



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102288750 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201110231726. 2

(22) 申请日 2011. 08. 12

(73) 专利权人 杭州环特生物科技有限公司
地址 311231 浙江省杭州市萧山区钱江农场
(浙江省农业高科技示范园区)

(72) 发明人 朱晓宇 李春启 郭胜亚

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101448952 A, 2009. 06. 03,

CN 102023199 A, 2011. 04. 20,

CN 1866025 A, 2006. 11. 22,

US 2006193776 A1, 2006. 08. 31,

TP Barros et al.. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery.. 《British Journal of Pharmacology》. 2008, 第 154 卷

J D Best 和 Wendy K Alderton. Zebrafish:

an in vivo model for the study of neurological diseases.. 《Neuropsychiatric Disease and Treatment》. 2008, 第 4 卷 (第 3 期),

Demian Park et al.. Zebrafish: a predictive model for assessing modulators of P-glycoprotein efflux.. 《Multidrug Resistance and ABC Transporters Conference》. 2008,

审查员 毕秀华

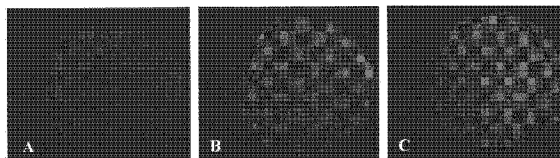
权利要求书2页 说明书16页 附图7页

(54) 发明名称

斑马鱼 P- 糖蛋白抑制剂筛选模型的建立方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种活体斑马鱼 P- 糖蛋白抑制剂筛选模型的建立以及评价或筛选 P- 糖蛋白抑制剂的方法, 主要包括: 斑马鱼选取, 化合物处理, 图像分析和 / 或微孔板分析几个步骤。本发明的方法具有经济、简便、快速、高效、化合物用量少等优点。本发明能显著提高 P- 糖蛋白抑制剂评价或筛选的速度, 对加快大规模 P- 糖蛋白抑制剂的筛选和评价具有重要意义。



1. 一种活体斑马鱼 P-糖蛋白抑制剂筛选模型的建立方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 斑马鱼选取

挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中;

(2) 化合物处理

移除微孔板中的培养液,设置多个实验组,每个实验组包括 1 个罗丹明 B 处理组、1 个 Pgp 抑制阳性对照组和 1 个空白对照组,每个实验组根据微孔板的规格分别加入相应的溶液,然后恒温培养;

(3) 图像分析和 / 或微孔板分析;

所述的步骤 (1) 中斑马鱼为受精后 4 小时 (4hpf) 的斑马鱼,所述步骤 (2) 化合物处理中斑马鱼培养 24 小时。

2. 一种评价 P-糖蛋白抑制剂的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 斑马鱼选取

挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中;

(2) 化合物处理

移除微孔板中的培养液,设置多个实验组:若干个化合物组合处理组、模型组、Pgp 抑制阳性对照组和空白对照组,每个实验组根据微孔板的规格分别加入相应的溶液,然后恒温培养;

(3) 图像分析和 / 或微孔板分析;

所述的步骤 (1) 中斑马鱼为受精后 4 小时 (4hpf) 的斑马鱼,所述步骤 (2) 化合物处理中斑马鱼培养 24 小时。

3. 一种筛选 P-糖蛋白抑制剂的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 斑马鱼选取

挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中;

(2) 化合物处理

移除微孔板中的培养液,设置多个实验组:若干个化合物组合处理组、模型组、Pgp 抑制阳性对照组和空白对照组,每个实验组根据微孔板的规格分别加入相应的溶液,然后恒温培养;

(3) 图像分析和 / 或微孔板分析;

所述的步骤 (1) 中斑马鱼为受精后 4 小时 (4hpf) 的斑马鱼,所述步骤 (2) 化合物处理中斑马鱼培养 24 小时。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述的罗丹明 B 处理组中加入的溶液为罗丹明 B 溶液,所述的 Pgp 抑制阳性对照组中加入的溶液为与罗丹明 B 处理组等体积的罗丹明 B 与环孢菌素 A 的混合溶液,混合溶液中罗丹明 B 的浓度与罗丹明 B 处理组中相同,环孢菌素 A 的浓度为 10mM。

5. 根据权利要求 2-3 任一项所述的方法,其特征在于:所述化合物组合处理组中加入的溶液为罗丹明 B 和待测化合物的混合溶液,模型组中加入的溶液为罗丹明 B 溶液,Pgp 抑制阳性对照组中加入的溶液为罗丹明 B 和环孢菌素 A 的混合溶液,其中化合物组合处理组、模型组、Pgp 抑制阳性对照组中罗丹明 B 的浓度相同。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述步骤(3)图像分析步骤如下:处理一段时间后,每组随机选取若干尾斑马鱼,利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存,一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度可定性评价环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应,另一方面利用图像处理软件对图像进行定量分析,计算斑马鱼荧光强度,环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

$$\text{Pgp 抑制}(\%) = \left(\frac{\text{Pgp抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明B处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%;$$

所述步骤(3)微孔板分析步骤如下:处理一段时间后,将斑马鱼转入 96 孔板,每孔 1 尾,然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度,环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

$$\text{Pgp 抑制}(\%) = \left(\frac{\text{Pgp抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明B处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%。$$

7. 根据权利要求 2-3 任一项所述的方法,其特征在于:所述步骤(3)图像分析步骤如下:处理一段时间后,每组随机选取若干尾斑马鱼,利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存,一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度可定性评价或筛选 Pgp 抑制剂,另一方面利用图像处理软件对图像进行定量分析,计算斑马鱼荧光强度,待测化合物对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

$$\text{PgP 抑制}(\%) = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%;$$
 所述

步骤(3)微孔板分析步骤如下:处理一段时间后,将斑马鱼转入 96 孔板,每孔 1 尾,然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度,待测化合物对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

$$\text{Pgp 抑制}(\%) = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%。$$

8. 根据权利要求 1-3 任一项所述的方法,其特征在于:所述的步骤(2)化合物处理中斑马鱼于 28°C 下恒温培养,所述的空白对照组中使用的溶液为斑马鱼养殖用水。

9. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于:所述化合物组合处理组、模型组、Pgp 抑制阳性对照组中罗丹明 B 浓度为 50mM, Pgp 抑制阳性对照组中环孢菌素 A 浓度为 10mM, 化合物组合处理组一共设置 5 个, 5 个化合物组合处理组中待测化合物浓度分别为 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M。

斑马鱼 P-糖蛋白抑制剂筛选模型的建立方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物筛选（评价）领域，具体涉及一种简单、经济、高通量的斑马鱼 P-糖蛋白抑制剂筛选模型的建立方法以及利用该动物模型筛选与评价 P-糖蛋白抑制剂的方法。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是严重危害人类健康的常见疾病。据世界卫生组织 (WHO) 报道，目前全世界每年新发现癌症患者约 1000 万，死于癌症的人数 600 ~ 700 万，而在中国近 20 年来的癌症死亡率上升了近 30%^[1]。

[0003] 化疗是治疗癌症的重要手段，但化疗中常见且难以解决的问题是肿瘤多药耐药性 (Multidrug resistance, MDR) 的产生，即肿瘤细胞在化疗药物或其他因素的作用下，对多种化学结构相似或不同的抗癌药物产生耐药性^[2]。MDR 形成的最主要的分子机制是肿瘤细胞多药耐药基因 MDR1 高表达，MDR1 基因是 ABC 基因家族的一个亚族，其编码产物为 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, Pgp)。Pgp 为跨膜糖蛋白，分子量为 170 ~ 180KD，Pgp 能够与进入细胞浆的抗肿瘤药物结合，借助 ATP 水解释放出的能量，直接或间接将药物泵出细胞；或借 Pgp 本身的通道作用，将药物从细胞内泵出细胞外，导致肿瘤细胞内药物浓度降低、细胞毒性或靶向治疗作用减弱或丧失，进而使肿瘤细胞产生耐药性^[3]。因此，使用 Pgp 抑制剂是逆转 MDR 的一个重要手段。近年来，评价与筛选 Pgp 抑制剂已成为抗肿瘤药物研究的前沿热点之一。

[0004] 建立 Pgp 抑制剂筛选模型对于评价与筛选 Pgp 抑制剂至关重要。目前 Pgp 抑制剂筛选模型主要有两大类，一类是体外细胞模型，另一类是体内耐药动物模型。体外细胞模型研究是利用肿瘤耐药细胞株来揭示肿瘤细胞的耐药机制、研究肿瘤细胞的耐药性逆转、开发及评价新的抗癌方法等^[4-8]。该模型研究方法虽然简单、所需费用较低，但体外细胞缺少药物在生物整体内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，对 Pgp 抑制剂的实际疗效预测性差。体内耐药动物模型的建立主要通过原位移植^[9]、皮下移植^[10]和腹腔移植^[11]三种途径。通常认为原位移植优于皮下移植，主要是由于能够模拟体内的器官微环境，虽能更好的反映肿瘤的形态特点和生物学行为，但由于操作复杂，创伤性大，每次接种数量有限，肿瘤深在不利于观察和治疗的部位，应用受到一定程度的限制；皮下移植法尽管操作简单，易于观察，但肿瘤生长局限，几乎无转移；腹腔移植法由于位置深，难以观察，潜伏期长且肿瘤生长慢。因此建立一种既能很好地模拟药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程，又能快速、准确的评价与筛选地 Pgp 抑制剂的动物模型具有重要意义。

[0005] 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% 以上，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^[12]。更

重要的是,斑马鱼模型具有与生俱来的优点^[12-13]: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,在受精后 24 小时 (24hpf),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 1-4mm,能够在—个标准的 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。

