

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780015786.2

[51] Int. Cl.

C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 31/00 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年6月3日

[11] 公开号 CN 101448952A

[22] 申请日 2007.1.8

[21] 申请号 200780015786.2

[86] 国际申请 PCT/CN2007/000034 2007.1.8

[87] 国际公布 WO2008/086645 英 2008.7.24

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.31

[71] 申请人 香港城市大学

地址 香港九龙

[72] 发明人 郑淑娴 陈保国

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 村磊

权利要求书 2 页 说明书 13 页

[54] 发明名称

使用硬骨鱼胚胎筛选具有血管调节活性的试剂的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种使用透明的硬骨鱼胚胎作为模型,筛选具有血管发生调节活性的化合物、草药提取物或配方中草药组合的提取物的3层次系统的方法。

1、用于筛选血管发生调节活性试剂的生物学方法，包括分等级的3个层次的生物筛选测定系统：

- a.筛选血管发生调节活性；
- b.试剂和终点之间的剂量-反应关系；
- c.确定器官特异性毒性和靶特异性效应。

2、权利要求1的方法，其中优选的硬骨鱼是斑马鱼。

3、权利要求1的方法，其中硬骨鱼是受精卵、胚胎、幼苗或幼体。

4、权利要求1的方法，其中该方法包括在容器中将一定数量的硬骨鱼暴露于各种浓度的试剂的测定。

5、权利要求1的方法，其中向培养基中添加试剂的最早时间和最晚时间分别是受精后4小时和受精后20小时。

6、权利要求1的方法，其中步骤(a)包括显示和分析硬骨鱼中的血管系统模式的方法。

7、权利要求6的方法，其中在受精后3-5天之间检查硬骨鱼。

8、权利要求6的方法，其中可通过在固定的硬骨鱼中用颜色底物或荧光底物染色内皮细胞显示血管系统模式。

9、权利要求6的方法，其中也可通过将荧光底物注射到活的硬骨鱼的循环系统内显示血管系统的模式。

10、权利要求6的方法，其中分析策略是通过计数从头到尾或者特定的区域，例如尾部区的节间血管的数量实施。

11、权利要求1的方法，其中步骤(b)包括确定在至少一天的暴露时间中不同浓度的试剂对硬骨鱼的副作用的方法。

12、权利要求11的方法，其中副作用包括死亡和畸形。

13、权利要求12的方法，其中畸形是硬骨鱼的外部形态学的改变。

14、权利要求11的方法，其中没有观察到副作用的浓度(NOAEC)是在试剂和副作用之间的剂量-反应关系中计算的。

15、权利要求1的方法，其中在步骤(c)中，在不诱导任何副作用的浓度，即：NOAEC，水平测定器官特异性毒性和靶特异性效应。

16、权利要求15的方法，其中暴露的时间是至少24小时。

17、权利要求 15 的方法，其中包括测量靶器官的大小和形状的方法。

18、权利要求 17 的方法，其中器官和靶通过器官特异性底物显示。

19、权利要求 18 的方法，其中器官特异性底物是荧光。

20、权利要求 17 的方法，其中定量确定 3D 大小和形状。

21、权利要求 15 的方法，其中进一步包括确定试剂对硬骨鱼的细胞毒性的方法。

22、权利要求 21 的方法，其中在大量硬骨鱼，即每个浓度至少 100 个硬骨鱼中，确定死亡细胞的发生率。

23、权利要求 15 的方法，其中进一步包括确定试剂的心脏毒性的方法。

24、权利要求 23 的方法，其中硬骨鱼处于至少在受精后 48 小时。

25、权利要求 23 的方法，其中待测量的参数是心率和心脏搏动节律性。

26、权利要求 23 的方法，其中待测量的区域是尾部循环。

使用硬骨鱼胚胎筛选具有血管调节活性的试剂的方法

发明背景

血管发生是一种从现有的血管中形成新血管的生理过程 (Risau, 1997)。这个过程正常地仅在生长和发育, 以及在对组织恢复血流的伤口愈合中发生。然而, 血管发生的失控是大多数重要疾病, 如癌症和类风湿性关节炎中的常见因素(Liekens 等, 2001)。这些疾病可能是由于新血管生长过度或不足所致或者由此发展产生的。血管生长过度发生在, 例如, 在癌症中, 由于为了形成新的血管用于满足对营养的过度需求, 异常地产生了过量的血管生长因子。在另一个方面, 血管发生不足发生在, 例如, 在冠状动脉疾病中, 由于血管生长因子的产量不足, 使血管不能充分生长, 导致组织损伤和死亡。因此, 全世界制药公司都在积极从事针对治疗血管发生失控的疗法。

