

楚璐萌,田子颖,崔蕊,等. 低氧对斑马鱼胚胎发育和红细胞生成的抑制作用 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 1-8.

Chu LM, Tian ZY, Cui R, et al. Inhibition effects of hypoxia on embryonic development and erythropoiesis in zebrafish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 1-8.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.01.001

# 低氧对斑马鱼胚胎发育和红细胞生成的抑制作用

楚璐萌<sup>1,4</sup>, 田子颖<sup>1</sup>, 崔蕊<sup>1</sup>, 吴娇<sup>2\*</sup>, 于海川<sup>1,3\*</sup>

(1. 新乡医学院医学检验学院, 河南省分子诊断与医学检验技术协同创新中心, 河南 新乡 453003;  
2. 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453003; 3. 新乡医学院第二附属医院, 河南省生物精神病学重点实验室,  
河南 新乡 453002; 4. 河南省郑州市第七人民医院, 郑州 450000)

**【摘要】 目的** 本文以斑马鱼(*Danio rerio*)为研究对象,探讨了低氧对早期胚胎发育、造血分化和红系分化的影响。**方法** 选取受精后12 h的斑马鱼胚胎,随机分为两组,以常氧组为对照组,低氧组为实验组,实时观察斑马鱼胚胎发育形态学的变化;通过联苯胺染色、邻联茴香胺染色、AO染色及瑞氏吉姆萨染色观察红细胞的生成及形态学变化;并通过Real time PCR检测了斑马鱼胚胎造血相关基因的表达情况。**结果** 与常氧相比,低氧降低了斑马鱼胚胎卵黄囊的营养消耗,抑制了色素细胞的形成,减慢了心率,延缓了斑马鱼胚胎的孵化,观察和分析了低氧对红细胞产生和成熟的抑制作用。**结论** 低氧延缓了斑马鱼胚胎发育,抑制了红细胞的产生和成熟。

**【关键词】** 斑马鱼;低氧;胚胎发育;造血分化;红细胞生成

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)01-0001-08

## Inhibition effects of hypoxia on embryonic development and erythropoiesis in zebrafish

CHU Lumeng<sup>1,4</sup>, TIAN Ziyang<sup>1</sup>, CUI Rui<sup>1</sup>, WU Jiao<sup>2\*</sup>, YU Haichuan<sup>1,3\*</sup>

(1. School of Laboratory Medicine, Henan Collaborative Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China. 2. School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003. 3. the Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan Key Laboratory of Biological Psychiatry, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453002.  
4. Zhengzhou No.7 People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450000)

Corresponding author: YU Haichuan. E-mail: haichuan\_yu@163.com; WU Jiao. E-mail: wujiao@xxmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** The vertebrate model of zebrafish (*Danio rerio*) was employed to explore the effects of hypoxia on early embryonic development, hematopoietic differentiation, and erythroid differentiation. **Methods** At 12 h

**【基金项目】** 国家自然科学基金(31301135), 河南省高等学校重点科研项目资助计划(21A320018), 河南省高校科技创新人才支持计划(17HASTIT047), 河南省高等学校青年骨干教师资助计划(2016GGJS-103), 新乡医学院精神神经医学学科群支持计划(2016PNKFKT-08), 新乡医学院产学研合作项目(2017CXY-2-14), 河南省生物精神病学重点实验室开放课题(ZDSYS2016001), 研究生创新支持计划资助项目(YJSCX201811Z)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31301135), Key Scientific Research Projects of Henan Province (21A320018), Innovative Talents in Science and Technology of Fund Program of Universities of Henan Province (17HASTIT047), the Young Backbone Teachers Fellowship in Henan Province (2016GGJS-103), the Disciplinary Group of Psychology and Neuroscience, Xinxiang Medical University (2016PNKFKT-08), Production, Study and Research Project Funding of Xinxiang Medical University (2017CXY-2-14), Open Program of Henan Key Laboratory of Biological Psychiatry (ZDSYS2016001), Graduate Innovation Support Program Funded Projects (YJSCX201811Z)。

**【作者简介】** 楚璐萌(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:造血分化发育研究。Email:670381639@qq.com

**【通信作者】** 于海川(1979—),男,博士,副教授,研究方向:造血分化发育。Email:haichuan\_yu@163.com;

吴娇(1978—),女,博士,副教授,研究方向:神经分化发育研究。Email:wujiao@xxmu.edu.cn。

\* 共同通信作者

post-fertilization, zebrafish embryos were randomly divided into two groups. The normoxic group was used as the control group, and the hypoxic group was used as the experimental group. The morphological changes of zebrafish embryos were observed in real-time. Erythropoiesis and morphological changes were observed by benzidine, O-dianisidine, acridine orange, and May-Grunwald Giemsa staining. Real time PCR was used to analyze hematopoietic gene expression in zebrafish embryos. **Results** Hypoxia reduced nutritional consumption of the yolk sac, inhibited the formation of pigment cells, slowed down the heart rate, and delayed the hatching of zebrafish embryos. Inhibitive effects of hypoxia on the production and maturity of red blood cells were observed. **Conclusions** Hypoxia delays zebrafish embryonic development and inhibits the production and maturity of red blood cells.

