

文章编号: 1004-0374(2011)03-0273-06

斑马鱼在新药发现中的应用

李乙根¹, 黄文瑾², 黄 诚^{1*}

(1 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2 中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所, 上海 200031)

摘要: 在过去20年里, 斑马鱼已成为一种重要的模式脊椎动物, 在发育、遗传、免疫、肿瘤和毒理等诸多研究领域中被广泛应用。近年来, 斑马鱼作为活体模型越来越多地应用于某些生物学过程的药物筛选。通过斑马鱼初步筛选, 在药物研发初期可确定化合物的生物学活性、毒性以及副作用等。最近的研究还发现, 斑马鱼不仅用于新药筛选, 还可用于药物结构的优化。本文重点介绍斑马鱼在新药发现中的应用。

关键词: 斑马鱼; 新药发现; 疾病模型

中图分类号: R96; R99 **文献标识码:** A

Zebrafish in drug discovery

LI Yi-Gen¹, HUANG Wen-Jin², HUANG Cheng^{1*}

(1 School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2 Institute of Neuroscience, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Zebrafish has become an important model organism for the study of development, genetics, immunity, cancer and toxicity. In the past 20 years, the zebrafish has also been used to determine the bioactivity, toxicity, and off-target side effects of the lead compounds for drug discovery. A recent study has demonstrated that the zebrafish is an effective model not only for drug screening but also for drug optimization. This review summarizes recent progress in drug discovery including identification and validation of novel drug targets, and screening for new therapeutic compounds.

Key words: zebrafish; drug discovery; disease model

包括中药化合物在内的天然产物是新药的主要来源之一。由于高通量筛选技术的进步, 体外筛选往往可获得大量的活性化合物, 但使用小鼠等哺乳动物对这些化合物的进一步鉴定却相当缓慢且代价昂贵。候选药物可因缺少活性, 或具有副作用或毒性而终止研发, 其中很多药物因为动物实验中吸收、分布、代谢、排泄及毒性等方面的问题而失败。因此, 要解决新药开发中的这个瓶颈问题, 需要在体外大规模筛选和哺乳动物鉴定之间建立一个中间验证的手段。斑马鱼是一种理想的模式脊椎动物, 利用斑马鱼可在药物研发初期进行活体大规模药物筛选, 确定药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄及毒性等, 从而节约大量的时间和经费, 加快新药开发过程(图1)^[1]。

1 斑马鱼在药物筛选中的优势

斑马鱼是一种产于南亚的热带鱼, 近年来被广泛应用于医学、生物学和药物研发^[2]。作为一种新的模式动物, 斑马鱼有以下诸多优点。首先, 由于斑马鱼在遗传、生理和药理反应方面与人类存在高度的相似性, 其具有与哺乳动物相似的心血管、造血、神经及代谢等系统, 在药物筛选方面具有相当大的潜能。其次, 它的体积小, 繁殖能力强, 生

收稿日期: 2010-08-16; 修回日期: 2010-10-18

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)
(2007CB947100)

*通讯作者: E-mail: chuang.shutcm@gmail.com; Tel:
021-51322182



图1 新药发现策略

传统的基于靶点的新药发现方法需要12~15年的研发，而基于斑马鱼筛选的新药发现方法可节省大约5年的时间

长发育迅速，养殖成本低。一般受精后24小时血液循环开始，3~4天主要器官就已形成，从而可以缩短药物筛选实验的周期，提高筛选效率，减少受试样本需求量的限制。另外，斑马鱼的胚胎和幼鱼透明，可在显微镜下观测到心跳的节律变化、血液流动，而使用其他动物如小鼠则必须采用剖杀的方法来观察体内的生理变化，相比之下借助相应工具斑马鱼模型能更直观地观察到活体动物体内的生理变化。最后，斑马鱼皮肤拥有良好的通透性，再加上体积小，这便意味着可像细胞模型一样使用微孔板进行大规模筛选，而且操作步骤也相当简单，只需要将小分子水溶性化合物直接加入水中；对于脂溶性小分子化合物，因为斑马鱼对二甲基亚砜(DMSO)有很大的耐受性，可将此类受试药物溶于其中，实验结果不受影响。

