

## 基于高内涵成像系统的斑马鱼血流动态分析

### Dynamic Analysis of Zebrafish Blood Flow by High-content Imaging System

任灿<sup>1</sup>, 陈雪纯<sup>1</sup>, 吴慧敏<sup>1</sup>, 赵璐<sup>1,\*</sup>, 王毅<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>药物信息学研究所, 浙江大学药学院, 杭州市, 浙江; <sup>2</sup>浙江大学智能创新药物研究院, 杭州市, 浙江

\*通讯作者邮箱:[lzhao@zju.edu.cn](mailto:lzhao@zju.edu.cn)

引用格式: 任灿, 陈雪纯, 吴慧敏, 赵璐, 王毅. (2021). 基于高内涵成像系统的斑马鱼血流动态分析. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010854. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010854.

How to cite: Ren, C., Chen, X. C., Wu, H. M., Zhao, L. and Wang, Y. (2021). Dynamic Analysis of Zebrafish Blood Flow by High-content Imaging System. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010854. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010854. (in Chinese)

**摘要:** 心脑血管疾病是近 30 年来全球首位死亡因素, 而血栓形成是心脑血管意外的关键病理过程。在血栓性疾病的病理机制研究和新药研发中, 对实验模型的血流动态分析极为必要。新兴脊椎动物模型斑马鱼体外发育且早期胚胎透明, 并在受精后 24 小时即建立全身血液循环, 故成为研究心血管循环相关疾病的理想动物模型。目前, 已有较多标记特定细胞类型的转基因荧光鱼被各实验室广泛使用, 例如标记红细胞的 *Tg (LCR:eGFP)* 鱼系, *Tg (gata1:eGFP)* 鱼系等, 使血流动态观测更为便捷。本文集中介绍了如何使用高内涵成像系统对斑马鱼活体胚胎进行血流动态分析, 并以苯肼血栓疾病造模为例, 为该方法在观测血栓性疾病的应用进行了展示。本方法具有操作简便、通量大、及活体动态观测等优势, 可应用于抗血栓药物及相关药物的大规模高通量体内筛选。

**关键词:** 斑马鱼, 血流, 红细胞流速, 高内涵成像

### 研究背景

血栓事件发生率在全球逐年增加。其中, 动脉血栓形成是缺血性心脏病与中风的关键病理机制, 而静脉血栓形成可导致静脉栓塞与肺栓塞, 是癌症病患中的主要致死因素。抗血栓治疗主要包括抗凝与抗血小板治疗。前者代表性药物如肝素、华法林等, 主要通过抑制凝血级联反应中的凝血因子发挥作用; 后者则主要作用于血小板活化信号通路中的关键靶点, 如环氧化酶抑制剂阿司匹林通过抑制血栓素 A<sub>2</sub> 合成发挥抗栓作用, 是心

脑血管血栓性事件二级预防的一线用药 (Depta and Bhatt, 2015)。然而, 包括阿司匹林在内的抗栓药物仍存在较多临床局限性, 如导致消化道出血等, 临床使用仍存在争议 (Raber *et al.*, 2019)。因此, 抗栓治疗领域的新药研发仍是重要研究方向。在血栓性疾病的病理机制研究和新药研发中, 对实验模型的血流动态分析极为必要。斑马鱼是新兴脊椎动物模式生物, 因其繁殖力强, 胚胎体型小且早期透明等独特优势, 倍受发育生物学及大规模毒理学及药理学筛选相关研究的青睐。其中, 斑马鱼胚胎在受精后 24 小时即建立全身血液循环, 且其心血管系统相关信号通路与人类高度保守, 故成为研究心血管循环相关疾病的理想动物模型。本课题组前期工作结合红细胞特异性荧光标记转基因荧光鱼, 例如 *Tg (LCR:eGFP)* 鱼系 (Ganis *et al.*, 2012), *Tg (gata1:eGFP)* 鱼系 (Traver *et al.*, 2003) 等, 使用苯肼构建血管内皮及红细胞膜损伤相关的血栓疾病模型, 对活血化瘀类中成药中的抗栓活性成分进行了筛选及深入分析 (Sheng *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021)。实验工作中发现, 使用手动式显微镜逐孔视频拍摄, 及后期基于视频与其他图像处理软件的红细胞流速定量分析过程对时间与人力成本要求较高, 难以适应大规模药理筛选的通量要求。而使用高内涵成像系统, 可自动进行拍摄, 并通过其配套软件完成血流定量分析, 具有操作简便、通量大、及活体动态观测等优势, 可应用于抗血栓药物及相关药物的大规模高通量体内筛选。因此本文以苯肼血栓疾病造模为例, 介绍高内涵成像在斑马鱼活体胚胎进行血流动态分析相关实验方法, 对该方法在观测血栓性疾病的应用进行了展示。

