

# 阿霉素对模式生物斑马鱼中 *abcb4* 基因表达的影响\*

孙琮杰<sup>1</sup>, 何志旭<sup>1,2△</sup>, 舒莉萍<sup>1,3</sup>, 胡荣英<sup>3</sup>, 何思佳<sup>1</sup>

1. 贵阳医学院 儿科教研室(贵阳 550004); 2. 贵阳医学院 组织工程与干细胞中心(贵阳 550004);

3. 贵阳医学院 免疫学教研室(贵阳 550004)

**【摘要】** 目的 选择斑马鱼作为实验对象,研究阿霉素(doxorubicin, DOX)对其 *abcb4* 基因表达的影响,进一步了解 *abcb4* 基因在斑马鱼多药耐药机制中可能的作用。方法 分别以 2 mL/L 二甲亚砜(DMSO), 10  $\mu$ mol/L DOX 及含 2 mL/L DMSO 的 10  $\mu$ mol/L DOX 对斑马鱼胚胎进行药物处理,另以 Eggwater 处理的胚胎作为对照组。将正常发育的 4~16 个细胞期斑马鱼胚胎,随机分入以上各组中,药物处理至 120 hpf。收集药物处理下的斑马鱼不同时期胚胎运用实时荧光定量 PCR 和胚胎原位杂交技术,检测 *abcb4* 基因在斑马鱼中的表达变化情况。结果 相较于对照组,药物处理的斑马鱼胚胎 *abcb4* 基因 mRNA 表达水平升高( $P < 0.05$ ),而 *abcb5* 基因 mRNA 表达情况则无明显变化。通过斑马鱼胚胎原位杂交,均在斑马鱼 120 hpf 胚胎小肠部位发现有 *abcb4* 基因阳性杂交信号,且药物处理的斑马鱼胚胎在脑及心脏部位发现 *abcb4* 基因阳性杂交信号。结论 DOX 能诱导斑马鱼胚胎 *abcb4* 基因表达水平增高,对阐明 *abcb4* 基因在斑马鱼多药耐药产生机制中的作用具有重要意义。

**【关键词】** 斑马鱼 多药耐药 阿霉素 *abcb4*

**Effect of Doxorubicin on *abcb4* Gene Expression in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos** SUN Cong-jie<sup>1</sup>, HE Zhi-xu<sup>1,2△</sup>, SHU Li-ping<sup>1,3</sup>, HU Rong-ying<sup>3</sup>, HE Si-jia<sup>1</sup>. 1. Department of Pediatrics, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Department of Immunology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China

△ Corresponding author, E-mail: hzx@gmc.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To determine the effect of doxorubicin (DOX) on *abcb4* gene expression and the role of *abcb4* gene in multidrug-resistance. **Methods** Zebrafish embryos were treated with 2 mL/L DMSO, 10  $\mu$ mol/L DOX and 2 mL/L DMSO+10  $\mu$ mol/L DOX, respectively. The zebrafish embryos treated with Eggwater served as controls. Exposures started at 4 to 16 cell stage of the embryos and terminated 120 hours post fertilization (hpf). The expression of *abcb4* gene in zebrafish embryos was examined on 48, 72, 96, and 120 hpf with whole-mount *in situ* hybridization (WISH) and quantitative real-time PCR (qPCR). **Results** Compared with the controls, DOX-exposed embryos had higher level of *abcb4* gene expression ( $P < 0.05$ ), but not for *abcb5* gene. WISH showed that *abcb4* gene was expressed in the guts of zebrafish embryos. However, those exposed to DOX also showed strong WISH signals in the brain and heart. **Conclusion** Doxorubicin increases the expression of *abcb4* gene in zebrafish embryos. *abcb4* gene may play an important role in multidrug-resistance.