背景技术和现有技术的描述

虽然存在大量血管发生相关治疗的潜在市场, 也很难找到适合用于评价血管发生反应效果的测定(Staton 等, 2004)。最常使用的测定是体外测定, 其中在塑料烧瓶中培养的内皮细胞中检验新药。缺点是, 其很难将体外测定中所获得的观察资料推延模拟体内环境中实际所发生的血管发生的复杂过程(Staton 等, 2004; Taraboletti 和 Giavazzi, 2004)。在另一个方面, 使用小鼠之类的动物模型的体内测定昂贵、费时且很难量化(Staton 等, 2004)。因此, 通常使用多种体外测定用于前导化合物的鉴定, 随后将通过一种以上的体内测定验证前导化合物对血管发生的功效。然而, 对于血管发生测定来说, 量化仍然是一种重要的关键参数。理想的定量的血管发生测定的标准(Hasan 等, 2004)是, 测定应当:

- 1) 提供新形成的血管的结构的定量测量;
- 2) 提供新形成的血管的功能特性的定量测量;
- 3) 能区分新形成的和先前存在的血管;
- 4) 适用于长期研究;
- 5) 是经济的, 快速的, 容易使用, 可重复的; 以及

6) 不导致任何组织损伤;

到目前为止, 现存的体内测定中没有一种真正地满足这些要求 (Hasan 等, 2004; Taraboletti 和 Giavazzi, 2004)。似乎使用斑马鱼作为模型的体内药物筛选测定满足理想的定量的血管发生测定的标准。斑马鱼体内测定具有体外测定 (与体外测定相比的高通量 (throughout)) 和体内测定 (是完整的生物体) 的优点和便利, 以及因此能用作体外筛选和随后的体内确认之间的桥梁或过滤器 (Epstein 和 Epstein, 2005; Goldsmith, 2004; Parng 等, 2002)。斑马鱼体内测定将在进入更昂贵的体内确认期前, 从体外测定所鉴定的列表中除去那些具有毒性作用的前导化合物。已经证明斑马鱼体内测定是一种用于筛选血管发生药物的有用方法 (综述见 (Kidd 和 Weinstein, 2003))。例如, Serbedzija 和他的同事描述了筛选方法学, 其基于计数在胚胎两侧卵黄表面上所形成的肠下血管的数量 (Serbedzija 等, 1999)。利用内源性碱性磷酸酶活性对血管进行染色。已经发展了具有荧光血管的转基因斑马鱼系 (Cross 等, 2003; Lawson 和 Weinstein, 2002), 使得可极大地简化血管发生的显像和分析。然而, 仍然没有全面描述斑马鱼如何用作血管发生药物开发以及相应的毒性试验的定量工具的方法和工具。

发明概述

本发明涉及一种使用硬骨鱼胚胎作为模型, 筛选具有血管发生调节活性、并没有表观毒性 (apparent toxicity) 的试剂的 3 层次 (3-tier) 筛选系统。本发明的 3 层次筛选系统满足上面所列理想的定量血管发生测定的标准, 并且提供用于鉴定具有最低毒性的血管发生调节剂的有效筛选测定系统。该筛选系统由 3 个分等级的层次构成: 1) 前导鉴定; 2) 一般毒性试验; 3) 器官特异性毒性试验。本发明优选的模型是斑马鱼或青鳉 (medaka) 胚胎。本发明的优点是, 其可在第一层次上迅速鉴定潜在的血管发生调节剂以及然后将这些潜在的血管发生调节剂分别进行层次 2 和 3 安全性检验。因此, 前导试剂中通过所有 3 个层次的最终候选物将具有期望的血管发生活性, 并具有最小的毒性。

在第一个层次中, 目的是快速鉴定能诱导硬骨鱼的脉管系统模式

发生变化 (alternation) 的试剂。在该层次中, 通过用涵盖了 7 个数量级 (order magnitude) 的, 浓度变化很大的试剂处理胚胎。为了在透明胚胎中显示 (visualize) 血管, 应用颜色染色以检测主要在血管内皮细胞中的内源性碱性磷酸酶活性。选择节间血管的模式作为待检查的靶, 因为该模式是有规律的并且个体之间的变异非常小, 使得更容易对血管发生效应进行解释。待检查的胚胎的优选阶段是在至少受精后 72 小时 (hpf)。所述试剂以的任何浓度引起节间血管模式的任何改变, 都将推断为血管发生调节剂并且该试剂将进入下一个层次。

