



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103430890 B

(45)授权公告日 2019.04.16

(21)申请号 201310398791.3

(22)申请日 2013.09.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103430890 A

(43)申请公布日 2013.12.11

(73)专利权人 南京新环检测科技有限公司
地址 210032 江苏省南京市江北新区新锦湖路3-1号中丹生态生命科学产业园一期A栋926-2室

(72)发明人 劳乔聪 李春启 朱凤 俞航萍

(51)Int.Cl.
A01K 61/00(2017.01)
A61K 49/00(2006.01)
G01N 21/64(2006.01)

(56)对比文件

CN 101968484 A,2011.02.09,
CN 1818621 A,2006.08.16,
CN 102288750 A,2011.12.21,
CN 1866025 A,2006.11.22,
CN 102023199 A,2011.04.20,
CN 101810866 A,2010.08.25,
Andrea C. Hermann. et al.Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos.《Journal of Immunological Methods》.2004,第119-129页.

审查员 丁齐亮

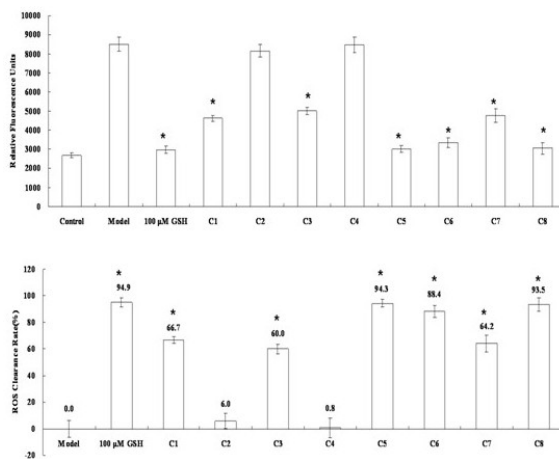
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种斑马鱼体内ROS检测模型的建立方法及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种斑马鱼体内ROS检测模型的建立方法,同时提供一种利用该模型筛选抗氧化药物的方法。模型的构建方法主要包括:斑马鱼的发育阶段的确定,检测用斑马鱼数量的确定,阳性对照化合物GSH的浓度确定微孔板分析,统计学分析几个步骤。应用斑马鱼体内ROS检测模型进行抗氧化药物的筛选具有可靠、快速、高效、经济、高通量等优点,可实现体内高通量筛选抗氧化药物。本发明对抗氧化药物的开发有着重要的意义。



1. 一种斑马鱼体内ROS检测模型的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 斑马鱼的发育阶段的确定,选择受精后3天的斑马鱼作为最佳发育阶段;

(2) 检测用斑马鱼数量的确定,选择1尾作为最佳的斑马鱼数量;

(3) 阳性对照化合物谷胱甘肽的浓度确定,选择100 μ M作为阳性对照化合物谷胱甘肽的最佳浓度;

所述的步骤(1)~(3)中,用ROS荧光检测试剂carboxy-H₂DCFDA处理斑马鱼。

2. 如权利要求1所述的斑马鱼体内ROS检测模型的构建方法,其特征在于,还包括以下步骤:

(4) 微孔板分析,将斑马鱼放入96孔板,然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光值。

3. 如权利要求1或2所述的斑马鱼体内ROS检测模型在筛选抗氧化药物中的应用。

4. 如权利要求3所述的斑马鱼体内ROS检测模型在筛选抗氧化药物中的应用,其特征在于:还包括以下步骤:

设置多个实验组:8个化合物处理组,1个对照组,1个模型组,1个阳性对照组;化合物以溶解的方式给药;所有的实验组含有相同的反应液,反应液为5 μ g/ml的carboxy-H₂DCFDA;于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养1小时;使用多功能酶标仪检测各实验组的荧光值;统计学处理结果以 \pm SE表示,多组间比较采用单因子方差分析,两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 为差异性显著。

