

訾化星,党驰,张晶晶. 模式动物斑马鱼在医学实验动物学教学中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 81-86.
Zi HX, Dang C, Zhang JJ. Application of zebrafish in medical experimental zoology teaching [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 81-86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.008

模式动物斑马鱼在医学实验动物学教学中的应用

訾化星^{1,2}, 党驰¹, 张晶晶^{1,2*}

(1. 广东医科大学医学技术学院, 广东 东莞 523808;
2. 广东医科大学东莞创新研究院, 广东 东莞 523808)

【摘要】 传统啮齿类实验动物在实验教学中存在成本高、周期长等限制。斑马鱼作为一种新兴的模式生物,以其繁殖快、发育迅速、成本低等优势,在生命科学研究中备受青睐。然而,斑马鱼在实验动物学教学中的应用仍有待深入开发。本研究以《医学实验动物学及技术》课程为例,将斑马鱼引入“组织切片技术”和“免疫实验技术”两个实验模块,旨在探索斑马鱼在实验动物学教学中的应用潜力。通过详细介绍实验操作流程、实验设计和教学内容,旨在为本科生提供一个高效、低成本,且具有较高实践性的实验教学平台。实验结果表明,斑马鱼在实验教学中具有显著优势,不仅可以降低实验成本,缩短实验周期,而且能够让学生更直观地掌握实验技术,提高学习兴趣。

【关键词】 斑马鱼;实验动物学;教学改革;组织切片;免疫实验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0081-06

Application of zebrafish in medical experimental zoology teaching

ZI Huaxing^{1,2}, DANG Chi¹, ZHANG Jingjing^{1,2*}

(1. School of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China.
2. Dongguan Innovation Institute, Guangdong Medical University, Dongguan 523808)

【Abstract】 Traditional laboratory animal breeding is costly and time-consuming, thus limiting experimental zoology teaching practices. Zebrafish have unique biological characteristics and have become widely used as an experimental animal model; however, teaching examples related to zebrafish in experimental zoology courses are still scarce. This review explores the application of zebrafish by incorporating them into the “Tissue Sectioning Techniques” and “Immunological Techniques” modules in the “Medical Laboratory Animal Science and Technology” course. The aim is to utilize the advantages of zebrafish in experimental zoology teaching and to explore their potential applications. This study provides a detailed introduction to the experimental procedures, experimental design, and teaching content involving zebrafish, with the aim of offering undergraduate students a more efficient, cost-effective, and practically meaningful experimental teaching platform.

【Keywords】 zebrafish; experimental zoology; teaching reform; tissue sectioning; immunological techniques

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

【基金项目】 广东省本科高校教学质量与教学改革工程建设项目(粤教高函[2024]9号,粤教高函[2024]30号);广东医科大学本科教学质量与教学改革工程项目(4SG25116P,4SG25124P)。

【作者简介】 訾化星(1991—),男,博士,副研究员,研究方向:疾病动物模型。E-mail: zihuaxing@gdmu.edu.cn

【通信作者】 张晶晶(1984—),男,博士,教授,研究方向:疾病动物模型与脑血管病。E-mail: jingjing.zhang@gdmu.edu.cn

传统的医学实验动物学教学多依赖于大鼠、小鼠和兔等实验动物。虽然这些动物在医学研究中有重要的作用,但其高昂的成本、繁琐的实验准备和较长的生长周期等问题,使得它们在教学实践中存在一定的局限性。与此同时,随着模式动物研究的不断发展,斑马鱼因其独特的优点,逐渐成为一种理想的实验动物模型^[1-2]。作为一种模式脊椎动物,斑马鱼基因组与人的相似度高达 87%,调控其胚胎发育和器官稳态的分子机制大多与高等脊椎动物一致^[3]。此外,相比其他更高等的脊椎动物,斑马鱼具有体型小、繁殖率高、体外发育、胚胎透明、遗传操作方便等特点,这使得斑马鱼在胚胎发育、神经生物学、遗传疾病、药物筛选、毒理评估等方面的研究有独特优势^[3-6]。因此,在医学实验类课程中,斑马鱼相关的实验技术具有较高的教学价值。然而,目前国内斑马鱼相关的实验教程还较少。本研究以《医学实验动物学及技术》课程中的“组织切片技术”和“免疫实验技术”两个教学模块为基础^[7-8],尝试将模式动物斑马鱼引入到实验动物学教学中,并详细探讨其在这些模块中的应用。

