

TCDD 对斑马鱼胚胎发育毒性机制的研究进展

靳洪涛/李万芳(综述)/王爱平(审校)

(中国医学科学院中国协和医科大学新药安全评价研究中心,北京 100050)

【摘要】二恶英类化合物具有致癌、致畸作用以及心血管神经内分泌毒性。2,3,7,8-四氯二苯并对二恶英(TCDD)是二恶英类化合物中毒性最强的一种。本文以二恶英-芳香烃受体为主线,从 TCDD 诱导斑马鱼胚胎下颌发育短小、神经元缺失、抑制总主静脉退化、抑制红细胞生成、心脏形态和功能缺陷、血液循环障碍、水肿、致死等方面概述了 TCDD 对斑马鱼胚胎发育毒性机制的研究现状。

【关键词】2,3,7,8-四氯二苯并对二恶英; 斑马鱼; 芳香烃受体; 芳香烃受体核转位子蛋白; 胚胎发育毒性

中国分类号: R994.6

文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2008)06-0500-03

自我国加入《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》(简称《POPs 公约》),人们对环境持久性污染物(POPs)的认识不断加强,有关二恶英类物质(dioxin-type chemicals, DTCs)的研究也受到重视。除皮肤毒性、生殖毒性、免疫毒性、致癌性之外,二恶英类物质的胎盘毒性尤为引人注目^[1]。其中,2,3,7,8-四氯二苯并对二恶英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)毒性最强,同时也是研究最多的,因此常用 TCDD 代表二恶英类化合物。

斑马鱼(danio rerio)是属于辐鳍亚纲(actinopterygii)鲤科(cyprinidae)短担尼鱼属(danio)的一种硬骨鱼。1981年,Streisinger等^[2]报道了斑马鱼的体外受精及单倍体诱导技术,建立了纯合品系,并介绍了斑马鱼的第一个自然突变体-golden,至今已证明斑马鱼是适用于饱和和诱变的唯一的脊椎动物。目前的生命科学研究中,斑马鱼、人、小鼠是3种主要的模式脊椎动物。TCDD对猴、兔、豚鼠、大鼠、小鼠、鸡的毒性研究较多,鱼类也是TCDD敏感的生物之一,特别是在胚胎期。TCDD对斑马鱼的胚胎发育毒性主要有:下颌发育短小、神经元缺失、抑制总主静脉退化、抑制红细胞生成、心脏形态和功能缺陷、血液循环障碍和水肿,最终致死。

1 TCDD 毒性分子生物学机制概述

TCDD的毒性与其诱导芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)能力及活化受体结合特异DNA区域(dioxin response element, DRE)的能力有密切相关性。胞浆中未活化的AhR与两分子热休克蛋白90(hsp90)结合。当TCDD与AhR结合后,两分子hsp90从AhR上解离使受体构象发生变化,TCDD-芳香烃受体复合物与芳香烃受体核转位子蛋白(Ah receptor nuclear translocator protein, ARNT)结合形成异型二聚体进入细胞核内,与DRE结合,进而引起一系列基因转录调节的变化,导致毒性反应。目前已知的TCDD激活的基因表达主要是指细胞色素P450基因超家

族,尤其是CYP1A,其他特异的下游靶基因还不清楚。

斑马鱼有两种AhR(AhR1, AhR2)及多种ARNT亚型(ARNT2, ARNT1),它们均已被成功克隆和表达。2000年,Nasevicius等^[3]提出了注射吗啡林(morpholinos)修饰性寡核苷酸可产生基因敲除的斑马鱼,吗啡林有抑制翻译的起始,减少传统反义寡核苷酸非特异性的效应。使用吗啡林特异敲除斑马鱼AhR2(zfAhR2-MO)和ARNT1(zfARNT-MO)能够阻断TCDD对CYP1A的诱导及多种TCDD毒性终点。值得注意的是zfAhR2-MO不能使TCDD染毒的胚胎免于死亡,只能将死亡出现推迟48h^[4]。另有证据表明斑马鱼发育毒性与ARNT2无关^[5]。

