



氯丙嗪在斑马鱼胚胎和早期幼鱼发育过程中的神经毒性作用

史慧勤, 张利军, 彭辉, 何俊, 郭家彬, 赵君, 彭双清

(军事医学科学院疾病预防控制所毒理学评价研究中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 采用模式动物斑马鱼作为研究对象, 观察氯丙嗪 (*chlorpromazine*, CPZ) 暴露对胚胎和幼鱼早期神经发育的影响。方法 在一般毒性评价的基础上, 通过整体胚胎细胞凋亡检测和脑组织病理学检查, 了解 CPZ 对神经发育的器质性改变; 采用神经行为学方法, 包括幼鱼触动逃避反应、自发运动以及惊恐逃避反射等, 研究氯丙嗪暴露所致的神经发育功能性障碍。结果 斑马鱼胚胎受精后 6 h (6 hpf) ~ 72 hpf 暴露于 CPZ (≥ 5 mg/L) 可引起胚胎和幼鱼死亡、致畸和幼鱼孵化延迟, 并呈浓度和时间依赖性; 采用吖啶橙染色检测 36 hpf 整体胚胎凋亡细胞, 发现凋亡细胞主要集中在胚胎中脑、后脑、丘脑以及中后脑连接区、脊索和尾部等处; 脑组织病理学检测发现 7 dpf 幼鱼颅腔增大、脑体积减小、脑细胞缩小且细胞间隙增宽。6 ~ 72 hpf CPZ (≥ 0.0625 mg/L) 暴露后, 幼鱼神经行为学研究发现, CPZ (≥ 0.125 mg/L) 可引起 3 dpf 幼鱼触觉运动能力下降; CPZ (≥ 0.5 mg/L) 可浓度依赖性地抑制幼鱼自发运动, 并出现僵直不动、震颤或快速刻板式转圈运动等行为改变; 光惊恐实验中, 暗环境下各暴露组幼鱼对突发强光刺激均表现为惊跳逃避, 并且暗-光交替期运动加速度变化与对照组无显著差异; 在撤除光源后, 1 mg/L 和 2 mg/L 暴露组幼鱼暗适应时程缩短, 而 0.125 mg/L 和 0.25 mg/L 暴露组暗适应时程延长, 提示 CPZ 对外界刺激引发的幼鱼活跃游动有抑制和促进双重毒性作用。结论 CPZ 暴露对斑马鱼胚胎和幼鱼具有明显的神经发育毒性作用。模式动物斑马鱼作为一种高通量筛选模型在外源性化合物神经发育毒性评价中具有较好的应用前景。

【关键词】 氯丙嗪; 斑马鱼; 神经发育毒性; 胚胎; 细胞凋亡

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)10-11-0150-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10.11.034

Developmental Neurotoxicity Effect of Chlorpromazine on Zebrafish Embryo and Larvae

SHI Hui-qin, ZHANG Li-jun, PENG Hui, HE Jun, GUO Jia-bin, ZHAO Jun, PENG Shuang-qing
(Evaluation and Research Center for Toxicology, Institute of Disease Control and Prevention,
Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To realize the potentially developmental neurotoxicity of chlorpromazine (CPZ) on zebrafish embryos and larvae. **Methods** The effect of the general toxicity in zebrafish embryos and larvae were assessed after high doses of CPZ (≥ 5 mg/L) administered to zebrafish embryos on 6 - 72 hours post fertilization (hpf). Then, pathology change and cell apoptosis were investigated. Under teratogenic dosage of CPZ (≤ 2.0 mg/L) administered to

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09501-034); 国家科技支撑计划“食品安全关键技术”(2006BAK02A02); 国家 973 计划(2011CB503803) 资助项目。

[作者简介] 史慧勤, 女, 博士生, 研究方向: 药品和食品安全。

[通讯作者] 彭双清, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 药物安全性评价; E-mail: pengsq@hotmail.com。

zebrafish embryos on 6 - 72 hpf, the escape times of 3 dpf larvae in the touched-evoked escape reaction was recorded. Moreover, spontaneous movement and light-evoked startle escape response of 6 dpf zebrafish were tracked and analyzed by using a video-tracking system. **Results** The lethal and teratogenic effects of CPZ was dose-dependent and stage-dependent. Histopathological examination revealed that brain volume and brain cells of 7 dpf larvae have reduced in size. The number of apoptotic cells of 36 hpf embryos has increased in midbrain, hindbrain, hypothalamus, midbrain hindbrain boundary, notochord as well as tail. The weaker tactile sensitivity was displayed when 3 dpf larvae were exposed to CPZ (≥ 0.125 mg/L). Hypoactivity was discovered when 6 dpf larvae were exposed to CPZ (≥ 0.5 mg/L). Furthermore, CPZ also evokes tremor, freezing or stereotypic circling swimming in 6 dpf larvae. CPZ (1.0 mg/L or 2.0 mg/L) can inhibit but CPZ (0.125 mg/L or 0.25 mg/L) can promote hyperactivity by light-evoked startle reaction. **Conclusion** CPZ can cause developmental neurotoxicity on zebrafish embryos and larvae. In addition, zebrafish larvae have obvious advantages to make it a powerful alternative for the developmental neurotoxicity assessment of exogenous compounds by using high-throughput behavioral test methods.

【Key words】 Chlorpromazine; Zebrafish; Developmental neurotoxicity; Embryo; Cell apoptosis

氯丙嗪(chlorpromazine, CPZ), 又称冬眠灵, 属于吩噻嗪类药物, 具有镇静、抗精神病、镇吐等作用, 临床常用于治疗精神分裂症和躁狂症。若长期大量使用, CPZ 易在体内蓄积, 导致人体出现锥体外系反应或迟发性运动障碍, 并且症状在停药后不易消失^[1]。CPZ 作为镇静类治疗药物, 在畜牧行业也被广泛使用。虽然我国规定在动物性食品中该药物不得检出(农业部第 235 号公告), 但由于不合理或非法使用, 导致动物性食品中氯丙嗪污染残留的问题时有发生。另外, CPZ 通过动物排泄物进入土壤和水体, 逐渐成为一种新型的环境污染物。因此, CPZ 其对人类健康的潜在威胁正日益引起人们的关注^[2]。

