘可春*

(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)

【摘要】 斑马鱼作为一种新兴的脊椎模式生物,近来被广泛应用于人类疾病研究。斑马鱼幼鱼前肾解剖结构简单,但在组织结构和分子水平上与哺乳动物后肾相似,并具备同样复杂的生物学功能,损伤后的病变反应与人类肾相似,同时斑马鱼幼鱼具有自身特点和优势,是进行肾发育和肾疾病研究的重要模型。本文从斑马鱼幼鱼前肾的生物学特点、幼鱼肾损伤的病变反应机制及在肾损伤研究中的应用优势 3 方面阐述该模型在急性肾损伤研究中的适用性。

【关键词】 斑马鱼;急性肾损伤;动物模型;幼鱼

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 06-0857-04

Applicability of zebrafish larvae in the research of acute kidney injury

WANG Xue, XIA Qing, WANG Rongchun, WANG Xixin, ZHANG Yun*, LIU Kechun*

(Biology Institute, Qilu University of Technology(Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China)

Corresponding author: ZHANG Yun. E-mail: xiaohan_0818@163.com; LIU Kechun. E-mail: hliukch@sdas.org

【Abstract】 As an emerging vertebrate animal model, zebrafish have been widely used in human disease research. Although simple in form, the larval pronephros is similar to the mammal kidney in terms of histological structure, gene expression, and functional complexity. Furthermore, the response of zebrafish larvae to kidney damage is similar to that of mammals. Because of their unique features and other advantages, zebrafish larvae present a useful model for research into kidney development and disease. This review discusses the applicability of zebrafish larvae in research into acute kidney injury based on the biological characteristics of the pronephros, the pathogenic mechanisms involved, and the advantages for kidney injury research.

【Keywords】 zebrafish; acute kidney injury; animal model; larvae

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肾是机体的主要排泄器官,能排出体内代谢废物、毒素,肾血流量大,易于累积有害物质,容易发生肾功能损伤。随着社会发展,环境污染、药物滥用等问题日益严重,人们接触药物或毒性物质的机率增加,急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的发生率呈大幅上升趋势。AKI 时肾功能迅速下降,排

泄受阻,患者对用药更加敏感,给治疗带来了难度,目前临床上对 AKI 尚缺乏有效的治疗措施,AKI 严重威胁着人类健康。虽然近年来人们对 AKI 的认识有所提高,但对于不同条件下 AKI 病变发展背后的分子机制,尤其是关于如何促进肾自身的损伤修复机能方面仍亟需开展更多研究。

【基金项目】 山东省优秀青年人才基金项目(ZR2020YQ60)。

Funded by Shandong Provincial Natural Science Foundation(ZR2020YQ60)。

【作者简介】 王雪(1978—),女,硕士,研究方向:药物活性筛选与安全性评价。Email: wangxue@sdas.org

【通信作者】 张云,女,博士,研究方向:药物活性筛选与安全性评价。Email: xiaohan_0818@163.com;

刘可春,男,博士,研究方向:药物活性筛选与安全性评价。Email: hliukch@sdas.org。

* 共同通信作者

斑马鱼是一种小型淡水硬骨鱼类,成鱼体长仅 3 ~ 4 cm。斑马鱼基因与人类基因具有高度同源性,体内许多器官功能机制及生理信号途径与哺乳动物相似,对毒性物质产生与人类相似的反应表现。因此,斑马鱼在发育生物学、疾病模型及药物研发等领域得到日益广泛的应用,成为继于啮齿动物之后的又一重要脊椎模式生物。72 hpf 后,斑马鱼各器官基本发育完成,体格小、鱼体透明、可视性强,相比于成鱼更易在显微镜下进行观察操作,斑马鱼幼鱼期是开展实验的重要阶段。本文结合斑马鱼幼鱼前肾的生物学特点、幼鱼肾损伤病变反应机制及斑马鱼幼鱼在 AKI 研究中的应用优势,对斑马鱼幼鱼模型在 AKI 研究中的适用性进行阐述。

1 斑马鱼幼鱼前肾的生物学特点

在进化上,斑马鱼肾分为幼鱼期(larvae)的前肾(pronephros)和成鱼(adult)期的中肾(mesonephros),受精后 14 h(hours post fertilization, hpf)时,肾开始发育,48 hpf 时,发育完成并具备滤过功能。斑马鱼前肾仅由一对肾单位组成,两个肾小球在背部中线、背主动脉腹侧处融合,肾小管分居于两侧,向尾部延伸汇于泄殖腔。斑马鱼前肾在解剖结构上比中肾及人类的后肾简单,但在细胞类型和分子水平上具有相似性,由内皮细胞、足细胞和肾小管上皮细胞组成,并含有相似基因,人类肾脏疾病中发现的一些异常基因,在斑马鱼前肾发育与功能维持中也发挥重要作用^[1]。斑马鱼前肾具备同样复杂的生物学功能,负责调节幼鱼水电解质平衡,维持内环境稳定^[2]。