在第二个层次中, 将确定试剂的剂量-反应关系 (dose response relationship)。剂量-反应关系描述了试剂的不同浓度水平所导致的效应的改变, 即, 死亡和畸形。研究剂量-反应关系是确定研究期间试剂的安全和危险水平的核心。将剂量-反应关系绘成一个图, 称作剂量-反应曲线。将曲线上的反应, 即包括死亡和畸形在内的总效应在零以上的第一个点称作阈浓度, 或者未观察到副作用的浓度 (NOAEC)。阈浓度以上, 不期望的副作用, 即, 死亡和畸形, 将仍然出现并且该效应将随着浓度增加而更强。因此, 在该层次中, 测定试剂对硬骨鱼的 NOAEC。待检查的胚胎的优选阶段是 24 或 48 hpf。

在第三个层次中, 将确定试剂在 NOAEC, 而不是总异常的水平, 是否将诱导器官水平和细胞水平的任何副作用。因此, 将通过细胞毒性检验、器官毒性检验和心脏毒性检验的均值评价试剂的安全性。另外, 将检验在 NOAEC 时的血管发生调节活性。在该层次中, 通过微血管造影成像技术显示节间血管, 其中将荧光染料, 例如, 荧光微珠或荧光葡聚糖注射到血液循环内, 使得其通过血液循环扩散到所有被记录的血管。节间血管的变化将是血管发生调节活性的指示剂。在其中的一个试验中具有任何阳性结果或者在血管发生调节活性中具有阴性结果的试剂都将被剔除。否则, 将认为其是安全的, 具有血管发生调节活性。

发明详述

本发明提供用于筛选具有血管发生调节活性的试剂的方法。

可利用本发明筛选多种试剂, 无论是合成的还是天然来源的。试剂可以是纯的小分子或者草药的粗提物或者不同草药组合的粗提物。

试剂将与多种载体溶剂，例如，乙醇、DMSO 一起，以可溶形式施用。已报道了这些溶剂在斑马鱼中没有诱导畸形的最大浓度 (Hallare 等, 2006)。例如，在斑马鱼胚胎测定中所用的 DMSO 和乙醇的水平应当分别低于 1.5% 和 1%。如果必要的话，试剂应当首先溶于载体溶剂中。然后，将其以期望的浓度添加到含有 20 个受精卵或者健康胚胎的胚胎培养基中。优选的添加的起始时间是在血管发生的开始前，即 24 hpf。将在某个间隔时间，例如 24 小时或者 48 小时或者更长一段时间后，观察由于存在所施用的试剂所诱导的任何效应。卵采集、挑出受精卵以及鉴定健康胚胎是本领域普通技术人员公知的 (Westerfield, 1995)。

在第一个层次中，将 4 phf 时的受精卵浸在含有各种浓度的待检验的试剂的胚胎培养基中，其中每个浓度之间有 10 倍的增量。待检验的浓度的总数是 7。因此，待检验的浓度的范围覆盖了 7 个数量级。孵育某个时间后（例如，96 小时），将胚胎固定，并且通过染色显示血管，所述的染色显示是指特异地使主要在血管内皮细胞中的内源性碱性磷酸酶活性染色。计数每个单个胚胎中的节间血管的数量。计数每个浓度中显示节间血管数量降低或增加的胚胎的数量。将在任何浓度都诱导节间血管数量改变的试剂表述为潜在的前导试剂并将其转到第二层次。同时，也在每个浓度中计数死亡胚胎的数量。该数据将在随后的第二层次中用作待检验浓度的初步范围。

在第二个层次中，将硬骨鱼暴露于不同浓度的、层次 1 中所鉴定的潜在的前导试剂，计数死亡和畸形的发生率。待检验的浓度范围是在第一层次中的范围探索 (range finding) 实验中初步确定的。在相等的位置中选择待检验的浓度。确定每个浓度中死亡和畸形的百分率并且绘成图表显示剂量 - 反应关系。使剂量 - 反应曲线适合所有数据点，并且将暴露组和对照组之间副作用的百分率没有显著增加的最高浓度所对应的浓度确定为 NOAEC。然后在第三层次中使用该浓度水平。对于任何试剂，如果不能确定 NOAEC，那么将其从测试中去除。

第三层次的目标是在不导致硬骨鱼中如死亡和畸形之类的任何严重副作用 (gross adverse effect) 的浓度水平，研究试剂是否引起任何副作用。因此，在第三层次中所包括的检验是细胞毒性检验、器官特异性毒性检验和心脏毒性检验。在细胞毒性检验中，通过流式细胞仪定量死亡细胞 (凋亡细胞) 的数量。除了死亡细胞的数量外，通过

