

· 基础研究 ·

高胆固醇饮食对斑马鱼脂代谢的影响

武琳^{1,2}, 陈忠^{2*}, 余翠¹, 刘帅³, 杨明³¹上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; ²上海健康医学院附属第六人民医院东院(上海市第六人民医院东院)心内科, 上海 201306; ³上海大学环境与化工学院, 上海 200444

[摘要] 目的: 建立一种稳定可靠的斑马鱼高脂血症模型, 并应用不同方法评估高胆固醇饮食对斑马鱼脂代谢的影响。方法: 受精5 d后(5 days post fertilization, 5dpf)的斑马鱼幼鱼随机分成普通饲料组和高胆固醇饲料模型组, 普通饲料为纯蛋黄干粉, 高胆固醇饲料是向纯蛋黄干粉中添加不同百分比的胆固醇配制而成, 连续喂养10 d后通过显微镜实时观察并对幼鱼生理生化指标进行检测评估。结果: 共聚焦显微镜下观察到不同百分比的高胆固醇饮食模型组幼鱼尾部动脉血管脂质沉积量均显著高于普通饲料组($P < 0.05$), 且随着饲料中胆固醇百分比增加, 幼鱼动脉血管脂质沉积量也随之增加; 增加5%高胆固醇饮食组投喂量, 其血管脂质沉积量先显著性增加($P < 0.05$)后渐趋稳定, 但幼鱼生存率逐渐降低($P < 0.05$); 5%高胆固醇饮食组幼鱼体宽明显大于普通饲料组($P < 0.01$), 但体长无明显差异($P > 0.05$); 5%高胆固醇饮食组幼鱼体内总胆固醇(total cholesterol, TC)和总甘油三酯(total triglyceride, TG)水平较普通饲料组明显升高($P < 0.01$), 且低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平也同时升高($P < 0.05$)。结论: 5%高胆固醇饲料喂养10 d可以诱导斑马鱼高脂血症的发生, 且适量增加饲料中胆固醇百分比或适当增加高胆固醇投喂量均能加快高脂血症模型建立。

[关键词] 胆固醇; 高血脂; 斑马鱼; 模型; 蛋黄**[中图分类号]** R589.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)07-978-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190706

Effects of high cholesterol diet on the lipid metabolism in zebrafish larvae

Wu Lin^{1,2}, Chen Zhong^{2*}, Yu Cui¹, Liu Shuai³, Yang Ming³¹College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ²Department of Cardiology, Shanghai Sixth People's Hospital East Affiliated to Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201306; ³College of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China

[Abstract] **Objective:** To establish a stable and reliable model of zebrafish hyperlipidemia and evaluate the effect of high cholesterol diet on the lipid metabolism in zebrafish larvae. **Methods:** Zebrafish larvae after five days post fertilization (5dpf) were randomly divided into two groups: normal feed group with dry powder of pure egg yolk, and high cholesterol feed model group with different percentages of cholesterol added to pure egg yolk. After 10 days, the evaluation was carried out by microscopy and detecting the physiological and biochemical indicators in the zebrafish larvae. **Results:** Confocal microscopy showed that the lipid deposition in caudal artery of juvenile fishes in high cholesterol diet model group was significantly higher than that in common diet group ($P < 0.05$), and the lipid deposition in caudal artery of juvenile fishes increased with the increase of cholesterol content in diet. When the feed intake of the 5% high cholesterol diet group increased, the lipid deposition in blood vessel increased significantly at the beginning ($P < 0.05$) and subsequently stabilized gradually, but the survival rate of juvenile fishes decreased significantly ($P < 0.05$). The body width of fish larvae in the 5% high cholesterol diet group was significantly larger than that in common diet group ($P < 0.01$), but no significant differences in body length were observed between the two groups ($P > 0.05$). The levels of total cholesterol (TC) and total triglyceride (TG) in juvenile fishes fed with 5% high cholesterol diet were both significantly higher than those fed with normal diet ($P < 0.01$), and the levels of LDL-C were also significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion:** Feeding 5% high cholesterol diet for 10 days could induce the occurrence of hyperlipidemia in zebrafish. Increasing the percentage of cholesterol in diet or increasing the dosage of high cholesterol properly could accelerate the establishment of hyperlipidemia model.

