



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106492232 B

(45)授权公告日 2019.11.12

(21)申请号 201610969159.3

(22)申请日 2016.11.03

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106492232 A

(43)申请公布日 2017.03.15

(73)专利权人 杭州环特生物科技股份有限公司

地址 310051 浙江省杭州市滨江区江陵路
88号5幢1楼A区

(72)发明人 朱晓宇 夏波 郭胜亚 劳乔聪
李春启

(51)Int.Cl.

A61K 49/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 102499135 A,2012.06.20,

CN 104274464 A,2015.01.14,

JP 特许第4630989号 B2,2011.02.09,

CN 103230397 A,2013.08.07,

朱晓宇 等.神香苏合丸防治心血管疾病的
实验研究.《浙江理工大学学报(自然科学版)》
.2016,第35卷(第4期),扉页,第631-635页.

刘新星 等.构建斑马鱼心脏损伤-再生模型
的手术方法.《遗传HEREDITAS》.2013,第35卷(第
4期),

Cristina Santoriello et al.Hooked!
Modeling human disease in zebrafish.《J
Clin Invest.》.2012,第122卷(第7期),

Amy L Rubinstein.Zebrafish: From
disease modeling to drug discovery.
《Current Opinion in Drug Discovery &
Development》.2003,第6卷(第2期),

审查员 张景雅

权利要求书3页 说明书13页 附图7页

(54)发明名称

一种用斑马鱼评价心肌损伤诱导剂毒性与
治疗剂功效的方法

(57)摘要

本发明建立了一种斑马鱼心肌损伤模型,并
提供了一种利用该模型评价心肌损伤诱导剂与
治疗剂功效的方法。本发明提供了一种全新的药
物评价模型与评价方法,具有可靠、快速、高效、
低廉、高性价比等优点,可用于评价已公开药物
的功效,还可用于筛选具有全新化合物结构的未
公开药物,应用广泛,意义重大。

1. 一种用斑马鱼评价心肌损伤诱导剂毒性的方法,包括如下步骤:

(1) 斑马鱼发育阶段的确定

取野生型AB品系斑马鱼亲本交配、孵化,选择不同发育阶段的斑马鱼分别移入对应的微孔板中;根据不同的发育阶段将对应的微孔板均设为2个实验组:1个为药物处理组,该组中对斑马鱼进行单浓度给药处理,1个为正常对照组,该组中对斑马鱼不进行任何处理;然后,各组均加入相同体积的养鱼用水,在相同温度下恒温培养;当药物处理斑马鱼至实验终点后,将2个实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,分析斑马鱼心输出量和血流速度,判断并确定斑马鱼的最佳发育阶段;

所述不同发育阶段的斑马鱼为受精后2天(2dpf)、受精后3天(3dpf)或受精后4天(4dpf)的斑马鱼;

所述最佳发育阶段的斑马鱼为受精后3天(3dpf)的斑马鱼;

(2) 诱导剂处理

将步骤(1)确定的3dpf的斑马鱼移入微孔板中,设置正常对照组和不同给药浓度的诱导剂处理组:正常对照组中对斑马鱼不进行任何处理,诱导剂处理组中对斑马鱼按不同给药浓度的诱导剂处理;然后,各组均加入相同体积的养鱼用水,在相同温度下恒温培养;

(3) 通过心输出量减少率和血流速度减少率来评价诱导剂毒性

当步骤(2)的诱导剂处理斑马鱼至实验终点后,将实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,统计、分析斑马鱼心输出量和血流速度,计算诱导剂处理组的心输出量减少率和血流速度减少率,与正常对照组比较、评价诱导剂对心肌损伤的毒性程度;

计算公式如下:

$$\text{心输出量减少率} = \left(1 - \frac{\text{诱导剂处理组心输出量}}{\text{正常对照组心输出量}}\right) \times 100\%;$$

$$\text{血流速度减少率} = \left(1 - \frac{\text{诱导剂处理组血流速度}}{\text{正常对照组血流速度}}\right) \times 100\%;$$

(4) 通过心脏损伤诱导率来评价诱导剂毒性

当步骤(2)的诱导剂处理斑马鱼至实验终点后,移除微孔板中的液体,各组中均加入浓度为 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 的吖啶橙染色液,在相同温度下恒温培养后,清洗斑马鱼,用立体荧光显微镜对斑马鱼心脏位置拍照并保存;统计、分析斑马鱼心脏部位的损伤细胞荧光强度,计算诱导剂处理组的心脏损伤诱导率,与正常对照组比较、评价诱导剂对心肌损伤的毒性程度;

计算公式如下:

$$\text{心肌损伤诱导率} = \left(\frac{\text{诱导剂处理组荧光强度}}{\text{正常对照组荧光强度}} - 1\right) \times 100\%;$$

当诱导剂为异丙肾上腺素时,步骤(2)中各诱导剂处理组的诱导剂给药浓度为 $20\sim 50\text{mg}/\text{ml}$ 。

2. 根据权利要求1所述的用斑马鱼评价心肌损伤诱导剂毒性的方法,其特征在于,当所述的诱导剂为异丙肾上腺素时,步骤(2)中诱导剂的最佳给药浓度为 $50\text{mg}/\text{ml}$ 。

3. 根据权利要求1所述的用斑马鱼评价心肌损伤诱导剂毒性的方法,其特征在于,所述的恒温培养条件为:微孔板置于恒温培养箱中,在 28°C 下培养 30min ;所述的清洗斑马鱼条

件为:使用养鱼用水,清洗滴加吡啶橙染色液的斑马鱼,清洗次数为3次,每次5min。

4.根据权利要求1所述的用斑马鱼评价心肌损伤诱导剂毒性的方法,其特征在于,所述的步骤(1)中药物处理组,对斑马鱼给药的药物为诱导剂。

5.根据权利要求1所述的用斑马鱼评价心肌损伤诱导剂毒性的方法,其特征在于,该评价方法构建的斑马鱼心肌损伤模型用于筛选已公开或未公开的药物是否能够诱发心肌损伤及评价损伤程度。

6.根据权利要求5所述的用斑马鱼评价心肌损伤诱导剂毒性的方法,其特征在于,所述的药物,包括链脉佐菌素。

7.一种用斑马鱼评价心肌损伤治疗剂功效的方法,包括如下步骤:

(1) 斑马鱼发育阶段的确定

取野生型AB品系斑马鱼亲本交配、孵化,选择不同发育阶段的斑马鱼分别移入对应的微孔板中;根据不同的发育阶段将对应的微孔板均设为2个实验组:1个为药物处理组,该组中对斑马鱼进行单浓度给药处理,1个为正常对照组,该组中对斑马鱼不进行任何处理;然后,各组均加入相同体积的养鱼用水,在相同温度下恒温培养;当药物处理斑马鱼至实验终点后,将2个实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,分析斑马鱼心输出量和血流速度,判断并确定斑马鱼的最佳发育阶段;

所述不同发育阶段的斑马鱼为受精后2天(2dpf)、受精后3天(3dpf)或受精后4天(4dpf)的斑马鱼;

所述最佳发育阶段的斑马鱼为受精后3天(3dpf)的斑马鱼;

(2) 诱导剂给药浓度的确定

将步骤(1)确定的3dpf的斑马鱼移入微孔板中,设置正常对照组和不同给药浓度的诱导剂处理组:正常对照组中对斑马鱼不进行任何处理,诱导剂处理组中对斑马鱼按不同给药浓度的诱导剂处理;然后,各组均加入相同体积的养鱼用水,在相同温度下恒温培养;

当诱导剂处理斑马鱼至实验终点后,将实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,分析斑马鱼心输出量和血流速度,判断并确定诱导剂的最佳给药浓度;

(3) 治疗剂处理

将步骤(1)确定的3dpf的斑马鱼移入微孔板中,设置正常对照组、模型对照组和不同给药浓度的治疗剂处理组:正常对照组中对斑马鱼不进行任何处理,模型对照组中对斑马鱼按步骤(2)确定的最佳诱导剂给药浓度处理,治疗剂处理组中对斑马鱼按不同给药浓度的治疗剂处理;然后,各组均加入相同体积的养鱼用水,在相同温度下恒温培养;

(4) 通过心输出量增加率和血流速度增加率来评价治疗剂功效

当步骤(3)的治疗剂处理斑马鱼至实验终点后,将实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,统计、分析斑马鱼心输出量和血流速度,计算治疗剂处理组的心输出量增加率和血流速度增加率,与模型对照组比较、评价治疗剂对心肌损伤的治疗效果;

计算公式如下:

$$\text{心输出量增加率} = \left(\frac{\text{正常对照组心输出量} - \text{治疗剂处理组心输出量}}{\text{正常对照组心输出量} - \text{模型对照组心输出量}} \right) \times 100\%;$$

$$\text{血流速度增加率} = \left(\frac{\text{正常对照组血流速度} - \text{治疗剂处理组血流速度}}{\text{正常对照组血流速度} - \text{模型对照组血流速度}} \right) \times 100\%;$$

(5) 通过心脏损伤保护率来评价治疗剂功效

当步骤(3)的治疗剂处理斑马鱼至实验终点后,移除微孔板中的液体,各组中均加入浓度为 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 的吡啶橙染色液,在相同温度下恒温培养后,清洗斑马鱼,用立体荧光显微镜对斑马鱼心脏位置拍照并保存;统计、分析斑马鱼心脏部位的损伤细胞荧光强度,计算治疗剂处理组的心脏损伤保护率,与模型对照组比较、评价治疗剂对心肌损伤的治疗效果;

计算公式如下:

$$\text{心肌损伤保护率} = \left(\frac{\text{治疗剂处理组荧光强度} - \text{正常对照组荧光强度}}{\text{模型对照组荧光强度} - \text{正常对照组荧光强度}} \right) \times 100\%;$$

当诱导剂为异丙肾上腺素时,步骤(2)中各诱导剂处理组的诱导剂给药浓度为 $20\sim 50\text{mg}/\text{ml}$ 。

8. 根据权利要求7所述的用斑马鱼评价心肌损伤治疗剂功效的方法,其特征在于,当所述的诱导剂为异丙肾上腺素时,步骤(2)中诱导剂的最佳给药浓度为 $50\text{mg}/\text{ml}$ 。

