

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102266313 B

(45) 授权公告日 2013.02.06

(21) 申请号 201110126427.2

(22) 申请日 2011.05.17

(73) 专利权人 杭州环特生物科技有限公司

地址 311231 浙江省杭州市萧山经济技术开
发区传化大地浙江省农业高科技示范
园区

(72) 发明人 朱晓宇 李春启

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公
司 33109

代理人 林宝堂

(51) Int. Cl.

A61K 31/15(2006.01)

A61P 7/02(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

审查员 韩征

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 14 页

(54) 发明名称

建立斑马鱼血栓模型的方法

(57) 摘要

本发明涉及本发明属于药物筛选领域，具体涉及一种斑马鱼血栓模型的建立方法，包括(1)斑马鱼选取；(2)化合物处理：移除微孔板中的养殖用水，然后按照血栓诱导剂处理组、溶剂对照组、空白对照组，根据微孔板的规格分别加入相应的血栓诱导剂溶液、溶剂、养殖用水，接着将微孔板于28℃下恒温培养24–48小时，其中，血栓诱导剂溶液为浓度为10mM–30mM的苯肼溶液，溶剂为浓度为0.1%的酒精，(3)荧光显微镜定性分析或/和定量分析。本发明还提供了一种建立斑马鱼血栓模型筛选药物的方法。本发明的方法具有简便、快速、高效和高通量的特点。

1. 一种建立斑马鱼血栓模型的方法,其特征在于,所述的方法包括下述步骤:

(1) 斑马鱼选取

选取受精后 2-4 天的正常发育的斑马鱼,放入微孔板中;

(2) 化合物处理

移除微孔板中的养殖用水,然后按照血栓诱导剂处理组、溶剂对照组、空白对照组,根据微孔板的规格分别加入相应的血栓诱导剂溶液、溶剂、养殖用水,接着将微孔板于 28℃下恒温培养 24-48 小时,其中,血栓诱导剂溶液为浓度为 10mM-30mM 的苯肼溶液,溶剂为浓度为 0.1% 的酒精,

(3) 荧光显微镜定性分析或 / 和定量分析。

2. 根据权利要求 1 所述的一种建立斑马鱼血栓模型的方法,其特征在于,所述的荧光显微镜定性分析按照下述方法操作:

移除微孔板中的液体,根据微孔板规格加入浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼,然后用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上,接着置于荧光显微镜下观察斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

3. 根据权利要求 1 所述的一种建立斑马鱼血栓模型的方法,其特征在于,所述的定量分析按下述步骤操作:

移除微孔板中的液体,根据微孔板规格加入邻联茴香胺染色液,然后将微孔板置于 28℃恒温培养 10-15min ;接着移除染色液,用 DMSO 快速清洗数遍,将斑马鱼转入新的微孔板中,根据微孔板规格加入 DMSO ;再将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上,最后置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存,再利用图像处理软件进行图像分析,计算心脏红细胞染色强度,血栓形成率计算公式如下:

$$\text{血栓形成率} (\%) = \left(1 - \frac{\text{血栓诱导剂处理组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度}} \right) \times 100\% \quad .$$

4. 根据权利要求 3 所述的一种建立斑马鱼血栓模型的方法,其特征在于,所述的邻联茴香胺染色液组成为含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精。

建立斑马鱼血栓模型的方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物筛选(评价)领域,具体涉及一种简便、经济、快速、高效、高通量的斑马鱼血栓模型的建立方法,并且利用该动物模型筛选抗血栓药物和评价药物的致血栓性。

背景技术

[0002] 血栓性疾病是一种血管内腔狭窄与闭塞引发的常见心脑血管病。血栓形成是造成脑卒中、冠心病、动脉粥样硬化等致残和致死率高的心脑血管疾病的主要病理基础。动脉血栓形成初期主要由血管内皮受损,血小板黏附和聚集所致,而静脉血栓一般由血流缓慢或瘀滞引起^[1]。

[0003] 随着人类生活环境和膳食习惯的变化,心、脑血管病的发病率和死亡率正逐年增高。据世界卫生组织(WHO)统计,全球每年平均有1700万人被心脑血管病夺走生命,占了世界总死亡人数的30%。我国是脑卒中高发病率国家,每年由高血压引致的脑血栓多达120万人,存活者中有75%的患者因病致残,40%以上为重度致残。

[0004] 据《2009-2010年中国抗血栓药市场研究分析预测报告》指出,抗血栓药物是年销售额数十亿美元的大市场,预计到2015全球新颖抗血栓药物创造的市场总价值将达到100亿美元左右。德国拜尔和法国赛诺菲-安万特引领抗血栓药物的市场,拜尔新药Rivaroxaban在2008年面市,成为凝血因子Xa抑制剂类的第一新药^[2]。百时美施贵宝公司销售的华法林(warfarin, Coumadin)^[3]以及赛诺菲安万特公司的氯吡格雷(clopidogrel, Plavix)是目前最畅销的两种抗血栓药物。华法林是一种口服抗凝剂,由DuPont公司(目前的百时美施贵宝公司)于20世纪40年代在美国上市。但是,华法林的使用剂量不当很可能引起过度抗凝及抗凝不足,分别表现为出血风险的提高及血栓形成风险的提高^[4]。Plavix能够预防曾发生过缺血性中风,血管栓塞,心梗发作或已有外周血管疾病的患者出现动脉粥样硬化。Plavix的缺点在于疗效不大。Lovenox(enoxaparin)也是由赛诺菲安万特推出,该药在全球抗栓药物中占据着很重要的地位。Pletalal(cilostazole)属于磷酸二酯酶抑制剂,具有抗血小板凝集及扩张血管作用,主要用于治疗间歇性跛行;该药也在巴西获批用于预防中风,在日本上市用于治疗复发性脑梗塞。专家认为,近年来临床在血栓治疗上取得的实质性进展很小,在这方面,备受关注的当属阿斯利康公司的血栓因子靶向抑制剂Exanta(ximelagatran)。Exanta已在许多欧盟国家上市用于大型整形术中静脉血栓形成的短期预防,但FDA因安全性及疗效问题对该药的推迟批准使得分析人士认为其上市后未必会一帆风顺。抗血栓药物市场的潜力是巨大的,谁填补了这个空白无疑将获得巨大的利润回报。

[0005] 药物筛选是发现、开发药物过程中一个重要的环节,实验动物血栓模型的建立对评价与筛选抗血栓药物至关重要。目前建立血栓模型的方法主要有:(1)体外血栓形成法:该法由Chandler提出,系在体外旋转圆环内模拟体内的血流状态以形成血栓^[5];(2)半体内血栓形成法:血流中的血小板接触旁路循环中的丝线粗糙面时,发生黏附、聚集,血小板

聚集物环绕丝线表面形成血栓^[6]；(3) 机械损伤法：机械损伤血管内膜后，使内皮细胞外基质裸露，促使血小板与胶原接触而被激活和黏附，启动凝血过程，导致血栓形成^[7]；(4) 电流损伤法：利用电刺激，破坏局部血管，使血管内膜损伤，促使血小板黏附聚集从而形成血栓^[8]；(5) 动脉异物法：动脉管腔狭窄形成湍流以及异物的诱导，均可激活血小板，使其黏附性和聚集性增加，血小板黏附于受损内膜下的胶原和异物，激活凝血途径形成血栓^[9]；(6) 结扎法：该法常用于制备下腔静脉血栓模型，静脉结扎后，引起局部血流瘀滞、低氧，导致血管内皮损伤，启动凝血系统，从而导致静脉血栓形成^[10]；(7) 光化学法：将光敏物质引入机体后在特定波长光线的照射下，发生光化学反应而产生单线态氧等活性氧，继而损伤血管内皮细胞，激发血小板聚集而形成血栓^[11]。

[0006] 研究表明以上的一些方法虽然是经典的血栓模型的制备方法，但有很多的弊端和局限性^[12-15]。体外血栓形成法和半体内血栓形成法所需费用较低，但缺少了生物整体的循环转换和药物在体内的循环分布，不能真正反映药物的整体生物活性。机械损伤法对动物创伤大且实验操作复杂^[13]。结扎法建立的血栓模型可靠，效果较为满意且可用于各种动物，但造模的手术操作过程繁琐，对动物创伤较大，且静脉血管很薄，在操作中易损伤而引发大出血^[14]。光化学法、电流损伤法制作方法复杂，技术要求高，造价昂贵。动脉异物法需从颈部入路，手术创伤大，对动物生理指标影响不可忽视^[13]。这些方法均较为复杂，不易控制血栓形成的程度，且与人类血栓形成的病理过程相距较远。

[0007] 常用于血栓模型研究的动物有犬、猪、兔、大鼠等。大鼠由于血管较细，动脉插管困难而较少运用。犬、猪在技术操作上显然不存在此问题，但往往受场地、经费等限制不宜大量饲养，从而影响研究中多组设计，给研究带来不利^[16]。兔的抵抗力差，造模周期过长（一般需要8周以上），易导致兔的继发性感染死亡从而影响实验的稳定性。这些动物模型均存在造模操作复杂、技术要求高、手术创伤大、血栓形成发生率低、并发症和死亡率高、模型建立不稳定、可重复性差等缺点^[17-19]，不利于后续抗血栓药物的评价与筛选工作，且实验周期长、费用高、工作量大。

[0008] 近年来化学药物诱导血栓形成法被广泛应用，其原理是利用化学物质损伤血管内膜，促进血小板黏附、聚集和促进血管活性物质的释放，形成闭塞性血栓^[20]。这是一种原位血栓形成的方法，能较好地模拟人类血栓形成的发病过程，为抗血栓药物的评价与筛选工作提供了较好的途径。Kuzz等^[21]首次报道了FeCl₃诱导的大鼠颈总动脉血栓形成模型，实验结果显示这种模型可靠、形成简便、快捷，血栓模型成功率100%，而且可以控制血栓形成的程度。但是该动物模型技术要求高、手术创伤大、并发症和死亡率高、容易引起血管痉挛等^[22]。

[0009] 为评价与筛选抗血栓药物，首先必须建立一种比较理想的动物血栓模型。本发明利用化学药物苯肼诱导活体斑马鱼血栓模型。苯肼能够损伤血管内膜，促进血小板黏附、聚集及血管活性物质的释放^[23]。斑马鱼具有凝血因子、血小板受体，已经应用于血小板功能与血栓形成的遗传实验研究^[23-26]。与传统的体内和体外筛选模型相较，活体斑马鱼筛选模型具有诸多优势，克服了原有体外模型在吸收、分布、代谢和排泄环节验证的欠缺及传统体内筛选模型实验周期长、成本高的弊端。与线虫、果蝇相比，斑马鱼是一种脊椎动物，与人类基因高度相似，经英国专家的基因预测发现，斑马鱼的基因与人类基因的相似度高达85%左右，实验结果可比性强。与鼠类等哺乳动物相比，斑马鱼胚胎透明，可同时观察分析多个

器官,实验周期短,样本容量大,结果可信度高,所需费用低^[27]。更重要的是,斑马鱼具有与生俱来的优点^[27-28]:1)饲养成本低,性成熟周期短;2)繁殖能力强,一尾雌鱼每次可产200~300枚卵;3)生长发育速度快,在受精24h后,斑马鱼主要的组织器官原基已形成,可为研究提供大量的样本和较短的实验周期;4)胚胎及幼鱼透明,体外受精,体外发育,可直接观察,并可同时分析多个器官系统;5)胚胎有可以提供营养的卵黄,第一周内不需喂食,可避免化合物处理时化合物与食物成份的相互作用;6)胚胎很小,幼鱼体长只有1-4mm,能够在标准的6、12、24、48或96孔板内进行分析;7)给药方式简单:溶于水的小分子物质可直接经皮肤、鳃及消化系统进入斑马鱼体内;不溶于水的物质、大分子物质及蛋白质可进行显微注射。因此斑马鱼可作为很好的血栓模型的研究材料。

[0010] 目前利用斑马鱼研究血栓的报道很少,并且大多集中在对与血栓形成相关的因子进行遗传学分析方面^[29-31]。Gregory等^[23]首先用FeCl₃和激光照射处理斑马鱼诱导血栓形成,然后采用两种筛选策略检测与血栓形成相关的新基因,最后对与血栓形成相关的基因进行了遗传学分析。该研究经FeCl₃和激光照射诱导形成的血栓分析过程复杂,细胞离体后缺少了生物整体的代谢循环转换和体内的循环分布,不能真正反映整体生物活性。值得一提的是,该篇文章中也尝试用苯肼诱导斑马鱼血栓,但并未成功,失败可能与作者选用斑马鱼发育阶段、处理时间及化合物剂量不当等有关。与该研究相比,我们利用苯肼诱导血栓模型的过程中对斑马鱼发育阶段、处理时间及化合物剂量进行了广泛优化。该项研究同时申请了公开号分别为US2005/0120392A1和US2005/0244808A1两项发明专利,专利写作中只提到利用FeCl₃和激光照射诱导血栓模型,并未涉及苯肼。该研究血栓分析方法虽然有效,但所需费用较高、实验周期较长、生物学功能较差、相对纯度较低、难以避免非特异性影响,从而产生假阳性或假阴性结果。Jagadeeswaran P等^[32]首先建立了斑马鱼止血(hemostasis)模型,然后采用一系列的方法分离止血突变体,同时提供了研究止血模型的基因敲除术。该项研究属分子水平方面,同样缺少了生物整体的循环转换和药物在体内的循环分布,且实验操作复杂,实验周期长,实验费用高,并不适合抗血栓药物的筛选。

发明内容

[0011] 针对上述现有技术存在的缺点和不足,本发明的目的首先在于提供一种建立斑马鱼血栓模型的方法。第二个目的提供一种建立斑马鱼血栓模型筛选抗栓/致栓药物的方法,可以简便、快速、高效和高通量实现对抗血栓药物的抗血栓性的定性或/和定量评价或者对致栓药物的致栓性的定性或/和定量评价。

[0012] 为实现本发明的目的,发明人提供如下技术方案:

[0013] 发明概述

[0014] 发明人首先提供了一种建立斑马鱼血栓模型的方法,包括下述步骤:

[0015] (1) 斑马鱼选取

[0016] 选取受精后2-4天的正常发育的斑马鱼,放入微孔板中;

[0017] (2) 化合物处理

[0018] 移除微孔板中的养殖用水,然后按照血栓诱导剂处理组、溶剂对照组、空白对照组,根据微孔板的规格分别加入相应的血栓诱导剂溶液、溶剂、养殖用水,接着将微孔板于28°C下恒温培养24-48小时,其中,血栓诱导剂溶液为浓度为10mM-30mM的苯肼溶液,溶剂

为浓度为 0.1% 的酒精，

[0019] (3) 荧光显微镜定性分析或 / 和定量分析。

[0020] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型的方法，其中，所述的养殖用水符合下述规格：溶解氧质量容量浓度为 6–8mg/L，水温为 28℃，pH 为 7.2–7.6，总硬度为 200–250mg/L。

[0021] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型的方法，其中，所述的荧光显微镜定性分析按照下述方法操作：

[0022] 移除微孔板中的液体，根据微孔板规格加入浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼，然后用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上，接着置于荧光显微镜下观察斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0023] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型的方法，其中，所述的定量分析按下述步骤操作：

[0024] 移除微孔板中的液体，根据微孔板规格加入邻联茴香胺染色液，然后将微孔板置于 28℃ 恒温培养 10–15min；接着移除染色液，用 DMSO（二甲基亚砜）快速清洗数遍，将斑马鱼转入新的微孔板中，根据微孔板规格加入 DMSO；再将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上，最后置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存，再利用图像处理软件进行图像分析，计算心脏红细胞染色强度，血栓形成率计算公式如下：

$$[0025] 血栓形成率 (\%) = \left(1 - \frac{\text{血栓诱导剂处理组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度}} \right) \times 100\%。$$

[0026] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型的方法，其中，所述的邻联茴香胺染色液组成为含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精。

