

文章编号:1673-0062(2016)03-0019-05

伽马辐照对斑马鱼胚胎谷胱甘肽还原酶活性及 基因表达的影响

胡 森,胡 南,丁德馨*,赵维超,冯永富,李广悦,王永东

(南华大学 铀矿冶生物技术国防重点学科实验室,湖南 衡阳 421001)

摘 要:谷胱甘肽还原酶(GR)是一种重要的抗氧化酶,其在生物体的抗氧化系统中起着关键作用.为了研究伽马辐照对斑马鱼胚胎 GR 活性及基因表达的影响,本实验用不同的辐照剂量(0.01、0.05、0.1、0.5 和 1 Gy)分别对三个发育时期(原肠胚期、体节期和咽囊期)的斑马鱼胚胎进行了辐照处理.分析了各组 GR 的活性,并采用荧光实时定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测了 GR 基因的表达水平.结果显示,伽马辐照以剂量依赖的方式调整了斑马鱼胚胎 GR 的活性及 GR 基因的表达.随着辐照剂量的增加,GR 活性及其 mRNA 的相对表达量呈现先升高后回落的趋势.这表明,GR 是一种可以对伽马辐照作出早期预警的生物标志物.斑马鱼胚胎可以通过上调 GR 基因的表达,来增加 GR 的合成,从而提高对伽马射线的防御能力.但是,这种反应和调整是有限度的.咽囊期胚胎比其它两个时期的胚胎对伽马射线的防御能力更强.

关键词:伽马辐照;斑马鱼胚胎;谷胱甘肽还原酶;基因表达;生物标志物

中图分类号:R811

文献标识码:B

The Effects of Gamma Irradiation on Activities and Gene Expression of Glutathione Reductase in Zebrafish Embryos

HU Miao, HU Nan, DING De-xin*, ZHAO Wei-chao, FENG Yong-fu,
LI Guang-yue, WANG Yong-dong

(Key Discipline Laboratory for National Defense for Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Glutathione reductase (GR), one of the most important antioxidant enzyme, plays a crucial role in the antioxidant system of an organism. This study was aimed to investigate the effects of gamma irradiation on activities and gene expression of glutathione reductase (GR) in

收稿日期:2016-04-08

基金项目:国防基础科研重点基金资助项目(B3720132001);国家自然科学基金资助项目(U1401231)

作者简介:胡 森(1991-),男,山东菏泽人,南华大学核资源工程学院硕士研究生.主要研究方向:辐射防护与环境保护.* 通讯作者.

zebrafish embryos. Different doses of gamma rays (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 Gy) were used to irradiate zebrafish embryos at three developmental stages (gastrula period, segmentation period and pharyngula period), respectively. The activities of GR were assayed and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to measure GR gene expression. The results showed that gamma irradiation modulated the activities and gene expression of GR in a dose-dependent manner. The activities and relative mRNA levels of GR rose at first and went down later with the increase of the irradiation doses. It was indicated that GR was a suitable biomarker for forecasting the gamma irradiation. By upregulating the gene expression of GR, and therefore increasing the synthesis of GR, the zebrafish embryos can enhance the resistance to gamma rays. But such reaction and adjustment are limited. And, the zebrafish embryos at pharyngula period had a greater ability to defend the gamma rays than those at other stages.

key words: gamma irradiation; zebrafish embryo; glutathione reductase; gene expression; biomarker

当前,核能的大规模使用满足了人类日益增长的能源需求,但近年来不断发生的核泄露事故加大了民众对于环境安全的担忧。例如,2011年日本福岛核事故中大量的放射性物质被释放到外部环境中,由此产生的电离辐射对于周边居民的危害尚不够明朗^[1]。斑马鱼(Danio rerio)是一种与人类基因高度同源的淡水鱼,其生理反应以及分子通道等都与人体有着相同的特性。因此以斑马鱼为模型所得的实验结果在大部分情况下能够应用到人体上^[2]。它还有一些优点,比如体型小、繁殖能力强、易于饲养、胚胎生长快等。此外,斑马鱼胚胎是透明的,而且科学界对斑马鱼生长发育过程已经全面了解并制定了各特定发育阶段时间表^[3]。所以,研究人员能方便地对胚胎发育的不同阶段进行操作。近些年,斑马鱼正逐渐成为分子遗传学、发育生物学和毒理学中一种重要的模式生物^[4]。