**【Key words】** Zebrafish Multidrug-resistance Doxorubicin *abcb4*

ABCB1 (multidrug resistance 1, MDR1) 是 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白家族的主要成员之一。高表达于多种耐药肿瘤细胞中,与肿瘤的多药耐药产生机制密切相关。而化疗药物失败的主要原因,也正是细胞多药耐药的产生所致<sup>[1]</sup>。但是在新型模式生物斑马鱼中,多药耐药机制以及相关基因的研究甚少,且不清楚。为了进一步了解该机制以及相关基因在斑马鱼中的情

况,我们选择了与人类 ABCB1 基因高度同源的斑马鱼 *abcb4* 基因进行初步研究。本研究通过抗肿瘤药物阿霉素(doxorubicin, DOX)对斑马鱼胚胎进行药物暴露实验,运用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)和原位杂交技术检测斑马鱼 *abcb4* 基因在药物暴露实验下表达变化情况,并与人类 ABCB1 基因进行同源性比较,从而初步判断 *abcb4* 基因在斑马鱼多药耐药产生,尤其是介导药物转运过程中可能起到的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、菌株及质粒

\* 国家自然科学基金(No. 31460312)和贵州省科技基础条件平台(黔科平台[2009]4005)资助

△ 通讯作者, E-mail: hzx@gmc.edu.cn

斑马鱼由上海生命科学研究院健康研究所馈赠,为野生 Tubingen 品系。根据 zebrafish book 中的方法进行养殖,以 12 h/12 h 的光照和黑暗时间比例和成年雌雄斑马鱼分开方式进行饲养。*E. coli* DH5 $\alpha$  由本课题组保存,pCS2<sup>+</sup> 质粒载体由上海生命科学院健康研究所馈赠。

## 1.2 试剂及酶类

二甲基亚砜(DMSO)、DOX(Sigma, 美国); IQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix 试剂(Bio-Rad, 美国); TRIzol 试剂、逆转录试剂 First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo, 美国);限制性内切酶 *RcoR* I、*Not* I 以及 T4 DNA 连接酶(Thermo, 美国);高保真 KOD-Plus PCR 酶(TOYOBO, 日本);质粒小抽试剂盒(Axygen, 美国);焦碳酸二乙脂、琼脂糖(西班牙);地高辛 RNA 标记及检测试剂盒、Nuc Away<sup>TM</sup> Spin Columns(Ambion, 美国); DNA 凝胶回收试剂盒(上海申能生物公司, 中国);BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(VECTOR Lab, 美国);胰蛋白胨、酵母提取物、氨卞青霉素(Amresco, 美国)。

## 1.3 胚胎收集

实验前 1 d 以 1:2 或 1:1 的雌雄比例放入产卵缸中,用隔板将雌雄分开。第 2 d 早上,将隔板取出。待雌雄斑马鱼追逐 30 min 后,收集受精卵。将受精卵放入消毒的一次性培养皿中,并使用配制完成的 Eggwater 养殖鱼水洗净,于 28 °C 恒温培养箱中进行培育。以 Kimmel 等<sup>[2]</sup>的方法对发育阶段进行分期,并根据实验要求选取不同繁育阶段的斑马鱼胚胎。

## 1.4 阿霉素药物处理

在体式显微镜下,挑选发育正常的 4~8 个细胞期阶段的受精卵,于 6 孔培养板中进行药物处理,每孔 20 枚,28 °C 恒温保存,暴露时间为 120 h。根据预实验结果,药物处理实验分别设置 4 组,包括①含 2 mL/L DMSO 的 DMSO 实验组,②含 10  $\mu$ mo/L DOX 的 DOX 实验组,③含 2 mL/L DMSO 及 10  $\mu$ mol/L DOX 的 DMSO+DOX 实验组,④对照组(纯 Eggwater 组)。为确保实验准确,在相同实验条件下实验重复 3 次。

## 1.5 *abcb4* 和 *abcb5* 基因表达测定

收集各实验组 48、72、96、120 hours post-fertilization(hpf) 4 个时相的斑马鱼胚胎。分别置于 1.5 mL 试管中,每管约 100 枚。随后加入 1 mL TRIzol 充分混匀处理,室温静置 5 min。经氯仿、异

丙醇、75%乙醇洗涤沉淀晾干后,加入适量 DEPC 水溶解 RNA。将提取的总 RNA 用 First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂在 ABI Veriti 仪上按试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA。反应结束后,用 DEPC 水 3 倍稀释。按照 IQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix 试剂说明制备反应体系,后应用 BIO-RAD CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System 仪进行扩增,扩增条件:95 °C,15 min;95 °C,10 s;58.3 °C,20 s;72 °C 20 s;40 个循环。溶解曲线分析:每 5 s 升高 0.5 °C,从 60 °C 至 95 °C。以  $\beta$ -actin、*GAPDH* 基因作为内参基因,对 *abcb4*、*abcb5* 基因进行相对定量分析。引物根据斑马鱼 *abcb4*、*abcb5* 基因的 mRNA 序列,经 Primer Premier 6 软件进行设计,并由北京奥维森基因科技有限公司进行合成(表 1)。基因相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值进行分析,实验重复 3 次。

