

盐酸肾上腺素诱导建立斑马鱼血栓模型的优化与适用性研究

樊娇娇 李发荣 赵崇军 徐柯心 杨冉 乔艺涵 倪媛媛 王雨彤 马志强 林瑞超

【摘要】 目的 优化盐酸肾上腺素诱导建立斑马鱼血栓模型的条件,并考察此模型在中药抗血栓活性筛选中的适用性。**方法** 应用正交实验,以斑马鱼尾静脉红细胞的染色强度为定量指标,考察盐酸肾上腺素诱导建立斑马鱼血栓模型的最佳条件。利用该模型,对临床常用的 11 味中药的抗血栓活性进行筛选,探讨该模型在中药抗血栓活性筛选中的适用性与可靠性。**结果** 盐酸肾上腺素诱导建立斑马鱼血栓模型的最佳条件为:受精后 3 天(3 dayspost fertilization,3dpf)的斑马鱼在浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸肾上腺素溶液中暴露 16 小时。9 味活血化瘀中药川芎、郁金、延胡索、丹参、红花、虎杖、三棱、莪术、水蛭在斑马鱼血栓模型中表现出显著的预防和治疗血栓作用,而甘草和党参两味中药在斑马鱼血栓模型中未表现出预防和治疗血栓的作用。**结论** 盐酸肾上腺素诱导建立的斑马鱼血栓模型在中药抗血栓活性的筛选与疗效评估中具有良好的适用性。

【关键词】 盐酸肾上腺素; 斑马鱼血栓模型; 定量; 抗血栓活性; 药物筛选

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.06.006

Optimization and adaptability of the zebrafish thrombosis model induced by Adrenaline Hydrochloride FAN Jiaojiao, LI Farong, ZHAO Chongjun, et al. Beijing Key Laboratory of Traditional

Chinese Quality Evaluation, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: LIN Ruichao, E-mail: linrch307@sina.com

【Abstract】 Objective To optimize the conditions of the zebrafish thrombosis model induced by

基金项目:北京市科委创新环境与平台建设专项(Z161110005000000)

作者单位:100029 北京中医药大学中药学院中药品质评价局北京市重点实验室[樊娇娇(硕士研究生)、赵崇军(博士研究生)、徐柯心(硕士研究生)、杨冉(硕士研究生)、乔艺涵(硕士研究生)、倪媛媛(硕士研究生)、王雨彤(硕士研究生)、马志强、林瑞超];陕西师范大学(李发荣)

作者简介:樊娇娇(1989-),女,2014 级在读硕士研究生。研究方向:中药毒性与活性。E-mail:276050202@qq.com

通信作者:林瑞超(1954-),博士,教授,博士生导师。研究方向:中药、天然药物的质量控制方法的研究。E-mail:linrch307@sina.com

Adrenaline Hydrochloride, and investigate the adaptability of the model in antithrombotic activity screening of traditional Chinese medicine. **Methods** This study applied orthogonal experiment to inspect the optimum conditions of the zebrafish thrombosis model induced by Adrenaline Hydrochloride. Quantitative index was quantitatively evaluated by the dyeing strength of zebrafish tail vein red blood cells. The model was used to screen the antithrombotic activity of 11 herbs, and applicability and reliability was discussed.

Results Zebrafish at 3dpf (days post-fertilization, 3dpf) treated with Adrenaline Hydrochloride at a concentration of $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for a time period of 16 hours were determined as the optimum conditions for the zebrafish thrombosis model development. 9 kinds of traditional Chinese medicine with invigorating blood circulation and eliminating blood stasis, such as, *Salvia miltiorrhiza*, *Sparganii Rhizoma*, *Ligusticum chuanxiong* Hort, etc showed significant preventive and therapeutic effects on zebrafish thrombosis model. However, *Glycyrrhizae Radix* and *Codonopsis pilosula* did not display the effect on this zebrafish thrombosis model. **Conclusion** Zebrafish thrombosis model induced by Adrenaline Hydrochloride has good applicability in antithrombotic activity screening and efficacy assessments of traditional Chinese medicine.

