

斑马鱼模型在糖尿病研究中的应用

王雪, 韩利文, 何秋霞, 韩建, 王荣春, 陈维云, 王希敏, 侯海荣, 刘可春*

(山东省科学院生物研究所, 山东省生物检测技术工程实验室, 山东省科学院药物筛选技术重点实验室, 济南 250014)

【摘要】 作为一种模式生物, 斑马鱼具有其他动物模型所不具备的诸多优势, 非常适用于进行人类疾病建模及机制研究。斑马鱼胰腺经历两次发育分化过程, 其间伴有多种信号途径的活化参与。成鱼的胰腺结构与其他动物胰腺相似, 能分泌包括胰岛素在内的多种激素。斑马鱼胰腺及对胰岛素敏感的肝脏、肌肉等这些与代谢调控相关的主要器官及外周组织, 在进化上具有保守性, 糖代谢调控机制也与其他哺乳动物相似, 这使得斑马鱼非常适用于糖代谢调控研究。除利用 STZ 诱导胰岛 β 细胞凋亡造成斑马鱼糖尿病模型外, 高糖溶液交替暴露及外源性干预代谢相关信号途径也可以造成斑马鱼血糖升高。成鱼血糖水平、幼鱼组织糖含量、视网膜及视网膜血管形态变化是目前斑马鱼糖尿病模型研究中的常用检测指标。

【关键词】 斑马鱼; 糖尿病; 模式生物; 胰腺; 糖代谢

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 08-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.08.001

Application of zebrafish models in research of diabetes

WANG Xue, HAN Li-wen, HE Qiu-xia, HAN Jian, WANG Rong-chun, CHEN Wei-yun, WANG Xi-min,
HOU Hai-rong, LIU Ke-chun*

(Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Shandong Provincial Engineering Laboratory for Biological Testing Technology, Key Laboratory for Drug Screening Technology of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

【Abstract】 As a model organism, zebrafish have many advantages over other animal models and is suitable for studies on establishment of human disease model and mechanism. In zebrafish, there are two phases of endocrine formation during early development, which are directed by concomitant activity of many signaling pathways. Zebrafish pancreas possess similar cell structure with that of other animals, which can express various endocrine hormones including insulin. The main organs required for metabolic control, such as the pancreas, islet, and insulin sensitive tissue (muscle, liver) are conserved in zebrafish, and the mechanisms of glucose regulation in zebrafish is similar to that seen in mammalian models. These render it an excellent model to study glucose metabolism. Hyperglycemia in zebrafish model can be induced by administration of the diabetogenic drug, streptozotocin (STZ), alternatively immersion of the fish in glucose solution and water, or disturbing of signaling pathways associated with glucose metabolism. Glucose levels in adult zebrafish blood or embryo tissue and phenotype of retinal cell layers or retinal vasculature are the commonly used measurement organs in zebrafish diabetic models.

【Key words】 Zebrafish; Diabetes; Model organism; Pancreas; Glucose metabolism

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31400979); 山东省自主创新重大专项(2014ZZCX0215)。

[作者简介] 王雪, 高级工程师, 硕士, 研究方向: 药物毒性评价与活性筛选。E-mail: wangxue8809@163.com

[通讯作者] 刘可春, 研究员, 博士, 研究方向: 药物活性筛选。E-mail: hliukch@sdas.org

糖尿病是一组由多病因引起的、以慢性高血糖为特征的终身性代谢性疾病。糖尿病患者体内长期存在的高血糖状态,会广泛导致机体各组织,尤其是眼、肾、心脏、血管及神经等的慢性损害和功能障碍,严重危害人体健康。糖尿病是全球流行性疾病,患病率呈逐年增高趋势,并成为致死和致残的重要原因,对糖尿病的研究一直是一项世界性的重要课题,但对糖尿病的病因,至今尚未完全阐明。