表 1 斑马鱼 *abcb4*、*abcb5* 及管家基因的 PCR 引物序列

Table 1 Primer used for quantitative real time PCR of zebrafish *abcb4* and *abcb5* and housekeeping genes with NCBI number and amplicon length

Gene name	NCBI number	Primer sequence (5'-3')	Amplicon length (bp)
<i>abcb4</i>	JQ014001	F: TACTGATGATGCTTGGCTTAATC	159
		R: TCTCTGAAAAGGTGAAGTTAGG	
<i>abcb5</i>	JQ014002	F: CGCTGGTCATTCTGGCTGTC	125
		R: CTCCTCTGCTACCGCTCCAG	
$\beta$ -actin	NM_131031	F: CGAGCAGGAGATGGGAAC	158
		R: CGTGGATACCGCAAGATT	
<i>GAPDH</i>	NM_001115114	F: AGGCAGAAGGGCGCAAAAC	124
		R: AAGACACCACTAGACTCCACAAC	

## 1.6 斑马鱼 *abcb4* 基因片段克隆

根据斑马鱼 *abcb4* 基因的 mRNA 序列(JQ014001, NCBI), 并加入 *RcoR* I、*Not* I 酶切位点以及保护碱基序列,通过 Primer Premier 6.0 软件设计引物序列,并由北京奥维森基因科技有限公司合成。引物序列分别为 F: 5'-CCGGAATTCCTCACAGATGAGCCACTGA-3'; R: 5'-ATAGTTAGCGGCCGCTGTGTGCTAGGAAAACAGTGC-3'。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 15 s,58 °C 退火 30 s,68 °C 延伸 1 min 共 35 次循环;最后延伸 68 °C 10 min。PCR 产物大小为 564 bp,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

## 1.7 斑马鱼 *abcb4* 基因探针重组质粒构建

将 pCS2<sup>+</sup> 质粒转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态菌中,通过氨苄抗药性筛选出阳性克隆。扩增后用质粒小抽试剂盒(Axygen, 美国)提取 pCS2<sup>+</sup> 质粒 DNA,用 *RcoR* I 以及 *Not* I 进行双酶切。再经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后进行割胶回收。将 *abcb4* 基因的 PCR

产物用 *RcoR* I 以及 *Not* I 双酶切, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后进行割胶回收。将经上述得到的 pCS2<sup>+</sup> 质粒与 *abcb4* 基因 PCR 产物通过 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接产物转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态菌中, 通过氨苄抗药性筛选出阳性克隆。扩增后用质粒小抽试剂盒 (Axygen, 美国) 提取 pCS2<sup>+</sup>-*abcb4* 探针重组质粒, 再将 pCS2<sup>+</sup>-*abcb4* 探针重组质粒送北京奥维森基因科技有限公司进行测序, 经 NCBI 检索, 通过 Clustal2X 软件比对来鉴定 pCS2<sup>+</sup>-*abcb4* 探针重组质粒。

### 1.8 地高辛标记的 *abcb4* 基因探针制备

将 pCS2<sup>+</sup>-*abcb4* 重组质粒用 *RcoR* I 进行单酶切。经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定后割胶回收得到线性化的 pCS2<sup>+</sup>-*abcb4* 探针重组质粒。利用 T3 RNA 体外转录体系以线性化的 pCS2<sup>+</sup>-*abcb4* 探针重组质粒 DNA 为模板, 以地高辛标记的 dNTP 为原料转录得到地高辛标记的 *abcb4* 反义 mRNA 探针后用 Nuc Away<sup>TM</sup> Spin Columns 纯化吸附柱回收。经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定后于 -70 °C 保存备用。

### 1.9 斑马鱼原位杂交

选取各实验组 48、72、96、120 hpf 4 个时相的斑马鱼胚胎进行原位杂交。使用 Fix 液固定各时相胚胎, 再用 100% 甲醇脱水 4 h 以上。1 $\times$  PBST 洗净胚胎后再将其置于 65 °C 杂交炉中, 用 HYB(-) 杂交液预杂交 1 h, 后加入制备好的地高辛标记的 *abcb4* 反义 mRNA 探针于 65 °C 杂交炉中过夜。用不同浓度的 SSC 液将多余的探针洗去, 而后加入地高辛抗体过夜。用 MABT 将多余的抗体洗掉加入 BCIP/NBT 染液对杂交胚胎进行染色, 在体视显微镜下观察并记录结果后, 用固定液对杂交胚胎进行再固定并拍照。

