

斑马鱼血管内脂代谢研究方法的构建

陈侃, 王长谦, 范虞琪, 韩志华, 汪月, 高霖, 曾华甦

(上海交通大学医学院附属第九人民医院心内科, 上海市 200011)

[关键词] 斑马鱼; 脂代谢; 油红 O 染色; 荧光探针标记

[摘要] **目的** 构建系统的斑马鱼血管内脂代谢的研究方法。**方法** 利用油红 O 染色、荧光探针标记、直接血脂检测等方法研究斑马鱼胚胎、幼鱼、成鱼等不同发育时期血管内的脂质代谢, 以及不同饮食对斑马鱼血脂的影响。**结果** 油红 O 可将斑马鱼胚胎血管内的脂质染色, 荧光探针可标记斑马鱼胚胎血管内的胆固醇。喂食蛋黄液可升高斑马鱼幼鱼的血脂水平, 油红 O 染色可反映这种血脂的变化。高胆固醇饮食可升高斑马鱼幼鱼血管内胆固醇水平, 荧光探针可标记幼鱼血管内胆固醇的变化。血脂检测显示高脂饮食的斑马鱼血清总胆固醇和甘油三酯均高于普通饮食的斑马鱼。**结论** 本研究利用油红 O 染色、荧光探针标记及血脂检测等技术构建了斑马鱼不同发育阶段血管内脂代谢的研究方法。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Establishing methods for studying intravascular lipid metabolism of zebrafish

CHEN Kan, WANG Chang-Qian, FAN Yu-Qi, HAN Zhi-Hua, WANG Yue, GAO Lin, ZENG Hua-Su

(Department of Cardiology, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to School of Medicine of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China)

[KEY WORDS] Zebrafish; Lipid metabolism; Oil red O staining; Fluorescent probe labeling

[ABSTRACT] **Aim** To establish systematic methods for studying intravascular lipid metabolism of zebrafish.

Methods Oil red O staining, CholEsteryl BODIPY 542/563 C11 fluorescently labelling and blood lipids detecting were used to study intravascular lipid metabolism of embryo, larvae and adult zebrafish and the effect of different diet on blood lipid of zebrafish.

Results Intravascular lipid of embryo zebrafish was stained by oil red O staining, and intravascular cholesterol was labeled by CholEsteryl BODIPY 542/563 C11. Increased intravascular lipid of larvae zebrafish incubated in egg yolk was stained by oil red O staining, and increased intravascular cholesterol of larvae zebrafish fed by high cholesterol diet was labeled by CholEsteryl BODIPY 542/563 C11. The serum total cholesterol and triglyceride of adult zebrafish were obviously increased after 7 weeks fat feeding.

Conclusion Oil red O staining, CholEsteryl BODIPY 542/563 C11 fluorescently labelling and blood lipids detecting can be applied for zebrafish intravascular lipid metabolism research.

高脂血症是动脉粥样硬化的独立危险因素^[1], 可进一步导致脑梗死、冠心病等严重心脑血管疾病^[2-4], 且与胰腺炎^[5-6]、脂肪肝^[7]、糖尿病^[8-9]、骨质疏松^[10-11]等疾病相关, 严重危害人类的健康。目前临床上使用的调脂药物虽具有明确的降脂效果, 但仍有不少患者在已使用调脂药物的情况下血脂无法得到很好的控制^[12], 或因药物的副作用而无法坚持用药, 因此深入研究脂代谢紊乱, 研发新的调脂药物具有重要

意义。斑马鱼的血脂组成和代谢特点与人类基本相同, 且胚胎和幼鱼身体透明, 利用染色或荧光标记等方法可在镜下直观地观察其体内的脂质变化^[13], 是研究脂代谢、研发调脂药物的理想的模式动物。然而目前研究斑马鱼血脂代谢的方法较少, 过去的一些研究主要偏重于斑马鱼消化道、神经系统及卵黄囊的脂代谢^[13]。本研究拟通过油红 O 染色、荧光探针标记及血脂检测等技术构建斑马鱼不同生长发育时期血

