

· 研究报告 ·

河豚毒素对斑马鱼的急性毒性研究

王浩能², 张吉芊竹¹, 李劲锋¹, 贾睿³, 朱玉平⁴, 朱江波¹, 陈基快¹, 严朗¹ (1. 中国人民解放军海军军医大学卫生毒理学教研室, 上海 200433; 2. 中国人民解放军海军军医大学舰船辐射医学防护教研室, 上海 200433; 3. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306; 4. 中国人民解放军海军军医大学基础医学院实验教学中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 研究河豚毒素对斑马鱼的急性毒性。方法 在斑马鱼中用最大非致死浓度(MNLC)和 10% 致死浓度(LC₁₀)测定和评估河豚毒素的急性毒性。结果 经 Origin 8.0 软件模拟, 得出河豚毒素对斑马鱼急性毒性 MNLC 为 8.62 μmol/L, LC₁₀ 为 15.2 μmol/L。在本实验条件下, 16.0 μmol/L 及以上浓度河豚毒素可诱发斑马鱼心包水肿和心律异常, 终点时出现部分或全部死亡。河豚毒素的急性毒性靶器官是心脏和肝脏, 主要表现为心包水肿、心律异常和卵黄囊吸收延迟, 毒性出现浓度为 0.958 μmol/L。结论 河豚毒素对斑马鱼具有一定的心脏和肝脏毒性, 且其毒性与河豚毒素的浓度相关。

[关键词] 河豚毒素; 斑马鱼; 急性毒性

[中图分类号] R992

[文献标志码] A

[文章编号] 2097-2024(2022)06-0536-04

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202202083

The acute toxicity of tetrodotoxin to zebra fish

WANG Haoneng², ZHANGJI Qianzhu¹, LI Jingfeng¹, JIA Rui³, ZHU Yuping⁴, ZHU Jiangbo¹, CHEN Jikuai¹, YAN Lang¹ (1. Department of Health Toxicology, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Marine Radiation Medicine, Naval Medical University, Shanghai 20043, China; 3. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Basic Medical Experimental Teaching Center, Basic Medical College, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the acute toxicity of tetrodotoxin to zebra fish. **Methods** The maximum non-lethal concentration (MNLC) and 10% lethal concentration (LC₁₀) determinations were used to assess the acute toxicity of tetrodotoxin. **Results** According to the simulation calculation of Origin 8.0 software, the MNLC was 8.62 μmol/L and 15.2 μmol/L for LC₁₀. Under the experimental conditions, tetrodotoxin at a concentration of 16.0 μmol/L and above induced pericardial edema and arrhythmia, leading to the death of zebra fish. The target organs for acute toxicity of tetrodotoxin were the heart and liver. The main manifestations were pericardial edema, arrhythmia, and delayed yolk sac absorption. The toxicity appeared at a concentration of 0.958 μmol/L. **Conclusion** Tetrodotoxin has heart and liver toxicity to zebra fish, and its toxicity is dose-dependent.

[Key words] tetrodotoxin; zebra fish; acute toxicity

河豚毒素是一种钠通道阻滞剂, 可以导致人类中毒和死亡^[1]。河豚毒素不仅存在于河豚科的河豚中, 而且在海洋和陆地环境的多种生物中均有发现^[2-4]。河豚毒素作用时具有选择性, 其与心肌 NaV 通道缺乏亲和力, 且无法穿透血脑屏障, 这些特性使其成为麻醉和镇痛药物设计的有吸引力的候选者^[5]。河豚毒素的毒理作用在神经性、急性和炎症性疼痛模型中得到证实^[6-8]。在远低于半数致死剂量(LD₅₀)的浓度下, 河豚毒素对神经系统的急性性和瞬时作用

使其在最低浓度时即可达到预期结果^[9]。然而, 河豚毒素的高毒性引发人们对其安全性问题的关注, 本文利用斑马鱼模型研究河豚毒素的急性毒性, 旨在为评价河豚毒素的安全性提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

河豚毒素 [中洋生物科技(上海)股份有限公司, 批号: 2020102307], 用醋酸盐缓冲液配制成 10.0 mmol/L 母液, 冷藏避光储存。斑马鱼饲养于 28 °C 的养鱼用水中(水质: 每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐, 电导率为 450 ~ 550 μS/cm, pH 为 6.5 ~ 8.5, 硬度为 50 ~ 100 mg/L CaCO₃), 由杭州环特生物科技股份有限公司养鱼中心繁殖提供, 实

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2019YFC0312604)