由此可见，斑马鱼是一种理想的模式动物，利用斑马鱼可进行活体大规模药物筛选。此模型克服了体外细胞和化学筛选模型的局限性——即只能观察化合物对某一特定生理过程的效果，而无法从整体水平直观地评估药物的治疗作用、不良反应及毒性作用等。与基于细胞培养的筛选相比，基于活体动物的整体器官与表型筛选可观察化合物对复杂生命过程的影响^[3]。

2 斑马鱼新药筛选方法

新药发现方法主要有两种模式：基于组织器官的新药筛选和基于分子靶点的新药筛选。前者为

传统的新药发现方法，以考察化合物对组织细胞的生长、增殖、分化、凋亡或病理变化等为指标而判断其作为药物的可能性。近来也有实验室建立了以对神经系统影响的斑马鱼行为为指标的药物筛选方法。而随着人类基因组研究的进步，基于靶点的新药发现被越来越多地应用在药物研发中。基于分子靶点的新药筛选是先确定疾病的分子机制，然后建立以该分子或通路为靶点的高通量筛选模型，选择该基因或通路调控的报告基因(如GFP强度)或表型等为指标，筛选出可以干预此靶点的小分子化合物。斑马鱼不仅可被用于这两种新药发现方法中，同时也可用于药物的结构优化。

2.1 基于靶点的斑马鱼新药筛选

基于靶点的新药研究中，应用正向遗传学方法已证实很多基因参与重要的生物学过程或疾病发病过程。一些基因突变鱼很好地模拟了人类疾病^[4]。利用这些突变体斑马鱼，可以筛选治疗相关疾病的潜在药物。另外一种策略是，构建疾病基因相关的转基因斑马鱼，用于药物筛选。比如，核受体转录因子与代谢性疾病和生殖等有关，是已被证明了的药物靶点。将核受体与GFP连接成融合蛋白，制备成转基因斑马鱼作为活体报告基因系统，利用GFP作为报告基因可简单而快速地对组织特异性核受体配体和共同作用因子进行筛选，同时很方便地对药物活性进行定量^[5]。

2.2 基于表型的斑马鱼新药筛选

斑马鱼在50年前首次被用于筛选小分子药物，近十年来斑马鱼才被用于药物的大规模筛选。2000年，Stuart Schreiber实验室首次报道应用斑马鱼在96孔板中筛选1 100个小分子化合物，鉴定出可影响中枢神经系统、心血管系统及耳发育的活性成分，并发现一些药物对心脏发育的影响与基因突变所导致的心脏发育异常一致^[6]。目前，基于斑马鱼的大规模筛选已从单纯筛选影响斑马鱼发育的药物^[7]发展到筛选细胞周期抑制剂^[8]、细胞凋亡诱导剂^[9]、血管生成抑制剂/促进剂^[10-12]、细胞色素调节剂^[13,14]、动脉缩窄^[15]、心脏节律调节剂^[16]及行为调控药物等多方面。

2.3 基于斑马鱼的化合物结构优化

先导化合物的结构优化是药物研发的重要过程，传统的方法是在体外以计算机理论为基础，预测化合物的治疗靶点，虽然在细胞株上得到预期结果，可是活体研究往往无法验证预期结果。在筛选影响斑马鱼前后轴对称性化合物的研究中，发现一个成骨蛋白信

号抑制剂dorsomorphin, 该化合物还可作用于VEGF受体, 阻断血管生成^[17]。进一步应用斑马鱼进行结构活性关联研究(structure-activity relationship, SAR), 筛选dorsomorphin类似物, 优化可选择性作用于成骨蛋白的分子结构, 结果发现结构优化的dorsomorphin类似物同时选择性作用于上述两个信号分子, 表明斑马鱼可作为药物结构优化的替代平台^[18]。

3 斑马鱼在中药有效成分发现中的应用

目前, 已有数个应用斑马鱼筛选活性天然产物及中药化合物的报道。Lam等^[19]发现应用当归抽提物处理*fli-1:EGFP*血管转基因斑马鱼可抑制其血管生成; 进一步地, 当归抽提物抑制了人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖和迁移等血管生成相关过程。在斑马鱼研究中还发现环巴胺(cyclopamine)抑制胚胎干细胞的分化, 其可能是一种hedgehog信号通路的抑制剂^[20]。由于hedgehog信号通路与肿瘤相关, 因此环巴胺及其类似物可能成为抗肿瘤先导化合物。由此可见, 应用斑马鱼活体筛选可能加快人类疾病信号通路相关新药的发现。

