



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106442960 B

(45)授权公告日 2018.10.12

(21)申请号 201610956504.X

(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 106442960 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(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 刘洪翠 柯越海 朱晓宇 张雪

黄燕烽 程洪强 李春启

(51)Int.Cl.

G01N 33/50(2006.01)

审查员 周洋

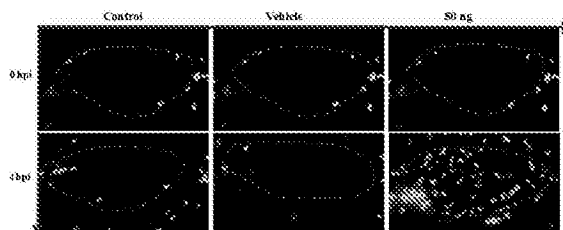
权利要求书2页 说明书14页 附图9页

(54)发明名称

用斑马鱼鳃损伤炎症模型评价肺损伤治疗  
剂与诱导剂的方法

(57)摘要

本发明提供了斑马鱼鳃损伤炎症模型的建立方法,以及应用该斑马鱼鳃损伤炎症模型评价肺损伤治疗剂与诱导剂功效的方法。本发明提供的斑马鱼鳃损伤炎症模型,具有简便、快速、经济、高效、高通量等优点;能准确反映肺损伤治疗剂或诱导剂在体内的真实情况,可实现在体内高通量评价药物对治疗急性肺损伤炎症的功效,其评价药物功效的方法具有可靠、快速、高效、低廉、高性价比等优点,意义重大。



1. 一种斑马鱼鳔损伤炎症模型的建立方法,包括如下步骤:

(1) 斑马鱼最佳发育阶段的确定

取中性粒细胞绿色荧光转基因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微孔板;

根据不同的发育阶段将对应的微孔板均设为3个实验组:1个为诱导剂处理组,该组中对斑马鱼鳔腔注射单浓度的诱导剂;1个为溶剂处理组,该组中对斑马鱼鳔腔注射等体积的PBS;1个为空白对照组,该组中对斑马鱼不进行任何处理;然后,各实验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,用立体荧光显微镜对斑马鱼鳔位置拍照并保存,对斑马鱼鳔位置聚集的中性粒细胞数量进行定性和定量评价,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4.5~6dpf的斑马鱼;所述最佳发育阶段的斑马鱼为5dpf的斑马鱼;

(2) 诱导剂最佳给药浓度的确定

取5dpf的斑马鱼移入微孔板;

设置空白对照组、溶剂注射组和不同给药浓度的诱导剂处理组:空白对照组对斑马鱼不进行任何处理,溶剂注射组对斑马鱼鳔腔注射PBS,诱导剂处理组对斑马鱼鳔腔分别注射等体积但不同给药浓度的诱导剂;然后,各实验组均加入相同体积的养殖用水,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,用立体荧光显微镜对斑马鱼鳔位置拍照并保存,对斑马鱼鳔位置聚集的中性粒细胞数量进行定性和定量评价,确定诱导剂的最佳给药浓度;

所述诱导剂的给药浓度为1~10mg/mL,所述诱导剂的最佳给药浓度为10mg/mL;

(3) 构建斑马鱼鳔损伤炎症模型

取5dpf的斑马鱼移入微孔板;

设置3个实验组:1个为诱导剂处理组,该组中对斑马鱼鳔腔注射10mg/mL的诱导剂,1个为溶剂注射组,该组中对斑马鱼鳔腔注射等体积的PBS;然后,各实验组均加入相同体积的养殖用水,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,用立体荧光显微镜对斑马鱼鳔位置拍照并保存,对斑马鱼鳔位置聚集的中性粒细胞数量进行统计分析,根据统计学结果,判断已建立了斑马鱼鳔损伤炎症模型。

2. 根据权利要求1所述的斑马鱼鳔损伤炎症模型的建立方法,其特征在于,所述的养鱼用水条件为: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。

3. 根据权利要求1所述的斑马鱼鳔损伤炎症模型的建立方法,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℃下培养4h。

4. 一种如权利要求1~3任一所述的斑马鱼鳔损伤炎症模型的用途,其特征在于,所述模型用于评价引起肺损伤毒性的诱导剂,所述的诱导剂为能够诱发肺损伤的药物或化学试剂,包括但不限于LPS、Poly I/C。

5. 一种用如权利要求1~3任一所述的斑马鱼鳃损伤炎症模型评价引起肺损伤毒性的诱导剂的方法,包括如下步骤:

(1) 斑马鱼选取

将处于5dpf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微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼;规格为6、12、24、48、96或384孔;

(2) 诱导剂处理

设置实验组:1个溶剂对照组、1个空白对照组、不同注射剂量的化合物处理组;空白对照组对斑马鱼不进行任何处理,溶剂注射组对斑马鱼鳃腔注射PBS,化合物处理组对斑马鱼鳃腔分别注射0.1、10、100、500和1000ng的诱导剂;然后,各实验组均加入相同体积的养殖用水,在相同温度下恒温培养;

(3) 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

当诱导剂处理至实验终点后,用立体荧光显微镜拍照并保存;观察对比各实验组斑马鱼鳃位置中性粒细胞聚集,定性评价肺损伤诱导剂诱导的鳃损伤;并采集、统计斑马鱼中性粒细胞数量,定量评价肺损伤诱导剂引起的鳃损伤程度,鳃损伤程度以鳃炎症诱发倍数表示,计算公式(b)为:

$$\text{鳃损伤炎症诱发倍数} = (N_{\text{化合物组}} - N_{\text{溶剂对照组}}) / N_{\text{溶剂对照组}};$$

根据统计学结果,评价肺损伤诱导剂引起的鳃损伤毒性程度。

6. 一种如权利要求1~3任一所述的斑马鱼鳃损伤炎症模型的用途,其特征在于,所述模型用于评价治疗肺损伤的治疗剂,所述的治疗剂为能够治疗肺损伤的药物或化学试剂,包括但不限于PD98059、LY294002、sp600125、PHPS1。

7. 一种用如权利要求1~3任一所述的斑马鱼鳃损伤炎症模型评价治疗肺损伤的治疗剂的方法,包括如下步骤:

(1) 斑马鱼选取

将处于5dpf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微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼;规格为6、12、24、48、96或384孔;

(2) 诱导剂处理

空白对照组对斑马鱼不做任何处理,溶剂对照组对斑马鱼鳃腔注射5nL PBS,其它组斑马鱼均鳃腔注射50ng诱导剂;

(3) 肺损伤治疗剂处理

设置实验组:1个空白对照组、1个溶剂对照组、1个模型对照组、不同浓度的化合物处理组;化合物处理组中斑马鱼以水溶或注射的方式给予0.1 $\mu$ M、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、100 $\mu$ M、1000 $\mu$ M的治疗剂;模型对照组,溶剂对照组和空白对照组斑马鱼不做任何处理;然后,各实验组均加入相同体积的养殖用水,在相同温度下恒温培养;

(4) 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

当治疗剂处理至实验终点后,用立体荧光显微镜拍照并保存;观察对比各实验组斑马鱼鳃位置中性粒细胞聚集,定性评价肺损伤治疗剂的抗炎作用;并采集、统计斑马鱼中性粒细胞数量,定量评价肺损伤治疗剂的抗炎作用,计算公式(a)为:

$$\text{抗炎作用}(\%) = (N_{\text{模型对照组}} - N_{\text{化合物处理组}}) / N_{\text{模型对照组}} \times 100\%;$$

根据统计学结果,评价肺损伤治疗剂的治疗功效。

## 用斑马鱼鳃损伤炎症模型评价肺损伤治疗剂与诱导剂的方法

### 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、高通量的斑马鱼鳃损伤炎症模型的应用,尤其是用该斑马鱼模型评价肺损伤治疗剂功效与诱导剂毒性的方法。

### 背景技术

[0002] 急慢性肺疾病,特别是肺损伤、肺部炎症、肺部肿瘤是严重危害人类健康的疾病之一。大气细颗粒物(PM<sub>2.5</sub>)、吸烟、放射、化疗等物理化学因素是引起急慢性肺损伤和肺癌的危险因素,其中PM<sub>2.5</sub>/吸烟等原因引起的慢性阻塞性肺损伤是一种不完全可逆的、对有害颗粒和气体产生异常炎症应答的、气流限制性呼吸系统疾病,可增加肺癌发生的风险,现今成为发病率较高的疾病之一。世界卫生组织(World Health Organization,WHO)报告指出,在全球范围内,空气污染导致了5%的食管癌、支气管癌和肺癌的发生,2%的心肺死亡率,以及1%呼吸系统感染的死亡率,相当于80万人死亡和790万人肺损伤。PM<sub>2.5</sub>表面吸附了大量有毒有害物质,可通过呼吸而沉积在肺泡,引起肺损伤。世界卫生组织、美国环境保护署等诸多机构已经公布PM<sub>2.5</sub>是对人体健康危害最大且代表性最强的大气污染物。目前肺损伤的治疗主要有:通气供氧、选用抗生素、糖皮质激素、外源性肺表面活性物质、血管扩张剂、相关酶等。但现有的肺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,因此开发新的肺损伤治疗药物显得非常必要<sup>[1-2]</sup>。

[0003] 药物筛选是发现、开发药物过程中一个重要的环节,实验肺损伤模型的建立对评价与筛选肺损伤治疗药物至关重要。目前肺损伤动物模型主要被用来研究肺损伤的机制,但这些动物模型大多数是根据已知的诱发肺损伤的危险因子复制的,例如脓毒血症、继发于骨折的脂肪栓塞、吸入酸性物质、肺或末端血管床的缺血-再灌注以及其他的临床危险因素,但所有这些模型都不可能完全充分复制人类肺损伤的特征。理想的肺损伤实验动物模型应能够复制人类肺损伤发生的机制和后果。但是目前为止没有任何一个实验动物模型可以完全复制人类肺损伤的所有特征,大多肺损伤实验动物模型只是针对人类肺损伤的单个或少数几个病理生理特征进行复制,如换气功能异常、肺顺应性下降、肺实质损伤和肺泡毛细血管膜通透性增加等,并且这些动物模型均存在造模操作复杂、技术要求高、手术创伤大、肺损伤发生率低、并发症和死亡率高、模型建立不稳定、可重复性差等缺点<sup>[3-4]</sup>,不利于后续肺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。体外细胞模型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肺损伤治疗药物的动物模型具有重要的应用价值。

