



斑马鱼:人类肾脏疾病治疗药物筛选的新工具

汪 玲,陈朝红*

(南京总医院,国家肾脏疾病临床医学研究中心,全军肾脏病研究所,南京 210016)

【摘要】 肾脏疾病的药物治疗是其重要的治疗手段之一,包括激素和免疫抑制剂等。斑马鱼模式动物已被广泛用于多个系统的小分子药物筛选。在肾脏领域,斑马鱼常被用于肾脏疾病相关的基因功能和分子机制研究。近年来,随着多种斑马鱼肾脏疾病模型的建立,利用斑马鱼来发现和验证肾脏疾病的潜在治疗药物是一个新兴的发展方向。本文对斑马鱼在肾脏领域进行小分子药物发现的可行性进行分析,并总结近年来所建立的斑马鱼肾脏疾病模型以及新发现的治疗药物。

【关键词】 肾脏;药物发现;斑马鱼

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018)12-0113-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.019

Zebrafish: A new tool for novel nephrology drug discovery

WANG Ling, CHEN Zhaohong*

(Nanjing General Hospital, National Clinical Research Center of Kidney Diseases,
Research Institute of Nephrology, Nanjing, 210016, China)

【Abstract】 Drugs are among the most important therapeutics for kidney diseases, including glucocorticoids and antirejection agents. Zebrafish is widely used for chemical screening and analyses of gene mutagenesis and molecular mechanisms of the pathogenesis of kidney diseases. Recently, several models of kidney disease have been established in zebrafish, providing the potential to identify and verify novel renoprotective drugs. Here, we discuss the feasibility of zebrafish for small-molecular drug screening in nephrology and summarize kidney disease models in zebrafish as well as new drugs for kidney diseases.

【Keywords】 kidney; drug discovery; zebrafish

近年来,基于斑马鱼模型的药物筛选发展迅速。而在肾领域,利用斑马鱼进行药物实验的研究相对较少。随着多种斑马鱼肾疾病模型的建立以及斑马鱼肾脏研究方法的完善,利用斑马鱼进行肾药物实验具有非常大的潜力。本文主要就斑马鱼在发现肾保护性药物中的应用作一综述。

1 斑马鱼用于肾药物发现的可行性分析

经分析,利用斑马鱼动物模型进行肾保护性药物筛查和药理学研究是切实可行的,主要体现在三个方面:第一,斑马鱼肾结构和功能与高等脊椎动物高度保守;第二,转基因技术和基因突变技术的发展促进肾脏疾病模型的建立;第三,斑马鱼肾功能检测方法学已建立并不断被完善。

【基金项目】 国家自然科学基金(81470943)。

【作者简介】 汪玲(1989—),女,住院医师,研究方向:肾脏病。E-mail: ahlw2016@163.com

【通信作者】 陈朝红(1971—),女,博士,副主任技师,研究方向:肾脏病。E-mail: rin@nju.edu.cn

1.1 斑马鱼肾脏结构特点

斑马鱼前肾与高等脊椎动物具有高度保守性^[1]。其前肾均起源于中胚层,由两个肾单位组成,肾小球在发育至 48 hpf(hours post fertilization)即可发挥血液滤过功能^[1]。96 hpf 时超微结构下可见与哺乳动物相似的完整的滤过膜,扫描电镜见前肾足细胞形态与人类相似^[2],足细胞伸出指状足突沿着毛细血管腔包绕,与基底膜(glomerular basement membrane, GBM)和内皮窗孔一起构成肾小球滤过屏障^[1]。肾小管在 2 dpf(days post fertilization)时即发育成熟。与哺乳动物类似,斑马鱼肾小管也是由不同节段组成,包括近曲小管(proximal convoluted tubule, PCT)、近端小管(proximal straight tubule, PST)、远端早期小管(distal early, DE)、远端晚期小管(distal late, DL)和前肾导管(pronephric duct, PD)^[3]。近端小管有刷状缘,细胞和细胞之间形成复杂连接并具有明显的极性,分布着多种跨膜转运蛋白,发挥调节水盐平衡的作用^[1]。对高等动物肾脏发育起重要调控作用的基因同样在斑马鱼前肾发育过程中表达。如在斑马鱼足细胞系发育过程中,其前体细胞表达与人相同的转录因子,包括 *wt1a*, *pax2a*^[1],随着足细胞分化,开始表达裂孔隔膜相关蛋白如 Nephron, Podocin 等^[4]。因此,斑马鱼和人类肾脏在结构、功能还是分子组成等方面均高度保守,故利用斑马鱼模型研究人类的肾脏疾病、筛选肾保护性药物是十分合适的。

