

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00421

以斑马鱼为模式动物研究器官的发育与再生

李礼, 罗凌飞

西南大学生命科学学院, 重庆 400715

摘要: 斑马鱼因其受精卵体外发育、胚胎透明、具有较强的再生能力以及适于大规模遗传筛选的优势, 成为研究脊椎动物器官发育与再生的新兴模式动物。通过数十年的探索, 科研工作者已经在斑马鱼中建立了一套成熟的研究方法, 并对斑马鱼胚胎发育早期的细胞命运决定和分化、组织器官的形态建成以及受损后的再生过程有了初步的认识。近年来, 随着遗传筛选技术的大规模开展和活体成像技术在斑马鱼中的深入应用, 许多在小鼠等模式动物中悬而未决的问题开始得到充分解答。随着研究的不断深化和技术的不断更新, 以斑马鱼为模式动物, 对脊椎动物器官发育与再生的研究将会更加深入, 相关的调控机制也会被逐步探明, 从而为临床相关疾病的防治提供富有价值的参考。文章通过对近年来发表的文章进行回顾, 总结了斑马鱼作为模式动物研究中中枢神经系统、肝脏和胰腺、血液细胞和血管等重要器官早期发育过程及其调控机制的进展, 并阐述了以斑马鱼研究尾鳍、心脏、肝脏等器官再生的优势和初步发现。

关键词: 斑马鱼; 发育; 再生

Zebrafish as the model system to study organogenesis and regeneration

LI Li, LUO Ling-Fei

School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Zebrafish (*Danio rerio*) is becoming more and more popular as a model organism to study vertebrate organogenesis and regeneration, taking the advantage of its extra-uterine development, transparency, strong regeneration ability and suitability for the large scale genetic screen. In the past decades, a series of useful methods have been established in zebrafish, which allows studies of important questions in developmental biology including cell fate determination, differentiation, morphogenesis, and regeneration after tissue/organ injury. Recently, using large scale mutagenesis screen and improved live imaging techniques, many questions that had not been well understood in mice have been successfully investigated in zebrafish. Therefore, we are confident that the zebrafish model system will further help decipher the cellular and molecular mechanisms of organogenesis and regeneration in the future, providing valuable references for the treatment of related clinical diseases. This review just summarized the progress in the studies of the important organs development using zebrafish, such as central nervous system(CNS), liver and pancreas, blood and vessel, recently. Meanwhile, the updated

收稿日期: 2012-11-27; 修回日期: 2013-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30925022, 31130038, 31271568)资助

作者简介: 李礼, 博士, 硕士生导师, 专业方向: 发育生物学。E-mail: alisir@sina.com

通讯作者: 罗凌飞, 博士, 博士生导师, 研究方向: 组织器官发育与再生。E-mail: lluo@swu.edu.cn

网络出版时间: 2013-3-27 13:39:34

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130327.1339.003.html>

informations about the regeneration of tail fin, heart, liver, retina and so on in zebrafish were also included in this paper.

Keywords: zebrafish; organogenesis; regeneration

脊椎动物器官的发育与再生既是重要的生物学现象, 它的异常又与许多疾病的发生发展密切相关, 因此研究器官发育与再生的过程和调控机制意义重大。通过对小鼠(*Mus musculus*)等模式动物的研究, 科研工作者对于胚胎的早期发育、器官建成、组织再生等过程已有了一定程度的了解。尤其是近年来遗传筛选技术的运用, 使得调控发育和再生的分子机制开始被逐步探明。遗憾的是, 小鼠等脊椎动物体内发育、再生能力弱且难以进行大规模遗传筛选, 大大阻碍了科研工作者对于器官发育与再生过程中的细胞来源、命运分化、形态建成等的调控机制的深入认识。因此寻找合适的模式动物来深入探究器官发育与再生的调控机制至关重要。斑马鱼(*Danio rerio*)的出现为科研工作者深入回答这些问题提供了理想的模型。斑马鱼是原产于印度、孟加拉等国的淡水鱼, 属脊椎动物亚门辐鳍鱼纲鲤科, 由于其基因序列与人类基因序列保持 87% 的相似性, 近年来被广泛应用与生命科学, 尤其是器官发育与再生的研究。关于以斑马鱼为模式动物研究器官发育与再生的综述已多有报道, 本综述将着重总结近年来利用斑马鱼研究器官发育与再生所取得的重要进展。

1 斑马鱼作为模式动物研究器官发育与再生的优势

1.1 自身特点为研究器官的发育与再生提供了便利

斑马鱼在 20 世纪 80 年代由 Streisinger 等带入实验室, 在近 30 年的时间里迅速发展为研究发育与再生的新兴模式动物^[1]。不同于小鼠, 斑马鱼的受精过程在体外进行, 且受精卵发育迅速。研究表明在受精后 24 h(Hours post fertilization, hpf), 几乎所有的系统都开始了器官发生。受精后 5 d(Days post fertilization, dpf)左右, 主要的器官已基本建成并发挥功能^[2]。体外快速发育的优势为研究早期器官发生和形态分化提供了便利。另一方面, 斑马鱼胚胎透明, 便于科研工作者对器官发育和再生的过程进

行直接观察^[3]。此外, 斑马鱼具有强大的再生能力, 它的多个组织和器官如尾鳍、心脏、神经细胞、血管和肝脏等都能再生^[4], 为研究器官再生的调控机制提供了巨大优势。显而易见, 斑马鱼的自身特点为深入研究器官发育与再生的过程和机制提供了理想的平台。

1.2 大规模遗传筛选和化合物筛选在斑马鱼中易于进行

数十年来, 遗传筛选尤其是正向遗传筛选无偏倚地回答了众多生物学现象的调控机制^[2], 成为科研工作者揭示调控机理的重要方法。大规模正向遗传筛选需要生物体具有较强的繁殖能力、巨大的后代数量、较短的成熟时间以及较廉价的饲养成本, 因此, 在小鼠等模式动物中难以实行。斑马鱼强大的繁殖能力、较短的成熟时间和易于大规模饲养的优势恰恰满足了正向遗传筛选的要求。具有噬菌体遗传筛选背景的 Streisinger 通过遗传学方法率先在斑马鱼中成功创建了色素细胞发育缺陷的突变体“golden”, 开创了利用斑马鱼进行正向遗传筛选的新纪元^[1, 5]。随后, Nüsslein-Volhard 和 Driever 在斑马鱼中进行了大规模的正向遗传筛选, 成功地获得了约 4 000 个影响斑马鱼早期发育的突变体, 这次筛选进一步强化了斑马鱼进行遗传筛选的优势, 奠定了斑马鱼作为模式动物的基础^[6, 7]。近年来, 随着斑马鱼基因组测序的基本完成, 寻找特定突变体的靶向基因越来越简单, 使得正向遗传筛选技术成为科研工作者利用斑马鱼研究器官发育与再生的首选方法之一。一系列针对特定器官发育与再生的突变体筛选已在多个课题组开展, 众多的作用因子被发掘, 其中多个是从未被报道过的全新基因^[8, 9], 进一步显示了用斑马鱼研究发育与再生调控机制的优势。除此之外, 吗啡啉介导基因敲降, 尤其是近来基于 TALENs、CRISPR/Cas9 介导的基因敲除等反向遗传技术在斑马鱼中的成功应用更为科研工作者深入探索重要因子的作用机制提供了巨大优势^[1, 10-13]。

