

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897-20140331002

于永利, 王丰, 陈彤, 等. 基于低浓度二噁英抑制青鳉幼鱼耳泡生成与 SOX9b 相关联[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(6): 1141-1145

Yu Y L, Wang F, Chen X, et al. The relation between SOX9b and TCDD inhibited development of otic vesicle in medaka embryos [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(6): 1141-1145 (in Chinese)

低浓度二噁英抑制青鳉幼鱼耳泡生成与 SOX9b 相关联

于永利^{1, 2}, 王丰¹, 陈彤¹, 于华荣³, 赵宝全⁴, 东彦新¹, 杨景峰¹, 董武^{1, *}

1. 内蒙古民族大学动物科技学院\内蒙古自治区高等学校毒物与动物疾病监控重点实验室, 通辽市 028042

2. 内蒙古民族大学生命科学院, 通辽市 028042

3. 内蒙古民族大学农学院, 通辽市 028042

4. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850

收稿日期: 2014-03-31 录用日期: 2014-08-20

摘要: 2,3,7,8-四氯二苯并对二噁英 (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin, TCDD) 是一种持久性环境有机污染物质,它在有机体内的蓄积性引起研究人员的重视。以青鳉胚胎作为实验动物模型,使用原位杂交和定量聚合酶链锁反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术从分子水平探讨了 TCDD 对胚胎耳泡的发育及其毒性作用机制。结果表明,TCDD 造成青鳉幼鱼耳泡生成障碍。通过原位杂交和 qPCR 分析表明,TCDD 引起软骨发育的变化与 SOX9b 表达降低有密切的关联。研究认为青鳉胚胎是一种非常敏感的 TCDD 模式动物,其耳泡软骨发育以及 SOX9b 基因表达可能是一种二噁英发育毒性的效应标记物。

关键词: TCDD; 青鳉胚胎; 耳泡; 毒性

文章编号: 1673-5897(2014)6-1141-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

The Relation Between SOX9b and TCDD Inhibited Development of Otic Vesicle in Medaka Embryos

Yu Yongli^{1, 2}, Wang Feng¹, Chen Xing¹, Yu Huarong³, Zhao Baoquan⁴, Dong Yanxin¹, Yang Jing-feng¹, Dong Wu^{1, *}

1. Inner Mongolia Provincial Key Laboratory for Toxicants and Animal Disease, College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, TongLiao 028042, China

2. College of Life Sciences, Inner Mongolia University for Nationalities, TongLiao 028042, China

3. Agriculture collage, Inner Mongolia University for Nationalities, TongLiao 028042, China

4. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850

Received 31 March 2014 **accepted** 20 August 2014

Abstract: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is one of persistent organic pollutants in the environment and have bioaccumulation. Medaka embryos were used as a testing platform, we explored the relationship between TCDD exposure and development of the otic vesicle. In this study, we employed both in situ hybridization and RT-PCR tech-

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (Nos. 2012MS1203); 国家自然科学基金项目 (Nos. 30360090; 21267015); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (Nos. NCET-04-0262); 内蒙古自治区“草原英才”工程 (2014)

作者简介: 于永利 (1978-) 男, 讲师, 硕士, 主要从事食品与环境卫生学研究。E-mail: 707928940@qq.com

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

niques to investigate the relationship between SOX9b expression and TCDD exposure during development of otic vesicle in medaka embryos. Our results showed that exposure of TCDD caused suppression in formation of otic vesicle in medaka embryos. By in situ hybridization and RT-PCR analyses, we can relate changes of cartilage development caused by TCDD with the reduced expression of SOX9b. These results indicated that otic vesicle cartilage development and SOX9b expression are potential biomarkers for TCDD toxicity.

Keywords: TCDD; medaka embryos; otic vesicle; toxicity

二噁英(简称 DXNs)是多氯代三环芳烃类化合物的总称,包括210种同系物,其中2,3,7,8-四氯代二苯并对二恶英(TCDD)的毒性相对较大。二噁英是工业生产或垃圾燃烧所产生的微量污染物,可在生物体内蓄积,对人类健康及环境污染的影响已引起人们高度重视^[1-5]。

二恶英类对胚胎软骨的发育有一定的影响^[6-7],Xiong等发现TCDD能够致使下颌短小,这种短小与sry-box containing gene 9(sox9)基因相关联^[8],而SOX9对神经脊与软骨发育具有决定性作用。但是,有关TCDD引起骨骼发育障碍及其机制还不是很清晰,有待于进一步研究^[9-10]。

