文章编号: 1007-4627(2016)01-0094-011

斑马鱼胚胎在电离辐射生物学研究中的应用

王玉佩^{1,2},张红¹,周鑫¹,周蓉¹,甘露¹

(1.中国科学院近代物理研究所,兰州 730000;2.中国科学院大学,北京 100049)

摘要: 斑马鱼胚胎最初为研究发育生物学与分子遗传学的重要模式动物,20世纪90年代关于斑马鱼胚胎研究的文章每年不足100篇,到本世纪初期已上升到每年1000余篇,目前这个数字正呈指数增长,斑马鱼胚胎的研究范围与应用价值正也随之逐步提升。该文综述了斑马鱼胚胎在电离辐射研究领域中的应用,包括电离辐射诱导斑马鱼的毒性作用、电离辐射引起的DNA损伤及其信号转导机制,以及利用斑马鱼对辐射防护剂与增敏剂进行评价。在此基础上还特别介绍了中国科学院近代物理研究所利用斑马鱼胚胎在放射生物学研究上取得的进展,其中包括一种具有物理激发、化学刺激作用的线粒体内活性氧(ROS)诱导剂,在非条件刺激下利用斑马鱼检测该物质的毒性,发现 < 10 μ L/mL的该物质无胚胎发育毒性,然而,在一定波长的光刺激下可造成DNA双链断裂,在理论上是一种潜在的辐射增敏剂。

关键词: 斑马鱼; 胚胎; 电离辐射; 细胞毒性; DNA 损伤; 辐射药剂 中图分类号: Q691 文献标志码: A DOI: 10.11804/NuclPhysRev.33.01.094

1 引言

斑马鱼是一种经典的脊椎动物模型,广泛应用于发 育生物学与分子遗传学的相关研究。由于其自身优势, 斑马鱼的研究价值不断被挖掘,应用领域也逐步延伸, 主要涉及生理学、毒理学、病理学、环境及肿瘤研究 等,其研究成果受到越来越多的关注。斑马鱼的优势表 现为饲养相对容易,生命力顽强,繁殖能力强,发育速 度快,实验周期短,保证实验数据的高产出量;胚胎接 近透明状,可通过体式光学显微镜进行观察,满足发育 过程中的可视化需求,在48 hpf (受精后48 h)其形态学 特征及主要的器官 (脑、眼、心脏、肺、肾、肌肉、胃 肠道)可清晰辨认,受精后的第六天完成胚胎发育的全 部过程^[1]。同时,斑马鱼具有完整的血管,造血功能, 免疫、中枢神经系统,对于研究人类相关疾病的分子机 制有巨大潜力^[2]。

目前,有关电离辐射的生物学研究也逐渐在斑马鱼 中展开。斑马鱼在研究体内电离辐射诱导的生物学效 应中具有独特的优势:斑马鱼体型较小,活动范围有 限,胚胎体外发育,电离辐射暴露便利;胚胎发育各时

相特征较为明晰,可用于电离辐射的胚胎毒性评估;斑 马鱼胚胎可直接从培养基中吸收处理药物,相对于需 要药物注射的小鼠,操作十分方便,有利于辐射药物的 筛选^[3]:在分子水平,斑马鱼基因操作相对简单,可以 通过显微注射 morpholino(MO) 修饰的寡聚核苷酸与目 标基因或其表达的mRNA 互补达到基因敲除的目的^[4], 也可通过反向遗传学方法筛选目标种系^[5]。斑马鱼的全 基因组测序已经完成,人类与斑马鱼共享大量的同源 基因,包括大部分的双链 DNA 保守序列,通过比较发 现,约有70%的人类基因与斑马鱼基因组中至少一个 基因直接同源,可进一步促进对人类基因组的理解^[1]。 部分人类疾病的关键直系同源基因在斑马鱼中已经得到 鉴定,这些基因的突变与人类的疾病具有相似表型^[6]。 斑马鱼具备完整的基因组学、分子遗传学、胚胎学的数 据库,这些信息都可以在斑马鱼信息库中获得。由此可 见,人类与斑马鱼高度保守的序列与可获取的基因组数 据是斑马鱼作为理想模式动物的主要因素,也使斑马鱼 成为研究电离辐射诱导生物学效应机制的理想材料。

生物有机体经常暴露于包括电离辐射在内的各种环 境胁迫中。自然环境中电离辐射主要有来自宇宙射线与

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(10835011; 11205219);

收稿日期: 2015-09-08; 修改日期: 2015-11-04

作者简介: 王玉佩(1990-), 女, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 从事重离子辐射对斑马鱼胚胎发育影响研究; E-mail: wangyp@impcas.ac.cn 通信作者: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn。

地球中的放射性物质,但其对生物有机体造成的影响十 分有限。然而,由于医疗诊断与放射治疗等现代医疗手 段使用频率的增加,现代人除了在自然条件下吸收少量 的本底辐射剂量外,暴露于人工辐射的几率与吸收剂量 大大增加^[7],结果可诱导肿瘤形成或诱发心血管、神经 系统疾病等,对人体健康产生巨大威胁^[8-9]。因此,放 射生物学研究的重要内容包括如何有效地利用射线杀死 肿瘤细胞并在此基础上提高正常组织对电离辐射的耐受 性,而X射线、γ射线、α离子、质子、重离子是研究 中最常使用的电离辐射类型。

中国科学院近代物理研究所斑马鱼模式动物平 台(图1)是我国西部地区首个系统完整的斑马鱼生物学 实验平台,是一个集斑马鱼繁育、转基因斑马鱼构建、 斑马鱼细胞分子生物学分析、认知行为学观测于一体的 综合性斑马鱼模式动物研究平台,可广泛应用于肿瘤防 治、环境毒性、胚胎发育及认知行为等各个方面的生物 学基础研究领域。



图 1 (在线彩图)斑马鱼模式动物平台 (a) 北京爱生科技斑马鱼繁育系统; (b) 动物行为轨迹跟踪系统(右)及斑马鱼幼鱼行为轨迹跟踪系统(左)。

2 电离辐射对斑马鱼胚胎发育影响

胚胎发育时期,细胞分裂迅速,各类细胞因子作 用复杂,许多基因处于表达活跃阶段。基因表达的时 空有序性影响个体器官组织的分化与生理功能,决定 个体存活。经济合作与发展组织(OECD)手册(n°212; 210)提出鱼类早期生命阶段可作为评估污染物的实验 模型^[10],同样也可用于环境中的辐射风险评估^[11-12]。 MacAleer等^[13]发现斑马鱼胚胎早期(2.75 hpf),即囊 胚中期转变(MBT)对辐射具有较强的敏感性,是体内 研究电离辐射胚胎毒性与基因毒性的首选模型。大量实 验观察表明,电离辐射诱导斑马鱼胚胎的生物效应与 电离辐射剂量大小、胚胎暴露的时相、暴露时长、辐射 类型密切相关,斑马鱼胚胎致死率、孵化率、形态学特 征、生理学特征是毒性评估的常规检测终点^[4]。