一种斑马鱼体内ROS检测模型的建立方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种药物筛选模型,具体的说,涉及一种简单、快速和高效的抗氧化药物筛选的斑马鱼体内ROS检测模型的建立方法及其应用。

背景技术

[0002] 活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)是生物体内影响信号传导的重要物质,包括: $O_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 及 HO_2^{\cdot} 、 $\cdot OH$ 等,与许多衰老相关疾病的发生、发展预防和治疗相关,如心血管疾病、老年痴呆、肿瘤、糖尿病等。大量人群和实验研究表明,采用有效的预防手段,特别是合理服用抗氧化剂或自由基清除剂,均可有效控制这些疾病的发生,发挥良好的预防作用^[1]。

[0003] 目前,抗氧化药物筛选模型常为分子与细胞水平的筛选模型,这些体外抗氧化药物筛选模型,都不涉及药物在生物体内的吸收分布代谢情况,所以都不能准确地预测药物的体内抗氧化能力^[2-3]。此外,一些体内的抗氧化筛选模型,由于检测方法复杂,检测指标较多,实验费用高等不利因素,未能广泛应用于抗氧化药物的筛选^[4-5]。所以,开发一种简单、快速的体内抗氧化药物筛选模型意义重大。

[0004] 斑马鱼是一种新颖的模式生物。与传统的体内和体外筛选模型相比较,活体斑马鱼筛选模型具有诸多优势,克服了原有体外模型在吸收、分布、代谢和排泄环节验证的欠缺及传统体内筛选模型实验周期长、操作复杂、成本高的弊端。斑马鱼是一种脊椎动物,与人类基因的相似度高达85%左右,实验结果可比性强。与鼠类等哺乳动物相比,斑马鱼胚胎透明,可同时观察分析多个器官,实验周期短,样本容量大,结果可信度高,所需费用低^[6]。更重要的是,斑马鱼模型具有与生俱来的优点^[6-7]:①饲养成本低,性成熟周期短;②繁殖能力强,一尾雌鱼每次可产200~300枚卵;③生长发育速度快,在受精24h后,斑马鱼主要的组织器官原基已形成,可为研究提供大量的样本和较短的实验周期;④胚胎及幼鱼透明,体外受精,体外发育,可直接观察,并可同时分析多个器官系统;⑤胚胎有可以提供营养的卵黄,第一周内不需喂食,可避免化合物处理时化合物与食物成份的相互作用;⑥胚胎体积小,幼鱼体长只有1-4 mm,能够在标准的6、12、24、48或96孔板内进行分析;⑦给药方式简单:溶于水的小分子物质可直接经皮肤、鳃及消化系统进入斑马鱼体内;不溶于水的物质、大分子物质及蛋白质可进行显微注射。因此斑马鱼可作为很好的疾病模型研究材料。

[0005] 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(carboxy-H₂DCFDA)是一种常用的ROS特异性荧光检测试剂,无荧光carboxy-H₂DCFDA通过与斑马鱼体内的ROS反应,生成荧光活性的2',7'-dichlorofluorescein(DCF);使用酶标仪定量检测DCF的荧光信号,从而相对定量测定生物体内ROS的量^[8]。

[0006] 本发明提供的斑马鱼ROS检测模型有利于简单、高效、快速筛选抗氧化药物,对抗衰老和预防衰老相关疾病有着重要意义。与以往的模型相比,本发明具有如下优点:

[0007] 1)活体内一实验材料为活体斑马鱼,作为一种脊椎动物,其筛选模型属体内模型,能够真实反映药物在体内的吸收、分布、代谢与排泄,真正反映药物的整体生物活性。

[0008] 2) 高通量—斑马鱼幼鱼很小,只有1-4毫米,能够在标准的6,12,24,48,96或384孔板内进行分析,实验周期短,使斑马鱼成为一种能进行高通量自动化体内药物致敏性评价的理想模型。

