

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00889

斑马鱼血液肿瘤学的研究进展

张勇¹, 陈芳源¹, 邓敏²

1. 上海交通大学医学院附属仁济医院血液科 上海血液学研究所白血病研究室, 上海 200127;
2. 中国科学院上海生命科学院健康科学研究所发育和疾病实验室, 上海 200025

摘要: 斑马鱼已经成为当今人类遗传学和血液学研究的重要模式生物之一。文章介绍了斑马鱼造血系统的基本生物学特征, 并重点阐述了斑马鱼在血液肿瘤学领域的应用和研究概况, 显示了斑马鱼在血液肿瘤学的基础和临床研究方面均有着独特的应用前景, 文章对此进行了展望。

关键词: 斑马鱼; 血液肿瘤学; 动物模型

Research progress of zebrafish as a model system for hematological neoplasms

ZHANG Yong¹, CHEN Fang-Yuan¹, DENG Min²

1. Department of Hematology, RenJi Hospital and Laboratory of Leukemia, Shanghai Institute of Hematology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China;
2. Laboratory of Development and Diseases, Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China

Abstract: Zebrafish is becoming a powerful vertebrate model for studies of human genetics and hematology. The biological characteristics of zebrafish organism, as well as its potential model for human blood developmental biology and hematologic malignancies are discussed. At last, we discussed the prospects of zebrafish in the clinical and basic research of hematological neoplasms.

Keywords: zebrafish; hematologic neoplasms; animal models

斑马鱼(Zebrafish, *Danio rerio*)是近年来新兴发展起来用于研究脊椎动物发育遗传学的一种模式生物, 其创始人是美国Oregon大学已故的著名遗传学家George Streisinger。斑马鱼成鱼长 3~4 cm, 常年产卵, 一次交配能获得数百个胚胎, 鱼卵易收集, 生殖一代的周期为 2~3 个月。作为遗传学和发育生物学研究的一种重要模式动物, 其显著优势在于[1]: 胚胎在发育早期透明, 易于观察和操作; 胚胎在体

外受精, 发育过程可被直接连续观察; 单倍体、雌核发育二倍体的制作和突变体的获得均较容易; 斑马鱼基因组测序已完成, 可以方便地进行大规模的诱变和突变型筛选等研究。而在小鼠模型中这些基因的突变或剔除则会导致胚胎致死而无法及时观察到表型, 不适合大规模的诱变和筛选; 与线虫和果蝇模式生物相比, 虽然后者也可用于大规模筛选, 但不能阐明脊椎动物特异的组织如肾脏、心脏、神

收稿日期: 2008-08-27; 修回日期: 2009-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30670881), 上海市科委基金项目(编号: 08JC1414900)资助

作者简介: 张勇(1981-), 男, 博士, 研究方向: 白血病转基因斑马鱼系建立及应用。Tel: 021-58752345; E-mail: zhangyong27010@163.com

通讯作者: 陈芳源(1962-), 女, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 白血病发病机制及个体化治疗研究。Tel: 021-58752345;

E-mail: Chenfy04@yahoo.com.cn

经和血液系统的发育和功能。因此利用斑马鱼作为人类疾病的动物模型,作为连接非脊椎动物(小模式生物体)和哺乳动物(大模式生物体)的“桥梁”,其独特的生物学、基因组学、遗传学优势及其高度保守的疾病信号转导路径,使其成为以表型驱动的“正向”及“反向”遗传学(Forward and Reverse Genetics)和在基因组规模上研究人类疾病相关病理生理学及在活体内进行先导药物筛选的最佳模式生物之一,具有广阔的生物医学及临床应用前景^[2,3]。本文就斑马鱼在血液肿瘤疾病的模型建立及其应用方面做一综述。

