

# 斑马鱼在血小板研究中的应用

李国然 单冬凯 宋晓伟 荆 清 赵仙先

**【摘要】** 斑马鱼是心血管生理病理研究中常用的模式生物。斑马鱼血小板与人类血小板具有高度相似性,而且斑马鱼具有体外受精、繁殖力强、胚胎透明等优点,越来越多关于血小板的研究利用斑马鱼作为模式生物,并取得了一定的进展。此文简要概述了斑马鱼血小板与人类血小板的相似性,以及利用斑马鱼作为模式生物研究血小板的一些进展。

**【关键词】** 斑马鱼;血小板;模式生物

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.03.012

血小板参与了冠状动脉粥样硬化等心血管事件的病理进程。在治疗中,虽然抗血小板治疗效果肯定,但是仍有部分患者发生心肌梗死、猝死等不良事件<sup>[1]</sup>。因此对于血小板生理病理深入研究就显得十分必要。近年来,越来越多的研究采用斑马鱼作为平台,与其他模式生物相比,斑马鱼具有高繁殖力、体外受精、胚胎透明及养殖造价低等特点,其在心血管领域尤其是血小板研究中的应用越来越受到重视。

## 1 斑马鱼的特点

斑马鱼(*Danio rerio*)是属于辐鳍亚纲鲤科短担尼鱼属的一种硬骨鱼。Streisinger 等首先对斑马鱼成功实施了体外受精技术、单倍体诱导技术,建立了纯合品系,并获得了第一个自然突变体——golden。此后斑马鱼就开始作为模式生物应用于生命科学研究中。斑马鱼具有以下特点:(1)成年鱼个体小,易于饲养。(2)发育快速、性成熟期短、繁殖力强。(3)胚胎体外发育,易于观察和操作。(4)较完善的胚胎和遗传学操作技术。(5)基因组序列的注释即将完成。(6)品系资源丰富。

## 2 斑马鱼血小板的形态学特点

与人类血小板不同,斑马鱼血小板为带有稀疏细胞质巨大细胞核的有核细胞。在光镜下斑马鱼的血小板与淋巴细胞的形态相似,但血小板胞质更加致密,通过血小板聚集实验可以鉴别淋巴细胞和血小板。电镜下斑马鱼血小板细胞表面光滑,染色质致密,细胞质中包含大量的囊泡,有些通过小管

系统开口于细胞膜。此外还可观察到伪足样突起。

## 3 斑马鱼血小板与人类血小板的相似性

尽管斑马鱼血小板与人类血小板在形态上具有一定差异,但二者在生理功能方面具有相似性,例如血小板的黏附、激活聚集、释放反应等<sup>[2]</sup>。因此,利用斑马鱼作为模式生物研究血小板的生理病理功能,具有较强的可行性和应用前景。

### 3.1 血小板黏附

血管内膜在一系列外来刺激条件下发生损伤,血小板通过特定的膜受体结合到内皮下细胞外基质上,从而触发血栓的形成,促进止血和血管的修复<sup>[3]</sup>。在人类,血小板膜表面的黏附蛋白糖蛋白 I b-V-IX (GP I b-V-IX) 通过血管性血友病因子(vWF)与内皮下细胞外基质结合<sup>[4-6]</sup>。vWF 由血管内皮细胞及巨核细胞合成和分泌,是一种存在于血浆、内皮细胞表面和血小板  $\alpha$  颗粒的糖蛋白。vWF 可与胶原及血小板膜 GP I b 和 GP II b/III a 结合,在血小板黏附与聚集中发挥重要作用。血小板也可以通过 GP II b/III a 与 vWF 结合从而黏附到细胞外基质,但这过程仅在血小板活化变形后发生,使黏附更加牢固<sup>[6]</sup>。有关研究在斑马鱼体内发现了 vWF mRNA 和 vWF 的存在<sup>[7]</sup>。斑马鱼数据库检索发现斑马鱼血小板表面黏附蛋白的种类与人类血小板保持一致,两者结构相似性很高<sup>[8]</sup>。

### 3.2 血小板的激活及聚集

血小板与内皮下细胞外基质结合后导致血小板激活,继而释放活性物质如花生四烯酸及血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)等,加速活化进程。TXA<sub>2</sub> 是花生四烯酸代谢过程中生成的具有很强生理活性的产物,具