2 TCDD 对斑马鱼胚胎毒性的分子生物学机制

2.1 下颌发育短小

Yang等^[6]证实斑马鱼下颌发育短小与sonic hedgehog(shh)基因表达相关联。Hiroki等^[7-8]发现TCDD染毒加强了斑马鱼AhR2 mRNA的表达,并且TCDD染毒引起的shh下调依赖于AhR2受体。失去shh信号的突变体,表现出类似于TCDD诱导的下颌发育迟缓^[9]。进一步的机制研究表明,TCDD可引起细胞增殖的显著降低,但并不引起下颌部细胞凋亡的显著增加^[7]。综上所述,TCDD引起下颌发育短小是AhR2介导的shh基因表达的降低及欠缺,进一步引起下颌部细胞增殖的降低致下颌发育短小。

但TCDD并未引起shh的受体patched1(pte1)表达明显下调,而shh抑制剂环王巴明(cyclopamine)处理组,pte1在神经元组织和下颌的表达明显减少^[7]。同时,与TCDD不同,shh抑制剂可同时引起细胞增殖降低和凋亡增加^[6-8]。由此推论,TCDD引起斑马鱼下颌发育短小不仅因为影响shh表达,还可能影响其他基因。Goosecoid(GSC)基因在鼠、斑马鱼和人类中高度保守,该基因的缺失或突变可以导致颅面部的多种畸形,研究发现染毒斑马鱼

收稿日期: 2007-12-12; 修订日期: 2008-03-16

基金项目: 药物研究所青年基金项目(2006QN26)

作者简介: 靳洪涛(1976-),男,山东省人,硕士,助理研究员,药物毒理学, Tel: 010-83159462, E-mail: jinhongtao@imm.ac.cn

胚胎 60 hpf (受精后 60 h) *GSC* 基因表达量的显著减少^[8-9]。

2.2 神经元缺失

TCDD 染毒可引起斑马鱼仔鱼脑部神经元的显著缺失,在此过程中 TCDD 首先对头部细胞凋亡产生强烈抑制,至 58 hpf 细胞凋亡才开始有所增加,80 hpf 100 ppt TCDD 染毒组细胞凋亡比对照组表现的更为广泛^[10]。最初 TCDD 对细胞凋亡的强烈抑制,可能阻碍正常神经组织通过凋亡进行的重建 (remastering),使大脑失去功能,导致后期凋亡的增加。

TCDD 染毒组斑马鱼大脑的 *AhR2* 和 *ARNT2* 表达增加,但 *CYP1A* 没有在斑马鱼脑部、脊髓和感觉器官出现^[11]。500 ppt TCDD 染毒组和对照组,在 24, 48, 72 hpf 分别对多种涉及脑部和眼部图式发育的基因如 *neurod*, *pax6a*, *pax2a*, *egr2b*, *rtk1*, *isl1*, *ashb*, *dbx1a*, *dlx3b*, *shh* 进行 SP6-RNA 探针全组织原位杂交,观察发现仅鳃弓的 *dlx3b* 在 72 hpf 表达显现出明显不同^[10]。

使用 *neurogenin1*, *shh* 特异性表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的转基因斑马鱼 (*neurog1:gfp*, *shh:gfp*) 研究发现,对神经系统的毒性作用与 *neurogenin1*, *shh* 基因的表达减少相关^[10]。*neurogenin1* 是斑马鱼基底前脑多巴胺能神经元的决定子,由保守的锌指蛋白 *Tof/Fez1* 调节。*shh* 是中枢神经系统细胞分化和增殖重要的调节器。*neurogenin1* 在脑区和 *shh* 在下丘脑和眼部表达的减少表明 TCDD 引起的神经毒性在不同的神经元群可能通过不同的基因表达通路介导。

2.3 循环系统

2.3.1 总主静脉退化抑制 *zAhR2-MO* 能保护 1 ng/ml 浓度的 TCDD 对总主静脉 (CCV) 退化的阻碍^[12]。说明 TCDD 引起的 CCV 退化是 *AhR2* 依赖的。但高浓度的 TCDD 能消除 *zAhR2-MO* 的作用,可能是因为 *zAhR2-MO* 不能完全阻断 *AhR2* 表达,或是因为高浓度 TCDD 阻碍血管退化的机制改变。无论是对照组还是染毒组在 CCV 区域内均没有观察到凋亡细胞。