9. 根据权利要求7所述的用斑马鱼评价心肌损伤治疗剂功效的方法,其特征在于,所述的恒温培养条件为:微孔板置于恒温培养箱中,在 28°C 下培养 30min ;所述的清洗斑马鱼条件为:使用养鱼用水,清洗滴加吡啶橙染色液的斑马鱼,清洗次数为3次,每次 5min 。

10. 根据权利要求7所述的用斑马鱼评价心肌损伤治疗剂功效的方法,其特征在于,所述步骤(1)中药物处理组,对斑马鱼给药的药物为诱导剂。

11. 根据权利要求7或10所述的用斑马鱼评价心肌损伤治疗剂功效的方法,其特征在于,所述的治疗剂为能够治疗心肌损伤的药物,选自地高辛、丹酚酸、雷诺嗪、维生素C、维生素E、辅酶Q、甘露醇、1,6-二磷酸果糖、谷胱甘肽、硝苯吡啶、异博定、硫氮卓酮、阿米洛利、美托洛尔、依那普利、厄贝沙坦、LCZ696、氢氯噻嗪、芪苈强心胶囊、参麦注射液中的一种。

一种用斑马鱼评价心肌损伤诱导剂毒性与治疗剂功效的方法

技术领域

[0001] 本发明属于药物评价与筛选的技术领域,具体涉及一种简便、经济、高通量的斑马鱼心肌损伤模型的应用,尤其是用该斑马鱼模型评价心肌损伤诱导剂毒性与治疗剂功效的方法。

背景技术

[0002] 随着生活水平的提高和人口老龄化,同时受社会、环境等因素的影响,心血管疾病发病率逐年增加,已成为人类死亡率最高的疾病之一。在心肌梗死、缺血再灌注损伤等多种心血管疾病的发生发展过程中多伴有心肌损伤,进而发生细胞凋亡,钙超载等,引起心血管功能的紊乱。从心肌缺血损伤的最新检测报告中可知,借助数十种机制治疗心肌损伤,经常使用的有缓解细胞能量代谢、剔除细胞氧自由基、保护血管、改善心肌细胞钙超载情况、优化细胞因子、控制炎症反应、减缓细胞凋亡速度等。但现有的心肌损伤治疗药物存在着或疗效不佳,或毒副作用较大或费用高等问题,因此开发新的心肌损伤治疗药物显得非常必要^[1-2]。

[0003] 建立适当的动物模型,不仅能为该病的发病机制和病理生理改变的研究奠定基础,而且更重要的是促进新药的开发,推进诊断和各种治疗方法的进步。目前心肌损伤模型的动物种类和造模方法较多,主要有:冠脉结扎法、冠脉夹闭法、微量直流电刺激法、冠脉局部滴敷药物法、球囊堵塞法、血栓堵塞法、药物造模法等。采用不同动物建立的心肌损伤模型具有不同特点,每一种动物模型和造模方法都有优缺点。这些动物模型存在的不足主要有:神经-体液等因素的干扰、造模操作复杂、技术要求高、手术创伤大、并发症和死亡率高、不能精确的确定结扎部位,心率、应激程度与心脏的前后负荷等影响梗死面积的一些重要因素难以控制^[3-4],不利于后续心肌损伤治疗药物的评价与筛选工作,且实验周期长、费用高、工作量大。离体心肌损伤模型及细胞模型虽然操作简单,但缺少药物在生物整体的代谢转化和体内的循环分布,不能反映药物在体内的真实情况。因此建立一种能很好的模拟药物在体内的过程,又能快速方便的评价与筛选心肌损伤治疗药物的动物模型具有重要的应用价值。

[0004] 与传统的模式生物相比,斑马鱼在心血管疾病研究中有其独特的优势,主要体现在以下几个方面:(1)斑马鱼体外受精,体外发育,胚胎及幼鱼身体透明,易于观察及干预。斑马鱼胚胎和日龄较小的幼鱼可以通过皮肤供氧,即使在循环系统完全无法运作的情况下,斑马鱼胚胎仍可存活较长一段时间^[5],这在研究致死性心血管畸形及侧枝动脉生成等方面有着小鼠无法替代的作用。此外,产卵量大、饲养密度高、养殖费用低廉等也是斑马鱼相对于小鼠的优势^[6-7]。(2)斑马鱼作为脊椎动物,其中枢神经系统、内脏器官、血液以及视觉系统,在分子水平上与人类85%相似(果蝇仅为61%),尤其是心血管系统,斑马鱼的早期发育^[8]与人类极为相似。另外,斑马鱼具备与哺乳动物相似的免疫系统,包括相对完整的适应性免疫系统和保守的先天性免疫系统^[9],这些都是果蝇、线虫等所无法比拟的。(3)斑马鱼在研究心脏发育方面有着重要作用,被称为“心脏发育研究的窗口”^[10],其优势体现在:

快速发育期的心脏可被高分辨率地显像;心脏形态与功能的显著缺损易于在活体胚胎发现,微小的缺损可以经分子生物学标记识别;易于研究功能障碍的心脏;可以应用遗传学技术对影响心脏发育的相关基因进行大规模的筛选等。

[0005] 目前,斑马鱼应用于心血管疾病的研究,主要有心律失常、扩张型心肌病、心力衰竭、等疾病,尚未见心肌损伤疾病的斑马鱼应用的文献报道。如,将斑马鱼应用于人类长QT综合症^[11,12]和短QT综合症^[13]的研究,Burns等^[14]将心肌细胞荧光标记的转基因斑马鱼放入96孔板中,每个孔内为不同浓度的实验药物,斑马鱼的心率可被检测系统自动检测,通过这种方法可快速评价抗心律失常药物的疗效以及药物对心率和心律的影响。如,Schonberger等发现^[15]转录激活辅助因子EYA4基因的突变可导致人类家族性扩张型心肌病^[16]。如,Gerull等^[17]报道了titin基因的突变可导致人类扩张型心肌病,同年Xu等^[18]发现titin基因突变也能使斑马鱼出现心肌病样表现。又如,在人类扩张型心肌病的患者中,层粘连蛋白a4基因和整合素耦联激酶基因的突变率非常高,而研究发现上述基因的突变也可使斑马鱼发生心力衰竭^[19]。又如,Huang等^[20]发现马兜铃酸可使斑马鱼胚胎的心脏出现收缩功能障碍,Wang等^[21]发现心脏特异性高表达Nip3 α 可使斑马鱼出现心脏发育异常及显著的心功能不全。

[0006] 可见,前述现有文献的报道,并未涉及有对心肌损伤疾病的斑马鱼模型研究;特别是如何用斑马鱼模型研究由化学类药物诱导的心肌损伤疾病,并评价心肌损伤诱导剂毒性或治疗剂功效的方法,未见文献报道。

[0007] 综上所述,如何建立一种斑马鱼心肌损伤模型,并用该模型评价心肌损伤诱导剂毒性与治疗剂功效,是本领域技术人员急需解决的技术难题。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于:发明人建立了一种斑马鱼心肌损伤模型,并提供了一种利用该模型评价心肌损伤诱导剂毒性与治疗剂功效的方法。

[0009] 为实现上述发明目的,本发明采取了以下技术方案:

[0010] 内容一:一种用斑马鱼评价心肌损伤诱导剂毒性的方法,包括如下步骤:

[0011] (1) 斑马鱼发育阶段的确定

[0012] 取野生型AB品系斑马鱼亲本交配、孵化,选择不同发育阶段的斑马鱼分别移入对应的微孔板中;根据不同的发育阶段将对应的微孔板均设为2个实验组:1个为药物处理组,该组中对斑马鱼进行单浓度给药处理,1个为正常对照组,该组中对斑马鱼不进行任何处理;然后,各组均加入相同体积的养鱼用水,在相同温度下恒温培养;当药物处理斑马鱼至实验终点后,将2个实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,分析斑马鱼心输出量和血流速度,判断并确定斑马鱼的最佳发育阶段;

[0013] 所述不同发育阶段的斑马鱼为受精后2天(2dpf)、受精后3天(3dpf)或受精后4天(4dpf)的斑马鱼;

[0014] 所述最佳发育阶段的斑马鱼为受精后3天(3dpf)的斑马鱼;

[0015] (2) 诱导剂处理

[0016] 将步骤(1)确定的3dpf的斑马鱼移入微孔板中,设置正常对照组和不同给药浓度的诱导剂处理组:正常对照组中对斑马鱼不进行任何处理,诱导剂处理组中对斑马鱼按不

同给药浓度的诱导剂处理;然后,各组均加入相同体积的养鱼用水,在相同温度下恒温培养;

[0017] (3)通过心输出量减少率和血流速度减少率来评价诱导剂毒性

[0018] 当步骤(2)的诱导剂处理斑马鱼至实验终点后,将实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,统计、分析斑马鱼心输出量和血流速度,计算诱导剂处理组的心输出量减少率和血流速度减少率,与正常对照组比较、评价诱导剂对心肌损伤的毒性程度;

[0019] 计算公式如下:

$$[0020] \quad \text{心输出量减少率} = \left(1 - \frac{\text{诱导剂处理组心输出量}}{\text{正常对照组心输出量}}\right) \times 100\%;$$

$$[0021] \quad \text{血流速度减少率} = \left(1 - \frac{\text{诱导剂处理组血流速度}}{\text{正常对照组血流速度}}\right) \times 100\%;$$

[0022] (4)通过心脏损伤诱导率来评价诱导剂毒性

[0023] 当步骤(2)的诱导剂处理斑马鱼至实验终点后,移除微孔板中的液体,各组中均加入浓度为3 μ g/mL的吖啶橙染色液,在相同温度下恒温培养后,清洗斑马鱼,用立体荧光显微镜对斑马鱼心脏位置拍照并保存;统计、分析斑马鱼心脏部位的损伤细胞荧光强度,计算诱导剂处理组的心脏损伤诱导率,与正常对照组比较、评价诱导剂对心肌损伤的毒性程度;

[0024] 计算公式如下:

$$[0025] \quad \text{心肌损伤诱导率} = \left(\frac{\text{诱导剂处理组荧光强度}}{\text{正常对照组荧光强度}} - 1\right) \times 100\%。$$