[0009] 3) 经济—所需费用低,以猴子为实验载体的筛选实验每只每天耗费大于10美元,以小鼠为实验载体的筛选实验每只每天耗费大于1美元,而以斑马鱼为实验载体的筛选实验每只每天耗费小于0.01美元。

[0010] 4) 化合物用量少—检测化合物用量少,通常只需几毫克,而传统的筛选实验则需几毫克以上的化合物。

[0011] 5) 简便—实验过程操作简单,斑马鱼经化合物处理可定量分析化合物抗氧化活性,而传统动物实验操作过程复杂,判断指标主观,容易产生假阳性结果。

[0012] 6) 快速—实验周期短,可在1小时内完成。斑马鱼在第一个72小时以内完成胚胎发育。多数的内部器官,包括心血管系统、肠、肝脏和肾,在24-48小时内快速成型,传统的实验载体老鼠和猴子则分别需要21天和9个月方可完成胚胎发育。

[0013] 7) 可靠的预测性—斑马鱼的基因与人类基因的相似度高达85%左右,其生物学功能与哺乳动物及人类高度相似,实验结果可比性强,预测性好。

[0014] 8) 敏感性高—carboxy-H₂DCFDA能与ROS特异性的反应,可以快速检测斑马鱼体内的ROS水平。

[0015] 9) 稳定性高、重复性好 — 本发明重复实验十几次,所获实验结果基本相同。

[0016] 本发明应用价值

[0017] 应用斑马鱼体内ROS检测模型进行抗氧化药物的筛选具有可靠、快速、高效、经济、高通量等优点,可实现体内高通量筛选抗氧化药物。本发明对抗氧化药物的开发有着重要的意义。

[0018] 试剂及仪器

[0019] carboxy-H₂DCFDA (C400, Invitrogen)、多功能微孔板分析仪 (Mithras LB940, Berthold Technologies)、96孔板 (Nest Biotech)。

发明内容

[0020] 本发明的目的在于提供一种斑马鱼体内ROS检测模型的建立方法,同时提供一种利用该模型筛选抗氧化药物的方法。本发明提供的方法具有可靠、快速、经济、高效、高通量等优点。

[0021] 内容一:本发明提供一种斑马鱼体内ROS检测模型的建立方法,设计方案为:

[0022] 1 斑马鱼选取

[0023] 取4~5对斑马鱼亲本交配,按照Westerfield^[9]的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入6、12、24、48、96或384孔微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0024] 2 斑马鱼体内ROS检测模型建立条件的确定

[0025] (1) 斑马鱼的发育阶段的确定。

[0026] (2) 检测用斑马鱼数量的确定。

[0027] (3) 阳性对照化合物谷胱甘肽 (GSH) 的浓度确定。

[0028] 本发明的实施例一中,对上述的建模条件进行确定。其中,斑马鱼的发育阶段为3 dpf,检测用斑马鱼数量为1尾,GSH浓度为100 μM 。

[0029] 内容二:本发明提供一种利用斑马鱼体内ROS检测模型筛选抗氧化药物的方法,设计方案为:

[0030] 1 斑马鱼选取

[0031] 取4~5对斑马鱼亲本交配,按照Westerfield^[9]的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入6、12、24、48、96或384孔微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0032] 2化合物处理

[0033] 化合物初筛浓度为30 μM ;检测试剂对照组(Control)为不含斑马鱼的反应液;以carboxy-H₂DCFDA处理的斑马鱼作为模型组(Model),以100 μM GSH处理模型组斑马鱼作为阳性对照组;实验在96孔板中进行,每孔1尾斑马鱼,100 μl 反应液,每个实验组处理6个孔。

[0034] 3 酶标仪分析:

[0035] 各实验组28 $^{\circ}\text{C}$ 反应1小时,反应结束后,使用多功能微孔分析仪检测各实验组的荧光值。ROS清除率公式如下:

$$[0036] \quad \text{ROS清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{化合物处理组荧光值}}{\text{模型组荧光值}}\right) \times 100\%$$