伽马射线是电离辐射中能量最高的一种形式,它会诱导生物体产生活性氧(ROS)。过量的活性氧会引起蛋白质、脂质等发生氧化,对细胞和基因结构造成损坏,并最终导致细胞死亡^[5]。因此,生物体有一套完整的抗氧化系统来维持体内活性氧含量的稳定。还原型谷胱甘肽(GSH)是一种重要的抗氧化剂,它可以清除生物体内的活性氧而自身被转化为氧化型谷胱甘肽(GSSG)^[6]。谷胱甘肽还原酶(GR)是一种重要的抗氧化酶,其在生物体的抗氧化系统中起着关键作用。它可以催化GSSG还原为GSH,从而维持细胞中的GSSG与GSH比率的动态平衡^[7]。目前尚不清楚GR能否作为伽马射线的生物标志物来对低剂量辐射污染作出早期预警。因此,本实验拟探究GR活性与伽马辐照剂量之间的关系,并采用实时荧光定量PCR技术(qRT-PCR)

对斑马鱼GR基因的表达水平进行定量分析,为阐明伽马辐照对抗氧化酶的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

HXFS-IA型(¹³⁷Cs)伽马生物辐照仪(中国核动力研究设计院);解剖显微镜(厦门麦克奥迪);T6型紫外分光光度计(上海元析);5804R型高速冷冻离心机(德国艾本德);AL104型电子分析天平(瑞士梅特勒托利多);12孔细胞培养板(美国康宁);SW-CF-1FD型超净台(上海博讯);XW-80A型涡旋振荡器(海门其林贝尔);DA7600型荧光定量PCR循环仪(广东达安)。

1.2 主要试剂

BCA蛋白法定量测试盒(南京建成);谷胱甘肽还原酶测试盒(南京建成);总RNA抽提试剂TRIzol(美国Invitrogen);cDNA第一链合成试剂盒(立陶宛Fermentas);SYBR Green Real-time PCR Master Mix试剂盒(日本TOYOBO);50×TAE电泳缓冲液(南京建成);0.1% DEPC水(南京建成);其他试剂均为市售分析纯。

1.3 斑马鱼的饲养和胚胎的生产

AB品系成年野生斑马鱼由中国科学院淡水生态与生物技术国家重点实验室提供。平均全长为 3.87 ± 0.33 cm,平均体重为 0.65 ± 0.05 g。饲养水温为 27 ± 1 °C,光照/黑暗周期为14 h:10 h,每日喂食3次新鲜孵化的丰年虫(卤虫)。每周换掉占总体积50%的水,并且每天补充被蒸发掉的水份。在产卵的前一天晚上将雌鱼和雄鱼用隔板隔开放入交配鱼缸,雌雄比例为2:1。第二天早晨,移去隔板,

雌雄鱼在光的刺激下相互追逐并将卵产在水中.胚胎会在光周期开始阶段的前15 min完成受精,这保证了所收集的胚胎是同一时期的.将收集的胚胎用斑马鱼 E3 培养液(5 mmol/L NaCl、0.33 mmol/L CaCl₂、0.33 mmol/L MgSO₄ · 7H₂O、0.17 mmol/L KCl,pH=7.8±0.2)清洗 3 次^[8].然后,把它们移到直径 10 cm 的培养皿中 28.5 ℃培养.在解剖显微镜下挑选出发育正常的胚胎,并根据 Kimmel 等人制定的标准分期方法,按照受精后的时间(hours post-fertilization,hpf)来确定发育时期^[3].本实验研究了斑马鱼胚胎的三个发育时期:原肠胚期(6 hpf)、体节期(12 hpf)和咽囊期(24 hpf).

1.4 胚胎辐照

将每组的 400 枚斑马鱼胚胎平均地散布到 12 孔板的小孔里,每孔加入 3 mL E3 培养液.室温下,将实验组的斑马鱼胚胎分别放入(¹³⁷ Cs)伽马生物辐照仪进行辐照处理.辐照仪有不同的运行模式,每个模式都有一个特定的辐照率.本实验使用的辐照率为 0.491 Gy/min,各实验组的辐照时间见表 1.每个实验组和对照组做两次平行实验.

