综述与专论

斑马鱼模型在常见骨疾病研究中的应用

王小琦[1,2],孙　岩[1,2],张　洋[1],赵宏斌[1],李文辉[2]

(1. 昆明医科大学第一附属医院,云南 昆明　650032;2. 中国科学院昆明动物研究所,云南 昆明　650032)

【摘要】 斑马鱼作为一种新型的脊椎模式生物,近年来在人类疾病模型中已广泛应用,特别是在人类骨疾病模型的研究中已显示出优势,如在疾病的相关基因及其功能表达和药效筛选评价等方面。这对于在骨疾病领域发挥特色疗效的传统医药而言,也具有重大的现实意义。本文就斑马鱼在骨质疏松、骨折、骨关节炎等常见骨疾病中的研究应用进行综述,以便给未来的临床相关研究提供一定的思路。

【关键词】 斑马鱼;骨疾病;动物模型

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2017) 06-0086-06

doi: 10.3969.j.issn.1671 -7856. 2017.06.018

Application of zebrafish models in the research on bone diseases

WANG Xiao-qi[1,2], SUN Yan[1,2], ZHANG Yang[1], ZHAO Hon-bin[1], LI Wen-hui[2]

(1. First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650032, China;
2. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650032)

【Abstract】 Zebrafish (*Danio rerio*), as a new vertebrate model organism, has been widely used in human disease research in recent years, especially in the study of human bone diseases. The zebrafish models show some advantages, such as expression of disease-related genes and application in pharmacodynamic screening and evaluation, etc. It is also of great practical significance for the traditional medicine, which has a characteristic efficacy in the treatment of bone diseases. This paper reviews the research and application of zebrafish in research on bone diseases such as osteoporosis, fracture, osteoarthritis, and so on, aiming to provide some inspiration for the future clinically relevant research.

【Key words】 Zebrafish; Bone diseases; Animal models

上世纪 70 年代初,美国的遗传学家 Streisinger 所领导的研究团队对斑马鱼进行了遗传筛选,建立了纯合品系,并于 1981 年率先在《Nature》杂志报导了斑马鱼的各种基本实验技术[1]。90 年代初,《Nature》和《Science》均发表相关专题[2,3],确立斑马鱼为一种新型的模式生物,完全具备成为分子发育生物学甚至人类基因组计划脊椎动物模式生物的条件。而后,德美两国的发育生物学家与遗传学家通过高通量筛选,鉴定出几千种斑马鱼基因突变体,开启了斑马鱼基因功能研究[4,5]。国内于 1998 年在清华大学建立了第一个以斑马鱼为模式动物的发育生物学实验室,开启了斑马鱼在我国的研究。2012 年,国家斑马鱼资源中心(China Zebrafish Resource Center, CZRC)在中国科学院水生生物研究所正式成立,提供斑马鱼研究相关的资源共享和技术服务。目前我国已有 250 个以上的实验室利用斑

[基金项目]国家自然科学基金委-云南省人民政府联合基金项目(编号:U150220034)。

[作者简介]王小琦(1984 -),女,硕士研究生,研究方向:骨质疏松及骨质疏松后骨折,E-mail:287253120@qq.com。

[通讯作者]赵宏斌(1967 -),男,主任医师,研究方向:骨质疏松和民族医药学,E-mail:596829191@qq.com;李文辉(1967 -),男,研究员,研究方向:动物活性多肽,E-mail:leewh@mail.kiz.ac.cn。

马鱼开展多学科领域的研究。令人振奋的是,斑马鱼已被美国国家卫生研究院(NIH)列为继人和小鼠之后的第三大模式生物,并被欧洲替代方法验证中心(ECVAM)推荐为新的替代动物[6]。随着研究的深入,目前斑马鱼模型在骨骼研究中的优势也逐渐突显,国内外专家纷纷开展以斑马鱼为动物模型的骨疾病研究,以期对多基因的复杂性骨疾病的病理机制和高通量药物筛选进行更深入细致的探究而为人类骨健康创造一个美好的未来前景。本文就斑马鱼在骨质疏松、骨折、骨关节炎等常见骨疾病中的研究应用作一综述,以便给临床相关研究提供新的思路和指导。