肾小管是 AKI 中发生损伤的重要部位。与哺乳动物类似,根据上皮细胞形态和细胞上所表达转运体的不同,斑马鱼幼鱼前肾的肾小管可分为不同节段,包括颈段(neck)、近端肾小管曲段(proximal convoluted tubule, PCT)和近端肾小管直段(proximal straight tubule, PST)、远端肾小管近段(distal early, DE)和远端肾小管远段(distal late, DL)和短的肾弓(pronephric duct, PD)^[3],这与哺乳动物肾小管的节段划分基本一致。前肾肾小管每个节段的组织结构、表达基因及离子转运体的分布与哺乳动物肾小管的相应节段具有相似性。比如,幼鱼前肾近端肾小管上皮细胞呈两极化结构,包括顶端刷状缘与含有离子转运体的基底膜,细胞核偏向于管腔内表面^[4]。近端肾小管表达 *slc9a3* 基因^[3]及酸碱平衡

相关的转运体如:AE2(chloride/bicarbonate anion exchanger)、NBCn1(sodium/bicarbonate cotransporter)、NHE(sodium/hydrogen exchanger)等^[5],具有调节体液 PH 的功能。斑马鱼前肾与哺乳动物后肾在组织结构及功能上的相似性,表明斑马鱼幼鱼应用于人类肾疾病研究具有生物学基础。

2 斑马鱼幼鱼肾损伤反应机制

2.1 斑马鱼幼鱼对 AKI 的损伤性反应

发生 AKI 时,斑马鱼幼鱼模型表现出与哺乳动物相似的病变反应,包括幼鱼局部或全身水肿、肾功能下降和前肾组织结构损伤等。3 dpf 斑马鱼幼鱼经肾毒性物质处理后,早期即出现近端肾小管体积膨大、结构紊乱、上皮细胞刷状缘缺失和坏死等组织改变,电镜观察发现受损上皮细胞内线粒体呈扁平、杆状等异常形态,或出现肿胀,并出现线粒体嵴断裂及基质颗粒丢失^[6],线粒体功能出现异常,这些表现均与哺乳动物发生 AKI 后的病变反应一致^[7-8]。同时,分子水平检测显示,哺乳动物体内已确认的一些肾损伤相关标志物基因,如 *hmoxl*(heme oxygenase 1)、*clu*(clusterin)和 *kim-1*(*havcr-1*)等,在幼鱼体内也出现不同程度反应性上调^[9]。

2.2 斑马鱼幼鱼肾损伤修复机制

脊椎动物不同种属间,肾的自我修复能力不同,目前人们对于肾修复的分子调控机制还不明确。细胞水平研究表明,哺乳动物和斑马鱼幼鱼间在肾修复过程上具有保守性^[10],近端肾小管发生损伤后,尚存活的部分上皮细胞发生去分化、增殖,重新覆盖于裸露的肾小管基底膜上,恢复管腔结构的完整,而斑马鱼成鱼则依赖“干细胞”再生进行肾修复。因此,相较于成鱼,斑马鱼幼鱼模型更适于进行 AKI 中肾修复机制或治疗药物筛选研究。

2.3 药物在斑马鱼幼鱼体内的代谢转化

斑马鱼体内表达多种药物吸收代谢所需的转运蛋白^[11]和代谢酶类^[12],如 I 相代谢酶细胞色素 P450(cytochrome450, CYP450), II 相代谢酶尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(uridine-diphospho glucuronosyl transferase, UGT)和磺基转移酶(sulfotransferase, SULT)等^[13],不同发育时期,斑马鱼表达的转运蛋白及代谢酶种类不同。斑马鱼对药物转运蛋白及代谢酶类的调控模式与人类相似,斑马鱼体内某些 CYP450 与人体内的 CYP450 具有相同的抑制剂/激动剂和底物。Gorgulho 等^[14]利用斑马鱼对醋氨酚

的肾毒性研究,为了解斑马鱼幼鱼对药物的吸收和代谢转化情况,对药物处理后的斑马鱼幼鱼(5 dpf)组织进行提取,并利用 LC-MS 进行成分分析,结果除 N-乙酰基亚胺醌(N-acetyl-P-benzoquinoneimine, NAPQI)和醋氨酚谷胱甘肽结合物两种性质极不稳定的成分外,所有人体内已发现的醋氨酚代谢物均可以在斑马鱼幼鱼体内检测到,表明药物在斑马鱼幼鱼体内的代谢转化方式与人类相似。