[收稿日期] 2016-07-27

[修回日期] 2016-12-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81500331); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(2014年-2016年)资助(ZY3-CCCX-3-3002)

[作者简介] 陈侃, 博士, 主治医师, 研究方向为基于斑马鱼平台的动脉粥样硬化发病机制研究, E-mail 为 chenkan19831983@163.com。通讯作者王长谦, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化的防治, E-mail 为 weqian@hotmail.com。

管内脂代谢的研究方法。

1 材料和方法

1.1 斑马鱼

本研究使用 casper 品系斑马鱼, fli1:EGFP 品系斑马鱼仅用于标示受精后 4 天斑马鱼的血管分布。成鱼研究时采用雌性斑马鱼。斑马鱼由上海南方模式生物研究中心提供, 在 28℃、pH7.0 的养鱼水中饲养。

1.2 饲料

根据不同的实验需要, 给予斑马鱼不同的饮食, 普食饲料: 斑马鱼常规干饲料(上海斯莱克), 含粗脂肪 3%; 蛋黄液: 将蛋黄粉(上海源叶生物)放入养鱼水中, 混匀后形成蛋黄液作为一种高脂饲料, 浓度为 0.1%; 高胆固醇饲料: 将普食饲料浸没于溶解有胆固醇的氯仿中, 氯仿挥发后, 胆固醇附于饲料上, 添加胆固醇含量为 4%; 高脂饲料: 将蛋黄液和高胆固醇饲料同时使用作为高脂饲料。

1.3 油红 O 染色

使用油红 O(Sigma 公司)对斑马鱼体内的中性脂质进行染色。将斑马鱼麻醉后置入 4%多聚甲醛中固定过夜, PBS 冲洗后转入 60%异丙醇中浸泡 30 min, 再用新鲜配置的 0.3%油红 O 工作液染色 3 h。

1.4 荧光探针标记斑马鱼体内胆固醇

使用荧光探针 CholEsteryl BODIPY 542/563 C11(购自 Invitrogen 公司, 后文中简称 542/563 C11)标记胆固醇, 设计两种 542/563 C11 的使用方法: 一种是将 542/563 C11 溶解于二甲基亚砜后加入养鱼水中, 终浓度为 0.1 mg/L; 另一种是把饲料浸没于溶解有 542/563 C11 的氯仿中, 氯仿挥发后 542/563 C11 结合于饲料上, 并占饲料的总质量的 1/100000。

1.5 显微镜照相

使用 Nikon SMZ1500 荧光显微镜。将斑马鱼置于甲基纤维素中固定, 整鱼拍摄时放大 30 倍, 局部躯干拍摄时以斑马鱼的肠道末端为左侧边界, 放大 100 倍。用于比较的照片均设置相同的拍摄参数。

1.6 血脂相对定量

1.6.1 油红 O 染色的相对定量 使用 ippp 6.0 软件对油红 O 染色的照片进行分析, 测定血管内累计光密度值(integrated optical density, IOD), 并以 IOD 作为斑马鱼血管内脂质的相对定量指标。

1.6.2 荧光强度定量 使用 NIS-Elements BR 3.1 软件测定斑马鱼血管内的荧光强度, 以此对斑马鱼

血管内的胆固醇含量进行相对定量。

1.7 血脂检测

将斑马鱼在 200 mg/L 的 MS-222(Sigma 公司)中麻醉后, 从背部剪开主动脉并吸取血液 5 μ L, 离心后吸取 1 μ L 血清, 同一处理组每 5 条鱼的血清混合作为一个样本, 稀释 20 倍后使用西门子 advia2400 生化仪及西门子公司原厂试剂检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)和血清甘油三酯(triglyceride, TG)。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组、三组计量资料间比较分别采用 *t* 检验和方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 斑马鱼胚胎油红 O 染色及荧光探针标记情况

