

# 基于激光消融技术的斑马鱼条纹再生的研究

蒋鹏翀<sup>1</sup>, 魏巍<sup>1</sup>, 胡芬<sup>1</sup>, 张心正<sup>1,2</sup>, 潘雷霆<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>南开大学物理科学学院, 泰达应用物理研究院, 弱光非线性光子学教育部重点实验室, 天津 300071;

<sup>2</sup>山西大学极端光学协同创新中心, 山西 太原 030006;

<sup>3</sup>南开大学生物治疗协同创新中心, 天津 300071

**摘要** 使用 355 nm 纳秒脉冲激光对斑马鱼体表条纹进行消融处理, 通过分析色素细胞簇的再生过程研究斑马鱼体表图案的形成及再生机制。结果表明: 斑马鱼体表的黄色素细胞簇能够促进周围一定区域内黑色素细胞的再生, 该区域限于稍远于紧邻黄色条纹的位置, 但在半个条纹宽度以内; 这种促进作用具有方向特异性, 即黄色素细胞更多地促进其本身条纹纵向处的黑色素细胞再生, 但不促进其本身条纹横向处的黑色素细胞再生。这一结果可为理解斑马鱼自主形成周期性条纹提供新的实验支持。

**关键词** 生物光学; 斑马鱼; 激光消融技术; 黄色素细胞; 黑色素细胞

中图分类号 Q631

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207024

## Study of Stripe Regeneration of Zebrafish Based on Laser Ablation Technology

Jiang Pengchong<sup>1</sup>, Wei Wei<sup>1</sup>, Hu Fen<sup>1</sup>, Zhang Xinzheng<sup>1,2</sup>, Pan Leiting<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Weak-Light Nonlinear Photonics, Ministry of Education, TEDA Applied Physics School and School of Physics, Nankai University, Tianjin 300071, China;

<sup>2</sup>Collaborative Innovation Center of Extreme Optics, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China;

<sup>3</sup>The 2011 Project Collaborative Innovation Center for Biological Therapy, Nankai University, Tianjin 300071, China

**Abstract** In the present work, 355 nm nanosecond pulsed laser is used to ablate zebrafish surface stripes to investigate the mechanism underlying formation and regeneration of pigment cells pattern. The experimental results show that zebrafish surface xanthophore clusters can only promote melanophore regeneration within the distance of half width of a stripe but not close to each other. Meanwhile, xanthophores significantly affect melanophore regeneration in a direction perpendicular to its stripe rather than parallel to its stripe, indicating the orientation specificity. The results can provide new experimental supports for understanding how zebrafish self-organize spatially periodic patterns.

**Key words** biological optics; zebrafish; laser ablation technology; xanthophores; melanophores

**OCIS codes** 170.1020; 170.1420; 170.7160

## 1 引言

动植物在生长发育过程中, 其组织器官中的细胞往往按照一定的空间模式分布排列, 呈现出特定的图

案, 如指纹图案、贝壳图案、斑马鱼体表条纹等。机体细胞图案化机制一直是经典的生物学谜题。早期试图解释图案化机制的工作大都基于理论建模展开, 这其中最重要的理论是由图灵于 1952 年提出的反应扩

收稿日期: 2017-05-12; 收到修改稿日期: 2017-06-07

基金项目: 国家自然科学基金(11574165)、111 计划(B07013)、长江学者和创新团队发展计划(IRT\_13R29)、山西大学极端光学协同创新中心资助项目

作者简介: 蒋鹏翀(1989—), 男, 博士研究生, 主要从事细胞通讯方面的研究。E-mail: soyida\_jpc@126.com

导师简介: 潘雷霆(1983—), 男, 博士, 副教授, 主要从事细胞通讯和显微成像方面的研究。

E-mail: plt@nankai.edu.cn(通信联系人)

