

文章编号: 1000-5641(2011)02-0134-08

视黄酸对热带爪蟾胚胎致畸效应的表型特征

曹庆珍, 钱丽娟, 张小利, 袁静, 刘俊奇, 施华宏

(华东师范大学 环境科学系 上海市城市化过程与生态恢复重点实验室, 上海 200062)

摘要: 选取典型的胚胎致畸剂——全反式视黄酸对热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)胚胎进行 24, 36 和 48 h 暴露. 结果表明, 2, 10 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 视黄酸暴露对胚胎的存活率没有影响, 对胚胎的生长和发育却有明显的抑制作用, 并导致所有胚胎出现畸形现象, 说明视黄酸对热带爪蟾胚胎具有极强的致畸性, 同时显示了热带爪蟾胚胎对视黄酸的敏感性. 视黄酸主要引起胚胎脑部缩小、眼睛色素减少、围心腔水肿和尾巴弯曲等多种畸形类型. 24, 36 和 48 h 后, 暴露组脑部畸形指数和眼睛畸形指数较对照组均有明显增加, 并表现出较好的浓度-效应关系, 而时间-效应关系不明显. 表明视黄酸对脑和眼部的影响主要发生在暴露的前 24 小时; 48 h 后尾部的畸形指数相对于 24 h 有明显的升高. 将视黄酸导致的胚胎畸形类型与污染物三丁基锡对比, 表明视黄酸致畸特征图谱在三丁基锡致畸机制的研究中有重要的参考价值. 由此可见, 有可能将 FETAX 实验发展为一种基于致畸机制的发育毒性检测方法.

关键词: 视黄酸; 爪蟾; 胚胎; 致畸

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2011.02.017

Teratogenic phenotypes induced in *Xenopus tropicalis* embryos by all-*trans* retinoic acid

CAO Qing-zhen, QIAN Li-juan, ZHANG Xiao-li, YUAN Jing,
LIU Jun-qi, SHI Hua-hong

(Shanghai Key Laboratory of Urbanization Processes and Ecological Restoration,
Department of Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: In this study, *Xenopus tropicalis* embryos were exposed to a known teratogen, all-*trans* retinoic acid (RA), for 24, 36 and 48 h. Exposure to 2, 10 and 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA showed no effects on the survival rate of embryos, but it significantly inhibited the growth and development of embryos. RA also led to malformations in all embryos, which suggests that RA is a strong teratogen, and *X. tropicalis* is very sensitive to RA. The most characteristic malformations were small brains, less pigmentation in eyes, pericardial edema and bent tails. After 24, 36 and 48 h of exposure, the brain teratogenic index and eye teratogenic index were significantly in-

收稿日期: 2010-02

基金项目: 国家自然科学基金(20877023); 上海市自然科学基金(08ZR1406900); 长江水环境教育部重点实验室开放基金(YRWEF06003)

第一作者: 曹庆珍, 女, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学. E-mail: zhen13953954115 @126.com.

通讯作者: 施华宏, 男, 副教授, 研究方向为生态毒理学. E-mail: hhshi@des.ecnu.edu.cn.

creased in the treatment groups, and these effects showed a good concentration-effect but not time-effect relation. The tail teratogenic index was higher in embryos after 48 h of exposure than that after 24 h of exposure. The comparisons of teratogenic phenotypes induced by RA and tributyltin indicate that RA is a good reference for revealing the mechanisms of tributyltin-mediated teratogenicity. Our results also suggest that FETAX might be modified as an assay to study the mechanisms of contaminants in future.

Key words: retinoic acid; *Xenopus tropicalis*; embryos; teratogenesis

0 引 言

自 20 世纪 90 年代以来,全球两栖类动物种群衰退现象十分严重.世界自然保护联盟发表的最新公报认为两栖类动物是当今世界上生存形势最为严峻的动物群体^[1-3].化学污染物被认为是引起两栖类种群衰退的重要原因之一.一些野外调查表明两栖类的畸形现象的确与化学污染有关^[4].因此,研究污染物对两栖类的致畸作用及其机制对揭示两栖类种群衰退的原因具有重要意义.