[0004] 肺泡作为一个基本单元,对外界致病菌的攻击更为敏感<sup>[5]</sup>,细菌和病毒对肺泡感染以及进入肺泡的污染空气中的颗粒均可引起ALI/ARDS疾病<sup>[6-8]</sup>,而肺泡被感染后,会引起中性粒细胞的聚集,随后中性粒细胞会释放颗粒蛋白或活性氧簇(ROS)等物质<sup>[9]</sup>,这些物质会进一步加快ALI/ARDS的进程。研究发现,在动物急性肺损伤疾病模型中,通过干扰中性粒

细胞趋化、迁移、粘附和细胞渗出等行为,可以缓解动物的病情进展<sup>[10-12]</sup>。目前对急性肺损伤的研究虽已有几十年的历史,但对于中性粒细胞在急性肺损伤进程中浸润的机理尚不明确,但在某种程度上,主要是因为动物模型无法为研究者提供对肺泡中性粒细胞行为进行动态观察的便利条件<sup>[13]</sup>。

[0005] 斑马鱼是一种新颖的脊椎模式动物,与人类基因同源性高达85%,其信号传导通路与人类基本近似,生物结构和生理功能与哺乳动物高度相似,具有体积小(可用微孔板分析)、发育周期短、体外受精、透明(可直接用肉眼和解剖显微镜观察)、单次产卵数较高等特点<sup>[14]</sup>。斑马鱼模型既具有体外实验快速、高效、低廉、用药量小等优势,又具有哺乳类动物实验预测性强、可比度高、可观察多个器官等优点,近年已在化合物药效、毒性评价中得到广泛应用<sup>[15,16]</sup>。

[0006] 鱼鳔作为鱼类浮力调节的重要器官,已经被大量的研究在解剖学<sup>[20]</sup>、形态学<sup>[21]</sup>和转录组学<sup>[22]</sup>等不同水平证实同陆生动物的肺为同源器官。2013和2014年,Cass和Robertson等分别在斑马鱼鳔上检测到了肺表面活性物质<sup>[21,23]</sup>;虽然已经有文献报道,斑马鱼鳔可以应用于一些人类疾病的基础研究,比如2013年,Gratacap等人通过研究斑马鱼对念珠菌感染鱼鳔后的反应,探究了白色念珠菌、上皮细胞与免疫细胞三者之间的交互关系;2015年Voelz等人通过斑马鱼对毛霉菌孢子感染斑马鱼后脑室和鳔后的反应,探索了毛霉菌孢子与机体免疫系统的交互作用;然而,迄今为止,用斑马鱼鳔作为动物模型开展肺疾病研究的相关文献尚未见报道。故,目前评价肺损伤治疗剂与诱导剂的方法,仍旧是基于传统的实验动物模型(如鼠类、犬类等),尚未见有基于斑马鱼鳔损伤炎症模型进行药物评价的文献报道。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于:提供一种斑马鱼鳔损伤炎症模型的建立方法,同时提供一种利用该模型评价肺损伤治疗剂与诱导剂功效的方法。本发明提供的方法具有简便、快速、经济、高效、高通量等优点。

[0008] 为实现上述发明目的,本发明采取了以下技术方案:

[0009] 内容一:一种斑马鱼鳔损伤炎症模型的建立方法,包括如下步骤:

[0010] (1) 斑马鱼最佳发育阶段的确定

[0011] 取4~5对中性粒细胞绿色荧光转基因品系斑马鱼(MP0)亲本交配,按照Westerfield<sup>[26]</sup>的方法孵化胚胎;选择不同发育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;

[0012] 根据不同的发育阶段将对应的微孔板均设为3个实验组:1个为诱导剂处理组,该组中对斑马鱼鳔腔注射单浓度的诱导剂;1个为溶剂处理组,该组中对斑马鱼鳔腔注射等体积的PBS;1个为空白对照组,该组中对斑马鱼不进行任何处理;然后,各实验组均加入相同体积的养鱼用水,在相同温度下恒温培养;

[0013] 当诱导剂处理斑马鱼至实验终点后,用立体荧光显微镜对斑马鱼鳔位置拍照并保存,对斑马鱼鳔位置聚集的中性粒细胞数量进行定性和定量评价,确定斑马鱼的最佳发育阶段;

[0014] 所述不同发育阶段的斑马鱼为4.5~6dpf的斑马鱼;所述最佳发育阶段的斑马鱼为5dpf的斑马鱼;

[0015] (2) 诱导剂最佳给药浓度的确定

[0016] 取5dpf的斑马鱼移入微孔板;

[0017] 设置空白对照组、溶剂注射组和不同给药浓度的诱导剂处理组:空白对照组对斑马鱼不进行任何处理,溶剂注射组对斑马鱼鳃腔注射PBS,诱导剂处理组对斑马鱼鳃腔分别注射等体积但不同给药浓度的诱导剂;然后,各实验组均加入相同体积的养殖用水,在相同温度下恒温培养;

[0018] 当诱导剂处理斑马鱼至实验终点后,用立体荧光显微镜对斑马鱼鳃位置拍照并保存,对斑马鱼鳃位置聚集的中性粒细胞数量进行定性和定量评价,确定诱导剂的最佳给药浓度;

[0019] 所述诱导剂的给药浓度为1~10mg/mL,所述诱导剂的最佳给药浓度为10mg/mL;

[0020] (3) 构建斑马鱼鳃损伤炎症模型

[0021] 取5dpf的斑马鱼移入微孔板;

[0022] 设置3个实验组:1个为诱导剂处理组,该组中对斑马鱼鳃腔注射10mg/mL的诱导剂,1个为溶剂注射组,该组中对斑马鱼鳃腔注射等体积的PBS;然后,各实验组均加入相同体积的养殖用水,在相同温度下恒温培养;

[0023] 当诱导剂处理斑马鱼至实验终点后,用立体荧光显微镜对斑马鱼鳃位置拍照并保存,对斑马鱼鳃位置聚集的中性粒细胞数量进行统计分析,根据统计学结果,判断已建立了斑马鱼鳃损伤炎症模型。

[0024] 优选的,养鱼用水条件为: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。

[0025] 优选的,恒温培养条件为:微孔板置于恒温培养箱中,在28℃下培养4h。

[0026] 内容二:一种应用斑马鱼鳃损伤炎症模型、评价肺损伤诱导剂毒性的方法,包括如下步骤:

[0027] (1) 斑马鱼选取

[0028] 将处于5dpf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微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼;规格可以为6、12、24、48、96或384孔。

[0029] (2) 诱导剂处理

[0030] 设置实验组:1个溶剂对照组、1个空白对照组、不同注射剂量的化合物处理组;空白对照组对斑马鱼不进行任何处理,溶剂注射组对斑马鱼鳃腔注射PBS,化合物处理组对斑马鱼鳃腔分别注射0.1、10、100、500和1000ng的诱导剂;然后,各实验组均加入相同体积的养殖用水,在相同温度下恒温培养;

[0031] (3) 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

[0032] 当诱导剂处理至实验终点后,用立体荧光显微镜拍照并保存;观察对比各实验组斑马鱼鳃位置中性粒细胞聚集,定性评价肺损伤诱导剂诱导的鳃损伤;并采集、统计斑马鱼中性粒细胞数量,定量评价肺损伤诱导剂引起的鳃损伤程度,鳃损伤程度以鳃炎症诱发倍数表示,计算公式(b)为:

[0033] 鳃损伤炎症诱发倍数 =  $(N_{\text{化合物组}} - N_{\text{溶剂对照组}}) / N_{\text{溶剂对照组}}$

[0034] (4) 统计学分析肺损伤诱导剂的毒性程度

[0035] 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。根据统计学结果, 评价肺损伤诱导剂引起的鳃损伤毒性程度。

[0036] 优选的, 诱导剂为能够诱发肺损伤的药物或化学试剂, 包括但不限于 LPS、Poly I/C。

[0037] 内容三: 一种应用斑马鱼鳃损伤炎症模型、评价肺损伤治疗剂功效的方法, 包括如下步骤:

[0038] (1) 斑马鱼选取

[0039] 将处于 5dpf 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微孔板中, 根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼; 规格可以为 6、12、24、48、96 或 384 孔。

[0040] (2) 诱导剂处理

[0041] 空白对照组对斑马鱼不做任何处理, 溶剂对照组对斑马鱼鳃腔注射 5nL PBS, 其它组斑马鱼均鳃腔注射 50ng 诱导剂;

[0042] (3) 肺损伤治疗剂处理

[0043] 设置实验组: 1 个空白对照组、1 个溶剂对照组、1 个模型对照组、不同浓度的化合物处理组; 化合物处理组中斑马鱼以水溶或注射的方式给予 0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1000  $\mu$ M 的治疗剂; 模型对照组, 溶剂对照组和空白对照组斑马鱼不做任何处理; 然后, 各实验组均加入相同体积的养殖用水, 在相同温度下恒温培养;

[0044] (4) 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

[0045] 当治疗剂处理至实验终点后, 用立体荧光显微镜拍照并保存; 观察对比各实验组斑马鱼鳃位置中性粒细胞聚集, 定性评价肺损伤治疗剂的抗炎作用; 并采集、统计斑马鱼中性粒细胞数量, 定量评价肺损伤治疗剂的抗炎作用, 计算公式 (a) 为:

[0046] 抗炎作用 (%) =  $(N_{\text{模型对照组}} - N_{\text{化合物处理组}}) / N_{\text{模型对照组}} \times 100\%$ ;

[0047] (5) 统计学分析肺损伤治疗剂的治疗功效

[0048] 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。根据统计学结果, 评价肺损伤治疗剂的治疗功效。

[0049] 优选的, 治疗剂为能够治疗肺损伤的药物或化学试剂, 包括但不限于 PD98059、LY294002、sp600125、PHPS1。

[0050] 与现有技术相比, 本发明建立的斑马鱼鳃损伤炎症模型, 具有如下优点:

[0051] (1) 活体内: 实验材料为斑马鱼, 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。

[0052] (2) 直观: 实验材料为中性粒细胞绿色荧光转基因斑马鱼, 斑马鱼经药物处理后, 借助荧光显微镜, 可以无创伤地在实验设置的任何时间点实时动态观察中性粒细胞的行为学特点; 而哺乳动物根本不可能完成这一操作。

[0053] (3) 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致敏性

评价的理想模型。

[0054] (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。

[0055] (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。

[0056] (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。

[0057] (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。

[0058] (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。

[0059] (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。

[0060] 与现有技术相比,本发明基于斑马鱼鳃损伤炎症模型的评价肺损伤治疗剂与诱导剂的方法,具有如下优点:

[0061] (1) 目前肺损伤动物模型主要被用来研究肺损伤的机制,但这些动物模型大多数是根据已知的诱发肺损伤的危险因子复制的,并且这些动物模型均存在造模操作复杂、技术要求高、手术创伤大、肺损伤发生率低、并发症和死亡率高、模型建立不稳定、可重复性差等缺点,不利于后续肺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;而体外细胞模型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。

[0062] (2) 本发明中,发明人在建立了斑马鱼鳃损伤炎症模型的基础上,又提供了一种利用该模型评价肺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,能准确反映药物在体内的真实情况,可实现在体内高通量评价药物对治疗急性肺损伤炎症的功效,具有可靠、快速、高效、低廉、高性价比等优点。

[0063] (3) 本发明的评价方法,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

[0064] 图1:图像定性评价确定斑马鱼最佳发育阶段

[0065] 图2:LPS对不同阶段斑马鱼诱发的鳃损伤炎症反应定量评价

[0066] 图3:通过图像分析定性确定斑马鱼鳃炎症模型

[0067] 图4:剂量及时间依赖性的LPS诱导的鳃损伤炎症反应定量分析

[0068] 图5:斑马鱼鳃光镜观察

[0069] 图6:斑马鱼鳃电镜观察上皮细胞损伤

[0070] 图7:斑马鱼鳃电镜观察线粒体损伤



- [0071] 图8:LPS在注射后不同时间点对LI-1 $\beta$ 表达水平的影响
- [0072] 图9:LPS在注射后不同时间点对LI-6表达水平的影响
- [0073] 图10:通过图像分析定性确定斑马鱼鳔损伤炎症模型
- [0074] 图11:50ng LPS诱导的鳔损伤炎症定量分析
- [0075] 图12:通过图像分析定性确定PD98059对斑马鱼鳔损伤炎症模型的抗炎作用
- [0076] 图13:PD98059显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳔损伤炎症反应
- [0077] 图14:通过图像分析定性确定LY294002对斑马鱼鳔损伤炎症模型的抗炎作用
- [0078] 图15:LY294002显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳔炎症反应
- [0079] 图16:通过图像分析定性确定sp600125对斑马鱼鳔损伤炎症模型的抗炎作用
- [0080] 图17:sp600125显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳔炎症反应
- [0081] 图18:通过图像分析定性确定PHPS1对斑马鱼鳔损伤炎症模型的抗炎作用
- [0082] 图19:PHPS1显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳔损伤炎症反应
- [0083] 图20:通过图像分析定性确定Poly I/C引起斑马鱼鳔损伤炎症反应
- [0084] 图21:Poly I/C可诱发斑马鱼鳔炎症反应

### 具体实施方式

[0085] 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。

[0086] 实施例1 确定斑马鱼最佳发育阶段

[0087] 1 斑马鱼选取

[0088] 取4~5对中性粒细胞绿色荧光转基因品系斑马鱼(MPO)亲本交配,按照Westerfield<sup>[26]</sup>的方法孵化胚胎。斑马鱼发育到4.5dpf时,前鳔已经充气形成。将4.5dpf、5dpf、6dpf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。(注:本发明中的dpf=day post fertilization,中文是指斑马鱼受精后天数,如5dpf是指斑马鱼受精后五天。)

[0089] 2 诱导剂LPS处理

[0090] 设置3个实验组(每组分别为4.5dpf、5dpf、6dpf的斑马鱼),每个实验组包括1个诱导剂处理组、1个溶剂对照组和1个空白对照组。诱导剂处理组中斑马鱼鳔腔注射50ng LPS;溶剂对照组中斑马鱼鳔腔注射等体积PBS(即PBS与LPS等量);空白对照组中斑马鱼不做任何处理;每个实验组按照微孔板的规格均加入相等体积的养殖用水,并将微孔板置于28℃恒温培养箱中培养4h。

[0091] 3 对鳔位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

[0092] 诱导剂LPS处理斑马鱼至实验终点后,利用立体荧光显微镜对个处理组斑马鱼拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼鳔位置中性粒细胞聚集程度定性确定斑马鱼最佳发育阶段(见图1。)另一方面利用尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件进行图像分析,采集并统计斑马鱼鳔位置中性粒细胞数量,定量评价诱导剂LPS引起的鳔损伤程度,其鳔损伤程度计算公式见(b)。

[0093] 空白对照组斑马鱼鳔位置中性粒细胞数量基本没有。随着斑马鱼年龄的增加,诱

导剂LPS处理组斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量呈现先增加后降低的趋势,5dpf斑马鱼鳃损伤程度最大(见图2.)。

[0094] 统计学处理结果显示:4.5dpf、5dpf、6dpf的斑马鱼鳃损伤率分别为(69.97±3.69)%、(45.18±2.98)%、(30.39±1.23)% (见图2.),这表明随着斑马鱼年龄的增加,鳃损伤率呈现先增加后降低的趋势,5dpf的斑马鱼鳃损伤率最高。通过方差分析,诱导剂处理组的鳃损伤率明显高于溶剂对照组,差异有统计学意义( $p<0.05$ );5dpf的斑马鱼与4.5dpf和6dpf的斑马鱼鳃鞘损伤率相比, $p<0.05$ 。

[0095] 图1:图像定性评价确定斑马鱼最佳发育阶段

[0096] 其中,Control为空白对照组,Vehicle为溶剂对照组;5dpf斑马鱼经诱导剂处理后,鳃腔中性粒细胞聚集最密集,诱发强度最为激烈,4.5dpf和6dpf时,中性粒细胞聚集相对稀疏,诱发强度相对温和。

[0097] 图2:LPS对不同阶段斑马鱼诱发的鳃损伤炎症反应定量评价

[0098] 与模型对照组比较, $*p<0.001$ 。Control为空白对照组,Vehicle为溶剂对照组;5dpf斑马鱼经诱导剂处理后,鳃腔中性粒细胞聚集最密集,诱发强度最为激烈,诱发倍数高达13.8倍;4.5dpf和6dpf时,中性粒细胞聚集相对稀疏,诱发强度相对温和,诱发倍数分别为5.3和3.4。

[0099] 综上,确定斑马鱼的最佳发育阶段为5dpf。

[0100] 实施例2 确定诱导剂LPS最佳处理时间长度和注射剂量

[0101] 1 斑马鱼选取

[0102] 将5dpf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。

[0103] 2 化合物处理

[0104] 设置6个实验组:4个诱导剂LPS处理组、1个溶剂注射组、1个空白对照组。诱导剂组斑马鱼鳃腔分别注射不同剂量的LPS(脂多糖),注射剂量分别为5ng、12.5ng、25ng和50ng(浓度分别为1mg/mL、2.5mg/mL、5mg/mL和10mg/mL的LPS分别鳃腔注射5nL);溶剂注射组斑马鱼鳃腔注射5nL PBS;空白对照组斑马鱼不做任何处理。各实验组按照微孔板规格均加入相同体积的养殖用水,并将微孔板置于28℃恒温培养箱中培养不同时间(比如1h、2h、4h、8h、16h、24h等)。

[0105] 3 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

[0106] 诱导剂LPS处理斑马鱼至不同实验终点后,利用立体荧光显微镜对斑马鱼鳃位置拍照并保存;观察并统计斑马鱼鳃位置聚集的中性粒细胞数量(见图3.),对不同剂量的诱导剂LPS在注射后不同时间点(x hpi:x hours post injection,注射后x小时)诱发的鳃炎症反应进行定量评价(见图4.)。

[0107] 图3:通过图像分析定性确定斑马鱼鳃炎症模型

[0108] LPS注射组中性粒细胞聚集特点:1hpi~4hpi近血管端中性粒细胞数量逐渐变多,逐渐向鳃中央迁移;4hpi和8hpi达到高峰;16hpi~24hpi中性粒细胞在中央位置逐渐减少,最后在近血管端位置接近消失。

[0109] 图4:剂量及时间依赖性的LPS诱导的鳃损伤炎症反应定量分析

[0110] 与溶剂对照组比较, $*p<0.001$ 。1hpi~4hpi斑马鱼鳃位置中性粒细胞显著增加,

呈现剂量正相关性;4hpi和8hpi达到高峰;16hpi~24hpi逐渐减少,但与溶剂对照组比较,仍有统计学差异。

[0111] 4 组织病理学检测(光镜观察)

[0112] 诱导剂LPS处理斑马鱼分别至1hpi、4hpi和24hpi后,分别采集斑马鱼样本,并用4%多聚甲醛固定24h,进行常规石蜡包埋、切片,H&E染色,在显微镜下观察并拍照,对斑马鱼进行鳃病理学分析(见图5.)。