## 材料与试剂

1. *Tg (LCR:eGFP)* 转基因斑马鱼 (Ganis *et al.*, 2012) (购自浙江大学公共技术平台斑马鱼分平台)
2. 苯肼 (阿拉丁, catalog number: G1324044)
3. 阿司匹林 (碧云天, catalog number: M0119A)
4. 1-苯基-2-硫脲(PTU) (Sigma-Aldrich, catalog number: 103-85-5)
5. 亚甲基蓝 (阿拉丁, catalog number: M19650)
6. 3-氨基苯甲酸乙酯 (Sigma-Aldrich, catalog number: MS-222)
7. 二甲基亚砜 (阿拉丁, catalog number: D103281)
8. 蛋白酶 (Roche, catalog number: 165921)

9. 一次性实验室用塑料吸管 (为尔康, catalog number: W208)
10. 96 孔黑板 (Corning, catalog number: 3340)
11. E3 胚胎培养液 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 高内涵成像系统 (Molecular Devices, model: ImageXpress Micro Confocal)
2. 体式显微镜 (麦克奥迪, model: SMZ-168)
3. 微量移液器 (德国, model: Eppendorf)
4. 实验用斑马鱼养殖与繁育系统 (上海海圣, model: Z-C-D5)
5. 智能生化培养箱 (宁波赛福, model: SPX-250)

## 实验步骤

### 一、斑马鱼饲养及胚胎采集

1. 成鱼饲养条件: 28 ℃ 恒温饲养; 光暗时间 14 h:10 h; 每日给予两次饲喂。具体养殖条件参照 (Westerfield, 2000)
2. 胚胎采集: 选择红细胞荧光标记的转基因鱼系, 实验前一日 19: 00 之前将雌雄鱼按 1:1, 2:1 或 2:2 的比例放于交配盒中, 用挡板隔开雌雄鱼。第二日 9: 00 左右抽出挡板, 雌雄鱼进行交配。待其产卵后, 将受精卵收集至 10 cm 培养皿中, 置于 E3 胚胎培养液中, 于生化培养箱中 28.5 ℃ 孵育至受精后 24 小时。
3. 抑制黑色素生成: 胚胎发育至约受精后 24 小时, 换液至含有 200 μM PTU 的 E3 胚胎培养液, 以抑制黑色素的生成便于后续显微成像。继续孵育至血流动态观察时期, 或相应药物处理时期。

### 二、斑马鱼胚胎入板及药物处理

1. 胚胎入板: 胚胎发育至受精后 24 小时即建立血流, 可根据具体实验需求选择合适时期进行血流动态观察。荧光成像前, 在体式显微镜下使用一次性实验室用塑料吸管或 1 ml 移液器, 将其按每孔一枚胚胎的比例移入 96 孔板, 每孔放置 300 μl E3 培养液或添加药物的培养液, 并进行后续实验操作。
2. 早期胚胎破膜: 斑马鱼胚胎外层绒毛膜约在受精后 30-48 小时自行破裂, 胚胎自然脱壳。但如需观测早期血流, 则需要进行人工破膜。将胚胎孵育于添加 2 mg/ml 蛋

白酶的 E3 培养液约 10 分钟后，使用 E3 培养液润洗 3-4 次，使胚胎与绒毛膜分离。

3. 药物处理：如需药物处理构建疾病模型或进行药理学分析，待胚胎发育至相应阶段，进行药物处理。以苯肼造模及阳性抗凝药阿司匹林为例 (Sheng *et al.*, 2020):

- 3.1 阿司匹林预保护：待胚胎发育至受精后 2 天，将胚胎按每孔一条的比例移入 96 孔板，加入 300  $\mu$ l 含 15  $\mu$ g/ml 阿司匹林的 E3 培养液，孵育 24 小时。