毒性试验中,常使用 24 hpf 的胚胎,因为部分胚胎 会在 24 hpf 内自然死亡或停止发育,存活下来的胚胎 可以正常发育并达到成年^[14]。6 hpf 胚胎更适宜研究剂 量依赖性的辐射早期效应,在此发育阶段胚胎,细胞 命运尚未决定,具有高度的同一性和适宜数量的细胞 群体,外界压力胁迫可诱导细胞凋亡^[15],在辐射处理 时代表了未分化命运未决定的细胞群^[16]。144 phf 的胚 胎用于检测死亡率及器官损伤,因为胚胎发育的前六 天由卵黄提供营养,不需要人工喂养,排除了辐射后 个体摄食能力的差异,6d后各器官发育基本完成。脊 索的发育对辐射高度敏感,可作为胚胎畸形的判断标 准^[14]。电离辐射对个体与形态学和生理学水平的效应 最终是由于细胞和分子水平的变化引起的^[17]。DNA 双 链断裂 (DSBs) 被认为是辐射诱导细胞凋亡的关键损伤, 并且比其他 DNA 损伤更难被修复^[18]。

2.1 生理与形态学影响

在胚胎发育早期 (24 hpf 左右),辐射剂量≥1 Gy 的条件下,辐射毒性与辐射剂量正相关,低剂量辐射暴 露并不会造成明显的形态学改变,而高剂量辐射能够致 畸或致死^[4,7,16–17,20]。Freeman^[7]证实,26 hpf的斑 马鱼胚胎暴露在 Co-60 放射源产生的 γ 辐射 (0, 1, 2, 5, 10 Gy)后,胚胎的死亡率与孵化率随剂量增大而下降, 但不具有显著性,而在 10 Gy剂量下,幼鱼的体长,头 部长度和眼的直径都显著减小。Zhou等^[19]发现8 hpf X射线辐射 (1, 2, 4 Gy)暴露不影响斑马鱼眼部发育, 而10 Gy 则造成眼部结构发育异常。Geiger^[17]研究发 现,斑马鱼胚胎20 Gy γ 射线暴露,可诱导严重的发 育畸形,包括眼睛尺寸减小、心囊水肿、脊柱弯曲、 黄色素沉积、卵黄吸收障碍、生长延迟,此结果得到 了 Bladen^[16]和 McAleer等^[20]的证实。Geiger^[17]还观 察到胚胎畸形程度会随时间加剧,致使胚胎在辐射 后的6天内全部死亡。胚胎对电离辐射的耐受会随着胚 胎发育时间的延长而加强, Geiger 等^[4]将2 hpf 胚胎置 于5 Gy γ 射线暴露, 4,6 hpf 胚胎置于 10 Gy γ 射线暴 露, 72 hpf观察结果结果表明, 4, 6 hpf 胚胎 10 Gy 辐 射后的存活率显著高于2 hpf 胚胎5 Gy 辐射。中国科学 院近代物理研究所依托兰州重离子研究装置(HIRFL), 在斑马鱼养殖实验平台上开展了重离子辐射效应研究。 Si等^[21]研究了¹²C⁶⁺离子辐射对斑马鱼胚胎的毒性,8 hpf 胚胎1, 3, 7 Gy 的¹²C⁶⁺离子辐射暴露, 72 hpf观 察结果显示,7 Gy辐射暴露会造成显著的胚胎畸形 和死亡,畸形率与死亡率分别为正常组的3.35和3.46 倍(图2),胚胎畸形主要表现为心包囊肿、脊柱弯曲、 尾部弯曲(图3),但1和3 Gy的辐射剂量下胚胎则无 明显变化。Zhou等^[22]对12 hpf的胚胎进行2,4,8 Gy 的¹²C⁶⁺离子辐射暴露,120 hpf观察结果表明死亡率 和畸形率与辐射剂量正相关(图4),3种剂量水平下斑马 鱼胚胎都出现心包积水现象,但小眼畸形仅在8 Gy 组 出现,占此组畸形总数的10%。综合上述结果可以看 出,在引起相同程度畸形的情况下,重离子辐射所需剂



图 2 (在线彩图)不同处理的斑马鱼形态异常 FA存在或不存在的情况下,不同剂量 $^{12}C^{6+}$ 离子辐射 下,斑马鱼的死亡率与畸形率.每个值以平均数±标准 差(N = 3)表示。* 与对照相比P < 0.05,** 与对照相 比P < 0.01, + FA联合辐照组与辐照组相比P < 0.05, ++ FA联合辐照组与辐照组相比 $P < 0.01^{[21]}$ 。







图 4 不同剂量¹²C⁶⁺处理下斑马鱼胚胎120 hpf死亡率 与畸形率

(a) 各组死亡率,以死亡胚胎占总胚胎数(100个)的比例计 算; (b) 各组畸形率,以畸形胚胎占存活胚胎数的比例 计算。每个值以平均数±标准差(N = 3)表示。对照组与 辐射组间的显著性差异使用one-way ANOVA分析后进 行Tukey检验。* 与对照组相比P < 0.05, ** 与对照组相 比 $P < 0.01^{[22]}$ 。

量小于其他类型电离辐射所需剂量;不同电离辐射类型 诱导斑马鱼形态畸形的表型相似。

电离辐射剂量小于1 Gy 的条件下,会出现应激反 应,使电离辐射诱导的细胞凋亡数目与辐射剂量不服从 线性关系^[23],定义为辐射刺激作用^[24]。Choi等^[25]利 用质子微束辐射系统对0.75 hpf(2细胞期)的斑马 鱼胚胎分别进行10, 20, 40, 50, 80, 100, 160, 200, 300, 2000个质子数的辐射暴露,发现剂量在30~60 mGy(200~400个质子)时,胚胎的细胞凋亡信号显著 低于对照组。Vala等^[26]发现3dpf的斑马鱼开始进行出 芽式血管生成, 0.5 Gy的X辐射暴露后, 7 dpf的辐射 组斑马鱼肠下静脉间形成更多的不规则的血管,并且肠 下静脉在17 dpf可清晰辨认,结果表明低剂量电离辐射 加快血管出芽生成,而没有形成额外的血管。对于胚胎 早期(24 hpf)的电离辐射诱导的长期响应,低剂量(0.1 Gv) 与中等剂量(1 Gv) 在转录与信号通路水平无差异, 长效响应包括细胞因子、炎症调节因子、转录与生长因 子的响应^[27]。