### 1.10 统计学方法

多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DOX 对斑马鱼胚胎 *abcb4*、*abcb5* 基因的影响

见表 2, 图 1。斑马鱼  $\beta$ -actin、*GAPDH*、*abcb4*、*abcb5* 基因的溶解曲线均为单峰, 目的基因扩增良好, 无非特异性产物产生。且扩增曲线光滑、连续, 呈“S”形, 重复性好。各组中 *abcb4* mRNA 表达量

表 2 不同时相的斑马鱼胚胎 *abcb4*、*abcb5* 基因的 mRNA 表达变化

Table 2 Relative *abcb4* and *abcb5* mRNA expressions in zebrafish embryos

Group	<i>abcb4</i>				<i>abcb5</i>			
	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
Control	1.00 $\pm$ 0.17	3.73 $\pm$ 1.01	5.86 $\pm$ 1.24	27.80 $\pm$ 2.17 $\Delta$	1.00 $\pm$ 0.17	0.75 $\pm$ 0.13	2.88 $\pm$ 0.60 $\Delta$	1.64 $\pm$ 0.23
DMSO	1.58 $\pm$ 0.13*	5.25 $\pm$ 0.66	29.64 $\pm$ 4.54* $\Delta$	109.55 $\pm$ 7.47* $\Delta$ , #	1.16 $\pm$ 0.11	1.83 $\pm$ 0.06*	4.03 $\pm$ 0.55 $\Delta$	6.50 $\pm$ 0.31* $\Delta$
DOX	2.23 $\pm$ 0.23*	3.39 $\pm$ 0.42	30.11 $\pm$ 2.75* $\Delta$	77.18 $\pm$ 7.75* $\Delta$	1.90 $\pm$ 0.39*	4.04 $\pm$ 0.54* $\Delta$	5.34 $\pm$ 1.10* $\Delta$	5.87 $\pm$ 0.44* $\Delta$
DMSO+DOX	1.34 $\pm$ 0.27	17.98 $\pm$ 1.6* $\Delta$	35.07 $\pm$ 4.20* $\Delta$	114.04 $\pm$ 11.45* $\Delta$ , #	3.34 $\pm$ 0.33*	3.25 $\pm$ 0.28*	5.81 $\pm$ 0.66* $\Delta$	7.80 $\pm$ 1.27* $\Delta$

\*  $P < 0.05$ , vs. control group at the same stage;  $\Delta$   $P < 0.05$ , vs. other stages in the same group; #  $P < 0.05$ , vs. DOX group at the same stage