正常生长的受精后 4 天 casper 品系斑马鱼胚胎如图 1A 所示, 受精后 4 天 fli1:EGFP 斑马鱼全身血管分布如图 1B 所示。油红 O 将斑马鱼胚胎血管内的脂质染成红色(图 1C 和 1D)。将受精后 3 天斑马鱼胚胎饲养于含 542/563 C11 的养鱼水中 24 h 后, 荧光显微镜下可见斑马鱼胚胎血管内胆固醇被 542/563 C11 红色荧光标记(图 1E 和 1F)。油红 O 和 542/563 C11 同时可以标记斑马鱼神经系统、卵黄囊等部位的脂质或胆固醇, 而斑马鱼肠道末端以远的躯干部分则只有血管内的脂质或胆固醇被标记(图 1D 和 1F)。

2.2 高脂饮食下油红 O 染色显示斑马鱼幼鱼血脂水平的变化

未进食的受精后 7 天斑马鱼幼鱼血脂水平很低, 油红 O 染色显示其血管内没有可被染色的脂质(图 2A 和 2B)。将受精后 6 天幼鱼共 10 条放入蛋黄液中饲养 24 h 后进行染色, 其血管内的脂质被油红 O 染色, 提示高脂饮食后的斑马鱼血脂水平较未进食时明显升高(图 2C 和 2D), 其血管内 IOD 值为 12502.3 ± 3430.4 。将受精后 5 天幼鱼 10 条放入蛋黄液中饲养 48 h 后进行染色, 其血管内的脂质被油红 O 染色(图 2E 和 2F), IOD 值为 25173.8 ± 2814.6 ; 将受精后 5 天幼鱼 10 条放入蛋黄液中饲养 72 h 后并染色(图 2G 和 2H), IOD 值为 26645.2 ± 5678.9 。其中 48 h 组与 72 h 组 IOD 值无显著性差异($P = 0.436$; 图 2I), 可见高脂饮食 48 h 后斑马鱼血脂已上升到一个高且相对稳定的水平。

