

TCDD 诱发斑马鱼胚胎 *shh* 基因表达降低及其对下颌发育的影响

杨景峰¹, 董武^{1,2,*}, 曹颖霞¹, 王思珍¹

(1. 内蒙古民族大学 动物科学技术学院, 内蒙古 通辽 028042; 2. Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Japan)

摘要: 2, 3, 7, 8-四氯-二苯基-对-二恶英 (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD) 为毒性很强的环境污染物质。用 0~1.0 $\mu\text{g/L}$ 的 TCDD 处理受精后 24 h (24 hpf) 的斑马鱼胚至观察时为止, 进行了形态学观察、基因阻断、原位杂交、TUNEL 染色以及免疫学染色等实验。结果表明, TCDD 处理后会引起斑马鱼下颌短小, *Shh* 基因在下颌部表达降低; 而在芳烃受体 AhR 功能阻断的胚胎中, TCDD 并没有引起斑马鱼下颌短小, 同时也没有观察到 *Shh* 基因表达缺失; 免疫学染色表明 TCDD 和 *Shh* 阻断物质 Cyclopamine 均可引起斑马鱼下颌区域增殖细胞的减少。TCDD 引起的下颌短小可能是首先引起以 AhR 为媒介的 *Shh* 表达缺失, 进而造成下颌部增殖细胞减少, 最终引起下颌短小的发生。

关键词: *Shh* 基因; 芳烃受体; 二恶英; 基因阻断; 下颌; 斑马鱼

中图分类号: Q132; Q754; Q355 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853 (2005) 05-0506-07

Reduction of *Shh* Gene Expression and Development of the Lower Jaw in Zebrafish Embryos Exposed to TCDD

YANG Jing-feng¹, DONG Wu^{1,2,*}, CAO Ying-xia¹, WANG Si-zhen¹,

(1. Animal Science and Technology College, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028042, China;

2. Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Japan)

Abstract: 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is one of the most toxic environmental pollutants. The goal of this study is to understand the cause of the short lower jaw induced by TCDD in the zebrafish embryos. Embryos are exposed to TCDD (0-1.0 $\mu\text{g/L}$) at 24 h post fertilization (24 hpf) until the time of observation and studied by gene knockdown, immunohistochemistry staining and *in situ* hybridization. The results show that TCDD treatment leads to decreases in the size of the lower jaw and reduced *Shh* gene expression. This effect can be blocked by injection of Morpholino antisense oligos against AhR2, the potential TCDD receptor. We also find Cyclopamine, a *Shh* inhibitor, caused short lower jaw and decreased cell proliferation in the zebrafish embryos. These results suggest that TCDD might inhibit the expression of *Shh* through AhR and lead to decreased cell proliferation and short lower jaw in zebrafish embryos.

Key words: *Shh* gene; AhR; Dioxin; Gene knock down; Jaw; Zebrafish

二恶英类物质有极强的致癌、致畸、致突变为主的“三致”作用, 并可能对我们的后代产生长期的较严重的影响。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》)以来, 人们对二恶英类 (dioxin) 为主的环境持久性污染物质 (POPs) 的认识不断加强, 有关二恶英的

研究也受到重视。

有关以二恶英为主的环境污染物质的研究所涉及的领域非常广。分析二恶英类物质对人体的毒性作用机理、进行基因毒性学研究, 是解开二恶英类物质的环境-机体相互作用机制的要点, 是保护人体健康的前提与基础, 也是对其生物学评价的依

收稿日期: 2005-05-08; 接受日期: 2005-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30360090); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-04-0262)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: dongwu2002@hotmail.com