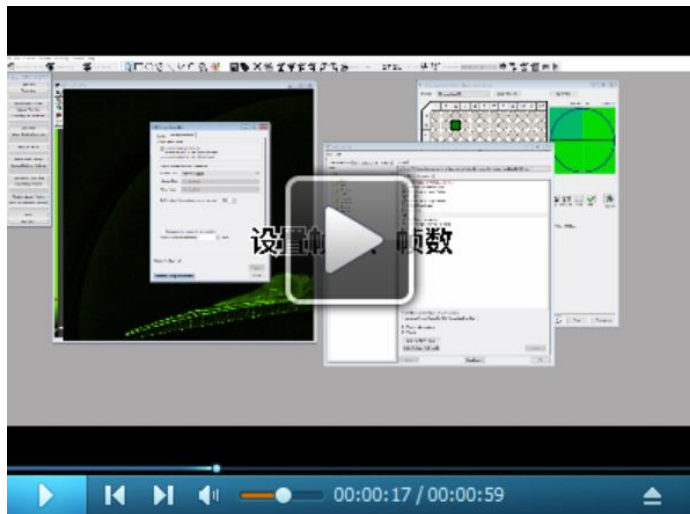
- 3.2 苯肼血栓造模：待胚胎发育至受精后 3 天，加入 300  $\mu$ l 含 0.75  $\mu$ M 苯肼的 E3 培养液，造模 12 小时后，替换为 300  $\mu$ l E3 培养液，进行后续拍照分析。

### 三、斑马鱼胚胎血流拍摄

1. 胚胎麻醉：在 E3 培养液中添加 0.016% 3-氨基苯甲酸乙酯后，等待约 10 分钟。体式显微镜下用移液枪头轻触胚胎，如无明显逃避反应，提示麻醉成功，此时胚胎大多呈现侧躺状态。
2. 拍摄血流动态视频：使用高内涵成像系统进行逐孔自动拍摄（图 1-2）。首先在 2 倍镜或 4 倍镜下定位胚胎并进行初步手动对焦，也可使用高内涵成像平台自带软件 MetaXpress 编程进行自动对焦。选中血管区域，切换 20 倍镜拍摄视频，拍摄速度为 35.7 帧/秒（详见视频 1）。

### 四、斑马鱼胚胎红细胞流速定量分析

1. 自动定量红细胞流速：拍摄后，选取每个斑马鱼胚胎相同部位的背主动脉和尾静脉位点进行观察，使用 MetaXpress 软件自动测算该位点在单位时间内流过的红细胞数目（图 3-4）：Measure→Region Measurements→Select Region→Measure Integrated Intensity（详见视频 1）。



视频 1. C 斑马鱼血流拍摄与分析

2. 血流流速分类：首先计算出对照组血流速度的平均值 $\Delta$ ，将 $\geq 70\% \Delta$ 定义为“血流正常”，反之则定义为“外周血流受阻”。该比值可因具体实验中观测到的阳性药药效或目标筛查敏感度而定 (Sheng *et al.*, 2020)。
3. 样本重复及统计分析：建议各组设置 8-12 枚胚胎，并计算出一个血流正常比例数值，作为单个生物样本重复。各组都进行至少 3 次生物样本重复。两组间采用 Student's t-test 分析进行比较，多组间采用 one-way anova 分析比较， $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 结果与分析