[0026] 优选的,恒温培养条件为:微孔板置于恒温培养箱中,在28 $^{\circ}$ C下培养30min。

[0027] 优选的,清洗斑马鱼条件为:使用养鱼用水,清洗滴加吖啶橙染色液的斑马鱼,清洗次数为3次,每次5min。

[0028] 优选的,步骤(1)中药物处理组,对斑马鱼给药的药物为诱导剂或治疗剂。

[0029] 更优选的,诱导剂为能够诱导心肌损伤的药物或化学试剂,包括但不限于异丙肾上腺素、垂体后叶素、链脲佐菌素、阿霉素、维拉帕米、马兜铃酸、特非那定、阿司匹林、盐酸氯米帕明、环磷酰胺、尼莫地平、奎尼丁、喹巴因、乌头碱、氯化钴、叠氮钠、亚硫酸钠、过氧化氢、氯化镉、三氧化二砷。

[0030] 更优选的,治疗剂为能够治疗心肌损伤的药物,包括但不限于地高辛、丹酚酸A、雷诺嗪、维生素C、维生素E、辅酶Q、甘露醇、1,6-二磷酸果糖、谷胱甘肽、硝苯吡啶、异博定、硫氮卓酮、阿米洛利、美托洛尔、依那普利、厄贝沙坦、LCZ696、氢氯噻嗪、芪苈强心胶囊、参麦注射液。

[0031] 进一步的,当诱导剂为异丙肾上腺素时,步骤(2)中各诱导剂处理组的诱导剂给药浓度为20~50mg/ml,最佳诱导剂给药浓度为50mg/ml;

[0032] 进一步的,当诱导剂为垂体后叶素时,步骤(2)中各诱导剂处理组的诱导剂给药浓度为40~60C,最佳给药浓度为60C。

[0033] 内容二:一种用斑马鱼评价心肌损伤治疗剂功效的方法,包括如下步骤:

[0034] (1)斑马鱼发育阶段的确定

[0035] 取野生型AB品系斑马鱼亲本交配、孵化,选择不同发育阶段的斑马鱼分别移入对

应的微孔板中；根据不同的发育阶段将对应的微孔板均设为2个实验组：1个为药物处理组，该组中对斑马鱼进行单浓度给药处理，1个为正常对照组，该组中对斑马鱼不进行任何处理；然后，各组均加入相同体积的养鱼用水，在相同温度下恒温培养；当药物处理斑马鱼至实验终点后，将2个实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统，分析斑马鱼心输出量和血流速度，判断并确定斑马鱼的最佳发育阶段；

[0036] 所述不同发育阶段的斑马鱼为受精后2天(2dpf)、受精后3天(3dpf)或受精后4天(4dpf)的斑马鱼；

[0037] 所述最佳发育阶段的斑马鱼为受精后3天(3dpf)的斑马鱼；

[0038] (2) 诱导剂给药浓度的确定

[0039] 将步骤(1)确定的3dpf的斑马鱼移入微孔板中，设置正常对照组和不同给药浓度的诱导剂处理组：正常对照组中对斑马鱼不进行任何处理，诱导剂处理组中对斑马鱼按不同给药浓度的诱导剂处理；然后，各组均加入相同体积的养鱼用水，在相同温度下恒温培养；

[0040] 当诱导剂处理斑马鱼至实验终点后，将实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统，分析斑马鱼心输出量和血流速度，判断并确定诱导剂的最佳给药浓度；

[0041] (3) 治疗剂处理

[0042] 将步骤(1)确定的3dpf的斑马鱼移入微孔板中，设置正常对照组、模型对照组和不同给药浓度的治疗剂处理组：正常对照组中对斑马鱼不进行任何处理，模型对照组中对斑马鱼按步骤(2)确定的最佳诱导剂给药浓度处理，治疗剂处理组中对斑马鱼按不同给药浓度的治疗剂处理；然后，各组均加入相同体积的养鱼用水，在相同温度下恒温培养；

[0043] (4) 通过心输出量增加率和血流速度增加率来评价治疗剂功效

[0044] 当步骤(3)的治疗剂处理斑马鱼至实验终点后，将实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统，统计、分析斑马鱼心输出量和血流速度，计算治疗剂处理组的心输出量增加率和血流速度增加率，与模型对照组比较、评价治疗剂对心肌损伤的治疗效果；

[0045] 计算公式如下：

$$[0046] \quad \text{心输出量增加率} = \left(\frac{\text{正常对照组心输出量} - \text{治疗剂处理组心输出量}}{\text{正常对照组心输出量} - \text{模型对照组心输出量}} \right) \times 100\%;$$

$$[0047] \quad \text{血流速度增加率} = \left(\frac{\text{正常对照组血流速度} - \text{治疗剂处理组血流速度}}{\text{正常对照组血流速度} - \text{模型对照组血流速度}} \right) \times 100\%;$$

[0048] (5) 通过心脏损伤保护率来评价治疗剂功效

[0049] 当步骤(3)的治疗剂处理斑马鱼至实验终点后，移除微孔板中的液体，各组中均加入浓度为3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的吖啶橙染色液，在相同温度下恒温培养后，清洗斑马鱼，用立体荧光显微镜对斑马鱼心脏位置拍照并保存；统计、分析斑马鱼心脏部位的损伤细胞荧光强度，计算治疗剂处理组的心脏损伤保护率，与模型对照组比较、评价治疗剂对心肌损伤的治疗效果；

[0050] 计算公式如下：

$$[0051] \quad \text{心肌损伤保护率} = \left(\frac{\text{治疗剂处理组荧光强度} - \text{正常对照组荧光强度}}{\text{模型对照组荧光强度} - \text{正常对照组荧光强度}} \right) \times 100\%。$$

[0052] 优选的，恒温培养条件为：微孔板置于恒温培养箱中，在28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养30min。

[0053] 优选的,清洗斑马鱼条件为:使用养鱼用水,清洗滴加吡啶橙染色液的斑马鱼,清洗次数为3次,每次5min。

[0054] 优选的,步骤(1)中药物处理组,对斑马鱼给药的药物为诱导剂或治疗剂。

[0055] 更优选的,诱导剂为能够诱导心肌损伤的药物或化学试剂,包括但不限于异丙肾上腺素、垂体后叶素、链脲佐菌素、阿霉素、维拉帕米、马兜铃酸、特非那定、阿司匹林、盐酸氯米帕明、环磷酰胺、尼莫地平、奎尼丁、喹巴因、乌头碱、氯化钴、叠氮钠、亚硫酸钠、过氧化氢、氯化镉、三氧化二砷。

[0056] 更优选的,治疗剂为能够治疗心肌损伤的药物,包括但不限于地高辛、丹酚酸A、雷诺嗪、维生素C、维生素E、辅酶Q、甘露醇、1,6-二磷酸果糖、谷胱甘肽、硝苯吡啶、异博定、硫氮卓酮、阿米洛利、美托洛尔、依那普利、厄贝沙坦、LCZ696、氢氯噻嗪、芪苈强心胶囊、参麦注射液。

[0057] 进一步的,当诱导剂为异丙肾上腺素时,步骤(2)中各诱导剂处理组的诱导剂给药浓度为20~50mg/ml,最佳诱导剂给药浓度为50mg/ml;

[0058] 进一步的,当诱导剂为垂体后叶素时,步骤(2)中各诱导剂处理组的诱导剂给药浓度为40~60C,最佳给药浓度为60C。

[0059] 本发明中,发明人建立斑马鱼心肌损伤模型,模型的重点在于斑马鱼最佳发育阶段的确定,以及当用于评价治疗剂功效时,作为模型对照组的诱导剂最佳给药浓度的确定。与传统的动物模型相比,本模型具有如下优点:

[0060] (1) 体内:斑马鱼作为一种脊椎动物,其药物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。

[0061] (2) 直观:通过本模型,当斑马鱼经药物处理后,借助心跳血流分析系统和荧光显微镜,可以无创伤地在实验设置的任何时间点实时动态斑马鱼心跳和血流情况,直观反映药物在斑马鱼体内的活性;而哺乳动物根本不可能完成这一操作。

[0062] (3) 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(即“微孔板”)内进行分析和实验,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。

[0063] (4) 经济:所需费用低,以犬类为实验载体的筛选实验每只每天耗费大于10美元,以豚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。

[0064] (5) 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。

[0065] (6) 简便:实验过程操作简单,斑马鱼经药物处理后,即可进行定量、分析该药物的致敏性,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。

[0066] (7) 快速:实验周期短,可在1天内完成;而豚鼠常需要数周到数月的时间,犬常需要数月至数年的时间。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。

[0067] (8) 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。

[0068] (9) 稳定性高、重复性好:本发明重复实验十几次,得到的实验结果基本相同。

[0069] 本发明中,发明人在建立了斑马鱼心肌损伤模型的基础上,又提供了一种利用该模型评价心肌损伤诱导剂毒性与治疗剂功效的方法,这是一种全新的药物评价模型与评价方法,具有可靠、快速、高效、低廉、高性价比等优点,既可用于评价已公开药物(如已知的诱导剂、治疗剂)的毒性或功效,还可用于筛选具有未公开药物(如结构全新、药效不明的化合物,常用于first、me-better、me-too等等的新药开发)的毒性或功效,应用广泛,意义重大。

附图说明

[0070] 图1是实施例1用异丙肾上腺素处理3dpf斑马鱼后的心输出量分析。

[0071] 图2是实施例1用异丙肾上腺素处理3dpf斑马鱼后的血流速度分析。

[0072] 图3是实施例2用不同浓度异丙肾上腺素处理斑马鱼后的心输出量减少率比较。

[0073] 图4是实施例2用不同浓度异丙肾上腺素处理斑马鱼后的血流速度减少率比较。

[0074] 图5是实施例2不同实验组对斑马鱼心脏损伤细胞染色后的比较。

[0075] 图6是实施例2用不同浓度异丙肾上腺素处理斑马鱼后的心脏损伤诱导率比较。

[0076] 图7是实施例3用不同浓度地高辛处理后斑马鱼后的心输出量增加率比较。

[0077] 图8是实施例3用不同浓度地高辛处理后斑马鱼后的血流速度增加率比较。

[0078] 图9是实施例3不同实验组对斑马鱼心脏损伤细胞染色后的比较。

[0079] 图10是实施例3用不同浓度地高辛处理斑马鱼后的心脏损伤保护率比较。

[0080] 图11是实施例4用不同浓度垂体后叶素处理斑马鱼后的心输出量减少率比较。

[0081] 图12是实施例4用不同浓度垂体后叶素处理斑马鱼后的血流速度减少率比较。

[0082] 图13是实施例4不同实验组对斑马鱼心脏损伤细胞染色后的比较。

[0083] 图14是实施例4用不同浓度垂体后叶素处理斑马鱼后的心脏损伤诱导率比较。

[0084] 图15是实施例5用不同浓度丹酚酸A处理后斑马鱼后的心输出量增加率比较。

[0085] 图16是实施例5用不同浓度丹酚酸A处理后斑马鱼后的血流速度增加率比较。

[0086] 图17是实施例6用不同浓度链脲佐菌素处理斑马鱼后的心输出量减少率比较。

[0087] 图18是实施例6用不同浓度链脲佐菌素处理斑马鱼后的血流速度减少率比较。

[0088] 图19是实施例6不同实验组对斑马鱼心脏损伤细胞染色后的比较。

[0089] 图20是实施例6用不同浓度链脲佐菌素处理斑马鱼后的心脏损伤诱导率比较。

[0090] 上述图1~图20中,*指 $p < 0.05$,**指 $p < 0.01$,***指 $p < 0.001$ 。

具体实施方式

[0091] 以下是本发明的具体实施例,对本发明的技术方案做进一步的描述,但是本发明的保护范围并不限于这些实施例。凡是不背离本发明构思的改变或等同替代均包括在本发明的保护范围之内。