表 1 各实验组的参数

Table 1 The parameter of each irradiation group

组号	总剂量/Gy	辐照时间/s
1	0.01	1.22
2	0.05	6.11
3	0.1	12.22
4	0.5	61.10
5	1	122.20

表 2 相关基因引物序列

Table 2 Sequences of primers of related genes

基因名称	登录号	引物(5'-3')	长度(bp)
GAPDH	NM_001115114.1	F: TGATGGTCATGCAATCACAG	138
		R: CCACCCTTAATGTGAGCAGA	
GR	NM_001020711.3	F: GGACTTTGAGCTGGATGGAT	124
		R: AGCCTTCGAGTCCCTGTCTA	

1.7 数据分析

使用 SPSS 19.0 来进行数据分析.数值表示为均值±三次独立实验的标准差(SD).组间差异用单因素方差分析法(one-way ANOVA)结合 Tukey 多重比较检验进行分析.与对照组之间的显著性差异表示为 **p*<0.05 和 ***p*<0.01.同一剂量下不同发育阶段间的显著性差异,分别用不同的字母(a,b,c)作标记(*p*<0.05).反之,相同的字母表示

1.5 酶活性的测定

每组取 200 枚胚胎进行酶活性的测定,分别在 1 mL 冷的 0.86%生理盐水中进行匀浆.然后把 1 : 10 的匀浆 12 000 ×*g*,4 ℃离心 30 min,取上清液进行生化检测.蛋白质含量的测定采用 BCA 法^[9],GR 活性的测定采用改良的 Foyer 法^[10],按试剂盒说明书进行操作.一个 GR 活性单位(U)定义为:每克组织蛋白每分钟使反应体系中底物 NADPH 的浓度改变 1 mmol/L 所需的酶量.

1.6 基因表达水平的测定

每组余下的 200 枚胚胎进行基因表达水平的测定.使用 Primer 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物,由南京金斯瑞科技有限公司合成,其序列见表 2.使用 Trizol 试剂提取总 RNA,用分光光度计测定样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光度,检测 RNA 的产量和纯度,并使用 1%的非变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品完整性.利用 cDNA 第一链合成试剂盒反转录成 cDNA 后用作 qRT-PCR 的模板.qRT-PCR 按照 SYBR GreenReal-time PCR Master Mix 试剂盒的说明书进行操作.扩增程序为:95 ℃预变性 5 min;接着 95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 1 min,共做 40 个循环.反应结束后分析荧光值变化曲线和溶解曲线以确定扩增目的基因片段的特异性.每个反应进行三次重复实验.以 GAPDH 基因作为内参,采用 2^{-ΔΔC_t}法计算各基因相对表达量.

没有显著性差异.标有“ab”表明此组与标有“a”或者“b”的组之间没有显著性差异.使用 Origin 7.5来制作图表.

2 结 果

2.1 酶活性分析

伽马辐照对 GR 活性的影响如表 3 所示.与对照组相比,受到 0.01 或 0.05 Gy 辐照后各时期胚

胎的 GR 活性都显著升高 ($p<0.01$).其中原肠胚期胚胎 GR 活性分别提高了 40.40%、30.42%,体节期胚胎 GR 活性分别提高了 67.04%、30.02%,咽囊期胚胎 GR 活性分别提高了 69.05%、95.02% ($p<0.01$).但是受到 0.5 或 1 Gy 辐照后,原肠胚期和体节期胚胎 GR 活性与对照组相比却显著下

降 ($p<0.05$),在咽囊期胚胎中则没有显著变化.其中原肠胚期胚胎 GR 活性分别下降了 10.22% ($p<0.05$) 和 38.90% ($p<0.01$),体节期胚胎 GR 活性分别下降了 23.48% 和 37.25% ($p<0.01$).另外,各组中咽囊期胚胎的 GR 活性均高于其他时期胚胎.