斑马鱼模型可与其他筛选方法结合, 快速而节约地从粗提物中发现化学活性物。比如, 结合高性能薄层色谱(high-performance thin-layer chromatography, HP-TLC)和高分辨率电喷雾电离质谱(high resolution electrospray ionization mass spectrometry, HR-ESI-MS), 利用斑马鱼活体筛选模型对植物粗提物进行筛选, 从中获得可抑制血管生成的化合物大黄素和一个松香烷二萜类化合物——鞣蕊酮A内酯^[3]。大黄素被证明在体内外均可抑制血管生成, 而鞣蕊酮A内酯被证明可影响相关内皮细胞增殖和血管形成。

4 斑马鱼在药物筛选中的应用

利用基因突变方法, 建立了各种斑马鱼疾病模型^[21], 其中有些斑马鱼突变系具有与人类疾病相似的症状, 这对新药筛选和内脏特异性毒理学研究起着至关重要的作用, 如: 肿瘤细胞周期抑制剂筛选^[8]、放化疗增敏剂筛选^[22]、血管生成抑制剂或促进剂^[10-12]、血管再生药物的筛选^[23]、红细胞生成促进剂^[24]、细胞色素调节剂^[13,14]。

4.1 肿瘤

细胞周期是生命活动的重要过程, 细胞周期异常将导致肿瘤的发生。通常情况下, 细胞周期在一系列调控机制的作用下, 有条不紊地进行着。细胞

周期检验点是其中一种重要的调控机制, 在整个细胞周期中起着启动、完成的作用。一旦检测到DNA受损或结构异常, 细胞会迅速通过检验点和DNA修复机制修复受损DNA。细胞周期检验点的缺陷, 会造成受损DNA通过检测点, 并发生恶性变化, 从而可能导致癌症的发生。

在肿瘤细胞中, 由于其细胞周期检验点存在缺陷, 所以会阻滞细胞周期进程, 阻碍DNA的损伤修复, 因此寻找特异性的检验点抑制剂可加强肿瘤治疗的疗效^[25]。斑马鱼作为一种新型的模式动物的优点之一是药物能够在完整的体内环境中得到测试, 且斑马鱼鱼卵中就存在各种细胞类型, 因此, 斑马鱼非常适用于细胞周期的研究^[8]。应用斑马鱼胚胎结合细胞分裂标记分子PH3染色, 对16 320个化合物库进行筛选, 在细胞试验中表现出抑制细胞周期作用的药物均在斑马鱼模型中得到了重现。同时, 还发现14个在体外细胞株筛选中未发现的细胞周期抑制剂, 在斑马鱼鱼卵上得到了证实。表明利用斑马鱼进行小分子化合物的筛选可能有助于发现新的活性物。

*p53*基因是研究最多的抑癌基因, 可调节细胞正常生长, 是细胞生长的副调节因子^[26]。*p53*基因通过凋亡和衰老两种抑癌途径发挥作用, 其结构和功能异常会导致细胞周期不正确的运行, 从而导致癌症的发生。50%以上的人类肿瘤疾病都是由于*p53*蛋白缺失或基因突变。在癌症治疗方面, 提高*p53*基因上、下游因子的表达水平, 从而一方面增强放、化疗的疗效, 另一方面减少放、化疗对正常细胞的杀伤^[27]。目前, 有工作表明斑马鱼*p53*突变系能够用来作为抗肿瘤药物筛选的模型^[2]。

应用斑马鱼还可筛选增加肿瘤对放疗敏感性的药物。对10 000个化合物进行筛选发现4'-bromo-3'-nitropropiofenone(NS-123)为人胶质瘤、直肠癌及肺癌的放疗增敏剂, 同时它并不增加人正常细胞和斑马鱼对放射性的敏感性^[22], 随后的小鼠移植肿瘤实验也证明了该化合物抑制肿瘤的同时不对正常组织造成影响。