斑马鱼(Danio rerio) 作为一种与人类基因同源性较高的新型模式动物, 其神经系统简单但能够支配复杂的活动, 可进行运动、学习、记忆等相关评价^[3]。神经行为学研究中水体给药和观察, 鱼产生的应激较小。此外, 因其体型小、占用空间少, 可用于高通量的神经行为学检测。近些年来, 斑马鱼在神经毒理学领域的应用正逐渐受到重视。

本文以斑马鱼为研究对象, 在检测 CPZ 所致一般神经发育毒性效应的基础上, 研究该药引起幼鱼神经行为学改变及神经毒作用特征, 为今后深入研究环境 CPZ 残留的生态毒性效应以及对人类健康的危害提供实验依据, 同时为利用斑马鱼模型建立高通量的神经行为学检测提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及配制

盐酸氯丙嗪(chlorpromazine hydrochloride) ($>$

99.0%) ,Sigma。幼鱼孵化液(30% Danieau's 液)。Danieau's 溶液成分: 58 mM NaCl、0.7 mM KCl、0.4 mM MgSO₄、0.5 mM Ca(NO₃)₂、5 mM HEPES, 调节 PH 值为 7.2。以幼鱼孵化液为溶剂配制不同浓度氯丙嗪受试液, 配制过程尽量避光。吡啶橙, 国药集团化学试剂有限公司, 用 PBS (PH7.2) 配制为 5 mg/ml 母液, 使用时配制为 2mg/L 工作液。麻醉剂 Tricaine Sigma, 用幼鱼孵化液配制为 0.4% 母液, 使用时稀释为 0.08%。

1.2 实验动物养殖和鱼卵采集

实验 AB 系斑马鱼, 取自北京大学生命科学研究院。斑马鱼的养殖和繁殖参照 Westerfield^[4] 方法。水温(28 ± 1) °C, 光照周期 L: D = 14: 10。成鱼雌雄分开饲养。实验前一天傍晚将亲鱼按比例(雌: 雄 = 1: 1) 放入交配缸。次日晨取隔板使其自然交配。采集 30min 内受精卵, 放入盛有孵化液的容器中, 置于 28.5 °C 孵箱, 受精后 2h (2hpf) 镜下检查, 确定发育阶段^[5] 并选择正常受精卵备用。

1.3 实验仪器

主要仪器: Noldus 幼鱼运动行为仪 [Noldus Information Technology, Leesburg, VA (www.noldus.com)]; 体式显微镜(OLYMPUS SZX16); 病理显微镜及成像系统(OLYMPUS, DP71); 电子天平(Sartorius BT224S、LP1200S); 石蜡包埋机(Leica, EG1150H); 旋转式显微镜用薄片切片机(Leica, RM2235)。

1.4 胚胎一般毒性实验

收集 6 hpf 斑马鱼胚胎置于 24 孔板中, 12 个卵/孔。将胚胎暴露于不同浓度的 1mL 氯丙嗪溶液中, 每个浓度组设置 3 个平行。分别于 24、48 hpf 更换一半的试剂, 72 hpf 时全部更换为新鲜孵

化液。对照组施用等量孵化液。以卵凝结和心脏停跳作为死亡终点,在体式显微镜下观察记录 24、48、72 hpf 胚胎和/或幼鱼的死亡数、畸形数及幼鱼孵化数,计算死亡率、畸形率和孵化率,并记录畸形特征。

1.5 胚胎或幼鱼病理学观察

6~36 hpf 暴露组胚胎经 2 mg/L 吖啶橙染色 1 h,方法参见^[6],Tricaine 麻醉后在荧光显微镜下观察整体胚胎凋亡细胞分布;将 6~72 hpf 暴露组幼鱼养至 7 dpf,取畸形幼鱼麻醉后固定并制成石蜡切片,方法参见^[7],HE 染色后显微镜下观察脑部组织细胞形态变化。

1.6 幼鱼机械触动逃避反射试验

选择对幼鱼生存和发育未造成明显影响的暴露浓度,经 6~72 hpf 暴露后,取 3 dpf 幼鱼置于盛有孵化液直径为 60 mm 的平皿中,放在印有数个直径为 1 cm 圆圈的塑封纸上。轻移平皿使幼鱼置于圆心位置,然后用探针轻触幼鱼尾部,记录幼鱼游动并逃出圈外的次数。受试幼鱼每浓度组 10 条,触动次数为 20 次/条。设正常对照。

1.7 幼鱼自发运动观察

选择未对幼鱼造成明显畸形的暴露浓度,经 6~72 hpf 暴露后,正常养至 6 dpf。取外观正常幼鱼放入 24 孔板中,24 条/浓度组。开启 Noldus 幼鱼运动行为仪,采集 3 min 幼鱼自发运动视频。应用 Ethovision XT 软件(Noldus Information Technology)将运动轨迹可视化,导出移动距离、运动速度等运动参数。实验设 3 次重复,同时设正常对照。实验时间:12:00~15:00。

1.8 幼鱼对强光刺激的惊恐逃避反射试验

将 2.7 同批暴露的幼鱼放入 24 孔板中,24 条/浓度组。控制 Noldus 幼鱼运动行为仪采集 7 min 幼鱼运动视频,其中前、后 3 min 无光照,中间 1 min(即第 4 min)突然开启底灯强光照 1 min 后迅速关闭。应用 Ethovision XT 软件导出运动速度、运动距离等参数。实验设 2 次重复,设正常对照。实验时间为 18:30~20:00。

1.9 结果统计和分析

应用 SPSS11.5 软件计算半数致死浓度(LC₅₀)和半数致畸浓度(EC₅₀)。计算致畸指数 TI = LC₅₀/EC₅₀;将运动参数按浓度组汇总,进行单因素 One-Way 方差分析,比较组间量-效相关性或组内的时效关系。