[0027] 发明人还提供了一种建立斑马鱼血栓模型筛选抗栓 / 致栓药物的方法，包括下述步骤：

[0028] (1) 斑马鱼选取

[0029] 选取受精后 2–4 天的正常发育的斑马鱼，放入微孔板中；

[0030] (2) 化合物处理

[0031] A 方案：移除微孔板中的养殖用水，然后按照待测化合物组合处理组、血栓模型组、阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组，根据微孔板的规格分别加入相应的血栓诱导剂溶液 +0.1–1000 μM 待测化合物溶液、血栓诱导剂溶液、血栓诱导剂溶液 +0.1–1000 μM 抗血栓药物溶液、溶剂、养殖用水，接着将微孔板于 28℃ 下恒温培养 24–48 小时，其中，血栓诱导剂溶液为浓度为 10mM–30mM 的苯肼溶液，溶剂为浓度为 0.1% 的酒精，或者

[0032] B 方案：移除微孔板中的养殖用水，然后按照待测化合物处理组、血栓形成阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组，根据微孔板的规格分别加入相应的 0.1–1000 μM 待测化合物溶液、血栓诱导剂溶液、溶剂、养殖用水，接着将微孔板于 28℃ 下恒温培养 24–48 小时，其中，血栓诱导剂溶液为浓度为 10mM–30mM 的苯肼溶液，溶剂为浓度为 0.1% 的酒精，

[0033] (3) 荧光显微镜定性分析或 / 和定量分析。

[0034] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型筛选抗栓 / 致栓药物的方法，其中，所述的 A 方案中：待测化合物组合处理组的加入采用同时添加的方式或者加入血

栓诱导剂苯肼 6-24h 后再加入待测化合物溶液的方式或者加入待测化合物溶液 6-24h 后再加入血栓诱导剂。

[0035] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型筛选抗栓 / 致栓药物的方法,其中,所述的养殖用水符合下述规格:溶解氧质量容量浓度为 6-8mg/L,水温为 28°C, pH 为 7.2-7.6,总硬度为 200-250mg/L。

[0036] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型筛选抗栓 / 致栓药物的方法,其中,所述的荧光显微镜定性分析按照下述方法操作:

[0037] 移除微孔板中的液体,根据微孔板规格加入浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼,然后用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上,接着置于荧光显微镜下观察斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0038] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型筛选抗栓 / 致栓药物的方法,其中,所述的步骤(2)化合物处理采用 A 方案后,步骤(3)定量分析按下述方法操作:

[0039] 移除微孔板中的液体,根据微孔板规格加入邻联茴香胺染色液,然后将微孔板置于 28°C 恒温培养 10-15min;接着移除染色液,用 DMSO (二甲基亚砜)快速清洗数遍,将斑马鱼转入新的微孔板中,根据微孔板规格加入 DMSO;再将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上,最后置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存,再利用图像处理软件进行图像分析,计算心脏红细胞染色强度,抗血栓药效计算公式如下:

$$[0040] \text{抗血栓药效} (\%) = \frac{\text{化合物组合处理组染色强度} - \text{血栓模型组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度} - \text{血栓模型组染色强度}} \times 100\%.$$

[0041] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型筛选抗栓 / 致栓药物的方法,其中,所述的步骤(2)化合物处理采用 B 方案后,步骤(3)定量分析按下述方法操作:

[0042] 移除微孔板中的液体,根据微孔板规格加入邻联茴香胺染色液,然后将微孔板置于 28°C 恒温培养 10-15min;接着移除染色液,用 DMSO (二甲基亚砜)快速清洗数遍,将斑马鱼转入新的微孔板中,根据微孔板规格加入 DMSO;再将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上,最后置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存,再利用图像处理软件进行图像分析,计算心脏红细胞染色强度,血栓形成率计算公式如下:

$$[0043] \text{血栓形成率} (\%) = (1 - \frac{\text{化学药物处理组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度}}) \times 100\%.$$

[0044] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼血栓模型筛选抗栓 / 致栓药物的方法,其中,所述的邻联茴香胺染色液组成为含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精。

[0045] 发明详述

[0046] 试剂及仪器:

[0047] 甲基纤维素胶(methyl cellulose)、阿司匹林购自美国 sigma 公司,碘吡酮、双嘧达莫、FeCl₃、苯肼和酒精均由北京鼎国昌盛科技有限公司提供;解剖显微镜(SMZ645, Nikon 公司, 日本);电动聚焦连续变倍荧光显微镜(AZ100, Nikon 公司, 日本)。

[0048] 一、建立斑马鱼血栓模型的方法,设计方案为:

[0049] (一)一种建立斑马鱼血栓模型的方法,包括:

[0050] 1 斑马鱼选取

[0051] 取 4 ~ 5 对斑马鱼亲本交配,按照 Westerfield^[33] 的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段(2dpf,是指斑马鱼受精后两天)的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入 6, 12, 24, 48, 96 或 384 孔微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0052] 2 化合物处理

[0053] 设置 7 个实验组 :5 个血栓诱导剂处理组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水(溶解氧质量浓度为 6~8mg/L;水温为 28°C; pH 为 7.2~7.6; 总硬度为 200~250mg/L, 下同), 血栓诱导剂处理组中加入一定体积(根据微孔板规格而定)浓度分别为 10mM、15mM、20mM、25mM、30mM 血栓诱导剂苯肼; 溶剂对照组中加入等体积 0.1% 的酒精; 空白对照组中加入等体积的养殖用水。按照最佳处理时间长度于 28°C 恒温培养箱中培养。

[0054] 3 定性分析

[0055] 移除微孔板中的液体,加入等体积浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼,用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0056] 溶剂对照组和空白对照组中尾静脉血流正常,无血栓形成。通过观察对比血栓诱导剂处理组中斑马鱼尾静脉血栓形成情况可定性确定斑马鱼血栓模型(如图 1)。从图 1 中可以看出,空白对照组斑马鱼尾静脉内无血栓形成(左图),血栓诱导剂处理后斑马鱼尾静脉内有大量血栓形成(右图)。

[0057] 4 定量分析

[0058] 本发明研究人员发现尾静脉血栓长度与心脏红细胞数(红细胞染色强度)成反比,两者之间呈明显的相关性(相关系数 $r > 95\%$)(见图 2、图 3),因此通过定量斑马鱼心脏中的红细胞染色强度可对血栓进行定量评价。

[0059] 用邻联茴香胺染色液(含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精)对血栓诱导剂处理组、溶剂对照组、空白对照组进行染色,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0060] 移除微孔板中的液体,用移液枪吸取等体积邻联茴香胺染色液于微孔板中;

[0061] 将微孔板置于 28°C 恒温培养箱中培养 10 ~ 15min;

[0062] 取出微孔板,移除染色液,用 DMSO 快速清洗 3 遍;

[0063] 将斑马鱼转入新的微孔板中,加入等体积 DMSO。

[0064] 将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存(如图 4)。从图 4 看出,空白对照组心脏红细胞染色强度强(左图);血栓模型组由于形成血栓,心脏红细胞染色强度减弱(右图)。利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析,计算心脏红细胞染色强度(如图 5)。从图 5 看出,空白对照组心脏红细胞染色强度值很高;血栓模型组由于形成血栓,心脏红细胞染色强度值降至很低。血栓形成率计算公式如下:

[0065] 血栓形成率 (%) = $(1 - \frac{\text{血栓诱导剂处理组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度}}) \times 100\%$,

[0066] 例如:空白对照组与溶剂对照组染色强度均为 500, 血栓诱导剂处理组染色强度

分别为 450、400、300、200、100，则根据计算公式得：血栓诱导剂处理组血栓形成率分别为 10%、20%、40%、60%、80%（见图 6）。

[0067] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm SE$ 表示，多组间比较采用方差分析(ANOVA)，两组间比较采用 Dunnett's T-检验进行统计学处理， $p < 0.05$ 为差异性显著。根据统计学处理结果可定量确定斑马鱼血栓模型。

[0068] (二)、确定斑马鱼最佳处理阶段

[0069] 1 斑马鱼选取

[0070] 将 2dpf、3dpf、4dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察，挑取发育正常的斑马鱼分别移入三个 6 孔板中，每孔 30 尾。（注：本发明中的 dpf=day post fertilization，中文是指斑马鱼受精后天数，如 2dpf 是指斑马鱼受精后两天。）

[0071] 2 化合物处理

[0072] 设置 3 个实验组（每组分别为 2dpf、3dpf、4dpf 的斑马鱼），每个实验组包括 1 个血栓诱导剂处理组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水，血栓诱导剂处理组中加入 3mL 20mM 的苯肼；溶剂对照组中加入 3mL 0.1% 的酒精；空白对照组中加入 3mL 养殖用水，于 28℃ 恒温培养箱中培养。

[0073] 3 定性分析

[0074] 移除微孔板中的液体，加入 3mL 浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼，用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后，置于荧光显微镜下观察各年龄组斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0075] 溶剂对照组和空白对照组中尾静脉无血栓形成。随着斑马鱼年龄的增加，血栓诱导剂处理组斑马鱼尾静脉血栓不断减少，2dpf 的斑马鱼血栓形成最多（见图 7）。从图 7 可以看出，空白对照组尾静脉无血栓形成（左一）；与 3dpf、4dpf 斑马鱼组尾静脉血栓形成相比，2dpf 斑马鱼组尾静脉内血栓形成最多（左二）。因此，定性确定将 2dpf 的斑马鱼作为化合物最佳处理阶段。

[0076] 4 定量分析

[0077] 用邻联茴香胺染色液（含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精）对血栓诱导剂处理组、溶剂对照组、空白对照组进行染色，整个染色过程需避光操作，步骤如下：

[0078] 移除微孔板中的液体，用移液枪吸取 3mL 邻联茴香胺染色液于微孔板中；

[0079] 将微孔板置于 28℃ 恒温培养箱中培养 10 ~ 15min；

[0080] 取出微孔板，移除染色液，用 DMSO 快速清洗 3 遍；

[0081] 将斑马鱼转入新的 6 孔板中，加入 3mL DMSO。

[0082] 将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上后，置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存（见图 8）。从图 8 可以看出，空白对照组心脏红细胞染色强度强（左一）；与 3dpf、4dpf 斑马鱼组心脏红细胞染色强度相比，2dpf 斑马鱼组心脏红细胞染色强度最弱（左二）。利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析，计算心脏红细胞染色强度。血栓形成率计算公式如下：

[0083] 血栓形成率(%) = $(1 - \frac{\text{血栓诱导剂处理组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度}}) \times 100\%。$

[0084] 统计学处理结果以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 为差异性显著。统计学处理结果显示: 2dpf、3dpf、4dpf 的斑马鱼血栓形成率分别为 $(72.97 \pm 0.69)\%$ 、 $(70.18 \pm 0.98)\%$ 、 $(68.39 \pm 1.23)\%$ (见图 9), 这表明随着斑马鱼年龄的增加, 血栓形成率逐渐降低, 2dpf 的斑马鱼血栓形成率最高。通过方差分析, 血栓诱导剂处理组的血栓形成率明显高于溶剂对照组, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$), 且 2dpf 的斑马鱼 p 值最小。

[0085] (三)、确定化合物最佳处理时间长度

[0086] 1 斑马鱼选取

[0087] 将 2dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察, 挑取发育正常的斑马鱼分别移入五个 6 孔板中, 每孔 30 尾。

[0088] 2 化合物处理

[0089] 设置 5 个实验组, 每个实验组包括 1 个血栓诱导剂处理组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水, 血栓诱导剂处理组中加入 3mL 20mM 的苯肼; 溶剂对照组中加入 3mL 0.1% 的酒精; 空白对照组中加入 3mL 养殖用水。将五个微孔板放入 28°C 恒温培养箱中分别培养 6h、12h、24h、28h、48h。

[0090] 3 定性分析

[0091] 移除微孔板中的液体, 加入 3mL 浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼, 用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0092] 溶剂对照组和空白对照组中尾静脉血流正常无血栓形成。随着处理时间的延长, 6h、12h 斑马鱼血流减慢, 但无明显血栓形成; 24h、28h、48h 时斑马鱼尾静脉有血栓形成, 其中 28h、48h 血栓形成最大且两者无明显差异(见图 10)。从图 10 可以看出, 空白对照组尾静脉无血栓形成(左图); 28h 处理组尾静脉内有大量血栓形成(右图)。因此, 定性确定处理 28h 作为化合物最佳处理时间长度。

[0093] 4 定量分析

[0094] 用邻联茴香胺染色液(含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精)对血栓诱导剂处理组、溶剂对照组、空白对照组进行染色, 整个染色过程需避光操作, 步骤如下:

[0095] 移除微孔板中的液体, 用移液枪吸取 3mL 邻联茴香胺染色液于微孔板中;

[0096] 将微孔板置于 28°C 恒温培养箱中培养 10 ~ 15min;

[0097] 取出微孔板, 移除染色液, 用 DMSO 快速清洗 3 遍;

[0098] 将斑马鱼转入新的 6 孔板中, 加入 3mL DMSO。

[0099] 将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存(见图 11)。从图 11 可以看出, 空白对照组心脏红细胞染色强度强(左图), 28h 处理组由于形成血栓, 心脏红细胞染色强度减弱(右图)。利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析, 计算心脏红细胞染色强度。血栓形成率计算公式如下:

$$[0100] \quad \text{血栓形成率} (\%) = \frac{(1 - \frac{\text{血栓诱导剂处理组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度}})}{\text{空白对照组染色强度}} \times 100\%,$$

[0101] 统计学处理结果以 $\bar{x} \pm SE$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 为差异性显著。

[0102] 统计学处理结果显示: 血栓诱导剂处理 6h、12h、24h、28h、48h 的斑马鱼血栓形成率分别为 (12.56 ± 1.32)%、(31.18 ± 1.96)%、(60.45 ± 3.21)%、(71.58 ± 2.59)%、(70.97 ± 1.63)% (见图 12), 这表明随着处理时间的延长, 斑马鱼血栓形成率逐渐增高。通过方差分析, 血栓诱导剂处理组处理 24h、28h、48h 的血栓形成率显著高于溶剂对照组, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$), 但处理 28h 和 48h 血栓形成率无显著性差异 ($p > 0.05$), 因此选择处理 28h 作为化合物最佳处理时间长度。不同化合物最佳处理时间长度也不相同, 需要具体化合物具体分析, 本发明按照血栓诱导剂的最佳处理时间长度进行实验。

[0103] 二、建立斑马鱼血栓模型筛选抗栓 / 致栓药物的方法, 设计方案为:

[0104] (一) 建立斑马鱼血栓模型筛选和评价抗血栓药物的方法

[0105] 1 斑马鱼选取

[0106] 将处于最佳处理阶段 (2dpf) 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察, 挑取发育正常的斑马鱼移入 6, 12, 24, 48, 96 或 384 孔微孔板中, 根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0107] 2 化合物处理

[0108] 设置 9 个实验组: 5 个化合物组合处理组、1 个血栓模型组、1 个阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水, 5 个化合物组合处理组中分别加入一定体积 (根据微孔板规格而定) 的血栓诱导剂苯肼 + 0.1 μM、1 μM、10 μM、100 μM、1000 μM 的待测化合物溶液; 血栓模型组中加入血栓诱导剂苯肼; 阳性对照组中加入血栓诱导剂苯肼 + 抗血栓药物; 溶剂对照组中加入等体积浓度为 0.1% 的酒精; 空白对照组中加入等体积的养殖用水。按照最佳处理时间长度于 28°C 恒温培养箱中培养。

[0109] 本发明化合物组合处理组除了采用上述同时添加两种物质 (血栓诱导剂 + 待测化合物) 的方式, 另外, 本步骤的化合物组合处理组也可采用以下两种方式处理:

[0110] 第一: 加入血栓诱导剂 6 ~ 24h 后, 再加入终浓度分别为 0.1 μM、1 μM、10 μM、100 μM、1000 μM 的待测化合物溶液; (适用于评价与筛选血栓治疗药)

