



# 模式动物斑马鱼在中枢神经系统疾病研究中的应用

黄春念,张晶晶\*

(广东医科大学附属第一医院神经内科,广东 湛江 524001)

**【摘要】** 斑马鱼作为一种新兴的模式动物,被广泛应用于神经、心血管、消化、造血等各生理系统的发育及相关疾病的研究。中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病是困扰人类健康的重大疾病之一。神经损伤后不易再生和修复等特点,导致了临床上诸多 CNS 疾病迄今仍无有效疗法。斑马鱼作为脊椎动物,因其与哺乳动物在遗传及生理上有很高的同源性和功能保守性,近年来成为研究 CNS 疾病的理想动物模型。基于斑马鱼构建的许多疾病研究模型对深入揭示 CNS 疾病的治病分子机制及对应疾病的靶向治疗等具有重要的启示作用。本文将综述近年来斑马鱼作为模式动物在 CNS 疾病研究中的应用进展。

**【关键词】** 斑马鱼;中枢神经系统疾病;模式动物

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0392-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.019

## Research progress on the application of zebrafish in central nervous system diseases

HUANG Chunlian, ZHANG Jingjing\*

(Department of Internal Neurology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Corresponding author: ZHANG JingJing. E-mail: gdmccrc@163.com

**【Abstract】** As a new model animal, zebrafish has been widely used in the research of the development and disease related to various organs, such as nervous, cardiovascular, digestive and hemopoietic system. Central nervous system (CNS) disease is one of the leading causes of death and disability worldwide. There is still lacking of effective therapeutic strategies to treat most of the CNS diseases, due to the low ability of self-regeneration and recovery of the neurons after injury. In recent years, zebrafish has been proved to be an ideal vertebrate model to study some of the CNS diseases because their genetic physiology and other features are closed and similar to humans. The application of zebrafish in CNS diseases has contributed largely on understanding the mechanisms and on the therapy of CNS diseases. This review summarizes the recent progress of the applications of zebrafish on the study of CNS diseases.

**【Key words】** zebrafish; central nervous system disease; model animal

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

斑马鱼,原产于印度、孟加拉国等地,属于辐鳍亚纲鲤形目鲤科短担尼鱼属,近年来已成为在发育生物学与疾病模型研究中最广泛的实验动物

之一。野生斑马鱼的全基因组与人类基因组的相似度高达 87%,使得两者在大部分发育信号通路上也是保守的<sup>[1]</sup>。一方面,作为脊椎动物,斑马鱼的

**【基金项目】**国家自然科学基金(No. 31771628);广东省自然科学基金杰出青年基金(No. 2017A030306024);广东省高等学校优秀青年教师培养计划(No. [2016]6:YQ2015081)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (No. 31771628); Guangdong Natural Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 2017A030306024) and the Initial Program of Excellent Young Teachers in Colleges and Universities in Guangdong Province, China (No. [2016]6: YQ2015081).

**【作者简介】**黄春念(1991—),女,硕士研究生,研究方向:发育神经生物学。E-mail: 1499360125@qq.com

**【通信作者】**张晶晶,博士,教授,博士生导师,研究方向:发育神经生物学。E-mail: gdmccrc@163.com

心血管、视觉、神经、消化和血液系统都与人类有着相似的发育机制和特点,使得其能作为模式动物应用于人类很多系统的发育及其相关疾病的研究;另外一方面,如 To2 转座子介导的基因捕获突变和转基因技术、吗啉基反义寡核苷酸(morpholino, MO)介导的基因下调技术和 CRISPR/Cas9 基因敲除技术等多种遗传操作方法及高分辨率活体成像技术的发展,极大地推动了斑马鱼在疾病研究中的应用,使得其能更好地在体研究各种疾病病理进程中的分子基础和潜在的遗传相互作用<sup>[2]</sup>。

中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病是老年人高发病率和高死亡率的主要原因之一,由于 CNS 的再生能力有限,神经退行性变疾病或神经损伤后的修复常常以失败告终。斑马鱼 CNS 在胚胎发育 4~10 d 左右就已发育成熟,其胚胎透明的特点便于 CNS 的观察,这使得斑马鱼成为理想的研究神经系统疾病的模式动物。

