

王洁,冯驰,董武,等. 斑马鱼肝纤维化动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(4): 531-540.

Wang J, Feng C, Dong W, et al. Application and progress of zebrafish in the study of liver fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(4): 531-540.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.04.014

斑马鱼肝纤维化动物模型研究进展

王洁^{1,2}, 冯驰^{1,2}, 董武^{1,2*}, 杨景峰^{1,2*}

(1. 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古 通辽 028000; 2. 内蒙古民族大学毒物监控
及毒理学重点实验室, 内蒙古 通辽 028000)

【摘要】 斑马鱼因胚胎光学透明、发育快以及药物可以通过皮肤和鳃渗入体内等原因, 被广泛应用于肝疾病的相关研究。肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是指由各种致病因子所致的肝内结缔组织异常增生的一种病理生理变化, 许多慢性肝病均可引起 HF。由于斑马鱼 HF 发生所涉及的信号传导机制与人类相似, 目前已成功构建斑马鱼肝纤维化模型。本文论述国内外斑马鱼 HF 模型研究的相关成果和肝纤维化治疗药物筛选的现状, 旨在为探索肝纤维化发病机制、寻找 HF 治疗药物及斑马鱼 HF 模型的合理应用提供指导。

【关键词】 斑马鱼; 肝纤维化; 模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 04-0531-10

Application and progress of zebrafish in the study of liver fibrosis

WANG Jie^{1,2}, FENG Chi^{1,2}, DONG Wu^{1,2*}, YANG Jingfeng^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China.

2. Inner Mongolia Key Laboratory of Toxicant Monitoring and Toxicology, Tongliao 028000)

Corresponding author: YANG Jingfeng. E-mail: yangjf@imun.edu.cn; DONG Wu. E-mail: dongwu2002@hotmail.com

【Abstract】 Zebrafish are widely used in liver disease research because of the optical transparency of embryos, rapid development, and drug penetration into the body through the skin and gills. Hepatic fibrosis (HF) is a pathophysiological change in abnormal proliferation of connective tissue in the liver caused by various pathological factors. HF can be caused by many chronic liver diseases. Because the signaling mechanism involved in the occurrence of HF in zebrafish is similar to that in humans, a zebrafish liver fibrosis model has been successfully established. This article discusses the relevant result of zebrafish HF model research and the current status of drug screening for liver fibrosis therapy domestically and abroad to provide guidance for research into the pathogenesis of liver fibrosis, screening for drug treatments of HF, and rational application of the zebrafish HF model.

【Keywords】 zebrafish; hepatic fibrosis; model

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

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 实质是肝炎的康复过程, 当损伤因素的持续存在造成肝细胞损伤超过肝本身的再生能力时, 会加剧 HF 并进展为肝硬化, 甚至转变为肝癌 (hepatocellular carcinoma,

HCC)。对于终末期肝病而言, 肝移植手术是唯一有效的治疗方法, 但肝供体稀缺、免疫排斥反应剧烈等问题无法从根本上得到解决。因此, 明确 HF 的生物学特性和发病机制, 进而根本防治 HF 成为

【基金项目】 国家自然科学基金 (82060672), 内蒙古民族大学研究生科研创新资助项目 (NMDSS2146)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82060672), Inner Mongolia Minzu University Postgraduate Research and Innovation Funding Project (NMDSS2146).

【作者简介】 王洁 (1998—), 女, 硕士, 研究方向: 以模式动物斑马鱼为对象的药理学。Email: wjlyhang@163.com

【通信作者】 杨景峰 (1974—), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 以模式动物斑马鱼为对象的药理学。Email: yangjf@imun.edu.cn;

董武 (1969—), 男, 博士, 教授, 硕士及博士生导师, 研究方向: 环境持久性有机污染物生物监测。

Email: dongwu2002@hotmail.com.

* 共同通信作者

肝病研究工作者面临的主要问题^[1]。啮齿动物模型已被广泛应用于 HF 研究中,但其存在养殖成本高、实验周期长、无法进行药物高通量筛选等问题。即使是在啮齿动物肝病研究技术已经成熟的条件下,单一的动物模型也不能概括人类肝疾病的各个方面。因此,结合多种动物模型更有利于理解 HF 疾病。斑马鱼是一种被广泛用作生理学、毒理学及分子遗传学研究的脊椎类模式动物。利用斑马鱼建立 HF 模型既具有实验周期短、成模效率高、造模费用低等优点,又具有啮齿类动物实验可比度高、预测性强等优势,可以有效地弥补体内和体外实验之间的巨大生物学断层^[2]。本文将对于斑马鱼在 HF 中的应用进行综述,并总结其优势及不足,以期作为斑马鱼在 HF 领域的研究提供参考。

1 HF 发生机制简介

药物引起的肝损伤、酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)、非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)、病毒感染和遗传性肝病等都会使肝结构遭到不同程度的破坏,进而触发 HF。HF 伴随着细胞外基质(extracellular matrix, ECM)分泌增多、降解减少。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)可转分化为表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB),因此, HSC 被认为是 HF 的关键细胞^[3]。HSC 相邻的多种细胞分泌促炎和促纤维化因子,通过各种信号通路促进/抑制 HF 发生发展。包括转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)/Smad 信号转导、TGF- $\beta 1$ /非 Smad 信号通路、Wnt/ β -连环蛋白信号通路、hedgehog(Hh)信号通路、Notch 信号通路以及脂质代谢和氧化应激等。其中最主要的是 TGF- β 信号通路。活化的 TGF- β 与其 II 型受体结合,其受体复合物与 TGF- β I 型受体形成 T β R I/T β R II 复合体,进而激活 Smads 蛋白,使其持续磷酸化,最终激活 HSC^[4-5]。在 TGF- $\beta 1$ /非 Smad 信号通路中, TGF- β I 受体调控 T β R I/T β R II 复合体,激活一系列下游信号通路,发挥促 HF 功能^[6-7]。除邻近细胞的旁分泌外, HSC 产生的活性氧也会触发 HSC 活化和凋亡,还伴随着 ECM 分泌增多。也有研究表明,活性氧(reactive oxygen species, ROS)可以介导 TGF β 诱导的 HSC 活化和肝细胞凋亡^[8]。