[0092] 实验仪器:

[0093] 解剖显微镜(SMZ645,Nikon,Japan),6孔板(Nest Biotech),精密电子天平(CP214,奥豪斯),荧光显微镜(AZ100,尼康),心跳血流分析系统(Zebralab3.3(PB2084C),ViewPoint Life Sciences,France),

[0094] 实验试剂:

[0095] 吡啶橙染色液(即A0染料,Alorich,494-38-2),链脲佐菌素(阿拉丁,37071),异丙肾上腺素(TCI,PTAPE-LJ),地高辛(阿拉丁,D102298),垂体后叶素(南京新百药业有限公司,20160517),丹酚酸A(阿拉丁,S101316)。

[0096] 实施例1确定斑马鱼最佳发育阶段

[0097] 1、斑马鱼选取

[0098] 取4~5对野生型AB品系斑马鱼亲本交配,按照Westerfield^[22]的方法孵化胚胎。将处于2dpf、3dpf、4dpf的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼分别移入三个6孔板中,每孔30尾。

[0099] 注:①本发明中的“dpf”=day post fertilization,即指斑马鱼受精后天数,如“3dpf”是指受精后五天的斑马鱼,下同。

[0100] ②本发明中的“微孔板”,包括但不限于前述的6孔板,其他诸如12、24、48、96或384孔板,均可,下同。

[0101] ③本发明中的“斑马鱼尾数”,包括但不限于前述的每孔30尾,可根据微孔板的不同规格,放入不同数量的斑马鱼。

[0102] 2、药物处理

[0103] 设置3个实验组,每组分别为2dpf、3dpf、4dpf的斑马鱼),每个实验组又包括1个药物处理组和1个正常对照组。药物处理组中,对斑马鱼水浴给予50mg/mL异丙肾上腺素处理;正常对照组中,对斑马鱼不进行任何处理;然后,各实验组中均加入相同体积的养殖用水,并将微孔板置于恒温培养箱中,在28℃下培养30min。

[0104] 3、判断并确定斑马鱼的最佳发育阶段

[0105] 当用异丙肾上腺素处理斑马鱼至实验终点后,将各实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,录制斑马鱼血流视频,分析斑马鱼心输出量和血流速度,判断并确定斑马鱼的最佳发育阶段。

[0106] 结果表明:

[0107] 2dpf阶段:正常对照组的斑马鱼心输出量平均值为0.15 μ L/s,血流速度为300mm/s,药物处理组因血流速度太慢、心跳血流分析仪检测灵敏度有偏差的原因,检测不出斑马鱼心输出量和血流速度的数据,因此模型不可行。

[0108] 3dpf阶段:正常对照组的斑马鱼心输出量平均值为0.22 μ L/s,血流速度为700mm/s,药物处理组的斑马鱼心输出量平均值为0.15 μ L/s,血流速度为460mm/s,心输出量减少率为40%,血流速度减少率为28%,与正常对照组相比p均<0.001,证明模型建立成功(见图1和图2)。

[0109] 4dpf阶段:正常对照组的斑马鱼因血流速度太快、心跳血流分析仪检测灵敏度有偏差的原因,检测不出斑马鱼心输出量和血流速度的数据,因此模型不可行。

[0110] 实施例2评价心肌损伤诱导剂异丙肾上腺素的功效

[0111] 根据实施例1确定的斑马鱼最佳发育阶段,建立斑马鱼心肌损伤模型,并评价心肌损伤诱导剂异丙肾上腺素的功效。

[0112] 1、斑马鱼选取

[0113] 将实施例1确定的处于3dpf的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼分别移入6孔板中,每孔30尾。

[0114] 2、诱导剂处理

[0115] 设置6个实验组:1个正常对照组、5个不同给药浓度的诱导剂处理组。正常对照组中,对斑马鱼不进行任何处理;诱导剂处理组中,对斑马鱼分别水溶给予不同浓度的异丙肾上腺素处理,其浓度分别为20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL和60mg/mL。

[0116] 然后,各实验组中均加入相同体积的养殖用水,并将微孔板置于恒温培养箱中,在28℃下培养30min。

[0117] 3、通过心输出量减少率和血流速度减少率来评价心肌损伤的损伤程度

[0118] 当用异丙肾上腺素处理斑马鱼至实验终点后,将实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,录制斑马鱼血流视频,统计、分析斑马鱼心输出量和血流速度,计算诱导剂处理组的心输出量减少率和血流速度减少率;计算公式如下:

$$[0119] \quad \text{心输出量减少率} = \left(1 - \frac{\text{诱导剂处理组心输出量}}{\text{正常对照组心输出量}}\right) \times 100\%;$$

$$[0120] \quad \text{血流速度减少率} = \left(1 - \frac{\text{诱导剂处理组血流速度}}{\text{正常对照组血流速度}}\right) \times 100\%;$$

[0121] 利用GraphPad Prim 5.0软件对上述实验数据进行统计分析。统计学处理结果以±SE表示,多组间比较采用方差分析,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。根据统计学处理结果,与正常对照组比较、评价诱导剂异丙肾上腺素对心肌损伤的损伤程度。

[0122] 结果表明,不同浓度的异丙肾上腺素对心肌损伤的毒性效果与程度不同(见图3和图4):

[0123] 1) 浓度为60mg/mL异丙肾上腺素处理组斑马鱼全部死亡。

[0124] 2) 浓度为20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL和50mg/mL的异丙肾上腺素诱发的心输出量减少率分别为3%、10%、14%和37%,与正常对照组比较,20mg/mL、30mg/mL和40mg/mL组p>0.05,50mg/mL组p<0.001。

[0125] 3) 浓度为20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL和50mg/mL的异丙肾上腺素诱发的血流速度减少率分别为-1%、10%、16%和30%,与正常对照组比较,20mg/mL、30mg/mL和40mg/mL组p>0.05,50mg/mL组p<0.001。

[0126] 4、通过心脏损伤诱导率来评价心肌损伤的损伤程度

[0127] 当用异丙肾上腺素处理斑马鱼至实验终点后,移除微孔板中的液体,各组中均加入浓度为3μg/mL的吖啶橙染色液(即AO染料),置于恒温培养箱中,在28℃下培养30min后,用养鱼用水清洗3次,每次5min,用立体荧光显微镜对斑马鱼心脏位置拍照并保存;统计、分析斑马鱼心脏部位的损伤细胞荧光强度,计算诱导剂处理组的心脏损伤诱导率;计算公式如下:

$$[0128] \quad \text{心肌损伤诱导率} = \left(\frac{\text{诱导剂处理组荧光强度}}{\text{正常对照组荧光强度}} - 1\right) \times 100\%;$$

[0129] 同样的,利用GraphPad Prim 5.0软件对上述实验数据进行统计分析,统计学处理结果为p<0.05表明差异性显著。根据统计学处理结果,与正常对照组比较、评价诱导剂异丙肾上腺素对心肌损伤的损伤程度。

[0130] 结果表明,不同浓度的异丙肾上腺素对心肌损伤的毒性效果与程度不同(见图5和图6):

[0131] 1) 60mg/mL异丙肾上腺素处理组斑马鱼全部死亡。

[0132] 2) 浓度为20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL和50mg/mL的异丙肾上腺素诱发的心脏损伤诱导率分别为12%、22%、27%和47%,与正常对照组比较,20mg/mL、30mg/mL和40mg/mL组 $p > 0.05$,50mg/mL组 $p < 0.001$ 。

[0133] 因此,选用20~50mg/mL的异丙肾上腺素作为建立斑马鱼心肌损伤模型的诱导剂给药浓度,并确定异丙肾上腺素的最佳给药浓度为50mg/mL。

[0134] 实施例3评价心肌损伤治疗剂地高辛的功效

[0135] 根据实施例1确定的斑马鱼最佳发育阶段、及实施例2确定的诱导剂最佳给药浓度,建立斑马鱼心肌损伤模型,并评价心肌损伤治疗剂地高辛的治疗功效。

[0136] 1、斑马鱼选取

[0137] 将实施例1确定的处于3dpf的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼分别移入6孔板中,每孔30尾。

[0138] 2、治疗剂处理

[0139] 设置7个实验组:1个正常对照组、1个模型对照组、5个不同给药浓度的治疗剂处理组。正常对照组中,对斑马鱼不进行任何处理;模型对照组中,对斑马鱼水溶给予按实施例2确定的50mg/mL异丙肾上腺素处理;治疗剂处理组中,对斑马鱼分别水溶给予不同浓度的地高辛处理,其浓度分别为0.01 μ g/mL、0.05 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL和1.0 μ g/mL。

[0140] 然后,各实验组中均加入相同体积的养殖用水,并将微孔板置于恒温培养箱中,在28 $^{\circ}$ C下培养30min。

[0141] 3、通过心输出量增加率和血流速度增加率来评价心肌损伤的治疗效果

[0142] 当地高辛处理斑马鱼至实验终点后,将实验组的斑马鱼置于心跳血流分析系统,统计、分析斑马鱼心输出量和血流速度,计算治疗剂处理组的心输出量增加率和血流速度增加率;计算公式如下:

[0143] 心输出量增加率=
$$\left(\frac{\text{正常对照组心输出量} - \text{治疗剂处理组心输出量}}{\text{正常对照组心输出量} - \text{模型对照组心输出量}} \right) \times 100\%;$$

[0144] 血流速度增加率=
$$\left(\frac{\text{正常对照组血流速度} - \text{治疗剂处理组血流速度}}{\text{正常对照组血流速度} - \text{模型对照组血流速度}} \right) \times 100\%;$$

[0145] 同样的,利用GraphPad Prim 5.0软件对上述实验数据进行统计分析,统计学处理结果为 $p < 0.05$ 表明差异性显著。根据统计学处理结果,与模型对照组比较、评价治疗剂地高辛对心肌损伤的治疗效果。

[0146] 结果表明(见图7和8):

[0147] 1) 浓度为0.01 μ g/mL、0.05 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL和1.0 μ g/mL的地高辛对异丙肾上腺素诱发的心肌损伤斑马鱼的心输出量增加率分别为0%、35%、77%、46%和0%,与模型对照组比较,0.01 μ g/mL和1.0 μ g/mL组 $p > 0.05$,0.05 μ g/mL、0.1 μ g/mL和0.5 μ g/mL组 $p < 0.05$ 且 $p < 0.001$ 且 $p < 0.01$;

[0148] 2) 浓度为0.01 μ g/mL、0.05 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL和1.0 μ g/mL的地高辛对异丙肾上腺素诱发的心肌损伤斑马鱼的血流速度增加率分别为4%、13%、79%、66%和18%,与

模型对照组比较,0.01 μ g/mL、0.05 μ g/mL和1.0 μ g/mL组 $p>0.05$,0.1 μ g/mL和0.5 μ g/mL组 $p<0.001$ 且 $p<0.01$ 。

[0149] 4、通过心脏损伤保护率来评价心肌损伤的治疗效果

[0150] 当地高辛处理斑马鱼至实验终点后,移除微孔板中的液体,各组中均加入浓度为3 μ g/mL的吖啶橙染色液(即A0染料),置于恒温培养箱中,在28 $^{\circ}$ C下培养30min后,用养鱼用水清洗3次,每次5min,用立体荧光显微镜对斑马鱼心脏位置拍照并保存;统计、分析斑马鱼心脏部位的损伤细胞荧光强度,计算治疗剂处理组的心脏损伤保护率;计算公式如下:

[0151] 心肌损伤保护率=
$$\left(\frac{\text{治疗剂处理组荧光强度} - \text{正常对照组荧光强度}}{\text{模型对照组荧光强度} - \text{正常对照组荧光强度}} \right) \times 100\%。$$

[0152] 同样的,利用GraphPad Prim 5.0软件对上述实验数据进行统计分析,统计学处理结果为 $p<0.05$ 表明差异性显著。根据统计学处理结果,与模型对照组比较、评价治疗剂地高辛对心肌损伤的治疗效果。

[0153] 结果表明(见图9和10):

[0154] 浓度为0.01 μ g/mL、0.05 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL和1.0 μ g/mL的地高辛对异丙肾上腺素诱发的心肌损伤斑马鱼的心脏损伤保护作用分别为9%、17%、22%、13%和10%,与模型对照组比较,0.01 μ g/mL、0.5 μ g/mL和1.0 μ g/mL组 $p>0.05$,0.05 μ g/mL和0.1 μ g/mL组 $p<0.05$ 且 $p<0.01$ 。

[0155] 实施例4评价心肌损伤诱导剂垂体后叶素的功效

[0156] 根据实施例1确定的斑马鱼最佳发育阶段,建立斑马鱼心肌损伤模型,并评价心肌损伤诱导剂垂体后叶素的功效。

[0157] 1、斑马鱼选取

[0158] 选取处于3dpf的斑马鱼,其余步骤与实施例2相同。

[0159] 2、诱导剂处理

[0160] 在诱导剂处理组中,对斑马鱼分别水溶给予不同浓度的垂体后叶素处理,其浓度分别为40C、50C、60C、70C和80C,其余步骤与实施例2相同。

[0161] 3、通过心输出量减少率和血流速度减少率来评价心肌损伤的损伤程度

[0162] 当用垂体后叶素处理斑马鱼至实验终点后,其余步骤与实施例2相同,统计、分析斑马鱼心输出量和血流速度,计算诱导剂处理组的心输出量减少率和血流速度减少率;对计算结果进行统计学处理,并与正常对照组比较、评价诱导剂垂体后叶素对心肌损伤的损伤程度。

[0163] 结果表明(见图11和图12):

[0164] 1) 浓度为70C和80C垂体后叶素处理组斑马鱼全部死亡。

[0165] 2) 浓度为40C、50C和60C的垂体后叶素诱发的心输出量减少率分别为2%、17%和34%,与正常对照组比较,40C和50C组 $p>0.05$,60C组 $p<0.001$ 。

[0166] 3) 浓度为40C、50C和60C的垂体后叶素诱发的血流速度减少率分别为1%、10%和31%,与正常对照组比较,40C和50C组 $p>0.05$,60C组 $p<0.001$ 。

[0167] 4、通过心脏损伤诱导率来评价心肌损伤的损伤程度

[0168] 当用垂体后叶素处理斑马鱼至实验终点后,其余步骤与实施例2相同,统计、分析斑马鱼心脏部位的损伤细胞荧光强度,计算诱导剂处理组的心脏损伤诱导率;对计算结果

进行统计学处理,并与正常对照组比较、评价诱导剂垂体后叶素对心肌损伤的损伤程度。

[0169] 结果表明(见图13和图14):

[0170] 1) 浓度为70C和80C垂体后叶素处理组斑马鱼全部死亡。

[0171] 2) 浓度为40C、50C和60C的垂体后叶素诱发的心脏损伤诱导率分别为2%、18%和32%,与正常对照组比较,40C和50C组 $p>0.05$,60C组 $p<0.001$ 。

[0172] 因此,选用40~60C的垂体后叶素作为建立斑马鱼心肌损伤模型的诱导剂给药浓度,并确定垂体后叶素的最佳给药浓度为60C。

[0173] 实施例5评价心肌损伤治疗剂丹酚酸A的功效

[0174] 根据实施例1确定的斑马鱼最佳发育阶段、及实施例4确定的诱导剂最佳给药浓度,建立斑马鱼心肌损伤模型,并评价心肌损伤治疗剂丹酚酸A的治疗功效。

[0175] 1、斑马鱼选取

[0176] 选取处于3dpf的斑马鱼,其余步骤与实施例3相同。

[0177] 2、治疗剂处理

[0178] 模型对照组中,对斑马鱼水溶给予按实施例4确定的60C的垂体后叶素处理;治疗剂处理组中,对斑马鱼分别水溶给予不同浓度的丹酚酸A处理,其浓度分别为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其余步骤与实施例3相同。

[0179] 3、通过心输出量增加率和血流速度增加率来评价心肌损伤的治疗效果

[0180] 当丹酚酸A处理斑马鱼至实验终点后,其余步骤与实施例3相同,统计、分析斑马鱼心输出量和血流速度,计算治疗剂处理组的心输出量增加率和血流速度增加率;对计算结果进行统计学处理,与模型对照组比较、评价治疗剂丹酚酸A对心肌损伤的治疗效果。

[0181] 结果表明(见图15和16):

[0182] 1) 浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丹酚酸A对垂体后叶素诱发的心肌损伤斑马鱼的心输出量增加率分别为9%、33%、66%、43%和0%,与模型对照组比较,2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 $p>0.05$,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 $p<0.05$ 且 $p<0.001$ 且 $p<0.01$ 。

[0183] 2) 浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丹酚酸A对垂体后叶素诱发的心肌损伤斑马鱼的血流速度增加率分别为4%、13%、79%、66%和18%,与模型对照组比较,2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 $p>0.05$,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 $p<0.001$ 且 $p<0.01$ 。

[0184] 实施例6评价心肌损伤诱导剂链脲佐菌素的功效

[0185] 根据实施例1确定的斑马鱼最佳发育阶段,建立斑马鱼心肌损伤模型,并评价心肌损伤诱导剂链脲佐菌素的功效。

[0186] 1、斑马鱼选取

[0187] 选取处于3dpf的斑马鱼,其余步骤与实施例2相同。

[0188] 2、诱导剂处理

[0189] 在诱导剂处理组中,对斑马鱼分别水溶给予不同浓度的链脲佐菌素处理,其浓度分别为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其余步骤与实施例2相同。

[0190] 3、通过心输出量减少率和血流速度减少率来评价心肌损伤的损伤程度

[0191] 当用链脲佐菌素处理斑马鱼至实验终点后,其余步骤与实施例2相同,统计、分析斑马鱼心输出量和血流速度,计算诱导剂处理组的心输出量减少率和血流速度减少率;对

计算结果进行统计学处理,并与正常对照组比较、评价诱导剂链脲佐菌素对心肌损伤的损伤程度。

[0192] 结果表明(见图17和图18):

[0193] 1) 浓度为5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL和80 μ g/mL的链脲佐菌素诱发的心输出量减少率分别为8%、14%、18%、21%和35%,与正常对照组比较,5 μ g/mL和10 μ g/mL组 $p > 0.05$,20 μ g/mL、40 μ g/mL和80 μ g/mL组 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 。

[0194] 2) 浓度为5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL和80 μ g/mL的链脲佐菌素诱发的血流速度减少率分别为-1%、10%、16%、23%和30%,与正常对照组比较,5 μ g/mL、10 μ g/mL和20 μ g/mL组 $p > 0.05$,40 μ g/mL和80 μ g/mL组 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 。

[0195] 4、通过心脏损伤诱导率来评价心肌损伤的损伤程度

[0196] 当用链脲佐菌素处理斑马鱼至实验终点后,其余步骤与实施例2相同,统计、分析斑马鱼心脏部位的损伤细胞荧光强度,计算诱导剂处理组的心脏损伤诱导率;对计算结果进行统计学处理,并与正常对照组比较、评价诱导剂链脲佐菌素对心肌损伤的损伤程度。

[0197] 结果表明(见图19和图20):

[0198] 浓度为5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL和80 μ g/mL的链脲佐菌素诱发的心脏损伤细胞不断增多,心脏损伤细胞荧光强度不断增强,心脏损伤诱导率分别为4%、12%、16%、27%和38%,与正常对照组比较,5 μ g/mL、10 μ g/mL和20 μ g/mL组 $p > 0.05$,40 μ g/mL和80 μ g/mL组 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 。

[0199] 参考文献:

[0200] [1]赵曲波.抗心肌损伤药物的进展研究[J].中国医药指南,2015(31):28-28.

