

# 阿尔茨海默病斑马鱼模型的研究现状及其应用

张玲希, 张信岳, 谷丽丽, 鲁佳琪, 李钦\* (浙江省医学科学院药物研究所药理研究室, 杭州 310000)

**摘要:** 斑马鱼作为一种新兴的脊椎模式动物, 被广泛用于多种疾病的研究, 包括心血管疾病、中枢神经系统疾病、肾脏疾病等。斑马鱼与人类基因高度同源, 具有体外受精、体外发育、个体透明等特点, 基于斑马鱼构建的疾病模型极大地推动了相关领域的基础性研究。本文综述了近年来运用斑马鱼构建的阿尔茨海默病相关模型的研究现状及其应用, 为斑马鱼在阿尔茨海默病新药开发研究中的应用提供新的思路。

**关键词:** 斑马鱼; 模式动物; 阿尔茨海默病; 生物学特性; 3R 原则; 应用

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)09-1145-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.022

引用本文: 张玲希, 张信岳, 谷丽丽, 等. 阿尔茨海默病斑马鱼模型的研究现状及其应用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1145-1152.

## Application of Zebrafish Model in the Study of Alzheimer's Disease

ZHANG Lingxi, ZHANG Xinyue, GU Lili, LU Jiaqi, LI Qin\* (Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310000, China)

**ABSTRACT:** Zebrafish (*Danio rerio*), as an emerging vertebrate model animal, is widely used in the research of various diseases, such as cardiovascular diseases, central nervous system diseases, kidney diseases and so on. Zebrafish's genes are highly homologous with human's. What's more, zebrafish is featuring *in vitro* fertilization, *in vitro* development in embryonic period and body transparency, etc. The models based on zebrafish has greatly promoted the basic research in the medical field. This review present the research progression in Alzheimer's disease (AD) and applications of the zebrafish models of AD in recent years. New ideas for the applications of zebrafish in the development and research of new drugs for AD are also provided.

**KEYWORDS:** zebrafish; model organism; Alzheimer's disease; biological characteristics; 3R principles; applications

斑马鱼作为目前一种新型模式脊椎动物, 与人类基因组具有高度同源性, 斑马鱼基因的核苷酸序列与人类基因的同源性约为 70%。与人类疾病相关的基因中有 87% 与斑马鱼的基因相对应<sup>[1]</sup>。斑马鱼与人类有着相似的病理特征和信号传导通路。斑马鱼的器官和组织在解剖学、生理学以及分子水平上均已被证实与哺乳动物相似。这些关于斑马鱼的基础性研究促进了斑马鱼作为疾病模型的应用与发展。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与年龄相关的进行性脑退行性疾病, 自 1907 年被首次报道以来, 预计到 2050 年, 全世界患 AD 的人数将上升至 13 150 万人, 根据 2013 年的官方死亡证明书统计, AD 已成为 65 岁以上人群中的第 5 大死因<sup>[2]</sup>。AD 的主要临床症状为进行性的记忆丧失, 主要表现为患者认知功能的下降, 以及

与此相关的抑郁症、焦虑症等并发症的出现<sup>[3]</sup>。尽管现在已经有越来越多的 AD 候选药物的药效在动物或细胞上得到明确, 但离治愈 AD 这一目标还有很长的路要走<sup>[4-6]</sup>。同时, 随着社会老龄化人口的急剧增加, 大量 AD 患者的出现给患者家属和社会带来了越来越重的经济负担, 因此寻找 AD 的治疗策略迫在眉睫。

本文综述了基于斑马鱼构建的 AD 相关模型的研究现状及其在 AD 新药研发中的应用。

### 1 AD 的研究现状

AD 通常分为遗传型 (familial AD, FAD) 和散发型 (sporadic AD, SAD) 2 种。超过 95% 的 AD 病例在本质上属于 SAD, 并且不是由任何已知的基因突变引起的。AD 的三大病理学特征是由  $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -peptide, A $\beta$ ) 积聚形成的淀粉样斑块 (amyloid plaque, AP), 由微管相关蛋白 Tau

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2017C37162); 浙江省神经精神疾病药物研究重点实验室资助项目 (2019E10021)

作者简介: 张玲希, 女, 硕士生 Tel: (0571)88215613 E-mail: m18980211993@163.com \*通信作者: 李钦, 女, 硕士, 副研究员 Tel: (0571)88215613 E-mail: liqin@zjams.com.cn

过磷酸化形成的神经纤维结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 和神经元的丢失。自 1907 年以来, 科学家们对 AD 的发病机制进行了长期的研究, 形成了以淀粉样蛋白级联学说<sup>[7-9]</sup>、胆碱能学说<sup>[10-11]</sup>、Tau 过磷酸化学说<sup>[12-13]</sup>、金属离子假说<sup>[14-15]</sup>、神经炎症学说<sup>[16-17]</sup>等为代表的几个较为成熟的假说, 见图 1A。目前, 学术界对 FAD 的分子机制研究的较为清楚。而由于 SAD 是一种具有多种变体、每种变体具有不同的临床特征和遗传关联的疾病, 所以对其发生的分子机制尽管目前学术界有诸多猜测, 见图 1B, 但仍然没有明确的答案。

在过去的十几年里, 虽然有 >50 种在研的 AD 药物成功通过了临床 II 期试验, 但都在临床 III 期时宣告失败<sup>[18]</sup>。回顾 AD 药物的研发史, 可以将 AD 药物研发失败的原因大致总结为以下几个方面: AD 疾病本身具有复杂多因性; 药物研发过程中, 用于药效评价的实验动物模型有待进一步完善; 临床试验设计不够全面恰当等<sup>[19-22]</sup>。