[0006] 系统发育学研究证实斑马鱼具有 52 个 ABC 转运基因,包括人类所有的 48 个 ABC 转运基因^[14-15],斑马鱼 ABC 基因与人类 ABC 基因的同源性高达 77%,两者具有一一对应的关系^[16]。目前 ABC 基因(特别是 ABCC1/MRP1,即 MDR1 基因)已被广泛研究,斑马鱼 ABCC1/MRP1 基因位于第 3 条染色体上,并且含有一个长度为 4,557bp 的开放阅读框,该基因编码的多肽由 1,518 个氨基酸组成,与人类 ABCC1 基因的同源性达到 70%。斑马鱼在 1hpf 时,ABCC1 基因呈高度表达;1hpf 至 12hpf 发育阶段,ABCC1 基因广泛分布于整个胚胎;24hpf 至 72hpf 发育阶段,主要分布于眼睛和脑部^[17]。

[0007] 目前国内外还未见有利用整体斑马鱼模型筛选 Pgp 抑制剂的报道,有少数研究也只是探讨化合物(毒物)对斑马鱼 Pgp 的毒性机理或针对 MDR 基因进行遗传学分析^[17-19]。国际公开号为 WO 2005/080974(01.09.2005 Gazette 2005/35)的专利研究发现,通过对斑马鱼血脑屏障中 Pgp 机制的抑制作用可筛选中枢神经系统治疗药。与该专利不同的是,本发明利用整体斑马鱼模型评价与筛选 Pgp 抑制剂。环孢菌素 A 是一种从真菌属中提取的天然药物,它能竞争性地与 Pgp 结合,阻断 Pgp 泵出药物功能从而逆转 MDR^[20]。脂质体荧光染料罗丹明 B 已被证实为一种 Pgp 特异性底物^[21]。本发明选用罗丹明 B 为 Pgp 的底物,环孢菌素 A 为建立 Pgp 模型的阳性对照药物。由于多药耐药性机制的存在,正常斑马鱼将罗丹明 B 泵出体外,从而存留在体内的荧光染料很少,荧光强度很弱;而用环孢菌素 A 处理后,Pgp 的活性受到抑制,Pgp 底物罗丹明 B 不能被排出,从而存留在斑马鱼体内的罗丹明 B 增多,荧光强度增强。推广开来,若某种化合物能够增加罗丹明 B 在斑马鱼体内的存留,则该种化合物可作为潜在的 Pgp 抑制剂(见图 1)。经广泛的实验条件优化,本发明选用 4hpf 阶段的斑马鱼作为实验材料,药物处理时间长度为 24h(即斑马鱼发育至 28hpf 时)。

发明内容

[0008] 为了克服上述现有技术存在的缺陷和不足,发明人经过研究,旨在提供一种简单、经济、高通量的斑马鱼 P-糖蛋白抑制剂筛选模型的建立方法以及利用该动物模型筛选与评价 P-糖蛋白抑制剂的方法。

[0009] 本发明是通过以下技术方案来实现的:

[0010] 一种活体斑马鱼 P-糖蛋白抑制剂筛选模型的建立方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0011] (1) 斑马鱼选取

[0012] 挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中;

[0013] (2) 化合物处理

[0014] 移除微孔板中的培养液,设置多个实验组,每个实验组包括1个罗丹明B处理组、1个Pgp抑制阳性对照组和1个空白对照组,每个实验组根据微孔板的规格分别加入相应的溶液,然后恒温培养;

[0015] (3) 图像分析和 / 或微孔板分析。

[0016] 优选的,所述的罗丹明B处理组中加入的溶液为罗丹明B溶液,所述的Pgp抑制阳性对照组中加入的溶液为与罗丹明B处理组等体积的罗丹明B与环孢菌素A的混合溶液,混合溶液中罗丹明B的浓度与罗丹明B处理组中相同,环孢菌素A的浓度为10mM。

[0017] 优选的,所述的步骤(1)中斑马鱼为4hpf的斑马鱼。

[0018] 优选的,所述步骤(2)化合物处理中斑马鱼培养24小时。

[0019] 优选的,所述的步骤(2)化合物处理中斑马鱼于28℃下恒温培养。

[0020] 优选的,空白对照组中使用的溶液为斑马鱼养殖用水。

[0021] 优选的,所述步骤(3)图像分析步骤如下:处理一段时间后,每组随机选取若干尾斑马鱼,利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存,一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度可定性评价环孢菌素A对Pgp的抑制效应,另一方面利用图像处理软件对图像进行定量分析,计算斑马鱼荧光强度,环孢菌素A对Pgp的抑制效应计算公式如下:

[0022]

$$\text{Pgp抑制率(\%)} = \left(\frac{\text{Pgp抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明B处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%.$$

[0023] 优选的,所述步骤(3)微孔板分析步骤如下:处理一段时间后,将斑马鱼转入96孔板,每孔1尾,然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度,环孢菌素A对Pgp的抑制效应计算公式如下:

[0024]

$$\text{Pgp抑制率(\%)} = \left(\frac{\text{Pgp抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明B处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%.$$

[0025] 一种评价或筛选P-糖蛋白抑制剂的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0026] (1) 斑马鱼选取

[0027] 挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中;

[0028] (2) 化合物处理

[0029] 移除微孔板中的培养液,设置多个实验组:若干个化合物组合处理组、模型组、Pgp抑制阳性对照组和空白对照组,每个实验组根据微孔板的规格分别加入相应的溶液,然后恒温培养;

[0030] (3) 图像分析和 / 或微孔板分析。

[0031] 优选的,所述的步骤(1)中斑马鱼为4hpf的斑马鱼。

[0032] 优选的,所述步骤(2)化合物处理中斑马鱼培养24小时。

[0033] 优选的,所述的步骤(2)化合物处理中斑马鱼于28℃下恒温培养。

[0034] 优选的,空白对照组中使用的溶液为斑马鱼养殖用水。

[0035] 优选的,所述化合物组合处理组中加入的溶液为罗丹明B和待测化合物的混合溶液,模型组中加入的溶液为罗丹明B溶液,Pgp抑制阳性对照组中加入的溶液为罗丹明B和环孢菌素A的混合溶液,其中化合物组合处理组、模型组、Pgp抑制阳性对照组中罗丹明B的

浓度相同。

[0036] 优选的,所述化合物组合处理组、模型组、Pgp 抑制阳性对照组中罗丹明 B 浓度为 50mM,Pgp 抑制阳性对照组中环孢菌素 A 浓度为 10mM,化合物组合处理组一共设置 5 个,5 个化合物组合处理组中待测化合物浓度分别为 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M。

[0037] 优选的,所述步骤 (3) 图像分析步骤如下:处理一段时间后,每组随机选取若干尾斑马鱼,利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存,一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度可定性评价或筛选 Pgp 抑制剂,另一方面利用图像处理软件对图像进行定量分析,计算斑马鱼荧光强度,待测化合物对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0038]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%.$$

[0039] 所述步骤 (3) 微孔板分析步骤如下:处理一段时间后,将斑马鱼转入 96 孔板,每孔 1 尾,然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度,待测化合物对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0040]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%.$$

[0041] 本发明提供的斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型的建立方法及其应用不仅可通过图像分析定性与定量评价药物对 Pgp 的抑制效应,而且可通过基于微孔板的酶标仪检测技术实现高通量筛选 Pgp 抑制剂的目的。与以往的模型相比,本发明具有如下优点:

[0042] 1) 活体内 - 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。

[0043] 2) 高通量 - 斑马鱼幼鱼很小,只有 1-4 毫米,能够在 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筛选的理想模型。

[0044] 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,以老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。

[0045] 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。

[0046] 5) 简便 - 实验过程操作简单,斑马鱼经药物处理、染色后便可进行定量与定性分析,而传统实验操作过程复杂,容易产生假阳性结果。

[0047] 6) 快速 - 实验周期短,可在 2 ~ 3 天内完成;而老鼠常需要数周到数月的时间,猴子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。

[0048] 7) 高效 - 斑马鱼胚胎及幼鱼透明,可同时观察多个器官系统,实验分析方法简单、快速。

[0049] 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。

[0050] 9) 直观性强 - 胚胎及幼鱼透明,可直接置于荧光显微镜下观察对比各实验组斑马鱼荧光强度。

[0051] 10) 敏感性高 - 罗丹明 B 已被证实为 Pgp 最好的底物。

[0052] 11) 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。

[0053] 本发明的应用价值:

[0054] 应用活体斑马鱼模型进行 Pgp 抑制剂的筛选与药效评价具有可靠、快速、高效、低廉、高性价比等优点,可实现体内高通量筛选 Pgp 抑制剂的目的。本发明对加速抗癌药物的研发进程及癌症病人的治疗意义重大。

[0055] 发明详述

[0056] 试剂及仪器

[0057] 罗丹明 B 购自上海晶纯实业有限公司。其他试剂均有北京鼎国昌盛科技有限公司提供。

[0058] 解剖显微镜 (SMZ645, Nikon 公司, 日本); 电动聚焦连续变倍荧光显微镜 (AZ100, Nikon 公司, 日本); 多功能微孔板分析仪 (Mithras LB940, Berthold Technologies 公司, 德国)。

[0059] 本发明的目的在于提供一种活体斑马鱼 P- 糖蛋白抑制剂筛选模型的建立方法,同时提供一种利用该模型筛选与评价 P- 糖蛋白抑制剂的方法。本发明提供的方法具有快速、可靠、经济、高效、高通量等优点。

[0060] 一、本发明提供一种活体斑马鱼 P- 糖蛋白抑制剂筛选模型的建立方法,具体步骤为:

[0061] 1 斑马鱼选取

[0062] 取 4 ~ 5 对斑马鱼亲本交配,按照 Westerfield^[22] 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。