非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)胚胎致畸实验(FETAX)是检测污染物发育毒性的常用方法^[5].目前,该方法仅用于污染物致畸效应的检测^[6].鉴于爪蟾作为发育生物学动物模型的诸多优势,运用爪蟾胚胎进行特定污染物致畸机制的研究将具有较大的潜力^[7].其中,胚胎畸形的表观特征可以作为研究污染物致畸机制的标志物.

信号调节在生物体的生长和发育过程中起着重要作用,如视黄酸能调节脊椎动物胚胎尤其是眼睛的发育.研究表明,过量的视黄酸却能导致胚胎的畸形发育^[8,9],并被认为是一种典型的胚胎致畸剂.污染物可能通过干扰视黄酸信号通路而引起胚胎的畸形现象^[10,11].

热带爪蟾(*X. tropicalis*)是发育生物学中一种新的模式动物,是非洲爪蟾的理想替身.本文以热带爪蟾胚胎为模型,对 FETAX 实验方法进行改进,检测视黄酸对胚胎的致畸效应,建立其表型特征图谱,为发展基于致畸机制的发育毒性检测方法奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

全反式视黄酸(all-*trans* retinoic acid; 化学名:3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基环己烯)-2,4,6,8-全反式壬四烯酸;CAS:302-79-4;98%)购自 Sigma-Aldrich 公司,人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波第二激素厂,L-半胱氨酸(L-cysteine;98.5%)购自国药集团化学试剂有限公司.

1.2 胚胎的获取

挑选性成熟热带爪蟾 13 对,采用人工注射 hCG 的方法诱导产卵.每只爪蟾都进行 2 次注射,待蛙抱对产卵结束后收集胚胎,选取产卵好的 3 对蛙的胚胎,将胚胎用 2% 的半胱氨酸处理 3 min,去膜,再用 Ringer 溶液清洗 3 遍,挑选出达到 NF 11-12 阶段发育正常的胚胎进行实验^[12].

1.3 胚胎的暴露实验

视黄酸用乙醇助溶,然后用 Ringer 溶液稀释成 2,10 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个浓度,放在 4 $^{\circ}\text{C}$

下备用. 在每个直径 90 mm 的玻璃培养皿内加 40 mL 溶液和 20 只发育正常的胚胎, 放置于恒温培养箱中, 温度控制在 $(26 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, 为避免视黄酸分解, 培养箱 24 h 保持黑暗. 实验共设 1 个乙醇(0.05%)对照组和 3 个暴露组, 各暴露组的乙醇浓度与对照组浓度相同. 每组 12 盘, 每 24 h 换液 1 次. 分别在 24, 36 和 48 h 从每组取 4 盘胚胎, 将存活胚胎用 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MS-222 麻醉处理后固定于 4% 的甲醛溶液中.

1.4 畸形的观察与分析

取出经固定的胚胎, 在 Nikon 解剖镜下观察胚胎的发育状况, 用 Nikon DS-SM 型显微镜照相系统进行拍照. 识别胚胎畸形特征并对脑、眼睛和尾部的畸形程度进行分级(见表 1), 统计其畸形指数(TI), 即各组的平均畸形级数.