2 斑马鱼 HF 模型诱导方法

目前,建立斑马鱼 HF 模型的方法主要有:向养殖水中加入诱导药物、饲喂高脂饮食(high fat diet, HFD)、应用转基因技术等,所建立的 HF 模型都具有良好的稳定性和重复性。本文综述的诱导方法汇总于表 1。

2.1 酒精诱导斑马鱼 HF 模型

斑马鱼通过直接浸泡在含有乙醇的养殖水中完成 HF 造模,可以避免饲喂过程中动物因饲料采食不均而出现成模差异。雌性斑马鱼对乙醇的敏感性会随暴露时间增长而增加,故多选择雄性斑马鱼进行实验^[9-10]。斑马鱼暴露于 1% 乙醇 8 周或 0.2% 乙醇 4 周后,肝出现炎症因子浸润、ECM 蓄积等 HF 阶段特征^[11-12]。与野生型斑马鱼相比,使用甲硝唑(metronidazole, Mtz)/硝基还原酶(nitroreductase, NTR)系统构建的基因工程斑马鱼经过乙醇处理会显著加快 HF 进程^[13]。斑马鱼幼鱼在 4 hpf(hours post fertilization)就可以代谢酒精,且此过程中所涉及的基因在幼鱼中是高度保守的^[14-16]。Chu 等^[17]建立了斑马鱼幼鱼先天性糖基化障碍 I b 型(MPI-CDG)模型,并指出发育早期 MPI 消耗可以驱动 HF 发生。DeRossi 等^[18]用 2% 乙醇处理上述转基因斑马鱼,观察到纤维化相关基因表达上调,而调节甘露糖代谢途径可以实现对 HF 的抑制。但在乙醇诱导的斑马鱼体内,未观察到晚期 HF 和肝硬化病理变化,因此上述模型更适合早期 HF 研究。

2.2 高脂饮食诱导斑马鱼 HF 模型

高脂饲喂转基因斑马鱼 2 个月后诱导 HF 的发生。岩藻依聚糖(i.e. oligo-fucoidan, OF)治疗或高脂饮食后运动(high-fat diet plus exercise, HEX)可以有效缓解成鱼的 HF^[19-20]。Turola 等^[21]通过研究更年期与 HF 的关系时发现,卵巢分泌的雌激素对 HF 具有抑制作用,卵巢衰老会加速 HF 形成。小鼠可以通过卵巢摘除手术诱发 HF,而斑马鱼随着卵巢的衰老也会发生 HF,这是一种类似于人类的自发过程。

2.3 化学药物诱导斑马鱼 HF 模型

2.3.1 硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)

TAA 在肝中转化为硫氢化合物诱导肝细胞膜损伤,进一步导致肝细胞坏死。此模型更适合早期肝硬化的研究,当增加给药剂量或延长实验周期可诱发急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)和 HCC。

成鱼每周 3 次腹腔注射 TAA (300 mg/kg), 连续 6 周显示造模成功^[22-24]。研究发现幼鱼经 TAA 浸泡处理后肝内可出现与腹腔注射 TAA 相似的脂肪变性和胶原纤维沉积现象^[25]。使用 25 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 的山奈酚-3-O-芸香糖苷治疗后, $\alpha\text{-SMA}$ 和 Collagen-I 基因表达显著下调, 提示山奈酚-3-O-芸香糖苷具有 HF 治疗药物的潜力^[26]。

2.3.2 二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN)

DEN 为水溶性物质且理化性质稳定, 可直接水浴给药^[27]。浓度范围为 150 ~ 200 mg/L, 常用浓度为 200 mg/L, 4 ~ 6 周可获得稳定的斑马鱼 HF 模型^[28-29]。I 型胶原纤维的大量沉积被认为是 HF 发生的标志, 牛大力水提物及一些新型抗 HF 药物均可通过抑制胶原纤维合成减轻 HF^[30]。

2.3.3 溴化聚苯乙烯 (brominated polystyrene, BPS)

BPS 与 DEN 类似, 更倾向于导致脂质代谢紊乱引起斑马鱼 HF。研究表明, BPS 能促进脂肪在血管内壁和肝中蓄积^[31]。短期 BPS 暴露后, 给予 90 d 的净化期, 肝脂质积累得到恢复。若幼鱼长时间暴露于 BPS, 使肝内未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 被激活, 导致雄性斑马鱼肝中三酰基甘油过量积累, 逐渐发展为 HF^[32]。斑马鱼肝细胞组成成分与哺乳动物相似, 但肝缺乏小叶结构, 导致幼鱼肝中 ECM 蓄积与人类和啮齿动物不同。

2.3.4 其他药物

重楼是一种具有抗菌消炎功效的中药。根据提取剂的不同可将重楼提取物分为很多种, 其中乙酸乙酯提取物 (AcOEtE) 会引起肝脂质代谢紊乱并引发幼鱼 HF^[33-34]。红霉素滥用会导致肝细胞损伤, 相比之下阿奇霉素的半衰期更长。0.5 ~ 2 mmol/L 阿奇霉素水浴染毒 72 h 后, 观察到幼鱼肝颜色加深, 肝面积减小。随着给药浓度增加, 两种药物的存在均能引发肝内 *tgfb1* 基因表达上调^[35]。TGF- β 包括 33 个家族蛋白, 其中 Tgf- β 1 在 HSC 活化、上皮间质转化、ECM 产生等过程中起关键作用。在米非司酮诱导 Tgf- β 1 基因过表达斑马鱼肝中发现, 层粘连蛋白和胶原蛋白表达显著增加^[36-37]。TGF 信号通路被认为与 HF 密切相关, 因此, 该模型可用于分析 Tgf- β 1 在 HF 发展过程中的作用。

2.4 遗传操作斑马鱼 HF 模型

2.4.1 HBV/HCV 转基因斑马鱼

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 宿主范围极窄, 建立动物模型比较困难^[38]。转基因斑马鱼

的出现就很好地解决了这个难题。通过显微注射 pFL-GIC (HCV IRES 介导核心蛋白 Core 表达) 和 pFL-5AiR (含有 HCV NS5A 的表达质粒) 构件显示, Core 与 NS5A 协同上调 *Tgf- β* 的转录水平, 促使 HSC 转化为 MFB, 分泌大量 ECM, 产生纤维化作用^[39]。在维生素 B₁₂ 处理后, HCV 转基因斑马鱼肝内 *Tgf- β* 和乙酰肝素酶等 HF 标志物表达下调, 表明维生素 B₁₂ 对 HF 有一定的抑制作用^[40]。临床上乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)/HCV 合并感染比单一病毒感染更易引发 HF 和肝硬化。1 月龄 HBx+HCP 转基因斑马鱼肝细胞已发生气球样变、胆管扩张及 HF 等^[41]。