4.2 血管生成

血管生成是肿瘤生长和转移、糖尿病血管病变、心脏病及创伤后再生等所必需的过程, 血管生成抑制剂或促进剂可能成为这些疾病的治疗药物。斑马鱼基因*vegf*、*fli-1*、*flt-1*等和人类基因在表达模式上十分类似^[28,29]。斑马鱼适用于小分子的血管增生药物的筛选^[10], 利用*fli-1-EGFP*转基因斑马鱼(一种血管内皮细胞特异表达GFP的斑马鱼, 可在荧光显微镜下观察绿色荧光血管), 使用胍屈嗪盐酸盐(HDZ)

和2,4吡啶二羧酸(PDCA)研究比较斑马鱼在不同浓度下SIV(subintestinal vessel plexus)和ISV(intersegmental vessels)的变化情况,结果发现用于调节高血压的药物HDZ能够发挥促进血管生成的作用。

视网膜血管的增生或缺乏都是造成失明的原因之一^[30]。目前主要的治疗方法为镭射手术或者抑制血管内皮生长因子(VEGF)信号以延缓血管增生,其中镭射手术成功率不高并伴有诸如白内障、出血、视网膜脱离等副作用。由于斑马鱼的视网膜血管在形态学和形成特点上与灵长类动物存在某些相似之处,利用*fli1-EGFP*转基因斑马鱼可观察视网膜血管的形成及生长过程,在人类眼部疾病的研究方面能够充当良好的研究模型。利用此模型对2 000多种小分子化合物进行的筛选实验中,发现了一种化合物只对视网膜的血管起调节作用,而对其他血管不造成影响,这种化合物很可能在将来被用于治疗眼部肿瘤^[31]。其次,该研究还发现一种化合物能够增加视网膜血管的直径和血流量,但不会引起血管的总量增加。在另一研究中,成功鉴定了LY294002是一个效果十分显著的PI3K抑制剂,它能够很好的抑制眼部血管的增生,同时不会造成视觉功能的减弱。最为重要的一个特点是,LY294002能够在对斑马鱼节间血管和躯干血管等已形成的血管不造成影响的情况下,有效地抑制新生血管的形成^[10]。

此外,应用转基因斑马鱼从LOPAC 1 280个化合物中,筛选出了3种新的血管生成抑制剂。应用人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)体外培养证实了这些化合物具有抑制血管生长相关过程的作用^[12]。香港科研人员使用转基因斑马鱼对大黄的4个组分和5个蒽醌类化合物进行筛选发现,大黄素、芦荟大黄素和大黄酸具有较强的抗血管生成作用,证明大黄抗炎可能与抗血管生成有关^[32]。

4.3 心脏病

由于斑马鱼通体透明,可直接观察到斑马鱼心率变化和心脏形态,而且可以观察到血液在身体各部分中的流动,这都给实验研究带来了极大的便利。利用*Tg(cmlc2:GFP)*转基因斑马鱼,在荧光显微镜下能更清晰地对心脏的跳动进行计数^[16]。该研究是第一次在完整的脊椎动物身上对器官功能进行的高通量微孔板实验,通过上述转基因斑马鱼,在化合物库中找到3种已知能引起QT间期延长的药物和3种不能引起QT间期延长的药物与对照组对比,得出斑马鱼能够快速、直观地得到引起心脏节律变

化或具有延长QT间期作用的潜在小分子药物的药代学相关数据这一结果。

研究表明,人类*TNNT2*基因的突变会导致心肌病变。同样,斑马鱼体内的*TNNT2*基因的突变也会导致相似的症状^[15]。此外,*Tbx5*基因的突变不仅会对斑马鱼的心脏造成影响,同时也对胸鳍造成影响,而在人类身上就表现为心脏畸形^[33]。由此可见,通过建立适当的斑马鱼疾病模型,可简单、快速地从化合物库中筛选出对所选模型有效的化合物,同时可获得IC₅₀、LD₅₀等各药物代谢动力学数据,并比较药物在各浓度下的作用效果和多种有效药物之间的协同效应,筛选行之有效的药物和最佳浓度。比如,在筛选抗主动脉缩窄药物研究中,发现GS4012在7.5 μg/mL下有最佳治疗效果^[15]。

