

硼砂对斑马鱼发育的影响^{*}

金鑫¹ 周钰林¹ 陈锡强² 张立涛¹ 葛顺^{1△}

(¹ 济宁医学院生物科学学院,日照 276826;² 山东省科学院生物研究所,济南 250014)

摘要 目的 以野生型和肝脏转基因 T3 斑马鱼为研究对象,探究硼砂对斑马鱼的发育毒性。方法 不同浓度的硼砂分别处理斑马鱼胚胎,以受精后小时(hpf)为时间段,每 24h 观察并统计野生型斑马鱼的自主活动次数、孵化率、心率、畸形率、死亡率以及肝脏发育面积。结果 斑马鱼胚胎 24hpf,随硼砂浓度升高,硼砂各浓度处理组自主活动次数逐渐降低,0.6mg/ml 硼砂组与空白对照组差异具有统计学差异($P < 0.01$)。与空白对照组相比,斑马鱼胚胎 72hpf 和 96hpf,硼砂各浓度处理组斑马鱼心率显著降低($P < 0.01$);96hpf,0.9mg/ml 硼砂组的畸形率显著性升高($P < 0.01$);96hpf 和 120hpf,0.9mg/ml 硼砂组的死亡率显著性升高($P < 0.01$);120hpf 和 144hpf,0.9mg/ml 硼砂组斑马鱼幼鱼的肝脏面积显著减小($P < 0.01$)。结论 高浓度的硼砂对斑马鱼具有发育毒性。

关键词 硼砂;斑马鱼;发育毒性

中图分类号:R22;R285.5; 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2020)08-229-04

The effect of borax on the development of zebrafish

JIN Xin¹, ZHOU Yulin¹, CHEN Xiqiang², ZHANG Litao¹, GE Shun^{1△}

(¹ Jining Medical University, Rizhao 276826, China;

² Biology Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract; Objective To study the developmental toxicity of borax to zebrafish of wild and liver transgenic T3 (lfabp:EGFP). **Methods** Zebrafish embryo were treated with different concentrations of borax. The number of spontaneous movement, hatching rate, heart rate, malformation, mortality and liver area of zebrafish were observed and counted every 24 hours. **Results** When zebrafish eggs were fertilized for 24 hours, the number of spontaneous movement gradually was decreased with the concentrations of borax increased. There were statistical difference when the concentrations of borax reached 600mg/L ($P < 0.01$). When zebrafish eggs were fertilized for 72 and 96 hours, the heart rate in borax group significantly was decreased ($P < 0.01$). When zebrafish eggs were fertilized for 96 hours, the malformation in borax group (900mg/L) was significantly increased ($P < 0.01$). When zebrafish eggs were fertilized for 96 and 120 hours, the mortality in borax group (900mg/L) was sharply increased ($P < 0.01$). When zebrafish eggs were fertilized for 120 and 144 hours, the liver area of zebrafish juvenile in borax group (900mg/L) significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** High concentrations of borax had developmental toxicity for zebrafish.

Keywords: Borax; Zebrafish; Development toxicity

据《本草纲目》记载,硼砂具有清凉解毒、消积块和除痰热等功效,是我国的一味传统中药。硼砂对乳腺癌、食管癌、宫颈癌和阴道癌等具有一定的

疗效^[1]。但是硼砂对人体具有一定的损伤,进入人体后会与胃酸反应生成硼酸不易排出^[2],易蓄积中毒,表现为头痛、头晕,严重可致死亡^[3]。目前,硼砂对大鼠、果蝇、鲫鱼的毒性研究已见报道^[4-6],但是未有其发育毒性方面的研究。

斑马鱼和人类有 87% 的基因同源性,且在生理功能、发育过程、器官构造等方面与哺乳动物非

* [基金项目] 济宁医学院大学生创新训练计划项目 (CX 2018035)