除了电离辐射的直接暴露外,非靶向辐射也可诱导 生物效应。旁观者效应(RIBE)为目前研究较多的一类,

具体指未被辐射直接作用的细胞接收到辐射细胞的信 号,从而产生一系列的生物学效应,包括染色体畸变、 姐妹染色单体交换、基因组不稳定、基因表达改变、细 胞凋亡、改变信号转导、产生辐射适应、产生ROS、致 瘤性转化^[10]。电离辐射诱导的斑马鱼胚胎RIBE的主要 表现为诱导细胞凋亡及胚胎死亡。Yum等^[28]将8枚α 粒子暴露的斑马鱼胚胎与8枚正常胚胎共同培养,观察 到2种胚胎的细胞凋亡信号都显著性增高,证明了斑马 鱼胚胎间的信号交流导致正常胚胎也具有辐射响应,旁 观者因子可能是分泌到水中的化学物质。Choi等^[29]研 究了低剂量 α 粒子诱导斑马鱼胚胎产生应激效应,辐射 后的胚胎与正常组胚胎共同孵育也可产生RIBE,结果 为两种胚胎的细胞凋亡信号同时减少,证明辐射后的斑 马鱼胚胎向水中释放压力因子诱导正常胚胎产生辐射应 激。Choi等进一步证明了旁观者胚胎(正常胚胎)对α 粒子辐射后的胚胎具有援救作用,当辐射后的胚胎与正 常胚胎在同一介质中培养,辐射胚胎的凋亡信号减小; 旁观者胚胎的数目由10枚增加到30枚后,与之共同培 养的辐射胚胎的凋亡信号也随之显著下降,原因是正 常胚胎会释放反馈因子,作用于辐射暴露胚胎,缓解由 电离辐射引起的 DNA 损伤^[30]。Choi 等^[31]将 5 hpf 斑 马鱼胚胎暴露于4 Gy的X射线,胚胎在培养液中发育 至29 hpf, 取培养液培养正常胚胎也可诱导 RIBE, 该 培养液稀释后 RIBE 解除,说明RIBE 的开关由效应因 子的浓度阈值调控。

2.2 电离辐射对斑马鱼胚胎眼与脑影响

电离辐射暴露诱导有机体眼疾以及各类并发症的 结果已经明确,如白内障形成、视网膜退化萎缩、眼 盲、畸形皆见报道,其中晶状体是对辐射最敏感的组 织^[4,19,32-34]。未经辐射暴露的斑马鱼眼是由不同类型 细胞组成的同心层结构,由内向外依次是晶状体、神经 节细胞层、内网层、内核细胞层、外织网层、外核层、 视网膜(视锥细胞,视杆细胞)色素上皮。与正常斑马鱼 胚胎眼的细胞结构相比, 24 hpf 10 Gy γ 辐射暴露后, 斑马鱼眼的同心层结构受到很大破坏,保留下来的细胞 层大部分很难辨别,例如内网层大部分消失、神经节细 胞层无法区分、晶状体浑浊、视锥细胞和视杆细胞层同 中心的分布形式遭破坏,色素上皮仍然可见,但薄于对 照组^[4]。8 Gv X 射线暴露不引起视网膜严重破坏,但 诱导内核层分布不均^[19]。Zhou等^[22]研究了¹²C⁶⁺离子 辐射对斑马鱼胚胎眼部发育的影响,12 hpf斑马鱼胚胎 接受2,4,8 Gy的¹²C⁶⁺离子辐射后,24,48,72 hpf时 间点观察,发现相同时间点不同剂量处理组间眼部细

胞ROS含量均无显著差异,而在24和48 hpf,眼部细胞凋亡数量与对照组相比显著上升且与辐射剂量成正比,72 hpf 只有4和8 Gy组眼部凋亡细胞数量较对照组显著提高。Zhou等^[22]进一步分析基因表达变化,发现8 Gy辐射后细胞凋亡相关的基因 *p53, Bax, Puma*表达均显著上调,而凋亡抑制基因 *Mdm2*和 *Bcl*-2表达显著下调,caspase凋亡途径的 *Caspase-3*和 *Caspase-9*表达显著上调,说明凋亡是caspase 凋亡途径依赖的;组织学方面,不同剂量辐射暴露后,144 hpf 的组织切片 HE 染色结果显示,晶状体的各同心层在正常组与辐射组中均清晰可见,但在4 Gy组,神经节细胞层分布不均匀,8 Gy组,神经节细胞层与内核细胞层均分布不均匀(图5)。



图 5 (在线彩图) 144 hpf斑马鱼幼鱼¹²C⁶⁺离子辐射对 眼发育的组织学影响(H&E染色检测)
(a) 对照组; (b) 2 Gy辐射组; (c) 4 Gy辐射组; (d) 8 Gy辐射组。GCL,神经节细胞层; IPL,内网层; INL, 内核细胞层; OPL,外网层; ONL,外核层; OS,外部 感光细胞; RPE,视网膜色素上皮^[22]。

Geiger 等^[4]发现 γ 辐射引起脑顶盖容量显著减少, 导致脑缺少大部分头骨。这种现象在10 Gy 已经很明 显,20 Gy 更加显著,有趣的是端脑和小脑受到辐射的 影响非常小。可见,斑马鱼胚胎器官中不同类型的组织 对电离辐射的感应具有不同的敏感性,这可能与辐射的 剂量与类型相关。Bladen 等^[16]证实6 hpf 0.15 Gy γ 射 线暴露与对照组无显著的细胞凋亡差异,而 0.5 Gy γ 射 线暴露则造成中枢神经系统细胞凋亡明显增加,在后脑 和延髓前脚最为显著,更高剂量 (1.5, 5, 15 Gy)致使细 胞凋亡数目持续增加,直至头部恶性畸形。

2.3 遗传毒性

辐射是一种明确的致癌或致突变剂,可在DNA作

用位点处或附近诱导突变,对DNA 造成可修复或不可 修复的损伤^[35-36]。电离辐射波长短、能量高,可直 接或间接诱导 DNA 链的断裂,产生遗传毒性。斑马鱼 胚胎电离辐射暴露后细胞凋亡总量、ROS产生都显著 提高且与辐射剂量正相关^[7,19,23],说明电离辐射可诱 导胞内 ROS 的产生,从而间接攻击 DNA 并启动细胞 凋亡信号通路。而重离子辐射由于能量大、穿透性强, 累积的能量可直接损伤DNA,导致细胞凋亡,但也存 在诱导 ROS 间接损伤 DNA 的情况。大量研究关注低 剂量的电离辐射暴露对斑马鱼基因组的影响,Simon 等^[36]对6hpf斑马鱼胚胎进行5个剂量率(0, 1, 10, 100, 1000 mGyd⁻¹)24 h 和48 h 的 γ 射线持续暴露, 彗星电 泳实验结果表明所有的辐射组的彗星拖尾较对照组显 著增加,表明DNA损伤(DSBs,单链断裂,DNA蛋 白交联)加剧,但暴露时间的增加并不引起DNA损伤 的明显提高。Jarvis等^[37]将144 hpf 斑马鱼分别暴露 于0.4, 1.2, 7.2 mGy/h 剂量率的γ射线24 h, 结果表 明, 1.2 和 7.2 mGy/h DNA 损伤程度较对照组显著提 高, 0.4 mGy/h无显著差异。可以看出辐射剂量是造 成 DNA 损伤的决定因素。电离辐射的遗传毒性是 DNA 的辐射敏感性与修复能力综合作用的结果, 电离辐射 诱导 DNA 损伤中各种损伤类型的比例仍需要进一步研 究。另外,斑马鱼胚胎暴露于不引起形态学畸形的最大 辐射剂量后,进行转录组分析,比较基因表达谱的差 异,发现功能得到确认的与人类直系同源的253个基因 均发生了显著的改变,基因功能与分子网络分析反映出 这些基因是与心血管和神经发育、功能、疾病有关的多 种基因^[7],即使DNA 断裂成功修复,电离辐射也会造 成诸多不利影响。