[0063] 2 化合物处理

[0064] 设置 5 个实验组,每个实验组包括 1 个罗丹明 B 处理组、1 个 Pgp 抑制阳性对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水(溶解氧质量浓度为 6-8mg/L;水温为 28℃;pH 为 7.2-7.6;总硬度为 200-250mg/L,下同),罗丹明 B 处理组中加入一定体积(根据微孔板规格而定)浓度分别为 10mM、25mM、50mM、75mM、100mM 的罗丹明 B;Pgp 抑制阳性对照组中相应的加入等体积同浓度的罗丹明 B+10mM 环孢菌素 A(其中罗丹明 B 的浓度分别为 10mM、25mM、50mM、75mM、100mM);空白对照组中加入等体积的养殖用水。按照最佳处理时间长度于 28℃ 恒温培养箱中培养。

[0065] 3 图像分析

[0066] 处理一段时间后,每组随机选取 10 尾斑马鱼,利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度定性确定斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型(图 2);另一方面利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件对图像进行定量分析,计算斑马鱼荧光强度。环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0067]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{Pgp抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明B处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0068] 例如表 1 中所示, 空白对照组荧光强度为 100000, 罗丹明 B 处理组荧光强度分别为 1100000、2100000、3100000、4100000、5100000, Pgp 抑制阳性对照组荧光强度分别为 1300000、2900000、4900000、5300000、5600000, 则根据计算公式得 :5 个实验组中环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率分别为 20%、40%、60%、30%、10% (图 3)。

[0069] 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, $p < 0.05$ 为差异性显著。根据统计学处理结果可定量确定斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型。

[0070] 表 1. 各实验组中环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率 (图像分析)

[0071]

编号	实验组	荧光强度值	Pgp 抑制率
	10 mM 罗丹明 B	1100000	
实验组 1	10 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	1300000	20%
	空白对照组	100000	
实验组 2	25 mM 罗丹明 B	2100000	40%
	25 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	2900000	
	空白对照组	100000	
实验组 3	50 mM 罗丹明 B	3100000	60%
	50 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	4900000	
	空白对照组	100000	
实验组 4	75 mM 罗丹明 B	4100000	30%
	75 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	5300000	
	空白对照组	100000	
实验组 5	100 mM 罗丹明 B	5100000	10%
	100 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	5600000	
	空白对照组	100000	

[0072] 4 微孔板分析

[0073] 处理一段时间后, 将斑马鱼转入 96 孔板, 每孔 1 尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为 540nm, 在 625nm 处采集发射光的荧光强度, 试验重复 3 次取其平均值。环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0074]

$$\text{Pgp 抑制}(\%) = \left(\frac{\text{Pgp抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明B处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0075] 例如表 2 中所示, 空白对照组荧光强度为 100, 罗丹明 B 处理组荧光强度分别为 1100、2100、3100、4100、5100, Pgp 抑制阳性对照组荧光强度分别为 1300、2900、4900、5300、5600, 则根据计算公式得: 5 个实验组中环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率分别为 20%、40%、60%、30%、10% (图 4)。

[0076] 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, 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可定量确定斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型。

[0077] 表 2. 各实验组中环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率 (微孔板分析)

[0078]

编号	实验组	荧光强度值	Pgp 抑制率
实验组 1	10 mM 罗丹明 B	1100	20%
	10 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	1300	
	空白对照组	100	
实验组 2	25 mM 罗丹明 B	2100	40%
	25 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	2900	
	空白对照组	100	
实验组 3	50 mM 罗丹明 B	3100	60%
	50 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	4900	
	空白对照组	100	
实验组 4	75 mM 罗丹明 B	4100	30%
	75 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	5300	
	空白对照组	100	
实验组 5	100 mM 罗丹明 B	5100	10%
	100 mM 罗丹明 B+10 mM 环孢菌素 A	5600	
	空白对照组	100	

[0079] 二、本发明还提供一种评价与筛选 P- 糖蛋白抑制剂的方法, 具体步骤为:

[0080] 1 斑马鱼选取

[0081] 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。

[0082] 2 化合物处理

[0083] 设置 8 个实验组: 5 个化合物组合处理组、1 个模型组、1 个 Pgp 抑制阳性对照组、1

个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,5个化合物组合处理组中分别加入一定体积(根据微孔板规格而定)的罗丹明 B+0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M 的待测化合物溶液;模型组中加入罗丹明 B;Pgp 抑制阳性对照组中加入罗丹明 B+环孢菌素 A;空白对照组中加入等体积的养殖用水,按照最佳处理时间长度于 28℃ 恒温培养箱中培养。

[0084] 3 图像分析

[0085] 处理一段时间后,每组随机选取 10 尾斑马鱼,利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度定性评价与筛选 Pgp 抑制剂(图 5);另一方面利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件对图像进行定量分析,计算斑马鱼荧光强度。待测化合物对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0086]

$$\text{Pgp 抑制率(\%)} = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0087] 例如:空白对照组荧光强度为 100000,模型组荧光强度分别为 3100000, Pgp 抑制阳性对照组荧光强度为 4900000,化合物组合处理组荧光强度分别为 3700000、4300000、4900000、5500000、6100000,则根据计算公式得:环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率为 60%,待测化合物对 Pgp 的抑制率分别为 20%、40%、60%、80%、100%(图 6)。

[0088] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm SE$ 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可定量评价与筛选 Pgp 抑制剂。

[0089] 4 微孔板分析

[0090] 处理一段时间后,将斑马鱼转入 96 孔板,每孔 1 尾。将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为 540nm,在 625nm 处采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。待测化合物对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0091]

$$\text{Pgp 抑制率(\%)} = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0092] 例如:空白对照组荧光强度为 100,模型组荧光强度分别为 3100, Pgp 抑制阳性对照组荧光强度为 4900,化合物组合处理组荧光强度分别为 3700、4300、4900、5500、6100,则根据计算公式得:环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率为 60%,待测化合物对 Pgp 的抑制率分别为 20%、40%、60%、80%、100%(图 7)。

[0093] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm SE$ 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可定量评价与筛选 Pgp 抑制剂。

附图说明

[0094] 图 1 为本发明 Pgp 抑制剂对 Pgp 抑制效应的定性评价图谱。A 为模型组;B 为化合物组合处理组;C 为 Pgp 抑制阳性对照组。

[0095] 图 2 为本发明定性确定斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型图谱。A 为 50mM 罗丹明 B 单独处理,斑马鱼荧光强度较弱;B 为加入环孢菌素 A 处理后, Pgp 的活性受到抑制,底物不能被

排出,从而存留在斑马鱼体内的罗丹明 B 增多,荧光强度增强。

[0096] 图 3 为本发明依赖罗丹明 B 浓度的环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率图谱(图像分析)。

[0097] 图 4 为本发明依赖罗丹明 B 浓度的环孢菌素 A 对的 Pgp 抑制率图谱(微孔板分析)。

[0098] 图 5 为本发明待测化合物对 Pgp 抑制效应的定性评价图谱。A 为模型组罗丹明 B 单独处理,斑马鱼荧光强度较弱;B 为待测化合物处理后,Pgp 的活性受到抑制,底物不能被排出,从而存留在斑马鱼体内的罗丹明 B 增多,荧光强度增强;C 为 Pgp 抑制阳性对照组。

[0099] 图 6 为本发明浓度依赖的待测化合物对 Pgp 的抑制率图谱(图像分析)。

[0100] 图 7 为本发明浓度依赖的待测化合物对 Pgp 的抑制率图谱(微孔板分析)。

[0101] 图 8 为本发明实施例 1 处理 24h 时罗丹明 B 处理组与 Pgp 抑制阳性对照组斑马鱼荧光强度比较照片。A 为罗丹明 B 单独处理组,斑马鱼荧光强度较弱;B 为环孢菌素 A 处理后,Pgp 的活性受到抑制,底物不能被排出,从而存留在斑马鱼体内的罗丹明 B 增多,荧光强度增强。

[0102] 图 9 为本发明实施例 1 不同处理时间长度下环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率图谱(图像分析)。

[0103] 图 10 为本发明实施例 1 不同处理时间长度下环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率图谱(微孔板分析)。

[0104] 图 11 为本发明实施例 2 定性确定斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型图谱。A 为 50mM 罗丹明 B 单独处理,斑马鱼荧光强度较弱;B 为环孢菌素 A 处理后,Pgp 的活性受到抑制,底物不能被排出,从而存留在斑马鱼体内的罗丹明 B 增多,荧光强度增强。

[0105] 图 12 为本发明实施例 2 依赖罗丹明 B 浓度的环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率图谱(图像分析)。

[0106] 图 13 为本发明实施例 2 依赖罗丹明 B 浓度的环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率图谱(微孔板分析)。

[0107] 图 14 为本发明实施例 3 环孢菌素 A 对 Pgp 抑制效应的定性评价图谱。A 为模型组,罗丹明 B 单独处理斑马鱼荧光强度较弱;B 为 10mM 环孢菌素 A 处理组,Pgp 的活性受到抑制,底物不能被排出,从而存留在斑马鱼体内的罗丹明 B 增多,荧光强度增强。

[0108] 图 15 为本发明实施例 3 浓度依赖的环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率图谱(图像分析)。

[0109] 图 16 为本发明实施例 3 浓度依赖的环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率图谱(微孔板分析)。

[0110] 图 17 为本发明实施例 4 奎尼丁对 Pgp 抑制效应的定性评价图谱。A 为模型组,罗丹明 B 单独处理斑马鱼荧光强度较弱;B 为奎尼丁处理组,Pgp 的活性受到抑制,底物不能被排出,从而存留在斑马鱼体内的罗丹明 B 增多,荧光强度增强;C 为 Pgp 抑制阳性对照组。

