

兰爱琳,黄春华,夏铭,等.斑马鱼肾损伤造模方法及评价指标的研究进展[J].中国比较医学杂志,2023,33(12):123-126.
Lan AL, Huang CH, Xia M, et al. Research progress on modeling methods and evaluation indexes of kidney injury in zebrafish [J].
Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 123-126.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.019

斑马鱼肾损伤造模方法及评价指标的研究进展

兰爱琳,黄春华,夏铭,李茂娟,汪思齐,楼迪栋*

(贵州省法医中药毒理学特色重点实验室,贵州中医药大学司法鉴定所,贵阳 550000)

【摘要】 肾容易受到体内外各种物理、化学和生物因素的影响,致使肾功能损害,造成急慢性肾疾病。预防和治疗各种因素引起的肾功能损害是泌尿系统研究的重要内容。斑马鱼幼鱼通体透明、产卵量大、易于基因编辑,在肾的形态、生理、功能等方面以及对化合物的反应也与人类具有很高的相似性,是理想的动物模型。本文将对斑马鱼肾损伤造模方法及评价指标进行综述。

【关键词】 斑马鱼;肾损伤;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 12-0123-04

Research progress on modeling methods and evaluation indexes of kidney injury in zebrafish

LAN Ailin, HUANG Chunhua, XIA Ming, LI Maojuan, WANG Siqi, LOU Didong*

(Guizhou Provincial Key Laboratory of Forensic Medicine Toxicology, Judicial Appraisal Center,
Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000, China)

【Abstract】 Kidneys filter blood and regulate fluid and electrolyte balances. However, the kidney is susceptible to toxicity of various compounds, resulting in renal damage. Hence, prevention and treatment of renal injury is a hot research topic. Zebrafish is an ideal animal model, because it is closely related to humans in terms of morphology, physiology, and kidney functions and its response to compounds. In this article, we review the method and evaluation indexes of zebrafish kidney injury modeling.

【Keywords】 zebrafish; kidney injury; animal models

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

肾疾病是一个全球性的问题,其发病率高、个人以及社会医疗压力大。临床前的实验动物研究有助于更好地理解各种肾疾病机制,并筛选治疗方法。斑马鱼具有与哺乳动物肾相当的基本解剖结构^[1],且功能上非常相似,因其体型小、产卵量大、易于基因操控、胚胎通体透明等优势使研究者可以对研究目标进行特异标记和实时观察^[2],本文就其在肾病研究的造模方法和观察指标做一综述。

1 造模方法

1.1 抗生素

嘌呤霉素 (Puromycin) 和阿霉素 (Adriamycin, ADR) 是斑马鱼急性足细胞损伤造模常用药物,会破坏其肾小球滤过屏障 (glomerular filtration barrier, GFB)^[3]。Rider 等^[1]利用嘌呤霉素使斑马鱼足细胞损伤、肾小球滤过通透性增加,镜下可见足细胞消失。但是,与啮齿类动物模型相比,嘌呤霉素会影

【基金项目】贵州省法医中药毒理学特色重点实验室(黔教合KY字[2021]004)。

【作者简介】兰爱琳(1998—),硕士研究生,研究方向:AAI 肾病毒理学。E-mail:chenandlin@yeah.net

【通信作者】楼迪栋(1977—),博士,教授,研究方向:AAI 肾病毒理学。E-mail:15761879@qq.com

响斑马鱼中枢血流,可能是水肿原因之一,需要进一步评估水肿和 GFB 变化之间的相关性^[1]。ADR 主要靶向哺乳动物肾小管,常诱导斑马鱼肾的退行性变化。Kato 等^[4]对成年斑马鱼连续 4 d 腹腔注射 40 mg/kg ADR,引起肾小球足细胞足突融合。但由于 ADR 的心血管毒性可能干扰葡聚糖清除率,不适合用于 3 日龄以上斑马鱼的肾小球损伤造模^[1]。