4.4 肥胖与动脉硬化

一种在体肠道脂质吸收与代谢的斑马鱼模型,用荧光标记的脂质或使用脂肪调控相关酶的报告基因可方便地检测肠道脂质吸收与代谢。由于脂质吸收与代谢在脊椎动物中较保守,向斑马鱼喂食高脂肪食物,建立人类肥胖模型,并进行大规模筛选减肥降脂药物。应用转基因技术构建Agouti相关蛋白(Agouti-related protein, AgRP)过量表达模型可模拟瘦素缺陷的人类肥胖疾病,并可应用于减肥药的大规模筛选^[34]。在以往的研究动脉硬化的方面,常通过向小鼠和家兔喂食高脂饲料的方法研究动脉粥样硬化。此动物模型的缺点在于,必须等到实验结束后,通过剖杀动物的方式才能观察到动脉壁斑块及对血小板进行显微观察。现今,加利福尼亚大学圣地亚哥医学院的Miller等向身体透明的*fli1-EGFP*幼年斑马鱼投喂一种经红色荧光脂类标记过的胆固醇饲料,然后直接利用共聚焦显微镜来检测,可在避免剖杀动物的情况下直接进行观察,还能够实时记录血管内壁的增厚情况^[35]。此外该研究小组利用此模型成功筛选出ezetimibe,该药对血管壁的增厚有减轻和增强血管壁屏障的作用。可见此类模型对研究血管壁的变化和脂类堆积有很大帮助,同时利用此模型也可进行药物筛选和新药发现。

4.5 忧郁症、睡眠紊乱等神经系统疾病

具有神经活性的小分子是治疗精神类疾病的主要药物来源,可这类药物较难发现与鉴定。利用斑马鱼可有效筛选影响生物体复杂功能行为并治疗神经系统疾病的药物。通过观察受精3天的斑马鱼睡眠—觉醒行为来监测小分子对斑马鱼行为的影响,对5 648种化合物筛选发现,有547种可以改变这种

行为^[36]。为了揭示斑马鱼和哺乳动物在睡眠—觉醒状态下的神经药理学, 运用聚类运算(clustering algorithms)可以预测一些化合物的靶点, 确定与睡眠—觉醒有关联的新通路。如L型钙通道抑制剂使静息的时间增长; 罗汉松科的化合物增加了静息的潜伏期; 抗炎的药物增加了白天的清醒活动; EGR钾通道阻滞剂选择性增加夜晚的清醒活动, 表明炎症信号通路不仅引起睡眠, 而且在日常活动水平上发挥重要作用。

通过药物对斑马鱼行为学的筛选可获得治疗抑郁症的化合物。应用光刺激引起斑马鱼光运动反应(photomotor response, PMR), 再使用药物处理观察其对行为的影响, 发现治疗抑郁症的药物异丙肾上腺素使PMR的活性增高, 而安定则使其活性减低, 多巴胺激动剂无水吗啡使PMR的潜伏期增长, 强心内酯洋地黄毒苷元则使斑马鱼对刺激产生的PMR活性增强且增长, 血清素重吸收抑制剂6-N2O增加斑马鱼对第一次刺激的反应^[37]。该研究表明不同机制的抗抑郁药对PMR均可产生影响。应用这一特性可快速而大规模筛选治疗抑郁症的相关药物。

使用斑马鱼还可以发现作用于靶分子的新的化合物, 在15种能引起STR(slow-to-relax)的化合物中, 已知毒扁豆碱是乙酰胆碱酯酶抑制剂, STR-1和STR-2则机制不明。通过斑马鱼实验证明STR-1为新的乙酰胆碱酯酶抑制剂, 而STR-2在活体动物实验中也能抑制乙酰胆碱酯酶, 说明利用活体动物行为实验可以发现新的刺激神经的化合物及其机制^[37]。

5 斑马鱼在药物毒理中的应用

斑马鱼也可用来对药物毒性作出评价。许多药物就是由于有较大的毒性副作用不能用于临床。在毒性评价实验中, 依据斑马鱼在受试药物作用下表现出的各种特征, 包括IC₅₀、死亡、发育异常、形态改变、色素消失等, 可知测试药物的毒性及其对哪些组织、器官存在毒性作用。很多药物具有心脏毒性, 从而引起服用者心率失常。在新药发现的初期, 可通过斑马鱼对药物心脏毒性进行早期评估。斑马鱼心脏和人类心脏有很大的相似处, 特别表现在心电图特征上^[38]。在斑马鱼之前, 通常用猪来做毒性实验, 且用药量大、操作繁琐。斑马鱼模型的使用, 大大减化了实验步骤及用药量, 最为重要的一点是, 斑马鱼在生长发育早期便能表现出心脏毒性症状。如在雷公藤红素对斑马鱼胚胎的心脏毒性试验中^[39], 发现只有在雷公藤红素1 μmol/L浓度下才未出现心瓣膜出血、血液