1.2 斑马鱼转基因和基因突变技术

斑马鱼疾病模型的建立依赖于转基因和基因突变技术。近年来,以 Tol2 转座子系统为载体的转基因技术被广泛用于构建转基因模型。将 Tol2 转座子供体质粒和 Tol2 mRNA 共注射入斑马鱼受精卵内,mRNA 可翻译成转座酶,该酶可催化转座子结构的切除并引导质粒中的外源基因与宿主基因组整合。该方法获得转基因斑马鱼的频率可达到 50%,且操作简单^[5]。在此基础上,利用 Tol2 转座系统和 multi-site gateway 技术^[6]构建出斑马鱼组织特异性表达转基因载体,并且商业化的 Tol2 试剂盒^[7]以及便携的在线 Tol2-kit 信息资源(http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Main_Page)使得 Tol2 转座系统逐渐成为日常的基因工程工具。此外,诱导表达系统可允许转基因在斑马鱼特定组织中表达,方法包括热休克^[8]、Cre-

loxP^[9], Gal4-UAS^[10], Tet-on^[11] 及 Tet-off^[12] 等。在诱导基因突变体系方面,反向遗传学方法吗啉代反义寡核苷酸(morpholinors, MOs)是人工合成的一段针对目的基因 mRNA 的反义核苷酸序列,MO 显微注射进斑马鱼胚胎后可与目的基因 mRNA 结合,从而阻断靶基因的翻译过程或引起目的 mRNA 的异常剪接^[13]。然而 MOs 的基因沉默效应会随着斑马鱼胚胎的发育逐渐被稀释和降解^[14],且注射 MOs 会导致非特异性的 p53 激活从而诱导脱靶效应^[15]。因此 MOs 提供的是一个短暂的、功能性的基因沉默而非完全性的基因破坏。近年来,靶向基因编辑技术逐步发展,可快速建立永久的、稳定的斑马鱼突变体系,包括锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)技术^[16]、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术^[17]以及 CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 核酸酶技术^[18]。尤其是 CRISPR/Cas9 系统的建立,极大地拓宽了基因编辑技术在各种生物学研究中的应用。其原理为位点特异性的核酸酶能在 DNA 靶位点诱导 DNA 双链断裂(double strand breaks, DSBs),诱发细胞内源性修复机制,激活体内非同源性末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复或同源重组修复(homologous recombination, HR),从而实现定点敲除、插入、碱基替换等^[19]。ZFN 和 TALEN 是以二聚体的形式发挥作用,故其靶点设计更加复杂和繁琐,制约了其应用。CRISPR/Cas9 系统是一种由单导向 RNA(single guide RNA, sgRNA)介导的定向基因编辑技术,它由单体发挥作用,只需要一个靶点,更加简单、价廉、高效,很快替代了 ZFN/TALEN 技术。Hwang 等^[18]首次将针对靶基因特异性的不同浓度的 gRNA 和 Cas9 mRNA 共同显微注射进单细胞期斑马鱼受精卵内,发现所有浓度的 RNAs 均能在特定基因位点内诱导出明显的插入或者碱基缺失的突变。Anderson 等^[20]将 *apol1*-gRNA 和 Cas9 共注射入斑马鱼胚胎后成功敲除 *apol1* 外显子 3,胚胎出现心包和卵黄囊水肿、蛋白漏出及广泛的足突融合,这是第一次将 CRISPR/Cas9 应用于斑马鱼肾领域的研究。随着转基因和诱导突变体系技术的飞速发展,大量的基因功能得到体内证实,同时多种疾病模型逐渐建立,使得基于疾病模型的药物筛选也逐步发展开来。

