

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200311001

陈佳明, 王庆, 王英英, 等. 水产动物模型的建立及在病害防控上的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(2): 119-126

Chen J M, Wang Q, Wang Y Y, et al. Establishment of aquatic animal model and its application in disease control [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(2): 119-126 (in Chinese)

水产动物模型的建立及在病害防控上的研究进展

陈佳明^{1,2}, 王庆^{1,*}, 王英英¹, 曾伟伟³, 尹纪元¹, 李莹莹¹

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔药创制重点实验室, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广州 510380

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

3. 佛山科学技术学院, 广东省动物分子设计与精准育种重点实验室, 普通高校动物分子设计与精准育种重点实验室, 生命科学与工程学院, 佛山 440605

收稿日期: 2020-03-11

录用日期: 2020-06-08

摘要: 近年来, 水产动物模型在鱼病防控方面的应用越来越广泛。其具备遗传背景清晰、条件可控性强等优点, 是鱼病防控基础研究的有效工具之一。本文论述了水产动物模型的建立方法以及在鱼类疾病病原分析、疫苗开发和水质监测方面应用的研究现状, 并对水产动物替代模型的发展前景做了简要论述。

关键词: 动物模型; 病原分析; 疫苗开发; 水质监测

文章编号: 1673-5897(2021)2-119-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Establishment of Aquatic Animal Model and Its Application in Disease Control

Chen Jiaming^{1,2}, Wang Qing^{1,*}, Wang Yingying¹, Zeng Weiwei³, Yin Jiyan¹, Li Yingying¹

1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510380, China

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3. School of Life Science and Engineering, Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Molecular Design and Precise Breeding, Key Laboratory of Animal Molecular Design and Precise Breeding of Higher Education Institute, Foshan University, Foshan 440605, China

Received 11 March 2020

accepted 8 June 2020

Abstract: In recent years, aquatic animal models have been widely used in the area of prevention and control of fish diseases. It has the clear genetic background of the used animals, strong controllability and thus can be an effective tool for basic research of fish disease prevention and control. In this paper, the establishment of aquatic animal model and its application for pathogen analysis of fish diseases, vaccine development and water quality monitoring were discussed, and the development prospect of aquatic animal experimental model was also mentioned.

Keywords: animal models; pathogen analysis; vaccine development; water quality monitoring

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31602202); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2020XT0403); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项资金资助项目(2021KJ150); 国家大宗淡水鱼产业技术体系(CARS-45)

第一作者: 陈佳明(1995—), 女, 硕士, 研究方向为水产病害防控, E-mail: 1192530574@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: sunny_929@163.com

随着世界人口的快速增长和工业化所带来的农用地面积减少,传统的种植与畜牧业已不能满足人类日益增长的食物需求。与此同时,鱼类及其他水产生物正成为人类重要的食物来源^[1]。在过去的30年里,水产养殖业取得了令人瞩目的进展,为世界上大部分人口提供了高质量的蛋白质。我国是水产养殖大国,是世界上唯一一个水产养殖产量超过捕捞产量的国家^[2]。水产养殖业是推动我国渔业持续、快速和稳定发展的重要力量^[3]。然而,鱼类病害问题发生频繁,造成了严重的经济损失,是我国目前水产养殖业发展的阻碍之一^[4-5]。因此鱼类疾病的防控成为了水产养殖业发展所面临的重要问题。

传统的鱼类疾病防控方法是直接以受感染的鱼类为研究对象,寻求可控制该种疾病的方法。然而,一些鱼类养殖条件差异大、遗传背景不清楚,且国内无特定病原体(specific pathogen free, SPF)实验动物,实验结果可信度较低,有时还会因为病原感染而影响结果的判断,阻碍了鱼类疾病的有效防控^[6]。水产动物模型是人工培育出来的动物,其种源、饲养管理、繁殖生产、生活环境和营养饲料都有系统严格的科学要求,是遗传背景明确和来源清晰的,可用于替代其他生物进行生产、科学研究和检定等的动物^[7]。近年来,水产动物模型逐渐应用于鱼病防治研究,借助水产动物模型为水产动物疾病的病原菌毒力分析、病原检测、传播途径研究及综合防治等提供有力的证据。例如,Rakus等^[8]的研究表明,斑马鱼可作为鲑鱼呼肠孤病毒(chum salmon reovirus, CSV)和2种同种异型疱疹病毒(cyprinid herpesvirus 1, CyHV-1; cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3)的研究模型,利用斑马鱼动物模型,可以评估病毒清除过程,并在CSV-受感染的鱼中,可以研究宿主与病原体的长期对抗。Das等^[9]以剑尾鱼为动物模型,研究水质和环境因素的变化对鱼类的健康和疾病易感性,表明气单胞菌(*Aeromonas*)是鱼类的主要病原体,证实了维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)的高致病性。水产动物模型的建立,将有效缓解鱼类疾病防控面临的诸多不便。

