



模式动物斑马鱼在组织屏障发育及功能研究中的进展

李强¹, 张晶晶^{1,2*}

(1. 广东医学院附属医院神经内科, 广东 湛江 524001; 2. 广东医学院附属医院临床医学研究中心, 广东 湛江 524001)

【摘要】 斑马鱼作为一种新型的模式动物,以其独特的优势,已经成为现代遗传学、发育生物学等研究的重要模式生物。与人类及其他高等脊椎动物相似,斑马鱼同样具有不同的组织屏障系统。近年来,此领域的研究者利用斑马鱼对血脑屏障等组织屏障的研究取得了重要的进展。这对揭示诸多生理屏障相关的人类疾病的发病机制,以及探讨通过调控组织屏障通透性来达到药物有效投递的可行性等研究具有重要的启示作用。本文将介绍近年来斑马鱼作为模式动物在血脑屏障、血-视网膜屏障、皮肤表皮屏障、肠黏膜上皮屏障等组织屏障发育和功能研究中的最新进展。

【关键词】 斑马鱼;组织屏障;血脑屏障;发育;疾病发生

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0523-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.016

Research progress on the development and functions of tissue barriers using zebrafish model

LI Qiang¹, ZHANG Jing-jing^{1,2}

(1. Department of Neurology; 2. Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang Guangdong 524001, China)

【Abstract】 Zebrafish has been widely used as an important model system in research fields of genetic and developmental biology over the past 20 years. Similar to the mammals and other vertebrate animals, zebrafish also has various tissue barriers. In recent years, more and more important progress of tissue barrier studies have been achieved using zebrafish as *in vivo* model, such as blood-brain barrier. These findings contribute to the understanding of the mechanisms of diseases caused by the disorders of physiological barriers. It also helps with the modulation of the permeability of tissue barriers for drug delivery. This review summarizes recent progress of zebrafish applications in the study of tissue barriers, such as blood-brain barrier, blood-retina barrier, epidermal barrier, etc.

【Key words】 Zebrafish; Tissue barrier; Blood-brain barrier; Development; Pathogenesis.

斑马鱼起源于印度,属辐鳍亚纲鲤科短担尼鱼属,是国际标准化组织认可的 5 种鱼类实验动物之一。斑马鱼繁殖能力强,能够体外受精和发育,其胚胎发育速度快,繁殖周期短,且胚胎和幼鱼身体透明,便于形态学观察。1981 年, Oregon 大学的 George Streisinger^[1]首次介绍了斑马鱼实验技术方法,为人类利用斑马鱼作为模式动物研究人类疾病的发病机制、寻找疾病治疗方法奠定了基础。经过

30 余年的发展,斑马鱼已成为可运用于遗传、发育、药理学和毒理学等多领域研究的重要模式生物。斑马鱼基因测序工程的完成,揭示其基因组与人类基因组的相似性高达 87%,与人类有着相似的病理特征和信号传导通路,同时斑马鱼大部分组织器官在解剖学、生理学和分子水平上已被证实与哺乳动物类似,这就意味着利用斑马鱼可以作为研究大多数人类疾病的模式生物。本文拟对近年来斑马鱼在血脑

[基金项目] 国家自然科学基金(31370824,81102524);广东省“培养高层次人才特殊支持计划”专项基金(粤人才办[2015]8号)。

[作者简介] 李强,男,硕士研究生,研究方向:脑组织屏障,E-mail: 330938901@qq.com。

[通讯作者] 张晶晶,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:发育神经生物学。E-mail: gdmccrc@163.com。