3 利用斑马鱼研究电离辐射诱导的DNA 损伤应答效应

环境中外源性及内源性的众多因素会对DNA造成损害,严重影响到遗传信息的正确传递甚至威胁细胞的存活,其中DNA DSBs在所有损伤中最为严重,是电离辐射诱导遗传毒性的主要原因。一般认为电离辐射引起的ROS爆发是攻击DNA 双链的罪魁祸首,高能量的电离辐射也可通过能量积累直接诱导DNA DSBs。在长期进化的过程中,有机体产生了一套保守而复杂的修复体系:DNA损伤反应(DNA Damage Response, DDR),可针对性地抵抗不同形式的DNA损伤,同源重组修复(Homologous Recombination Repair, HR)和非同源的末端连接(Non-Homologous End Joining, NHEJ)是修复DSBs损伤的两条主要途径。

DNA 修复机制的探索最早见于酵母细胞中。然而, 在体内电离辐射诱导的DNA DSBs 复机制的研究受 到一定的限制, 斑马鱼基因组DNA 包含高等真核生 物DNA 修复途径的直系同源基因, DNA 损伤应答过 程中有关的功能基因可以通过 MO和 shRNA 诱导基因 沉默的方法研究, 而且许多修复基因缺陷型的斑马鱼种 系已经建立, 使得斑马鱼逐渐成为研究 DNA 损伤修复 机制的理想模型。

ATM(Ataxia telangiectasia-mutated gene, 毛细 血管扩张性共济失调突变基因)在DNA损伤的信号 传导中起关键作用, ATM 的活化是整个 DDR 途径激 活的第一步。该基因编码核内丝氨酸/苏氨酸激酶,在 人体中若发生常染色体隐性失活就会导致一种罕见的 神经退行性疾病:毛细血管扩张性失调(A-T),表现 为肿瘤易患、免疫缺陷、生长滞后、过早衰老、射线 高度敏感。在正常细胞中,调节ATM 激酶活性和功 能的3-磷脂酰肌醇激酶样 (PI3-K-like) 催化域隐藏于二 聚化的结构中,处于非激活状态,受到DNA 损伤信 号的刺激后,活性位点相互催化丝氨酸磷酸化,二聚 体结构解离成为具有激酶活性的单体形式,催化下游 众多 DNA 损伤相关的效应蛋白级联活化。细胞周期 调节蛋白激活后,细胞有丝分裂停滞,启动DNA 修复 进程,若修复失败则导致细胞凋亡。Garg等^[38]利用斑 马鱼基因组数据库,比对了斑马鱼ATM(zATM)与人 类ATM(hATM)cDNA的PI-3K区编码序列,克隆并 表征了 zATM 催化域编码序列,发现其为一个编码 907 个氨基酸的开放阅读框,位于ATM 羧基端,与人类及 小鼠分别共享67%, 68% 的同源序列。Imamuraa 等^[39] 利用PCR的方法分离得到zATM cDNA 全克隆,序 列分析表明zATMPI-3 K蛋白结构域之外与hATM有 大约50%同源的氨基酸序列。上述研究均说明ATM基 因在斑马鱼和人类之间非常保守。斑马鱼胚胎发育的 过程中zATM 表达的动态变化可通过分子原位杂交 检测,结果发现0.75 (2细胞期)~5.25 hpf(50%外包 期)可检测到ATM的表达, 10~14 hpf无检测信号, 14 hpf后衰减的信号重新出现,并在19 hpf显著增加, 19~24 hpf 特异存在于眼脑,至48 hpf 存在于躯干、尾 部(图6)。6 hpf 8 Gy 电离辐射前,使用靶向 PI3-K-like 结构域基因的 MO 抑制 zATM 的表达, 斑马鱼胚胎表 现出与MO浓度呈正相关的畸形表型,而仅注射MO的 对照组与仅辐射的对照组发育正常,说明了 zATM 在斑 马鱼胚胎发育中可抵抗电离辐射诱导的胚胎畸形,而早 期zATM 的固有表达对基因组稳定性具有监视作用^[39]。 Ku80蛋白是DNA NHEJ修复途径的必备组分,动态的

结合于断裂 DNA 两端并募集相关效应蛋白,不同于HR 的高保真修复,NHEJ 修复的错误性较强,主要保证电 离辐射暴露后的胚胎细胞能够存活。Bladen等^[16]克隆 表征了胚胎 Ku80 编码基因 *Xrcc5*。研究发现,合子转 录起始后,Ku80 mRNA 在特定组织中积累,包括视网 膜与中枢神经系统的细胞分裂活跃区域。在没有 DNA 损伤压力时 Ku80 表达降低的斑马鱼胚胎发育正常,当 此类胚胎暴露于低剂量的电离辐射后,斑马鱼胚胎神 经系统区域与对照组相比发生显著的细胞凋亡。另外, ATM与Ku80 在斑马鱼中时空特异性的分布模式与细 胞分裂的速度有关,对保护神经系统和眼的发育具有重 要意义。