[0111] 图 18 为本发明实施例 4 浓度依赖的奎尼丁对 Pgp 的抑制率图谱(图像分析)。

[0112] 图 19 为本发明实施例 5 浓度依赖的奎尼丁对 Pgp 的抑制率图谱(微孔板分析)。

具体实施方式

[0113] 以下实施例是为了进一步说明本发明提供的斑马鱼 P-糖蛋白抑制剂筛选模型的实施方式和用途。实施例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

员在权利要求的范围内所做出的某些改变和调整也应认为属于本发明的范围。

[0114] 实施例 1 确定斑马鱼发育阶段和化合物处理时间长度

[0115] 1 斑马鱼发育阶段的选取

[0116] 本发明选取 4hpf 的斑马鱼作为实验材料原因有三：一是由于斑马鱼 4hpf 时，ABCC1 (MDR1) 基因呈高度表达并且广泛分布于整个胚胎^[17]；二是随着斑马鱼年龄的增长，皮肤的通透性逐渐降低，底物透过不断减少，影响环孢菌素 A 对 Pgp 抑制效应的评价结果；三是药物处理需要一定的时间，药物处理从斑马鱼 4hpf 到 1dpf 过程中，卵黄囊较大，对药物的吸收较好，便于实验分析。

[0117] 将 4hpf 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五个 6 孔板中，每孔 30 尾。

[0118] 2 化合物处理

[0119] 设置 5 个实验组，每个实验组包括 1 个罗丹明 B 处理组、1 个 Pgp 抑制阳性对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水，罗丹明 B 处理组中加入 3mL 50mM 的罗丹明 B；Pgp 抑制阳性对照组中加入 3mL 50mM 的罗丹明 B+10mM 的环孢菌素 A；空白对照组中加入 3mL 养殖用水。将五个微孔板放入 28℃ 恒温培养箱中分别培养 6h、12h、24h、48h、72h。

[0120] 3 图像分析

[0121] 处理一段时间后，每组随机选取 10 尾斑马鱼，利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存。

[0122] 一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度可定性确定最佳处理时间长度。空白对照组中无荧光；处理 6h、12h 后，罗丹明 B 处理组与 Pgp 抑制阳性对照组荧光强度都很弱，基本不能看出环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应；处理 24h 后，罗丹明 B 处理组荧光强度弱，而 Pgp 抑制阳性对照组与罗丹明 B 处理组相比荧光强度很强（见图 8）；处理 48h、72h 后，罗丹明 B 处理组与 Pgp 抑制阳性对照组荧光强度都很强，基本不能看出环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应。因此，定性确定处理 24h 作为化合物最佳处理时间长度。

[0123] 另一方面可利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件对图像进行定量分析，计算斑马鱼荧光强度。环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下：

[0124]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{Pgp 抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明 B 处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0125] 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，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。统计学处理结果显示：环孢菌素 A 处理 6h、12h、24h、28h、48h 的 Pgp 抑制率分别为 $(12.32 \pm 1.78)\%$ 、 $(21.18 \pm 1.55)\%$ 、 $(57.21 \pm 3.21)\%$ 、 $(22.58 \pm 3.42)\%$ 、 $(23.97 \pm 1.89)\%$ （见图 9），这表明随着处理时间的延长，环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率先增高后降低。通过方差分析，实验组处理 24h 后环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率显著高于空白对照组，差异有统计学意义 ($p < 0.001$)。

[0126] 4 微孔板分析

[0127] 处理一段时间后，将斑马鱼转入 96 孔板，每孔 1 尾。将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为 540nm，在 625nm 处采集发射光的荧光强度，试验重复 3 次取其平均值。环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下：

[0128]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{Pgp抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明B处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0129] 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, 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。统计学处理结果显示: 环孢菌素 A 处理 6h、12h、24h、28h、48h 的 Pgp 抑制率分别为 $(13.15 \pm 2.41)\%$ 、 $(24.36 \pm 2.78)\%$ 、 $(54.20 \pm 1.99)\%$ 、 $(22.69 \pm 2.39)\%$ 、 $(24.88 \pm 2.10)\%$ (见图 10), 这表明随着处理时间的延长, 环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率先增高后降低。通过方差分析, 实验组处理 24h 后环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率显著高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($p < 0.001$)。通过微孔板高通量分析与图像定量分析所获实验结果一致, 因此选择处理 24h 作为化合物最佳处理时间长度。不同化合物最佳处理时间长度也不相同, 需要具体化合物具体分析。

[0130] 实施例 2 罗丹明 B 浓度的优化

[0131] 基于实施例 1 中的斑马鱼发育阶段和化合物处理时间长度, 通过优化罗丹明 B 的浓度建立活体斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型。设计方案如下:

[0132] 1 斑马鱼选取

[0133] 将 4hpf 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 48 孔板中, 每孔 10 尾。

[0134] 2 化合物处理

[0135] 设置 5 个实验组, 每个实验组包括 1 个罗丹明 B 处理组、1 个 Pgp 抑制阳性对照组、1 个空白对照组 (见表 3)。移除微孔板中的养殖用水, 罗丹明 B 处理组中加入 1mL 浓度分别为 10mM、25mM、50mM、75mM、100mM 的罗丹明 B; Pgp 抑制阳性对照组中相应的加入 1mL 同浓度的罗丹明 B+10mM 环孢菌素 A; 空白对照组中加入 1mL 养殖用水。于 28°C 恒温培养箱中培养 24h。

[0136] 表 3. Pgp 抑制剂筛选模型建立方法中的实验组设置

[0137]

编号	实验分组
实验组 1	10 mM 罗丹明 B
	10 mM 罗丹明 B+10mM 环孢菌素 A
	空白对照组
实验组 2	25 mM 罗丹明 B
	25 mM 罗丹明 B+10mM 环孢菌素 A
	空白对照组
实验组 3	50 mM 罗丹明 B
	50 mM 罗丹明 B+10mM 环孢菌素 A
	空白对照组

[0138]	实验组 4	75 mM 罗丹明 B
		75 mM 罗丹明 B+10mM 环孢菌素 A
		空白对照组
[0138]	实验组 5	100 mM 罗丹明 B
		100 mM 罗丹明 B+10mM 环孢菌素 A
		空白对照组

[0139] 3 图像分析

[0140] 处理一段时间后, 每组随机选取 10 尾斑马鱼, 利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存。

[0141] 一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度可定性确定斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型。空白对照组中无荧光; 实验组 1 与 2 中, 罗丹明 B 处理组与 Pgp 抑制阳性对照组荧光强度都很弱, 基本看不出环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应; 实验组 3 中, 罗丹明 B 处理组荧光强度弱, 而 Pgp 抑制阳性对照组与罗丹明 B 处理组相比荧光强度很强 (见图 11); 实验组 4 与 5 中, 罗丹明 B 处理组与 Pgp 抑制阳性对照组荧光强度都很强, 基本看不出环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应, 因此定性确定将 50mM 罗丹明 B 处理组作为斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型。

[0142] 另一方面可利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件对图像进行定量分析, 计算斑马鱼荧光强度。环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0143]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{Pgp抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明B处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0144] 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, 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。统计学处理结果显示: 5 个实验组中环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率分别为 $(15.24 \pm 2.56)\%$ 、 $(22.69 \pm 1.38)\%$ 、 $(58.36 \pm 1.77)\%$ 、 $(29.46 \pm 1.89)\%$ 、 $(28.37 \pm 2.03)\%$ (见图 12), 这表明随着罗丹明 B 浓度的增加, 环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率先增高后降低。通过方差分析, 实验组 3 中环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率显著高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($p < 0.001$)。

[0145] 4 微孔板分析

[0146] 处理 24h 后, 将斑马鱼转入 96 孔板, 每孔 1 尾。将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为 540nm, 在 625nm 处采集发射光的荧光强度, 试验重复 3 次取其平均值。环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0147]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{Pgp抑制阳性对照组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{罗丹明B处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0148] 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, 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。统计学处理结果显示: 5 个实验组中环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率分别为 $(13.69 \pm 1.95)\%$ 、 $(19.36 \pm 1.79)\%$ 、

(60.23±3.12)%、(27.82±1.85)%、(26.37±1.30)% (见图 13), 这表明随着罗丹明 B 浓度的增加, 环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率先增高后降低。通过方差分析, 实验组 3 中环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率显著高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($p < 0.001$)。通过微孔板高通量分析与图像定量分析所获实验结果一致, 因此定量确定将 50mM 罗丹明 B 处理组作为斑马鱼 Pgp 抑制剂筛选模型。

[0149] 实施例 3 验证斑马鱼 P-糖蛋白抑制剂筛选模型

[0150] 1 斑马鱼选取

[0151] 将 4hpf 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 12 孔板中, 每孔 20 尾。

[0152] 2 化合物处理

[0153] 设置 7 个实验组: 5 个化合物组合处理组、1 个模型组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水, 化合物组合处理组中分别加入 2mL 终浓度为 50mM 的罗丹明 B+ 浓度分别为 0.1mM、1mM、10mM、25mM、50mM 的环孢菌素 A; 模型组中加入 2mL 50mM 的罗丹明 B; 空白对照组中加入 2mL 养殖用水, 于 28°C 恒温培养箱中共同处理 24h。

[0154] 3 图像分析

[0155] 处理一段时间后, 每组随机选取 10 尾斑马鱼, 利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存。

[0156] 一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度可定性评价环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应 (图 14)。空白对照组中无荧光; 随着环孢菌素 A 浓度的增加, 化合物组合处理组斑马鱼荧光强度先增强后逐渐减缓, 浓度为 0.1mM、1mM、10mM、25mM、50mM 的环孢菌素 A 处理组斑马鱼荧光强度与模型组对比越来越明显, 而 10mM、25mM、50mM 处理组之间斑马鱼荧光强度无明显差别。