1 斑马鱼造血系统与人类高度保守

脊椎动物在进化过程中造血发育高度保守。在形态学和分子水平上,斑马鱼和哺乳类造血调控网络在长期进化过程中亦高度保守^[4,5]。许多哺乳类造血调控的重要转录因子,如*runx1*、*scl*、*lmo2*、*pu.1*、*c/ebp α* 、*gata1*和*gata2*等,都在斑马鱼中存在直向同源基因,且其调控网络高度保守^[6]。斑马鱼的成年造血组织是肾脏,包括其他造血器官如胸腺和脾脏^[7]。利用原位杂交技术,已确定了造血发育各阶段的相关分子标记物^[8-20]。利用斑马鱼胚胎透明的特点,结合转基因技术,通过造血基因启动子控制下游的增强型绿荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)在特定血液细胞中表达,可直观地观测相应细胞的生物学行为和基因表达谱。相应的转基因系也已建立,如红系(*gata-1*)、髓系(*pu.1*)、中性粒细胞(*mpo*)、T细胞(*lck*)和血小板(*cd41*)转基因系^[20-24]。近年来,斑马鱼已用于人类各类血液疾病的研究,如在大规模的突变筛选中,有50多个造血缺陷的突变株被确定,对铁代谢、血红素和血红蛋白合成研究提供了重要模型^[6,25,26]。利用斑马鱼对骨髓衰竭综合征如Fanconi贫血发病机制的研究也取得了一定进展^[27],对出凝血系统的研究亦有相关文献报道^[28,29],对于血液系统恶性疾病的研究下文将详细阐述。

2 斑马鱼用于血液恶性肿瘤的研究

2.1 斑马鱼与肿瘤学研究

斑马鱼已成为当今肿瘤研究的重要模式生物^[30,31],

其功能基因组学成为当前的一个研究热点。目前用于斑马鱼肿瘤模型建立的策略主要有:致癌剂处理斑马鱼,如使用亚硝基二乙胺诱导肝癌和胰腺癌或采用亚硝基二甲胺诱导肝癌发生^[32];体内移植哺乳动物肿瘤细胞系,结合斑马鱼胚胎透明的特点,可实时观察肿瘤细胞浸润转移以及生成新生血管的动态过程^[33];正向遗传筛选如采用反转录病毒介导的大规模插入突变策略或ENU(N-ethyl-N-nitrosourea, N-乙基-N-亚硝基脲)突变技术,突变某些与细胞增殖及基因组不稳定的相关基因,从突变体库中选择具有类似于某些人类肿瘤疾病的突变体鱼进行疾病研究和药物筛选;反向遗传学如通过转基因技术操纵已知基因的过表达,利用斑马鱼胚胎透明的特点,构建GFP和癌基因的融合蛋白,通过启动子控制从而观察目的癌基因的功能和表型特点^[2]。一些实体瘤的斑马鱼模型已被建立,如黑色素瘤^[34-36]、胰腺癌^[37,38]、肝癌^[39,40]、结肠癌^[41]、恶性神经鞘瘤^[42]等。在斑马鱼中已经建立了几乎包含所有人类肿瘤类型的模型,具有与人类肿瘤发生的相关形态学、基因表达谱以及肿瘤信号传导路径的相似性。

2.2 斑马鱼与血液恶性肿瘤模型

目前已知的与血液恶性肿瘤发生密切相关的许多转录因子基因在进化过程中相当保守,与斑马鱼等模式动物中控制胚胎发育的基因具有很高的同源性,提示它们在早期细胞发育中的相关性,如AML1^[43,44]、HOX家族^[45,46]等;另外哺乳类中很多癌基因和抑癌基因,在斑马鱼中均存在直向同源基因,且它们的蛋白氨基酸序列及功能保守,如Myc、Ras、Notch家族成员、 β -catenin、p53、Mdm2、Bcl-2、Bcl-xL和CTNNA1等^[27,47,48]。斑马鱼的基因特点使它可以成为一种很好的人类血液肿瘤模型,从而提高人们对血液肿瘤细胞增殖分化、凋亡和治疗机制的理解。目前血液系统恶性疾病模型的建立主要为转基因技术,如通过启动子控制目的癌基因在特定造血细胞的表达来建立,其他如通过一过性注射癌基因mRNA, morpholino(修饰的反义寡核苷酸)“knock-down”技术或者ENU突变技术,从突变体库中选择具有类似于某些人类血液肿瘤疾病的突变体鱼进行疾病研究。