散模型<sup>[1]</sup>。该模型指出,在特定的条件下,几种“形态发生素”通过互相反应及自身的扩散作用,最终形成了一种稳定的空间分布模式,这种模式决定了生物器官组织的图案。1972年 Gierer 和 Meinhardt 提出了激活-抑制模型,指出生物组织最终形成的图案通常是由早期两种性质相反的形态发生素经扩散作用形成的稳定图案决定的<sup>[2]</sup>。这些理论模型已成功应用于斑马鱼皮肤条纹形成<sup>[3]</sup>、贝壳图案形成<sup>[4]</sup>、神仙鱼图案变化<sup>[5]</sup>、细胞体外迷宫图案形成<sup>[6]</sup>及手指脚趾指纹形成<sup>[7]</sup>等研究领域。2012年,英国伦敦国王学院科学家通过研究小鼠口腔上腭脊纹的生长过程,从实验上直接证实了图灵提出的反应扩散图案形成理论,并鉴定出与这一过程有关的形态发生素分子<sup>[8]</sup>。

近年来,随着光刻微加工等技术的发展,细胞图案化技术应运而生,为体外研究细胞图案化过程提供了实验手段<sup>[9-12]</sup>。然而由于技术缺乏及伦理限制,在体组织器官图案化的研究尚未有效开展。激光消融技术是利用一定波长和功率的脉冲激光,在不损害真皮层组织细胞的前提下,对动物体表的色素细胞进行局部物理去除的方法,是研究在体动物体表图案化机制的有效手段。斑马鱼是一种热带淡水鱼,由于其体表分布着若干颜色相间的条纹而得名。斑马鱼的基因组与人类的基因高度保守,而且具有发育行为易于体外观察、养殖费用低廉等优点,已成为发育生物学研究中最重要模式生物之一<sup>[13]</sup>。Kondo 等<sup>[14-16]</sup>基于脉冲激光消融技术发现斑马鱼体表条纹图案的形成与色素细胞间的相互作用关系密切。本文基于激光消融技术自行搭建实验光路,使用 355 nm 的纳秒脉冲激光对野生斑马鱼体表色素细胞进行消融处理,通过观察色素细胞簇的再生过程来研究斑马鱼图案化的形成机制,以期对斑马鱼体表条纹图案化研究提供更多的实验支持。

## 2 实验材料与方法

### 2.1 斑马鱼的培养

斑马鱼培养系统包括鱼缸、加热棒、氧气泵、温度计、吸水管、鱼网及鱼食。斑马鱼来源为野生,鱼龄约为孵化后四周。饲养时保持水温为 23~28 ℃,每日中午 12 时喂养斑马鱼,随后换水(水量为鱼缸体积的三分之一),每月清理鱼缸底部代谢废物,并更换过滤棉。

### 2.2 麻醉剂的配制及使用

实验用麻醉剂为三卡因(Tricaine, ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt),室温保存,并采取避光防潮措施。实验前取三卡因粉末,将其溶于蒸馏水(三卡因粉末与蒸馏水的质量比为 1:250),配成麻醉剂母液,将母液包裹锡纸后储存在 4 ℃ 的冰箱中。实验时再按 1:25 稀释成工作液,然后将斑马鱼置于其中麻醉 4 min。因斑马鱼存在个体差异,可根据具体样本活动状态适当调整麻醉时间,使实验既能顺利进行,又不会导致斑马鱼死亡。

### 2.3 纳秒脉冲激光消融光路搭建及应用

为了防止激光消融处理对斑马鱼靶细胞周围组织造成过高的热效应损伤,选用瞬时功率高而作用时间短的纳秒脉冲激光器(SLII-10 8033, Continuum 公司)进行实验,激光波长为 355 nm,重复频率为 10 Hz,脉冲带宽为 7 ns。通过反射镜调整光束的方向,通过提升器提升光束的高度,通过可调节衰减片调节光束的强度,最后由凸透镜将光束聚焦于斑马鱼体表。聚焦后光斑的直径为 68 μm,功率约为 3.14 mW,则功率密度约为 86.5 W/cm<sup>2</sup>,每处消融 1 s。此外,实验装置还包括三维载物台、体视显微镜和亮度可调冷光源。图 1(a)为脉冲激光消融系统示意图,图 1(b)为实物图。