2.4.2 β -catenin 转基因斑马鱼

在慢性或严重肝损伤时, 肝祖细胞 (liver progenitor cell, LPCs) 增殖分化为肝细胞或胆管细胞参与肝再生。但研究表明, LPCs 的数量往往与肝疾病的发展程度成正比。此外, LPCs 还会分泌促炎症细胞因子, 故长期存在会加剧炎症和纤维化^[42-43]。So 等^[44]建立了一种新的斑马鱼模型, 即 *Tg (fabp10a:pt- β -catenin)*^{s704}, 该模型可在肝细胞特异性启动子 *Fabp10a* 作用下促进肝细胞出现 DNA 损伤和凋亡, 受损的肝细胞还可引起炎症、LPCs 活化以及 HF, 通过抑制 *EGFR-ERK-SOX9* 轴可促进大量的 LPCs 向肝细胞分化, 参与受损肝的修复。

2.4.3 Sox9b 基因敲除突变体

胆汁淤积是由多种肝内和肝外淤胆原因导致胆汁分泌或排泄障碍, 伴随着胆管细胞和肝细胞损伤, 最终导致 ECM 在肝内过度蓄积^[45]。胆管结扎术 (bile duct ligation, BDL) 是建立小鼠和大鼠胆汁淤积性 HF 模型的方法之一, 但应用该方法建立的 HF 模型死亡率较高, 且不适用利胆药物的作用评价。*Sox9* 基因主要表达于胆管细胞, 在慢性肝损伤时, 肝细胞内的 *Sox9* 基因表达上调。与人类和小鼠不同, 斑马鱼基因组存在两个 *Sox9* 同源基因, 分别为 *Sox9a* 和 *Sox9b*^[46-47]。4 dpf (days post fertilization) 斑马鱼肝部位具有较强的 *Sox9a/b* 基因表达信号, *sox9b*^{h313} 基因突斑马鱼在 5 mpf (months post fertilization), 由于胆汁淤积使得肝和胰腺均出现纤维化样病变^[48]。

2.4.4 MicroRNA-21 (miRNA-21) 转基因斑马鱼

MicroRNA-21 (miRNA-21) 转基因斑马鱼在 6 mpf, 可明显观察到肝细胞内的胞质透明包涵体 (Mallory-Denk bodies, MDBs) 增多并伴随炎症和 HF

的发生。如同时用 DEN 处理 3 ~ 9 个月,会加快 HF 的发生和发展^[49]。与单一化学试剂法相比,使用转基因技术和 DEN 联合处理可以大大缩短实验周期。

2.4.5 Tol2 转座子介导的转基因斑马鱼

内皮素(endothelin, ET)来源的主要场所为肝,在 ET 的 3 个蛋白质家族(Edn1、Edn2、Edn3)中, *Edn1* 基因具有调控炎症反应和脂肪细胞分化的作用。HSC 的活化被认为是 HF 发生的核心,而肝内 ET 的受体也位于 HSC 上^[50]。*edn1* 转基因斑马鱼在 3 ~ 11 mdp,肝内胶原纤维表达逐渐增高^[51]。

上皮细胞通过上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)转化为 MFB 最终参与 HF^[52]。研究发现, *Dact2* 基因缺失会加速 EMT^[53]。Su 等^[54]使用两种转基因斑马鱼研究极光激酶 A(Aurora A)在肝中的作用,发现 *AURKA(V352I)* 转基因斑马鱼早于 *AURKA(WT)* 转基因斑马鱼 2 个月发生 HF,在 5 ~ 7 mpf 两种转基因鱼肝中 *Ctgfa* 和 *Hpse* 基因的表达上调,并逐渐进展为 HCC。对于小鼠转基因模型来说,即使经过长期诱导肝癌发生率仍然较低^[55]。由此可以看出,斑马鱼比小鼠更为敏感,更适合人类肝疾病模型的建立。

2.4.6 Tet-off/Tet-on 调控系统

HF 程度常常与 HCC 进展呈负相关,即在 HCC 早期 HF 标志物表达上调,晚期则出现下调的趋势。7 ~ 12 月龄 *Gankyrin* 转基因斑马鱼会自发胆管炎、肝脂肪变性、HF、HCC 等一系列病理变化^[56]。Yan 等^[57]经免疫染色发现, *Kras^{V12}* 转基因斑马鱼肝内 Collagen I 和层粘连蛋白大量沉积、活化 HSC 的比例显著增加。加入西仑吉肽后,转基因斑马鱼 HF 指标明显降低。

在上述 HF 模型中,药物造模应用时间较早,虽然有一定的成功率,但其缺乏统一的操作标准使得造模成功率不同。HF 的发生是一个缓慢进程,药物诱导模型可以更全面地复刻人类 HF 各个阶段的特征病变,但药物相加作用及不同药物作用机制的不同,药物 HF 模型对药物开发也存在一定的局限性。近些年,由于技术手段的创新,研究人员已经通过修改斑马鱼的基因组,来实现特定基因在肝部位的可控表达,并且在除去诱导因素后,基因在肝部位表达随之减弱,引发的肝病变也会停滞。同时,部分转基因斑马鱼后代可以稳定自发形成 HF 且会快速进展为 HCC,因此转基因 HF 模型更适合研究 HF 发病进程的机制及药物开发。