【Key words】 Adrenaline Hydrochloride; Zebrafish thrombosis model; Quantitative; Antithrombotic activity; Drug screening

血栓形成是导致心脑血管疾病的重要因素,此类疾病严重威胁人类健康,据世界卫生组织统计数据显示,全世界每年约有 2300 万人死于血栓性疾病^[1]。活血化瘀中药具有良好的抗血栓活性,从中药中筛选出较好的抗血栓物质,进行药物研发,已引起国内的普遍重视。目前抗血栓药物的筛选主要采用体外凝血实验和传统的啮齿类动物在体血栓模型,前者只能针对其中部分靶点^[2],难以模拟体内血栓发生的真实情况;后者在进行活性筛选时,操作复杂、周期长、费用高,尚不适用于抗血栓药物的大规模筛选^[3]。因此,开发出操作便捷、准确、高通量,并与临床病理生理机制相似的的血栓模型具有重大的意义^[4]。

斑马鱼作为一种新的动物模型,与人类基因相似度高达 87%,且繁殖能力强,发育周期短,养殖成本低,并且早期幼鱼透明,可在显微镜下直接观察斑马鱼的血液流动情况^[5],已广泛应用于药物毒性和活性方面的研究。本课题组利用盐酸肾上腺素成功建立了斑马鱼血栓模型,此模型既能克服体外凝血实验的弊端,又能实现高通量筛选。本研究应用正交试验,以斑马鱼尾静脉红细胞染色强度为定量指标,优化盐酸肾上腺素诱导建立斑马鱼血栓模型的建模条件,并通过斑马鱼尾静脉组织病理学检查,进一步验证该血栓模型的形成。利用此模型,筛选川芎、丹参、甘草等中药的抗血栓活性,探讨此模型在中药抗血栓活性研究中的适用性,期望为抗血栓药物的筛选与新药研发提供高通量和重复性良好的动物模型。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

盐酸肾上腺素(adrenaline hydrochloride, AH)购自上海源叶生物科技有限公司,批号:Y03J7C15662;阿司匹林(aspirin)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,批号:50-78-2;邻联茴香胺购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:119-90-4;二甲基亚砜(DMSO)购自西陇化工股份有限公司,批号:160306;NaCl 购自北京化工,批号 20150905;KCl 购自北京化工,批号 20151203;K₂HPO₄购自西陇化工,批号:7758-11-4;Na₂HPO₄购自北京化工,批号 20150814;NaHCO₃购自北京化工,批号 20160521;MgSO₄购自西陇化工,批号:7487-88-9;CaCl₂购自西陇化工,批号:10035-04-8。

斑马鱼循环水养殖系统(北京爱生科技公司), 1000 μL 、5000 μL 移液器(eppendorf),恒温培养箱 LRH-250Z(广州瑞明仪器有限公司),真空干燥箱 DZF-6050B(上海恒科学仪器有限公司),体视显微镜 SMZ64(株式会社尼康),微循环观测系统 Eclipse Lv100No(株式会社尼康),生物荧光显微镜 80i(株式会社尼康)。

1.2 实验样品的制备

川芎、延胡索、郁金、丹参、红花、虎杖、莪术、三棱、水蛭、甘草、党参各 30 g,均购自北京同仁堂有限公司,经北京中医药大学刘春生教授鉴定,符合《中华人民共和国药典》2015 版要求。中药水提液制备方法为:取药材饮片粉碎,过 40 目筛,称取约 100 g 药材粉末,加入 10 倍量的水,回流提取 2 次,每次 2

小时,过滤,浓缩,真空干燥。

胚胎培养水的配制:按照 Zebrafish Book^[6] 的标准,配制 NaCl 浓度为 0.137 mol/L、KCl 浓度为 5.4 mol/L、Na₂HPO₄ 0.25 mol/L、K₂HPO₄ 0.44 mol/L、CaCl₂ 1.3 mol/L、MgSO₄ 1.0 mol/L、NaHCO₃ 4.2 mol/L 的水溶液。

邻联茴香胺染色液的配制:精密称取邻联茴香胺 30 mg、醋酸钠 41 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加 35% 的过氧化氢溶液 0.11 mL,再用 40% 的乙醇定容,摇匀。