## 1 斑马鱼在脑血管类疾病中的研究

### 1.1 烟雾病

烟雾病(Moyamoya disease, MMD)是一种以颈内动脉末端进行性狭窄和大脑底部异常血管网形成特征的脑血管疾病<sup>[3]</sup>。近年来,全基因组关联研究确定了环指蛋白 213(*RNF213*)基因是东亚人群 MMD 的易感基因<sup>[4-5]</sup>。Kanoke<sup>[6]</sup>, Kobayashi<sup>[7]</sup>和 Sonobe<sup>[8]</sup>等利用 *Rnf213* 基因敲除小鼠或小鼠 *Rnf213* R4 828 K 突变体来研究 *Rnf213* 基因在体内的生理功能。但是,所有的 *Rnf213* 突变体都没有表现出与 MMD 相似的脑血管表型。

Sheng 等<sup>[9]</sup>研究团队采用转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术敲除了斑马鱼体内 MMD 的易感基因 *rnf213*,构建了 *rnf213* 基因敲除的斑马鱼模型。这个模型可用来研究 *Rnf213* 蛋白在胚胎发育过程中血管特别是脑血管形成和血液循环的作用。研究发现,72 hpf *rnf213* 基因敲除斑马鱼模型中颅内主干血管有不规则狭窄及颅内外异常芽生血管形成,符合 MMD 脑血管的临床症状。*rnf213* 基因敲除的斑马鱼 MMD 疾病模型的构建,为研究 MDD 的发病机制和治疗提供了基础。

### 1.2 脑卒中

脑卒中(stroke)分为缺血性和出血性脑卒中,最为常见的是缺血性脑卒中,占卒中患者的 70%~80%。虽然大脑的重量是体重的 2%,但有 15%~20% 的血液从心脏循环到大脑,并且脑耗氧量占总

耗氧量的 20% 左右。由于脑高代谢需求,因此脑细胞对缺氧极其敏感,氧气供应切断 5 min 即可造成脑细胞死亡<sup>[10]</sup>。缺血缺氧性脑损害病灶由中心坏死区及周围的缺血半暗带组成。目前研究脑缺血缺氧的动物模型最广泛的是鼠,可通过颈动脉结扎和颈动脉夹的开闭来控制缺血与再灌注时间<sup>[11]</sup>。这种啮齿类动物卒中模型的缺点是外周血管具有一定的手术创伤性。斑马鱼作为一种新型的没有组织损伤的动物模型,有以下优势:①斑马鱼作为水生生物,可以把溶解在水中的化学物质通过鳃的呼吸而进入血循环或皮肤表皮屏障而吸收;②斑马鱼是一个单一的循环回路:心-鳃-身体-心。Yu 等<sup>[10]</sup>将斑马鱼放入一个缺氧室里,里面装有氧浓度很低的水( $< 0.8$  mg/mL)来模拟一个缺血缺氧性脑损伤模型。缺氧一定时间后鱼会沉到容器底部,然后将其转移到正常培养环境让其复氧。缺氧处理后的斑马鱼会有行为学上的改变如抽搐、不平衡游动等,缺氧性脑损伤后的斑马鱼脑组织用 TTC 染色观察脑组织损伤的分布,发现缺血缺氧后 10 min 的斑马鱼脑组织视神经叶顶盖处会出现缺血半暗区,并且随着缺氧时间的延长梗死灶的范围会扩大。此研究构建了一个相当于缺血性脑卒中造成的缺血缺氧性脑损伤的斑马鱼模型,对于研究脑卒中复杂的细胞分子病理生理改变和临床上开发神经保护药物有着重要意义。

### 1.3 脑微出血的脑血管修复

出血性脑卒中和脑微出血是由于血管破裂引起的,脑血管破裂的关键因素是内皮细胞层完整性的破坏<sup>[12]</sup>。因此,能快速修复内皮细胞的损伤和内皮细胞的完整性是脑出血最有希望的治疗方法。内皮细胞的修复可以通过内皮细胞的自我复制和骨髓来源的内皮祖细胞的分化<sup>[13]</sup>。但是,这两种修复机制一般是发生在缺血性脑卒中的血管再生,在治疗过程中往往伴随着新生血管的形成。因此,脑血管破裂修复的分子机制还有待阐明。

