

斑马鱼造血系统发育与人类血液系统疾病研究进展*

夏海雄¹, 何志旭^{1,2**}, 舒莉萍^{1,3,4**}

(1. 贵州医科大学 组织工程和干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 儿童医学中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学 实验动物中心, 贵州 贵阳 550004)

[关键词] 斑马鱼; 胚胎发育; 造血系统; 突变; 造血干细胞

[中图分类号] R321-33 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2016)07-0745-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.07.001

斑马鱼(zebrafish)是一种热带硬骨鱼,目前作为研究造血系统、胚胎发生以及器官形成过程的一种脊椎动物模型^[1]。斑马鱼的显著特点是在体外排卵受精,形成的胚胎是透明的,所以在显微镜下可以观察整个器官的形成过程,可以直接观察脉管系统循环通路^[2]。斑马鱼基因组测序工程研究结果显示,其基因与人类基因保守度约85%,从而使得斑马鱼逐渐成为连接非脊椎动物(果蝇、线虫等)和哺乳动物(小鼠)的“桥梁”,越来越受到科研者的关注^[3]。在过去二十多年里,大量前期的基因筛查已经产生了成千上万的突变体,关于伴有造血缺陷的斑马鱼的研究加深了对造血系统发育及功能的认识。斑马鱼作为一种理想的人类血液疾病研究的动物模型,是以其造血系统与人类造血系统在进化上高度保守性为前提的^[4]。研究发现,斑马鱼造血系统的形成,包括红系、髓系、淋系及巨核系为主的造血系统,其相关的转录因子及信号转导通路同人类有高度的同源性,这些特点使斑马鱼在人类造血系统和血液疾病的研究中有着更加广泛的应用。由于斑马鱼早期出现血液循环时胚胎透明,可用显微镜直接观察循环细胞的数量和形态,这一优势极大地方便了突变体的筛选。目前对红系造血疾病尤其是贫血症的研究比较深入,已经建立不少疾病模型,如:地中海贫血模型、由 α -LAS-2基因突变导致的先天性铁粒幼红细胞性贫血模型等。因此本文就斑马鱼的造血发育过程以

及斑马鱼突变体在人类造血系统疾病的应用综述如下。

1 哺乳动物相关造血

在脊椎动物早期胚胎发育过程中,其造血细胞来源于自我更新的多能干细胞,造血组织和血管系统起源于腹部的中胚层区域。在哺乳动物中,原始造血第一个波峰开始于在原肠胚时期,细胞内陷穿过原始线条并迁移到卵黄囊,卵黄囊是红系造血主要区域^[5],也有少量的巨核样吞噬细胞和髓系细胞。胚胎期的红细胞具有特定的形态,主要产生胚胎期血红蛋白,在造血岛中同时也发现血细胞和血管细胞,推测两者是由共同的前体细胞成血管干细胞(hemangioblast)发育而来的,这种成血管干细胞可产生两种红细胞类型^[6]。胚胎期除了卵黄囊造血外,大多数脊椎动物背部肠系膜(即主动脉—性腺—中肾区, aorta-gonad-mesonephros, AGM)也是胚胎时期主要定向造血区,随后胎肝造血,最后骨髓造血,骨髓是成熟个体的造血部位。

实验证明,共同参与原始造血和定向造血的转录因子有 gata-1、gata-2、lmo2、TGF- β 和 scl, gata-1 在哺乳动物的红细胞和巨核细胞中表达,是红细胞系统发育所必需的重要转录因子^[7];另外,单独参与哺乳动物定向造血的转录因子还包括-myb、cbf α 2、cbf β 和 ekf 等。

* [基金项目] 国家自然科学基金资助(31360285; 31260284)

** 通信作者 E-mail: hzx@gmc.edu.cn; gyslp456@gmc.edu.cn

网络出版时间:2016-07-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160717.1318.050.html>

