

硫代硫酸钠干扰斑马鱼胚胎发育并致畸

胡 玮^{1), 2)}, 程露阳¹⁾, 宋韞韬³⁾, 夏鸿飞²⁾, 孙大光^{1), 2)}, 李 鹏²⁾,
李 丹^{1), 2)}, 陆彩玲²⁾, 马 旭^{1), 2)}*

(¹⁾北京协和医学院研究生院, 北京 100005; ²⁾国家人口计生委科学技术研究所遗传研究室, 北京 100081;

³⁾北京大学第一医院, 北京 100034)

摘要 硫的衍生物潜在的威胁着胚胎的发育过程. 斑马鱼被用于研究不同浓度($1 \times 10^{-6} \sim 1$ mol/L)的硫代硫酸钠(sodium thiosulfate, STS)对胚胎发育的影响, 在解剖显微镜下实时观察斑马鱼胚胎发育的全过程. 采用 Western 印迹法检测乙酰化的微管蛋白——微管蛋白(acetylated tubulin, α -tubulin)和神经元增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达, 分别检测 STS 暴露后胚胎的运动神经元功能, 神经元的增殖状态. 发育中的斑马鱼胚胎暴露于 0.1~1 mol/L STS, 呈现出严重的发育迟缓, 并且伴随多脏器畸形; 暴露于 10 μ mol/L~10 mmol/L STS, 胚胎呈现循环系统、神经系统以及颌面部畸形. 胚胎在 48 hpf (hours post fertilization) 时, 对 STS 的暴露敏感高于 24 hpf 和 96 hpf. STS 可能干扰细胞的增殖及运动神经元的正常分化. STS 可能干扰正常的细胞骨架结构, 并在胚胎发育晚期影响细胞增殖, 对胚胎神经系统、循环系统及颌面部有致畸作用.

关键词 硫代硫酸钠; 斑马鱼; 畸形; 微管蛋白; 细胞增殖

中图分类号 Q132; R99

Induction of Zebrafish Malformation by Sodium Thiosulfate During Embryogenesis

HU Wei^{1), 2)}, CHENG Lu-Yang¹⁾, SONG Yun-Tao³⁾, XIA Hong-Fei²⁾, SUN Da-Guang^{1), 2)},
LI Peng²⁾, LI Dan^{1), 2)}, LU Cai-Ling²⁾, MA Xu^{1), 2)}*

(¹⁾ Graduate School, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China; ²⁾ Department of Genetics, National

Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China; ³⁾ Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract Sulfuric derivatives are potentially hazardous to embryogenesis. The toxic effect of sodium thiosulfate (STS) ($1 \times 10^{-6} \sim 1$ mol/L) on zebrafish embryo development were studied using real-time *in vivo* imaging. The motor neuron proliferation and differentiation were analyzed by the formation dynamics of acetylated tubulin (α -tubulin) or nuclear antigens (PCNA) in proliferating cell. The development of embryos exposed to 0.1~1 mol/L STS was severely retarded. The exposure to 10 μ mol/L~10 mmol/L STS resulted in malformations in multiple organs; like the circulatory, nervous and maxillofacial systems. The embryos appeared to be more sensitive to STS at 48 hours post fertilization (hpf) than at 24 or 96 hpf. We conclude that STS may interfere with the normal cytoskeleton, disturbs cell proliferation and leads to nervous, cardiac and maxillofacial malformations.

Key words sodium thiosulfate; zebrafish; malformation; tubulin; cell proliferation

收稿日期: 2009-04-04; 接受日期: 2009-06-12

国家重大基础 Research 资助项目 (No. 2007CB511905)

*联系人 Tel: 010-62179059; E-mail: huweibeiyi@163.com; genetic@263.net.cn

Received: April 4, 2009; Accepted: June 12, 2009

Supported by National Basic Research Program of China (No. 2007CB511905)

* Corresponding author Tel: 010-62179059; E-mail: huweibeiyi@163.com; genetic@263.net.cn