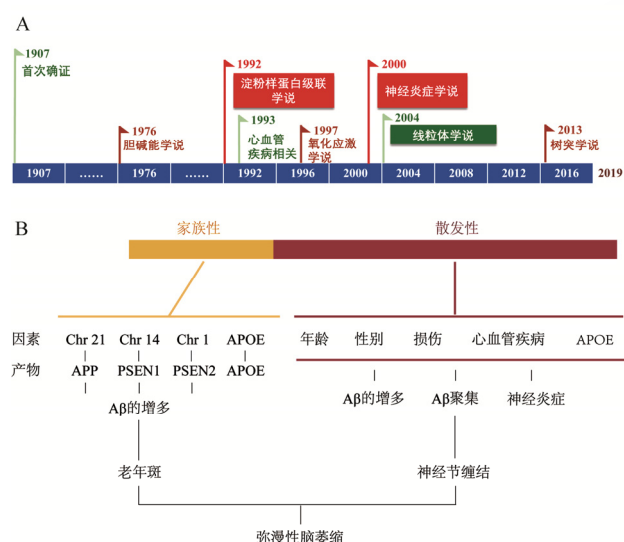


图 1 目前主流的 AD 假说和靶点

A-AD 主要假说的发展历史; B-现在研究中 AD 的主要靶点。

Fig. 1 Current mainstream AD hypothesis and targets

A-study timeline of AD's main hypothesis; B-main targets in present study.

无论是 AD 发病机制的研究还是 AD 药物的研发, 合理、有效的动物模型都是不可或缺的一环。迄今为止, 科学家们已经开发了多种用于研究 AD 的模式生物, 包括“大”模式生物(大鼠、小鼠)和“小”模式生物(斑马鱼、酵母、果蝇和秀丽隐杆线虫)等。其中, 斑马鱼兼具“大”模式生物和“小”模式生物的综合优势, 被视为连接两者之间的“桥梁”<sup>[23-25]</sup>。

## 2 斑马鱼的生物学特性

斑马鱼是一种淡水热带鲤科鱼类, 原产于印度<sup>[26]</sup>。斑马鱼个体小, 易于饲养, 成体长 4~5 cm, 饲养所需的空间小, 可满足样本需求量大研究。斑马鱼发育迅速, 受精后约 40 min 完成第一次有丝分裂, 24 h 后主要器官基本形成, 此时斑马鱼的各脏器发育情况相当于 28 d 的人类胚胎。幼鱼孵出后约 3 个月达到性成熟。成熟雌鱼每周可产卵 1 次, 产卵量大, 卵子体外受精和发育, 受精卵直径约 1 mm, 在普通的体视显微镜下即可完成显微注射和细胞移植等操作。斑马鱼的胚胎和幼鱼个体透明, 易于观察。1989 年 Streisinger 等<sup>[27-28]</sup>提出了斑马鱼作为模式动物的可能性。斑马鱼以其特殊的生理结构、高繁殖率、操作方便等优势, 一跃成为最受欢迎的模式生物之一<sup>[29]</sup>, 见图 2A。因斑马鱼在动物疾病模型构建过程中完全符合 3R(替代、减少、优化)原则, 2009 年, 斑马鱼被欧洲替代法验证中心推荐为新的替代模式动物<sup>[30]</sup>。PubMed 上的数据统计分析结果提示在过去的 30 年中, 斑马鱼已经迅速成为生物医学研究中一种流行的模式生物, 见图 2B<sup>[31-33]</sup>。

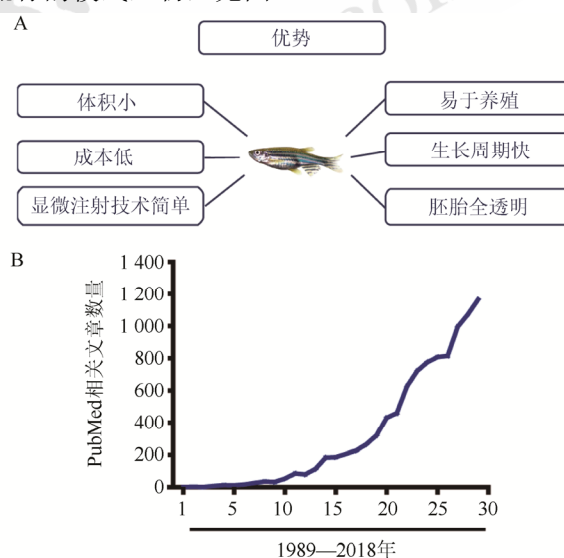


图 2 斑马鱼在实验研究中的优势及应用现状

A-斑马鱼的优势; B-近 30 年来在 PubMed 上发表的关于斑马鱼的文章大幅增长(截至 2018 年 12 月取自 PubMed 数据库, 检索方式: “zebrafish”)

Fig. 2 Advantages and applications of zebrafish model in research

A-advantages of zebrafish as a model; B-growing number of published zebrafish models(assessed in PubMed in December 2018, using terms “zebrafish”).