2.2.1 斑马鱼淋巴细胞白血病模型建立

Langenau等^[49]用斑马鱼T淋巴细胞特异的Rag2

启动子驱动鼠源性的*c-myc*基因(该基因对白血病和淋巴瘤的发生有着重要作用,其末端连有*EGFP*报告基因),通过显微注射到一个细胞的斑马鱼胚胎中建立*c-myc*基因的转基因系。Langenau等^[49]的结果表明大约出生 22 天后,所有携带*myc*基因的转基因斑马鱼都会产生白血病。由于斑马鱼的表皮透明,研究者可以实时观察到带有绿色荧光的白血病细胞的发生和扩散情况:它们首先出现在胸腺,随后逐渐扩散到胸腺附近组织,再进一步扩散至骨骼肌和腹腔内器官,并可扩散至脑部,流式细胞仪分选绿色白血病细胞并鉴定其为T细胞源性。将这些绿色的白血病细胞注射到亚致死剂量射线照射的野生型斑马鱼腹腔,2周后可看到绿色的白血病细胞扩散至整个腹腔,从而建立起T淋巴细胞白血病模型^[49]。

在人类急性T细胞白血病(T-ALL)中最常见的突变为*NOTCH1*的突变,见于约 60%的T-ALL患者中,在小鼠的造血前体细胞中表达截短的人*NOTCH1*胞内功能域(ICN1,氨基酸序列:1762-2555)可导致T淋巴细胞白血病的发生^[50]。Chen等^[51]用T淋巴细胞特异的Rag2启动子驱动人*NOTCH1*胞内功能域(ICN1,其末端连接有*EGFP*),将其注射入斑马鱼胚胎中,5个月后长大的F₀嵌合体中有 7 条发生了白血病,绿色的荧光细胞起源于胸腺并向周围组织如鳍部扩散,进一步扩散至肌肉和皮下脂肪组织,最终这些白血病细胞浸润至肾脏和脾脏并导致白血病斑马鱼的死亡。经流式细胞仪分选鉴定这些白血病细胞也为T细胞源性,并可在经射线照射处理的野生型斑马鱼中扩散。与*c-myc*转基因鱼T白血病细胞高表达*tal1/scl*和*lmo2*不同的是,*NOTCH1*转基因鱼T白血病细胞并不高表达这些癌基因/转录因子,提示这些T淋巴细胞白血病的发生是受不同的机制控制的;当转有*ICN1-EGFP*的转基因鱼与Rag2启动子驱动的*Bcl-2*转基因鱼交配后产生的双转基因鱼能够显著加速白血病的发生,提示*NOTCH1*路径和*Bcl-2*抗凋亡路径能够协同作用导致白血病的发生^[51]。

上述两个斑马鱼T淋巴细胞白血病模型不仅有利于实时观测白血病细胞的发生发展和转移,并且能够分析不同癌基因下游影响的病理生理信号路径,同时通过观测绿色细胞的消减,还能够更快速直接地检验药物对于治疗这种疾病的效果。由于*myc*和*NOTCH1*导致的白血病属于人类T细胞白血病中的

两种难治亚型,故该模型有助于理解人类T细胞白血病发生的分子基础和筛选针对特定分子的靶向治疗药物。

人类急性淋巴细胞白血病中最常见是t(12; 21)(p13; q22)染色体易位,形成*TEL-AML1*融合基因,而阻断野生型*TEL*基因的生长抑制作用,同时该融合基因可以抑制野生型*AML1*基因的诱导分化活性,而导致前体B淋巴细胞急性白血病的发生^[52]。Hattem等^[53]用斑马鱼广泛表达的β-actin的启动子或T/B淋巴细胞特异的Rag2启动子驱动人*TEL-AML1*融合基因(末端连接有*EGFP*)广泛表达或特定在淋巴前体细胞中表达,结果在β-actin的启动子驱动广泛表达*TEL-AML1*的转基因斑马鱼中有 6%的鱼在出生后约 4 周发生了淋巴组织低增生状态且呈分化阻滞特性,外周血中未成熟幼稚淋巴细胞增多(10%~15%),肾脏切片中未成熟幼稚淋巴细胞亦增多,这些鱼外观呈恶液质状态和广泛的全身出血。随着生长过程,3%的转基因鱼在出生后 8~12 个月发生了白血病,这些发病的鱼呈明显恶液质状态和广泛的全身出血,其外周血中有 92%~98%的未成熟幼稚淋巴细胞,肾脏组织中未成熟幼稚淋巴细胞大量增多,并向周围组织如肝脏、卵巢、肌肉和脑部浸润,经流式细胞仪分选,RT-PCR鉴定这些白血病细胞为B细胞源性。将这些白血病细胞移植到射线照射的野生斑马鱼中,结果 6~9 周后这些鱼亦发生了同样性质的B淋巴细胞白血病。分析这些白血病细胞的基因表达谱,发现其与儿童CD10⁺前B淋巴细胞白血病类似,内源性*TEL*表达几乎消失而*Bcl2/Bax*比例增加,其他如*INK4*、*pRB*等抑癌基因的下调等。此斑马鱼模型提供了*TEL-AML1*融合基因的多步骤发病机制,首先产生白血病前期克隆即前B细胞的分化阻滞,当基因突变逐渐积累或表观遗传学发生改变后,这些白血病前期克隆增殖增加或凋亡减少,乃至获得了无限制的自我更新能力从而形成了白血病干细胞克隆,导致白血病的发生。因此,此斑马鱼模型有助于加深我们对白血病发生过程的认识,并有助于了解*TEL-AML1*融合基因发病的分子机制和筛选针对特定分子的治疗药物^[53]。

