

# 斑马鱼血栓模型的建立与冠心宁片的干预作用

王木兰<sup>1</sup>, 潘永明<sup>2</sup>, 金敏<sup>1</sup>, 徐孝平<sup>2</sup>, 王德军<sup>2</sup>, 马全鑫<sup>2</sup>, 陈民利<sup>2\*</sup>

(1. 正大青春宝药业有限公司, 杭州 310023; 2. 浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053)

**【摘要】** 目的 采用3种诱导剂分别建立斑马鱼血栓模型, 观察冠心宁片的抗血栓作用。方法 分别采用1.5  $\mu\text{mol/L}$  苯肼、80  $\mu\text{mol/L}$  花生四烯酸和5 mg/L 普纳替尼建立活体斑马鱼血栓模型, 并用冠心宁片、氯吡格雷或阿司匹林等药物干预, 观察尾静脉血栓形成情况, 并用邻联茴香胺染色法对心脏红细胞染色强度进行定量分析, 计算预防血栓药效。结果 苯肼、花生四烯酸和普纳替尼诱导后斑马鱼尾静脉血栓明显增加和心脏红细胞染色强度显著降低 ( $P < 0.001$ ), 同时冠心宁片均能显著对抗这三种模型的血栓形成, 其心脏红细胞染色强度和预防血栓药效均明显增加 ( $P < 0.001$ ), 具有一定的剂量效应关系,  $\text{IC}_{50}$  分别为44.32、138.5和459.5 mg/L。结论 苯肼、花生四烯酸和普纳替尼均能建立不同形成机理的斑马鱼血栓模型, 而冠心宁片具有明显的抗血栓作用, 且其抗血栓机制存在多靶点效应。

**【关键词】** 冠心宁片; 血栓模型; 斑马鱼; 抗栓作用

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0432-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.018

## Establishment of a zebrafish model of thrombosis and the intervention effect of Guanxinling tablet

WANG Mu-lan<sup>1</sup>, PAN Yong-ming<sup>2</sup>, JIN Min<sup>1</sup>, XU Xiao-ping<sup>2</sup>,  
WANG De-jun<sup>2</sup>, MA Quan-xin<sup>2</sup>, CHEN Min-li<sup>2\*</sup>

(1. Zhengda Qingchunbao Pharmaceutical Co., Ltd. Hangzhou 310023;

2. Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a zebrafish model of thrombosis induced by three kinds of inducers and observe the anti-thrombotic effect of a Chinese traditional medicine, Guanxinling tablet (GXN). **Methods** The zebrafish models of thrombosis was induced by using 1.5  $\mu\text{mol/L}$  phenyl hydrazine, 80  $\mu\text{mol/L}$  arachidonic acid and 5 mg/L ponatinib, respectively, and were treated with various concentration of GXN, clopidogrel or aspirin. The thrombus in the tail vein was observed under microscope, Erythrocytes in the zebrafish heart were stained with o-dianisidine and the erythrocyte staining intensity was assessed with a NIS-Elements DTM image analyzer, and the anti-thrombotic effect of GXN was calculated. **Results** Venous thrombus was significantly increased and the staining intensities of erythrocytes in the heart were significantly decreased after induction by phenyl hydrazine, arachidonic acid or Ponatinib ( $P < 0.001$ ), respectively. At the same time, GXN showed an increasing anti-thrombotic effect in the zebrafish models ( $P < 0.001$ ) in a dose-effect manner, with a  $\text{IC}_{50}$  of GXN of 44.32 mg/L, 138.5 mg/L and 459.5 mg/L, respectively. **Conclusions** The zebrafish models of thrombosis are successfully established by phenyl hydrazine, arachidonic acid or Ponatinib, respectively, by different formation mechanisms. GXN has been shown to have an anti-thrombosis effect, probably, by multiple target effects.

**【Key words】** Guanxinling tablet; Thrombosis model; Zebrafish; Anti-thrombotic effect; Phenyl hydrazine; Arachidonic acid; Ponatinib

[基金项目] 浙江中医药大学比较医学创新团队(XTD201301)。

[作者简介] 王木兰(1983-), 女, 工程师, 研究方向为中药药理。E-mail: qcbwml@163.com

[通讯作者] 陈民利(1963-), 女, 教授, 研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: cml1991@aliyun.com