**【Keywords】** zebrafish; hypoxia; embryonic development; hematopoietic differentiation; erythropoiesis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

斑马鱼 (*Danio rerio*) 是研究发育、造血和遗传学的强大模型<sup>[1]</sup>, 其具有体外受精发育、产卵量大、胚胎透明等多种优势<sup>[2-4]</sup>。斑马鱼与人类之间的遗传同源性达 87%<sup>[5]</sup>, 同时具有遗传操作和再生能力<sup>[6]</sup>, 这使得斑马鱼成为目前研究脊椎动物胚胎发育和造血分化的优秀动物模型<sup>[7]</sup>。低氧是影响水生系统的最重要的压力源之一<sup>[8-9]</sup>, 目前有关低氧对斑马鱼胚胎发育的影响机制研究报道非常少。斑马鱼胚胎发育是一个复杂的、高度协同的过程。斑马鱼与人的造血分化是保守一致的, 已经发现并克隆了造血过程中的阶段特异性表达基因, 包括 EPO、Globin 和 GATA1 等<sup>[3,10]</sup>。研究发现红细胞生成受到低氧环境的影响, 其中一个或多个异常可能导致不同类型的红细胞生成障碍<sup>[10]</sup>。本文采用联苯胺染色、邻联茴香胺染色及瑞氏吉姆萨染色来显示红细胞的生成及形态学变化, 观察了低氧下斑马鱼胚胎的整个发育过程, 并对常氧和低氧下的基因表达水平进行了比较, 从而加深了低氧对脊椎动物影响的认识。目前涉及低氧对斑马鱼影响的详细研究很少, 本研究为揭示低氧影响斑马鱼胚胎发育和红细胞生成的具体过程提供了新数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

本实验得到新乡医学院动物实验伦理委员会的审批 (XYLL-2020163), 于河南省免疫与靶向药物重点实验室中进行实验, 实验动物实验使用许可证号【SYXK(豫)2018-0014】。约 100 对状态良好的生育期的 AB 品系斑马鱼养殖于上海海圣斑马鱼实验养殖系统中, 光照/黑暗 14 h/10 h, 水温为 28℃。受精卵在 28.5℃ 下孵育, 并根据 Kimmel 等<sup>[2]</sup>方法进行分期。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (MACKLIN, 中国); 瑞氏吉姆萨染液 (Baso, 中国); AO 染液 (索莱宝, 中国); 邻联茴香胺 (Sigma, 美国); TRIzol 试剂 (ambion, 美国); 逆转录试剂盒 (诺唯赞, 中国)。

斑马鱼养殖系统 (上海海圣生物实验设备有限公司, 中国); YCP 系列三气培养箱 (长沙华曦电子科技有限公司, 中国); ZEISS Discovery.V8 体式荧光显微镜 (ZEISS, 德国); BX51 正置荧光显微镜 (Olympus, 日本); PikoReal™ 实时荧光定量 PCR 检测仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国); Tanon-3500 凝胶成像系统 (上海天能公司, 中国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 斑马鱼的繁殖和胚胎处理

斑马鱼是根据已有文献的标准条件饲养和繁殖<sup>[11]</sup>, 交配和胚胎培养方法由中国斑马鱼资源中心提供。12 hpf (hours post fertilization) 后收集高质量的胚胎进行实验。将胚胎分为低氧和常氧培养组, 低氧组的胚胎暴露于 5% O<sub>2</sub> 浓度下。每 12 h 收集 1 次斑马鱼胚胎, 鉴定胚胎的发育阶段。在不同发育时期, 从常氧和低氧组各随机选取 10 个胚胎, 用 ZEISS ZEN 软件计算卵黄囊的比例; 用 Image J 软件分析体表皮素沉着的比例; 在体视显微镜下观察并计算胚胎个体的心率。

#### 1.2.2 联苯胺染色和邻联茴香胺染色

联苯胺染色按照本实验室的方法进行<sup>[12]</sup>, 邻联茴香胺染色参照文献方法进行<sup>[13]</sup>。使用体式显微镜对各发育阶段的胚胎进行观察并拍照, 用 Image J 软件分析整个斑马鱼中染色部分的占比。图像至少是从 3 个独立的实验中获得, 每组至少有 6 个胚胎或幼鱼。

#### 1.2.3 瑞氏吉姆萨染色

对胚胎进行断尾处理收集血细胞, 制备血涂

片。斑马鱼预处理及瑞氏吉姆萨染色方法参照文献进行,并稍作改进<sup>[14-15]</sup>。使用 BX51 正置荧光显微镜观察并鉴定红细胞类型,并依据统计学方法计算红细胞在所有血细胞中的比例。

#### 1.2.4 AO 染色

随机收集 10 个胚胎/幼鱼移至包含 1 mL ddH<sub>2</sub>O 的 EP 管中,然后加入 30  $\mu$ L 10  $\mu$ g/mL 的 AO 染液,避光染色 1 h<sup>[16-17]</sup>。立即使用体式荧光显微镜观察并拍摄胚胎中的荧光。

#### 1.2.5 RNA 提取和 Real time PCR

每组随机取 50 个胚胎/幼鱼,溶于 TRIzol 试剂中提取总 RNA。使用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。使用特异性基因引物(见表 1)进行常规 RT-PCR 和 Real time PCR。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物名称及序列