在现有的 AD 动物模型中, 小鼠是应用最广泛的模式动物。其在多年远交、近交等遗传筛选的

基础上已拥有大量遗传背景和不同的品系用于实验研究。但是与斑马鱼相比较,小鼠的生长周期显得漫长,基因操纵的难度大;小鼠的胚胎必须在亲代的子宫内发育,因此很难对胚胎发育的整个过程进行实时观察或实验操作;斑马鱼生理构造具有特殊性,可以利用全脑成像和细胞特异性标记技术轻松地研究斑马鱼大脑任何区域中的任一神经元<sup>[34]</sup>,但是小鼠模型却不能实现此操作。总的来说,斑马鱼作为一种新兴的模式动物,与小鼠相比有着明显的优势,见表1。

表1 斑马鱼与小鼠生物学特性的比较

Tab. 1 Comparison of biological characteristics between zebrafish and mice

| 特性      | 斑马鱼       | 小鼠     |
|---------|-----------|--------|
| 饲养成本    | 较低        | 较高     |
| 繁殖能力    | 100~200 枚 | 5~10 只 |
| 受精方式    | 体外        | 体内     |
| 构建突变体价格 | 约 2 万元    | 约 6 万元 |
| 胚胎是否透明  | 透明        | 不透明    |

斑马鱼模型在衰老相关的精神疾病和认知能力下降的临床精神病学中的应用得到了学术界越来越多的认可<sup>[35]</sup>。

运用斑马鱼构建 AD 模型还有着其独特的优势。从脑形态来说,斑马鱼和哺乳动物(啮齿动物)高度相似,包括脑的一般宏观组织和细胞形态。当斑马鱼的缰核(Habeluna)影响其行为时,所得到的数据与从人类身上得到的数据十分相近。由于缰核在进化过程中高度保守,这说明了斑马鱼和哺乳动物的脑底物之间的高度相似性<sup>[36-37]</sup>。从神经化学成分来说,在斑马鱼体内存在的所有主要的神经介质系统,包括递体、相对应的受体、转运蛋白和合成与代谢酶,与在人类和啮齿动物中观察到的对应的化学物质高度相似<sup>[38-40]</sup>。目前,斑马鱼还是唯一能进行高通量分子药物筛选的脊椎动物,这为 AD 药物研发前期进行高通量的药物筛选提供了极大的便利<sup>[41]</sup>。从构建 AD 转基因模型方面来说,斑马鱼的体外受精方式给基因操纵带来了极大的便利,斑马鱼转基因技术包括显微注射,电穿孔(电脉冲介导),精子载体法,GAL4/UAS 转录激活系统,Tol2 转座子介导等<sup>[42-47]</sup>,见图3。

综上所述,在研究 AD 发病机制及 AD 新药研发的过程中,模式动物斑马鱼发挥着越来越重要的作用。

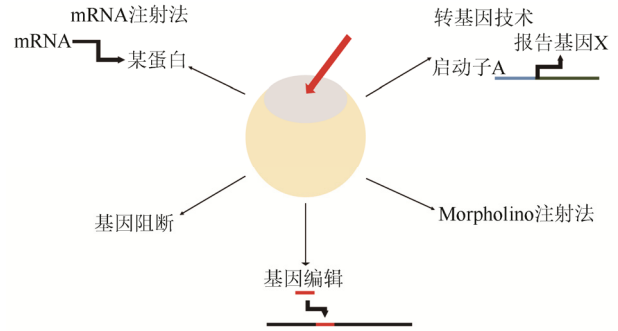


图3 斑马鱼模型中的显微注射技术

Fig. 3 Microinjection method of zebrafish

### 3 AD 的主要发病机制及其对应的斑马鱼 AD 模型的应用

本文总结了部分针对不同的 AD 发病机制建立的斑马鱼模型,这些模型可供学者对 AD 发病机制进行深入研究,或进行基于该机制的 AD 药物的筛选及研发。

#### 3.1 A $\beta$ 级联假说及斑马鱼 AD 模型的构建及应用

1992 年,Hardy 等<sup>[48]</sup>发现,淀粉样前体蛋白基因的突变会导致脑内 A $\beta$  的异常聚集,A $\beta$  和 A $\beta$  的聚合物均会对神经造成毒性,从而提出了 A $\beta$  级联假说。A $\beta$  斑块是由 A $\beta$  组成的不溶性细胞外斑块,其在 AD 患者的脑中会累积非常高的水平。A $\beta$  衍生自淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)。在 AD 中,这些弥漫性斑块遍布整个中枢神经系统<sup>[49]</sup>。

##### 3.1.1 侧脑室注射 A $\beta$ 蛋白构建斑马鱼 AD 模型

斑马鱼成鱼麻醉后脑室内注射 A $\beta$ ,随后放入运输容器中,斑马鱼苏醒后将其重新放入循环系统中饲养。注射后 1 d 左右可以观察到淀粉样蛋白的沉积<sup>[50]</sup>。该模型成功模拟了淀粉样蛋白积聚的过程。可以通过 T 迷宫对侧脑室注射 A $\beta$  后的斑马鱼的学习、记忆和空间认知等方面能力的变化进行检测。实验结束后,将斑马鱼脑组织冰冻切片并进行免疫组化染色,分析其病理学变化和神经元再生反应等。利用成年斑马鱼脑室内注射 A $\beta$  构造 AD 模型,可以帮助研究者深入了解脊椎动物大脑如何自然再生,从而通过靶向内源性 NSPCs 更好地治疗 AD。综上,利用斑马鱼侧脑室注射 A $\beta$  建立的淀粉样蛋白毒性模型可以帮助研究者简单高效地进行 AD 药物的初筛,同时也为深入研究 A $\beta$  级联假说机制提供了有效且操作简便的实验模型。

在另一项研究中,研究人员发现通过显微注射 A $\beta$ <sub>1-42</sub>,斑马鱼发生了神经元的再生,特别是神

经细胞/祖细胞增殖和神经发生。通过进一步研究年老的鱼和幼鱼的再生能力,研究人员发现,在由 A $\beta$  诱导斑马鱼神经变性的过程中,小胶质细胞被激活以防止突触变性和促进神经发生。这项研究表明了神经变性,神经炎症和神经发生之间潜在的联系<sup>[51]</sup>。