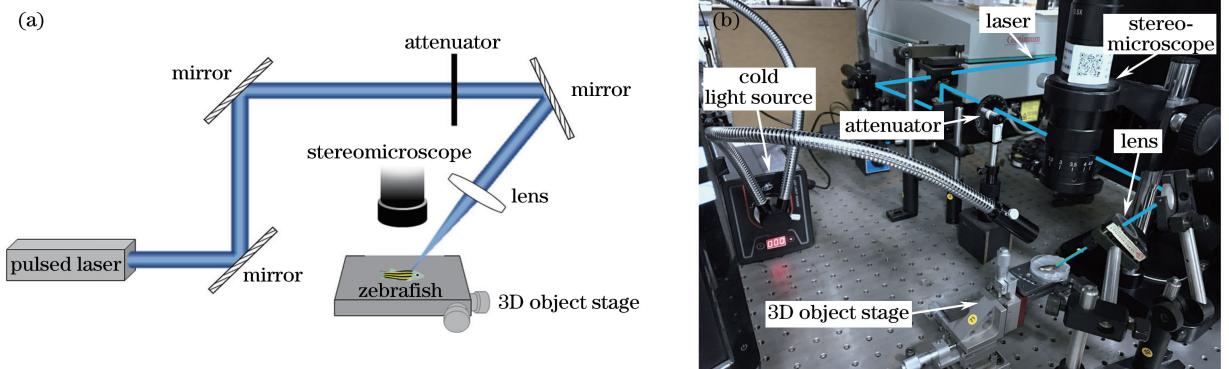


图 1 脉冲激光消融系统。(a)示意图;(b)实物图

Fig. 1 Pulsed laser ablation system. (a) Schematic; (b) photographic image

实验时,先对斑马鱼编号并麻醉,然后将参考光对准靶细胞位置,再进行激光消融处理。移动三维载物台控制消融区域。实验结束后立即将斑马鱼放回鱼缸中恢复。随后,利用 SIGE 软件每隔 24 h 对样品消融区域进行观察、拍摄。每组实验用三条斑马鱼。

### 3 结果与分析

#### 3.1 黑色素细胞促进黑色素细胞再生

为了探究黑黄色素细胞对黑色素细胞再生的影响,首先按照图 2(a)所示的图案(白色部分)对斑马鱼体表一条长黑色条纹及上下相邻的两条黄色条纹进行消融。以消融后第 3 天的体表图案表示消融效果(如图 2(b)所示),以第 25 天的体表图案表示恢复效果(如图 2(c)所示)。由图 2(c)、(d)可见:对于区域 I,第 25 天有大量黑色素细胞再生,密度为  $(166.1 \pm 39.5) \text{ mm}^{-2}$  (样本量  $n=3$ );区域 II 中的再

生细胞较少,密度为  $(32.3 \pm 28.3) \text{ mm}^{-2}$  ( $n=3$ ),约为区域 I 的 20%;两个区域的统计结果具有显著性差异。分析认为,区域 I 的再生现象可能是该区域上下黄色素细胞导致的,也可能是其左右黑色素细胞导致的。为区分两者的作用,按照图 2(e)所示的图案进行消融处理,此时残余细胞基本为黑色素细胞(如图 2(f)所示)。25 d 后,消融区域没有黑色素细胞再生(如图 2(g)所示)。这一结果排除了黑色素细胞对周围细胞再生有促进作用的可能性。综上,黑色素细胞的再生只依赖于附近黄色素细胞的促进作用。在图 2(d)中,柱状图表示平均值±标准差( $n=3$ )。独立样本  $t$  检验分析后可知,显著性水平  $P < 0.001$ ,具有统计学差异。图 2 中,红色矩形表示黑条纹消融区域,紫色矩形表示黑色素细胞再生区域,白色矩形表示与黄色素细胞横向相邻的消融区域。