Table 1 Primer names and sequences of Real time PCR

| 引物名称<br>Primer names | 引物序列(5'-3')<br>Primer sequences(5'-3') |
|----------------------|----------------------------------------|
| Z-Globin-F           | TTTCCGCAAAGGACAAAGCG                   |
| Z-Globin-R           | AGGAGAGTTGGGGCTTAGGT                   |
| Z-GATA1-F            | TTTACGGCCCTTCTCCACAC                   |
| Z-GATA1-R            | GGTGGCACCACAATTCCACAC                  |
| Z-l-plastin-F        | GATGTGGATGGGAACGGTCA                   |
| Z-l-plastin-R        | ATGAACCACTTGGCGAACT                    |
| Z-scl-F              | CGGGCTGACAACTAGCGTAT                   |
| Z-scl-R              | TACCTGATGAGGCGTGGTA                    |
| Z-c-myc-F            | TATGCTGCAAGTGACCGGAG                   |
| Z-c-myc-R            | GCTGGATGGAGTCGTAGTCG                   |
| Z-NFIL3-F            | TAGCCCGATGTCCTTCCAGA                   |
| Z-NFIL3-R            | TGGTGAGTCTGGACATTGCC                   |
| Z-GAPDH-F            | TCACATTAAGGGTGGTGCAA                   |
| Z-GAPDH-R            | GTGATGGCATGAACAGTGCT                   |

#### 1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 7 软件对实验数据进行分析。计量资料以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验比较两组样本的均值,多组间的样本采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 低氧延迟斑马鱼胚胎发育

依据前期实验结果,最终选定 5% O<sub>2</sub> 浓度作为低氧条件。将 12 hpf 的斑马鱼胚胎(图 1A)随机分为两组,分别在常氧和低氧下培养。24 hpf,咽囊期原基-5 期视网膜色素沉着和皮肤黑色素沉积较早,卵黄囊内出现红细胞,此时出现早期心脏搏动(图 1B);36 hpf,原基-25 期,绒毛膜中的斑马鱼胚胎出

现早期运动、尾部色素沉着和血液循环(图 1C);48 hpf,长胸鳍期,卵黄囊开始变薄,侧边带出现黑色素细胞,视网膜上的虹膜色素细胞丰富,头部出现黄色(图 1D);60 hpf,高胸鳍期,血液循环明显,视网膜虹膜色素细胞环加深(图 1E);72 hpf,孵化期的突口阶段,虹膜色素细胞覆盖眼睛,背部与头部相同颜色(图 1F);84 hpf,斑马鱼胚胎已经发育到幼鱼期(图 1G)。低氧下,胚胎在 24 hpf 时发育到卵裂期的 20-体节阶段,在胚胎背侧区域共观察到 20 个体节,相当于在常氧下 19 hpf 时的发育阶段(图 1H)。同样,低氧下,36、48、60、72、84 hpf 的胚胎发育阶段分别为原基-6 期、原基-25 期、高胸鳍期、长胸鳍期和胸鳍期,分别与常氧下的 25、36、42、48、60 hpf 一致(图 1I、1J、1K、1L、1M),即低氧在一定程度上延迟了斑马鱼胚胎的整体发育。

#### 2.2 低氧对于斑马鱼卵黄囊、色素沉着、胚胎孵化和心率的影响

在相同发育阶段,低氧组斑马鱼的卵黄囊体积明显大于常氧组(图 2A、2B);低氧组斑马鱼眼睛、头部、躯干和卵黄囊中的色素沉着明显低于常氧组(图 2A、2C);在相同的长胸鳍阶段,常氧组胚胎完成了孵化,低氧组胚胎仍然包裹在绒毛膜中(图 2A)。常氧组斑马鱼在 24 hpf 时胚胎开始出现早期的心脏搏动,而此时低氧组未发现心脏搏动。从 24 hpf 开始,无论是否低氧培养,胚胎早期心率随时间变化趋势一致,约 60 hpf 后心率趋于稳定,而在相同发育时间,低氧组斑马鱼胚胎心率明显低于常氧组(图 2D)。另外,相同发育阶段,低氧下的胚胎心率明显低于常氧(图 2E)。

#### 2.3 低氧减少斑马鱼早期胚胎发育红细胞的生成

邻联茴香胺染色结果显示,经低氧处理的斑马鱼胚胎的邻联茴香胺的着色面积显著降低,染色部位主要位于卵黄囊,而常氧组斑马鱼胚胎的染色部位则逐渐从卵黄囊转移到心脏和头部(图 3A-a, c, e, g)。联苯胺染色结果与邻联茴香胺染色基本一致,常氧下胚胎的主要染色部位逐渐从卵黄囊和大血管转移到心脏、大血管和节间血管,低氧下的染色部位逐渐从卵黄囊转移到心脏和血管,节间血管染色不明显(图 3B)。使用 Image J 软件对联苯胺染色结果进行分析,在同一发育阶段,低氧下胚胎的着色面积比例明显低于常氧(图 3C)。AO 染色结果显示,低氧下斑马鱼胚胎卵黄囊的前部和上部有大量的凋亡细胞(绿色荧光颗粒);但其会随着斑马