据。只有深入地了解其机制,人们才能更好地采取有效保护措施,加强防治二恶英类物质造成的环境污染。

2, 3, 7, 8-四氯-二苯基-对-二恶英(2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD)是毒性最强的环境持久性有机污染物之一,可引起小鼠上腭的开裂,血液循环系统障碍等典型症状(Peterson et al, 1993; Theobald & Peterson 1997; Takagi et al, 2000)。在鱼类也观察到由 TCDD 引起的斑马鱼下颌短小等典型特征(Dong et al, 2005)。这些症状的形成机制是:TCDD 首先与细胞质内的芳烃基受体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)竞争性结合,再与核内的转录因子形成异型二聚体并进入细胞核内,特异地与 DNA 相应区域(dioxin response element, DRE)结合,引起以细胞色素 P450 (CYP)为代表的转录因子的活化,进而引起一系列基因转录调节的变化(Teraoka et al, 2002; Dong et al, 2004)。在与二恶英的毒性密切关联的基因中,对 AhR 的研究较为深入,用 TCDD 处理 AhR 欠缺小鼠,没有出现上腭开裂及水肾病等综合症(Peterson et al, 1993)。同样的现象也在斑马鱼(*Danio rerio*)的试验中发现:用 TCDD 进行功能阻断(knock down)的斑马鱼胚胎,没有出现心血管发育障碍以及 CYP 的诱导(Prasch et al, 2003)。

鱼类下颌发育短小,已经成为由二恶英类物质毒性引起的典型症状之一,目前已经对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、青鳞(*Oryzias latipes*)、斑马鱼等相继作了定性报道(Cantrell et al, 1996; Horning et al, 1999; Henry et al, 1997; Teraoka et al, 2002),而下颌短小的机制还不是十分清楚。

我们在以往的研究中探明 TCDD 引起斑马鱼下颌短小与 *Sonic hedgehog* (*Shh*) 基因表达相关联(Dong et al, 2005)。斑马鱼的 *Shh* 基因,以及类似基因 *Tiggy-winkle hedgehog* (*Twhh*) 已被确认与头部颜面、肢体发育有密切的关系。由于 *Shh* 基因在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的上颌、下颌均有表达(Suzuki & Kurokawa, 1996),因此,Young et al (2000)认为 *Shh* 基因与上颌和下颌的增殖、分化相关。我们使用 AhR2 基因阻断(gene knock down)的斑马鱼,研究 TCDD 对 *Shh* 表达的影响以及 TCDD 对下颌部细胞增殖与细胞凋亡的作用,以期探明 *Shh* 和 AhR2 的关系,以及 *Shh* 表达减少是否与下颌的短小有直接的关系。

1 材料和方法

1.1 实验用鱼

斑马鱼 AB 系,由日本酪农学园大学引入,按 Westerfield (1993) 的方法繁育。

1.2 采卵及药物处理

将斑马鱼雌雄分别培养,并以 L:D = 14:10 光周期促熟,实验前一天混养。自行产卵受精,收集受精卵并放入盛有斑马鱼林格尔液(ZR 液:38.7 mmol/L NaCl, 1.0 mmol/L KCl, 1.7 mmol/L HEP-ES, 2.4 mmol/L CaCl₂, pH 7.2)的培养皿中,置于 28.5 °C 孵化箱(LTI-600ED)中孵化。受精后 24 h (24 hpf, 24 hours post-fertilization) 开始进行药物处理,TCDD (Cambridge isotope Laboratories, Inc) 分别按 0.1、0.3、0.5 和 1.0 μg/L 的浓度梯度,溶剂二甲基亚砜(DMSO)的最终浓度为 0.1%,将药物加入 3.5 cm 培养皿,用 ZR 液定容到 3 mL。每个培养皿中放入 10 个受精卵,置于 28.5 °C 孵化箱内继续孵化。用含有 0.1% DMSO 的 ZR 液饲育的卵作为对照。

1.3 Alcian-blue 软骨染色

发育到一定时期斑马鱼胚胎用 10% 的中性甲醛固定 24 h,于染色液(0.1% Alcian blue 8GX/80% 甲醇/20% 醋酸)中染色 6 h,然后用 75%、50% 的酒精以及蒸馏水各清洗 3 h,再用消化液(0.05% 的胰酶/饱和四硼酸盐)以及 1% KOH/30% H₂O₂/各处理 1 h,最后在 70% 的甘油中观察及保存。

1.4 基因阻断

被检测基因 5' 末端的 morpholino antisense oligonucleotide 序列为: AhR2-MO: 5'-TGTACC-GATACCCGCCGACATGGTT-3'。用 4 mis-AHR2-MO: 5'-TGAACCCcATACCCGCC G t CATcGTT-3' 序列作为 MO 对照,与 AhR2-MO 不同的 4 个碱基用小写字母表示。