[Key words] cholesterol; hyperlipidemia; zebrafish; model; yolk**[基金项目]** 上海健康医学院师资人才项目

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(07):978-982]

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhongchen7498@hotmail.com

高脂血症是一种脂代谢紊乱慢性疾病,是动脉粥样硬化、冠心病等心血管类疾病发生的主要危险因素^[1-2]。高脂血症模型的建立为与相关疾病的预防治疗及发病机制的研究提供了重要工具^[3-5]。国内外建立高脂血症模型的方法有多种,选用的动物通常是鼠^[6-7]、兔^[8-9]、鸡^[10]、猪^[11]等,但这些动物生长周期长、成本高,不适合大规模的实验。斑马鱼是近几十年新兴起的模式生物,与人类基因组具有高度同源性,其体积小、产卵量高、发育迅速,且适合活体和大规模实验的优势让研究者们不可忽视。目前虽然也有少数学者利用斑马鱼建立高脂血症模型^[12-15],但高脂血症模型建立方法也是因人而异。本实验主要探究一种稳定可靠的斑马鱼高脂血症模型建立方法,通过显微镜实时观察以及相关生理生化指标的检测来进行评价,为高血脂及其并发症的药物筛选、毒性评估和机制研究提供重要工具。

1 材料和方法

1.1 材料

野生型(AB系)和转基因型Fli1-EGFP(AB系)斑马鱼成鱼均购自武汉水生所国家斑马鱼资源中心,其中Fli1-EGFP斑马鱼的血管内皮表达绿色荧光蛋白,在荧光显微镜下可以观察斑马鱼血管。

胆固醇(北京博易汇科生物技术有限公司),荧光胆固醇酯类似物cholesteryl bodipy 524/563 C11(Invitrogen公司,美国),乙醚(上海国药集团),BCA蛋白测定试剂盒(南京建成生物公司),血脂检测试剂盒(上海延慕实业有限公司及南京建成生物公司)。氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、二水氯化钙(CaCl₂·2H₂O)和七水硫酸镁(MgSO₄·7H₂O)、甲基纤维素(上海生工生物有限公司)。60×E3配方:17.2 g NaCl、0.76 g KCl、2.9 g CaCl₂·2H₂O和4.9 g MgSO₄·7H₂O溶于超纯水中并定容至1 L。水循环养殖系统(北京爱生科技发展有限公司),生化培养箱(上海博讯实业有限公司),酶标仪(TECAN公司,瑞士),共聚焦显微镜(Olympus公司,日本),体视荧光显微镜(ZEISS公司,德国),台式冷冻干燥器(LABCONCO公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼饲养和幼鱼获取

斑马鱼成鱼于斑马鱼水循环养殖系统中饲养,水温及环境温度(28.0±0.5)℃,光照周期14 h(光):10 h(暗),每天喂食丰年虾2次。实验所用斑马鱼幼鱼饲养在9 cm玻璃培养皿,70 mL 1×E3培养液,

每皿30条幼鱼,(28.0±0.5)℃培养,光照周期14 h(光):10 h(暗),每天喂食2次实验饲料,每次喂食持续1.5 h后换水。

实验所用野生型AB系斑马鱼幼鱼获取:将健康野生型AB系雌雄斑马成鱼以2:1比例置于交配盒。次日交配1.5 h后收卵。显微镜下挑出健康的卵置于1×E3培养液中28℃恒温培养,5 d后显微镜下挑选健康斑马鱼幼鱼用于实验。

实验所用转基因Fli1-EGFP斑马鱼幼鱼获取:与野生型斑马鱼配鱼方法相同,受精48 h后(48 hours post fertilization, 48 hpf)的斑马鱼用体视荧光显微镜挑选出血管具有绿色荧光蛋白表达的健康斑马鱼幼鱼置于28℃恒温培养箱中继续培养。将受精5 d后(5 days post fertilization, 5dpf)的健康转基因斑马鱼幼鱼分选出用于实验。

