

# 心血管发育相关基因 *mpx* 在斑马鱼早期胚胎发育中的表达<sup>\*</sup>

向文碧<sup>1,2,3</sup>, 周栋珍<sup>1,4</sup>, 李志操<sup>1,5</sup>, 周艳华<sup>1,2</sup>, 张鹏<sup>1,2</sup>, 崔冬冰<sup>1,2</sup>, 何志旭<sup>2,6\*\*</sup>, 舒莉萍<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室, 组织工程与干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 中国医学科学院成体干细胞转化研究重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 儿科学教研室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州大学, 贵州 贵阳 550025; 5. 贵州省贵阳市妇幼保健院 贵阳市儿童医院, 贵州 贵阳 550003; 6. 遵义医科大学附属医院 儿科学教研室, 贵州 遵义 563000)

**[摘要]** 目的: 探讨斑马鱼体内髓样特异性过氧化物酶(*mpx*)在胚胎发育过程中的表达模式。方法: 按 Trizol 法提取斑马鱼总 RNA 后逆转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板 RT-PCR 扩增 *mpx* 基因片段; 用基因重组技术构建 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒后将质粒酶切线性化, T3 聚合酶制备 *mpx* 反义 RNA 探针, 用全胚胎原位杂交检测 *mpx* 基因的表达。结果: 成功构建了 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒, 原位杂交结果显示在 24 hpf, *mpx* 基因在斑马鱼胚胎中间细胞团表达; 从 24 hpf 开始, *mpx* 基因在斑马鱼胚胎卵黄囊表面、心脏和轴向脉管系统中高表达, 一直持续到 72 hpf; 尤其是在 72 hpf, *mpx* 基因在整个胚胎头部、卵黄囊表面、尾部中弥散表达。结论: *mpx* 基因在斑马鱼心血管系统发育的时间和部位中都有表达, *mpx* 基因可能参与调控斑马鱼心血管系统发育。

**[关键词]** 斑马鱼; 心血管疾病; 早期胚胎发育; *mpx* 基因; 全胚胎原位杂交; 心血管

**[中图分类号]** R332.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-8388(2020)05-0526-06

**DOI:** 10.19367/j.cnki.2096-8388.2020.05.005

## Expression of Cardiovascular Development-Related Gene *mpx* in Early Embryo Development of Zebrafish

XIANG Wenbi<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Dongzhen<sup>1,4</sup>, LI Zhicao<sup>1,5</sup>, ZHOU Yanhua<sup>1,2</sup>,  
ZHENG Peng<sup>1,2</sup>, CUI Dongbing<sup>1,2</sup>, HE Zhixu<sup>2,6</sup>, SHU Liping<sup>1,2</sup>

(1. National&Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Adult Stem Cell Translational Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Pediatrics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Guizhou University School, Guiyang 550025, Guizhou, China; 5. Guiyang Maternal and Child Health Center of Guizhou, Guiyang Children's Hospital, Guiyang 550003, Guizhou, China; 6. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression pattern of myeloid-specific peroxidase (*mpx*) in embryonic development in zebrafish. **Methods:** The total RNA of zebrafish was extracted by Trizol method and then reversely transcribed into cDNA, which served as a template to amplify *mpx* gene fragment by RT-PCR. *mpx* gene fragment was ligated into *pCS2* to obtain the recombinant plasmid *pCS2<sup>+</sup>-mpx*, which was further linearized. Digoxigenin-labeled *mpx* antisense RNA probe was

\*[基金项目] 国家自然科学基金项目(31860325); 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2018PT31048); 贵州省科技厅科技平台及人才团队计划[(2017)5611]

\*\* 通信作者 E-mail: hzx@gmc.edu.cn; gyslp-456@163.com

synthesized in vitro by T3 RNA polymerase. After the embryos of different phases were fixed, the expression of *mpx* gene in zebrafish embryos was detected by whole embryo in situ hybridization.

**Results:** The *pCS2<sup>+</sup>-mpx* recombinant plasmid was successfully constructed. In situ hybridization showed that the *mpx* gene was expressed in intermediate cell mass at 24 hpf and highly expressed in the zebrafish embryonic yolk sac surface, heart and axial vasculature from 24 to 72 hpf. Especially, *mpx* gene is expressed throughout the embryonic head, the surface of the yolk sac, and the tail at 72 hpf.