循环异常等中毒症状。同时雷公藤红素引起斑马鱼胚胎心率下降的EC₅₀为1.78 μmol/L。

此外, 某些药物可能会造成斑马鱼的发育畸形, 如四肢短小、色素消失、尾巴消失等。DTAB(IUPAC: 3-[(4,6-diphenoxy-1,3,5-triazin-2-yl)amino]benzoic acid)造成斑马鱼发育畸形^[8]。在TCDD(2,3,7,8-四氯二苯并对二恶英)研究中发现, TCDD对斑马鱼胚胎有很强的毒性, 表现在诸多方面, 如致死性、下颌发育短小、神经系统等^[40]。

斑马鱼模型也存在一定的局限性。在进行药物筛选时, 通常在斑马鱼生长早期加入药物, 由于胚胎、幼鱼和成鱼在生理上存在差异, 所以药物也可能引起不同的结果。其次, 鉴于斑马鱼皮肤的亲水、亲脂性, 疏水性小分子化合物无法被吸收, 因此可能观测到错误的现象。这些在应用时需要加以注意。

6 结语

斑马鱼在其生命的各个阶段都可作为人类疾病模型, 与传统的动物模型相比, 斑马鱼在药物筛选方面能够更便捷地得到实验数据, 且能够得到传统模型不能够得到的结果。可是, 斑马鱼在新药发现中的应用也有一定的局限性。首先, 斑马鱼基因虽然与人类基因有高度相似性, 但也存在差异, 其调控基因网络也有不同, 因此其药物结合位点和效应可能也不同。其次, 某些生物学特征的差异可能需要不同的药物筛选策略。如对黑色素调节剂的筛选, 就应考虑到斑马鱼与人类的皮肤的差异; 再如斑马鱼缺少与哺乳动物类似的呼吸系统, 对该系统的药物筛选只能通过基因操作获得靶点模型再进行筛选。在斑马鱼试验之后, 需要再使用哺乳动物模型对已筛选出的药物进行进一步的实验验证。最后, 目前缺少能够重现人类疾病机制的斑马鱼模型, 而这类模型对相关疾病的药物筛选研究至关重要, 这是目前需要进一步发展的领域。尽管应用斑马鱼作为药物筛选模型还处在发展阶段, 但已经显示出巨大的潜力。相信在不久的将来, 通过国内外科工作者的研究, 斑马鱼终将在新药发现中发挥重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] Zon LI, Bowman TV. Swimming into the future of drug discovery: *in vivo* chemical screens in zebrafish. ACS Chem Biol, 2010, 5(2): 159-61
- [2] Zon LI, Peterson RT. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(1): 35-44
- [3] Crawford AD, Esguerra CV, de Witte PA. Fishing for drugs