1.2.2 饲料制备

野生型AB系斑马鱼幼鱼饲料配制:将新鲜鸡蛋煮熟,取出蛋黄,压碎分装进50 mL离心管中,冷冻干燥器处理3 d得到蛋黄干粉,在干粉中添加胆固醇制作胆固醇添加百分比分别为2.5%、5.0%、7.5%、10.0%和12.5%的高胆固醇饲料(high cholesterol diet, HCD),纯蛋黄干粉为普通饲料,乙醚为助溶剂。高胆固醇饲料和普通饲料都经过乙醚挥发处理。

转基因Fli1-EGFP斑马鱼幼鱼饲料配制:与野生型AB系斑马鱼幼鱼饲料配制过程基本一致,但需要在普通饲料和高胆固醇饲料中加入胆固醇示踪剂荧光胆固醇酯类似物cholesteryl bodipy 524/563 C11,比例为10 μg/g,此试剂标记了荧光物质DiI,在荧光显微镜下可以激发红色荧光追踪血管中胆固醇。避光下通风处理20 h使乙醚完全挥发。

1.2.3 共聚焦或体视荧光显微镜实时观察

5dpf转基因斑马鱼幼鱼在连续喂养10 d后,用甲基纤维素凝胶将普通饲料喂养组或高胆固醇饮食模型组中的斑马鱼侧面平直固定在载玻片上,共聚焦或体视荧光显微镜对幼鱼尾部进行实时观察和图像采集,用Image J软件/蔡司ZEN分析软件对特定尾部动脉感兴趣区的红色荧光光密度进行数据处理。用蔡司ZEN分析软件测量体长体宽。体长是从斑马鱼幼鱼吻端到尾鳍基部的长度,体宽是垂直于后部主要静脉且泄殖腔之前第4至第5体节位置从背部顶端到主要静脉下方的宽度。

1.2.4 生化指标检测

5 dpf野生型AB系斑马鱼幼鱼在连续喂养10 d,空腹36 h后收样,将其保存在-80℃超低温冰箱直

至使用时取出。组织样本处理方法:每条幼鱼重量以1 mg 计算,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例加入生理盐水,冰水匀浆液于2 500 r/min 离心10 min,取上清液,用于总胆固醇(total cholesterol,TC)、总甘油三酯(total triglyceride, TG)及低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的测定。取上清液稀释成1%匀浆组织用来检测各样品的总蛋白量,用于生化指标的标准化。

1.3 统计学方法

所有结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 22.0对数据进行处理分析,绘图软件使用GraphPad Prism 5。Kolmogorov-Smimov 和 Levene 方法检验所有数据的正态分布和方差齐性,单因素方差分析进行统计学分析,LSD 检验其显著性水平, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