**Conclusion:** *mpx* gene expresses at the time and location of zebrafish cardiovascular system development, suggesting that *mpx* gene may be involved in the regulation of zebrafish cardiovascular system development.

[ **Key words** ] zebrafish; cardiovascular diseases (CVD); early embryo development; *mpx* gene; whole embryo in situ hybridization; cardiovascular

髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 是髓系细胞的特异性标志物,主要由中性粒细胞以及单核细胞分泌<sup>[1-2]</sup>。随着对 MPO 的深入研究,发现 MPO 涉及多种疾病进程。既往国内外研究证实, MPO 与心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 的发生有关<sup>[3-4]</sup>,髓样特异性过氧化物酶 *mpx* 基因是斑马鱼中最接近哺乳动物 *MPO* 基因的同源物<sup>[5]</sup>。基于斑马鱼胚胎通体透明、体外受精、发育迅速等优势,本研究以斑马鱼为实验动物开展相关实验研究,旨在探讨斑马鱼 *mpx* 在胚胎发育过程中的表达,为进一步探索 *mpx* 与 CVD 的关系及开发治疗 CVD 的新药奠定基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 野生型斑马鱼由本课题组实验中心饲养;28 ℃ 循环水中养殖,幼鱼和成鱼分别以草履虫和丰年虾喂养,光照 12 h/d,收集受精后 0.75 h、3.7 h、6 h、9 h、12 h、18 h、24 h、30 h、36 h、48 h、72 h (hours post-fertilization, hpf) 共 11 个时相的胚胎,用于提取总 RNA 和原位杂交。

**1.1.2 主要实验试剂** 限制性内切酶 *Hind* III、*Xho* I、DNA Marker、Trizol、First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂均购自 Thermo 公司,KOD-Plus PCR 酶购自 Toyobo 公司,T3 聚合酶购自 Promega 公司,T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司,地高辛 RNA 和 NucAway<sup>TM</sup> Spin Columns 均购自 Ambion 公司,BCIP/NBT 试剂盒购自 VECTORLab 公司,Proteinase K 购自 Sigma 公司,酵母提取物和氨卞青霉素均购自索索莱宝生物科技公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 斑马鱼总 RNA 提取及 cDNA 的合成** 收集 0.75 h、3.7 h、6 h、9 h、12 h、18 h、24 h、30 h、36 h、48 h、72 hpf 共 11 个时相的斑马鱼胚胎,每个时相 25 枚置于 1.5 mL 的 Ep 管中,按 Trizol 法提取总 RNA,然后用 First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒按说明书将 RNA 逆转录成 cDNA 后于 -20 ℃ 保存备用。

**1.2.2 *mpx* 基因片段克隆** 用 NCBI 查询 *mpx* 基因的全长 cDNA,根据 *mpx* 全长 cDNA 设计 *mpx* 基因引物序列,*mpx*-R:5'-CCCAAGCTTCCTCAACGA-CAGCACTCTGA-3',*mpx*-F: 5'-TCGCTCGAGTACTC CAGGTAGGGTTGAGCA-3',该引物含有 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点。PCR 扩增程序为:94 ℃ 2 min, (94 ℃ 15 s、61 ℃ 30 s、68 ℃ 1 min) 36 次循环, 68 ℃ 10 min。将扩增的目的条带割胶回收。

**1.2.3 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 探针质粒构建及鉴定** 用 *Hind* III 和 *Xho* I 酶将 PCR 扩增的 *mpx* 产物和载体 *pCS2<sup>+</sup>* 进行双酶切,电泳分析双酶切产物并割胶回收。将酶切后的 *mpx* 基因 PCR 产物和载体 *pCS2<sup>+</sup>* 用 T4 连接酶进行连接、连接产物进行转化,通过 AMP 抗性进行筛选,长菌后挑单克隆用于菌落 *mpx* 基因 RT-PCR 鉴定,并通过试剂盒抽提 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 探针质粒;再将获得的 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 探针质粒用 *Hind* III 和 *Xho* I 酶进行双酶切鉴定,且送诺赛基因公司进行测序鉴定。