屏障、血-视网膜屏障、皮肤表皮屏障、肠黏膜上皮屏障等组织屏障中的最新研究进展作一综述。

1 组织屏障简介

组织屏障是生物种系在长期进化过程中形成的机体抵抗外来有害物质(特别是细菌、病毒等微生物)入侵机体的重要结构,对维持机体内环境的稳定、各器官的功能以及正常的生命活动具有重要的作用。在人体内,组织屏障主要包括血脑屏障、血-视网膜屏障、皮肤上皮屏障、肠黏膜上皮屏障等。虽然这些屏障的功能各不相同,但主要都是由紧密连接(tight junction, TJ)、粘附连接(adhesion junction, AJ)和桥粒等结构组成,这些结构相互联系、相互作用,共同形成完整的屏障结构,对机体发挥重要的保护作用。

1.1 紧密连接

紧密连接主要由跨膜蛋白和胞质附着蛋白两种成分构成,是构成组织屏障的重要结构,位于两个相邻内皮或上皮细胞间,能够封闭细胞间隙,使相邻的细胞紧密贴合在一起,形成细胞间天然的物理屏障,起着选择性通透、维持细胞极性和细胞内环境稳态的作用。除此之外,最近的研究显示,TJ 还参与上皮细胞增殖分化、基因的转录和调控等活动^[2,3]。TJ 跨膜结构主要由跨膜蛋白 occludin, claudin 和连接黏附分子(junction adhesion molecules, JAMs)组成。其中 claudin 和 occludin 起主要作用,尤以 claudin 的功能最为重要,它是构成紧密连接的主要骨架蛋白^[4],能与 TJ 的其他成分共同作用,形成 TJ 嵴线。1998 年,日本的 Shoichiro Tsukita 研究团队首次发现并报道了 claudin1 和 claudin2 为 TJ 嵴线的整体成分^[5]。之后的研究表明,claudin 为多基因家族,至今,已有 20 多个 claudin 家族的成员在人类和小鼠体内被发现^[6],50 余个在斑马鱼中被发现^[7]。利用小鼠等哺乳动物细胞模型研究显示,不同 claudin 成员在各种组织中的分布及功能不同。TJ 中每一种 claudin 都有自己独特的细胞间隙离子选择性^[8],这种独特的选择性增加了紧密连接的结构和功能的多样性,为不同组织类型屏障功能的多样性提供了分子学依据。同时,同种或异种的 claudin 可形成聚合体并与邻近的 claudin 相互作用构成胞间连接骨架。不同的 claudin 亚型对细胞间隙渗透性的调控通常不同的,这可能是由于表达不同 claudin 的内皮细胞和上皮细胞的不同属性决定的^[9,10]。也

有证据显示某些 claudin 的亚型能够形成特殊的孔或离子通道,用来调节离子的转运^[11,12]。在对模式动物斑马鱼的研究中发现,许多在人体和小鼠中表达的 claudin 蛋白也能够在斑马鱼体内检测到,如 claudin5a 主要分布在斑马鱼脑腔内,claudin-b 在斑马鱼皮肤表皮屏障形成过程中起着重要的作用。除此之外,claudin-1, -2, 7, -10, -11, -12, -h, -e, -d, -c 等 claudin 家族的其他成员也先后在斑马鱼体内被检测到^[13],这使得斑马鱼成为研究细胞间紧密连接的重要模式动物,从而为我们进一步研究组织屏障的功能和调节提供了一种很好动物模型。