2.3.2 心脏毒性 使用吗啡林特异阻断 *zAhR2*, *zARNT1*, *zARNT2*, *zCYP1A* 表达,发现阻断 *zAhR2*, *zARNT1* 表达,不会导致 TCDD 染毒的仔鱼心脏形态改变,心肌数量减少,心输出量降低及心室停顿。而阻断 *zARNT2*, *zCYP1A* 不能对抗 TCDD 诱导的心脏毒性^[13]。

为了分辨 TCDD 心血管毒性作用中可能涉及的基因,构建 cDNA 微阵列^[14],试验结果显示细胞色素 P450 (CYP) 1A, 1B1 及其它 *AhR* 基因组 (gene battery) 成员,均可被 TCDD 强烈诱导且呈剂量依赖性。更重要的是肌小节原 (心脏肌钙蛋白 T2 和多种肌球蛋白亚型) 表达的改变,这与 TCDD 引起扩张性心肌病的假说一致。而线粒体能量转移基因 (mitochondrial energy transfer genes) 的表达水平升高也可能与心肌病相关。其它主要的 TCDD 反应基因还涉及脂肪酸,甾类代谢酶,核糖体,信号转导蛋白,未知蛋白同系物的 18 表达序列标签 (18 expressed sequence tags, ESTs)。

2.3.3 红细胞生成抑制 与斑马鱼造血有关的转录因子与其它的哺乳动物具有高度的同源性。如 *scl* 可诱导造血与血管组织的生成,*cloche* 基因决定血管内皮细胞干细胞的形成^[15]。

TCDD 对 72 hpf 前早期的造血细胞标记物 (*GATA-1*, *GATA-2*) 的表达没有影响。使用 *scl* 突变体研究表明 *scl* 直到定向造血才起作用。TCDD 能轻微阻滞表达 *scl* 的血细胞从中间细胞群

或肾节到背侧肠系膜和背主动脉的迁移^[16]。

2.3.4 中脑循环障碍 对中脑染色观察发现 TCDD 染毒可以显著升高背侧中脑视顶盖核固缩细胞的死亡率,这些核固缩细胞的超微结构表现出凋亡特征,如核固缩和核分裂^[17]。Dong 等^[18]也观察到 TCDD 在 60 hpf 时引起细胞凋亡,但是并没有发现中脑血管上皮的细胞凋亡。中脑细胞凋亡的发生率与这些区域的血流变化负相关 ($r = -0.91$)。Dong 等^[17-18]对中脑局部循环障碍和细胞凋亡的发生机制进行深入研究,发现 50 hpf,在产生中脑血流减少和凋亡增加的浓度范围内,TCDD 可加强中脑血管和心脏的血管上皮细胞 *CYP1A* mRNA 的表达和免疫反应活性,但不影响脑实质细胞。TCDD 对中脑循环和细胞凋亡的影响,既可能被 *AhR* 激动剂 (β -萘黄酮, BNF) 模拟,也可被 *AhR* 抑制剂 (α -萘黄酮, ANF) 阻断。细胞色素 P450 抑制剂 (咪康唑, SKF525) 或抗氧化剂 (N-乙酰半胱氨酸, Vit C) 也能抑制 TCDD 的作用,并且 SKF525 对 TCDD 作用的阻断比咪康唑更有效。

半胱天冬酶抑制剂 Z-VAD-FMK 能消除细胞凋亡,但不能消除血流的减少,说明半胱天冬酶只涉及凋亡作用,与血流无关。另外,TCDD 提高了背侧中脑血管对蛋白质的通透性,也可以被 *AhR2-MO* 和 N-乙酰半胱氨酸阻断。