**1.2.4 地高辛标记的 *mpx* 基因反义 mRNA 的制备** 用 *Hind* III 将 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 质粒酶切线性化并回收,再以线性化的 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 质粒为模板,加入地高辛标记的寡核苷酸用 T3 聚合酶合成 *mpx* 探针并回收,电泳鉴定后保存在 -70 ℃。

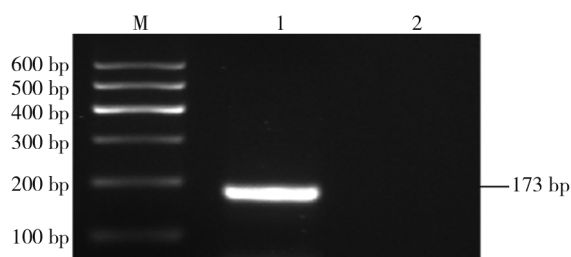
**1.2.5 斑马鱼全胚胎原位杂交 (whole mount in si-**

tu hybridization, WISH) 洗涤和脱水:将不同时相的胚胎从 4 ℃ 冰箱取出并用 1 × PBST 进行洗涤,再用 1 × PBST 配置的不同浓度的甲醇将胚胎进行梯度脱水处理。预杂交:加入 1 mL 预杂交液于 68 ℃ 预杂交 15 min, 去掉预杂交液,加入 0.3 mL 杂交液于 68 ℃ 预杂交 1 h。杂交:加入 300 ng 探针于 68 ℃ 杂交过夜。洗涤:去掉杂交液后用不同浓度 SSCT 进行洗涤。封闭:用阻滞液封闭 2 h。孵抗体:于阻滞液中加入为 1:5 000(体积比)地高辛抗体,于冷库中 4 ℃ 孵育过夜。洗涤:用 MABT 进行洗涤。染色:用 BCIP/NBT 染液室温进行染色约 4 h,边染色边观察并记录。终止染色和拍照:染色完毕后,用 1 × PBST 洗去染液终止染色,并用体视显微镜进行拍照。

## 2 结果

### 2.1 *mpx* 基因扩增结果

*mpx* 基因扩增结果得到一条单一的位于 100 ~ 200 bp 的电泳条带,大小跟设计的 *mpx* 目的片段 173 bp 相符(图 1),说明 *mpx* 基因片段扩增成功。



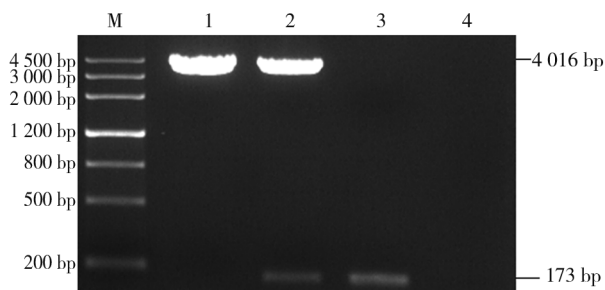
注:M 为 DNA marker I, 1 为 *mpx* RT-PCR product, 2 为 Blank control。

图 1 *mpx* 基因 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果  
Fig. 1 Electrophoresis of *mpx* gene amplified by RT-PCR

### 2.2 酶切鉴定结果

*pCS2<sup>+</sup>-mpx* 双酶切后得到两个条带,一条位于 100 ~ 200 bp,这与目的片段 *mpx* 基因的 173 bp 大小是一致的;另外一条约 4 016 bp,这与 *pCS2<sup>+</sup>* 载体 *Hind* III、*Xho*I 双酶切产物的电泳结果一致(图 2)。说明 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 探针质粒构建成功。

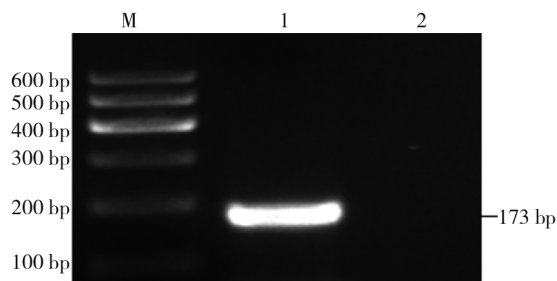
**2.3 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒菌落 RT-PCR 鉴定结果**  
*pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒经菌落 RT-PCR 得到的条带与设计的 *mpx* 目的片段一致(图 3)。