[作者简介] 王浩能, 助理实验师, 研究方向: 药物安全性评价, Email: wanghaoneng@smmu.edu.cn

[通信作者] 严朗, 讲师, 研究方向: 毒理学研究, Email: langyan@smmu.edu.cn

验动物使用许可证号为: SYXK(浙)2012-0171, 饲养管理符合国际 AAALAC 认证(编号: 001458)的要求。野生型 AB 品系斑马鱼, 以自然成对交配繁殖方式进行, 年龄为受精后 2 d(2 dpf)。

1.2 研究方法

1.2.1 最大非致死浓度 (MNLC) 和 10% 致死浓度 (LC₁₀) 的测定

随机选取 2 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼于 6 孔板中, 每孔(实验组)均处理 30 尾斑马鱼。分别水溶给予河豚毒素(浓度为 0.125、0.250、0.500、1.00、2.00、4.00、8.00、16.0、32.0、64.0 $\mu\text{mol/L}$), 同时设置正常对照组和溶剂对照组, 每孔容量为 3 ml。28 $^{\circ}\text{C}$ 处理 72 h, 每天统计各实验组的斑马鱼死亡数量并及时移除。

1.2.2 急性毒性检测

实验结束后, 在解剖显微镜下观察并记录斑马鱼心脏、循环系统、出血及血栓、脑、下颌、眼睛、肝脏、肾脏、肠道、躯干/尾/脊索、肌肉/体节、身体着色、体长等变化情况, 采集典型毒性器官照片。以各器官的毒性发生率评价河豚毒素样品对斑马鱼的急性毒性, 并鉴别毒性靶器官。

1.3 统计学方法

用 Origin 8.0 统计学软件绘制“浓度-死亡率”效应曲线, 并计算河豚毒素对斑马鱼的 MNLC 和 LC₁₀。

2 结果

2.1 最大非致死浓度和 10% 致死浓度

研究结果显示, 正常对照组和溶剂对照组斑马鱼的死亡率均为 0; 0.125 ~ 8.00 $\mu\text{mol/L}$ 的河豚毒素处理后斑马鱼的死亡率均为 0; 当河豚毒素的浓度达到 16.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 斑马鱼死亡 4 尾, 死亡率为 13%, 当河豚毒素的浓度达到 32.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 斑马鱼死亡 29 尾, 死亡率为 97%, 而当河豚毒素的浓度达到 64.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 斑马鱼死亡 30 尾, 死亡率为 100%。经 Origin 8.0 软件模拟得出河豚毒素对斑马鱼急性毒性 MNLC 为 8.62 $\mu\text{mol/L}$, LC₁₀ 为 15.2 $\mu\text{mol/L}$, 详见图 1。

2.2 急性毒性

在本实验条件下浓度摸索过程中, 16.0 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度诱发心包水肿和心律异常, 河豚毒素处理后 72 h 出现部分或全部死亡。如表 1 和图 2、图 3 所示, 河豚毒素急性毒性靶器官是心脏和肝脏, 当河豚毒素的浓度达到 0.958 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时, 斑马鱼表现出卵黄囊吸收延迟。当河豚毒素的

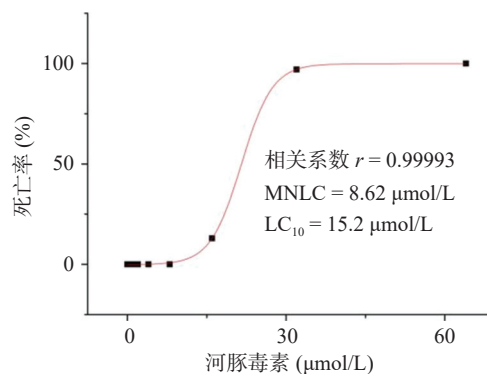


图 1 河豚毒素“浓度-死亡率”曲线

浓度达到 2.87 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时斑马鱼表现出心律异常和肠腔异常。当河豚毒素浓度达到 8.62 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时斑马鱼表现出心包水肿。不同浓度的河豚毒素均未发现躯干/尾/脊索、肌肉/体节、身体着色以及体长生长等异常。