动物模型是进行人类疾病研究的重要工具,利用动物模型不仅能直观的体现人类疾病的病理生理改变,进行疾病机制研究,还可以在模型基础上筛选活性药物。目前在利用动物糖尿病模型研究糖尿病及其并发症方面已有大量的报道,其中最为常用的动物是大、小鼠,但还没有哪种动物模型能完全呈现人类糖尿病临床症状。斑马鱼是一种理想的脊椎模式生物,体格小、产卵量大、生长周期短,成鱼养殖简单,能够有效提高实验效率。同时,斑马鱼的基因信息已为人类熟知,针对斑马鱼的基因操作技术已非常成熟,通过靶向性地诱导或敲除体内某些基因,改变其表达水平,可以较容易的在斑马鱼上复制人类的一些疾病状态,非常适用于进行人类疾病建模及机制研究。而在内分泌腺体功能及糖代谢方面,斑马鱼有其自身的特点及优势,并已应用于人类糖尿病等代谢类疾病方面的研究,本文对此作一综述。

1 斑马鱼胰腺发育及生物学特点

自 1996 年,研究者开始从分子、遗传及形态学等多个角度对斑马鱼胰腺进行研究^[1]。在胚胎早期发育中,斑马鱼胰腺经历两次发育分化过程。胰腺第一次发育出现于胚胎受精后 24 h (hours post-fertilization, hpf),主要是形成一些分泌胰岛素的细胞^[2],即为初级胰岛;5 dpf (days post-fertilization) 时,位于胰腺管内的前体细胞开始转化并聚集,形成次级胰岛,只有在第二次分化中形成的内分泌细胞具有增殖潜能,并形成后来成鱼的胰腺^[3,4]。与其他脊椎动物一样,斑马鱼胰腺的内分泌腺及外分泌腺均来源于内胚层。继内胚层分化及与中胚层分离之后,消化管前后轴的分化是胰腺发育的重要一步,这个过程直接伴随有多种信号途径的活化参与,包括 Wnt、RA (retinoic acid)、BMP (bone morphogenetic protein)、FGF (fibroblast growth factor) 和 Hh (Hedgehog) 等^[5]。每种信号途径具有不同的

作用,这些信号的综合作用实现了胰腺原基的精确定位,及胰腺一些早期标志物的区域化表达,如 Pdx1 因子,研究表明 Pdx1 因子在脊椎动物胰腺原基的形成及后期的分化中发挥重要作用。与哺乳动物一样,斑马鱼胰腺 β 细胞的分化过程受 Notch 信号控制,胰腺内一些对 Notch 信号敏感的腺管相关的前体细胞 (notch-responsive cells, PNCs),具有分化成 β 细胞的潜能^[6]。同时,幼鱼期 β 细胞的形成与腺管上皮细胞密切相关,研究表明,腺管上皮细胞具有向胰腺 β 细胞转化的能力^[5]。

与其他动物胰腺的细胞结构一样,斑马鱼胰腺由一个外分泌腺(腺管结构)和一个内分泌腺组成,其中内分泌腺由 α 、 β 、 δ 和 PP 细胞组成,这些细胞分别具有表达分泌胰高血糖素 (glucagon)、胰岛素 (insulin)、生长抑素 (somatostatin) 和胰多肽 (pancreatic polypeptide) 的功能^[7,8]。在胚胎发育第一周,斑马鱼胰腺结构简单,仅有一个胰岛^[9]。在斑马鱼成鱼,一部分胰腺 β 细胞聚集于胰腺头部的边缘部位,形成单个大的胰岛,另一部分则形成一些小的胰岛,嵌入外分泌腺组织中,并沿胰腺管散在分布^[10]。