表 1 斑马鱼 HF 模型
Table 1 Zebrafish liver fibrosis model

暴露起始 时期 Period of onset of exposure	诱导药物/ 修饰基因 Inducing drug/ modifying gene	剂量 Dose	方法 Method	实验周期 Experimental period	成模依据 Mold basis	参考文献 References
7 mpf	乙醇 Ethanol	1%	暴露于乙醇水溶液 Exposure with ethanol	3 个月 3 months	天狼星红染色、免疫荧光染色,胶原纤维沉积; <i>Col1a1a</i> 、 <i>Hpse2</i> 、 <i>Mmp2</i> 、 <i>Tgfb1a</i> 、 <i>Timp2a</i> 表达上调 IF and Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver; expression up-regulation of <i>Col1a1a</i> , <i>Hpse2</i> , <i>Mmp2</i> , <i>Tgfb1a</i> , <i>Timp2a</i>	[11]
8 mpf	乙醇 Ethanol	0.2%	暴露于乙醇水溶液 Exposure with ethanol	4 周 4 weeks	<i>Col1a1a</i> 表达上调 Expression up-regulation of <i>Col1a1a</i>	[12]
12 mpf	EtOH/MTZ	-	暴露于乙醇水溶液 Exposure with ethanol	3 d	Collagen I 沉积 Deposition of Collagen I	[13]
1 ~ 4 胚 胎期 1 ~ 4 cell embryo	<i>mpi</i> +乙醇 <i>mpi</i> +ethanol	2%	暴露于乙醇水溶液 Exposure with ethanol	5 d	MASSON、免疫荧光染色,胶原纤维沉积; <i>Col1a1a</i> 、 <i>Acta2</i> 表达上调 IF and MASSON staining, deposition of collagen fibers in liver; expression up-regulation of <i>Col1a1a</i> , <i>Acta2</i>	[18]
3 mpf	高脂饲喂 High-fat feeding	83 mg	-	2 个月 2 months	天狼星红染色,胶原纤维沉积; <i>Ctgfa</i> 、 <i>Hpse</i> 、 <i>Col1a1a</i> 表达上调 Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver; expression up-regulation of <i>Ctgfa</i> , <i>Hpse</i> , <i>Col1a1a</i>	[19]

续表1

暴露起始 时期 Period of onset of exposure	诱导药物/ 修饰基因 Inducing drug/ modifying gene	剂量 Dose	方法 Method	实验周期 Experimental period	成模依据 Mold basis	参考文献 References
6 mpf	高脂饲喂 High-fat feeding	20%	—	12 周 12 weeks	MASSON 染色, 胶原纤维沉积; α -SMA 表达上调 MASSON staining, deposition of collagen fibers in liver; expression up-regulation of α -sma	[20]
18 mpf	高脂饲喂 High-fat feeding	20 mg	—	24 周 24 weeks	天狼星红染色, 胶原纤维沉积; $Tgf-\beta$ 表达上调 Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver; expression up-regulation of $Tgf-\beta$	[21]
2 hpf	HCP+TAA/TAA	300 mg/kg 每周 3 次 300 mg/kg 3 times per-week	腹腔注射 Intraperitoneal injection	2 ~ 4 周/ 4 ~ 8 周 2 ~ 4 weeks/ 4 ~ 8 weeks	天狼星红染色, 肝胶原纤维沉积; Collagen I、 $Tgf-\beta$ 1、Ctgf、Timp 表达 上调 Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver; expression up-regulation of Collagen I, $Tgf-\beta$ 1, Ctgf, Timp	[23]
成鱼 Adult	TAA	5 mg/mL	暴露于 TAA 水溶液 Exposure with TAA	72 h	Gemori 染色, 肝胶原纤维沉积 Gemori staining, deposition of collagen fibers in liver	[24]
3 dpf	TAA	1 ~ 10 mmol/L	暴露于 TAA 水溶液 Exposure with TAA	72 h	$Tgf-\beta$ 1、 $Tgf-\beta$ 2 表达上调 Expression up-regulation of $Tgf-\beta$ 1, $Tgf-\beta$ 2	[25]
2 dpf	TAA	0.06%	暴露于 TAA 水溶液 Exposure with TAA	6 d	天狼星红染色, 胶原纤维沉积; <i>collagen 1a1</i> 、 <i>acta2</i> 、 <i>hand2</i> 、 <i>TGF β</i> 、 <i>SDF-1a</i> 、 <i>SDF-1b</i> 表达上调 Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver Expression up-regulation of <i>collagen 1a1</i> 、 <i>acta2</i> 、 <i>hand2</i> 、 <i>TGF β</i> 、 <i>SDF-1a</i> 、 <i>SDF-1b</i>	[26]
3 mpf	DEN	150 ~ 200 mg/L	暴露于 DEN 水溶液 Exposure with DEN	4 ~ 6 周 4 ~ 6 weeks	Gemori 染色和天狼星红染色, 胶原纤维过度沉积 Gemori and Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver	[29]
3 hpf	BPS	1 ~ 100 μ g/L	暴露于 BPS 水溶液 Exposure with BPS	120 d	天狼星红染色, 胶原纤维沉积 Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver	[32]
4 dpf	AcOEtE	0.3 μ g/mL	暴露于 AcOEtE 水溶液 Exposure with AcOEtE	24 h	胶原纤维沉积 Deposition of collagen fibers in liver	[34]
3 dpf	红霉素/阿奇霉素 Erythromycin/ Azithromycin	2 mmol/L	暴露于红霉素/阿奇霉素水溶液 Exposure with Erythromycin/ Azithromycin	72 h	<i>Fabp10</i> 、 <i>Lepr</i> 、 <i>Tgfb1</i> 表达上调 Expression up-regulation of <i>Fabp10</i> , <i>Lepr</i> , <i>Tgfb1</i>	[35]
3 mpf	米非司酮+ <i>tgf-β1a</i> Mifepristone+ <i>tgf-β1a</i>	1 ~ 3 μ mol/L	—	6 周 6 weeks	免疫荧光染色和天狼星红染色, 胶原纤维沉积 IF and Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver	[37]
8 细胞期 胚胎 8-cell embryo	pFL-GIC/pFL-GIC + pFL-5AiR	—	显微注射 Microinjection	10 d	<i>Tgf-β</i> 、 <i>Pdgf-a</i> 、 <i>Pdgf-b</i> 表达上调 Expression up-regulation of <i>Tgf-β</i> , <i>Pdgf-a</i> , <i>Pdgf-b</i>	[39]

