

叁、斑馬魚動物實驗應用與國際趨勢

Zebrafish as a Research Animal Model-Its Application and International Trends

斑馬魚動物實驗應用與國際趨勢

國家衛生研究院 核心儀器設施中心主任/游美淑博士

斑馬魚研究的發展歷史

斑馬魚(Danio rerio)主要棲息地在北印度、北巴基斯坦、尼泊爾等南亞地區，是屬於輻鰭魚綱鯉形目鯉科的一種小型淡水魚。在熱帶魚的水族館中牠不是最起眼的，但在科學家的眼裡他卻是最閃亮的明星。利用斑馬魚來從事科學研究開始於 1970 年代的美國，有一位奧立岡大學的教授 George Streisinger 最早用斑馬魚來從事遺傳及發育生物學的研究，所以他也被稱為「斑馬魚之遺傳與發育生物學研究之父”Founding Father” of Zebrafish Developmental and Genetic Research”。斑馬魚之所以被 Streisinger 教授用做科學研究之動物，主要是由於牠所具有的幾個重要特性，包括：屬於脊椎動物，具有光週期誘發產卵、體外受精、胚胎透明、胚胎發育期短(5-7 天)、器官形成的過程易於觀察、性成熟期短(3 個月)、可以物理及化學方法誘發產生變種魚、可用分子生物學方法改變或剔除特定基因的表現及產生基因轉殖魚等。70~90 年代可以說是利用斑馬魚從事遺傳與發育生物學研究的極盛時期。於 1984 年 Streisinger 教授過世後，他在奧立岡大學的同事及學生們繼續並發揚他的工作(包括 Charles Kimmel, Monte Westerfield, Judith Eisen, and John Postlethwait 等教授)，他們在建立斑馬魚胚胎發育、基因與遺傳及飼育等基本資料方面做出了極大的貢獻，這使後來的研究人員對於如何使用斑馬魚來從事科研有了系統性的了解，也因此催生了 90 初期(1992~1996)分別於德國的杜賓根(Tübingen)及美國的波士頓(Boston)所舉行的大規模斑馬魚變異種篩選計畫。科學家們利用特殊化學物質誘發變異種的產生(Chemical mutagenesis)，經過人工顯微鏡的觀察與篩選，找出不同於野生種的各種變異品系，之後再利用分子生物的方法來找到造成斑馬魚產生不同變異的各種控制基因。這樣的研究我們稱之為正向基因篩選

(Forward genetic screen)研究。相反的，若先由基因體定序中篩選到產生變異的基因，再去找出攜帶這些變異基因的各種變異品系，這樣的研究方法稱為反向基因篩選(Reversed genetic screen)研究。從這兩個大型正向篩選計畫所找出的斑馬魚變異品系分別為超過 1000 株及 500 株，而反向基因篩選研究計畫主要是由位於荷蘭 Utrecht 的 Hubrecht 研究所及英國劍橋的 Sanger Center 執行，配合斑馬魚基因體定序的完成，這兩個中心及其他幾個小型正、反向基因篩選研究計畫的成果使斑馬魚變異品系的數目大幅增加，這些寶貴的資源使後來的發育生物學家有了很好的材料來探究基因、遺傳與脊椎動物發育之間的相關性。由齧齒類成為模式動物所經過的過程中可以得知，一個模式生物的建立除了要有強而有力的科學證據外，還需要有足夠的配套資源，如種源中心的建立、各種技術及方法的分享跟新技術的開發等等，來幫助斑馬魚研究社群(Zebrafish research community)的形成及茁壯。沿續 Streisinger 博士留下的美好傳統，美國奧立岡大學投入許多資源建立了斑馬魚國際資源中心(Zebrafish International Resource Center, ZIRC)及斑馬魚資訊聯繫網(Zebrafish Information Network, ZFIN)，接著歐洲也成立歐洲斑馬魚資源中心(European Zebrafish Resource Center, EZRC)來收集、整合世界各國關於斑馬魚研究的成果及資源，並使所有研究人員可以使用這些資源。這對於斑馬魚研究的推廣起了非常大的作用。我國於 2010 年為順應世界潮流、推廣並資源整合國內的斑馬魚研究，科技部(當年的國科會)特別編列了「生物資源建置」的經費來支持「台灣斑馬魚核心設施」的建立，包括分別位於中央研究院及國家衛生研究院內的兩個分支，在過去 7 年來與其他各國種魚中心簽訂合作及資源轉移合約(Material Transfer Agreement, MTA)，協助國內斑馬魚的研究與世界接軌。因為上述這些相關組織的成立，促進斑馬魚的研究更加蓬勃發展，研究的方向更加多元化。這些發展奠定了斑馬魚作為一個模式生物的良好基礎，更將斑馬魚研究推向與轉譯醫學(translational