污染物毒性的生物评价是生态毒理学研究的一种重要手段。目前已有多种模式生物,如黑腹果蝇、非洲爪蟾和斑马鱼等。在水生态毒理学的研究中,常使用的鱼类实验生物有斑马鱼和青鳉。青鳉与斑马鱼相比,具有以下特点:(1)温度适应范围较广,对二恶英有更高的敏感性;(2)鱼卵体积大且不易破损;(3)各阶段发育变化明显,易于观察和操作;(4)全基因组序列解析完毕等诸多优点^[11-12]。

本实验以青鳉作为动物模型,用低浓度的TCDD进行短时间染毒,观察TCDD对青鳉耳泡软骨的影响及基因变化,以期二噁英影响青鳉鱼胚胎软骨发育的毒性机制提供进一步的实验依据。

1 材料和方法(Materials and methods)

1.1 药物

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)来自Cambridge Isotope Laboratories(Andover, MA)。纯度 $\geq 98\%$ 。DIG抗体等购自Roch(Indianapolis, IN),其他药物购自Sigma(St. Louis, MO)。

1.2 试验动物及染毒方式

受精卵根据文献^[6]的方法,将青鳉雌雄分别培养,并以L:D=14:10光周期促熟,实验前一天混养。自然交配后,采集受精卵并放入盛有青鳉缓冲液的培养皿中,置于28.5℃孵化箱(LTI-600ED)中孵化。受精后6h开始染毒(6 hours post

-fertilization,以下略为6 hpf),染毒时使用3 cm培养皿,二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂,采用 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 二噁英染毒等定容到3 mL,每个培养皿放入10个受精卵,置于28.5℃孵化箱内续孵化。用含有0.1% DMSO的青鳉缓冲液饲养的卵作为溶媒对照。青鳉胚胎进行TCDD染毒1h后使用培养液清洗,然后将青鳉(medaka)放在培养皿中直至固定用于以下各种试验。

1.3 软骨染色

青鳉胚胎染毒1h后,培养至10h使用10%甲醛固定一夜,自来水冲洗2次,每次30 min,取固定后的胚胎在Alcian Blue 8GR中染色6h,然后用梯度酒精(90%~20%)水合,胰蛋白酶消化液消化15~30 min,0.5% KOH加双氧水处理1h之后水洗,添加70%甘油后摄影。

1.4 原位杂交

青鳉胚胎(4h)经TCDD或者DMSO处理1h后清洗,培育至8d,或者10d后使用10%中性缓冲福尔马林固定(过夜),然后用磷酸缓冲液清洗后放在甲醇中备用。胚胎使用蛋白酶K室温消化,然后加入杂交液(内含50%甲酰胺,300 mmol·L⁻¹ NaCl,30 mmol·L⁻¹柠檬酸钠)放于65℃的恒温箱中预杂交1h,再用含有SOX9b探针的杂交缓冲液更换,放于恒温箱中过夜,次日清洗放入含有3000倍稀释的抗DIG抗体放在4℃冰箱中反应过夜,在清洗液后显色摄影。

1.5 RNA的提取纯化以及定量PCR(RT-PCR)技术

总RNA的制备将使用Trizol(Gibco产品),使用手动或者匀浆仪打碎斑马鱼胚胎后者脏器后,加入氯仿并且离心,使之分为水相和有机相两层。用移液枪转移水相(内含有RNA),用异丙醇沉淀RNA,经75%乙醇洗涤两遍后用水(RNase free)溶解。制备好的RNA样品用核酸定量分析仪检测OD260、OD260/OD280的值,并计算RNA产量,根据需要,进行RNA的提纯工作。转录使用反转录酶1 μL ,10x缓冲液2 μL ,25x dNTP加0.8 μL ,反转

录抑制剂 1 μL , 10x RT Random 引物 2 μL , 后加纯净水(无核酸酶)至 10 μL , 然后加入 250 ng 等量 total RNA 10 μL 混合后 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 120 min 反应, 再用 85 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭活。Sybr GreenI RT-PCR 方法的建立: 在 25 μL 反应体系中, 加入 sybr GreenI PCR 反应混合液 12.5 μL , 上下游引物各 1 μL , cDNA 1 μL (1 ng), (上游引物: 5'-AAAGC-CAACAGGGTCAACAG-3'; 下游引物: 5'-GCTG-TAGTAAGAGTTGGCAC-3') 水 9.5 μL 。在 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 条件下反应 40 个循环。内参基因以及计算使用 18s, 计算采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法来计算基因表达的相对变化。