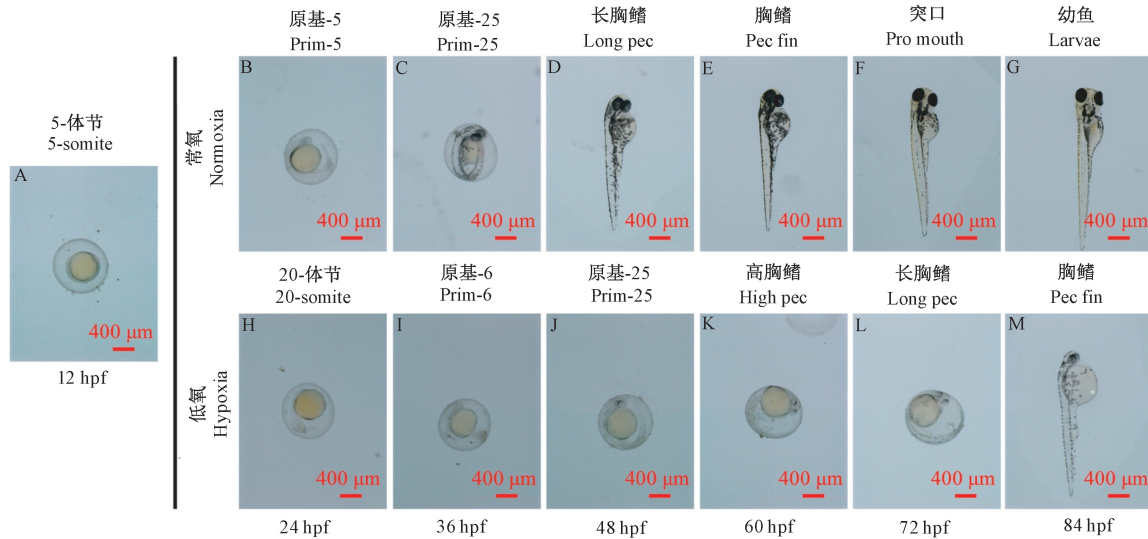
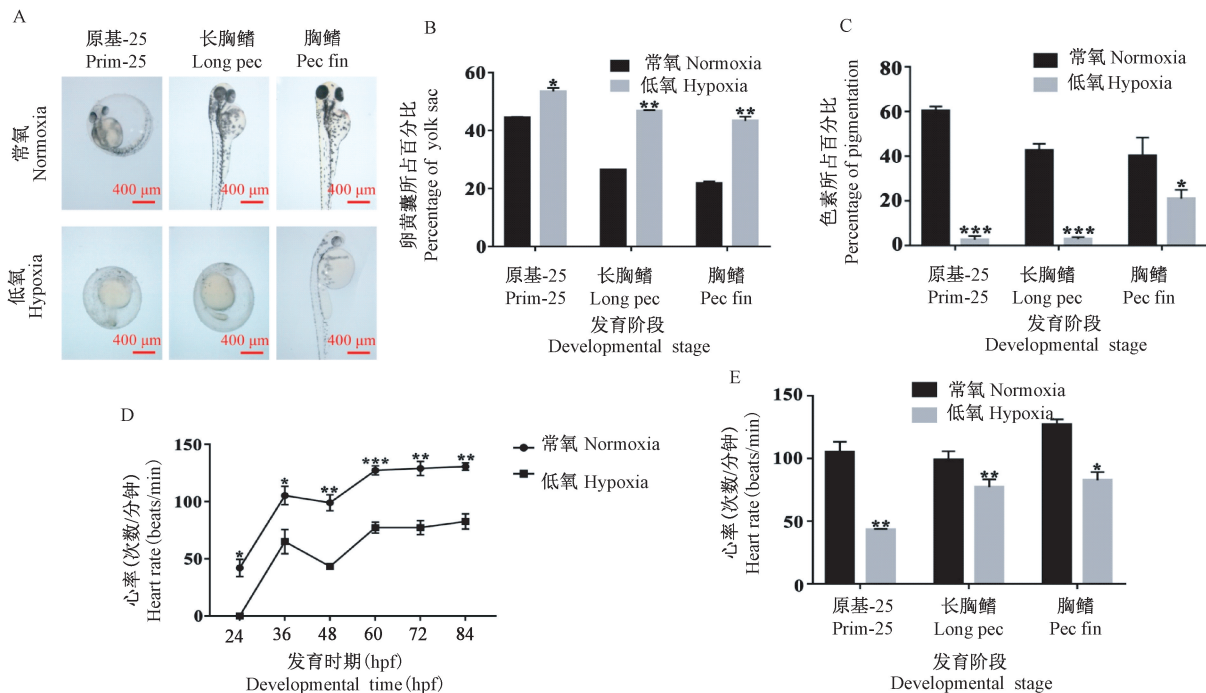


图 1 斑马鱼胚胎发育代表性图片(× 150)

Figure 1 Representative images of zebrafish embryonic development(× 150)



注:A:斑马鱼胚胎的代表性图片(× 150);B、C:斑马鱼卵黄囊体积占比和色素沉着占比;D:不同发育时间斑马鱼胚胎的心率变化;E:相同发育阶段下斑马鱼胚胎的心率的差异。与常氧相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。(下图同)

图 2 低氧对于斑马鱼胚胎卵黄囊、色素沉着和心率的影响

Note. A. Representative images of zebrafish embryos(× 150). B, C. The proportion of yolk sac volume and the proportion of pigmentation. D. The heart rate of zebrafish embryos under normoxic and hypoxic conditions at different developmental time. E. The heart rate of zebrafish embryos under normoxic and hypoxic conditions at the same developmental stage. Compared with normal oxygen, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (The same in the following figures)

Figure 2 Effects of hypoxia on yolk sac, pigmentation and heart rate of zebrafish embryos