2 结果与分析

2.1 氯丙嗪对斑马鱼胚胎的一般毒性作用观察

在 72 hpf 内,氯丙嗪暴露浓度 > 5.0 mg/L 时,可引起斑马鱼胚胎可出现浓度依赖性死亡; > 2.5 mg/L 致畸作用和胚胎孵化迟滞具有量效关系(图 1-3)。72 hpf 幼鱼 LC₅₀ = 9.23 mg/L; EC₅₀ = 5.44 mg/L; 致畸指数 TI = 1.69 > 1 结合畸形表现:卵黄突出、头部和眼部发育不良、脊索弯曲、短尾、围心包水肿并伴有细胞沉积(图 4),提示该药对斑马鱼胚胎组织尤其是神经发育有潜在致畸效应。

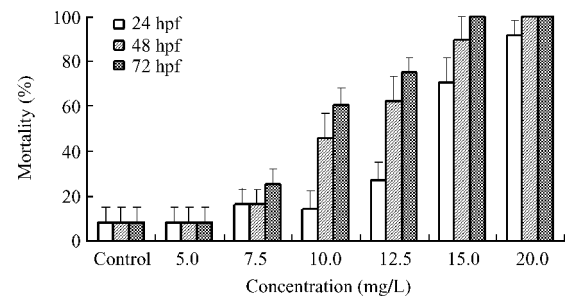


图 1 6hpf 暴露于不同浓度氯丙嗪后斑马鱼胚胎的总死亡率(n = 36)

Fig. 1 The cumulative mortality in zebrafish embryos at 24, 48 and 72 hpf upon exposed to different CPZ concentrations (0, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 and 20.0 mg/L) from 6 hpf (n = 36)

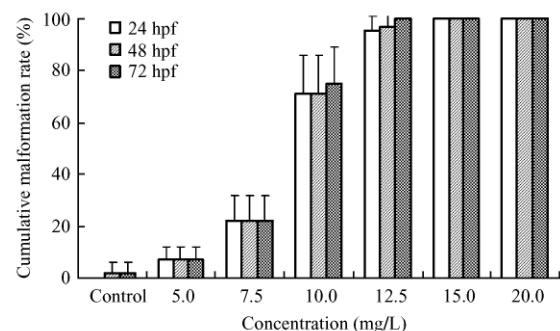


图 2 6hpf 暴露于不同浓度氯丙嗪后斑马鱼胚胎的总畸形率(n = 36)

Fig. 2 The cumulative malformation rate in zebrafish embryos at 24, 48 and 72 hpf upon exposed to different CPZ concentrations (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 and 15.0 mg/L) from 6 hpf (n = 36)

2.2 氯丙嗪对斑马鱼胚胎中枢神经系统的病理学观察

整体胚胎吖啶橙染色后发现, ≥ 5 mg/L 暴露组胚胎(36 hpf)体内凋亡细胞主要分布于中后脑连接

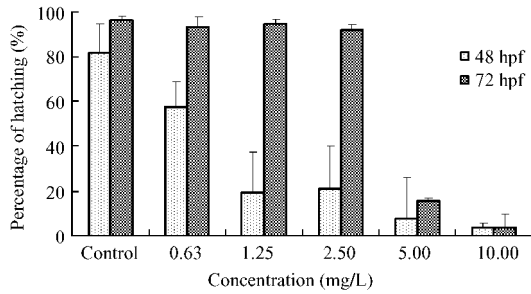


图 3 6hpf 暴露于不同浓度氯丙嗪后斑马鱼胚胎的总孵化率 (n = 36)

Fig. 3 Percentage of hatching in zebrafish embryos/larvae at 48 and 72 hpf upon exposed to different CPZ concentrations (0, 0.63, 1.25, 5.00 and 10.00 mg/L) from 6 hpf (n = 36)

处、中脑、后脑、底部丘脑区、脊索及尾部,并有一定的剂量反应趋势(见图 5)。石蜡切片病理检测发现 7 dpf 幼鱼脑发育不良、脑部体积减小、颅腔增大;脑细胞体积减小、脑细胞间隙增大(见图 6)。

2.3 氯丙嗪对斑马鱼幼鱼神经行为学的影响

2.3.1 氯丙嗪暴露对幼鱼(3 dpf)触动逃避反应能力的影响

最高暴露浓度为 1 mg/L,胚胎一般毒理学检测不引起明显致畸(资料未附)。6 ~ 72 hpf 暴露后 3 dpf 幼鱼的触动逃避反射试验发现,≥0.125 mg/L 组幼鱼逃离设定范围的次数减少,对触动刺激的反应敏感性降低(见图 7),结果提示氯丙嗪暴露后幼鱼存在感觉运动障碍。

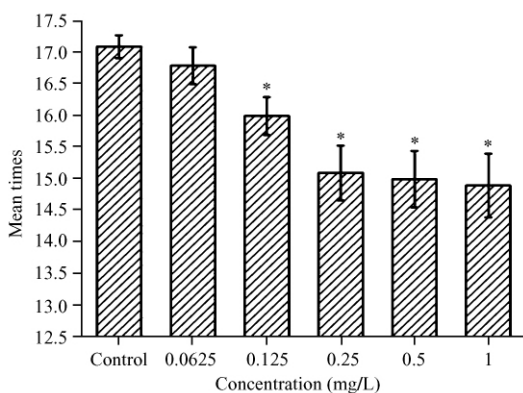


图 7 6 ~ 72 hpf CPZ 暴露后 3 dpf 幼鱼触动逃避次数(平均次数/20 次)(n = 10)

注: * 与正常对照相比。P < 0.05

Fig. 7 The mean escape times of 3 dpf larvae in 20 times tactile sensitivity test after 6 ~ 72 hpf CPZ exposure (n = 10)

* vs control P < 0.05

2.3.2 氯丙嗪暴露对幼鱼(6 dpf)自发运动的影响

在最高暴露浓度为 2.0 mg/L 下,胚胎一般毒理学检测不引起明显致畸效应(资料未附)。6 dpf 幼鱼的自发运动观察及运动轨迹分析表明:与正常对照相比,暴露组幼鱼运动随剂量增加,出现僵直不动、震颤或快速刻板式转圈运动,并且自发触壁游动方式消失(见图 8)。运动参数分析发现,暴露幼鱼自发运动能力受到抑制。最高浓度组(2.0 mg/L)幼鱼的运动速度低于正常对照;因高浓度暴露组运动两级分化,为防止取平均速度掩盖真实情况,按每 10 mm/s 为一个等级将速度分级,分析发现 ≥ 0.5 mg/L 组平均运动等级低于对照组,这与浓度组间 3 min 总移动距离比较结果一致。