[0037] 统计学处理结果以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理,以模型组作为标准,比较各实验组ROS清除率,确定化合物的抗氧化效果。

附图说明

[0038] 图1、斑马鱼的发育阶段的确定

[0039] 图2、检测用斑马鱼数量的确定

[0040] 图3、阳性对照化合物GSH的浓度确定

[0041] 图4、筛选化合物C1-C8的抗氧化活性。

具体实施方式

[0042] 以下实施例为进一步说明本发明提供的抗氧化药物筛选的斑马鱼体内ROS检测模型的建立方法及其应用。实施是为了解释而不是以任何方式限制本发明的范围,本领域技术人员在权力要求的范围内所作的某些改变和调整也应认为属于本发明的范围。

[0043] 实施例一、斑马鱼体内ROS检测模型的建立

[0044] 1 斑马鱼选取

[0045] 取4~5对斑马鱼亲本交配,按照Westerfield^[9]的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入6、12、24、48、96或384孔微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0046] 2斑马鱼体内ROS检测模型建立条件的确定。

[0047] (1) 斑马鱼的发育阶段的确定

[0048] 以5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的ROS荧光检测试剂(carboxy-H₂DCFDA)分别处理1、2、3、4、5和6 dpf的斑马鱼,检测试剂对照组(Control)为不含斑马鱼的反应液;实验在96孔板中进行,每孔1尾斑马鱼,100 μl 反应液,每个实验组处理6个孔;各实验组28 $^{\circ}\text{C}$ 反应1小时,反应结束后,使用多功能微孔分析仪检测各组荧光值。统计学处理结果以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理,通过比较不同阶段的斑马鱼产生ROS的量,确定斑马鱼体内ROS检测模型的斑马鱼发育阶段。

[0049] (2)检测用斑马鱼数量的确定。

[0050] 以5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的carboxy-H₂DCFDA分别处理1、2和3尾3 dpf的斑马鱼,Control为不含斑马鱼的反应液;实验在96孔板中进行,每孔100 μl 反应液,每个实验组处理6个孔;各实验组28 $^{\circ}\text{C}$ 反应1小时,反应结束后,使用多功能微孔分析仪检测各组荧光值。统计学处理结果以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理,通过比较不同数量的斑马产生ROS的量,确定斑马鱼体内ROS检测模型的斑马鱼数量。

[0051] (3)阳性对照化合物GSH的浓度确定。

[0052] 以5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的carboxy-H₂DCFDA分别处理含有1 μM 、10 μM 和100 μM GSH的3 dpf斑马鱼,Control为不含斑马鱼的反应液,Model为carboxy-H₂DCFDA处理不含GSH的斑马鱼;实验在96孔板中进行,每孔1尾斑马鱼,100 μl 反应液,每个浓度的GSH处理6个孔;各实验组28 $^{\circ}\text{C}$ 反应1小时,反应结束后,使用多功能微孔分析仪检测各组荧光值。统计学处理结果以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理,通过比较不同浓度GSH处理的斑马鱼产生ROS的量,确定斑马鱼体内ROS检测模型阳性对照化合物GSH的最佳浓度。

[0053] 结果显示,1-6 dpf斑马鱼实验组荧光值与Control相比均有统计学意义($p < 0.01$, $p < 0.001$)。1 dpf斑马鱼实验组的荧光值与对照组相比,有数量级的差异,但是由于1 dpf的斑马鱼尚未发育完全,不能完全体现药物体内的药效,所以不选择1 dpf斑马鱼作为建模的斑马鱼。2 dpf的斑马鱼实验组与对照组的荧光值比值(信噪比)为1.4,而一般微孔板分析灵敏度要求的信噪比大于或等于2,所以不选择2 dpf斑马鱼作为建模的斑马鱼。3-6 dpf斑马鱼实验组与对照组的荧光值比值(信噪比)为3.1至7.2,均大于2,所以3-6 dpf斑马鱼均可作为建模的斑马鱼,但为了方便实验操作,节省实验时间,选择3 dpf的斑马鱼建模的斑马鱼。(图1)