巨噬细胞与脑损伤、脑出血以及血管发育和重塑等密切相关。为了到达损伤的炎症部位,巨噬细胞在血流运动中通过粘附因子(如 PECAM1 和 ICAM1)与活化的内皮细胞进行物理粘附,然后穿过内皮细胞间的紧密连接结构跨越内皮细胞层迁移<sup>[14]</sup>。此外,巨噬细胞也被报导可通过分泌血管内皮细胞生长因子(VEGF-C)来稳定内皮细胞间的接触和增强血管的复杂性<sup>[15]</sup>。巨噬细胞在血管修复中扮演重要角色。由于缺乏高分辨率体内实时示踪技术,各类细胞参与脑血管修复过程的研究受到

很大限制<sup>[16]</sup>。

最近,西南大学罗凌飞团队在斑马鱼中利用多光子激光束靶向灼伤建立了脑血管定点破裂技术。体内延时成像显示,脑血管破裂损伤后巨噬细胞到达损伤处延长丝状或板状伪足物理粘附于破裂的血管内皮的两端,然后巨噬细胞产生机械牵引力把破裂的血管两端连接起来,稳定内皮细胞间的融合,从而修复破裂的血管<sup>[16]</sup>。另外,他们还发现,微丝的解聚作用和抑制 PI3K 或 Rac1 的活性可破坏巨噬细胞与内皮细胞间的物理粘附和阻止脑血管的修复<sup>[16]</sup>。利用斑马鱼模型建立的脑血管破裂诱导系统,不仅揭示了巨噬细胞通过直接物理粘附和机械牵引治疗脑血管破裂修复的分子机制,也为脑出血的内源性修复疗法的研究奠定了基础。

## 2 斑马鱼在神经退行性疾病中的研究

### 2.1 帕金森氏病

帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病,病理表现为中脑黑质纹状体多巴胺能(dopaminergic, DA)神经元变性缺损及路易小体形成。PD 的易感基因很多, $\alpha$ -synuclein, parkin 和 ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH-L1) 基因是 PD 的三个主要致病基因<sup>[17-19]</sup>。其中,泛素羧基末端水解酶(ubiquitin C-terminal hydrolase, UCH-L1) 基因对多巴胺能神经元有重要作用,其编码的 UCH-L1 蛋白既具有泛素水解酶活性,又具有泛素连接酶活性,同时又有稳定单体的作用。UCH-L1 功能异常会导致蛋白水解途径障碍,使得神经元中异常蛋白聚积,如 PD 特征性病理表现路易小体的形成。斑马鱼 *uch-l1* 与人 *UCH-L1* 同源性高达 79%,并且在神经组织上特异性表达。Son 等<sup>[20]</sup> 通过双荧光原位杂交发现,*uch-l1* 基因与多巴胺能分子标记物酪氨酸羟化酶在 48 hpf 斑马鱼的间脑腹侧共表达,而该区域相当于人类 PD 的病理改变部位—中脑黑质,提示了该基因可能对间脑腹侧多巴胺能神经元的分化具有重要作用,也为研究 PD 的发病机制提供了理想的疾病模型。此外,除了  $\alpha$ -synuclein, parkin 和 *UCH-L1* 外,*DJ-1* 基因也与 PD 有关。Breteau 等<sup>[21]</sup> 在斑马鱼上注射 *DJ-1* MO 敲降 *DJ-1* 基因,发现 *DJ-1* 的敲降会增加多巴胺能神经元对过氧化氢和蛋白酶抑制剂 MG132 的敏感性,使得 *p53* 和 *bax* 表达上调,导致多巴胺能神经元死亡,而加入 *p53* 抑制剂治疗可拯救多巴胺能神经元的死亡。此外,即使没有暴露于毒物,同时敲降 *DJ-1* 和 *p53* 的负调控因子 *mdm2* 也可导致多巴胺能神经元

死亡,提示 *p53* 参与 *DJ-1* 缺陷介导的多巴胺能神经元的死亡。敲降 *DJ-1* 基因构建的 PD 斑马鱼模型,可以用来研究 *DJ-1* 和 *p53* 在 PD 疾病中潜在的上下游信号通路调控机制。

