

刘诗成,张瑞,唐景峰,等. 斑马鱼黑色素瘤模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 416-422.

Liu SC, Zhang R, Tang JF, et al. Research progress in zebrafish melanoma model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 416-422.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.015

斑马鱼黑色素瘤模型研究进展

刘诗成^{1,2}, 张瑞^{1,2}, 唐景峰^{1,2*}, 陈兴珍^{1,2*}

(1. 湖北工业大学 生物工程与食品学院, 武汉 430068; 2. 湖北工业大学 科技部/教育部细胞调控与分子药物“111”引智基地, 武汉 430068)

【摘要】 斑马鱼作为一种新型模式动物已广泛应用于肿瘤疾病的相关研究,例如异种移植观察肿瘤转移、抗肿瘤药物高通量筛选和安全性评价,此模型能够使我们更好的认识肿瘤与机体活动的关系。恶性黑色素瘤是皮肤和其他器官的黑色素细胞产生的一种恶性肿瘤,致死率高且转移性强,且近年来,患病人数激增且呈年轻化趋势。斑马鱼与人类的黑素细胞发育和功能具有高度的保守型和一致性,同时恶性黑色素瘤发生和转移涉及到的信号通路在斑马鱼上高度保守,因此斑马鱼是研究黑色素瘤的发病机理和转移的新型常用模型。本文论述最新的斑马鱼模型运用于黑色素瘤疾病机制的研究的相关成果,及利用斑马鱼进行小分子化合物/药物筛选和研发的现状,最后总结了斑马鱼模型在黑色素瘤研究中的重要价值,将为黑色素瘤发病发生机制、寻找疾病治疗方法提供新的方法和思路。

【关键词】 斑马鱼;黑色素瘤;异种移植;转移

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0416-07

Research progress in zebrafish melanoma model

LIU Shicheng^{1,2}, ZHANG Rui^{1,2}, TANG Jingfeng^{1,2*}, CHEN Xingzhen^{1,2*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China. 2. HBUT National “111” Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics, Hubei University of Technology, Wuhan 430068)

Corresponding author: CHEN Xingzhen. E-mail: xzchen@ualberta.ca; TANG Jingfeng. E-mail: tangjingfeng@hbut.edu.cn

【Abstract】 Zebrafish are commonly used as model animals, and recent developments in techniques such as xenotransplantation for observation of tumor metastasis, and high-throughput screening and safety evaluation of drugs have furthered the study and understanding of diseases. Malignant melanoma is a common malignant skin tumor with high mortality and strong metastasis, and a low 5-year survival rate. In addition, the incidence rate of melanoma has been gradually increasing and the onset age has been getting younger. Zebrafish and human melanocyte development have certain similarities, and the signaling pathways involved in the occurrence and metastasis of malignant melanoma are highly conserved in zebrafish, making zebrafish a common model for studying the pathogenesis and metastasis of melanoma. In this paper, we summarize the application of new zebrafish models and analyze their value for melanoma research.

【Keywords】 zebrafish; melanoma; xenograft; metastasis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 国家自然科学基金(32000523)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China (32000523).

[作者简介] 刘诗成(1995—),男,硕士,研究方向:细胞自噬与代谢调控相关方面研究。Email: 623797978@qq.com

[通信作者] 陈兴珍,男,教授/博导,研究方向:膜蛋白方面研究。Email:xzchen@ualberta.ca;
唐景峰,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:细胞自噬与代谢调控,蛋白工程及分子药物方向研究。
Email: tangjingfeng@hbut.edu.cn。
* 共同通信作者

斑马鱼 (*Danio rerio*) 是生活在印度和南亚的热带淡水鱼, 成年野生型雄性斑马鱼身体细长, 雌性斑马鱼腹部有微微隆起, 长度 3 ~ 6 cm, 背部有深色条纹纵横类似斑马, 寿命约为 3 ~ 5 年。斑马鱼具有其他模式动物 (如小鼠) 所不具备的天然优势, 例如体外受精、体外发育、性成熟快、繁殖力强及饲养成本低。斑马鱼最独特的优势是斑马鱼胚胎发育在体外进行, 早期胚体透明, 适用于整体成像和实时活体观察^[1]。

斑马鱼在生命科学研究领域发挥着越来越明显的作用, 因为其基因组与人类基因组有着高度同源性, 在调控疾病的一些信号通路高度保守, 在血液、视觉、神经系统等方面与人类有着相似的机制^[2-4]。使得其本身可以作为模式生物应用于大部分人类的生态和疾病研究。同时, 因为现阶段各种针对性基因下调技术或者敲除技术的发展, 更高效的异种移植技术, 极大程度地推进了斑马鱼在各种疾病机制与病理上的研究进度。