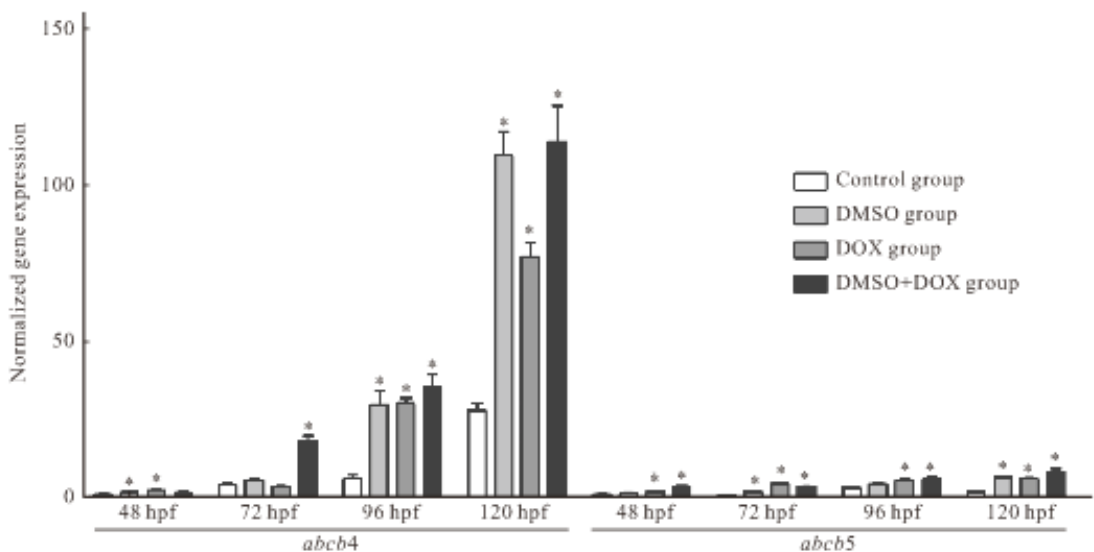


图 1 不同组别、时相的斑马鱼胚胎 *abcb4*、*abcb5* 基因的 mRNA 表达变化

Fig 1 Relative *abcb4* and *abcb5* mRNA expression in zebrafish embryos (\*  $P < 0.05$ , vs. control group at the same stage)



在斑马鱼野生型对照组中 48、72、96 hpf 胚胎均无杂交信号的表达, 而 120 hpf 胚胎在斑马鱼小肠部位都有蓝黑色阳性杂交信号(如图 5A, 黑色箭头)。DMSO 组、DOX 组、DMSO + DOX 组 48、72 hpf 胚胎与对照组相比同样无明显杂交信号。DMSO 组 96、120 hpf 胚胎在脑、小肠部位出现蓝黑

色阳性杂交信号(如图 5B, 红、黑色箭头)。DOX 组 96、120 hpf 胚胎并没在脑部出现明显蓝黑色阳性杂交信号, 但在小肠、心脏部位出现明显蓝黑色阳性杂交信号(如图 5C, 黑、绿色箭头)。DMSO+DOX 组 96、120 hpf 胚胎在脑、小肠、心脏均出现相当明显的蓝黑色阳性杂交信号(如图 5D, 红、黑、绿色箭头)。