与此同时,小分子化合物的高通量筛选在斑马鱼中也蓬勃开展起来,为科研工作者寻找影响器官发育与再生的有效药物,从而治疗相关的临床疾病提供了富有价值的信息。

1.3 活体成像在斑马鱼中显示出独特优势

斑马鱼胚胎的透明和体外发育特点可以最大程度地发挥活体成像和细胞追踪的优势,有助于科研工作者直接观测发育与再生过程中更为细节的生物学现象并探索其中的调控机制,获得我们以前所未知的诸多信息。这是斑马鱼作为模式动物得以流行的又一重要原因。近年来,众多利用荧光蛋白特异性标记靶细胞的转基因品系开始被逐步构建,进一步强化了活体成像在斑马鱼中的优势。尤其在直接观测造血干细胞发生、血管和淋巴管建成以及特定细胞的迁移等细胞行为学方面,活体成像的结果直接且清晰,对于科研工作者认知整个过程贡献巨大。VE-DIC(Video-enhanced differential interference contrast)直接成像技术在斑马鱼中的改良让直接观测活体细胞的形态和显微结构简单易行^[14]。除此之外,Zhong等^[15]在斑马鱼中建立的解笼锁技术使得追踪靶细胞的来龙去脉变得可行。同时,基于光转化或光激活的Kaede、PA-GFP/PA-mCherry等蛋白^[16,17]的转基因品系的构建为更广泛地运用细胞追踪技术提供了平台^[15,18]。随着显微成像技术的日新月异,不断改进的活体成像和细胞追踪技术将为解决细胞的分化谱系、再生器官的来源等难题提供无与伦比的优势^[19]。

1.4 其他

随着斑马鱼作为模式动物的推广,众多传统和新兴的分子生物学技术如原位杂交、免疫组化、转基因品系构建、深度测序等在斑马鱼中广泛运用并不断成熟。近年来基于特定组织或细胞功能的直接染色技术,如针对肝脏的油红、巨噬细胞的中性红、粒细胞的苏丹黑等的成功运用更显示了利用斑马鱼操作的简便^[14,20,21]。

2 以斑马鱼为模式动物研究器官发育

2.1 中枢神经系统的发育

脊椎动物的中枢神经系统起源于原肠胚时期的外胚层。通过对小鼠等模式动物的研究,科研工作

者发现脊椎动物中枢神经系统尤其是脑的建成主要经历以下几个阶段:1)随着原肠胚时期背腹轴极性的建立,神经板首先开始形成^[22];2)神经板形成后其边缘区域会向背侧的中线区域折叠,并不断迁移至背部中线区域融合成管状结构的神经管;3)神经管进一步分化使前脑、中脑和后脑开始形成,随后前脑进一步分化出端脑、眼睛、下丘和间脑等组织。斑马鱼中枢神经系统的建成与小鼠相似,但神经管形成过程略有不同。在斑马鱼中,神经板首先通过融合形成神经龙骨,进而发育成为神经腔,神经腔中心的细胞通过脱离的方式渐渐形成神经管^[23]。伴随着中枢神经系统的建立,神经元渐渐成熟,轴突开始充分发育,在出生后1d左右,斑马鱼胚胎便会出现身体的自发摆动^[24]。尽管斑马鱼中枢神经系统的发育过程与小鼠有所区别,但众多在小鼠中发挥作用的调节因子在斑马鱼的中枢神经系统发育中也表现出重要功能,这种保守性使得基于斑马鱼来研究中枢神经系统发育的调控机制意义重大。基于细胞系和小鼠的研究表明在神经板从外胚层形成过程中,Bmp信号通路起着非常重要的作用,它可以促进外胚层细胞的命运向表皮细胞分化而抑制神经细胞的发生^[25,26]。在斑马鱼中,通过突变体筛选,科研工作者发现Bmp2和Bmp7功能缺失的突变体表现出神经板的扩张和非神经外胚层的缺失^[27,28],进一步揭示了Bmp信号通路在调控神经系统发育中的保守性。Wnt信号通路在脑的各个部分模式建成中至关重要^[22,29]。斑马鱼中,多个Wnt抑制因子功能缺陷的突变体,如*tlc*、*axin1*、*tcf3*等,都表现出了端脑和眼睛发育的缺失和间脑的扩张^[30-32]。除此之外,Wnt信号通路在多巴胺能神经元簇的形成、大脑皮质和皮质下组织的命运决定^[33]等过程中也不可或缺。近来的研究表明,Shh信号通路的下游作用因子*foxl1*在大脑皮质的命运得以正常形成和维持中也扮演了重要角色,而这种作用是通过通过对*wnt8b*的抑制得以实现的,进一步提示多个信号通路在早期中枢神经系统发育尤其是细胞命运决定中都扮演着重要角色^[34,35]。除此之外,miRNA的作用也开始被越来越关注。斑马鱼中剪切miRNA的Dicer缺失会导致脑发育的严重畸形^[36],进一步证实了miRNA在脑早期发育中的重要作用。

2.2 消化腺的发育

在小鼠和人等脊椎动物中, 肝脏和胰腺是重要的消化腺且共同来自于内胚层。对于肝脏和胰腺发育的研究在斑马鱼中进行较多, 已有的研究表明在 6 hpf 的原肠胚时期, 位于胚胎腹侧且距离背侧组织中心较远的内胚层细胞会分化为肝芽, 而较近的背侧内胚层细胞则倾向于发育成胰腺^[37]。关于随后的肝脏和胰腺前体细胞形成过程, 目前存在着两种假说, Korzh 等^[38]通过分析肝脏和胰腺前体细胞表达的特异性基因如 *cp*、*pdx1* 等, 认为在消化道形态建成以前, 肝脏前体细胞的命运已经形成, 这些前体细胞进一步迁徙和聚集到特定的部位分化为肝芽。胰腺前体细胞也是以同样的方式在 14 hpf 时完成了向胰腺的分化进而迁徙聚集形成胰腺。这种假说因为缺乏确切的实验证明, 目前尚未得到广泛认同。另一种假说基于解剖形态学以及肝脏、胰腺所表达的重要因子, 认为肝脏的形成大致经历了以下步骤^[39]:(1)在体节形成早期大约 4~10 体节时期, 内胚层细胞增殖为片层结构并在目前还未知的区域预定了肝脏的前体细胞。在这个时期, 预定的肝脏前体细胞仍具有一定的多能性, 还没有完全分化为已决定命运的肝脏前体细胞。(2)在 10 体节以后时期, 内胚层细胞按从头到尾的次序逐步向胚胎中轴线聚集, 与此同时, 预定区域内的细胞逐渐完成向肝脏前体细胞的分化并随着整个内胚层向中线聚集。内胚层细胞在 24 hpf 基本完成向胚胎中轴的聚集而形成原始肠管, 肝脏前体细胞在原始肠管的某一区域聚集。(3)从 24 hpf 肠管形成之后到约 34 hpf, 肝脏前体细胞经过一段快速的细胞分裂时期形成肝芽, 这段时间里肝细胞也逐步完成分化成为肝脏原基。(4)从 34 hpf 到 76 hpf, 肝脏原基进入形态建成阶段。肝细胞继续增殖, 肝芽继续生长膨大, 肝脏原基内血管、胆管逐渐形成, 胆囊开始形成。(5)至 76 hpf, 肝脏原基基本成熟, 随后肝脏开始分泌白蛋白并发挥功能, 肝脏体积进一步增大。根据以上发育过程, 在斑马鱼中, 肝脏原基的分化形成大约经历了从 6 hpf 内胚层开始分化到 76 hpf 形成约 70 h^[2]。斑马鱼胰腺的发育大致经历了相似的步骤:(1)在 5~7 体节时期, 胰腺的前体细胞开始在原肠胚中轴两侧的内胚层细胞中形成;(2)胚胎中轴两侧的前体细胞在形成后开始向中线融合并在 10 体节时期出现了背侧胰腺芽;