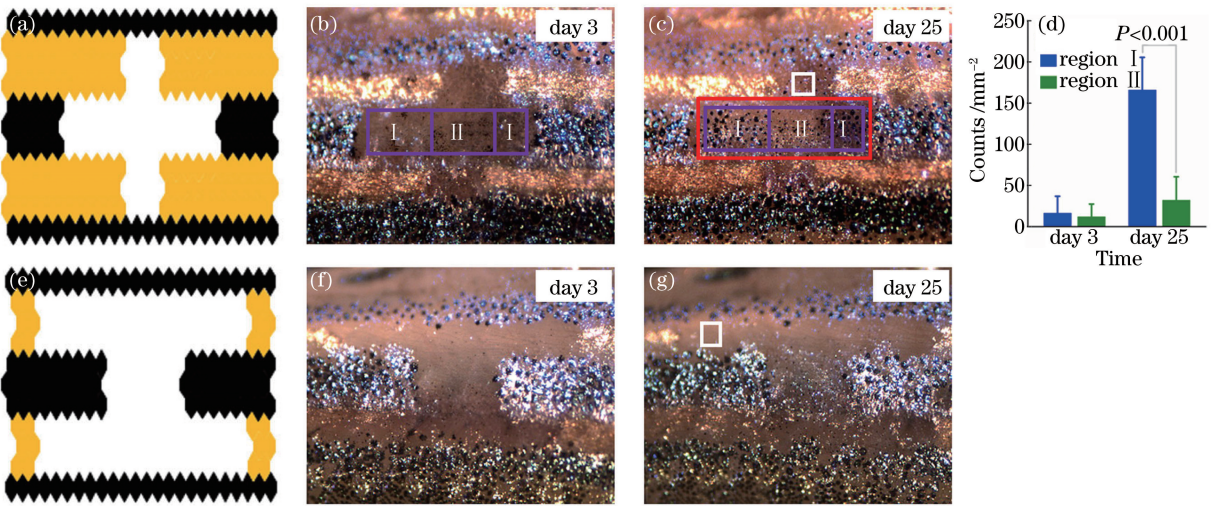


图 2 黑黄色素细胞对黑色素细胞再生的影响。(a)(e)消融区域示意图;(b)(f)消融后第 3 天斑马鱼体表图案;(c)(g)消融后第 25 天斑马鱼体表图案;(d)细胞密度统计图

Fig. 2 Effects of melanophores and xanthophores on melanophore regeneration. (a)(e) Schematics of ablation areas; (b)(f) regenerated zebrafish surface patterns on the third day after ablation; (c)(g) regenerated zebrafish surface patterns on the twenty-fifth day after ablation; (d) statistical data of cell density

#### 3.2 近距离或中距离下黄色素细胞对黑色素细胞再生的影响

图 2 显示黄色素细胞可促进黑色素细胞的再生,但仔细观察后可发现紧邻黄色条纹的消融区域却没有黑色素细胞再生(红色方框边缘)。为了确认黄色素细胞距离对黑色素细胞再生的影响,按照图 3(a)所示的图案进行消融,即消融黑色条纹中部的圆形区域 C1 和下部的圆形区域 C2。图 3(c)、(d)显示:第 25 天后,距离黄色条纹稍远的区域 C1 有大量黑色素细胞再生,上半圆区域的细胞密度为

$(287.8 \pm 34.8) \text{ mm}^{-2}$  ( $n=3$ ),下半圆区域的细胞密度为  $(276.4 \pm 47.4) \text{ mm}^{-2}$  ( $n=3$ ),上半圆区域的细胞密度没有显著性差异。同时,紧邻黄色条纹的区域 C2 中再生细胞明显较少,且主要分布于远离黄色条纹的上半圆区域,密度为  $(265.2 \pm 49.7) \text{ mm}^{-2}$  ( $n=3$ );而非紧邻黄色条纹的下半圆的细胞密度为  $(59.4 \pm 69.3) \text{ mm}^{-2}$  ( $n=3$ ),仅为上半圆的 22%;上下半圆细胞密度具有显著性差异。以上结果说明,黄色素细胞对紧邻黑色素细胞的再生具有抑制作用。随后,按照图 3(e)所示图

案进行消融,即在图 3(a)的基础上又消融了上下两条相邻的黄色条纹。图 3(f)、(g)显示,消融区域 C3、C4 中均无细胞再生,说明 C1 区域黑色素细胞的再生并非是由周围黑色素细胞扩散导致的,进一步佐证了黑色素细胞的再生依赖于黄色素细胞。图

3(d)中,柱状图表示平均值±标准差( $n=3$ )。独立样本  $t$  检验分析后可知, $P<0.001$ ,具有统计学差异;N.S.表示没有统计学差异。图 3 中,红色圆圈 C1、C2、C3、C4 为黑色条纹上的消融区域,白色矩形为与黄色素细胞横向相邻的消融区域。