1 课程设计与教学目标

1.1 组织切片技术模块

组织切片技术是实验动物学课程中的基础模块,旨在教授学生如何进行动物组织的固定、切片、染色及观察等操作^[9]。传统上,这一技术模块多使用小鼠、大鼠等哺乳动物进行教学。然而,斑马鱼作为一种小型、透明的模式动物,其胚胎和成鱼的组织可以在较短时间内完成取样,且胚胎透明,便于学生观察和操作^[10-11]。

(1) 斑马鱼胚胎组织取样

斑马鱼的胚胎透明且发育周期短,24 h 内胚胎的心脏、眼睛、脑部等器官即已初步成型^[1]。这一特点使得斑马鱼在组织切片实验中具有明显的优势。学生可以在短时间内采集到新鲜的胚胎组织,快速进行固定和处理。

(2) 固定与处理

学生将在指导教师的帮助下,学习如何将斑马鱼胚胎进行固定。常用的固定剂包括福尔马林(paraformaldehyde, PFA)。通过浸泡固定剂、乙醇梯度脱水处理和二甲苯透明处理,使得组织

在光线下完全呈半透明状,在切片前能够保持原有的组织结构和形态。

(3) 石蜡切片与冰冻切片

斑马鱼组织切片有两种常见方式:石蜡切片和冰冻切片。石蜡切片适用于常规组织学染色,如 HE 染色,而冰冻切片则适用于对细胞结构完整性要求较高的组织样品进行分子标记物染色。通过这两种方法,学生能够获得不同切片的观察效果和应用场景,帮助他们理解不同切片方法的优劣势。

(4) 染色与显微观察

通过常规 HE 染色、PAS 染色等方法,学生可以直观观察斑马鱼组织中的细胞形态、结构及其分布情况。实验过程中,学生将学习如何操作显微镜,分析切片中的组织结构,进一步加深对组织学知识的理解。

(5) 教学案例

在实践教学过程中,利用肝特异性转基因斑马鱼品系 Tg(*lfabp:eGFP*)的胚胎和成鱼分别进行了整胚免疫荧光化学实验、组织切片免疫荧光化学实验^[12]。借助于斑马鱼胚胎透明,且 Tg(*lfabp:eGFP*)转基因斑马鱼可直接示踪其肝细胞的优势(图 1A),学生可直接挑选并利用其胚胎进行了免疫荧光组织化学染色实验,通过检测磷酸化组蛋白 H3 的表达定位来反映肝细胞的增殖情况(图 1B~1C);在成年斑马鱼肝的组织切片实验中,由于成鱼个体较小,学生无须解剖出肝组织,可直接对成体进行冰冻切片,切片后在荧光体视镜下得到 eGFP 标记的肝切片并进行了后续免疫荧光组织化学实验即可(图 1D)。操作过程便捷直观,挑选分离的胚胎或定位的组织精准,且整胚染色可同时进行多达 25 个个体的实验,满足了大样本量的需求。与小鼠相比,操作流程简化、样本通量高、易于筛选目的组织、且能节省试剂特别是昂贵抗体等来满足本科生公共实验课的教学需求。