(3)在 16 体节时期, 前体融合完成, α 、 β 、 δ 细胞开始产生;(4)从 24 hpf~48 hpf, 随着肠管方向的扭转, 背侧胰腺芽会重新定位于肠管的右侧并在 28 hpf 分化出内分泌胰岛;(5)在 40 hpf, 位于背侧胰腺芽前方腹侧的肠管开始产生出腹侧胰腺芽, 随后, 腹侧胰腺芽开始向后方生长, 渐渐包围第一胰腺芽, 在 52 hpf 融合完成, 在此过程中及随后直至 72 hpf, 腹侧胰腺芽进一步分化出外分泌胰腺、胰腺管以及靠近胰腺管的部分内分泌胰腺^[40,41]。

因为同是起源于内胚层, 多个在内胚层命运特化过程中发挥作用的因子都在肝脏和胰腺原基的建成中发挥重要功能, 如 *Nodal*、*Fgf*、*RA* 和 *Bmp* 等多个信号通路以及 *Gata* 家族成员、*Sox17*、*Foxa2* 和 *Foxa3* 等^[42-43]多个因子。在肝脏和胰腺的发育过程中, *Bmp* 和 *Fgf* 信号通路作用重大。*fgf10* 的缺失会导致肝脏、胰腺管发育的缺陷和内分泌胰腺的过度分化, 表明 *Fgf10* 在确保和维持肝脏和胰腺细胞的各自命运过程中至关重要^[44]。*Bmp2b* 则可以诱导内胚层向肝脏的分化但抑制胰腺的形成^[45]。通过研究 *Mypt1* 的斑马鱼突变体, Huang 等^[46]发现 *Mypt1* 对于肝原基细胞接受 *Bmp* 信号从而促使肝脏形成至关重要, 这种作用是通过介导后部侧板中胚层 (*Lateral plate mesoderm, LPM*) 和内胚层之间细胞的协调运动来实现的。近来研究表明 *Fgf* 和 *Bmp* 信号主要是通过作用于 *RA* 从而进一步控制 *Hnf1b* 的活性来实现其调节功能^[47], 而 *Hnf1b* 在肝脏和胰腺的发育中至关重要^[40]。此外, *hdac1* 在内胚层细胞命运特化为肝脏或是胰腺以及内分泌胰腺胰岛的形态建成中发挥重要作用^[48]。另一个在肝脏和胰腺原基命运决定中起重要作用的信号通路是 *Wnt*, 在斑马鱼中, *prr/wnt2bb* 突变体的肝芽无法形成而其余内胚层器官发育正常^[49], 而在体节形成过程中过表达 *wnt8* 可以导致肝脏发育的增大, 而胰腺芽却变小, 进一步揭示了 *Wnt* 信号通路在肝脏和胰腺发育过程中作用的复杂性。近来通过研究斑马鱼肝脏发育缺陷的突变体, Lu 等^[50]发现, 单次跨膜蛋白 *EpCAM* 使内胚层细胞具备了特异性响应 *Wnt2bb* 肝脏诱导信号的能力, 而这个过程是通过特异性地抑制 *Lrp6* 内吞, 进而帮助对于 *Wnt* 信号激活至关重要的 *Lrp6* 信号转导复合体的形成来实现的。这些研究对于我们深入认识经典 *Wnt* 信号 *Wnt2bb* 如何诱导肝脏发生至关

重要。此外,在肝脏前体细胞分化为肝细胞或胆管细胞过程中 Notch 信号具有重要作用^[51],不仅如此,近来的研究发现在 Notch 突变体 *mib* 中,外分泌腺会加快分化,提示 Notch 在胰腺的发育中也发挥重要功能。在肝芽形成过程中,转录因子 Hex、Prox1 是必需的^[2, 52],肝脏生长因子(Hgf)和转录因子 Hlx 在肝细胞的增殖中发挥重要功能。近年来随着斑马鱼正向遗传筛选的开展,其他的重要因子,如与 *p53* 信号通路密切相关的 *def*^[49]、RNA 结合基因 *npo*^[53]、以及 TOR 信号通路^[54]对于肝脏发育的作用也开始被揭示。除此之外,通过研究斑马鱼的 *dnmt* 突变体,科研工作者进一步揭示了表观遗传对肝脏发育的影响^[2]。因此,在肝脏的形成和发育过程中,多个信号通路和因子都发挥着重要作用。

在胰腺发育过程中,近来研究表明 Hh 信号通路在外分泌腺的发育过程中至关重要。*pdx1* 因子对于胰腺细胞类型的分化不可或缺,但在 β 细胞的形态建成中作用有限。通过研究斑马鱼的突变体 *med12/shiri*,科研工作者进一步发现 *her5* 在胰腺芽基的扩张中扮演重要角色。近年来,通过对 *ptfla* 的突变体的研究,Dong 等^[55]发现 *ptfla* 在内分泌腺的命运特化中起着重要的平衡作用即低水平的 *ptfla* 可以促进内分泌腺的命运特化,但外分泌腺的形成则需要较高水平的 *ptfla*。

2.3 血液细胞的发育

众所周知,血液细胞是一个大家族,主要有 3 大系,即由红细胞、血小板组成的红系,巨噬细胞和粒细胞构成的髓系以及由 T、B 淋巴细胞形成的淋系,整个血液细胞家族最初来源于一个共同的祖细胞即源于中胚层的造血干细胞。研究表明,整个血液细胞的形成并不是一蹴而就的。虽然已有研究报道显示整个造血过程是通过相继多次的血液发生而最终形成,但是两次造血,即原始造血和永久造血,一直以来都被认为是最经典的造血模式^[56]。原始造血是发生在胚胎早期的一次造血,在小鼠中主要发生于 E7.5 时期的位于卵黄囊的血岛。原始造血持续时间短暂,且只产生最初的红细胞和少许髓系细胞,并不分化出淋系细胞,因此多数观点倾向认为在原始造血阶段并不存在具有全能性的造血干细胞^[56]。永久造血相对稍晚,在 mice 中开始于 E10.5 时期的

Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM)区域。不同于原始造血,永久造血会产生造血干细胞并分化出所有的血液细胞谱系。研究表明,造血干细胞在 AGM 区域形成以后会出现在小鼠的胚胎期肝脏并最终汇集于骨髓。骨髓是永久造血持续发生的器官,在那里造血干细胞持续不断地进行自我更新和增殖分化,源源不断地供应着维持机体正常生命活动所需的各种血液细胞。与小鼠相似,斑马鱼的血液发生也分为两次。斑马鱼的原始造血开始于 6 hpf 左右,发生在解剖位置不同的前部(ALM)和后部侧板中胚层(PLM)区域,其中 ALM 产生原始的粒细胞和巨噬细胞,而 PLM 主要产生原始的红细胞,原始造血将持续至血液循环开始,也就是 24 hpf 左右^[56]。随后永久造血开始,从 26 hpf 开始,造血干细胞陆续从背侧大动脉腹侧(Dorsal aorta, DA)区域的血液血管母细胞以出芽方式完成从内皮细胞向造血干细胞的命运转变(Endothelial haematopoietic transition, EHT)^[57],造血干细胞产生后会迁移到后部血岛(Caudal hematopoietic tissue, CHT)进一步增殖和分化。在受精后 3~4 d,造血干细胞开始迁移到胸腺和肾脏,在胸腺中造血干细胞进一步分化为 T 淋巴细胞,而肾脏则变成永久造血持续发生的器官^[17, 58]。从造血干细胞向下游的血液细胞分化的过程中,细胞的全能性逐渐丧失并有序地分化为各个谱系的前体细胞,进而分化为成熟的血液细胞。整个过程中细胞命运的分化是受到严格控制的。

在原始造血的发生中,Sc1 作为较上游的作用因子对于整个原始造血的发生都起着控制作用^[56]。而 *pu.1* 和 *gata1* 的拮抗作用对于前体细胞的命运决定为红系或是髓系细胞至关重要,研究表明,*Pu.1* 功能缺失时,前体细胞向髓系细胞的分化将会被阻断取而代之分化为红细胞,而 *Gata1* 功能缺失的斑马鱼突变体表现为红细胞发育的缺失和髓系细胞数目的大量增生^[59]。在髓系前体细胞向巨噬细胞或是粒细胞的分化过程中,*Pu.1* 表达水平的高低是细胞命运的决定因素。*Runx1* 是 *Pu.1* 的下游因子,通过负反馈作用于 *pu.1* 的启动序列使 *Pu.1* 低水平表达确保粒细胞的形成。而高水平的 *Pu.1* 则通过 *Irf8* 促使前体细胞向巨噬细胞分化。因此 *pu.1*、*runx1* 和 *irf8* 的相互协同以及拮抗作用保障了髓系前体细胞的正确分化^[60, 61]。永久造血中造血干细胞命运特化的调控机

制相对复杂, Wnt/ β -catenin、Notch-Delta、Fgf 以及 Prostaglandin 等信号通路都在其中扮演着重要角色^[56-62], 这些信号通路又进一步通过直接或是间接地调控特异性影响造血干细胞的因子 Scl、Runx1、Cmyb、Lmo2 等来发挥作用。近年来通过活体实时成像技术, Herbolmel 和 Traver 等^[57, 63]直接证明了 Wnt16、Runx1 等因子主要是通过影响造血干细胞的 EHT 过程来影响永久造血, 而 Cmyb 的作用更多的是在造血干细胞向后部血岛和肾脏的迁移中发挥影响^[64]。通过正向遗传筛选和小分子化合物筛选, 多个在造血干细胞形成、增殖、分化、迁移以及存活中起作用的因子也已相继被揭示。

2.4 血管和淋巴管的发生

已有的研究表明脊椎动物血管与血液细胞来源于共同的前体细胞, 即由中胚层分化而来的血液血管母细胞^[65-66]。但由于模式动物的缺乏, 对于早期血管形成的动态过程了解较少。近年来活体成像技术在斑马鱼中的成功运用使得科研工作者可以直观地观测和研究整个血管发育的动态过程。通过在活体状态下直接观测标记血管的 *Tg(fli1a:eGFP)* 或 *Tg(flk1:eGFP)* 转基因斑马鱼品系, 科研工作者发现斑马鱼的血管发生主要经历以下几个阶段: (1) 在 12~14 hpf, 成血管祖细胞已经在胚胎两侧的侧板中胚层区域形成紧密聚合体^[67], 这些聚合体起初沿着胚胎的前后轴不连续的排列; (2) 在来源于中胚层信号的影响下, 这些成血管祖细胞以单细胞的方式向胚胎的背侧中轴线迁移^[68], 并逐渐融合形成管状结构, 整个迁移过程分为两次, 第一次的迁移形成背部主动脉(DA), 第二次迁移形成静脉(Posterior cardinal vein, PCV); (3) 大约在 28~30 hpf, 腔隙结构清晰可见的动脉和静脉血管便形成, 继而血液开始正常循环流动^[69]。近年来, 关于成血管祖细胞迁移、融合并特化为 DA 和 PCV 的调控机制开始被深入研究。在成血管祖细胞特化为动脉或是静脉细胞过程中, Vegf 和 Notch 信号通路的相互作用极为关键^[70]。已有的研究表明, 由脊索分泌的 Shh 可以诱导产生 Vegfa, Vegfa 通过作用于成血管祖细胞上的受体 Vegfr2/ Kdr/Flk1, 从而激活 Notch 信号通路使得下游的相关因子如 phospholipase C (PLC)- γ 1 等开始表达^[71], 进而诱导成血管祖细胞分化为动脉细胞。但

在静脉细胞命运特化的过程中, Vegf 和 Notch 的角色非常有限^[72], 截至目前, 静脉细胞命运特化的分子机制仍知之甚少, 虽然 Eph-ephrin 亚家族的 EphrinB2/Efnb2 在动脉中高表达但另一个成员 EphB4 在静脉中高表达提示着这个家族在动静脉细胞命运特化中可能发挥着重要作用^[73], 但多数的观点倾向认为静脉细胞的命运特化是在早期已经预先确定的。

淋巴管是脊椎动物所特有的重要结构, 但由于淋巴管特异性标记物和理想研究平台的匮乏, 长久以来关于它的细胞起源、发育过程和调控机制饱受争议^[74]。Yaniv 等^[75]通过活体情况下实时观测可以荧光标记淋巴管的 *Tg(fli1a:eGFP)* 斑马鱼转基因品系, 直接揭示了斑马鱼淋巴管的起源和发育过程。活体成像资料显示在 2 dpf, 淋巴组织的重要结构胸导管开始形成于由 PCV 而来的索旁血管。随后淋巴管从胸导管上长出并在 DV 腹侧面的组织中沿着体轴先后生长、融合, 成为一个联通的网络。这个研究无争议的证明了淋巴管来源于静脉血管的内皮细胞。在静脉内皮细胞特化为淋巴管内皮细胞(Lymphatic endothelial cells, LECs)过程中, Sox18、Prox1 起着举足轻重的作用, 而 *prox1* 的表达恰恰受 *sox18* 的调控, 但对于 *prox1* 的下游作用因子, 目前仍不得而知^[74]。虽然有研究表明 *Vegfc* 在 LEC 特化中也扮演着重要角色^[76], 但是相关的体内实验证据仍不足, 因此相关问题的解答仍需要进一步的研究^[77]。Hogan 等^[78]近来发现当斑马鱼的 *ccbel* 被敲降时, LEC 的出芽和迁移过程都受到明显影响, 但关于 *ccbel* 作用的方式和具体机制, 目前仍在进一步研究中。