[0113] 图5:斑马鱼鳃光镜观察

[0114] 50ng LPS注射组斑马鱼在1hpi和4hpi时,炎症细胞增多,24hpi鳃壁增厚,炎症细胞减少。

[0115] 5 超微病理学检测(电镜观察)

[0116] 诱导剂LPS处理斑马鱼分别至1hpi、4hpi和24hpi后,分别采集斑马鱼样本,用2.0% (体积分数)多聚甲醛和2.0% (体积分数)戊二醛溶液前固定24h(4℃)后,用磷酸缓冲液(pH 7.12)冲洗,然后置于1% (体积分数)锇酸中后固定2h,双蒸水冲洗后系列酒精脱水、包埋、超薄切片机切片(60~90nm),醋酸铀-柠檬酸铅复染,透射电镜下观察并拍照,对斑马鱼进行鳃电镜超微病理学分析(见图6.和图7.)。

[0117] 图6:斑马鱼鳃电镜观察上皮细胞损伤

[0118] 诱导剂50ng LPS在1hpi、4hpi和24hpi时,均引起不同程度的上皮细胞损伤(箭头所示)。

[0119] 图7:斑马鱼鳃电镜观察线粒体损伤

[0120] 诱导剂50ng LPS在4hpi和24hpi时,均引起不同程度的线粒体损伤(箭头所示)。

[0121] 6 炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-6表达水平分析

[0122] 诱导剂LPS处理斑马鱼至不同实验终点后,如1hpi (hours post injection)、2hpi、3hpi、4hpi、8hpi等,采集样本,利用q-PCR方法检测IL-1 $\beta$ 和IL-6的表达水平(见图8.和图9.)。

[0123] 图8:LPS在注射后不同时间点对IL-1 $\beta$ 表达水平的影响

[0124] 与溶剂对照组比较,\*\* $p < 0.001$ 。50ng LPS注射后0-1小时,IL-1 $\beta$ 表达呈现激增趋势,并在1hp达到峰值,随后1-24hpi呈现下降趋势,除在4hpi时与溶剂对照组比较,仍有统计学差异( $p < 0.001$ )外,在其余时间点均无统计学差异( $p > 0.05$ )。

[0125] 图9:LPS在注射后不同时间点对IL-6表达水平的影响

[0126] 与溶剂对照组比较,\* $p < 0.01$ 。50ng LPS注射后0-1小时,IL-6表达呈现激增趋势,并在1hp达到峰值,随后1-24hpi呈现下降趋势,除在4hpi时与溶剂对照组比较,仍有统计学差异( $p < 0.001$ )外,其余时间点均无统计学差异( $p > 0.05$ )。

[0127] 7 统计学分析

[0128] 利用JMP8.0软件对上述图像分析统计所得的鳃位置中性粒细胞数量、炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-6表达水平进行统计分析。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。

[0129] 综上,确定诱导剂LPS的最佳给药浓度为10mg/mL(相当于最佳注射剂量为50ng),最佳处理时间为4h。

[0130] 实施例3 斑马鱼鳃损伤炎症模型的构建方法

[0131] 基于实施例1和2中的斑马鱼最佳发育阶段、化合物最佳处理时间长度和注射剂量,通过优化LPS的浓度建立斑马鱼急性肺损伤炎症模型。设计方案如下:

[0132] 1 斑马鱼选取

[0133] 将5dpf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六孔板中,每孔30尾。

[0134] 2 诱导剂LPS处理

[0135] 设置3个实验组:1个诱导剂处理组、1个溶剂注射组、1个空白对照组。诱导剂组斑马鱼鳃腔分别注射50ng LPS (10mg/mL浓度注射5nL);溶剂对照组斑马鱼鳃腔注射5nL PBS;正常对照组斑马鱼不做任何处理。各实验组均按照微孔板规格加入相等体积的养殖用水,并将微孔板置于28℃恒温培养箱中培养4小时。

[0136] 3 统计分析斑马鱼鳃位置的中性粒细胞聚集数量,确认已建立斑马鱼鳃损伤炎症模型

[0137] 诱导剂LPS处理斑马鱼至4h后,利用立体荧光显微镜对斑马鱼鳃位置拍照并保存;观察并统计斑马鱼鳃位置聚集的中性粒细胞数量(图10.),对鳃位置聚集的中性粒细胞数量进行统计分析,根据统计学处理结果,判断已建立了斑马鱼鳃损伤炎症模型(图11.)。

[0138] 图10:通过图像分析定性确定斑马鱼鳃损伤炎症模型

[0139] 50ng的LPS鳃腔注射后4小时,诱发斑马鱼鳃位置中性粒细胞大量聚集。

[0140] 图11:50ng LPS诱导的鳃损伤炎症定量分析

[0141] 与溶剂对照组比较,\* $p < 0.001$ 。50ng LPS诱发斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量大量聚集,诱导倍数高达10倍,与溶剂对照组比较具有显著性统计学差异。

[0142] 实施例4 用斑马鱼鳃损伤炎症模型评价已知肺损伤治疗剂的功效

[0143] 实验一:评价已知肺损伤治疗剂PD98059的抗炎作用

[0144] PD98059可用于治疗急性肺损伤引起的炎症反应,是已知的肺损伤治疗剂。本实验通过实施例3构建的斑马鱼鳃损伤炎症模型,评价肺损伤治疗剂PD98059的抗炎作用。

[0145] 1 斑马鱼选取

[0146] 将5dpf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孔板中,每孔30尾。

[0147] 2 LPS处理

[0148] 正常对照组斑马鱼不做任何处理,溶剂对照组斑马鱼鳃腔注射5nL PBS,

[0149] 其它组斑马鱼均鳃腔注射50ng LPS,随后立即开展步骤3。

[0150] 3 PD98059处理

[0151] 设置8个实验组:5个化合物处理组、1个模型对照组、1个溶剂对照组、1个空白对照组。5个PD98059处理组分别为浓度为6.25、12.5、25、50和100 $\mu$ M的PD98059,每个实验组药液体积为3mL;模型对照组,溶剂对照组和空白对照组斑马鱼不做任何处理,每个实验组均加入3mL养殖用水。

[0152] 4 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

[0153] 诱导剂LPS和药物PD98059共同处理斑马鱼至4h后,利用立体荧光显微镜对斑马鱼鳃位置拍照并保存;观察并统计斑马鱼鳃位置聚集的中性粒细胞数量N(图12.),对PD98059对LPS诱导的斑马鱼鳃损伤炎症模型的抗炎作用进行量分析(图13.),并计算抗炎作用,抗

炎作用公式见(a)。

[0154] 图12:通过图像分析定性确定PD98059对斑马鱼鳃损伤炎症模型的抗炎作用

[0155] 其中,Control为正常对照组,Vehicle为溶剂对照组,Model为模型对照组。PD98059五个浓度组斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量,较模型对照组斑马鱼明显减少。

[0156] 图13:PD98059显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳃损伤炎症反应

[0157] 与模型对照组比较,\* $p < 0.001$ 。PD98059各浓度组斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量与模型组比较显著减少(图A),提示PD98059各浓度组均显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳃炎症反应,且抑制率呈现上图所示的剂量相关性增加(图B)。

[0158] 实验二:评价已知肺损伤治疗剂LY294002的抗炎作用

[0159] LY294002可用于治疗急性肺损伤引起的炎症反应,是已知的肺损伤治疗剂。本实验通过实施例3构建的斑马鱼鳃损伤炎症模型,评价肺损伤治疗剂LY294002的抗炎作用。

[0160] 1 斑马鱼选取

[0161] 将5dpf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孔板中,每孔30尾。

[0162] 2 诱导剂LPS处理

[0163] 正常对照组斑马鱼不做任何处理,溶剂对照组斑马鱼鳃腔注射5nL PBS,

[0164] 其它组斑马鱼均鳃腔注射50ng LPS,随后立即开展步骤3。

[0165] 3 LY294002处理

[0166] 设置6个实验组:3个化合物组合处理组、1个模型对照组、1个溶剂对照组、1个空白对照组。3个LY294002处理组分别为浓度为37.5、75和150 $\mu$ M的LY294002,每个实验组药液体积为3mL;模型对照组,溶剂对照组和空白对照组斑马鱼不做任何处理,每个实验组均加入3mL养殖用水。

[0167] 4 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

[0168] 诱导剂LPS和LY294002共同处理斑马鱼至4h后,利用立体荧光显微镜对斑马鱼鳃位置拍照并保存;观察并统计斑马鱼鳃位置聚集的中性粒细胞数量N(图14.),对LY294002对LPS诱导的斑马鱼鳃损伤炎症模型的抗炎作用进行量分析(图15.),并计算抗炎作用,其中抗炎作用公式同a。

[0169] 图14:通过图像分析定性确定LY294002对斑马鱼鳃损伤炎症模型的抗炎作用

[0170] 其中,Control为正常对照组,Vehicle为溶剂对照组,Model为模型对照组。LY294002三个浓度组斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量,较模型对照组斑马鱼明显减少。

[0171] 图15:LY294002显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳃炎症反应

[0172] 与模型对照组比较,\* $p < 0.001$ 。LY294002各浓度组斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量与模型组比较显著减少(图A),提示LY294002各浓度组均显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳃炎症反应,且抑制率呈现上图所示的剂量相关性增加(图B)。

[0173] 实验三:评价已知肺损伤治疗剂sp600125的抗炎作用

[0174] sp600125可用于治疗急性肺损伤引起的炎症反应,是已知的肺损伤治疗剂。本实验通过实施例3构建的斑马鱼鳃损伤炎症模型,评价肺损伤治疗剂sp600125的抗炎作用。