表 1 热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 胚胎脑、眼睛和尾部畸形程度分级的方法

Tab. 1 The degree of malformations in brains, eyes and tails of *Xenopus tropicalis* embryos

分级	脑	眼睛	尾巴
0	脑发育正常	色素发育正常, 圆形	尾巴平直, 末端微上弯
1	脑轻度收缩	色素、眼睛形状或大小轻度异常	弯曲度 $< 90^\circ$
2	脑中度收缩	色素、眼睛形状或大小中度异常	$90^\circ \leq$ 弯曲度 $< 180^\circ$
3	脑严重收缩	外观上看不到眼睛	弯曲度 $\geq 180^\circ$, 蜷曲

1.5 数据统计

用 SPSS 16.0 进行数据的统计分析. 以一个培养皿中的胚胎为一个平行样, 数据以平均值 \pm 标准差(S. D.)表示, $n = 4$. 组间存活率、体长和畸形指数的差异用 Tukey-test 进行分析; 发育阶段(NF)以中位数表示, 用 Jonckheere-Terpstra 检验组间数据差异性; 用 Origin-Pro 8.0 作图.

2 结果与讨论

2.1 视黄酸对胚胎存活和生长的影响

暴露 24, 36 和 48 h 后, 各组胚胎的存活率均在 95% 及以上. 这表明在实验浓度下, 视黄酸对爪蟾胚胎没有明显的致死效应. 24 h 后, 2, 10 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组胚胎的体长较对照组分别减少 20%, 31% 和 36%; 36 h 后, 各暴露组的体长依次减少 21%, 28% 和 42%; 48 h 后, 依次减少 21%, 35% 和 42%. 由此可见, 视黄酸对爪蟾胚胎的生长有明显的抑制作用.

2.2 视黄酸对胚胎发育阶段的影响

与对照组相比, 暴露组胚胎的发育明显受阻, 主要表现为卵黄收缩不完全和各器官的发育迟缓. 24 h 后, 2, 10 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组胚胎的发育分别延缓 2, 4 和 5 个阶段; 36 h 后, 各暴露组依次延缓 3, 5 和 6 个阶段; 48 h 后, 依次延缓 4, 7 和 10 个阶段. 上述结果表明, 视黄酸对爪蟾胚胎的发育有明显的抑制作用, 并随浓度的增加和时间的延长而加强.

2.3 视黄酸对胚胎的致畸效应

对照组胚胎的总畸形率低于 5%, 而暴露组畸形率均达到 100%. 视黄酸对胚胎的存活基本没有影响, 却导致了极高的畸形发生率, 由此可见, 视黄酸是一种极强的致畸剂. 这一结果与对其他动物胚胎进行暴露的报道相符^[13].

24 h 后, 正常胚胎眼睛呈圆形, 色素较深且均匀分布; 唾液腺位于头腹侧, 呈锥形, 基部黑色, 顶端白色; 尾短小且平直; 鳍平展, 无波形; 体表色素刚开始出现, 较淡(见图 1A). 与对

对照组相比,暴露组出现多种畸形现象,如前脑缩小、卵黄收缩不完全、眼睛色素减少以及脊椎和尾巴弯曲等(见图 1B-F)。随着视黄酸浓度的增高,胚胎脑部畸形更加严重,眼睛轮廓逐渐消失,唾液腺变形、缩小,尾部也严重蜷曲至身体的一侧(见图 1D-F)。

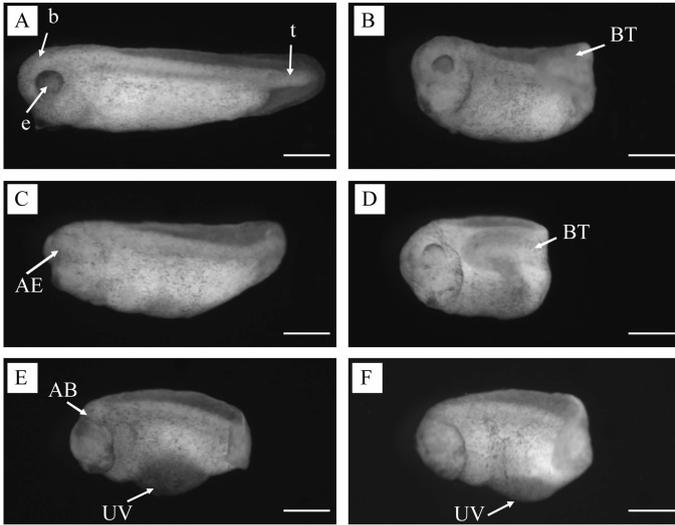


图 1 视黄酸暴露 24 h 后对热带爪蟾胚胎的致畸效应

Fig. 1 Teratogenic effects of all-*trans* retinoic acid (RA) on *Xenopus tropicalis* embryo after 24 h of exposure