1.2 粘附连接

粘附连接是相邻细胞通过细胞膜蛋白相互连接,在 Ca^{2+} 的参与下,由单次跨膜的 cadherin 介导,在细胞膜的胞质区域通过多种蛋白与微丝相连接形成贯穿相邻细胞的细胞连接,包括与邻近上皮细胞形成的粘着带以及与成熟成纤维细胞形成的粘着斑。AJ 是不同类型细胞中均普遍存在的一种细胞与细胞之间连接的结构^[14],在细胞与细胞的粘附中起着关键作用。AJ 需要 Ca^{2+} 的参与,由相邻细胞通过细胞膜的表面蛋白相互连接。目前已发现参与粘附连接形成的蛋白主要包括钙粘蛋白家族(cadherin family)、连接素家族(nectin family)以及与 claudin、occludin 和 JAM 一起构成细胞粘附分子(cell adhesion molecules, CAMs)家族。其中形成粘附连接的钙粘蛋白 cadherin 是钙离子依赖性的介导同质性细胞粘附的单次跨膜糖蛋白,主要包括 E-cadherin, N-cadherin 和 P-cadherin 三种,在粘附连接复合体中起着关键作用^[15]。然而,E-cadherin 是上皮细胞主要的钙粘蛋白,广泛分布于成熟组织和胚胎的上皮组织中,在组织形成、胚胎发育、细胞粘附和细胞间信息传递等多种生物学过程中起着重要的调控作用;N-cadherin 主要表达于神经和肌肉组织的细胞内;而 P-cadherin 则主要表达在胚胎细胞中。此外,钙粘蛋白还存在很多种亚型,如 K-cadherin (kidney-cadherin) 和 R-cadherin (retinal-cadherin) 等。经研究发现,人 E-cadherin 基因编码 882 个氨基酸,分子量约 100×10^3 ,分为胞外区、跨膜区和胞内区三部分。其中胞内结构域上含有 p120-catenin 结合位点和 β -catenin 结合位点,可通过 β -catenin 等锚定蛋白与 F-actin 细胞骨架相连^[16];而胞外区含有 5 个由 110 个氨基酸组成的同源重复序列结构域(EC1-EC5),每个重复序列均有独立的钙

离子结合位点,能够形成依赖钙离子的同源二聚体,从而与邻近细胞的同种分子形成特异的相互作用。在对斑马鱼的研究中也发现,如 cadherin-6,在斑马鱼视网膜的形成过程中具有重要的作用^[17],这说明 E-cadherin 对调节细胞之间粘附的发生起着重要作用^[18]。连接素家族蛋白是 Ca^{2+} 非依赖的免疫球蛋白样细胞粘附分子,包括四个成员,分别为 nectin-1, nectin-2, nectin-3, nectin-4,其中,nectin-1, nectin-2, nectin-3 又分别因剪切方式的不同而产生多种亚型^[19]。

2 内皮屏障系统

内皮屏障系统主要是由内皮细胞和基膜构成。通过对小鼠等哺乳动物的研究显示,血管内皮屏障系统的调节机制非常复杂,对机体具有重要的作用。通过对血管通透性的研究显示,许多有害因素均可损伤血管内皮细胞,导致其通透性改变,引起组织、器官水肿和功能障碍;通过对这些有害因素对内皮屏障系统的损伤,能使我们对这些有害因素的损伤机制及药物治疗进行更深入的研究。模式动物斑马鱼体内的内皮屏障系统主要包括血脑屏障及血-视网膜两大内皮屏障系统,下面就这两大系统做主要介绍。

2.1 血脑屏障

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 是位于血液与神经细胞之间,系由脑毛细血管内皮细胞和内皮细胞的紧密连接、星形胶质细胞以及基底膜所组成的一个细胞联合体。它对维持中枢神经系统的内环境稳定起着重要作用。脑毛细血管内皮细胞没有窗孔,缺少收缩性蛋白,彼此之间能够形成较严密的紧密连接,从而构成一个物理屏障,使蛋白质分子及其他大分子物质难以透过,也可限制离子和非电解质通过。研究表明,TJ 存在孔通道和渗漏通道,它们具有不同的结构基础和调节机制。其中孔通道为离子选择性通道,主要由 claudin 胞外环状结构域决定其离子选择性。渗漏通道则主要与大分子物质转运有关。两种通道能够通过各自的调节机制影响 TJ 对物质的渗透性。因此,TJ 被认为是血脑屏障功能发挥作用的重要结构基础。