△ [通信作者] 葛顺, E-mail: geshun@163.com

常接近^[7],同时斑马鱼具有胚胎透明易于观察、给药剂量少和体外受精等特点^[8-9],是理想的模式生物,而且因为减少、替代和优化等动物实验原则,实现保护动物福利和减少哺乳动物等较高级实验动物的使用量,斑马鱼发育毒性实验替代哺乳动物模型已广泛应用于药物的发育毒性与致畸性研究^[10-11]。本研究以斑马鱼为研究对象,探讨硼砂对斑马鱼的发育毒性,为硼砂的毒理机制提供科学实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物

野生型 AB 品系斑马鱼 18 条(4 月龄)和肝脏转基因 T3(lfabp:EGFP)品系斑马鱼 18 条(4 月龄),由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。

1.2 试剂与仪器

硼砂(中国食品药品检定研究院,批号:190166-201601),锡纸遮光室温保存,用斑马鱼养殖水溶解稀释,现配现用;三卡因(Sigma 公司),用蒸馏水配制成质量分数为 0.16% 的溶液,放 4℃ 冰箱保存;斑马鱼养殖水,19.26 μg/ml MgSO₄·12.67 μg/ml KCl、44.4 μg/ml CaCl₂ 和 292.22 μg/ml NaCl^[12]。

斑马鱼饲养养殖系统(北京爱生科技有限公司);光照培养箱 HPG280BX(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);体视荧光显微镜 SZX16(Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 鱼卵收集 挑选健康性成熟的野生型 AB 品系和肝脏转基因 T3(lfabp:EGFP)品系斑马鱼按雌雄比例 1:2 放入交配缸中,用隔板隔开,16h 后抽隔板,2h 后即可收集鱼卵,移入盛养殖水的鱼缸中,滴亚甲基蓝溶液,将鱼缸放光照培养箱(温度:28℃;光周期:14h 光照,10h 黑暗)培养。

1.3.2 发育毒性实验 将受精 6h 的野生型 AB 品系斑马鱼胚胎在显微镜下观察,将发育正常的胚胎随机转入 12 孔板中,每孔 20 个胚胎,3ml 不同硼砂浓度的养殖水,每个浓度 3 个重复孔。硼砂浓度梯度设为 0.3mg/ml、0.6mg/ml 和 0.9mg/ml,不加硼砂的设为空白对照。每日对斑马鱼胚胎或幼鱼进行观察并记录数据,将死亡的胚胎或幼鱼即时清除,以受精后小时(hpf)为时间段,在受精 48h 更

换新的硼砂浓度的养殖水。每天对斑马鱼的自主活动次数、心率、孵化数、畸形数和死亡数进行记录。利用肝脏荧光且发育正常的肝脏转基因 T3(lfabp:EGFP)品系斑马鱼幼鱼研究硼砂对肝脏发育的影响,在显微镜下挑选发育 72h 的健康幼鱼,将其随机转入 12 孔板中,每孔 20 个胚胎,3ml 不同硼砂浓度的养殖水,每个浓度 3 个重复孔。硼砂浓度梯度为 0.1mg/ml、0.3mg/ml 和 0.5mg/ml,不加硼砂的设为空白对照。每天将死亡的幼鱼即时清除并在给药后 48h 更换新的不同硼砂浓度的养殖水。每天用三卡因溶液将斑马鱼幼鱼麻醉,在体视荧光显微镜下对斑马鱼幼鱼进行拍照并观察绿色荧光肝脏面积大小。

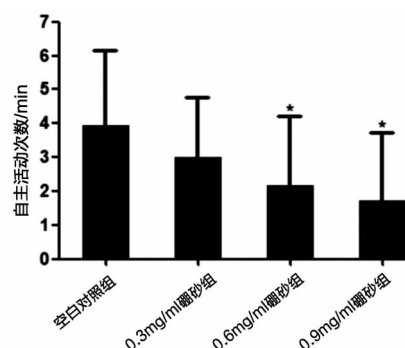
1.4 统计学方法

斑马鱼幼鱼肝脏面积用软件 Image-Pro Plus 5.1 进行统计。使用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 分析,组间两两比较用 Tukey 检验, $P < 0.0167$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 硼砂对斑马鱼胚胎自主活动的影响