2 斑马鱼的造血系统

2.1 斑马鱼的原始造血

哺乳动物和鸟类的原始造血主要发生在胚外卵黄囊血岛中,主要生成红细胞。斑马鱼的原始造血主要发生在胚外的两个区域,第一个区域在脊索和躯干中胚层之间,称为中间细胞群或肾节(intermediate cell mass, ICM),第二个区域位于胚胎前部的侧板中胚层^[8],目前认为,斑马鱼原始红细胞生成的部位主要在 ICM,而原始造血的第二个区域则是产生巨噬细胞的主要场所。斑马鱼的中间细胞群呈带状结构,起源于腹侧及外侧中胚层其功能类似于哺乳动物胚胎时期卵黄囊的血岛,这也是将斑马鱼作为研究人类造血功能及血液疾病模型的原因之一。斑马鱼胚胎的中间细胞群中含有的原始造血细胞的前体(如 scl、hhex、lmo2 和 runx1 等因子)分布于前面的躯干区及后部的造血岛两个区域,后者稍后形成尾部的腹侧区,后部的造血岛的细胞较迟进入血循环,它标志着原始造血的结束;而斑马鱼胚胎侧板中胚层是早期巨噬细胞及其它髓系细胞前体的起源区。斑马鱼的血液循环在受精后 24 h 开始。

在斑马鱼原始造血时期,有一些重要的转录因子参与了原始造血过程。例如在原始祖系造血时期,目前被鉴定表达的转录因子包括 scl、gata-1、fli1、gata2、bbex、lmo2 和 tlf1r 等。其中, scl 基因编码的 helix-loop-helix 转录因子大约在胚胎受精 10 h 后在中胚层后部表达,它的表达标志着原始造血干细胞(HSCs)和血管前体(即成血管细胞)的形成; gata-1 是已经分离到的原始红细胞生成的关键转录因子,它在斑马鱼胚胎的中胚层外侧胚盘的两侧表达,然后逐渐向胚层的中间移行形成 ICM 或肾节^[9]。斑马鱼早期的髓系造血和红系定向造血在解剖位置上是分开的,分别是位于前侧和尾侧的中胚层。研究已经确定的与胚胎期髓系发育有关的转录因子有 pu. 1、mpo、L-plastin 等, pu. 1 在斑马鱼胚胎受精 16 ~ 30 h 时的造血前体细胞中表达,而之后的胚胎则不表达^[10]。这些表达 pu. 1 的细胞随后也可以表达转录因子 scl、lmo2 和 gata-2,这与哺乳动物中发现的一样,表明斑马鱼 pu. 1 是早期造血干细胞向髓系分化所必需的^[11]。经过双色原位杂交证实,斑马鱼中不存在共同表达 mpo 和 L-plastin 的细胞, mpo 只在中性粒细胞中表达,而

L-plastin 标记仅显示在巨噬细胞/单核细胞。

2.2 斑马鱼的定向(成体)造血

定向或成体造血提供给生物体长期的 HSC, 这些多能 HSC 具有无限的自我更新能力,并且能生成所有成熟的造血谱系^[11]。研究证明,斑马鱼的背主动脉处也有类似 AGM 的功能。斑马鱼胚胎受精 24 ~ 48 h,当 gata-1、gata-2 和 scl 表达时,可以发现 c-myb 和 runx1 也在 AGM 表达,而 runx1 是 AGM 和 HSC 形成的一个必要的转录因子,同时,其他转录因子如 c-myb、ikaros、lmo-2 和 scl 也在 AGM 表达^[8,11];大约在受精 4 ~ 5 d 后,当终生的成体造血机制已经建立起来时,血液的形成部位转移到肾脏。AGM 祖系被认为是成体 HSC 的前体(母体),这些成体 HSC 最终种植到肾脏和骨髓。