[0054] 1-3尾斑马鱼实验组荧光值与Control相比均有统计学意义($p < 0.001$),而且呈现线性相关($R^2 = 0.9988$),说明每尾斑马鱼本底产生的ROS的量相当,进一步证明了carboxy-H₂DCFDA能够灵敏地检测斑马鱼体内的ROS。1-3尾斑马鱼实验组与Control的荧光值比值(信噪比)为3.2至7.5,均大于微孔板分析灵敏度要求的最低信噪比(2倍),所以1-3尾可作为建模的斑马鱼数量,但为了方便实验操作,节省斑马鱼用量,选择1尾斑马鱼建模的斑马鱼数量。(图2)

[0055] 还原型谷胱甘肽(GSH)存在于斑马鱼体内,是斑马鱼体内清除ROS的重要物质;临床上常使用还原型谷胱甘肽作为抗氧化剂,故被用作本模型的阳性对照化合物。Model与Control相比,有统计学意义($p < 0.001$),说明模型建立成功;GSH在浓度为1 μM 、10 μM 和100 μM 时,抗氧化效果与Model相比,均有统计学意义($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$),而且随着GSH

浓度的增加,抗氧化效果越好,呈现抗氧化效果的浓度依赖性;进一步验证了GSH的体内抗氧化效果。GSH在100 μM 时的抗氧化效果最好,为了方便评价其它化合物的抗氧化效果,选择100 μM 的GSH作为本模型的阳性对照化合物浓度。(图3)

[0056] 实施例二、利用斑马鱼体内ROS检测模型筛选抗氧化药物

[0057] 1 斑马鱼选取

[0058] 取4~5对斑马鱼亲本交配,按照Westerfield^[9]的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入6、12、24、48、96或384孔微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0059] 2化合物处理

[0060] 化合物(C1至C8)是肉桂皮分离纯化得到的8种化合物,初筛浓度为30 μM ;Control为不含斑马鱼的反应液;以carboxy-H₂DCFDA处理的斑马鱼作为模型组,以100 μM GSH处理模型组斑马鱼作为阳性对照组;实验在96孔板中进行,每孔1尾斑马鱼,100 μl 反应液,每个实验组处理6个孔。

[0061] 3 酶标仪分析:

[0062] 各实验组28 $^{\circ}\text{C}$ 反应1小时,反应结束后,使用多功能微孔分析仪检测各实验组的荧光值。ROS清除率公式如下:

$$[0063] \quad \text{ROS清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{化合物处理组荧光值}}{\text{模型组荧光值}}\right) \times 100\%$$

[0064] 统计学处理结果以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理,以模型组作为标准,比较各实验组ROS清除率,确定化合物的抗氧化效果。

[0065] 结果显示,Model与对Control相比,有统计学意义($p < 0.001$);GSH的ROS清除率为(94.9 \pm 3.5)%,与Model相比有统计学意义($p < 0.001$);由于模型组和阳性对照组均符合要求,说明模型建立成功,实验数据有效、可靠。

[0066] 化合物C2和C4的ROS清除率分别为(6.0 \pm 5.8)%和(0.8 \pm 7.3)%,与模型组(Model)相比,均没有统计学意义($p > 0.05$),说明C2和C4均没有体内的抗氧化作用。化合物C1、C3、C5、C6、C7和C8的ROS清除率分别为(66.7 \pm 2.5)%、(60.0 \pm 3.4)%、(94.3 \pm 3.0)%、(88.4 \pm 4.6)%、(64.2 \pm 6.2)%和(93.5 \pm 5.1)%,与模型组(Model)相比,均有统计学意义($p < 0.001$),说明化合物C1、C3、C5、C6、C7和C8均有体内抗氧化效果,抗氧化效果从低到高分别为C3、C7、C1、C8和C5。利用斑马鱼体内ROS检测模型,在肉桂皮分离纯化得到的8种化合物中,筛选出有抗氧化活性的化合物5个,没有抗氧化活性的化合物3个。(图4)

[0067] 参考文献:

[0068] [1] Harman D. Free radicals in aging[J]. Mol Cell Biochem, 1988, 84(2): 155-161.