[0157] 另一方面利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件对图像进行定量分析, 计算斑马鱼荧光强度。环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0158]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0159] 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, 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。通过统计学处理结果可定量评价环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应。统计学处理结果显示: 环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率分别为 (21.19±1.56)%、(31.32±1.95)%、(48.96±2.36)%、(49.17±1.75)% 和 (50.41±1.87)% (见图 15)。

[0160] 4 微孔板分析

[0161] 处理 24h 后, 将斑马鱼转入 96 孔板, 每孔 1 尾。将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为 540nm, 在 625nm 处采集发射光的荧光强度, 试验重复 3 次取其平均值。环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0162]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0163] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm SE$ 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。通过统计学处理结果可定量评价环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制效应。统计学处理结果显示: 环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率分别为 $(20.56 \pm 2.35)\%$ 、 $(30.21 \pm 1.85)\%$ 、 $(47.69 \pm 2.45)\%$ 、 $(47.89 \pm 1.45)\%$ 和 $(48.23 \pm 2.14)\%$ (见图 16)。

[0164] 实施例 4 通过图像分析筛选奎尼丁

[0165] 1 斑马鱼选取

[0166] 将 4hpf 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 48 孔板中, 每孔 3 尾。

[0167] 2 化合物处理

[0168] 设置 8 个实验组: 5 个化合物组合处理组、1 个模型组、1 个 Pgp 抑制阳性对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水, 化合物组合处理组中分别加入 300 μ L 终浓度为 50mM 的罗丹明 B+ 浓度分别为 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M 的奎尼丁^[23] (Pgp 抑制剂); 模型组中加入 300 μ L 50mM 的罗丹明 B; Pgp 抑制阳性对照组中加入 300 μ L 50mM 的罗丹明 B+10mM 环孢菌素 A; 空白对照组中加入 300 μ L 养殖用水, 于 28°C 恒温培养箱中共同处理 24h。

[0169] 3 定性分析

[0170] 处理一段时间后, 每组随机选取 10 尾斑马鱼, 利用立体荧光显微镜侧位拍照并保存。通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度定性评价奎尼丁。空白对照组中无荧光; 随着奎尼丁浓度的增加, 化合物组合处理组斑马鱼荧光强度先增强后逐渐减缓, 浓度为 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M 的奎尼丁处理组荧光强度与模型组对比越来越明显, 而 100 μ M、1000 μ M 的奎尼丁处理组之间斑马鱼荧光强度无明显差别 (见图 17)。

[0171] 4 定量分析

[0172] 利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件对图像进行定量分析, 计算斑马鱼荧光强度。奎尼丁对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0173]

$$\text{Pgp 抑制率}(\%) = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0174] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm SE$ 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。通过统计学处理结果可定量评价奎尼丁对 Pgp 的抑制效应。统计学处理结果显示: 阳性对照组环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率为 $(60.12 \pm 1.96)\%$, 奎尼丁对 Pgp 的抑制率分别为 $(15.23 \pm 1.99)\%$ 、 $(29.87 \pm 2.19)\%$ 、 $(39.68 \pm 1.78)\%$ 、 $(59.33 \pm 2.44)\%$ 和 $(60.07 \pm 1.34)\%$ (见图 18)。

[0175] 实施例 5 通过微孔板分析筛选奎尼丁

[0176] 1 斑马鱼选取

[0177] 将 4hpf 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 96 孔板中, 每孔 1 尾。

[0178] 2 化合物处理

[0179] 设置 8 个实验组: 5 个化合物组合处理组、1 个模型组、1 个 Pgp 抑制阳性对照组、1

个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,化合物组合处理组中分别加入 100 μ L 终浓度为 50mM 的罗丹明 B+ 浓度分别为 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M 的奎尼丁;模型组中加入 100 μ L 50mM 的罗丹明 B;Pgp 抑制阳性对照组中加入 100 μ L 50mM 的罗丹明 B+10mM 环孢菌素 A;空白对照组中加入 100 μ L 养殖用水,于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中共同处理 24h。

[0180] 3 微孔板分析

[0181] 将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为 540nm,在 625nm 处采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。奎尼丁对 Pgp 的抑制效应计算公式如下:

[0182]

$$\text{Pgp 抑制率(\%)} = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{空白对照组荧光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0183] 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,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。通过统计学处理结果可定量评价奎尼丁对 Pgp 的抑制效应。统计学处理结果显示:阳性对照组环孢菌素 A 对 Pgp 的抑制率为 $(59.68 \pm 2.47)\%$,奎尼丁对 Pgp 的抑制率分别为 $(19.67 \pm 4.59)\%$ 、 $(28.77 \pm 3.24)\%$ 、 $(41.26 \pm 2.38)\%$ 、 $(63.45 \pm 1.99)\%$ 和 $(65.17 \pm 3.16)\%$ (见图 19)。

[0184] 由上述优选实施例可见:本发明提供的活体斑马鱼模型能够简便、快速、经济、高效、高通量、准确地评价与筛选 Pgp 抑制剂。本发明提供的方法步骤简单,成本低廉,准确性高,具有很好的稳定性和可靠性,活体斑马鱼能够真正反映药物的整体生物活性,包括药物的吸收、分布、代谢、排泄,可实现高通量筛选。

[0185] 尽管发明人已经对本发明的技术方案做了较为详细的阐述和列举,应当理解,对于本领域一个熟练的技术人员来说,对上述实施例作出修改和/或变通或者采用等同的替代方案是显然的,都不能脱离本发明精神的实质,本发明中出现的术语用于对本发明技术方案的阐述和理解,并不能构成对本发明的限制。

[0186] 参考文献

[0187] [1] 苗傲霜,齐玉龙,王岚,等. 癌症病人家庭负担及影响因素的研究 [J]. 全科护理,2010,8(189):2227-2229.

[0188] [2] Murata T, Shimotohno K. Ubiquitination and proteasome dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E [J]. J Biol Chem, 2006, 281(29):20788.

[0189] [3] Sharom FJ. Shedding light on drug transport structure and function of the p-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1) [J]. Biochem Cell Biol, 2006, 84(6):979-992.

[0190] [4] 李向上,林阳,胡蕴慧,等. II-7 逆转肿瘤细胞 K562/A02 耐药机制的研究 [J]. 中国药理学通报,2010,26(6):750-753.

[0191] [5] 刘传亮,王辉,陈伟娟,等. Snail 增强乳腺癌细胞 MCF-7 中 P-gp 介导的多药耐药 [J]. 中国药理学通报,2010,(1):87-90.

[0192] [6] 玄基泽,关宏伟,韩辉,等. 丹参逆转胃癌耐药细胞的作用及其机制分析 [J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(33):4054-4056.

- [0193] [7] 王珊珊,刘明,刘英,等. MTT 法测定多柔比星和氟尿嘧啶及顺铂对肝癌耐药细胞 Bel-7402/ADM 的 IC₅₀[J]. 医药导报,2010,29(5):579-581.
- [0194] [8] 季梦遥,谭诗云,张军. 小剂量顺铂联合 5-氟尿嘧啶对胃癌细胞增殖抑制及其机制的研究[J]. 现代肿瘤医学,2010,18(5):861-864.
- [0195] [9] 陆守荣,茆勇,郁皓,等. 低分子肝素对人胃癌裸鼠原位移植模型肿瘤生长、转移及趋化因子受体 4 表达的影响[J]. 肿瘤,2010,30(7):591-595.
- [0196] [10] 张志灯,曹治云. Hepal-6 细胞的培养及小鼠皮下移植瘤模型的建立[J]. 实验动物科学,2009,4:1-3.
- [0197] [11] 代军,刘培淑,侯萍,等. 人卵巢癌 3A0 裸鼠移植瘤模型的研究[J]. 医学研究杂志,2009,38(3):36-37.
- [0198] [12] McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J]. Drug Discover Today,2008,13(9):394-401.
- [0199] [13] 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.
- [0200] [14] Park D, Haldi M, Seng WL, et al. Zebrafish: a predictive model for assessing modulators of P-glycoprotein efflux[C]. Multidrug Resistance and ABC Transporters Conference,2008. Abcam.
- [0201] [15] Sadler KC, Amsterdam A, Soroka C, et al. A genetic screen in zebrafish identifies the mutants vps18, nf2 and foie gras as models of liver disease[J]. Development and Disease,2005,132:3561-6572.
- [0202] [16] Annilo T, Chen ZQ, Shulenin S, et al. Evolution of the vertebrate ABC gene family: Analysis of gene birth and death[J]. Genomics,2006,88:1-11.
- [0203] [17] Long Y, Li Q, Cui ZB. Molecular analysis and heavy metal detoxification of ABC1/MRP1 in zebrafish[J]. Mol Biol Rep,2011,38:1703-1711.
- [0204] [18] Long Y, Li Q, Cui ZB. MRP proteins as potential mediators of heavy metal resistance in zebrafish cells[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C,2011,153:310-317.
- [0205] [19] Scholz S, Fischer Stephan, Gundel U, et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-application beyond acute toxicity testing[J]. Environ Sci Pollut Res,2008,15:394-404.
- [0206] [20] 龚玉萍,刘霆,贾永前,等. 环孢菌素 A 逆转 Pgp 多药耐药机理的研究[J]. 华西医学报,2002,33(3):394-396.
- [0207] [21] Witherspoon SM, Emerson DL, Kerr BM, et al. Flow cytometric assay of modulation of P-glycoprotein function in whole blood by the multidrug resistance inhibitor GG918[J]. Clin Cancer Res,1996,2:7.
- [0208] [22] Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish[M]. Eugene, Oregon: The University of Oregon Press,1993.
- [0209] [23] 付东,王玉芝. 肿瘤耐药逆转剂的研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册,1997,24(1):18-21.