以上 morpholino antisense oligonucleotide (由美国 Gene Tools 公司制成)稀释至 30 μmol/L,通过微量注射注入 2 细胞期的斑马鱼胚胎,使其与二恶英毒性关联基因 AhR 的 5' 末端相应部位结合,从而使相应的 mRNA 不能转录翻译,达到 AhR 基因阻断的目的。

1.5 原位杂交

原位杂交按 Barth & Wilson (1995) 的方法进

行。用蛋白酶 K (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 室温消化 15 min, 然后加入杂交液 (50% 甲酰胺, $5 \times \text{SSC}$, 2 mg/mL Torula RNA, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 肝素) 放于 65 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中 1 h (预杂交), 再用含有 *Shh* 探针的杂交缓冲液更换, 放于恒温箱中过夜。用 $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.2 \times \text{SSC}$ 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中各清洗 30 min, 再用顺丁烯二酸 buffer (100 mmol/L 顺丁烯二酸, 150 mmol/L NaCl, 0.1% 吐温 20, pH 7.5) 清洗 15 min。用 blocking buffer (2% blocking reagent, 100 mmol/L 顺丁烯二酸, 150 mmol/L NaCl, 0.1% 吐温 20, 0.1% Triton x-100, pH 7.5) 在室温清洗 1 h, 放入含有 4 000 倍稀释的抗-DIG 抗体 (Roche) 并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中反应过夜。在清洗液 NTMT (100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5, 100 mmol/L NaCl, 50 MgCl_2 , 0.1% 吐温 20) 中静置 15 min, 使用 BM purple AP substrate precipitating (Roche) 显色。

1.6 TUNEL 染色

鱼胚从 48 hpf 开始分别用 0.1% DMSO (Control)、1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ TCDD、10 mmol/L Cyclopamine 和 20 mmol/L Cyclopamine 处理, 至 60 hpf 用中性甲醛固定, 取一部分胚胎进行整体 TUNEL 染色, 另一部分常规石蜡包埋、切片, 进行 TUNEL 染色。首先用 0.3% H_2O_2 /甲醇去除内源性过氧化酶, 再用蛋白酶 K (Proteinase K, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 消化后, 滴加反应液 (反应缓冲液 500 μL , Biotin-16-dUTP 5 μL , Terminal deoxynucleotidyl transferase 2.79 μL), 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中反应一夜 (切片染色时 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h), 用 PBS 清洗后滴加 AB 试剂 (Elite, Vector), 室温反应 1 h, PBS 清洗后用 3, 3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride Dihydrate (DAB, 关东化学) 显色, 75% 的甘油中保存 (切片用中性树胶封片)。每个处理随机选取 10 个胚胎, 显微镜检测, 计数观察到的所有阳性细胞。

1.7 免疫染色

鱼胚从 48 hpf 开始分别用 0.1% DMSO (Control)、1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ TCDD、10 mmol/L Cyclopamine 和 20 mmol/L Cyclopamine 处理, 至 60 hpf 用中性甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h, 常规石蜡包埋、切片、梯度酒精脱水。用蛋白酶 K 消化, 1% 马血清/PBTR (含 1% Triton X-100 的 PBS) 30 min 处理后, 与小鼠抗 H3 单克隆抗体, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中反应过夜。用 PBTR 清洗后, 滴加第二抗体抗小鼠 IgG 抗体 (200 倍稀释), 置于室温反应 2 h。用 ABC KIT (Vectar Lab)

发色, 用甲基绿 (methyl green) 对比染色。部分胚胎进行整体免疫染色。显微镜检测, 每个处理随机选取 10 个胚胎, 计数观察到的所有阳性细胞。

1.8 统计方法

试验所得数据用平均值 \pm 标准误表示, 用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), LSD 法进行多重比较, 差异显著性水平设置为 $\alpha = 0.05$, 极显著水平设为 $\alpha = 0.01$ 。

2 结果

2.1 TCDD 引起的短下颌

通过软骨染色, 在 72 hpf 观察到 TCDD 已经引起麦克氏软骨以及第一到第五鳃骨发育的低下, 在 96 hpf 以及 120 hpf, 不但观察到麦克氏软骨发育的低下还观察到鳃骨发育的畸形, 如鳃骨呈波纹状 (图 1—12)。