近年来,斑马鱼逐渐成为研究血脑屏障形成和发育以及药物渗透作用的一种理想的模式动物。Isogai 等^[20]利用微血管造影术研究注射 Berlin-blue 染料的 1 dpf - 7 dpf (受精后天数,days post fertiliza-

tion, dpf) 的斑马鱼,结果表明斑马鱼循环系统在 24 hpf (受精后小时数, hours post fertilization, hpf) 左右出现。此期间斑马鱼的血管形成过程是高度动态变化的,但又遵循相对固定的模式。Jeong 等^[21]利用辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 进行血管内注射的观察结果表明,斑马鱼同其他脊椎动物一样,具有以内皮细胞为基础的血脑屏障。2.5 dpf 之前,其头部主要血管形成为血管发生方式,自此之后,一定数量的中央动脉开始刺入脑实质,大量的微血管网开始形成。随着血管网的逐渐形成,血脑屏障也开始发育,并逐渐形成。Claudin-5 和 ZO-1 在表达增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) 的微血管的内皮细胞中检测到,这表明在 3 dpf 时斑马鱼已具备以 TJ 为基础的血脑屏障,而斑马鱼的这种循环系统,能够为其早期发育提供重要保障。

Claudin-5 是构成血脑屏障紧密连接的重要蛋白,其在斑马鱼血脑屏障的形成过程中起着非常重要的作用。在斑马鱼体内共检测到两种 claudin-5, 分别是 claudin-5a 和 claudin-5b,且两者具有高度的同源性。Xie 等^[22]通过建立双转基因斑马鱼 Tg (*l-fabp:DBP-EGFP*) 模型,将荧光染料注入不同时期的斑马鱼胚胎,通过对斑马鱼胚胎期前 4 天 claudin-5a 和 claudin-5b 的检测,进一步证实斑马鱼血脑屏障开始发育是在 3 dpf。Zhang 等^[23]通过对斑马鱼脑室形成和发育的研究,发现 claudin-5a 与脑室膨胀有密切关系,而脑室膨胀则是形成血脑屏障最至关重要的一步,claudin-5a 缺失会影响斑马鱼神经内皮细胞旁路的屏障功能,并导致紧密连接不完整和脑室膨胀障碍,从而导致血脑屏障的形成障碍。此外,claudin-5b 能够特异性的分布在脉管系统,有研究表明 claudin-5b 在节间血管 (intersegmental vessel, IVS) 的生成过程中起着重要的作用^[24],但其在血脑屏障中的作用需进一步研究。除了 claudin-5 之外,claudin 家族的其他成员 (如 claudin-1, -j, -7, -10, -11, -12, -e, -d) 也在斑马鱼脑内被发现,但在斑马鱼血脑屏障的发育形成过程的具体作用目前还需进一步研究^[13]。

ZO-1 (zonula occludens-1) 既是组成 AJ 的主要结构,也是构成 TJ 的重要成分之一,为 TJ 的许多跨膜蛋白和细胞质紧密连接蛋白搭建具有连接作用的脚手架样平台。有研究发现,由于 ZO-1 结构和功能与紧密连接的其他成员密切相关,多数情况下只要

ZO-1 受到破坏,紧密连接的功能多随之发生变化。通过对模式动物斑马鱼血脑屏障的研究发现,从 3 dpf 开始,在斑马鱼鱼卵的大脑微血管中就可检测到 ZO-1 蛋白,并且该蛋白伴随血脑屏障成熟的整个过程这再一次证实斑马鱼血脑屏障开始发育是在 3 dpf^[21]。

Occludin 是第一个被鉴定出来的跨膜蛋白^[25]。目前认为,其主要功能可能是参与调控 TJs 间的信号转导^[2]。但其在斑马鱼血脑屏障中的作用尚需进一步证实。