2.2.2 斑马鱼髓细胞白血病模型建立

急性髓细胞白血病中t(8; 21)是一种最常见的染

染色体易位, 它累及 21 号染色体的 *AML1* 基因和 8 号染色体的 *ETO* 基因, 产生 *AML1-ETO* 融合蛋白。该融合蛋白主要通过抑制 *AML1* 靶基因的活化, 干扰造血干细胞正常的增殖与分化, 从而促进白血病发生。Kalev-Zylinska 等^[54] 将人 *AML1-ETO* 融合基因的 mRNA 一过性注射到一个细胞期的斑马鱼胚胎中, 导致了胚胎造血发育缺陷, 循环血流减少, 脑组织和心包周围出血; 这些胚胎的后部造血岛有大量的非成熟造血前体细胞积聚。这些表型与 *AML1-ETO* 转基因小鼠发病的表型类似^[55], 有助于加深对 t(8; 21) 的 M2b 白血病发病机制的认识。

2.2.3 斑马鱼条件性白血病转基因模型建立

传统的转基因技术不能定时地表达基因, 而转有癌基因的斑马鱼通常在性成熟前就已经发病, 直接导致转基因系不能长久维持下去, 势必会给小分子化合物的药物筛选及后续的利用突变体筛选特定白血病发病中相关癌基因/抑癌基因带来麻烦。因此, 为了充分挖掘斑马鱼作为人类疾病模型的优势, 条件性的转基因策略如 Cre/loxP、Gal4-UAS 系统已在斑马鱼中初步建立^[56, 57], 在特定条件下才会条件性地表达目的基因, 使得转有癌基因的斑马鱼系能持久传代下去。其中 Cre 是位点特异性重组所需的特异性重组酶, 其识别位点为 loxP, Cre 可将两个 loxP 位点之间的序列切除, 从而达到对基因表达的调控^[58], 另外利用热休克 70 蛋白 (hsp70) 启动子控制下游 Cre 表达, 通过热敏效应达到时间特异性地控制 Cre 蛋白的表达, 可达到定时定位地控制癌基因的表达^[59]。Langenau 等^[60] 在 Rag2 启动子与 *EGFP-mMyc* 基因之间插入 *loxP-dsRED2-loxP* 形成 *Rag2-(loxP-dsRED2-stop-loxP)-(EGFP-mMyc)*, 并将其显微注射获得转基因系。这些转基因鱼产生的胚胎其淋系表达红荧光蛋白, 由于两个 loxP 位点之间的终止序列存在, 故不表达 *myc* 并能够正常生存; 而当将体外转录的 Cre mRNA 注射到转基因鱼产生的一个细胞期的胚胎中后, 由于 Cre 可将两个 loxP 位点之间的终止序列切除, Rag2 启动子驱动 *myc* 的表达, 形成与上文一致的 T 细胞白血病, 并能使转基因鱼一直传代下去。