流式细胞仪可在大量标本，例如在单个实验中 300 个硬骨鱼中，分析处于细胞周期不同阶段中的细胞数量。在器官特异性毒性中，通过与器官特异性探针的荧光原位杂交，研究器官的形态学。通过共焦图像的光学切片的 3D 重建，量化器官的形态学。器官大小和形状的任何改变可揭示由所检验的试剂所诱导的毒性效应。心脏毒性是检验阳性候选物是否能影响心脏的功能，如心输出量和心律。心脏毒性是很重要的试验，因为已证明越来越多的药物显示对心脏的副作用，即使是以极低的频率，也必需从市场中退出。最后，在 NOEC 时评价阳性候选物的血管发生调节活性的效应。不诱导任何细胞毒性、器官特异性毒性和心脏毒性效应、并且在 NOEC 时显示血管发生调节活性的阳性候选物是所述的通过了第三层次，并因此，完成该筛选生物测定。

实施例

1、材料和方法

a. 卵采集

斑马鱼在有光线的时候交配并产卵。为了收集卵，必需保护卵不被成体吃掉。所用的卵采集盒由丙烯酸制成，顶部安置有金属网。这然后用塑料海藻覆盖以便成体将在塑料海藻上交配，产生的卵将落入丙烯酸盒中。用金属网将卵保护起来避免被成体鱼吃掉。将在光照 30 分钟后移走采集盒。然后通过将采集盒中的鱼水经鱼网倒出，采集卵。将卵在流动的自来水下漂洗 30 秒钟，然后转移到具有 15 ml 胚胎培养基（19.3 mM NaCl、0.23 mM KCl、0.13 mM MgSO₄·7H₂O、0.2 mM Ca(NO₃)₂、1.67 mM HEPES (pH 7.2)）的 90-mm 培养皿内。然后将培养皿置于 28℃ 的培养箱内。

b. 试剂的施用

将试剂以期望的浓度溶解，使得包含载体溶剂（例如，DMSO、乙醇）浓度的最高的检验浓度不超过建议的耐受浓度。将试剂直接添加到具有 4 hpf 的鱼胚胎的培养基溶液内。测定将在培养皿中 (60 mm x 15 mm, Falcon, BD Bioscience, San Jose, California) 进行。每个培养皿有 20 个胚胎。

作为第一层次中进行的化合物效应的初步筛选，每个试剂在 8 个不同浓度下检测，每个浓度相差一个数量级以便确定哪个浓度将提供

最多的信息。对于第二层次中的剂量 - 反应研究，待检验的浓度范围覆盖没有观察到副作用的最低浓度到所有胚胎都被杀死的最高浓度。

对于第二层次中的细胞毒性、心脏毒性和器官毒性以及第3层次的机制 (mechanistic) 研究，待检验的唯一浓度是从剂量 - 反应曲线确定的 NOAEC。对于各试剂的浓度，向培养皿中所培养的 20 个胚胎中添加 6 ml 培养基。然后检验每个试剂每个浓度的 15 个重复实验 (即，对于试剂的每个浓度来说， $20 \times 15 = 300$ 个胚胎)。可观察不同时间点的效应，例如，28 hpf、52 hpf 或 76 hpf。此外，可在试剂处理后实施检查毒性和血管发生的其它实验。

c. 毒性试验

为了确定化合物对生物系统的毒性，必需鉴定可观测的和明确的终点。死亡率是一种被广泛使用的终点。将描述化合物效能的致死效应的指数称作 LC50，其定义为导致所检验动物至少 50% 死亡的化学产品的剂量。除了致死率外，由化合物所诱导的副作用如形态学中的畸形可用作观察的终点。将这些不良结果与死亡一起归为总的副作用 (total adverse effect)。将化合物诱导副作用的潜能定义为 EC50，其是导致所检验动物至少 50% 显示异常表现和死亡的化合物的浓度。