硫的衍生物主要包括二氧化硫(SO_2)、硫化氢、氟化硫、亚硫酸盐和硫代硫酸盐等。二氧化硫是大气中常见的污染物,吸入 SO_2 可导致未成年小鼠和兔骨骼变型率增高。国外流行病学调查显示,吸入 SO_2 可导致人低体重新生儿增多^[1,2]。还有实验证明,二氧化硫衍生物是一种潜在的神经毒物,具有引起哺乳动物海马神经元细胞 DNA 突变的潜在危险^[3]。当给予母体高剂量的亚硫酸氢钠(3.3 g/kg)时,大鼠胚胎出现肾盂及侧脑室膨胀,而降低剂量可以降低母体的体重^[4,5]。这些结果显示,一些硫的衍生物对胚胎的发育有毒性作用。硫的衍生物对人类健康,尤其是对胚胎发育可能有潜在的危害。

硫代硫酸钠(sodium thiosulfate, STS)是广泛应用于食品加工业、造纸业、感光工业、染料制造和医药工业的一种硫的衍生物。以前的研究表明,STS 能够对大鼠神经干细胞产生损伤,并且可用于恢复神经干细胞的缺氧模型^[6]。STS 在大鼠实验性胰腺炎中以微变态为标志,可诱导再生性肥大的发展,但它同时也抑制了炎症向慢性转化^[7]。一些报道指出,静脉注射 STS 治疗水肿,可使个别病人产生过敏反应^[8~12]。这些报道也暗示了 STS 有毒害性。

目前,STS 对胚胎发育的暴露影响还不清楚。本研究采用斑马鱼作为实验动物模型,研究 STS 对胚胎发育的影响,可能为我国孕妇含硫化合物发育暴露危险度评价工作的开展,降低因含硫化合物暴露导致的生育风险提供参考。

1 材料和方法

1.1 斑马鱼的饲养与胚胎的选择

斑马鱼(AB 系,北京大学生命科学院遗传发育中心斑马鱼实验室)喂养方案根据 Westerfield^[13]的方法进行。用自动定时器控制光照时间(照明 14 h 黑暗 10 h 交替),雌雄两组分别饲育。定时喂以咸水丰年虫(Artemien, Salina),2 次/d,胚胎来自于水产养殖设备^[13]中成对的成熟斑马鱼自然交配,用细管吸取清晨 6~8 h 时产的卵。收集的鱼卵培养于 28.5 的培养液(5 g 速溶海盐溶于 25 L 蒸馏水, pH 7.4)中,根据形态特征区分发育阶段。

1.2 储备溶液的配制及暴露方法

胚胎孵育至 4 hpf,根据形态特征选取囊胚期胚胎。将胚胎分组暴露于 1 、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 和 1×10^{-6} mol/L STS 溶液中,每组溶液体积 50 ml,每个处理时期设 1 个对照组。每批胚胎约 200 枚,分别孵育至 24、48 和 96 hpf

(hours post fertilization),随后,将一半的胚胎转移至各浓度 STS 溶液,剩下一半用培养液培养,作为对照。处理后用培养液冲洗 3 次,培养至观察期。胚胎发育至 24 hpf 时,给予 0.003 % 苯硫脲(Sigma-Aldrich 公司)处理,防止黑色素生成。

1.3 形态学观察和统计

胚胎于 12 hpf 手工去膜。在 Zeiss 体式显微镜下观察斑马鱼胚胎 24~96 hpf 心血管系统和神经系统发育的全过程,并进行活体成像。采用 Zhang 等^[14]改良评分系统,分别在 48 hpf 和 96 hpf 时,对 1×10^{-3} mol/L STS 溶液暴露组进行评分,每组观察对象为 5 个斑马鱼胚胎。多参数评定各浓度的发育畸形指数(developmental malformation index, DMI),总阳性计数与总体参数的比值为该浓度下 DMI。