2 斑马鱼在糖尿病模型研究中的应用

2.1 斑马鱼糖尿病模型的应用基础及优势

硬骨鱼类体内分布有一些包含激素分泌细胞的内源性腺体,这些腺体分泌产生包括胰岛素在内的多种激素,用于机体的代谢调节,研究表明,这些腺体与人类的具有同源性^[11]。在斑马鱼,与代谢调控相关的主要器官,如胰腺,及一些对胰岛素敏感的外周组织组织肝脏、肌肉等在进化上具有保守性^[12],一些与糖代谢调控相关的关键机制与其他哺乳动物非常相似^[13],使得斑马鱼可以作为糖代谢调控的研究模型,用于人类糖尿病研究^[11]。另外,对鱼类在碳水化合物利用方面的研究表明,如斑马鱼类生活在温水、杂食性的硬骨鱼对碳水化合物的利用度远高于生活在冷水、肉食性硬骨鱼,其糖代谢速度也比肉食性鱼类要快。碳水化合物是斑马鱼食物中的重要成分,斑马鱼生长速度与其含量成正比。一些与糖代谢有关的重要基因如己糖激酶、葡萄糖转运蛋白基因在斑马鱼体内活跃表达,而这些基因的缺失会引发斑马鱼胚胎发生一系列严重的神经缺陷,因此,糖代谢是斑马鱼机体代谢的重要组成部分,斑马鱼是进行糖尿病相关研究的理想模型。

由于基因组部分复制,斑马鱼的许多基因包含两个相应的直向同源基因,两个同源基因含的增强子不同,使其在不同的组织存在职能化表达。如胰腺的 *nkx2.2a*、*pax6b* 及 *jagged1b* 基因等即存在这一现象^[7,14]。利用斑马鱼基因表达的特点,现已构建了大量的斑马鱼突变体及转基因斑马鱼品系,如绿色荧光转基因斑马鱼,这种斑马鱼体内的器官或组织细胞能特异表达绿色荧光蛋白,加上斑马鱼幼鱼鱼体透明的特点,直接在显微镜下即可观察器官形态及组织成分的变化,可以有效的简化实验过程,非常适于药物的高通量筛选。

2.2 斑马鱼糖尿病模型的造模方法

糖尿病动物模型来源有两种,一种是由于动物自身基因的缺陷自发形成的糖尿病^[15],另一种是通过药物诱导使动物发生糖尿病。药物诱导的啮齿类动物糖尿病模型是目前最常用的,常用药物有链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)和四氧嘧啶(alloxan),两者均是通过烷化或诱导 DNA 破坏造成胰岛 β 细胞凋亡,造成胰岛素分泌量不足使血糖升高。啮齿类动物模型普遍存在成本高、周期长的缺点。

STZ 易溶于水,但其水溶液在室温下极不稳定。Olsen^[16] 研究中将 STZ 注入斑马鱼成鱼体内,斑马鱼出现血糖升高症状,而血液及胰腺中胰岛素含量显著降低。Michael 等^[17] 用同样方法建立了斑马鱼糖尿病模型,发现在去除 STZ 后 2 周内,斑马鱼胰腺 β 细胞完成再生修复,血糖恢复至正常水平。众所周知,糖尿病会引起伤口愈合困难,Michael 实验中的糖尿病斑马鱼同样出现鳍再生及皮肤伤口的愈合障碍,而且,在血糖水平恢复正常后,这种现象仍持续存在^[18],这与临床糖尿病表现是一致的,即一旦发生糖尿病后,即使通过药物干预将血糖控制到正常水平,但一些并发症会依然存在并继续进展^[19]。其他的多项实验也证明最初的高血糖阶段会造成靶器官出现持久的功能异常。这一现象被命名为“代谢记忆效应(metabolic memory, MM)”。

Michael 进一步对糖尿病高血糖期及血糖恢复后这两种状态下基因的表达情况进行研究,发现这两种状态下基因的表达模式发生了相似的改变,这也是血糖恢复正常后仍出现鳍及皮肤再生障碍的原因,即使血糖水平等指征恢复正常,高血糖对靶器官造成的损害仍无法逆转^[17]。

斑马鱼对环境中的糖的摄取与渗透压调节有关,

体内高渗状态使环境中的水分进入体内,葡萄糖随之摄入体内。Gleeson 等^[20] 利用高糖溶液浸泡法建立斑马鱼糖尿病模型,研究中将斑马鱼交替暴露于无葡萄糖的水与含 2% 葡萄糖的水溶液中,每 24 h 更换一次,持续 28 d,会导致斑马鱼出现持续高血糖症状,在每次浸入 2% 葡萄糖溶液中时会重复出现血糖峰值。实验中将斑马鱼持续暴露于含糖溶液中,血糖也出现升高,但这种升高是短暂的,而且连续浸入糖溶液,尤其是高浓度糖溶液中,会导致斑马鱼出现游动及鳃功能异常,甚至出现死亡。