注: A 0.05%乙醇对照组, B $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA, C和D $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA, E和F $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA, 标尺=0.5 mm;

AE 眼睛畸形, AB 脑部畸形, b 脑, BT 尾巴弯曲, e 眼睛, t 尾, UV 卵黄收缩不完全

在所有畸形类型中,头部、眼睛和尾部的畸形现象最普遍,各暴露组中这些部位的畸形率也都达到 100%,为便于区分各浓度组中各个部位的畸形程度,采用畸形指数来进行评价.对照组脑畸形指数(BTI),眼畸形指数(ETI)和尾部畸形指数(TTI)分别为 1.10, 0.29 和 0.18. $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组 BTI(1.50), ETI(1.86)和 TTI(1.15)值明显升高;10 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组胚胎的 BTI(2.76 和 2.98)和 ETI(1.86 和 2.87)值进一步升高,而 TTI(1.36 和 1.22)与 $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 相近(见图 2)。

36 h 后,正常胚胎眼睛黑亮,体表黑色素斑点明显,尾部延长,鳍平展无波形(见图 3A)。与对照组相比,暴露组继续出现脑缩小、眼睛色素减少和尾巴弯曲等现象(见图 3B-F)。对照组各畸形指数均低于 0.2, $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组 BTI(1.54), ETI(1.50)和 TTI(1.88)值明显升高;10 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组胚胎的 BTI(2.29 和 2.97)和 ETI(2.38 和 2.90)值进一步升高,而 TTI(1.75 和 1.73)与 $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 相近(见图 2)。

48 h 后,正常胚胎体表色素更加明显可见,主要分布在头顶和腹部两侧;尾巴约为体长的 2/3,末端微弯曲(见图 4A)。与对照组相比,暴露组畸形现象更加突出,除在 24 h 和 36 h 观察到的畸形现象之外,还发现围心腔水肿和窄鳍现象(见图 4C-F)。一些畸形严重的个体,常包括多种常见的畸形类型.对照组各畸形指数均低于 0.3, $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组 BTI(1.38), ETI(1.38)和 TTI(1.61)值明显升高;10 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组胚胎的 BTI(2.21 和 3.00)和 ETI(2.21 和 2.90)值进一步升高,而 TTI(2.03 和 1.94)与 $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 相近(见图 2)。

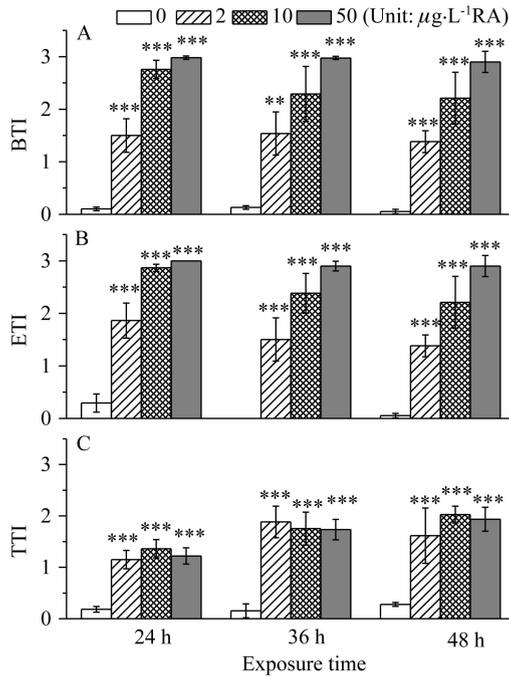


图 2 视黄酸对热带爪蟾胚胎脑畸形指数(BTI)、眼畸形指数(ETI)和尾部畸形指数(TTI)的影响
 Fig. 2 Effects of all-trans retinoic acid (RA) on brain teratogenic index (BTI), eye teratogenic index (ETI) and tail teratogenic index (TTI) of *Xenopus tropicalis* embryos