庆大霉素也是斑马鱼肾损伤的常用造模药物。Shao 等^[5]用 750 ppm 的庆大霉素处理斑马鱼胚胎即可引起明显的心包水肿。Kato 等^[4]对成年斑马鱼腹腔注射或口服庆大霉素处理 4 d 导致其肾小管坏死,肾小管上皮细胞中溶酶体和髓样小体增多。Gorgulho 等^[6]使用 10% 的幼鱼致死浓度庆大霉素导致其肾清除率降低,并出现线粒体变形、肿胀,嵴破坏、基粒受损。Cernaro 等^[7]对斑马鱼腹腔注射 0.8 μL 的庆大霉素,细胞顶端刷状缘消失,细胞坏死和透明滴包涵体形成,小管间可见小的、浓缩的嗜碱性细胞团簇(间充质凝析物),其他区域可见具有清晰细胞质边界的多边形细胞以及梭形嗜碱性细胞成群出现。然而,氨基糖苷类对斑马鱼幼体的毒性过大,在研究中有一定的局限性。

1.2 合成药物和天然产物

顺铂常用于抗癌治疗,但易在肾中累积,导致肾小管细胞凋亡,并诱发急性肾损伤(acute kidney injury, AKI),其特征在于肾功能快速下降、组织损伤和免疫细胞浸润。Morales Fénero 等^[8]对成年斑马鱼腹腔注射 120 $\mu\text{g}/\text{g}$ 的顺铂,注射 24 h 后斑马鱼存活率降低、肾小管结构丧失、炎性浸润和细胞凋亡增加。

马兜铃酸 I (aristolochic acid I, AAI) 对多种动物均具有肾毒性。0.5 $\times 10^{-6}$ mol/L AAI 下暴露 8 d 的 15 dpf 幼鱼身体弯曲、体长缩短、GFB 功能相对丧失^[9]。湛晶晶等^[10]利用 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AAI 处理 72 hpf 斑马鱼,11.1% 的斑马鱼出现严重的肾包膜水肿。王雪等^[11]发现 AAI 处理 30 h 后,幼鱼出现水肿的同时肾 *Kim-1* 基因(早期肾病的重要分子指标)转录及蛋白水平升高。

1.3 基因修饰斑马鱼

斑马鱼作为重要的模式动物,基因修饰技术十分完善^[12]。*Nphs2/podocin* 可能是浆膜和细胞骨架之间的一种连接剂,在调控肾小球过滤功能方面起着重要作用,而 *Podocin* 是足细胞特异性标志物,且足细胞特异性高表达硝基还原酶(nitroreductase,

NTR)。利用 *nphs2/podocin* 启动子在足细胞中表达 *NTR*,可将甲硝唑(metronidazole, MTZ)转化为细胞毒素。Wang 等^[13]构建了 *Tg(pod:Gal4)/Tg(UAS:NTR-mCherry)* 转基因斑马鱼品系,*GAL4/UAS* 基因表达调控系统相结合可诱导足细胞中 *NTR-mCherry* 更强的特异性基因表达,提高了 *NTR* 将 MTZ 转化为细胞毒素致足细胞损伤的效率。MTZ 处理此种转基因斑马鱼可致眶周水肿,足细胞完整性被破坏,电镜下肾小球中广泛的足突消失,GFB 受损,免疫染色可见足细胞凋亡^[13],在 *Tg(pod:gal4;UAS:NTR-mCherry)* 转基因斑马鱼基础上使足细胞特异性过表达 *Gadd45b* 会使足细胞易受损伤,加重水肿、蛋白尿和足突消失^[13],表明 *Gadd45b* 基因在足细胞损伤中起重要作用。

斑马鱼 *Kim-1* 蛋白与哺乳动物 *Kim-1* 具有高度的结构和功能同源性,哺乳动物的肾损伤与近端肾小管细胞中 *Kim-1* 表达上调相关。Yin 等^[14]利用钙粘蛋白 17(Cadherin-17, CDH17) 启动子表达 *kim1-RFP* 融合蛋白生成 *pTol-cdh17:kim1-RFP* 斑马鱼使肾小管上皮细胞中过表达 *Kim-1*,导致其肾小管刷状缘丧失、肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)降低、心包水肿和死亡率增加。因为斑马鱼肾小球屏障在 72~96 hpf 形成,*Kim-1* 表达的转基因鱼可能导致其吸收在肾小球完全成熟后通常不会出现在小管腔中的有害因子。Yin 等^[14]创建了 *Cre/Loxp* 介导的组织特异性 *Kim-1* 过表达斑马鱼,*Kim-1* 在 GFB 成熟后的肾小管上皮细胞中表达。与对照组相比,*Cre/Loxp* 介导的 *Kim-1* 在两个肾前小管中的过表达(*Kim1^{ku+/+}*)导致较高的死亡率和水肿,而仅在一个肾前肾小管中过表达 *Kim-1* 的鱼水肿和死亡率较低。