1.6 统计方法

试验数据用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析方法进行多重比较, 用平均值 \pm 标准误差表示, 差异显著性水平设置为 $p < 0.05$ 。

2 结果(Results)

2.1 TCDD 引起青鳉幼鱼耳泡部位软骨缺失

青鳉胚胎发育到 9~10 hpf 后, 用 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD (DMSO 0.1%)、0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 和 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 对胚胎进行连续染毒 1 h 后, 转移到正常的胚胎培养液中, 其中一部分胚胎培育到 10 d 及其 20 d 后进行软骨染色; 另一部分胚胎培育到 8 d 实施原位杂

交。胚胎发育至 10 d, 各组之间的死亡率与对照组相比没有差异, 但通过软骨染色发现, 无论是低浓度的 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 染毒组, 还是高浓度的 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 染毒组, 均致使耳泡部软骨发育缺失(图 1B 和 C)。胚胎发育到 20 d 时, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 染毒组与对照组的死亡率没有显著差异, 但 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 染毒组尚未发育到 20 d, 幼鱼已经全部死亡。通过软骨染色发现, 与对照相比(图 1D) 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 染毒组幼鱼耳泡部软骨发育仍然缺失(图 1E)。

2.2 TCDD 对青鳉幼鱼耳泡部软骨和 SOX9b 基因表达的影响

当胚胎发育到 8 d 后使用 4% 多聚甲醛(PFA) 4 摄氏度固定一夜后, 实施原位杂交和定量 PCR (qPCR) 检测。与对照组比较, SOX9b 基因在耳泡部位、腮弓部位有较强的表达(图 2A)。但是染毒组从 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始在耳泡部位的表达有明显的减低(图 2, B), 使用 ImageJ 软件分析耳泡部位 SOX9b 的表达强度, 发现 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 染毒组与对照相比, 减低了 1.68 倍, 而 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 染毒组没有显著变化(图 2, C)。通过 qPCR 进一步定量 TCDD 所产生的影响, 发现 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 所产生的影响同样不明显, 但 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD 染毒组显著抑制了 SOX9b 基因的表达, 表达量降低了 2.66 倍(图 3)。

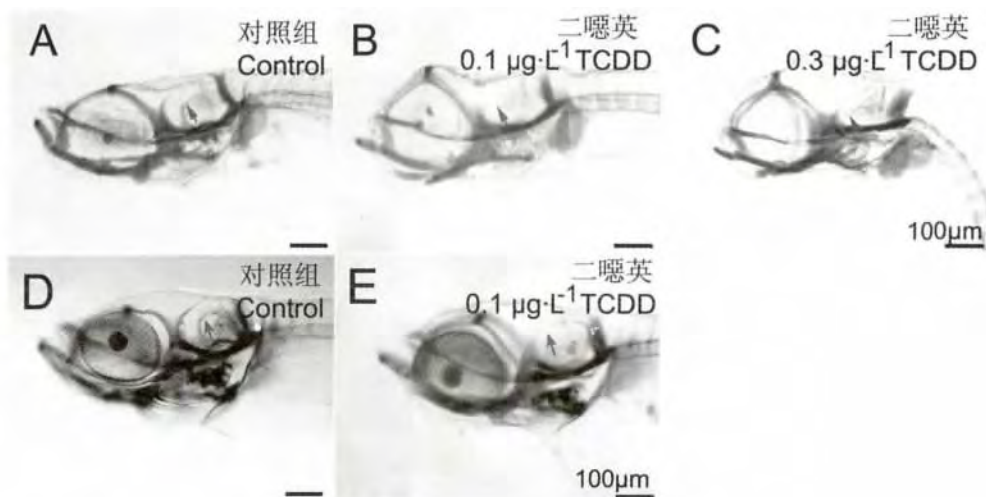


图1 TCDD对青鳉幼鱼耳泡部软骨发育的影响。给6hpf斑青鳉幼鱼染毒1h后进行水洗培养至10d或者20d进行软骨染色观察。A、B和C为10d胚胎,D和E为20d幼鱼。A、D为对照组,B和E表示0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,C为0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 染毒胚胎,箭头表示耳泡部软骨。比例尺为100 μm 。

Fig. 1 The effect of TCDD on otic vesicle development in medaka larva. Embryos were exposed for 1 hour from 6 hpf, washed and incubated until 10 dpf or 20 dpf, and carried out cartilage stain. A, B and C: 10 dpf; D and E: 20 dpf. A and D: control; B and E: 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD; C: 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCDD. Arrow: otic vesicle. Bar = 100 μm .