1.3 斑马鱼肾小球和肾小管功能检测方法

肾小球滤过和肾小管重吸收是肾维持正常生理功能的两个重要过程。检测药物对肾小球和/或肾小管功能的影响是判断药物疗效的必要条件。随着研究的深入,目前已建立起相对完善的检测斑马鱼蛋白尿、滤过屏障完整性以及肾小管重吸收功能的方法。Tg(*pod: GFP*)转基因斑马鱼在 *podocin* 启动子作用下足细胞被 GFP 标记,可在显微镜下直接观察和分离足细胞,GFP 信号强弱还可以直接反应足细胞的发育异常或损伤^[2]。为了检测肾小球裂孔隔膜的完整性,Hentschel 等^[21]诱导斑马鱼足细胞损伤后向胚胎心腔静脉内显微注射 70-kDa FITC 标记的右旋糖苷,观察眼球血管内和心脏最大荧光强度随时间的变化并定量,发现胚胎其眼球血管内及心脏的荧光强度均随时间的增加而明显减弱,表明经肾小球漏出的 FITC 标记的右旋糖苷增加。但是这种方法耗时、费力,且不能应用于成鱼。Zhou 等^[22]建立的 *l-fabp: VDBP-EGFP* 转基因斑马鱼不但能克服这个局限性,还可以准确客观地检测蛋白尿的水平。*VDBP-EGFP* 分子量为 79.6×10^3 ,与哺乳动物的白蛋白大小相近,在肝脏特异性脂肪酸结合蛋白(*l-fabp*)启动子的作用下,肝产生 GFP 标记的 *VDBP*,并分泌到血液循环中。双转基因斑马鱼 *pod: NTR-mCherry/l-fabp: VDBP-GFP* 在 MTZ 诱导下损伤足细胞,可见近端小管内有 GFP 荧光累积,表明 *VDBP* 经肾小球漏出并被肾小管重吸收。利用 ELISA 试剂盒检测水中 GFP 含量可直接反应蛋白尿水平。在肾小管方面,与哺乳动物一样,斑马鱼肾小管也可进行 HE、PAS 染色以及银染,且可通过观察刷状缘来直接区分近端和远端小管。此外,莲花翅荚豌豆凝集素(*lotus tetragonolobus lectin*, LTL)、扁豆凝集素(*dolichos bifows agglu-tinin*, DBA)和肌球蛋白 VI 免疫荧光染色可分别用来识别近端、远端小管和集合管。碱性磷酸酶 ELF-97 染色可用于标记整个近端小管,包括 PCT 和 PST^[23]。TUNEL 可用于检测肾小管上皮细胞凋亡,PCNA 或 BrdU 标记可用于发现增殖细胞^[23]。为分析肾小管的重吸收功能,McC Campbell 等^[23-24]向斑马鱼腹腔内注射荧光素标记的小分子右旋糖苷,正常斑马鱼近端肾小管可重吸收染料,而庆大霉素诱导损伤的斑马鱼近端肾小管无染料累积,表明近端小管重吸收功能障碍。这些方法学的不断建立和完善方便了人们在将来的研究中可以准确评价药物疗效。

2 足细胞损伤模型的建立及相关药物的发现

足细胞损伤会导致足突融合,是许多肾小球疾病发生的早期表现。足细胞持续损伤会引起足细胞脱落,最终发生肾小球硬化。因此,寻找直接靶向作用于足细胞、阻止足突融合的药物是治疗抗肾小球疾病的重要途径^[25]。目前,已诱导出多种斑马鱼足细胞损伤的模型,并被广泛用于足细胞损伤的机制研究。Kramer 等^[4]用 *nephrin* 和 *podocin* MO 分别阻断斑马鱼前肾 *nephrin* 和 *podocin* 表达,导致足突融合和肾小球滤过屏障完整性被破坏。构建可诱导的靶向足细胞损伤的转基因斑马鱼 Tg(*pod: NTR-mCherry*)是目前比较常用的足细胞损伤模型:在 *podocin* 启动子的驱动下,足细胞特异性地表达细菌的硝基还原酶(NTR)与 mCherry 融合蛋白,加入甲硝唑(MTZ)诱导后,NTR 可将 MTZ 转化为毒性前体物质从而导致足细胞凋亡而不损伤其他细胞^[22]。最近,一种更新的利用 UAS/GAL4 系统构建的双转基因斑马鱼 Tg(*pod: Gal4; UAS: NTR-mCherry*)能明显增加 NTR-mCherry 的表达,从而大大提高足细胞的损伤效率^[26-27]。另外,传统的化学药物诱导方法如嘌呤霉素(PAN)、阿霉素处理同样可用于诱导斑马鱼足细胞损伤^[21,28]。然而,比较化学药物诱导损伤和靶向转基因技术诱导损伤:前者作用于全身;而转基因斑马鱼的损伤作用直接靶向于足细胞,对其他细胞不受影响,是一个可诱导的、在时间和空间上可控制的足细胞损伤模型,其可靠性更高。