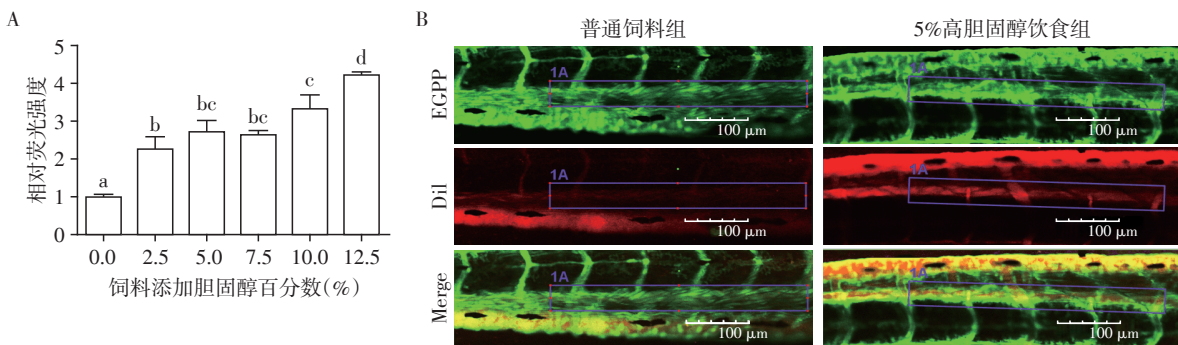
2.1 饲料中胆固醇百分比对斑马鱼幼鱼体内血管脂质水平的影响

本实验中健康的5 dpf转基因Fli1-EGFP斑马鱼

幼鱼随机分为普通饲料组(胆固醇0%)和高胆固醇饮食(2.5%、5.0%、7.5%、10%和12.5%)组,每组30尾鱼,70 mL 1×E3培养,每次喂食30 mg,每天喂食2次。在连续喂养10 d后利用共聚焦荧光显微镜对幼鱼尾部动脉血管感兴趣区实时观察并采集图像。如图1A所示,数据来自于共聚焦图像处理,表示为高胆固醇饮食组(2.5%、5.0%、7.5%、10%和12.5%)和普通饲料组(胆固醇0%)幼鱼尾部动脉血管感兴趣区红色荧光强度平均值的比值,反映了血管脂质沉积量;结果显示,与普通饲料组相比,高胆固醇饮食组荧光强度的相对值均显著增加($P < 0.05$),且随着高胆固醇饲料中添加的胆固醇比例的增加,荧光强度也随之增加,表明饲料中胆固醇百分比与斑马鱼体内血管脂质积累量呈正相关。图1B为普通饲料对照组(0%)和5%高胆固醇饮食组(5%)的共聚焦显微镜图像。

2.2 饲料投喂量改变对斑马鱼幼鱼体内血管脂质水平影响

本实验中,5 dpf斑马鱼幼鱼随机分为6组,每组30尾鱼,每组分别每次饲喂胆固醇的添加百分比为



A: Fli1-EGFP斑马鱼幼鱼在添加不同百分比的胆固醇(2.5%、5.0%、7.5%、10%和12.5%)饲料下饲养10 d后,感兴趣区内红色荧光强度平均值对普通饲料组的相对值;B:普通饲料组(0%)和5%高胆固醇饮食组(5%)的共聚焦显微镜图像($\times 100$)。a、b、c表示显著性水平差异性,字母相同表示各组之间 $P > 0.05$,字母不同表示各组之间 $P < 0.05$ 。

图1 转基因Fli1-EGFP斑马鱼幼鱼尾部血管脂质沉积情况

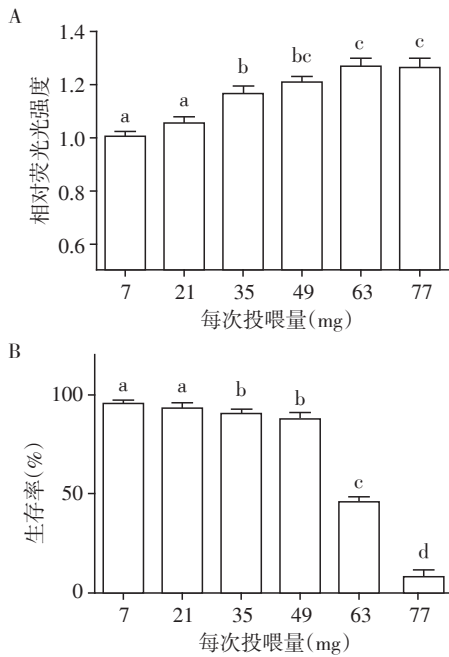
Figure 1 The caudal vascular lipid deposition in transgenic Fli1-EGFP zebrafish larvae

5%的高胆固醇饲料7、21、35、49、63和77 mg,每天喂食2次,70 mL 1×E3培养。图2A为喂养1 d后不同的高胆固醇饲料投喂量的幼鱼尾部动脉血管感兴趣区红色荧光强度平均值与最低投喂量(7 mg)组的比值。图2B为喂养10 d后各投喂量组的生存率。由图可知,随着高胆固醇饲料投喂量的增加,幼鱼尾部动脉血管感兴趣区红色荧光强度的相对值先明显增加后趋于稳定,且高投喂量(35、49、63和77 mg)组明显高于低投喂量组(7和21 mg)($P < 0.05$),但高投喂量组(49、63和77 mg)之间无显著性