Corresponding author: CHEN Min-li. E-mail: cml991@aliyun.com

急性血栓栓塞性疾病仍然是引起死亡或致残的主要原因。动物模型常被用来了解病理过程包括血栓的形成机制以及抗血栓药物的有效性和安全性评价。斑马鱼作为一种研究人类疾病理想的新型模式动物,具有许多独特的优势<sup>[1]</sup>,如斑马鱼与人类一样具有遗传保守性,存在 70% 的人类同源基因<sup>[2]</sup>,以及拥有凝血因子、血小板受体,并对临床应用的抗凝血和抗血栓药物具有很好的反应<sup>[3-4]</sup>,适合于血栓形成机制和治疗药物的评价。故斑马鱼作为新型模式动物逐渐受到国内研究者的青睐,被广泛用于生理毒理、药理和肿瘤等研究中。近来有学者用苯肼诱导建立斑马鱼血栓模型<sup>[5]</sup>,但血栓形成机制十分复杂,涉及氧化应激、花生四烯酸代谢途径、血管内皮生长因子受体调控等,且其发生发展受凝血、纤溶系统、前列腺素、血小板等方面的影响,因此,从不同层次、环节和研究手段来阐明血栓形成的发展机理并寻找有效治疗药物成为当前研究的热点。近来认为,活血化瘀是中医抗血栓的治则。冠心宁片(GXN)是由活血化瘀中药川芎和丹参经改进提取工艺而制成的一个新制剂,用于治疗冠心病、心绞痛(胸痹心痛)。本课题组前期发现冠心宁片能明显升高急性心肌缺血犬血清一氧化氮(NO)水平,增加冠脉流量;并能降低气滞血瘀大鼠血小板聚集和改善血液粘聚性,通过改变血小板花生四烯酸代谢途径,改善血栓素 B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>)/6-酮-前列腺素 F1 $\alpha$  (6-keto-PGF1 $\alpha$ ) 的平衡,保护血管内皮的作用<sup>[6-7]</sup>,提示冠心宁片可能有抗血栓形成的作用。为此,本文利用不同诱导剂苯肼(phenyl hydrazine, PH)、花生四烯酸(arachidonic acid, AA)、普纳替尼(ponatinib)建立活体斑马鱼血栓模型并初步探讨其可能的形成机制,同时观察冠心宁片抗血栓的作用,为冠心宁片用于临床的应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验所用斑马鱼为健康 AB 系和 Albino 系野生型斑马鱼,参照 Westerfield<sup>[8]</sup> 的养殖方法,饲养于杭州环特生物科技有限公司斑马鱼实验室[SYXK(浙)2012-0171]。在 28℃ 条件下用养鱼用水孵育胚胎,胚胎可以从自身的卵黄囊中获取营养物质,故在受精后 9 d 内(9 days post fertilization, dpf)无需喂食。实验完成后用三卡因甲磺酸对各个发育阶段

的斑马鱼进行过度暴露处理,从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AV-MA)对动物麻醉处死的规范要求。

### 1.2 试验药物与仪器试剂

冠心宁片(冠心宁浸膏, GXN),正大青春宝药业有限公司;氯吡格雷(clopidogrel),上海晶纯实业有限公司;阿司匹林(aspirin),上海晶纯实业有限公司;苯肼,阿拉丁;花生四烯酸,上海船夫生物科技有限公司;普纳替尼(ponatinib), MedChemExpress 公司。临用前冠心宁浸膏粉用 0.9% 生理盐水配成 20 g/L 的母液,苯肼用 100% 乙醇配成 1.5 mmol/L 母液;花生四烯酸、阿司匹林、氯吡格雷和普纳替尼用 100% 二甲基亚砜(DMSO)助溶分别配成 8 mmol/L、45 g/L、7.5 g/L 和 5 g/L 母液,备用。SZX 7 型解剖显微镜,日本 Olympus 公司;TK-C1481EC 高清摄像机,日本凯勒电子公司;6 孔板,上海 Nest Biotech 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 苯肼诱发斑马鱼血栓模型的建立及药物干预

AB 系斑马鱼胚胎发育至 2 d 时,在解剖显微镜挑选发育正常的胚胎,将其分到微孔板中,设置 8 个实验组:即正常对照组(NC)、模型组(用 1.5  $\mu$ mol/L 苯肼处理, PH model)、冠心宁片干预组:分别将终浓度为 12.5、25、50、100 和 200 mg/L 的冠心宁片预处理 6 h 后加入诱导剂 1.5  $\mu$ mol/L 苯肼;氯吡格雷组:终浓度 7.5 mg/L 氯吡格雷预处理 6 h 后加入诱导剂 1.5  $\mu$ mol/L 苯肼。每组 30 尾,之后 28℃ 恒温培养箱培养 24 h。

#### 1.3.2 花生四烯酸诱发斑马鱼血栓模型的建立及药物干预

Albino 系斑马鱼胚胎发育至 3 d 时,在解剖显微镜挑选发育正常的胚胎,将其分到微孔板中,设置 8 个实验组:即正常对照组(NC)、模型组(用 80  $\mu$ mol/L 花生四烯酸处理, AA model)、冠心宁片干预组:分别将终浓度为 75、150、300、600 和 1200 mg/L 的冠心宁片预处理 6 h 后加入诱导剂 80  $\mu$ mol/L 花生四烯酸;阿司匹林组:终浓度 22.5 mg/L 阿司匹林预处理 6 h 后加入诱导剂 80  $\mu$ mol/L 花生四烯酸。每组 30 尾,之后 28℃ 恒温培养箱培养 1.5 h。