近几年的研究表明,哺乳动物的成体造血也可以在卵黄囊和胚盘中存在,并且认为出现在 AGM 和 HSC 的形成之前,或者伴随 HSC 一起出现^[12]。一些文献报道,这些哺乳动物组织中共同标记成体 HSC 和原始祖细胞的是一个整联蛋白—CD41 分子。在胚胎期 9.5 d 以前, CD41⁺ 的卵黄囊细胞产生多个髓样细胞和红细胞系谱,但是没有生成淋巴细胞的潜能。在胚胎时期 10.5 d 的时候,利用纯化的卵黄囊细胞通过结合 CD41⁺ c-Kit⁺ CD45⁻ 表达获得相同的结果^[13]。此外,在 gata-1 启动子的对照之下,通过对表达 GFP 的转基因老鼠的研究显示,从胚胎时期 7.5 d 的卵黄囊提纯的 gata-1 细胞能产生粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和红细胞。从这些结果表明,定向造血过程中,卵黄囊中的红髓祖细胞在 HSC 产生之前就已经出现了^[14]。斑马鱼胚胎与哺乳动物胚胎造血组织结构、造血时相、转录因子表达的相似性表明研究斑马鱼造血功能形成及机制有利于特别是对人类血液疾病的研究。

3 斑马鱼突变体与人类血液系统疾病

3.1 斑马鱼突变体的制备

Streisinger 等在 1970 年首先实现斑马鱼的单倍体培育,建立了第一个用紫外线突变的突变体^[15]。随着纯合子培养技术的成熟和广泛高效的突变剂 ENU (N-ethyl-N-nitrosourea, N-乙基-N-亚硝基脲)的出现位,位于 Tubingen 和 Boston 等地的几个实验室自 1993 年就已经开始对斑马鱼进行了 ENU 大规模系统突变筛选和建库工作,已取得可

喜的成绩。现在致斑马鱼突变的方法主要有乙基亚硝脒(N-ethyl-N-nitrosourea, ENU)化学诱导、 γ 或X射线照射及插入诱变等。ENU是一种DNA烷基化试剂,在生殖细胞减数分裂前可以诱导碱基对的替换,这种诱导产生的突变率为0.1%~0.2%,累及的是单个基因。实验方法为:将成体雄性斑马鱼暴露于突变剂ENU中,然后用这些已经诱导处理的雄鱼和正常的雌鱼交配得F1,杂合子F1子代再与野生型交配产生F2,F2代家族的50%由于特殊的突变而形成杂合子,而50%仍是野生型。当两个杂合子F2代杂交后,结果F3代中有25%是野生型鱼,50%是杂合子鱼,25%是伴有特殊突变表型的杂合子突变鱼。其次,典型的 γ 射线照射产生的突变率高达1%,突变类型包括点突变到染色体大片段的缺失或染色体的重排。插入诱变,即以逆转录病毒为载体,用显微注射法将目的基因片段导入斑马鱼的受精卵中整合到基因组,干扰正常基因的表达,其产生的突变率低于ENU化学诱导法的90%。产生高效率的突变是进行大规模突变筛选的前提,尽管 γ 射线照射产生的突变率是化学诱导法的10倍,但由于其突变常累及多个基因,突变的表型通常是若干个基因功能改变的共同结果,不利于进行致突变基因的功能分析^[16]。因此,ENU化学诱导法成为诱导斑马鱼突变的最主要的方法^[17]。

3.2 斑马鱼突变体在人类血液系统疾病的研究应用

斑马鱼有许多的有利因素,这些有利因素使这种生物模型特别适合于造血方面的研究^[18]。斑马鱼是体外受精,胚胎是透明的,便于观察和操作;且因血红蛋白是红色的,由贫血所致的突变体可用肉眼观察^[19]。在斑马鱼胚胎发育的早期,能通过氧的被动扩散呼吸,其存活无需功能性的造血组织和心血管系统的存在。因此,在早期可与死胚胎分辨开来,这有利于进行早期造血和心血管系统缺陷的研究^[20]。目前,两次大规模的化学突变筛选已获得500多个与斑马鱼早期发育有关的突变体,其中有50个突变体与造血系统有关。首先通过肉眼观察是否有血循环存在或血液颜色是否改变,然后用细胞的形态学特征,对造血系统分子标记物进行原位杂交法分析其表达谱及缺陷基因可对这些突变体进行鉴定。这些造血系统分子标记物包括转录因子:gata-1和scl。这些突变体包括:HSC、增殖与分化、低色素(红细胞染色过浅)及卟啉症样等突变类型。这些突变体主要表现为红系发育的缺