[0069] [2] 蓝开蔚,黄建鸣,谢之荣,等.超氧化物歧化酶活性测定—Pyro—gallol—NBT比色法与化学的比较[J].生物化学与生物物理进展,1998,15(2):138—140.

[0070] [3] Diez L, Livertoux M H, Srark AA, et al. High—performance liquid chromatographic assay of hydroxyl free radical using salicylic acid

hydroxylation during in vitro experiments involving thiols[J].Journal of Chromatography B,2001,763:185-193.

[0071] [4] 陆蓓, 叶灵静, 颜文钦, 等. 柑橘黄酮对D-半乳糖衰老模型小鼠抗氧化作用[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(5): 343-345.

[0072] [5] 罗丽萍, 高荫榆, 洪雪娥, 等. 薯蓣黄酮和多糖体内抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 408-410.

[0073] [6] 殷梧, 邹苏琪, 王光辉, 等. 模式动物斑马鱼在神经系统疾病研究中的应用[J]. 生命科学, 2008, 20(5): 773-777.

[0074] [7] McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J]. Drug Discover Today, 2008, 13(9): 394-401.

[0075] [8] Andrea C. H, Paul J. M, Sharon L. B, Carol H. K: Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos. Journal of Immunological Methods, 2004, 292:119- 129

[0076] [9] Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish. Eugene, Oregon: The University of Oregon Press, 1993..