[0201] [2]王恒,沈祥春,余跃生,等.基于创新药物研究的心肌损伤/心肌梗死生物模型[J].中国药房,2012(37):3528-3530.

[0202] [3]白玉花,辛颖.心肌损伤再灌注损伤模型建立方法的研究进展[J].内蒙古民族大学学报:自然科学版,2015(3):251-256.

[0203] [4]卢志强,张艳军,崔广智,等.心肌损伤模型的制作方法研究进展[J].中国药理学通报,2012,28(8):1053-1057.

[0204] [5]Zon LI,Peterson RT.In vivo drug discovery in the zebrafish[J].Drug Discovery.2005,4:35-44.

[0205] [6]McGrath P,Li CQ.Zebrafish:a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J].Drug Discovery Today.2008,13:394-401.

[0206] [7]Barros T P,Alderton WK,Reynolds HM,et al.Zebrafish:An emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery[J].British Journal of Pharmacology.2008,154:1400-1413.

[0207] [8]Chico TJ,Ingham PW,Crossman DC.Modeling cardiovascular disease in the zebrafish[J].Trends Cardiovasc Med,2008,18:150-155.

[0208] [9]Renshaw SA,Loynes CA,Trushell DM,et al.A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation[J].Blood,2006,108:3976-3978.

[0209] [10]Christoffels VM,Hoogaars WMH,Tessan A,et al.T-box transcription

- factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chamber[J]. *Dev Dyn*, 2004, 229(4): 763-770.
- [0210] [11] Milan DJ, Macrae CA. Zebrafish genetic models for arrhythmia[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008, 98(2-3): 301-308. 866-875.
- [0211] [12] Meder B, Scholz EP, Hassel D, et al. Reconstitution of defective protein trafficking rescues Long-QT syndrome in zebrafish[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(2): 218-224.
- [0212] [13] Hassel D, Scholz EP, Trano N, et al. Deficient zebrafish *eter-à-go*-related gene channel gating causes short-QT syndrome in zebrafish *reggae* mutants[J]. *Circulation*, 2008, 117(7): 866-875.
- [0213] [14] Burns CG, Millan DJ, Grande EJ, et al. High-throughput assay for small molecules that modulate zebrafish embryonic heart rate[J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1: 263-264.
- [0214] [15] Schonberger J, Levy H, Grunig E, et al. Dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss: a heritable syndrome that maps to 6q23-24[J]. *Circulation*, 2000, 101: 1812-1818.
- [0215] [16] Schonberger J, Wang L, Shin JT, et al. Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss[J]. *Nat Genet*, 2005, 37: 418-422.
- [0216] [17] Gerull B, Gramlich M, Atherton J, et al. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy[J]. *Nat Genet*, 2002, 30: 201-204.
- [0217] [18] Xu X, Meiler SE, Zhong TP, et al. Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin[J]. *Nat Genet*, 2002, 30: 205-209.
- [0218] [19] Knoll R, Postel R, Wang J, et al. Laminin α 4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells[J].
- [0219] [20] Song Y, Cone RD. Creation of a genetic model of obesity in a teleost[J]. *Faseb J*, 2007, 21: 2042-2049.
- [0220] [21] Chico TJ, Ingham PW, Crossman DC. Modeling cardiovascular disease in the zebrafish[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2008, 18: 150-155.
- [0221] [22] Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish*[M]. Eugene, Oregon: The University of Oregon Press, 1993.