斑马鱼胚胎 24hpf,随着硼砂浓度的升高斑马鱼胚胎自主活动次数逐渐降低,其中 0.9mg/ml 硼砂处理组[(1.72 ± 1.99)次/min]斑马鱼胚胎自主活动次数不足空白对照组[(3.94 ± 2.21)次/min]的 50%,具有显著性差异($P < 0.01$)。见图 1。



注:与空白对照组相比,* $P < 0.01$

图 1 硼砂对斑马鱼胚胎自主活动的影响

2.2 硼砂对斑马鱼胚胎孵化率的影响

空白对照组 48hpf 的孵化率为(98.33 ± 2.89)%,硼砂处理组(0.3mg/ml、0.6mg/ml 和 0.9mg/ml)的胚胎已全部孵化,无统计学差异。空

白对照组和硼砂处理组 72hpf 的斑马鱼胚胎均全部孵化。见图 2。

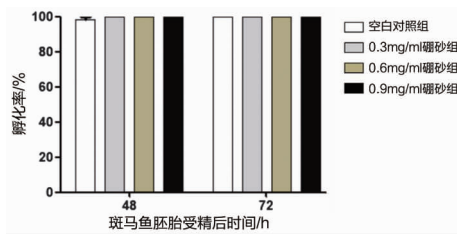
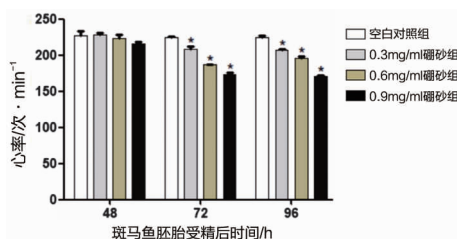


图 2 硼砂对斑马鱼胚胎孵化率的影响

2.3 硼砂对斑马鱼幼鱼心率影响

硼砂各处理组和空白对照组受精 48h 后的斑马鱼胚胎在心率上无统计学差异;72、96hpf 随着硼砂浓度的逐渐升高,斑马鱼幼鱼的心率逐渐降低,硼砂各处理组显著低于空白对照组 ($P < 0.01$)。见图 3。

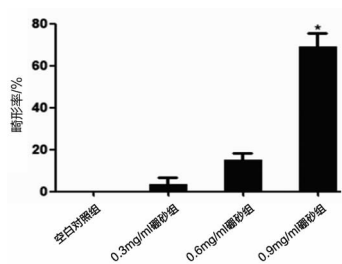


注:与空白对照组相比, $*P < 0.01$

图 3 硼砂对斑马鱼幼鱼心率的影响

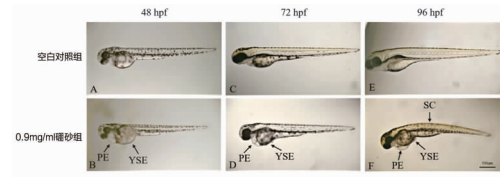
2.4 硼砂对斑马鱼幼鱼畸形率的影响

随着硼砂浓度的升高,96hpf 后的斑马鱼胚胎畸形率逐渐上升(图 4),0.3、0.6mg/ml 硼砂处理组与空白对照组在斑马鱼胚胎畸形率上无统计学差异,0.9mg/ml 硼砂组斑马鱼幼鱼的畸形率达到了 70% ($P < 0.01$)。斑马鱼幼鱼的畸形主要表现为卵黄囊水肿、心包水肿和脊柱弯曲等症状(图 5)。