恶性黑色素瘤是较为常见的恶性皮肤癌的一种, 是目前全球增速最快的恶性肿瘤, 且具有高度转移性以及强致死性。它们遍布全身, 通常存在于皮肤中, 部分还可渗透进葡萄膜, 脑膜和粘膜组织等组织^[5]。中国黑色素瘤患者在不断增多且呈年轻化, 5 年生存率仅为 65%, 远低于欧美发达国家的 80%。目前对于黑色素瘤的治疗主要还是外科手术, 早期黑色素瘤患者经过手术治疗可以获得较好的控制^[6]。然而, 近几十年来对中晚期黑色素瘤的治疗尚未有效果明显的治疗方法。除大剂量注射 IL-2 和达卡巴嗪以外, 世界各国还未批准过任何一种新药用于晚期黑色素瘤患者的治疗。黑色素瘤发生受到多种基因的调控, 比如黑色素细胞诱导转录因子 (melanocyte inducing transcription factor, Mitf)、B-Raf 原癌基因 (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase, BRAF)、细胞质多聚腺苷酸化原件结合蛋白 4 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4, CPEB4) 等^[7]。黑色素瘤极易发生转移, 初期进入到皮下组织。之后色素瘤细胞会通过血管系统和淋巴系统扩散至继发部位^[8]。

当前, 利用斑马鱼模型研究黑色素肿瘤, 有一系列的报道。

1 斑马鱼作为动物模型研究黑色素瘤的优势

目前常用的模式生物有果蝇、酵母、小鼠、斑马

鱼等。黑色素瘤是皮肤癌的一种, 黑色素前体细胞的胚胎发育在小鼠上高度保守, 这使得小鼠更适合模拟人黑色素瘤的病理特征。目前主要是小鼠黑色素瘤模型, 通常是将黑色素瘤细胞注入裸鼠体内来观察成瘤情况。恶性黑色素瘤的高转移性一直是棘手的问题, 肿瘤的转移以及微环境间的相互作用对肿瘤的治疗有着很大的影响, 小鼠模型在实时追踪肿瘤以及观测微环境变化这一方面还是有一定的限制^[9-10]。

斑马鱼作为在机体内研究黑色素肿瘤发生和发展的模型具有独特的优势。斑马鱼与人类黑色素细胞相关的信号通路高度保守, 透明的转基因斑马鱼可以应用活体成像帮助我们更好的观察体内的黑色细胞变化。斑马鱼和哺乳动物的黑色素细胞高度相似。在这两个类群中, 黑色素细胞前体 (黑素母细胞, 起源于背部的神经嵴细胞的一个子集) 迁移到它们在动物皮中的最终目的地。调节黑素细胞的规格, 增殖, 存活, 迁移。参与分化成黑素细胞这一过程的蛋白质在序列和功能上高度保守。恶性黑色素瘤的发生和转移, 涉及到 Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) 和 PI3K/AKT 多种信号通路的调控, 斑马鱼为这类研究提供了一个可靠的载体^[11]。

斑马鱼作为黑色素瘤的模式生物, 在黑色素瘤的相关调控途径中与哺乳动物具有高度同源性, 例如小眼症相关转录因子 Mitf。Raf/Ras/PI3K-AKT 等多种黑色素瘤发生相关信号通路高度保守^[12]。相较于小鼠模型, 斑马鱼因其通体透明可以更好地观察色素的沉积, 血管内的细胞流动, 同时也可以实时观察黑色素瘤的转移, 这一直是肿瘤研究的热点。并且早期的胚胎没有成熟的自体免疫系统, 可通过异种移植肿瘤, 达成更快的成瘤速度, 使得用更短的实验周期来检测药物效果。同时斑马鱼所需要的实验面积相较于小鼠需要的更少, 以及遗传易操作性等多方面优势使得斑马鱼模型为疾病的研究提供了更好的帮助。

2 斑马鱼黑色素瘤模型的建立

当前, 已利用斑马鱼模型建立了多种人类疾病模型 (图 1)^[9,13]。科学家已开发出多种实验技术以建立斑马鱼黑色素瘤模型。主要方法包括化学诱变方法, 利用基因编辑技术构建特异的转基因模型和异种移植的方法。