2.2 TCDD 处理引起 *Shh* 表达的降低与 AhR 的关系

在对照组, *Shh* 从 48 hpf 于下颌原基开始表达, 55 hpf 时在下颌处的表达最为明显。*Shh* 的表达部位为神经底板、上颌以及下颌。0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ TCDD 对 *Shh* 表达无显著影响, 但从 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 开始, *Shh* 在下颌部的表达降低; 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时, *Shh* 在下颌部几乎没有表达 (图 14)。在 2 细胞期阻断 AhR2 基因, 再用同样的方法处理和原位杂交, AhR2-MO 本身没有对下颌没有任何的影响 (图 15), 而在 TCDD 处理组, 并没有观察到 TCDD 引起的下颌短小和 *Shh* 表达显著减弱的现象 (图 16)。与 AhR2-MO 有 4 个碱基不同的阴性对照组, 没有发现明显的变化, 但用 TCDD 处理后, 表现为 *Shh* 表达显著减弱 (图 17, 18)。表明斑马鱼在 TCDD 处理时, AhR2 基因是 *Shh* 的上游控制基因。

2.3 TCDD 以及 *Shh* 阻断剂处理引起的细胞凋亡以及增殖

TCDD 虽没有明显的引起下颌部的细胞凋亡, 但有增加的倾向 (图 19—24)。方差分析结果表明, Cyclopamine 极显著影响斑马鱼胚胎下颌区细胞凋亡数目 ($F_{3,24} = 9.922$, $P < 0.001$)。TCDD 处理胚胎细胞凋亡数目为 (2.43 ± 0.69) 个/胚, 稍高于对照组 (1.14 ± 0.26) ($P = 0.248$), 10 mmol/L Cyclopamine 处理组细胞凋亡数目为 (5.57 ± 0.97) 个/胚, 极显著高于对照组 ($P < 0.001$) 和 TCDD 组 ($P = 0.008$), 但和 20 mmol/L Cyclopa-

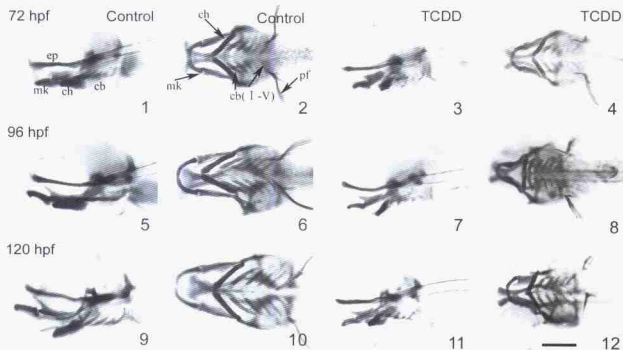


图 1—12 TCDD 引起斑马鱼下颌短小 (Alcian blue 软骨染色)

Figs. 1—12 Retardation of lower jaw growth by TCDD in zebrafish

cb (1-V): 第一到第五角鳃骨; ch: 角舌骨; ep: 鳃骨; mk: 麦克氏软骨; pf: 胸鳍。比例尺 = 100 μm 。

cb (1-V): First to fifth ceratobranchial; ch: ceratohyal; ep: ethmoid plate; mk: Meekel's cartilage; pf, pectoral fin. Bar = 100 μm .

1—2. 72 hpf 0.1 号 DMSO 处理 (Control); 3—4. 72 hpf 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD 处理 (TCDD); 5—8. 96 hpf; 9—12. 120 hpf。

1, 3. 侧面观 (Lateral views); 2, 4. 腹面观 (Ventral views)。

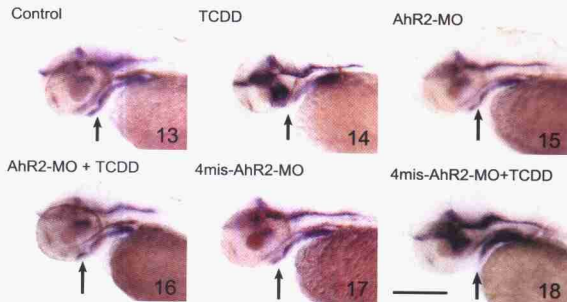


图 13—18 *Shh* 基因在斑马鱼 (55 hpf) 下颌部位的表达

Figs. 13—18 Expressions of *Shh* in lower jaw region of zebrafish (55 hpf)

13—18. 55 hpf 不同处理胚胎, 进行 *Shh* 基因整体原位杂交, 箭头指示表达差异区域, 比例尺 = 100 μm (Embryos were used for whole mount in situ hybridization of *shh*. Arrows indicate the difference of *Shh* expression. Bar = 100 μm).