鱼胚胎的发育逐渐减少(图 3A-b, d, f, h)。

## 2.4 低氧抑制红细胞成熟

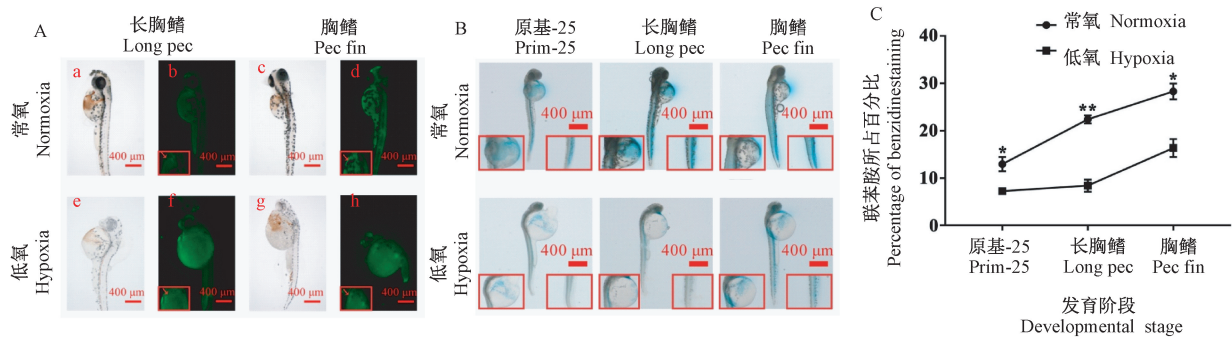
瑞氏吉姆萨染色结果显示,同一发育时期,低

氧下斑马鱼的总红细胞(包括幼稚红细胞和成熟红细胞)比例低于常氧(图 4A、4B)。图 4A 中,蓝色箭头处为未成熟红细胞,胞体呈圆形,胞质丰富,细胞

核呈圆形或类圆形,蓝色,多居中;红色箭头处为成熟的红细胞,胞体比未成熟红细胞小,呈椭圆形,胞质丰富,细胞核呈椭圆形,深紫色。低氧下 84 hpf 的斑马鱼血液中只有未成熟的红细胞存在。但是同一发育阶段下常氧和低氧相比较,红细胞总数的比例没有统计学意义(图 4C)。以往的研究表明,斑马鱼血液中的红细胞呈连续性年龄分布,成熟的红细胞血红蛋白含量较高<sup>[18]</sup>。这些结果表明低氧在一定程度上抑制了红细胞的成熟。

## 2.5 低氧对于斑马鱼胚胎发育过程中造血相关基因表达的影响

通过绘制斑马鱼胚胎发育早期的造血细胞分化发育图谱,我们选定了部分重要的造血相关基因进行表达检测。首先使用 RT-PCR 的方法观察了在正常培养过程中斑马鱼胚胎发育 6、12、24、48、72 hpf 时一些重要造血相关基因的表达情况(图 5A),在 24 hpf 之后,红系特异性造血因子 GATA1 和 Globin 随着发育时间的增加其表达强度逐渐增加;

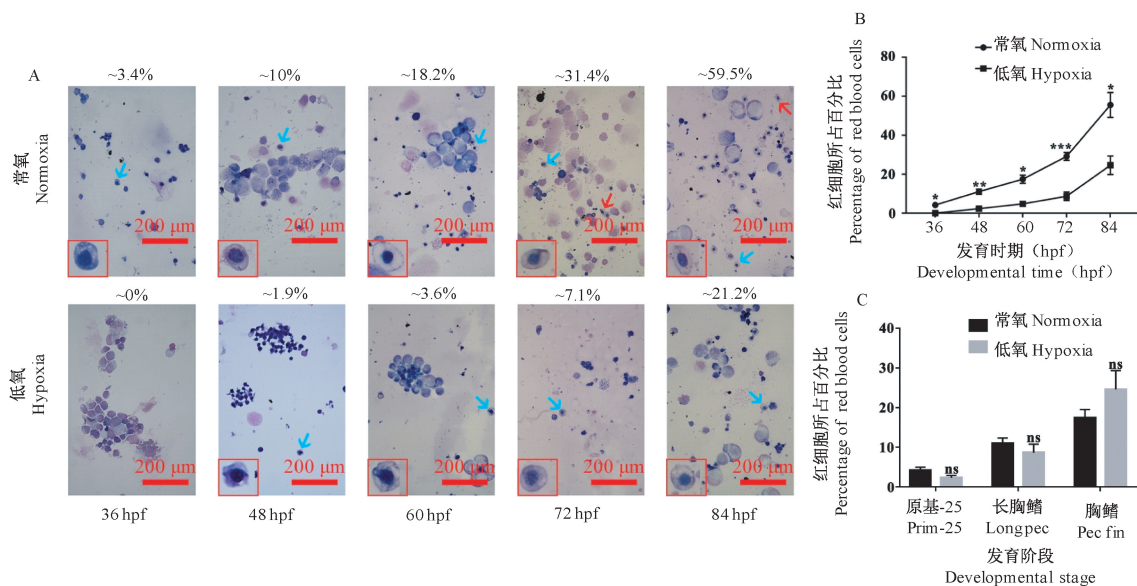


注:A:斑马鱼胚胎的邻联茴香胺染色图片和 AO 染色图片( $\times 150$ );B:斑马鱼胚胎的代表性联苯胺染色图片( $\times 100$ );C:联苯胺染色量化图。

图 3 低氧对斑马鱼胚胎血红蛋白的生成和细胞凋亡的影响

Note. A. O-dianisidine staining pictures and Acridine orange staining pictures of zebrafish embryos( $\times 150$ ). B. Representative benzidine staining of zebrafish embryos( $\times 100$ ). C. Quantitative line chart of Benzidine staining.

Figure 3 Effects of hypoxia on hemoglobin production and cell apoptosis of zebrafish embryos



注:A:斑马鱼胚胎血细胞的瑞氏吉姆萨染色( $\times 1000$ );B:不同发育时期斑马鱼胚胎中红细胞的比例;C:在相同的发育阶段,斑马鱼胚胎中红细胞的比例。

图 4 低氧抑制红细胞成熟

Note. A. May-Grunwald Giemsa staining of zebrafish embryonic blood cells( $\times 1000$ ). B. The proportion of red blood cells in blood of zebrafish embryos at different developmental time. C. At the same developmental stage, the proportion of red blood cells in blood of zebrafish embryos.

