

斑马鱼作为模式动物在鱼类病原学中的研究进展

柯 翎, 林晨韬, 龚 晖

(福建省农业科学院生物技术研究所 350003)

摘 要: 斑马鱼模型在人类病害的研究上有广泛的应用, 其遗传背景较清晰、分子生物学信息资源丰富。该文介绍有关斑马鱼遗传背景的信息资源, 以及斑马鱼与水产病害模型的研究进展。

关键字: 斑马鱼; 模式动物; 鱼类; 病原学

A review on the fish etiology by using zebrafish as a model animal

KE Ling, LIN Chen-tao, GONG Hui

(Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences 350003)

Abstract: The model of zebrafish (*Danio rerio*) was widely applied in the research on human diseases, the genetic background of zebrafish was clearer and its molecular biology information resources were abundant. The information resources related genetic background of zebrafish and the research progress in zebrafish and aquatic disease model were introduced in this paper.

Key words: *Danio rerio*; model animal; fish; etiology

斑马鱼 (*Danio rerio*) 作为一种生物学研究的模式动物受到生物学家的重视, 它作为遗传学、发育生物学、免疫学研究的模式生物已经得到了较为广泛的应用, 尤其是在人类病害的研究上应用广泛。科学家以斑马鱼建立了研究模型, 进行各种病原的分子生物学和免疫学方面的研究, 以期深入了解这些病原并消除这些病原。

斑马鱼在养殖鱼类疾病方面的应用与研究相对较少。在我国, 鱼类的养殖品种众多, 养殖和育苗技术研究走在世界前列, 但病害问题也不断出现。近年来, 寄生虫、细菌、病毒这三大类病害屡屡引起养殖鱼类爆发性死亡。目前, 人们对养殖鱼类和病原相互作用的分子机制了解程度还很低。斑马鱼基因组已公布, 其遗传背景清晰, 通过了解病原与斑马鱼之间的相互作用, 有助于加深对病原与养殖鱼类关系的理解, 达到防治鱼类病害的研究目的。

以下介绍斑马鱼相关信息, 及其与病原的研究模型在鱼类病原学中的应用研究进展。

1 有关斑马鱼遗传背景的信息资源

国内对于斑马鱼的研究逐步开始, 上海生科院、北京大学和清华大学在 2006 年联合建立了国家斑马鱼模式动物中心。国内一些科研院所都有引进品系的斑马鱼, 并在实验室中进行保种传代。

在国外, 进行斑马鱼相关研究的单位较多, 很多研究机构不仅建立了自己的斑马鱼信息网站, 而且数据是对外共享的。例如, 俄勒冈大学 (University of Oregon) 建立的 <http://zfinfo.org/> (ZFIN) 和 Zebrafish International Resource Center (ZIRC) 建立的 <http://zebrafish.org/>。ZFIN 和 ZIRC 几乎涵盖了斑马鱼研究的所有相关信息, 包括各种基因、标记物、品系、相关出版物。这些网站为斑马鱼在水产动物的病害研究提供了丰富的信息资源。表 1 列出了与斑马鱼生物学信息相关的网站。

2 斑马鱼与病害的研究模型

不同来源的病毒、细菌, 其宿主与斑马鱼虽然在进化距离上远近不一。但大部分病原对斑马鱼都具有一定的感染性。因此, 斑马鱼可以作为研究这

收稿日期: 2012-04-09

作者简介: 柯翎, 男, 1979 年生, 助理研究员。

通讯作者: 龚晖, 男, 1971 年生, 副研究员 (E-mail: ghxfjm@163.com)。

基金项目: 福建省科技厅公益类科研院所基本科研专项 (2010R1021-6); 福建省科技厅平台项目 (2007N2003)。

表 1 斑马鱼生物学信息资源相关网站

机构名称	网 址
University of Oregon	http://zfin.org/
Zebrafish International Resource Center(ZIRC)	http://zebrafish.org/
Sanger 研究机构	http://www.sanger.ac.uk/resources/zebrafish/
缅因州州立大学	http://umaine.edu/biomed/facilities/zebrafish-facility/
Zebrafish Genome Resources	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/zebrafish/
Zebrafish Genome Annotation	http://www.ensembl.org/Danio_rerio/
Japan Zebrafish Resources Center	http://shigen.lab.nig.ac.jp/zebra/index_en.html
WashU – Zebrafish Genome Resources Project	http://zfish.wustl.edu/
Tübingen Zebrafish Stock center in Max Planck Institute for Developmental Biology	http://www3.eb.tuebingen.mpg.de/core-facilities/zebrafish-stockcenter/
University of South Carolina	http://zebra.sc.edu/
Zebrafish research at University of Oregon	http://www.neuro.uoregon.edu/k12/zfk12.html
NIH zebrafish website	http://www.nih.gov/science/models/zebrafish/