**3.1.2 转基因构建 APP<sup>sw</sup> 型斑马鱼 AD 模型** 在基础 Tol2 质粒载体上插入斑马鱼的 appb 启动子,启动人源 APP 的表达。通过点突变斑马鱼中的人源 APP,得到 APP<sup>sw</sup>(APP Swedish mutation, KM595/596NL)型目标质粒。将目标质粒与 Tol2 mRNA 以 1:1 的比例混合后注入至斑马鱼胚胎一细胞期中,挑选阳性表达的斑马鱼进行下一步实验。APP<sup>sw</sup> 型斑马鱼在体内过表达 APP,从而产生更多的 A $\beta$  使斑马鱼出现 AD 的表型。利用荧光影像,免疫组化,RT-PCR 和蛋白质印迹分析均证实了其在转基因斑马鱼的脑、心脏、眼睛和脉管系统中成功表达;行为学观察表明转基因斑马鱼的学习记忆能力明显下降具有 AD 样症状;组织病理学观察发现 APP<sup>sw</sup> 型转基因斑马鱼 AD 模型存在脑淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy, CAA),诱导神经元丢失和血管周围腔扩大<sup>[52]</sup>。在 APP<sup>sw</sup> 型斑马鱼 AD 模型中神经元和脑微管系统中的超微结构改变提示血管损伤和神经元损伤之间的密切关系,这在其他文献中也有相关报道<sup>[53-55]</sup>。与同样携带 APP<sup>sw</sup> 的转基因 AD 小鼠模型(Tg2576)相比,斑马鱼表现出了同样的 A $\beta$  沉积,神经胶质增生和神经炎性营养不良,行为学方面都表现为多动以及学习记忆能力减退。从造模时间、造模成本等方面考虑,APP<sup>sw</sup> 型斑马鱼明显优于 Tg2576 小鼠,因此可以看作是此小鼠模型的优化模型之一。在此模型基础上给予受试药物,从蛋白表达、行为学和组织病理学等层面研究药物所带来的影响,探究受试药物治疗 AD 的可能性及可能的机制。

### 3.2 Tau 过度磷酸化假说及斑马鱼 AD 模型的构建及应用

在 AD 大脑中神经纤维病变是一个重要特征指标。对这类结构进行分析发现,它是由异常的 6 种 Tau 蛋白异构体组成的,Tau 蛋白作为一类微管相关蛋白,能够与微管蛋白共聚,促进微管的形成并发挥稳定微管的作用。与正常的 Tau 蛋白相比,成对螺旋丝由异常磷酸化的 Tau 蛋白组成。

过度磷酸化的 Tau 蛋白一方面会失去与微管蛋白结合的能力,丧失稳定微管的功能,另一方面由此产生的神经节缠结阻断了正常的 Tau 蛋白发挥功能,直接导致了微管动力学的改变。神经节缠结还可以产生物理空间的阻断,妨碍了囊泡及其他相关物质的运输并与微管的功能改变造成轴突运输的受损,从而加深对神经的损害<sup>[56]</sup>。

**3.2.1 冈田酸(okadaic acid, OKA)诱导斑马鱼 AD 模型** OKA 是一种蛋白磷酸酶 2A(protein phosphatase 2A, PP2A)抑制剂<sup>[57]</sup>。而 PP2A 是 Tau 蛋白的主要去磷酸化酶<sup>[58]</sup>,对 Tau 蛋白的去磷酸化可以抑制其微管的解离,最终抑制 NFTs 的形成。因此,OKA 可以通过抑制 PP2A、增加糖原合成酶激酶 3(kinase glycogen synthase 3 $\beta$ , GSK 3 $\beta$ )使 Tau 蛋白过磷酸化造成更多的 NFTs,进而使认知能力下降诱导 AD 模型。

将斑马鱼成鱼置于 10 nmol·L<sup>-1</sup>~1 mol·L<sup>-1</sup> OKA 条件下饲养 9 d 以诱导斑马鱼 AD 模型,实验证明,在 100 nmol·L<sup>-1</sup> OKA 条件下诱导的斑马鱼 AD 模型最为有效。在 OKA 诱导的斑马鱼 AD 模型中通过免疫组化、免疫印迹等手段检测到了 A $\beta$  的聚集、Tau 的过磷酸化以及 GSK 3 $\beta$  含量的增加<sup>[59]</sup>。通过 OKA 诱导的基于 Tau 过磷酸化的斑马鱼 AD 模型,该模型制作过程简便、经济,可用于相关 AD 药物的初筛,也可用于深入研究该发病机制,以寻找高效的治疗策略。

**3.2.2 转基因 A152T 型斑马鱼 AD 模型** Tau 突变体 p.A152T 是额颞叶痴呆谱和 AD 的危险因素,它的存在明显增加了进行性核上性麻痹综合征和额颞叶痴呆的风险。通过构建表达 A152T-Tau 的转基因斑马鱼 AD 模型评估该变体的功能和生物化学后果。和野生型(wild type, WT)斑马鱼相比,A152T-Tau 型斑马鱼中 Tau 蛋白水平显著增加,从外观上表现出不同程度的背脊异常弯曲和运动缺陷。相关学者通过构建 A152T-Tau 型斑马鱼,得出了自噬诱导可能是针对 Tau 蛋白过磷酸化的有效治疗策略<sup>[60]</sup>。

### 3.3 胆碱能学说及斑马鱼 AD 模型的构建及应用

胆碱能神经元的作用遍及哺乳动物的整个大脑,包括在皮质和海马区的处理、注意力、决策以及记忆的编码和检索方面有着关键作用。作为最早被提出的学说,AD 患者脑部表现出显著的胆碱能功能障碍,其主要表现为大面积胆碱能神经

元的丢失、乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, AChR)功能异常等<sup>[10]</sup>。有学者利用免疫组织化学法检测了胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)在斑马鱼体内的位置,为后续的研究提供了参考<sup>[61]</sup>。