1.3 斑马鱼的养殖

AB 系野生型斑马鱼和血小板荧光标记转基因斑马鱼(CD41:GFP)均购自于国家斑马鱼中心,由本实验室循环养殖系统饲养,参照 Westerfield 等^[6-7] 的方法繁殖,水温 27.5 ~ 28.5℃,电导率 450 ~ 850 μS/cm, pH 值 6.8 ~ 7.2,明/暗周期为 14 h/10 h。挑选健康性成熟的斑马鱼,按雌雄 1:2 的比例放入交配缸内,次日清晨获得胚胎,用胚胎培养水进行清洗,除去死卵,放入 28℃ 下恒温控光培养箱,每日更换胚胎培养水两次。

1.4 单因素考察

盐酸肾上腺素浓度的单因素考察:在体视显微镜下挑选发育正常的 5 dpf 斑马鱼幼鱼,并将其随机放入含有不同浓度 AH 溶液的 6 孔板中,每孔 30 条,每组 1 孔。依据 AH 对斑马鱼幼鱼的最大非致死浓度,确定 AH 的浓度为 5 μmol/L、10 μmol/L、15 μmol/L、20 μmol/L、25 μmol/L,置于 28.5℃ 恒温生化培养箱中 16 小时。取不同亲本的幼鱼重复实验三次。

定性分析:在实验终点,从每组随机抽取 10 条斑马鱼,用质量浓度为 0.3% 的三卡因将幼鱼麻醉,用自制的发圈将幼鱼取出,侧位放置于双凹载玻片上,用荧光显微镜观察斑马鱼体内血小板的聚集情况,进行直观定性分析。

定量分析:从每组随机抽取 10 条斑马鱼,用邻联茴香胺染色液进行染色,用发圈将幼鱼取出,侧位放置于双凹载玻片上,置于显微镜下对尾部进行拍照。利用 Image-Pro Plus 6 图像处理软件,统计尾部静脉红细胞染色强度,进行定量分析。

诱导时间的单因素考察:在体视显微镜下挑选发育正常的 5 dpf 斑马鱼幼鱼,并将其随机放入含有 AH 溶液(浓度:15 μmol/L)的 6 孔板中,每孔 30 条,每组 1 孔,根据预实验,确定诱导时间为 4 小时、

8 小时、12 小时、16 小时、20 小时、24 小时,取不同亲本的幼鱼重复实验三次,定性定量分析同上。

1.5 正交试验

依据单因素考察的结果,选取 AH 的浓度和诱导时间的 3 个水平。根据斑马鱼的发育规律(斑马鱼在 36 hpf 时表达出功能性血小板和凝血因子^[8-10],72 dpf 完全孵化,7 dpf 之内可以从卵黄获取营养物质,无需喂食^[6]),选取斑马鱼鱼龄的 3 个水平,见表 1,分别以斑马鱼尾静脉血小板的聚集情况和红细胞的染色强度为定性、定量指标,进行 L₉(3⁴)正交实验,优化造模条件,见表 2,并对结果进行极差与方差分析。

在体视显微镜下挑选发育正常的 3 dpf、5 dpf、7 dpf 斑马鱼幼鱼,并将其随机放置在含有 3 mL 胚胎培养水的 6 孔板中^[6,11],每孔 30 条,每组 1 孔,分为 10 组,1 个空白组,空白组为胚胎培养水。根据正交表设计 9 个模型组,取不同亲本的幼鱼重复实验三次,定性定量分析同 1.4。

表 1 因素水平表

水平	AH 的浓度(μmol/L)	诱导时间(h)	鱼龄(dpf)
	A	B	C
1	10	12	3
2	15	16	5
3	20	20	7

表 2 正交实验设计表

实验组号	因素		
	AH 的浓度(μmol/L)	诱导时间(h)	鱼龄(dpf)
I 组	10	12	3
II 组	10	16	5
III 组	10	20	7
IV 组	15	12	5
V 组	15	16	7
VI 组	15	20	3
VII 组	20	12	7
VIII 组	20	16	3
X 组	20	20	5