注: 暴露组与对照组相比 * $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

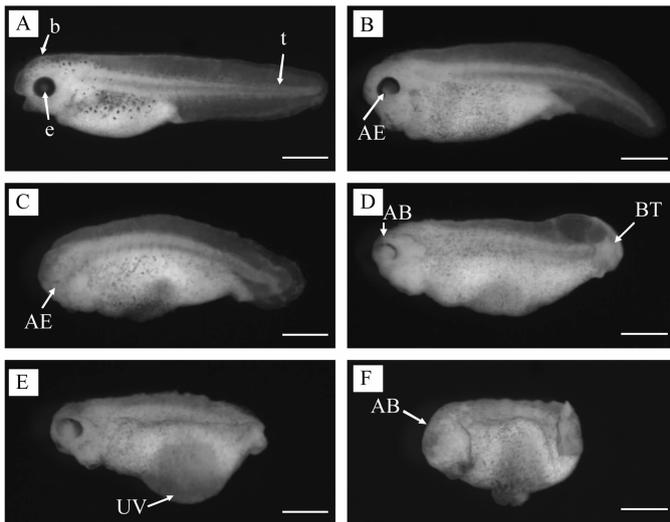


图 3 视黄酸暴露 36 h 后对热带爪蟾胚胎的致畸效应

Fig. 3 Teratogenic effects of all-trans retinoic acid (RA) on *Xenopus tropicalis* embryos after 36 h of exposure

注: A 0.05%乙醇对照组, B $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA, C和D $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA, E和F $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA, 标尺 = 0.5 mm;
 AE 眼睛畸形, AB 脑部畸形, b 脑, BT 尾巴弯曲, e 眼睛, t 尾, UV 卵黄收缩不完全

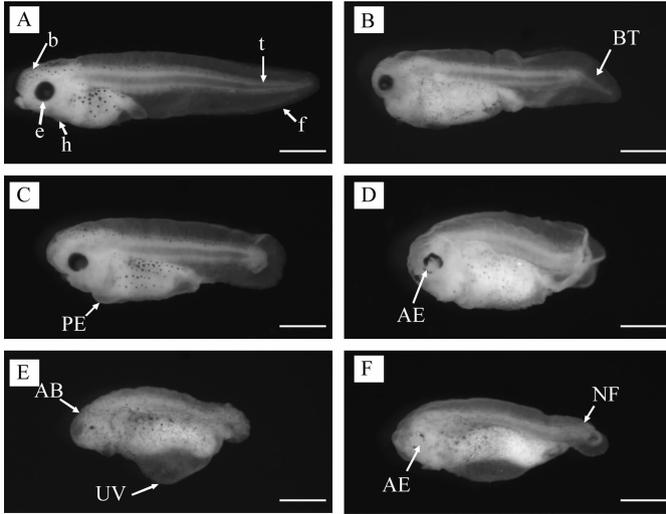


图4 视黄酸暴露48 h后对热带爪蟾胚胎的致畸效应

Fig. 4 Teratogenic effects of all-*trans* retinoic acid (RA) on *Xenopus tropicalis* embryos after 48 h of exposure

注: A 0.05%乙醇对照组, B $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA, C和D $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA, E和F $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ RA, 标尺 = 0.5 mm;