#### 1.3.3 普纳替尼诱发斑马鱼血栓模型的建立及药物干预

Albino 系斑马鱼胚胎发育至 5 d 时,在解剖显微镜挑选发育正常的胚胎,将其分到微孔板中,设置 8 个实验组:即正常对照组(NC)、模型组(用 5 mg/L

普纳替尼处理, ponatinib model group)、冠心宁片干预组:分别将终浓度为 150、300、600、1200 和 1500 mg/L 的冠心宁片与诱导剂 5 mg/L 普纳替尼共处理 18 h;阿司匹林组:终浓度 45 mg/L 阿司匹林与诱导剂 5 mg/L 普纳替尼共处理 18 h。每组 30 尾,之后 28℃ 恒温培养箱培养 18 h。

1.4 观察指标

分别经苯胍处理 24 h、花生四烯酸处理 1.5 h、普纳替尼处理 18 h 后,用 1 g/L 邻联茴香胺染液对斑马鱼染色 30 min;然后,每组随机挑选 20 尾斑马鱼在显微镜下观察尾静脉血栓情况并拍照,照片拍摄放大倍数为 56 倍;用 NIS-Elements D™ 图像处理软件进行定量分析心脏红细胞染色强度(SI),并计算预防血栓药效(%)=[SI(药物干预组)-SI(模型组)]/SI(正常对照组)-SI(模型组)×100%和半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>。

1.5 统计学处理

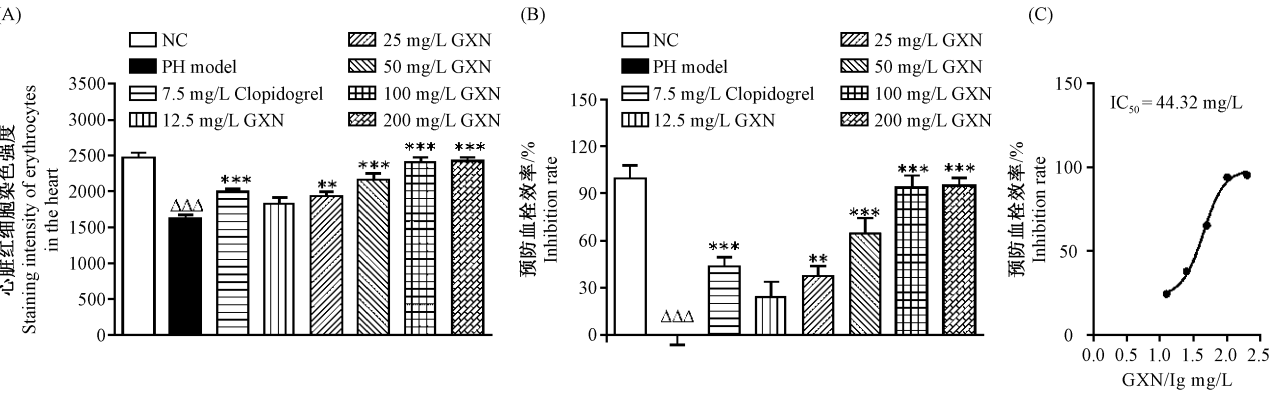
所有数据均用均数±标准误( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ )表示,采

用 GraphPad 8.0 软件进行统计分析,组间比较采用方差分析和 Dunnett's *t* 检验,*P* < 0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 苯胍诱导斑马鱼血栓模型的建立及药物干预

与正常对照组比,PH 模型组尾静脉血栓明显增加而心脏红细胞染色强度(SI)明显减少(*P* < 0.001),提示建模成功;与 PH 模型组比,7.5 mg/L 氯吡格雷干预后尾静脉血栓减少明显,并能显著增加 SI(*P* < 0.001),预防血栓效率达 43.79%;同时,12.5、25、50、100 和 200 mg/L 的冠心宁片干预后 SI 亦有不同程度的增加,其中 25~200 mg/L 剂量组的作用显著(*P* < 0.01, *P* < 0.001),各剂量组预防血栓效率分别为 24.32%、37.63%、65.02%、93.90% 和 95.16%,具有一定的剂量效应关系,IC<sub>50</sub> 为 44.32 mg/L,同时 200 mg/L 冠心宁片也能显著减少尾静脉血栓。见图 1、2。



注:与正常对照组比,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ ; 与 PH 模型组比,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ 。□正常对照组, ■苯胍模型组, ▨7.5 mg/L 氯吡格雷组, ▩12.5 mg/L, ▪25 mg/L, ▫50 mg/L, ▬100 mg/L 和 ▮200 mg/L 冠心宁片组。

图 1 苯胍诱导斑马鱼血栓模型的建立及药物干预 (*n* = 20)  
Note. Compared with the NC group,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ; Compared with the PH model group,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ . □ NC group, ■ PH model group, ▨7.5 mg/L Clopidogrel group, ▩12.5 mg/L, ▪25 mg/L, ▫50 mg/L, ▬100 mg/L and ▮200 mg/L GSN group.