1 斑马鱼的生物特点

1.1 斑马鱼的一般生物特性

以果蝇、线虫为代表的无脊椎动物模型广泛应用于发育、遗传及相关领域研究,并取得了令人瞩目的发展,但它们在胚胎结构及器官形成等方面都与脊椎动物存在差异,且一些器官缺乏基因同源性,导致人类某些特征不能采用无脊椎动物进行研究[7]。此外,以啮齿类动物、兔、犬、灵长类等为代表的脊椎动物模型,虽可从整体水平直观地模拟人的生理和病理过程,但存在费用昂贵、饲养繁琐、繁殖速度较慢、操作复杂且存在风险、实验周期长、受到法律伦理的限制等弊端。斑马鱼作为一种脊椎动物模式生物,以其独特的优势避免了其他脊椎动物的缺点。Sanger 研究院在 2001 年开始对斑马鱼基因组测序[8],于 2009 年完成全基因组测序,发现其与人类基因的相似度达到 87%,而且两者在基因和蛋白质的序列、功能上都具有很高的保守性。斑马鱼的心血管、血液、消化道、肝脏、肾脏、骨骼系统以及生理功能毒性反应方面与人类有许多共同特点,为开展比较医学研究和建立人类疾病动物模型提供了重要基础[9]。且斑马鱼具有饲养成本低、体积小、发育周期短、单次产卵数较高、胚胎体外发育且透明而可视、易获突变体、施药方式易操作、高通量筛选易实现等优势[10,11]。由此,我们就可以便捷、经济、实时、有效地利用斑马鱼模型进行正反向遗传筛选法以及药物诱导的方法,选择合适的基因型建立疾病模型,进行相应研究。

1.2 斑马鱼的骨骼发育特点

斑马鱼在骨骼发育方面与人类极其相似,其骨发育与人类骨生物矿化作用基本一致,存在软骨内骨化过程,发育完整的斑马鱼骨拥有与人类长骨一致的分层结构[12]。此外,斑马鱼与人类在骨骼生长发育的分子机理方面也极为相似;参与人类成骨作用的 BMP 和 Wnt 信号通路被证实也存在于斑马鱼中;而且参与斑马鱼骨发育调控的关键基因—*runx*2、*osteoprogenin*(*BMP*-3)与哺乳动物也具有高度的同源性。由此推断,以斑马鱼为骨疾病模型做的相关实验在多数情况下也是适用于人类的。因此,国内外专家在此方面做了大量研究,并取得了令人瞩目的成果。2005 年,Fleming[13] 首次通过在培养水体中加入对哺乳动物有效的促骨形成药物维生素 D3 类似物和甲状旁腺激素(parathyroid hormone,PTH),观察斑马鱼幼鱼头部骨骼的发育状况,与哺乳动物实验结果一致,从而证实了斑马鱼为有效筛选促骨合成代谢药物的动物模型系统,而且与啮齿类动物模型相比,假阳性和假阴性发生率更小。而在成年斑马鱼骨骼发育不良的正向遗传筛选中,Nan Li[14] 以胶原蛋白Ⅰα1 基因突变为靶点,成功模拟了人类的成骨不全症,同时发现了 *Runx*2 基因、*Osx* 基因、骨基质基因的顺序表达,以及成骨细胞分化所需的转录调控体系与哺乳动物保持着一致性。随后,Yang 等[15] 还发现,给斑马鱼胚胎注射与 *runx*2b 的表达相关的 *twist*1a 和 *twist*1b mRNA 后,*runx*2b 的表达被抑制,骨发育受阻;而敲除 *twist*1a 和 *twist*1b 基因后,*runx*2b 表达增加,骨发育能力也相应增加,为人类骨骼发育疾病的治疗提供新的研究靶点。最近,Pasqualetti S 等[16] 通过对成骨细胞特异标记物(碱性磷酸酶)和鱼鳞外观形状特征的研究,发现斑马鱼鱼鳞在分析成骨细胞在骨形成、骨矿化期间的行为是一种很好的模式样本。由此可见,斑马鱼在筛选与骨发育疾病相关的靶向基因和有效药物中,是一个强大的工具。

2 研究方法

以上述斑马鱼生物特点为基础,国内外研究人员已经利用组织染色、转基因技术以及影像学检测对斑马鱼骨骼系统进行了更全面的研究,从而为骨疾病相关研究提供坚实的技术基础。

2.1 组织染色

斑马鱼的胚胎发育全程透明、幼鱼呈半透明,可观察到器官形成。因此借助立体显微镜,荧光染色后就可清晰观察到早期发育的骨骼。组织染色技术已广泛应用于对斑马鱼模型的研究。其中,骨