2.2 血-视网膜屏障

血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)由视网膜血管和视网膜色素上皮共同组成。视网膜毛细血管内皮则形成血-视网膜内屏障(blood-retinal inner barrier),视网膜色素上皮则形成血-视网膜外屏障(blood-retinal outer barrier)。屏障功能依赖于紧密连接,限制细胞间水溶性分子的运动,防止这些分子进入视网膜。电子显微镜显示围绕视网膜毛细血管内皮细胞和视网膜色素上皮顶端有大量阻塞小带,大分子和离子不能从循环中被动的扩散进入视网膜,但可与选择性的主动运输联系起来。斑马鱼眼的发育与人类非常相似,经过数十年的研究,已逐渐成为研究血-视网膜屏障的理想模式动物。Alvarez 等通过对斑马鱼视网膜血管发育过程的研究发现,在透明血管发育成视网膜血管的过程中,血管并未退化。同时,成年斑马鱼的视网膜血管内皮细胞及其周围细胞具有紧密连接结构^[26,27]。有研究显示,在斑马鱼受精后 3 dpf,其眼内的血管中即可检测到紧密连接蛋白 claudin-5,这表明斑马鱼 BRB 形成与 BBB 一样,亦是在受精后 3 天(3 dpf),同时通过对 ZO-1 蛋白的检测,发现 ZO-1 在眼内的表达比 claudin-5 更早^[22]。除了 claudin 蛋白之外, cadherin 也在斑马鱼视网膜形成中具有重要作用。Liu 等通过对斑马鱼视网膜的发育过程的研究发现,在斑马鱼受精后 32 h,便可在斑马鱼的视神经和视网膜前腹侧区域检测到 cadherin-6,而此区域是视网膜细胞最早分化的区域,若阻止 cadherin-6 的表达,则会导致视网膜细胞的形成障碍^[19]。

3 上皮屏障系统

上皮屏障系统主要是由上皮细胞和基膜等结构构成,能够通过相邻细胞间的相互连接而形成屏障,使机体免受外来有害物质的损伤,对维持机体的内

环境稳定具有重要的作用。目前在斑马鱼系统中研究较多的上皮屏障主要有皮肤表皮屏障及肠黏膜上皮屏障,下面就这两种屏障做进一步介绍。

3.1 皮肤表皮屏障

斑马鱼表皮为其内部结构和外界环境提供了一个必要的屏障结构,在胚胎期 14 hpf,表皮即可完全包裹胚胎^[28],随着胚胎的发育,其角质形成细胞也逐渐增殖,可在成鱼时分化形成三层:外层,中间层及基底层^[29],但各层间相互粘连,形成 TJ。Raymond 等使用反向遗传法阻止斑马鱼幼鱼 claudin-b 蛋白的翻译,发现 claudin-b 敲低后导致斑马鱼幼鱼皮肤表皮细胞间隙的渗透性增加,Na⁺ 丢失,使整个机体的 Na⁺ 减少,但 Cl⁻ 并未发生明显改变,从而证明了 claudin-b 在调节斑马鱼皮肤上表皮细胞渗透性和 Na⁺ 转运中起着重要的作用^[30]。Zhang 等^[31]利用仅含 194 到 319 位氨基酸的产气荚膜梭菌内毒素(cCPE₁₉₄₋₃₁₉)肽段来调控斑马鱼幼鱼表皮的渗透性,发现 cCPE₁₉₄₋₃₁₉ 能够特定的从上皮细胞移走 claudin-b,使单层细胞的紧密连接中断。通过 4 kDa 荧光染料扩散实验分析发现表皮屏障的渗透性增加主要是因为 cCPE₁₉₄₋₃₁₉ 导致的,电子显微镜结果显示移除 cCPE₁₉₄₋₃₁₉ 能够使上皮细胞间的 TJs 结构恢复。以上结果表明使用 cCPE₁₉₄₋₃₁₉ 能够调控 claudin-b 从而控制表皮屏障的瞬时开关,这就使得斑马鱼可以作为新的模式动物,来研究借助 cCPE 提高药物通过组织屏障的可能性。除此之外, Kiener 等^[32]通过对斑马鱼胚胎期表皮屏障形成过程的研究发现,Tjp/ZO-3 首先是在其胚胎的周围层(enveloping layer, EVL)被检测到,阻止 Tjp/ZO-3 的表达,将会导致 EVL 的发育缺陷,从而导致胚胎对渗透压力的敏感性增加。因此 Tjp/ZO-3 在斑马鱼胚胎期表皮屏障的功能也具有重要作用。