2.3.3 氯丙嗪暴露对幼鱼(6 dpf)惊恐逃避反射能力的影响

各浓度组在光照 1 min 内运动速度较之前黑暗期均增快,各浓度组间加速度与对照相比未见明显改变(见图 10)表明在安静(或睡眠)状态下,幼鱼对突发强光刺激表现为瞬时速度加快即惊跳现象,暴露组幼鱼的这种反应能力与对照相比没有显著差异(见图 11)。关闭光源后,对照组幼鱼在 2 min 内即恢复至给光前的水平,而高浓度组(≥1 mg/L)则在 1 min 内就很快降低。值得注意的是,低浓度组(0.125 mg/L 和 0.25 mg/L)经过 3 min 恢复期运动水平与光照期无显著差异,速度不仅高于仍然高于光前而且还高于对照组和高浓度组(见表 1)。此现象提示不同暴露浓度下,幼鱼在惊恐后的恢复过程存在差异,高浓度对光刺激引起的活跃运动有较强的抑制作用,低浓度可能存在一定程度的兴奋效应因而延缓幼鱼的暗适应时程。

3 讨论

氯丙嗪作为中枢神经抑制剂,主要是通过阻断脑内多巴胺 D₂ 受体而产生镇静作用。该药进入机体后主要经肝微粒体药物代谢酶代谢和与葡糖醛酸结合,经肾脏排出, t_{1/2} 为 30 h^[8]。CPZ 进入体内后可分布于全身各组织,以肝、脑等组织含量较高,脑中浓度为血中的 10 倍。由于排出过程缓慢,容易造成机体内药物残留。CPZ 作为一种镇静类兽药,随畜牧业发展,CPZ 被滥用、乱用和非法使用的现象逐渐增多,直接导致了食品性动物和环境中的残留污染问题日益严重。有报道表明,

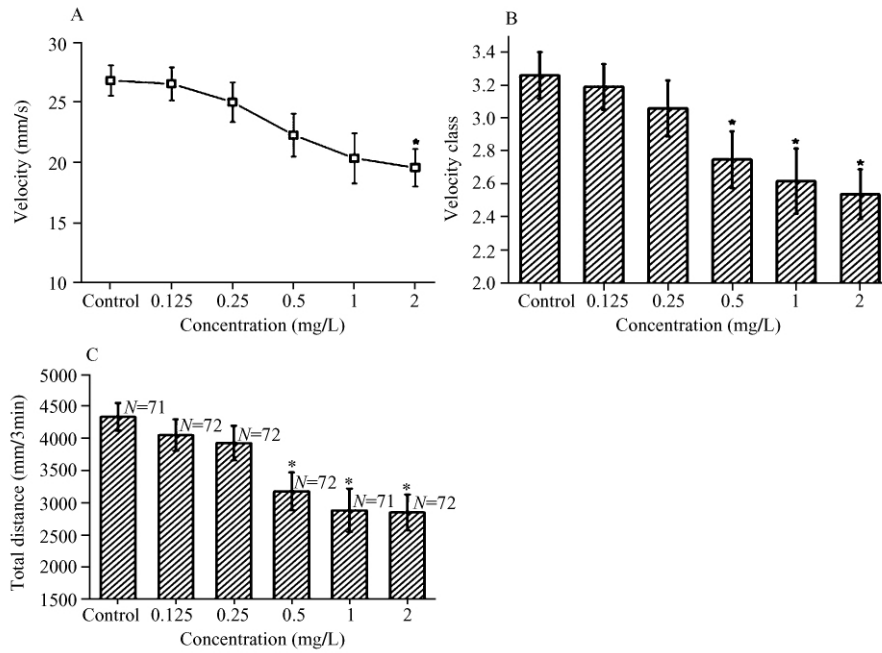


图 9 6~72 hpf CPZ 暴露后 6 dpf 幼鱼自发运动参数分析 (n = 72)

注: A 速度; B 速度等级; C: 3 min 移动距离。其中速度等级分级标准: V (velocity) ≤ 10 mm/s 为 1 级; 10 mm/s < V ≤ 20 mm/s 为 2 级; 20 mm/s < V ≤ 30 mm/s 为 3 级; 以此类推, * 与正常对照相比, P < 0.05

Fig. 9 The 6 dpf larvae behavioral parameter analysis after 6~72 hpf CPZ exposure in the spontaneous movement (n = 72)

A: velocity; B: Velocity class; C: total distance in 3 min. Standard of velocity class increasing a class at every 10 mm/s speed. * vs. controls, P < 0.05

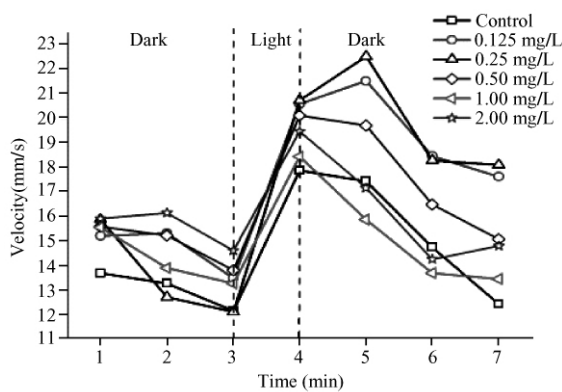


图 10 6~72 hpf CPZ 暴露后光惊恐逃避反射试验中 6 dpf 幼鱼运动速度 (n = 48)

Fig. 10 The velocity changes of 6 dpf larvae in light-evoked startle escape response test after 6~72 hpf exposure to CPZ (n = 48)

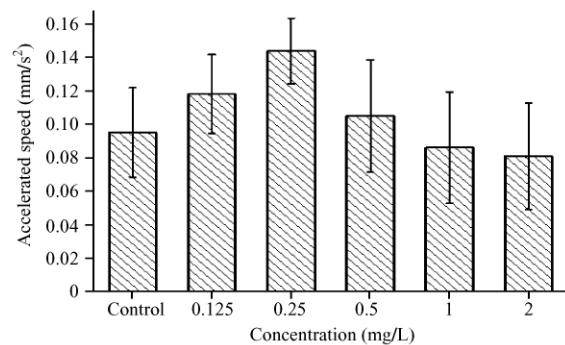


图 11 6~72 hpf 光惊恐逃避反射试验 6 dpf 幼鱼暗-光交替时加速度 (n = 48)