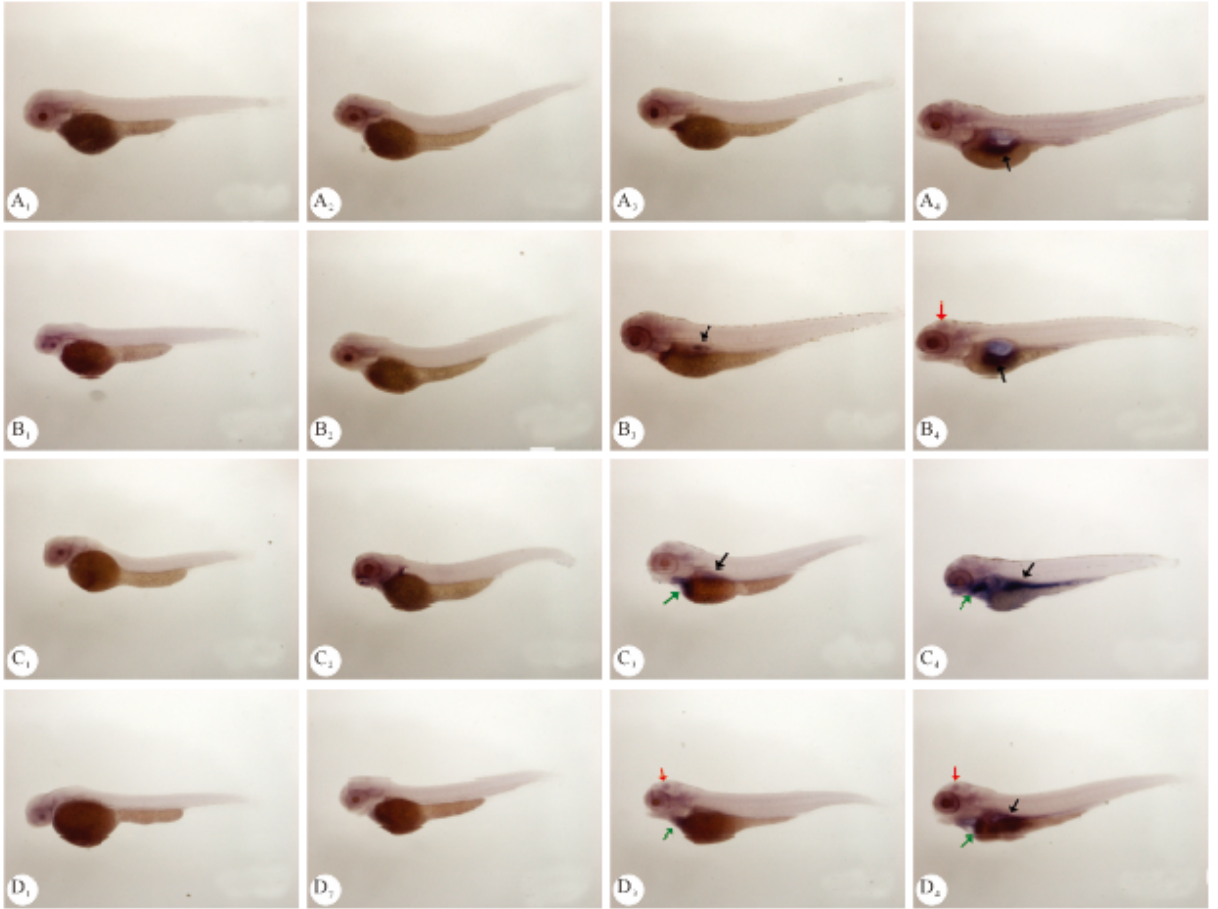


图 5 不同组别、时相的斑马鱼 *abc4* 基因原位杂交结果。×30

Fig 5 *In situ* hybridization of *abc4* gene. ×30

A: Control group; B: DMSO group; C: DOX group; D: DMSO+DOX group; 1: 48 hpf; 2: 72 hpf; 3: 96 hpf; 4: 120n hpf. *In situ* hybridization of *abc4* gene was expressed in guts (black arrows) at 120 hpf in zebrafish embryos (A<sub>4</sub>). At 120 hpf, expression of *abc4* gene was observed in brains (red arrows) of embryos exposed to DMSO (B<sub>4</sub>), and *abc4* gene was specially expressed in hearts of embryos (green arrows) exposed to DOX at 96, 120 hpf (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>). Strong WISH signal occurred in the brains and hearts of embryos exposed to DMSO and DOX (D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>)

### 3 讨论

斑马鱼(zebrafish)是新兴的研究人类发育与疾病发生的模式生物, 其为原产于印度的硬骨鱼类。斑马鱼及其胚胎因体积小、易吸收、通体透明和花费低廉等优点, 故普遍应用于高通量、小分子筛选中<sup>[3]</sup>。同时, 斑马鱼的全基因组测序工作已经完成。且相较于其他无脊椎动物, 斑马鱼与人类基因更具

有同源性<sup>[4]</sup>, 具有与人类高度保守的发育和疾病基因及信号传导通路, 是研究人类发育和疾病信号传导路径的最佳模式生物之一。特别是在新药开发和药物筛选, 及其相关基因的研究中, 斑马鱼被广泛运用<sup>[3-5]</sup>。

ABC转运蛋白也称为ABC转运体, 是一类结构相似的膜蛋白家族, 有一个共同的细胞内结构域, 被称核苷酸结合结构域(nucleotide binding

domain, NBD), 这些 NBD 的主要功能是结合和水解 ATP 并利用释放出来的能量逆浓度梯度转运物质。人类基因可以编码 48 个 ABC 转运蛋白, 这些转运蛋白可分为 A~G 7 个亚家族<sup>[6]</sup>。虽然 ABC 转运体可以介导自身代谢物和毒物外排, 但同时也能介导药物外排, 这也是产生肿瘤多药耐药的关键原因。而 ABCB1(即 P-gp) 与肿瘤的多药耐药性密切相关, 是产生多药耐药的重要因素<sup>[1]</sup>。

阿霉素是一种抗肿瘤药物, 通过抑制 RNA 和 DNA 的合成, 达到杀灭肿瘤细胞的作用。主要适用于急性白血病, 对急性淋巴细胞白血病及粒细胞白血病均有效。多种肿瘤细胞可以通过阿霉素诱导处理产生耐药细胞株。如人白血病耐药细胞株、乳腺癌耐药细胞株、人膀胱癌耐药细胞株、结肠癌耐药细胞株等。且在这一类耐药细胞株中, 检测到 ABC 转运体大幅增加<sup>[7-9]</sup>。说明阿霉素能通过引起 ABC 转运体表达增高, 特别是 ABCB1 表达增高, 使细胞产生多药耐药。