[0175] 1 斑马鱼选取

[0176] 将5dpf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孔板中,每

孔30尾。

[0177] 2 诱导剂LPS处理

[0178] 正常对照组斑马鱼不做任何处理,溶剂对照组斑马鱼鳃腔注射5nL PBS,其它组斑马鱼均鳃腔注射50ng LPS,随后立即开展步骤3。

[0179] 3 sp600125处理

[0180] 设置6个实验组:3个化合物组合处理组、1个模型对照组、1个溶剂对照组、1个空白对照组。3个sp600125处理组分别为浓度为37.5、75和150 $\mu$ M的sp600125,每个实验组药液体积为3mL;模型对照组,溶剂对照组和空白对照组斑马鱼不做任何处理,每个实验组均加入3mL养殖用水。

[0181] 4 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

[0182] 诱导剂LPS和sp600125共同处理斑马鱼至4h后,利用立体荧光显微镜对斑马鱼鳃位置拍照并保存;观察并统计斑马鱼鳃位置聚集的中性粒细胞数量N(图16.),对sp600125对LPS诱导的斑马鱼鳃损伤炎症模型的抗炎作用进行量分析(图17.),并计算抗炎作用,其中抗炎作用公式同a。

[0183] 图16:通过图像分析定性确定sp600125对斑马鱼鳃损伤炎症模型的抗炎作用

[0184] 其中,Control为正常对照组,Vehicle为溶剂对照组,Model为模型对照组。sp600125的三个浓度量组斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量,较模型对照组斑马鱼明显减少。

[0185] 图17:sp600125显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳃炎症反应

[0186] 与模型对照组比较,\* $p < 0.001$ 。sp600125各浓度组斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量与模型组比较显著减少(图A),提示sp600125各浓度组均显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳃炎症反应,且抑制率呈现上图所示的剂量相关性增加(图B)。

[0187] 实施例5 用斑马鱼鳃损伤炎症模型评价PHPS1的抗炎作用

[0188] PHPS1是蛋白酪氨酸磷酸酶Shp2的抑制剂,但其对急性肺损伤是否具有治疗效果,尚未见报道。实施例4用已知肺损伤治疗剂,验证了用斑马鱼鳃损伤炎症模型的评价治疗剂功效的可行性,因此本实施例可利用该模型评价PHPS1的抗炎作用,已判断其是否具有肺损伤治疗的功效。

[0189] 1 斑马鱼选取

[0190] 将5dpf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微孔板中。

[0191] 2 诱导剂LPS处理

[0192] 正常对照组斑马鱼不做任何处理,其它实验组斑马鱼均鳃腔注射50ng LPS,之后立即进行步骤3。

[0193] 3 待测药物PHPS1处理

[0194] 设置8个实验组:3个PHPS1处理组、1个模型对照组、1个正常对照组。3个PHPS1处理组分别为3.75、7.5和15ng PHPS1(静脉注射);模型对照组和正常对照组斑马鱼不做任何处理。各实验组按照微孔板的规格加入相等体积的养殖用水,并将微孔板置于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养4h。

[0195] 4 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

[0196] 诱导剂LPS和药物PHPS1共同处理斑马鱼至4h后,利用立体荧光显微镜对斑马鱼鳃位置拍照并保存;观察并统计斑马鱼鳃位置聚集的中性粒细胞数量N(图18.),对PHPS1对

LPS诱导的斑马鱼鳃损伤炎症模型的抗炎作用进行量分析(图19.),并计算抗炎作用,计算公式同a.

[0197] 图18:通过图像分析定性确定PHPS1对斑马鱼鳃损伤炎症模型的抗炎作用

[0198] PHPS1显著抑制LPS诱导的鳃位置中性粒细胞的聚集。

[0199] 图19:PHPS1显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳃损伤炎症反应

[0200] 与模型对照组比较,\* $p < 0.001$ 。PHPS1各剂量注射组斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量与模型组比较显著减少,提示PHPS1各剂量组均可显著抑制LPS诱发的斑马鱼鳃炎症反应,且抑制率呈现上图所示的剂量相关性增加。

[0201] 实施例6 用斑马鱼鳃损伤炎症模型评价Poly I/C的诱发炎症作用

[0202] Poly I/C为人工合成的双链RNA[polyriboinosinic polyribocytidylic acid, poly (I:C)],常被用来模拟RNA病毒感染及病毒致病机制的相关研究,但其能否诱发急性肺损伤炎症,尚未见报道。实施例3用已知肺损伤诱导剂,验证了所构建的斑马鱼鳃损伤炎症模型有效,因此本实施例可利用该模型评价Poly I/C的诱发炎症作用,评价Poly I/C对斑马鱼鳃诱发的炎症反应程度(即诱导剂的毒性评价)。

[0203] 1 斑马鱼选取

[0204] 将5dpf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孔板中,每孔30尾。

[0205] 2 Poly I/C处理

[0206] 设置6个实验组:4个化合物组合处理组、1个溶剂对照组、1个空白对照组。4个化合物处理组分别为注射剂量为10、20、40和80ng的Poly I/C;每个实验组均加入3mL养殖用水。

[0207] 3 对鳃位置中性粒细胞聚集数量进行定性和定量评价

[0208] Poly I/C处理斑马鱼至4h或不同时间段(1h、4h、8h等)后,利用立体荧光显微镜对斑马鱼鳃位置拍照并保存;观察并统计斑马鱼鳃位置聚集的中性粒细胞数量N(图20.),对Poly I/C引起的斑马鱼鳃炎症反应进行定量分析(图21.),并计算鳃损伤炎症诱发倍数,计算公式同b。

[0209] 图20:通过图像分析定性确定Poly I/C引起斑马鱼鳃损伤炎症反应

[0210] Control为正常对照组,Vehicle为溶剂对照组,Poly I/C5的四个剂量组斑马鱼鳃位置中性粒细胞数量,较溶剂对照组斑马鱼在1-4hpi呈现时间和剂量相关性增加,随后呈现时间相关性减少。

[0211] 图21:Poly I/C可诱发斑马鱼鳃炎症反应

[0212] 与溶剂对照组比较,\*\* $p < 0.05$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。在0~4hpi呈现剂量和时间相关性增加( $p < 0.001$ ),并在4hpi时达到峰值,为溶剂对照组的2.6~4.4倍;在4hpi~24hpi呈现剂量和时间相关性减少( $p < 0.001$ 或0.05),在24hpi时各注射组与溶剂PBS注射组比较均无统计学差异( $p > 0.05$ )。

[0213] 参考文献:

[0214] [1]余艳丽,曹殿青.急性肺损伤药物保护的研究进展[J].医学综述,2008,14(21):3284-3288.

[0215] [2]孙洋.丙烯醛诱导小鼠肺损伤及其机制[D].吉林大学,2014.

[0216] [3]陈勇,周继红,欧阳瑶.急性肺损伤实验动物模型[J].创伤外科杂志,2013(5):

466-469.

[0217] [4]李竹英,王雪慧,刘建秋.急性肺损伤动物模型研究进展[J].中国中医急症,2011,20(11):1817-1818.

[0218] [5]Zaas A K and Schwartz DA.Innate immunity and the lung:Defense at the interface between host and environment[J].Trends in Cardiovascular Medicine.2005,15:195-202.

[0219] [6]Soberanes S,Urich D,Baker C,et al.Mitochondrial Complex III-generated Oxidants Activate ASK1 and JNK to Induce Alveolar Epithelial Cell Death following Exposure to Particulate Matter Air Pollution[J].Journal of Biological Chemistry.2009,284:2176-2186.

[0220] [7]Werner J L and Steele C.Innate Receptors and Cellular Defense against Pulmonary Infections[J].Journal of Immunology.2014,193:3842-3850.

[0221] [8]Yacobi N,R,Fazlollahi F,Kim Y H,et al.Nanomaterial interactions with and trafficking across the lung alveolar epithelial barrier:implications for health effects of air-pollution particles[J].Air Quality Atmosphere and Health.2011,4:65-78.

[0222] [9]Grommes J and Soehnlein O.Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury[J].Molecular Medicine.2011,17:293-307.

[0223] [10]Kumar S,Xu J.Y,Kumar R S,et al.The small GTPase Rap1b negatively regulates neutrophil chemotaxis and transcellular diapedesis by inhibiting Akt activation[J].Journal of Experimental Medicine.2014,211:1741-1758.

[0224] [11]Rimensberger PC,Fedorko L,Cutz E,et al.Attenuation of ventilator-induced acute lung injury in an animal model by inhibition of neutrophil adhesion by leumedins(NPC 15669) [J].Critical Care Medicine.2008,26:548-555.

[0225] [12]Zeng YM,Wu CY,Ding H Z,et al.Moderate hypothermia attenuates intercellular adhesion molecule-1 and the migration of neutrophils in rat acute lung injury[J].Faseb Journal.2003,17:A1047-A1047.

[0226] [13]Matute-Bello G,Frevert CW and Martin TR.Animal models of acute lung injury[J].Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2008,295:L379-L399.

[0227] [14]Zon LI,Peterson RT.In vivo drug discovery in the zebrafish[J].Drug Discovery.2005,4:35-44.

[0228] [15]McGrath P,Li CQ.Zebrafish:a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J].Drug Discovery Today.2008,13:394-401.

[0229] [16]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.British Journal of Pharmacology [J].2008,154:1400-1413.

[0230] [17]Benyumov A O,Hergert P,Herrera J,et al.A Novel Zebrafish Embryo Xenotransplantation Model to Study Primary Human Fibroblast Motility in



Health and Disease[J].Zebrafish.2012,9:38-43.

[0231] [18]Hernandez Y L,Yero D,Pinos-Rodriguez JM,et al.Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens [J].Frontiers in Microbiology.2015:6.

[0232] [19]Renshaw SA,Loynes CA,Elworthy S,et al.Modeling inflammation in the Zebrafish:How a fish can help us understand lung disease[J].Experimental Lung Research.2007,33:549-554.