RAS 家族基因的活化突变在骨髓增殖性疾病 (Myeloproliferative disease, MPD) 和急性单核细胞白

血病中较为常见^[61]。Le 等^[62] 建立了人类 *k-RAS* 基因 *G12D* 活化点突变 (*kRASG12D*) 的条件性转基因斑马鱼, 他们用斑马鱼 β -actin 的启动子驱动 (*loxP-EGFP-stop-loxP*)-(*kRASG12D*) 的表达, 当与 hsp70 启动子驱动的 Cre 转基因鱼交配后, 双转基因的胚胎在 37 °C 被热激 1 h 后产生 Cre 重组酶的表达, (*loxP-EGFP-stop-loxP*) 被切除导致 *kRASG12D* 的表达, 大约热激 25 d 后一部分发育中的胚胎死亡, 剩余的胚胎大部分发生了横纹肌肉瘤。由于 *hsp70-Cre* 转基因鱼在没有热休克的应激情况下也可有少量 Cre 的表达, 因此没有热激的双转基因胚胎也可少量表达 *kRASG12D*, 并在出生后 66 d 左右大约 8% 的斑马鱼发生了 MPD, 其病理表现与人类骨髓增殖性疾病类似, 表现为肾脏中髓系细胞的增殖, 粒系和单核系被阻滞于各个阶段; 将双转基因成鱼的肾脏取出, 然后在体外热激, 并将其移植入亚致死剂量照射的野生型斑马鱼后, 这些受体鱼也发生了 MPD, 因此该条件性的 MPD 转基因斑马鱼模型将有助于发现促使 MPD 向 AML 转化的新的分子机制^[62]。

2.2.4 ENU 前向遗传学筛选与斑马鱼血液肿瘤模型建立

正向遗传筛选如 ENU 大规模突变技术, 可从突变体库中选择具有类似于某些人类血液肿瘤疾病的突变体鱼进行疾病发病机制研究和药物筛选。Sarah 等^[63] 通过 ENU 化学诱导突变筛选到了一个斑马鱼造血缺陷突变株 (*crs*), 表现为骨髓增生异常综合征 (MDS) 的无效造血表型, 如贫血和全血细胞减少, 造血细胞发育异常且凋亡增加。通过定位克隆, mRNA 解救及 morpholino “knock-down” 技术确定导致该突变株的基因为 *hsps9b*, 定位于斑马鱼 14 号染色体 z43267 和 z26376 之间, 在人类中其直向同源物 *HSPA9B* 是位于人类 MDS 5q31 关键缺失区中的一个基因, 编码线粒体基质伴侣蛋白, 参与线粒体中氧化磷酸化的转运, 代谢和减少活性氧自由基 (ROS) 的过程, 突变的 *hsps9b* 导致造血细胞中线粒体功能受损, 活性氧自由基压力增加, 造血干祖细胞凋亡增加且发育异常从而导致了 MDS 的症状。该模型有助于我们理解 MDS 发生的多步骤发病机制: 造血细胞中 DNA 的损伤 (*hsps9b*) 并暴露于有毒物质 (ROS), 可逐渐导致细胞遗传学的改变, 出现异常克隆并可

向白血病干细胞转化^[63]。

2.3 斑马鱼血液恶性肿瘤模型在临床治疗方面的价值

综上所述, 斑马鱼已成为良好的血液肿瘤学模型, 在这些模型基础上进行其独特的正向遗传学筛选影响肿瘤进程的特定疾病相关基因, 如影响肿瘤的发生、细胞特异性、疾病进展速度和肿瘤转移过程等的基因, 进而寻找抑制肿瘤的相关机制, 从而加深对血液肿瘤治疗的认识。另外也可通过大规模的小分子化合物筛选针对特定血液肿瘤疾病基因如 *myc*、*RAS*、*TEL-AML1* 等治疗药物, 通过直接观测绿色白血病细胞的消减, 从而高通量筛选诸如格列卫(Gleevec)这样的靶向药物, 更好地治疗血液肿瘤疾病^[64, 65]。

斑马鱼业已成为临床造血干细胞移植(Hematopoietic cell transplantation, HCT)治疗白血病的良好可示踪模型, Traver等^[66]将发病的转*myc*基因的T淋巴细胞白血病斑马鱼进行亚致死剂量的 γ 射线照射, 并将野生型斑马鱼的肾脏造血干细胞移植入这些鱼体内, 由于移植的造血细胞带有荧光, 故可方便实时观测到整个造血重建的过程, 并可看到白血病发病鱼的淋巴组织由移植的造血细胞重建, 从而模拟了人类的骨髓移植治疗白血病的过程。由于斑马鱼通体透明, 结合利用荧光转基因技术, 有助于示踪移植后的造血干细胞的生物学行为; 同时荧光标记的斑马鱼转基因免疫细胞如巨噬细胞/树突状细胞, 将有助于我们理解骨髓移植过程中移植抗白血病(GVL)/移植抗宿主病(GVHD)发生发展的确切机制, 更好地促进血液肿瘤治疗学的进展。