3 讨论

河豚毒素是一种致命的神经毒素, 作为一种选择性 Na⁺通道阻滞剂, 其在生物学中的应用引起了广泛关注^[10]。日本传统医学中曾使用河豚鱼来治疗麻风病患者的神经痛, 后来河豚毒素被发现、提取和纯化, 并用于抑制破伤风患者的痉挛^[11]。近年来, 在双壳贝类中也发现了河豚毒素。例如, 2011 年在新西兰发现一种蛤类中的河豚毒素(0.8 mg/kg)^[12], 2014 年英国学者发现贻贝和太平洋牡蛎样本中的河豚毒素(0.003 ~ 0.12 mg/kg)^[13]。这些证据表明, 河豚毒素对于食品安全来说具有一定的威胁, 因此, 国际食品和药品监管机构将河豚毒素作为一种新的风险。

在本研究中我们通过使用 MNLC 和 LC₁₀ 这两个指标, 以评估河豚毒素对斑马鱼的急性毒性。研究发现, 当河豚毒素的浓度达到 16.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 斑马鱼出现了心包水肿和心律异常, 导致部分或者全部的斑马鱼死亡。有研究证实, 选择性激活河豚毒素敏感的神经元钠通道可以安全地增加心脏收缩力^[14]。还有研究结果显示, 河豚毒素的肌肉内给药改变了肝脏中参与各种信号通路的肝脏基因的表达^[15]。由此可见, 河豚毒素对斑马鱼具有明显的心脏和肝脏毒性, 且其毒性随着河豚毒素浓度的升高而增强。

目前, 尚无针对河豚毒素的解毒剂, 一旦摄入河豚毒素, 严重中毒者可发生心力衰竭甚至死亡^[16]。多年前有研究者收治了 5 例河豚毒素中毒者, 患者出现了肾脏损害, 表现为多尿, 经过治疗后仍有患

表 1 河豚毒素急性毒性发生率统计 (n=30)

毒性类型		正常对照组	溶剂对照组	河豚毒素浓度(μmol/L)			
				0.958	2.87	8.62	15.2
心脏	心包水肿	-	-	-	-	7(2/30)	13(4/30)
	房室缺失	-	-	-	-	-	-
	心律异常	-	-	-	7(2/30)	7(2/30)	17(5/30)
循环系统	血流变慢	-	-	-	-	-	-
	循环缺失	-	-	-	-	-	-
出血及血栓		-	-	-	-	-	-
脑	畸形	-	-	-	-	-	-
下颌	短小	-	-	-	-	-	-
眼睛	眼变小	-	-	-	-	-	-
	缺失	-	-	-	-	-	-
肝脏	肝肿大	-	-	-	-	-	-
	肝变性	-	-	-	-	-	-
卵黄囊吸收延迟		-	-	80(24/30)	80(24/30)	87(26/30)	93(28/30)
肾脏	水肿	-	-	-	-	-	-
肠道	肠腔异常	-	-	-	7(2/30)	13(4/30)	13(4/30)
躯干/尾/脊索	弯曲	-	-	-	-	-	-
肌肉/体节	肌肉变性	-	-	-	-	-	-
身体着色	异常	-	-	-	-	-	-
体长变短		-	-	-	-	-	-
死亡		-	-	-	-	-	-

注：“-”表示未见明显异常

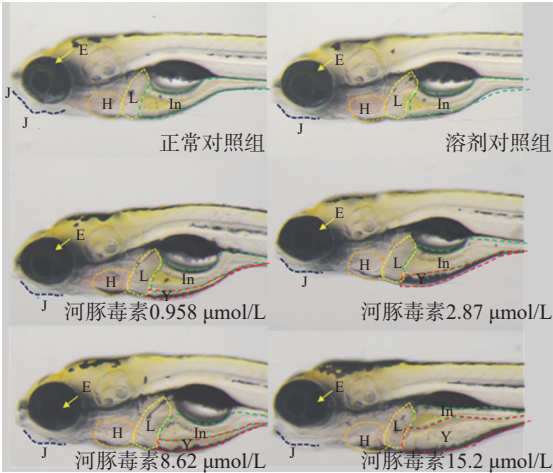


图 2 河豚毒素处理后的斑马鱼毒性表型

注: H.心脏; J.下颌; L.肝脏; Y.卵黄囊; E.眼睛

者死亡^[17]。在日本,监管规定了河豚毒素的摄入量不得超过 2 mg/kg^[11]。目前,关于河豚毒素急性毒性的可用数据非常少,而且现有的大部分数据都缺乏足够的实验细节。有研究者发现,在昆明小鼠腹膜内(ip)、皮下(sc)和胃内(ig)注射的中位致死剂量(LD₅₀)分别为 10.7、12.5、532 μg/kg^[18]。我们