注:与空白对照组相比, $*P < 0.01$

图 4 硼砂对斑马鱼幼鱼畸形率的影响

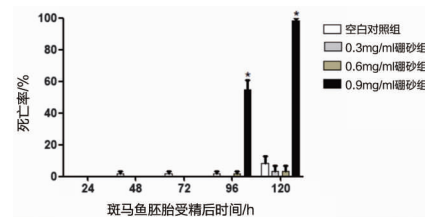


注:YSE. 卵黄囊水肿;PE. 心包水肿;SC. 脊柱弯曲。

图 5 空白对照组和 0.9mg/L 硼砂组斑马鱼幼鱼在不同时间的发育形态

2.5 硼砂对斑马鱼死亡率的影响

硼砂各处理组和空白对照组的斑马鱼胚胎在 24、48、72hpf 死亡率无统计学差异。0.9mg/ml 硼砂组斑马鱼胚胎 96hpf 死亡率显著性升高 ($P < 0.01$),达到了 50% 以上;120hpf 死亡率几乎达到了 100% ($P < 0.01$)。见图 6。



注:与空白对照组相比, $*P < 0.01$

图 6 硼砂暴露对斑马鱼胚胎或幼鱼死亡率的影响

2.6 硼砂对斑马鱼肝脏发育的影响

斑马鱼胚胎 96hpf, 硼砂各处理组和空白对照组肝脏大小无统计学差异,120、144hpf,0.5mg/ml 硼砂组斑马鱼肝脏明显小于空白对照组 ($P < 0.01$)。见图 7,8。

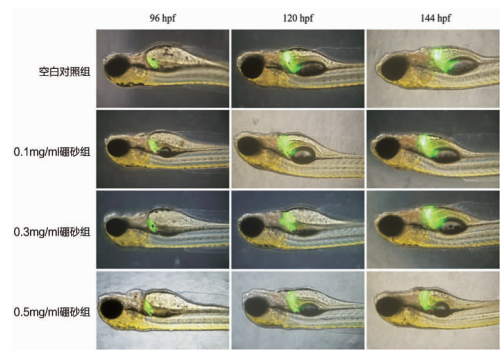
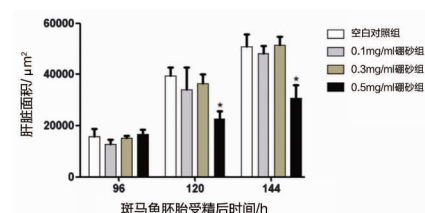


图 7 斑马鱼幼鱼肝脏荧光信号图



注:与空白对照组相比, $*P < 0.01$

图 8 硼砂暴露对斑马鱼幼鱼肝脏的影响

3 讨论

硼砂又叫月石,为硼酸盐类硼砂族矿物,其功效为清热消痰、解毒防腐,常用于治疗咽喉肿痛、口舌生疮、目赤翳障胬肉等。在脊椎动物发育过程中,硼发挥着重要的作用,硼的缺乏会导致妊娠起始和胚胎发育有关的基因下调,导致胚胎发育早期不良。但是高浓度的硼会干扰鸡和大鼠某些器官的发育^[13]。在利用斑马鱼模型对硼砂发育毒性进行研究,斑马鱼胚胎自主活动次数、孵化率、心率、畸形率、畸形形态和死亡率等是重要的评价指标^[14]。高剂量硼可降低鸡胸肌肉纤维中葡萄糖、糖原、乳酸和 ATP 的浓度,破坏肌纤维中线粒体结构,影响其能量代谢^[15]。本文结果显示,斑马鱼的自主活动次数随硼砂浓度的升高逐渐降低,硼砂可降低斑马鱼的自主活动次数和心率,增加死亡率和畸形率(心包水肿,卵黄囊水肿和脊柱弯曲),高浓度的硼砂在受精 120h 死亡率达到 98.3%,在受精 120h 和 144h 后,0.5mg/ml 硼砂处理组斑马鱼肝脏明显小于空白对照组,提示高浓度的硼砂可能破坏斑马鱼体内的能量代谢,这与鸡中的研究结果一致。此外,高剂量的硼可能引起细胞浑浊肿胀^[16],而斑马鱼的畸形是以卵黄囊水肿和心包水肿为主。硼诱发 Gcn2 激酶催化 eIF2 α 的磷酸化,干扰翻译的起始,导致蛋白质合成的抑制作用^[17]。因此,斑马鱼心脏和肝脏等器官的发育受到了抑制。