骼固定染色是最经典、可靠的方法，适用于分析幼鱼及成鱼骨骼。目前国际上多采用阿辛蓝、茜素红复合染色法，较为公认的方法是 Dingerkus and Uhler 的传统染色法和 MB Walke 的无酸染色法。近年来，国内的张燕丽研究团队[17]根据斑马鱼的骨骼发育特点对上述染色方法进行了改进，即对不同发育阶段的斑马鱼分别采用无酸染色法和双染色法（传统染色法 + 无酸染色法）染色，发现虽然两种方法均可将其软骨染为蓝色，但仍存在一定差异。对于 15 d 内的斑马鱼，由于骨矿化不完全，无酸染色法较适合；而对于 15 d 以上的斑马鱼，由于骨矿化程度高，运用双染色法更有利于突出其骨骼特征。利用张燕丽团队的方法，可更直观地反映斑马鱼骨化程度的改变及骨化次序，有利于在骨疾病研究中分析影响骨发育的因素。而 Du SJ 等人[18]在建立筛选斑马鱼胚胎骨骼发育突变体的可视化方法研究中发现，特异性地结合含钙骨结构的钙黄绿素荧光染色特点与所检测的骨形态发生蛋白-2（BMP2）的表达一致，以此从骨骼发育正常的斑马鱼中筛选出有缺陷的突变体。因此他们认为与阿辛蓝染色剂相比，钙黄绿素荧光染色剂在斑马鱼胚胎骨骼发育及其对骨发育缺陷突变体的有效可视化筛选中更具敏感性和兼容性。最近，国内张姗姗等[19]首次采用钙黄绿素染色法，分别对用于骨关节炎的氨基葡萄糖盐酸盐和骨质疏松的淫羊藿提取物进行促斑马鱼幼鱼骨矿化的活性评价，发现此方法具有实验周期短、染色时间短、操作简单且对斑马鱼幼鱼毒性低等优点，而具有早期、快速筛选促骨矿化药物的可行性。当然，对斑马鱼不同形态发育阶段及各阶段不同时期的骨骼染色采用何种染色方法，还需更多的研究进一步证实，从而在提高实验效率的同时，也可推广活体染色可视化的应用。

2.2 转基因技术

转基因技术可在时空上特异地表达或关闭特定基因，利用这类技术可更确切地研究目标基因及相关生物学过程。近年来，此技术也逐渐应用于对斑马鱼骨疾病模型的研究，为此领域带来新突破。2006 年，Rembold 等[20]首次发现将报告基因插入到骨骼组织特异的启动子后，即可筛选出稳定遗传的转基因斑马鱼，实时、直接的观测斑马鱼骨骼发育机制及相关基因的联系，而开启了转基因技术在斑马鱼骨骼发育研究中的应用。俄勒冈大学的 Delaurier A 研究组[21]于 2010 年，利用转基因斑马鱼品系—— *Tg*（*sp*7：EGFP）b1212，发现标记成骨和软骨细胞的 *Sp*7 基因在幼鱼耳囊泡、骨骼的发育中及成鱼断鳍后的再生中表达，表明这一品系为研究耳囊泡的形成、骨骼发育和骨再生提供了一个基本的工具。最近，Mitchell RE 等人[22]通过构建一种新的斑马鱼转基因品系——*Tg*（*Col*10α1BAC：mCitrine），真实地模拟 Col2a1a 和 Col10a1 在肥大软骨细胞的可视化内源性表达，用于实时追踪其肥大软骨细胞在骨骼发育过程中的功能，从而应用于人类骨关节炎（osteoarthritis，OA）疾病模型中。此实验表明，此转基因斑马鱼品系可作为研究骨关节炎遗传学的新工具，并有望用于其他软骨遗传疾病，如遗传性多发性骨软骨瘤（multiple hereditary exostoses，MHE）。目前，在国家斑马鱼资源中心（China Zebrafish Resource Center，CZRC），我们可以根据研究需求获得与骨疾病相关的转基因斑马鱼资源。如 *Tg*（－2.2*col*10*a*1*a*：GFP），用于标记来自成骨细胞的骨结构；*Tg*（UAS：*bmp*2*b-UTRnanos*3），标记骨形态发生蛋白 2b（*BMP*-2b）；*Tg*（UAS：*dnbmpr*1*aaUTRnan- os*3），标记骨形态发生蛋白受体 IAa（*BMPR-IAa*）；*Tg*（UAS：*wnt*8*a-UTRnanos*3），标记与骨形成密切相关的信号通路 *Wnt*8a；而 *Tg*（UAS：*fgf*8*a- UTRnanos*3），与颅脑软骨发育相关。我们可以利用这些转基因斑马鱼品系，评估相应基因及编码蛋白的功能，创建相应的疾病模型，也可根据其构建新的转基因品系，为骨疾病的研究创造更好的技术平台。