本文主要论述水产动物模型的建立方法,及其在鱼类疾病病原分析、水产疫苗开发和水质监测等方面的应用,为水产动物模型的应用推广提供参考。

1 水产动物模型的建立方法 (Establishment method of aquatic animal model)

1.1 模型动物的选择

模型动物在试验研究中有双重作用,它既是研

究对象,又是研究手段,在阐明动物疾病机理、预防及治疗等一系列的研究中都起着至关重要的作用^[10]。建立水产动物模型试验中模型动物的选择是重要部分,模型动物的选择需主要符合以下几点:(1)可人工培育并能稳定传代;(2)子代多、世代短和遗传背景清楚;(3)易于试验操作。目前常用的水生模型动物有斑马鱼、稀有鮡鲫、青鳉、剑尾鱼、新月鱼、红鲫、丝足鱼、虹鳟、鲤鱼和尼罗罗非鱼等。

1.2 建立水产动物模型的原则

1.2.1 相似性

建立水产动物模型的目的是找出可以推广并应用于水生动物疾病研究的有关规律。然而,模型动物并不是水产养殖中的实际患病动物,因此应尽可能找到患病情况与实际患病动物近似的模型动物,即相似性。为了辨别所找到的模型动物是否与自然环境下的实际患病动物患病情况近似的一致,需要对模型动物进行病理学研究。例如,Renshaw等^[11]建立了可通过产生特定嗜中性粒细胞的启动子下表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的转基因斑马鱼体内模型,用于炎症反应的遗传分析,通过对斑马鱼感染炎症的病原分析,发现斑马鱼的尾部被剪断后会引起炎症,而这种炎症随后会在与哺乳动物系统相似的时间过程中消退,证明斑马鱼可作为哺乳动物炎症诊治的水产动物模型。

1.2.2 重复性

理想的动物模型应具有良好的重复性^[12]。例如,Tao等^[13]和Guan等^[14]都利用稀有鮡鲫模型,研究了水中双酚A对鱼类的影响。

1.2.3 适用性和可控性

所用的动物模型可人为地控制一些试验条件,以便于突出表现该疾病主要病症。用于医学试验研究的模型,应考虑到今后的临床应用以便于控制该疾病的研究发展,也利于该疾病模型研究的开展^[15-16]。例如,笔者所在实验室以稀有鮡鲫为模型研究草鱼呼肠孤病毒,可人为地控制温度、剂量和攻毒方式等条件,以便于对该种疾病进行研究。

1.3 建立模型动物的方法

1.3.1 自发模型

自发模型是指试验动物在未经任何的化学处理下,动物自然发生或基因突变产生疾病。以J-db自发糖尿病小鼠模型为例,该小鼠出生即带有糖尿病致病基因,倪程佩等^[17]比较了自发与诱发模型小鼠2型糖尿病的特征,发现8周后自发性2型糖尿病

模型糖代谢异常以及炎症反应都日渐加重,长时间维持高血糖症状;诱发性2型糖尿病模型在饲养8周后糖代谢以及炎症反应部分缓解,高血糖症状部分好转。这证明,自发模型和诱发模型在实验中可能存在不同研究结果。自发模型是经遗传育种保留下来的动物,自发模型的建立具有十分重要的参考价值。然而,水产动物模型作为一类新兴的动物模型,目前极少存在自发模型的建立,预计在不久的将来,这个领域的研究将会有新的进展。

1.3.2 诱发模型

诱发模型是指试验者通过一定的化学、物理或生物的致病因素作用于试验动物,造成患有疾病的动物模型。生物因素致病是目前研究常用的手段,生物因素包括细菌、病毒、寄生虫、细胞、生物毒素和激素等。如 Saraceni 等^[18]用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*, AH)感染斑马鱼模型,并通过用实时荧光定量核酸扩增检测系统(real-time quantitative PCR detecting system, qRT-PCR)检测基因表达,分析炎症相关基因表达,结果表明,斑马鱼可作为嗜水气单胞菌感染模型。Ahmadifard 等^[19]以剑尾鱼为模型,研究了富集枯草芽孢杆菌的青蒿对观赏鱼的影响,实验组长期饲喂添加枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的富集蒿属植物,结果表明,枯草杆菌培养期间浓度为 1×10^5 CFU·mL⁻¹的枯草杆菌可以改善剑尾鱼的繁殖性能、肠道菌群和对病原菌的抗性。Lin 等^[20]将草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)通过腹腔注射的方式感染稀有鮕鲫,采用BGISEQ-500对肝胰腺、鳃、头肾和脾脏4个cDNA文库进行转录组测序,并采用qRT-PCR方法进行验证,探索发病机制。建立诱发模型的理想目的是在确认水产动物模型的种类、使用药物、剂量和方法之后,可以容易地再造和重复,同时,这样的过程也使得鱼病预防的方式得到实践和创新。