差异($P > 0.05$)。同时,高胆固醇饲料投喂量越大生存率越小,且投喂量大于49 mg后,增加投喂量会显著降低斑马鱼幼鱼的生存率($P < 0.05$)。结果表明,增加高胆固醇饲料投喂量会加快斑马鱼幼鱼血管脂质积累,但投喂量过高会影响其生存率。

2.3 高胆固醇饮食对幼鱼体长、体宽的影响

本实验中健康的5 dpf野生型AB系斑马鱼幼鱼随机分为普通饲料组和5%胆固醇添加的高胆固醇饮食组,每次投喂30 mg。图3A为普通饲料组和高胆固醇饮食组幼鱼的平均体长。与普通饲料组幼



A: 5 dpf 转基因 Fli1-EGFP 斑马鱼幼鱼经 5% 的高胆固醇饲料不同投喂量 (7、21、35、49、63 和 77 mg) 喂养 1 d 后, 与最低投喂量 (7 mg) 相比, 感兴趣区 (如图 1B) 内红色荧光强度的相对值; B: 斑马鱼幼鱼经 5% 的高胆固醇饲料不同投喂量 (7、21、35、49、63 和 77 mg) 喂养 10 d 后的生存率。a、b、c 表示显著性水平差异性, 字母相同表示各组之间 $P > 0.05$, 字母不同表示各组之间 $P < 0.05$ 。

图2 饲料投喂量对斑马鱼幼鱼血管脂质沉积和生存率的影响
Figure 2 Effects of feeding amount on vascular lipid deposition and survival in zebrafish larvae

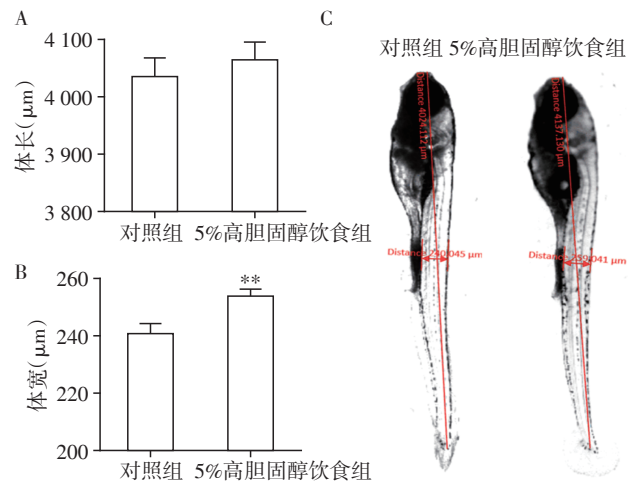
鱼相比, 高胆固醇饮食组体长有所增加, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。图 3B 为普通饲料组和高胆固醇饮食组幼鱼的平均体宽, 高胆固醇饮食组体宽显著高于普通饲料组 ($P < 0.01$)。以上结果表明高胆固醇饮食可以促进斑马鱼幼鱼侧面生长, 但对体长无明显影响。

2.4 5%高胆固醇饮食对幼鱼体内生化指标的影响

5 dpf 野生型 AB 系斑马鱼幼鱼经连续喂养 10 d, 每次投喂 30 mg, 检测幼鱼整体组织中的 TC、TG 和 LDL-C 水平, 并以总蛋白进行标准化 (图 4), 结果显示, 高胆固醇饮食组幼鱼组织中 TC 和 TG 水平显著高于普通饲料组 ($P < 0.01$), LDL-C 水平也显著高于普通饲料组 ($P < 0.05$)。结果表明高胆固醇饮食可以促进幼鱼体内脂质水平显著升高。