3 展望

研究疾病信号传导路径及发现对其有修饰作用的基因或药物, 已成为生命科学界在后基因组时代的主导研究领域, 而斑马鱼作为新兴人类疾病脊椎动物模式生物和高效的“生物反应器”, 其独特的生物学优势顺应了时代的要求。活体高通量药物筛选(Whole-animal high throughput screen, W-HTS)是目前国际上日益受到重视的药物筛选平台。由于斑马鱼造血发育调控网络和血液肿瘤信号转导路径与人类高度保守, 可以预见: 筛选对斑马鱼恶性血液肿

瘤有治疗作用的小分子化合物或中医中草药(Traditional chinese medicine, TCM), 将为与血液肿瘤发生发展密切相关的临床治疗提供先导候选药物, 同时基于斑马鱼疾病模型的正向遗传筛选以及活体可示踪造血干细胞移植研究也将为血液肿瘤的治疗发展提供前所未有的动力。

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.
- [2] Zon LI. Zebrafish: a new model for human disease. *Genome Res*, 1999, 9(2): 99-100.
- [3] Shin JT, Fishman MC. From Zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2002, 3: 311-340.
- [4] Orkin SH. Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol*, 1995, 7(6): 870-877.
- [5] Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*, 2003, 53: 139-158.
- [6] North TE, Zon LI. Modeling human hematopoietic and cardiovascular diseases in zebrafish. *Dev Dyn*, 2003, 228(3): 568-583.
- [7] Hsu K, Kanki JP, Look AT. Zebrafish myelopoiesis and blood cell development. *Curr Opin Hematol*, 2001, 8(4): 245-251.
- [8] Burns CE, DeBlasio T, Zhou Y, Zhang J, Zon L, Nimer SD. Isolation and characterization of runxa and runxb, zebrafish members of the runt family of transcriptional regulators. *Exp Hematol*, 2002, 30(12): 1381-1389.
- [9] Gering M, Rodaway AR, Göttgens B, Patient RK, Green AR. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J*, 1998, 17(14): 4029-4045.
- [10] Gering M, Yamada Y, Rabbitts TH, Patient RK. Lmo2 and Scl/Tal1 convert non-axial mesoderm into haemangioblasts which differentiate into endothelial cells in the absence of Gata1. *Development*, 2003, 130(25): 6187-6199.
- [11] Liao W, Ho CY, Yan YL, Postlethwait J, Stainier DY. Hhex and scl function in parallel to regulate early endothelial and blood differentiation in zebrafish. *Development*, 2000, 127(20): 4303-4313.
- [12] Lieschke GJ, Oates AC, Paw BH, Thompson MA, Hall NE, Ward AC, Ho RK, Zon LI, Layton JE. Zebrafish SPI-1 (PU.1) marks a site of myeloid development independent of primitive erythropoiesis: implications for axial patterning. *Dev Biol*, 2002, 246(2): 274-295.