注:M 为 DNA marker III, 1 为 *pCS2<sup>+</sup>*, 2 为 *pCS2<sup>+</sup>-mpx*, 3 为 *mpx* PCR product, 4 为 Blank control。

图 2 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒 *Hind* III、*Xho* I 双酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of digestion products of *pCS2<sup>+</sup>-mpx* by *Hind* III and *Xho* I



注:M 为 DNA marker I, 1 为 *mpx* RT-PCR product, 2 为 Blank control。

图 3 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒菌落 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis of RT-PCR product of bacterial colony for recombinant plasmid *pCS2<sup>+</sup>-mpx*

### 2.4 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒测序结果

通过氨苄抗性筛选的 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒经测序结果如图 4,经 NCBI 检索对比发现与 *mpx* 基因一致。说明 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 探针质粒构建正确。

### 2.5 *mpx* 基因的斑马鱼全胚胎原位杂交结果

结果显示在 18 hpf 前的斑马鱼胚胎中无明显阳性信号表达,在 24 hpf,斑马鱼胚胎中间细胞团有较弱的蓝紫色阳性信号表达;从 24 hpf 开始一直持续到 72 hpf,在斑马鱼胚胎卵黄囊表面、心脏和轴向脉管系统中出现较强的蓝紫色阳性信号表达;尤其是在 72 hpf,在整个胚胎头部、卵黄囊表面、尾部中均有弥散的蓝紫色阳性信号表达(图 5)。说明 *mpx* 基因在斑马鱼胚胎 18 hpf 以后开始表达,并且主要在心血管系统中高表达。

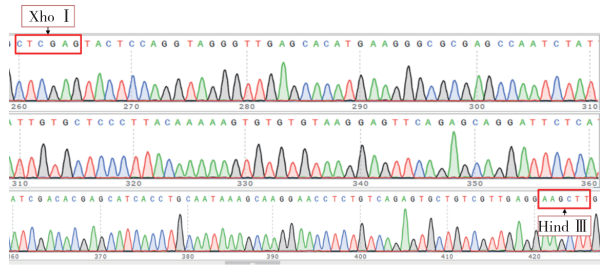
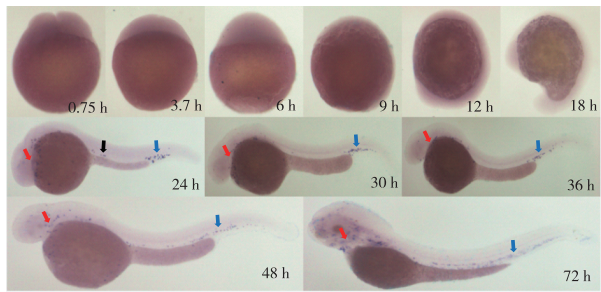


图 4 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒测序结果

Fig.4 Verification of sequence in recombinant plasmid *pCS2<sup>+</sup>-mpx* by sequencing



注:红色箭头所示心脏,蓝色箭头所示轴向脉管系统,黑色箭头所示中间细胞团。

图 5 *mpx* 基因的斑马鱼全胚胎原位杂交结果(40 ×)

Fig.5 Expression pattern of *mpx* gene in zebrafish embryos at different periods after fertilization using whole-mount in situ hybridization (40 ×)

3 讨论

MPO 是血红素过氧化物酶超家族的主要成员,主要表达于中性粒细胞、单核细胞<sup>[6]</sup>。人 MPO 是一种同源二聚体蛋白,其质量大小为 146 kDa,主要由两个结构完全相同但功能相互独立的 73 kDa 的蛋白质所构成。人类 *mpo* 基因位于 17 号染色体,由 12 个外显子和 11 个内含子构成,大小约 11 kb。MPO 在血液中水平升高与炎症和氧化应激增加有关<sup>[7-8]</sup>,并且国内外研究表明 MPO 与 CVD (包括冠状动脉疾病、动脉高压、肺动脉高压、心肌缺血再灌注相关损伤、中风、心律失常和静脉血栓形成等)之间存在联系<sup>[9-13]</sup>,MPO 升高可能意味着 CVD 的风险增加<sup>[14]</sup>。斑马鱼相比于其它模式生物具有胚胎通体透明、体外受精、发育迅速等用于 VCD 研究和开发心血管新药的优势<sup>[15]</sup>,因此本研究以斑马鱼为实验动物开展相关研究。