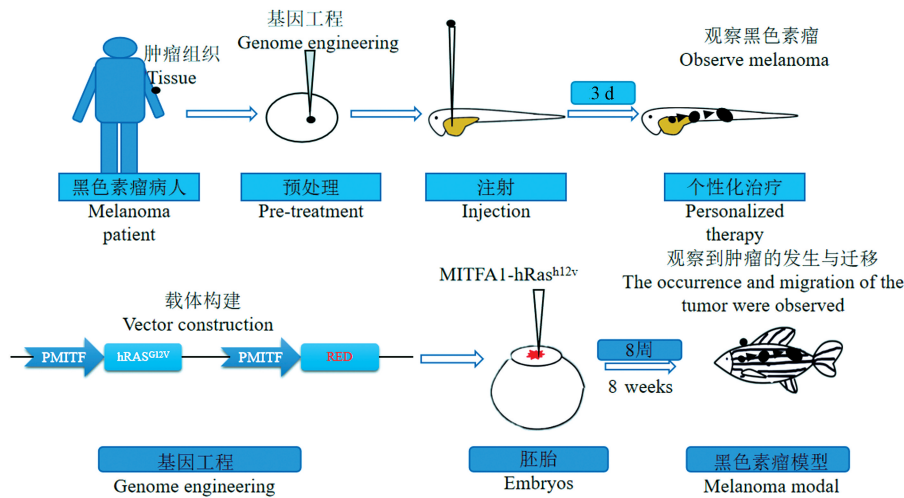


图 1 斑马鱼黑色素瘤模型的建立流程图
Figure 1 Flow chart of zebrafish melanoma model

2.1 异种移植斑马鱼模型的建立

斑马鱼在早期的时候尚未形成成熟的免疫系统,肿瘤异种移植的成功率较高,利用这个优势可以在短时间内让斑马鱼获得人类肿瘤细胞,模拟肿瘤在体内环境的“运动”。运用斑马鱼异种移植模型可以在初期对药物进行筛选,同时可以利用这个特点来观察肿瘤细胞的转移。

Casper 品系的斑马鱼敲除了线粒体内膜蛋白 (mitochondrial inner membrane protein, ROY) 和黑色素细胞诱导转录因子 (melanocyte inducing transcription factor a, NACRE),使其色素生成能力缺失^[14], 通体透明,易于观察。Zhang 等^[15] 基于转基因技术使黑色素瘤细胞系与基因敲除的透明斑马鱼相结合,将斑马鱼特异性黑色素瘤细胞系 (ZMEL1-GFP) 通过不同部位注射入 Casper 斑马鱼体内,观察黑色素瘤与脂肪细胞相关作用。

建立斑马鱼异种移植模型,可以将荧光标记好的人类转移性黑色素瘤细胞移植到囊胚期斑马鱼卵黄囊中。移植的卵细胞表现出存活,增殖,运动性,能够分裂但不发展肿瘤,也没有整合进入器官。细胞散布在整个囊胚的间隙中,通常被定义为原发性肿瘤细胞。之前有发现一种从在牛肝菌蘑菇中提取出的新型凝集素 (boletus edulis lectin β -trefoil, BEL β -Trefoil) 存在着抗肿瘤的作用,为了研究 BEL β -Trefoil 对黑色素瘤迁移能力的影响,Valenti 等^[16] 在胚胎受精 2 d 后用 Tricaine (三卡因) 麻醉,将培养好的肿瘤细胞与 BEL β -Trefoil 孵育,后经显微注射技术,注射到麻醉后的斑马鱼幼虫卵黄囊中,在不同的注射时间后观察,发现 BEL β -Trefoil 可以有效地

降低黑色素瘤在斑马鱼体内的扩散和转移。Ogryzko 等^[17] 建立斑马鱼异种移植黑色素瘤模型,使用电脑软件在斑马鱼体内对黑色素瘤细胞与巨噬细胞之间的相互作用进行成像处理,发现了巨噬细胞会与黑色素瘤相互作用,通过血管内运输,从而转移到更远的地方。

斑马鱼的适宜温度为 28℃,而肿瘤细胞的适宜温度为 37℃。这种差异使得异种移植技术不能长久的观察肿瘤细胞变化,肿瘤细胞生长受到影响。最近新发现了 1 种敲除了 DNA 依赖性蛋白激酶的催化亚基 (protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit, PRKDC) 和白细胞介素 2 受体 (interleukin 2 receptor, gamma a, il2rga) 的斑马鱼模型^[18],可以让斑马鱼适应人体温度 37℃,并利用该模型结合 Casper 鱼系。直接从患者处得到肿瘤细胞,在斑马鱼体内观察生长发育的研究,为个性化治疗提供一种有效思路。