Fig. 11 The accelerated speed changes of 6 dpf larvae at dark-light transition in light-evoked startle escape response test after 6~72 hpf exposure to CPZ (n = 72)

人食用 CPZ 等镇静类药物残留的肉类食品后,可出现意识模糊、嗜睡等症状^[9]。因而,CPZ 作为兽药和环境污染物对人类健康的潜在危害正日益引起人们的重视。

CPZ 具有高度的亲脂性,易透过血脑屏障,婴幼儿药物代谢功能不完善,对其的毒性敏感性要高于成人。有研究表明 CPZ 可抑制小鼠脑细胞内 NO 合成酶和羟酸酯酶的活性^[10,11],从而造成

表 1 光照惊恐逃避反射试验中 6 dpf 幼鱼速度比较

Tab. 1 The velocity comparison of 6 ~ 72 hpf exposure to CPZ on 6dpf larvae tested in light-evoked startle escape response

Concentration (mg/L)	N	Velocity(mm/s)							
		Time(min)	1	2	3	4(light)	5	6	7
0. 125	48		15. 20	15. 30	13. 48	20. 56*	21. 50*	18. 46*	17. 61*☆
0. 25	48		15. 87	12. 70	12. 10	20. 72*	22. 51*	18. 27*	18. 08*☆
0. 5	48		15. 57	15. 21	13. 81	20. 10*	19. 70*	16. 47	15. 06
1. 0	48		15. 55	13. 89	13. 26	18. 42*	15. 86	13. 69	13. 44
2. 0	48		15. 90	16. 14	14. 60	19. 45*	17. 15	14. 24	14. 79
Control	48		13. 67	13. 26	12. 15	17. 86*	17. 43*	14. 74	12. 42

注: * 与同一浓度组前光照前 3min 相比较, $P < 0.05$; ☆: 与同一时间对照组相比, $P < 0.05$.

Note: * : vs. first 3min in the same group; $P < 0.05$. ☆: vs. controls in the same time.

脑神经元损伤。因此本实验采用模式动物斑马鱼胚胎和早期幼鱼作为研究对象,对 CPZ 暴露后引起的斑马鱼神经发育毒性特征进行研究,为探讨 CPZ 对婴幼儿神经发育毒性提供线索。结果发现,一定剂量的 CPZ 暴露具有对斑马鱼胚胎和幼鱼的致畸效应,并可引起胚胎神经细胞凋亡和幼鱼脑发育迟缓。在不引起明显致畸效应的暴露浓度下,CPZ 可引起 6dpf 幼鱼神经行为学的改变。实验结果表明:即使已经脱离暴露 3d,幼鱼的自发运动能力仍可受到 CPZ 的影响,暴露组幼鱼自发运动受到抑制并存在一定的量-效关系,少数幼鱼还存在震颤、僵直不动和刻板式转圈运动等类似锥体外系反应表现。此外,幼鱼在外界刺激发生后恢复时程也发生改变,高剂量对刺激引起的兴奋呈抑制效应,而低剂量则具有促进作用,这与文献^[12]报导的 CPZ 虽引起大鼠活动性抑制但在操作性条件反射活动改变存在剂量反应现象相一致。因此,CPZ 在暴露撤除后对斑马鱼幼鱼仍存在残留效应,

本实验使用模式动物斑马鱼作为神经发育毒性评价对象,除因其具有应用于毒理学研究的共同优点,即实验对象易得、体外发育时间可控、给药方便、透明易观察等特点^[13]外,作为研究神经系统的脊椎动物模型,又有其独特优势^[14]。首先,在发育期的前几天,斑马鱼通体透明,在活体或完整的固定标本中很容易观察染料、荧光示踪剂、抗体和基因探针的分布情况^[15]。许多定性的和定量的生物学终点不用通过人工分离细胞或器官,在完整的斑马鱼神经系统中就能进行快速检测。第二,斑马鱼大脑具有典型脊椎动物脑部形态学特征^[15]。从前到后,从腹面到背面均有具有明确的分区,并且形态发育遵循保守的进化机制。斑马鱼轴突的位置与其他脊椎动物也非常相似。第三,神经系统相关抗体和神经基因序列广泛应用^[16];利用在感觉、运动、脑区神经连接处表达的基因或特异性抗体,能

够将神经构造和轴突的变化可视化,从而对神经毒性作用进行直观评价。第四,斑马鱼具有学习、攻击、运动等一系列的复杂行为^[3],是一种比较好的行为学评价模型。对其进行适应性、学习、记忆等相关评价,能够分析早期毒物的暴露对成鱼的视神经和中枢神经的毒性作用。此外,斑马鱼的运动行为按照固定的顺序发育,是评价药物对运动神经发育毒性作用的依据。

本实验中 0. 125 mg/L CPZ 暴露即可引起 3 dpf 幼鱼对触动敏感性下降,参照文献^[17]粗略估算 CPZ 对斑马鱼胚胎的暴露量约为 0. 7 mg/kg,接近或低于小鼠的神经毒作用剂量(1. 2 mg/kg)^[12,18],但值得注意的是,在撤除 0. 125 ~ 2. 0 mg/L CPZ(约为 0. 7 ~ 11. 2 mg/kg 暴露量)3 d 后,斑马鱼幼鱼运动仍能表现类似锥体外系反应或迟发型运动障碍等表现症状,并且条件反射活动改变与小鼠实验相似,同时,幼鱼还存在体型小(5 ~ 6 mm)、占用空间少,具有进行运动行为学的高通量筛选的优势,因而与啮齿动物模型相比,应用斑马鱼胚胎和早期幼鱼作为实验对象进行外源性化合物的神经发育毒性评价更为敏感、经济和快捷。至于如何把斑马鱼神经毒性的实验结果外推到人,还存在很多未解的问题,如斑马鱼胚胎和人类相比对特殊化合物和普通药物种类的灵敏性和易感性;以水为载体的斑马鱼 ADME 与通过其他途径用药的人类 ADME 之间的可比性等,都还需要我们在今后的实践应用中不断积累经验,逐步加以解决。