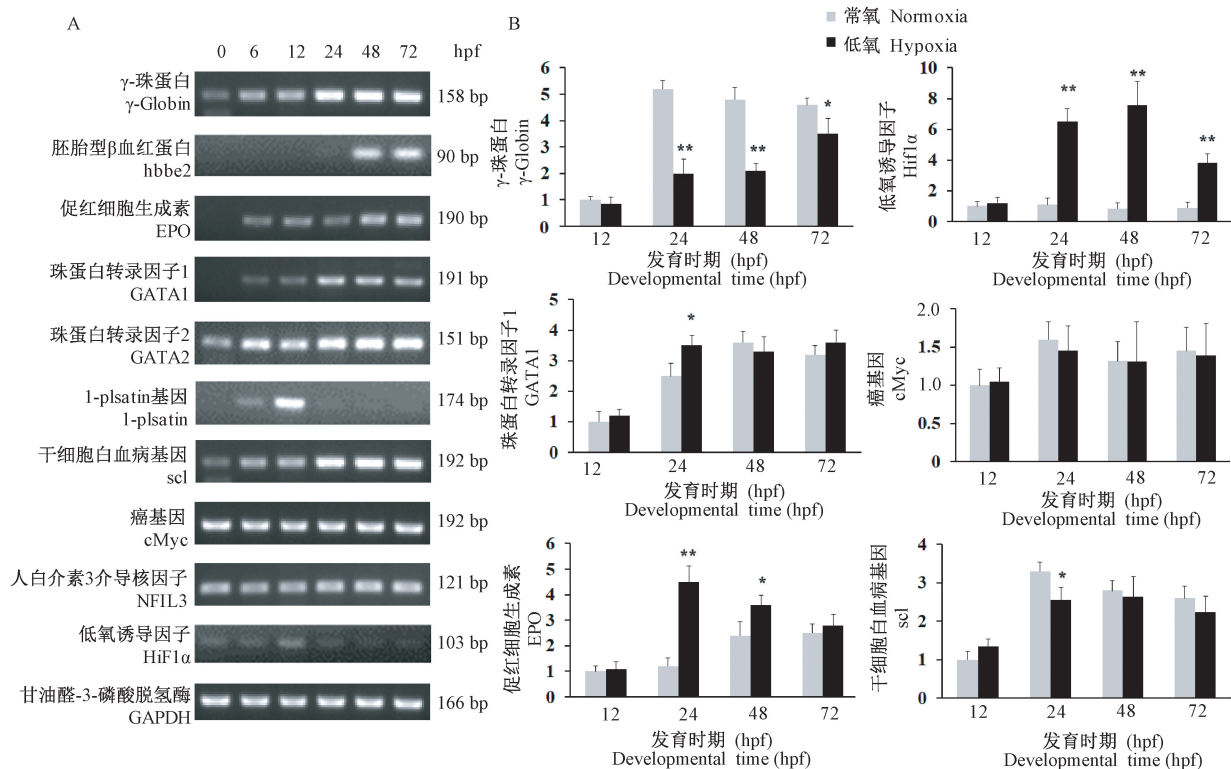
Figure 4 Hypoxia inhibits red blood cell maturity

同时其他的与造血相关的基因 *c-myc*、*scl*、*GATA2* 和 *NFIL3* 等在斑马鱼胚胎发育早期,也随着发育时间呈逐渐升高的趋势,而 *l-plastin* 在早期的表达更加明显。另外,Real time PCR 结果显示了常氧和低氧下一些红系相关基因的表达差异。*Globin* 在相同的发育时期低氧下的表达强度要明显低于常氧下的表达强度,与之相反 *Epo* 基因在低氧下则显示较高,同时其他相关造血基因在某些发育阶段也显示出低氧下表达强度低于常氧下(图 5B)。这些基因表达的变化情况证实并解释了先前观察到的低氧抑制斑马鱼胚胎早期红系分化的结果。

### 3 讨论

为了探讨低氧对斑马鱼胚胎发育和造血作用的影响,我们使用了不同的低氧浓度和低氧处理时间。前期的实验结果表明当受精后的胚胎直接暴露于 1%  $O_2$  浓度下超过 24 h,死亡率几乎是 100%。我们最终选定了 5%  $O_2$  浓度作为最适低氧浓度,而 12 hpf 作为最佳低氧处置时间。斑马鱼胚胎是一个

“封闭系统”,且发育早期不能合成血红蛋白来供应自身氧气的需求,只能通过外界氧气的被动扩散才能满足斑马鱼胚胎的正常生长发育,所以绒毛膜上的孔洞是氧气和营养物质从外部水环境运输到胚胎和清除废物所必需的<sup>[19]</sup>,通过独特的绒毛膜结构,未孵化的胚胎感受到低氧并影响其发育,本研究发现低氧延缓了斑马鱼的孵化时间。卵黄囊的主要作用是为斑马鱼早期发育提供所需的营养物质,使发育不受外界干扰<sup>[20]</sup>。但有研究发现抵抗动物缺氧的最重要的防御机制之一是能量消耗的下调<sup>[21]</sup>,本实验结果显示:低氧下斑马鱼胚胎卵黄囊的体积占比大于常氧,即实验证实低氧抑制卵黄囊的消耗。同时低氧减少了胚胎的体外色素沉着,这可能是由于低氧降低细胞色素 P450 的表达<sup>[22]</sup>,或者因为低氧影响了酪氨酸酶的活性从而延迟了胚胎色素细胞的发育<sup>[23]</sup>。总之,低氧从整体上抑制了斑马鱼胚胎的发育过程,而持续的低氧不利于胚胎发育和生物学进化,在某些情况下甚至可能导致严重的疾病或死亡。鱼类心脏对多种环境因素敏感,



注:A:RT-PCR 分析常氧条件下斑马鱼胚胎发育过程中的 mRNA 表达水平;B:Real time PCR 分析比较常氧和低氧条件下造血相关 mRNA 的表达差异。

图 5 低氧对于斑马鱼胚胎发育中基因表达的影响

Note. A. Some mRNA level was analyzed by RT-PCR during embryonic development of zebrafish. B. Real time PCR was employed to analyze the differential expression of hematopoietic related mRNA.