1.4 Western 印迹分析

选取 1 mol/L STS 处理组和正常对照组胚胎孵育至 24、48 和 96 hpf (24 hpf 和 48 hpf 胚胎需手工去膜),每组取 50 枚胚胎加入 200 μ l 裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4 % CHAPS, 6.5×10^{-2} mol/L DTT),迅速加入一定比例的蛋白酶抑制剂,冰上放置 1 h,离心 15 000 r/min,4,40 min,取上清。Bradford 法测蛋白含量,将所检测各样品中蛋白总量调为一致,同时各样品上样量均为 20 μ l。经 SDS-PAGE 分离的蛋白电转移至 PVDF(Millipore)上,电转条件恒电流 200 mA,2 h。转移膜用含 5 % 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液(5×10^{-2} mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1.5×10^{-1} mol/L NaCl)室温封闭 1 h,加入一抗(鼠单克隆抗 α -微管蛋白抗体,鼠单克隆抗 PCNA 抗体, Sigma-Aldrich 公司)4 孵育过夜。再用 TBS-T(TBS 含 0.5 % Tween-20)洗膜 3 次,加入二抗(碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG 抗体,中杉金桥,产品编号 ZB-2310)孵育 1 h,洗膜 5 次后,在暗室中曝光,显影,观察结果。

1.5 统计学分析

实验数据采用图像分析软件 Quantity-one 进行光密度积分值分析。用 SPSS13.0 统计分析软件对样本的平均光密度采用方差齐性检验和组间 t 检验统计学分析,检验水准为 0.05,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硫代硫酸钠暴露可致早期胚胎发育畸形

研究发现,早期胚胎暴露产生的畸形与 STS 有剂量依赖效应,并与胚胎所处时期有关。 $1 \times 10^{-1} \sim$

1 mol/L STS 暴露处理的胚胎有严重的发育迟滞、多器官发育畸形、血流缓慢和局限性出血。1 $\times 10^{-6}$ mol/L \sim 1 $\times 10^{-2}$ mol/L STS 暴露处理表现出心血管系统和神经系统发育畸形,主要表现为颌面部畸形、心包扩张、血流减慢、脑室膨胀等。在胚胎暴露处理至 24 hpf 时,观察头部较对照组 (Fig. 1A, G) 小且分化不清,心包略有膨大 (见 Fig. 1 B, H, I),而与 48 hpf (Fig. 1 C, J) 和 96 hpf (Fig. 1 E, L) 对照组相比暴露处理的胚胎出现心包水肿、视顶盖凹陷和颌面部发育不良等畸形。说明硫代硫酸钠对斑马鱼胚胎发育影

响的敏感期为早期 (24 hpf) 即有轻微影响,而晚期 (48 hpf) 较为显著。各浓度计量的 STS 暴露后的胚胎,48 hpf 的死亡率和畸形率均高于 24 hpf (数据未显示)。1 $\times 10^{-3}$ mol/L STS 暴露处理的发育畸形指数 DMI 48 hpf 为 25/(11 \times 5) = 45.45 %,在 96 hpf 为 20/(10 \times 5) = 40 % (数据未显示),作用靶位点相对集中在神经系统、心脏及颌面部。STS 暴露处理主要干扰神经发育,预示着 STS 暴露处理斑马鱼神经管发育机制还需要进行深入地研究。