[0111] 第二: 首先加入终浓度分别为 0.1 μM、1 μM、10 μM、100 μM、1000 μM 的待测化合物溶液 6 ~ 24h 后, 再加入血栓诱导剂。 (适用于评价与筛选血栓预防药)

[0112] 3 定性分析

[0113] 移除微孔板中的液体, 加入等体积浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼, 用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0114] 溶剂对照组和空白对照组中尾静脉血流正常, 无血栓形成。血栓模型组中尾静脉血流减慢, 有血栓形成; 阳性对照组中血栓溶解。因此, 通过观察尾静脉血栓溶解情况可定性评价与筛选抗血栓药物 (如图 13)。从图 13 可以看出, 血栓模型组尾静脉内有大量血栓形成 (左图), 抗血栓药物处理后尾静脉血栓基本消失 (右图)。

[0115] 4 定量分析

[0116] 用邻联茴香胺染色液(含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精)对化合物组合处理组、血栓模型组、阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组进行染色,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0117] 移除微孔板中的液体,用移液枪吸取等体积邻联茴香胺染色液于微孔板中;

[0118] 将微孔板置于 28℃恒温培养箱中培养 10 ~ 15min;

[0119] 取出微孔板,移除染色液,用 DMSO 快速清洗 3 遍;

[0120] 将斑马鱼转入新的微孔板中,加入等体积 DMSO。

[0121] 将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存(如图 14)。从图 14 可以看出,空白对照组心脏红细胞染色强度强(左一);血栓模型组由于形成血栓,心脏红细胞染色强度减弱(左二);阳性对照组心脏红细胞染色强度恢复(右二);抗血栓药物处理后心脏红细胞染色强度恢复(右一)。利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析,计算心脏红细胞染色强度(如图 15)。从图 15 可以看出,空白对照组心脏红细胞染色强度值很高;血栓模型组心脏红细胞染色强度值降至很低;阳性对照组与血栓模型组相比,心脏红细胞染色强度值升高;化合物组合处理组与血栓模型组相比,心脏红细胞染色强度值升高。抗血栓药效计算公式为:

$$[0122] \text{抗血栓药效} (\%) = \frac{\text{化合物组合处理组染色强度} - \text{血栓模型组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度} - \text{血栓模型组染色强度}} \times 100\%,$$

[0123] 例如:我们评价了双嘧达莫(设置 5 个浓度,分别为 0.1μM、1μM、10μM、100μM、1000μM)的抗血栓药效。溶剂对照组与空白对照组染色强度均为 550,化合物组合处理组(双嘧达莫 + 苯肼共同处理)染色强度分别为 150、250、350、450、500,血栓模型组染色强度为 50,抗血栓阳性对照药物阿司匹林组染色强度为 400,则根据计算公式得:抗血栓阳性对照药物阿司匹林的药效为 70%,抗血栓药物双嘧达莫的药效分别为 20%、40%、60%、80%、90%(见图 16)。

[0124] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm \text{SE}$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 Dunnett's T- 检验进行统计学处理,p < 0.05 为差异性显著。通过统计学处理结果可定量评价与筛选抗血栓药物。

[0125] (二) 建立斑马鱼血栓模型筛选和评价致栓药物的方法

[0126] 1 斑马鱼选取

[0127] 将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入 6,12,24,48,96 或 384 孔微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0128] 2 化合物处理

[0129] 设置 8 个实验组:5 个化学药物处理组、1 个血栓形成阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,化学药物处理组中加入一定体积(根据微孔板规格而定)浓度分别为 0.1 μM、1 μM、10 μM、100 μM、1000 μM 待测化学药物;血栓形成阳性对照组中加入血栓形成诱导剂苯肼;溶剂对照组中加入等体积 0.1% 的酒精;空白对照组中加入等体积的养殖用水。按照最佳处理时间长度于 28℃恒温培养箱中培养。

[0130] 3 定性分析

[0131] 移除微孔板中的液体,加入等体积浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼,用 3% 甲基

纤维素胶固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0132] 溶剂对照组和空白对照组中尾静脉血流正常,无血栓形成。血栓形成阳性对照组中尾静脉有血栓形成;通过观察化学药物处理组中斑马鱼尾静脉血栓形成情况可定性评价药物是否能够诱导血栓形成(如图 17)。从图 17 可以看出,空白对照组尾静脉无血栓形成(左图);血栓形成阳性对照组尾静脉内有大量血栓形成(中图);化学药物处理组尾静脉内有血栓形成(右图)。

[0133] 4 定量分析

[0134] 用邻联茴香胺染色液(含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精)对化学药物处理组、血栓形成阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组进行染色,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0135] 移除微孔板中的液体,用移液枪吸取等体积邻联茴香胺染色液于微孔板中;

[0136] 将微孔板置于 28℃恒温培养箱中培养 10 ~ 15min;

[0137] 取出微孔板,移除染色液,用 DMSO 快速清洗 3 遍;

[0138] 将斑马鱼转入新的微孔板中,加入等体积 DMSO。

[0139] 将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存(如图 18)。从图 18 可以看出,空白对照组心脏红细胞染色强度强(左图);血栓形成阳性对照组由于形成血栓,心脏红细胞染色强度减弱(中图);化学药物处理组由于形成血栓,心脏红细胞染色强度减弱(右图)。利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析,计算心脏红细胞染色强度(如图 19)。从图 19 可以看出,空白对照组心脏红细胞染色强度值很高;血栓模型组心脏红细胞染色强度值降至很低;化学药物处理组心脏红细胞染色强度也降至很低。血栓形成率计算公式如下:

[0140]

$$\text{血栓形成率} (\%) = \left(1 - \frac{\text{化学药物处理组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度}} \right) \times 100\%$$

[0141] 例如:我们评价了 FeCl₃(设置 5 个浓度,分别为 0.1μM、1μM、10μM、100μM、1000μM)的致血栓性。溶剂对照组与空白对照组染色强度均为 500,化学药物处理组染色强度分别为 450、400、300、200、100,血栓形成阳性对照组染色强度为 100,则根据计算公式得:血栓形成阳性对照组血栓形成率为 80%;化学药物处理组血栓形成率分别为 10%、20%、40%、60%、80%(见图 20)。

[0142] 统计学处理结果以 $\bar{x} \pm SE$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 Dunnett's T-检验进行统计学处理, p<0.05 为差异性显著。根据统计学处理结果可定量评价药物的致血栓性。

[0143] 本发明与现有技术相比,具有以下优点:

[0144] 本发明提供的血栓模型具有制作简便、快速、成功率高、重复性好且稳定可靠等优点,降低了血栓模型制作成本,提高了实验研究结果的可靠性。本发明不仅提供一种活体斑马鱼血栓模型的建立方法,同时提供一种利用该模型筛选抗血栓药物和评价药物的致血栓性的方法。无论是斑马鱼血栓模型的建立过程还是应用技术,均可实现定性分析与定量分

析。通过观察尾静脉血流及血栓形成情况实现了定性分析,利用邻联茴香胺染色法对血栓进行定量分析是本发明独具特色的创新之处。与以往的动物血栓模型相比,本发明建立的活体斑马鱼血栓模型具有简便、快速、经济、高效、高通量等优点。具体地说,本发明具有如下优点:

[0145] ①活体内——实验材料为活体斑马鱼,作为一种脊椎动物,其筛选模型属体内模型,能够真实反映药物在体内的吸收、分布、代谢与排泄,真正反映药物的整体生物活性。

[0146] ②高通量——斑马鱼幼鱼很小,只有1~4毫米,能够在一个标准的6,12,24,48,96或384孔板内进行分析和实验周期短使斑马鱼成为一种能进行高通量自动化体内药物筛选的理想模型。

[0147] ③经济——所需费用低,以猴子为实验载体的筛选实验每只每天耗费大于10美元,以老鼠为实验载体的筛选实验每只每天耗费大于1美元,而以斑马鱼为实验载体的筛选实验每只每天耗费小于0.01美元。

[0148] ④化合物用量少——检测化合物用量少,通常只需几毫克,而传统的筛选实验则需几毫克以上的化合物。

[0149] ⑤简便——实验过程操作简单,斑马鱼经药物处理、染色后便可进行定量与定性分析,而传统实验操作过程复杂,容易产生假阳性结果。

[0150] ⑥快速——实验周期短,可在2~3天内完成;而老鼠常需要数周到数月的时间,猴子常需要数月至数年的时间。斑马鱼在第一个72小时以内完成胚胎发育。多数的内部器官,包括心血管系统、肠、肝脏和肾,在24~48小时内快速成型,传统的实验载体老鼠和猴子则分别需要21天和9个月方可完成胚胎发育。

[0151] ⑦高效——斑马鱼胚胎及幼鱼透明,可同时观察多个器官系统,实验分析方法简单、快速。

[0152] ⑧可靠的预测性——斑马鱼的基因与人类基因的相似度高达85%左右,其生物学功能与哺乳动物及人类高度相似,实验结果可比性强,预测性好。

[0153] ⑨直观性强——胚胎及幼鱼透明,可直接置于显微镜下观察血栓形成及溶栓情况。

[0154] ⑩敏感性高——苯肼损伤血管内膜,促进血小板黏附、聚集及血管活性物质释放的敏感性很高,本发明用很低浓度的苯肼即可诱导斑马鱼血栓形成。

[0155] ⑪稳定性高、重复性好——本发明重复实验十几次,所获实验结果基本相同。

附图说明

[0156] 图1是本发明血栓模型组斑马鱼尾静脉血栓形成图谱。

[0157] 图2是本发明血栓模型组斑马鱼尾静脉血栓长度与心脏红细胞染色强度之间的线性相关性图谱。

[0158] 图3是本发明各实验组斑马鱼尾静脉血栓长度与心脏红细胞染色强度之间的相关性图谱。

[0159] 图4是本发明血栓模型组斑马鱼心脏红细胞染色图谱。

[0160] 图5是本发明血栓模型组斑马鱼心脏红细胞染色强度。

- [0161] 图 6 是本发明浓度依赖的血栓诱导剂诱导的血栓形成率。
- [0162] 图 7 是本发明不同年龄组斑马鱼尾静脉血栓形成图谱。
- [0163] 图 8 是本发明不同年龄组斑马鱼心脏红细胞染色图谱。
- [0164] 图 9 是本发明不同年龄组斑马鱼血栓形成率。
- [0165] 图 10 是本发明 28h 处理组斑马鱼尾静脉血栓形成图谱。
- [0166] 图 11 是本发明 28h 处理组斑马鱼心脏红细胞染色图谱。
- [0167] 图 12 是本发明不同处理时间长度下的斑马鱼血栓形成率。
- [0168] 图 13 是本发明化合物组合处理组斑马鱼尾静脉血栓溶解图谱。
- [0169] 图 14 是本发明化合物组合处理组斑马鱼心脏红细胞染色图谱。
- [0170] 图 15 是本发明化合物组合处理组斑马鱼心脏红细胞染色强度。
- [0171] 图 16 是本发明浓度依赖的化合物抗血栓药效。
- [0172] 图 17 是本发明化学药物处理组斑马鱼血栓形成图谱。
- [0173] 图 18 是本发明化学药物处理组斑马鱼心脏红细胞染色图谱。
- [0174] 图 19 是本发明化学药物处理组斑马鱼心脏红细胞染色强度。
- [0175] 图 20 是本发明浓度依赖的化学药物诱导的血栓形成率。
- [0176] 图 21 是本发明 20 μ M 苯肼组斑马鱼尾静脉血栓形成图谱。
- [0177] 图 22 是本发明 20 μ M 苯肼组斑马鱼心脏红细胞染色图谱。
- [0178] 图 23 是本发明浓度依赖的苯肼诱导的血栓形成率。
- [0179] 图 24 是本发明 100 μ M 磺吡酮组斑马鱼尾静脉血栓溶解图谱。
- [0180] 图 25 是本发明 100 μ M 磺吡酮组斑马鱼心脏红细胞染色图谱。
- [0181] 图 26 是本发明浓度依赖的磺吡酮的抗血栓药效。
- [0182] 图 27 是本发明 100 μ M 双嘧达莫组斑马鱼尾静脉血栓溶解图谱。
- [0183] 图 28 是本发明 100 μ M 双嘧达莫组斑马鱼心脏红细胞染色图谱。
- [0184] 图 29 是本发明浓度依赖的双嘧达莫的抗血栓药效。
- [0185] 图 30 是本发明 100 μ M FeCl₃ 组斑马鱼尾静脉血栓形成图谱。
- [0186] 图 31 是本发明 100 μ M FeCl₃ 组斑马鱼心脏红细胞染色图谱。
- [0187] 图 32 是本发明浓度依赖的 FeCl₃ 诱导的血栓形成率。

具体实施方式

[0188] 下面结合实施例，更具体地说明本发明的内容。应当理解，本发明的实施并不局限于下面的实施例，对本发明所做的任何形式上的变通和 / 或改变都将落入本发明保护范围。

[0189] 在本发明中，若非特指，所有的设备和原料等均可从市场购得或是本行业常用的。下述实施例中的方法，如无特别说明，均为本领域的常规方法。

试剂及仪器：

[0191] 甲基纤维素胶(methyl cellulose)、阿司匹林购自美国 sigma 公司，磺吡酮、双嘧达莫、FeCl₃、苯肼和酒精均由北京鼎国昌盛科技有限公司提供；解剖显微镜(SMZ645, Nikon 公司, 日本)；电动聚焦连续变倍荧光显微镜(AZ100, Nikon 公司, 日本)。

[0192] 实施例 1 建立斑马鱼血栓模型的方法

[0193] 基于斑马鱼最佳处理阶段和化合物最佳处理时间长度,通过优化苯肼浓度建立活体斑马鱼血栓模型。设计方案如下:

[0194] 1 斑马鱼选取

[0195] 将 2dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼分别移入 48 孔板中,每孔 10 尾。

[0196] 2 化合物处理

[0197] 设置 7 个实验组 :5 个血栓诱导剂处理组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,血栓诱导剂处理组中加入 1mL 浓度分别为 10mM、15mM、20mM、25mM、30mM 血栓诱导剂苯肼;溶剂对照组中加入 1mL 0.1% 的酒精;空白对照组中加入 1mL 养殖用水。于 28℃ 恒温培养箱中培养 28h。

[0198] 3 定性分析

[0199] 移除微孔板中的液体,加入 1mL 浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼,用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0200] 溶剂对照组和空白对照组中尾静脉血流正常,无血栓形成。随着苯肼浓度的增加,血栓诱导剂处理组血流逐渐减慢直至停止。10mM、15mM 苯肼处理组斑马鱼血流减慢,但无明显血栓形成;20mM、25mM、30mM 苯肼处理组斑马鱼血栓形成最多且三者无明显差异。因此,定性确定将 20mM 苯肼处理组作为斑马鱼血栓模型组(见图 21)。从图 21 可以看出,空白对照组尾静脉无血栓形成(左图);20mM 苯肼组尾静脉内有大量血栓形成(右图)。

[0201] 4 定量分析

[0202] 用邻联茴香胺染色液(含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精)对血栓诱导剂处理组、溶剂对照组、空白对照组进行染色,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0203] 移除微孔板中的液体,用移液枪吸取 1mL 邻联茴香胺染色液于微孔板中;

[0204] 将微孔板置于 28℃ 恒温培养箱中培养 10min;

[0205] 取出微孔板,移除染色液,用 DMSO 快速清洗 3 遍;

[0206] 将斑马鱼转入新的 48 孔板中,加入 1mL DMSO。

[0207] 将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存(见图 22)。从图 22 可以看出,空白对照组心脏红细胞染色强度强(左图),20mM 苯肼组由于形成血栓,心脏红细胞染色强度减弱(右图)。利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析,计算心脏红细胞染色强度。血栓形成率计算公式如下:

[0208]

$$\text{血栓形成率} (\%) = \left(1 - \frac{\text{血栓诱导剂处理组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度}} \right) \times 100\%$$

[0209] 统计学处理结果以 \bar{x} \pm SE 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 Dunnett's T-检验进行统计学处理, p<0.05 为差异性显著。