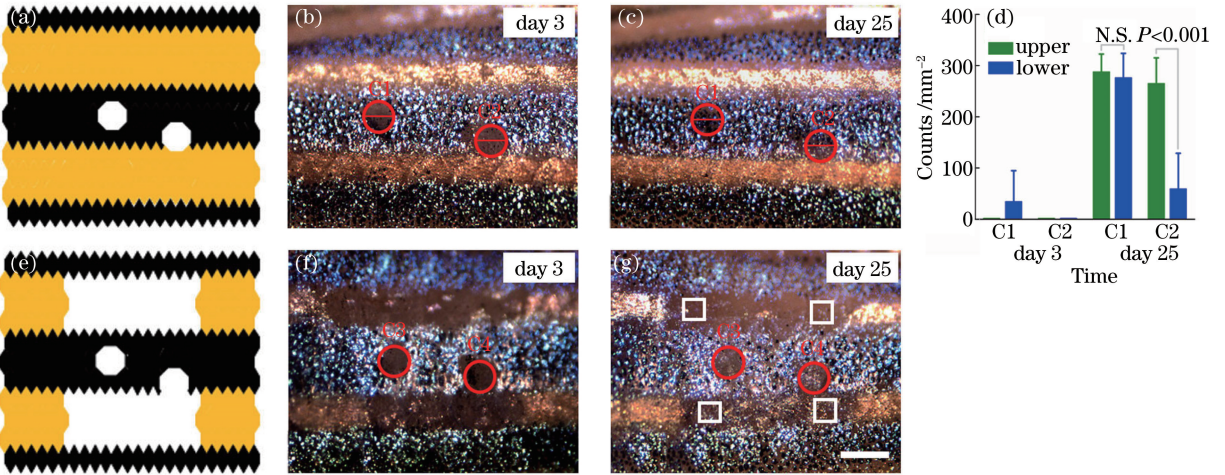


图 3 近中距离黄色素细胞对黑色素细胞再生的影响。(a)(e)消融区域示意图;(b)(f)消融后第 3 天斑马鱼体表图案;(c)(g)消融后第 25 天斑马鱼体表图案;(d)细胞密度统计结果

Fig. 3 Effects of xanthophores within short/middle distance on melanophore regeneration.

(a)(e) Schematics of ablation areas; (b)(f) regenerated zebrafish surface patterns on the third day after ablation;

(c)(g) regenerated zebrafish surface patterns on the twenty-fifth day after ablation; (d) statistical data of cell density

### 3.3 远距离黄色素细胞对黑色素细胞再生的影响

前文已经揭示了近(紧贴)、中(稍远)距离黄色素细胞对黑色素细胞再生的影响。为探究更远距离黄色素细胞对黑色素细胞再生的影响,按图 4(a)所示图案进行消融处理。图 4(c)、(d)显示:第 25 天后,靠近上方黄条纹的半条纹宽矩形 I 内有大量黑色素细胞再生,细胞密度为  $(228.6 \pm 86.0) \text{ mm}^{-2}$  ( $n=3$ );距离较远的下方区域 II 中只有少量细胞再生,密度为  $(44.7 \pm 42.9) \text{ mm}^{-2}$  ( $n=3$ ),约为前者的

20%;上下区域的细胞密度具有显著性差异。综合图 3 的结果可发现,黄色素细胞对黑色素细胞再生的促进作用仅限于稍远于紧邻位置到半条纹宽度处,而对紧邻或超过半个条纹宽度的区域只有较弱的促进作用,甚至没有促进作用。图 4(d)中的柱状图表示平均值±标准差( $n=3$ )。独立样本  $t$  检验分析后可知  $P<0.001$ ,具有统计学差异。紫色矩形表示黑色素细胞再生区域,白色矩形表示黄色素细胞横向相邻的消融区域。