表 3 不同发育阶段的胚胎受到辐照后 GR 的活性(U/mg prot)
Table 3 The GR activities of gamma-irradiated embryos at different developmental stages

时期(hpf)		辐照剂量/Gy					
		0	0.01	0.05	0.1	0.5	1
GR	6	4.01±0.69 ^b	5.63±0.76 ^{c, **}	5.23±1.15 ^{b, **}	3.88±0.80 ^e	3.60±0.83 ^{b, *}	2.45±0.37 ^{c, **}
活	12	4.43±1.17 ^a	7.40±1.13 ^{b, **}	5.76±1.07 ^{b, **}	3.76±0.51 ^b	3.39±1.34 ^{b, **}	2.78±0.82 ^{b, **}
性	24	4.62±0.73 ^a	7.81±1.23 ^{a, **}	9.01±1.56 ^{a, **}	5.21±1.17 ^a	5.41±0.72 ^a	3.91±1.06 ^a

2.2 基因表达水平分析

各组斑马鱼胚胎 GR 基因 mRNA 的相对表达量如图 1 所示.与对照组相比,受到 0.05、0.1、0.5 或 1 Gy 的辐照后,原肠胚期胚胎的 GR 基因表达显著上调,分别上调至 1.19 倍、1.34 倍、1.25 倍和 1.23 倍 ($p<0.01$).但在 0.01 Gy 组,该时期胚胎 GR 基因表达水平与对照组相比则没有显著的差异.

与对照组相比,受到 0.01、0.05 或 0.1 Gy 的辐照后,咽囊期胚胎的 GR 基因表达显著上调,分别上调至 2.42 倍、2.68 倍和 1.25 倍 ($p<0.01$).但在 0.5 Gy 组,该时期胚胎 GR 基因表达水平与对照组相比则没有显著的差异.然而,受到 1 Gy 的辐照后,该时期胚胎 GR 基因表达水平与对照组相比则显著地下降了 71.45%±0.89% ($p<0.01$).

3 讨 论

伽马射线能够诱导生物体产生过多的活性氧 (ROS) 物质,如超氧阴离子 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟自由基 ($OH^\cdot$) 和超氧化氢 ($HO_2^\cdot$) 等^[5].过量的活性氧会引起体内氧化与抗氧化作用失衡而出现氧化应激效应,这被认为是导致生物体衰老和疾病的一个重要因素^[11].因此为了对抗氧化应激,生物体进化出一套完整的防御系统.这一系统主要划分为两类:一是非酶促抗氧化剂,包括还原型谷胱甘肽 (GSH)、抗坏血酸 (ASA) 等;抗氧化酶类,包括过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 等^[12].

GSH 是一种非常重要的非酶促抗氧化剂,它可以在 GPx 的催化下与过氧化物和自由基结合,从而维持含巯基蛋白质的生物活性,而自身被转化为氧化型谷胱甘肽 (GSSG).另外,它可以参与抗坏血酸—谷胱甘肽循环,实现 ASA 的再生,从而在保障 APX 清除 H_2O_2 的过程中起到重要的作用^[13].GR 是一种重要的内源性抗氧化酶,它可以催化 GSSG 还原为 GSH.GR 主要分布于胞浆及线粒体内,而 CAT 主要集中分布在过氧化物酶体

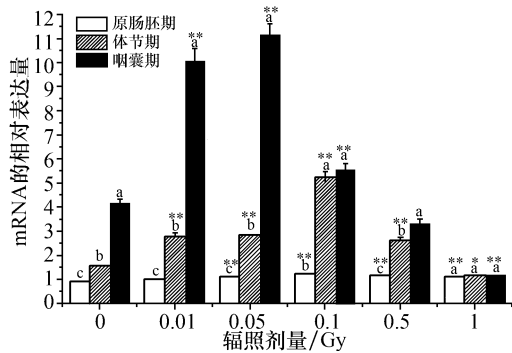


图 1 不同发育时期(6~24 hpf)的
斑马鱼胚胎受到不同剂量的伽马辐照
(0.01~1 Gy)后 GR 基因 mRNA 的相对表达量
Fig.1 The glutathione reductase (GR) mRNA
levels in zebrafish embryos at different developmental
stages (6~24 hpf) with different doses of
gamma irradiation (0.01~1 Gy)

0.01、0.05、0.1 或 0.5 Gy 的辐照能显著诱导体节期胚胎 GR 基因的表达,与对照组相比分别上调至 1.78 倍、1.83 倍、3.56 倍和 1.68 倍 ($p<0.01$).然而,受到 1 Gy 的辐照后,该时期胚胎 GR 基因表达水平与对照组相比则显著地下降了 74.97%±2.42% ($p<0.05$).