斑马鱼足细胞损伤模型的建立为筛选足细胞保护性药物提供了理想的实验工具。足细胞与树突状的神经元细胞相似,均是依靠动态的肌动蛋白细胞骨架结构来维持结构和功能。Li 等^[29]利用阿霉素诱导斑马鱼足细胞损伤,然后给予脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BAND)处理,发现 BAND 能明显改善足突融合程度、维持 *nephrin* 和 TrkB 的表达、减轻肾小球滤过屏障损害。发动蛋白(dynammin)作为一个 GTP 酶对维持足细胞结构和功能具有重要作用^[30-31]。发动蛋白寡聚为更高级的结构后可以促进肌动蛋白的聚合从而维持足细胞正常生理功能^[32]。Schiffer 等^[33]用 *dym2* MO 沉默斑马鱼 *dynammin2* 的基因表达,发现斑马鱼胚胎出现心包水肿、生存率下降、大分子蛋白的漏出以及足突广泛融合,重新注入人和鼠 Dyn1 mRNA 以及增强其寡聚化作用的突变体 Dyn1^{E/K}可以避免

上述表型的出现,表明 dynamin 寡聚化是维持足细胞功能所必需的,并可能是 CKD 治疗的潜在靶点。已有研究表明,小分子药物 Bis-T-23 可促进肌动蛋白依赖的 dynamin 的寡聚化^[33]。Schiffer 等^[33]利用 MO 分别敲低斑马鱼 *prkce*, *cd2ap*, *inf2*, *nphs1* 基因表达后给予 Bis-T-23 处理,发现 Bis-T-23 可明显降低其蛋白尿水平。

3 斑马鱼 AKI 模型的建立及相关的药物发现

AKI 是临床常见病,占住院患者的 2% ~ 7%^[34],死亡率高达 50% ~ 80%^[35]。严重的 AKI 通常需要肾脏替代治疗。AKI 还是进展为 CKD 的危险因素^[36]。然而目前还没有明确的治疗策略可以阻止肾脏的损伤、促进肾损伤的恢复或者降低损伤后肾纤维化的发生^[37],故需要发展可靠的实验动物模型来发现有效的治疗药物和生物标志物。斑马鱼由于其肾小管结构的保守性^[3]和强大的再生能力^[38],使其成为发现 AKI 相关药物的理想模型。Hentschel 等^[39]利用肾毒性药物第一次成功地构建了斑马鱼 AKI 模型:他在 50 hpf 或者 72 hpf 的斑马鱼胚胎心脏静脉窦内注射庆大霉素或者顺铂引起严重的肾小管重吸收功能障碍。此外,用镊子机械阻断前肾小管 30 s 左右,可立刻中断尿液流动并迅速引起肾小管上皮的囊性扩张^[40-41]。使用激光消除的方法可破坏斑马鱼肾小管特定靶区域,引起局部肾小管损伤^[42]。基于 NTR/MTZ 损伤原理,构建的 Tg(*enpep*:*Gal4*; *UAS*:*NTR-mCherry*)转基因斑马鱼可特异性地诱导肾小管上皮细胞损伤^[43]。

利用斑马鱼 AKI 模型,研究者发现一些小分子药物并对其功能进行验证。de Groh 等^[44]用斑马鱼作为筛查工具发现组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitor, HDAC i) 类似物 4 苯硫基丁酸 (4PTBA) 可以促进肾脏前体细胞标志物如 *lhx1a*, *pax2a* 和 *pax8* 的表达,其作用依赖于视黄酸 (retinoic acid, RA) 信号通路。随后进一步研究发现,4PTBA 另一酯化类似物 4 甲硫基丁酸 (m4PTB) 可促进庆大霉素诱导的斑马鱼肾小管的损伤后恢复,包括提高幼鱼存活率以及促进肾小管上皮细胞再生^[45]。肾损伤分子 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1) 是一个特异的近端小管损伤标志物^[46],其过表达可导致前肾急性肾小管损伤,持续表达 *kim-1* 可使中肾出现 CKD 样改变,损伤机制与雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通