有强烈的血小板聚集作用,能促使血小板聚集形成血栓。血小板活化后,蕴含其中的致密颗粒释放活性物质,如二磷酸腺苷、凝血酶等,它们激活并招募循环血中的静息血小板,富集于损伤部位<sup>[9]</sup>,这过程为血小板聚集,此反应的发生与血小板之间的 GP II b/III a 黏附密切相关。斑马鱼数据库检索显示,在斑马鱼血小板上存在二磷酸腺苷受体。凝血酶活化血小板主要通过一族 G 蛋白偶连的蛋白酶活化受体(PARs)介导。人类凝血酶受体为 PAR1-4,在斑马鱼上经证实也存在 PAR1-4。有文献报道了 27 种斑马鱼 PAR,例如 PAR1 家族、PAR2 家族等<sup>[10]</sup>。环氧酶(COX)是花生四烯酸代谢过程中前列腺素(PGs)合成的限速酶,具有 2 种结构亚型,即结构型 COX-1 和诱导型 COX-2。斑马鱼拥有 COX-1 和 COX-2 两种酶,而哺乳动物仅拥有 COX-1 一种酶<sup>[11]</sup>。此外,磷脂酶 A2 及血栓素 A 合成酶-1 也被发现存在于斑马鱼体内。斑马鱼血小板同样可以被胶原、二磷酸腺苷、瑞托霉素、花生四烯酸等激活而发生聚集。总之,斑马鱼血小板与人类血小板激活受体及花生四烯酸代谢相关酶具有高度相似性<sup>[8]</sup>。Jagadeeswaran 等<sup>[2]</sup>利用瑞斯托霉素、胶原、凝血酶、二磷酸腺苷和花生四烯酸刺激斑马鱼全血发现血液凝固,表明了人类与斑马鱼血小板在激活和聚集方面具有一定的相似性。

### 3.3 血小板的分泌

血小板细胞内含有丰富的胞内颗粒,包括致密体、 $\alpha$  颗粒、溶酶体。致密体中含有 ATP、ADP、 $\text{Ca}^{2+}$ 、5-羟色胺、磷酸和胍核苷酸。其中, $\alpha$  颗粒含有许多酶及酶的抑制剂,以及部分粘附分子、生长因子、细胞因子样蛋白和凝血因子等<sup>[12]</sup>。在正常血液循环中血小板处于静息状态,在受到生理或物理刺激因子作用时,血小板发生活化伸出伪足并释放胞内颗粒内容物,参与生理性止血或病理性血栓形成等。同样,斑马鱼在血小板分泌的特性和分泌的物质方面与人类相比也基本相同<sup>[8]</sup>。

## 4 利用斑马鱼作为模式生物研究血小板

由于斑马鱼和人类血小板的相似性,使得在斑马鱼体内研究血小板功能,为探索人类血小板相关疾病的病理机制提供了理论基础。但是由于斑马鱼血小板功能研究起步较晚,目前还处于初级阶段,相关报道还较少。CD41 抗原是一种相对分子质量为 14 000 的糖蛋白,CD41 分子是整合素  $\alpha$  II b 链,也称血小板表面 GP II b,是位于血小板表面的

黏附蛋白受体,有文献报道,通过显微注射 CD41-GFP 质粒构建 CD41-GFP 转基因斑马鱼,用绿色荧光蛋白标记斑马鱼血小板,受精后 48 h 在斑马鱼幼鱼动静脉中出现带有绿色荧光的血小板,这样就可以在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下直接观察血小板<sup>[13]</sup>。Gregory 等<sup>[14]</sup>发展了激光介导血栓形成的方法来评估血小板的止血及凝血功能。这种方法主要是通过将斑马鱼幼鱼暴露在  $\text{FeCl}_3$ ,或者利用激光损伤的方法损伤血管壁,构建血管闭塞模型,并检测以下 4 个指标:从激光损伤到动脉闭塞的时间、从激光损伤到第一个血小板附着的时间、从激光损伤到血栓完全溶解所需的时间、形成血栓的表面积,从而通过衡量这些指标来了解血小板功能的变化<sup>[15-18]</sup>。上述 CD41-GFP 转基因斑马鱼及斑马鱼血管损伤模型的建立为后续血小板的研究提供了良好的平台。此外,基因敲除技术在斑马鱼研究中已经被广泛应用,同样在斑马鱼血小板功能研究方面也应用广泛<sup>[19]</sup>。斑马鱼基因敲除技术主要是通过将相关基因的吗啉基寡核苷酸显微注射至斑马鱼胚胎内,从而达到目的基因敲除的目的。基因敲除技术应用于斑马鱼使得大规模筛选血小板功能调控基因成为可能。Williams 等<sup>[20]</sup>利用斑马鱼血管损伤模型及基因敲除技术筛选出 *prkca*、*prkcb* 在维持斑马鱼血小板功能方面发挥重要作用,敲除这些基因后斑马鱼出现出血及血栓表面积减低的表现。*Mlck1a* 为肌球蛋白轻链激酶的亚型,相关文献报道,通过斑马鱼卵显微注射 *mlck1a* 的吗啉基寡核苷酸敲除该基因,利用 CD41-GFP 转基因斑马鱼及斑马鱼血管损伤模型评估血小板功能的改变,证明 *mlck1a* 有助于血小板形状的变化和血栓形成<sup>[21]</sup>。O'Connor 等<sup>[22]</sup>通过生物信息学筛选出 *BAMBI*、*LRRC32*、*DCBLD2*、*ESAM*、*ANTXR2* 几种基因可能编码血小板膜蛋白,利用基因敲除技术实现上述基因的沉默,随后在 CD41-GFP 转基因斑马鱼上利用激光介导的血管损伤模型评估血小板功能的改变,证实了 *BAMBI*、*LRRC32* 的促进血栓形成作用及 *DCBLD2*、*ESAM* 的抑制血栓形成作用。通过注射凝血酶基因的吗啉基寡核苷酸实现凝血酶基因的敲除,然后分析相关基因表达的改变,发现一种 *phlda3* 的基因表达明显升高<sup>[23]</sup>。向成年斑马鱼静脉内注射  $\alpha$  II b 的吗啉基寡核苷酸敲除该基因,证实  $\alpha$  II b 基因在维持血小板的正常止血功能上具有重要作用,同时发展了一种在成年斑马