3 斑马鱼幼鱼模型在 AKI 研究中的应用优势

3.1 体格小、药物用量少

由于斑马鱼幼鱼体格小,于普通细胞培养板内利用水溶液处理方式即可对一定样本量的幼鱼群体进行给药,药物用量一般为 μg 级。对于一些性质不稳定或存在其他问题的药物,可以利用显微注射方式将药物直接注入斑马鱼体内。庆大霉素具有肾毒性,常用于肾损伤造模,由于其生物利用度低,通过水溶液给药后进入斑马鱼幼鱼体内的庆大霉素量极低^[14]。研究中利用显微注射将庆大霉素溶液通过心脏静脉窦(cardiac venous sinus)注入斑马鱼幼鱼血液循环系统,成功造成幼鱼 AKI,幼鱼出现心包水肿、近端肾小管扩张、上皮细胞刷状缘缺失等肾损伤表现^[15-16]。

3.2 前肾结构简单、鱼体透明、便于直接观察

斑马鱼幼鱼鱼体透明,前肾仅由一对肾单位组成,结构简单,借助于组织特异显色,可在整体水平上对幼鱼肾进行原位观察。*wt1* (Wilms' tumor gene)是肾发育关键因子,为肾发育和修复的分子标志物。斑马鱼 *wt1* 包括 *wt1a* 与 *wt1b* 两种同源基因,在 > 30 hpf 斑马鱼, *wt1b* 基因高表达于肾^[17]。利用 *wt1b* 启动子构建的 Tg(*wt1b*:GFP)转基因斑马鱼,肾小球和肾小管显示绿色荧光,显微镜下可直接原位观察肾各部位的形态。Chvistou-Savina 等^[18]研究中利用显微注射将荧光标记的葡聚糖(10×10^3)分子注入幼鱼血液循环系统,然后定时采集幼鱼荧光图像,测量荧光强度随时间降低速率,作为检测肾小球滤过功能的指标。同时,通过在显微镜下观察近端肾小管荧光强度,检测其对荧光标记物的摄取情况,可以直接评估近端肾小管重吸收功能^[19]。

3.3 易于进行基因编辑

斑马鱼在体外完成受精和胚胎发育过程,在受精卵单细胞期通过显微注射对基因组进行编辑操作。近年来,随着基因编辑技术的发展^[20],越来越

多的斑马鱼突变体和转基因品系被构建,并广泛用于基因功能分析、疾病建模等。Podocin 是足细胞表面表达的一种重要膜分子,与另两种膜分子, Nephlin 和 CD2A,共同组成蛋白复合体,并与相邻足细胞膜表面的蛋白复合体相互连接,构成裂孔隔膜的主要元件,对维持肾小球滤过膜的完整性具有重要作用^[21]。Zhou 等^[22]利用 *podocin* 启动子构建的 Tg(*pod*:NTR-mCherry)转基因斑马鱼,在足细胞表面表达硝基还原酶和红色荧光蛋白,与甲硝唑反应产生毒性代谢物而引起足细胞凋亡,以此建立条件诱导斑马鱼急性肾损伤模型,并可在显微镜下直接观察测量红色荧光强度变化,了解足细胞凋亡程度。

4 总结

斑马鱼幼鱼体格小、数量大、鱼体透明,是一种兼具了细胞模型优点的整体模式生物,非常适用于进行高通量基因筛查和药物发现研究。荧光转基因和显微注射等技术的应用从模型建立及观察检测等多方面为利用斑马鱼幼鱼开展 AKI 研究带来便利,使研究者能在动物整体水平上从幼鱼表型、组织结构及分子表达等不同层面进行原位观察与研究,极大地促进了该模型在 AKI 研究中的应用。

作为一种淡水鱼类,斑马鱼幼鱼前肾与哺乳动物的肾在组织结构上存在一定差异。斑马鱼幼鱼肾小管缺少细段部分,缺乏尿液浓缩功能;肾弓比哺乳动物收集管短而简单^[23];斑马鱼肾小管上无致密斑结构,而包含特有的斯坦尼氏小体(Corpuseles of Stannius, CS)^[24],有研究认为斯坦尼氏小体可能与哺乳动物肾的致密斑功能相似^[25];同时,斑马鱼幼鱼仅有一对肾单位,无法模拟 AKI 时哺乳动物肾组织复杂的内环境变化,尤其是肾单位间的相互作用情况。因此,相比于小鼠等哺乳动物模型,斑马鱼幼鱼模型更适用于 AKI 前期探索研究和药物快速筛查,所获得的结果对后续的哺乳动物实验具有重要借鉴意义。