2.2 斑马鱼黑色素瘤转基因模型的建立

在斑马鱼中,有两个 Mitf 基因 (Mitfa 和 Mitfb), Mitfa 对于神经 C 衍生的黑素细胞的发育至关重要。基于转基因技术,将特异性黑色素瘤细胞系与基因敲除的透明斑马鱼相结合, Kim 等^[19] 建立了一个由神经特异性 Mitfa 启动子驱动的人 BRAF^{V600E} 基因,并融合荧光蛋白的转基因斑马鱼品系,从而获得了带绿色荧光标记的斑马鱼特异性黑色素瘤细胞系——ZMEL1-GFP。将 ZMEL1-GFP 癌细胞注射到斑马鱼体内。21 dpf, 100% 的局部植入的皮肤肿瘤出现色素异常堆积,黑色素瘤出现转移并表现出了分化特征^[19]。绿色荧光追踪了黑色素瘤的转移,肿

瘤色素沉积的表型标志了黑素瘤的分化,利用该模型可以实时观察肿瘤转移过程中的分化状态,帮助我们更好的认识黑色素瘤细胞在机体内迁移的过程,因此,此模型可以更好的帮助医疗人员了解疾病发生的进程。在人类黑色素瘤细胞中经常发现 BRAF 和 NRAS 的激活突变。Mitfa 驱动的 NRAS^{Q61K},在 P53 缺失的情况下,也可以稳定的观察到黑色素瘤的生成。Kita 在发育中的黑素细胞组细胞中表达,在 Kita 启动子下表达致癌基因 HRAS^{G12V}。2 ~ 4 周后黑色素细胞在尾部积累,并逐渐形成黑色素瘤^[13]。目前使用的各种斑马鱼黑色素瘤模型都与人类黑色素瘤模型有一定的相似性,都在黑色素瘤的研究中取得了一定的进展。对比各个模型发现影响黑色素瘤的更高的渗透率和更早的发作可能是由于癌基因表达的水平 and 持续性,而不是由于 Kita 和 Mitfa 两个启动子的细胞特异性不同。Scahill 等^[20]发现 7 个月大的赖氨酸 (K) 特异性脱甲基酶 2Aa (lysine (K)-specific demethylase 2Aa, kdm2aa) 缺陷型的鱼可以生成肿瘤,同时发现了黑色素细胞的异常沉积,也是目前发现的第 1 个单基因敲除的黑色素瘤动物模型。

3 斑马鱼在黑色素瘤研究中的应用

3.1 黑色素瘤药物安全性评价模型

斑马鱼因其体型小,胚胎透明,一次繁殖可以多达几百条。同时斑马鱼和哺乳动物在药物毒性评估上具有高度一致性^[21]。这些优势使得斑马鱼可以在多孔板内进行高通量的药物安全性测试,测试各种药物浓度的危险范围及其可能的副作用,一方面可以检查药物对动物发育表型的不利影响,另一方面通过荧光显微镜观察肿瘤的动态。根据各种药物的性质不同,给药方式可以采用水溶,卵黄注射或血液循环注射等方式。一般来说,判断药物毒性可以通过观察心跳变化,生长发育变化等方法。

Fisetin 是一种膳食类黄酮,在抗关节炎和抗癌活性都有一定的作用,为了探究 Fisetin 对黑色素细胞的作用,使用 24 hpf 的斑马鱼,用不同浓度的 Fisetin 进行处理,同时用立体显微镜观察幼虫的体形与心率,算出每组的每分钟平均心跳数,可以发现心率与对照组无差,但同时黑色素细胞有增多。再用 FH535 (WNT/ β -catenin 抑制剂) 处理后加入 Fisetin 发现 FH535 显著下调了 Fisetin 诱导的斑马鱼幼虫中黑色素的生成,同样无明显心脏变化。证

实了 Fisetin 可以在没有毒性的情况下作用于 Gsk-3 β ,抑制其活性,阻断对于 β -catenin 的降解,来促进斑马鱼幼虫黑色素的生成^[22]。茛菪酰胺 (piperlongumine, PL),一种天然生物碱,可以通过增加活性氧水平,来选择性杀死癌细胞。对 6 hpf 的斑马鱼胚胎进行了不同浓度的药物处理,虽然 PL 在一定程度上对斑马鱼胚胎黑色素产生有抑制作用,可高浓度的 PL 使斑马鱼幼虫有明显的脊柱弯曲,PL 表现出了极大的发育毒性^[23],高通量的斑马鱼药物筛选实验大大提高了人类药物的安全性。