参考文献:

[1] 鲁桂芳,滕青贤. 氯丙嗪不良反应回顾性分析[J]. 中国医院用药评价与分析 2007, 7 (5): 388 - 390.
 [2] 李婷,周启星. 氯丙嗪生态毒理效应与人体健康影响研究与展望[J]. 生态学杂志 2006, 25(12): 1554 - 1558.
 [3] Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? [J]. Genes Brain

- Behav, 2004, 3, 63-74.
- [4] Westerfield M. The zebrafish book (4th) [M]. Eugene: University of Oregon Press, 2000.
- [5] Kimmel C., Ballard W. W., Kimmel S. R., et al. Stages of embryonic development in the zebrafish [J]. *Dev. Dyn.*, 1995, 203: 253-310.
- [6] Gu A., Shi X., Yuan C., et al. Exposure to fenvalerate causes brain impairment during zebrafish development [J]. *Toxicology Letters*, 2010, 197: 188-192.
- [7] 袁广明, 胡黎平, 李燕, 等. 成年斑马鱼石蜡连续切片的制作和苏木精-伊红染色 [J]. *解剖学研究* 2006, 28(1): 173-75.
- [8] 李瑞. 药理学(第5版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005, 134-135.
- [9] 张春旺, 潘心红, 冯彩群. 一起由氯丙嗪引起的食物中毒的快速测定 [J]. *中国卫生检验杂志* 2001, 11(1): 109-110.
- [10] Lores-Arnaiz S., D'Amico G., Czerniczyniec A., et al. Brain mitochondrial nitric oxide synthase: in vitro and in vivo inhibition by chlorpromazine [J]. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004, 430: 170-177.
- [11] Radenovic L., Kart elija G. Chlorpromazine treatment induced inhibition of intracellular biochemical activity of mouse brain issue [J]. *Acta Vet. Beogr.*, 2000, 50(5-6): 361-373.
- [12] Tsay H. J., Wang. Y. H., Chen W. L., et al. Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2007, 29: 562-569.
- [13] 孙智慧, 贾顺姬, 孟安明. 斑马鱼: 在生命科学中畅游 [J]. *生命科学* 2006, 18(5): 431-436.
- [14] Parng C., Roy N. M., Ton C., et al. Neurotoxicity assessment using zebrafish [J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2007, 55, 103-112.
- [15] Patarnello T., Bargelloni L., Boncinelli E., et al. Evolution of *Emx* genes and brain development in vertebrates [J]. *Proc. Biol. Sci.* 1997, 264, 1763-1766.
- [16] Tropepe V., Sive H. L. Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism? [J]. *Genes Brain Behav.* 2003, 2, 268-281.
- [17] 罗质璞, 徐玉坤, 王静明. 宁静剂对大鼠固定比率操作行为的影响 [J]. *军事医学科学院院刊*, 1986, 10(4): 282-285.
- [18] Simón V. M., Parra A., Miñarro J., et al. Predicting how equipotent doses of chlorpromazine, haloperidol, sulpiride, raclopride and clozapine reduce locomotor activity in mice [J]. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 2000, 10: 159-164.

(修回日期)2011-09-19

(上接第 161 页)

- [6] Lilienblum W., Dekant W., Foth H., et al. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH) [J]. *Arch Toxicol.* 2008, 82: 21-236.
- [7] http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/Atpanelrpt06/ATpanelrpt.pdf
- [8] Basketter DA, York M, McFadden JP, et al. Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis*. 2004, 51: 1-4.
- [9] Krewski D, Acosta D, Andersen M, et al. Toxicity testing in the 21st century: a vision and strategy [J]. *J Toxicol Environ Health B*. 2010, 13: 51-138.
- [10] Vliet E. Current standing and future prospects for the technologies proposed to transform toxicity testing in the 21st century [J]. *ALTEX*. 2011, 28: 17-44.
- [11] Jaworska J, Hoffmann S. Integrated Testing Strategy (ITS) - Opportunities to better use existing data and guide future testing in toxicology [J]. *ALTEX*. 2010, 27: 231-42.
- [12] 中国科学技术协会. 2010~2011 毒理学学科发展报告 [M]. 北京: 中国科学技术出版社. 2011: 16-35.
- [13] 刘密凤, 郭家彬, 彭双清. 体外方法在药物急性毒性评价中的应用 [J]. *毒理学杂志*. 2007, 21: 235-238.
- [14] 刘密凤, 彭双清, 陈显红等. 抗艾滋病候选药物 DCK 系列化合物毒性评价 [J]. *中国新药杂志*. 2007, 16(5): 370-373.
- [15] Zhao J, Wang Q, Xu J, Liu G, et al. Cyclovirobuxine D inhibits the currents of HERG potassium channels stably expressed in HEK293 cells [J]. *Eur J Pharmacol.* 2011, 660: 259-267.
- [16] 徐江, 彭双清, 翁谢川. hERG 钾离子通道表达系统的建立及其对药物致 QT 间期的影响 [J]. 2007, 21: 325.
- [17] Van Wobus AM, Löser P. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research [J]. *Arch Toxicol.* 2011, 85: 79-117.
- [18] Liao Y, Peng SQ, Zhang LS. Gene expression profile of isoniazid liver-injured rat using cDNA microarray [J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2009, 31: 308-314.
- [19] Shuai Y, Guo J, Dong Y, et al. Global gene expression profiles of MT knockout and wild-type mice in the condition of doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Toxicol Lett.* 2011, 200: 77-87.
- [20] Liao Y, Peng SQ, Yan XZ, et al. Metabonomic profile of urine from rats administrated with different treatment period of rifampin [J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2008, 30: 696-702.