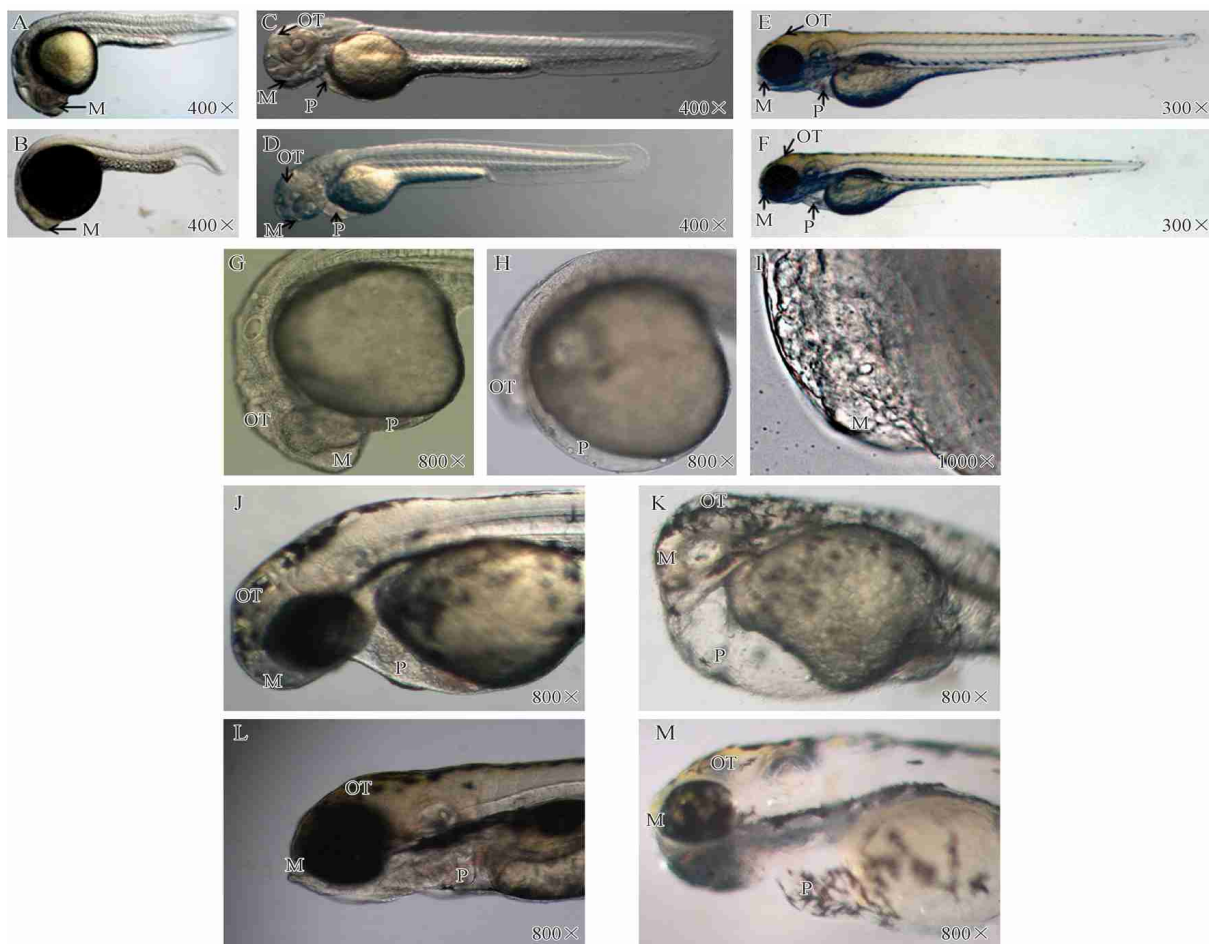


Fig. 1 Effects of STS exposure on early embryo development

The entire processes of cardiovascular system and nervous system development were observed in zebrafish embryos, incubated from 24 to 96 hpf, using *in vivo* live imaging. Comparing with controls (A, G), embryos exposed into STS at 24 hpf (B, H, I) show abnormal differentiation of head and pericardial expansion, while embryos exposed at 48 hpf (D, K) and at 96 hpf (F, M) presented with marked pericardial expansion, optic tectum and maxillofacial malformation. In untreated controls, zebrafish embryos underwent normal development at 48 hpf (C, J) and 96 hpf (E, L). OT: optic tectum; P: pericardium; M: maxillary surface

2.2 硫代硫酸钠阻碍运动神经元的发育

本研究对轴突定位的标志物 α -微管蛋白 (acetylated tubulin, α -tubulin)^[15] 进行检测。蛋白印迹

结果显示:在分子量约 40 kD 处有 1 条特异性的 α -微管蛋白表达条带 (见 Fig. 2 A)。用灰度表示蛋白条带中蛋白表达的量。在保证各组蛋白总量一致的前提

下, 24 hpf 对照组与实验组蛋白表达量灰度值经统计学分析后, 无明显差异 ($P > 0.05$), 表明 α -微管蛋白表达量无明显改变. 48 和 96 hpf 实验组与对照组相比, 有显著差异, α -微管蛋白表达量明显减少 ($P < 0.01$) (Fig. 2 B). 结果表明, 在胚胎发育晚期, 经 STS 暴露处理的胚胎运动神经元的发育受到了阻碍.