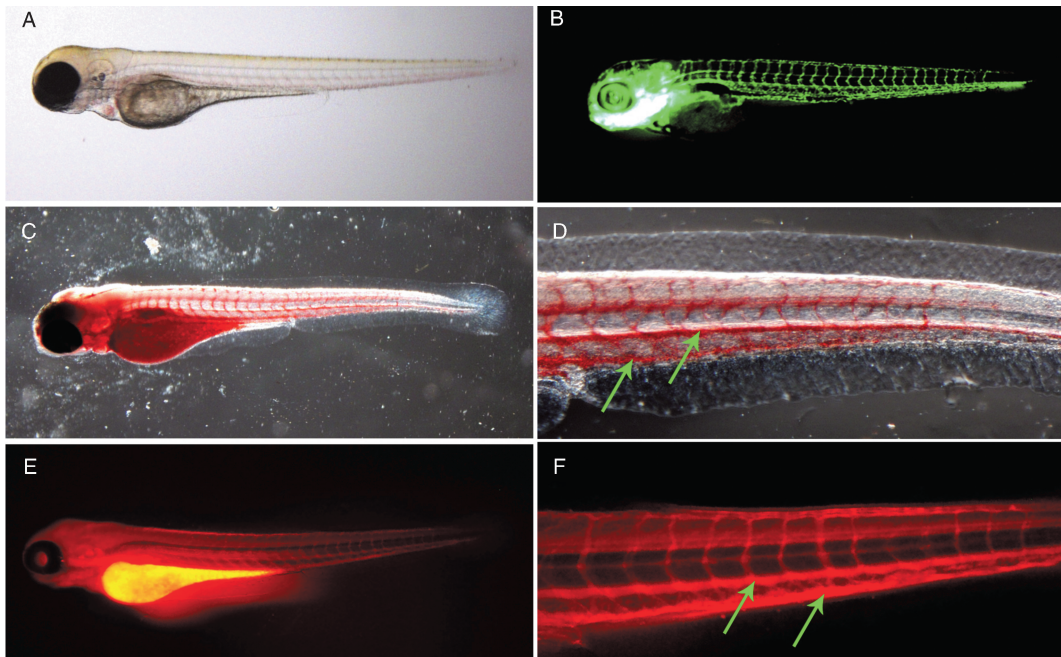


图 1. 斑马鱼胚胎油红 O 染色及 542/563 C11 荧光标记结果 A 为受精后 4 天 casper 品系斑马鱼胚胎; B 为受精后 4 天 *fl1:EGFP* 品系斑马鱼全身血管分布; C、D 为受精后 4 天斑马鱼油红 O 染色结果, C 躯干部放大后为 D, 箭头所示为血管内被染色的脂质; E、F 为 542/563 C11 标记受精后 4 天斑马鱼血管内胆固醇, E 躯干部放大后为 F, 箭头所示为血管内被荧光标记的胆固醇。A、B、C、E 放大 30 倍, D、F 放大 100 倍。

Figure 1. The oil red O staining and fluorescent probe labeling for zebrafish embryo