Fig. 1 Establishment of thrombosis model induced by phenyl hydrazine in the zebrafish and drug intervention of the models

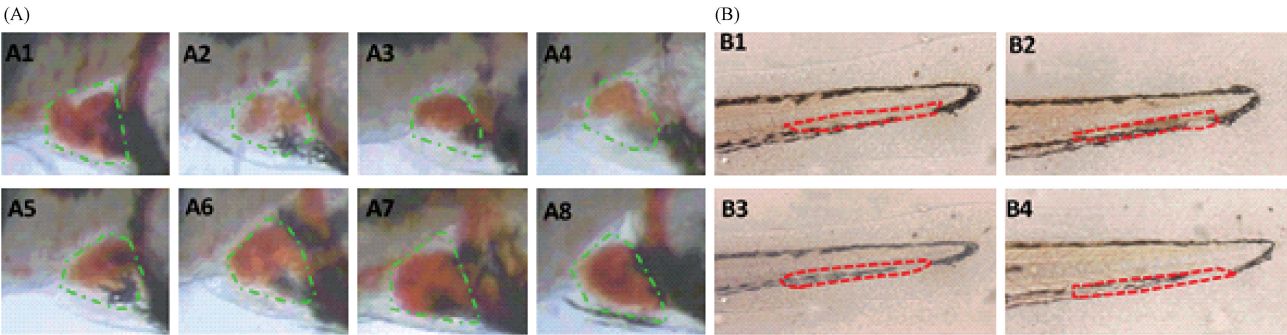
2.2 花生四烯酸诱导斑马鱼血栓模型的建立及药物干预

与正常对照组比, AA 模型组尾静脉血栓生成明显增加,同时心脏红细胞染色强度(SI)明显减少(*P* < 0.001),提示建模成功;与模型组比,22.5 mg/L 阿司匹林干预后能明显减少尾静脉血栓和显著增加 SI(*P* < 0.001),预防血栓效率达 69.17%;且 75、150、300、600 和 1200 mg/L 的冠心宁片干预后 SI 亦有不同程度增加,其中 150~1200 mg/L 剂量组的作用

显著(*P* < 0.01, *P* < 0.001),各剂量组的预防血栓效率分别为 9.83%、29.83%、53.01%、61.63% 和 71.40%,有一定的剂量效应关系,IC<sub>50</sub> 为 138.5 mg/L,同时 1200 mg/L 冠心宁片也能显著减少尾静脉血栓,见图 3、4。

2.3 普纳替尼诱导斑马鱼血栓模型的建立及药物干预

与正常对照组比, Ponatinib 模型组尾静脉血栓生成明显增加而心脏红细胞染色强度(SI)明显减

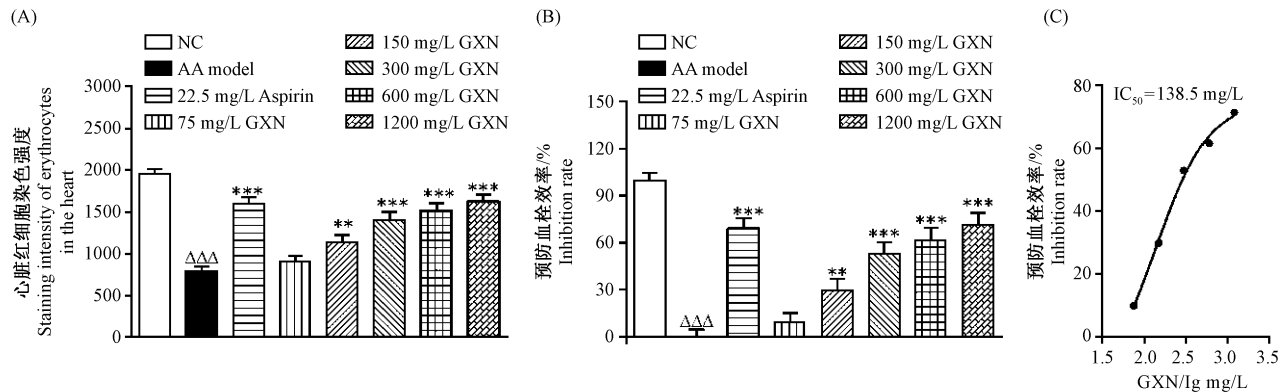


注:图 A1-A8 分别为正常对照组,苯肼模型组,7.5 mg/L 氯吡格雷组,12.5、25、50、100 和 200 mg/L 冠心宁片组;图 B1-B4 分别为正常对照组,苯肼模型组,7.5 mg/L 氯吡格雷组和 200 mg/L 冠心宁片组。

图 2 各组心脏红细胞染色(A)和尾静脉血栓(B)的变化

Note. Figure A1-A8: NC group, phenyl hydrazine model group, 7.5 mg/L Clopidogrel group, GXN groups in a dose of 12.5, 25, 50, 100 mg/L, and 200 mg/L, respectively. Figure B1-B4: NC group, phenyl hydrazine model group, 7.5 mg/L Clopidogrel group and 200 mg/L GXN group, respectively.