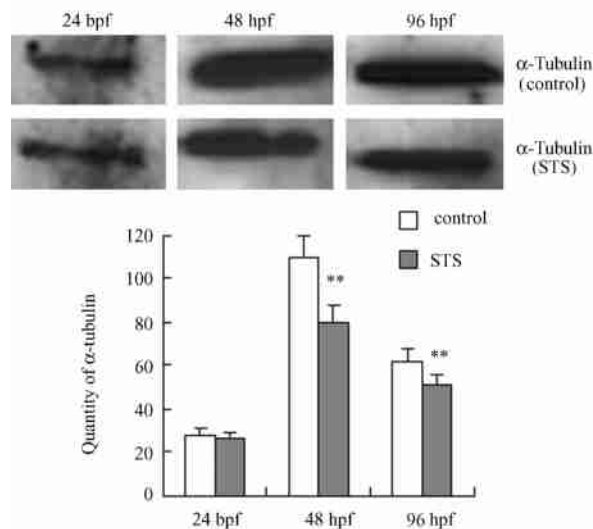


Fig. 2 Western blot analysis of α -tubulin in the zebrafish embryos Zebrafish embryos were collected, stripped and lysed by lysis buffer. Proteins of tissue lyses were purified and separated by 10 % SDS-PAGE. After electrophoresis, protein samples from gel were transferred to PVDF membrane. The PVDF membranes were treated with antibodies. The results showed that expressions of α -tubulin in embryos treated with STS were lower than that in control, especially in 48 hpf and 96 hpf. ** $P < 0.01$. T-text

2.3 STS 干扰胚胎发育晚期的细胞增殖

本研究对反映细胞增殖的标志物增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 进行检测. 蛋白印迹结果显示: 在分子量约 36 kD 处有一条特异性的 PCNA 蛋白表达条带 (Fig. 3A). 24 hpf 对照组与实验组 PCNA 蛋白表达量灰度值经分析后, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 蛋白表达无明显改变. 48 hpf 对照组与实验组蛋白表达量灰度值经分析后, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 实验组与对照组相比, PCNA 蛋白表达明显增加. 96 hpf 实验组与对照组相比, PCNA 蛋白表达明显减少 (Fig. 3B) ($P < 0.05$). 上述改变提示, STS 在胚胎发育早期对细胞增殖无明显促进或抑制作用; 而在发育至 48 hpf 时, STS 刺激胚胎细胞大量增殖; 当部分器官发育成熟后, STS 的暴露抑制了晚期开始发育的器官组织的细胞增殖.

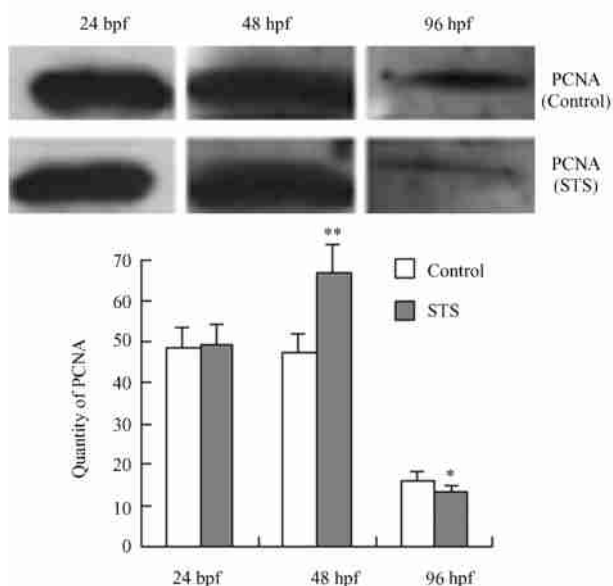


Fig. 3 Western blot analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the zebrafish embryos Zebrafish embryos were collected, stripped and lysed by lysis buffer. Proteins of cell lyses were purified and separated by 10 % SDS-PAGE. After electrophoresis, protein samples from gel were transferred to PVDF membrane. The PVDF membranes were treated with antibodies. The results showed that expressions of PCNA in embryos treated with STS were no difference to that in control in 24 hpf, and higher in 48 hpf, but lower in 96 hpf. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. T-text