1.3.3 遗传修饰模型

遗传修饰模型是利用基因克隆、基因敲除和转基因等技术作用于动物,患有疾病的动物模型。随着现代分子生物技术在水产动物模型研究中的应用,水产动物遗传修饰模型的研究正经历着从宏观到微观的过程,从动物模型的群体、个体和细胞水平正向着分子水平方向发展,从分子水平上阐明生命的现象和疾病的本质^[6]。Chen 等^[21]为了研究整合素 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$ subunit, ITGB 1b)对GCRV的感染作用,以稀有鮕鲫为动物模型,使用CRISPR/Cas9

系统产生了ITGB 1b缺失的稀有鮕鲫(ITGB 1b-/-)。GCRV攻毒后,ITGB 1b-/-稀有鮕鲫的存活时间较野生型稀有鮕鲫长,这些发现为GCRV的防治提供了新的研究思路。冯志桐等^[22]以转基因斑马鱼T_g(lyz:EGFP)-Lyz fish为模型探讨了重金属镉对转基因斑马鱼的胚胎毒性和免疫毒性,结果表明,转基因斑马鱼对镉的免疫性更强,转基因斑马鱼模型的建立在环境污染物的免疫毒性检测方面有着重要意义。遗传修饰水产动物模型是对已知基因加以修饰建立的,能够作为工具,帮助实现其他目的基因修饰动物模型。遗传修饰水产动物模型在基因功能和信号通路等生物学基础研究方面做出了突出贡献。

2 水产动物模型在鱼类疾病防控中的应用 (Application of aquatic animal model in fish disease prevention and control)

2.1 水产动物模型在鱼类疾病病原分析中的应用

鱼类疾病诊断中病原分离和鉴定对疾病防治具有至关重要的作用,回归感染试验确定病原致病性是鱼病研究中常用的方法,但是一些鱼类具有体型大、饲养难、价格昂贵和不易繁殖等特点,阻碍了试验进行,因此,需用水产动物模型进行相关研究。稀有鮕鲫、斑马鱼、剑尾鱼和异育银鲫等都普遍作为疾病模型应用于鱼病病原分析研究,研究要求遗传背景清晰、来源清楚和雌雄比例相当的1~6月龄鱼。1994年,王铁辉等^[23]研究稀有鮕鲫对GCRV的敏感性,通过对感染呼肠孤病毒后的病理观察,证明稀有鮕鲫对GCRV敏感,可作为抗GCRV育种的模型。2000年,潘厚军等^[24]用18株从淡水鱼中分离出来的细菌感染剑尾鱼模型,发现细菌对剑尾鱼和敏感鱼的毒力一致,证明剑尾鱼模型作为评价水生细菌毒力的水生动物模型具有较好的前景。2007年,Harrieff 等^[25]用2种海洋分枝杆菌(*Mycobacterium balnei*)感染斑马鱼,分别从鱼体的肝脏、脾脏和肠道分离到该细菌。组织病理分析发现,海洋分枝杆菌可以通过肠道感染鱼体,在内脏形成肉芽肿。2016年,夏立群等^[26]通过对鳊鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)感染斑马鱼后的病理研究,建立了鳊鱼诺卡氏菌感染斑马鱼模型,该动物模型的建立将有助于诺卡氏菌病致病机理的研究和疫苗的研制。2016年, Yuan 等^[27]以稀有鮕鲫为动物模型,探索Cr⁶⁺积累和消除的动态规律,揭示其解毒和抗氧化的机理,对Cr⁶⁺中毒稀有鮕鲫进行分析,发现谷胱甘肽巯基转移酶蛋白(GST)和金属硫蛋白(MT)可能参与了Cr⁶⁺