鱼体内敲除基因的方法<sup>[24]</sup>。

## 5 展望

由于斑马鱼与人类血小板的高度相似性,未来利用斑马鱼作为平台,结合基因诱变、基因敲除、转基因和胚胎学技术,广泛开展血小板功能的研究成为可能。利用 CD41-GFP 转基因斑马鱼以及激光介导的血管损伤技术,可以大量筛选影响血小板功能的基因。同时,斑马鱼的高繁殖力、幼鱼早期透明等优点也将为相关研究的开展提供便利。随着斑马鱼实验技术越来越成熟,其在血小板研究中的优势将会更加突出。

## 参 考 文 献

- [1] Malek LA, Spiewak M, Fillipiak KJ, et al. Persistent platelet activation is related to very early cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes[J]. *Kardiol Pol*, 2007,65(1):40-45.
- [2] Jagadeeswaran P, Sheehan JP, Craig FE, et al. Identification and characterization of zebrafish thrombocytes[J]. *Br J Haematol*, 1999,107(4):731-738.
- [3] Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997,29(1):91-105.
- [4] Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications[J]. *Circ J*, 2010,74(4):597-607.
- [5] Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2005,31(4):381-392.
- [6] Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008,28(3):403-412.
- [7] Carrillo M, Kim S, Rajpurohit SK, et al. Zebrafish von Willebrand factor[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010,45(4):326-333.
- [8] Lang MR, Gihir G, Gawaz MP, et al. Hemostasis in *Danio rerio*: is the zebrafish a useful model for platelet research? [J]. *J Thromb Haemost*, 2010,8(6):1159-1169.
- [9] Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, et al. Signaling during platelet adhesion and activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010,30(12):2341-2349.
- [10] Kim S, Carrillo M, Kulkarni V, et al. Evolution of primary hemostasis in early vertebrates[J]. *PLoS One*, 2009,4(12):e8403.
- [11] Grosser T, Yusuff S, Cheskis E, et al. Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002,99(12):8418-8423.
- [12] Dale GL, Friese P, Batar P, et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface[J]. *Nature*, 2002,415(6868):175-179.
- [13] Lin HF, Traver D, Zhu H, et al. Analysis of thrombocyte development in CD41-GFP transgenic zebrafish[J]. *Blood*, 2005,106(12):3803-3810.
- [14] 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.
- [15] Jagadeeswaran P, Carrillo M, Radhakrishnan UP, et al. Laser-induced thrombosis in zebrafish[J]. *Methods Cell Biol*, 2011,101:197-203.
- [16] Jagadeeswaran P, Cykowski M, Thattaliyath B. Vascular occlusion and thrombosis in zebrafish[J]. *Methods Cell Biol*, 2004,76:489-500.
- [17] Jagadeeswaran P, Liu YC, Sheehan JP. Analysis of hemostasis in the zebrafish[J]. *Methods Cell Biol*, 1999,59:337-357.
- [18] Jagadeeswaran P, Paris R, Rao P. Laser-induced thrombosis in zebrafish larvae: a novel genetic screening method for thrombosis[J]. *Methods Mol Med*, 2006,129:187-195.
- [19] Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish[J]. *Nat Genet*, 2000,26(2):216-220.
- [20] Williams CM, Feng Y, Martin P, et al. Protein kinase C alpha and beta are positive regulators of thrombus formation in vivo in a zebrafish (*Danio rerio*) model of thrombosis[J]. *J Thromb Haemost*, 2011,9(12):2457-265.
- [21] Tournioj E, Weber GJ, Akkerman JW, et al. *Mlck1a* is expressed in zebrafish thrombocytes and is an essential component of thrombus formation[J]. *J Thromb Haemost*, 2010,8(3):588-595.
- [22] O'Connor MN, Salles II, Cvejic A, et al. Functional genomics in zebrafish permits rapid characterization of novel platelet membrane proteins[J]. *Blood*, 2009,113(19):4754-4762.
- [23] Day KR, Jagadeeswaran P. Microarray analysis of prothrombin knockdown in zebrafish[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2009,43(2):202-210.
- [24] Kim S, Radhakrishnan UP, Rajpurohit SK, et al. *Vivo-Morpholino* knockdown of  $\alpha$ IIb: A novel approach to inhibit thrombocyte function in adult zebrafish[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010,44(3):169-174.

(收稿:2013-02-04 修回:2013-03-14)

(本文编辑:金谷英)