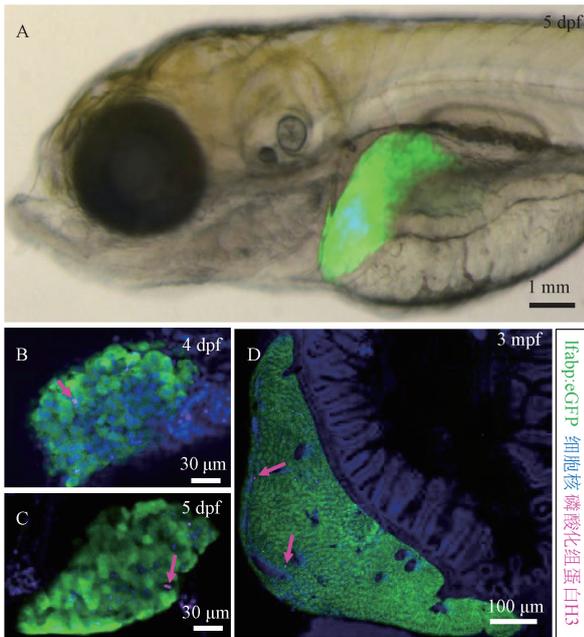
1.2 免疫实验技术模块

免疫实验技术是现代生物医学实验中非常重要的一部分,涵盖了免疫组化(IHC)、免疫荧光染色(IF)等技术^[13-14]。这些技术广泛应用于分子生物学、病理学以及疾病诊断等领域。模式动物斑马鱼在免疫实验中有着较为明显的优势,特

别是在胚胎免疫反应的研究中,透明的胚胎使得学生能够更加直观地观察免疫反应过程(图 1)。

(1) 抗原修复与免疫染色

学生将在实验中学习多种抗原修复方法并进行免疫染色。首先,学生需要对切片进行抗原修复,如蛋白酶消化修复、微波加热修复等,用于去除蛋白交联,充分暴露组织抗原,后利用特异性抗体对组织进行标记,通过免疫组化或免疫荧



注:A:5 d(5 dpf)大小的肝特异性转基因斑马鱼品系 $Tg(lfabp:eGFP)$; B~C: 利用 4 d 和 5 d 大小的 $Tg(lfabp:eGFP)$ 斑马鱼胚胎进行的整胚免疫荧光组织化学实验来检测磷酸化组蛋白 H3 的表达定位情况(粉色箭头); D: 利用 3 个月的 $Tg(lfabp:eGFP)$ 斑马鱼成鱼进行的组织切片来观察其肝细胞磷酸化组蛋白 H3 的表达定位情况(粉色箭头)。

图 1 利用组织切片和免疫组化技术检测斑马鱼肝细胞增殖水平

Note. A, Liver-specific transgenic zebrafish line $Tg(lfabp:eGFP)$ at 5 days post-fertilization (5 dpf). B~C, Whole-mount immunofluorescence histochemistry experiments conducted on $Tg(lfabp:eGFP)$ zebrafish embryos at 4 and 5 dpf to examine the expression and localization of phosphorylated histone H3 (pink arrows). D, Tissue sections from 3-month-old $Tg(lfabp:eGFP)$ adult zebrafish used to observe the localization of phosphorylated histone H3 in liver cells (pink arrows).

Figure 1 Detection of liver cell proliferation levels of zebrafish via tissue sectioning and immunohistochemistry techniques

光技术对斑马鱼的组织进行染色。这一过程中,学生不仅能够理解抗体与抗原特异性结合的原理,还能了解到多种免疫标记的设计思路。

(2) 免疫组化与免疫荧光技术

免疫组化技术可以将目标抗原与特定的抗体结合,并通过显色反应可视化特定蛋白的分布情况。而免疫荧光技术则通过荧光标记的抗体对目标分子进行检测,使得学生能够清晰地观察到细胞或组织中的分子分布。

(3) 成像分析与数据解读

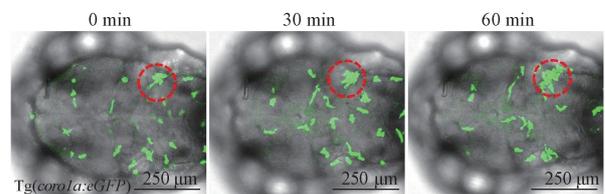
免疫实验技术的核心在于如何通过成像技术分析实验结果。在实验中,学生将使用荧光显微镜或共聚焦显微镜进行成像,学习如何处理、分析实验数据,并根据成像结果推断免疫反应的机制。

(4) 教学案例

在教学过程中利用特异性标记脑部巨噬细胞(小胶质细胞)和中性粒细胞的转基因斑马鱼品系 $Tg(corola:eGFP)$ ^[15],在荧光体视显微镜下实时观察和跟踪记录了胚胎脑部发生炎症反应后小胶质细胞的动态迁移和往损伤部位聚集情况。该模型和观察方法使得学生能够实时观察免疫反应的发生和免疫细胞的动态迁移(图 2)。相比较,在利用小鼠模型进行的课程教学中无法达到上述理想的教学效果。

1.3 教学方法与创新设计

为了让学生更加深入地理解斑马鱼模式动物在医学实验中的应用,我们对传统的实验教学



注:分别于脑部损伤后 0 min、30 min 和 60 min 实时捕捉脑部损伤部位小胶质细胞聚集情况。

图 2 实时示踪观察斑马鱼脑部损伤后小胶质细胞迁移情况

Note. Real-time capture of microglial aggregation at the brain injury site at 0 minutes, 30 minutes, and 60 minutes after brain injury.