[0210] 统计学处理结果显示:5 个血栓诱导剂处理组的斑马鱼血栓形成率分别为 (22.73 \pm 2.33)%、(45.25 \pm 3.12)%、(70.02 \pm 2.15)%、(70.17 \pm 3.14)%、(70.52 \pm 2.87)%

(见图 23)。这表明随着苯肼浓度的增加,血栓形成率先增高后逐渐减缓。通过方差分析,浓度为 20mM、25mM、30mM 的血栓诱导剂处理组血栓形成率显著高于溶剂对照组,差异有统计学意义($p<0.05$),而 20mM、25mM、30mM 的血栓诱导剂处理组之间无统计学差异($p>0.05$),因此定量确定将 20mM 苯肼处理组作为斑马鱼血栓模型组。

[0211] 实施例 2 利用斑马鱼血栓模型评价抗血栓药物

[0212] 1 斑马鱼选取

[0213] 将 2dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入 12 孔板中,每孔 20 尾。

[0214] 2 化合物处理

[0215] 设置 8 个实验组 :5 个化合物组合处理组、1 个血栓模型组、1 个阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,化合物组合处理组中分别加入 2mL 终浓度为 20mM 的苯肼 + 浓度分别为 0.1μM、1μM、10μM、100μM、1000μM 的磺吡酮(抗血栓药物);血栓模型组中加入 2mL 20mM 的苯肼;阳性对照组中加入 2mL 60 μM 的阿司匹林;溶剂对照组中加入 2mL 0.1% 的酒精;空白对照组中加入 2mL 养殖用水。于 28°C 恒温培养箱中共同处理 28h。

[0216] 3 定性分析

[0217] 移除微孔板中的液体,加入 2mL 浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼,用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0218] 溶剂对照组和空白对照组中尾静脉血流正常,无血栓形成。血栓模型组中尾静脉有血栓形成;随着磺吡酮浓度的增加,化合物组合处理组与血栓模型组相比尾静脉血栓形成逐渐减少,其中 100μM、1000μM 血栓形成最少且两者之间无明显差别(见图 24)。从图 24 可以看出,空白对照组尾静脉血流量正常(左一),血栓模型组尾静脉内有大量血栓形成(左二),阳性对照组尾静脉血栓基本消失(右二),100μM 磺吡酮组尾静脉血栓基本消失(右一)。因此,通过观察尾静脉血栓溶解情况可定性评价抗血栓药物磺吡酮的抗血栓药效。

[0219] 4 定量分析

[0220] 用邻联茴香胺染色液(含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、0.01M 醋酸钠、0.65%H₂O₂、40% 酒精)对化合物组合处理组、血栓模型组、阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组进行染色,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0221] 移除微孔板中的液体,用移液枪吸取 2mL 邻联茴香胺染色液于微孔板中;

[0222] 将微孔板置于 28°C 恒温培养箱中培养 15min;

[0223] 取出微孔板,移除染色液,用 DMSO 快速清洗 3 遍;

[0224] 将斑马鱼转入新的 12 孔板中,加入 2mL DMSO。

[0225] 将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存(见图 25)。从图 25 可以看出,空白对照组心脏红细胞染色强度强(左一);血栓模型组由于形成血栓,心脏红细胞染色强度减弱(左二);阳性对照组心脏染色强度比血栓模型组强(右二);抗血栓药物处理后心脏红细胞染色强度比血栓模型组强(右一)。利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析,计算心脏红细胞染色强度。抗血栓药效计算公式如下:

[0226]

$$\text{抗血栓药效}(\%) = \frac{\text{化合物组合处理组染色强度} - \text{血栓模型组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度} - \text{血栓模型组染色强度}} \times 100\%$$

[0227] 统计学处理结果以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 为差异性显著。通过统计学处理结果可定量评价磺吡酮的抗血栓药效。统计学处理结果显示: 阳性对照组阿司匹林的抗血栓药效为 $(63.56 \pm 2.31)\%$, 化合物组合处理组磺吡酮的抗血栓药效分别为 $(25.21 \pm 1.67)\%$ 、 $(34.33 \pm 2.17)\%$ 、 $(49.56 \pm 2.78)\%$ 、 $(65.57 \pm 1.88)\%$ 和 $(65.66 \pm 2.46)\%$ (见图 26)。

[0228] 实施例 3 利用斑马鱼血栓模型筛选抗血栓药物

[0229] 1 斑马鱼选取

[0230] 将 2dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察, 挑取发育正常的斑马鱼移入 96 孔板中, 每孔 1 尾。

[0231] 2 化合物处理

[0232] 设置 9 个实验组: 5 个化合物组合处理组、1 个血栓模型组、1 个阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水, 化合物组合处理组中分别加入 $150 \mu\text{L}$ 终浓度为 20mM 的苯肼 + 浓度分别为 $0.1\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $1000\mu\text{M}$ 的双嘧达莫(抗血栓药物); 血栓模型组中加入 $150 \mu\text{L}$ 20mM 的苯肼; 阳性对照组中加入 $150 \mu\text{L}$ $60 \mu\text{M}$ 的阿司匹林; 溶剂对照组中加入 $150 \mu\text{L}$ 0.1% 的酒精; 空白对照组中加入 $150 \mu\text{L}$ 养殖用水。于 28°C 恒温培养箱中共同处理 28h。

[0233] 3 定性分析

[0234] 移除微孔板中的液体, 加入 $150 \mu\text{L}$ 浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼, 用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0235] 溶剂对照组和空白对照组中尾静脉血流正常, 无血栓形成。血栓模型组中尾静脉有血栓形成; 阳性对照组中血栓溶解; 随着双嘧达莫浓度的增加, 化合物组合处理组与血栓模型组相比血栓形成逐渐减少(见图 27)。从图 27 可以看出, 空白对照组尾静脉血流量正常(左一), 血栓模型组尾静脉内有大量血栓形成(左二), 阳性对照组尾静脉血栓基本消失(右二), $100\mu\text{M}$ 双嘧达莫组尾静脉血栓基本消失(右一)。因此, 通过观察尾静脉血栓溶解情况可定性筛选双嘧达莫。

[0236] 4 定量分析

[0237] 用邻联茴香胺染色液(含 0.6mg/mL 邻联茴香胺、 0.01M 醋酸钠、 $0.65\%\text{H}_2\text{O}_2$ 、 40% 酒精)对化合物组合处理组、血栓模型组、阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组进行染色, 整个染色过程需避光操作, 步骤如下:

[0238] 移除微孔板中的液体, 用移液枪吸取 $150 \mu\text{L}$ 邻联茴香胺染色液于微孔板中;

[0239] 将微孔板置于 28°C 恒温培养箱中培养 15min;

[0240] 取出微孔板, 移除染色液, 用 DMSO 快速清洗 3 遍;

[0241] 将斑马鱼转入新的 96 孔板中, 加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO。

[0242] 将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并

保存(见图 28)。从图 28 可以看出,空白对照组心脏红细胞染色强度强(左一);血栓模型组心脏红细胞染色强度减弱(左二);阳性对照组心脏染色强度比血栓模型组强(右二); $100\mu\text{M}$ 双嘧达莫组心脏红细胞染色强度比血栓模型组强(右一)。利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析,计算心脏红细胞染色强度。抗血栓药效计算公式如下:

$$[0243] \quad \text{抗血栓药效}(\%) = \frac{\text{化合物组合处理组染色强度} - \text{血栓模型组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度} - \text{血栓模型组染色强度}} \times 100\%$$

[0244] 统计学处理结果以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 为差异性显著。通过统计学处理结果可定量筛选双嘧达莫。统计学处理结果显示:阳性对照组阿司匹林的抗血栓药效为 $(62.89 \pm 1.69)\%$,化合物组合处理组双嘧达莫的抗血栓药效分别为 $(24.56 \pm 3.98)\%$ 、 $(32.59 \pm 4.21)\%$ 、 $(43.77 \pm 3.96)\%$ 、 $(58.66 \pm 2.56)\%$ 、 $(58.98 \pm 2.33)\%$ (见图 29)。

[0245] 实施例 4 利用活体斑马鱼评价化学药物诱导的血栓形成

[0246] 化学物质损伤血管内膜,促进血小板黏附、聚集和促进血管活性物质的释放,形成闭塞性血栓^[20]。因此,可利用活体斑马鱼血栓模型评价化学药物诱导的血栓形成。

[0247] 1 斑马鱼选取

[0248] 将 2dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入 48 孔板中,每孔 10 尾。

[0249] 2 化合物处理

[0250] 设置 8 个实验组:5 个化学药物处理组、1 个血栓形成阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,化学药物处理组中分别加入 1mL 浓度分别为 $0.1\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $1000\mu\text{M}$ 的 FeCl_3 溶液;血栓形成阳性对照组中加入 1mL 20mM 的苯肼;溶剂对照组中加入 1mL 0.1% 的酒精;空白对照组中加入 1mL 养殖用水。于 28°C 恒温培养箱中培养 28h。

[0251] 3 定性分析

[0252] 移除微孔板中的液体,加入 1mL 浓度为 0.64mM 的甲磺酸麻醉斑马鱼,用 3% 甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼尾静脉血栓形成情况。

[0253] 溶剂对照组和空白对照组中尾静脉血流正常,无血栓形成。随着 FeCl_3 溶液浓度的增加,化学药物处理组斑马鱼血栓形成先增多后逐渐减缓。 $0.1\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 化学药物处理组血栓形成较少; $100\mu\text{M}$ 、 $1000\mu\text{M}$ 化学药物处理组血栓形成最多且两者无明显差异(见图 30)。从图 30 可以看出,空白对照组尾静脉无血栓形成(左图);血栓形成阳性对照组尾静脉内有大量血栓形成(中图); $100\mu\text{M}$ FeCl_3 组尾静脉内有血栓形成(右图)。因此,通过观察尾静脉血栓形成情况可定性评价 FeCl_3 的致血栓性。

[0254] 4 定量分析

[0255] 用邻联茴香胺染色液(含 $0.6\text{mg}/\text{mL}$ 邻联茴香胺、 0.01M 醋酸钠、 $0.65\%\text{H}_2\text{O}_2$ 、 40% 酒精)对化学药物处理组、血栓形成阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组进行染色,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0256] 移除微孔板中的液体,用移液枪吸取 1mL 邻联茴香胺染色液于微孔板中;

[0257] 将微孔板置于 28°C 恒温培养箱中培养 12min;

[0258] 取出微孔板, 移除染色液, 用 DMSO 快速清洗 3 遍;

[0259] 将斑马鱼转入新的 48 孔板中, 加入 1mL DMSO。

[0260] 将斑马鱼侧位放置于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下对心脏部位进行拍照并保存(见图 31)。从图 31 可以看出, 空白对照组心脏红细胞染色强度强(左图); 血栓形成阳性对照组由于形成血栓, 心脏红细胞染色强度减弱(中); 100 μ M FeCl₃ 组由于形成血栓, 心脏红细胞染色强度减弱(右图)。利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析, 计算心脏红细胞染色强度。血栓形成率计算公式如下:

[0261]

$$\text{血栓形成率} (\%) = \left(1 - \frac{\text{化学药物处理组染色强度}}{\text{空白对照组染色强度}} \right) \times 100\%$$

[0262] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm \text{SE}$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 为差异性显著。通过统计学处理结果可定量评价 FeCl₃ 的致血栓性。统计学处理结果显示: 血栓形成阳性对照组血栓形成率为 (72.89 ± 1.69)%, 化学药物处理组 FeCl₃ 诱导的血栓形成率分别为 (23.84 ± 2.07)%、(31.16 ± 1.98)%、(45.74 ± 2.54)%、(61.22 ± 1.78)%、(62.23 ± 2.87)% (见图 32)。化学药物处理组与溶剂对照组相比差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。

[0263] 由上述优选实施例可见: 本发明提供的活体斑马鱼血栓模型能够简便、快速、经济、高效、高通量、准确地筛选抗血栓药物和评价化合物的致血栓性。本发明提供的方法步骤简单, 成本低廉, 准确性高, 具有很好的稳定性和可靠性, 活体斑马鱼能够真正反映药物的整体生物活性, 包括药物的吸收、分布、代谢、排泄, 可实现高通量筛选。

[0264] 工业实用性

[0265] 应用活体斑马鱼血栓模型进行抗血栓药物筛选与药效评价具有可靠、快速、高效、高性价比等优点, 可实现抗血栓药物体内筛选高通量的目的。本发明对加速抗血栓药物的研发进程及血栓的预防和血栓病人的治疗意义重大。

[0266] 上述优选实施例只是用于说明和解释本发明的内容, 并不构成对本发明内容的限制。尽管发明人已经对本发明做了较为详细地列举, 但是, 本领域的技术人员根据发明内容部分和实施例所揭示的内容, 能对所描述的具体实施例做各种各样的修改或 / 和补充或采用类似的方式来替代是显然的, 并能实现本发明的技术效果, 因此, 此处不再一一赘述。本发明中出现的术语用于对本发明技术方案的阐述和理解, 并不构成对本发明的限制。

[0267] 参考文献

[0268] [1] 车薇, 李霞, 梁艳. 大鼠实验性血栓模型的建立及其应用 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28 (12): 1045 — 1050.

[0269] [2] 黄胜炎. 影响血液及造血系统新药 [J]. 上海医药, 2010, 31 (8): 371 — 373

[0270] [3] Zhao S L, Li P, Ji M, et al. Upper gastrointestinal hemorrhage caused by superwarfarin poisoning [J]. World Journal of Gastroenterology, 2010, 16 (13): 1680—1682.

[0271] [4] 赵春玉, 雷霆. 华法林抗凝疗效监测的相关问题分析 [J]. 中国医药指南,

2010,8 (7):106 — 107.