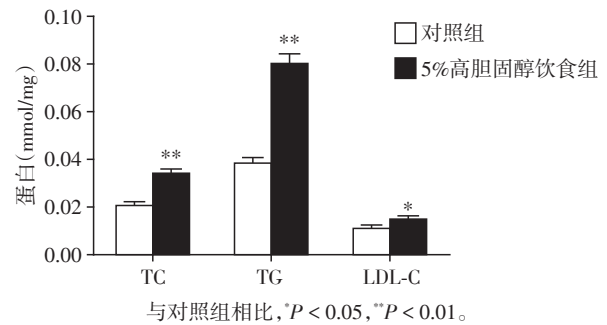
3 讨论

建立高脂血症模型可用的动物有很多, 最常用的模式动物是鼠和兔。鼠应用广泛, 易获取、易饲养、生理结构与人类极为相似。朱磊等^[6]通过向 SD 大鼠喂食不同配方的高脂饲料以确认肥胖模型建



5 dpf 野生型 AB 系斑马鱼幼鱼经连续喂养 10 天后对照组 (0%) 和 5% 胆固醇模型组的体长 (A) 和体宽 (B) 比较 ($n=15$), 测量方法如图 C ($\times 10$)。与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图3 高胆固醇饮食对幼鱼体长、体宽的影响
Figure 3 Effects of high cholesterol diet on body length and body width of zebrafish larvae



与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图4 高胆固醇饮食对斑马鱼幼鱼 TC、TG 和 LDL-C 的影响
Figure 4 Effects of high cholesterol diet on TC, TG, and LDL-C in zebrafish larvae

立的最佳方法, 最终认为 45% 脂供能高脂饲料喂食 6 周是最经济的建模方案。陈剑峰等^[7]在高脂饲料中添加膨润土提高高脂饲料的硬度和可食性, 证明了喂养 8 周后膨润土高脂饲料诱导 SD 大鼠高脂血症更优于普通高脂饲料组。

兔为草食性动物, 对高脂饮食非常敏感, 也是研究者们建立高脂模型偏爱的对象。由于饲料的配方和饲养的方法不同, 建模时间长短也因人而异。游晓庆等^[8]认为新西兰兔经高脂膳食诱导 6 周可成功建立高脂模型, 而吴缜宏等^[9]利用健康雄性新西兰白兔经自配高脂饲料喂养 5 周建立了高脂模型。

鼠、兔在高脂模型建立方面各有独特的优势, 但其避免不了周期长、成本高、不易活体观察和大规模实验的劣势, 新型模式生物斑马鱼则因产卵

量大、发育迅速、胚胎及幼鱼透明适合大规模实验而弥补了它们的不足^[16-17]。本研究建立斑马鱼高脂模型思路设计主要来自于Stoletov^[12]、王泽民^[14]和李春启等的研究。Stoletov等^[12]在斑马鱼幼鱼高脂模型建立过程中主要采用向人工卤虫中添加不同百分比的胆固醇制作高胆固醇饲料, 喂养10 d后4%以上胆固醇添加量建模成功; 与该实验相比, 本研究主要采用向纯蛋黄干粉中添加5%胆固醇制作高脂饲料, 纯蛋黄干粉作为普通饲料, 连续喂养10 d后发现5%胆固醇添加量可极显著促进血管脂质积累。此外, 纯蛋黄干粉相比卤虫更易获得, 成本更低, 操作也更容易。李春启等^[15]的研究是通过给斑马鱼喂食不同剂量浓度的纯蛋黄干粉建立斑马鱼高脂血症模型, 但喂养量过高不利于斑马鱼幼鱼的健康生存, 而本研究是在蛋黄干粉基础之上增加饲料中胆固醇的含量作为高脂饲料, 可以在相对低的饲料喂养量情况下达到同等效果。本研究饲料配制方法借鉴于王泽民等学者^[14], 但在其基础之上改变了饲料中胆固醇百分比。