些病原的模式动物。目前已有部分动物病原感染斑马鱼的研究报道,为斑马鱼作为水产病原侵染模型提供了依据^[1]。

2.1 病毒感染斑马鱼的研究模型

一类来自人类的病毒也可以感染斑马鱼的成体或细胞系。斑马鱼的科萨奇 (coxsackievirus) 病毒和腺病毒受体 (zCAR, the coxsackievirus and adenovirus receptor) 与人 CAR (hCAR) 有不到 50% 的相似性,但 zCAR 能调节腺病毒和 coxsackievirus 病毒所感染的细胞。hCAR 的单抗不与鼠 CAR 反应,但是能与作者所克隆的 zCAR 反应。一系列实验推测 CAR 与柯萨奇病毒作用的凹陷区域是 zCAR 和 hCAR 高度保守的,推断这个凹陷的区域核能与病毒的粘附有关。而凹陷边缘部分相对不保守,这可能是与病毒粘附无关紧要的区域^[2]。HSV-1 (1 型单纯疱疹病毒: herpes simplex virus) 可以感染人类的神经系统,在感染斑马鱼 1~4 d 后可以在鱼体中检测到该病毒,这表明疱疹病毒也可以感染斑马鱼^[3]。

对于水产来源的病毒在斑马鱼模型上也有深入的研究,VHSV (病毒性出血败血症病毒: viral haemorrhagic septicemia virus) 是三文鱼的重要病毒病,能导致鱼类致死性贫血和溶血,Novoa 等将该病毒在 15℃ 时对斑马鱼进行攻毒,可以造成 100% 的死亡率,并将弱化的重组病毒免疫斑马鱼,免疫组死亡率明显低于对照组^[4]。TFV (虎蛙病毒: Ti-

ger frog virus) 可造成养殖的虎蛙蝌蚪大量死亡,Luo 等将 TFV 感染斑马鱼并与宿主 ZF4 细胞作用。TFV 引起 ZF4 细胞典型的病变空斑,并且采用电镜和间接免疫荧光观察到病毒增殖的不同阶段,并发现 10 个免疫相关蛋白的表达量出现了上调或下调^[5]。Sanders 研究表明,在 10~15℃ 温度下斑马鱼对 SVCV (鲤春病毒: spring viremia of carp virus) 敏感。被感染的斑马鱼出现厌食和出血点的症状,随后死亡。组织化学研究表明,病理损伤诱导病灶坏死和黑素瘤细胞的增殖^[6]。ISKNV (感染性脾脏和肾脏坏死病毒: Infectious spleen and kidney necrosis virus) 注射感染斑马鱼,其死亡率可以达到 60%,而且 ISKNV 可以传播到健康斑马鱼的成体^[7]。Altmann 等为了了解鱼类干扰素 (interferon, IFN) 的抗病毒作用,采用了两种鱼类弹状病毒 (rhabdovirus) SVCV 和 SHRV (snakehead rhabdovirus) 对 ZF4 细胞进行感染,结果有 zIFN 转染的斑马鱼细胞的病变空斑数比对照减少 36% 以上。*Mx* 基因是 IFN 所诱导的下游效应元件,借助 *Mx* 基因检测 IFN 基因的表达量^[8]。Aggad 等研究了在 SVCV 和 IHNV 病毒影响下不同 IFNs 与细胞受体的作用^[9],并用 morpholino 调节的功能丢失 (morpholino-mediated loss-of-function) 来筛选潜在的细胞受体,发现 *Ifnγ1* 和 *Ifnγ2* 可与不同 *Crfb* (细胞受体家族 b) 结合,*Ifnγ2* 与 *Crfb6*、*Crfb13*、*Crfb17* 结合,但是 *Ifnγ1* 的受体包括 *Crfb17*,却不包括 *Crfb6*

表 2 在斑马鱼模型中的病毒研究

病毒名称	类别	文献
Coxsackievirus	Adenovirus 腺病毒	[2]
Type I herpes simplex virus(HSV - 1)	Herpsvirus 疱疹病毒	[3]
Tiger frog virus(TFV)	Iridoviridae 虹彩病毒	[5]
Infectious spleen and kidney necrosis virus(ISKNV)	Iridoviridae 虹彩病毒	[7]
Spring viremia of carp virus (SVCV)	Rhabdoviridae 弹状病毒	[6,9,11]
Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)	Rhabdoviridae 弹状病毒	[4]
Snakehead rhabdovirus (SHRV)	Rhabdoviridae 弹状病毒	[8]