综上所述,高浓度的硼砂在斑马鱼发育过程中会减少其自主活动次数,增加其畸形率和死亡率,同时抑制心脏和肝脏的发育,具有发育毒性,但是当硼砂浓度低于 0.3 mg/ml 时对斑马鱼发育几乎没有影响,可以作为其安全浓度。在未来,需要进一步对硼砂毒性作用靶点进行分析,确定其毒性机理,为其进一步的应用奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 翟卫红,马富春,晁宏梅. 中药硼砂研究进展[J]. 动物医学进展,2007,28(8):87-91. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2007.08.023.
- [2] 褚红英. 食品中硼砂的检测[J]. 食品安全导刊,2017(6):23. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2017.06.012.
- [3] 刘少伟,阮赞林. “任性”的硼砂丸子[J]. 质量与标准化,2016(11):39-40.
- [4] 李升和. 微量元素硼对大鼠营养和毒性作用及作用机理的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2008.
- [5] 刘敏杰. 硼砂对果蝇生殖力和寿命的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(17):206-208. DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2016.1724.
- [6] 许岩岩,宋青春,陈秀敏. 硼砂对鲫鱼的毒性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017(15):237-239,299. DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.1370.
- [7] 何贝钗,杨雨婷,何育霖,等. 木香挥发油对斑马鱼胚胎发育毒性的初步研究[J]. 中华中医药杂志,2016,31(11):4714-4716.
- [8] Zhang Q, Cheng J, Xin Q, et al. Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. Ecotoxicology, 2015, 24(4):707-719. DOI:10.1007/s10646-015-1417-9.
- [9] Voelz K, Gratacap RL, Wheeler RT, et al. A zebrafish larval model reveals early tissue-specific innate immune responses to *Mucor circinelloides*[J]. Dis Model Mech, 2015, 8(11):1375-1388. DOI:10.1242/dmm.019992.
- [10] 戴明珠,黄燕烽,彭逸,等. 斑马鱼发育毒性致畸性相关实验研究进展[J]. 中国实验动物学报,2020,28(1):137-142.
- [11] Raldua D, Pina B. In vivo zebrafish assays for analyzing drug toxicity[J]. Expert Opin on Drug Met, 2014, 10(5):685-697. DOI:10.1517/17425255.2014.896339.
- [12] 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.
- [13] Hu Q, Li S, Qiao E, et al. Effects of boron on structure and antioxidative activities of spleen in rats[J]. Biol Trace Elem Res, 2014, 158(1):73-80. DOI:10.1007/s12011-014-9899-5.
- [14] 罗隽,梅雪,夏青,等. 醋甘遂不同提取物对斑马鱼幼鱼的毒性[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(4):160-166. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.2018040160.
- [15] Geyikoglu F, Turkez H. Acute toxicity of boric acid on energy metabolism of the breast muscle in broiler chickens[J]. Biologia, 2007, 62(1):112-117. DOI:10.2478/s11756-007-0018-3.
- [16] Bakirdere S, Orenay S, Korkmaz M, et al. Effect of Boron on Human Health[J]. The Open Mineral Processing Journal, 2010, 3(1):54-59. DOI:10.2174/1874841401003010054.
- [17] Uluisik I, Kaya A, Fomenko D E, et al. Boron Stress Activates the General Amino Acid Control Mechanism and Inhibits Protein Synthesis[J]. PLoS One, 2011, 6(11). DOI:10.1371/journal.pone.0027772.

(收稿日期 2020-05-13)

(本文编辑:石俊强)