非特异性胆碱能激动剂卡巴胆碱(carbachol, CCh)多应用于脑切片制备和神经元细胞培养中,以检测 AChR、细胞内蛋白激酶、突触可塑性和疾病发病机制之间的联系。将成年斑马鱼的脑取出后放置于 12 孔组织培养板中,每孔装有 2 mL 的人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF),造模组给予  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 CCh,在 95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$  下培养。此模型的建立,对于分别在哺乳动物模型中获得的和在组织培养模型中获得的胆碱能功能相关的脑疾病研究数据的相关性提供了依据<sup>[62]</sup>。该造模方法给药量少、给药方式便捷,因此是一种性价比很高的造模方式。其次,该方法使用的样本是基本上具有完整内部电路的成年斑马鱼的脑部,因此也可以用作研究大脑衰老过程的模型。基于该模型探索斑马鱼 AChRs、GSK  $3\beta$  之间潜在的联系,有助于深入探讨斑马鱼作为复杂脑疾病的模式生物的应用前景。

### 3.4 其他假说及其斑马鱼 AD 模型及应用

**3.4.1 金属离子假说及斑马鱼 AD 模型** 近年来,随着对金属离子和 AD 病症的深入研究,金属离子假说也得到了越来越多的学者的认可。

铝(aluminum, Al)是一种已知的神经毒素,铝暴露被认为是 AD 发病的危险因素<sup>[63]</sup>。Al 造成神经毒性的机制复杂,其在脑内蓄积可导致乙酰胆碱活性下降,从而引起胆碱能神经功能受损;Al 也会与神经末梢的蛋白结合,从而影响神经元间的信号传递,造成神经元细胞的氧化应激损伤等<sup>[64]</sup>。有学者将斑马鱼胚胎(6 h post-fertilization, 6hpf)和斑马鱼幼鱼(72hpf)分别暴露于不同浓度的  $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶液中,结果发现胚胎对于 Al 暴露的耐受性更强,可能原因是胚胎外的卵膜在胚胎发育的早期为胚胎提供了较大的保护作用<sup>[65]</sup>。而将斑马鱼幼鱼暴露于 pH 5.8 的铝离子条件下,斑马鱼的游弋距离、平均速度显著降低,表现出了学习记忆能力的下降。

铜(copper, Cu)是已知的最古老的金属之一。有研究表明,在 AD 患者大脑中细胞外神经毒性  $\text{A}\beta$  寡聚体中有大量 Cu 富集<sup>[66]</sup>。 $\text{Cu}^{2+}$ 能使  $\text{A}\beta$

的产生速率加倍,促进其纤维的成核和延长,进而导致神经元死亡,是 AD 的危险因素之一<sup>[67]</sup>。

Cu 作为一种有害物质与 AD 相关分子结合产生毒性;Cu 在脑部皮质中降低,在血清中升高<sup>[68]</sup>。将斑马鱼暴露于含有 Cu 的环境中检测发现斑马鱼显现出了 AD 的相关特征<sup>[69-70]</sup>。

**3.4.2 神经炎症假说及斑马鱼 AD 模型** 在 AD 中,神经炎症被证实其并不是  $\text{A}\beta$  斑块或 NFTs 的继发产物,而是与这 2 个产物几近同时发生的病理过程<sup>[71]</sup>。与 AD 密切相关的 *TREM2*<sup>[72]</sup>和 *CD33*<sup>[73-74]</sup>基因的发现为神经炎症假说提供了有力的支持。

中性粒细胞在先天免疫反应中起关键作用。已知小细胞因子 Cxcl8(也称为 IL-8)是最有效的化学引诱物分子之一,它负责引导嗜中性粒细胞通过组织基质直至它们到达损伤部位。与缺乏 Cxcl8 同源物的小鼠和大鼠不同,斑马鱼具有 2 种不同的 Cxcl8 同源物: Cxcl8-11 和 Cxcl8-12<sup>[75]</sup>。基于斑马鱼建立的神经炎症模型有助于研究 Cxcl8 在中性粒细胞募集中所发挥的作用。

**3.4.3 ApoE 学说及对应的斑马鱼 AD 模型** 载脂蛋白 e(apolipoprotein E, ApoE)在 AD 中被认为是一个关键蛋白,它与特定受体结合并介导脂蛋白的摄取。协同的 ApoE $\epsilon$ 4 等位基因与 SAD 的发病机制相关联,是一个主要的危险因素<sup>[76]</sup>。

ApoE 表达于卵黄细胞层,在功能上对斑马鱼的营养具有重要意义<sup>[77]</sup>。敲低(Knock-down)或敲除(Knock-out)ApoE $\epsilon$ 4 可用于研究 ApoE 在 AD 发病过程中发挥的作用<sup>[78]</sup>。

**3.4.4 自然老化学说及对应的斑马鱼 AD 模型** 老龄化也是引起 AD 的因素之一。关于斑马鱼的自然老化模型有相关报道,但由于造模时间过长一般很少采用。

## 4 斑马鱼在 AD 中的应用前景

在 AD 疾病模型的复制过程中,与其他模式动物相比较,斑马鱼的繁殖量大,养殖技术简单,是目前实验领域十分重要的模式动物<sup>[79-80]</sup>。其次,斑马鱼体积小、渗透性好,这意味着它可以在 96 孔细胞培养板中养殖以用于高通量筛选<sup>[81-82]</sup>。在给药方面,由于斑马鱼对二甲亚砜(DMSO)有着很强的耐受性,因此对于溶解性差的脂溶性药物可以通过 DMSO 溶解后直接给予,这种给药方式不会对实验结果产生影响。斑马鱼的血脑屏障在