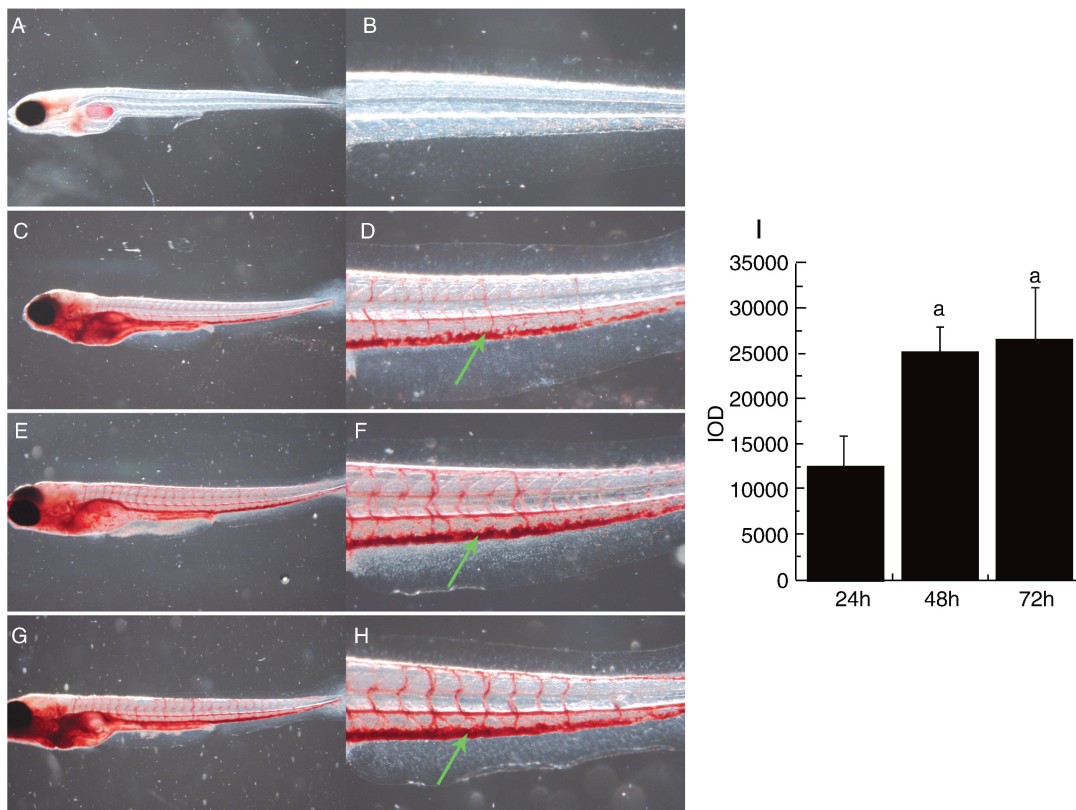


图 2. 油红 O 染色观察高脂饮食后斑马鱼幼鱼血脂水平的变化 A、B 为未进食的受精后 7 天斑马鱼幼鱼油红 O 染色结果; C、D 为受精后 6 天幼鱼在蛋黄液中饲养 24 h 后油红 O 染色结果; E、F 为受精后 5 天幼鱼在蛋黄液中饲养 48 h 后油红 O 染色结果; G、H 为受精后 5 天幼鱼在蛋黄液中饲养 72 h 后油红 O 染色结果; I 为各组 IOD 值比较。a 为 $P < 0.001$, 与 24 h 组比较。箭头所示为幼鱼血管内被油红 O 染色的脂质。A、C、E、G 放大 30 倍, B、D、F、H 放大 100 倍。

Figure 2. Effect of high fat diet on zebrafish intravascular lipids via oil red O staining

2.3 高胆固醇饮食下荧光探针标记斑马鱼幼鱼血管内胆固醇的变化

斑马鱼幼鱼(受精后 5 天)分两组,每组各 10 条,分别给予添加了 542/563 C11 的普通饲料或高胆固醇饲料,每日喂食 2 次,每次投喂过量的饲料,投喂 30 min 后将剩余饲料移除并换水,连续 10 天。

10 天后荧光显微镜下可见普通饮食组幼鱼血管内有微弱的红色荧光(图 3A),而高胆固醇饮食组幼鱼血管内红色荧光明显增强(图 3B),两组血管内的相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI)差异有统计学意义(图 3C)。