Fig. 2 Changes of cardiac red blood cells stained with O-dianisidine and venous thrombus in the zebrafish



注:与正常对照组比,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ ; 与 AA 模型组比,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ 。□正常对照组,■花生四烯酸模型组,▨22.5 mg/L 阿司匹林组,▤75 mg/L,▦150 mg/L,▧300 mg/L,▨600 mg/L 和 ▩1200 mg/L 冠心宁片组。

图 3 花生四烯酸诱导斑马鱼血栓模型的建立及药物干预 ( $n = 20$ )

Note. Compared with the NC group,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ; Compared with the AA model group,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ . □ NC group, ■ AA model group, ▨ 22.5 mg/L Aspirin group, ▤ 75 mg/L, ▦ 150 mg/L, ▧ 300 mg/L, ▨ 600 mg/L and ▩ 1200 mg/L GXN group.

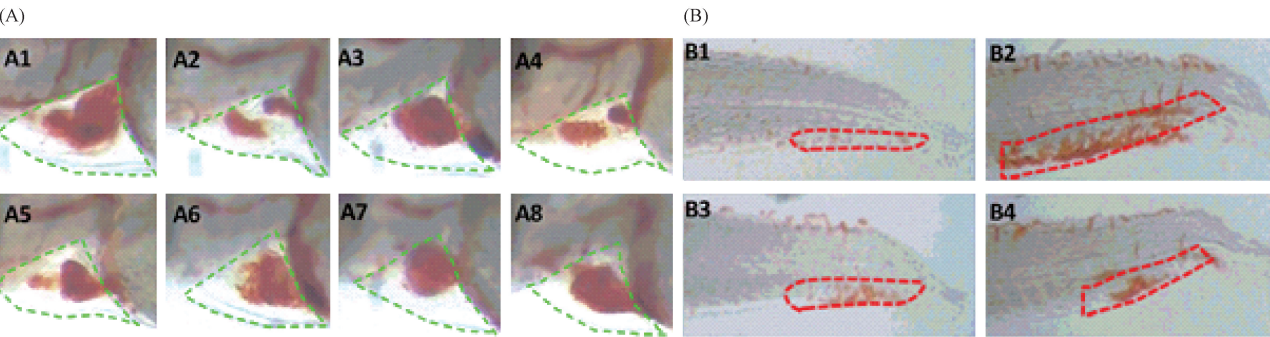
Fig. 3 Establishment of thrombosis model induced by arachidonic acid in the zebrafish and drug intervention

少( $P < 0.001$ ),提示建模成功;与模型组比,45 mg/L 阿司匹林干预后能减少尾静脉血栓并能显著增加 SI( $P < 0.001$ ),预防血栓效率达 66.36%;同时,剂量为 150、300、600、1200 和 1500 mg/L 的冠心宁片干预后 SI 也有不同程度的增加,其中 600 ~ 1500 mg/L 剂量组的作用显著( $P < 0.001$ ),各剂量组的预防血栓效率分别为 5.33 %、9.91 %、85.84 %、89.93 % 和 107.73%; $IC_{50}$  为 459.5 mg/L,同时 1500 mg/L 冠心宁片也能显著减少尾静脉血栓,见图 5,6。

3 讨论

血栓形成是多因素参与、渐进发展的复杂过程,血液在流动状态下因血小板的活化和凝血因子被激

活而发生的异常凝固<sup>[9]</sup>。血栓形成在心脑血管疾病的发生与发展中起促进作用,也是引起死亡和致残的主要原因之一。血栓形成的条件包括血管内膜损伤、血流状态的改变和血液凝固性增加。因此,抑制血小板功能和防止血液凝固可预防血栓形成。临床上应用的抗血小板和抗凝血酶药物较多,如血小板环氧化酶抑制剂阿司匹林、血小板内环核苷酸抑制剂双嘧达莫、二磷酸腺苷(ADP)受体拮抗剂氯吡格雷、抗凝血酶 III(ATIII)的肝素、维生素 K 拮抗剂华法林等,这些药物共同的特点是单药、单靶点、且不可逆的抑制,导致不良反应时有发生,如阿司匹林能引起患者过敏、胃肠道反应、瑞氏综合征、肝损害、凝血障碍等<sup>[10]</sup>;也有发现部分患者存在阿司匹林和