的解毒作用,此外, Cr^{6+} 诱导的稀有鮡鲫 GST 解毒可能是通过 Nr2 介导的基因表达调控完成的。2018 年,Rozi 等^[28]以丝足鱼为动物模型,研究来自东爪哇和中爪哇地区水域中 5 株嗜水气单胞菌对丝足鱼的致病性及组织病理特性,结果表明,3 株为致病菌,2 株为非致病菌,致病菌的组织病理特性可为感染病原菌的水生动物提供依据。同年,Boucontet 等^[29]使用亚致死剂量的辛德毕斯病毒(*Sindbis virus*)和福氏志贺菌(*Shigella flexneri* bacteria)来建立病毒和细菌共感染的斑马鱼模型,进行病原分析后发现,病毒诱发 I 型干扰素(IFN)的反应,而细菌引发强烈 IL1 β 和 TNF α 炎症反应。与单纯感染细菌的鱼相比,同时感染病毒的鱼死亡率更高,相比之下,先感染细菌后感染病毒并没有导致死亡率的增加,病毒-细菌共感染的鱼中性粒细胞存活受损,在共感染的鱼中强烈诱导了 2 种类型的细胞因子反应。2019 年,谭宏亮等^[30]以异育银鲫为动物模型,研究白藜芦醇对嗜水气单胞菌的毒力抑制作用,结果显示,大黄、虎杖等含白藜芦醇成分的药用植物具有有效抑制嗜水气单胞菌毒力、降低鱼体炎症反应的功效;腹腔注射 25 ~ 100 mg·kg⁻¹ 白藜芦醇对感染病原菌的异育银鲫有一定保护作用,可用于水产细菌病防控。

2.2 水产动物模型在水产疫苗开发中的应用

目前,鱼类传染性疾病的防控主要有免疫预防和药物控制等方法。其中,由药物控制引起的变态反应、耐药性反应和中毒反应等潜在危害很大,对养殖动物、养殖产品、食用者和环境具有严重影响;而免疫预防不仅可以提高鱼类体内特异性免疫水平,亦能增强其机体抗应激的能力^[31]。渔用疫苗的研制与应用一直是水产病害防治的重要研究方向之一,水产动物模型在疫苗研发方面的应用空间十分广阔。斑马鱼、稀有鮡鲫、剑尾鱼和虹鳟鱼等常被用作疫苗研发的实验鱼,要求为遗传背景清晰、来源清楚和雌雄比例相当的 1 ~ 6 月龄鱼。2010 年,乔迁^[32]以剑尾鱼作为动物模型,评价大菱鲈红体病虹彩病毒基因疫苗(pVAX1 25R、pVAX1 47R)对大菱鲈红体病的治疗效果,结果表明,pVAX1 47R 疫苗对预防大菱鲈红体病具有一定的保护作用。2013 年,张智慧^[33]完成了鳃弧菌减毒活疫苗注射免疫斑马鱼的免疫保护分析,使用疫苗后相对免疫保护率达到 90% 以上,与在牙鲆等经济鱼种上的结果类似,说明斑马鱼经疫苗免疫后产生跟宿主动物类似的保护作用,可作为疫苗免疫效果评价和保护机理研究的动

物模型。2015 年,LaPatra 等^[34]以虹鳟鱼为动物模型,研究传染性造血坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)和肠道红口病(enteric red mouth vaccines, ERM)的双重疫苗使用鼻腔途径接种的情况,结果显示,通过鼻腔途径对 2 种病原体进行双重接种是一种非常有效的水产养殖疫苗接种策略。2017 年,Marana 等^[35]同样以虹鳟鱼为动物模型,研究沙门氏菌灭活疫苗中抗原浓度对疫苗效力的影响,发现沙门氏菌灭活疫苗中抗原浓度与免疫保护力呈正相关。2018 年,Myllmäki 等^[36]以斑马鱼为动物模型,用分歧杆菌低剂量腹腔注射感染斑马鱼,研究潜伏性海洋分枝杆菌感染重新激活机制,试验证明斑马鱼感染模型为研究海洋分枝杆菌感染的再活化机制、筛选疫苗和候选药物提供了一种可行的工具。2019 年,Ramírez-Paredes 等^[37]以尼罗罗非鱼为动物模型,研制了一种弗朗西斯氏菌病(*Franciscosis*)的全细胞福尔马林灭活疫苗,接种疫苗 840 d 后,相对免疫保护率达到 100%。

2.3 水产动物模型在水质监测方面的应用

在过去的 30 年中,世界水产养殖总产量以每年 8% 的速度增长^[38],到 2030 年,世界近 2/3 的水产品将来自于水产养殖业^[39-40]。在养殖期间,水生环境为淡水和海洋生物提供了生活环境、食物和氧气。但由于环境污染、人类活动和农业生产等原因影响水环境中的溶解氧含量、温度和酸碱度等指标,从而影响水生生物的生长并引起鱼类疾病。因此,水质参数的监控调节是水产养殖过程的必要环节。水产动物模型在水质监测中的应用十分广泛。斑马鱼、稀有鮡鲫、新月鱼和青鳉常被用来检测水毒性,其中稀有鮡鲫的应用最为广泛,大多选育遗传背景清晰、雌雄比例相当的幼年或胚胎实验鱼进行各个生命阶段的毒性影响研究,或选用成年实验鱼对水体污染物的毒性进行研究。Sadeghi 和 Imanpoor^[41]研究了水体中农药残留的各个成分对新月鱼模型的影响,证明新月鱼可作为水体质量检测的模型。Yang 等^[42]以斑马鱼为动物模型,对水中噻唑胺的毒性进行了研究,96 h-LC₅₀ 值分别为:成鱼(4.19 mg·L⁻¹)<仔鱼(3.52 mg·L⁻¹)<胚胎(3.08 mg·L⁻¹),在斑马鱼的这 3 个阶段中感染噻唑胺的症状包括异常的自发运动、心跳缓慢、孵化抑制、生长退化和形态畸形,此外,成年斑马鱼暴露于 0.19、1.33 和 2.76 mg·L⁻¹ 噻唑胺后 21 d,肝脏和肾脏有明显的病理变化。Liang 和 Zha^[43]通过稀有鮡鲫对新型水质污染物苯丙三唑