[0233] [20]Winata C L,Korz S,Kondrychyn I,et al.Development of zebrafish swimbladder:The requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers[J].Developmental Biology.2009,331:222-236.

[0234] [21]Cass AN,Servetnick M D and McCune A R.Expression of a lung developmental cassette in the adult and developing zebrafish swimbladder[J].Evolution&Development.2013,15:119-132.

[0235] [22]Zheng WL,Wang ZY,Collins JE,et al.Comparative Transcriptome Analyses Indicate Molecular Homology of Zebrafish Swimbladder and Mammalian Lung[J].Plos One.2011,6.

[0236] [23]Robertson GN,Croll RP and Smith FM.The Structure of the Caudal Wall of the Zebrafish(Danio rerio)Swim Bladder:Evidence of Localized Lamellar Body Secretion and a Proximate Neural Plexus[J].Journal of Morphology.2014,275:933-948.

[0237] [24]Gratacap RL,Rawls JF and Wheeler RT.Mucosal candidiasis elicits NF-kappa B activation,proinflammatory gene expression and localized neutrophilia in zebrafish[J].Disease Models&Mechanisms.2013,6:1260-1270.

[0238] [25]Voelz K,Gratacap RL and Wheeler RT.A zebrafish larval model reveals early tissue-specific innate immune responses to Mucor circinelloides [J].Disease Models&Mechanisms.2015,8:1375-1388.

[0239] [26]Westerfield M.The Zebrafish Book:A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish[M].Eugene,Oregon:The University of Oregon Press,1993.