和 Crfb13。且斑马鱼中的 Jak2 同源基因中的 Jak2a 参与 Ifn - γ 信号的细胞间传导，而 Jak2b 不参与 [4]。Wang 等在体外的研究表明：重组斑马鱼 IFN 对 EPC 和 CO 细胞有抗 SVCV 和抗 IHNV（传染性造血组织坏死病病毒：Infectious hematopoietic necrosis virus）的作用 [1]。

2.2 细菌感染斑马鱼的研究模型

由于分枝杆菌对于人类的危害较大，且斑马鱼对于分枝杆菌也较为易感，从而使之成为一种研究人类分枝杆菌的良好动物模型，而分枝杆菌也同样是鱼类的重要致病菌。因此，借鉴分枝杆菌在斑马鱼上的研究，也同样有助于对养殖鱼类中分枝杆菌等致病菌的防治研究。Harriff 将两种海洋分枝杆菌（Mycobacterium）感染斑马鱼。随后从鱼体的肝脏、脾脏、肠道可以分离到该细菌。组织化学分析发现，分枝杆菌会形成肉芽肿，其结果证实海洋分枝杆菌可通过肠道感染鱼体 [2]。Prouty 等 [3] 和 Davis 等 [4] 建立的海洋分枝杆菌感染斑马鱼模型，模拟人类结核病，可以形成类似肉芽肿的损伤，以及慢性和急性的感染。

李斯特菌等革兰氏阳性菌也能够感染斑马鱼。Menudier 等将不同种的李斯特菌注射到斑马鱼，并和小鼠进行比较，发现斑马鱼对于李斯特菌比小鼠不敏感，需要更大剂量的菌才会致死 [5]。2009 年 Levraud 等在斑马鱼体内直接观测了李斯特菌（Listeria monocytogenes）的感染，发现巨噬细胞在其中起到重要作用，李斯特菌的毒性依赖于 listerio-lysin 和 actin 这两种蛋白，使这两种蛋白失活可以降低李斯特菌的毒性 [6]。一些重要的人畜共患病原菌也能够感染斑马鱼，Van Der Sar 等将鼠伤寒沙门氏菌（Salmonella typhimurium）用红色荧光蛋白

标记后，微量注射到斑马鱼胚胎中，并通过显微多维数码成像技术发现，在注射鼠伤寒沙门氏菌后 28 h 后，细菌数从 50 个增殖到 500 个 [7]。

水产来源的病原也能够感染斑马鱼。O'Toole 等于 2004 年用绿色荧光蛋白 GFP 标记鳃弧菌（Vibrio anguillarum）浸泡感染斑马鱼幼体，发现在肠道中最早出现鳃弧菌，鱼体黏膜对鳃弧菌有趋化作用 [8]。2011 年华东理工大学的 Xiao J. 等将迟钝爱德华菌（Edwardsiella tarda）减毒基因（arcC、eseBCD、esaC 基因）删除后，注射疫苗斑马鱼成体，攻毒后的相对保护率可以达到 60% ~ 80% [9]。Rodriguez 等将嗜水气单胞菌（Aeromonas hydrophila）及其胞外产物（ECP）注射攻毒斑马鱼成体，在几个小时内即可产生较高的死亡率，在感染后的细菌其 TNF - α 、IL - 1 β 、IFN - γ 的表达都出现上调 [10]。

表 3 在斑马鱼模型中的细菌研究

学名	革兰氏 阳性/阴性	文献
<i>Vibrio anguillarum</i>	-	[8]
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	[10]
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	[9]
<i>Listeria</i> spp.	+	[5,16]
<i>Mycobacterium</i> spp.	+	[2 - 14]
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	[7]

总之，斑马鱼对于虹彩病毒、弹状病毒较为敏感，陆生脊椎动物来源的病毒和细菌，在一定条件下可以感染斑马鱼，斑马鱼产生的免疫反应也可以采用分子生物学手段进行检测，一些重组的疫苗也可通过斑马鱼验证其有效性。

对于一些养殖的新品种，出现病原病料时却没

有合适的细胞系或试验动物可供研究,由于斑马鱼对于各种病原的易感性,水产动物中分离到的病毒和细菌更加容易感染斑马鱼的胚胎或者成体。可以尝试用斑马鱼胚胎、成体或其细胞系作为研究材料。同时,一些我国特有的养殖鱼类品种在实验室条件下或养殖环境中,都不适合进行病原学、免疫学的试验,而斑马鱼饲养条件简单。因此,借助斑马鱼来加深病原菌对养殖鱼类致病机理的了解,从而使得更加快捷地研发更具有针对性的疫苗成为可能。