内.因此 GR 较 CAT 分布更为广泛,从而成为了生物体清除 H_2O_2 最主要的途径^[14].

为了研究伽马辐照对斑马鱼胚胎中 GR 活性以及基因表达的影响,本实验用不同的辐照剂量(0.01、0.05、0.1、0.5 和 1 Gy)分别对三个发育时期(原肠胚期、体节期和咽囊期)的斑马鱼胚胎进行了辐照处理.分析了 GR 的活性,并采用荧光实时定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测了 GR 基因的表达水平.结果显示,伽马辐照以剂量依赖的方式调整斑马鱼胚胎 GR 的活性及其基因的表达.随着辐照剂量的增加,GR 的活性及其 mRNA 的相对表达量呈现先升高后回落的趋势.并且咽囊期胚胎 GR 活性及基因表达水平明显高于其他时期的胚胎.

在低剂量(0.01 Gy 和 0.05 Gy)组,GR 基因的表达水平以及酶活性提升很快.这表明,斑马鱼胚胎可以通过上调 GR 基因的表达,来增加谷胱甘肽还原酶的合成,从而提高对伽马射线的防御能力.研究发现 *kryptolebias marmoratus* 胚胎受到伽马辐照后也曾出现过类似的结果^[15].但在高剂量(0.5 Gy 和 1 Gy)组,GR 基因的表达水平仅有略微增长,甚至出现了下降的趋势,酶活性的变化趋势与其基本一致.这表明,斑马鱼胚胎抵抗伽马射线的能力是有限的,高剂量的辐照可能对 GR 基因造成了不可逆转的损伤,从而降低了该基因的转录水平,进而影响 mRNA 翻译为蛋白质等环节.

4 结 论

GR 是一种可以对伽马辐照作出早期预警的生物标志物.斑马鱼胚胎可以通过上调 GR 基因的表达,来增加谷胱甘肽还原酶的合成,从而提高对伽马射线的防御能力,但这种反应和调整是有限度的.咽囊期的斑马鱼胚胎比其他两个时期的胚胎对伽马射线的防御能力更强.

参考文献:

- [1] Nair R N, Sunny F, Chopra M, et al. Estimation of radioactive leakages into the Pacific Ocean due to Fukushima-nuclear accident [J]. *Environmental Earth Sciences*, 2014, 71(3): 1007-1019.
- [2] 雷继晓,倪瑾,沈建良,等.以斑马鱼为模式生物的辐射效应修饰剂研究[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2010, 28(6): 321-324.
- [3] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 1995, 203(3): 253-310.
- [4] Hill A J, Teraoka H, Heideman W, et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity [J]. *Toxicological Sciences*, 2005, 86(1): 6-19.
- [5] Srinivasan M, Sudheer A R, Pillai K R, et al. Modulatory effects of curcumin on gamma-radiation-induced cellular damage in primary culture of isolated rat hepatocytes [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2007, 24(2): 98-105.
- [6] 赵妍,马丹丹,姜威,等.草菇谷胱甘肽还原酶基因受低温影响的表达研究[J]. *生物学杂志*, 2015, 32(1): 44-47.
- [7] Achary V M, Reddy C S, Pandey P, et al. Glutathione reductase a unique enzyme: molecular cloning, expression and biochemical characterization from the stress adapted *C₄* plant, *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br [J]. *Molecular Biology Reports*, 2015, 42(5): 947-962.
- [8] Cunliffe V T. Zebrafish: A Practical Approach [J]. *Genetics Research*, 2003, 82(1): 79-79.
- [9] Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. *Analytical Biochemistry*, 1985, 150(1): 76-85.
- [10] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism [J]. *Planta*, 1976, 133(1): 21-25.
- [11] Xu H, Shao X, Zhang Z, et al. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 93(7): 39-44.
- [12] Zhao X, Wang S, Wu Y, et al. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 136(14): 49-59.
- [13] Grant C M, Collinson L P, Roe J H, et al. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation [J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(1): 171-179.
- [14] 张兵,杨细飞,王晓梅.纳米二氧化硅对 HaCaT 细胞谷胱甘肽还原酶表达及活力的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2010, 27(7): 581-584.
- [15] Rhee J S, Kim B M, Kang C M, et al. Gamma irradiation-induced oxidative stress and developmental impairment in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus* embryo [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, 31(8): 1745-1753.