3.2 肠黏膜上皮屏障

人体肠道内栖息着大量的微生物,这些微生物在长期进化过程中和宿主形成了共生关系。正常情况下并不损害机体健康,这完全依赖机体完整的肠道黏膜屏障功能。在正常情况下,肠道的屏障作用可有效的阻挡肠道内 500 多种、浓度高达 10¹² 个/g 的肠道内寄生菌及其毒素向肠腔外组织、器官移位,防止机体受内源性微生物及其毒素的侵害。肠道黏膜屏障主要是由机械屏障、免疫屏障、化学屏障和生物屏障四部分组成,其中以机械屏障及免疫屏障最为重要。成年斑马鱼没有胃,其肠道分为前肠、中肠

和后肠,通过免疫组织化学检测发现其肠道上皮结构主要由柱状细胞、杯状细胞及内分泌细胞等组成,细胞之间由 TJs、AJs 组成物理屏障以限制肠腔内容物进入机体。斑马鱼的消化系统的快速发育大约是在 18 hpf^[33],其肠管逐渐形成,随着肠道与外界环境相通,微生物也逐渐进入斑马鱼肠道内。Wallace 等^[34]通过对斑马鱼肠道形成及发育的研究发现,在斑马鱼 50 hpf 时,大多数肠道上皮细胞即可观察到散乱的 ZO-1,在 74 hpf, ZO-1 更加明显。在这个时期,通过电子显微镜可观察到上皮细胞间的桥粒。有研究表明^[35],由免疫细胞和上皮细胞分泌的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF),若其分泌过多,可导致斑马鱼肠上皮屏障功能障碍,从而导致炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)的发生。该结果说明, TNF 对维持肠道的屏障功能具有重要的作用。

4 利用斑马鱼进行其他组织屏障的研究

斑马鱼作为研究组织屏障结构和功能的理想模式动物,除上述几种组织屏障外,斑马鱼体内还存在肾小球滤过屏障,能够为肾脏发育和功能的研究提供一个适用的生物模型。斑马鱼肾脏结构较为简单,其幼鱼的前肾仅由 2 个肾单位组成,并通过 2 个肾小管连接其肾小球与前肾导管,前肾导管在尾部汇合通到泄殖腔。斑马鱼的肾小球由有孔的毛细血管内皮细胞、毛细血管基底膜(GBM)、足细胞等组成,具有与高等脊椎动物肾脏一样的细胞组成。Kramer 等^[36]学者通过对斑马鱼肾小球电子显微镜观察,结果表明,斑马鱼足细胞在足状凸起部分形成的隔膜类似于哺乳动物肾脏足细胞,并已证明,斑马鱼在 24 hpf 时期的同源基因 podocin 和 nephrin 均能够特异表达于足细胞中,且该基因在肾脏足细胞隔膜的 formed 中是必不可少的。

Majumdar 等研究发现,肾小球毛细血管内皮细胞表达 VEGF 受体和其早期标志物 flk-1,而 flk-1 阳性的内皮细胞能够侵入肾小球上皮细胞形成肾小球毛细血管祥。但是当背脊动脉发育发生缺陷而无法形成正常的肾小球脉管系统时,足细胞仍然能够继续表达 WT1 和 VEGF,从该结果推断,足细胞似乎能够从附近的静脉俘获 flk-1 阳性的内皮细胞以形成具有功能的肾小球。可见,足细胞通过表达 VEGF 在吸引和聚集肾小球毛细血管丛的形成中起着重要作用^[38]。此外, Serluca 等^[37]研究表明,血管