的内分泌干扰作用和神经毒性进行研究,证实稀有鮕鲫是水生毒性试验和化学安全评价的优良模型动物。Luo 等^[44]同样以稀有鮕鲫为模型动物,研究水环境中含氮污染物(氨、亚硝酸盐和硝酸盐)对水生生物早期生命阶段的影响,结果表明,氨、亚硝酸盐和硝酸盐对稀有鮕鲫生长无明显影响的浓度分别为 2.49、13.33 和 19.95 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,含氮污染物对稀有鮕鲫的生长构成了威胁,为建立含氮污染物水质标准提供了有益的信息。廖伟等^[45]以斑马鱼为动物模型,研究斑马鱼不同生长时期对 Cu^{2+} 的毒性响应差异,并利用物种敏感度分布法表征不同生长阶段斑马鱼对 Cu^{2+} 的敏感性差异,结果证实,斑马鱼体长、体质量的变化均符合逻辑斯蒂增长方程($R^2>0.97$),斑马鱼成鱼阶段对 Cu^{2+} 较敏感,而幼鱼的敏感性次之,仔鱼最不敏感,此研究为水质基准的设计提供了依据。2019 年, Guan 等^[46]通过研究水体中双酚 A 对稀有鮕鲫模型脂质代谢的调控机制及卵巢发育的影响,证明稀有鮕鲫可作为水体中双酚 A 的检测模型,是优良的水产毒理学研究的动物模型。

3 前景展望 (Prospect forecast)

水生动物模型在科学研究中的建立和应用始于 20 世纪 80 年代,1981 年 Streisinger 在 *Nature* 发表了一篇有关斑马鱼雌核发育和纯系建立的文章,标志着水生动物模型研究的开始^[47]。水产动物模型具备遗传背景清晰、条件可控性强等优点,目前,关于水产动物模型的研究已不再局限于在模型动物群体的研究,基因克隆^[48-49]、基因敲除^[50-52]、蛋白定位^[53-54]、细胞因子^[55-56]和转录水平^[57-59]等分子水平的研究在不断深入。此外,构建基因突变文库^[60]、转基因模型生物研究^[61]、反向基因筛查技术^[62-64]和高通量基因定位^[65]等新型研究手段的出现对水产动物疾病模型构建和应用具有较大推动作用。

然而,水产动物模型的标准化研究仍处于初步阶段,目前国际认可的应用于疾病研究的标准化水产动物模型仅有斑马鱼、青鳉、黑头软口鲮和孔雀鱼等。近几年,我国重视水生模型动物的研究与应用开发,加强选育工作,已陆续开展了剑尾鱼、稀有鮕鲫、红鲫和剑尾鱼等优良的水生动物模型的标准化研究,而对于其他模型动物的标准化研究还有待开发。水产动物模型作为一种新手段在水生动物疾病预防研究中具有广阔的发展空间。

动物模型是医学、生命科学研究的基础和重要支撑条件之一,反映了一个国家或地区科技综合能

力的高低,是评价这个国家或地区生命科学水平高低的重要标志之一。水产动物模型具有种类多、繁殖力强和遗传容易控制等诸多优点,逐渐被应用到水产动物疾病模型复制及病原致病机理等方面研究。最近 20 多年,世界各国用鱼类在鱼病防治实验研究中已取得很多科研成果,发表的科研论文已达数千篇,应用价值已日益为人们所重视。水产动物模型将在水产养殖病害综合防治中得到愈来愈广泛的应用。

通讯作者简介:王庆(1976—),女,博士,研究员,主要研究方向为水产病害防控。

参考文献 (References):