1.6 组织病理学检查

进行斑马鱼尾静脉组织病理学检查,进一步验证 AH 诱导斑马鱼尾静脉血栓的形成。3 dpf 的斑马鱼在浓度为 15 μmol/L 盐酸肾上腺素溶液中暴露 16 小时。在实验终点,将斑马鱼浸泡并固定在中性福尔马林溶液(10% 的甲醛溶液)中,再用发圈将幼鱼取出,并用不同浓度梯度的乙醇溶液进行脱水,

石蜡包埋,纵向切片,苏木精和伊红(HE)染色^[3]。

1.7 盐酸肾上腺素诱导建立斑马鱼血栓模型的重复性检验

选取 5 个不同亲本的斑马鱼幼鱼,根据正交试验结果进行建模,定性定量分析同 1.4。

1.8 斑马鱼血栓模型在中药抗血栓活性筛选中的适用性

在中药预防血栓形成活性筛选中的适用性:利用 AH 诱导建立的斑马鱼血栓模型,筛选 9 味现已报道有抗血栓作用^[12-14]的中药(川芎、郁金、延胡索、丹参、红花、虎杖、莪术、三棱、水蛭)和 2 味临床常用的中药(甘草、党参)预防血栓形成的活性。在体视显微镜下挑选发育正常的 5 dpf 斑马鱼幼鱼,随机放置在含有 3 mL 胚胎培养水的 6 孔板中,每孔 30 条,每组 1 孔,分为 14 组,空白组为胚胎培养水,模型组为 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 AH,阳性对照组为 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 AH 和 15 $\mu\text{g/mL}$ 阿司匹林的混合液,给药组为 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 AH 和测试药物(浓度如表 5),暴露处理 16 小时,取不同亲本的幼鱼重复实验三次,定性定量分析同 1.4。

在中药治疗血栓活性筛选中的适用性:利用 AH 诱导建立斑马鱼血栓模型,筛选上述 11 味中药治疗血栓的活性。在体视显微镜下挑选发育正常的 5 dpf 斑马鱼幼鱼,随机放置在含有 3 mL 胚胎培养水的 6 孔板中,每孔 30 条,每组 1 孔,分为 14 组,先将斑马鱼暴露在 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 AH 溶液中 16 小时,再将模型组更换为胚胎培养水,给药组更换为所测试药物的样品溶液(浓度如表 5),阳性对照组更换为 15 $\mu\text{g/mL}$ 的阿司匹林溶液,放置于 28.5℃ 恒温生化培养箱中 16 小时,取不同亲本的幼鱼重复实验三次,定性定量分析同 1.4。

1.9 统计学处理

数据运用 SAS 8.2 统计软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,部分数据不符合正态分布,故组间比较采用非参数检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,以 $P<0.01$ 为有显著性统计学差异。

2 结果

2.1 单因素考察

盐酸肾上腺素浓度的单因素考察:低浓度时,斑马鱼尾静脉红细胞的染色强度与 AH 浓度成正相关,15 $\mu\text{mol/L}$ 时尾静脉红细胞的染色强度最大,

20 $\mu\text{mol/L}$ 时尾静脉红细胞的染色出现下降趋势,25 $\mu\text{mol/L}$ 时尾静脉红细胞的染色大幅度下降(如图 1A 所示),并且斑马鱼出现游动缓慢、侧位、心包水肿的现象,因此选取 10 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 三个水平。

诱导时间的单因素考察:4 小时至 16 小时,尾静脉红细胞的染色强度与诱导时间成正相关,在 16 小时尾静脉红细胞的染色强度最大,并逐渐趋于平稳(如图 1B 所示),因此选取 12 小时、16 小时、20 小时三个水平。