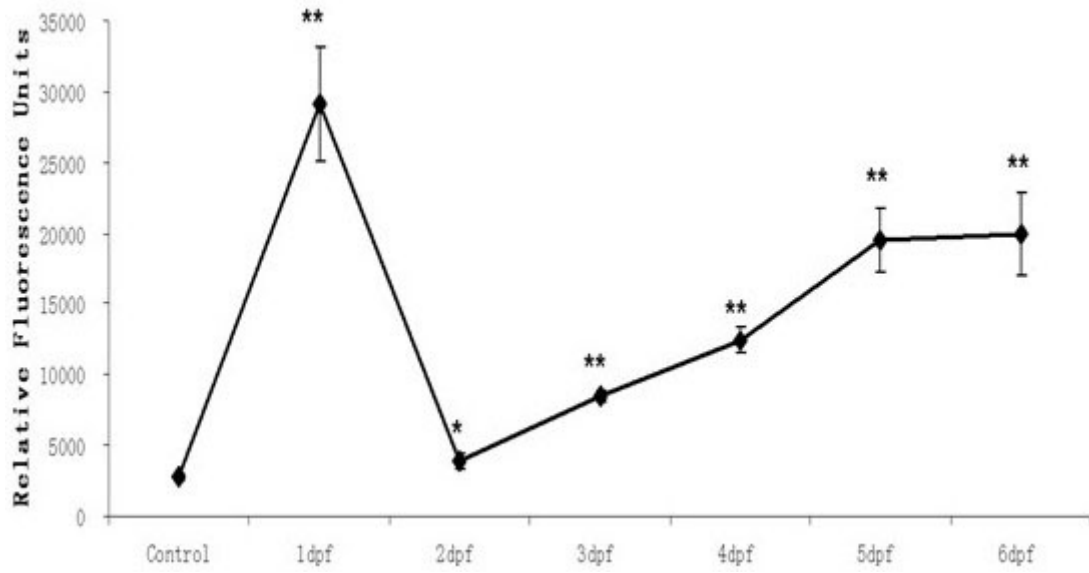


图1

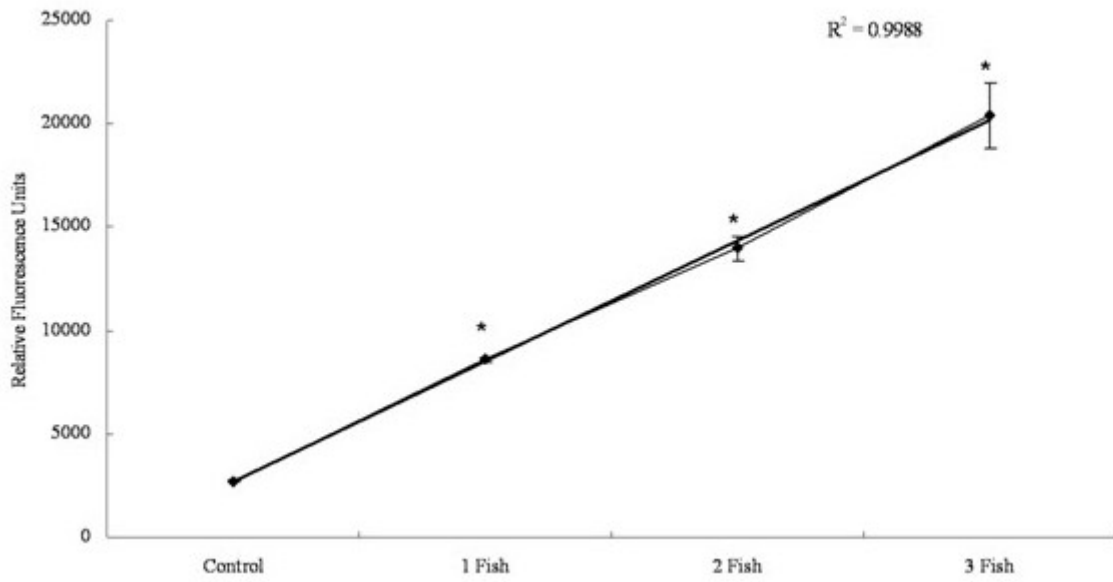


图2