受精后 3 d 即形成,这使得研究者在短期内就可以在斑马鱼身上开展药物筛选工作<sup>[83]</sup>。

AD 斑马鱼模型在 AD 药物筛选方面有着很高的价值,转基因或非转基因斑马鱼 AD 模型均有相关报道和证实<sup>[84]</sup>。与斑马鱼模型相比,如果在药物筛选时使用小鼠或大鼠等哺乳类动物作为模式动物,则实验等待的时间和投入的成本将显著增加,这对于争分夺秒的药物开发研究工作来说无疑是一个不利因素。

尽管斑马鱼作为构建 AD 模型的模式动物有着众多的优势,但是同样存在着一些问题。例如,目前虽然已经有强大的基因操纵手段允许研究者随机或针对性地引入突变和鉴定突变基因,但在对斑马鱼进行基因操纵时必须面对一个问题:与拥有大量标准和高度不同的近交系的小鼠不同,斑马鱼在亲代时可以选择的品系相对较少。大多数斑马鱼品系或是远交(遗传变异),或是其繁殖历史和纯合性水平没有很好的记录。虽然许多目前可用的远交品系(例如 AB 和 TU)是良好繁殖的优良种群,但它们在多个标记基因座处的可变性暗示着潜在的问题,这也许是今后需要努力研究的一个方向<sup>[85]</sup>。

## 5 总结和展望

随着科学技术的发展,人们对斑马鱼的研究越来越深入。由于它具有与人类基因组的高度相似性的特点,并且易于培育、成本低廉,必将成为今后动物模型开发运用的重点。此外,斑马鱼具有完整的神经系统,在学习和记忆方面和人类有着很高的相似性,并且它在与 AD 相关的基因位点中与人类有着极高的相似性,综上所述,利用斑马鱼构建 AD 动物模型是可行的。特别是在基因编辑层面,斑马鱼的易操作性为实验带来了很大的便利,因此它非常适合使用生化方法来检查正常环境中的结果。虽然全基因组关联研究揭示了其他参与斑马鱼 AD 病理学发展的基因,但这些基于生物化学的方法可以快速帮助我们理解这些基因的相关性,同时减少组织培养系统实验结果的误差,以及在体内看到结果可以实现。

当然,对于 AD 这种涉及到多个器官和多个过程的疾病,研究者不能仅仅关注单一通路所带来的病变,而是应该将整个有机体统一考虑,这可能会产生意想不到的结果。也就是说,追求单一机制下的最优动物模型可能导致研究停滞不前。

未来的研究仍应致力于寻找有效、合理的 AD 模式动物,发展与之相匹配的动物模型,从而促进 AD 病因学、病理学和治疗学的快速发展,推动 AD 新药的研发进程。

## REFERENCES

- [1] LANGHEINRICH U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk [J]. *Bioessays*, 2003, 25(9): 904-912.
- [2] ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2016 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(4): 459-509.
- [3] GHOSH A K, KUMARAGURUBARAN N, TANG J. Recent developments of structure based beta-secretase inhibitors for Alzheimer's disease [J]. *Curr Top Med Chem*, 2005, 5(16): 1609-1622.
- [4] ZHOU T T, ZENG C Y, CHEN C, et al. Protective effect of novel gastrodin derivatives on Alzheimer's disease model mice [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2019, 36(5): 537-541.
- [5] DONG W, WANG S A, CHEN X J, et al. Research progress on the mechanism of resveratrol in the prevention and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2018, 35(11): 1745-1748.
- [6] CHENG J A, YANG H, ZHANG J T. Study of the brain regional homogeneity changes in response to the treatment with rivastigmine in Alzheimer's disease [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2019, 36(11): 1379-1385.
- [7] BARAGE S H, SONAWANE K D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease [J]. *Neuropeptides*, 2015(52): 1-18.
- [8] SELKOE D J, HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(6): 595-608.
- [9] HARDY J. The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the "amyloid cascade hypothesis" [J]. *FEBS J*, 2017, 284(7): 1040-1044.
- [10] CONTESTABILE A. The history of the cholinergic hypothesis [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221(2): 334-340.
- [11] BOHNEN N I, GROTHE M J, RAY N J, et al. Recent advances in cholinergic imaging and cognitive decline-Revisiting the cholinergic hypothesis of dementia [J]. *Curr Geriatr Rep*, 2018, 7(1): 1-11.
- [12] KOCAN S, DOĞAN Z. Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: The brain, neural pathology, N-methyl-D-aspartate receptors, tau protein and other risk factors [J]. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 2017, 15(1): 1-8.
- [13] LUCKE-WOLD B, SEIDEL K, UDO R, et al. Role of tau acetylation in Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy: The way forward for successful treatment [J]. *J Neurol Neurosurg*, 2017, 4(2): 140.
- [14] CRISTOVAO J S, SANTOS R, GOMES C M. Metals and neuronal metal binding proteins implicated in Alzheimer's disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016(9812178).
- [15] CALSOLARO V, EDISON P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(6): 719-732.
- [16] SPINELLO A, BONSIGNORE R, BARONE G, et al. Metal ions and metal complexes in Alzheimer's disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(26): 3996-4010.