NF- κ B 是一类核转录因子蛋白家族,能调节炎症相关基因的表达,在肿瘤发生与炎症反应中起重要作用。研究发现, NF- κ B 经典与旁路两种信号途径均与代谢综合症相关,与糖尿病中胰岛素抵抗及 β 细胞功能异常有重要关系。在肥胖病人的肌肉组织中, NF- κ B 诱导激酶(NF- κ B-inducible kinase, NIK)呈高水平状态,说明 NF- κ B 旁路信号途径被活化。Malle 等^[12] 利用药物诱导提高斑马鱼幼鱼体内的 NIK 水平,外源性激活 NF- κ B 旁路信号途径,6 h 后幼鱼血糖水平出现显著升高,说明体内的糖平衡调节功能受到影响。进一步研究发现,药物处理组幼鱼的 β 细胞功能出现异常,虽然细胞内胰岛素能正常生成,但其分泌明显受阻。

2.3 斑马鱼糖尿病模型的评价指标

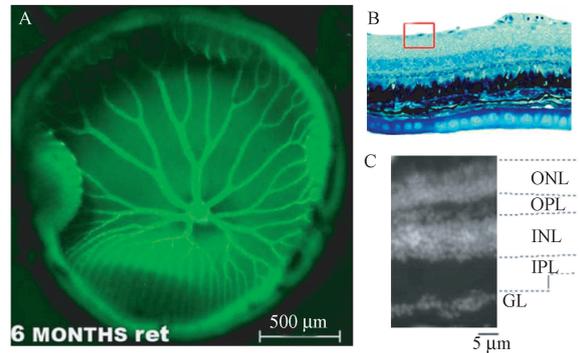
血糖水平是反映胰腺 β 细胞功能的主要指标,也是临床糖尿病诊断或糖尿病动物模型研究中的常用检测指标。Stefani 等^[21] 对麻醉后的斑马鱼成鱼取血,分别检测了斑马鱼空腹血糖(fasting)、餐后血糖(feeding)及糖负荷值(a glucose challenge)等指标,以研究斑马鱼体内的糖代谢规律。发现斑马鱼血糖处于动态地自我调节的状态。禁食 2 d 时,血糖会出现应激性升高,第 3 天时即回落到正常水平。注射葡萄糖后 30 min 内血糖水平升高并达到峰值,在 6 h 时,血糖又重新回落到正常水平。在斑马鱼血糖检测中,麻醉方法是影响血糖值的一个因素,多数麻醉剂是神经细胞离子通道阻滞剂^[22],会直接作用于 β 细胞通道影响胰岛素分泌。已有研究称麻醉剂 MS-222 会干扰 β 细胞功能,引起硬骨鱼血糖升高^[23]。Stefani 的实验中也显示, MS-222 麻醉组斑马鱼血糖的 CV 值较高,故在其研究中采用低温麻醉法。一些脊椎动物,包括硬骨鱼在内,血糖水平还受性别影响^[23],但 Stefani 实验中斑马鱼血糖水平未检测出性别差异^[21]。对于斑马鱼,由于其体

格较小,要采集足够体积的血液样本比较困难^[21],因此,仍需要寻找一种更为简易有效的胰岛功能评价方法,用于斑马鱼胰腺功能及糖代谢研究。

斑马鱼是进行糖尿病研究的理想模型,但对斑马鱼内源性血糖水平的变化模式及胰岛在血糖调节中的作用还不清楚,尤其是斑马鱼胚胎早期是否产生和利用糖,早期胚胎的胰岛是否具有调节糖代谢功能仍是未知数。Jurczyk^[13]用酶法检测斑马鱼胚胎裂解物中的葡萄糖绝对含量,获得了胚胎发育过程中体内糖含量动态变化资料。发现,在斑马鱼发育早期,未检测到葡萄糖存在,在 16 hpf 至 24 hpf 阶段内,胚胎体内的葡萄糖含量逐渐上升,并在胰腺内分泌腺分化及胰岛形态发育早期达到峰值,这与鼠胚发育过程中的糖动态变化模式非常相似。Jurczyk 的研究结果也表明,在胚胎发育早期,胰岛具有糖代谢调节功能。