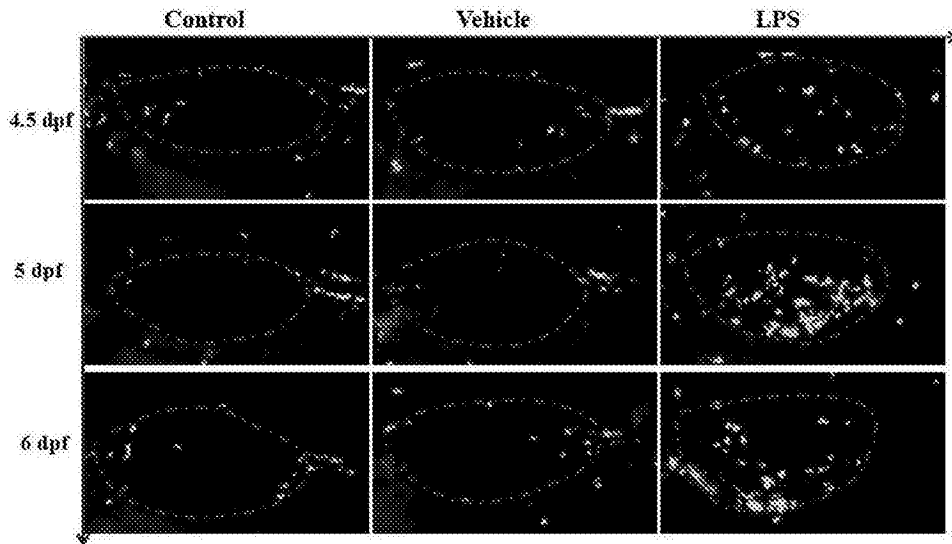


图1

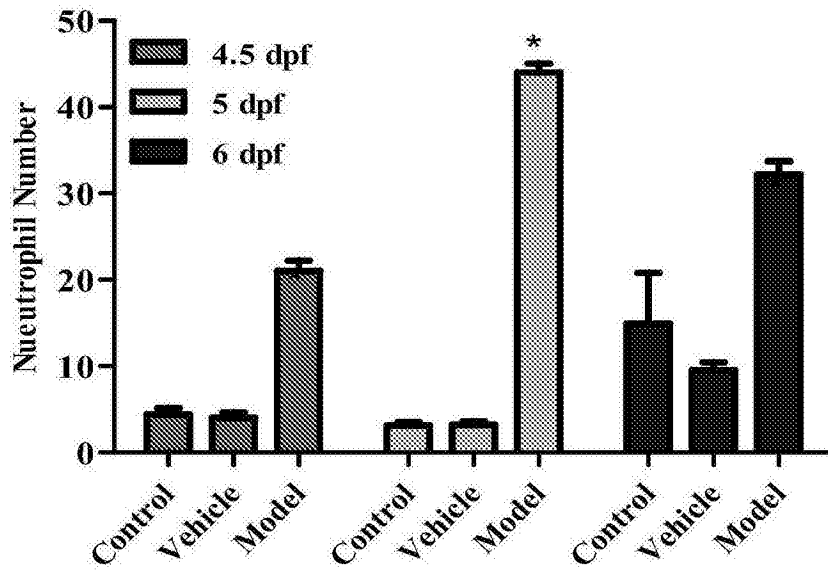


图2

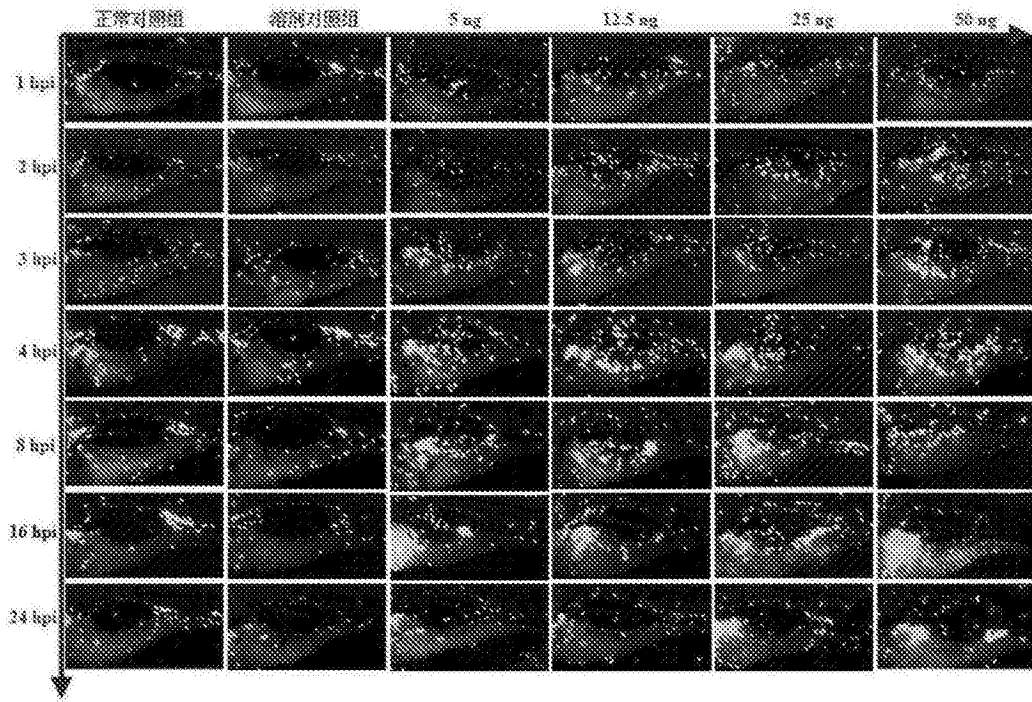


图3

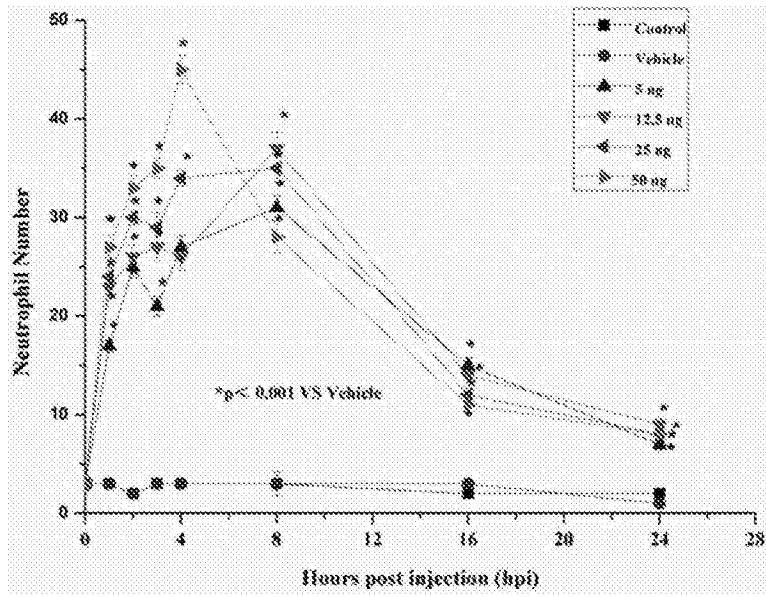


图4

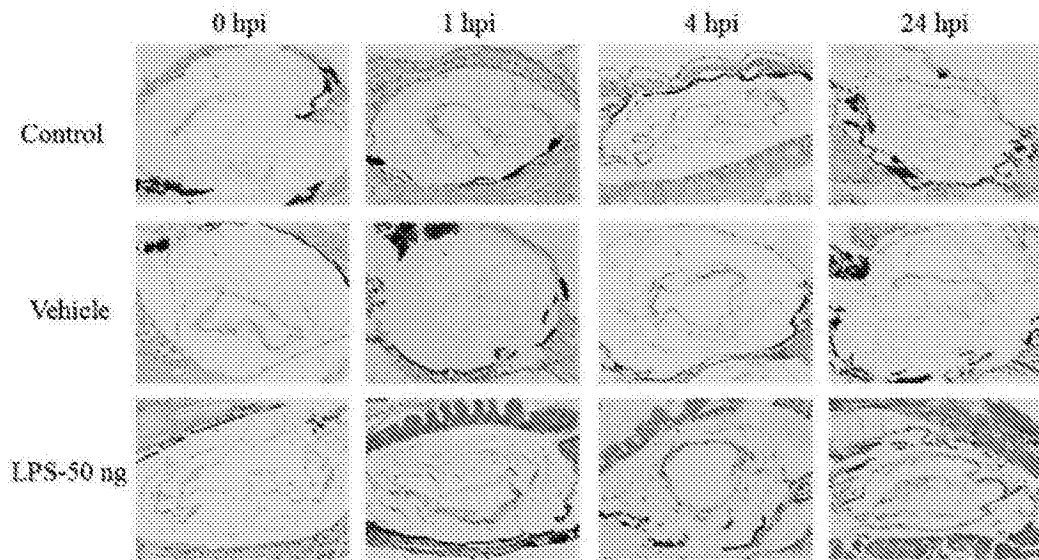


图5

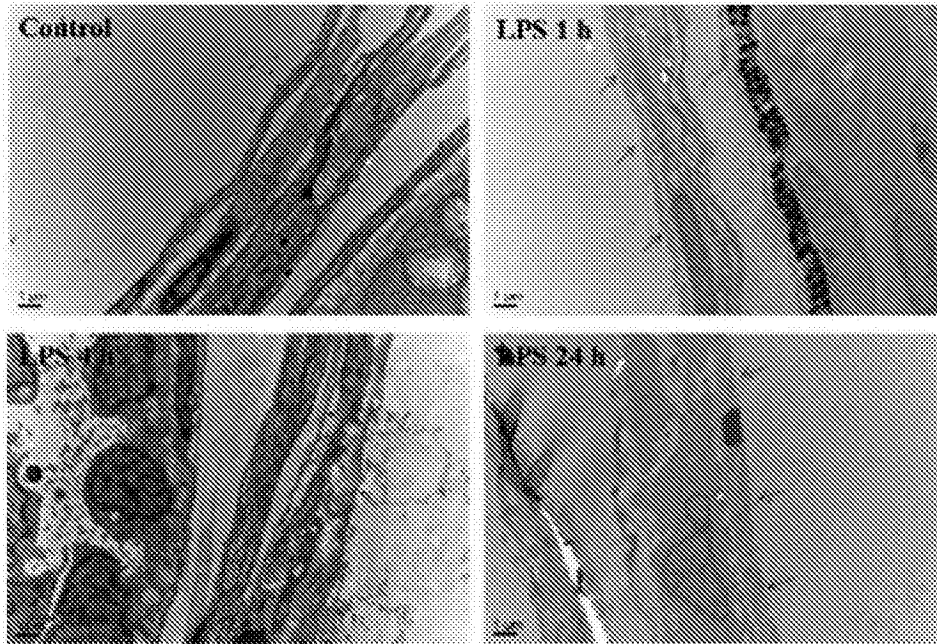


图6

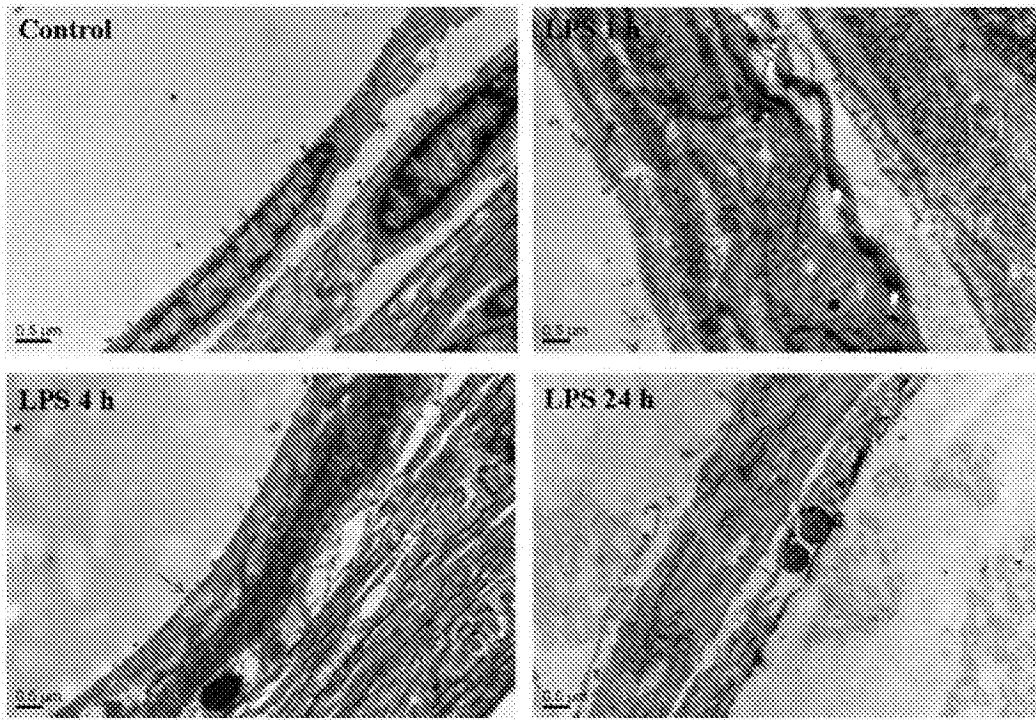


图7

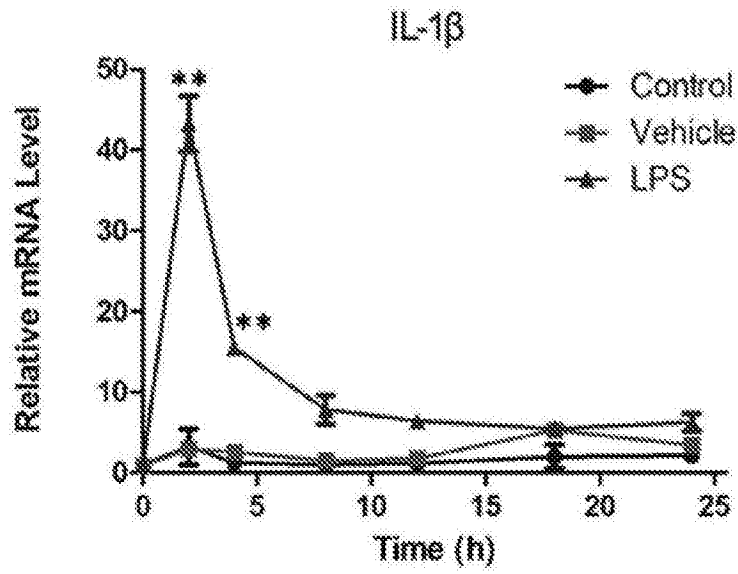


图8

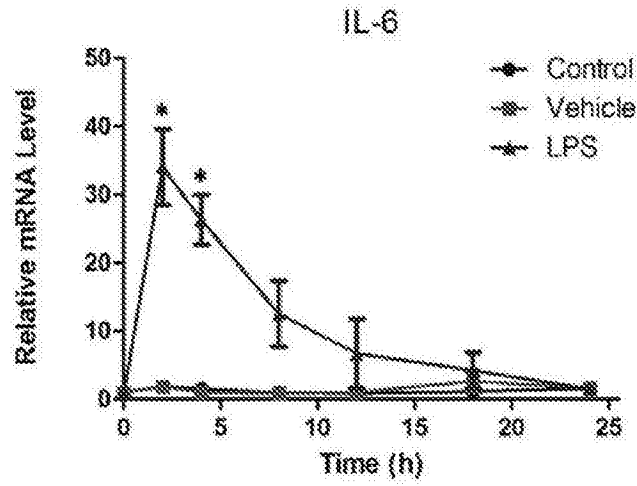