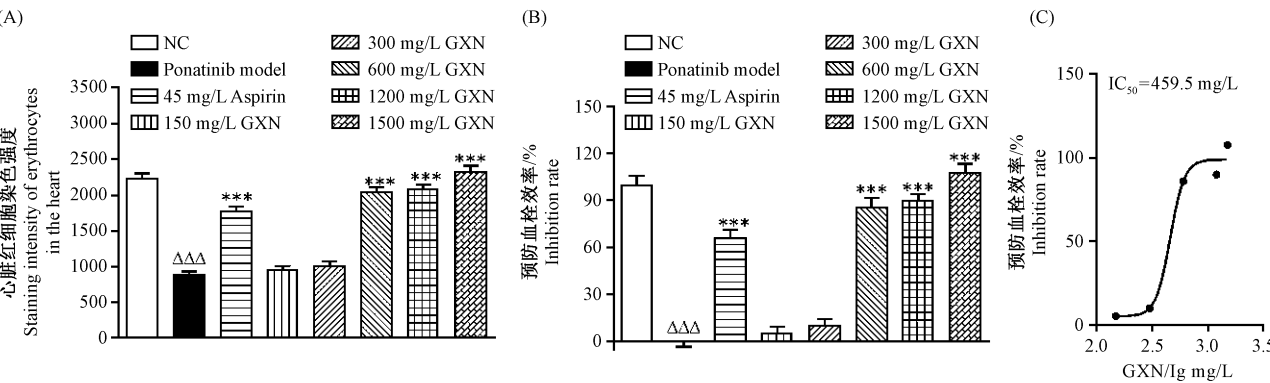


注:图 A1-A8 分别为正常对照组,花生四烯酸模型组,22.5 mg/L 阿司匹林组,75、150、300、600 和 1200 mg/L 冠心宁片组;图 B1-B4 分别为正常对照组,花生四烯酸模型组,22.5 mg/L 阿司匹林组和 1200mg/L 冠心宁片组。

图 4 各组心脏红细胞染色(A)和尾静脉血栓(B)的变化

Note. Figure A1-A8: NC group, Arachidonic acid model group, 22.5 mg/L Aspirin group, GXN groups in a dose of 75,150, 300,600 mg/L, and 1200 mg/L, respectively. Figure B1-B4: NC group, Arachidonic acid model group, 22.5 mg/L Aspirin group and 1200 mg/L GXN group, respectively.

Fig. 4 Changes of the O-dianisidine staining intensity of erythrocytes in the heart and venous thrombus in the zebrafish



注:与正常对照组比,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ ; 与 ponatinib 模型组比,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ 。□正常对照组,■普纳替尼模型组,▨45 mg/mL 阿司匹林组,▤150 mg/L,▦300 mg/L,▧600 mg/L,▨1200 mg/L 和 ▩1500 mg/L 冠心宁片组。

图 5 普纳替尼诱发活体斑马鱼血栓模型的建立及药物干预 (n = 20)

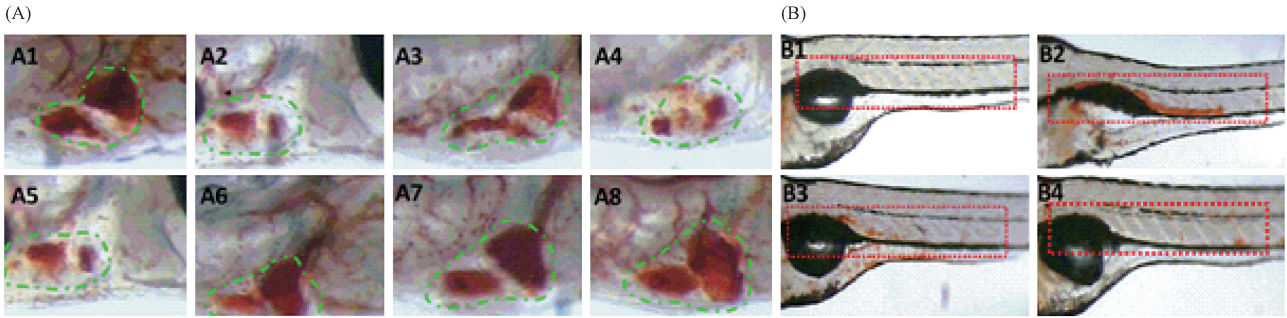
Note. Compared with the NC group,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ; Compared with the ponatinib model group,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ . □ NC group, ■ Ponatinib model group, ▨ 45 mg/mL Aspirin group, ▤ 150 mg/L, ▦ 300 mg/L, ▧ 600 mg/L, ▨ 1200 mg/L and ▩ 1500 mg/L GXN group.

Fig. 5 Establishment of the thrombosis model induced by ponatinib in the zebrafish and drug intervention

氯吡格雷抵抗或反应性低的现象,甚至对这两药存在同时抵抗,导致术后血栓形成的并发症明显增加<sup>[11]</sup>。因此,寻找多靶点、多通路且疗效显著、安全性高的抗血栓药物具有重要意义;而建立理想的血栓模型是研究人类疾病机理和药物防治重要的研究手段之一。

苯肼是一种强氧化剂,能作用于机体后引起自由基产生,促进红细胞膜骨架和珠蛋白的氧化,使得红细胞内的抗氧化系统失衡,加速膜脂质过氧化,最终红细胞变形能力降低并使其易于黏附到细胞外基质中,进而损伤血管内膜,促进血小板黏附、聚集和血管活性物质的大量释放,导致血栓形成<sup>[5,12]</sup>。本研究显示,苯肼诱导后斑马鱼的心脏红细胞染色强