图 3 河豚毒素处理后的斑马鱼体长表型

在斑马鱼模型中研究发现,河豚毒素对斑马鱼急性毒性 MNLC 为 $8.62 \mu\text{mol/L}$, LC_{10} 为 $15.2 \mu\text{mol/L}$, 急性毒性靶器官是心脏和肝脏,主要表现为心包水肿、心律异常和卵黄囊吸收延迟,毒性出现浓度为 $0.958 \mu\text{mol/L}$ 。

本研究还存在一定的不足。作为一种常用于药物毒性评价的模式生物,斑马鱼具有易养殖、繁殖快、成本低等优势,但斑马鱼被用于药物毒性检测时易存在假阳性和假阴性。因此,本研究的结论还需要在其他动物模型中进一步研究。

【参考文献】

- [1] ZIMMER T. Effects of tetrodotoxin on the mammalian cardiovascular system[J]. *Mar Drugs*, 2010, 8(3): 741-762. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20411124/>
- [2] BIESSY L, BOUNDY M J, SMITH K F, et al. Tetrodotoxin in marine bivalves and edible gastropods: a mini-review[J]. *Chemosphere*, 2019, 236: 124404. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31545201/>
- [3] TAMELE I J, SILVA M, VASCONCELOS V. The incidence of tetrodotoxin and its analogs in the Indian Ocean and the red sea[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(1): 28. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30621279/>
- [4] MAGARLAMOV T Y, MELNIKOVA D I, CHERNYSHEV A V. Tetrodotoxin-producing bacteria: detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems[J]. *Toxins*, 2017, 9(5): 166. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28513564/>
- [5] NIETO F R, COBOS E J, TEJADA M Á, et al. Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain[J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(2): 281-305. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22412801/>
- [6] MATTEI C. Tetrodotoxin, a candidate drug for Nav1.1-induced mechanical pain? [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(2): E72. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29470418/>
- [7] SALAS M M, MCINTYRE M K, PETZ L N, et al. Tetrodotoxin suppresses thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in a rat full thickness thermal injury pain model[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 607: 108-113. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26424077/>
- [8] QIU F, JIANG Y G, ZHANG H, et al. Increased expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 with in dorsal root Ganglia in a rat model of bone cancer pain[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 512(2): 61-66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22342308/>
- [9] NEWMAN D J, CRAGG G M. Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current “state of play”[J]. *Planta Med*, 2016, 82(9-10): 775-789. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26891002/>
- [10] JAL S, KHORA S S. An overview on the origin and production of tetrodotoxin, a potent neurotoxin[J]. *J Appl Microbiol*, 2015, 119(4): 907-916. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26178523/>
- [11] LAGO J, RODRÍGUEZ L P, BLANCO L, et al. Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: distribution, toxicity, origin and therapeutical uses[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(10): 6384-6406. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26492253/>
- [12] MCNABB P S, TAYLOR D I, OGILVIE S C, et al. First detection of tetrodotoxin in the bivalve *Paphies australis* by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry with and without precolumn reaction[J]. *J AOAC Int*, 2014, 97(2): 325-333. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24830143/>
- [13] TURNER A D, POWELL A, SCHOFIELD A, et al. Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014[J]. *Euro Surveill*, 2015, 20(2): 21009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25613778/>
- [14] KIRCHHOF P, TAL T, FABRITZ L, et al. First report on an inotropic peptide activating tetrodotoxin-sensitive, “neuronal” sodium currents in the heart[J]. *Circ Heart Fail*, 2015, 8(1): 79-88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25424392/>
- [15] MATSUMOTO T, FERROUDJ H, KIKUCHI R, et al. DNA microarray analysis on the genes differentially expressed in the liver of the pufferfish, *Takifugu rubripes*, following an intramuscular administration of tetrodotoxin[J]. *Microarrays (Basel)*, 2014, 3(4): 226-244. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27600346/>
- [16] 王敏, 臧奎, 尚福泰, 等. 河豚毒素中毒致心跳呼吸骤停1例[J]. *临床急诊杂志*, 2014, 15(1): 54-55. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZZLC201401024&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>
- [17] 张桦, 赵剑. 河豚毒素中毒致急性肾脏损害5例报告[J]. *中国实用内科杂志*, 2002, 22(5): 303. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=SYNK200205028&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>
- [18] 徐勤惠, 黄凯, 高莉莎, 张翰, 荣康泰. 河豚毒素对小鼠和家兔的毒性研究[J]. *卫生研究*, 2003, 32(4): 371-374. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=WSYJ200304022&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>

【收稿日期】 2022-02-28 【修回日期】 2022-06-22

【本文编辑】 陈盛新