1.4 基因敲降

酪氨酸蛋白激酶受体 *Tyro3* mRNA 在人肾小球中高表达,是肾小球疾病中的足细胞保护因子。Zhong 等^[15]利用吗啉基(Morpholino)敲低 *Tyro3* 生成 *tyro3-MO* 斑马鱼,与对照组相比 55% 的 *tyro3-MO* 在 72 hpf 出现心包和眶周水肿,注射 FITC-葡聚糖瞳孔荧光强度迅速减弱,且足突消失和足突之间的特殊细胞连接狭缝隔膜破裂。由此可知,敲低 *Tyro3* 会损伤斑马鱼 GFB。

Tmem63c 基因在 GFB 完整性中起着重要作用,Schulz 等^[16]利用 Morpholino 敲降斑马鱼 *Tmem63c*,*Tmem63c* 有缺陷的胚胎电镜下显示严重的形态学缺

陷,足细胞损伤、足突消失以致 GFB 受损产生蛋白尿。

1.5 物理/手术造模

Johnson 等^[17]通过脉冲微点激光系统对近端小管荧光标记的斑马鱼靶向细胞消融使其上皮损伤,此种方法可以基于形态位置、功能甚至特定细胞表型来靶向细胞的不同区域,增强了研究的特异性,可广泛应用于斑马鱼胚胎中各种器官的细胞群。Datta 等^[18]认为前者未考虑损伤的分级,选择使用较脉冲激光系统相比低能量的紫色激光(405 nm)靶向消融特异性绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的肾单位片段,此过程中可调节针孔尺寸、激光强度功率等。通过观察荧光变化来研究其损伤和修复过程。这种方法能够调节活体动物模型损伤水平,并达到精确的时空控制。

1.6 其他

脓毒症发生过程中常见并发症也包括 AKI。脓毒症急性肾损伤(septic-acute kidney injury, S-AKI),发病快、肾损伤程度高。Wen 等^[19]在幼鱼 78~82 hpf 时静脉注射 1 nL 迟缓爱德华氏菌,成年斑马鱼在 1 岁腹腔注射 20 μ L,出现明显心包水肿,表明肾功能障碍以致液体滞留。王壮^[20]以致死剂量脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)浸泡幼鱼,也可见心包腔水肿和尾鳍溃烂等。

2 评价指标

2.1 形态学、行为学

斑马鱼幼鱼体积小、通体透明,研究者可在镜下实时观察其整体或局部的形态变化^[2]。可以通过对比身长、大小、瞳距体长之比、体轴弯曲、进食情况、局部或全身水肿、活跃程度、应激反应等^[9],评估药物的毒性作用、斑马鱼的病变程度等。

斑马鱼的光学透明性加上基因操控技术的发展,使得学者可以对研究目标进行特异性标记,通过荧光强度、面积等实时观察各段肾小管。Yin 等^[14]利用莲藕凝集素(*lotustetragonolobus lectin*, LTL)标记近端小管、双花扁豆凝集素(double flowers lentil lectin, DBA)标记远端小管和集合管;Wen 等^[19]使用转基因斑马鱼品系 *Tg*(*PT:eGFP*)、*Tg*(*cdh17:eGFP*),分别荧光标记近端前肾小管或全长前肾小管中的细胞;同时对目标蛋白进行共定位染色,观察目标蛋白在肾小管各节段上的表达情况。