*mpx* 基因是斑马鱼中最接近哺乳动物 *MPO* 基因的同源物。成年斑马鱼体内主要包括嗜中性粒细胞(即中性粒细胞)和较稀有的嗜酸性粒细胞这两种粒细胞。*mpx* 基因主要表达在斑马鱼的中性粒细胞,并且斑马鱼中性粒细胞的发生发展及功能活性与哺乳动物中性粒细胞类似<sup>[16]</sup>。因此,本研究主要探讨斑马鱼 *mpx* 基因的具体表达模式,以期为进一步探索 *mpx* 与 CVD 的关系和开发治疗 CVD 的新药奠定基础。本课题首先通过设计 *mpx* 基因引物成功扩增出 *mpx* 基因片段,并通过基因重组技术构建 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 重组质粒,经菌落 *mpx* 基因 RT-PCR、双酶切和测序鉴定 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 质粒构建成功。然后,以 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 质粒为模板用 T3 聚合酶成功制备了 *mpx* 反义 RNA 探针。最后,用全胚胎原位杂交技术检测了斑马鱼 *mpx* 在胚胎发育中的具体表达情况。

原位杂交结果显示,*mpx* 基因在 18 hpf 前的斑马鱼胚胎中无明显表达,提示 *mpx* 基因在斑马鱼胚胎中 18 hpf 前可能不表达或者表达量较少以致于用全胚胎原位杂交技术无法检测出。在 24 hpf, *mpx* 基因在斑马鱼胚胎中间细胞团中低表达,这与中性粒细胞产生的位置一致<sup>[17]</sup>。斑马鱼心血管系统由静脉窦、心房、心室和动脉球等结构组成,斑马鱼的心血管发育速度较快,心肌在 22 hpf 即开始收缩,24 hpf 产生心跳,48 hpf 心血管系统发育基本完成<sup>[18-19]</sup>。在 22 hpf 时,原始心管能够产生有节奏的蠕动波,在大约 33 hpf 原始心管心管发育成 S 形构型并分化成心房和心室时,这些蠕动波转化为规律协调的收缩<sup>[20-21]</sup>。本研究发现,*mpx* 基因 24 ~ 72 hpf 在斑马鱼卵黄囊表面及心脏高表达,这与斑马鱼心脏发育的主要部位和时间相吻合,提示 *mpx* 基因可能参与调控斑马鱼心脏的发育。血管是所有器官功能和发育的基本组成部分,具有不同的大小和特殊的反应性,这取决于它们的功能和它们所连接的器官<sup>[22]</sup>。斑马鱼血管发育始于内皮祖细胞从中胚层迁移形成原始主动脉和主要静脉而形成简单的循环,在 24 hpf 后,建立主要的轴向血管<sup>[23-24]</sup>。到 72 hpf 时,主要的轴向血管通过背腹对齐的节间动脉和节间静脉相连,随后产生两个单独的背侧纵向吻合血管以连接躯干每侧的节间血管<sup>[25-26]</sup>。本研究发现,从 24 hpf 开始斑马鱼 *mpx* 基因在卵黄囊表面和轴向脉管系统中高表达,一直持续到 72 hpf,这与斑马鱼早期胚胎血管发育的时间和部位一致,尤其是在 72 hpf, *mpx* 基因在整个