另外,由于斑马鱼幼鱼体格小,无法获取足量的血液、尿液样本,不易进行组织定量,人类及哺乳动物模型上常用的一些肾功能指标在斑马鱼幼鱼模型上无法检测,目前已有研究中针对幼鱼前肾的肾功能检测方法,尤其是量化指标尚比较匮乏,因此,在斑马鱼幼鱼肾功能检测方面还需要开展更多探索性研究,以使其在 AKI 及其它肾疾病机制与治疗研究中得到更好的应用。

参 考 文 献(References)

- [1] Drummond IA, Davidson AJ. Zebrafish kidney development [J]. Methods Cell Biol, 2016, 134: 391-429.
- [2] McCampbell KK, Springer KN, Wingert RA. Analysis of nephron composition and function in the adult zebrafish kidney [J]. J Vis Exp, 2014, 90: e51644.
- [3] Wingert RA, Davidson AJ. The zebrafish pronephros; A model to study nephron segmentation [J]. Kidney Int, 2008, 73(10): 1120-1127.
- [4] Drummond IA, Majumdar A, Hentschel H, et al. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function [J]. Development, 1998, 125(23): 4655-4667.
- [5] Drummond IA. Zebrafish kidney development [J]. Methods Cell Biol, 2004, 76: 501-530.
- [6] Waring WS, Moonie A. Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury [J]. Clin Toxicol (Phila), 2011, 49(8): 720-728.
- [7] Yan LJ. Folic acid-induced animal model of kidney disease [J]. Anim Model Exp Med, 2021, 4(4): 329-342.
- [8] Gerhardt LMS, Liu J, Koppitch K, et al. Single-nuclear transcriptomics reveals diversity of proximal tubule cell states in a dynamic response to acute kidney injury [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(27): e2026684118.
- [9] 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.
- [10] Loverre A, Capobianco C, Ditunno P, et al. Increase of proliferating renal progenitor cells in acute tubular necrosis underlying delayed graft function [J]. Transplantation, 2008, 85(8): 1112-1119.
- [11] Mihaljevic I, Popovic M, Zaja R, et al. Phylogenetic, syntenic, and tissue expression analysis of *slc22* genes in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 626.
- [12] Levi L, Ziv T, Admon A, et al. Insight into molecular pathways of retinal metabolism, associated with vitellogenesis in zebrafish [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 302(5): E626-E644.
- [13] Hill A, Mesens N, Steemans M, et al. Comparisons between in vitro whole cell imaging and in vivo zebrafish-based approaches for identifying potential human hepatotoxicants earlier in pharmaceutical development [J]. Drug Metab Rev, 2012, 44(1): 127-140.
- [14] 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(1): 411-423.
- [15] Cianciolo Cosentino C, Roman BL, et al. Intravenous microinjections of Zebrafish larvae to study acute kidney injury [J]. J Vis Exp, 2010, 42: 2079.
- [16] McKee RA, Wingert RA. Nephrotoxin microinjection in zebrafish to model acute kidney injury [J]. J Vis Exp, 2016, 113: e54241.
- [17] Perner B, Englert C, Bollig F. The Wilms tumor genes *wt1a* and *wt1b* control different steps during foation of the zebrafish pronephros [J]. Dev Biol, 2007, 309(1): 87-96.
- [18] Christou-Savina S, Beales PL, Osborn DP. Evaluation of zebrafish kidney function using a fluorescent clearance assay [J]. J Vis Exp, 2015, 96: e52540.
- [19] McCampbell KK, Wingert RA. New tides: using zebrafish to study renal regeneration [J]. Transl Res, 2014, 163(2): 109-122.
- [20] Outtandy P, Russell C, Kleta R, et al. Zebrafish as a model for kidney function and disease [J]. Pediatr Nephrol, 2019, 34(5): 751-762.
- [21] Kawachi H, Suzuki K, Miyauchi N, et al. Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states;entification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome [J]. Clin Exp Nephrol, 2009, 13(4): 275-280.
- [22] Zhou WB, Hildebrandt F. Inducible podocyte injury and proteinuria in transgenic zebrafish [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(6): 1039-1047.
- [23] Wingert RA, Selleck R, Yu J, et al. The *cdx* genes and retinoic acid control the positioning and segmentation of the zebrafish pronephros [J]. PLoS Genet, 2007, 3(10): 1922-1938.
- [24] Ishibashi K, Imai M. Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(3): F367-F375.
- [25] Butler DG, Zhang DH, Villadiego R, et al. Response by the corpuscles of Stannius to hypotensive stimuli in three divergent ray-finned fishes (*Amia calva*, *Anguilla rostrata*, and *Catostomus commersoni*): cardiovascular and morphological changes [J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 132: 198-208.

[收稿日期] 2022-01-14