- [13] Willett CE, Cherry JJ, Steiner LA. Characterization and expression of the recombination activating genes (rag1 and rag2) of zebrafish. *Immunogenetics*, 1997, 45(6): 394–404.
- [14] Willett CE, Zapata AG, Hopkins N, Steiner LA. Expression of zebrafish rag genes during early development identifies the thymus. *Dev Biol*, 1997, 182(2): 331–341.
- [15] Bennett CM, Kanki JP, Rhodes J, Liu TX, Paw BH, Kieran MW, Langenau DM, Delahaye-Brown A, Zon LI, Fleming MD, Look AT. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood*, 2000, 98(3): 643–651.
- [16] Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development*, 1999, 126(7): 3735–3745.
- [17] Parichy DM, Ransom DG, Paw B, Zon LI, Johnson SL. An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 2000, 127(14): 3031–3044.
- [18] Detrich HW 3rd, Kieran MW, Chan FY, Barone LM, Yee K, Rundstadler JA, Pratt S, Ransom D, Zon LI. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(23): 10713–10717.
- [19] Hansen JD, Zapata AG. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunol Rev*, 1998, 166: 199–220.
- [20] Lin HF, Traver D, Zhu H, Dooley K, Paw BH, Zon LI, Handin RI. Analysis of thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish. *Blood*, 2005, 106(12): 3803–3810.
- [21] Long Q, Meng A, Wang H, Jessen JR, Farrell MJ, Lin S. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development*, 1997, 124(20): 4105–4111.
- [22] Hsu K, Traver D, Kutok JL, Hagen A, Liu TX, Paw BH, Rhodes J, Berman JN, Zon LI, Kanki JP, Look AT. The *pu.1* promoter drives myeloid gene expression in zebrafish. *Blood*, 2004, 104(5): 1291–1297.
- [23] Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DM, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MK. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*, 2008, 108(13): 3976–3978.
- [24] Langenau DM, Ferrando AA, Traver D, Kutok JL, Hezel JP, Kanki JP, Zon LI, Look AT, Trede NS. *In vivo* tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(19): 7369–7374.
- [25] Shafizadeh E, Paw BH. Zebrafish as a model of human hematologic disorders. *Curr Opin Hematol*, 2004, 11(4): 255–261.
- [26] Berman J, Hsu K, Look AT. Zebrafish as a model organism for blood diseases. *Br J Haematol*, 2003, 123(4): 568–576.
- [27] Liu TX, Howlett NG, Deng M, Langenau DM, Hsu K, Rhodes J, Kanki JP, D'Andrea AD, Look AT. Knockdown of zebrafish *Fancd2* causes developmental abnormalities via p53-dependent apoptosis. *Dev Cell*, 2003, 5(6): 903–914.
- [28] Jagadeeswaran P. Zebrafish: a tool to study hemostasis and thrombosis. *Curr Opin Hematol*, 2005, 12(2): 149–152.
- [29] Jagadeeswaran P, Gregory M, Day K, Cykowski M, Thattaliyath B. Zebrafish: a genetic model for hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(1): 46–53.
- [30] Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, Zon LI. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*, 2002, 1(3): 229–231.
- [31] Berghmans S, Jette C, Langenau D, Hsu K, Stewart R, Look T, Kanki JP. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Bio Techniques*, 2005, 39(2): 227–237.
- [32] Mizgirev IV, Majorova IG, Gorodinskaya VM, Khudoley VV, Revskoy SY. Carcinogenic effect of N-nitrosodimethylamine on diploid and triploid zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Pathol*, 2004, 32(5): 514–518.
- [33] Stoletov K, Montel V, Lester RD, Gonias SL, Klemke R. High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(44): 17406–17411.
- [34] Topczewska JM, Postovit LM, Margaryan NV, Sam A, Hess AR, Wheaton WW, Nickoloff BJ, Topczewski J, Hendrix MJ. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med*, 2006, 12(8): 925–932.
- [35] Haldi M, Ton C, Seng WL, McGrath P. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*, 2006, 9(3): 139–151.
- [36] Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, Berghmans S, Mayhall EA, Traver D, Fletcher CD, Aster JC, Granter SR, Look AT, Lee C, Fisher DE, Zon LI. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol*, 2005, 15(3): 249–254.
- [37] Yee NS, Pack M. Zebrafish as a model for pancreatic cancer research. *Methods Mol Med*, 2005, 103: 273–298.
- [38] Yang HW, Kutok JL, Lee NH, Piao HY, Fletcher CD, Kanki JP, Look AT. Targeted expression of human MYCN selectively causes pancreatic neuroendocrine tumors in transgenic zebrafish. *Cancer Res*, 2004, 64(20): 7256–7262.
- [39] Lam SH, Gong Z. Modeling liver cancer using zebrafish: a comparative oncogenomics approach. *Cell Cycle*, 2006, 5(6): 573–577.
- [40] Grabher C, Look AT. Fishing for cancer models. *Nat Bio-*