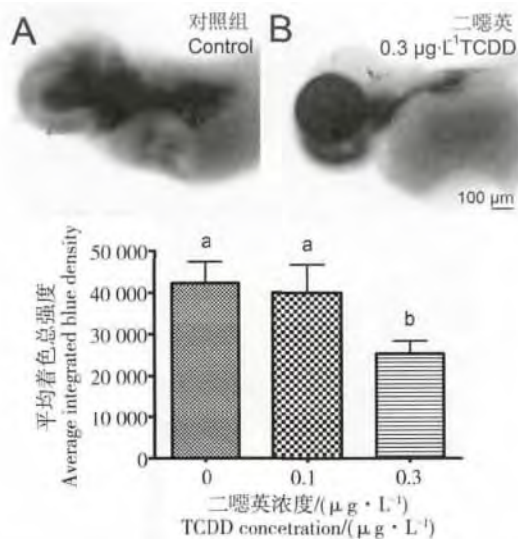


图2 TCDD对青鳞幼鱼耳泡部位SOX9b基因表达的影响。给6 hpf斑青鳞幼鱼染毒1 h后进行水洗培养至8 d后进行原位杂交后对比观察。A为对照组 B $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TCDD染毒胚胎 A和B中的箭头指示SOX9b基因在耳泡部位表达。C是使用ImageJ对耳泡表达强度进行定量分析。不同字母之间表示差异及显著 $p < 0.05$ 。

Fig. 2 The effect of TCDD on SOX9b mRNA expression in otic vesicle of Medaka Larva. Embryos were exposed for 1 hour from 6 hpf, washed and incubated until 8 dpf. A: control; B: $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TCDD. Arrow: otic vesicle in A and B, C: Integrated blue density of SOX9a, was analyzed by Image J. different letter indicate significant different, $p < 0.05$.

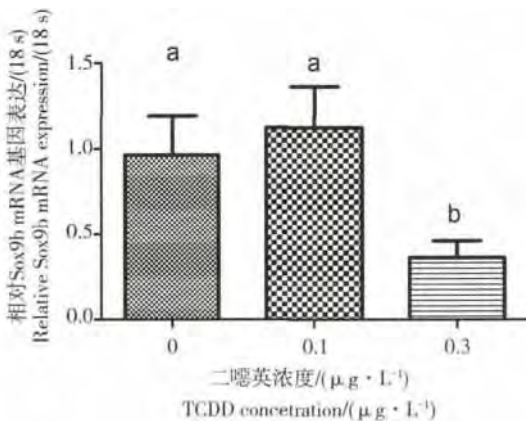


图3 TCDD对青鳞幼鱼SOX9b基因表达的影响。给6 hpf斑青鳞幼鱼染毒1 h后进行水洗培养至8 h通过定量PCR检测。不同字母表示差异极显著 $p < 0.05$ 。

Fig. 3 The effect of TCDD on expression of SOX9b in larva of medka as determined by QPCR. Embryos were exposed for 1 hour from 6 hpf, washed and incubated until 8 dpf. Different letters indicate significant difference, $p < 0.05$.

3 讨论(Discussion)

本试验首次通过软骨染色确认了短时间一次性低浓度染毒,TCDD可以抑制青鳞鱼胚胎耳泡的生成。当TCDD浓度达到 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,胚胎发育到8 d后,观察结果表明耳泡生成便明显受到抑制。在基因水平上,SOX9b是软骨发育的重要调节基因,通过原位杂交观察SOX9b基因表达,发现TCDD同样显著抑制了耳泡部位Sox9b的基因表达。

SOX有两个分型,一个是Sox9a,另一种是Sox9b,其中Sox9b是软骨细胞分化与增殖的重要转录因子^[13],其对斑马鱼下颌软骨的发育与生长有非常重要的调节作用,Xiong等使用SOX9b寡核苷酸减低Sox9b的表达与转录,斑马鱼表现出与TCDD染毒同样下颌软骨发育不全与骨畸形,但是当注射Sox9b mRNA后,发现SOX9b mRNA具有阻止这种发育不全或者畸形作用^[8]。这与Mathe等报道相符,当TCDD染毒后,斑马鱼幼鱼与成鱼尾鳍再生障碍,同时SOX9b mRNA表达显著降低。有关青鳞SOX9b与软骨发育调控机制有待于进一步研究。本研究明确了TCDD导致耳泡部软骨发育障碍,这种发育障碍同时伴随着SOX9b mRNA表达的显著降低,这种耳泡发育的影响必然影响幼鱼的运动与平衡调节。