续表 1

暴露起始 时期 Period of onset of exposure	诱导药物/ 修饰基因 Inducing drug/ modifying gene	剂量 Dose	方法 Method	实验周期 Experimental period	成模依据 Mold basis	参考文献 References
F3 代 F3 generation	<i>HBx+HCP</i>	-	-	1 个月 1 month	MASSON、天狼星红染色, 胶原纤维沉积; <i>Tgfb1</i> 、 <i>Mmp9</i> 表达上调 MASSON and Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver; expression up-regulation of <i>Tgfb1</i> , <i>Mmp9</i>	[41]
F1 代 F1 generation	<i>sox9b</i>	-	-	5 个月 5 months	胶原纤维沉积 Deposition of collagen fibers in liver	[48]
21 dpf	<i>MicroRNA-21/</i> <i>MicroRNA-21+DEN</i>	-	暴露于 DEN 水溶液 Exposure with DEN	6 个月/ 3 个月 6 months/ 3 months	MASSON、天狼星红染色, 胶原纤维沉积 MASSON and Sirius red staining, deposition of collagen fibers in liver	[49]
F1 代 F1 generation	<i>Edn1</i>	-	Tol2 转座子介导 Tol2 transposon	11 个月 11 months	α - <i>sma</i> 、 <i>Col1agen1a1</i> 、 <i>Ctgfa</i> 、 <i>Mmp9</i> 、 <i>Loxa</i> 、 <i>lamb2</i> 表达上调 Expression up-regulation of α - <i>sma</i> , <i>Col1agen1a1</i> , <i>Ctgfa</i> , <i>Mmp9</i> , <i>Loxa</i> , <i>lamb2</i>	[51]
F2 代 F2 generation	<i>dact2</i>	-	-	6 个月 6 months	MASSON, 胶原纤维沉积 MASSON staining, deposition of collagen fibers in liver	[53]
F1 代 F1 generation	<i>AURKA</i>	-	Tol2 转座子介导 Tol2 transposon	5 ~ 7 个月 5 ~ 7 months	<i>Ctgfa</i> 、 <i>Hpse</i> 表达上调 Expression up-regulation of <i>Ctgfa</i> , <i>Hpse</i>	[54]
F4、F5、F6 代 F4、F5、F6 generation	<i>Gankyrin</i>	-	Tet-off 系统 Tet-off system	7 ~ 12 个月 7 ~ 12 weeks	胶原纤维沉积 Deposition of collagen fibers in liver	[56]
3 dpf	<i>Kras</i> ^{V12}	-	Tet-On 系统 Tet-On system	4 d	免疫荧光染色, Collagen I 增加 IF staining, expression up-regulation of Collagen I	[57]

3 斑马鱼 HF 研究中发现的药物作用机制

相比于啮齿动物,使用斑马鱼 HF 模型进行药物筛选的优势有很多,包括所需的养殖空间更小、管理人员需求量更少、饲养成本更低且由于实验数量更大,得到的数据比啮齿动物更精确。大多数 HF 相关蛋白在人类和斑马鱼之间是保守的,意味着在斑马鱼体内有与人体内相同的发挥活性的药物分子靶标。现今 HF 治疗药物主要集中在中药提取物和小分子抑制剂等,且对 HF 有一定的预防和治疗作用(见表 2)。

4 斑马鱼模型与其他动物模型的比较

小鼠作为哺乳动物肝疾病模型的代表,其肝结构和功能与人相似。但哺乳动物胚胎发育于母体子宫中,繁育过程较长,无法直接观测到^[58]。相比之下斑马鱼在一些方面具有小鼠等模式动物无法替代的优势:(1)斑马鱼是胚胎透明的,可以监测标记的单个细胞甚至整个肝^[59]。在体式显微镜下观

察,斑马鱼幼鱼早期 HF 主要表现为肝面积变小。随着药物处理时间延长,肝组织内出现胶原纤维沉积现象。(2)斑马鱼在繁殖能力强、实验周期短的基础上可以使实验更快、更大规模的进行。斑马鱼利用卵黄囊中的营养可以在 8 d 内成功建立 HF 模型^[25]。(3)斑马鱼胚胎和幼鱼阶段免疫系统尚未发育完全,幼鱼 HF 模型可能无法完整地反映人类的疾病状态,而斑马鱼成鱼就很好地弥补了这种不足^[28]。小鼠的平均寿命在 1 ~ 2 岁,而斑马鱼在 2 ~ 5 岁,由此可以说明,斑马鱼成鱼更适合 HF 这类慢性疾病的研究。(4)斑马鱼与人类具有很高的基因组同源性^[60],且斑马鱼在肝细胞组成、信号传导和损伤反应等方面与人类具有极高的相似性。(5)人体内介导 HSC 和 MFB 激活、增殖、迁移、分化和凋亡的信号通路在斑马鱼体内也有发现^[61-62]。