- technol*, 2006, 4(1): 45–46.
- [41] Shelton DN, Sandoval IT, Eisinger A, Chidester S, Ratanayake A, Ireland CM, Jones DA. Up-regulation of CYP26A1 in adenomatous polyposis coli-deficient vertebrates via a WNT-dependent mechanism: implications for intestinal cell differentiation and colon tumor development. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7571–7577.
- [42] Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, Neuberg D, Kutok JL, Fletcher CD, Morris JP, Liu TX, Schulte-Merker S, Kanki JP, Plasterk R, Zon LI, Look AT. tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(2): 407–412.
- [43] Burns CE, Traver D, Mayhall E, Shepard JL, Zon LI. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev*, 2005, 19(19): 2331–2342.
- [44] Nakagawa M, Ichikawa M, Kumano K, Goyama S, Kawazu M, Asai T, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood*, 2006, 108(10): 3329–3334.
- [45] Prince V. The Hox Paradox: More complex(es) than imagined. *Dev Biol*, 2002, 249(1): 1–15.
- [46] Shimizu T, Bae YK, Hibi M. Cdx-Hox code controls competence for responding to Fgfs and retinoic acid in zebrafish neural tissue. *Development*, 2006, 133(23): 4709–4719.
- [47] Langheinrich U, Hennen E, Stott G, Vacun G. Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling. *Curr Biol*, 2002, 12(23): 2023–2028.
- [48] Schreiber-Agus N, Horner J, Torres R, Chiu FC, DePinho RA. Zebra fish myc family and max genes: differential expression and oncogenic activity throughout vertebrate evolution. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(5): 2765–2775.
- [49] Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, Kutok JL, Aster JC, Kanki JP, Lin S, Prochownik E, Trede NS, Zon LI, Look AT. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science*, 2003, 299(5068): 887–890.
- [50] Aster JC, Xu L, Karnell FG, Patriub V, Pui JC, Pear WS. Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(20): 7505–7515.
- [51] Chen J, Jette C, Kanki JP, Aster JC, Look AT, Griffin JD. NOTCH1-induced T-cell leukemia in transgenic zebrafish. *Leukemia*, 2007, 21(3): 462–471.
- [52] Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 2004, 350(15): 1535–1548.
- [53] Sabaawy HE, Azuma M, Embree LJ, Tsai HJ, Starost MF, Hickstein DD. TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(41): 15166–15171.
- [54] Kalev-Zylinska ML, Horsfield JA, Flores MV, Postlethwait JH, Vitas MR, Baas AM, Crosier PS, Crosier KE. Runx1 is required for zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. *Development*, 2002, 129(8): 2015–2030.
- [55] Okuda T, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu CJ, van Deursen JM, Harada H, Downing JR. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood*, 1998, 91(9): 3134–3143.
- [56] Pan X, Wan H, Chia W, Tong Y, Gong Z. Demonstration of site-directed recombination in transgenic zebrafish using the Cre/loxP system. *Transgenic Res*, 2005, 14(2): 217–223.
- [57] Scheer N, Campos-Ortega JA. Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech Dev*, 1999, 80(2): 153–158.
- [58] Kühn R, Torres RM. Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol Biol*, 2002, 180: 175–204.
- [59] Thummel R, Burket CT, Brewer JL, Sarras MP Jr, Li L, Perry M, McDermott JP, Sauer B, Hyde DR, Godwin AR. Cre-mediated site-specific recombination in zebrafish embryos. *Dev Dyn*, 2005, 233(4): 1366–1377.
- [60] Langenau DM, Feng H, Berghmans S, Kanki JP, Kutok JL, Look AT. Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(17): 6068–6073.
- [61] Emanuel PD. Juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Hematol Rep*, 2004, 3(3): 203–209.
- [62] Le X, Langenau DM, Keefe MD, Kutok JL, Neuberg DS, Zon LI. Heat shock-inducible Cre/Lox approaches to induce diverse types of tumors and hyperplasia in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(22): 9410–9415.
- [63] Craven SE, French D, Ye W, de Sauvage F, Rosenthal A. Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2005, 105(9): 3528–3534.
- [64] Stern HM, Zon LI. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(7): 533–539.
- [65] Zon LI, Peterson RT. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(1): 35–44.
- [66] Traver D, Winzeler A, Stern HM, Mayhall EA, Langenau DM, Kutok JL, Look AT, Zon LI. Effects of lethal irradiation in zebrafish and rescue by hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 2004, 104(5): 1298–1305.