确定死亡率和总的副作用是在本研究中的观察终点。向鱼胚胎施用化合物后，将胚胎在 28°C，分别保持到 28 hpf 和 52 hpf。向培养鱼胚胎的培养基中添加化合物后 24 小时和 48 小时后，在解剖显微镜 (Zeiss, Jena, 德国) 下肉眼观察胚胎的死亡率、运动和总的形态学缺陷。然后对每个试验中所检验的 20 个胚胎中死亡胚胎的数量进行记分。从 15 个重复实验中所收集的数据验证所有浓度的死亡率之间没有显示差异的零假说 (null hypothesis)。然后进行方差分析，连同 post-hoc Tukey's 可靠地显著性差异检验一起，以确定处理浓度和未处理的对照之间的死亡率差异。同样地，使用方差分析和 post-hoc Tukey 可靠的显著性差异检验两者来确定处理浓度和未处理的对照之间总的副作用的差异。将使用 Windows 的统计学软件 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) 进行计算。

d. 内源性碱性磷酸酶染色

可使用 72 hpf 以上的胚胎用于内源性碱性磷酸酶染色。特别地，将胚胎固定在溶于 PBS 和 1% Triton x-100 的 4% 低聚甲醛 (PFA) 中。

将胚胎在 4℃ 过夜固定，然后用 PBS/0.1% Tween-20 (PBT) 洗涤 4 次，5 分钟。为了染色，在室温，将胚胎在 TMNT 缓冲液(0.1M Tris-HCl pH 9.5; 50 mM MgCl₂; 0.1M NaCl; 0.1% Tween 20)中平衡 10 分钟，三次。胚胎平衡后，将他们在底物溶液（含有 4.5 μl 的 75 mg/ml 氮蓝四唑 (NBT)和 3.5 μL 的 50 mg/ml X-磷酸盐的 1 ml TMNT 溶液）中染色。染色 12 分钟后，鱼胚胎中的所有血管都被标记。通过在 PBT 中洗涤三次终止染色反应，并且在室温下将胚胎在溶于 PBS 的 4% 低聚甲醛中固定 30 分钟。然后将胚胎在 PBT 中稍洗涤两次，再洗涤 10 分钟，4 次。洗涤后，在检查和在 CCD 照相机上捕获影像前，将胚胎浸在溶于 PBS 的 70% 甘油中。

为了检查由化合物诱导的前-/抗-血管发生活性，需要在立体显微镜或复合显微镜下计数节间血管的数量。将染色的胚胎横向地置于甘油中。检查的区域是从第一个节间血管到恰好在肛门上的一个区域。通常，应当有 12-13 对。有益之处在于，在 3 天的胚胎中有恒定数量的节间血管，由此易于在对照和处理组之间进行比较。使用斑马鱼用于这类测定的另一个有益之处是，位于卵黄上部的肠下血管既对影响血管形成的因子敏感又易于通过该方法测定。肠下血管正常地存在于发育 48 小时的斑马鱼胚胎卵黄的背外侧表面。他们形成清楚的篮形，在卵黄上部从体节的腹侧边缘延伸 50-100μm。通过在发育 72 小时测定肠下血管（肠下血管正常出现后 24 小时），避免了在血管形成时的正常变异。

e. 微血管造影术

采用经修改的、Weinstein 等(Nat Genet, 1995)的微血管造影术的方法。如下所述，将胚胎横向地封固 (mounted) 于 0.3% 琼脂糖中。然后将荧光素化的和羧基化的乳胶微珠(0.02-μm, cat# F-8787, Molecular Probes, USA)注射到静脉窦内。珠悬液将用 2% BSA 1: 1 稀释，以最大功率超声 5 分钟，然后以最大速度离心 5 分钟。然后将上清液转移到新管中用于注射。然后通过使用 Narishige PC-10 微量加液器拉出工具 (puller)，从 1 mm OD 毛细管(World Precision Instruments, cat # TW100-4 或者 TW100F-4 用于玻璃，没有或有内部细丝)中制备玻璃显微针。为了制备这些显微针，需要使用其自身重量的重力，用该微量加液器拉出工具垂直地牵拉玻璃毛细管。进行两次牵拉，其中

第一次牵拉是在 76℃ 的温度时，第二次牵拉是在 64℃ 的温度时。然后通过 MF-900 显微拉制仪将显微针打破，以产生大约 5 μ m 宽的口。在显微拉制仪的 10X 物镜的监控下，通过将一小滴融化的玻璃推向显微拉制仪的铂丝，将显微针的顶部打破。由于胚胎安置在琼脂糖中，因此在该方案中不需要拿着移液管。然后用微量加液器的加载器将珠悬液在更宽的一端加载到显微针内。然后将玻璃显微针倾斜地插入到静脉窦内。应当在长达一分钟的时间期间注射许多 (20+) 小团 (small boluses) 的珠悬液。使胚胎恢复 3-5 分钟后，获得共焦图像。仪器的设置如下所述。注射后，荧光珠将在整个血管网络中循环，照亮了每个具有来自心脏的活动血流的血管。然后获得共焦图像 (配备了 LSM 版本 5 的 Carl Zeiss 共焦显微镜)，用于斑马鱼胚胎血管系统的 3D 结构的详细重建。