Figure 5 Effects of hypoxia on gene expression in embryonic development of zebrafish

其中之一就是低氧。在低氧状态下,由于外部氧气浓度较低,通过绒毛膜被动扩散进入斑马鱼胚胎的氧气含量无法满足斑马鱼胚胎心脏形成和发挥功能的需求,从而导致其出现持续性心动过缓,通过降低心率和能量消耗从而提高成活率<sup>[24]</sup>。与文献报道相一致,本研究发现低氧会导致斑马鱼心率发生复杂的变化,其确切的变化取决于发育阶段,并且在较小的程度上取决于饲养温度<sup>[25]</sup>。同时,以往文献显示,低氧导致斑马鱼胚胎出现一定程度的心包水肿,伴有卵黄囊水肿,胚胎血管系统发育不良,血液流速变缓<sup>[26-28]</sup>。我们的研究结果再一次证实了这一结果,心包水肿影响血液循环、心率,并很可能对血细胞生成有一定影响。

低氧不仅影响斑马鱼胚胎的形态和心脏功能,造血分化和红细胞生成也受到了影响。斑马鱼是研究胚胎红细胞生成的理想系统<sup>[29]</sup>。红细胞的产生在许多水平上受到调节,包括基因表达的控制,环境条件的改变。本研究结果显示胚胎发育早期低氧对红细胞产生和成熟具有抑制作用。这可能是由于在胚胎发育的早期,低氧下卵黄囊前部和上部的血供不足引起的细胞凋亡,但在发育后期斑马鱼胚胎出现低氧耐受,凋亡模式发生改变,细胞凋亡数量减少。为了揭示低氧对红细胞生成过程中基因表达可能存在的调控机制,我们检测了一些重要的造血相关基因。有研究表明斑马鱼胚胎发育后期,12 hpf 胚胎血红蛋白的表达水平开始增加,并在孵化前后达到高峰,且胚胎血红蛋白基因水平一直保持在高水平,直到成年<sup>[30]</sup>。本实验的初步结果表明,常氧下 12 hpf,红系特异性造血因子 Globin 开始表达,随着发育时间的增加其表达强度逐渐增加,这与已有的研究报道结果是一致的;但是低氧下 Globin 的表达水平降低,及 HIF1 $\alpha$  的表达水平升高,提示在斑马鱼胚胎发育早期,低氧确实影响基因表达,但其分子机制尚不清楚。据报道,低氧可以通过调节斑马鱼胚胎的 HIF 通路,影响斑马鱼胚胎造血干细胞的产生和造血末期红细胞的终末分化<sup>[31-33]</sup>。

综上所述,低氧延缓了斑马鱼胚胎的发育,抑制了红细胞的产生和成熟。我们的结果加深了人们对低氧诱导脊椎动物产生影响的认识,同时也提供了低氧对斑马鱼胚胎发育和红细胞生成的最新认识。由于斑马鱼相对于小鼠模型具有许多优势,斑马鱼疾病模型的进一步发展将加速我们对疾病

各种病理、生理过程的了解。随着斑马鱼疾病模型的可用性和日益增加的多样性,该动物系统将为疾病诊断,有效治疗和预后提供强大的基础。在高海拔地区,低氧与中风或癌症等疾病相关<sup>[34]</sup>。所以此项研究在一定程度上为探索临床上低氧性疾病提供了新的认识和见解,但低氧究竟如何影响斑马鱼的胚胎发育和造血分化,还有待进一步研究。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] 王小琦,孙岩,张洋,等. 斑马鱼模型在常见骨疾病研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(6): 86-91.  
Wang XQ, Sun Y, Zhang Y, et al. Application of zebrafish models in the research on bone diseases [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(6): 86-91.
- [2] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. Dev Dyn, 1995, 203(3): 253-310.
- [3] Gore AV, Pillay LM, Venero GM, et al. The zebrafish: A fantastic model for hematopoietic development and disease [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2018, 7(3): e312.
- [4] 王雪,韩利文,何秋霞,等. 斑马鱼模型在糖尿病研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 1-5.  
Wang X, Han LW, He QX, et al. Application of zebrafish models in research of diabetes [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(8): 1-5.
- [5] Woo K, Shih J, Fraser SE. Fate maps of the zebrafish embryo [J]. Curr Opin Genet Dev, 1995, 5(4): 439-443.
- [6] Brönnimann D, Annese T, Gorr TA, et al. Splitting of circulating red blood cells as an in vivo mechanism of erythrocyte maturation in developing zebrafish, chick and mouse embryos [J]. J Exp Biol, 2018, 221(15): 184564.
- [7] de Jong JL, Zon LI. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis [J]. Annu Rev Genet, 2005, 39: 481-501.
- [8] Fitzgerald JA, Jameson HM, Fowler VH, et al. Hypoxia suppressed copper toxicity during early development in zebrafish embryos in a process mediated by the activation of the HIF signaling pathway [J]. Environ Sci Technol, 2016, 50(8): 4502-4512.
- [9] Kwong RW, Kumai Y, Tzaneva V, et al. Inhibition of calcium uptake during hypoxia in developing zebrafish is mediated by hypoxia-inducible factor [J]. J Exp Biol, 2016, 219(24): 3988-3995.
- [10] Rasighaemi P, Basheer F, Liongue C, et al. Zebrafish as a model for leukemia and other hematopoietic disorders [J]. J Hematol Oncol, 2015, 8: 29.
- [11] Varga ZM, Ekker SC, Lawrence C. Workshop report: zebrafish and other fish models-description of extrinsic environmental factors for rigorous experiments and reproducible results [J]. Zebrafish, 2018, 15(6): 533-535.
- [12] Yu HC, Zhao HL, Wu ZK, et al. Eos Negatively regulates