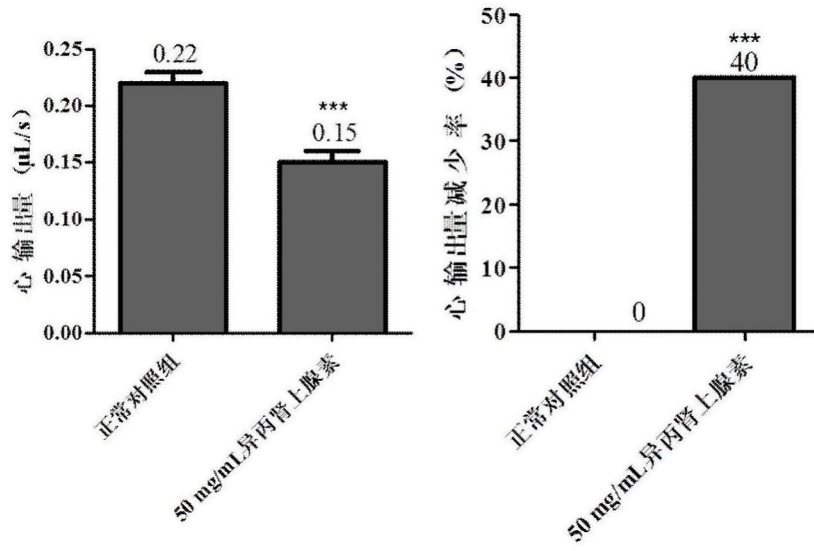


图1

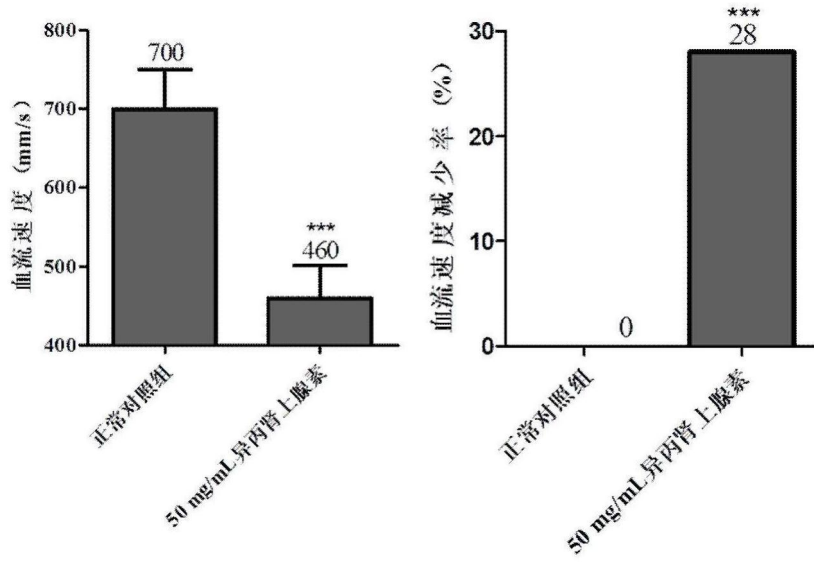


图2

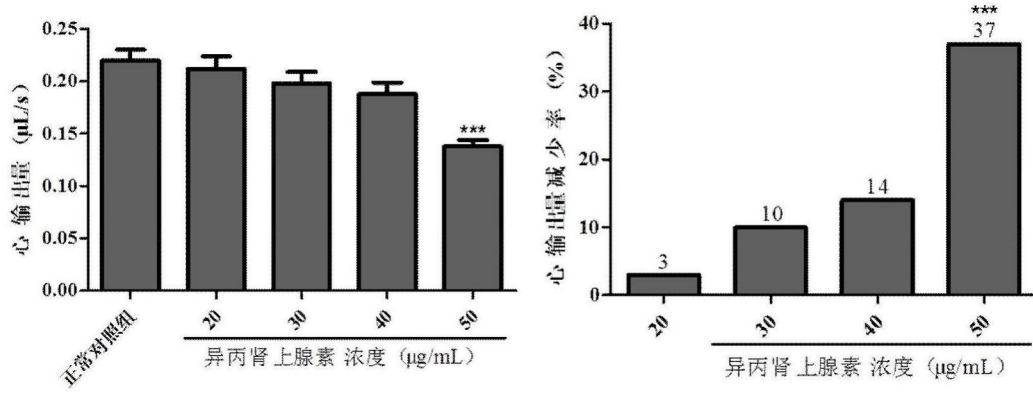


图3

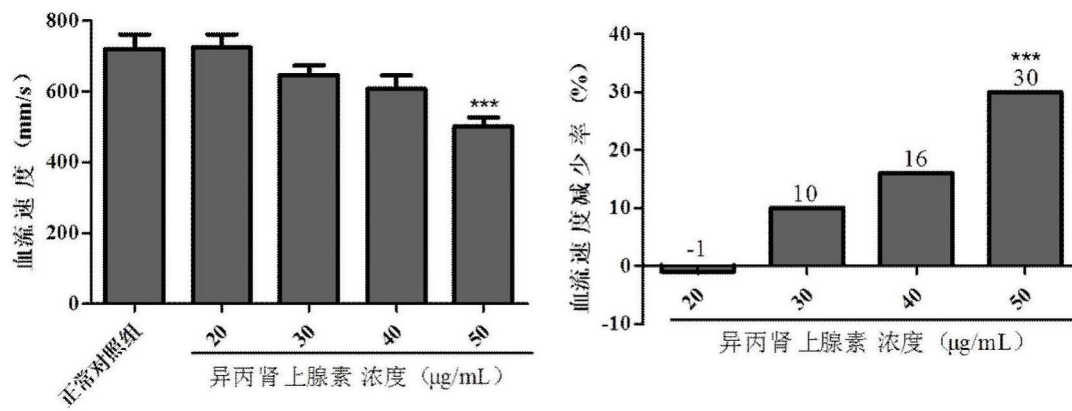


图4

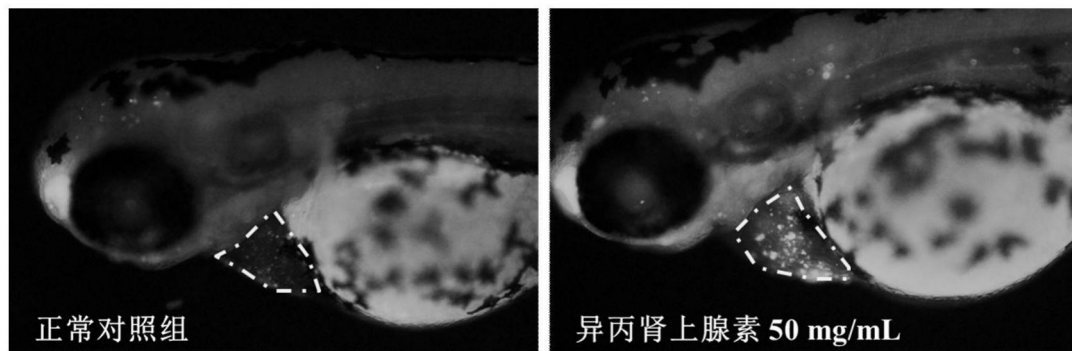


图5

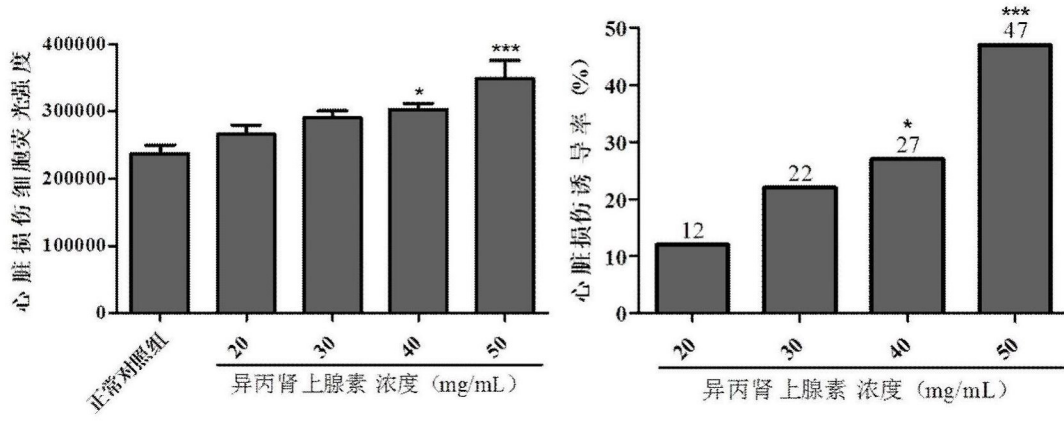


图6

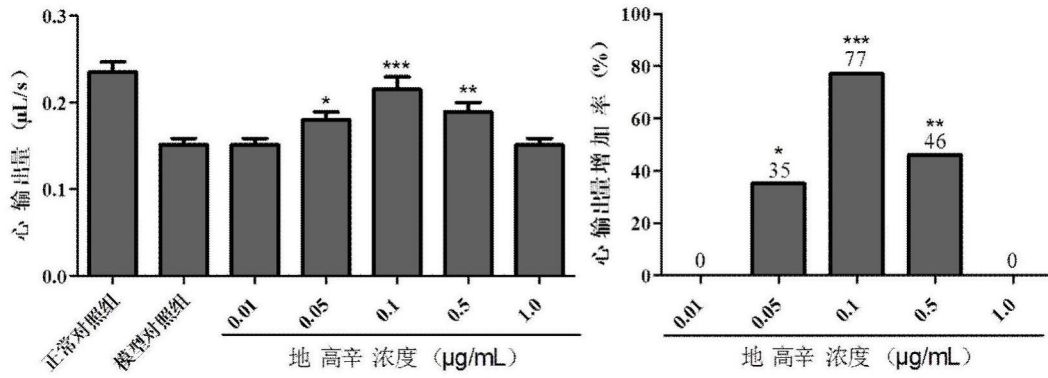


图7

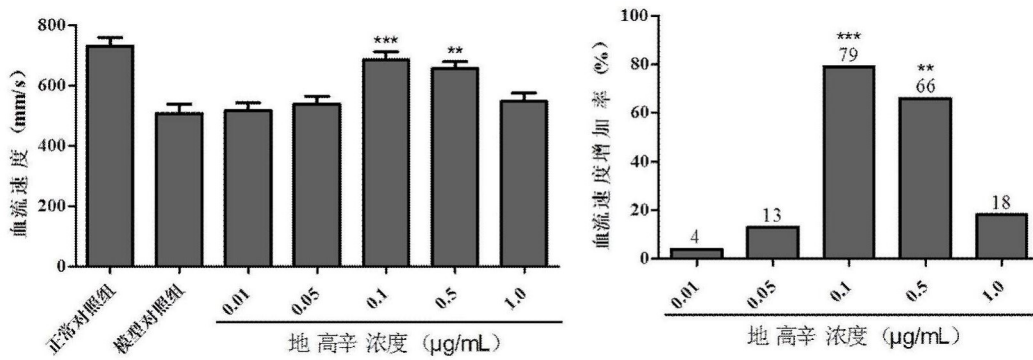


图8

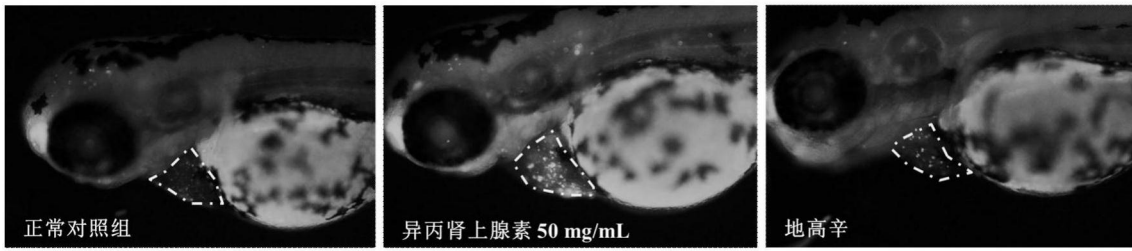


图9

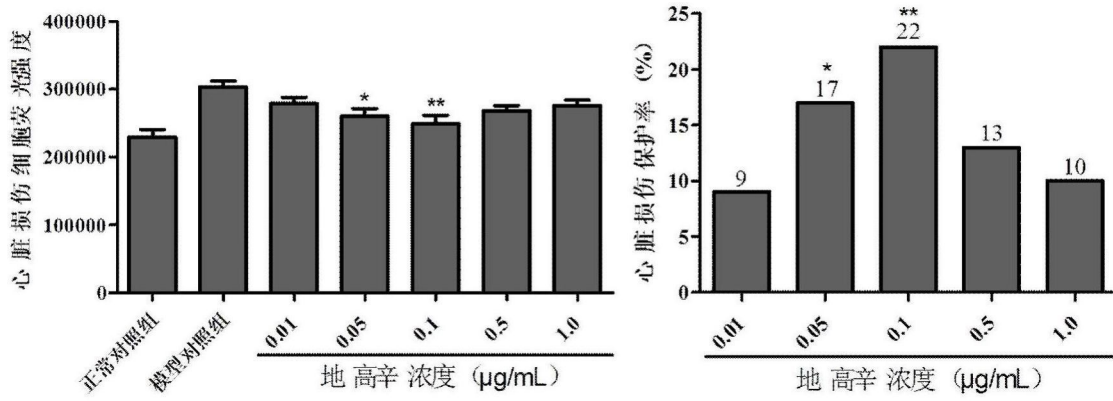


图10