- [0272] [5] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1996, 569 — 571.
- [0273] [6] 张均田. 现代药理实验方法学 [M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999, 1216 — 1217.
- [0274] [7] 夏红梅. 建立动脉血栓模型的方法学及其应用的研究进展 [J]. 临床超声医学杂志, 2007, 9 (6):353 — 354.
- [0275] [8] Han G Z, Li X Y, Lu L, et al. Antithrombotic effects of veratrum nigrum var ussuricense alkaloids[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2003, 34(12): 1107-1110.
- [0276] [9] 潘伟民,叶红华,蒋建设. 冠状动脉血栓形成动物模型的建立 [J]. 临床心血管杂志, 2000, 16 (7):318 — 320.
- [0277] [10] Rhodes J M, Cho J S, Gloviczki P, et al. Thrombolysis for experimental deep venous thrombosis maintain valvular competence and vasoreactivity[J]. Vasc Surg, 2000, 31(6): 1193-1205.
- [0278] [11] 张敏,徐晓路,张剑. YAG 激光诱导光化学脑梗死溶栓动物模型 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26 (4):829 — 832.
- [0279] [12] 夏红梅,高云华,卞爱娜,等. 动脉血栓靶向超声显像的体内实验研究 [J]. 中国医学影像技术, 2007, 23 (1):13 — 16.
- [0280] [13] 冯敏,赵洪洋,刘莹莹,等. 家兔实验性血栓模型的建立及其检测 [J]. 临床心血管病杂志, 2009, 25 (10):781 — 783.
- [0281] [14] 张鹏,施海彬,刘圣,等. 犬下肢深静脉血栓模型的实验研究 [J]. 介入放射学杂志, 2006, 15 (5):299 — 302.
- [0282] [15] 王东生,陈方平,贺石林,等. 胶原包裹挂线法家兔动脉血栓形成模型的建立与评价 [J]. 中南大学学报(医学版), 2008, 33 (11):993 — 998.
- [0283] [16] 张明勤,冯广森,许立国,等. 一种新的血栓性兔脑梗死模型的建立 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009, 12 (13):48 — 50.
- [0284] [17] Kim D E, Schellinghout D, Jaffer F A, et al. Nearinfrared fluorescent imaging of cerebral thrombi and blood-brain barrier disruption in a mouse model of cerebral venous sinus thrombosis[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25: 226-233.
- [0285] [18] Klaus K, Thomas W, Saida Z, et al. New method of embolus preparation for standardized embolic stroke in rabbits[J]. Stroke, 2002, 33 (9):23-30.
- [0286] [19] Reza Jahan M D, Daphne Stewart M D, Harry V V, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rabbit using selective angiography: application for assessment of thrombolysis[J]. Stroke, 2008, 39(5): 1613-1615.
- [0287] [20] 任开环,吕莉,韩国柱. 血栓形成动物模型的研究概况 [J]. 医学导报, 2005, 24 (6):505 — 507.
- [0288] [21] Kurz K D, Ain B W, Sandusky G E. Rat model of arterial thrombosis

- induced by ferric chloride[J]. Thromo Res, 1990, 60(4): 269–280.
- [0289] [22] 魏汝云,徐婧婧,王淑贞. 基质金属蛋白酶-9与脑缺血损伤的关系研究进展[J]. 中国现代医学杂志,2007,17 :567.
- [0290] [23] Gregory M, Hanumanthaiah R, Jagadeeswaran P. Genetic analysis of hemostasis and thrombosis using vascular occlusion[J]. Blood cells, Molecules and Diseases, 2002, 29(3): 286–295.
- [0291] [24] Jagadeeswaran P, Sheehan J P, Craig F E, et al. Identification and characteriza- tion of zebrafish thrombocytes[J]. British Journal of Haematology, 1999, 107: 731–738.
- [0292] [25] Gregory M, Jagadeeswaran P. Selective labeling of zebrafish thrombocytes: qu- antitation of thrombocyte function and detection during development[J]. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2002, 28(3): 418–427.
- [0293] [26] Kim S, Carrillo M, Kulkarni V, et al. Evolution of primary hemostasis in early vertebrates[J]. Role of Trypsins in Hemostasis, 2009, 24(12): 1–10.
- [0294] [27] McGrath P, Li C Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J]. Drug Discover Today, 2008, 13(9): 394–401.
- [0295] [28] 殷梧,邹苏琪,王光辉,等. 模式动物斑马鱼在神经系统疾病研究中的应用[J]. 生命科学,2008,20 (5):773 — 777.
- [0296] [29] Jagadeeswaran P, Gregory M, Day K, et al. Zebrafish: a genetic model for hemostasis and thrombosis[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2005, 3: 46–53.
- [0297] [30] Thattaliyath B, Cykowski M, Jagadeeswaran P. Young thrombocytes initiate the formation of arterial thrombi in zebrafish[J]. Blood, 2005, 106: 118–124.
- [0298] [31] O'Connor M N, Salles I I, Nicholase A C, et al. Functional genomics in zebrafish permits rapid characterization of novel platelet membrane proteins[J]. Blood, 2009, 113: 4754–4762.
- [0299] [32] Jagadeeswaran P, Kulkarni V, Carrillo M, et al. Zebrafish: from hematology to hydrology[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007, 5(1): 300–304.
- [0300] [33] Westerfield M.. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish. Eugene, Oregon: The University of Oregon Press, 1993.