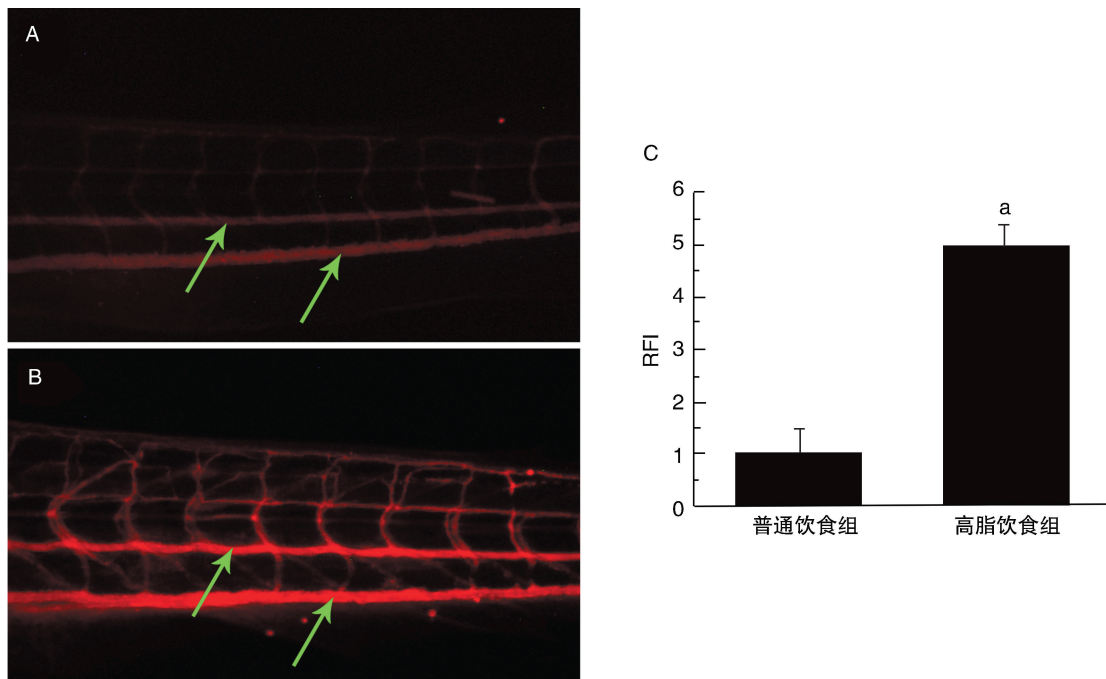


图 3. 542/563 C11 荧光标记斑马鱼幼鱼血管内胆固醇的变化 A 为受精后 5 天斑马鱼幼鱼喂食添加了 542/563 C11 的普通饲料 10 天;B 为受精后 5 天斑马鱼幼鱼喂食添加了 542/563 C11 的高胆固醇饲料 10 天;C 为两组斑马鱼血管内相对荧光强度比较($n=10$)。a 为 $P<0.001$,与普通饮食组比较。箭头所示为斑马鱼血管内经荧光标记的胆固醇。A、B 放大 100 倍。

Figure 3. Intravascular cholesterol of larvae zebrafish labelled by CholEsteryl BODIPY 542/563 C11

2.4 高脂饮食下斑马鱼成鱼血脂水平

取 13 周龄的斑马鱼雌性成鱼,分为普通饮食组和高脂饮食组,每组各 30 条。普通饮食组每日投喂普通饲料 2 次;高脂饮食组每日投喂高脂饲料,即蛋黄液 1 次、高胆固醇饲料 1 次,每次投喂过量饲料,投喂 30 min 后移除饲料并换水。7 周后,高脂饮食组斑马鱼体型明显大于普通饮食组。高脂饮食组斑马鱼 TC 高于普通饮食组(640.8 ± 47.4 mg/dL 比 250.0 ± 36.3 mg/dL, $P<0.001$), TG 同样高于普通饮食组(576.8 ± 48.2 mg/dL 比 356.7 ± 42.0 mg/dL, $P<0.001$;图 4)。

3 讨论

斑马鱼是近年来新兴的模式生物,正越来越地被应用于科学研究中,尽管由于抗体缺乏使其在机制研究方面存在不足,但其体型小、繁殖量大、生

长发育快、身体透明等特点,仍使其在心血管疾病研究中具有独特的优势。斑马鱼在不同的生长发育阶段,其血脂代谢有着不同的特点。斑马鱼胚胎不能进食,依靠卵黄囊提供营养物质,卵黄囊富含脂质,因此血脂水平较高,在胚胎发育过程中,卵黄囊逐渐被吸收,至受精后 7 天时卵黄囊完全吸收,此时如斑马鱼尚未喂食,其血脂水平较胚胎期明显降低^[14]。斑马鱼的口器一般在受精后 5 天形成并开始摄食,不同的食物可影响斑马鱼的血脂水平。另外,斑马鱼胚胎和幼鱼体型小,身体透明,而斑马鱼成鱼身体不透明。斑马鱼的这些特点提示在其生长发育的不同时期,需要使用不同的方法来研究其血脂代谢。

油红 O 是一种脂质染料,可将中性脂质染成红色。Schlegel 等^[14]曾利用油红 O 对斑马鱼胚胎血管内的脂质进行染色,但该文并未对染色进行定量,也没有介绍如何利用油红 O 染色研究受精后 7