Figure 2 Real-time tracking of microglial migration after brain injury in zebrafish

方法进行了改进,并加入了以下创新:

(1) 学生主导实验操作

传统的实验教学模式多为教师演示,学生仅在教师指导下完成实验步骤。为了提升学生的实验能力,我们采用了“学生主导、教师督促”的教学模式。在该模式下,学生需要全程参与实验的各个环节,从斑马鱼的胚胎孵化、组织切片的准备,到免疫实验的操作和数据分析,学生都能够亲自操作,增加了其动手能力和实验思维。

(2) 多学科整合与实践导向

实验课程不仅仅局限于技术操作,还注重理论知识的学习和思维的培养。每个实验模块都结合免疫学、分子生物学和病理学的相关知识,帮助学生系统地掌握实验技能,理解实验背后的原理。

(3) 小班教学与个性化指导

为了保证每个学生都能获得充分的实验操作机会,我们采取了小班授课的方式,每个班级人数控制在 20 人以内。在实验过程中,教师根据学生的具体情况提供个性化指导,帮助学生及时解决实验中的问题,确保实验效果。

2 实验教学流程

2.1 组织切片技术模块的教学流程

(1) 实验前准备

学生在教师的指导下,学习斑马鱼的基本生物学特性,掌握斑马鱼胚胎的培养技巧,并了解组织切片技术的基本步骤和注意事项。

(2) 胚胎取样与固定

学生使用显微镜仔细观察斑马鱼胚胎的发育进程,并在最佳阶段进行取样。随后,将胚胎放入固定液中进行组织固定,为后续的切片和染色做好准备。

(3) 切片与染色

学生对固定后的组织进行脱水、浸蜡、切片等处理,并进行常规染色(如 HE 染色)。最后,在显微镜下仔细观察组织切片,详细记录实验结果。

(4) 结果分析与讨论

通过观察不同组织的形态变化,学生深入分析不同阶段的胚胎及成鱼组织结构,了解各组织的特点及功能,并进行深入的讨论和交流。

2.2 免疫实验技术模块的教学流程

(1) 免疫染色准备

学生学习如何为斑马鱼制备免疫原,选择合适的抗体,并进行标记。这一步骤是免疫实验的关键环节之一。

(2) 免疫染色操作

学生按照步骤进行免疫组化或免疫荧光染色,学习如何处理组织样本,抗体孵育等关键操作。

(3) 显微观察与数据分析

使用荧光显微镜或共聚焦显微镜观察免疫反应的结果。学生需要仔细分析标记物的分布情况,解读实验结果,并撰写实验报告。

(4) 结果讨论与总结

学生在实验结束后,深入分析实验结果,讨论模式动物斑马鱼在免疫实验中的独特优势及其广阔的应用前景。同时,将其与传统动物模型进行对比分析,进一步加深对免疫学原理的理解。

3 课程实施的效果与评估

在课程实施过程中,斑马鱼作为新型模式动物的引入,有效地克服了传统实验动物在医学实验教学中所面临的各种问题。以下是斑马鱼在教学应用中的具体效果与评估:

3.1 提高学生的实验动手能力

通过模式动物斑马鱼的使用,学生不仅能够获得更丰富的实验操作经验,还能更好地理解动物模型在生物医学实验中的应用。斑马鱼胚胎透明以及早期发育较快等优势,使学生能够更加直观地观察和操作实验,从而有助于学生理论学习和实际操作的良好结合。学生在“组织切片技术”和“免疫实验技术”的实践中,掌握了组织取样、固定、切片、染色和免疫检测的全过程,进一步提升了他们的实验动手能力。为验证斑马鱼教学对学生实验动手能力的促进作用,笔者分别对斑马鱼教学班级和小鼠教学班级的学生进行了问卷调查法,让学生选择投选《医学实验动物与技术》课程中对自己实验操作能力提高最有帮助的两个项目。斑马鱼教学班级学生选择“组织切片技术”和“免疫实验技术”的比例分别为 26% 和 30%,高于小鼠教学班级(对应比例分别为 18% 和 20%),因此用于斑马鱼教学可提高学生的