流量及肾小球基底膜的降解与再塑^[38]也是毛细血管形成过程中的两个必需因素。

5 总结

人体时刻都与外界接触并进行物质交换,为了防范外界不良因素对机体的侵犯,人体具有数重天然保护性“墙”——组织屏障,作为阻止外来有害物质入侵机体的重要结构。斑马鱼各组织屏障的发育形成过程及结构功能同哺乳动物相似,这就使得斑马鱼成为研究组织屏障结构、功能的理想模型。通过电镜技术及分子生物学技术研究发现,斑马鱼组织屏障主要是由 TJ、AJ、桥粒等结构组成,而这些结构主要是由 occludin, claudin, cadherin, ZO 等蛋白组成,这些蛋白伴随着各组织屏障发育形成的全过程。对这些蛋白形成过程、结构和功能的研究,使得我们对早期发现疾病、研究疾病的发病机制及药物如何通过这些屏障到达靶器官提供了重要的基础。随着免疫荧光技术的发展、转基因斑马鱼模型的建立,世界各国科学工作者在研究组织屏障中也取得了重大的成果。尽管如此,由于各连接蛋白家族数量众多且功能不尽相同,各组织屏障所表达的连接蛋白又各不相同,这就为我们如何发现各组织屏障中的关键蛋白带来难题。虽然有的屏障结构研究日渐清晰,但其与疾病的发生、发展关系仍需进一步探究。如何利用这些研究成果,使药物能够更加容易通过这些屏障结构,从而达到治疗疾病的目的仍待解决。且这些研究成果都是通过动物模型研究所得,在应用于人类时是否具有差异性,仍需继续研究。

参 考 文 献

- [1] Streisinger G, Walker C, Dower N et al. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*. 1981, 291(5813): 293–296.
- [2] Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004, 286(6): C1213–1228.
- [3] Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006, 22: 207–235.
- [4] Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins [J]. *J Cell Sci*. 2004, 117(Pt 12): 2435–2447.
- [5] Nitkunan A, Lanfranchi RA, Charlton RA, et al. Brain atrophy and cerebral small vessel disease: a prospective follow-up study [J]. *Stroke*. 2011, 42(1): 133–138.
- [6] Wada M, Nagasawa H, Kawanami T, et al. Cystatin C as an index of cerebral small vessel disease: results of a cross-sectional study in community-based Japanese elderly [J]. *Eur J Neurol*. 2010, 17(3): 383–390.