斑马鱼胚胎头部、卵黄囊表面、尾部中弥散表达,这与血管是所有器官和组织的基本组成部分的特点相吻合,提示 *mpx* 基因可能与斑马鱼血管的发育相关。

综上所述,本研究通过构建 *pCS2<sup>+</sup>-mpx* 质粒制备 *mpx* 反义 RNA 探针,并以 *mpx* 反义 RNA 探针进行全胚胎原位杂交技术证实,*mpx* 基因在斑马鱼的心血管系统发育的时间和部位中都有表达,提示 *mpx* 基因可能参与调控斑马鱼心血管系统发育,但具体机制有待进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] LIN X, ZHOU Q, ZHAO C, et al. An ectoderm-derived myeloid-like cell population functions as antigen transporters for langerhans cells in zebrafish epidermis[J]. *Dev Cell*, 2019,49(4): 605–617e5.
- [2] DUAN J, HU H, LI Q, et al. Combined toxicity of silica nanoparticles and methylmercury on cardiovascular system in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016,44: 120–127.
- [3] ETWEBI Z, LANDESBURG G, PRESTON K, et al. Mechanistic role of the calcium-dependent protease calpain in the endothelial dysfunction induced by MPO (myeloperoxidase) [J]. *Hypertension*, 2018,71(4): 761–770.
- [4] ERGEN A, KARAGEDIK H, KARAALI Z E, et al. An association between MPO-463 G/A polymorphism and type 2 diabetes[J]. *Folia Biol (Praha)*, 2014,60(3): 108–112.
- [5] WANG Z, LIN L, CHEN W, et al. Neutrophil plays critical role during *edwardsiella piscicida* immersion infection in zebrafish larvae [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019,87: 565–572.
- [6] BUCHAN K D, PRAJSNAR T K, OGYZKO N V, et al. A transgenic zebrafish line for in vivo visualisation of neutrophil myeloperoxidase [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215592.
- [7] MARCINKIEWICZ J, WALCZEWSKA M. Neutrophils as sentinel cells of the immune system: A role of the MPO-halide-system in innate and adaptive immunity[J]. *Curr Med Chem*, 2019.
- [8] CHENG D, TALIB J, STANLEY C P, et al. Inhibition of MPO (myeloperoxidase) attenuates endothelial dysfunction in mouse models of vascular inflammation and atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019,39(7): 1448–1457.
- [9] VARIJI A, SHOKRI Y, FALLAHOPOUR S, et al. The combined utility of myeloperoxidase (MPO) and paraoxonase 1 (PON1) as two important HDL-associated enzymes in coronary artery disease: Which has a stronger predictive role? [J]. *Atherosclerosis*, 2019,280: 7–13.
- [10] UYSAL A, SAHNA E, OZGULER I M, et al. Effects of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, on levels of ADMA, MPO, iNOS and TLR4 induced by myocardial ischemia reperfusion [J]. *Perfusion*, 2015,30(6): 472–477.
- [11] LIU D, LIU L, SONG Z, et al. Genetic variations of oxidative stress related genes ALOX5, ALOX5AP and MPO modulate ischemic stroke susceptibility through main effects and epistatic interactions in a chinese population [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,43(4): 1588–1602.
- [12] SAITO T, FUJIMORI J, YOSHIDA S, et al. Case of cerebral venous thrombosis caused by MPO-ANCA associated hypertrophic pachymeningitis [J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2014,54(10): 827–830.
- [13] KATAOKA Y, SHAO M, WOLSKI K, et al. Myeloperoxidase levels predict accelerated progression of coronary atherosclerosis in diabetic patients: insights from intravascular ultrasound[J]. *Atherosclerosis*, 2014,232(2): 377–383.
- [14] NDREPEPA G. Myeloperoxidase-A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2019,493: 36–51.
- [15] KESSLER M, ROTTBAUER W, JUST S. Recent progress in the use of zebrafish for novel cardiac drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2015,10(11): 1231–1241.
- [16] LIESCHKE G J, OATES A C, CROWHURST M O, et al. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish [J]. *Blood*, 2001,98(10): 3087–3096.
- [17] BENNETT C M, KANKI J P, RHODES J, et al. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Blood*, 2001,98(3): 643–651.
- [18] KITHCART A P, MACRAE C A. Zebrafish assay development for cardiovascular disease mechanism and drug discovery[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2018,138: 126–131.
- [19] ROCKE J, LEES J, PACKHAM I, et al. The zebrafish as a novel tool for cardiovascular drug discovery[J]. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2009,4(1): 1–5.
- [20] SETO S W, KIAT H, LEE S M, et al. Zebrafish models of cardiovascular diseases and their applications in herbal medicine research[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015,768: 77–86.