传统的肿瘤药物往往带有强烈的副作用,药物到达患处也会受到多种生物学阻碍^[24]。纳米治疗技术的发展,可以将药物靶向到患病部位,减少药物副作用,这将对癌症治疗提供更高效安全的方法。斑马鱼模型的无创实时成像技术将为这项技术提供一个很好的帮助。Kocere 等^[25]验证了载药纳米颗粒在斑马鱼体内的功能。在显微镜下可以看到斑马鱼体内纳米颗粒协助药物聚集到了血管周围的肿瘤区域,并有效减少了癌细胞的增殖与凋亡,保证了更高的存活率,大大降低了肿瘤药物的毒性。

针对不同的药物,要采取不同的给药方式,以达到最好的效果。TLD1433 化合物作为光敏剂可以治疗结膜黑色素细胞^[26],使用 3 种不同的给药方式:水溶暴露、静脉注射和眼后注射,观察各个部位的最大耐受剂量,同时在高剂量下评判该药物的治疗效果,发现在经眼后注射中,该药物对眼部的异位肿瘤有着明显的抑制作用。硫磺粉菌凝集素 (laetiporus sulphureus lectin, LSL) 被发现广泛存在于传统药物中,与其同类型的乙醇提取物 (ethanol extract, LSE) 共同作用能有效抑制肿瘤生长发育,为了验证 LSL 的发育毒性,将 6 hpf 的斑马鱼胚胎暴露在不同浓度的 LSL 和 LSE 中,120 hpf 后检查存活胚胎的心率无异常,在 400 mg/mL 的高剂量下仍没有诱导出毒性。目前,骨髓抑制和中性粒细胞减少是目前多数抗癌药会让患者引起的副作用。使用转基因型斑马鱼胚胎 Tg (mpx:GFP) 进行了 LSL 和 LSE 的骨髓毒性评测,处理后使用荧光显微镜观察,相较于目前市面上的一些抗肿瘤药物,没有发现中性粒细胞减少等副作用,证实了 LSL 和 LSE 不是影响中性粒细胞减少的原因,证明了 LSL 和 LSE 无毒性^[27],为 LSL 用作抗黑色素瘤的安全佐药作出了一定贡献。

3.2 黑色素瘤生成机制的研究

Mitf 是黑色素瘤整个调节网络的中心位置^[28], 且 Mitfa 是黑色素存活和分化的主要调节因子。同时 Mitf 影响了多条黑色素瘤相关的信号通路, 例如 bmp 信号通路的抑制会影响到 Mitfa 表达, 导致黑色素细胞的降低^[29]。之前也有发现低 Mitf 活性加上 P53 突变可以导致黑素瘤的发生^[30]。Santoriello 等^[31]在斑马鱼珍珠母突变型 (Mitfa^{-/-}) 中培养了 Kita-GFP-Ras 鱼系, 9 个月后观察到没有黑素瘤的形成。足以发现 Mitfa 表达对于黑素细胞存活的重要性, 而致癌因子 HRAS^{V12} 的突变不足以使黑色素瘤生成。Lister 等^[32]使用条件性 Mitfa 温度敏感的斑马鱼突变体 (Mitfa^{trc7}) 模型揭示了 Mitf 在黑素瘤中的作用, 该模型会因为温度的不同调节体内 Mitf 的活性, 通过控温将温度控制在 32℃ 时关闭 Mitfa 活性发现黑素瘤消退, 但在将水温重新调回到 26℃ 以下时, 黑色素瘤仍旧会出现, 这一现象表明靶向 Mitf 活性可能是一种有效的抗黑色素瘤机制。Taylor 等^[33]用色素作为标记, 从胚胎头部观察黑色素细胞的发育。再结合热敏感斑马鱼突变体 Mitfa^{trc7}, 观察斑马鱼胚胎发育出黑色素细胞后追踪不同的 Mitf 活性下的斑马鱼黑色素细胞分化生长, 发现 Mitf 的活性变化可以使黑色素细胞分裂的增加, 进一步说明了 Mitf 在黑色素瘤中的重要地位。

BRAF 作为 Raf 家族中的一员, 有超过 80% 的黑色素瘤患者存在 BRAF 或 RAS 突变^[13], 且在 MAPK 信号通路中有着一定的影响。从数据上看, 很大一部分黑色素瘤患者有发生 BRAF^{V600E} 的突变^[34]。目前, 针对 BRAF 突变患者的治疗也是以抑制 MAPK 和 BRAF 为主, 尽管有很好的效果, 但耐药性的发展使得效果不持久也一直是研究的重点。Das 等^[35]发现 AXL 受体酪氨酸激酶 (AXL receptor tyrosine kinase, AXL) 和细胞质膜小凹蛋白 (caveolin-1, CAV-1) 与蛋白耐药性有关, 同时受到 TH1579 (MTH1 抑制剂) 的影响。利用斑马鱼异种移植模型, 观察药物联合 TH1579 可以有效增强对黑素瘤的抑制作用, 为药物治疗的耐药性提供了一种解决方案。