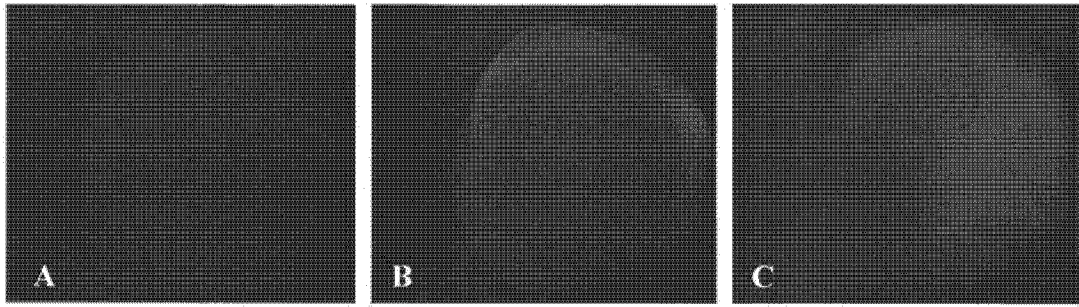


图 1

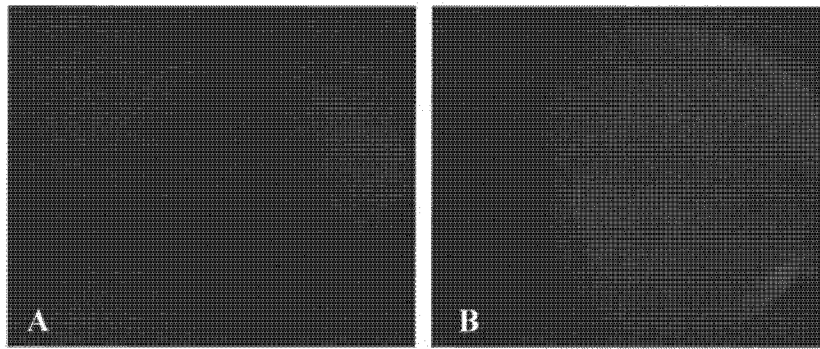


图 2.