13. 0.1% DMSO 处理 (Embryos were exposed to 0.1% DMSO);

14. 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD 处理 (Embryos were exposed to 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD);

15. AhR2 基因阻断胚胎 (AhR2 gene knockdown);

16. AhR2 基因阻断, 再进行 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD 处理胚胎 (AhR2 gene knockdown and embryos were exposed to 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD);

17. 与 AhR2-MO 有 4 个碱基不同的阴性对照胚胎 (4mis-AHR2-MO control);

18. 与 AhR2-MO 有 4 个碱基不同的阴性对照胚胎并进行 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD 处理胚胎 (4mis-AHR2-MO control and embryos were exposed to 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD).

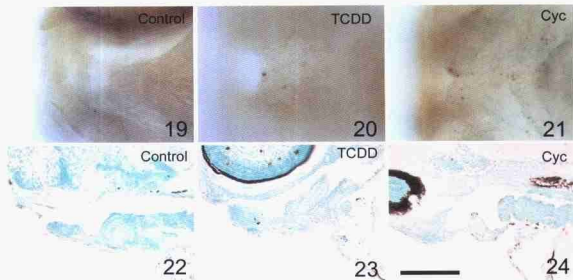


图 19—24 斑马鱼下颌部细胞凋亡

Figs. 19—24 The apoptosis in lower jaw of zebrafish embryos

19—21. 从 48—60 hpf, 整体 TUNEL 染色 (Embryos were exposed from 48 hpf until 60 hpf, whole mount TUNEL staining);

22—24. 从 48—60 hpf, 切片 TUNEL 染色, 比例尺为 100 μm (Embryos were exposed from 48 hpf until 60 hpf, section TUNEL staining. Bar = 100 μm);

19, 22. 0.1% DMSO 处理 (Embryos were exposed to 0.1% DMSO);

20, 23. 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD 处理 (Embryos were exposed to 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD);

21, 24. 10 mmol/L Cyclopamine 处理 (Embryos were exposed to 10 mmol/L Cyclopamine).

mine 处理组差异不显著 ($P = 0.604$) (图 31A)。

同样通过 H3 免疫染色, 观察到 TCDD 以及 Cyclopamine 同样明显地引起细胞增殖降低 (图 25—30)。方差分析结果表明, Cyclopamine 显著影响斑马鱼胚胎下颌区增殖细胞数目 ($F_{2,35} = 4.672$, $P = 0.016$)。TCDD 处理胚胎增殖细胞数目为 ($14.33 \pm .51$) 个/胚, 显著低于对照组 (20.38 ± 1.77) ($P = 0.011$), 但和 10 mmol/L Cyclopamine 处理组差异不显著 ($P = 0.902$) (图 31B)。

3 讨论

本试验探讨了 TCDD 引起的短下颌的控制基因 AhR 与 *Shh* 的关系, 以及 *Shh* 基因与细胞的增殖、细胞凋亡的关系。通过基因阻断法有力的证明了

AhR 为 *Shh* 的上游控制基因, 而 *Shh* 基因的缺失又可以引起细胞增殖的降低。这与 Prasch et al (2003) 的报道是相一致的, 即阻断 AhR2 基因 (AhR-MO) 可以抑制 TCDD 引起的包括软骨发育在内的各种发育障碍。也就是说, TCDD 引起短下颌是由于 TCDD 以 AhR2 为媒介引起 *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, 最终引起下颌的短小。这也与 Teraoka et al (2002) 的推断一致: 通过测定斑马鱼初期胚胎下颌的血流量, 至 96 hpf 没有观察到 TCDD 对下颌血液循环的阻碍作用, 引起短下颌有可能是因为 TCDD 对下颌原始基的直接作用。在我们以往的研究中发现 1 $\mu\text{g/L}$ TCDD 引起的下颌的变化或短小是从 60hpf 开始的, 0.5 $\mu\text{g/L}$ TCDD 是从 72 hpf 开始的 (Dong et al,