2.3 影像学检查

影像学检查具有快捷方便、直观精确的特点。如双能 X 线吸收法（dual-energy X-ray absorptiometry，DXA）是骨密度测定的金标准，而显微 CT（Micro-CT）是一种可以在不破坏样本的情况下清楚了解样本的内部显微结构，直接评估骨骼结构的方法，其分辨率可达到 15 μm，通过三维重建可获得骨骼的三维结构及其参数。2009 年，华盛顿大学医学部的 Green 等人[23]将双能 X 线吸收法、显微 CT 等技术运用于斑马鱼成鱼突变体的研究，可更精确地得到骨密度、矿物质含量等组织染色无法测量的参数，这样就能为斑马鱼疾病模型及后续实验提供更有力的科学依据。梅西大学的 Bruneel B 和 Witten PE [24]在 2015 年回顾了 X 光、Micro-CT、光学投影层析和活体成像技术在斑马鱼骨骼可视化技术应用中的优点和局限性，最后还探讨了光片

照明显微镜（light-sheet fluorescence microscopy）在斑马鱼骨骼分析中应用的可能性。表明了影像可视化技术在斑马鱼骨骼分析中更精确的发展，斑马鱼模式生物在骨骼发育模型的研究应用中就更有价值。

3 斑马鱼在骨疾病领域的研究应用

3.1 骨质疏松

骨质疏松是以骨量减低、骨显微结构退化、骨脆性增高、易发生骨折为特征的全身代谢性骨疾病，而糖皮质激素是引起骨质疏松、增加骨折风险的常见因素。因此，国内外许多专家建立以糖皮质激素诱导骨质疏松的斑马鱼模型，并开展后续研究。2006 年，Barrett R 等[25]首次采用不同浓度泼尼松龙作用不同时间，创建斑马鱼骨质疏松模型，并最终确定泼尼松龙建模的最佳浓度为 25 μM，最佳暴露时间为斑马鱼受精后 4 ~ 5 h，且连续作用 5 d；随后还验证了药物 RU486 和双膦酸盐作用于骨质疏松模型后，斑马鱼骨量得到恢复，进一步表明糖皮质激素发挥作用是通过糖皮质激素受体介导的，也为目前广泛应用于骨质疏松治疗的双膦酸盐提供了实验数据。而后，有国外研究人员利用此动物模型，对目前常用药物阿仑膦酸钠和依替膦酸钠的抗骨质疏松药效进行了实验室药效评价，证实其与临床应用一致。而 Siccardi 等[12]在 1 月龄斑马鱼的饮食中添加不同浓度的锶盐，采用 Micro-CT 检测 12 周后的骨密度，发现随锶盐浓度增加，骨密度亦相应增加。这些研究都与临床研究结果一致，亦提示斑马鱼骨质疏松模型对骨质疏松的治疗具有临床用药指导价值。国外研究还发现[26]，使用糖皮质激素可导致斑马鱼鱼鳞再生的缺损，且成骨细胞和破骨细胞中与骨质疏松相关基因的表达改变，与骨质疏松的病理机制一致。自 2012 年后，国内的研究团队[27-30]也分别建立了地塞米松、泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型，先后用此类模型对西药依替膦酸二钠，中药淫羊藿、续断的代表成分以及复方接骨汤进行了抗骨质疏松活性评价，并采用计算斑马鱼头骨矿化面积等数据，检测淫羊藿黄酮对骨骼生长的促进作用，结果与已有的大鼠或细胞模型实验结论一致，进一步揭示斑马鱼骨质疏松模型可用于高通量筛选防治骨质疏松的药物，对临床的指导具有合理性。