(修回日期)2011-09-16

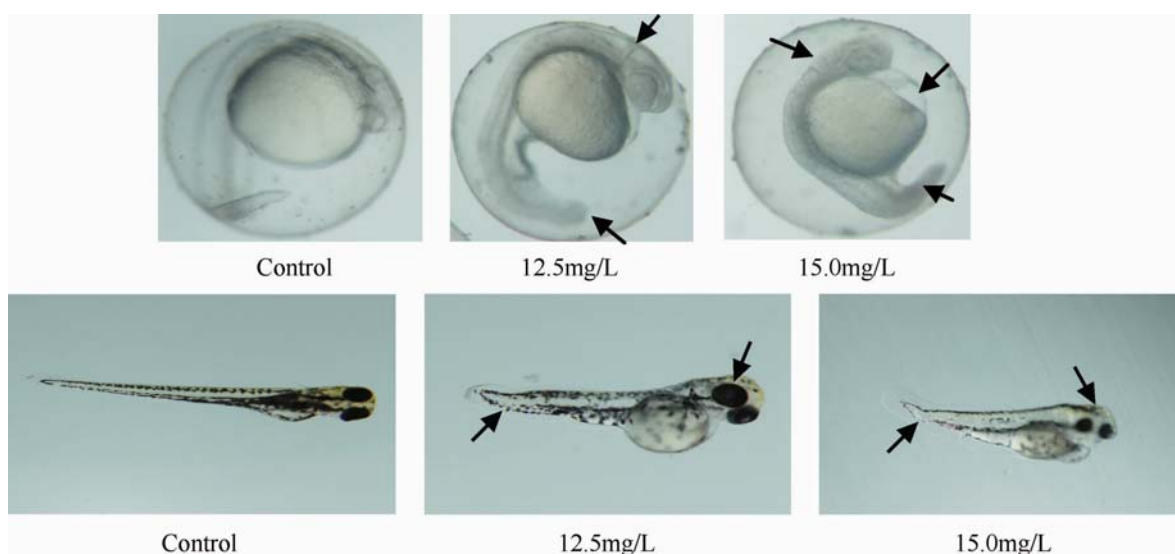


图 4 氯丙嗪对斑马鱼致畸特征(上:24 hpf 胚胎 下:72 hpf 幼鱼)

Fig. 4 The teratogenic feature of CPZ to 24 hpf zebrafish embryos and 72 hpf larvae

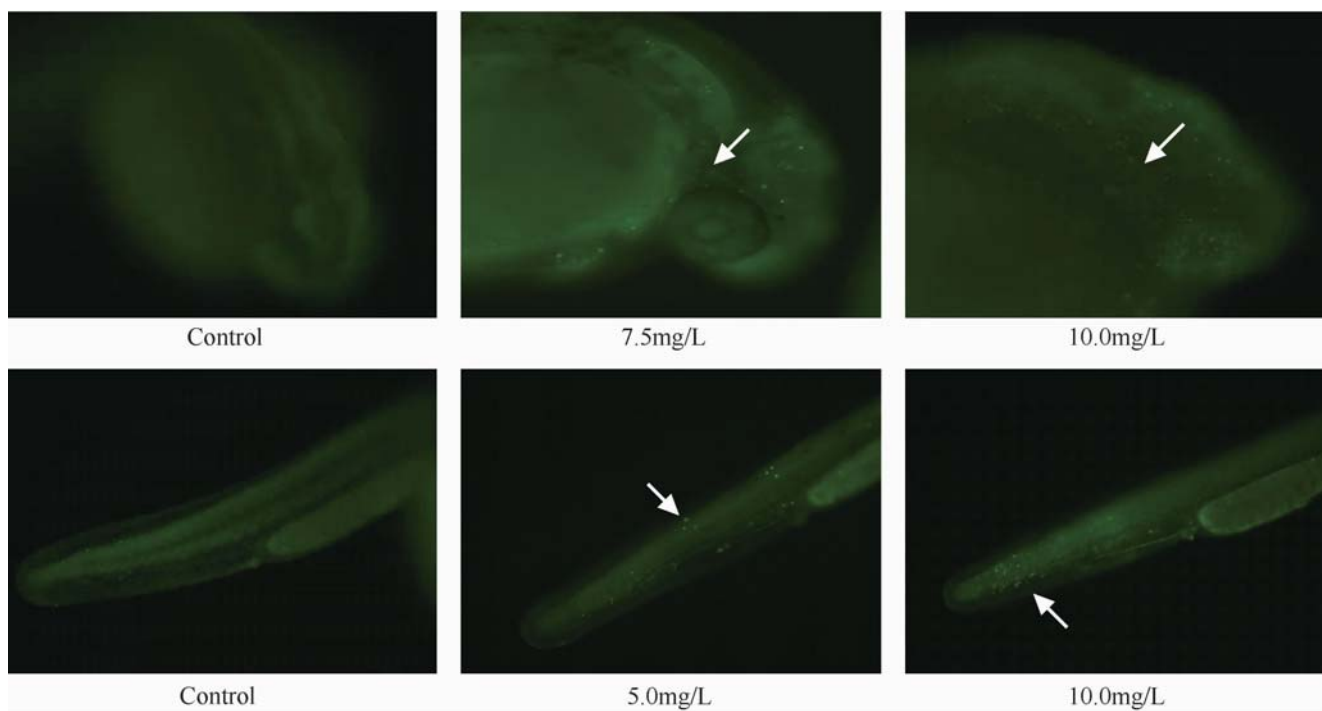


图 5 氯丙嗪暴露后 36 hpf 胚胎凋亡细胞分布

Fig. 5 Apoptotic signals of 36 hpf zebrafish embryos revealed by acridine orange staining after CPZ exposure