### 2.2 阿尔茨海默病

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以大脑神经细胞外淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid peptides, A $\beta$ )沉积为核心的老年斑、细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化异常聚集形成神经元内神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)以及神经元丢失为主要病理特征的中枢神经系统退行性变性疾病,是痴呆最常见的病因<sup>[22]</sup>。Tau 蛋白属于微管相关蛋白家族,由微管相关蛋白 Tau (microtubule associated protein tau, MAPT) 基因编码,主要分布于神经元内,是 AD 和其他神经退行性疾病中神经纤维缠结的主要成分。Tau 蛋白与微管结合而促进微管的组装和维持微管的稳定性,对轴突的延伸和运输有重要作用<sup>[23]</sup>。AD 的 Tau 蛋白病因假说认为,异常条件修饰下 Tau 蛋白过度磷酸化可生成双螺旋神经丝(paired helical filament, PHF)和 NFTs,使得轴突运输功能障碍和神经元活性下降甚至死亡,最终导致 AD 的发病。在 AD 进程中 Tau 蛋白在神经元轴突的正常分布到神经元胞体出现 NFTs 病理改变,其 Tau 蛋白是如何再分配的还不清楚。为了探讨 Tau 蛋白早期功能改变对神经元的影响,Tomasiewicz 等<sup>[24]</sup> 建立了过表达 Tau 蛋白的转基因斑马鱼,该模型中斑马鱼的神经纤维原细胞上能特异表达人 Tau-GFP 融合蛋白。将导致人 AD 遗传性痴呆的第 17 号染色体上突变的 Tau 基因表达在斑马鱼上会导致神经元骨架的破坏,这与 AD 进程中的 NFTs 的病理改变非常相像。过表达 Tau 蛋白的转基因斑马鱼模型的构建对于神经退行性疾病发展的早期阶段的机制研究至关重要。

除了 Tau 蛋白异常是 AD 的病因外, $\beta$  淀粉样沉积也是 AD 的发病机制之一。A $\beta$  是淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)水解而产生的蛋白片段,很容易积聚沉积形成斑块。目前公认的 A $\beta$  级联假说认为,A $\beta$  代谢异常造成 A $\beta$  片段积聚沉积,而导致了 AD 的发病。AD 淀粉样假说认为 A $\beta$  聚合物是有毒的,因此目前对于 AD 的治疗主要致力于研制能降低 A $\beta$  毒性损害的化合物。 $\beta$  分泌酶( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1)是 A $\beta$  产生的限速酶,也是药物研究的主要靶点。Bace1 是  $\beta$  分泌酶的抑制剂,为了评定斑马鱼体内 *bace1* 的功能和寻找 AD 治疗药物的靶点, van Beber 等<sup>[25]</sup> 利用锌指

核酸酶技术成功构建了 *bace1* 和 *bace2* 基因表达缺失突变的斑马鱼, *bace1* 突变体 (*bace1*<sup>-/-</sup>) 表现出外周神经系统部分缺乏髓鞘和感觉神经节增多的表型, 而 *bace2* 突变体则表现出黑素细胞迁移的表型。 *bace1* 和 *bace2* 双纯合突变体没有表现出单纯合体表型的增强, 提示这两个基因没有明显冗余的生理功能。并且, *bace1* 纯合突变体和 *bace1*、*bace2* 双纯合突变体斑马鱼都是可生育产生下一代的, 提示 *bace1* 是一个 AD 治疗中对机体副作用较小的潜在基因治疗靶点。

### 3 斑马鱼在中枢神经系统脱髓鞘疾病中的研究

多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是最常见的 CNS 白质炎性脱髓鞘病变, 它是自身免疫性疾病。患者 CNS 处的髓鞘或少突胶质细胞上的共同抗原会受到免疫细胞的攻击, 进而导致 CNS 白质髓鞘的脱失。脱髓鞘会严重影响神经冲动的传递, 从而出现各种神经功能障碍。目前对于 MS 的治疗大多是用药物抑制免疫炎症反应, 但是这类免疫抑制剂对于复发进展型 MS 的抑制作用是有限的, 因为它们不能促进 MS 脱髓鞘的再生修复。因此, 近年来对 MS 治疗的研究主要是促进轴突的再髓鞘化<sup>[26]</sup>。CNS 的髓鞘化是由少突胶质细胞粘附包裹神经纤维轴突并引发质膜极化形成多层髓鞘的过程。