3.2 骨折修复与再生

斑马鱼的鳍相当于人类的四肢，又因尾鳍结构简单、易于手术操作、损伤后不影响生存和便于观察等特点，成为目前研究器官再生及骨折修复的重要部位。早在 2003 年，就有研究表明斑马鱼鱼鳍有较强的再生能力，成年斑马鱼尾鳍被截断后，可重新激活骨分化信号，使受损伤的骨骼、血管、神经、结缔组织及表皮得到修复[31]。2006 年底，美国华盛顿州立大学的研究团队也通过对斑马鱼模型的研究，发现 Wnt/β-Catenin 信号通路可促进斑马鱼尾鳍的再生，相关蛋白 *Wnt*8 对成骨细胞增殖起到增强作用，而由 *Wnt*5b 激活的细胞信号通路可关闭由 Wnt/β-Catenin 开启的基因，削弱成骨细胞的再生能力。斑马鱼机体通过开启或关闭这些基因来调控成骨细胞的增殖状态，从而调节尾鳍再生。而 Sousa 等[32]于 2013 年发表文章证实了斑马鱼鳍的挤压骨折与人类骨折更为相似，当鱼鳍受到挤压时，骨细胞开始发生沉积，与骨发育相关的基因表达减缓，而骨桥蛋白、肌腱蛋白-C 表达时间延迟，这些表现与人类骨折修复机理都非常接近。因此，斑马鱼挤压骨折模型较截断模型能更好的模拟哺乳动物创伤引起的骨折，有助于此类骨折修复研究。De Vrieze 等[33] 通过研究在细胞外基质中与发育和再生相关的关键转换酶——基质金属蛋白酶（Matrix, metalloproteinases, MMPs），发现其可影响斑马鱼鳞片在再生过程中的重建，证实斑马鱼鱼鳞再生模型可很好的应用于研究骨发育、再生、重建的机制。此外，Geurtzen K 等[34]通过分析斑马鱼断鳍和骨折以及颅骨损伤模型，阐明了成骨细胞去分化可提高骨愈合的机制。上述研究均体现了斑马鱼骨创伤模型，将有助于了解骨折修复和再生的关键机制，为骨折的修复再生带来新的思路。

3.3 骨关节炎

斑马鱼在骨关节炎（OA）模型中的应用研究相对较晚，国外也鲜见报道。越来越多的证据表明，OA 的易患因素中遗传因素约占一半，而斑马鱼是理想的发育生物学和遗传学模式生物。由此推断，将斑马鱼模型运用于骨关节炎的研究将有助于阐明该病的发生机制。Mitchell[22]等以转基因斑马鱼为模型，首次采用分析 OA 相关基因 Mcf2l 的时空表达模式，表明了 Mcf2l 在软骨发育上的功能。此外，还对斑马鱼幼鱼中六个 OA 易感基因的表达进行了

筛选。说明转基因斑马鱼模型在 OA 相关基因的功能研究方面的实用性,并可将其用于高通量筛选研究项目。莱顿大学医学中心的 Wiweger 团队[35]发现在骨软骨瘤和骨性关节炎中,蛋白多糖上的糖胺聚糖(GAGs)在结构和组成上都发生了变化,并采用斑马鱼突变体分析了五种参与蛋白多糖合成的基因,表明了各个基因所决定的表型:*dackel* 与软骨形态;*hi*307 与细胞外基质的组成;*pinscher* 与细胞外基质的超微结构;*hi*954 与软骨细胞的超微结构;*Knypek* 在 Simpson-Golabi-Behmel 综合征颅面表型中的表达,支持了磷脂酰肌醇蛋白多糖 4(GPC4)的参与。此外,他们推测骨骼发育不良可能与 *slc*35*b*2,*β*3*gat*3 和 *uxs*1 表达有关。这项研究促进了利用斑马鱼作为一种人类骨骼发育和相关病理学研究的动物模型,并证实斑马鱼可作为研究人类病因复杂的骨疾病的理想模型。

4 展望

斑马鱼的诸多优点,使其经过几十年的研究发展,积累了很多研究成果,也建立了一系列技术平台,从而在人类骨疾病的相关基因、功能研究及其药效筛选和评价中,成为一个可靠工具。作为一种新兴的脊椎模式生物,斑马鱼的基因与人类更加相似,在鉴定和分析调节胚胎发育和器官发生的未知基因、人类疾病的基因治疗和药物开发等方面都将发挥重要作用,从而带动整个生命科学的变革和发展。对于以经方验方为特色的我国传统医药而言,通过斑马鱼模型,可深入研究传统医药的体内代谢特点及其在骨形成信号通路中的调控机制,从而有力推动我国传统医药得到国际认可。