TCDD的典型症状是引起心囊水肿和血液流动延迟,有关毒性机制研究被认为是经由上游基因芳烃受体而引发^[14-15]。但导致具体心囊水肿的下游基因还是未知,最近Hofsteen等报道导致心脏畸形的下游基因SOX9b具有决定性作用,如SOX9b的缺乏导致斑马鱼颅面畸形,并且SOX9b在心室的表达被TCDD显著下调,导致下调的原因可能是心脏的心外膜层的形成和迁移受到影响,但这种现象没有在SOX9a敲除组中发现^[16-17]。

通过本试验表明,TCDD染毒引起青鳞胚胎耳泡发育障碍,这种障碍与TCDD的浓度有剂量响应关系,当浓度达到 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,耳泡软骨发育几乎全部受到抑制;低浓度TCDD($0.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)一次性染毒(1 h)显著抑制了与软骨(骨)相关基因SOX9b的表达,并在8 d之内能够监测出青鳞胚胎形态学(耳泡)的变化和SOX9b表达的变化,说明青鳞胚胎是一种非常敏感的TCDD模式动物,其耳泡软骨发育以及SOX9b基因表达可能是一种二恶英发育毒性的效应标记物。

通讯作者简介: 董武(1969—), 教授, 博士, 硕导, 主要从事环境毒理学研究, 发表学术论文 50 余篇。

参考文献:

- [1] Passuello A, Mari M, Nadal M, et al. POP accumulation in the food chain: Integrated risk model for sewage sludge application in agricultural soils [J]. *Environment International*, 2010, 36(6): 577–583
- [2] Castro-Jimenez. Atmospheric input of POPs into Lake Maggiore (Northern Italy): PCDD/F and dioxin-like PCB profiles and fluxes in the atmosphere and aquatic system [J]. *Chemosphere*, 2008, (Suppl1): S122–130
- [3] 凌艺辉, 宾晓农, 刘晓琦, 等. 2,3,7,8-四氯二苯并二噁英对金黄地鼠脏器指数及氧化应激指标的影响 [J]. *现代预防医学*, 2007, 34(23): 4401–4402
- [4] 吴广枫, 孙晨星, 石英. 食品中二噁英检测方法的研究进展 [J]. *食品科技*, 2007, (11): 23–28
- [5] 王敬贤, 吴文忠. 二噁英的主要来源、排放量及相关环境健康标准 [J]. *水生生物学报*, 2002, 26(3): 286–294
- [6] Dong W, Hinton D E, Kullman S W. TCDD disrupts hypural skeletogenesis during medaka embryonic development [J]. *Toxicological Science*, 2012, 125(1): 91–104
- [7] Dong W, Matsumura F, Kullman SW. TCDD induced pericardial edema and relative COX-2 expression in medaka (*Oryzias latipes*) embryos [J]. *Toxicological Sciences*, 2010, 118(1): 213–223
- [8] Xiong K M, Peterson R E, Heideman W. Aryl hydrocarbon receptor-mediated down-regulation of sox9b causes jaw malformation in zebrafish embryos [J]. *Molecular Pharmacology*, 2008, 74(6): 1544–1553
- [9] Wagner E F, Karsenty G. Genetic control of skeletal development [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2001, 11(5): 527–532
- [10] Jenny M J. Distinct roles of two zebrafish AHR repressors (AHRRa and AHRRb) in embryonic development and regulating the response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 110(2): 426–441
- [11] Wakamatsu Y, Pristiyazhnyuk S, Kinoshita M, et al. The see-through medaka: A fish model that is transparent throughout life [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(18): 10046–10050
- [12] Ishikawa Y. Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics [J]. *BioEssays*. 2000, 22(5): 487–495
- [13] Yan Y L. A pair of Sox: Distinct and overlapping functions of zebrafish SOX9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development [J]. *Development*, 2005, 132(5): 1069–1083
- [14] Teraoka H, Dong W, Tsujimoto Y, et al. Induction of cytochrome P450 1A is required for circulation failure and edema by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 304(2): 223–228
- [15] Dong W, Teraoka H, Tsujimoto Y, 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]. *Toxicological Sciences* 2004, 77(1): 109–116
- [16] Hofsteen P, Plavicki J, Johnson SD, et al. Sox9b is required for epicardium formation and plays a role in TCDD-induced heart malformation in zebrafish [J]. *Molecular Pharmacology*, 2013, 84(3): 353–360
- [17] Mehta V, Peterson R E, Heideman W. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure prevents cardiac valve formation in developing zebrafish [J]. *Toxicological Science*, 2013, 04(2): 303–11 ◆