- from nature: Zebrafish as a technology platform for natural product discovery. *Planta Med*, 2008, 74(6): 624-32
- [4] Rubinstein AL. Zebrafish: From disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2003, 6(2): 218-23
- [5] Tiefenbach J, Moll PR, Nelson MR, et al. A live zebrafish-based screening system for human nuclear receptor ligand and cofactor discovery. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9797
- [6] Sehnert AJ, Stainier DY. A window to the heart: Can zebrafish mutants help us understand heart disease in humans? *Trends Genet*, 2002, 18(10): 491-4
- [7] Sachidanandan C, Yeh JR, Peterson QP, et al. Identification of a novel retinoid by small molecule screening with zebrafish embryos. *PLoS ONE*, 2008, 3(4): e1947
- [8] Murphey RD, Stern HM, Straub CT, et al. A chemical genetic screen for cell cycle inhibitors in Zebrafish embryos. *Chem Biol Drug Des*, 2006, 68(4): 213-9
- [9] Parnig C, Seng WL, Semino C, et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol*, 2002, 1(1 Pt 1): 41-8
- [10] Raghunath M, Wong YS, Farooq M, et al. Pharmacologically induced angiogenesis in transgenic zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(4): 766-71
- [11] Alvarez Y, Astudillo O, Jensen L, et al. Selective inhibition of retinal angiogenesis by targeting PI3 kinase. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7867
- [12] Tran TC, Sneed B, Haider J, et al. Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11386-92
- [13] Choi TY, Kim JH, Ko DH, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(2): 120-7
- [14] Jung DW, Williams D, Khersonsky SM, et al. Identification of the F1F0 mitochondrial ATPase as a target for modulating skin pigmentation by screening a tagged triazine library in zebrafish. *Mol Biosyst*, 2005, 1(1): 85-92
- [15] Sehnert AJ, Huq A, Weinstein BM, et al. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat Genet*, 2002, 31(1): 106-10
- [16] Burns CG, Milan DJ, Grande EJ, et al. High-throughput assay for small molecules that modulate zebrafish embryonic heart rate. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(5): 263-4
- [17] Yu PB, Deng DY, Lai CS, et al. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic ossification. *Nat Med*, 2008, 14(12): 1363-9
- [18] Hao J, Ho JN, Lewis JA, et al. *In vivo* structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem Biol*, 2010, 5(2): 245-53
- [19] Lam HW, Lin HC, Lao SC, et al. The angiogenic effects of *Angelica sinensis* extract on HUVEC *in vitro* and zebrafish *in vivo*. *J Cell Biochem*, 2008, 103(1): 195-211
- [20] Lauth M, Toftgard R. The Hedgehog pathway as a drug target in cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007, 8(6): 457-61
- [21] Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(5): 353-67
- [22] Lally BE, Geiger GA, Kridel S, et al. Identification and biological evaluation of a novel and potent small molecule radiation sensitizer via an unbiased screen of a chemical library. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8791-9
- [23] Mathew LK, Sengupta S, Kawakami A, et al. Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *J Biol Chem*, 2007, 282(48): 35202-10
- [24] Shafizadeh E, Peterson RT, Lin S. Induction of reversible hemolytic anemia in living zebrafish using a novel small molecule. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2004, 138(3): 245-9
- [25] Yelon D. Cardiac patterning and morphogenesis in zebrafish. *Dev Dyn*, 2001, 222(4): 552-63
- [26] Vazquez A, Bond EE, Levine AJ. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12): 979-87
- [27] 牟华. 细胞周期检验点与肿瘤发生之间关系的研究进展. *生物技术通讯*, 2009, 20(1): 111-3
- [28] Fouquet B, Weinstein BM, Serluca FC, et al. Vessel patterning in the embryo of the zebrafish: guidance by notochord. *Dev Biol*, 1997, 183(1): 37-48
- [29] Liang D, Xu X, Chin AJ, et al. Cloning and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) from zebrafish, *Danio rerio*. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1397(1): 14-20
- [30] Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol*, 1996, 114(10): 1219-28
- [31] Kitambi SS, McCulloch KJ, Peterson RT, et al. Small molecule screen for compounds that affect vascular development in the zebrafish retina. *Mech Dev*, 2009, 126(5-6): 464-77
- [32] He ZH, He MF, Ma SC, et al. Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121(2): 313-7
- [33] Garrity DM, Childs S, Fishman MC. The *heartstrings* mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development*, 2002, 129(19): 4635-45
- [34] Song Y, Cone RD. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J*, 2007, 21(9): 2042-9
- [35] Stoletov K, Fang L, Choi SH, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circ Res*, 2009, 104(8): 952-60
- [36] Rihel J, Prober DA, Arvanites A, et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science*, 2010, 327(5963): 348-51
- [37] Kokel D, Bryan J, Laggner C, et al. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(3): 231-7
- [38] Hu N, Yost HJ, Clark EB. Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *Anat Rec*, 2001, 264(1): 1-12
- [39] 王思锋, 刘可春, 王希敏, 等. 雷公藤红素对斑马鱼胚胎心脏毒性的初步研究. *中国药理学通报*, 2009, 25(5): 634-6
- [40] 靳洪涛, 李万芳, 王爱平. TCDD对斑马鱼胚胎发育毒性机制的研究进展. *癌变·畸变·突变*, 2008, 20(06): 500-2