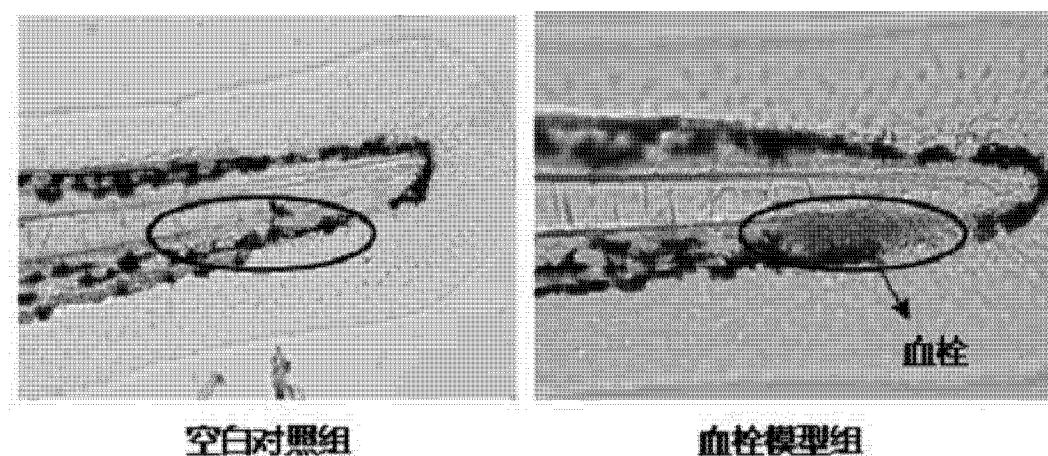


图 1

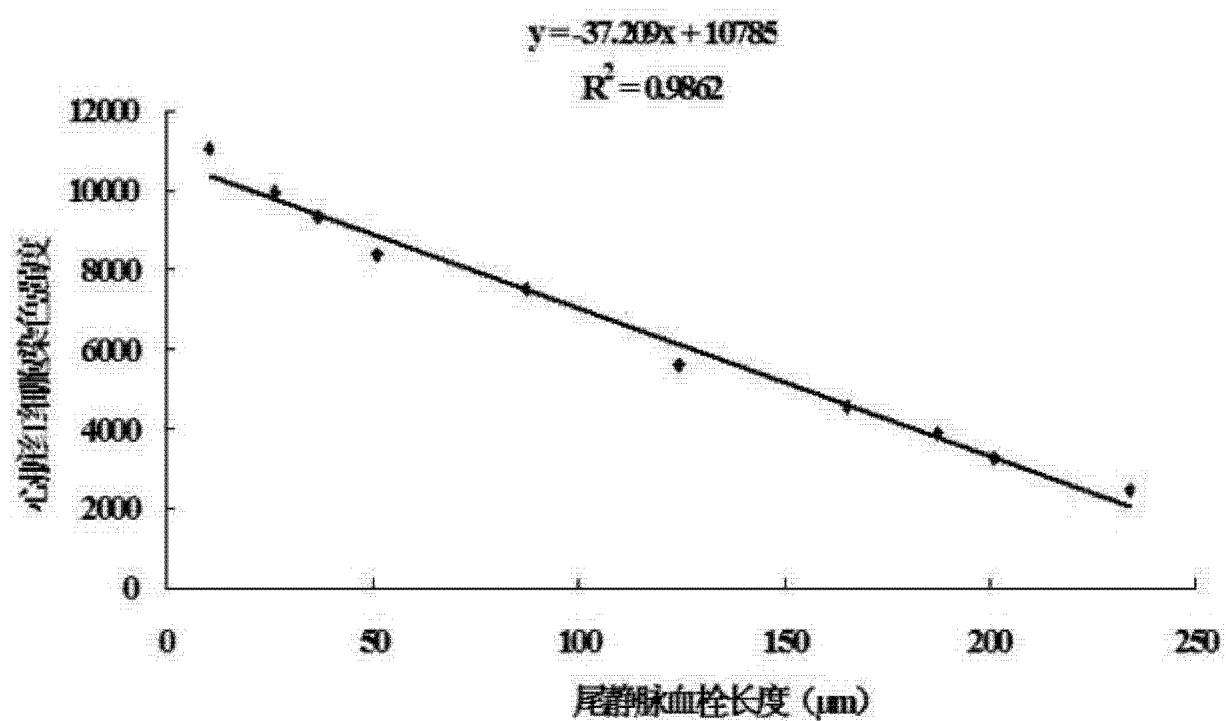


图 2

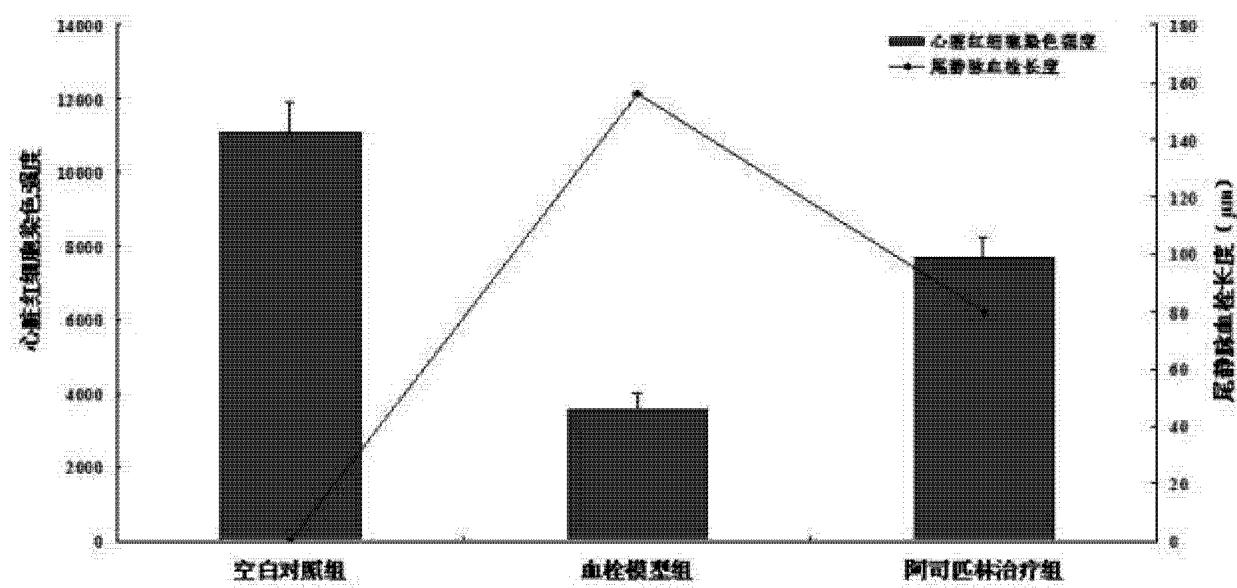


图 3

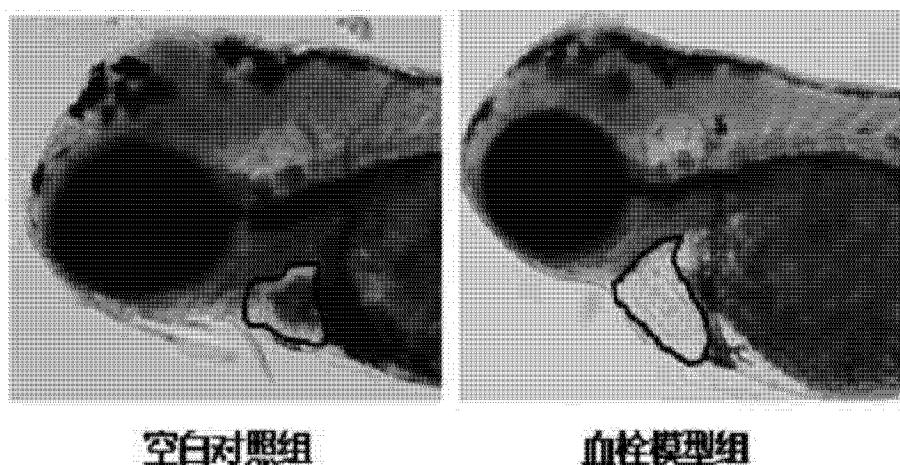


图 4

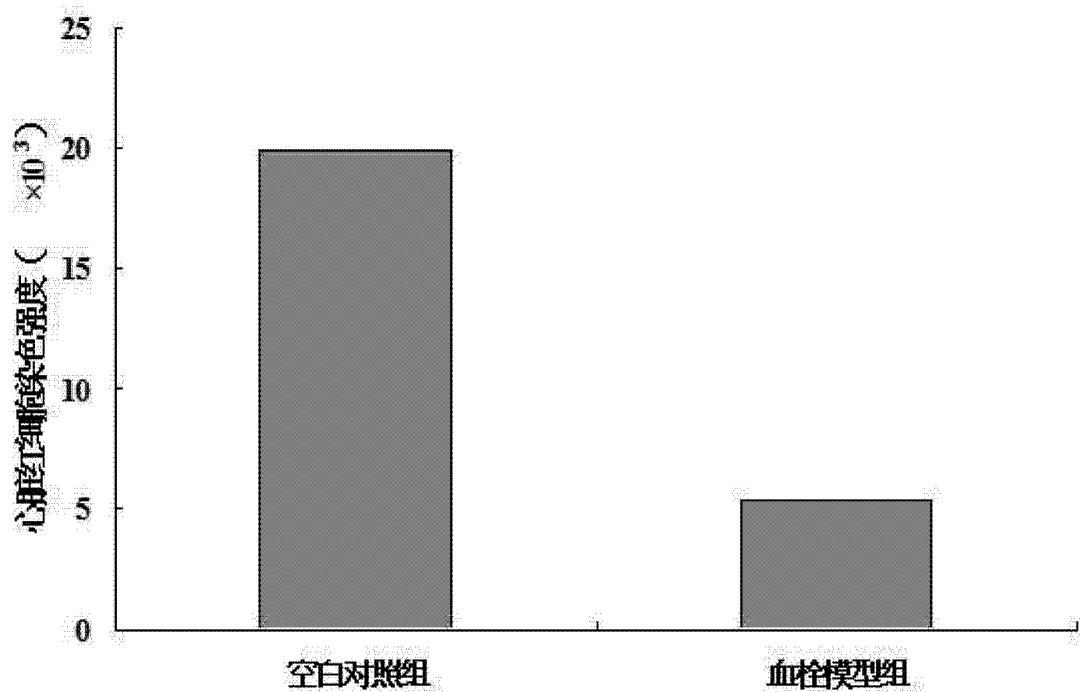


图 5

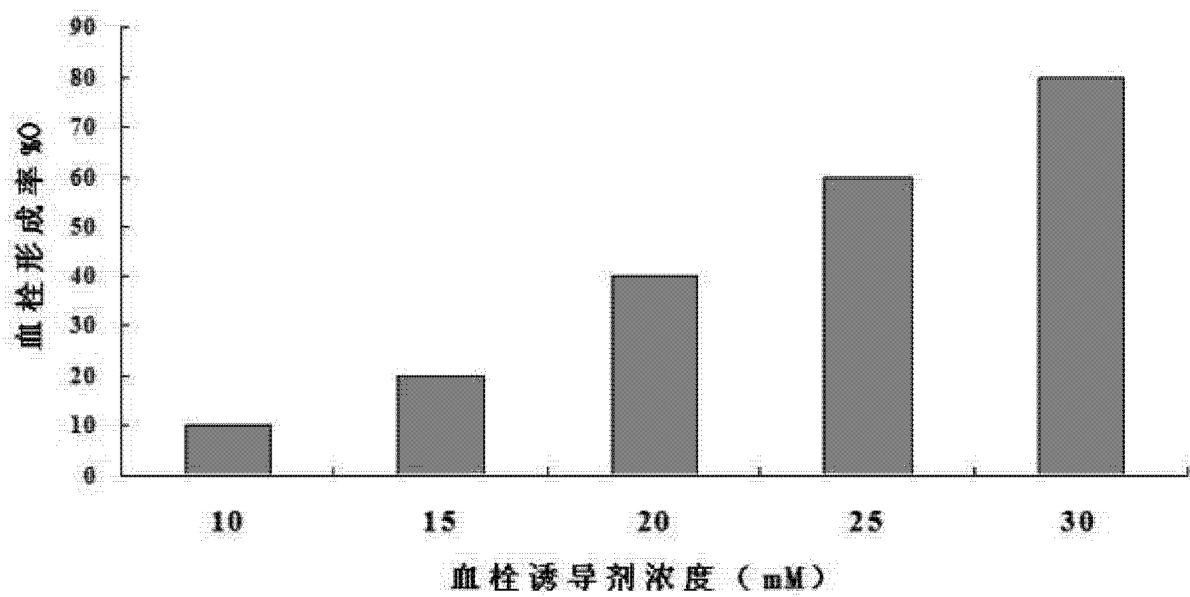


图 6

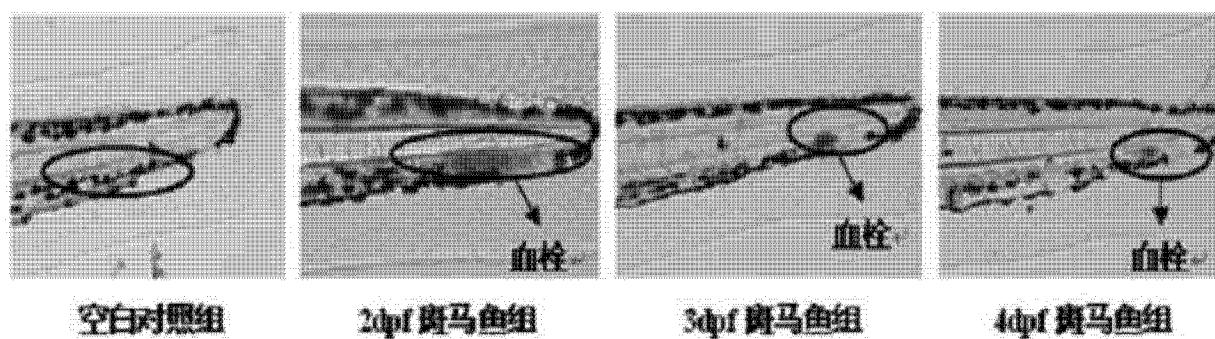


图 7

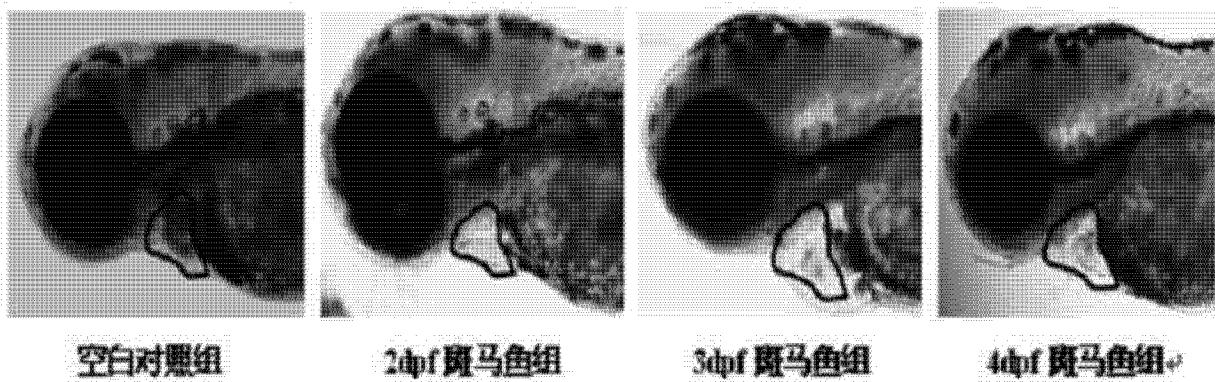


图 8

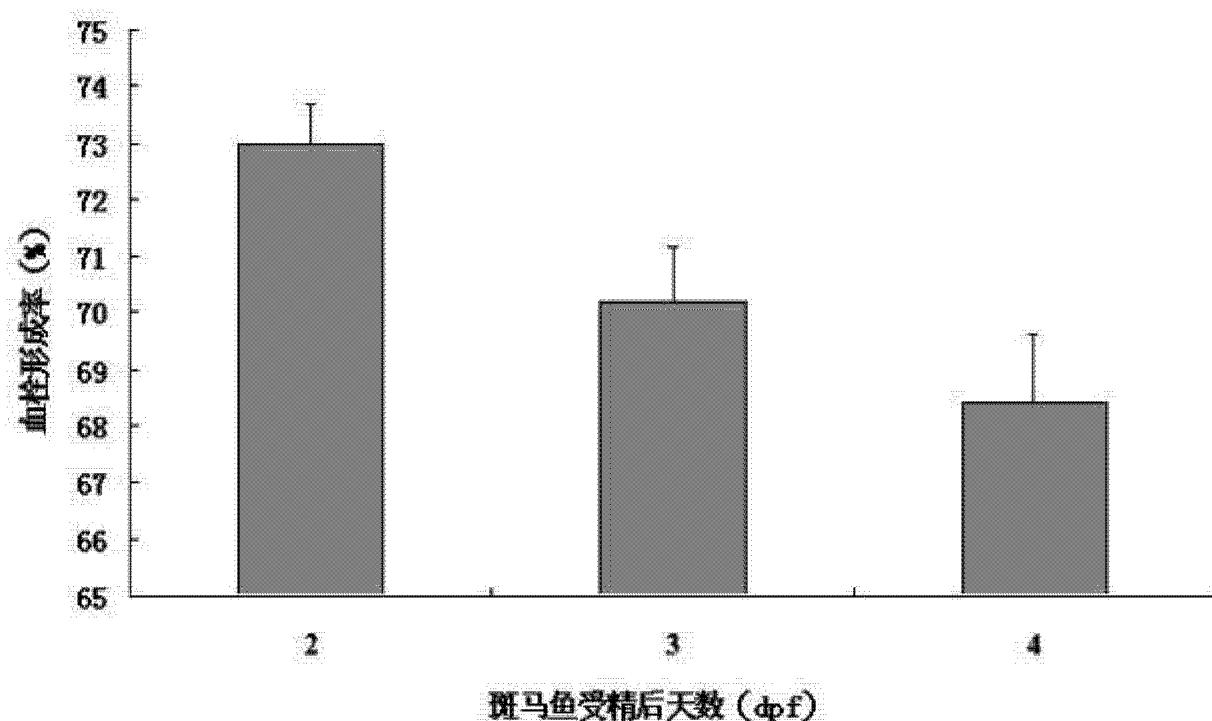


图 9

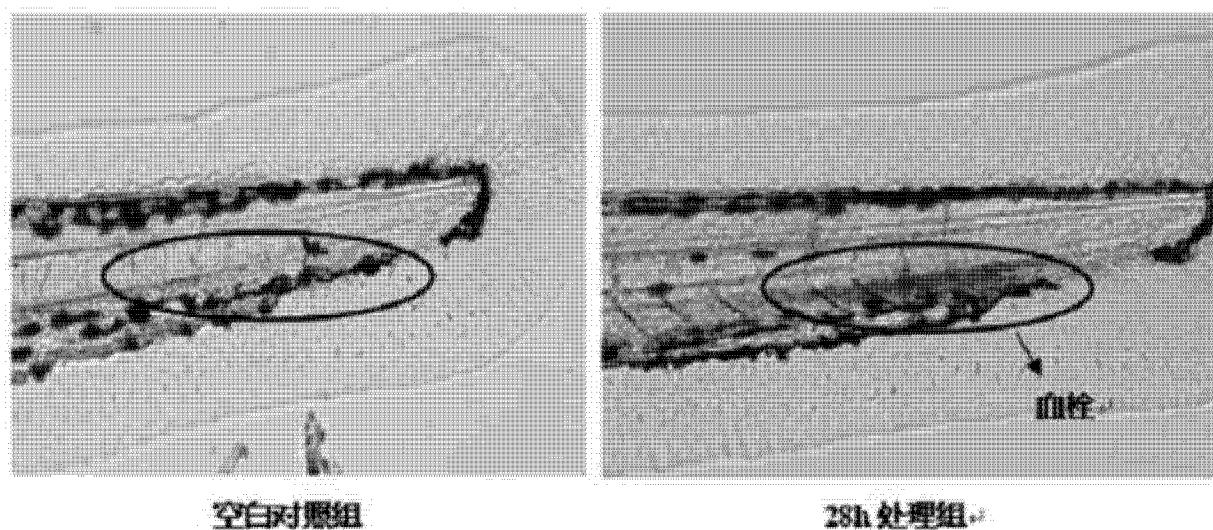


图 10

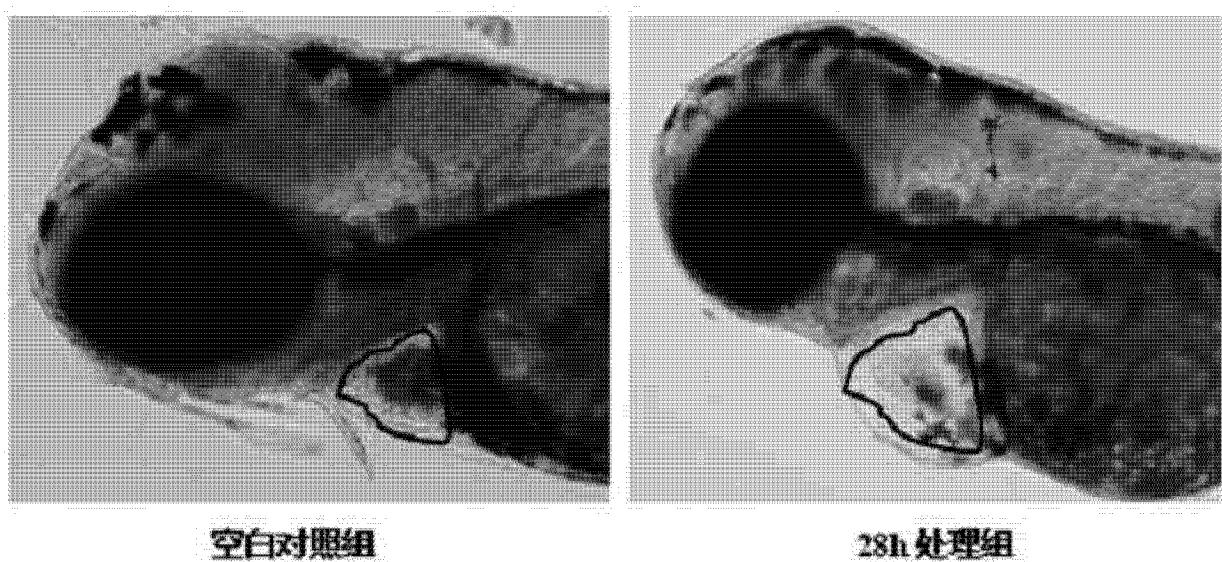