3 讨论

本研究以斑马鱼 (zebrafish, 学名 *Danio rerio*) 作为模式动物, 有以下优点: (1) 斑马鱼可高密度饲养, 产卵量大, 毒性试验时只需微量的化学物质加到水体中, 经济方便, 这对环境中含量极微的环境激素化合物的研究比采用哺乳动物更显出其优越性; (2) 胚胎体外受精, 可以在母体外对胚胎进行独立操作, 胚胎透明, 比小鼠胚胎更容易观察; (3) 胚胎在宫外同步快速发育, 各发育阶段有其明显的特征, 可直接观察其组织和器官发育的全过程, 并可准确地各特定阶段进行处理或收集同期胚胎材料; (4) 斑马鱼是脊椎动物, 比果蝇和线虫更接近人类, 是研究胚胎神经系统发育畸形的重要模式动物. 目前已有研究证明, 斑马鱼中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 与哺乳动物的神经系统有许多相似之处, 斑马鱼胚胎脑部神经元坏死和凋亡可以作为检测神经毒性的指标, 尾部运动神经元的凋亡常和运动缺陷有关, α -微管蛋白可以观察运动神经元的改变, PCNA

特异反应大脑神经元增殖的状况^[16]。

STS 暴露处理主要干扰神经发育,预示着 STS 暴露处理斑马鱼神经管发育机制还需要进行深入研究。为进一步研究 STS 作用下斑马鱼神经系统的发育状况,除采用显微活体成像技术进行胚胎发育的观察外,本实验利用了神经系统发育阶段的一些关键的分子标志,进行了蛋白印迹分析,以检测 STS 暴露后斑马鱼胚胎运动神经元功能以及神经元的增殖状态。

-微管蛋白是细胞骨架蛋白之一,在运动神经元的功能维持中起关键作用,与神经轴突相互作用,可用作轴突定位的标志,对微管蛋白聚集或微管解聚的抑制将导致细胞有丝分裂中止^[17],并受甲状腺激素的特异调节。在脑发育的关键期,甲状腺激素减少可延迟微管蛋白基因发育,导致微管组装和稳定性改变^[18]。Hu 等^[19]前期研究结果显示,在 STS 作用下,在斑马鱼胚胎发育过程中,-微管蛋白主要表达在端脑、间脑、小脑、尾部脊髓和外周神经中,与正常胚胎相比表达明显减少,并且躯干部的运动神经元的形态呈现薄而短小。本研究结果与其相一致,在胚胎发育晚期,STS 暴露导致 -微管蛋白表达水平显著低于对照组,说明 STS 的暴露影响了细胞质骨架系统中的微管结构,并且可能影响正常的细胞周期,从而影响神经元的增殖与分化,进而影响了神经轴突的生长或形成,最终影响到运动神经元的功能。这可能是由于胚胎发育时期,STS 暴露使甲状腺激素减少从而延迟 -微管蛋白基因发育使 -微管蛋白基因的表达水平降低^[18],或药物直接与 -微管蛋白结合,有效地阻碍了 -, -微管蛋白二聚体的形成^[20],使微管的延长受阻,进而影响了纺锤体的形成,导致细胞有丝分裂受抑制,延缓神经元的正常分化。 -微管蛋白表达水平降低可能与 miRNA-124 在转录后翻译水平上的微调控抑制有关^[19]。另有报道指出,STS 能够辅助增强抗肿瘤药的疗效,这可能与其阻碍微管的延长、导致细胞有丝分裂受抑制有关。