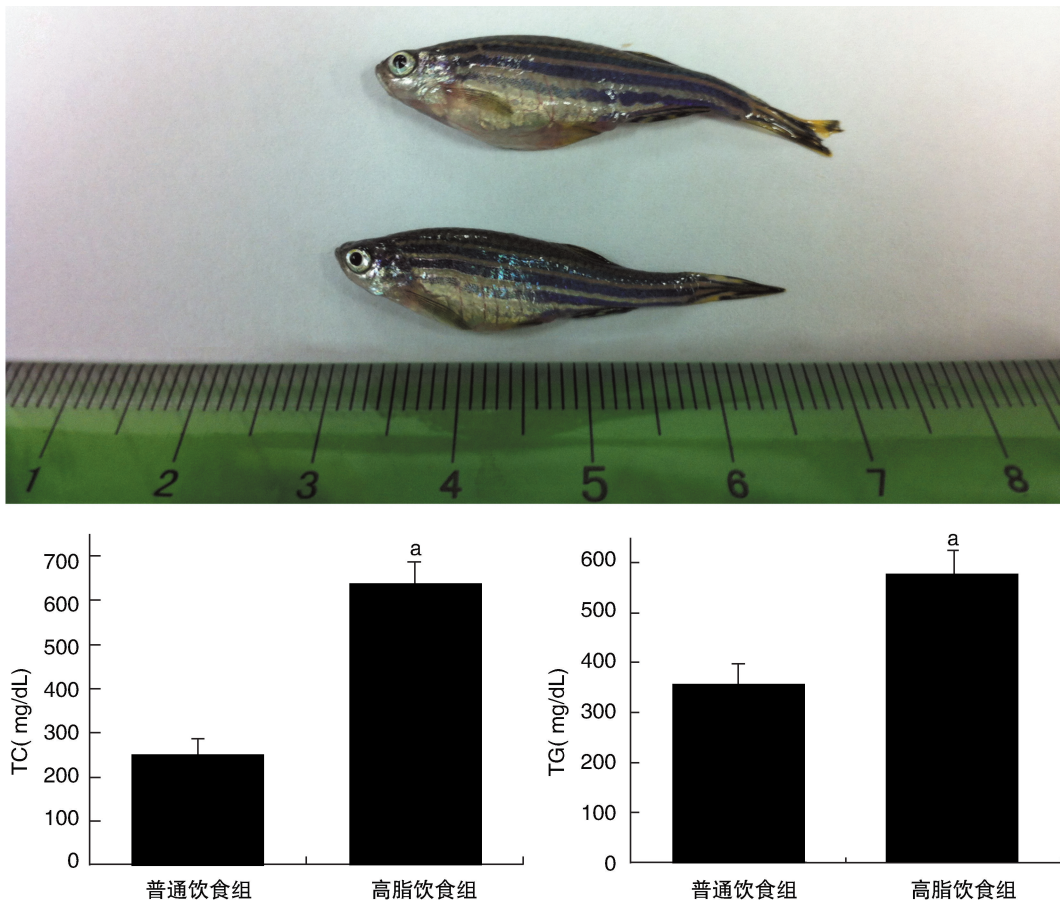


图 4. 不同饮食对斑马鱼成鱼血脂水平的影响 上图中, 上为高脂饮食斑马鱼成鱼, 下为普通饮食斑马鱼成鱼。a 为 $P < 0.001$, 与普通饮食组比较。

Figure 4. The differences in the TC and TG between the zebrafish fed with normal and high fat diet

天以后的斑马鱼幼鱼的血脂代谢。本研究利用高脂饮食的方法, 使受精后 7 天的斑马鱼幼鱼血脂水平显著升高, 通过油红 O 染色来反映幼鱼的这种血脂变化, 并且结合图像分析软件, 对染色的结果进行相对的定量分析, 因此拓展并优化了油红 O 染色在斑马鱼血脂研究中的应用。油红 O 染色的主要优点是廉价、操作简单、结果稳定, 且染色后的标本易于保存; 主要缺点在于染色过程必然导致动物的死亡, 因此无法对活体进行动态观察, 另外整鱼油红 O 染色也不能用于成鱼的研究。

油红 O 染色的大体上可以认为是斑马鱼血管内总的脂质, 而在各类脂质成分中胆固醇与心脑血管疾病的关系最为密切。Stoletov 等^[15]曾使用 Cholesteryl BODIPY 576/589 C11 荧光探针标记斑马鱼血管内胆固醇, 然而该探针已停产, 因此该文中的实验方法和结果都难以复制。本研究成功地使用 542/563 C11 标记斑马鱼血管内的胆固醇, 并构建胚胎和幼鱼期不同的实验方法。与油红 O 染色不同, 使用 542/563 C11 标记胆固醇时不需要处死