通过生物信息学分析, 我们发现斑马鱼基因组中并不存在 *abcb1* 基因, 但存在 *abcb4*、*abcb5* 等基因。且斑马鱼 *abcb4*、*abcb5* 与人 ABCB1 氨基酸序列相似度分别为 64% 和 57%。根据国外文献报道, 斑马鱼 *abcb4* 在鱼体内中与多种有毒化合物转运密切相关, 且参与阻碍化学物质的吸收<sup>[10]</sup>。而人类 ABCB4(即 multidrug resistance 3, MDR3) 存在于人类肝细胞的胆小管膜上, 介导转运磷脂酰胆碱进入胆汁<sup>[11]</sup>。在斑马鱼中目前并没有检测到磷脂酰胆碱或者胆汁, 故相较于人类 ABCB4, 斑马鱼 *abcb4* 的功能可能更近似于 ABCB1 且不同于 ABCB4<sup>[10]</sup>。但是 *abcb4* 基因在斑马鱼多药耐药中的研究尚不完全清楚。所以本实验通过阿霉素的药物暴露实验, 对斑马鱼 *abcb4* 基因表达变化进行研究, 并与人类 ABCB1 基因比较分析, 进一步了解 ABCB1 与 *abcb4* 的同源性。

本研究对斑马鱼胚胎进行抗肿瘤药物阿霉素的药物暴露实验, 并收集药物暴露后的各个时相的斑马鱼胚胎。通过实时荧光定量 PCR 和原位杂交实验, 检测斑马鱼 *abcb4* 基因表达情况的变化。实验结果表明, *abcb4* 基因在野生型斑马鱼胚胎的小肠部位有明显的表达, 这类似于人类 ABCB1 基因表达部位, 与国外文献报道相符<sup>[10, 12]</sup>。同时, 药物处理组的斑马鱼胚胎 *abcb4* 基因 mRNA 表达水平明显高于对照组, 也证实了 DOX 能引起斑马鱼胚胎中 *abcb4* 基因表达增高。而在原位杂交实验中, 药

物处理组的斑马鱼胚胎分别在脑、心脏也存在额外的 *abcb4* 基因表达, 这一实验结果也印证了国外关于 DOX 对斑马鱼心脏发育影响的文献报道<sup>[13]</sup>。其中值得注意的是, DMSO 组的斑马鱼胚胎 *abcb4* 基因 mRNA 表达水平同样增高, 且 *abcb4* 基因在胚胎脑、心脏存在额外的表达。推测可能因为在 DMSO 作用下, 细胞膜通透性增加, 致使膜外异物大量进入细胞, 从而激活多药耐药机制, 使得 *abcb4* 基因 mRNA 表达水平增高。故在今后的斑马鱼 *abcb4* 基因的研究中, 需要排除 DMSO 对其产生的影响。

在前期的生物信息学分析中, 斑马鱼 *abcb5* 与人类 ABCB1 氨基酸序列相似度为 57%。与斑马鱼 *abcb4* 基因一样, *abcb5* 基因同人类 ABCB1 基因也存在着一定的同源性。并且硝苯地平、克霉唑、大黄素等药物能诱导 *abcb5* 基因的 mRNA 和蛋白质表达水平增高<sup>[14, 15]</sup>。这也提示我们, 在斑马鱼中 *abcb5* 基因与药物耐药性存在着一定的相关性。但是在长春新碱、长春花碱、麝香以及菲等药物和化合物的研究中, 斑马鱼 *abcb4* 却作为对抗化学毒物的细胞毒物转运体而被报道。其中提到通过抑制物和 Morpholino 下调斑马鱼 *abcb4* 基因的表达, 可以增加荧光底物在胚胎组织中的累积量和对有毒化合物的敏感性, 但是 *abcb5* 基因却不存在这种影响<sup>[10]</sup>。以至于, 判断两个基因在斑马鱼多药耐药机制中的相关性和重要性, 成为了需要去研究的问题。故在本实验中增加斑马鱼 *abcb5* 基因表达变化检测。实验结果表明 *abcb5* 基因表达有所增高, 但是并没有 *abcb4* 基因增高得明显。结合阿霉素对人类 ABCB1 基因表达变化的影响, 进一步证实了 *abcb4* 基因与 ABCB1 基因在表达影响上更具有相似性。由此可以推断, 相较于斑马鱼 *abcb5* 基因, *abcb4* 基因在多药耐药机制中可能起到更重要的作用。