陷,仅有少数影响到髓系的发育^[21]。

目前,在斑马鱼动物模型上所完成的基因突变中,大多数突变是影响了斑马鱼ICM造血晚期红细胞的生成^[22]。其中与HSC的形成或维持有关的突变体有cloche(clo)、spadetail(spt)、kuggelig、bloodless和moonshine,这些突变体在血液循环开始时血细胞就严重减少或完全缺失。Cloche(clo)是起源于印尼鱼场半野生(杂合子)斑马鱼的自发突变,以血液和血管细胞严重缺失为特征的cloche(clo)突变体,由于心内膜的缺失而导致其心脏的心房变大。一些研究表明cloche(clo)基因包括scl、lmo2、gata-2、runx1、flila、flk1可能对HSC和成血管细胞的形成和维持是有影响的,所以cloche(clo)突变体被广泛用于HSC和成血管细胞基因方面的研究^[23]。Spadetail(spt)突变体是由于编码T-box转录因子tbx16的缺失而引起的,它同cloche(clo)突变体一样,spadetail(spt)的原始造血和定向造血均受影响。此外,kuggelig突变体以短尾和简化的卵黄管扩张为特征,其外形保持球状。Bloodless在胚胎受精开始的4d内,表现为严重的贫血,但在青春期及成鱼期可以完全恢复。

对斑马鱼的研究也加深对贫血突变体的了解^[24]。例如,伴有进行性贫血的突变体在正常血细胞发育受精最初2d后被鉴定有缺陷,这种缺陷导致血细胞数量的减少。这些突变体包括:cabernet(cab)、chablis(cba)、grenache(gre)、merlot(mot)、riesling(ris)、retsina(ret)、thunderbird(tbr),它们最初的造血功能都是正常的,能正常的表达gata-1,典型的表现是红色的血液,并且在最初几天内很难与同属性的野生型相区别;大约在受精2~4d时它们出现贫血,表明这些突变体影响了红细胞的膨胀或成熟红细胞的稳定性。在受精24h时,mot/cba的纯合子也能正常表达gata-1、scl和胚胎的珠蛋白,这暗示当红细胞生成没有受损时,这些异常的成熟红细胞就会发生溶血。Mot/cba成体纯合子红细胞有奇异的薄膜凸起和渗透脆性的增加,这表明了人类溶血性贫血是由渗透脆性的增加所引起。事实上,利用位置的克隆和候选基因的克隆方法证明mot和cba突变是位于编码红细胞蛋白4.1的基因座上,这种红细胞与膜收缩蛋白结合并固定膜收缩蛋白——肌动蛋白细胞支架到红细胞薄膜上,人类红细胞蛋白4.1缺乏会导致遗传性椭圆形红细胞增多症。ris突变体在受精4d时其纯合子伴有严重的贫血,形态上,这种ris