实验动手能力。

3.2 提高了学生对学科知识的掌握

模式动物斑马鱼不仅能应用于组织学、免疫学等传统学科,还能够作为分子生物学、基因组学等新兴学科的教学工具。因此,利用斑马鱼模型进行实验教学,学生能够在学习实验技术的同时,加深对相关学科理论知识的理解。例如,在免疫实验模块中,学生通过操作斑马鱼胚胎,学习免疫组化、免疫荧光等技术,能够深入理解免疫反应机制和相关疾病的诊断方法,从而实现学科知识的交叉融合。为检测学科知识学习效果,笔者分别随机选择并统计了斑马鱼教学班级和小鼠教学班级各 50 位学生的期末考试成绩,发现在“组织切片技术”和“免疫实验技术”相关的知识考点中(相关题目总分为 14 分),斑马鱼班级学生得分(平均分 8.34 分)高于小鼠班级学生(平均分 8.12 分)。因此,用斑马鱼作为教学材料可有助于学生对于学科知识的掌握。

3.3 降低实验成本与时间消耗

传统的实验动物如小鼠、大鼠等,尤其是用于医学实验教学时,通常需要较高的成本和较长的实验周期。相比之下,斑马鱼具有较短的发育周期和较低的饲养成本,能够大大降低实验的经济负担。此外,斑马鱼的高产卵率和胚胎的透明性使得实验的时间消耗得到了有效缩短。学生能够在较短的时间内完成多个实验操作,提高了实验的效率和教学质量。

4 总结与展望

本文介绍了在《医学实验动物学及技术》课程中,通过引入斑马鱼作为实验动物来实践“组织切片技术”和“免疫实验技术”两个教学模块,并评估了教学效果。结果表明,这一教学方法有助于提高学生对实验操作和理论知识的掌握,提供了进一步在实验课程中发挥斑马鱼这一模式动物优势的参考案例。

随着医学教育的不断发展,模式动物斑马鱼在实验教学中的应用前景广阔。未来可以根据课程需求进一步拓展斑马鱼模型的应用范围,将其引入到其他医学相关课程中。首先,作为毒理学的模型,斑马鱼可用于评估药物或环境有害物质对人类健康的影响。例如,利用胚胎发育过程

中畸形率的变化评估目标样本的胚胎毒性,或者通过观察神经、血管等组织的发育,评估目标样本对相关器官的影响。其次,作为遗传学研究的工具,斑马鱼可用于研究基因突变在神经、心血管等系统性疾病中的致病机制。此外,斑马鱼具有体外发育和胚胎透明的特点,可作为理想的发育生物学模型,动态观察特定组织和器官的发育过程。这些功能使得斑马鱼成为实验教学中不可或缺的资源,为学生提供更加全面的实验教学体验^[16-19]。此外,近年来以 CRISPR/Cas9 技术为代表的斑马鱼基因编辑技术取得了重要进展^[20-21],这使得斑马鱼在疾病模型的建立和药物筛选等方面的潜力得到进一步释放。斑马鱼全器官单细胞转录组数据库的建立^[22-23],为从多角度研究斑马鱼模型中的生物学过程奠定了坚实的基础,同时也为医学研究和临床应用提供了更多的可能性。

参考文献:

- [1] WESTERFIELD M. A guide for the laboratory use of zebrafish danio rerio [M]. Eugene: University of Oregon Press, 2007.
- [2] ANGOM R S, NAKKA N M. Zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease: the future of precision medicine [J]. Biomedicines, 2024, 12(3):693.
- [3] ENGESZER R E, PATTERSON L B, RAO A A, et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field [J]. Zebrafish, 2007, 4(1): 21-40.
- [4] MACRAE C A, PETERSON R T. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(10): 721-731.
- [5] TORRACA V, MOSTOWY S. Zebrafish infection: from pathogenesis to cell biology [J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(2): 143-156.
- [6] ADAMSON K I, SHERIDAN E, GRIERSON A J. Use of zebrafish models to investigate rare human disease [J]. J Med Genet, 2018, 55(10): 641-649.
- [7] MACDONALD R. Molecular methods in developmental biology: Xenopus and Zebrafish [M]. New York: Springer Press, 1999.
- [8] YODER J A, NIELSEN M E, AMEMIYA C T, et al. Zebrafish as an immunological model system [J]. Microbes Infect, 2002, 4(14): 1469-1478.
- [9] 刘世新. 实用生物组织学技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- LIU S X. Practical biohistological techniques [M]. Beijing:

- Science Press, 2004.
- [10] 何嘉玲, 暴国, 王天奇, 等. 斑马鱼幼鱼整鱼石蜡切片制作 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 35-41.
HE J L, BAO G, WANG T Q, et al. Preparation of paraffin-embedded sections of zebrafish larva [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 35-41.
- [11] HER G M, CHIANG C C, CHEN W Y, et al. *In vivo* studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*) [J]. FEBS Lett, 2003, 538(1/2/3): 125-133.
- [12] 刘承英, 赵燕, 刘娟. 斑马鱼石蜡组织切片技术的优化 [J]. 安徽农学通报, 2019, 25(9): 67-68.
LIU C Y, ZHAO Y, LIU J. Optimization of paraffin tissue section technology for zebrafish [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2019, 25(9): 67-68.
- [13] 张文学. 免疫学实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
ZHANG W X. Experimental techniques in immunology [M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [14] 赵燕燕. 免疫组化技术在小鼠组织中的应用 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(6): 34.
ZHAO Y Y. Application of immunohistochemical technique in mouse tissues [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2010, 19(6): 34.
- [15] LI L, YAN B, SHI Y Q, et al. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration [J]. J Biol Chem, 2012, 287(30): 25353-25360.
- [16] 戴明珠, 黄燕烽, 彭逸, 等. 斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 137-142.
DAI M Z, HUANG Y F, PENG Y, et al. Advances in zebrafish experimental research on developmental toxicity and teratogenicity [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 137-142.
- [17] 董忠典, 张宁, 刘志刚. 斑马鱼在水产动物育种学课程教学实践应用初探 [J]. 教育现代化, 2018, 5(30): 216-217.
DONG Z D, ZHANG N, LIU Z G. An exploratory study on the practical application of zebrafish in the teaching of aquaculture animal breeding [J]. Educ Modernization, 2018, 5(30): 216-217.
- [18] 李文华, 王福财. 浅谈模式生物斑马鱼在细胞生物学实验教学中的应用 [J]. 当代教育实践与教学研究, 2020, 8(13): 199-200.
LI W H, WANG F C. A brief discussion on the application of model organism zebrafish in cell biology experimental teaching [J]. Contemp Educ Res Teach Pract, 2020, 13: 199-200.
- [19] 马宁, 陈小辉, 张译月, 等. 斑马鱼科学研究平台在医学发育生物学实验教学中的应用 [J]. 基础医学教育, 2016, 18(5): 367-369.
MA N, CHEN X H, ZHANG Y Y, et al. Application of zebrafish scientific research platform in experimental teaching of medical developmental biology [J]. Basic Med Educ, 2016, 18(5): 367-369.
- [20] LI M, ZHAO L, PAGE-MCCAW P S, et al. Zebrafish genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [J]. Trends Genet, 2016, 32(12): 815-827.
- [21] MEDISHETTI R, BALAMURUGAN K, YADAVALLI K, et al. CRISPR-Cas9-induced gene knockout in zebrafish [J]. STAR Protoc, 2022, 3(4): 101779.
- [22] FARRELL J A, WANG Y, RIESENFELD S J, et al. Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis [J]. Science, 2018, 360(6392): eaar3131.
- [23] SUR A, WANG Y, CAPAR P, et al. Single-cell analysis of shared signatures and transcriptional diversity during zebrafish development [J]. Dev Cell, 2023, 58(24): 3028-3047.

[收稿日期] 2024-12-23