AE 眼睛畸形, AB 脑部畸形, b 脑, BT 尾巴弯曲, e 眼睛, f 鳍, h 心脏, NF 窄鳍,

PE 围心腔水肿, t 尾, UV 卵黄收缩不完全

2.4 视黄酸对热带爪蟾胚胎致畸效应的表型特征及其应用

实验结果表明,视黄酸能引起热带爪蟾胚胎的多种畸形现象,并表现出一定的空间、时间和量-效特征.从部位上看,脑、眼和尾等器官的畸形尤为普遍;从暴露时间上看,脑和眼部的畸形24,36和48 h之间无明显变化,而48 h后尾部的畸形相对于24 h有明显的升高.这表明脑和眼部畸形的诱导主要发生在暴露的前24小时内,这与该阶段正处于神经分化期有密切关系.而尾部的畸形在48 h继续升高的原因可能是尾部的延展主要发生在暴露的24 h之后,并且尾巴越长,越容易发生弯曲;从暴露浓度上看,随着视黄酸浓度的增高,胚胎脑部收缩更加严重,眼睛轮廓逐渐消失, $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组胚胎的眼睛几乎没有,脑和眼部的畸形表现出较好的量-效关系,而尾部畸形的量-效特征不明显.

Kraft等^[8]研究发现, $50 \sim 2\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的9-顺视黄酸(9-*cis*-RA)和全反式视黄酸可直接导致非洲爪蟾胚胎头、眼和心脏的畸形.本实验结果表明,视黄酸在更低浓度下可以导致热带胚胎严重的畸形现象.这表明热带爪蟾对视黄酸更敏感,更适合于作为研究视黄酸信号干扰物的动物模型.

目前,FETAX实验主要通过统计胚胎的存活率、生长率和畸形率等3项指标来评价受测试化学品的致畸性.本文采用了24,36和48 h 3个暴露时间段,并采用畸形指数的方法,对主要的畸形表型进行分类统计,以获取更为详细的畸形变化数据. Minucci等^[9]研究表明,将发育到囊胚后期(NF 9.5)的非洲爪蟾胚胎暴露于 $10 \mu\text{mol/L}$ 的9-顺视黄酸和全反式视黄酸中45 min后,能引起胚胎头部和眼睛发育异常,而对其他部位产生的畸形现象很少.这说明在不同暴露时间窗内,胚胎的畸形变化不同,畸形的表型特征在一定程度上反映了受测试化学品对胚胎作用的靶器官.因此,本文通过对FETAX实验方案进行改进,获得了更丰富的畸形图谱,这将有助于分析污染物可能的毒作用机制.

Guo 等^[11]的研究表明,环境浓度的三丁基锡能引起热带爪蟾胚胎眼睛色素减少、围心腔水肿、泄殖腔拉长和尾鳍变窄等畸形现象.三丁基锡与视黄醇类受体(RXR)具有较强的结合能力^[14],并通过这种结合引起海产腹足类的性畸变现象^[15].在两栖类中,RXR能与视黄酸受体(RAR)或甲状腺激素核受体(TR)结合形成二聚体,即RXR-RAR或RXR-TR.Guo 等^[11]认为,三丁基锡可能与RXR结合,从而干扰视黄酸或甲状腺信号通路,导致胚胎的畸形.将本文视黄酸的畸形特征表型与三丁基锡的相对比,发现二者引起胚胎脑和眼的畸形特征较一致,而心脏、泄殖腔、鳍和尾等部位的畸形特征则有较大差别.将三丁基锡导致的胚胎畸形特征与一种典型的甲状腺激素干扰物四溴双酚-A的相对比^[16],则发现二者引起的主要畸形类型和变化特征十分相似.在今后的工作中,需要在表型特征图谱的基础上增加分子指标,分析其对相关受体基因及调控基因的表达是否受影响,以揭示污染物的致畸机制.