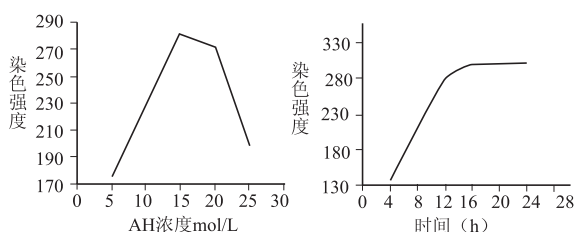


图 1 AH 浓度和诱导时间对尾静脉血栓形成的影响

2.2 斑马鱼尾静脉血栓的定性分析

在显微镜下对斑马鱼尾静脉血栓进行直观观察并拍照,如图 2 所示,空白组(A)斑马鱼无血栓形成,模型组(B)斑马鱼形成严重血栓,阳性对照组(C)斑马鱼有少量血栓形成。



图 2 斑马鱼尾静脉红细胞邻联茴香胺染色图

在荧光显微镜下对斑马鱼尾静脉血小板的聚集进行直观观察并拍照,如图 3 所示,空白组(A)斑马鱼的血小板在血管内没有出现聚集的现象,模型组(B)斑马鱼的血小板有大量聚集的现象,阳性对照组(C)斑马鱼的血小板有少量的聚集。

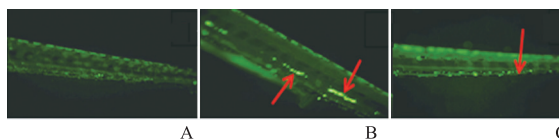


图 3 斑马鱼尾静脉血小板荧光聚集图

2.3 正交实验

如表 3 所示,并对结果进行极差分析,见表 3,对各个因素进行方差分析,见表 4。由表 3 可知,极差 $R_A > R_B > R_C$,即 AH 的浓度是影响血栓形成的主要影响因素,其次是诱导时间和鱼龄。根据各因素的 K 值可知,最佳组合为 $A_2B_2C_3$ 。由表 4 可知,AH 的

浓度对血栓形成有显著性差异,诱导时间和鱼龄对血栓形成无显著性差异,并且鱼龄 3 个水平的极差较小,因此,可以选取 3 dpf 的斑马鱼幼鱼进行造模,以减少养殖时间与实验周期。以此条件建立的血栓模型,斑马鱼游动正常,无明显的畸形和脏器毒性。

表 3 正交实验结果

列号 实验组号	A AH 的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	B 诱导时间 (h)	C 鱼龄 (dpf)	血栓染色强度
I 组	10	12	3	195.00 \pm 9.80
II 组	10	12	5	223.87 \pm 4.75
III 组	10	12	7	225.87 \pm 7.93
IV 组	15	16	5	278.73 \pm 1.87
V 组	15	16	7	300.87 \pm 4.84
VI 组	15	16	3	285.00 \pm 10.56
VII 组	20	20	7	222.47 \pm 9.15
VIII 组	20	20	3	230.07 \pm 6.30
X 组	20	20	5	193.27 \pm 2.49
K ₁	214.913	232.067	236.690	
K ₂	288.200	251.603	231.957	
K ₃	215.270	234.713	249.737	
R	73.287	19.536	17.780	

表 4 正交实验方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	10689.848	2	24.893	19.000	*
B	673.958	2	1.569	19.000	
C	508.748	2	1.185	19.000	
误差	429.43	2		19.000	

2.4 斑马鱼尾静脉组织病理学检查

由图 4 可知,空白组(A)斑马鱼尾静脉血管内红细胞无聚集现象,模型组(B)斑马鱼尾静脉血管内红细胞出现聚集现象。

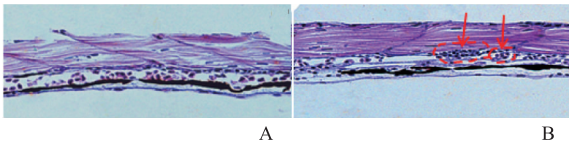


图 4 斑马鱼尾静脉组织 HE 染色图

2.5 重复性考察

五次尾静脉红细胞的染色强度分别为 294.73、289.85、299.12、317.49、302.85, RSD 为 1.16%, 小于 5%, 实验结果表明 AH 诱导建立的斑马鱼血栓