3 展望

总之,斑马鱼与病害的研究模型经过多年的应用研究和发展,奠定了研究基础,已成为鱼类病害模型研究的优良资源。斑马鱼已经开始应用于鱼类的重大课题研究和行业测试应用。斑马鱼之所以作为人源疾病的模式动物,是基于斑马鱼、人类和相关病原遗传背景信息都较为清晰。但目前我国一些养殖鱼类及其病害的遗传背景信息不明确。因此,利用斑马鱼作为模式动物,将鱼类病害与斑马鱼的关系转化为鱼类病害与各种养殖鱼类的直接关系,并在鱼类养殖业生产上加以推广,这虽然存在一定的难度,但也是学术上的空白和鱼类养殖利润上的空间,需要科学家和鱼类养殖业者的共同努力,一起构筑鱼类健康养殖的美好前景。

参考文献:

- [1] SULLIVAN C, KIM C H. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(4): 341-350.
- [2] PETRELLA J, COHEN C J, GAETZ J, et al. A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus [J]. J Virol, 2002, 76(20): 10503-10506.
- [3] BURGOS J S, RIPOLL-GOMEZ J, ALFARO J M, et al. Zebrafish as a new model for herpes simplex virus type 1 infection [J]. Zebrafish, 2008, 5(4): 323-333.
- [4] NOVOA B, ROMERO A, MULERO V, et al. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) [J]. Vaccine, 2006, 24(31-32): 5806-5816.
- [5] LUO Y, WENG S, WANG Q, et al. Tiger frog virus can infect zebrafish cells for studying up- or down-regulated genes by proteomics approach [J]. Virus Res, 2009, 144(1-2): 171-179.
- [6] SANDERS G E, BATTIS W N, WINTON J R. Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus [J]. Comp Med, 2003, 53(5): 514-521.
- [7] XU X, ZHANG L, WENG S, et al. A zebrafish (*Danio rerio*) model of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) infection [J]. Virology, 2008, 376(1): 1-12.
- [8] ALTMANN S M, MELLON M T, DISTEL D L, et al. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio* [J]. J Virol, 2003, 77(3): 1992-2002.
- [9] AGGAD D, MAZEL M, BOUDINOT P, et al. The two groups of zebrafish virus-induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains [J]. J Immunol, 2009, 183(6): 3924-3931.
- [10] AGGAD D, STEIN C, SIEGER D, et al. In vivo analysis of Ifn-gamma1 and Ifn-gamma2 signaling in zebrafish [J]. J Immunol, 2010, 185(11): 6774-6782.
- [11] WANG L, WANG L, ZHANG H X, et al. In vitro effects of recombinant zebrafish IFN on spring viremia of carp virus and infectious hematopoietic necrosis virus [J]. J Interferon Cytokine Res, 2006, 26(4): 256-259.
- [12] HARRIFF M J, BERMUDEZ L E, KENT M L. Experimental exposure of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: a potential model for environmental mycobacterial infection [J]. J Fish Dis, 2007, 30(10): 587-600.
- [13] PROUTY M G, CORREA N E, BARKER L P, et al. Zebrafish - *Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 225(2): 177-182.
- [14] DAVIS J M, CLAY H, LEWIS J L, et al. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos [J]. Immunity, 2002, 17(6): 693-702.
- [15] MENUDIER A, ROUGIER F P, BOSGIRAUD C. Comparative virulence between different strains of *Listeria* in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and mice [J]. Pathol Biol (Paris), 1996, 44(9): 783-789.
- [16] LEVRAUD J P, DISSON O, KISSA K, et al. Real-time observation of *Listeria monocytogenes*-phagocyte interactions in living zebrafish larvae [J]. Infect Immun, 2009, 77(9): 3651-3660.
- [17] VAN DER SAR A M, MUSTERS R J, VAN EEDEN F J, et al. Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections [J]. Cell Microbiol, 2003, 5(9): 601-611.
- [18] O'TOOLE R, VON HOFSTEN J, ROSQVIST R, et al. Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum* [J]. Microb Pathog, 2004, 37(1): 41-46.
- [19] XIAO J, CHEN T, WANG Q, et al. Search for live attenuated vaccine candidate against edwardsielliosis by mutating virulence-related genes of fish pathogen *Edwardsiella tarda* [J]. Lett Appl Microbiol, 2011, 53(4): 430-437.
- [20] RODRIGUEZ I, NOVOA B, FIGUERAS A. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(3): 239-249.

(责任编辑: 杨小萍)