- [7] Wardlaw JM, Doubal FN, Valdes-Hernandez M, et al. Blood-brain barrier permeability and long-term clinical and imaging outcomes in cerebral small vessel disease [J]. *Stroke*. 2013, 44(2): 525–527.
- [8] Williams LA, Martin-Padura I, Dejana E et al. Identification and characterisation of human junctional adhesion molecule (JAM) [J]. *Mol Immunol*. 1999, 36(17): 1175–1188.
- [9] Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* [J]. 2001, 2(4): 285–293.
- [10] Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport [J]. *Annu Rev Physiol*. 2006, 68: 403–429.
- [11] Amasheh S, Meiri N, Gitter AH et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells [J]. *J Cell Sci*. 2002, 115(Pt24): 4969–4976.
- [12] Hou J, Gomes AS, Paul DL, et al. Study of claudin function by RNA interference [J]. *J Biol Chem*. 2006, 281(47): 36117–36123.
- [13] Kolosov D, Bui P, Chasiotis H, et al. Claudins in teleost fishes [J]. *Tissue Barrier*. 2013, 1(3): e25391.
- [14] Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009, 1(6): a002899.
- [15] Adams CL, Nelson WJ. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion [J]. *Curr Opin Cell Biol*. 1998, 10(5): 572–577.
- [16] Hogan C, Serpente N, Cogram P, et al. Rap1 regulates the formation of E-cadherin based cell-cell contacts [J]. *Mol Cell Biol*. 2004, 24(15): 6690–6700.
- [17] Liu Q, Lohrville R, Marrs JA, et al. Cadherin-6 function in zebrafish retinal development [J]. *Dev Neurobiol*. 2008, 68(8): 1107–1122.
- [18] Takeichi M. Self-organization of animal tissues: cadherin-mediated processes [J]. *Dev Cell*. 2011, 21: 24–26.
- [19] Cocchi F, Lopez M, Dubreuil P, et al. Chimeric nectin1-poliovirus receptor molecules identify a nectin1 region functional in herpes simplex virus entry [J]. *J Virol*. 2001, 75(17): 7987–7994.
- [20] Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development [J]. *Dev Biol*. 2001, 230(2): 278–301.
- [21] Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC et al. Functional and developmental analysis of the blood brain barrier in zebrafish [J]. *Brain Res Bull*. 2008, 75(5): 619–628.
- [22] Xie J, Farage E, Sugimoto M, et al. A novel transgenic zebrafish model for blood-brain and blood-retinal barrier development [J]. *BMC Dev Biol*. 2010, 10: 76.
- [23] Zhang JJ, Piontek J, Wolburg H, et al. Establishment of a neuroepithelial barrier by claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(4): 1425–1430.
- [24] Hassan A, Hunt BJ, O'Sullivan M, et al. Markers of endothelial dysfunction in lacunar infarction and ischaemic leukoaraiosis [J]. *Brain*. 2003, 126 (Pt 2): 424–432.
- [25] Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions [J]. *J. Cell Biol*. 1993, 123(6 Pt 2): 1777–1788.
- [26] Alvarez Y, Cederlund ML, Cottell DC, et al. Genetic determinants of hyaloid and retinal vasculature in zebrafish [J]. *BMC Dev Biol*. 2007, 7: 114.
- [27] Santoro MM, Pesce G, Stainier DY. Characterization of vascular mural cells during zebrafish development [J]. *Mech Dev*. 2009, 126(8–9): 638–649.
- [28] Raible DW, Wood A, Hodsdon W, et al. Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish [J]. *Dev Dyn*. 1992, 195(1): 29–42.
- [29] Le Guellec D, Morvan-Dubois G, Sire JY. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Int J Dev Biol*. 2004, 48(2–3): 217–231.
- [30] Raymond W, Kwong M, Perry SF. The tight junction protein claudin-b regulates epithelial permeability and sodium handling in larval zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013, 304(7): R504–513.
- [31] Zhang J, Ni C, Yang Z, et al. Specific binding of Clostridium perfringens enterotoxin fragment to claudin-b and modulation of zebrafish epidermal barrier [J]. *Exp Dermatol*. 2015, 24(8): 605–610.
- [32] Kiener TK, Seltsova-Friedrich I, Hunziker W. Tjp3/zo-3 is critical for epidermal barrier function in zebrafish embryos [J]. *Dev Biol*. 2008, 316(1): 36–49.
- [33] Ng AN, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, et al. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis [J]. *Dev Biol*. 2005, 286: 114–135.
- [34] Wallace KN, Akhter S, Smith EM, et al. Intestinal growth and differentiation in zebrafish [J]. *Mech Dev*. 2005, 122: 157–173.
- [35] Marjoram L, Alvers A, Deerhake ME, et al. Epigenetic control of intestinal barrier function and inflammation in zebrafish [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2015, 112(9): 2770–2775.
- [36] Kramer-Zucher AG, Wiessner S, Jensen AM et al. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires nephrin, podocin and the FERM domain protein mosaic eyes [J] *Dev Biol*. 2005, 285: 316–329.
- [37] Serluca FC, Drummond IA, Fishman MC. Endothelial signaling in kidney morphogenesis: a role for hemodynamic forces [J]. *Curr Biol*. 2002, 12(6): 492–497.
- [38] Drummond IA. Kidney development and disease in the zebrafish [J]. *J Am Soc Nephrol*. 2005, 16(2): 299–304.