3 结 论

FETAX实验是将发育期处于NF 8-11阶段的爪蟾胚胎置于受试液中暴露4 d,通过检测胚胎死亡率、畸形率和致畸指数等指标来评价化学品的发育毒性.本文通过改进FETAX实验方案获取了丰富的胚胎畸形表型特征图谱,表明了视黄酸对热带爪蟾胚胎具有较强的致畸作用,相对于非洲爪蟾胚胎而言,热带爪蟾胚胎对视黄酸更敏感.实例分析也表明,视黄酸畸形图谱在三丁基锡致畸机制的研究中有重要的参考价值.本文为今后建立基于致畸机制的发育毒性检测方法奠定了良好的基础.

[参 考 文 献]

- [1] COLLINS J P, STORFER A. Global amphibian declines: Sorting the hypotheses [J]. *Divers Distrib*, 2003(9): 89-98.
- [2] SCHOFF P K, JOHNSON C M, SCHOTTHOEFER A M, et al. Prevalence of skeletal and eye malformations in frogs from north-central United States: Estimations based on collections from randomly selected sites [J]. *J Wildl Dis*, 2003, 39(3): 510-521.
- [3] STUART S N, CHANSON J S, COX N A, et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide [J]. *Science*, 2004, 306: 1783-1786.
- [4] MANN R M, HYNE R V, CHOUNG C B, et al. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment [J]. *Environ Pollution*, 2009, 11(157): 2903-2927.
- [5] DAWSON D A, WILKE T S. Evaluation of the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX) as a model system for mixture toxicity hazard assessment [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1991(10): 940-945.
- [6] HOKE R A, ANKLEY G T. Application of frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* to ecological risk assessment [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2005, 24(10): 2677-2690.
- [7] 钱丽娟,刘青坡,郭素珍,等.爪蟾胚胎致畸实验(FETAX)在检测污染物发育毒性中的应用[J].*安全与环境学报*, 2009, 9(4): 24-28.
QIAN L J, LIU Q P, GUO S Z, et al. Application of frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* in the measurement of developmental toxicity of contaminants [J]. *J Saf Environ*, 2009, 9(4): 24-28.
- [8] KRAFT J C, JUCHAU M R. *Xenopus laevis* a model system for the study of the embryonic retinoid metabolism. III Isomerization and metabolism of all-*trans*-retinoic acid and 9-*cis*-retinoic acid and their dysmorphogenic effects in embryos during neurulation [J]. *Drug Metab Dispos*, 1995, 23(10): 1058-1071.
- [9] MINUCCI S, SAINT-JEANNET J, TOYAMA R, et al. Retinoid X receptor-selective ligands produce malforma-

- tions in *Xenopus* embryos [J]. *Develop Biol*, 1996, 93: 1803-1807.
- [10] HU J Y, ZHANG Z B, WEI Q W, et al. Malformations of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, and its causal agent [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(23): 9339-9344.
- [11] GUO S Z, QIAN L J, SHI H H, et al. Effects of tributyltin (TBT) on *Xenopus tropicalis* embryos at environmentally relevant concentrations [J]. *Chemosphere*, 2010, 79(5): 529-533.
- [12] NIEUEKOP P D, FABER J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin)[M]. Amsterdam: North Holland Publ Co, 1956.
- [13] REIJNTJES S, BLEBTIC A, GALE E, et al. The control of morphogen signalling: Regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo [J]. *Develop Biol*, 2005, 285(1): 224-237.
- [14] NISHIKAWA J, MAMIYA S, KANAYAMA T, et al. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 6271-6276.
- [15] SHI H H, HUANG C J, ZHU S X, et al. Generalized system of imposex and reproductive failure of females in gastropods along the coastal waters of mainland China [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 2005, 304: 179-189.
- [16] SHI H H, QIAN L J, GUO S Z, et al. Teratogenic effects of tetrabromobisphenol A on *Xenopus tropicalis* embryos [J]. *Com Biochem Physiol*, 2010, 152(1): 62-68.