将所制备的用于显微血管造影术的胚胎通过琼脂糖固定。制备琼脂糖溶液 (0.3%) 并在加热块上保持在大约 45℃。通过使用具有宽开口的 Pasteur 移液管将胚胎转移到清洁的载玻片上。为了避免卵黄囊破损，将在向胚胎添加预热的 0.3% 琼脂糖前，向胚胎加入一小滴溶液。恰好在琼脂糖变硬前 (其通常需要一两分钟)，用 27G 针将胚胎安排到适当的位置。

首先打开具有适当波长的激光灯 (例如，对于 FITC/荧光素和吖啶橙，是 488 nm 激光)。然后将针孔大小调整到某一值，使得空气的值 (airy value) 是 1.00。使用侧面菜单栏的 “Find” 按钮自动调整检测器增益、偏移和放大器增益。必要时调整检测器增益和放大器增益以提高强度，对于检测器偏移来说，抑制背景噪音。通过选择 “起始标记 (Mark first)”，定义并标记起始光学切片 (“切片”) 的位置。类似地，通过选择 “最末标记 (Mark last)”，定义并标记结束光学切片的位置。通过设置 “X:Y:Z: = 1:1:1”，定义切片的时间间隔和数量，以便如 X 和 Y 分辨率一样设置 Z 轴的分辨率。然后在用作备份的 CD-R 中捕获、保存以及记录一系列的大量共焦图像。可通过使用 LSM 图像浏览器 (Carl Zeiss) 的 standalone 版本，以 TIFF 格式 (16-bit 原始图像) 输出共焦图像用于在其它图像分析软件中的分析，例如，MetaMorph (Universal Imaging, USA)。

f. 整封固的原位杂交

除了进行视觉筛选外，可通过特异性蛋白质的 RNA 或者抗体染色的原位杂交检测硬骨鱼组织中的特异性分子改变。可使用 Roche 的地高辛标记试剂盒标记反义 RNA 探针。通过在 50 μ l 混合物 (cocktail) 中用适当的限制酶将质粒 pBlueScript (10 μ g) 线性化，合成反义探针。使用琼脂糖凝胶电泳作为监控以确保质粒被完全消化，使用等体积的酚/氯仿 (Gibco BRL, Life Technology, USA) 终止反应。然后在室温下，将混合物在实验台顶部微型离心机上全速 (13,000 rpm) 离心 3 分钟。将水相转移到新管中，随后添加 1/10 体积 3M 乙酸钠 (pH 8.0) (Sigma, USA) 和 2 体积的乙醇 (Sigma, USA)，室温下离心 30 分钟。然后将沉淀用 70% 乙醇洗涤并放在实验台上进行风干，在适当量的无 RNA 酶 (DEPC; Sigma, USA) 的水中重悬，配制成 0.5 μ g/ μ l 的浓度。

然后在转录混合物中用 T3 RNA 聚合酶或 T7 RNA 聚合酶转录线性化的质粒，在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时用于制备无放射性的地高辛转录本。通过添加 1 μ l EDTA (0.5M, pH8.0) 终止反应。添加 2.5 μ l LiCl (4M) 和 75 μ l 冷乙醇，通过在 4 $^{\circ}$ C 全速离心 30 分钟沉淀 RNA 探针。然后将沉淀用 70% 乙醇洗涤，放置在实验台上进行风干并在无 RNA 酶 (DEPC) 的水中重悬。