2.2 肾小球滤过等功能学

肾滤过功能正常时只有小分子蛋白可通过,当

GFB 受损,可滤过大分子蛋白^[21]。Kamei Caramai 等^[22]通过观察水中由死亡上皮组织形成的白色管型物质目测庆大霉素是否造成斑马鱼肾损伤。Lee 等^[23]利用接近人白蛋白分子量、表达 GFP 的维生素 D 结合蛋白(vitamin D binding protein, VDBP)转基因斑马鱼,其近端小管重吸收并积累 VDBP-GFP,通过荧光成像示踪蛋白尿。Wang 等^[9]利用同种转基因斑马鱼经 AAI 处理后,眼周荧光强度降低推测 AAI 造成其肾小球滤过通透性增加。GFP 还可用 ELISA 检测,灵敏度高,特异性强,Chen 等^[24]用 GFP ELISA 试剂盒测定的转基因斑马鱼蛋白尿。

为动态观察肾小球通透性,Rider 等^[1]开发了右旋糖酐(Dextran)排泄测定法,经心窝静脉注射,通过背主动脉的荧光强度测定 Dextran 清除率,观察肾小球损伤和修复过程中的蛋白质排泄,其清除率与 GFR 呈正相关。

甘露醇通过调整体液和水环境之间的渗透梯度,能够减轻由于皮肤或鳃衰竭引起的心包水肿^[25]。为了区分心包水肿是由于肾小球损伤还是其他水屏障改变,可使用甘露醇处理肾损伤后的斑马鱼胚胎,观察其心包水肿是否减轻,如并未改善可排除皮肤和鳃的参与。

2.3 病理学

HE 染色是病理学最常用的方法,Wang 等^[9]对 AAI 处理后的野生型斑马鱼进行 HE 染色,可见增大的肾小管、浓缩的细胞,AAI 处理端粒酶缺失斑马鱼可见空泡细胞和结构紊乱的肾小球。对 AAI 处理的斑马鱼进行 Masson 染色观察胶原蛋白,未见阳性反应。Morales Fénero 等^[8]通过流式细胞术和 TUNEL 染色来评估细胞凋亡状况。

为了进一步观察斑马鱼肾损伤后细胞形态及结构改变,Gorgulho 等^[6]通过双光子显微镜观察近曲小管三维形态,并使用 Amira 软件对近曲小管进行三维重建,观察管状形态、上皮组织和管腔面积。

2.4 分子生物学

Kato 等^[4]使用 DNA 芯片数据分析斑马鱼肾基因表达,挑选出早期 *Egr1*、*Atf3* 和 *Fos* 作为成年斑马鱼药物性肾损伤(drug-induced kidney injury, DIKI)的候选标记。Wen 等^[19]对转基因斑马鱼 *Tg*(*PT:eGFP*)和 *Tg*(*cdh17:eGFP*)进行 AKI 生物标记物(*Kim-1*、*Timp-2* 和 *Igfbp7*)共定位染色,以此观察上述标记物在肾小管局部表达情况,结果显示 *Timp-2* 主要存在于远端小管,*Igfbp7* 主要存在于近端小管,

脓毒症幼鱼肾小管全长中 *Kim-1* 表达上调。

3 总结

斑马鱼作为新兴模式生物,兼具了传统动物及细胞模型的优点^[26],其肾的分子组成、结构和功能与高等哺乳动物相似^[27],胚胎透明、体外受精、基因编辑较其他模式动物更易于操作^[27-28],给学者们提供了一个简单、价廉、高效的研究平台^[27]。但是如何构建理想的疾病模型,筛选肾疾病的治疗方法^[27],以及肾功能检测方面还需要进一步探索,从而在肾疾病机制与治疗研究中更好地应用^[25]。

参考文献:

[1] Rider SA, Bruton FA, Collins RG, et al. The efficacy of puromycin and adriamycin for induction of glomerular failure in larval zebrafish validated by an assay of glomerular permeability dynamics [J]. *Zebrafish*, 2018, 15(3): 234-242.

[2] Coppola A, Lombardi P, Mazzella E, et al. Zebrafish as a model of cardiac pathology and toxicity: spotlight on uremic toxins [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5656.

[3] Zhai X, Wang L, Xu C, et al. Triptolide preserves glomerular barrier function via the inhibition of p53-mediated increase of GADD45B [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 671: 210-217.