红细胞是伴有巨大核的异常细胞,并且这类细胞是类似于人类遗传性椭圆形红细胞增多症所观察到的细胞,这种病是由人类 β -膜收缩蛋白突变所引起。成体 ris 突变体斑马鱼在肾节观察到祖系造血数量的增加,这类似于伴有遗传性椭圆形红细胞增多症的人类骨髓中祖系红细胞数量的增加。与 mot/cba 及 ris 突变体一样,斑马鱼突变体 ret 大约在受精 4 d 后即在成体造血开始后不久开始出现贫血;与其它伴有膜蛋白异常的突变体不同的是,ret 突变体中成熟红细胞的循环在幼红细胞阶段就停止了,并且有相当大的比例(大约 27%)有两个细胞核,这表明存在细胞分裂缺陷。这个表型与人类已知的先天性红细胞生成不良性贫血 II 的表型是一样的。此外,已经发现的引起贫血的还有血红蛋白过少的突变体,其包括 chardonnay (cdy)、cbianti (cia)、frascati (frs)、gavi (gav)、montalcino (mnt)、sauternes (sau)、sbiraz (rir)、weissberbst (web) 和 zinfandel (zin)。其中,斑马鱼 sau 突变体由于原始红细胞异常分化导致胚胎在受精 2 d 后第十因子和 β -珠蛋白的减少,这种 sau 血红蛋白过少的突变体模仿的是人类疾病先天性铁贫血(human disease congenital sideroblastic anemia)。突变体 zinfandel (zin) 是斑马鱼地中海贫血的模型,但因为斑马鱼 α -珠蛋白和 β -珠蛋白位于同一条染色体上,与人类珠蛋白基因不同,zin 可能与人类典型的地中海贫血稍有不同,典型的人类地中海贫血珠蛋白表达是不平衡。weissberbst (web)、cbianti (cia) 和 chardonnay (cdy) 一样都是由于铁新陈代谢缺陷而引起的贫血。这些突变体对深入研究铁代谢、血红素代谢及血红蛋白的调节和合成提供了重要模型。

所谓光敏感性血细胞突变体,就是当血循环中的红细胞暴露在管线之下时,光敏感性血细胞突变体的红细胞能自发荧光和细胞溶解,这个表型类似于人类先天性红细胞卟啉病。例如,这些光敏感性血细胞突变体包括 dracula (drc)、desmodius (dsm)、freixinet (frx) 和 yquem (yqe),突变体 dracula (drc) 表现为光依赖性的红细溶解,是由于 ferrochelatase 基因在剪接位点 G—T 的改变产生终止密码突变所致。突变体 yquem (yqe) 导致卟啉症的特点是在紫外光下自发荧光,当其暴露在灯光下时有红细胞的光挥发作用。利用卟啉和酶的测定法证明,yqe 是由于血红素合成的一个酶即尿卟啉原脱羧酶(uroporphyrinogen decarboxylase, UROD) 缺

陷引起^[25]。

4 展望

模式生物体是全面准确解释基因功能的有效手段,被广泛应用于未知基因的功能和人类疾病的动物模型的研究。20 多年以来,斑马鱼从玻璃缸里的观赏宠物鱼逐渐发展为实验中研究遗传与发育的热门理想生物模型。它遗传的多样性以及基因功能在硬骨鱼和哺乳动物上的高度保守的特性使其很适合用于研究造血发育与造血系统疾病^[26]。相信在未来的科研工作中,通过对生物体表型变化(突变体)的分析,可在动物整体、细胞或分子水平认识基因的功能;并且随着基因组技术的完善,加上斑马鱼众多有利于基因组功能研究的特点,以斑马鱼为模式生物体对未知基因的功能和人类疾病机制的研究有诱人的应用前景。

5 参考文献

- [1] Rochford R, Ohrt C, Baresel PC, et al. Humanized mouse model of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency for in vivo assessment of hemolytic toxicity [J]. PNAS, 2013(43):17486–17491.
- [2] Tahara N, Brush M, Kawakami Y. Cell migration during heart regeneration in zebrafish [J]. Developmental Dynamics, 2016(7):774–787.
- [3] Davidson AJ, Zon LI. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis [J]. Oncogene, 2004(43):7233–7246.
- [4] Bancone G, Chowwiwat N, Somsakchaicharoen R, et al. Single low dose primaquine (0.25mg/kg) does not cause clinically significant haemolysis in G6PD deficient subjects [J]. PloS One, 2016(3):e0151898.
- [5] Barminko J, Reinholt B, Baron MH. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2016(58):18–29.
- [6] Jang GH, Lee KY, Choi J, et al. Multifaceted toxicity assessment of catalyst composites in transgenic zebrafish embryos [J]. Environ Pollut, 2016(6):45–48.
- [7] Hu B, Zhang W, Feng X, et al. Zebrafish eaf1 suppresses foxo3b expression to modulate transcriptional activity of gata1 and spi1 in primitive hematopoiesis [J]. Developmental Biology, 2014(1):81–93.
- [8] Hsia N, Zon LI. Transcriptional regulation of hematopoi-