但斑马鱼模型还存在一些问题有待深入研究。如它缺少哺乳动物的一些器官,如:肺、皮肤、前列腺和乳腺,使其生物代谢过程与人存在差异性。以斑马鱼作为模式生物进行骨疾病模型及药物筛选、药效评价的研究报道相对较少,特别是与已深入基因水平的国外研究相比,国内刚刚起步,研究成果不多;斑马鱼缺乏滑膜关节,因此不能在此模型中充分研究参与滑膜关节形成的基因;此外,斑马鱼有 20% 相对于人类的的基因存在两个同源基因,导致两者基因绝对相似度没有 87%;斑马鱼模型与现有模型研究的相关性,以及斑马鱼模型实验结果的稳定性和重复性也不十分明朗等。考虑到这些潜在的不足,我们并不是以期斑马鱼短期内取代经典的哺乳动物模型,而是在以脊椎动物为模式生物的骨疾病模型及其药物开发研究中做一名探路者。

参考文献:

[1] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291(5813): 293 - 296.

[2] Concordet JP, Ingham P. Developmental biology. Catch of the decade [J]. Nature, 1994, 369(6475): 19 - 20.

[3] Kahn P. Zebrafish hit the big time [J]. Science, 1994, 264(5161): 904 - 905.

[4] Haffter P, Nusslein-Volhard C. Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish [J]. Int J Dev Biol, 1996, 40(1): 221 - 227.

[5] Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish [J]. Development, 1996, 123: 37 - 46.

[6] Mcgrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. Drug Discov Today, 2008, 13(9 - 10): 394 - 401.

[7] 于学慧, 张世栋, 张承梅. 发育生物学的理想动物模型——斑马鱼 [J]. 中国实验动物学杂志, 2001, 11(3): 45 - 48.

[8] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498 - 503.

[9] 何嘉玲, 刘静, 王天奇, et al. 斑马鱼的质量标准化 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 99 - 102.

[10] Borski RJ, Hodson RG. Fish research and the institutional animal care and use committee [J]. ILAR J, 2003, 44(4): 286 - 294.

[11] Rubinstein AL. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery [J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003, 6(2): 218 - 223.

[12] Siccardi AJR, Padgett-Vasquez S, Garris HW, et al. Dietary strontium increases bone mineral density in intact zebrafish (Danio rerio): a potential model system for bone research [J]. Zebrafish, 2010, 7(3): 267 - 273.

[13] Fleming A, Sato M, Goldsmith P. High-throughput in vivo screening for bone anabolic compounds with zebrafish [J]. J Biomol Screen, 2005, 10(8): 823 - 831.

[14] Li N, Felber K, Elks P, et al. Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation [J]. Dev Dyn, 2009, 238(2): 459 - 466.

[15] Yang DC, Tsai CC, Liao YF, et al. Twist controls skeletal development and dorsoventral patterning by regulating runx2 in zebrafish [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27324.

[16] Pasqualetti S, Banfi G, Mariotti M. The zebrafish scale as model to study the bone mineralization process [J]. J Mol Histol, 2012, 43(5): 589 - 595.

[17] 张燕丽, 张翠珍, 彭刚, et al. 斑马鱼颅骨骨组织发育特征的研究 [J]. 口腔医学研究, 2014, 02): 97 - 99.

[18] Du SJ, Frenkel V, Kindschi G, et al. Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein [J]. Dev Biol, 2001, 238(2): 239 – 246.

[19] 张姗姗, 何秋霞, 韩建, 等. 利用斑马鱼模型评价氨基葡萄糖盐酸盐及淫羊藿的促进骨骼矿化作用 [J]. 山东科学, 2016, 29(2): 19 – 24.

[20] Rembold M, Lahiri K, Foulkes NS, et al. Transgenesis in fish: efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct [J]. Nat Protoc, 2006, 1(3): 1133 – 1139.

[21] Delaurier A, Eames BF, Blanco-Sanchez B, et al. Zebrafish sp7: EGFP: a transgenic for studying otic vesicle formation, skeletogenesis, and bone regeneration [J]. Genesis, 2010, 48(8): 505 – 511.