生物学上斑马鱼与哺乳动物的髓鞘是同源的。另外, 成像技术和多种转基因斑马鱼品系的发展, 为在体研究髓鞘形成和髓鞘再生提供了一个实时可视化的髓鞘模型<sup>[27]</sup>。CNS 由少突胶质细胞负责髓鞘化。少突胶质细胞可由不同来源的少突胶质前体细胞 (oligodendrocyte progenitor cells, OPCs) 分化而来。Kirby 等<sup>[28]</sup> 在表达绿色荧光蛋白的少突胶质细胞谱系的转基因斑马鱼上用激光束靶向灼伤少突胶质细胞, 通过延时拍摄发现, 当少突胶质细胞灼伤后, 斑马鱼体内的 OPCs 可通过伸伪足运动迁移到灼伤处包裹轴突, 替代损伤的少突胶质细胞而维持髓鞘的功能。且 OPCs 这种迁移运动是由周围的 OPCs 和少突胶质细胞的分布密度决定的。LINGO-1 是少突胶质细胞参与髓鞘形成的一个重要的负调控因子, 它可以抑制 OPC 的分化<sup>[29]</sup>。LINGO-1 可选择性地在中枢神经系统的 OPCs 和神经元上表达<sup>[30]</sup>, 提示与 OPC 分化成熟和髓鞘化有关。

Yin 等<sup>[31]</sup> 将 *LINGO-1b* 基因的启动子序列, 整

合到荧光报告序列的表达载体上, 构建了少突胶质细胞特异性标记的转基因斑马鱼品系。在共聚焦显微镜下检测到 3 dpf 时绿色荧光信号主要分布于脑和脊髓处的少突胶质细胞和某些神经元上。通过注射 morpholino 来敲降斑马鱼 *lingo-1b* 基因后发现, 斑马鱼 Lingo-1 蛋白的下调会促进髓鞘化和 OPC 分化。Tg (*Lingo-1b*:EGFP) 转基因斑马鱼的构建对于研究 OPC 参与髓鞘再生的机制有重要意义。

### 4 斑马鱼在亨廷顿氏舞蹈病中的研究

亨廷顿病 (Huntington's disease, HD) 是一种常染色体显性遗传性神经退行性疾病, 是由致病蛋白的异常积聚和细胞自身清除异常蛋白能力失调造成的, 其临床表现主要为不自主地肢体舞蹈样运动、精神异常和痴呆等。HD 是由编码亨廷顿蛋白 (Huntingtin, Htt) 的 *HD* 基因第一个外显子中 CAG 重复序列异常扩展所致。正常情况下, *HD* 基因编码产物为 Htt 氨基末端的一段多聚谷氨酰胺重复序列 (polyglutamine, PolyQ), 而突变的 *HD* 基因则会编码产生具有超长 PolyQ 结构的突变亨廷顿蛋白 (mutant huntingtin, mHtt)<sup>[32-33]</sup>。以往研究发现, 扩增的 PolyQ 使 mHtt 蛋白形成异常的空间结构而不能被及时降解, 而是错误折叠在神经元核内和神经毡内形成核内聚集物 (intranuclear aggregate) 和神经毡聚集物 (neuropil aggregate)<sup>[34]</sup>, 这种错误的折叠的聚集物可对细胞产生毒性作用。因此, 防止 mHtt 引起的细胞毒性的关键是降低细胞内这种错误折叠的蛋白质聚集。

Hsc70 碳末端相互作用蛋白 (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein, CHIP) 是具有分子伴侣和泛素连接酶功能的蛋白。CHIP 氮端的三十四肽重复单元 (TPR) 结构域负责与 Hsp70 和 Hsp90 等分子伴侣相互作用参与分子伴侣介导的蛋白质折叠过程, 而 E4/U-box 结构域具有泛素 E3 连接酶活性, 负责与蛋白酶体相互作用<sup>[35-36]</sup>。细胞中错误折叠的蛋白质如果不及时清除会形成聚集物对细胞产生毒性。机体的“蛋白质质量监控系统”, 是清除体内异常聚集蛋白的重要途径。CHIP 可与分子伴侣 Hsp70、Hsp90 等分子结合, 引导错误折叠的蛋白进入泛素-蛋白酶体途径降解。因此, CHIP 被称为“分子伴侣依赖的泛素 E3 连接酶”<sup>[37]</sup>。为了探讨 CHIP 在 HD 疾病中对 PolyQ 的作用, Miller 等<sup>[38]</sup> 构建了 PolyQ 积聚 HD 疾病的转基因斑马鱼模型, 并向 PolyQ-GFP 斑马鱼模型注射 CHIP 表达质粒, 发现可以降低斑马鱼胚胎的死亡率并且使胚胎表型

趋于正常。结果表明,CHIP 蛋白可以抑制 PolyQ 的聚集和毒性,这是神经细胞对于错误折叠的 PolyQ 蛋白的一种重要反应手段。这个模型的建立对于研究 CHIP 作为 HD 疾病治疗的潜在靶点有重要作用。