- [1] 张智慧. 模型动物斑马鱼对鳃弧菌减毒活疫苗的免疫应答[D]. 上海: 华东理工大学, 2013: 14
- [2] Sommerset I, Krossøy B, Biering E, et al. Vaccines for fish in aquaculture [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2005, 4(1): 89-101
- [3] Rao Y L, Su J G. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp [J]. *Journal of Immunology Research*, 2015, 2015: 670437
- [4] Xiong J B, Nie L, Chen J. Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity [J]. *Zoological Research*, 2019, 40(2): 70-76
- [5] 黄志斌. 剑尾鱼在水产药物临床试验中应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006: 13
Huang Z B. Application of *Xiphophorus helleri* in the research of aquatic pharmaceutical clinical experiment [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006: 13 (in Chinese)
- [6] 窦海鸽, 黄捷, 王秀华, 等. 鱼类实验动物研究概况及在水产动物病害研究上的应用[J]. *海洋湖沼通报*, 2006(4): 78-85
Dou H G, Huang J, Wang X H, et al. An overview of studies on fish as laboratory animals and its application to the research of aquatic animal diseases [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2006(4): 78-85 (in Chinese)
- [7] 卢耀增. 实验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 1-2
- [8] Rakus K, Adamek M, Mojżesz M, et al. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model for the viral infections of fish [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(6): 923-934
- [9] Das S, Aswani R, Jasim B, et al. Distribution of multi-virulence factors among *Aeromonas* spp. isolated from dis-

- eased *Xiphophorus hellerii* [J]. Aquaculture International, 2020, 28(1): 235-248
- [10] 张斌. 医学研究中人类疾病动物模型的应用[J]. 中外医学研究, 2009, 7(11): 58-59
- [11] Renshaw S A, Loynes C A, Trushell D M, et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation [J]. Blood, 2006, 108(13): 3976-3978
- [12] Fernandez A A, Bowser P R. Selection for a dominant oncogene and large male size as a risk factor for melanoma in the *Xiphophorus* animal model [J]. Molecular Ecology, 2010, 19(15): 3114-3123
- [13] Tao S Y, Wang L H, Zhu Z L, et al. Adverse effects of bisphenol A on Sertoli cell blood-testis barrier in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 171: 475-483
- [14] Guan Y J, Zhang T, He J F, et al. Bisphenol A disturbed the lipid metabolism mediated by sterol regulatory element binding protein 1 in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Aquatic Toxicology, 2019, 207: 179-186
- [15] 周燕, 朱剑文, 邹丽, 等. 改良法建立妊娠期高血压疾病大鼠模型[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(1): 53-56, 83
- Zhou Y, Zhu J W, Zou L, et al. An improved method to establish animal model of hypertensive disorder complicating pregnancy [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2009, 17(1): 53-56, 83 (in Chinese)
- [16] 赵建学, 郭海燕, 陆玮婷, 等. 双虎清肝颗粒对四氯化碳诱发大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(28): 3215-3220
- Zhao J X, Guo H Y, Lu W T, et al. Efficacy of Shuanghu liver-clearing granule in prevention and treatment of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2008, 16 (28): 3215-3220 (in Chinese)
- [17] 倪程佩, 王婧怡, 沈艳华, 等. 自发与诱发2型糖尿病小鼠模型的比较研究[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(9): 36-41, 49
- Ni C P, Wang J Y, Shen Y H, et al. Comparison of spontaneous type 2 diabetes mice with induced diabetes mice [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2016, 26 (9): 36-41, 49 (in Chinese)
- [18] Saraceni P R, Romero A, Figueras A, et al. Establishment of infection models in zebrafish larvae (*Danio rerio*) to study the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1219
- [19] Ahmadifard N, Rezaei Aminloo V, Tukmechi A, et al. Evaluation of the impacts of long-term enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on growth performance, reproduction, intestinal microflora, and resistance to *Aeromonas hydrophila* of ornamental fish *Poecilia latipinna* [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11(3): 957-965
- [20] Lin Y S, Wang B, Wang N H, et al. Transcriptome analysis of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) infected by the grass carp reovirus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 337-344
- [21] Chen G, Xiong L, Wang Y M, et al. ITGB1b-deficient rare minnows delay grass carp reovirus (GCRV) entry and attenuate GCRV-triggered apoptosis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 3175
- [22] 冯志桐, 赵爽, 潘炯, 等. 镉对转基因斑马鱼的急性毒性效应[J]. 天津理工大学学报, 2019, 35(2): 61-64
- Feng Z T, Zhao S, Pan J, et al. Acute toxic effects of cadmium on transgenic zebrafish [J]. Journal of Tianjin University of Technology, 2019, 35(2): 61-64 (in Chinese)
- [23] 王铁辉, 刘沛霖, 陈宏溪, 等. 稀有鮡鲫对草鱼出血病病毒敏感性的初步研究[J]. 水生生物学报, 1994, 18(2): 144-149
- Wang T H, Liu P L, Chen H X, et al. Preliminary study on the susceptibility of *Gobiocypris rarus* to hemorrhagic virus of grass carp (GCHV) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1994, 18(2): 144-149 (in Chinese)
- [24] 潘厚军, 吴淑勤, 李凯彬, 等. 剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用[J]. 水产学报, 2000, 24(5): 467-471
- Pan H J, Wu S Q, Li K B, et al. Application of *Xiphophorus helleri* to detection of virulence of fish pathogenic bacteria [J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(5): 467-471 (in Chinese)
- [25] Harrieff M J, Bermudez L E, Kent M L. Experimental exposure of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: A potential model for environmental mycobacterial infection [J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(10): 587-600
- [26] 夏立群, 汪美, 赖杰彬, 等. 鲫鱼诺卡氏菌感染斑马鱼模型的建立与组织病理学研究[J]. 热带生物学报, 2016, 7(4): 409-416
- Xia L Q, Wang M, Lai J B, et al. Establishment of a zebrafish model for *Nocardia seriolae* and histopathological study [J]. Journal of Tropical Biology, 2016, 7 (4): 409-416 (in Chinese)
- [27] Yuan J L, Gu Z M, Zheng Y, et al. Accumulation and detoxification dynamics of microcystin-LR and antioxidant responses in male red swamp crayfish *Procambarus clarkia* [J]. Aquatic Toxicology, 2016, 177: 8-18
- [28] Rozi, Rahayu K, Daruti D N, et al. Study on characterization, pathogenicity and histopathology of disease caused