1. 在低倍镜下定位胚胎

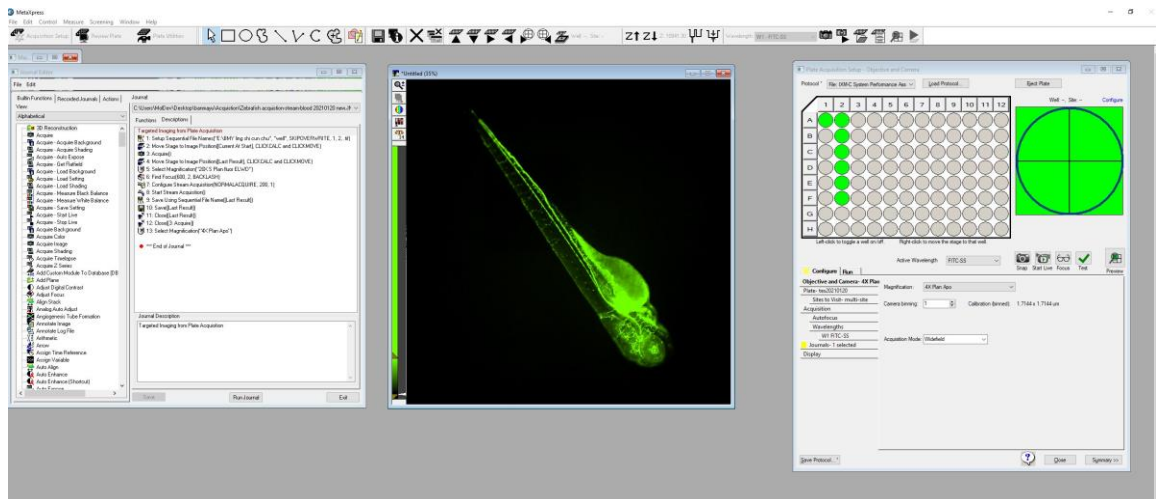


图 1. 空白对照组 *Tg(LCR:eGFP)* 转基因斑马鱼胚胎

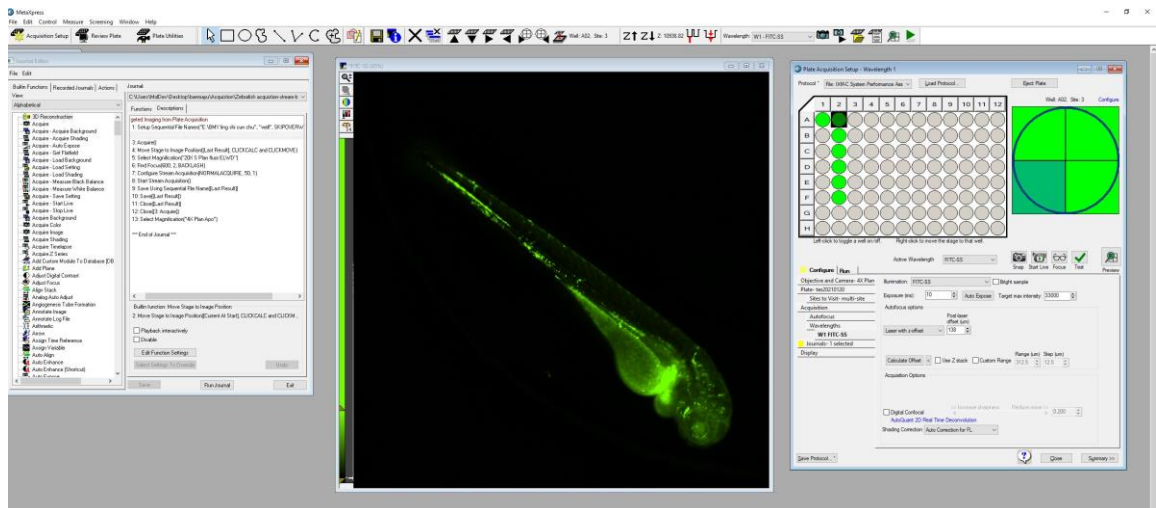


图 2. 苯胍血栓造模组 *Tg(LCR:eGFP)* 转基因斑马鱼胚胎

2. 对高倍镜下拍摄视频中血流速度的自动分析

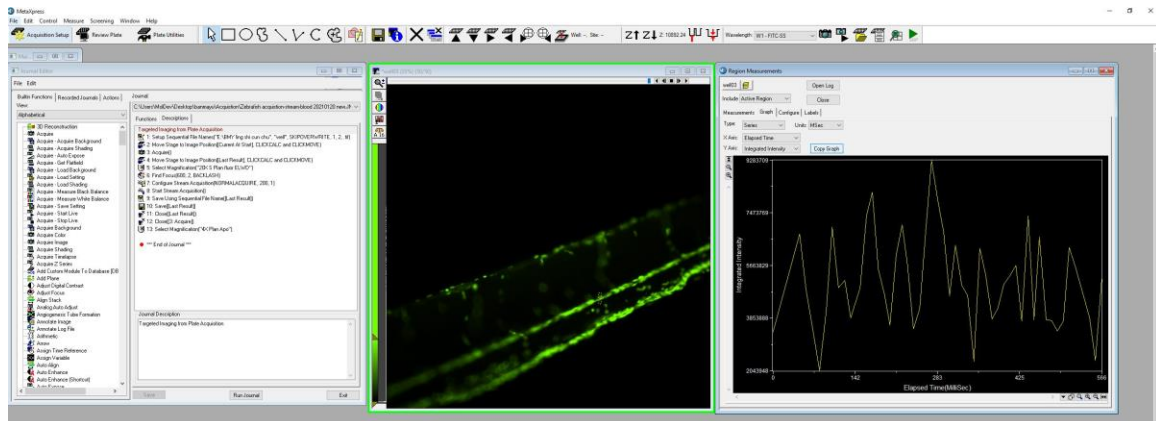


图 3. 空白对照组 *Tg (LCR:eGFP)* 转基因斑马鱼胚胎血流流速定量分析

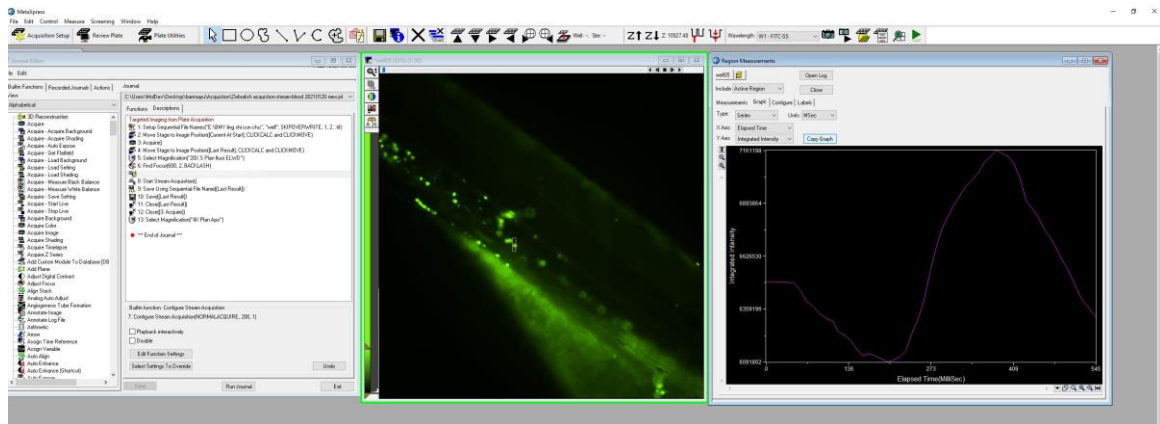


图 4. 苯肼血栓造模组 *Tg (LCR:eGFP)* 转基因斑马鱼胚胎血流流速定量分析

## 溶液配方

### 1. E3 胚胎培养液

0.29 g/L NaCl, 0.013 g/L KCl, 0.048 g/L CaCl<sub>2</sub> •2H<sub>2</sub>O, 0.082 g/L MgCl<sub>2</sub> •6H<sub>2</sub>O, pH 7.2,使用去离子水配制。

## 致谢

感谢浙江大学药物信息学研究所-Molecular Devices 高内涵成像联合实验室的设备支持。该项目受国家自然科学基金 (项目编号 81822047) 的支持资助。

## 参考文献

1. Depta, J. P. and Bhatt, D. L. (2015). [New approaches to inhibiting platelets and coagulation](#). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55: 373-397.
2. Ganis, J.J., Hsia, N., Trompouki, E. (2012). [Zebrafish globin switching occurs in two developmental stages and is controlled by the LCR](#). *Dev Biol* 366: 185-194.