3 以斑马鱼为模式动物研究器官再生

再生能力在不同生物不同组织中的迥异使得再生的调控机制一直以来都是生命科学的研究热点, 而临床的神经退行性疾病、肿瘤切除后的器官再生、心肌的损伤、疤痕的产生等难题的亟待破解也使得对于再生机制的了解具有重大的应用价值。长久以来, 蝾螈(*Salamander*) 等低等脊椎动物因其再生能力强而成为科研工作者研究再生的首选, 但由于蝾螈在实验室条件下极难饲养, 许多研究方法难以实行^[79], 阻碍了对再生机制的深入认识。另一方面, 小鼠等高等脊椎动物再生能力的匮乏也使其难以成为

研究再生的理想模型。斑马鱼具有很强的再生能力,它的多个组织和器官如尾鳍、心脏、神经细胞、视网膜、肝脏等在切除或受损后短期内都可以完整再生,因此近年来渐渐成为研究再生的理想模型^[4]。目前为止,一系列造成组织或器官特异性损伤的方法和技术在斑马鱼中已经建立^[80],这些方法主要包括:(1)通过手术对部分组织或器官进行切除;(2)通过强光或激光造成局部组织或特异性细胞的损伤;(3)通过化学试剂的处理造成损伤;(4)采用转基因技术建立在特定的组织或细胞表达致死蛋白或相关化合物的稳定遗传品系等。通过这些技术的应用,关于斑马鱼再生器官的细胞来源和分子机制等问题已开始被初步探明。

3.1 尾鳍的再生

虽然斑马鱼的多个器官和组织都可以再生,但是尾鳍再生模型因其操作容易、尾鳍结构简单和组织再生迅速而率先被科研工作者所选用。当成年斑马鱼的尾鳍被95%切除后,在2周左右的时间内就可以快速再生^[4]。通过对尾鳍再生过程的研究,科研工作者发现当尾鳍被切除后,切口将迅速被两侧迁移而来的上皮细胞所封闭从而形成顶端上皮帽(Apical epithelial cap, AEC)^[81]。随后,这些覆盖在切口的上皮组织开始变厚,其下的间质细胞开始在一些生长因子的影响下去分化、增殖并从较远处向伤口的AEC迁移,使得间质组织渐渐失去原来的结构形态完成去组织化^[81]。当去组织化完成后,具有多能性的胚基开始形成,标志着再生的开始。目前为止,胚基的形成来源还不清楚,它极有可能来源于切口附近的固有干细胞或是间质细胞的去分化。在尾鳍切除后24 h左右,胚基细胞开始进一步分化为形态相同但功能迥异的两个部分。靠近AEC部分的胚基会表达*msxb*,并增殖的非常缓慢,被认为是真正的再生中心,控制着再生的进程;而离AEC较远的胚基细胞则迅速增殖。上皮组织和其下结缔组织的相互作用维持着这两个区域的差别^[82]。较远区域胚基细胞的迅速增殖标志着再生开始进入迅速生长期。在此过程中,新生的细胞将不断地迁移并分化为再生尾鳍的间质细胞和成纤维细胞^[83]。当再生的尾鳍达到原先的长度时,再生随即终止。对于再生终止的调控机制,目前知之甚少。在再生过程中,

Wnt及其下游的RA和Fgf信号通路发挥着重要作用。研究表明,在胚基形成过程中,受Wnt调节的Lef1不可或缺^[84]。近来的研究进一步表明,Shh信号通路以及Non-coding RNAs也是调节尾鳍再生的重要因素^[81]。

3.2 心脏的再生

心肌细胞再生能力的缺失使得临床的心肌受损等疾病极难治愈,因此探究调节心脏再生的机制对于再生医学意义重大。近年来,科研工作者发现斑马鱼的心脏具有极强的再生能力,是研究心脏再生的理想模型。为了模仿人体的心肌坏死过程,Poss等^[85]首先用手术的方法切除了20%左右的成年斑马鱼的心室组织,随后发现损伤引起的出血迅速凝结,在受伤后7 d内成熟的纤维蛋白便将受伤区域覆盖并充填,随后再生的心肌细胞开始出现并大量增殖,在切除后60 d左右,心室基本完全再生。遗憾的是,手术造成的创伤不能够完全模仿临床常见的由于缺血引起的心肌坏死过程^[86]。因此,近年来,多个课题组开始尝试着通过快速冷冻的方法造成心室组织的心肌坏死^[87]。这种冷冻后损伤模型会导致约25%的心室肌肉坏死但并不影响斑马鱼的存活。尽管这种模型造成的心肌坏死会需要较长的时间来完成再生,但坏死组织的清除和随后的心脏室壁再生并不受影响,因此可以作为研究心脏再生的平台^[88]。与此同时,通过转基因技术构建的药物诱导的特异性心肌组织大规模坏死模型^[89]也开始建立。结果表明在药物处理5~7 d后,超过60%的心室肌肉会发生坏死但不影响斑马鱼的存活,而30 d后坏死的心室组织就会完全再生。通过转基因技术构建的药物诱导模型操作简单,为通过大规模遗传筛选方法来深入研究心脏再生的调节机制提供了可能。在心脏再生过程中,RA、Fgf、Notch等信号通路的作用已被广泛认知。而Lien等^[90]通过筛选进一步提示Pdgf家族因子在心脏再生过程扮演重要角色,近来的研究进一步确认*pdgf*的作用主要是再次激活心脏再生过程中的血管发生^[91]。除此之外,在细胞周期中起作用的Mps1、Pololike kinase 1等因子近年来也被揭示在心脏再生中起着重要作用^[88]。

3.3 视网膜和脊髓再生

不同于小鼠等高等生物,斑马鱼的神经组织具

有极强的再生能力, 研究表明在斑马鱼的整个生命过程中其视网膜等神经组织一直源源不断地进行着新老细胞的代谢, 也就意味着具有神经发生能力的前体细胞在斑马鱼中一直存在。因为操作的容易, 视网膜和视神经的再生最早被用来研究斑马鱼神经系统的再生。通过对视网膜再生进行研究, 科研工作者发现, 当用手术或是强光刺激等物理方法造成斑马鱼的视网膜损伤时, 来源于睫状边缘带(Ciliary marginal zone, CMZ) 的 Müller glia 细胞^[92, 93]被迅速激活, 进行去分化和增殖并再生出所有视网膜的细胞类型, 因此 Müller glia 被认为是成年斑马鱼的视网膜再生所需干细胞的主要来源^[80]。虽然对于激活 Müller glia 的分子信号通路目前尚不清楚, 但通过对一系列突变体的研究, 科研工作者发现众多基因如 *hspd2*、*msh1*、*mdka*、*mdkb*、*stat3* 以及 Wnt、Notch、Fgf 等信号通路都在其中发挥重要功能^[80]。近年来, 对于脊髓再生的研究也开始在斑马鱼中逐渐开展起来^[80]。当斑马鱼的脊髓在受损后, 可以迅速进行神经元和轴突的再生并恢复功能。已有的研究表明, 再生的神经元主要来源于脊髓投射的大脑核^[94]。有趣的是, 不同的脑核的再生能力差别明显, 而这种区别又依赖于脊髓损伤的位置, 提示着控制其再生的分子机制复杂。近年来研究表明, 细胞粘蛋白 L1.1、GAP-43、cAMP 等因子在脊髓再生中作用重大^[80, 95, 96]。除此之外, Sox11b 对于脊髓受损后再生过程中运动功能的恢复至关重要, 这种作用是通过调控神经干细胞自我更新和分化所需的重要因子 Nestin 以及 Mash1a 来实现^[97]。Kyritsis 等^[98]通过研究斑马鱼成鱼脑损伤后再生过程, 发现急性免疫反应是引起脑再生的起始信号, 进一步强化了免疫反应在脑再生中的重要地位。与此同时, 随着斑马鱼脑部的干细胞近年来被逐渐鉴定出来, 使得利用斑马鱼研究大脑核的再生也渐渐开展起来。随着研究的进行, 人们寄希望可以发现越来越多的控制神经再生的重要因子, 从而为治疗临床的神经退行性疾病提供宝贵的参考依据。