5 展望

造成肝纤维化的治病因素很多,病理机制也有所不同。概括起来肝纤维化是由遗传因素、酒精/

表 2 抗纤维化药物及其作用机制
Table 2 Anti-fibrotic drugs and their mechanisms of action

活性成分 Active ingredient	来源 Source	动物模型 Animal model	下调基因 Down-regulated genes	机制 Rathogenesis	参考文献 References
荔枝草乙醇提取物 Salvia plebeia R. Br. ethanol extracts	荔枝草 Salvia plebeia R.Br.	TAA 诱导斑马鱼 HF 模型 TAA-induced zebrafish HF model	-	减少肝细胞凋亡 Improve hepatocyte apoptosis	[24]
牛大力水提物 Millettia speciosa aqueous extracts	美丽崖豆藤 Millettia speciosa Champ	DEN 诱导斑马鱼 HF 模型 DEN-induced zebrafish liver fibrosis model	Bax , a-SMA , Tnf-a	减少肝细胞凋亡 Improve hepatocyte apoptosis	[30]
GFT505、F3SM	PPAR 受体激动剂 PPAR receptor agonist	DEN 诱导斑马鱼 HF 模型 DEN-induced zebrafish HF model	Tgfb2b , Smad	抑制 TGF-β/smad 信号转导通路 Inhibition of the TGF-β/smad signaling pathway	[29]
胡椒碱 Piperine	胡椒 Pepper	DEN 诱导斑马鱼 HF 模型 DEN-induced zebrafish HF model	Tgfb2b , Smad	抑制 tgfb2b 基因表达 Inhibits tgfb2b gene expression	[29]
奥贝胆酸 OCA	法尼醇 X 受体激动剂 farnesoid X receptor agonist	DEN 诱导斑马鱼 HF 模型 DEN-induced zebrafish HF model	Tgfb2b , Smad	抑制 TGF-β/smad 信号转导通路 Inhibition of the TGF-β/smad signaling pathway	[29]
SB415286、CHIR99021	Wnt 受体激动剂 Wnt receptor agonist	酒精诱导斑马鱼 HF 模型 Ethanol-induced zebrafish HF model	Notch 信号通路 Notch signaling pathway	Wnt/Notch 信号通路相互作用 Wnt/Notch signaling pathway interaction	[13]
低聚岩藻依聚糖 Oligo-fucoidan	棕色海藻 Brown seaweeds	HFD 诱导斑马鱼 HF 模型 High fat diet-induced zebrafish HF model	Hpse , Col1a1a , Ctgfa	-	[19]
间充质干细胞 Mesenchymal stromal cells	小鼠 Mice	TAA 诱导斑马鱼 HF 模型 TAA-induced zebrafish HF model	Acta-2 , Hand-2 Sdf-1a , Sdf-1b , Tgf-β	抑制 HSC 活化 Inhibits hepatic stellate cell activation	[25]
山萘酚-3-O-芸香糖苷 kaempferol-3-rutinoside	红花 Flos Carthami	TAA 诱导斑马鱼 HF 模型 TAA-induced zebrafish HF model	α-SMA , Collagen I	-	[26]
D-甘露糖 D-Mannose	植物 Plant	MPI-CDG 斑马鱼模型 MPI-CDG zebrafish model	Col1a1b , Acta2、Pdgfrb , Lamb4a , Timp2b	抑制 HSC 活化 Inhibits hepatic stellate cell activation	[18]
AG1478	EGFR 抑制剂 EGFR inhibitor	转基因斑马鱼模型 Transgenic zebrafish model	Acta2 , Collagen I	促进 LPCs 向肝细胞分化 Promote the differentiation of LPCs into hepatocytes	[48]
维生素 B ₁₂ Vitamin B ₁₂	维生素 B ₁₂ Vitamin B ₁₂	HCV IRES-斑马鱼模型 HCV IRES-zebrafish model	Heparanase , Pdgf-α , Pdgf-β , Tgf-β	-	[40]
西仑吉肽 Cilengitide trifluoroacetate salt	整合素拮抗剂 Integrin Antagonist	kras ^{V12} 转基因斑马鱼模型 kras ^{V12} transgenic zebrafish model	Collagen I , Tgfβ1	抑制 HSC 活化 Inhibits hepatic stellate cell activation	[57]

药物性肝损伤、胆汁淤积和病毒性肝炎等因素引起的肝异常修复而造成的^[63]。在肝纤维化的病理进程中,肝内各种细胞之间的相互作用,如上皮、内皮和炎症细胞、引发和维持纤维化肝星状细胞和肌成纤维细胞等最终造成纤维化^[64-66]。有关纤维化的信号通路,越来越多的证据表明 Wnt/β-连环蛋白信

号通路、Notch 信号通路、核因子 κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、Hippo (果蝇中的蛋白激酶)/YAP (Yes 相关蛋白) 信号通路、TGF-β/Smad 和磷酸肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-AKT-哺乳动物雷

帕霉素靶标(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路等被认为参与调节肝纤维化^[67-71]。最近研究发现细胞自噬,凋亡和不依赖于 Caspase 的铁死亡也参与到肝纤维化的发生和发展中^[72-74]。进行有关肝纤维化的研究,有必要综合考虑以上各种治病原因及病理机制。

现有斑马鱼 HF 造模方法基本可以实现从不同的发病原因来模拟临床中出现肝病理变化,其不仅可以从数量上满足实验和药物筛选的需求,还可以在实验过程中对各个环节进行条件控制,从而实现对 HF 发病机制、疾病进展、治疗药物筛选、相关疾病预防等进行深入的研究。总而言之,相较于啮齿动物模型来说,斑马鱼 HF 模型作为一种低成本、高效益的替代方案,为肝疾病领域的研究带来了新的改革。我们相信,斑马鱼 HF 疾病模型的进一步优化发展将为肝疾病的探索带来新的见解,从而为验证新的治疗靶点和治疗方法提供大量机会。

参 考 文 献(References)

- [1] Wilkins BJ, Pack M. Zebrafish models of human liver development and disease [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(3): 1213-1230.
- [2] 张金花, 桂芳, 司婧, 等. 斑马鱼肠道微生物的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(6): 637-642.
Zhang JH, Gui F, Si J, et al. Research progress on intestinal tract microorganisms in zebrafish [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(6): 637-642.
- [3] Yahaghi L, Ebrahim-Habibi A, Hayati-Roodbari N, et al. A simple method for inducing nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis [J]. *Anim Model Exp Med*, 2019, 2(4): 282-290.
- [4] Dewidar B, Meyer C, Dooley S, et al. TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated 2019 [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1419.
- [5] Massagué J. TGF β signalling in context [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(10): 616-630.
- [6] Park JH, Park B, Park KK. Suppression of hepatic epithelial-to-mesenchymal transition by melittin *via* blocking of TGF β /smad and MAPK-JNK signaling pathways [J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(4): 138.
- [7] Zhang Z, Mu Y, Zhang J, et al. Kindlin-2 is essential for preserving integrity of the developing heart and preventing ventricular rupture [J]. *Circulation*, 2019, 139(12): 1554-1556.
- [8] Zhang F, Ni C, Kong D, et al. Ligustrazine attenuates oxidative stress-induced activation of hepatic stellate cells by interrupting platelet-derived growth factor- β receptor-mediated ERK and p38 pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 265(1): 51-60.
- [9] 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.
- [10] Di YN, Zhu LY, Shen J, et al. Effects of four carrier solvents on eye development in zebrafish embryos [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(5): 75-80.
- [11] Dlugos CA, Brown SJ, Rabin RA. Gender differences in ethanol-induced behavioral sensitivity in zebrafish [J]. *Alcohol*, 2011, 45(1): 11-18.
- [12] Lin JN, Chang LL, Lai CH, et al. Development of an animal model for alcoholic liver disease in zebrafish [J]. *Zebrafish*, 2015, 12(4): 271-280.
- [13] Park KH, Kim SH. Low dose of chronic ethanol exposure in adult zebrafish induces hepatic steatosis and injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109179.
- [14] Huang M, Chang A, Choi M, et al. Antagonistic interaction between Wnt and Notch activity modulates the regenerative capacity of a zebrafish fibrotic liver model [J]. *Hepatology*, 2014, 60(5): 1753-1766.
- [15] Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, et al. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation [J]. *Hepatology*, 2009, 49(2): 443-452.
- [16] Lassen N, Estey T, Tanguay RL, et al. Molecular cloning, baculovirus expression, and tissue distribution of the zebrafish aldehyde dehydrogenase 2 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(5): 649-656.
- [17] Reimers MJ, Flockton AR, Tanguay RL. Ethanol-and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2004, 26(6): 769-781.
- [18] Chu J, Mir A, Gao N, et al. A zebrafish model of congenital disorders of glycosylation with phosphomannose isomerase deficiency reveals an early opportunity for corrective mannose supplementation [J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6(1): 95-105.
- [19] DeRossi C, Bambino K, Morrison J, et al. Mannose phosphate isomerase and mannose regulate hepatic stellate cell activation and fibrosis in zebrafish and humans [J]. *Hepatology*, 2019, 70(6): 2107-2122.
- [20] Wu SY, Yang WY, Cheng CC, et al. Low molecular weight fucoidan inhibits hepatocarcinogenesis and nonalcoholic fatty liver disease in zebrafish via ASGR/STAT3/HNF4A signaling [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(8): e252.
- [21] Zou Y, Chen Z, Sun C, et al. Exercise intervention mitigates pathological liver changes in NAFLD zebrafish by activating SIRT1/AMPK/NRF₂ signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 10940.
- [22] Turola E, Petta S, Vanni E, et al. Ovarian senescence increases liver fibrosis in humans and zebrafish with steatosis [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(9): 1037-1046.
- [23] Rekha RD, Amali AA, Her GM, et al. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio* [J]. *Toxicology*, 2008, 243(1-2): 11-22.
- [24] Chuang HM, Su HL, Li C, et al. The role of butyridenephthalide