- by *Aeromonas hydrophila* in gourami (*Osphronemus gouramy*) [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2018, 137: 012003
- [29] Boucontet L, Passoni G, Thiry V, et al. A model of super-infection of virus-infected zebrafish larvae: Increased susceptibility to bacteria associated with neutrophil death [J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 1084
- [30] 谭宏亮, 陈凯, 习丙文, 等. 白藜芦醇抑制嗜水气单胞菌毒力作用研究[J]. 水生生物学报, 2019, 43(4): 861-868
- Tan H L, Chen K, Xi B W, et al. Resveratrol inhibits growth, virulence and biofilm formation of *Aeromonas hydrophila* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(4): 861-868 (in Chinese)
- [31] 孙恒昌, 陈庭金, 黄艳, 等. 鱼用疫苗研究进展[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(12): 1651-1656
- [32] 乔迁. 大菱鲆红体病虹彩病毒核酸疫苗及两种海水名贵鱼类疾病的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 5
- Qiao Q. The study for TRBIV genetic vaccine and the diseases of two rare marine fish species [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010: 5 (in Chinese)
- [33] 张智慧. 模型动物斑马鱼对鳃弧菌减毒活疫苗的免疫应答[D]. 上海: 华东理工大学, 2013: 5
- Zhang Z H. Immune responses of zebrafish vaccinated with a live attenuated vaccine *Vibrio anguillarum* [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013: 5 (in Chinese)
- [34] LaPatra S, Kao S, Erhardt E B, et al. Evaluation of dual nasal delivery of infectious hematopoietic necrosis virus and enteric red mouth vaccines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Vaccine, 2015, 33(6): 771-776
- [35] Marana M H, Skov J, Chettri J K, et al. Positive correlation between *Aeromonas salmonicida* vaccine antigen concentration and protection in vaccinated rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* evaluated by a tail fin infection model [J]. Journal of Fish Diseases, 2017, 40(4): 507-516
- [36] Myllymäki H, Niskanen M, Luukinen H, et al. Identification of protective postexposure mycobacterial vaccine antigens using an immunosuppression-based reactivation model in the zebrafish [J]. Disease Models & Mechanisms, 2018, 11(3): dmm033175
- [37] Ramírez-Paredes J G, Mendoza-Roldan M A, Lopez-Jimena B, et al. Whole cell inactivated autogenous vaccine effectively protects red Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against francisellosis via intraperitoneal injection [J]. Journal of Fish Diseases, 2019, 42(8): 1191-1200
- [38] Shareef Z, Reddy S R N. Wireless sensor network for aquaculture: Review, survey, and case study of aquaculture practices in western Godavari region [J]. Journal of Ambient Intelligence and Smart Environments, 2018, 10(5): 409-423
- [39] Ottinger M, Clauss K, Kuenzer C. Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments—A review [J]. Ocean & Coastal Management, 2016, 119: 244-266
- [40] Zhou C, Xu D M, Lin K, et al. Intelligent feeding control methods in aquaculture with an emphasis on fish: A review [J]. Reviews in Aquaculture, 2018, 10(4): 975-993
- [41] Sadeghi A, Imanpoor M R. Investigation of LC₅₀, NOEC, and LOEC of oxadiazon, deltamethrin, and malathion on platy fish (*Xiphophorus maculatus*) [J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2015, 9(28): 1271-1276
- [42] Yang Y, Qi S Z, Wang D H, et al. Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 307: 127-136
- [43] Liang X F, Zha J M. Toxicogenomic applications of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) in aquatic toxicology [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D, Genomics & Proteomics, 2016, 19: 174-180
- [44] Luo S, Wu B L, Xiong X Q, et al. Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to early life stages of the rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2016, 35(6): 1422-1427
- [45] 廖伟, 刘大庆, 冯承莲, 等. 不同生长阶段斑马鱼对Cu²⁺的毒性响应差异[J]. 环境科学研究, 33(3): 626-633
- Liao W, Liu D Q, Feng C L, et al. Difference in the toxicity response of zebrafish to Cu²⁺ at different life stages [J]. Research of Environmental Sciences, 33(3): 626-633 (in Chinese)
- [46] Guan Y J, Zhang T, He J F, et al. Bisphenol A disturbed the lipid metabolism mediated by sterol regulatory element binding protein 1 in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Aquatic Toxicology, 2019, 207: 179-186
- [47] 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
- [48] Ke F, Wang Y, Yang C S, et al. Molecular cloning and antibacterial activity of hepcidin from Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2015, 18(3): 169-174
- [49] Zou P F, Chang M X, Li Y, et al. Higher antiviral response of RIG-I through enhancing RIG-I/MAVS-mediated signaling by its long insertion variant in zebrafish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 43(1): 13-24
- [50] Wu R S, Lam I I, Clay H, et al. A rapid method for directed gene knockout for screening in G0 zebrafish [J].