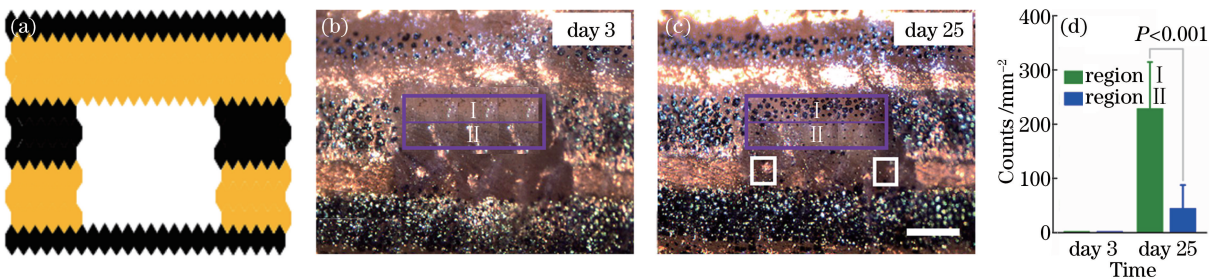


图 4 远距离黄色素细胞对黑色素细胞再生的影响。(a)消融示意图;(b)消融后第 3 天斑马鱼体表图案;

(c)消融后第 25 天斑马鱼体表图案;(d)矩形区域 I、II 内的细胞密度统计数据

Fig. 4 Effects of xanthophores with long distance on melanophore regeneration. (a) Schematics of ablation areas; (b) regenerated zebrafish surface patterns on the third day after ablation; (c) regenerated zebrafish surface patterns on the twenty-fifth day after ablation; (d) statistical data of cell densities in regions I and II

### 3.4 黄色素细胞促进黑色素细胞再生具有方向特异性

图 2~4 中的白色矩形区域虽然也在黄色素细胞的促进作用范围内,但并无黑色素细胞再生。为了探明这一反常现象的原因,按图 5(a)所示图案进行消融,即只留下中间的黄色素细胞簇,将周围区域全部消融。图 5(c)、(d)显示:第 25 天后,虽然黄色素细胞簇周围再生了一圈黑色素细胞,但这些细胞的分布并不均匀,而是呈“上下(绿色区域)多、左右(蓝色区域)少”的特点;上下区域的细胞密度为  $(324.1 \pm 74.4) \text{ mm}^{-2}$  ( $n=3$ ),左右区域的细胞密度为  $(140.0 \pm 84.9) \text{ mm}^{-2}$  ( $n=3$ ),约为上下区域的 43%;两者具有显著性差异。综合这一结果和前面白色区域的反常现象进行分析后认为,黄色素细胞

对黑色素细胞再生的促进作用具有方向特异性,即黄色素细胞更容易促进其本身条纹上下区域的黑色素细胞再生,但较难促进其本身条纹左右区域的细胞再生。随后,又按图 5(e)所示图案进行消融,即只留下中间的黑色素细胞簇。图 5(g)显示,周围区域没有细胞再生,再次说明黑色素细胞不能促进黑色素细胞的再生。同时,黄条纹本身横向处的绿色方框区域内也没有细胞再生,进一步佐证了黄色素细胞对黑色素细胞再生的促进具有方向特异性。图 5(d)中的柱状图表示平均值  $\pm$  标准差 ( $n=3$ )。独立样本  $t$  检验分析后可知  $P < 0.001$ ,具有统计学差异。绿色矩形表示黄色素细胞簇自身条纹纵向恢复区域,蓝色矩形表示黄色素细胞簇自身条纹横向恢复区域,白色矩形表示黄色素细胞横向相邻区域。