模型的重复性良好。

2.6 斑马鱼血栓模型在中药抗血栓活性筛选中的适用性

采用非参数检验对数据进行分析,由表 5 可知,与模型组相比,阳性对照组斑马鱼尾静脉红细胞的染色强度明显减少,并有显著性统计学差异($P<0.01$)。在中药预防血栓形成活性筛选的实验中,与模型组相比,丹参、红花、虎杖、三棱、水蛭组斑马鱼尾静脉红细胞的染色强度减少($P<0.01$),表现出明显抑制血栓形成的活性,川芎、郁金、延胡索、莪术组斑马鱼尾静脉红细胞的染色强度也减少($P<0.05$),有抑制血栓形成的活性。在中药治疗血栓活性筛选的实验中,与模型组相比,川芎、丹参、红花、虎杖、三棱、水蛭组斑马鱼尾静脉红细胞的染色强度减少,并有显著统计学差异($P<0.01$),有明显治疗斑马鱼血栓的活性。郁金、延胡索、莪术组斑马鱼尾静脉红细胞的染色强度也减少,差异有统计学意义($P<0.05$),表现出治疗血栓的活性。但在预防与治疗实验中,与模型组相比,甘草、党参组斑马鱼尾静脉红细胞的染色强度都未减少($P>0.05$),未表现出抗血栓的活性。因此,AH 诱导建立的斑马鱼血栓模型可以对抗血栓药物的活性进行筛选与评估。

表 5 不同中药对斑马鱼血栓的预防与治疗作用比较($\bar{x}\pm s$)

药物名称	浓度	染色强度(预防)	染色强度(治疗)
模型组	15 $\mu\text{mol/L}$	301.76 \pm 3.06	301.27 \pm 4.36
阳性对照组	15 $\mu\text{g/mL}$	129.95 \pm 1.29 ^b	113.47 \pm 10.86 ^b
党参	350 mg/L	290.30 \pm 9.37	312.10 \pm 13.04
甘草	350 mg/L	285.85 \pm 3.76	324.27 \pm 8.75
川芎	250 mg/L	180.19 \pm 9.80 ^a	153.46 \pm 8.55 ^b
郁金	250 mg/L	196.58 \pm 5.29 ^a	193.07 \pm 13.05 ^a
延胡索	150 mg/L	182.59 \pm 4.18 ^a	201.37 \pm 19.04 ^a
红花	250 mg/L	163.65 \pm 9.77 ^b	137.57 \pm 8.02 ^b
丹参	250 mg/L	135.64 \pm 7.78 ^b	127.70 \pm 3.80 ^b
虎杖	150 mg/L	160.28 \pm 0.31 ^b	166.37 \pm 17.11 ^b
莪术	150 mg/L	179.45 \pm 13.43 ^a	185.60 \pm 6.36 ^a
三棱	150 mg/L	139.39 \pm 7.58 ^b	127.13 \pm 1.03 ^b
水蛭	150 mg/L	134.62 \pm 4.57 ^b	117.25 \pm 6.12 ^b

注:与模型组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

3 讨论与分析

斑马鱼与人类基因相似度高达 87%,在心血管系统不完善的情况下,仍可以存活,并且 Williams 等^[15]研究发现斑马鱼血液系统与人类血液系统的

血小板和凝血因子有许多共同的特点,因此逐步成为了研究血栓和抗血栓药物筛选的模型生物。本研究旨在优化 AH 诱导建立斑马鱼血栓模型的建模条件,并研究此模型在中药抗血栓活性的筛选与疗效评估中的适用性。

实验选取了 AH 的浓度,诱导时间,鱼龄三个因素,进行正交实验,考察 AH 诱导建立斑马鱼血栓模型的最佳条件,即 3 dpf 的斑马鱼在浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ AH 溶液中暴露 16 小时,在此条件下所建的斑马鱼血栓模型重复性良好,RSD 为 1.16%,小于 5.0%,结果表明,正交实验在斑马鱼建模条件的筛选实验中具有良好的适用性。