- in targeting the microenvironment which contributes to liver fibrosis amelioration [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 112.
- [24] 邓云云. 荔枝草和三种多酚类单体物质对斑马鱼肝损伤的修复作用机理研究 [D]. 南昌: 江西师范大学; 2020.
- Deng YY. Study on the repair mechanism of *Salvia plebeia* R.Br. and three polyphenol monomers on zebrafish liver injury [D]. Nanchang: Jiangxi Normal University; 2020.
- [25] van der Helm D, Groenewoud A, de Jonge-Muller ESM, et al. Mesenchymal stromal cells prevent progression of liver fibrosis in a novel zebrafish embryo model [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16005.
- [26] 吕志平, 黄莎, 周楚莹, 等. 山奈酚-3-O-芸香糖苷在制备治疗肝纤维化药物中的应用; CN110522757A [P]. 2019-12-03.
- Lv ZP, Huang S, Zhou CY, et al. Application of Kaempferol 3-rutinoside to preparation of medicines for treating hepatic fibrosis; CN110522757A [P]. 2019-12-03.
- [27] Huang D, Li H, He Q, et al. Developmental toxicity of diethylnitrosamine in zebrafish embryos/juveniles related to excessive oxidative stress [J]. *Water Air Soil Pollut*, 2018, 229(3): 81.
- [28] 王坤元, 刘莉, 戴文聪, 等. 二乙基亚硝胺诱导建立斑马鱼肝纤维化模型 [J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(6): 777-782.
- Wang KY, Liu L, Dai WC, et al. Establishment of a hepatic fibrosis model induced by diethylnitrosamine in zebrafish [J]. *J South Med Univ*, 2014, 34(6): 777-782.
- [29] 赵静. 新型 PPAR 双重激动剂 F₃SM 和胆宁片治疗实验性斑马鱼肝纤维化的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2019.
- Zhao J. Study on the treatment of experimental zebrafish liver fibrosis with new PPAR dual agonists F₃SM and Danning Tablets [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2019.
- [30] 周楚莹, 赖裕玲, 谢凌鹏, 等. 牛大力水提物对斑马鱼药物性肝纤维化损伤的保护作用 [J]. *新中医*, 2018, 50(12): 12-16.
- Zhou CY, Lai YL, Xie LP, et al. Aqueous extract of *Millettia speciosa* champ has protective effect on drug-induced liver fibrosis in zebrafish [J]. *J New Chin Med*, 2018, 50(12): 12-16.
- [31] Wang W, Zhang J, Li Z, et al. Bisphenol S exposure accelerates the progression of atherosclerosis in zebrafish embryo-larvae [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 426: 128042.
- [32] Qin J, Ru S, Wang W, et al. Long-term bisphenol S exposure aggravates non-alcoholic fatty liver by regulating lipid metabolism and inducing endoplasmic reticulum stress response with activation of unfolded protein response in male zebrafish [J]. *Environ Pollut*, 2020, 263: 114535.
- [33] 王明亮, 丁永芳, 印鑫, 等. 斑马鱼在毒理学中的应用研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 390-396.
- Wang ML, Ding YF, Yin X, et al. Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(3): 390-396.
- [34] Li C, Wang M, Fu T, et al. Lipidomics indicates the hepatotoxicity effects of EtOAc extract of *Rhizoma paridis* [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 799512.
- [35] 张苗青, 张靖博. 红霉素和阿奇霉素诱导斑马鱼肝毒性及作用机制研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2021, 46(3): 256-261.
- Zhang MQ, Zhang JP. Study on hepatotoxicity inducement and mechanisms of erythromycin and azithromycin in zebrafish [J]. *Chin J Antibio*, 2021, 46(3): 256-261.
- [36] Huang S, Mo C, Zeng T, et al. Lupeol ameliorates LPS/D-GalN induced acute hepatic damage by suppressing inflammation and oxidative stress through TGFβ1-Nrf2 signal pathway [J]. *Aging*, 2021, 13(5): 6592-6605.
- [37] Yan C, Yang Q, Gong Z. Transgenic expression of *tgfb1a* induces hepatic inflammation, fibrosis and metastasis in zebrafish [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(1): 175-181.
- [38] Berggren KA, Suzuki S, Ploss A. Animal models used in hepatitis C virus research [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3869.
- [39] Ding CB, Zhao Y, Zhang JP, et al. A zebrafish model for subgenomic hepatitis C virus replication [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(3): 791-797.
- [40] Zhao Y, Qin W, Zhang JP, et al. HCV IRES-mediated core expression in zebrafish [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e56985.
- [41] Liu W, Chen JR, Hsu CH, et al. A zebrafish model of intrahepatic cholangiocarcinoma by dual expression of hepatitis B virus X and hepatitis C virus core protein in liver [J]. *Hepatology*, 2012, 56(6): 2268-2276.
- [42] Russell JO, Ko S, Monga SP, et al. Notch inhibition promotes differentiation of liver progenitor cells into hepatocytes via *sox9b* repression in zebrafish [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 8451282.
- [43] Yan Y, Wang R, Hu X, et al. miR-126 regulates properties of SOX9⁺ liver progenitor cells during liver repair by targeting Hoxb6 [J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 15(3): 706-720.
- [44] So J, Kim M, Lee SH, et al. Attenuating the epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase-sex-determining region Y-box 9 axis promotes liver progenitor cell-mediated liver regeneration in zebrafish [J]. *Hepatology*, 2021, 73(4): 1494-1508.
- [45] Yin Y, Kong D, He K, et al. Regeneration and activation of liver progenitor cells in liver cirrhosis [J]. *Genes Dis*, 2021, 8(5): 623-628.
- [46] Ko S, Russell JO, Tian J, et al. Hdac1 regulates differentiation of bipotent liver progenitor cells during regeneration via Sox9b and Cdk8 [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(1): 187-202.
- [47] Fagoonee S, Arigoni M, Manco M, et al. Circulating extracellular vesicles contain liver-derived RNA species as indicators of severe cholestasis-induced early liver fibrosis in mice [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 36(7-9): 480-504.
- [48] Delous M, Yin C, Shin D, et al. Sox9b is a key regulator of pancreaticobiliary ductal system development [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(6): e1002754.
- [49] Lai CY, Yeh KY, Lin CY, et al. microRNA-21 plays multiple oncometabolic roles in the process of NAFLD-related