可如 Westerfield (1994) 所述，经过修改 (Cheng 等 2000) 的方法进行全封固的原位杂交：通过使用一双镊子将 24hpf 的胚胎脱卵壳 (dechorionated)，并在 4 $^{\circ}$ C 在具有 4% 低聚甲醛 (PFA) 和 1% Triton X-100 的 PBS (磷酸缓冲盐) 中过夜固定。简要地，然后将质粒线性化和用 T7 聚合酶和地高辛-11-UTP (Roche, Basel, Switzerland) 转录，合成反义 RNA。将胚胎转移到甲醇中并贮藏在 -20 $^{\circ}$ C 以提高渗透性。然后洗涤并在 65 - 70 $^{\circ}$ C 用反义探针原位杂交溶液 (50% 甲酰胺、5 x SSC、50 μ g/ml 肝素、500 μ g/ml tRNA、9mM 柠檬酸，pH 6.0 和 0.1% Tween 20) 过夜孵育前，用溶于 PBT (具有 0.1% Tween 20 的 PBS) 的 10 μ g/ml 蛋白酶 K 稍消化。杂交后，用高严格条件洗涤除去探针。简要地，将胚胎在 50% 甲酰胺:50% (2 x SSC/0.1%) Tween-20 中洗涤两次，每次 30 分钟。随后在 65 $^{\circ}$ C 用 2x SSC/0.1% Tween-20 洗涤 15 分钟，在 65 $^{\circ}$ C 用 2 x SSC 和 0.2 x SSC 各洗涤两次，每次 30 分钟。随后于 4 $^{\circ}$ C 在旋转器 (nutator) 上，将胚胎与预先吸收的绵羊抗地高辛碱性磷酸酶 Fab 片段 (Roche, Basel, Switzerland) 过夜孵育。用 PBT 洗

涤 6 次后, 添加 5-溴-4-氯吡啶磷酸作为底物以及氮蓝四唑(Roche, Basel, Switzerland)作为偶联剂, 用于染色。

g. 凋亡

将用试剂处理过的胚胎(15个重复实验)汇集到一个用0.3%琼脂糖包被的90-mm培养皿内并在胚胎培养基中洗涤3次。在立体显微镜下通过一双镊子撕去绒毛膜进行脱去卵壳。然后将胚胎转移到装有8-ml胰蛋白酶溶液(溶于0.14M NaCl、0.05M KCl、0.005M葡萄糖、0.007M NaHCO₃和0.7mM EDTA溶液的0.5 mg/ml胰蛋白酶)的15-ml培养管中。然后将胚胎通过狭窄内径 Pasteur 吸液管磨碎, 直到在解剖显微镜下进行连续检查发现它们已经解离为止。然后将细胞悬液在4°C以1000X g离心7分钟。弃去上清液, 将细胞在5ml PBS中重悬以洗涤掉胰蛋白酶。然后将它们再次在4°C以1000X g离心7分钟, 随后在5ml PBS中重悬以及在4°C以1000X g离心7分钟。弃去水溶液, 然后将沉淀在200 μl PBS中完全重悬。在这之后, 添加2 ml 70%乙醇并将混合物在-20°C过夜孵育。然后将样本在4°C以1000X g离心7分钟, 向沉淀中加入100 μl 碘化丙锭(400 μg/ml)和100 μl RNA酶(1 mg/ml), 在流式细胞仪分析前在28.5°C孵育30分钟。

h. 心脏毒性

通过琼脂糖固定所制备的用于微血管造影术的胚胎。制备琼脂糖溶液(0.3%)并在加热块上保持大约45°C。通过使用具有宽开口的 Pasteur 移液管将胚胎转移到清洁的载玻片上。为了避免卵黄囊破损, 在向胚胎添加预热的0.3%琼脂糖前, 向胚胎添加一小滴溶液。恰好在琼脂糖变硬前, 用27G针将胚胎置于它们的侧面。琼脂糖变硬后, 在具有与配备了视频抓拍装置的个人电脑或者数字视频相机连接的CCD照相机的解剖显微镜下, 检查尾部区域的循环。在应用数字视频相机的情况下, 将存储在迷你DV带中的数据经i-Link连接转移到个人电脑中并且以AVI格式保存用于视频图像分析。视频图像分析后, 获得血细胞运动的功率谱数据。两个参数源于功率谱。代表心率的第一个参数是基本频率成分, 其是具有最大功率值的频率值。第二个参数是基本频率成分的功率值与整个功率谱的总功率值之比。该比率与心脏搏动节律性相关。

2. 结果

a. 层次 1

总的来说,在层次 1 中已经筛选了 1431 个单个化合物,107 个不常见的草药和 13 个配方。这些试剂选自中医药书籍。在 1431 个化合物中,有 11 个至少在所检验的浓度之一显示抗血管发生调节活性。抗血管发生的现象是缺乏至少一个节间血管。在 107 个草药中,有 11 个至少在所检验的浓度之一显示抗血管发生调节活性。在 13 个所检验的配方中,有 4 个至少在所检验的浓度之一显示抗血管发生调节活性,而有 3 个至少在所检验的浓度之一显示前-血管发生调节活性。从不同供应商购买的同一试剂也显示相似的反应。