图 11

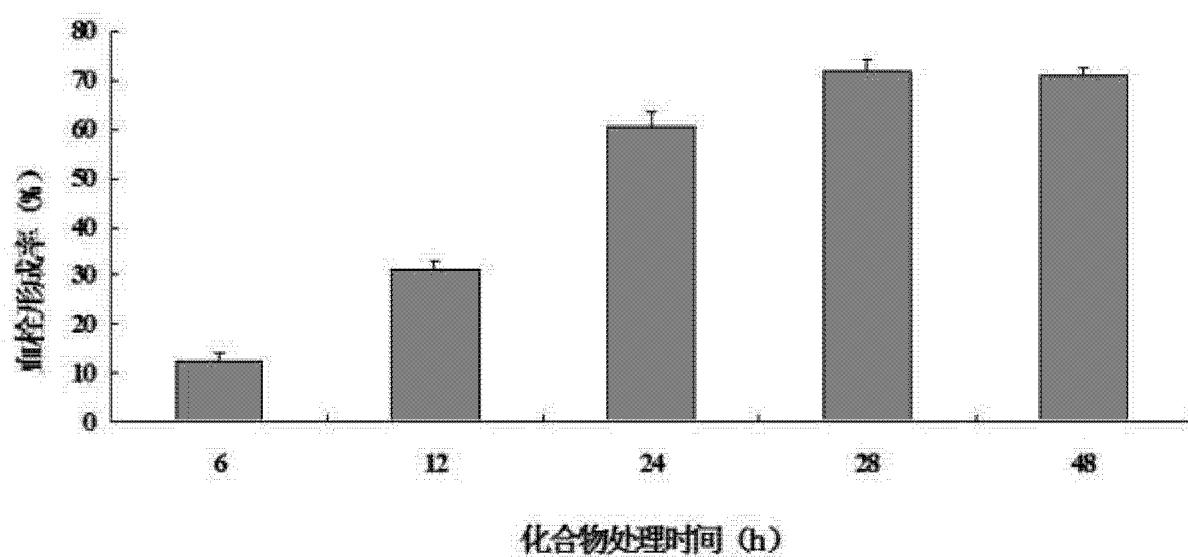


图 12

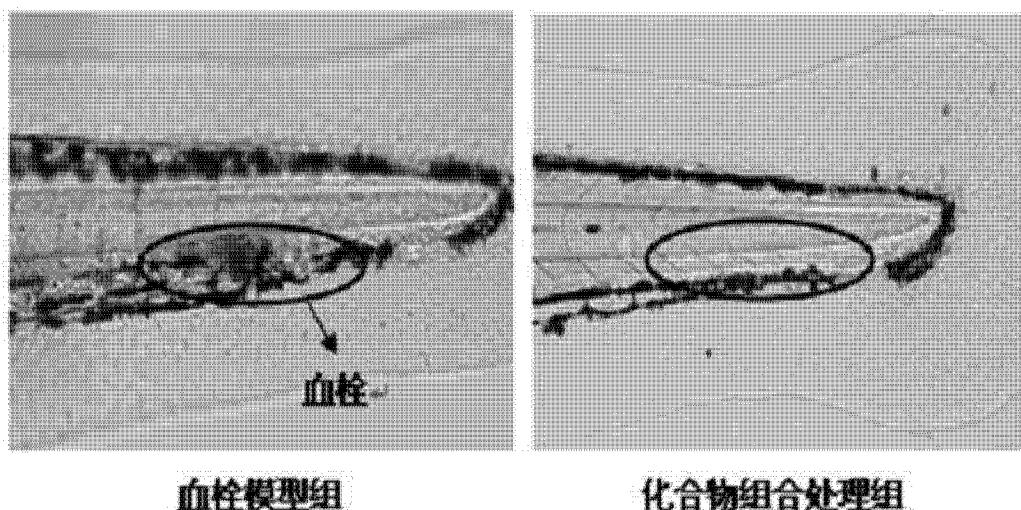


图 13

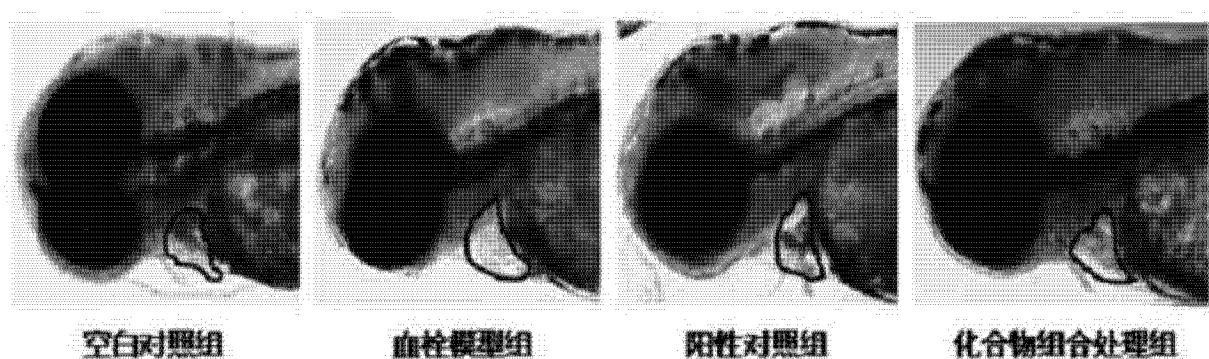


图 14

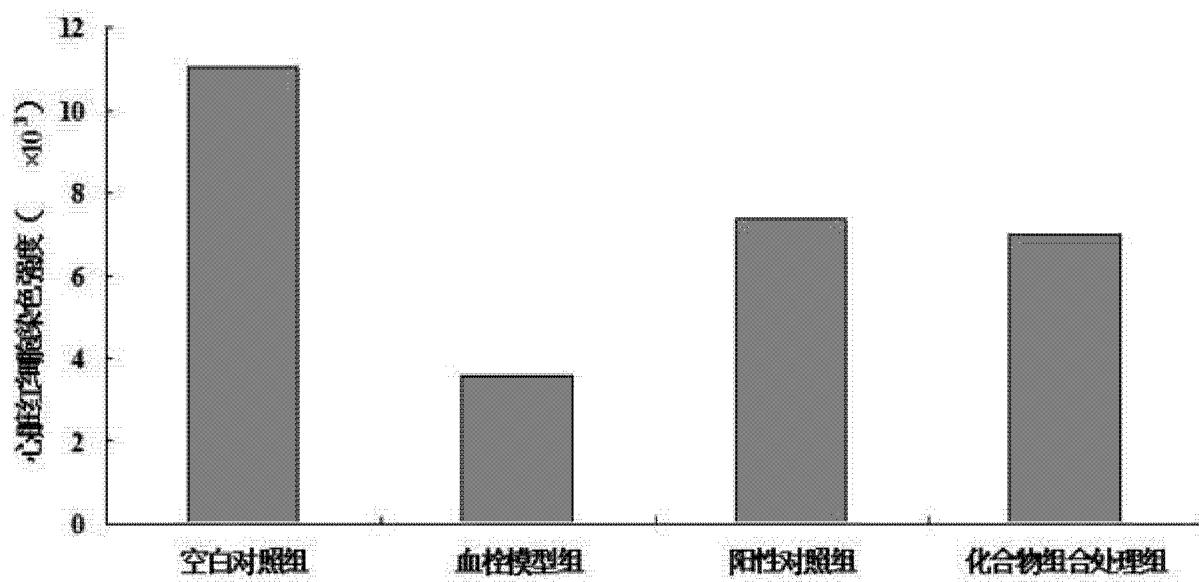


图 15

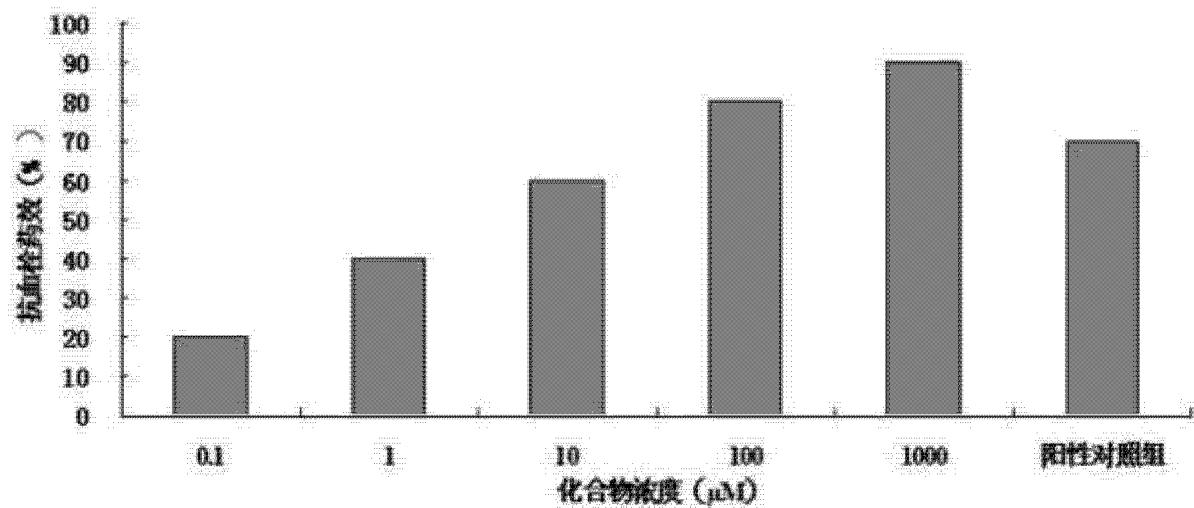


图 16

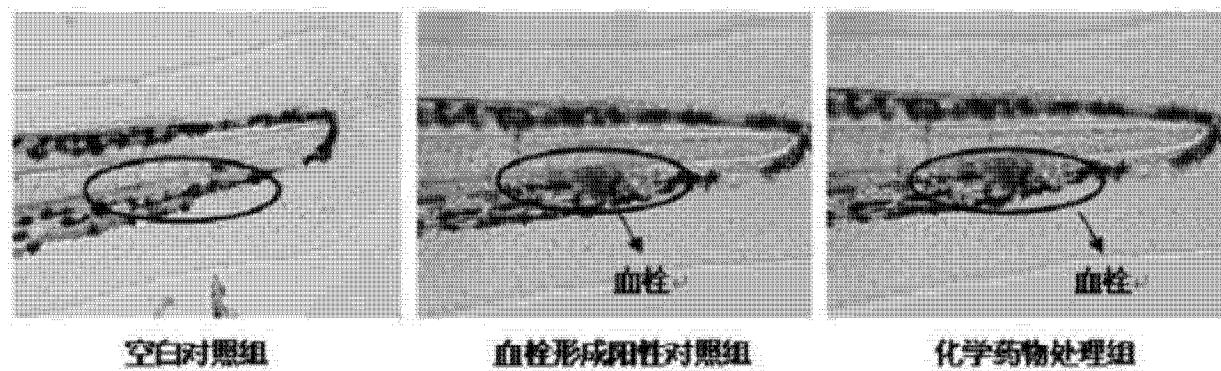


图 17

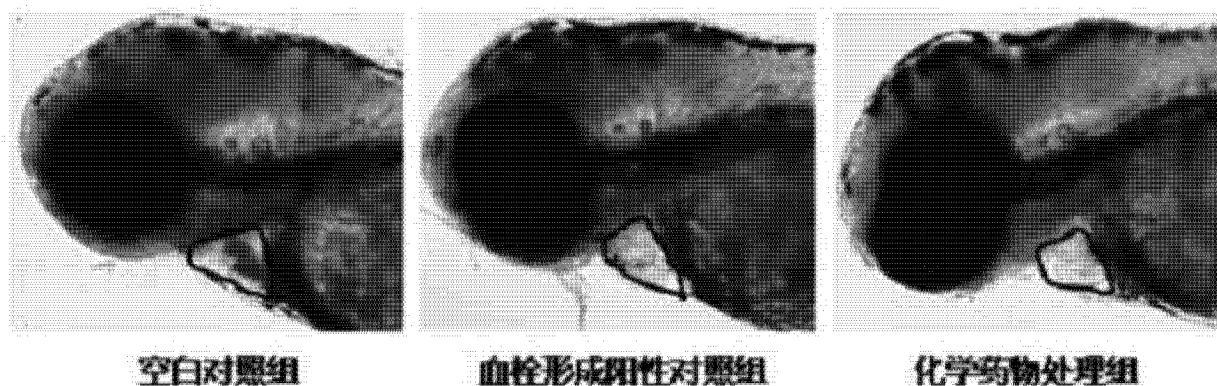


图 18

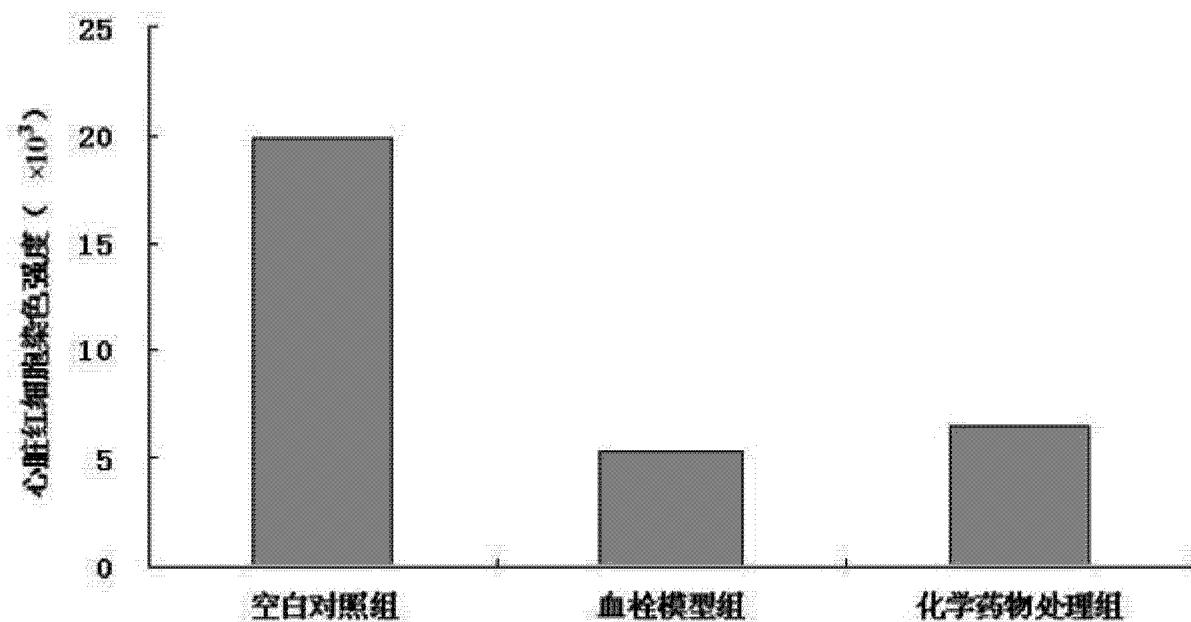


图 19

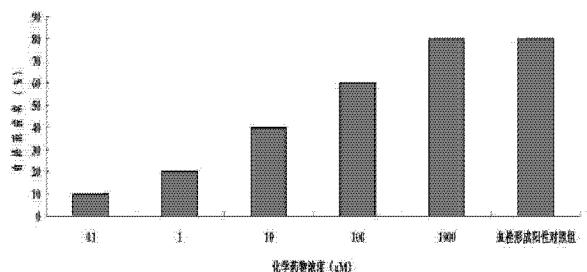


图 20

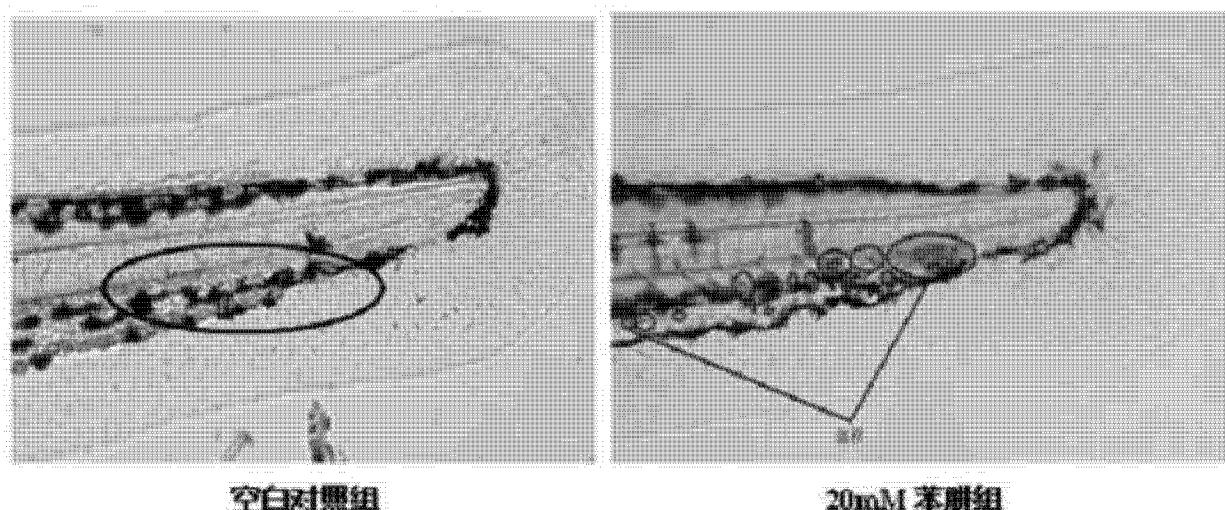


图 21