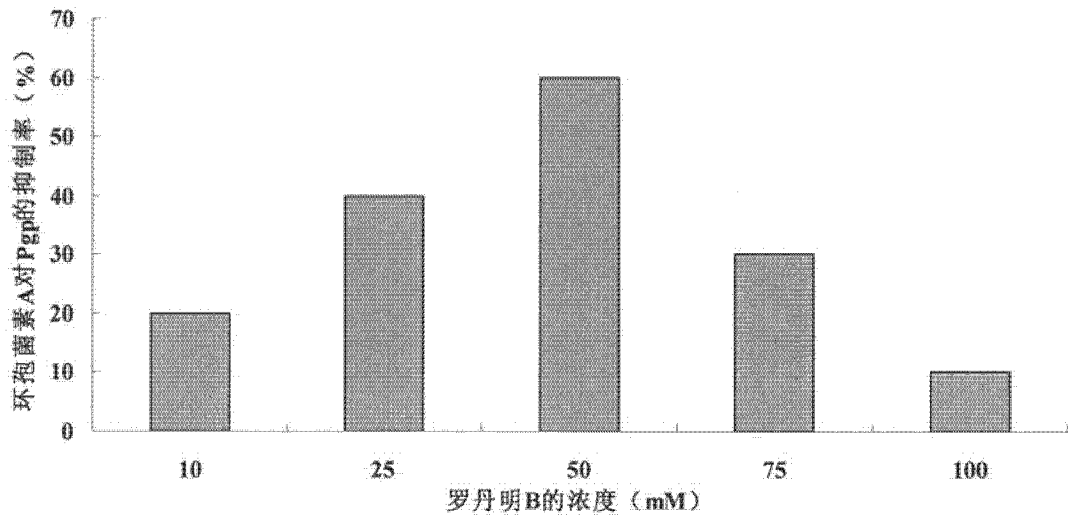


图 3

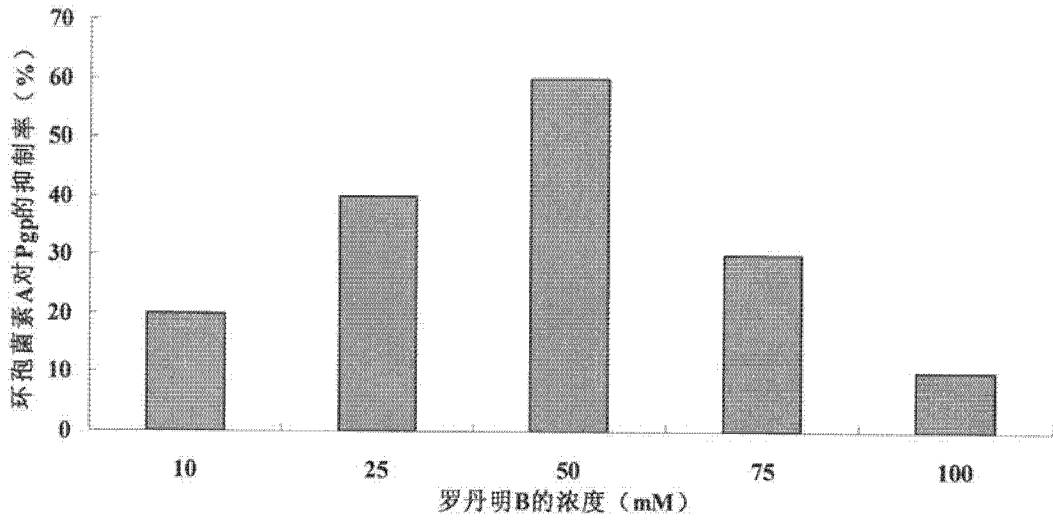


图 4

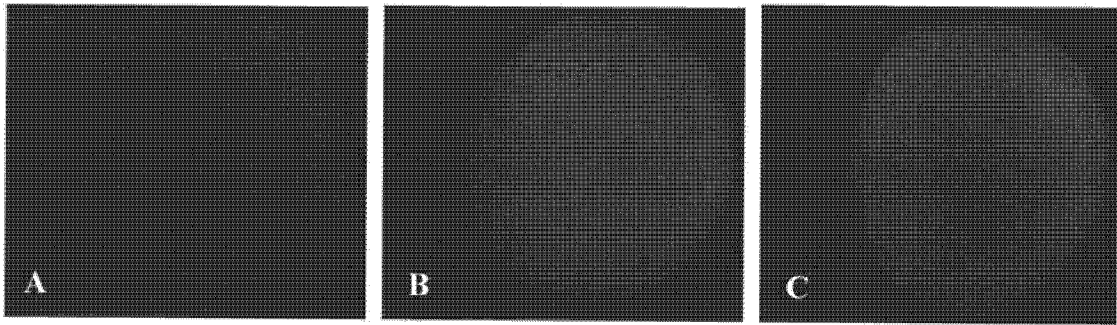


图 5

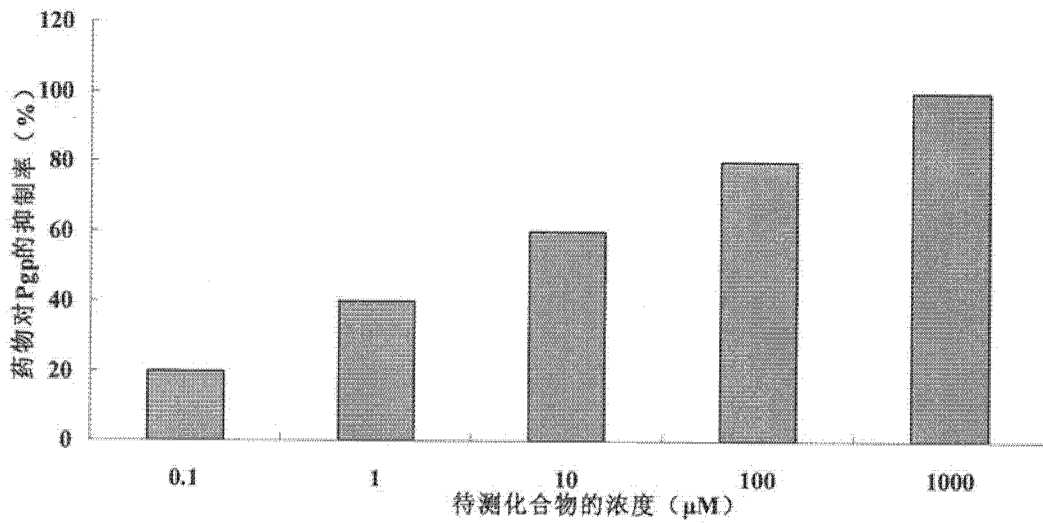


图 6

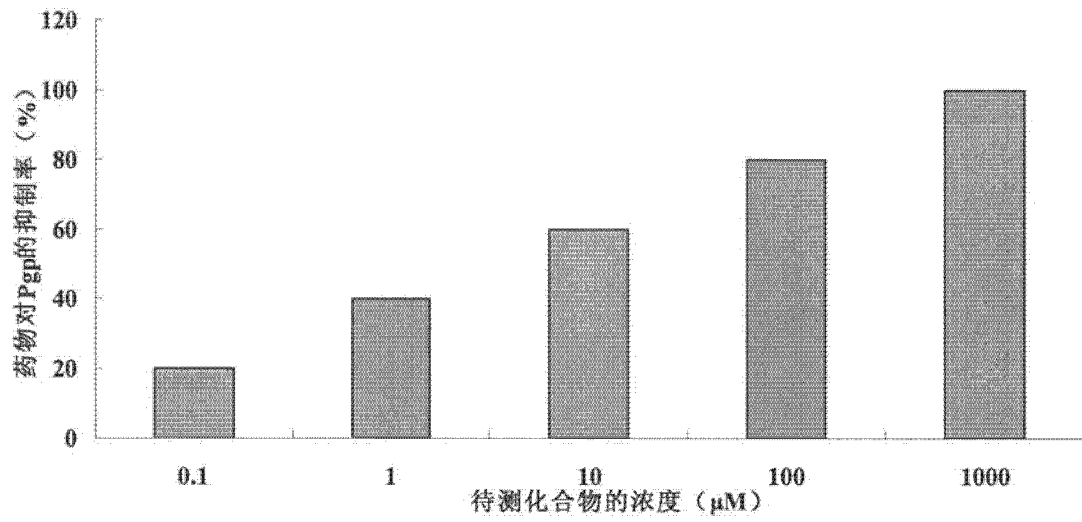


图 7

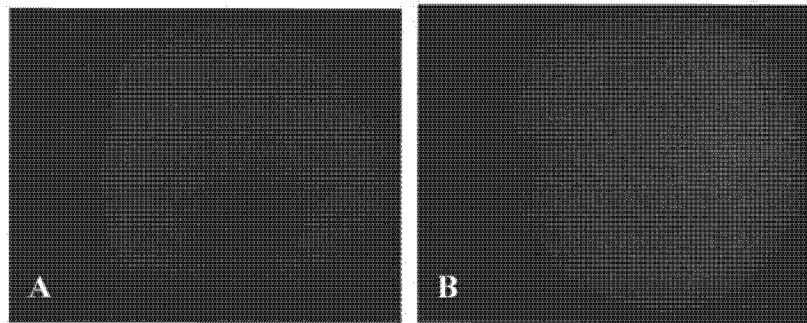


图 8

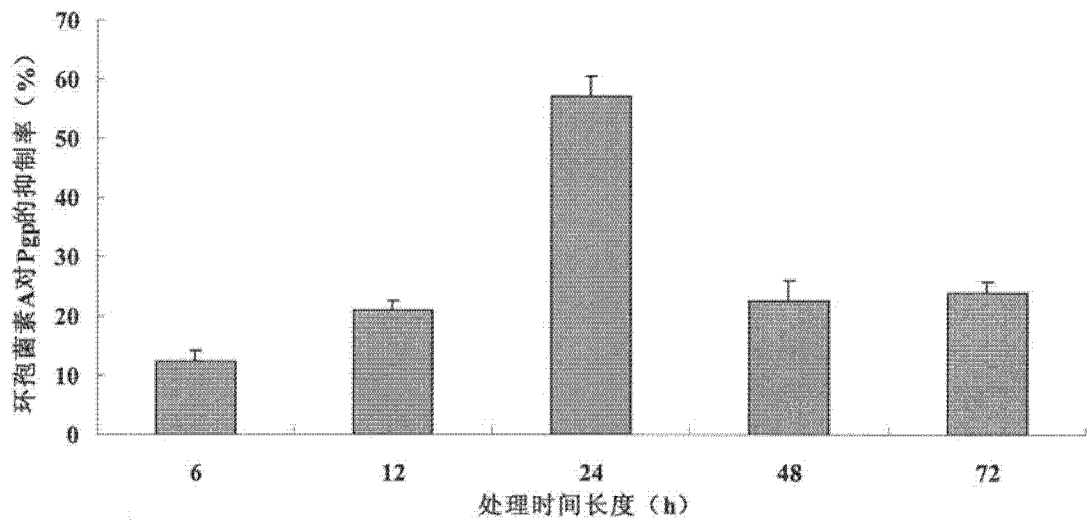


图 9

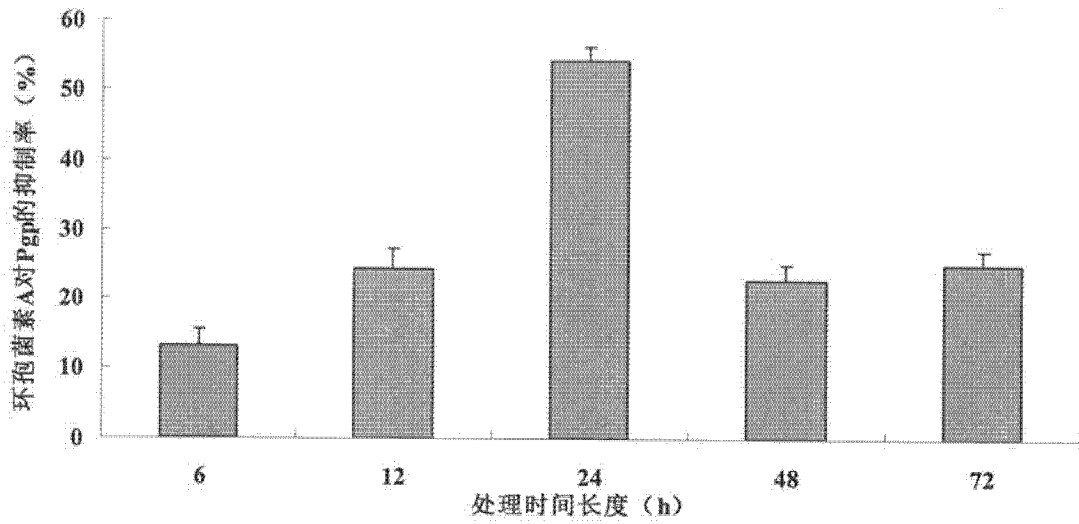


图 10

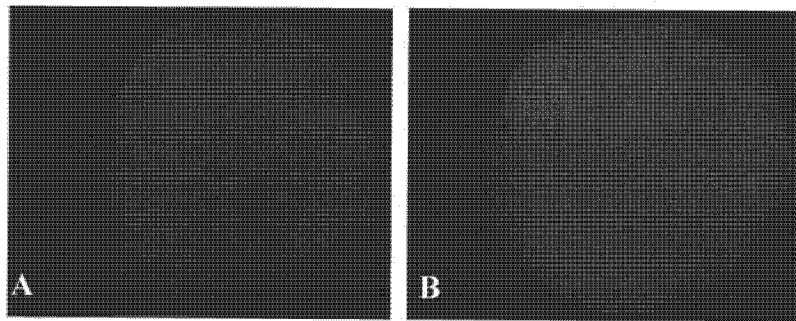