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病常见的微血管并发症之一,是糖尿病人致盲的主要原因。斑马鱼的视觉系统与人类及其他哺乳动物的非常相似,在斑马鱼能够清楚的观察到整个视网膜细胞层结构,包括从神经节细胞层 (ganglion cell layer) 到视网膜色素上皮细胞层^[24] (图 1 B 和 C),因此斑马鱼被广泛用于视觉发育及修复研究中。Gleeson 用高糖溶液暴露法建立斑马鱼糖尿病模型,并进行 DR 研究。对视网膜形态观察发现,血糖持续升高 28 d 后,糖尿病模型组斑马鱼内网层 (inner plexiform layer, IPL) 和内核层 (inner nuclear layer, INL) 均比正常组明显减少, IPL 明显变薄^[20],这与糖尿病患者及其他糖尿病动物模型中的视网膜病变表现一致。因此,斑马鱼视网膜形态的变化,可作为斑马鱼糖尿病模型研究中的一项观察指标。

在 DR,高血糖导致视网膜部位的微血管发生病变,同时,视网膜损害会刺激新生血管生长,形成增殖性视网膜病变,因此,视网膜血管形态学观察是糖尿病研究中一项必不可少的内容。目前,已建立了一些特异的斑马鱼血管生成模型,可以用于 DR 中视网膜血管的观察与研究。但是斑马鱼成鱼视网膜血管系统比较复杂^[25] (图 1 A),内核层血管的三级静脉丛缺失,视网膜静脉系统也与人类的不同,因此,在利用斑马鱼进行 DR 研究时要注意可能带来的细胞或血管层面的偏差。



注: A 斑马鱼视网膜血管形态; B 和 C 视网膜组织结构分层; ONL: 外核层; OPL: 外丛状层; INL: 内核层; IPL: 内丛状层; GL: 神经节细胞层; 方框: 视网膜血管覆盖于内界膜 (the inner limiting membrane, ILM) 表面。

图 1 斑马鱼视网膜血管形态及视网膜组织结构
Note. A: The retinal blood vessels; B, C: Layers of the zebrafish retina; ONL: Outer nuclear layer; OPL: Outer plexiform layer; INL: Inner nuclear layer; IPL: Inner plexiform layer; GL: Ganglion cell layer; The rectangle frame indicates the inner limiting membrane (ILM).

Fig. 1 Morphology of the retinal blood vessels and histological structure of the zebrafish retina

3 结束语

动物模型对于研究人类疾病的发病机制、确定药物靶点及发现新的活性药物具有重要意义。斑马鱼作为一种脊椎模式生物,具有其他模型所不具备的独特优势,非常易于进行转基因操作及药物实施。斑马鱼胰腺结构简单,利用斑马鱼模型,可以在整体动物水平对糖尿病的病理现象及发病机制进行分析,并开展高通量药物筛选。同时,以早期胚胎为模型,通过正向遗传药物筛选技术,可以确定与代谢相关的特异基因、信号途径或活性化合物。而从斑马鱼模型上获得的活性药物或数据,又可以进一步在鼠等其他动物模型中得到验证。

随着基因操作技术的发展,现在的研究中已将斑马鱼模型与绿色荧光转基因技术及 Tilling- 或 zinc finger 介导的靶基因突变技术结合起来,可以更深入地剖析胰腺细胞发育、生长及再生机制,并从分子水平精确分析糖尿病发病机制,以用于糖尿病造模及治疗方面的研究。由此可见,在不远的将来,斑马鱼这一动物模型,将会在包括糖尿病在内的人类胰腺疾病的治疗中发挥更重要的作用。

参考文献:

- [1] Pack M, Solnica-Krezel L, Malicki J, et al. Mutations affecting development of zebrafish digestive organs [J]. *Development*, 1996, 123: 321 – 328.
- [2] Pisharath H, Rhee JM, Swanson MA, et al. Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using *E. coli* nitroreductase [J]. *Mech Dev*, 2007, 124: 218 – 229.
- [3] Wang Y, Rovira M, Yusuff S, et al. Genetic inducible fate mapping in larval zebrafish reveals origins of adult insulin-producing β -cells [J]. *Development*, 2011, 38: 609 – 617.
- [4] Parsons MJ, Pisharath H, Yusuff S, et al. Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas [J]. *Mech Dev*, 2009, 126: 898 – 912.
- [5] Tiso N, Moro E, Argenton F. Zebrafish pancreas development [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 312(1 – 2): 24 – 30.
- [6] Rovira M, Huang W, Yusuff S, et al. Chemical screen identifies FDA-approved drugs and target pathways that induce precocious pancreatic endocrine differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(48): 19264 – 19269.
- [7] Biemar F, Argenton F, Schmidtke R, et al. Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet [J]. *Dev Biol*, 2001, 230: 189 – 203.
- [8] Pauls S, Zecchin E, Tiso N, et al. Function and regulation of zebrafish *nkx2.2a* during development of pancreatic islet and ducts [J]. *Dev Biol*, 2007, 304: 875 – 890.
- [9] Kinkel MD, Prince VE. On the diabetic menu: zebrafish as a model for pancreas development and function [J]. *Bioessays*, 2009, 31: 139 – 152.
- [10] Chen S, Turner S, Tsang E, et al. Measurement of pancreatic islet cell proliferation by heavy water labeling [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293: E1459 – E1464.
- [11] Lai AKW, Lo ACY. Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison [J]. *J Diabetes Res*, 2013, 2013: 106594.
- [12] Malle EK, Zammit NW, Walters SN, et al. Nuclear factor κ B-inducing kinase activation as a mechanism of pancreatic β cell failure in obesity [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(8): 1239 – 1254.
- [13] Jurczyk A, Roy N, Bajwa R, et al. Dynamic glucoregulation and mammalian-like responses to metabolic and developmental disruption in zebrafish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2011, 170(2): 334 – 345.
- [14] Zecchin E, Conigliaro A, Tiso N. et al. Expression analysis of jagged genes in zebrafish embryos [J]. *Dev Dyn*, 2005, 233: 638 – 645.
- [15] Acha-Orea H, McDevitt HO. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A β chain is unique [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84: 2435 – 2439.
- [16] Olsen AS, Sarras MP Jr, Intine RV. Limb regeneration is impaired in an adult zebrafish model of diabetes mellitus [J]. *Wound Repair Regen*, 2010, 18(5): 532 – 542.
- [17] Sarras MP Jr, Leontovich AA, Olsen AS, et al. Impaired tissue regeneration corresponds with altered expression of developmental genes that persists in the metabolic memory state of diabetic zebrafish [J]. *Wound Repair Regen*, 2013, 21(2): 320 – 328.
- [18] Olsen AS, Sarras MP Jr, Leontovich A, et al. Heritable transmission of diabetic metabolic memory in zebrafish correlates with DNA hypomethylation and aberrant gene expression [J]. *Diabetes*, 2012, 61(2): 485 – 491.
- [19] Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(15): 1577 – 1589.
- [20] Gleeson M, Connaughton V, Arneson LS. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina [J]. *Acta Diabetol*, 2007, 44: 157 – 163.
- [21] Eames SC, Philipson LH, Prince VE, et al. Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis [J]. *Zebrafish*, 2010, 7(2): 205 – 213.
- [22] Frazier DT, Narahashi T. Tricaine (MS – 222): effects on ionic conductances of squid axon membranes [J]. *Eur J Pharmacol*, 1975, 33: 313 – 317.
- [23] Kilpatrick ES, Rumley AG, Rumley CN. The effect of haemolysis on blood glucose meter measurement [J]. *Diabet Med*, 1995, 12: 341 – 343.
- [24] Goldsmith P, Harris WA. The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(1): 11 – 18.
- [25] Alvarez Y, Cederlund ML, Cottell DC, et al. Genetic determinants of hyaloid and retinal vasculature in zebrafish [J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7, article 114.

[收稿日期] 2016 – 11 – 03