medicine)相關的嶄新領域。

斑馬魚實驗的應用

除了上述最初作為基礎發育生物學及基因遺傳學的模式生物外，斑馬魚的胚胎也常被用來做毒性試驗。數量多而透明的胚胎，加上發育成長快速，在 24 小時之內可以由一個受精卵長成一隻小魚，而在 5 天之內幾乎所有的器官都已具備。這些特性使科學家可以研究各種物質對動物成長、發育中各個不同階段的影響。集合許多研究成果及經過多年的改進，歐盟的經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 於 2013 年公佈了斑馬魚胚胎急性毒性測試的方法(TG236)。另外，斑馬魚與人類基因組間高度同源，有 70% 的人類基因具有至少一個顯而易見的斑馬魚直系同源基因，且 80% 的人類疾病相關基因可在斑馬魚找到對等的基因。在一些器官組織如耳朵、肌肉、心臟、眼睛、血液、脊柱、胰臟及腎等所產生的缺陷，與人類這些器官所產生的一些疾病之病理特徵相似，且為相同基因變異所造成。隨著 OECD 的方法被廣泛的應用於各種毒物試驗，愈來愈多研究人員利用相同的原理，來發展使用斑馬魚胚胎或仔魚建立藥物篩選的平台。這些平台能有效的被建立除前面所提與人類之諸多相似性外，最主要是因為斑馬魚的基礎研究非常扎實，尤其基因轉殖技術及方法的成熟，利用建立特殊基因及具有專一表達特性的各種螢光轉殖魚，研究人員可以高通量的來篩選藥物，最有名的例子就是由美國哈佛大學醫學院教授 Leonard Zon 所率領的團隊用斑馬魚成功地篩選到有效抗血癌的小分子藥物。這些成果終於讓美國食品藥物管理局(Food and Drug Administration, FDA) 接受並通過斑馬魚作為臨床前試驗的模式動物，這是繼大鼠與小鼠之後第三個最常被使用的模式動物。累積了近 40 年的研究成果，斑馬魚實驗的應用逐漸變得更多元、也更貼近我們的生活。

常見的斑馬魚實驗應用領域一覽表

基礎科研	轉譯科研
發育生物學、胚胎學	急性生物毒性測試
基因遺傳學	慢性環境污染物測試
免疫學	藥物篩選
細胞與信息傳導	致病機轉研究的動物模式(包括癌症)
病理學	感染性疾病之動物模式
營養代謝科學	神經退化性疾病之動物模式
行為認知學	老化疾病之動物模式

斑馬魚研究的國際趨勢

隨著人口的老化、氣候的變遷及生活型態的改變，人類所面臨的環境與疾病的挑戰比以往更加嚴苛，這些因素會直接或間接地影響我們學術研究的方向，斑馬魚是國際認同的一個研究生物醫學很好的模式動物，尤其在發育生物學、胚胎學、基因遺傳學等的研究方面一定會持續被大量應用。然而當資源不足，又要快速的有成果時，斑馬魚比起其他模式動物相對的便宜、子代數量又多，所以比較容易讓研究人員當作替代的動物模式，尤其符合現今國際間不遺餘力推動的動物研究 3R 精神(Reduction, Replacement and Refinement)。因為斑馬魚的胚胎在 5 天之內並不被視為活體動物，所以斑馬魚胚的實驗更是動保團體推薦的項目。然而斑馬魚畢竟是水生的脊椎動物，與人類在分類上的距離比起哺乳類的齧齒動物還是遠的多，所以在轉譯醫學的研究方面，目前的國際趨勢大致可分成兩大類：第一類著重於利用斑馬魚相對經濟、快速、操做簡便等優勢從事先導的試驗，包括藥物篩選、致病基因的剔除、轉殖及過度表達等，也就是建立某種特殊疾病的斑馬魚模式，研究人員先在斑馬魚的研究中獲得初步的結果，再去蕪存菁選擇最好或最

有利的方法用於更高等的模式動物。第二類是利用斑馬魚胚胎的特性來從事各項實驗包括:毒性試驗、藥物作用等測試。這類的應用非常廣泛,舉凡藥物、環境汙染物、食品添加物、環境賀爾蒙等均已具有許多成功的研究報告。尤其 2013 年美國 FDA 接受斑馬魚作為臨床前試驗的動物模式後,可預期的將來,以疾病治療及藥物開發為導向的斑馬魚研究將會更被重視。另外順應此類研究的趨勢,一些與斑馬魚健康監測、繁殖、飼育、行為等生理值標準化的相關研究也會連帶的發展,來幫助斑馬魚成為一個更完備、更理想的模式動物。

斑馬魚這個只有 3~5 公分長的小型淡水熱帶魚,在經過約 40 年的洗鍊,著實對人類的科學研究貢獻良多,真可以說是「小魚立大功」,相信未來會有更多的人加入斑馬魚研究的領域,而斑馬魚也終將成為人類科研的最佳夥伴。

參考資料

1. Peter Aldhous, 'Saturation screen' lets zebrafish show their stripes, *Nature* 404, 910 (27 April 2000) doi: 10. 1038/35010215.
2. Leonard I. Zon, Randall T. Peterson, *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer*, 2003 Jul; 3(7):533-9.
3. Zon, L. Peterson RT. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Reviews Drug Discovery*. *Nature* 2005, 4, 35-44.
4. Westerfield, M., *THE ZEBRAFISH BOOK*, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), 2007, Eugene, University of Oregon Press.
5. K Howe, MD Clark, CF Torroja, J Torrance, C Berthelot, M Muffato, The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013, 496 (7446), 498-503.
6. Barbara Squiban and J. Kimble Frazer. *Danio rerio*: Small Fish Making a Big Splash in Leukemia. *Curr Pathobiol Rep*. 2014 Jun; 2(2): 61–73.