故综上所述, 本研究发现阿霉素能诱导斑马鱼 *abcb4* 基因表达水平增高, 且作用增高部位表现为心脏部位。同时, 首次发现二甲基亚砷能诱导增加斑马鱼 *abcb4* 基因表达水平。结合实验结果, 并与人类 ABCB1 基因进行比较, 发现相较于 *abcb5* 基因, *abcb4* 基因与 ABCB1 基因在表达影响上更具有相似性。证实斑马鱼 *abcb4* 基因与人类 ABCB1 基因具有较高同源性。介于人类 ABCB1 在肿瘤的多药耐药机制中的重要性, 由此推断 *abcb4* 基因的表达变化在斑马鱼多药耐药产生, 尤其是介导药物、异物转运过程中可能起到重要作用。研究结果为下一步 *abcb4* 基因在斑马鱼多药耐药机制中的研究以

及斑马鱼在肿瘤多药耐药性中研究与抗肿瘤药物多药耐药性筛选的应用奠定了重要基础。

本研究针对的是代表性药物阿霉素对 *abcb4* 基因的表达影响,但抗肿瘤药物类别繁多,且多药耐药发生机制复杂。需要进行更多类别的抗肿瘤药物实验,并检测更多耐药相关基因及蛋白,以便更好地了解斑马鱼多药耐药产生的机制,以及 *abcb4* 基因在其中所起到的重要作用。

### 参 考 文 献

- Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, *et al.* ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*, 2010;10(2):147-156.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 1995;203(3):253-310.
- Gibert Y, Trengove MC, Ward AC. Zebrafish as a genetic model in pre-clinical drug testing and screening. *Curr Med Chem*, 2013;20(19):2458-2466.
- Das BC, McCormick L, Thapa P, *et al.* Use of zebrafish in chemical biology and drug discovery. *Future Med Chem*, 2013; 5(17):2103-2116.
- Binder V, Zon LI. High throughput *in vivo* phenotyping: The zebrafish as tool for drug discovery for hematopoietic stem cells and cancer. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2013; 10(1):e17-e22.
- Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*, 2008;73(5):592-604.
- Han L, Wang Y, Guo X, *et al.* Downregulation of *MDR1* gene by cepharanthine hydrochloride is related to the activation of c-Jun/JNK in K562/ADR cells. *Biomed Res Int*, 2014;2014: 164391. doi:10.1155/2014/164391.
- Wu L, Xu J, Yuan W, *et al.* The reversal effects of 3-bromopyruvate on multidrug resistance *in vitro* and *in vivo* derived from human breast MCF-7/ADR cells. *PLoS One*, 2014;9(11):e112132. doi: 10.1371/journal.pone.0112132.
- Zhang YF, Li XH, Shi YQ, *et al.* CIAPIN1 confers multidrug resistance through up-regulation of MDR-1 and Bcl-L in LoVo/Adr cells and is independent of p53. *Oncol Rep*, 2011;25(4): 1091-1098.
- Fischer S, Klüver N, Burkhardt-Medicke K, *et al.* Abcb4 acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *BMC Biol*, 2013;11:69. doi: 10.1186/1741-7007-11-69.
- Kiehl S, Herkt SC, Richter AM, *et al.* ABCB4 is frequently epigenetically silenced in human cancers and inhibits tumor growth. *Sci Rep*, 2014; 4: 6899-6899. doi: 10.1038/srep06899.
- Lu X, Long Y, Sun R, *et al.* Zebrafish Abcb4 is a potential efflux transporter of microcystin-LR. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2015; 167: 35-42. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.08.005.
- Han Y, Zhang JP, Qian JQ, *et al.* Cardiotoxicity evaluation of anthracyclines in zebrafish (*Danio rerio*). *J Appl Toxicol*, 2015;35(3):241-252.
- Bresolin T, de Freitas Rebelo M, Celso Dias Bainy A. Expression of *PXR*, *CYP3A* and *MDR1* genes in liver of zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2005; 140(3-4):403-407.
- He Q, Liu K, Wang S, *et al.* Toxicity induced by emodin on zebrafish embryos. *Drug Chem Toxicol*, 2012;35(2):149-154. (2015-05-11 收稿, 2015-09-16 修回)

编辑 吕 熙