PCNA 又名周期素,1978 年 Miyachi 等^[21]首先在 1 例系统性红斑狼疮患者的血清中发现并命名。它是增殖期细胞特异性表达的核蛋白,是检测细胞增殖状态有效的标志之一^[22]。在发育早期,所有的细胞都表现为 PCNA 阳性,但随着形态发生和分化的进程,PCNA 的表达逐渐减少,仅有一些晚期才开始发育的器官组织有 PCNA 的表达,如胸鳍、咽腭弓等^[23]。在斑马鱼胚胎的发育过程中,24 hpf 和 48 hpf 集中表达在端脑、小脑、肌节和尾部神经中,96 hpf

则在视顶盖、小脑、胸鳍和腮弓处表达^[19]。本研究结果提示,胚胎早期发育器官的细胞增殖对 STS 暴露不敏感,而晚期发育器官的细胞增殖对 STS 暴露敏感。在胚胎发育晚期,STS 可能通过刺激细胞异常增殖而引起胚胎部分器官发育畸形。当部分器官发育成熟后,STS 暴露可能通过阻碍这些器官中的微管延长,进而影响了纺锤体的形成,使大部分细胞处于静止状态,使细胞有丝分裂受到抑制,而少数处于增殖状态的细胞可能受到细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子对细胞周期的负调控作用而使细胞增殖受到抑制,如 P21^{cip1} 与 DNA 聚合酶 竞争结合 DNA 聚合酶的辅助因子 PCNA,直接抑制 DNA 的合成^[24]。PCNA 蛋白表达的改变预示了,STS 在胚胎发育早期和晚期对细胞增殖的作用机制不同,还有待进一步研究。

总之,STS 的暴露对斑马鱼胚胎的神经系统、循环系统及颌面部的发育可产生影响,-微管蛋白的表达水平降低和 PCNA 表达水平的改变可能影响细胞骨架的正常结构及细胞的增殖,说明 STS 具有遗传毒性和致突变的潜在危险。关于 STS 对胚胎发育的影响还有待于进一步探讨。

致谢 本研究 AB 品系斑马鱼胚胎由北京大学生命科学学院遗传发育中心张博教授赠送,且得到国家人口计生委科学技术研究所生殖免疫研究室于和鸣研究员的热情帮助,在此表示衷心感谢。

参考文献 (References)

- [1] Murray F J, Schwetz B A, Crawford A A, *et al.* Embryotoxicity of inhaled sulfur dioxide and carbon monoxide in mice and rabbits[J]. *J Environ Sci Health C*, 1979, **13** (3): 233-250
- [2] Mborovic L. First two months of pregnancy——critical time for preterm delivery and low birthweight caused by adverse effects of coal combustion toxics [J]. *Early Hum Dev*, 2004, **80** (2): 115-123
- [3] 孟紫强,白巨利. 二氧化硫体内衍生物对小鼠海马神经元 DNA 的损伤作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Meng Zi-Qiang, Bai Ju-Li. DNA damage of hippocampus neurons in mice by sulfur dioxide derivatives [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2003, **19** (6): 791-794
- [4] Itami T, Ema M, Kawasaki H, *et al.* Evaluation of teratogenic potential of sodium sulfite in rats[J]. *Drug Chem Toxicol*, 1989, **12** (2): 123-135
- [5] Nair B, Elmore A R, Cosmetic Ingredients Review Expert Panel. Final report on the safety assessment of sodium sulfite, potassium sulfite, ammonium sulfite, sodium bisulfite, ammonium bisulfite, sodium metabisulfite and potassium metabisulfite [J]. *Int J Toxicol*, 2003, **22** (Supple 2): 63-88
- [6] 武冰峰,杨娟,谢红,等. 党参多糖对神经干细胞硫代硫酸钠损