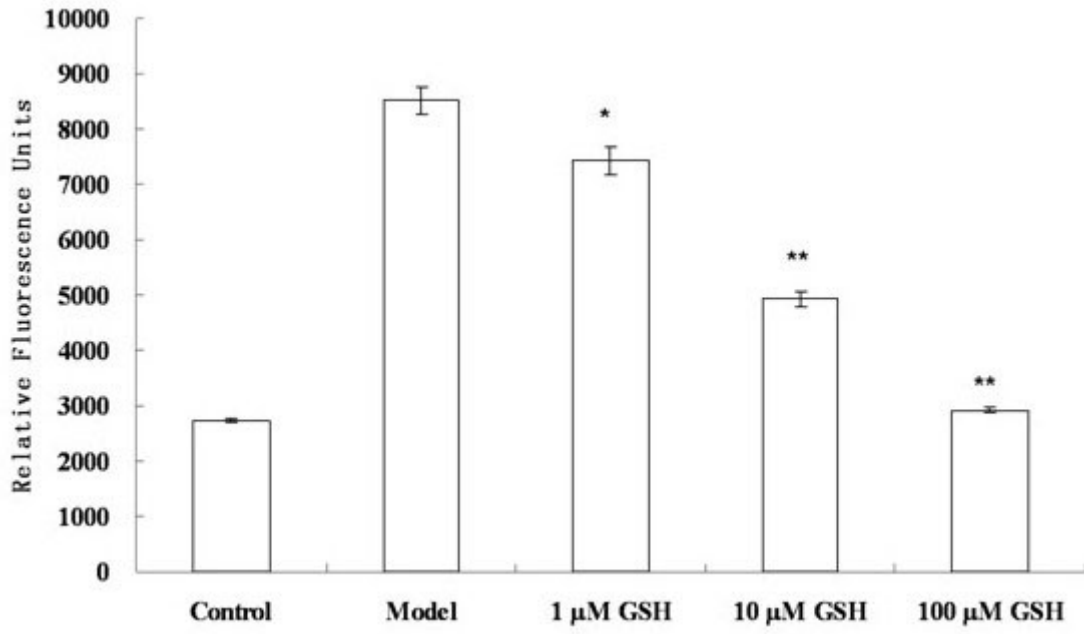


图3

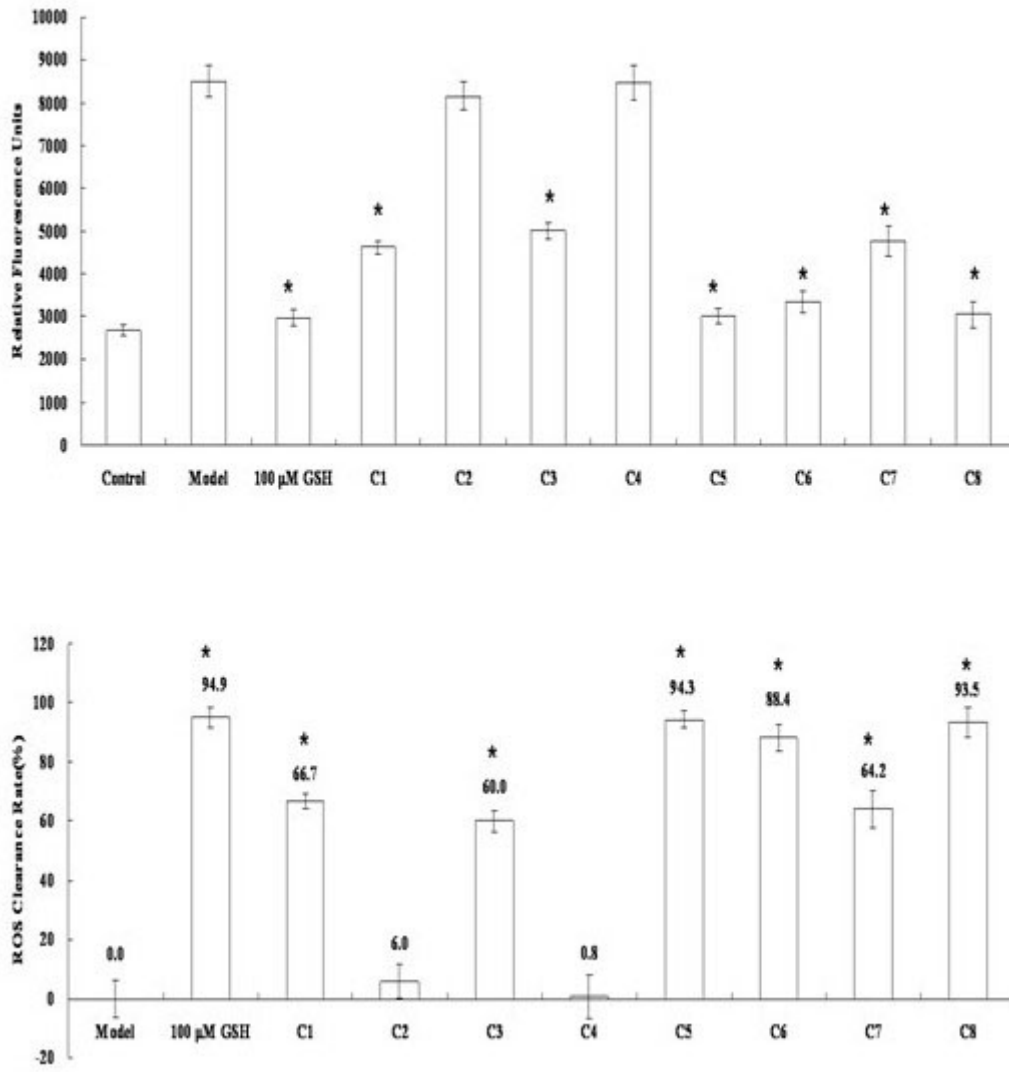


图4