- [17] CALSOLARO V, EDISON P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(6): 719-732.
- [18] HONG H, KIM B S, IM H I. Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders [J]. *Int Neurol*, 2016, 20(Suppl 1): S2-S7.
- [19] BACHURIN S O, BOVINA E V, USTYUGOV A A. Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: The major trends [J]. *Med Res Rev*, 2017, 37(5): 1186-1225.
- [20] KNOPMAN D S. Clinical trial design issues in mild to moderate Alzheimer disease [J]. *Cogn Behav Neurol*, 2008, 21(4): 197-201.
- [21] ANDRIEU S, COLEY N, LOVESTONE S, et al. Prevention of sporadic Alzheimer's disease: Lessons learned from clinical trials and future directions [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(9): 926-944.
- [22] MCGHEE D J, RITCHIE C W, ZAJICEK J P, et al. A review of clinical trial designs used to detect a disease-modifying effect of drug therapy in Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. *BMC Neurol*, 2016(16): 92.
- [23] NOVOA B, FIGUERAS A. Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012(946): 253-275.
- [24] RENSHAW S A, LOYNES C A, ELWORTHY S, et al. Modeling inflammation in the zebrafish: How a fish can help us understand lung disease [J]. *Exp Lung Res*, 2007, 33(10): 549-554.
- [25] HERNANDEZ P P, UNDURRAGA C, GALLARDO V E, et al. Sublethal concentrations of waterborne copper induce cellular stress and cell death in zebrafish embryos and larvae [J]. *Biol Res*, 2011, 44(1): 7-15.
- [26] ELLETT F, LIESCHKE G J. Zebrafish as a model for vertebrate hematopoiesis [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(5): 563-570.
- [27] EISEN J S. Zebrafish make a big splash [J]. *Cell*, 1996, 87(6): 969-977.
- [28] STREISINGER G, COALE F, TAGGART C, et al. Clonal origins of cells in the pigmented retina of the zebrafish eye [J]. *Dev Biol*, 1989, 131(1): 60-69.
- [29] STREISINGER G, WALKER C, DOWER N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, 1981, 291(5813): 293-296.
- [30] SCHMID B, HAASS C. Genomic editing opens new avenues for zebrafish as a model for neurodegeneration [J]. *J Neurochem*, 2013, 127(4): 461-470.
- [31] EIMON P M, RUBINSTEIN A L. The use of *in vivo* zebrafish assays in drug toxicity screening [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009, 5(4): 393-401.
- [32] GERLAI R. High-throughput behavioral screens: The first step towards finding genes involved in vertebrate brain function using zebrafish [J]. *Molecules*, 2010, 15(4): 2609-2622.
- [33] GERLAI R. Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 207(2): 223-231.
- [34] LOPES DA FONSECA T, CORREIA A, HASSELAAR W, et al. The zebrafish homologue of Parkinson's disease ATP13A2 is essential for embryonic survival [J]. *Brain Res Bull*, 2013(90): 118-126.
- [35] KAWASHIMA T, ZWART M F, YANG C T, et al. The serotonergic system tracks the outcomes of actions to mediate short-term motor learning [J]. *Cell*, 2016, 167(4): 933-946. e20.
- [36] KISHI S. Using zebrafish models to explore genetic and epigenetic impacts on evolutionary developmental origins of aging [J]. *Transl Res*, 2014, 163(2): 123-135.
- [37] BERETTA C A, DROSS N, GUITERREZ-TRIANA J A, et al. Habenula circuit development: Past, present, and future [J]. *Front Neurosci*, 2012(6): 51.
- [38] MATHURU A S, JESUTHASAN S. The medial habenula as a regulator of anxiety in adult zebrafish [J]. *Front Neural Circuits*, 2013(7): 99.
- [39] CHEN Y C, PRIYADARSHINI M, PANULA P. Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish [J]. *Histochem Cell Biol*, 2009, 132(4): 375-381.
- [40] ANICHTCHIK O, SALLINEN V, PEITSARO N, et al. Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 498(5): 593-610.
- [41] PANULA P, SALLINEN V, SUNDBIK M, et al. Modulatory neurotransmitter systems and behavior: Towards zebrafish models of neurodegenerative diseases [J]. *Zebrafish*, 2006, 3(2): 235-247.
- [42] LIESCHKE G J, CURRIE P D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(5): 353-367.
- [43] YANG Q Q, YAN C, GONG Z Y. Activation of liver stromal cells is associated with male-biased liver tumor initiation in XMRK and Myc transgenic zebrafish [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10315.
- [44] HANOVIC N J, MCMAINS E, GROSS J M. Corrigendum: a GAL4-inducible transgenic tool kit for the *in vivo* modulation of Rho GTPase activity in zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 2017, 246(6): 485.
- [45] POON K L, WANG X G, LEE S G, et al. Editor's highlight: Transgenic zebrafish reporter lines as alternative *in vivo* organ toxicity models [J]. *Toxicol Sci*, 2017, 156(1): 133-148.
- [46] FÖRSTER D, ARNOLD-AMMER I, LAURELL E, et al. Genetic targeting and anatomical registration of neuronal populations in the zebrafish brain with a new set of BAC transgenic tools [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5230.
- [47] CHLEBOWSKI A C, LA DU J K, TRUONG L, et al. Investigating the application of a nitroreductase-expressing transgenic zebrafish line for high-throughput toxicity testing [J]. *Toxicol Rep*, 2017(4): 202-210.
- [48] LI Y, LI H K, SPITSBERGEN J M, et al. Males develop faster and more severe hepatocellular carcinoma than females in *kras*<sup>V12</sup> transgenic zebrafish [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41280.
- [49] HARDY J, HIGGINS G A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis [J]. *Science*, 1992, 256(5054): 184-185.
- [50] HARRISON J R, OWEN M J. Alzheimer's disease: The amyloid hypothesis on trial [J]. *Br J Psychiatry*, 2016, 208(1): 1-3.
- [51] BHATTARAI P, THOMAS A K, COSACAK M I, et al. Modeling amyloid-β42 toxicity and neurodegeneration in adult zebrafish brain [J]. *JoVE*, 2017(128). Doi: 10.3791/56014.
- [52] BHATTARAI P, THOMAS A K, ZHANG Y X, et al. The effects of aging on Amyloid-β42-induced neurodegeneration and regeneration in adult zebrafish brain [J]. *Neurogenesis (Austin)*, 2017, 4(1): e1322666. Doi: 10.1080/23262133.2017.1322666.
- [53] PU Y Z, LIANG L, FU A L, et al. Generation of Alzheimer's disease transgenic zebrafish expressing human APP mutation under control of zebrafish *apbb* promoter [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2017, 14(6): 668-679.