斑马鱼, 可以对活体进行动态观察, 然而由于荧光容易淬灭, 其结果不如油红 O 染色稳定, 另外也不能用于成鱼研究。

油红 O 染色和 542/563 C11 荧光标记都是间接地反应血脂的相对变化, 而检测 TC 和 TG 则可直接测得斑马鱼血脂的绝对水平, 因此结果更为可靠。但该方法实验周期较长, 不适合于高通量研究, 另外胚胎和幼鱼体型过小, 无法获取足量的血液进行检测, 因此该方法只能用于成鱼研究。油红 O 染色、荧光探针标记及血脂检测有着各自不同的特点, 未来可根据不同的研究目的来选择合适发育阶段的斑马鱼及相应的实验方法。

本研究通过投喂过量饲料来保证每条实验用鱼都能充分摄食, 但是并未对每条鱼的进食量进行精确的定量, 因此不能排除进食量的差异对结果可能造成的影响, 这是本研究的主要不足。未来需要建立精确定量斑马鱼进食量的方法以避免进食的差异对结果造成的干扰。

[参考文献]

- [1] Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease[J]. *Atherosclerosis*, 1996, 124(Suppl): S1-S9.
- [2] 杜永成, 李黎明, 文乾灵. 冠心病发病危险因素分析[J]. *内科*, 2016, 11(1): 29-31.
- [3] 王德江, 朱育昌, 李传彪. 高脂血症、颈动脉粥样硬化与脑梗死的相关性研究[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(21): 467-468.
- [4] 郑丽萍. 冠心病的防治[J]. *医学信息*, 2013, 26(2): 489-489.
- [5] 刘丽娜, 林财威, 王旭东. 高脂血症性急性胰腺炎降脂治疗疗效分析[J]. *中国临床医生杂志*, 2015, 43(12): 33-34.
- [6] 李文科, 王东. 高脂血症性胰腺炎研究进展[J]. *中国全科医学*, 2013, 16(8): 2793-795.
- [7] 王世宏. 脂肪肝与高脂血症的相关性分析[J]. *医学信息*, 2014, 24(8): 178-179.
- [8] 柴三葆, 孙健斌, 辛思旭. 2型糖尿病患者合并代谢综合征不同组分血脂谱分析[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(4): 416-418.
- [9] 吴静. 糖尿病患者降脂治疗的研究与探讨[J]. *医学信息*, 2014, 27(9): 650.
- [10] 杨五洲, 曹奇, 唐朝克. 高脂血症与骨质疏松[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(3): 321-324.
- [11] 王峥嵘, 朱昀. 老年慢性病患者骨质疏松的相关因素分析[J]. *中华老年医学杂志*, 2014, 33(3): 272-275.
- [12] Pahan K. Lipid-lowering drugs[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(10): 1165-178.
- [13] Holttä-Vuori M, Salo V, Nyberg L. Zebrafish: gaining popularity in lipid research[J]. *Biochem J*, 2010, 429(2): 235-242.
- [14] Schlegel A, Stainier DY. Microsomal triglyceride transfer protein is required for yolk lipid utilization and absorption of dietary lipids in zebrafish larvae[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(51): 15179-187.
- [15] Stoletov K, Fang L, Choi SH. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish[J]. *Circ Res*, 2009, 104(8): 952-960.

(此文编辑 文玉珊)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

作者声明

中国动脉硬化杂志 2017 年第 3 期 314 页《非血脂因素致血管内皮损伤时黏附分子变化的研究进展》,原作者单位调整如下:

非血脂因素致血管内皮损伤时黏附分子变化的研究进展

陈洪娜^{1,2,3,4}, 李军^{2,3,4}, 王福文^{2,3,4}

- (1. 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东省济南市 250200;
2. 山东省医学科学院药物研究所, 山东省济南市 250062; 3. 国家卫生部生物技术药物重点实验室,
山东省济南市 250062; 4. 山东省罕见病重点实验室, 山东省济南市 250062)