路激活有关。在过表达 *kim-1* 的斑马鱼中予以雷帕霉素处理,发现其心包水肿率以及死亡率明显降低,并且雷帕霉素可降低 *Kim-1* 过表达小鼠的血肌酐水平、改善其肾纤维化,表明雷帕霉素可缓解 KIM-1 所诱导的肾小管损伤^[47]。

4 多囊肾及其相关药物的发现

多囊肾 (polycystic kidney disease, PKD), 是一种常见的引起终末期肾疾病 (end stage renal disease, ESRD) 的遗传性肾疾病。初级纤毛 (primary cilia) 缺陷是其重要发病机制。斑马鱼因其胚胎透明,便于在显微镜下直接观察囊肿,且基因易操作,使得人们可以利用斑马鱼进行大规模的基因筛查来发现与肾囊肿形成有关的突变基因。Sun 等^[48]采用大范围反转录病毒插入突变筛查的方法发现了 12 个与斑马鱼多囊肾形成相关的突变基因,胚胎主要表现为囊肿形成、左右对称改变以及身体轴异常弯曲。Huang 等^[49]利用 MO 沉默 *wnt5a* 基因表达后斑马鱼胚胎出现肾囊肿扩张和尾巴弯曲,注射鼠 *wnt5a* mRNA 后能挽救异常表型。*poc1b* 是另一与纤毛发生相关的基因,敲低 *poc1b* 基因后斑马鱼前肾同样出现多囊肾及视网膜病变^[50]。*bicc1* 基因也被证明与肾囊肿形成相关,当阻断其基因表达后也可导致斑马鱼胚胎出现肾囊肿、身体弯曲,而共注射鼠 *Bicc1* mRNA 可挽救该表型^[51]。

目前对于 PKD 尚缺乏有效的治疗药物。为寻找潜在的治疗 PKD 药物, Cao 等^[52]利用斑马鱼 *pkd2*^{hi4166} 和 *ift172*^{hi2211} 突变体作为 PKD 模型,以身体弯曲作为观察指标,筛选了 115 个化合物,最终发现组蛋白去乙酰化酶抑制剂 trichostatin A 和 valproic acid 可以缓解身体弯曲的表型。trichostatin A 是一个泛 HDAC 抑制剂,研究证明它可以抑制 *pkd2* 突变体胚胎的囊肿形成。val-proic acid 是 HDAC1 的特异性抑制剂,它可减慢 *Pkd1* 敲除小鼠肾囊肿进展。此研究证明 HDAC 抑制剂可成为治疗 PKD 的候选药物。嘌呤受体信号通路是 PKD 发生的潜在机制之一。P2X7 嘌呤受体在高浓度 ATP 激活下可促进囊肿的形成与扩大^[53]。Chang 等^[54]将 *pkd2*-MO 斑马鱼分别暴露于 P2X7 受体拮抗剂 (OxATP) 和激动剂 (BzATP),结果显示与 BzATP 相比,暴露于 OxATP 能明显抑制囊肿的形成,另一 P2X7 受体特异性拮抗剂 A-438079 同样证实该结果,证明 P2X7 拮抗剂可能是治疗 ADPKD 一个有效药物。cAMP

水平增高被证实与 PKD 发病相关,磷酸二酯酶 (phosphodiesterases, PDEs) 可水解 cAMP, Sussman 等^[55]发现当敲除斑马鱼 *pde1a* 基因时可导致前肾囊肿和脑积水,而给予人 *PDE1A* mRNA 或蛋白酶 A (protein kinase A, PKA) 抑制剂时表型好转,从而证明 *PDE1A* 可能是治疗 PKD 一个可靠的靶点。

5 小结

斑马鱼提供了一个简单、价廉、高效的药物筛选平台,尽管已有一些肾脏保护性药物被发现和验证,但是目前在肾脏领域应用还相对较少,具有极大的潜力。利用斑马鱼研究人员可以进行药物靶点的识别和验证、发现药物主要成分、研究结构和功能的关系以及药物安全性和毒性评估等。斑马鱼用于药物筛选具有其他模式动物和体外细胞培养不可替代的优势,已有的研究已经证明利用斑马鱼进行肾方面的药物实验是切实可行的,下一步要做的是如何构建更多的疾病模型,寻找更多有益于控制肾疾病的新药物。

参考文献:

[1] Drummond IA, Majumdar A, Hentschel H, et al. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function [J]. *Development*, 1998, 125 (23): 4655 - 4667.