- [54] MARTÍNEZ-LIZANA E, CARMONA-IRAGUI M, ALCOLEA D, et al. Cerebral amyloid angiopathy-related atraumatic convexal subarachnoid hemorrhage: An *ARIA* before the tsunami [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(5): 710-717.
- [55] AL-SHAWI R, TENNENT G A, MILLAR D J, et al. Pharmacological removal of serum amyloid P component from intracerebral plaques and cerebrovascular A $\beta$  amyloid deposits *in vivo* [J]. *Open Biol*, 2016, 6(2): 150202.
- [56] VOGELGESANG S, WARZOK R W, CASCORBI I, et al. The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2004, 1(2): 121-125.
- [57] SONAWANE S K, CHINNATHAMBI S. Prion-like propagation of post-translationally modified tau in Alzheimer's disease: A hypothesis [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 65(4): 480-490.
- [58] MEDINA M, AVILA J, VILLANUEVA N. Use of okadaic acid to identify relevant phosphopeptides in pathology: A focus on neurodegeneration [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(5): 1656-1668.
- [59] GOEDERT M, JAKES R, QI Z, et al. Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates  $\tau$  protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase [J]. *J Neurochem*, 2002, 65(6): 2804-2807.
- [60] NADA S E, WILLIAMS F E, SHAH Z A. Development of a novel and robust pharmacological model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease in zebrafish [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2016, 15(1): 86-94.
- [61] LOPEZ A, LEE S E, WOJTA K, et al. A152T tau allele causes neurodegeneration that can be ameliorated in a zebrafish model by autophagy induction [J]. *Brain*, 2017, 140(4): 1128-1146.
- [62] MUELLER T, VERNIER P, WULLIMANN M F. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio* [J]. *Brain Res*, 2004, 1011(2): 156-169.
- [63] MANS R A, HINTON K D, PAYNE C H, et al. Cholinergic stimulation of the adult zebrafish brain induces phosphorylation of glycogen synthase kinase-3  $\beta$  and extracellular signal-regulated kinase in the telencephalon [J]. *Front Mol Neurosci*, 2019(12): 91.
- [64] WANG Z J, WEI X M, YANG J L, et al. Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 610: 200-206.
- [65] KIM Y, OLIVI L, CHEONG J H, et al. Aluminum stimulates uptake of non-transferrin bound iron and transferrin bound iron in human glial cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 220(3): 349-356.
- [66] MONACO A, GRIMALDI M C, FERRANDINO I. Aluminium chloride-induced toxicity in zebrafish larvae [J]. *J Fish Dis*, 2017, 40(5): 629-635.
- [67] WANG H J, WANG M, WANG B, et al. Immunogold labeling and X-ray fluorescence microscopy reveal enrichment ratios of Cu and Zn, metabolism of APP and amyloid- $\beta$  plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Metallomics*, 2012, 4(10): 1113-1118.
- [68] PEREIRA T C, CAMPOS M M, BOGO M R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model [J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 36(7): 876-885.
- [69] ALSOP D, WOOD C M. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across multiple metals [J]. *Aquat Toxicol*, 2011, 105(3/4): 385-393.
- [70] DAI Y J, JIA Y F, CHEN N, et al. Zebrafish as a model system to study toxicology [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2014, 33(1): 11-17.
- [71] ZHANG B, GAITERI C, BODEA L G, et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease [J]. *Cell*, 2013, 153(3): 707-720.
- [72] GUERREIRO R, WOJTAS A, BRAS J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(2): 117-127.
- [73] GRICIUC A, SERRANO-POZO A, PARRADO A R, et al. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta [J]. *Neuron*, 2013, 78(4): 631-643.
- [74] BRADSHAW E M, CHIBNIK L B, KEENAN B T, et al. CD33 Alzheimer's disease locus: Altered monocyte function and amyloid biology [J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(7): 848-850.
- [75] DE OLIVEIRA S, REYES-ALDASORO C C, CANDEL S, et al. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response [J]. *J Immunol*, 2013, 190(8): 4349-4359.
- [76] ROSES A D. On the discovery of the genetic association of Apolipoprotein E genotypes and common late-onset Alzheimer disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2006, 9(Suppl 3): 361-366.
- [77] BABIN P J, THISSE C, DURLIAT M, et al. Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(16): 8622-8627.
- [78] XI Y W, NOBLE S, EKKER M. Modeling neurodegeneration in zebrafish [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2011, 11(3): 274-282.
- [79] SCHARTL M. Beyond the zebrafish: Diverse fish species for modeling human disease [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(2): 181-192.
- [80] SMITH C. Drug target validation: Hitting the target [J]. *Nature*, 2003, 422(6929): 341, 343, 345 passim.
- [81] CIARLO C, KAUFMAN C K, KINIKOGLU B, et al. A chemical screen in zebrafish embryonic cells establishes that Akt activation is required for neural crest development [J]. *Elife*, 2017(6): e29145.
- [82] MA Z P, ZHU P P, PANG M J, et al. A novel inducible mutagenesis screen enables to isolate and clone both embryonic and adult zebrafish mutants [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10381.
- [83] JEONG J Y, KWON H B, AHN J C, et al. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish [J]. *Brain Res Bull*, 2008, 75(5): 619-628.
- [84] NEWMAN M, VERDILE G, MARTINS R N, et al. Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(3): 346-352.
- [85] SISON M, CAWKER J, BUSKE C, et al. Fishing for genes influencing vertebrate behavior: Zebrafish making headway [J]. *Lab Anim (NY)*, 2006, 35(5): 33-39.

收稿日期: 2019-08-01  
(本文责编: 曹粤锋)