- human  $\gamma$ -globin gene transcription during erythroid differentiation [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22907.
- [13] Liu C, Han T, Stachura DL, et al. Lipoprotein lipase regulates hematopoietic stem progenitor cell maintenance through DHA supply [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1310.
- [14] Ghersi JJ, Mahony CB, Bertrand JY. *bif1*, a new BMP signaling inhibitor, regulates embryonic hematopoiesis in the zebrafish [J]. Development, 2019, 146(6): 164103.
- [15] Bertrand JY, Kim AD, Violette EP, et al. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo [J]. Development, 2007, 134(23): 4147–4156.
- [16] 杨菲, 华永庆, 林紫薇, 等. 斑马鱼眼部细胞凋亡模型的建立 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(9): 1320–1325.
- Yang F, Hua YQ, Lin ZW, et al. Establishment of apoptotic model of zebrafish eye [J]. Pharmacol Bulletin, 2019, 35(9): 1320–1325.
- [17] 李梦婷, 张慧琼, 文瑞琪, 等. 基于斑马鱼研究附子脂溶性总生物碱的神经毒性 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(6): 63–66.
- Li MT, Zhang HQ, Wen RQ, et al. Study on the Neurotoxicity of fat-soluble alkaloids from radix aconiti lateralis based on zebrafish [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(6): 63–66.
- [18] Nikinmaa M. Environmental regulation of the function of circulating erythrocytes via changes in age distribution in teleost fish; Possible mechanisms and significance [J]. Mar Genomics, 2020, 49: 100717.
- [19] Zhang Q, Kopp M, Babiak I, et al. Low incubation temperature during early development negatively affects survival and related innate immune processes in zebrafish larvae exposed to lipopolysaccharide [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 4142.
- [20] Fraher D, Sanigorski A, Mellett NA, et al. Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the Yolk cell is metabolically active in processing lipid [J]. Cell Rep, 2016, 14(6): 1317–1329.
- [21] Ton C, Stamatiou D, Liew CC. Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development [J]. Physiol Genomics, 2003, 13(2): 97–106.
- [22] Shang EH, Wu RSS. Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development [J]. Environ Sci Technol, 2004, 38(18): 4763–4767.
- [23] Cheng J, Flahaut E, Cheng SH. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Environ Toxicol Chem, 2007, 26(4): 708–716.
- [24] Steele SL, Lo KH, Li VW, et al. Loss of M2 muscarinic receptor function inhibits development of hypoxic bradycardia and alters cardiac  $\beta$ -adrenergic sensitivity in larval zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 297(2): R412–R420.
- [25] Barrionuevo WR, Burggren WW.  $O_2$  consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient  $O_2$  [J]. Am J Physiol, 1999, 276(2): 505–513.
- [26] Damalas DE, Bletsou AA, Agalou A, et al. Assessment of the acute toxicity, uptake and biotransformation potential of benzotriazoles in zebrafish (*Danio rerio*) larvae combining HILIC- with RPLC-HRMS for high-throughput identification [J]. Environ Sci Technol, 2018, 52(10): 6023–6031.
- [27] Antkiewicz DS, Geoffrey BC, Carney SA, et al. Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish [J]. Toxicol Sci, 2005, 84(2): 368–377.
- [28] Wu BJ, Chiu CC, Chen CL, et al. Nuclear receptor subfamily 2 group F member 1a (*nr2f1a*) is required for vascular development in zebrafish [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105939.
- [29] Brownlie A, Hersey C, Oates AC, et al. Characterization of embryonic globin genes of the zebrafish [J]. Dev Biol, 2003, 255(1): 48–61.
- [30] Tiedke J, Gerlach F, Mitz SA, et al. Ontogeny of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. J Comp Physiol B, 2011, 181(8): 1011–1021.
- [31] Zhang Y, Jin H, Li L, et al. cMyb regulates hematopoietic stem/progenitor cell mobilization during zebrafish hematopoiesis [J]. Blood, 2011, 118(15): 4093–4101.
- [32] Wang Y, Liu X, Xie B, et al. The NOTCH1-dependent HIF1 $\alpha$ /VGLL4/IRF2BP2 oxygen sensing pathway triggers erythropoiesis terminal differentiation [J]. Redox Biol, 2020, 28: 101313.
- [33] Pelster B, Egg M. Hypoxia-inducible transcription factors in fish: expression, function and interconnection with the circadian clock [J]. J Exp Biol, 2018, 221(13): jeb 163709.
- [34] Ward AC, McPhee DO, Condrum MM, et al. The zebrafish *spi1* promoter drives myeloid-specific expression in stable transgenic fish [J]. Blood, 2003, 102(9): 3238–3240.

[收稿日期] 2020-05-27