图 6 (在线彩图)斑马鱼胚胎发育时期ATM mRNA表达 全胚胎在所显示的不同时期mRNA原位杂交结果^[39]。

电离辐射引起DNA 损伤后,由ATM 激活的修复 途径必须在细胞分裂暂停的情况下进行,检验点基 因是终止细胞分裂、保持基因组稳定性的关键。研究 人员已利用斑马鱼模型筛选检验点基因,并印证了 在DNA损伤检验点途径激活过程中,各种核心组分与 不同调节因子、效应因子及DNA 损伤修复蛋白间复杂 的相互作用机制。磷酸化 (Ser10) 组蛋白 H3 抗体 (pH3) 可标记有丝分裂G2后期到有丝分裂晚期的细胞,32 hpf 斑马鱼胚胎辐射暴露后的1h内, 原本pH3阳性 细胞几乎完全消失,说明G2期的延续时间超出1 h, 由pH3 阳性转变为阴性的细胞正处于G2 检验点,当 咖啡因抑制辐射组ATR 活性后pH3 阳性细胞不再改 变,说明ATR 激酶对检验点是必须的。通过这一有 效手段筛选斑马鱼中的检验点基因, Sansam 等^[40] 发 现 Dtl/Cdt2 是细胞分裂早期辐射诱导的G2/M 检验 点的必备组分。随后发现 Dtl/Cdt2 对于正常细胞周期 控制是需要的, 主要功能是避免重复复制。研究揭 示了CDT1是复制前复合物形成所需蛋白,重复复制 需要DTL对CDT1进行调节。在正常细胞中或DNA 损伤后的细胞中,DTL与eCUL4-DDB1 E3 泛素连接 酶结合,可下调CDT1,CDT1在S期降解可避免再次 复制。Dtl 缺陷的斑马鱼通过降低 Cdt1 水平终止细胞 周期。相反,早期G2/M检验点缺陷不依赖于Cdt1。 因此,促进基因组稳定通过两个不同的机制。第一, DTL 是CUL4-DDB1 复合物的必备组分,控制CDT1

水平,防止重复复制。第二,DTL对于早期G2/M 检验点是必须的。Sansam等^[41]发现斑马鱼中复制调节 基因*Ticrr*,可防止辐射处理的细胞进入有丝分裂周 期,缺失*Ticrr*损害DNA复制,扰乱S/M检验点,导 致细胞提前进入有丝分裂并产生有丝分裂障碍。人 类TICRR蛋白同源物可与己知的检验点蛋白拓扑异构 酶IIβ结合蛋白1(TopBP1)相互作用,TopBP1是DNA 复制早期爆发复合物(pre-IC)的核心组分,在没有 染色质时TICRR-TopBP1相互作用稳定。*Ticrr*缺陷 扰乱核染色质与pre-IC的结合,说明TICRR的作用 与TopBP1有关,在pre-IC形成中发挥必备功能。

DNA 修复失败后,细胞进入凋亡从而清除了受损 严重的细胞,防止复制错误导致可遗传的基因突变。在 许多体系中肿瘤抑制蛋白 p53 对 DNA 损伤诱导的细胞 凋亡是必要的。在体外,缺乏 p53 可以保护特定细胞 抵抗由 DNA 损伤试剂暴露诱导的死亡。在体内MO 抑 制p53 蛋白的表达可提高辐射后斑马鱼胚胎存活,减 少形态学畸变。斑马鱼胚胎中抑制 Ku80 表达,辐射 诱发凋亡是 p53 依赖的,说明 p53 是 DNA 损伤诱导细 胞凋亡信号通路的下游节点蛋白^[16]。低剂量辐射可诱 导远高于野生型 p53 水平的缺陷型 p53 积累。 MO 抑 制斑马鱼同源基因 Mdm2 和 Mdm4 表达引起突变 p53 蛋白显著积累。长期检测 p53 蛋白水平,发现电离辐 射后突变的 p53 蛋白水平增加并持续数天,伴随着磷 酸化的 H2AX 持续升高,暗示了 p53 蛋白突变不能有 效缓解DNA 损伤信号导致的结果,因此,p53突变 导致持续性损伤响应的放大,从而驱动肿瘤的发展进 程^[42]。p53家族的另一成员p73由DNA损伤后检验点 激酶Chk1和Chk2诱导,被认为是p53的"助手",监 视基因组的完整性,起到限制DNA受损的细胞继续分 裂的作用。Davidson等^[43]在斑马鱼胚胎中发现p73 可 造成p53药理学抑制剂PFT α 的脱靶效应。PFT α 处 理的3 hpf 电离辐射暴露导致斑马鱼胚胎发育畸形,影 响脑眼肾功能,与MO降低p73表达的表型相似。PFT α 也抑制p73 依赖的报告基因的转录,其结构包括经典 的p53 响应的启动子序列。胚胎发育后期,PFT α 处理 的23 hpf辐射暴露不会引起明显的发育缺陷,反而对斑 马鱼胚胎具有辐射保护作用。

Sorrells 等^[44]在斑马鱼中发现由辐射敏感突 变7(rs7)介导了p53受抑制的损伤保护新机制。rs7 能显著提高斑马鱼胚胎神经对电离辐射诱导的细胞 凋亡的辐射敏感性。rs7 突变扰乱了编码序列 Ccdc94, Cdc94 基因高度保守,是 Prp19 复合物的功能成员,如 果敲除此复合物的核心成员可引起对电离辐射凋亡的敏感, CCDC94 和 Prp19 复合物通过抑制 p53mRNA 的 表达保护细胞避免电离辐射诱导的凋亡。

4 利用斑马鱼对保护剂和增敏剂进行评价

4.1 辐射保护剂

4.1.1 氨磷丁(amifostine)、富勒烯纳米颗粒(DF-1)与阿魏酸(FA)

氨磷丁是一种能够清除自由基的硫醇,作为辐射保 护剂已经在临床中应用。该药物可减缓一定剂量的范围 的电离辐射造成的斑马鱼胚胎毒性,起到提高存活率、 畸形率,防止视网膜细胞层的瓦解、晶状体浑浊,减少 脑与眼部的细胞凋亡的作用^[4]。Geiger^[45]研究发现氨 磷丁可抑制由辐射诱导的凋亡蛋白酶 caspase 的活性。 因此,氨磷丁对器官或胚胎个体的辐射防护是二者的综 合作用:一方面清除细胞内 ROS,保护DNA 免受 ROS 攻击;另一方面阻碍细胞凋亡的发生途径,增强细胞辐 射耐受性。

DF-1为水溶性的抗氧化剂,是中空纳米结构的富 勒烯,富勒烯代表20,40,60,80,84的碳原子家族, 其中C₆₀富勒烯最常使用。DF-1是C₆₀富勒烯的衍生 物,结构中加入18个羟基基团从而加强了水溶性^[22]。 富勒烯具有清除ROS 的潜能,包括过氧化氢、羟自 由基、过氧化氢自由基、超氧自由基。利用斑马鱼胚 胎可对DF-1的辐射保护作用进行初步评估,Daroczi 等^[46]研究发现适量的DF-1(1~1000 μmol/L)对斑马 鱼胚胎形态学发育与活力无影响; 100 μmol/L DF-1 预 处理胚胎3 h后进行 10~40 Gy 电离辐射暴露,胚胎整 体或特定器官受到的辐射毒性显著减弱,如: 20 Gy 电 离辐射可造成 24 h 内肾对荧光标记的葡萄聚糖注射物 的清除率降低, DF-1 预处理组可使 24 h 内清除率达到 正常水平,恢复肾功能; DF-1 预处理组也可保护 5 dpf 斑马鱼神经细胞免受 80 Gy 的辐射损害。进一步检测受 保护与未受保护辐射暴露胚胎的 ROS 水平,后者显著 高于前者,而前者则与空白对照组无明显差别,揭示这 种辐射保护作用与ROS 的清除有关。