与国内外^[12, 14]高脂模型建立方法相比, 本研究探索出了一套专门适合于斑马鱼高脂模型的建立方法。高脂饲料是高脂模型建立常用食物, 对于哺乳动物和鸟类动物而言只要对其长时间进行高脂饲料喂食, 高脂模型便会在一定时期内建立成功, 并且实验期间并不会严重影响其生命活动。而斑马鱼幼鱼体型小生命脆弱, 且生活在食物的水环境中, 食物的投喂量和喂食时间均有可能影响幼鱼的健康生长。而本研究从饲料胆固醇百分比含量和投喂量两方面做了探究, 并且限定了投喂时间, 形成了一套稳定可靠简便的方法, 以上凸显出本研究中建立的高脂血症模型斑马鱼的优势。

本研究证实, 增加饲料中胆固醇百分比可引起幼鱼血脂升高, 并且适量增加投喂量可以加快幼鱼血管脂质沉积; 5%高胆固醇饮食模型组在70 mL培养皿中每次喂养30 mg, 喂养10 d可成功建立成高脂血症斑马鱼模型。

[参考文献]

- [1] Bozkurt B, Aguilar D, Deswal A, et al. Contributory risk and management of comorbidities of hypertension, obesity, diabetes mellitus, hyperlipidemia, and metabolic syndrome in chronic heart failure: a scientific statement from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016, 134(23):e535-e578
- [2] Egan BM, Li J, White K, et al. 2013 ACC/AHA cholesterol guideline and implications for healthy people 2020 cardiovascular disease prevention goals [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(8):e003558
- [3] 叶振南, 李楠, 盛丹丹, 等. 青钱柳多糖对高脂血症大鼠血脂及抗脂质过氧化作用的影响 [J]. *现代食品科技*, 2014, 30(4):1-5, 20
- [4] Khan TJ, Ahmed YM, Zamzami MA, et al. Effect of atorvastatin on the gut microbiota of high fat diet-induced hypercholesterolemic rats [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):662
- [5] Sharma MS, Choudhary PR. Effect of fenugreek seeds powder (*Trigonella foenum-graecum* L.) on experimental induced hyperlipidemia in rabbits [J]. *J Diet Suppl*, 2017, 14(1):8
- [6] 朱磊, 路瑛丽, 冯连世, 等. 不同配方高脂饲料构建SD大鼠肥胖模型的实验研究 [J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 35(7):642-647
- [7] 陈剑峰, 万勇. 不同配方高脂饲料构建高脂血症大鼠模型的比较及评价 [J]. *实验动物科学*, 2018, 35(1):30-34
- [8] 游晓庆, 吴春芳, 骆凯, 等. 高脂膳食诱导新西兰兔高脂血症模型的研究 [J]. *中国保健营养*, 2016, 26(17):414-415
- [9] 吴韞宏, 方显明. 家兔实验性高脂血症模型的研究 [J]. *广西中医药大学学报*, 2004, 7(2):1-2
- [10] Martín-Castillo A, Castells MT, Adán G, et al. Effect of atorvastatin and diet on non-alcoholic fatty liver disease activity score in hyperlipidemic chickens [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(4):275-281
- [11] 方斌. ApoE基因敲除巴马猪动脉粥样硬化模型的建立及表型分析 [D]. 南京: 南京医科大学, 2018
- [12] Stoletov K, Fang L, Choi SH, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish [J]. *Circ Res*, 2009, 104(8):952-960
- [13] 韩冰. 斑马鱼高脂模型的建立及小檗胺降血脂机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2016
- [14] 王泽民. 高糖高脂导致的斑马鱼血管病变 [D]. 山东: 山东大学医学院, 2014
- [15] 李春启, 陈汝家, 郭胜亚, 等. 一种斑马鱼高脂血症模型的建立方法及其应用: CN, CN102907357A [P]. 2013
- [16] 李德利, 黄梦圆, 魏丽圆, 等. KLF7b对斑马鱼胚胎发育的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(5):605-611
- [17] 李楠, 张昕, 史春梅, 等. 斑马鱼胚胎发育过程中内源性多肽的表达及与眼发育的相关研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(2):161-165

[收稿日期] 2019-02-01