[2] He B, Ebarasi L, Hultenby K, et al. Podocin-green fluorescence protein allows visualization and functional analysis of podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(6): 1019 - 1023.

[3] Wingert RA, Davidson AJ. The zebrafish pronephros: a model to study nephron segmentation [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(10): 1120 - 1127.

[4] Kramer-Zucker AG, Wiessner S, Jensen AM, et al. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephhrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes [J]. *Dev Biol*, 2005, 285(2): 316 - 329.

[5] Kawakami K, Shima A, Kawakami N. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (21): 11403 - 11408.

[6] Villefranc JA, Amigo J, Lawson ND. Gateway compatible vectors for analysis of gene function in the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(11): 3077 - 3087.

[7] Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, et al. The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(11): 3088 - 3099.

[8] Shoji W, Sato-Maeda M. Application of heat shock promoter in

transgenic zebrafish [J]. *Dev Growth Differ*, 2008, 50(6): 401 - 406.

[9] Seok SH, Na YR, Han JH, et al. Cre/loxP-regulated transgenic zebrafish model for neural progenitor-specific oncogenic Kras expression [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(1): 149 - 154.

[10] Scheer N, Campos-Ortega JA. Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish [J]. *Mech Dev*, 1999, 80(2): 153 - 158.

[11] Campbell LJ, Willoughby JJ, Jensen AM. Two types of Tet-On transgenic lines for doxycycline-inducible gene expression in zebrafish rod photoreceptors and a gateway-based tet-on toolkit [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51270.

[12] Pai WY, Hsu CC, Lai CY, et al. Cannabinoid receptor 1 promotes hepatic lipid accumulation and lipotoxicity through the induction of SREBP-1c expression in zebrafish [J]. *Transgenic Res*, 2013, 22(4): 823 - 838.

[13] Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish [J]. *Nat Genet*, 2000, 26(2): 216 - 220.

[14] Fukuyo Y, Nakamura T, Bubenshchikova E, et al. Nephhrin and Podocin functions are highly conserved between the zebrafish pronephros and mammalian metanephros [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(2): 457 - 465.

[15] Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, et al. p53 activation by knockdown technologies [J]. *PLoS Genet*, 2007, 3(5): e78.

[16] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 702 - 708.

[17] Huang P, Xiao A, Zhou M, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 699 - 700.

[18] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227 - 229.

[19] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397 - 405.

[20] Anderson BR, Howell DN, Soldano K, et al. In vivo modeling implicates APOLI in nephropathy: evidence for dominant negative effects and epistasis under anemic stress [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(7): e1005349.

[21] Hentschel DM, Mengel M, Boehme L, et al. Rapid screening of glomerular slit diaphragm integrity in larval zebrafish [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(5): F1746 - 1750.

[22] Zhou W, Hildebrandt F. Inducible podocyte injury and proteinuria in transgenic zebrafish [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(6): 1039 - 1047.

[23] McCampbell KK, Springer KN, Wingert RA. Atlas of Cellular Dynamics during Zebrafish Adult Kidney Regeneration [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 547636.

[24] McCampbell KK, Springer KN, Wingert RA. Analysis of nephron composition and function in the adult zebrafish kidney [J]. *J Vis Exp*, 2014, (90): e51644.