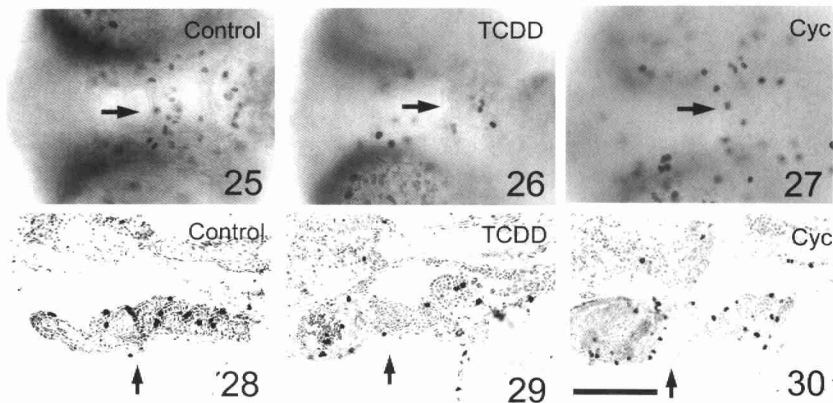


图 25—30 斑马鱼胚胎下颌细胞增殖

Figs. 25—30 Proliferating in jaw of zebrafish embryos

25—27. 从 48—60 hpf, 整体 H3 免疫染色. 箭头表示下颌前端开口部 (Embryos were exposed from 48 hpf until 60 hpf, whole mount immunohistochemistry staining. Arrows indicate the position of mouth opening);

28—30. 从 48—60 hpf, 切片 H3 免疫染色. 箭头表示下颌. 比例尺为 100 μm (Embryos were exposed from 48 hpf until 60 hpf, section immunohistochemistry staining. Arrows indicate the jaw of zebrafish embryos. Bar = 100 μm);

25, 28, 0.1% DMSO 处理 (Embryos were exposed to 0.1% DMSO);

26, 29, 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD 处理 (Embryos were exposed to 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD);

27, 30, 10 mmol/L Cycloamine 处理 (Embryos were exposed to 10 mmol/L Cycloamine).

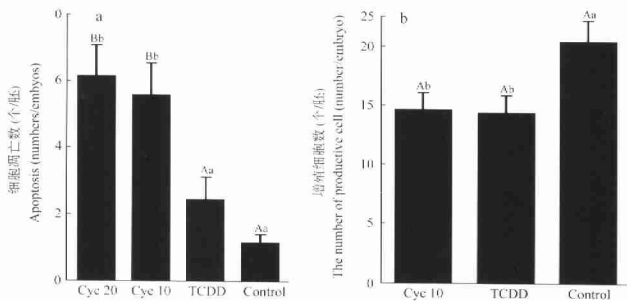


图 31 TCDD 和 Cycloamine 处理后斑马鱼胚胎下颌细胞凋亡 (a) 和细胞增殖 (b)

Figs. 31 Numbers of apoptosis (a) and proliferating (b) of lower jaw in zebrafish embryos exposed to TCDD and Cycloamine

相异小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相异大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), $n = 10$.
Control: 0.1% DMSO 处理; TCDD: 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD 处理; Cyc10: 10 mmol/L Cycloamine 处理; Cyc20: 20 mmol/L Cycloamine 处理.

The different small letters in chart means significant difference ($P < 0.05$) and capital letters means high significant difference ($P < 0.01$). Control: Embryos were exposed to 0.1% DMSO; TCDD: Embryos were exposed to 1.0 $\mu\text{g/L}$ TCDD; Cyc10: Embryos were exposed to 10 mmol/L Cycloamine; Cyc20: Embryos were exposed to 20 mmol/L Cycloamine.