4 结语与展望

经过 30 年多的发展, 利用斑马鱼为模式动物研究脊椎动物的器官发育与再生已经蓬勃开展起来。

除了以上提到的组织和器官, 近年来, 以斑马鱼为模式动物研究胰腺、肾脏、肠、肌肉、骨骼等的发育也如火如荼。截至目前, 几乎斑马鱼所有器官的发育过程都开始被研究。通过正反向遗传筛选, 影响器官发育的多个突变体及其对应的靶向基因已经获得, 相关的机制已经或是正被进行着更为深入和细致的研究。同时高通量化合物筛选和活体成像在斑马鱼的成功运用和不断改进也为细致研究器官发育的机制提供了新的手段和优势, 加之常规分子生物学方法在斑马鱼中的不断成熟, 大大促进了对于重要因子调控器官发育的分子机制的深入认识。与此同时, 基于已有突变体筛选表型增强或减弱的突变体(Suppressor/enhancer screen)已经在斑马鱼中开展^[99], 为我们深入认识相关因子调控器官发育的机制提供了强大工具, 不难想象, 今后的研究中, 这种遗传筛选方法会越来越多的为斑马鱼实验室所采用。在再生的研究中, 肝脏、肾脏、血管、胰腺、血液等多个组织和器官的再生能力正被慢慢认知, 相关的调控机制也已开始被深入探求。遗憾的是, 以往关于再生的研究多是基于成年斑马鱼, 使得遗传筛选技术在再生研究中的应用极为困难。基于此, 近年来科研工作者已经开始对斑马鱼幼鱼的诸多组织和器官的再生进行研究, 并发现幼鱼的组织 and 器官的再生机制与成鱼极为相似^[100], 从而为采用大规模遗传筛选的方法研究再生的机制提供了可能。尤其是众多可以实时控制特定组织和细胞损伤的转基因品系的成功构建使得研究再生的操作更加简便, 进一步为筛选提供了理想平台。近年来, 基于 TALEN 和 CRISPR/Cas9 的基因敲除尤其是条件敲除技术在斑马鱼中成功开展, 使得研究重要因子在器官再生中的功能和作用机制更加容易。除此之外, 活体成像和细胞追踪技术在斑马鱼中的不断改进为我们探究再生器官的细胞来源提供了可能, 也为探索器官再生的调控机制提供了有利武器, 这一系列问题的解答为解决再生医学所面临的器官再生供体不足、重要器官再生能力较弱等问题奠定了基础。总而言之, 通过众多方法的综合运用, 斑马鱼模型将越来越多地帮助我们认识器官发育与再生的调节机制, 进而为探知发育和再生的奥秘、治疗相关疾病提供更有价值的信息。

参考文献(References):

- [1] Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(9): 717–724. [DOI](#)
- [2] Chu J, Sadler KC. New school in liver development: lessons from zebrafish. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1656–1663. [DOI](#)
- [3] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 1995, 203(3): 253–310. [DOI](#)
- [4] Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A. Tales of regeneration in zebrafish. *Dev Dyn*, 2003, 226(2): 202–210. [DOI](#)
- [5] Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 1981, 291(5813): 293–296. [DOI](#)
- [6] Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkuis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J, Boggs C. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 1996, 123: 37–46. [DOI](#)
- [7] Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nüsslein-Volhard C. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 1996, 123: 1–36. [DOI](#)
- [8] Du Ls, Xu J, Li XL, Ma N, Liu YM, Peng JR, Osato M, Zhang WQ, Wen ZL. Rumba and Haus3 are essential factors for the maintenance of hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish hematopoiesis. *Development*, 2011, 138(4): 619–629. [DOI](#)
- [9] Chen J, Ruan H, Ng SM, Gao C, Soo HM, Wu W, Zhang ZH, Wen ZL, Lane DP, Peng JR. Loss of function of *def* selectively up-regulates *Al13p53* expression to arrest expansion growth of digestive organs in zebrafish. *Genes Dev*, 2005, 19(23): 2900–2911. [DOI](#)
- [10] Huang P, Xiao A, Zhou MG, Zhu ZY, Lin S, Zhang B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 699–700. [DOI](#)
- [11] King A. Researchers find their Nemo. *Cell*, 2009, 139(5): 843–846. [DOI](#)
- [12] Zu Y, Tong XJ, Wang ZX, Liu D, Pan RC, Li Z, Hu YY, Luo Z, Huang P, Wu Q, Zhu ZY, Zhang B, Lin S. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*, 2013, doi:10.1038/nmeth.2374. [DOI](#)
- [13] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227–229. [DOI](#)
- [14] Le GD, Redd MJ, Colucci-Guyon E, Murayama E, Kissa K, Briolat V, Mordelet E, Zapata A, Shinomiya H, Herbomel P. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood*, 2008, 111(1): 132–141. [DOI](#)
- [15] Zhong TP, Childs S, Leu JP, Fishman MC. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature*, 2001, 414(6860): 216–220. [DOI](#)
- [16] Hatta K, Tsujii H, Omura T. Cell tracking using a photoconvertible fluorescent protein. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 960–967. [DOI](#)
- [17] Subach FV, Patterson GH, Manley S, Gillette JM, Lippincott-Schwartz J, Verkhusa VV. Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 2009, 6(2): 153–159. [DOI](#)
- [18] Jin H, Xu J, Wen ZL. Migratory path of definitive hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish development. *Blood*, 2007, 109(12): 5208–5214. [DOI](#)
- [19] Kohli V, Rehn K, Sumanas S. Single cell fate mapping in zebrafish. *J Vis Exp*, 2011, (56): 3172. [DOI](#)
- [20] Herbomel P, Levraud JP. Imaging early macrophage differentiation, migration, and behaviors in live zebrafish embryos. *Methods Mol Med*, 2005, 105: 199–214. [DOI](#)
- [21] Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*, 2009, 49(2): 443–452. [DOI](#)
- [22] Blader P, Strahle U. Zebrafish developmental genetics and central nervous system development. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(6): 945–951. [DOI](#)
- [23] Papan C, Campos-Ortega JA. Region-specific cell clones in the developing spinal cord of the zebrafish. *Dev Genes Evol*, 1999, 209(3): 135–144. [DOI](#)
- [24] Mendelson B. Development of reticulospinal neurons of the zebrafish. I. Time of origin. *J Comp Neurol*, 1986, 251(2): 160–171. [DOI](#)
- [25] Kimmel CB. Patterning the brain of the zebrafish embryo. *Annu Rev Neurosci*, 1993, 16: 707–732. [DOI](#)
- [26] Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. Vertebrate neural induction: inducers, inhibitors, and a new synthesis. *Neuron*, 1997, 18(5): 699–710. [DOI](#)
- [27] Kishimoto Y, Lee KH, Zon L, Hammerschmidt M, Schulte-Merker S. The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development*, 1997, 124(22): 4457–4466.