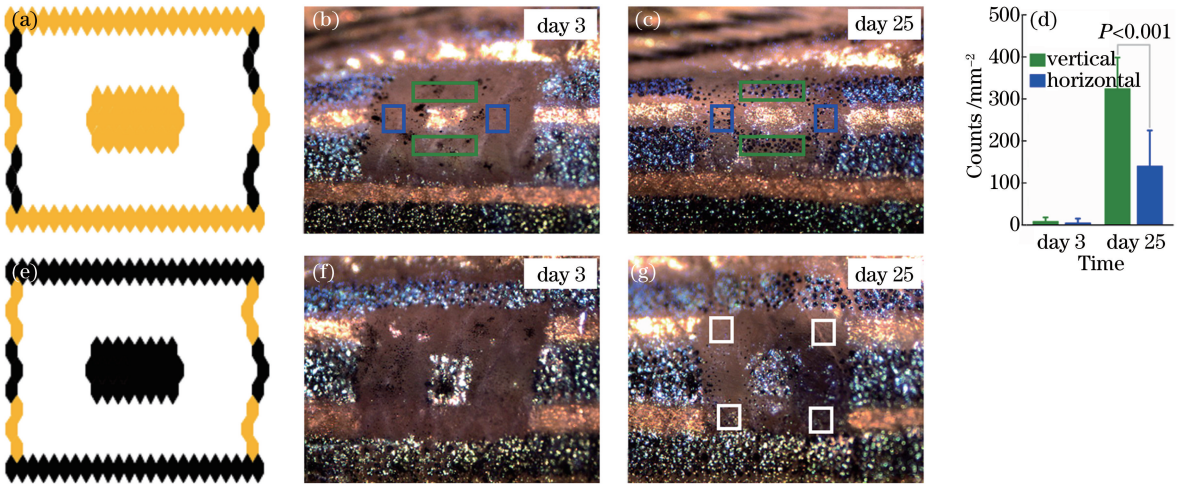


图 5 黄色素细胞对黑色素细胞再生促进作用的方向特异性。(a)(e)消融区域示意图;(b)(f)消融后第 3 天斑马鱼体表图案;(c)(g)消融后第 25 天斑马鱼体表图案;(d)蓝色和绿色矩形区域内的细胞密度统计数据

Fig. 5 Direction-dependent manner of promotion of xanthophores on melanophore regeneration. (a)(e) Schematics of ablation areas; (b)(f) regenerated zebrafish surface patterns on the third day after ablation; (c)(g) regenerated zebrafish surface patterns on the twenty-fifth day after ablation; (d) statistical data of cell densities for blue and green rectangular regions

### 3.5 黄、黑色素细胞相互作用机制总结

综合以上实验结果,将斑马鱼黄、黑色素细胞间的相互作用机制总结为图 6。首先,黄色素细胞能够促进周围消融区域黑色素细胞的再生,而黑色素细胞不具有这种促进作用;其次,这种促进作用仅限于不紧邻且距离小于半个条纹宽度的范围内(如图 6(a)~(c)所示);最后,这种促进作用具有方向特异性,即黄色素细胞更多地促进黑色素细胞在其本身条纹的纵向处生长(如图 6(b)所示),而对横向区域几乎没有促进作用(如图 6(d)所示)。

控制细胞的恢复环境,通过观察细胞的恢复情况,最终揭示了斑马鱼体表条纹恢复过程中色素细胞相互作用的机制,即黄色素细胞可促进黑色素细胞再生,且该促进作用具有范围和方向两种特异性。该结论不仅符合本研究的一系列实验结果,而且能够很好地解释斑马鱼如何自发地形成体表条纹图案。

在斑马鱼形成黄黑相间条纹过程中应当存在某种驱动力,使两种色素细胞不会因随机增殖而形成杂乱无章的图案。促进作用范围与方向特异性结合后恰好满足了这一驱动力的要求。本研究提出了一种斑马鱼体表图案形成机制的假说:黄色素细胞可通过接触抑制或释放特异性抑制因子,使其紧邻位置无黑色素细胞生长,从而有利于黄色素细胞簇生

## 4 结 论

采用脉冲激光对斑马鱼体表色素细胞进行消融,

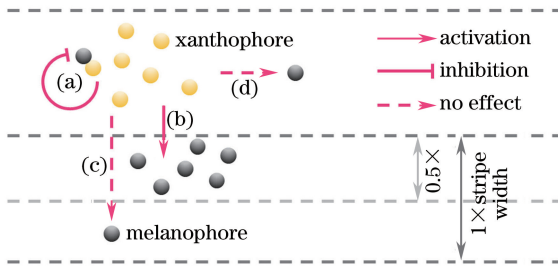


图 6 斑马鱼色素细胞间主要相互作用示意图。(a)近距离(紧邻)黄色素细胞抑制黑色素细胞再生;(b)中距离(半个条纹宽度以内)黄色素细胞促进黑色素细胞在其本身条纹纵向区域再生;(c)远距离(半个条纹宽度之外)黄色素细胞对黑色素细胞没有作用;(d)黄色素细胞不促进黑色素细胞在其本身条纹横向区域再生