3.3 黑色素瘤转移机制的研究

黑色素瘤是皮肤癌中转移能力较强的一种, 其高致死性也是因为转移所导致的。肿瘤的转移通常包括了血管内, 淋巴道等途径, 恶性黑色素瘤常常表现出较强的血管倾向性^[36]。转移性黑色素瘤

的患者治愈后存活率低, 癌症的转移问题也一直是国内癌症研究的热点。斑马鱼被认为是最好的观察肿瘤转移过程的模式生物, 因为其体态透明。利用斑马鱼黑色素瘤模型可以很好的在显微镜下实时观察到肿瘤由原发到继发的整个转移过程, 这在小鼠肿瘤模型中很难办到, 大量的数据可以更直观的评估肿瘤转移的能力。为了评估细胞的扩散, 通常将分散在整个鱼体内的细胞被定义为转移细胞, 而聚集在注射部位卵黄囊间隙的细胞为非转移细胞。利用斑马鱼模型可以更好的揭示肿瘤转移方式, 帮助我们更好的研究肿瘤运动。

将 BEL β -Trefol 与肿瘤细胞一同注射到斑马鱼体内明显可以看到对细胞扩散和转移形成有一定的抑制作用^[16], 最后, 通过分析总的 RNA 水平, 以及 RUNX 家族转录因子 2 (RUNX family transcription factor 2, RUNX2) 的表达水平, 发现 BEL β -Trefol 可以通过抑制 RUNX2 (其 Hunt 结构域与黑色素瘤的增殖和迁移有关) 来达到抑制肿瘤细胞扩散转移的作用^[37-38]。

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1, Spint1) 突变存在于 10% 的皮肤黑色素瘤患者中。用 Spint1a^{hi2217/hi2217} 的母鱼^[39]分别与 Spint1a^{+/+} (野生型) 和 Spint1a^{hi2217/hi2217} 的公鱼杂交, 对比与野生型杂交, 发现 Spint1 缺陷型会显著增加皮肤黑色素瘤的发生率, 对成年斑马鱼注射 Spint1a 缺失的皮肤黑色素瘤细胞也能观察到更强的侵袭性。用斑马鱼模型揭示了 Spint1 对黑素瘤的调节^[34]。Bcl-2 家族中的 Bcl-xl 是一种常见的抗凋亡蛋白。有研究指出葡萄膜黑色素瘤细胞逃避治疗诱导的凋亡的主要手段之一是通过上调生存 Bcl-2 家族蛋白中的 Bcl-XI^[40-41]。除了抗凋亡外, Gabellini 等^[42]还发现 Bcl-xl 可以调节肿瘤转移的过程, 通过 NF- κ B 途径来影响白细胞介素-8 (C-X-C motif chemokine ligand 8, CXCL8) 的分泌, CXCL8 可以通过激活 CXCR1 与 CXCR2 受体来影响黑色素瘤的进展, 将稳定表达 Bcl-xl 蛋白的黑色素细胞异种移植到斑马鱼卵黄囊中, 对比干扰 CXCL8 细胞表面受体 CXCR1, 发现在干扰 CXCR1 后斑马鱼黑色素瘤未发生明显侵袭, 说明 Bcl-xl 调控肿瘤侵袭依赖 CXCL8 的分泌, 进一步揭示了 Bcl-xl 调控黑色素瘤转移机制。

4 总结与展望

目前, 已利用斑马鱼建立了多种黑色素瘤模型

用于相关的研究。近年来,更多的研究定位于通过可视化的斑马鱼体内,观察肿瘤形成与治疗,同时随着新型转基因型斑马鱼模型的出现,给人类移植细胞提供了一个合适的观察场所。同时,斑马鱼作为黑色素瘤模型,基因编辑后的成年鱼也能保持全身透明,便于观察。纳米治疗技术的发展,可以靶向到患病部位,更好的减少药物副作用,这将对癌症治疗提供更有效更安全的方法,斑马鱼模型的无创实时成像技术将为这项技术提供一个很好的帮助。相信随着科学进步,斑马鱼的应用将会更多的被开发,也将为疾病的解决提供更多的可能性。

参 考 文 献(References)