## 5 斑马鱼模型在脊髓损伤修复研究中的应用

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)作为严重的神经损伤,可造成损伤节段以下躯体运动、感觉及自主神经功能障碍。SCI 的修复和治疗一直是研究的热点和难点,如何有效地促进脊髓损伤的修复一直是神经科学领域研究的难题。

实验动物模型对于研究脊髓损伤修复的潜在分子机制是非常重要的。这些动物模型有猴、鼠来进行脊髓损伤的手术,如压迫性损伤、脊髓半切、脊髓完全性横切<sup>[39-41]</sup>。相比于鼠和猴,成年斑马鱼对于神经损伤,显示出强大的神经再生、神经突和功能性突触形成的能力,且在神经损伤时维持低细胞凋亡水平<sup>[42-43]</sup>。因此,斑马鱼 CNS 损伤后非凡的再生能力使其成为研究脊髓损伤修复的理想动物模型。为了研究脊髓损伤修复的分子机制,Shen 等<sup>[44]</sup>和 Zhang 等<sup>[45]</sup>研究团队利用外科手术成功构建了斑马鱼脊髓完全横断损伤模型,并且提供了两个评估斑马鱼脊髓损伤和功能恢复的指标:一是行为学分析斑马鱼手术前后的游动能力,发现脊髓完全横断后的成年斑马鱼 6 周左右可以自主恢复到损伤前的运动水平;二是在形态学上通过生物素逆行性轴索跟踪,发现脊髓损伤后随着时间的推移,脊髓轴突可以穿越横断处向灰质和白质处延伸。斑马鱼脊髓损伤模型的构建对于研究脊髓损伤后轴突再生的分子机制和脊髓损伤的修复机制有重要作用。

## 6 应用展望

斑马鱼基因序列与酵母、线虫和果蝇等相比,与人类的同源性更高(70%~80%)<sup>[46]</sup>。其优势主要体现在以下几个方面:①与人类基因的相似度达 87%,这意味着利用其作为研究模型所得到的结果在多数情况下也适用于人体;②成鱼个体小,繁殖能力强,与鼠相比,斑马鱼体外受精发育,发育快,性成熟周期短,且胚胎身体透明,便于形态学观察;③具有 6000 多种遗传突变,可提供研究人员丰富的正向遗传学品系来进行发育机制上的研究;④Morpholino 反义寡核苷酸、CRISPR/Cas9 等技术的发展,可用逆向遗传学

手法来验证基因的功能。正向遗传学和逆向遗传学的方法相结合来研究斑马鱼遗传发育等的规律,也是斑马鱼目前成为研究人类疾病较好模型的特点之一;⑤斑马鱼的细胞标记技术、组织移植技术、突变技术、转基因技术、基因活性抑制技术等已经成熟。以上这些优点,使得斑马鱼广泛应用于中枢神经系统疾病分子机制的研究。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Lam SH, Wu YL, Vega VB, et al. Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(1): 73-75.
- [2] Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(5): 353-367.
- [3] Suzuki J, Takaku A. Cerebrovascular "Moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain [J]. *Arch Neurol*, 1969, 20(3): 288-299.
- [4] Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene [J]. *J Hum Genet*, 2011, 56(1): 34-40.
- [5] Liu W, Morito D, Takashima S, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for Moyamoya disease and its possible role in vascular development [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22542.
- [6] Kanoke A, Fujimura M, Niizuma K, et al. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-tesla magnetic resonance angiography and histological analysis in mice with the R4859K mutation of RNF213, the susceptibility gene for Moyamoya disease [J]. *Brain Res*, 2015, 1624: 497-505.
- [7] Kobayashi H, Yamazaki S, Takashima S, et al. Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse [M]. 2013: 519-525.
- [8] Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, et al. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-T magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213: a susceptibility gene for Moyamoya disease [J]. *Brain Res*, 2014, 1552: 64-71.
- [9] Wen J, Sun X, Chen H, et al. Mutation of rnf213a by TALEN causes abnormal angiogenesis and circulation defects in zebrafish [J]. *Brain Res*, 2016, 1644: 70-78.
- [10] Yu X, Li YV. Zebrafish as an alternative model for hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2011, 3(2): 88-96.
- [11] Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. *Exp Neurol*, 1966, 16(3): 255-262.
- [12] Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance [J]. *Circulation*, 2007, 115(10): 1285-1295.
- [13] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [14] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, et al. Getting to the site of