FA 是一种存在于木贼属、当归属等一些草本植物 中具有生物活性的小分子化合物,因其具有抗氧化性 的功效而广泛应用于药物、化妆品和药膳中。许多报道 都证明 FA 可以结合在磷脂酰乙醇胺 (PE)保护膜脂上 而免受自由基的攻击,是一种能够清除超氧阴离子、羟 自由基、过氧化氢的天然抗氧化剂。例如,Si等^[21]证 明 FA 预处理的斑马鱼胚在1,3,7 Gy 剂量电离辐射暴 露后,死亡率和畸形率相比于单独辐射组均有下降, 且在7 Gy 辐射剂量下降显著 (图3)。进一步分析发现, FA 预处理的7 Gy 剂量组胚胎 ROS 含量显著下降,超 氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)和谷胱甘 肽 (GSH)含量显著提高,丙二醛(MDA)含量显著下 降,表明 FA 可提高细胞清除 ROS 的能力,从而起到保 护胚胎免受 ROS 攻击的作用。

4.1.2 托屈嗪 (Todralazine) 与盐酸丙胺卡因 (Prilocaine hydrochloride)

在电离辐射治疗中,造血干细胞(HSCs)受到很大 的损害,具有刺激产生造血干细胞功能的小分子化合 物具有辐射防护的潜能,早先的研究中β2肾上腺素 受体(β₂AR)的拮抗剂可以起到扩增造血干细胞的作 用^[47]。Dimri等^[14,48]通过化合物库的筛选,在斑马鱼 胚胎模型中,证明了托屈嗪与盐酸丙胺卡因通过扩增红 细胞发挥辐射防护作用。托屈嗪是造血干细胞的有效 调节剂,5 µmol/L的托屈嗪处理可以显著提高野生型 与贫血型斑马鱼胚胎尾部造血组织(CHT)的红血球生 成(分别为2.33 倍和1.44 倍)。5 µmol/L 的托屈嗪处理 同样可增加CHT红系祖细胞的特异性基因的表达,说 明托屈嗪还可提高红祖细胞的数量。24到36 hpf的斑 马鱼胚胎暴露于5 µmol/L 的托屈嗪后,其主动脉-性 腺-中肾区域的HSCs增加近2倍,HSC 的特异性标记 基因 runx1 和 cMyb 分别增长 3.3 和 1.41 倍支持这一结 果。个体水平, 5 µmol/L 的托屈嗪预处理 30 min 后 20 Gv 的辐射暴露,可保护斑马鱼胚胎免受辐射诱发的器 官毒性、细胞凋亡, 6 dpf 胚胎存活率可以提高到 60%,

并具有清除羟自由基的潜在作用。因此,托屈嗪通过造血干细胞的扩增与清除ROS发挥辐射防护的作用。

盐酸丙胺卡因是一种常用于牙科手术的局部麻醉 剂,也是一种潜在的辐射防护剂。20 μmol/L的盐酸 丙胺卡因可以保护斑马鱼胚胎免受20 Gy 电离辐射诱 导的心包水肿、小眼。相比于对照,具有高达60%的 辐照后存活优势,10 μmol/L的盐酸丙胺卡处理仍具 有40%的辐照后存活优势。丙胺卡因对超氧阴离子的清 除作用是浓度依赖型的,1 mmol/L的丙胺卡因可清除 辐射诱导的羟自由基含量的43%。20 μmol/L的盐酸丙 胺卡因具有造血干细胞的功能,与未处理的阴性对照组 相比,盐酸丙胺卡因可显著增加野生型斑马鱼及贫血斑 马鱼尾部造血组织中红血球的生成(分别为1.48 和0.85 倍)。丙胺卡因是一种自由基清除剂,具有造血干细胞 的功能,因此具有辐射保护作用^[48]。

4.2 辐射增敏剂

4.2.1 弗拉平度(flavopiridol)

弗拉平度是小分子半合成的类黄酮抑制剂,作用于 周期蛋白激酶,可增强体内或体外癌细胞对辐射的敏感 性,从而抑制多种信号途径的级联传导,发挥多效抑制 效应。但是在临床使用时受毒性的限制并不理想,利用 斑马鱼胚胎评价弗拉度对正常组织的影响,对临床应用 具有重要意义。McAleer等^[13]研究证实1-4细胞期斑马 鱼胚胎500 nmol/L弗拉平度处理,24 hpf 40 Gy 电离 辐射暴露,96 hpf胚胎死亡率为单一辐射处理组的两倍, 体轴发育卷曲的频率也提高。同时,McAleer等^[13]还 证实弗拉平度可抑制周期蛋白D1 的活性,从而达到增 强斑马鱼胚胎的电离辐射敏感性。

4.2.2 4'溴3'硝基丙酮(NS-123)与替莫唑胺

NS-123 是体内外神经胶质瘤细胞U251 的辐射增 敏剂,同样也可使HT-29 结肠癌细胞与A549 肺腺癌细 胞辐射敏感化。研究发现NS-123 对正常的神经胶质细 胞和斑马鱼胚胎无辐射增敏作用,斑马鱼胚胎经过5 µmol/L NS-123 预处理8 h 后置于6 Gy 电离辐射暴露, 与单一辐射组相比,胚胎发育及存活率无显著差异。 胶质瘤细胞U251 细胞通过显微注射的方法移植到4.5 hpf 胚胎的卵黄囊中,并进行NS-123 处理,U251 能在 斑马鱼胚胎中吸收营养而继续增殖,红色荧光蛋白标记 的U251 在斑马鱼胚胎组织背景下容易分辨,24 hpf给 予电离辐射,检测3 dpf和5 dpf的红色荧光强度,发 现NS-123 单一处理组的胚胎,移植细胞的范围大小无 明显变化,单一辐射暴露组的胚胎移植细胞逐步退化, 然而 NS-123 预处理的胚胎辐射后,移植细胞存活率与 单一辐射组比较显著减小,结果说明NS-123 可降低辐射后肿瘤细胞的扩增,而对体内的正常细胞没有明显的毒性,证明了NS-123 作为辐射增敏剂具有肿瘤细胞靶向性^[49]。