b. 层次 2

29 个试剂通过第一个层次并在第二个层次中进行检验。已经进行了一般毒性试验。然后确定每个试剂的 NOAEC。在它们中,有 6 个不能确定 NOAEC 的试剂(4 个草药和 2 个配方),因此不在第三个层次中对它们进行进一步检验。

c. 层次 3

进行 NOAEC 时的毒性试验。所有 11 个化合物在它们的 NOAEC 时均在硬骨鱼胚胎中诱导异位凋亡(ectopic apoptosis)并且细胞毒性试验中失败。因此,它们在第三个层次中失败并且没有进行另外的毒性试验。7 个草药中的 5 个在它们的 NOAEC 时诱导异位凋亡,而剩余的 2 个通过了细胞毒性试验。在这两个中,仅有一个显示抗血管发生活性并且在其 NOAEC 时通过了器官特异性毒性试验和心脏毒性。此外,5 个配方中的 3 个在它们的 NOAEC 时不诱导异位凋亡并且进行了另外的试验,而剩余的两个在细胞毒性试验中失败。在通过细胞毒性试验的 3 个中,一个在其 NOAEC 时不能在脉管系统中诱导任何改变。但是,有 1 个在其 NOAEC 时显示抗血管发生活性,而有 1 个显示前-血管发生活性。这 2 个配方通过了器官特异性毒性试验和心脏毒性试验。因此,有 3 个试剂,包括 1 个草药和 2 个配方,通过了所有的 3 个层次的检验。

参考文献

Cross, L. M., Cook, M. A., Lin, S., Chen, J. N. and Rubinstein, A. L. (2003). Rapid Analysis of Angiogenesis Drugs in a Live Fluorescent Zebrafish Assay. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 911-912.

Epstein, F. H. and Epstein, J. A. (2005). A Perspective on the Value of Aquatic Models in Biomedical Research. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **230**, 1-7.

Goldsmith, P. (2004). Zebrafish as a Pharmacological Tool: The how, Why and when. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 504-512.

Hallare, A., Nagel, K., Kohler, H. R. and Triebkorn, R. (2006). Comparative Embryotoxicity and Proteotoxicity of Three Carrier Solvents to Zebrafish (*Danio Rerio*) Embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **63**, 378-388.

Hasan, J., Shnyder, S. D., Bibby, M., Double, J. A., Bicknel, R. and Jayson, G. C. (2004). Quantitative Angiogenesis Assays *in Vivo*--a Review. *Angiogenesis* **7**, 1-16.

Kidd, K. R. and Weinstein, B. M. (2003). Fishing for Novel Angiogenic Therapies. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 585-594.

Lawson, N. D. and Weinstein, B. M. (2002). In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development using Transgenic Zebrafish. *Dev. Biol.* **248**, 307-318.

Liekens, S., De Clercq, E. and Neyts, J. (2001). Angiogenesis: Regulators and Clinical Applications. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 253-270.

Parng, C., Seng, W. L., Semino, C. and McGrath, P. (2002). Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. *Assay Drug Dev. Technol.* **1**, 41-48.

Risau, W. (1997). Mechanisms of Angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.

Serbedzija, G. N., Flynn, E. and Willett, C. E. (1999). Zebrafish Angiogenesis: A New Model for Drug Screening. *Angiogenesis* **3**, 353-359.

Staton, C. A., Stribbling, S. M., Tazzyman, S., Hughes, R., Brown, N. J. and Lewis, C. E. (2004). Current Methods for Assaying Angiogenesis *in Vitro* and *in Vivo*. *Int. J. Exp. Pathol.* **85**, 233-248.

Taraboletti, G. and Giavazzi, R. (2004). Modelling Approaches for Angiogenesis. *Eur. J. Cancer* **40**, 881-889.

Westerfield, M. (1995). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory use of Zebrafish*. Eugene: Univ. of Oregon Press.

专利名称(译)	使用硬骨鱼胚胎筛选具有血管调节活性的试剂的方法		
公开(公告)号	CN101448952A	公开(公告)日	2009-06-03
申请号	CN200780015786.2	申请日	2007-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	香港城市大学		
申请(专利权)人(译)	香港城市大学		
当前申请(专利权)人(译)	香港城市大学		
[标]发明人	郑淑娴 陈保国		
发明人	郑淑娴 陈保国		
IPC分类号	C12Q1/00 G01N31/00 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/4603 G01N33/5088 G01N33/5014 G01N2333/515		
代理人(译)	郭文洁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种使用透明的硬骨鱼胚胎作为模型，筛选具有血管发生调节活性的化合物、草药提取物或配方中草药组合的提取物的3层次系统的方法。