[4] Kato Y, Tonomura Y, Hanafusa H, et al. Adult zebrafish model for screening drug-induced kidney injury [J]. *Toxicol Sci*, 2020, 174(2): 241-253.

[5] Shao W, Zhong D, Jiang H, et al. A new aminoglycoside etimicin shows low nephrotoxicity and ototoxicity in zebrafish embryos [J]. *J Appl Toxicol*, 2021, 41(7): 1063-1075.

[6] 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.

[7] Cernaro V, Sfacteria A, Rifici C, et al. Renoprotective effect of erythropoietin in zebrafish after administration of gentamicin: an immunohistochemical study for β -catenin and c-kit expression [J]. *J Nephrol*, 2017, 30(3): 385-391.

[8] 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, 16(171): e61575.

[9] Wang X, Giusti A, Ny A, et al. Nephrotoxic effects in zebrafish after prolonged exposure to aristolochic acid [J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(4): 217.

[10] 湛晶晶,唐旭霞,徐慧芳,等. 马兜铃酸对斑马鱼的耳毒性及肾毒性研究 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2020, 28(1): 57-61.

[11] 王雪,韩利文,何秋霞,等. 马兜铃酸对斑马鱼肾损伤因子(KIM-1)表达的影响 [J]. *动物学杂志*, 2018, 53(4): 622-627.

[12] Simone BW, Martínez-Gálvez G, WareJoncas Z, et al. Fishing for understanding: Unlocking the zebrafish gene editor's toolbox [J]. *Methods*, 2018, 150: 3-10.

[13] Wang L, Zhang L, Hou Q, et al. Triptolide attenuates proteinuria and podocyte apoptosis via inhibition of NF- κ B/GADD45B [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10843.

[14] 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(7): 1943-1957.

[15] Zhong F, Chen Z, Zhang L, et al. Tyro3 is a podocyte protective factor in glomerular disease [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(22): e123482.

[16] Schulz A, Müller NV, van de Lest NA, et al. Analysis of the genomic architecture of a complex trait locus in hypertensive rat models links *Tmem63c* to kidney damage [J]. *Elife*, 2019, 8: e42068.

[17] Johnson CS, Holzemer NF, Wingert RA. Laser ablation of the zebrafish pronephros to study renal epithelial regeneration [J]. *J Vis Exp*, 2011(54): 2845.

[18] Datta R, Wong A, Camarata T, et al. Precise cellular ablation approach for modeling acute kidney injury in developing zebrafish [J]. *J Vis Exp*, 2017(124): 55606.

[19] Wen X, Cui L, Morrisroe S, et al. A zebrafish model of infection-associated acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(2): F291-F299.

[20] 王壮. 斑马鱼细胞焦亡介导脓毒症急性肾损伤的分子机制 [D]. 上海: 华东理工大学, 2020.

[21] 侯庆,陈朝红. 斑马鱼在足细胞研究中的应用及其进展 [J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(9): 976-981.

[22] Kamei Caramai N, Yan L, Drummond Iain A. Kidney regeneration in adult zebrafish by gentamicin induced injury [J]. *J Vis Exp*, 2015, 10(102): e51912.

[23] Lee MS, Devi S, He JC, et al. A zebrafish model of congenital nephrotic syndrome of the Finnish type [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 976043.

[24] Chen Z, Luciani A, Mateos JM, et al. Transgenic zebrafish modeling low-molecular-weight proteinuria and lysosomal storage diseases [J]. *Kidney Int*, 2020, 97(6): 1150-1163.

[25] Wiegand J, Cheng V, Reddam A, et al. Triphenyl phosphate-induced pericardial edema is associated with elevated epidermal ionocytes within zebrafish embryos [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2022, 89: 103776.

[26] 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.

[27] 陈朝红,刘志红. 模式动物斑马鱼在肾脏疾病研究中的应用 [J]. *肾脏病与透析移植杂志*, 2016, 25(2): 159-164.

[28] 马田田,施潇潇,陈丽萌. 斑马鱼在急性肾损伤研究中的应用进展 [J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(2): 257-261.