- 伤的保护作用[J]. 时珍国医国药 (Wu Bing-Feng, Yang Juan, Xie Hong, *et al.* Protective effect of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* on neural stem cell injury induced by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [J]. Li Shizhen Med Mater Medica Res), 2008, **19**(2):280-281
- [7] Kanaian A S, Simavorian P S. Effect of sodium thiosulfate on the pancreas in experimental pancreatitis[J]. Biull Eksp Biol Med, 1978, **86**(11):548-552
- [8] Matkova K P, Smaga O A. Anaphylactic shock developing after the intravenous administration of sodium thiosulfate [J]. Vrach Delo, 1991, **11**:115-116
- [9] 邱健, 许艳平. 硫代硫酸钠静脉注射致休克 1 例[J]. 福建医药杂志 (Qiu Jian, Xu Yan-Ping. A case of intravenous injection STS induced shock[J]. J Fujian Med), 1994, **16**(4):127
- [10] 刘伟, 李仁宏, 孙运才. 硫代硫酸钠致急性剥脱性皮炎 1 例[J]. 皮肤病与性病 (Liu Wei, Li Ren-Hong, Sun Yur-Cai. A case of STS led to acute exfoliative dermatitis [J]. J Dermatol Venereol), 2006, **28**(4):53-54
- [11] 单宗英. 静注硫代硫酸钠致过敏反应二例[J]. 温州医学院学报 (Shan Zong-Ying. Two cases of intravenous injection STS induced anaphylaxis[J]. J Wenzhou Med Coll), 2001, **31**(5):298
- [12] 程毅华, 胡树民. 静注硫代硫酸钠引起重症过敏反应 1 例[J]. 药物流行病学杂志 (Cheng Yi-Hua, Hu Shu-Min. A case of STS led to severe allergic reaction[J]. Chin J Pharmacoevidemiol), 1996, **5**(2):118
- [13] Westerfield M. The Zebrafish Book: General Methods for Zebrafish Care [M]. Eugene: The University of Oregon Press, 2000:8-42
- [14] Zhang C, Fremgen T, Willett C. Zebrafish: An Animal Model for Toxicological Studies[M]. In: Current Protocols in Toxicology, New York: John Wiley, 2003:1-18
- [15] Wilson S W, Brand M, Eisen J S. Patterning the zebrafish central nervous system[J]. Results Probl Cell Differ, 2002, **40**:181-215
- [16] Ton C, Lin Ying-Xin, Willett C. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing[J]. Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol, 2006, **76**(7):553-567
- [17] 杨君, 邵刚, 姚新生. 微管蛋白活性抑制剂研究进展[J]. 沈阳药科大学学报 (Yang Jun, Shao Gang, Yao Xin-Sheng. Tubulin inhibitors research in progress[J]. J Shenyang Pharm Univ), 1998, **15**(3):157, 217-223
- [18] Biesiada E, Adams P M, Shanklin D R, *et al.* Biology of the congenitally hypothyroid hyt/hyt mouse [J]. Adv Neuroimmunol, 1996, **6**(4):309-346
- [19] Hu Wei, Cheng Lur-Yang, Xia Hong-Fei, *et al.* Teratogenic effects of sodium thiosulfate on developing zebrafish embryos[J]. Front Biosci, 2009, **14**:3680-3687
- [20] 徐忠东, 吴琴. 微管蛋白的研究进展[J]. 安徽教育学院学报 (Xu Zhong-Dong, Wu Qin. Tubulin research in progress[J]. J Anhui Inst Educ), 1999, (2):73-74
- [21] Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells[J]. J Immunol, 1978, **121**(6):2228-2234
- [22] Bravo R, Macdonald H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites[J]. J Cell Biol, 1987, **105**(4):1549-1554
- [23] Baker K, Warren K S, Yellen G, *et al.* Defective "pacemaker" current (I_h) in a zebrafish mutant with a slow heart rate[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, **94**(9):4554-4559
- [24] Cazzalini O, Perucca P, Riva F, *et al.* p21CDKN1A does not interfere with loading of PCNA at DNA replication sites, but inhibits subsequent binding of DNA polymerase delta at the G1/S phase transition[J]. Cell cycle, 2003, **2**(6):596-603