- [28] Dick A, Hild M, Bauer H, Imai Y, Maifeld H, Schier AF, Talbot WS, Bouwmeester T, Hammerschmidt M. Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development*, 2000, 127(2): 343–354. [DOI](#)
- [29] Rinkwitz S, Mourrain P, Becker TS. Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Prog Neurobiol*, 2011, 93(2): 231–243. [DOI](#)
- [30] Heisenberg CP, Houart C, Take-Uchi M, Rauch GJ, Young N, Coutinho P, Masai I, Caneparo L, Concha ML, Geisler R, Dale TC, Wilson SW, Stemple DL. A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev*, 2001, 15(11): 1427–1434. [DOI](#)
- [31] Houart C, Caneparo L, Heisenberg CP, Barth KA, Take-Uchi M, Wilson SW. Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron*, 2002, 35(2): 255–265. [DOI](#)
- [32] Kim CH, Oda T, Itoh M, Jiang D, Artinger KB, Chandrasekharappa SC, Driever W, Chitnis AB. Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature*, 2000, 407(6806): 913–916. [DOI](#)
- [33] Danesin C, Peres JN, Johansson M, Snowden V, Cording A, Papalopulu N, Houart C. Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1. *Dev Cell*, 2009, 16(4): 576–587. [DOI](#)
- [34] Hanashima C, Fernandes M, Hebert JM, Fishell G. The role of Foxg1 and dorsal midline signaling in the generation of Cajal-Retzius subtypes. *J Neurosci*, 2007, 27(41): 11103–11111. [DOI](#)
- [35] Hébert JM, Fishell G. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(9): 678–885. [DOI](#)
- [36] Leucht C, Stigloher C, Wizenmann A, Klafke R, Folchert A, Bally-Cuif L. MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nat Neurosci*, 2008, 11(6): 641–648. [DOI](#)
- [37] Tao T, Peng JR. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). *J Genet Genomics*, 2009, 36(6): 325–334. [DOI](#)
- [38] Korzh S, Emelyanov A, Korzh V. Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish. *Mech Dev*, 2001, 103(1–2): 137–139. [DOI](#)
- [39] Field HA, Ober EA, Roeser T, Stainier DYR. Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Dev Biol*, 2003, 253(2): 279–290. [DOI](#)
- [40] Tiso N, Moro E, Argenton F. Zebrafish pancreas development. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 312(1–2): 24–30. [DOI](#)
- [41] Wendik B, Maier E, Meyer D. Zebrafish *mnx* genes in endocrine and exocrine pancreas formation. *Dev Biol*, 2004, 268(2): 372–383. [DOI](#)
- [42] Shin D, Shin CH, Tucker J, Ober EA, Rentzsch F, Poss KD, Hammerschmidt M, Mullins MC, Stainier DYR. Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish. *Development*, 2007, 134(11): 2041–2050. [DOI](#)
- [43] Reiter JF, Kikuchi Y, Stainier DY. Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation. *Development*, 2001, 128(1): 125–135. [DOI](#)
- [44] Dong PD, Munson CA, Norton W, Crosnier C, Pan XF, Gong ZY, Neumann CJ, Stainier DYR. Fgf10 regulates hepatopancreatic ductal system patterning and differentiation. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 397–402. [DOI](#)
- [45] Chung WS, Shin CH, Stainier DYR. Bmp2 signaling regulates the hepatic versus pancreatic fate decision. *Dev Cell*, 2008, 15(5): 738–748. [DOI](#)
- [46] Huang H, Ruan H, Aw MY, Hussain A, Guo L, Gao C, Qian F, Leung T, Song HW, Kimelman D, Wen ZL, Peng JR. Mypt1-mediated spatial positioning of Bmp2-producing cells is essential for liver organogenesis. *Development*, 2008, 135(19): 3209–3218. [DOI](#)
- [47] Song JB, Kim HJ, Gong ZY, Liu NA, Lin S. *Vhnfl* acts downstream of Bmp, Fgf, and RA signals to regulate endocrine beta cell development in zebrafish. *Dev Biol*, 2007, 303(2): 561–575. [DOI](#)
- [48] Noël ES, Casal-Sueiro A, Busch-Nentwich E, Verkade H, Dong PDS, Stemple DL, Ober EA. Organ-specific requirements for Hdac1 in liver and pancreas formation. *Dev Biol*, 2008, 322(2): 237–250. [DOI](#)
- [49] Ober EA, Verkade H, Field HA, Stainier DYR. Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. *Nature*, 2006, 442(7103): 688–691. [DOI](#)
- [50] Lu HQ, Ma J, Yang Y, Shi WC, Luo LF. EpCAM is an Endoderm-specific Wnt Derepressor that licenses hepatic development. *Dev Cell*, 2013, 24(5): 543–553. [DOI](#)
- [51] Lorent K, Yeo SY, Oda T, Chandrasekharappa S, Chitnis A, Matthews RP, Pack M. Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development*, 2004, 131(22): 5753–5766. [DOI](#)
- [52] Bort R, Signore M, Tremblay K, Barbera JPM, Zaret KS. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol*, 2006, 290(1): 44–56. [DOI](#)
- [53] Mayer AN, Fishman MC. *Nil per os* encodes a conserved