- [1] Osmani N, Goetz JG. Multiscale imaging of metastasis in Zebrafish [J]. Trends Cancer, 2019, 5(12): 766-778.
- [2] 李志操, 黄波, 向文碧, 等. 红系祖细胞在造血缺陷斑马鱼体内的移植 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 84-89. Li ZC, Huang B, Xiang WB, et al. Transplantation of erythroid progenitor cell in hamatopoietic deficient zebrafish [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 84-89.
- [3] 邸亚男, 朱丽英, 沈婕, 等. 四种有机溶剂对斑马鱼眼睛发育的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 75-80. Di YN, Zhu LY, Shen J, et al. Effects of four organic solvents on eye development of zebrafish [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 75-80.
- [4] Gore AV, Pillay LM, Veneor Galanternik M, et al. The zebrafish: A fintastic model for hematopoietic development and disease [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2018, 7(3): e312.
- [5] Idilli AI, Precazzini F, Mione MC, et al. Zebrafish in translational cancer research: insight into leukemia, melanoma, glioma and endocrine tumor biology [J]. Genes, 2017, 8(9): 236.
- [6] 高原, 商冠宁. 皮肤黑色素瘤的外科治疗现状及研究进展 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2020, 12(2): 100-104. Gao Y, Shang GN. Research progress of surgical treatment for cutaneous melanoma [J]. Chin J Surg Oncol, 2020, 12(2): 100-104.
- [7] 李治, 张林梦, 斯越秀, 等. 恶性黑色素瘤的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2018, 25(1): 70-74. Li Z, Zhang LM, Si YX, et al. Research progress of malignant melanoma [J]. Chin J Pharm Biotec, 2018, 25(1): 70-74.
- [8] Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(11): 1366-1379.
- [9] 周斌, 盛哲津, 冯琛卓, 等. 一种体内实时观察黑色素瘤的斑马鱼模型 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(1): 22-28. Zhou B, Sheng ZJ, Feng CZ, et al. A melanoma zebrafish model for real-time imaging *in vivo* [J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(1): 22-28.
- [10] Pérez-Guijarro E, Day CP, Merlino G, et al. Genetically engineered mouse models of melanoma [J]. Cancer, 2017, 123(S11): 2089-2103.
- [11] Michailidou C, Jones M, Walker P, et al. Dissecting the roles of Raf- and PI3K-signalling pathways in melanoma formation and progression in a zebrafish model [J]. Dis Model Mech, 2009, 2(7-8): 399-411.
- [12] Hamilton N, Diaz-De-Cerio N, Whitmore D. Impaired light detection of the circadian clock in a zebrafish melanoma model [J]. Cell Cycle, 2015, 14(8): 1232-1241.
- [13] van Rooijen E, Fazio M, Zon LI. From fish bowl to bedside: The power of zebrafish to unravel melanoma pathogenesis and discover new therapeutics [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2017, 30(4): 402-412.
- [14] White RM, Sessa A, Burke C, et al. Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 183-189.
- [15] Zhang MM, Di Martino JS, Bowman RL, et al. Adipocyte-derived lipids mediate melanoma progression via FATP proteins [J]. Cancer Discov, 2018, 8(8): 1006-1025.
- [16] Valenti MT, Marchetto G, Perduca M, et al. BEL β -trefoil reduces the migration ability of RUNX2 expressing melanoma cells in xenotransplanted zebrafish [J]. Molecules, 2020, 25(6): 1270.
- [17] Ogryzko N, Feng Y. Helping hand for melanoma invasion: Transparent zebrafish can catch macrophages in the act [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2018, 31(4): 459-460.
- [18] Yan C, Brunson DC, Tang Q, et al. Visualizing engrafted human cancer and therapy responses in immunodeficient zebrafish [J]. Cell, 2019, 177(7): 1903-1914. e14.
- [19] Kim IS, Heilmann S, Kansler ER, et al. Microenvironment-derived factors driving metastatic plasticity in melanoma [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14343.
- [20] Seahill CM, Digby Z, Sealy IM, et al. Loss of the chromatin modifier Kdm2aa causes BrafV600E-independent spontaneous melanoma in zebrafish [J]. PLoS Genet, 2017, 13(8): e1006959.
- [21] 钟健, 朱佳瑞, 何欣宇, 等. 斑马鱼模型在纳米毒理学中的研究应用与进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 107-113, 118. Zhong J, Zhu JR, He XY, et al. Application and progress of zebrafish model in nanotoxicology [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 107-113, 118.
- [22] Molagoda IMN, Karunaratne WAHM, Park SR, et al. GSK-3 β -targeting fisetin promotes melanogenesis in B16F10 melanoma cells and zebrafish larvae through β -catenin activation [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(1): 312.
- [23] Jeon HJ, Kim K, Kim YD, et al. Antimelanogenic activities of piperlongumine derived from Piper longum on murine B16F10 melanoma cells *in vitro* and zebrafish embryos *in vivo*: its molecular mode of depigmenting action [J]. Appl Biol Chem,