图 11

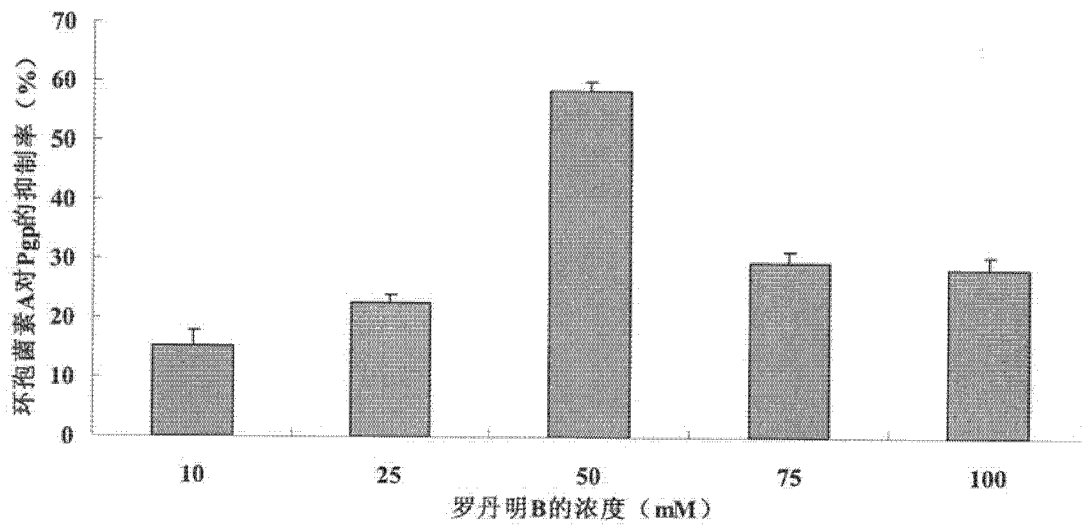


图 12

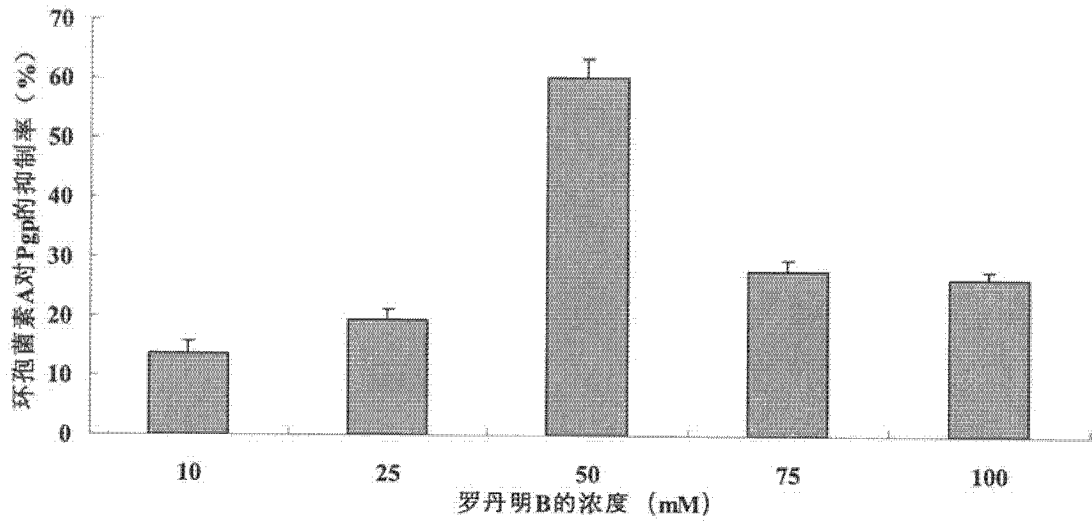


图 13

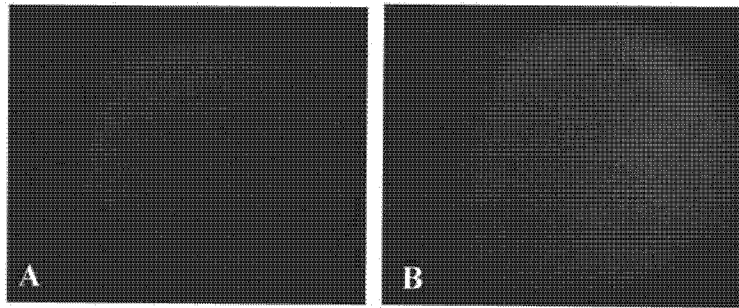


图 14

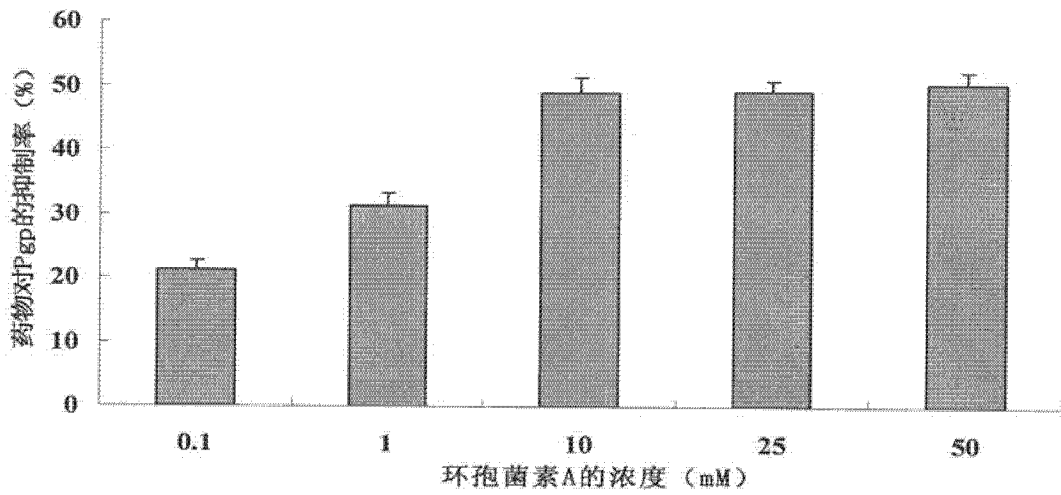


图 15

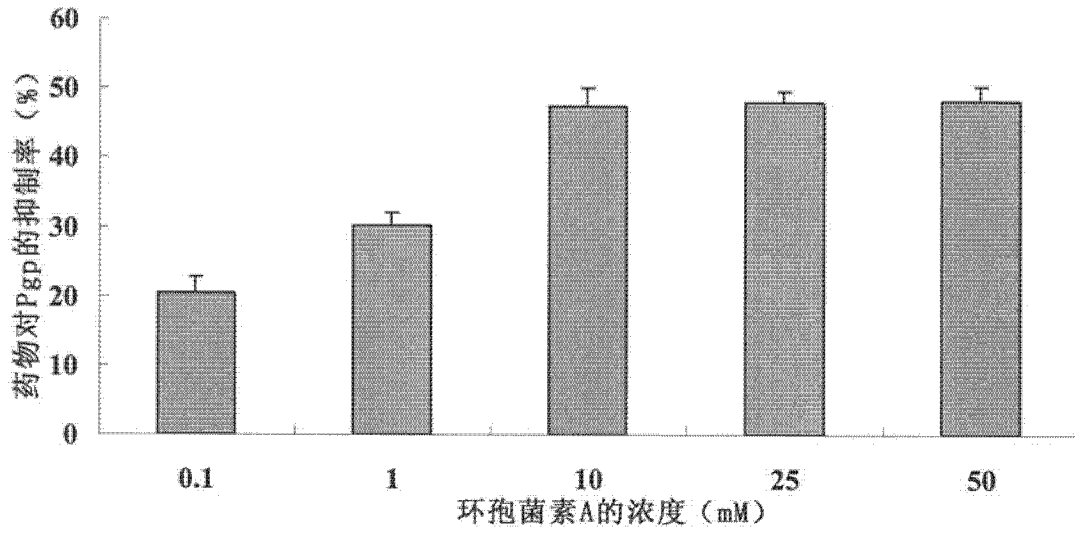


图 16

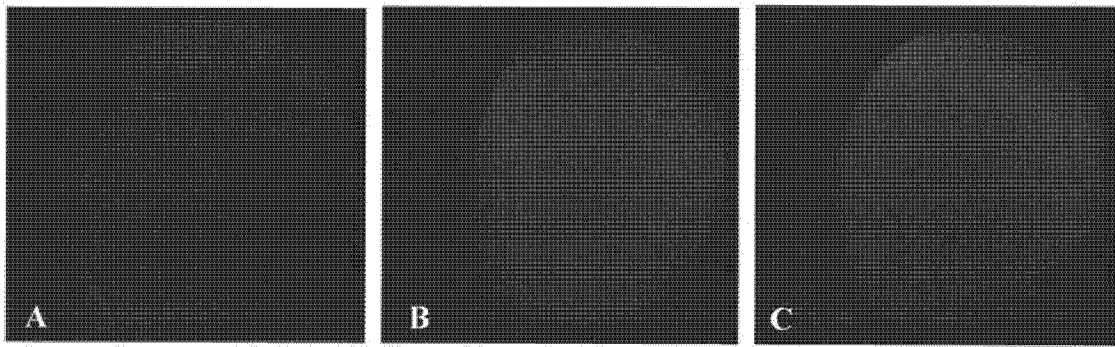


图 17

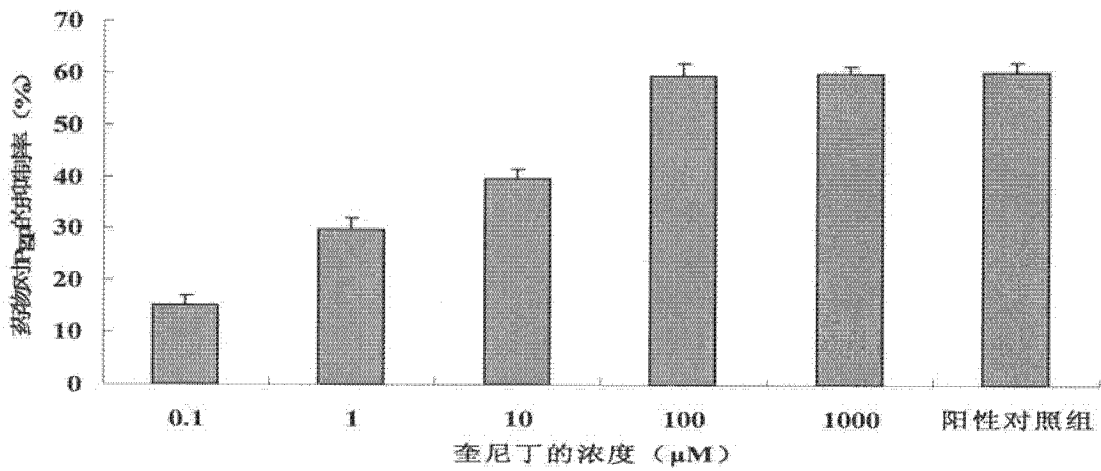


图 18

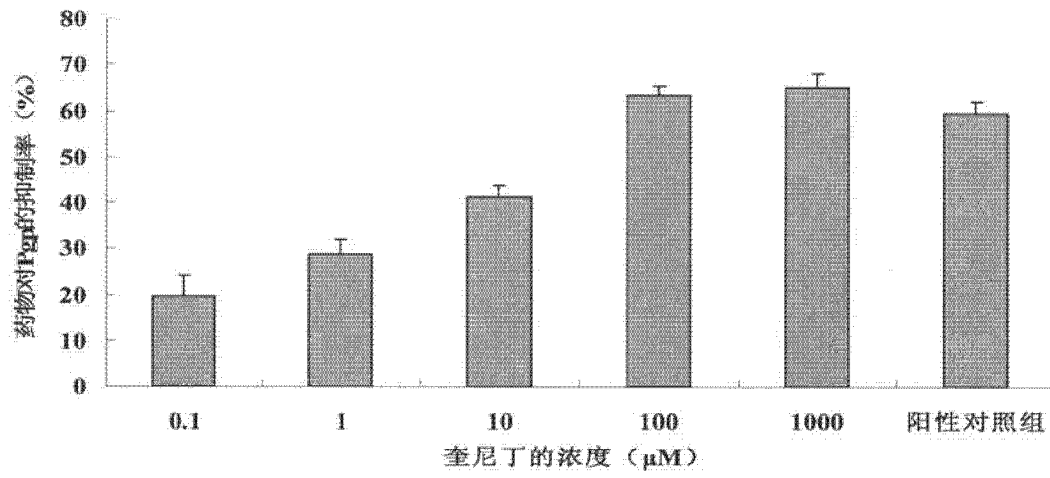


图 19