2005); 而本研究发现在 55 hpf 时, *Shh* 表达表现为明显的降低或缺失 (图 13—18), 说明 *Shh* 表达降低或缺失在出现下颌结构缺失之前, 而非由于结构缺失引起的假象。

Shh 阻断剂 Cyclopamine 的处理引起下颌增殖细胞数目的减少以及细胞凋亡的增加, 同样 TCDD 也引起的下颌部细胞增殖的降低, 但并没有发现细胞凋亡显著增加, 考虑 TCDD 引起斑马鱼短下颌不仅是 *Shh* 表达的降低欠缺, 还有可能有其他控制基因的存在, 可能是受其他基因影响所致。另外, 脊椎动物下颌软骨主要由颜面部神经嵴细胞迁移分化而来, 而 *Shh* 信号对神经嵴细胞的分化有重要影

响。这一点, 有待以后研究。

总之, 本研究表明 *Shh* 是对下颌的生长发育起重要作用的基因之一; TCDD 引起下颌短小是由于 TCDD 以 AhR2 为媒介引起 *Shh* 基因表达的欠缺, 进而引起下颌部增殖细胞的减少, 最终引起短下颌的发生。此研究也进一步表明, TCDD 引起的下颌短小有可能作为低浓度二恶英类物质生物评价的一个参考指标。

致谢: 日本酪农学园大学的 Dr. Takeo. Hiraga. 以及 Dr. Hiroki. Teraoka 给予诸多帮助, 在此表示诚挚的谢意。

参考文献:

- Barth KA, Wilson SW. 1995. Expression of zebra fish nk2.2 is influenced by sonic hedgehog/vertebrate hedgehog-1 and demarcates a zone of neuronal differentiation in the embryonic forebrain [J]. *Development*, **121** (6): 1755 - 1768.
- Cantrell SM, Lutz LH, Tillitt DE, Hannink M. 1996. Embryotoxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): the embryonic vasculature is a physiological target for TCDD-induced DNA damage and apoptotic cell death in Medaka (*Orizias latipes*) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, **141** (1): 23 - 34.
- Dong W, Yang JF, Cao YX, Wang SZ, Hiroki T, Takeo H. 2005. Correlation between short lower jaw in zebrafish embryos induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and *Shh* gene [J]. *J Lake Sci*, **17** (2): 162 - 168. [董武, 杨景峰, 曹颖霞, 王思珍, Hiroki T, Takeo H. 2005. 二恶英引起斑马鱼下颌短小及其与 Sonic hedgehog 基因的关联. 湖泊科学, **17** (2): 162 - 168.]
- Dong W, Teraoka H, Tsujimoto Y, Stegeman JJ, Hiraga T. 2004. 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*, **77** (1): 109 - 116.
- Henry TR, Spitsbergen JM, Hornung MW, Abnet CC, Peterson RE. 1997. Early life stage toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, **142** (1): 56 - 68.
- Hornung MW, Spitsbergen JM, Peterson RE. 1999. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters cardiovascular and craniofacial development and function in sac fry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Toxicol Sci*, **47** (1): 40 - 51.
- Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. 1993. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: Cross-species comparisons [J]. *Crit Rev Toxicol*, **23** (3): 283 - 335.
- Prasch AL, Teraoka H, Carney SA, Dong W, Hiraga T, Stegeman JJ, Heideman W, Peterson RE. 2003. Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin developmental toxicity in zebrafish [J]. *Toxicol Sci*, **76** (1): 138 - 150.
- Suzuki T, Kurokawa T. 1996. Functional analyses of FGF during pharyngeal cartilage development in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryo [J]. *Zool Sci*, **13**: 883 - 891.
- Takagi TN, Matsui KA, Yamashita K, Ohmori H, Yasuda M. 2000. Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) [J]. *Teratog Carcinog Mutagen*, **20** (2): 73 - 86.
- Teraoka H, Dong W, Ogawa S, Tsukiyama S, Okuhara Y, Niiyama M, Ueno N, Peterson RE, Hiraga T. 2002. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: Altered regional blood flow and impaired lower jaw development [J]. *Toxicol Sci*, **65** (2): 192 - 199.
- Theobald HM, Peterson RE. 1997. In utero and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Effects on development of the male and female reproductive system of the mouse [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, **145** (1): 124 - 135.
- Westerfield M. 1993. The Zebrafish Book [M]. Eugene: University of Oregon Press.
- Young DL, Schneider RA, Hu D, Helms JA. 2000. Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, **11** (3): 304 - 317.