度明显减少和尾静脉血栓明显增加,这与张勇等<sup>[5]</sup>研究结果一致,并发现斑马鱼红细胞染色强度与尾静脉血栓长度呈明显负相关,故可用红细胞染色强度评估血栓生成情况。用氯吡格雷干预后能明显减轻其血栓率,证实苯肼能诱导活体斑马鱼血栓形成,其形成机制与苯肼引起红细胞抗氧化系统失衡,自由基生成过多和脂质过氧化反应增加,促进血管内皮损伤和血小板聚集,导致血栓形成有关。冠心宁片是由丹参和川芎两味中药组成,且这两味药均有活血化瘀的疗效,在临床上被广泛用于治疗冠心病心绞痛。前期已证实冠心宁片具有抗自由基作用<sup>[13]</sup>。同样,冠心宁片能显著对抗苯肼诱导斑马鱼的血栓形成,具有一定的剂量效应关系,表明冠心宁



注:图 A1-A8 分别为正常对照组,普纳替尼模型组,45 mg/mL 阿司匹林组,150、300、600、1200 和 1500 mg/L 冠心宁片组;图 B1-B4 分别为正常对照组,普纳替尼模型组,45 mg/mL 阿司匹林组和 1500mg/L 冠心宁片组。

图 6 各组心脏红细胞染色(A)和尾静脉血栓(B)的变化

Note. Figure A1-A8: NC group, Ponatinib model group, 45 mg/L Aspirin group, GXN groups with 150, 300, 600, 1200 mg/L, and 1500 mg/L, respectively. Figure B1-B4: NC group, Ponatinib model group, 45 mg/L aspirin group and 1500 mg/L GXN group, respectively.

Fig. 6 Changes of the O-dianisidine staining intensity of erythrocytes in the heart and venous thrombus in the zebrafish

片有抗血栓形成作用,其效应与对抗自由基生成,抑制脂质过氧化反应和血小板聚集有关<sup>[7,13]</sup>。

花生四烯酸可诱导血小板释放内源性 ADP,激活血小板聚集,这是血小板聚集的主要途径之一;并且花生四烯酸通过环氧合酶和脂氧酶的作用,产生血栓素、前列腺素和白三烯等,其代谢产物血栓素 TXA<sub>2</sub> 具有收缩血管、促进血小板聚集,增加血液粘滞性的作用,同时前列腺素具有扩张血管和抑制血小板聚集的作用,两者共同调节血小板的聚集和血管收缩程度,维持血管的正常张力和血液循环通畅<sup>[14]</sup>。本研究结果表明花生四烯酸能引起斑马鱼心脏红细胞染色强度降低和尾静脉血栓明显增加,用环氧化酶抑制剂阿司匹林干预后血栓形成减少明显,故花生四烯酸也可诱导活体斑马鱼血栓形成,其机制与花生四烯酸代谢途径有关。而给予冠心宁片干预后也能明显对抗花生四烯酸诱导斑马鱼血栓形成,提示冠心宁片抗血栓作用也可能影响花生四烯酸代谢途径有关。

普纳替尼是一种多靶点小分子酪氨酸激酶抑制剂,用于治疗急性淋巴细胞白血病,但在临床应用后发现患者出现严重的血栓和血管狭窄等副作用而受监控。近来发现普纳替尼导致血栓形成与抑制血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成,影响 NO 合成,导致血管内皮损伤,诱发血栓形成有关<sup>[15]</sup>,并有学者发现普纳替尼内有血管内皮生长因子受体(VEGFR)<sup>[16]</sup>,可阻断 PI3K/AKT/eNOS 通路的传递。令狐克刚等<sup>[17]</sup>发现阿司匹林对氧化低密度脂蛋白诱导的人主动脉内皮细胞损伤有保护作用,与其调控激活 p-Akt/eNOS 信号通路密切相关。本研究也发现普纳替尼诱导后斑马鱼能形成明显的血栓,并用

阿司匹林干预后能抑制血栓的形成,提示普纳替尼所致斑马鱼血栓形成可能与 PI3K/AKT/eNOS 通路表达调控异常有关。另外,冠心宁片干预后同样能明显对抗普纳替尼诱导斑马鱼血栓的形成,该效应可能与其能提高 NO 水平和保护血管内皮损伤有关,但是否与 PI3K/AKT/eNOS 通路表达调控有关,还有待于进一步研究。

由此可见,苯酚、花生四烯酸和普纳替尼均能建立活体斑马鱼血栓模型,并能快速、简便、直观的观察血栓形成和溶栓情况,但血栓形成机制可能有所差异,如苯酚诱导可能与自由基生成有关,花生四烯酸诱导可能与花生四烯酸代谢途径有关,而普纳替尼诱导可能与 PI3K/AKT/eNOS 通路表达调控异常有关,故这些斑马鱼血栓模型对加快筛选抗栓药物并了解其作用特点具有支撑作用。此外,通过对冠心宁片、氯吡格雷和阿司匹林药物的干预也进一步证实了斑马鱼模型的敏感性和有效性;进而也证实冠心宁片具有抗血栓作用,且其抗血栓机制存在多靶点效应。

参 考 文 献

[ 1 ] Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish [J]. J Clin Invest, 2012, 122: 2337 - 2343.