- [25] Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases [J]. *Kidney Int*, 2007, 71(12): 1205–1214.
- [26] Wan X, Chen Z, Choi WI, et al. Loss of epithelial membrane protein 2 aggravates podocyte injury via upregulation of caveolin-1 [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(4): 1066–1075.
- [27] Chen Z, Wan X, Hou Q, et al. GADD45B mediates podocyte injury in zebrafish by activating the ROS-GADD45B-p38 pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7:e2068.
- [28] Zennaro C, Mariotti M, Carraro M, et al. Podocyte developmental defects caused by adriamycin in zebrafish embryos and larvae: a novel model of glomerular damage [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98131.
- [29] Li M, Armelloni S, Zennaro C, et al. BDNF repairs podocyte damage by microRNA-mediated increase of actin polymerization [J]. *J Pathol*, 2015, 235(5): 731–744.
- [30] Sever S, Altintas MM, Nankoe SR, et al. Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8): 2095–2104.
- [31] Soda K, Balkin DM, Ferguson SM, et al. Role of dynamin, synaptotagmin, and endophilin in podocyte foot processes [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12): 4401–4411.
- [32] Gu C, Yaddanapudi S, Weins A, et al. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton [J]. *EmboJ*, 2010, 29(21): 3593–3606.
- [33] Schiffer M, Teng B, Gu C, et al. Pharmacological targeting of actin-dependent dynamin oligomerization ameliorates chronic kidney disease in diverse animal models [J]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 601–609.
- [34] Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. The changing epidemiology of acute renal failure [J]. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006, 2(7): 364–377.
- [35] Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study [J]. *Jama*, 2005, 294(7): 813–818.
- [36] Siew ED, Deger SM. Recent advances in acute kidney injury epidemiology [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2012, 21(3): 309–317.
- [37] Faubel S, Chawla LS, Chertow GM, et al. Ongoing clinical trials in AKI [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012, 7(5): 861–873.
- [38] Sander V, Davidson AJ. Kidney injury and regeneration in zebrafish [J]. *Semin Nephrol*, 2014, 34(4): 437–444.
- [39] Hentschel DM, Park KM, Cilenti L, et al. Acute renal failure in zebrafish; a novel system to study a complex disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288(5): F923–929.
- [40] Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, et al. Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis [J]. *Development*, 2005, 132(8): 1907–1921.
- [41] Hellman NE, Liu Y, Merkel E, et al. The zebrafish foxj1a transcription factor regulates cilia function in response to injury and epithelial stretch [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(43): 18499–18504.
- [42] Johnson CS, Holzemer NF, Wingert RA. Laser ablation of the zebrafish pronephros to study renal epithelial regeneration [J]. *J Vis Exp*, 2011(54): e2845–e2845.
- [43] 侯庆, 汪玲, 张利文, 等. 基于硝基还原酶/甲硝唑系统构建斑马鱼急性肾损伤模型 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2018, 27(2): 130–134.
- [44] de Groh ED, Swanhart LM, Cosentino CC, et al. Inhibition of histone deacetylase expands the renal progenitor cell population [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(5): 794–802.
- [45] Cianciolo Cosentino C, Skrypnik NI, Brilli LL, et al. Histone deacetylase inhibitor enhances recovery after AKI [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(6): 943–953.
- [46] Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(7): 4135–4142.
- [47] Yin W, Naini SM, Chen G, et al. Mammalian target of rapamycin mediates kidney injury molecule 1-dependent tubule injury in a surrogate model [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(7): 1943–1957.
- [48] Sun Z, Amsterdam A, Pazour GJ, et al. A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney [J]. *Development*, 2004, 131(16): 4085–4093.
- [49] Huang L, Xiao A, Wecker A, et al. A possible zebrafish model of polycystic kidney disease: knockdown of wnt5a causes cysts in zebrafish kidneys [J]. *J Vis Exp*, 2014, 94):
- [50] Beck BB, Phillips JB, Bartram MP, et al. Mutation of POC1B in a severe syndromic retinal ciliopathy [J]. *Hum Mutat*, 2014, 35(10): 1153–1162.
- [51] Bouvrette DJ, Sittaramane V, Heidel JR, et al. Knockdown of bicaudal C in zebrafish (*Danio rerio*) causes cystic kidneys; a nonmammalian model of polycystic kidney disease [J]. *Comp Med*, 2010, 60(2): 96–106.
- [52] Cao Y, Semanchik N, Lee SH, et al. Chemical modifier screen identifies HDAC inhibitors as suppressors of PKD models [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 21819–21824.
- [53] Monif M, Reid CA, Powell KL, et al. The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(12): 3781–3791.
- [54] Chang MY, Lu JK, Tian YC, et al. Inhibition of the P2X7 receptor reduces cystogenesis in PKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(9): 1696–1706.
- [55] Sussman CR, Ward CJ, Leightner AC, et al. Phosphodiesterase 1A modulates cystogenesis in zebrafish [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(10): 2222–2230.