- 2019, 62(1): 1–7.
- [24] Tran S, Degiovanni PJ, Piel B, et al. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery [J]. Clin Transl Med, 2017, 6(1): 44.
- [25] Kocere A, Resseguier J, Wohlmann J, et al. Real-time imaging of polymersome nanoparticles in zebrafish embryos engrafted with melanoma cancer cells: Localization, toxicity and treatment analysis [J]. EBioMedicine, 2020, 58: 102902.
- [26] Chen Q, Ramu V, Aydar Y, et al. TLD1433 photosensitizer inhibits conjunctival melanoma cells in zebrafish ectopic and orthotopic tumour models [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(3): 587.
- [27] Petrović J, GlamoLAMOčljja J, Ilić-Tomić T, et al. Lectin from Laetiporus sulphureus effectively inhibits angiogenesis and tumor development in the zebrafish xenograft models of colorectal carcinoma and melanoma [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 148: 129–139.
- [28] 马家芳, 孔燕, 郭军. MITF 在黑素瘤中的研究现状及进展 [J]. 肿瘤, 2013, 33(12): 1130–1134.
Ma JF, Kong Y, Guo J. Research status and progress of MITF in melanoma [J]. Cancer, 2013, 33(12): 1130–1134.
- [29] Gramann AK, Venkatesan AM, Guerin M, et al. Regulation of zebrafish melanocyte development by ligand-dependent BMP signaling [J]. eLife, 2019, 8: e50047.
- [30] Travnickova J, Wojciechowska S, Khamseh A, et al. Zebrafish MITF-low melanoma subtype models reveal transcriptional subclusters and MITF-independent residual disease [J]. Cancer Res, 2019, 79(22): 5769–5784.
- [31] Santoriello C, Gennaro E, Anelli V, et al. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish [J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15170.
- [32] Lister JA, Capper A, Zeng Z, et al. A conditional zebrafish MITF mutation reveals MITF levels are critical for melanoma promotion vs. regression *in vivo* [J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(1): 133–140.
- [33] Taylor KL, Lister JA, Zeng Z, et al. Differentiated melanocyte cell division occurs *in vivo* and is promoted by mutations in Mitf [J]. Development, 2011, 138(16): 3579–3589.
- [34] Gómez-Abenza E, Ibáñez-Molero S, García-Moreno D, et al. Zebrafish modeling reveals that SPINT1 regulates the aggressiveness of skin cutaneous melanoma and its crosstalk with tumor immune microenvironment [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 405.
- [35] Das I, Gad H, Bräutigam L, et al. AXL and CAV-1 play a role for MTH1 inhibitor TH1579 sensitivity in cutaneous malignant melanoma [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(7): 2081–2098.
- [36] Bentolila LA, Prakash R, Mihic-Probst D, et al. Imaging of angiotropism/vascular Co-option in a murine model of brain melanoma: implications for melanoma progression along extravascular pathways [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23834.
- [37] Perduca M, Dalle Carbonare L, Bovi M, et al. Runx2 downregulation, migration and proliferation inhibition in melanoma cells treated with BEL β -trefoil [J]. Oncol Rep, 2017, 37(4): 2209–2214.
- [38] Deiana M, Dalle Carbonare L, Serena M, et al. New insights into the runt domain of RUNX2 in melanoma cell proliferation and migration [J]. Cells, 2018, 7(11): 220.
- [39] Mathias JR, Dodd ME, Walters KB, et al. Live imaging of chronic inflammation caused by mutation of zebrafish Hai1 [J]. J Cell Sci, 2007, 120(19): 3372–3383.
- [40] Némati F, de Montron C, Lang G, et al. Targeting Bcl-2/Bcl-XL induces antitumor activity in uveal melanoma patient-derived xenografts [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e80836.
- [41] Bush JA, Li G. The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma [J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(6): 531–539.
- [42] Gabellini C, Gómez-Abenza E, Ibáñez-Molero S, et al. Interleukin 8 mediates bcl-xL-induced enhancement of human melanoma cell dissemination and angiogenesis in a zebrafish xenograft model [J]. Int J Cancer, 2018, 142(3): 584–596.

[收稿日期] 2021-08-24