- inflammation; the leukocyte adhesion cascade updated [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(9): 678–689.
- [15] Rymo SF, Gerhardt H, Wolfhagen SF, et al. A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15846.
- [16] Liu C, Wu C, Yang Q, et al. Macrophages mediate the repair of brain vascular rupture through direct physical adhesion and mechanical traction [J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 1162–1176.
- [17] Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23 [J]. *Science*, 1996, 274(5290): 1197–1199.
- [18] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism [J]. *Nature*, 1998, 392(6676): 605–608.
- [19] Leroy E, Boyer R, Auburger G, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease [J]. *Nature*, 1998, 395(6701): 451–452.
- [20] Son OL, Kim HT, Ji M H, et al. Cloning and expression analysis of a Parkinson's disease gene, uch-L1, and its promoter in zebrafish [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(3): 601–607.
- [21] Bretau S, Allen C, Ingham PW, et al. p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2007, 100(6): 1626–1635.
- [22] Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11(3): 332–384.
- [23] Poorkaj P, Kas A, D'Souza I, et al. A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau [J]. *Mamm Genome*, 2001, 12(9): 700–712.
- [24] Tomaszewicz HG, Flaherty DB, Soria JP, et al. Transgenic zebrafish model of neurodegeneration [M]. 2002: 734–745.
- [25] van Bebber F, Hruscha A, Willem M, et al. Loss of Bace2 in zebrafish affects melanocyte migration and is distinct from Bace1 knock out phenotypes [J]. *J Neurochem*, 2013, 127(4): 471–481.
- [26] Martino G, Franklin RJ, Baron Van Evercooren A, et al. Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(5): 247–255.
- [27] Buckley CE, Goldsmith P, Franklin RJ. Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination? [J]. *Dis Model Mech*, 2008, 1(4–5): 221–228.
- [28] Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, et al. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(12): 1506–1511.
- [29] Mi S, Miller RH, Lee X, et al. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(6): 745–751.
- [30] Mi S, Sandrock A, Miller RH. LINGO-1 and its role in CNS repair [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10): 1971–1978.
- [31] Yin W, Hu B. Knockdown of Lingolb protein promotes myelination and oligodendrocyte differentiation in zebrafish [J]. *Exp Neurol*, 2014, 251: 72–83.
- [32] A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group [J]. *Cell*, 1993, 72(6): 971–983. [No authors listed]
- [33] Imarisio S, Carmichael J, Korolchuk V, et al. Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies [J]. *Biochem J*, 2008, 412(2): 191–209.
- [34] Li H, Li SH, Cheng AL, et al. Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(7): 1227–1236.
- [35] Ballinger CA, Connell P, Wu Y, et al. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(6): 4535–4545.
- [36] Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, et al. CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 42938–42944.
- [37] Esser C, Alberti S, Hohfeld J. Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1695(1–3): 171–188.
- [38] Miller VM, Nelson RF, Gouvion CM, et al. CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(40): 9152–9161.
- [39] Mehanna A, Jakovcevski I, Acar A, et al. Polysialic acid glycomimetic promotes functional recovery and plasticity after spinal cord injury in mice [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(1): 34–43.
- [40] Nout YS, Ferguson AR, Strand SC, et al. Methods for functional assessment after C7 spinal cord hemisection in the rhesus monkey [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2012, 26(6): 556–569.
- [41] Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(1): 80–90.
- [42] Hui SP, Dutta A, Ghosh S. Cellular response after crush injury in adult zebrafish spinal cord [J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(11): 2962–2979.
- [43] Kroehne V, Freudenreich D, Hans S, et al. Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors [J]. *Development*, 2011, 138(22): 4831–4841.
- [44] Fang P, Lin J F, Pan HC, et al. A surgery protocol for adult zebrafish spinal cord injury [J]. *J Genet Genomics*, 2012, 39(9): 481–487.
- [45] 李强, 郑苏林, 冯瑜菲, 等. 水温改变对斑马鱼脊髓损伤修复的影响 [J]. *中国实验动物学报*. 2017, 25(01): 1–7.
- Li Q, Zheng SL, Feng YF, et al. Effect of water temperature on the recovery of spinal cord injury in zebrafish [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(01): 1–7.
- [46] Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human diseases [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10(3): 252–256.