3. Li, J., Liu, H., Yang, Z., Yu, Q., Zhao, L. and Wang, Y. (2020). [Synergistic Effects of Cryptotanshinone and Senkyunolide I in Guanxinling Tablet Against Endogenous Thrombus Formation in Zebrafish](#). *Front Pharmacol* 11: 622787.
4. Raber, I., McCarthy, C. P., Vaduganathan, M., Bhatt, D. L., Wood, D. A., Cleland, J. G. F., Blumenthal, R. S. and McEvoy, J. W. (2019). [The rise and fall of aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease](#). *Lancet* 393(10186): 2155-2167.

5. Sheng, J., Meng, Q., Yang, Z., Guan, J., Zhao, Y., Zhang, J., Wang, Y., Zhao, L. and Wang, Y. (2020). [Identification of cryptotanshinone from Tongmai to inhibit thrombosis in zebrafish via regulating oxidative stress and coagulation cascade.](#) *Phytomedicine* 76: 153263.
6. Traver, D., Paw B.H., Poss, K.D. (2003). [Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants.](#) *Nat Immunol* 4: 1238-1246.
7. Westerfield, M. (2000). [The Zebrafish Book. A guide for the Laboratory Use of Zebrafish \(Danio Rerio\).](#) fourth ed. Univ. of Oregon Press, Eugene.