[22] Mitchell RE, Huitema LF, Skinner RE, et al. New tools for studying osteoarthritis genetics in zebrafish [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(2): 269 – 278.

[23] Green J, Taylor JJ, Hindes A, et al. A gain of function mutation causing skeletal overgrowth in the rapunzel mutant [J]. Dev Biol, 2009, 334(1): 224 – 234.

[24] Bruneel B, Witten PE. Power and challenges of using zebrafish as a model for skeletal tissue imaging [J]. Connect Tissue Res, 2015, 56(2): 161 – 173.

[25] Barrett R, Chappell C, Quick M, et al. A rapid, high content, in vivo model of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Biotechnol J, 2006, 1(6): 651 – 655.

[26] De Vrieze E, Van Kessel MA, Peters HM, et al. Prednisolone induces osteoporosis-like phenotype in regenerating zebrafish scales [J]. Osteoporos Int, 2014, 25(2): 567 – 578.

[27] 王长梅, 韦英杰, 贾晓斌, 等. 泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松模型的建立 [J]. 世界科学技术 – 中医药现代化, 2013, 15(3): 509 – 514.

[28] 韦英杰, 王长梅, 蔡雪婷, 等. 地塞米松影响骨骼发育的斑马鱼模型的建立 [J]. 药学学报, 2013, 48(2): 255 – 260.

[29] 韦英杰, 王长梅, 詹扬, et al. 淫羊藿苷对泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松防治作用研究[C]. 2012 年中国药学大会暨第十二届中国药师周, 中国江苏南京,2012.

[30] 景莉君, 王长梅, 韦英杰, 等. 接骨汤抗泼尼松龙诱导斑马鱼骨丢失的作用研究 [J]. 世界科学技术 – 中医药现代化, 2014, 16(5): 1071 – 1075.

[31] Akimenko MA, Mari-Beffa M, Becerra J, et al. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration [J]. Dev Dyn, 2003, 226(2): 190 – 201.

[32] Sousa S, Valerio F, Jacinto A. A new zebrafish bone crush injury model [J]. Biol Open, 2012, 1(9): 915 – 921.

[33] De Vrieze E, Sharif F, Metz JR, et al. Matrix metalloproteinases in osteoclasts of ontogenetic and regenerating zebrafish scales [J]. Bone, 2011, 48(4): 704 – 712.

[34] Geurtzen K, Knopf F, Wehner D, et al. Mature osteoblasts dedifferentiate in response to traumatic bone injury in the zebrafish fin and skull [J]. Development, 2014, 141(11): 2225 – 2234.

[35] Wiweger MI, Avramut CM, De Andrea CE, et al. Cartilage ultrastructure in proteoglycan-deficient zebrafish mutants brings to light new candidate genes for human skeletal disorders [J]. J Pathol, 2011, 223(4): 531 – 542.

〔修回日期〕2016 – 11 – 15

(上接第 85 页)

[34] Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120 [J]. Nature, 1995, 375(6531): 497 – 500.

[35] Anand AR, Ganju RK. HIV-1 gp120-mediated apoptosis of T cells is regulated by the membrane tyrosine phosphatase CD45 [J]. J Biol Chem, 2006, 281(18): 12289 – 12299.

[36] Lantéri M, Giordanengo V, Hiraoka N, et al. Altered T cell surface glycosylation in HIV-1 infection results in increased susceptibility to galectin-1-induced cell death [J]. Glycobiology 2003, 13: 909 – 918.

[37] Dahabieh MS, Battivelli E, Verdin E. Understanding HIV latency: The road to an HIV cure [J]. Ann Rev Med, 2015, 66: 407 – 421.

[38] Angela C, Pejman M, Monica G, et al. Bioinformatics and HIV latency [J]. Curr HIV/AIDS Rep, 2015, 12(1): 97 – 106.

[39] Valentine M, Song K, Maresh GA, et al. Expression of the memory marker CD45RO on helper T cells in macaques [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73969.

[40] Mccoig C, Dyke GV, Chou CS, et al. An anti-CD45RO immunotoxin eliminates T cells latently infected with HIV-1 in vitro [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(20): 11482 – 11485.

[41] Saavedra-Lozano J, Cao Y, Callison J, et al. An anti-CD45RO immunotoxin kills HIV-latently infected cells from individuals on HAART with little effect on CD8 memory [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(8): 2494 – 2499.

〔修回日期〕2017 – 02 – 21