- Developmental Cell, 2018, 46(1): 112-125
- [51] Zheng Y, Chen J Z, Liu Y, et al. Molecular mechanism of endocrine system impairment by 17 α -methyltestosterone in gynogenic Pengze crucian carp offspring [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 128: 143-152
- [52] Tian J J, Hu J, Chen M L, et al. The use of mrp1-deficient (*Danio rerio*) zebrafish embryos to investigate the role of Mrp1 in the toxicity of cadmium chloride and benzo[a]pyrene [J]. Aquatic Toxicology, 2017, 186: 123-133
- [53] Beyer H M, Juillot S, Herbst K, et al. Red light-regulated reversible nuclear localization of proteins in mammalian cells and zebrafish [J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4 (9): 951-958
- [54] Kumar A, Bhandari A, Sarde S J, et al. Ancestry & molecular evolutionary analyses of heat shock protein 47 kDa (HSP₄₇/SERPINH₁) [J]. Scientific Reports, 2017, 7 (1): 10394
- [55] Chen J, Lv Y P, Dai Q M, et al. Host defense peptide LEAP-2 contributes to monocyte/macrophage polarization in barbel steed (*Hemibarbus labeo*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 87: 184-192
- [56] Maekawa S, Chiang Y A, Hikima J, et al. Expression and biological activity of two types of interferon genes in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 48: 20-29
- [57] Wu X M, Hu Y W, Xue N N, et al. Role of zebrafish NLRC5 in antiviral response and transcriptional regulation of MHC related genes [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2017, 68: 58-68
- [58] Uchimura T, Hara S, Yazawa T, et al. Involvement of heat shock proteins on the transcriptional regulation of corticotropin-releasing hormone in medaka [J]. Frontiers in Endocrinology, 2019, 10: 529
- [59] Armant O, Gourain V, Etard C, et al. Whole transcriptome data analysis of zebrafish mutants affecting muscle development [J]. Data in Brief, 2016, 8: 61-68
- [60] 覃初斌. 干酪乳杆菌对斑马鱼抵御气单胞菌感染的分子机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017: 13
- Qin C B. The molecular mechanism of *Lactobacillus casei* resistance against *Aeromonas* infection in zebrafish [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017: 13 (in Chinese)
- [61] Watakabe I, Hashimoto H, Kimura Y, et al. Highly efficient generation of knock-in transgenic medaka by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering [J]. Zoological Letters, 2018, 4: 3
- [62] Kok F O, Shin M, Ni C W, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish [J]. Developmental Cell, 2015, 32(1): 97-108
- [63] Shah A N, Davey C F, Whitebitch A C, et al. Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish [J]. Nature Methods, 2015, 12(6): 535-540
- [64] D'Agostino Y, Locascio A, Ristoratore F, et al. A rapid and cheap methodology for CRISPR/Cas9 zebrafish mutant screening [J]. Molecular Biotechnology, 2016, 58(1): 73-78
- [65] Wagner D E, Weinreb C, Collins Z M, et al. Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo [J]. Science, 2018, 360(6392): 981-987