- RNA recognition motif protein required for morphogenesis and cytodifferentiation of digestive organs in zebrafish. *Development*, 2003, 130(17): 3917–3928. [DOI](#)
- [54] Makky K, Tekiela J, Mayer AN. Target of rapamycin (TOR) signaling controls epithelial morphogenesis in the vertebrate intestine. *Dev Biol*, 2007, 303(2): 501–513. [DOI](#)
- [55] Dong PD, Provost E, Leach SD, Stainier DYR. Graded levels of Ptf1a differentially regulate endocrine and exocrine fates in the developing pancreas. *Genes Dev*, 2008, 22(11): 1445–1450. [DOI](#)
- [56] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 2008, 132(4): 631–644. [DOI](#)
- [57] Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, 2010, 464(7285): 112–115. [DOI](#)
- [58] Murayama E, Kissa K, Zapata A, Mordelet E, Briolat V, Lin HF, Handin RI, Herbomel P. Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity*, 2006, 25(6): 963–975. [DOI](#)
- [59] Rhodes J, Hagen A, Hsu K, Deng M, Liu TX, Look AT, Kanki JP. Interplay of pu. 1 and gata1 determines myeloid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell*, 2005, 8(1): 97–108. [DOI](#)
- [60] Jin H, Li L, Xu J, Zhen F, Zhu L, Liu PP, Zhang M, Zhang W, Wen Z. Runx1 regulates embryonic myeloid fate choice in zebrafish through a negative feedback loop inhibiting Pu. 1 expression. *Blood*, 2012, 119(22): 5239–5249. [DOI](#)
- [61] Li L, Jin H, Xu J, Shi YQ, Wen ZL. Irf8 regulates macrophage versus neutrophil fate during zebrafish primitive myelopoiesis. *Blood*, 2011, 117(4): 1359–1369. [DOI](#)
- [62] North TE, Goessling W, Walkley CR, Lengerke C, Kopani KR, Lord AM, Weber GJ, Bowman TV, Jang IH, Grosser T, FitzGerald GA, Daley GQ, Orkin SH, Zon LI. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature*, 2007, 447(7147): 1007–1011. [DOI](#)
- [63] Clements WK, Kim AD, Ong KG, Moore JC, Lawson ND, Traver D. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature*, 2011, 474(7350): 220–224. [DOI](#)
- [64] Zhang YY, Jin H, Li L, Qin FFX, Wen ZL. cMyb regulates hematopoietic stem/progenitor cell mobilization during zebrafish hematopoiesis. *Blood*, 2011, 118(15): 4093–4101. [DOI](#)
- [65] Ellertsdóttir E, Lenard A, Blum Y, Krudewig A, Herwig L, Affolter M, Belting HG. Vascular morphogenesis in the zebrafish embryo. *Dev Biol*, 2010, 341(1): 56–65. [DOI](#)
- [66] Wang X, Xiong JW. Vascular endothelial cell development and underlying mechanisms. *Hereditas*, 2012, 34(9): 1114–1122. [DOI](#)
- [67] Eriksson J, Löfberg J. Development of the hypochord and dorsal aorta in the zebrafish embryo (*Danio rerio*). *J Morphol*, 2000, 244(3): 167–176. [DOI](#)
- [68] Jin SW, Beis D, Mitchell T, Chen JN, Stainier DYR. Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development*, 2005, 132(23): 5199–5209. [DOI](#)
- [69] Lawson ND, Weinstein BM. *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol*, 2002, 248(2): 307–318. [DOI](#)
- [70] Lawson ND, Vogel AM, Weinstein BM. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell*, 2002, 3(1): 127–136. [DOI](#)
- [71] Lawson ND, Mugford JW, Diamond BA, Weinstein BM. phospholipase C gamma-1 is required downstream of vascular endothelial growth factor during arterial development. *Genes Dev*, 2003, 17(11): 1346–1351. [DOI](#)
- [72] Covassin LD, Villefranc JA, Kacergis MC, Weinstein BM, Lawson ND. Distinct genetic interactions between multiple Vegf receptors are required for development of different blood vessel types in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(17): 6554–6559. [DOI](#)
- [73] Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, Weinstein BM. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, 2001, 128(19): 3675–3683. [DOI](#)
- [74] Butler MG, Isogai S, Weinstein BM. Lymphatic development. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2009, 87(3): 222–231. [DOI](#)
- [75] Yaniv K, Isogai S, Castranova D, Dye L, Hitomi J, Weinstein BM. Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med*, 2006, 12(6): 711–716. [DOI](#)
- [76] Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, 2004, 5(1): 74–80. [DOI](#)
- [77] Kreuger J, Nilsson I, Kerjaschki D, Petrova T, Alitalo K, Claesson-Welsh L. Early lymph vessel development from embryonic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(5): 1073–1078. [DOI](#)
- [78] Hogan BM, Bos FL, Bussmann J, Witte M, Chi NC,

- Duckers HJ, Schulte-Merker S. *Ccbe1* is required for embryonic lymphangiogenesis and venous sprouting. *Nat Genet*, 2009, 41(4): 396–398. [DOI](#)
- [79] Sanchez AA, Tsonis PA. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(11): 873–884. [DOI](#)
- [80] Fleisch VC, Fraser B, Allison WT. Investigating regeneration and functional integration of CNS neurons: lessons from zebrafish genetics and other fish species. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(3): 364–380. [DOI](#)
- [81] Tal TL, Franzosa JA, Tanguay RL. Molecular signaling networks that choreograph epimorphic fin regeneration in zebrafish - a mini-review. *Gerontology*, 2010, 56(2): 231–240. [DOI](#)
- [82] Nechiporuk A, Keating MT. A proliferation gradient between proximal and *msxb*-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. *Development*, 2002, 129(11): 2607–2617. [DOI](#)
- [83] Lee Y, Hami D, De Val S, Kagermeier-Schenk B, Wills AA, Black BL, Weidinger G, Poss KD. Maintenance of blastemal proliferation by functionally diverse epidermis in regenerating zebrafish fins. *Dev Biol*, 2009, 331(2): 270–280. [DOI](#)
- [84] Poss KD, Shen J, Keating MT. Induction of *lef1* during zebrafish fin regeneration. *Dev Dyn*, 2000, 219(2): 282–286. [DOI](#)
- [85] Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science*, 2002, 298(5601): 2188–2190. [DOI](#)
- [86] Poss KD. Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18(1): 36–45. [DOI](#)
- [87] Chablais F, Veit J, Rainer G, Jaźwińska A. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev Biol*, 2011, 11: 21. [DOI](#)
- [88] Choi WY, Poss KD. Cardiac regeneration. *Curr Top Dev Biol*, 2012, 100: 319–344. [DOI](#)
- [89] Wang JH, Panáková D, Kikuchi K, Holdway JE, Gemberling M, Burris JS, Singh SP, Dickson AL, Lin YF, Sabeh MK, Werdich AA, Yelon D, MacRae CA, Poss KD. The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development*, 2011, 138(16): 3421–3430. [DOI](#)
- [90] Lien CL, Schebesta M, Makino S, Weber GJ, Keating MT. Gene expression analysis of zebrafish heart regeneration. *PLoS Biol*, 2006, 4(8): e260. [DOI](#)
- [91] Kim J, Wu Q, Zhang Y, Wiens KM, Huang Y, Rubin N, Shimada H, Handin RI, Chao MY, Tuan TL, Starnes VA, Lien CL. PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(40): 17206–17210. [DOI](#)
- [92] Ottesson DC, Hitchcock PF. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Res*, 2003, 43(8): 927–936. [DOI](#)
- [93] Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL, Perkowski JJ. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol*, 2006, 6: 36. [DOI](#)
- [94] Becker T, Wullmann MF, Becker CG, Bernhardt RR, Schachner M. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J Comp Neurol*, 1997, 377(4): 577–595. [DOI](#)
- [95] Becker CG, Lieberoth BC, Morellini F, Feldner J, Becker T, Schachner M. *L1.1* is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *J Neurosci*, 2004, 24(36): 7837–7842. [DOI](#)
- [96] Bhatt DH, Otto SJ, Depoister B, Fetcho JR. Cyclic AMP-induced repair of zebrafish spinal circuits. *Science*, 2004, 305(5681): 254–258. [DOI](#)
- [97] Guo Y, Ma L, Cristofanilli M, Hart RP, Hao A, Schachner M. Transcription factor *Sox11b* is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *Neuroscience*, 2011, 172: 329–341. [DOI](#)
- [98] Kyritsis N, Kizil C, Zocher S, Kroehne V, Kaslin J, Freudreich D, Iltzsche A, Brand M. Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science*, 2012, 338(6112): 1353–1356. [DOI](#)
- [99] Bai XY, Kim J, Yang ZA, Jurynek MJ, Akie TE, Lee J, LeBlanc J, Sessa A, Jiang H, DiBiase A, Zhou Y, Grunwald DJ, Lin S, Cantor AB, Orkin SH, Zon LI. *TIF1gamma* controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell*, 2010, 142(1): 133–143. [DOI](#)
- [100] Yoshinari N, Ishida T, Kudo A, Kawakami A. Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Dev Biol*, 2009, 325(1): 71–81. [DOI](#)