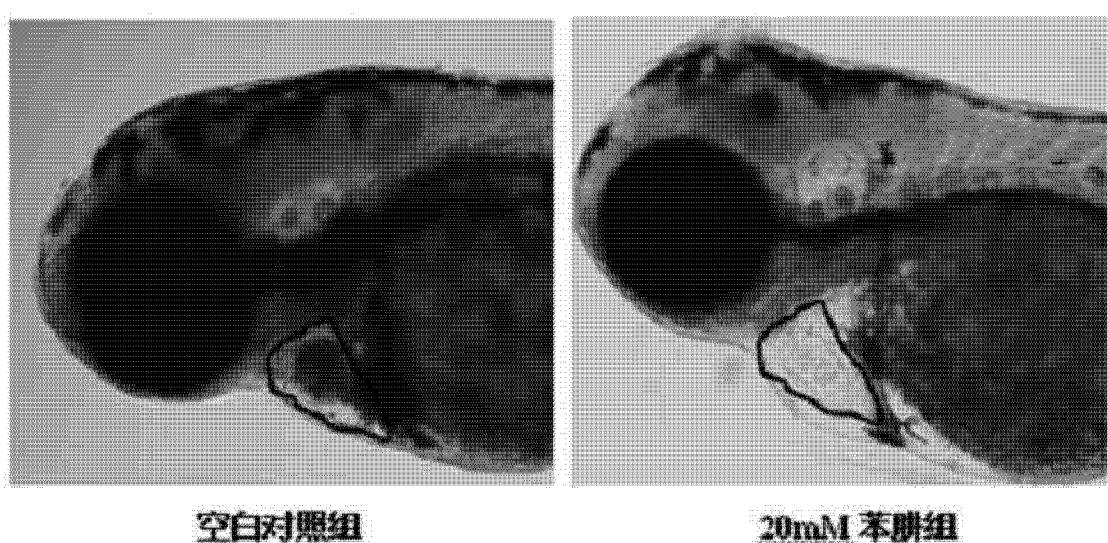


图 22

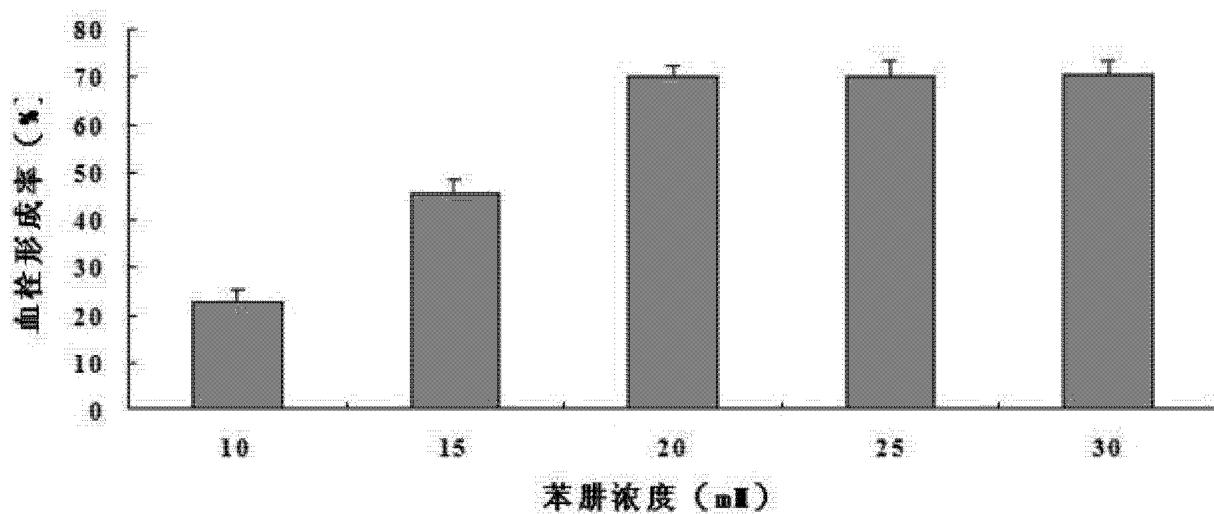


图 23

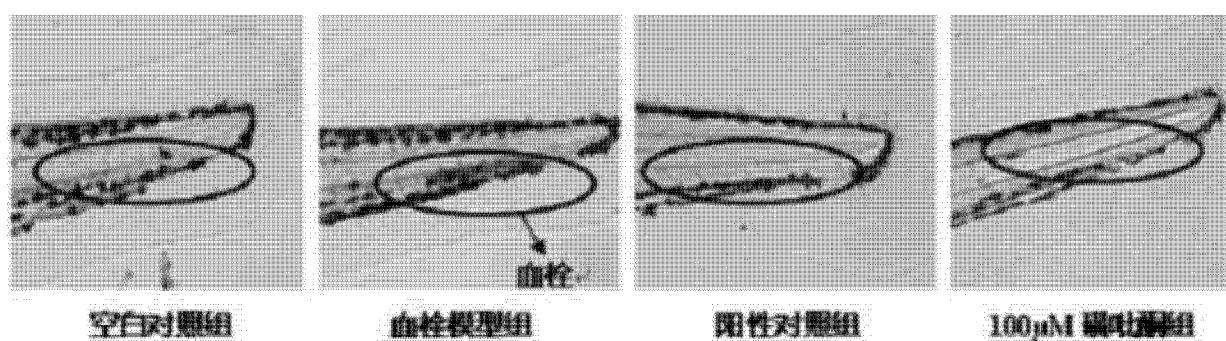


图 24

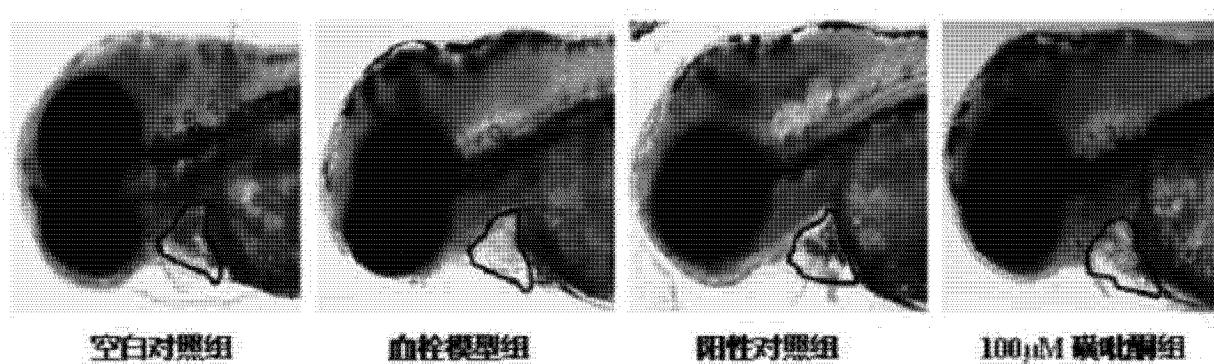


图 25

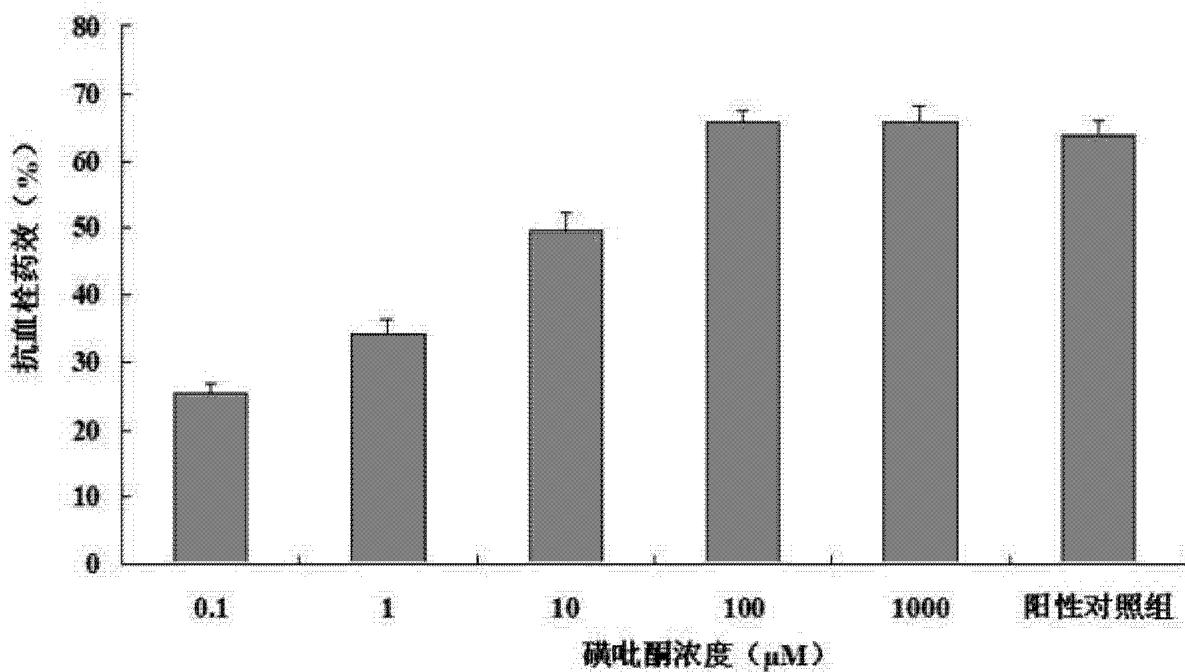


图 26

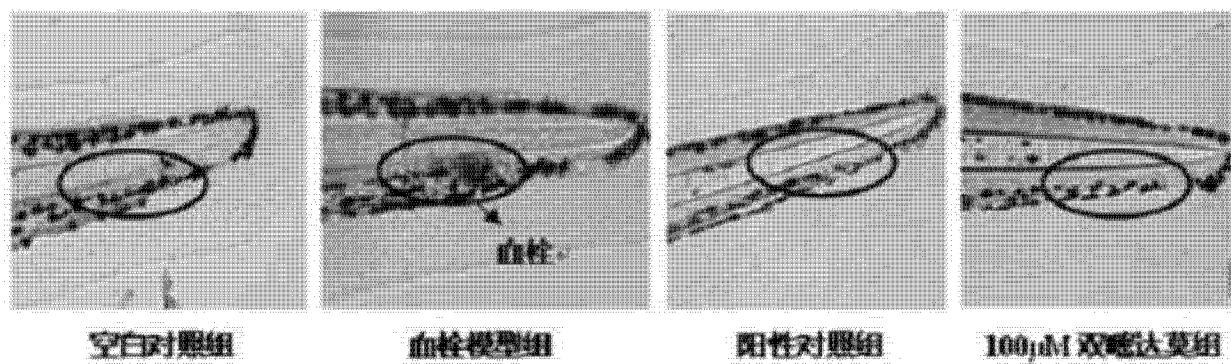


图 27

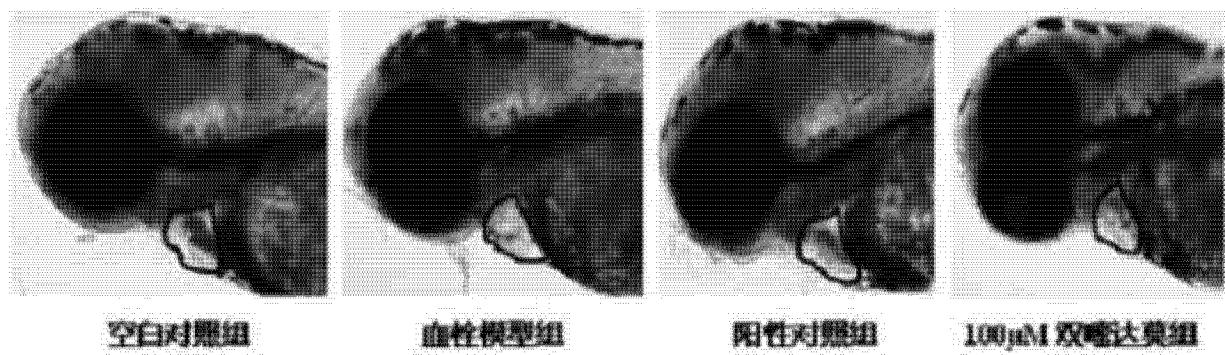


图 28

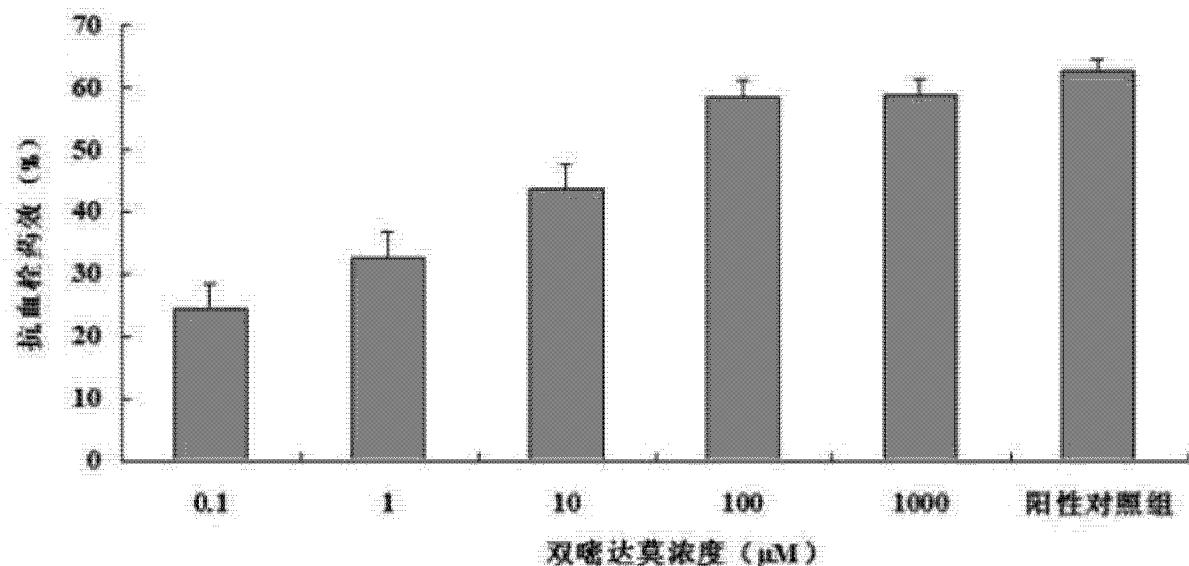


图 29

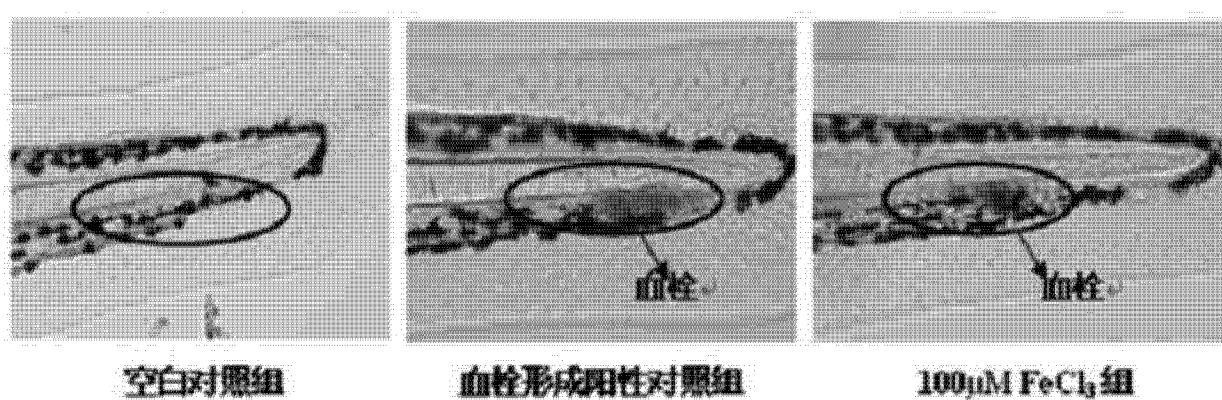


图 30

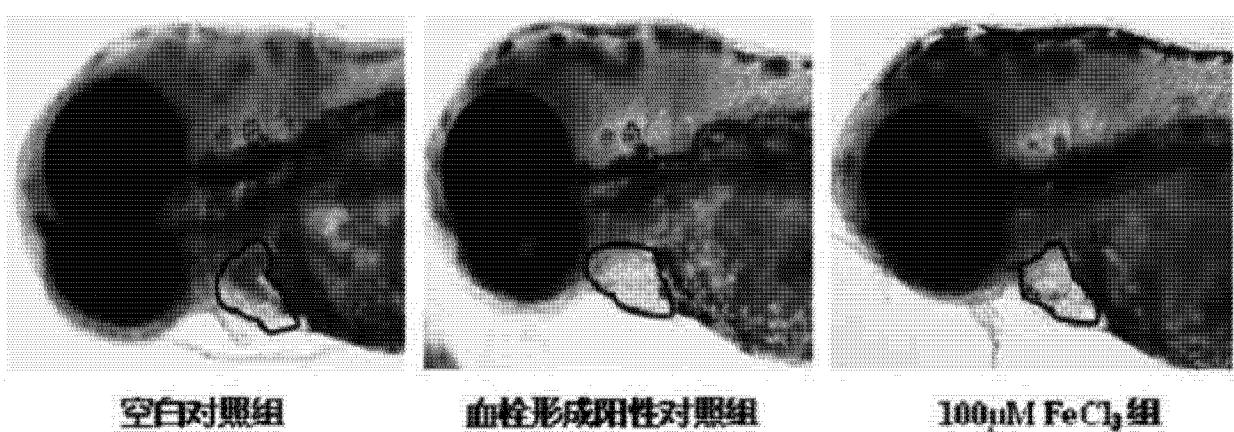


图 31

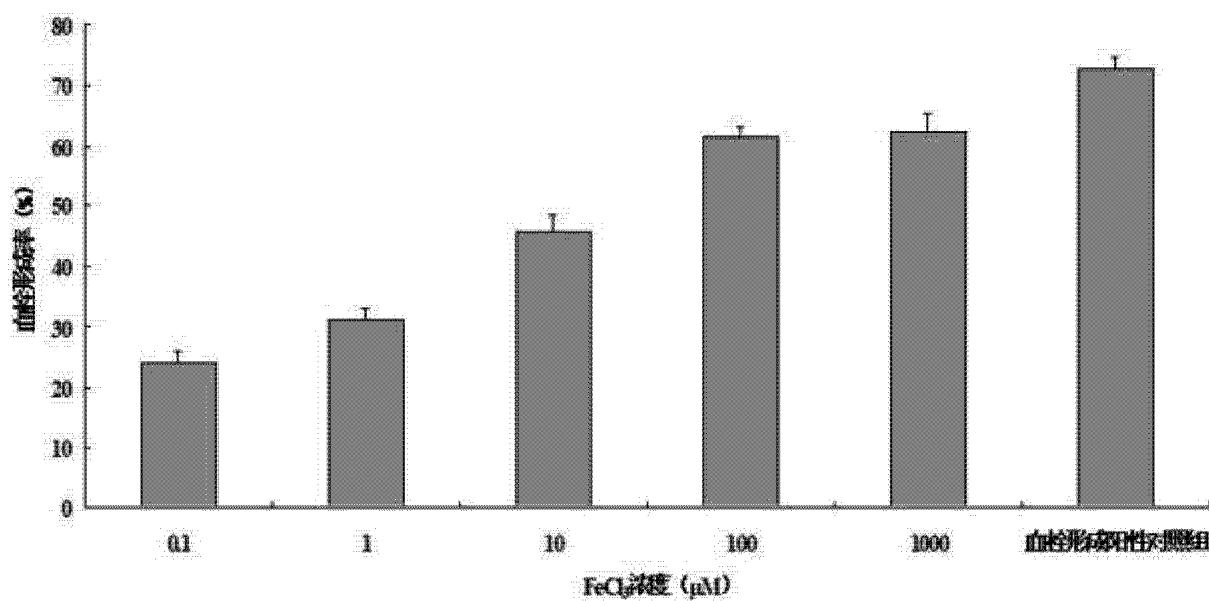


图 32