- etic stem cell development in zebrafish[J]. *Experimental Hematology*, 2005(9):1007-1014.
- [9] Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation[J]. *International Journal of Hematology*, 2014(5):417-424.
- [10] Liu F, Yao S, Zhang T, et al. Kzfp regulates the transcription of gata2 and pu.1 during primitive hematopoiesis in zebrafish embryos[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2012(9):463-471.
- [11] Bahary N, Zon LI. Use of the zebrafish (*Danio rerio*) to define hematopoiesis[J]. *Stem Cells*, 1998(Suppl 2):67-78.
- [12] De Jong JL, Zon LI. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis[J]. *Annual Review of Genetics*, 2005(39):481-501.
- [13] Stachura DL, Traver D. Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis[J]. *Methods in cell Biology*, 2016(133):11-53.
- [14] Hu T, Zhang C, Tang Q, et al. Variant G6PD levels promote tumor cell proliferation or apoptosis via the STAT3/5 pathway in the human melanoma xenograft mouse model[J]. *BMC Cancer*, 2013(13):251.
- [15] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*, 1981(5813):293-296.
- [16] Kettleborough RN, Busch-Nentwich EM, Harvey SA, et al. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function[J]. *Nature*, 2013(7446):494-497.
- [17] Weinstein BM, Schier AF, Abdelilah S, et al. Hematopoietic mutations in the zebrafish [J]. *Development*, 1996(123):303-309.
- [18] Pedros GL, Hammes TO, Escobar TD, et al. Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish [J]. *JoVE*, 2012(63):e3865.
- [19] Xue WW, Wang HN, Wang ZM, et al. Cloning and characterization of ifitm1 and ifitm3 expression during early zebrafish development[J]. *Zygote*, 2016(1):149-158.
- [20] Cao J, Navis A, Cox BD, et al. Single epicardial cell transcriptome sequencing identifies Caveolin 1 as an essential factor in zebrafish heart regeneration[J]. *Development*, 2016(2):232-243.
- [21] Yeh JR, Munson KM, Elagib KE, et al. Discovering chemical modifiers of oncogene-regulated hematopoietic differentiation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009(4):236-243.
- [22] Zhang XY, Rodaway AR. SCL-GFP transgenic zebrafish: in vivo imaging of blood and endothelial development and identification of the initial site of definitive hematopoiesis [J]. *Developmental Biology*, 2007(2):179-194.
- [23] Ma N, Huang Z, Chen X, et al. Characterization of a weak allele of zebrafish cloche mutant [J]. *PloS One*, 2011(11):e27540.
- [24] Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish [J]. *Developmental Biology*, 2002(2):307-318.
- [25] Wang H, Long Q, Marty SD, Sassa S, Lin S. A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria [J]. *Nature Genetics*, 1998(3):239-243.
- [26] Harrison NR, Laroche FJ, Gutierrez A, Feng H. Zebrafish Models of Human Leukemia: Technological Advances and Mechanistic Insights[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016(916):335-369.

(2016-04-28 收稿, 2016-06-29 修回)

编辑: 周 凌

《贵阳医学院学报》更名启事

经国家新闻出版广电总局(新广出审[2016]267号)批准,原《贵阳医学院学报》于2016年第6期更名为《贵州医科大学学报》,主管、主办单位变更为贵州医科大学,出版单位变更为《贵州医科大学学报》编辑部(为贵州医科大学内设机构)。其他登记项目不变。

特此公告

《贵州医科大学学报》编辑部