Fig. 6 Schematic of main interactions between zebrafish pigment cells. (a) Xanthophores inhibit melanophore regeneration within short distance (adjacent location); (b) xanthophores promote melanophore regeneration in a direction perpendicular to its stripe within middle distance (half stripe); (c) xanthophores have no effect on melanophore regeneration within long distance (beyond half width); (d) xanthophores do not promote melanophore regeneration in a direction parallel to its stripe

成,同时与斑马鱼体表可标定方向的组织器官(如侧线等)相互作用而生长出横向条纹;再通过对称破缺的分泌方式(如调控半通道在细胞膜不同方向的表达),在横向和纵向分别释放抑制和促进黑色素细胞生长的细胞因子,从而导致本身条纹横向处的黑色素细胞无法产生;同时在纵向区域促进黑细胞生长的细胞因子扩散至半条纹宽距离后,浓度衰减至低于黑色素细胞再生的阈值,从而实现只促进黑细胞在纵向区域半条纹宽范围内增殖的效果,最终形成黑黄相间的条纹片段。总体来说,这样一个激活-抑制过程决定了体表条纹的宽度和走向,避免了色素细胞的混乱生长。

### 参 考 文 献

[1] Turing A M. The chemical basis of morphogenesis [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 1952, 237(641): 37-72.  
 [2] Gierer A, Meinhardt H. A theory of biological pattern formation[J]. Biological Cybernetics, 1972, 12(1): 30-39.  
 [3] Bard J B. A model for generating aspects of zebra and other mammalian coat patterns [J]. Journal of Theoretical Biology, 1981, 93(2): 363-385.  
 [4] Meinhardt H, Klingler M. A model for pattern formation on the shells of mollusks [J]. Journal of

Theoretical Biology, 1987, 126(7): 63-69.  
 [5] Kondo S, Asai R. A reaction-diffusion wave on the skin of the marine angelfish *Pomacanthus* [J]. Nature, 1995, 376(6543): 765-768.  
 [6] Garfinkel A, Tintut Y, Petrasek D, et al. Pattern formation by vascular mesenchymal cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(25): 9247-9250.  
 [7] Raspopovic J, Marcon L, Russo L, et al. Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients [J]. Science, 2014, 345(6196): 566-570.  
 [8] Economou A D, Ohazama A, Porntaveetus T, et al. Periodic stripe formation by a Turing-mechanism operating at growth zones in the mammalian palate [J]. Nature Genetics, 2012, 44(3): 348-352.  
 [9] El-Ali J, Sorger P K, Jensen K F. Cells on chips[J]. Nature, 2006, 442(7101): 403-411.  
 [10] Falconnet D, Csucs G, Grandin H M, et al. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays [J]. Biomaterials, 2006, 27(16): 3044-3063.  
 [11] Chen T H, Hsu J J, Zhao X, et al. Left-right symmetry breaking in tissue morphogenesis via cytoskeletal mechanics [J]. Circulation Research, 2012, 110(4): 551-559.  
 [12] Chen T H, Zhu X L, Pan L T, et al. Directing tissue morphogenesis via self-assembly of vascular mesenchymal cells[J]. Biomaterials, 2012, 33(35): 9019-9026.  
 [13] Irion U, Singh A P, Nüsslein-Volhard C. The developmental genetics of vertebrate color pattern formation: Lessons from zebrafish [J]. Current Topics in Development Biology, 2016, 117: 141-169.  
 [14] Nakamasu A, Takahashi G, Kanbe A, et al. Interactions between zebrafish pigment cells responsible for the generation of Turing patterns[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(21): 8429-8434.  
 [15] Yamanaka H, Kondo S. *In vitro* analysis suggests that difference in cell movement during direct interaction can generate various pigment patterns *in vivo* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(5): 1867-1872.  
 [16] Kondo S. An updated kernel-based Turing model for studying the mechanisms of biological pattern formation[J]. Journal of Theoretical Biology, 2017, 414: 120-127.