斑马鱼早期幼鱼透明,可在体视显微镜下对尾静脉血栓形成进行可视化追踪与定性分析,结果显示,AH 可以引起斑马鱼血流速度减慢,血小板聚集增多,与文献报道相符^[16-17],并且尾静脉血栓形成的与尾静脉红细胞的染色强度相一致。斑马鱼尾静脉组织病理学诊断显示,模型组红细胞聚集明显增多,进一步验证了 AH 诱导斑马鱼尾静脉血栓。因此,AH 诱导建立的斑马鱼血栓模型可以较好地模拟人类疾病状态下血栓的发生,用于体内血栓形成的研究。

活血化瘀类中药具有较好的抗血栓作用,在临床实践中已经被广泛应用与验证。本实验利用 AH 诱导建立的斑马鱼血栓模型对 11 味中药进行抗血栓活性筛选。实验结果显示,9 味活血化瘀中药在斑马鱼血栓模型中表现出显著的抗血栓的作用,甘草、党参在斑马鱼血栓模型中未表现出抗血栓的作用,与文献报道相符^[18-19]。本模型是基于整体动物建立的在体血栓模型,符合中药治疗的整体性作用特点,对于中药抗血栓的活性筛选与评价尤为适用。实验后期将利用此模型研究活血化瘀中药的抗血栓物质基础与机制,并考察此模型在活血化瘀药质量评价中的适用性,以期对活血化瘀中药的生物活性评价提供一种新的方法。

参 考 文 献

- [1] 聂勇胜. 复方血栓通胶囊抗血栓作用及其机制的实验研究[D]. 广州:广州中医药大学,2014.
- [2] Sathler PC, Lourenço AL, Rodrigues CR, et al. In vitro and in vivo analysis of the antithrombotic and toxicological profile of new antiplatelets N-acylhydrazones and development of nanosystems; determination of novel NAH derivatives antiplatelet and nanotechnological approach[J]. Thrombosis Research, 134(2): 376-383.
- [3] Zhu XY, Liu HC, Guo SY, et al. A Zebrafish Thrombosis Model for Assessing Antithrombotic Drugs[J]. Zebrafish, 2015, 13(4): 335-342.
- [4] 张勇,朱晓宇,郭胜亚,等. 苯肼诱导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.
- [5] Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2004, 4(5): 504-512.
- [6] Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish [M]. 4th. Eugene: University of Oregon Press, 1993.
- [7] Brand M, Granato M, Nusslein-Volhard C. Keeping and Raising Zebrafish [M]. Oxford: Oxford University Press, 2002: 7-37.
- [8] Weyand AC, Shavit JA. Zebrafish as a model system for the study of hemostasis and thrombosis[J]. Curr Opin Hematol, 2014, 21: 418-422.
- [9] 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.
- [10] Khandekar G, Kim S, Jagadeeswaran P. Zebrafish thrombocytes: functions and origins[J]. Advances in Hematology, 2012, 2012(7): 857058.
- [11] McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J]. Drug Discovery Today, 2008, 13(9-10): 394.
- [12] 辛淑杰. 丹参的药理作用及临床应用探讨[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(5): 26-27.
- [13] 金玉青,洪远林,李建蕊,等. 川芎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药与临床, 2013, 4(3): 44-48.
- [14] 黄新炜,段玉峰,韩果萍,等. 中药三棱的化学及药理研究进展[J]. 西安联合大学学报, 2003, 6(4): 22-25.
- [15] Williams C H, Hong C C. Multi-Step Usage of in Vivo Models During Rational Drug Design and Discovery [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(4): 2262-2274.
- [16] 肖素军,谢露,黎静,等. 肾上腺素损伤内皮致动脉血栓形成的实验研究[J]. 基层医学论坛, 2010, 14(4): 97-99.
- [17] 赵玲,魏海峰,李雅莉,等. 从血液流变学的改变分析肾上腺素致血瘀证大鼠模型的建立[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2): 188-190.
- [18] 潘素静,龙晓英,陈梓侠,等. 活血中药对血瘀和血栓模型作用的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2013, (5): 78-82.
- [19] 李伦,刘琳,李传钰,等. 3 种活血化瘀药对实验性血瘀证模型大鼠作用的比较研究[J]. 中医药学报, 2011, (6): 37-39.

(收稿日期: 2016-09-19)

(本文编辑: 韩虹娟)