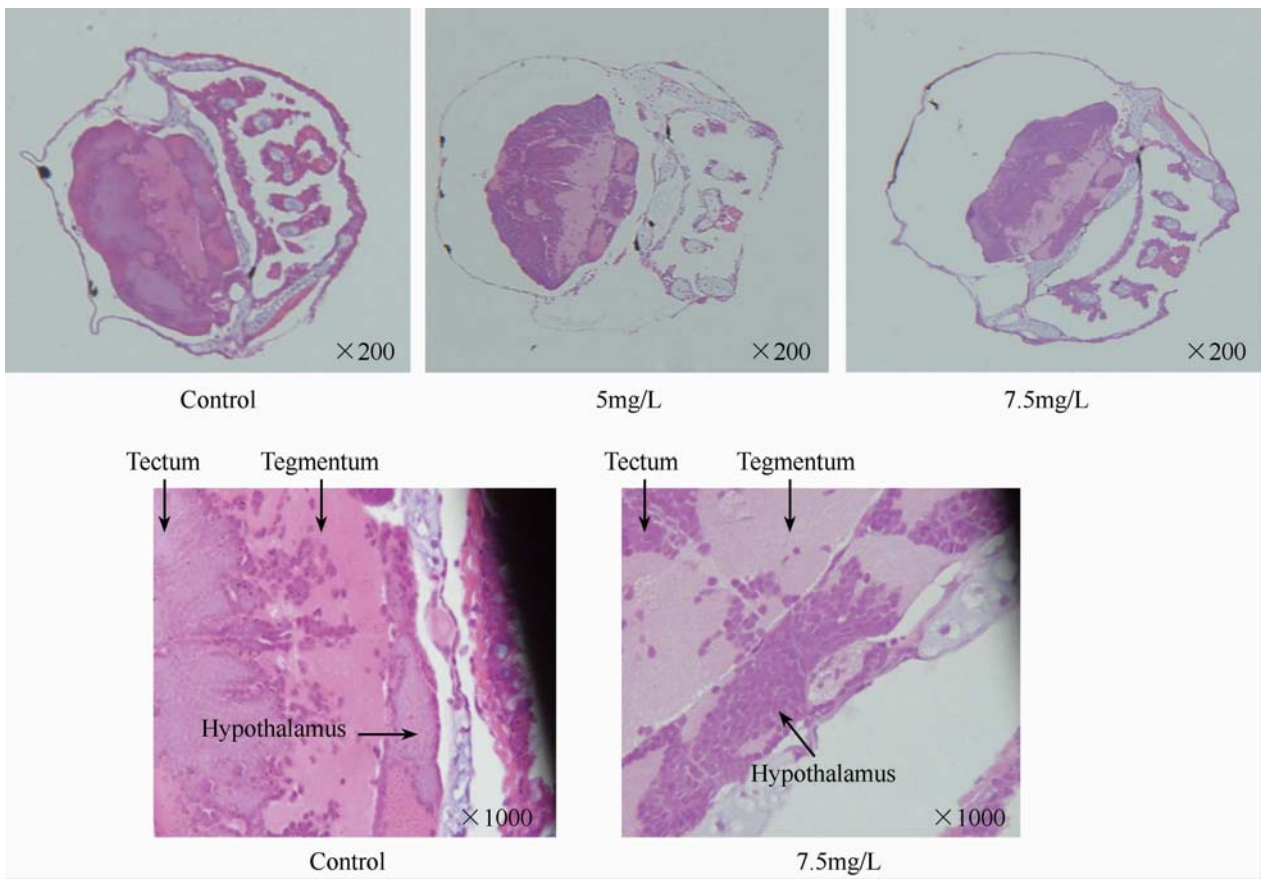


图 6 6-72hpf CPZ 暴露后 7dpf 幼鱼脑组织病理切片 (HE 染色)

Fig. 6 The pathology change in brain of 7dpf zebrafish larvae after 6-72hpf CPZ exposure

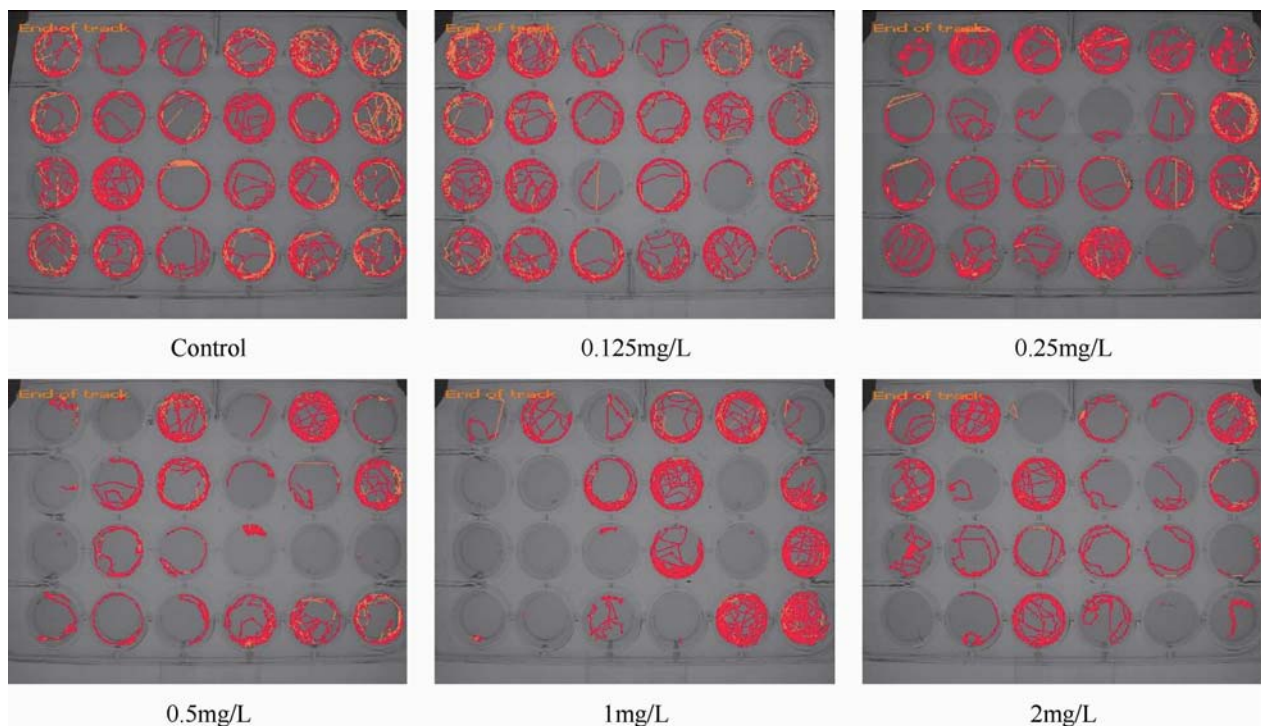


图 8 6-72 hpf CPZ 暴露后 6 hpf 幼鱼自发运动轨迹

Fig. 8 The track of 6hpf larvae locomotion after 6-72 hpf CPZ exposure