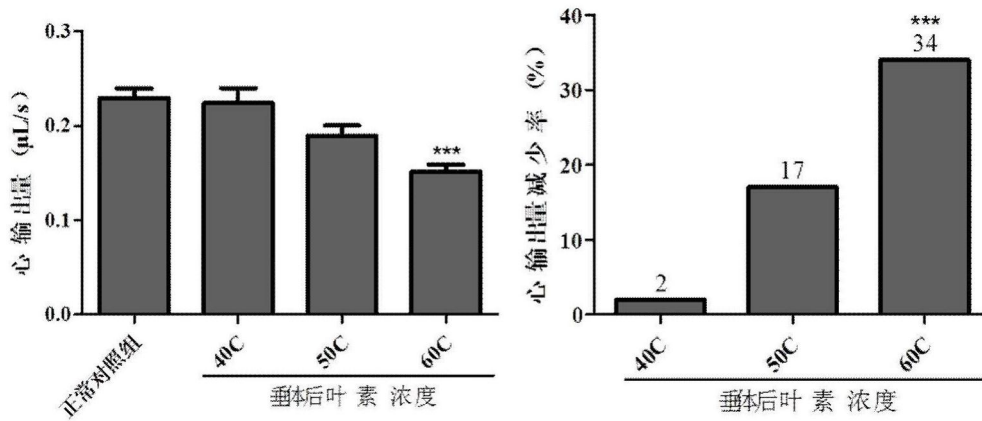


图11

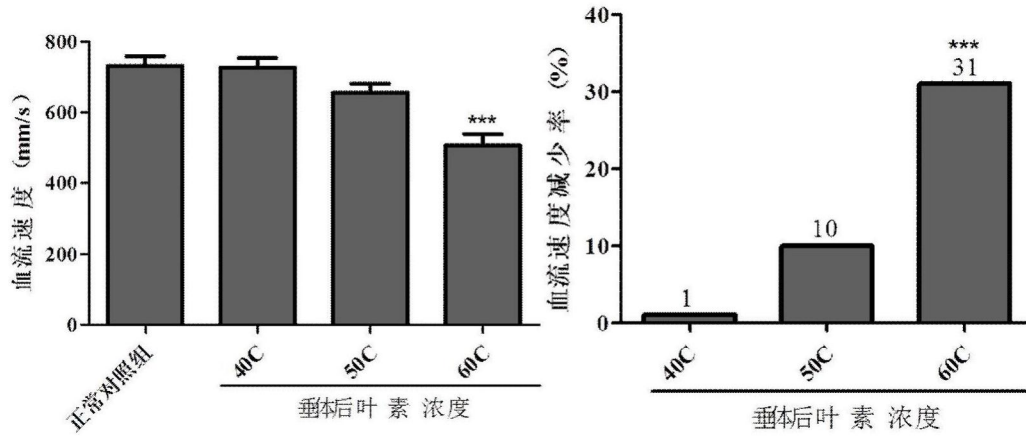


图12

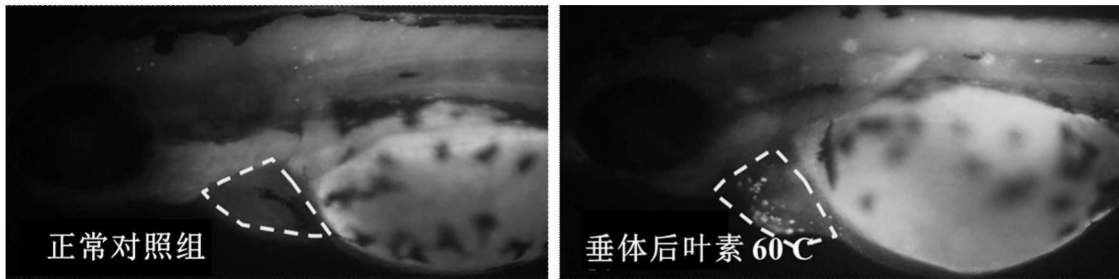


图13

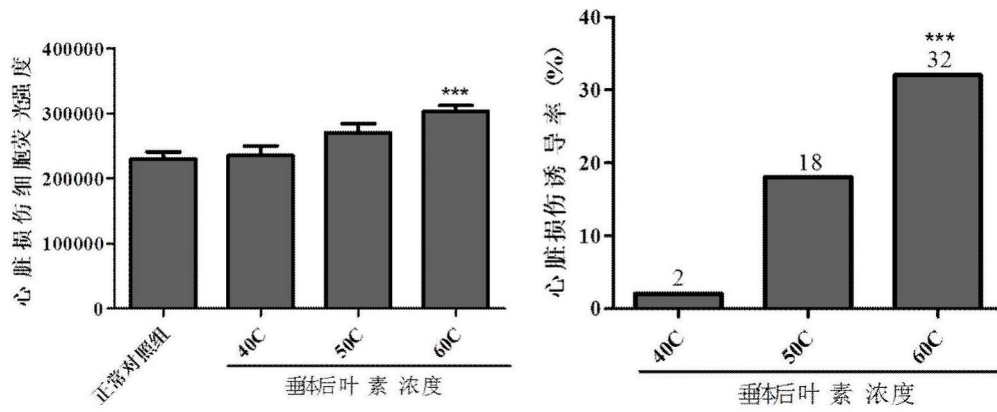


图14

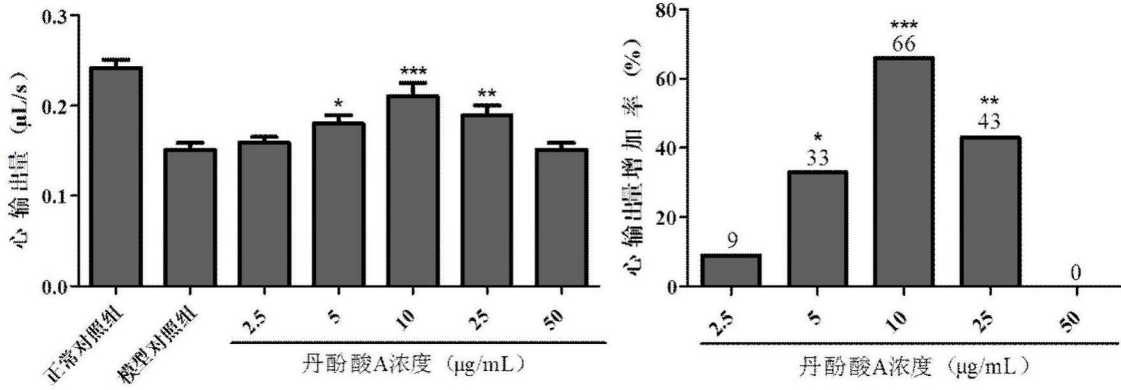


图15

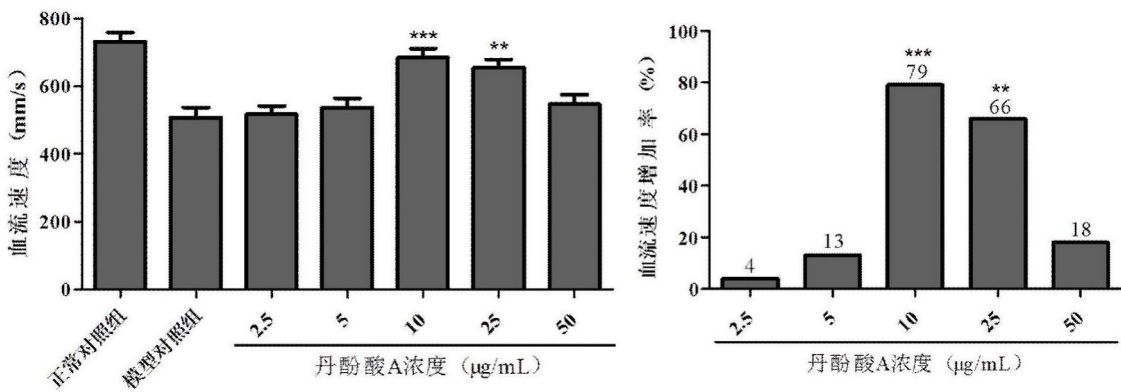


图16

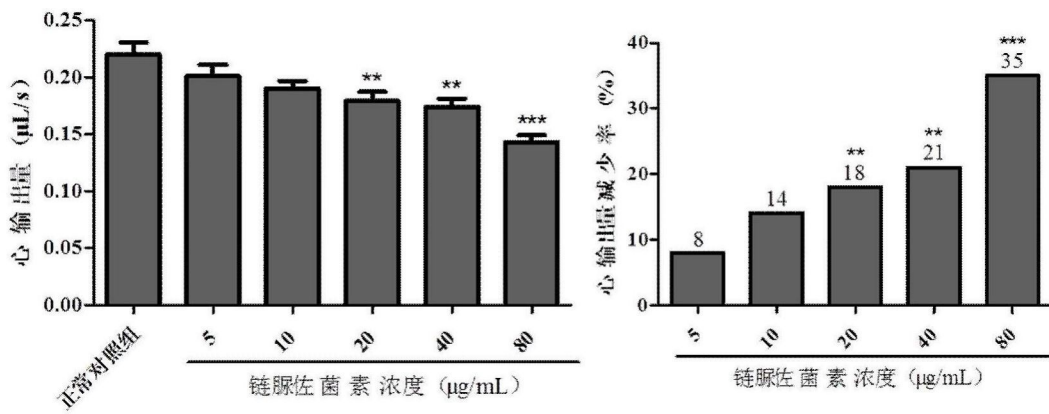


图17

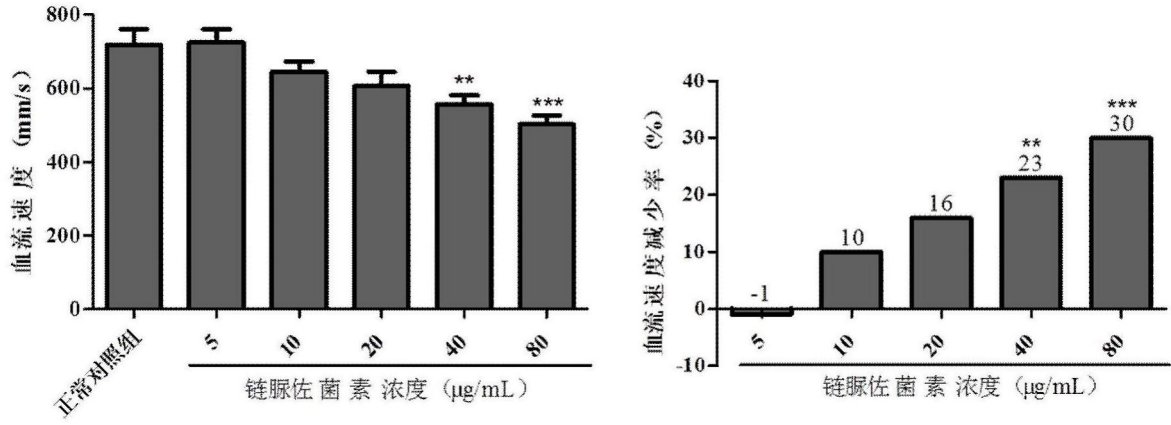


图18

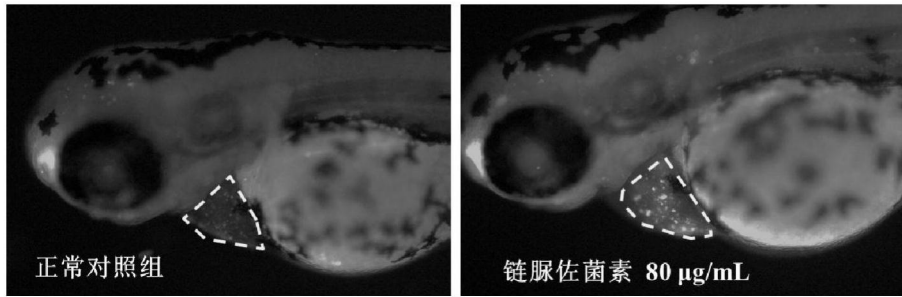


图19

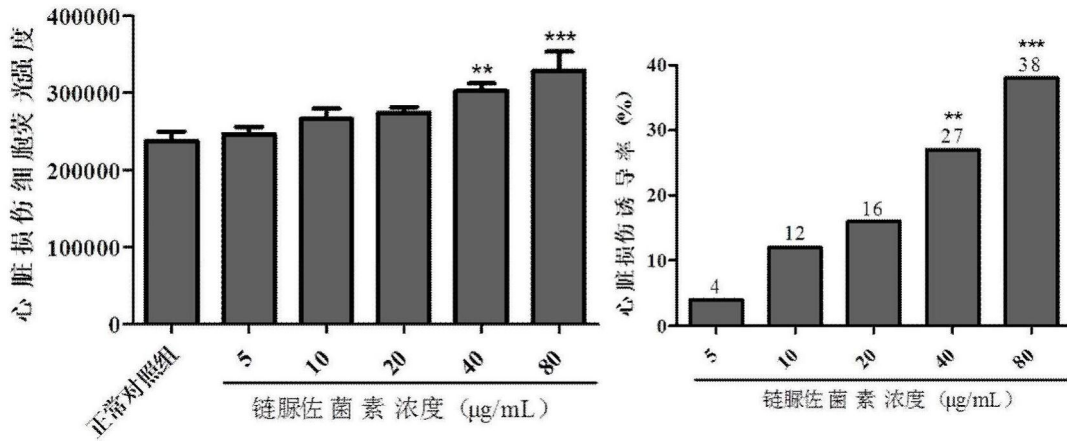


图20