(下转第 615 页)

- 委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2):3-10.
- [10]CHASE S C, TAYLOR B J, CROSS T J, et al. Influence of thoracic fluid compartments on pulmonary congestion in chronic heart failure[J]. J Card Fail, 2017, 23(9):690-696.
- [11]PANGULURI S, GUNDA P, DEBONNETT L, et al. Economic evaluation of tobramycin inhalation powder for the treatment of chronic pulmonary pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis[J]. Clin Drug Investig, 2017, 37(1):795-805.
- [12]王郝, 崔娜, 牛芳, 等. 降钙素原对心脏外科术后重症患者感染的早期预测价值[J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29(10):897-901.
- [13]蒋全坤, 王百鸣. 血清降钙素原检测在老年心力衰竭合并肺部感染患者中的应用[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(9):2058-2061.
- [14]刘婷, 肖华. 芪参归龙饮联合西药对慢性心力衰竭合并高脂血症老年患者血清心肌肌钙蛋白与骨桥蛋白的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(8):1108-1110,1133.
- [15]张德龙, 殷莉, 姜芳, 等. 丹参川芎嗪注射液联合单硝酸异山梨酯对冠心病不稳定型心绞痛血脂水平及疗效的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6):1451-1454.
- [16]RAVASSA S, BEGO? A L, RAM6N Q, et al. Phenotyping of myocardial fibrosis in hypertensive patients with heart failure. Influence on clinical outcome[J]. J Hypertens, 2017, 35(4):853-861.
- [17]李琳, 陈玉清, 陈龙. 降钙素原对老年人急性左心衰竭并发肺部感染的早期诊断意义[J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38(8):836-839.
- [18]赵光强. 痰热清注射液联合盐酸氨溴索治疗老年退行性心脏病心力衰竭致肺部感染:随机, 平行, 对照, 临床试验研究[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(27):4402-4407.
- [19]吴素丽, 王萌, 王宏鑫, 等. 血清降钙素原与 C-反应蛋白对急性左心衰竭患者肺部感染的诊断研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(10):1491-1494.
- [20]孙鹏, 吉伟丽, 苏红, 等. 头孢哌酮/舒巴坦治疗慢性心衰并肺部感染的疗效[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(5):680-683.
- [21]秦燕, 刘文秀, 耿炳超. 光子治疗联合盐酸氨溴索及机械辅助排痰护理治疗慢性心力衰竭并发肺部感染的临床研究[J]. 激光杂志, 2016, 37(6):150-152.
- [22]FUJISUE K, SUGAMURA K, KUOKAWA H, et al. Colchicine improves survival, left ventricular remodeling, and chronic cardiac function after acute myocardial infarction[J]. Circ J, 2017, 81(8):1174-1182.
- [23]崔晓婷, 郑红晓, 李海燕, 等. 血清 BNP 与 hs-CRP 和 PCT 对慢性心力衰竭患者肺部感染的诊断评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(11):1651-1655.
- [24]杨红霞, 高景, 魏捷飞, 等. 成人肺炎支原体感染并发心肌损害患者 CRP、IL-6 等炎症指标与心肌酶谱变化的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(1):109-112.
- (2020-03-09 收稿, 2020-04-26 修回)  
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳
- 
- (上接第 530 页)
- [21]PALENCIA-DESAI S, ROST M S, SCHUMACHER J A, et al. Myocardium and BMP signaling are required for endocardial differentiation[J]. Development, 2015, 142(13):2304-2315.
- [22]HUANG M, CAI Q, XU Y, et al. Paraquat affects the differentiation of neural stem cells and impairs the function of vascular endothelial cells: a study of molecular mechanism[J]. Environ Toxicol, 2019, 34(4):548-555.
- [23]GERRI C, MARIN-JUEZ R, MARASS M, et al. Hif-1 $\alpha$  regulates macrophage-endothelial interactions during blood vessel development in zebrafish[J]. Nat Commun, 2017, 8:15492.
- [24]ESSER J S, STEINER R E, DECKLER M, et al. Extracellular bone morphogenetic protein modulator BMPER and twisted gastrulation homolog 1 preserve arterial-venous specification in zebrafish blood vessel development and regulate notch signaling in endothelial cells[J]. Febs J, 2018, 285(8):1419-1436.
- [25]HOGAN B M, SCHULTE-MERKER S. How to plumb a Pisces: understanding vascular development and disease using zebrafish embryos[J]. Dev Cell, 2017, 42(6):567-583.
- [26]HU X, GAN S, XIE G, et al. KCTD10 is critical for heart and blood vessel development of zebrafish[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014, 46(5):377-386.
- (2020-02-23 收稿, 2020-04-29 修回)  
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 张启芳