使用 *zAhR2-MO*, *zCYP1A-MO* 均能阻断 TCDD 的作用^[19]。但随着 TCDD 剂量的升高,*AhR2-MO* 对中脑上皮细胞 *CYP1A* 诱导的阻断效果变差,但对皮肤和原肺 (branchogenic primordial) 的 *CYP1A* 诱导仍能被有效的阻断。*AhR2-MO* 的作用随处理时间而降低,96 hpf, *AhR2-MO* 完全失去对抗 TCDD 的作用。

以上可见,TCDD 诱导的中脑细胞凋亡继发于中脑循环障碍。局部循环障碍与 *AhR* 的激活诱导 *CYP1A* 和氧化应激反应相关。同时也证明了血管内皮细胞是 TCDD 引起中脑循环障碍和凋亡的靶部位,且不同浓度,不同部位 TCDD 的作用机制不同。

2.3.5 血液循环与水腫 自高水平的 *CYP1A* 在上皮鉴定后,众多证据表明 *AhR* 在鱼类的血管上皮细胞存在,上皮被认为是 *AhR* 激动剂可能的毒作用位点。*CYP1A* 抗体染色发现 TCDD 染毒群在血管上皮看到极强的阳性反应,对 *CYP1A* 的诱导作用被 *zAhR2-MO* 和 *zCYP1A-MO* 显著抑制,表明 TCDD 对斑马鱼胚胎的循环系统的损坏作用与 *AhR2*, *CYP1A* 相关联^[20]。在猪培养血管上皮细胞,具有芳基受体 *AhR* 活性的二恶英类 PCB77 引起脂的过氧化,内皮细胞透过性增加以及 *CYP1A* 的显著增加^[21-22]。

由此推论,TCDD 以 *AhR* 为媒介诱导 *CYP1A*,引起血管的氧化应力,致使血管的透过性增大,最后引起血流的延缓和水腫。

虽然 *CYP1A* 在皮肤也有表达,可能与 TCDD 对作为水屏障的皮肤毒性有关^[11],但现在的研究还没有发现 TCDD 对皮肤 *CYP1A* 的诱导,只有证据表明 *zAhR2-MO* 的斑马鱼胚胎 TCDD 染毒不出现水腫^[5]。

Hiroki 等^[8]认为血流的减少可能会使发育中原肾的滤过作用降低,进而导致水腫,但 Adrian 的研究并未发现肾功能的改变^[12]。*sim 1*, *pax2a*, *wt1* 基因是斑马鱼和高等脊椎动物肾发生必要的调节基因。TCDD 1 ng/ml 和 5 ng/ml 染毒组没有造成肾发生期这些基因表达的改变,没有破坏顶端细胞的极性, Na^+/K^+ ATPase 仍位于肾小管上皮细胞基底外侧表面。将荧光标记的葡聚



糖注入血液,对照组和染毒组均可见正常滤过。虽然 56 hpf 横切面显示 TCDD 染毒的肾小球呈扁平状,但已证明是继发于水肿^[23]。

水肿是原发还是继发于循环系统毒性还需要进一步研究。

3 展望

目前已经较广泛的研究了 TCDD 对斑马鱼胚胎的毒性芳香烃受体机制。但对于 TCDD 对胚胎发育毒性的机制,还有很多问题有待进一步研究。例如,细胞凋亡在毒性发生发展过程中的作用,芳香烃受体通路的下游信号转导方式,不同位点、不同作用时期、不同染毒浓度 TCDD 毒性机制的变化;除芳香烃受体通路外的其它作用机制等等。

工业的发展使水源污染问题日趋加重,严重威胁着人们的健康。对水域污染进行监测及全面了解水污染情况是解决水源污染的首要前提。随着转基因技术的发展,已有实验室通过针对不同污染物作用的不同启动子,启动表达荧光蛋白的基因,培育出一些在特定条件下显示绿色或红色荧光的转基因斑马鱼,对污染物进行直观的监测。随着研究的深入,如何根据斑马鱼胚胎对 TCDD 最为敏感的毒性终点,发现敏感的基因或蛋白,应用分子生物学技术实现对环境 TCDD 含量的监测,更具现实意义。

随着对斑马鱼认识的深入和相关分子生物学技术的飞速发展,斑马鱼在此领域将会有更广阔的发展空间。

参考文献:

- [1] Schnorr TM, Lawson CC, Whelan EA, et al. Spontaneous abortion, sex ratio, and paternal occupational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Environ Health Perspect*, 2001, 109(11): 1127 - 1132.
- [2] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, 1981, 291(5813): 293 - 296.
- [3] Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish [J]. *Nat Genet*, 2000, 26(2): 216 - 220.
- [4] Prasch AL, Teraoka H, Carney SA, et al. Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin developmental toxicity in zebrafish [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 76(1): 138 - 150.
- [5] Prasch AL, Heideman W, Peterson, RE. ARNT2 is not required for TCDD developmental toxicity in zebrafish [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 82(1): 250 - 258.
- [6] Yang Jing-feng, Dong Wu, Cao Ying-xia, et al. Reduction of Shh gene expression and development of the lower jaw in zebrafish embryos exposed to TCDD [J]. *Zoological Research*, 2005, 26(5): 506 - 512.
- [7] Hiroki T, Dong Wu, Yuji Okuhara, et al. Impairment of lower jaw growth in developing zebrafish exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and reduced hedgehog expression [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 78(2): 103 - 113.
- [8] Hiroki T, Dong Wu, Shuji Ogawa, et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: altered regional blood flow and impaired lower jaw development [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 65(2): 192 - 199.
- [9] Dong Wu, Yang Jingfeng, Wang Sizhen, et al. 2, 3, 7, 8-

tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced special short lower jaw-measure of morphology in the zebrafish embryos [J]. *Journal of Inner Mongolia University Nationalities*, 20(3): 298 - 301.

- [10] Adrian H, Vyvyan H, Uwe S, et al. Neurodevelopmental defects in zebrafish (*Danio rerio*) at environmentally relevant dioxin (TCDD) concentrations [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 76(2): 392 - 399.
- [11] Andreasen EA, Spitsbergen JM, Tanguay RL, et al. Tissue-specific expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in zebrafish embryos and larvae: Effects of development stage and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 68(2): 403 - 419.
- [12] Bello SM, Heideman W, Peterson RE. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits regression of the common cardinal veining developing zebrafish [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 78(2): 258 - 266.
- [13] Antkiewicz DS, Peterson RE, Heideman W. Blocking expression of AHR2 and ARNT1 in zebrafish larvae protects against cardiac toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 94(1): 175 - 182.
- [14] Handley-Goldstone HM, Grow MW, Stegeman JJ. Cardiovascular gene expression profiles of dioxin exposure in zebrafish embryos [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 85(1): 683 - 693.
- [15] Paw BH, Zon LI. Zebrafish: a genetic approach in studying hematopoiesis [J]. *Curr Opin Hematol*, 2000, 7(2): 79 - 84.
- [16] Cassandra DB, Richard EP, Warren H. Disruption of erythropoiesis by dioxin in the zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 2001, 222(4): 581 - 594.
- [17] Dong W, Hiroki T, Kondo S, et al. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis in the dorsal midbrain of zebrafish embryos by activation of arylhydrocarbon receptor. [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 303(3): 169 - 172.
- [18] Dong Wu, Hiroki T, Koji Y, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 69(1): 191 - 201.
- [19] Dong Wu, Hiroki T, Yoshikazu T, et al. Role of aryl hydrocarbon receptor in mesencephalic circulation failure and apoptosis in zebrafish embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Toxicol Sci*, 2004, 77(1): 109 - 116.
- [20] Dong Wu, Wei Qiang, Hiroki T, et al. Toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cardiovascular system of zebrafish embryos early life stage [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2002, 10(2): 69 - 72.
- [21] Toborek M, Barger SW, Mattson MP, et al. Exposure to polychlorinated biphenyls causes endothelial cell dysfunction [J]. *Biochem Toxicol*, 1995, 10(4): 219 - 226.
- [22] Stegeman JJ, Hahn ME, Weisbrod R, et al. Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells [J]. *Mol Pharmacol*, 1995, 47(2): 296 - 306.
- [23] Hill AJ, Bello SM, Prasch AL, et al. Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages [J]. *Toxicol Science*, 2004, 78(1): 78 - 87.