- hepatocellular carcinoma via PI3K/AKT, TGF- β , and STAT3 signaling [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(5): 940.
- [50] 周利民. 内皮素在肝纤维化的发生中具有双重作用吗? [J]. 国外医学(流行病学传染病学分册), 1997, 24(3): 143-144.
- Zhou LM. Does endothelin play a dual role in the occurrence of liver fibrosis? [J]. *Int J Epidemiol Infect Dis*, 1997, 24(3): 143-144.
- [51] Lu JW, Liao CY, Yang WY, et al. Overexpression of endothelin 1 triggers hepatocarcinogenesis in zebrafish and promotes cell proliferation and migration through the AKT pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85318.
- [52] Taura K, Iwaisako K, Hatano E, et al. Controversies over the epithelial-to-mesenchymal transition in liver fibrosis [J]. *J Clin Med*, 2016, 5(1): 9.
- [53] Kim DH, Kim EJ, Kim DH, et al. Dact2 is involved in the regulation of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(1): 190-197.
- [54] Su ZL, Su CW, Huang YL, et al. A novel AURKA mutant-induced early-onset severe hepatocarcinogenesis greater than wild-type via activating different pathways in zebrafish [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7): 927.
- [55] Li CC, Chu HY, Yang CW, et al. Aurora-A overexpression in mouse liver causes p53-dependent premitotic arrest during liver regeneration [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(5): 678-688.
- [56] Huang SJ, Cheng CL, Chen JR, et al. Inducible liver-specific overexpression of gankyrin in zebrafish results in spontaneous intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(3): 1052-1058.
- [57] Yan C, Yang Q, Gong Z. Activation of hepatic stellate cells during liver carcinogenesis requires fibrinogen/integrin $\alpha v \beta 5$ in zebrafish [J]. *Neoplasia*, 2018, 20(5): 533-542.
- [58] Dudziak K, Nowak M, Sozoniuk M. One host-multiple applications: zebrafish (*Danio rerio*) as promising model for studying human cancers and pathogenic diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10255.
- [59] Vliegenthart AD, Tucker CS, del Pozo J, et al. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 78(6): 1217-1227.
- [60] 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.
- [61] Huang S, Wang Y, Xie S, et al. Isoliquiritigenin alleviates liver fibrosis through caveolin-1-mediated hepatic stellate cells ferroptosis in zebrafish and mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154117.
- [62] Zhong X, Li J, Lu F, et al. Application of zebrafish in the study of the gut microbiome [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(4): 323-336.
- [63] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-166.
- [64] Jung K, Kim M, So J, et al. Farnesoid X receptor activation impairs liver progenitor cell-mediated liver regeneration via the PTEN-PI3K-AKT-mTOR axis in zebrafish [J]. *Hepatology*, 2021, 74(1): 397-410.
- [65] Migdal M, Tralle E, Nahia KA, et al. Multi-omics analyses of early liver injury reveals cell-type-specific transcriptional and epigenomic shift [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 904.
- [66] Zhao ZM, Liu HL, Sun X, et al. Levistilide A inhibits angiogenesis in liver fibrosis via vascular endothelial growth factor signaling pathway [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242(9): 974-985.
- [67] Huang S, Zhou C, Zeng T, et al. P-hydroxyacetophenone ameliorates alcohol-induced steatosis and oxidative stress via the NF- κ B signaling pathway in zebrafish and hepatocytes [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1594.
- [68] So J, Khaliq M, Evason K, et al. Wnt/ β -catenin signaling controls intrahepatic biliary network formation in zebrafish by regulating Notch activity [J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2352-2366.
- [69] Huang M, Chang A, Choi M, et al. Antagonistic interaction between Wnt and Notch activity modulates the regenerative capacity of a zebrafish fibrotic liver model [J]. *Hepatology*, 2014, 60(5): 1753-1766.
- [70] Liu M, Ai W, Sun L, et al. Triclosan-induced liver injury in zebrafish (*Danio rerio*) via regulating MAPK/p53 signaling pathway [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2019, 222: 108-117.
- [71] Brandt ZJ, Echert AE, Bostrom JR, et al. Core Hippo pathway components act as a brake on Yap and Taz in the development and maintenance of the biliary network [J]. *Development*, 2020, 147(12): dev184242.
- [72] Wang J, Han SL, Lu DL, et al. Inhibited lipophagy suppresses lipid metabolism in zebrafish liver cells [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1077.
- [73] Lu JW, Yang WY, Tsai SM, et al. Liver-specific expressions of HB α and src in the p53 mutant trigger hepatocarcinogenesis in zebrafish [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76951.
- [74] Huang S, Wang Y, Xie S, et al. Isoliquiritigenin alleviates liver fibrosis through caveolin-1-mediated hepatic stellate cells ferroptosis in zebrafish and mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154117.

[收稿日期] 2022-11-28