替莫唑胺是一种 DNA 甲基化试剂,是治疗恶性胶 质瘤的活性药物。替莫唑胺可造成鸟嘌呤O⁶位置甲基 化从而导致细胞毒作用。复制时O⁶甲基鸟嘌呤与胸 腺嘧啶错误配对激活错配修复系统,修复错配的碱基 时,会再次优先插入胸腺嘧啶,这种重复性的无用修复 可能会引起 DNA 链断裂,最终分裂增殖停滞,细胞调 亡。与NS-123作用相同, 替莫唑胺介导人神经胶质瘤 细胞的辐射增敏作用,Geoffrev 等^[17]在斑马鱼胚胎系 统中进行了研究,优化了表达红色荧光蛋白的胶质瘤 细胞(U251-RFP)移植到斑马鱼胚胎的条件,在2 dpf 斑马鱼胚胎的卵黄囊中注射U251-RFP细胞群,可以明 显减少胚胎24 h内的死亡率,也可减小发育中的信号 对U251-RFP 细胞微环境的干扰,温度的选择取决于 二者均能正常增殖的共同温度32°C。宿主胚胎在7 dpf 内正常发育,U251-RFP 细胞追踪容易,可观察到正 常、清晰的数量增长。研究发现,人神经胶质瘤细胞可 以在宿主内募集血管,观察显示被绿色荧光蛋白标记外 周的血管在胚胎发育过程中明显的向肿瘤细胞团处延伸 并直接接触。100 μmol/L 替莫唑胺单一作用12 h对胚 胎形态发育和存活率没有明显的影响。1 dpf 10 Gy 辐 射单一作用斑马鱼胚胎,神经胶质瘤细胞的荧光信号随 时间逐渐降低,说明电离辐射可降低神经胶质瘤细胞的 存活。替莫唑胺处理后联合辐射暴露可更大程度地减少 神经胶质瘤细胞的存活,在某些胚胎中甚至能完全清 除,揭示了替莫唑胺的辐射增敏作用的有效性。

4.2.3 线粒体激动剂(Mitochondros)

中国科学院近代物理研究所自主合成的 Mitochondros 是一种线粒体ROS诱导剂,作为一种 新型合成材料,具有物理激发、化学刺激的双重效应, 可自由穿过细胞膜,进入线粒体并停靠在线粒体内膜 上。Mitochondros在特定波长光的激发下发生状态的 改变,能够在同一激发态的不同能级间通过生电子的跃 迁发生转化,也可通过电子的系统间穿梭完成不同激 发态的转化,此过程伴随着电子自旋形式的改变,并有 磷光产生。此物质靶向细胞线粒体,与线粒体内部物质 相互作用,尤其可与可溶性氧分子作用产生ROS,从 而对 DNA 进行攻击造成 DSBs 的损害,在理论上是一 种潜在的辐射增敏剂。通过检测 Mitochondros 对斑马 鱼胚胎发育的影响,发现受精后的斑马鱼胚胎持续暴 露于小于10 μL/mL Mitochondros 后,死亡率与孵化 率与正常组相比无显著差异(图7)。但随着药物浓度的 增大,72 hpf 斑马鱼每分钟的心率呈现出稳定的上升趋 势,相比于对照组,2,5,10 µL/mL处理组的心率分 别提高了10.4%, 15.3%, 18%, 差异显著(图8)。这说 明Mitocondros 有加快斑马鱼心脏节律性收缩的功能, 其原因可能与心肌细胞中的线粒体的增多或 ATP 产量 的增加有关。更为重要的是,我们发现药物处理后的 斑马鱼幼鱼在运动能力的各个方面都得到了加强,斑 马鱼的热区图(图9)反映了幼鱼在不同位置出现的概率 的大小, 红色区域表示出现率最大, 随颜色变化依次 减弱, 蓝色区域代表概率最小。对照组中, 红色区域呈 片状覆盖,而在各处理组中热区面积大大减小,呈点 状零散分布。幼鱼均在1×1的正方形小面积范围内活 动,对照组的热区表示幼鱼集中在此区域活动,在小面 积内即可认为是一种区域停滞状态,热区的减少甚至 消失,表明斑马鱼的运动停滞减少,运动活力增强,处 于运动兴奋状态。这些数据表明, Mitocondros 能够提 高斑马鱼的运动兴奋性,从而使运动范围内的热点消 失,活动热区图中的活动热点也相应消失。以上结果提 示 Mitochondros 可能通过 ROS 的产生增强线粒体功能 从而影响斑马鱼幼鱼的运动能力, Mitochondros 介导 的辐射增敏作用还需要进一步验证。



图 7 (在线彩图)各时间点不同浓度Mitocondros处理后 斑马鱼的孵化率与死亡率



图 8 72 hpf 不同浓度 Mitocondros 处理后斑马鱼心律 * 与对照组相比P<0.05, ** 与对照组相比P<0.01。



图 9 (在线彩图) 144 hpf 不同浓度 Mitocondros 处理后 斑马鱼活动热区图 红色区域表示出现率最大,随颜色变化依次减弱,蓝色 区域代表概率最小。A: 对照组; B: 2 μL/mL; C: 5 μL/mL; D: 10 μL/mL。

5 展望

在放射生物学领域,利用斑马鱼这种模式动物来研究电离辐射对生物体影响的相关研究还处于初级阶段。 基于斑马鱼本身的特点,其在研究电离辐射引起的发育 毒性、遗传毒理以及药物筛选等方面具有得天独厚的优势,可弥补目前利用大/小鼠模式动物进行放射生物学 研究的不足。中国科学院近代物理研究所建立起来的西 北首个斑马鱼放射生物学研究平台目前已经从电离辐射 引起的斑马鱼生理变化、遗传毒性、DNA损伤应答机 制以及辐射增敏剂、防护剂筛选多个方面深入探索了斑 马鱼在放射生物学研究方面的应用价值。

目前国际上基于斑马鱼重离子生物学效应的相关研 究仅有日本放射医学研究中心。中国科学院近代物理研 究所近年也开展了斑马鱼放射生物学方面的研究,并搭 建了西北首个斑马鱼放射生物学研究平台,该平台充分 利用 HIRFL 提供的高能重离子束流,搭配目前新建起 来的微束终端,在重离子束引起的 RIBE 及相关分子机 制方面开展有特色的研究工作。利用现有的胚胎显微注 射系统,构建 DNA 损伤修复反应相关蛋白基因型缺失 的新斑马鱼品系,深入确定 DSBs 相关响应蛋白在重离 子引起的生物学效应中所起的作用。在此基础上,该平 台建立的斑马鱼生理行为学监测系统也使得相关研究从 分子、细胞到整体水平都得到了完善,进一步整合生物 学相关的重离子斑马鱼生物学效应研究。

参考文献:

- [1] CHOI V W, YU K N. Cancer Lett 2015, **356**: 91.
- [2] YU K N, TUNG M M, CHOI V W, et al. Environmental Science and Pollution Research International, 2012, 19: 3831.
- [3] HWANG M, YONG C, MORETTI L, et al. Current Genomics, 2007, 8: 360.
- [4] GEIGER G A, PARKER SE, BEOTHY AP, et al. Cancer Research, 2006, 66: 8172.
- [5] DOVEY M C, ZON LI. Methods in Molecular Biology, 2009, 568: 1.
- [6] PARANT J M, GEORGE S A, HOLDEN J A, et al. Disease Models & Mechanisma, 2010, 3: 45.
- [7] FREEMAN J L, WEBER G J, PETERSON S M, et al. Frontiers in Genetics, 2014, 5: 268.
- [8] KIM J H, BROWN S L, JENROW K A, et al. Journal of Neuro-oncology, 2008, 87: 279.
- [9] MCGALE P, DARBY S C, HALL P, et al. Radiotherapy and Oncology: Jjournal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 2011, 100: 167.
- [10] HATZI VI, LASKARATOU DA, MAVRAGANI IV, et al. Cancer Lett, 2015, 356: 34.
- [11] LAVRENTYEV EN, MALIK KU. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296: H106.
- [12] GE XS, MA HJ, ZHENG XH, et al. Cancer Sci, 2013, 104: 1675.
- [13] MCALEER M F, DUFFY K T, DAVIDSON W R, et al. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 2006, 66: 546.
- [14] DIMRI M, JOSHI J, CHAKRABARTI R, et al. Zebrafish, 2015, 12: 33.
- [15] IKEGAMI R, HUNTER P, YAGER T D. Developmental Biology, 1999, 209: 409.
- [16] BLADEN C L, LAM W K, DYNAN W S, et al. Nucleic acids Research, 2005, 33: 3002.
- [17] GEIGER G, FU W, KAO G. Cancer research, 2008, 68: 3396.
- [18] PEREIRA S, BOURRACHOT S, CAVALIE I, et al. Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC, 2011, 30: 2831.
- [19] ZHOU R, SI J, ZHANG H, et al. Human & Experimental Toxicology, 2014, 33: 1040.

- [20] MCALEER M F, DAVIDSON C, DAVIDSON W R, et al. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 2005, 61: 10.
- [21] SI J, ZHANG H, WANG Z, et al. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2013, 745–746: 26.
- [22] ZHOU R, ZHANG H, WANG Z, et al. Life Sciences, 2015, 139: 114.
- [23] BLADEN C L, FLOWERS M A, MIYAKE K, et al. Radiation Research, 2007, 168: 149.
- [24] CALABRESE E J, BALDWIN L A. Human & Experimental Toxicology, 2002, 21: 91.
- [25] CHOI V W, YUM E H, KONISHI T, et al. Journal of Radiation Research, 2012, 53: 475.
- [26] SOFIA V, MARTINS L, IMAIZUMI N, et al. PLoS One, 2010, 5: e11222.
- [27] JAAFAR L, PODOLSKY R, DYNAN W. Plos One, 2013, 8: e69445.
- [28] YUM E, CHOI V W, NIKEZIC D, et al. Radiation Measurements, 2009, 44: 1077.
- [29] CHOI V W, CHEUNG A L, CHENG S H, et al. Environ Sci Technol, 2012, 46: 11678.
- [30] CHOI V W, NG C, CHENG S, et al. Environ Sci Technol, 2012, 46: 226.
- [31] CHOI V W, NG C Y, KOBAYASHI A, et al. Environ Sci Technol, 2013, 47: 6368.
- [32] MILACIC S. La Medicina del Lavoro, 2009, 100: 178.
- [33] AINSBURY E, BOUFFLER S, DORR W, et al. Radiation Research, 2009, 172: 1.
- [34] HAMADA N, FUJIMICHI Y. Cancer Lett, 2015, 368: 262.
- [35] TSYUSKO O, YI Y, COUGHLIN D, et al. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology: CBP, 2007, 145: 103.
- [36] SIMON O, MASSARIN S, COPPIN F, et al. J Environ Radioact, 2011, **102**: 1039.
- [37] JARVIS R, KNOWLES J. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2003, 541: 63.
- [38] GARG R, GENG C D, MILLER J L, et al. Molecular Cancer research: MCR, 2004, 2: 348.
- [39] IMAMURA S, KISHI S. The international Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37: 1105.
- [40] SANSAM C, SHEPARD J, LAI K, et al. Genes & Development, 2006, 20: 3117.
- [41] SANSAM C, CRUZ N, DANIELIAN P, et al. Genes & Development, 2010, 24: 183.
- [42] GUO L, LIEW H, CAMUS S, et al. Oncogene, 2013, 32: 4009.
- [43] DAVIDSON W, REN Q, KARI G, et al. Cell cycle , 2008, 7: 1224.
- [44] SORRELLS S, CARBONNEAU S, HARRINGTON E, et al. PLoS Genetics, 2012, 8: e1002922.
- [45] GEOFFREY A. GEIGER A, GARY D, et al. Cancer Research, 47: 1245.
- [46] DAROCZI B, KARI G, MCALEER M F, et al. Clinical Can-

cer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2006, **12**: 7086.

- [48] DIMRI M, JOSHI J, SHRIVASTAVA N, et al. The Tokai journal of Experimental and Clinical Medicine, 2015, 40: 8.
- [47] NORTH TE, GOESSLING W, PEETERS M, et al. Cell, 2009, 137: 736.

[49] LALLY B, GEIGER G, KRIDEL S, et al. Cancer Research, 2007, 67: 8791.

Applications of Zebrafish Embryo in Ionizing Radiation Biology

WANG Yupei^{1,2}, ZHANG Hong¹, ZHOU Xin¹, ZHOU Rong¹, GAN Lu¹

(1. Institute of modern physics, Chinese academy of sciences, Lanzhou 730000, China;
 2. University of China Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Zebrafish embryo is a classic animal model to study developmental and molecular biology. The related works using zebrafish embryo arise from less than 100 papers per year in 90 s to more than 1000 papers per year at the beginning of 21st century. The research scope and application value of zebrafish embryo in biology studies are gradually extending, along with the exponential increase of related papers. Here, the applications of zebrafish embryo in the field of radiation biology are reviewed, including radiation-induced toxicity, signal transduction in response to radiation-induced DNA damage, and the assessment of radio-protection and radiosensitizers, respectively. The progress in radiation biology employing zebrafish embryo in Institute of Modern Physics has also been reported, including a novel mitochondrial reactive oxygen species inducer, which can be triggered by exogenous physical signal and exert chemical stimulation. This inducer shows no obvious embryo toxicity to zebrafish under 10 μ L/mL. It can induce DNA double strand breaks if activated by certain wavelength of lights. Itisa potential radiosensitizerin theory.

Key words: zebrafish; embryo; radiation; cytotoxicity; DNA damage; radiation agents

<sup>Received date: 8 Sep. 2015; Revised date: 4 Nov. 2015
Foundation item: National Natural Science Foundation of China (10835011; 11205219)
Corresponding author: ZHANG Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn.</sup>