[ 2 ] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496: 498 - 503.

[ 3 ] Gregory M, Hanumanthaiah R, Jagadeeswaran P. Genetic analysis of hemostasis and thrombosis using vascular occlusion [J]. Blood Cells Mol Dis, 2002, 29(3): 286 - 295.

[ 4 ] Schurgers E, Moorlag M, Hemker C, et al. Thrombin generation in Zebrafish blood [J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149135.

- [5] 张勇, 朱晓宇, 郭胜亚, 等. 苯胍诱发建立斑马鱼血栓模型的方法 [J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(1): 27–31.
- [6] 邹煜, 应华忠, 潘永明, 等. 冠心宁片对犬急性心肌缺血时冠脉流量的影响 [J]. (8): 482–485.
- [7] 陈民利, 寿旗扬, 潘永明, 等. 冠心宁片对气滞血瘀大鼠抗血小板聚集和保护血管内皮作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(5): 586–589.
- [8] Westemeld M. The Zebrafish Book [M]. Eugene: University of Orgen Press, 1955, 16–21.
- [9] 庞兴学, 王显. 血栓形成的过程与机制研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(11): 1613–1615.
- [10] 兰志新, 林秀山. 阿司匹林临床应用的不良反应分析 [J]. 医学理论与实践, 2016, 29(3): 384–385.
- [11] 刘芳, 刘加春, 王大明, 等. 症状性颈动脉和椎-基底动脉狭窄患者的阿司匹林和氯吡格雷抵抗现象 [J]. 中国脑血管病杂志, 2008, 5(1): 15–18.
- [12] 任德旺, 叶婷婷, 倪必辉, 等. 盐酸苯胍致小鼠化学损伤性血虚证模型的改良 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(8): 108–110.
- [13] 陈民利, 吕建敏, 潘永明, 等. 冠心宁片对 Beagle 犬急性心肌缺血的作用 [J]. 浙江中医药大学学报, 2005, 29(4): 54–56.
- [14] Jouve R, Rolland PH, Delboy C, et al. Thromboxane B<sub>2</sub>, 6-keto-PGF 1 $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, PGF 2 $\alpha$  and PGA 1 plasma levels in arteriosclerosis obliterans: Relationship to clinical manifestations, risk factors, and arterial pathoanatomy [J]. Am Heart J, 1984, 107: 45.
- [15] Ghatalia P, Je Y, Kaymakcalan MD, et al. QTc interval prolongation with vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. Br J Cancer, 2015, 112(2): 296–305.
- [16] 张亚楠, 孙继红, 黄新益, 等. 普纳替尼对人血管内皮细胞功能的影响 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 156–160.
- [17] 令狐克刚, 曾玉, 张彦燕, 等. 基于 p-Akt/eNOS 信号的阿司匹林对 ox-LDL 诱导的人主动脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(8): 785–788.

[收稿日期] 2016-05-10

## (上接第 431 页)

- [4] Dossey AT. Insects and their chemical weaponry: New potential for drug discovery [J]. Natural Product Reports, 2010, 27(12): 1737–1757.
- [5] Garenaux E, Maes E, Levêque S, et al. Structural characterization of complex O-linked glycans from insect-derived material [J]. Carbohydrate Res, 2011, 346(9): 1093–1104.
- [6] 唐静. 不同剂量川牛膝多糖对小鼠抗氧化活性的影响 [D]. 四川: 四川农业大学, 2013.
- [7] 侯潇, 刘剑利, 常浩, 等. 香蕉皮多糖对小鼠抗氧化损伤作用 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(11): 1398–1399.
- [8] 李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85–88.
- [9] Xu WT, Zhang FF, Luo YB, et al. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from pteridium aquilinum [J]. Carbohydrate Res, 2009, 344: 217–222.
- [10] 赵昕, 吴子龙, 陈立凤, 等. 香菇菌柄基部多糖的提取及其清除 DPPH 自由基作用的研究 [J]. 北方园艺, 2012, 24: 165–168.
- [11] 聂少平, 谢明勇, 罗珍. 茶叶多糖的抗氧化活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(5): 549–552.
- [12] Gawel S, Wardas M, Niedworok E, et al. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker [J]. Wiad Lek, 2004, 57(9–10): 453–455.
- [13] 张德华. 夏枯草多糖分离纯化与抗氧化活性研究 [J]. 云南植物研究, 2006, 28(4): 410–414.
- [14] 梁俊, 李建科, 赵伟, 等. 石榴皮多酚体外抗脂质过氧化作用研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(2): 102–108.
- [15] 张彬, 谭琼, 李丽立, 等. 金属硫蛋白对奶牛血液抗氧化酶 GSH-Px 和 CAT 基因表达的影响 [J]. 草业学报, 2010, 19(3): 132–138.
- [16] 晏涛, 陈世保, 徐蕾, 等. 灵芝多糖对阿尔茨海默病大鼠学习记忆和氧化应激的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2011, 40(4): 387–389.

[收稿日期] 2016-01-29