图9

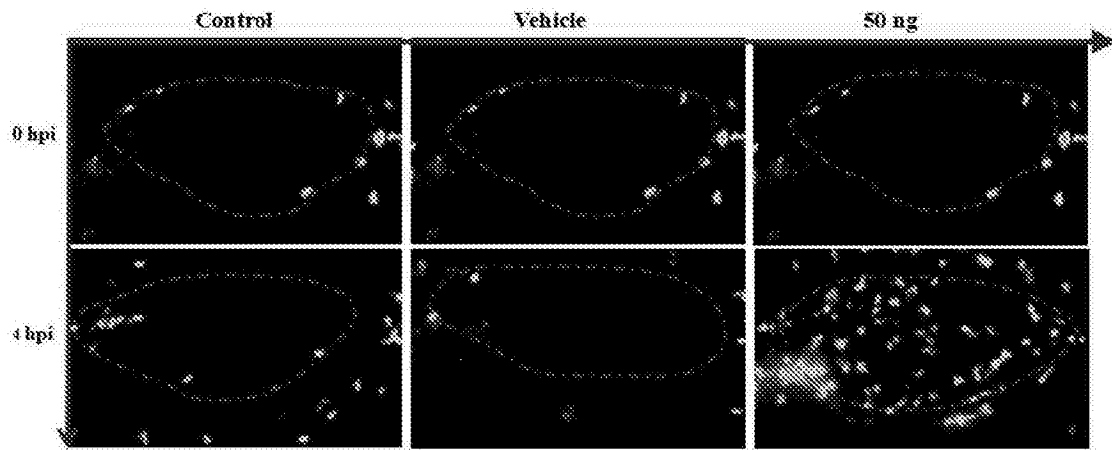


图10

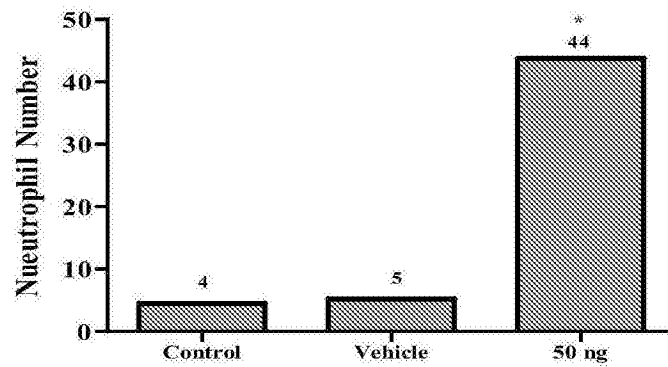


图11

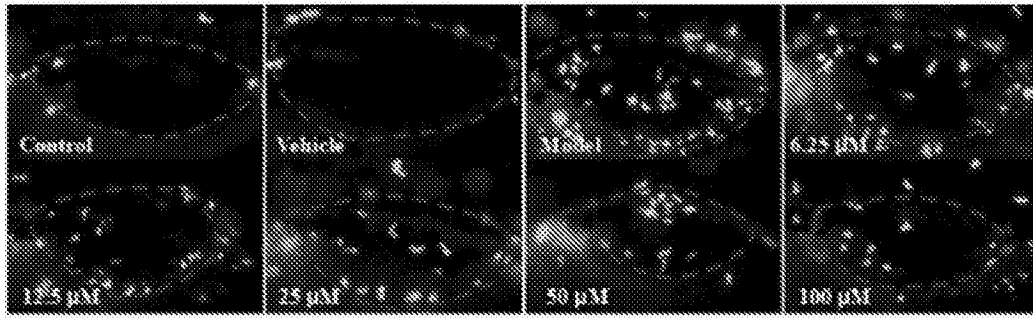


图12

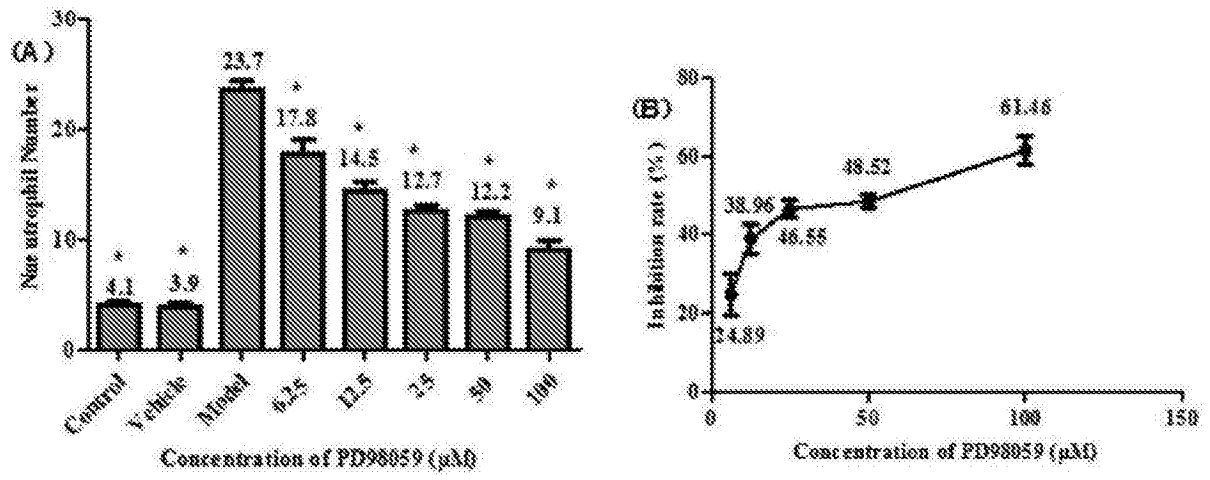


图13

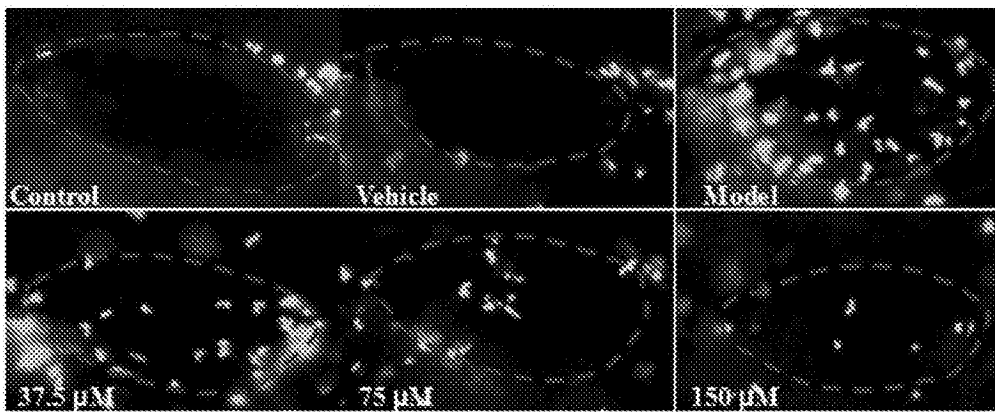


图14

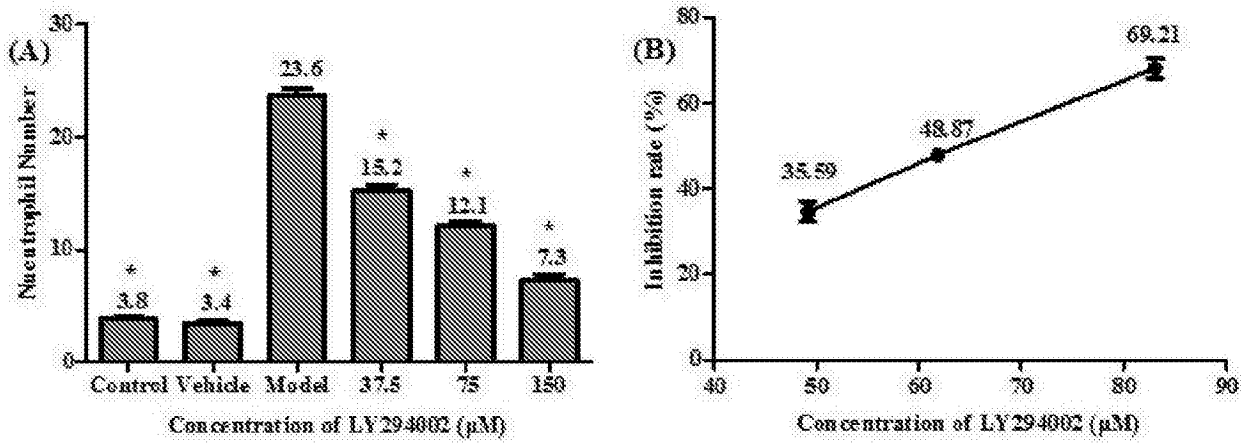


图15

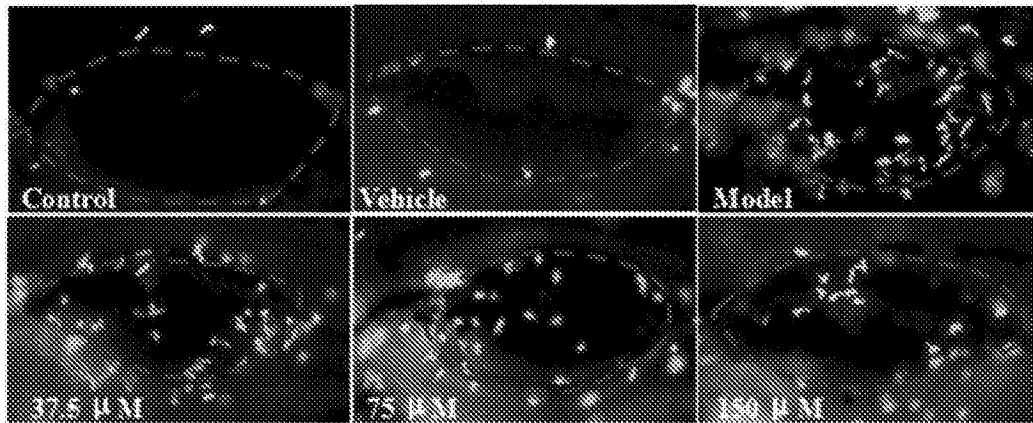


图16

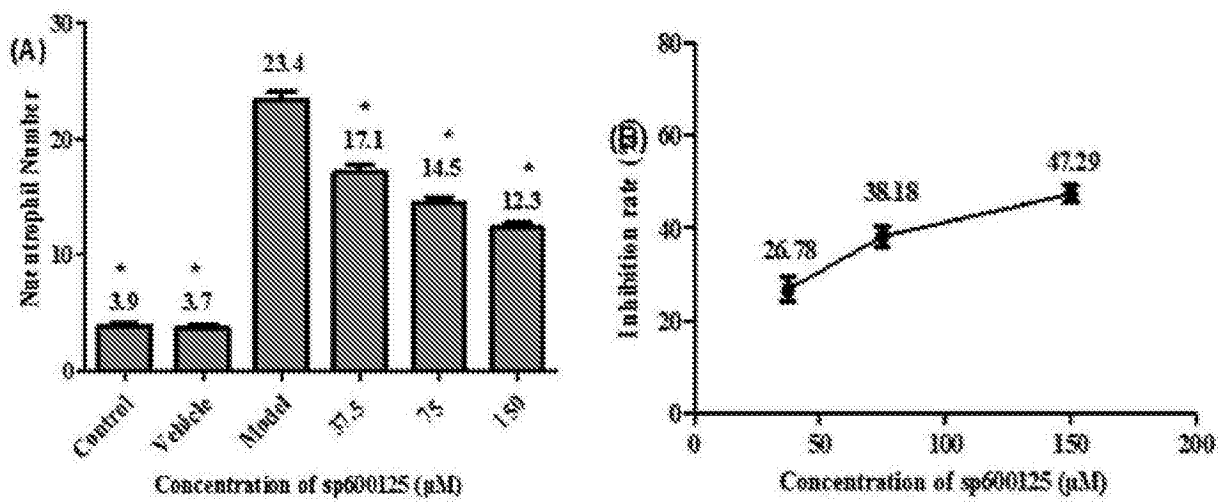


图17



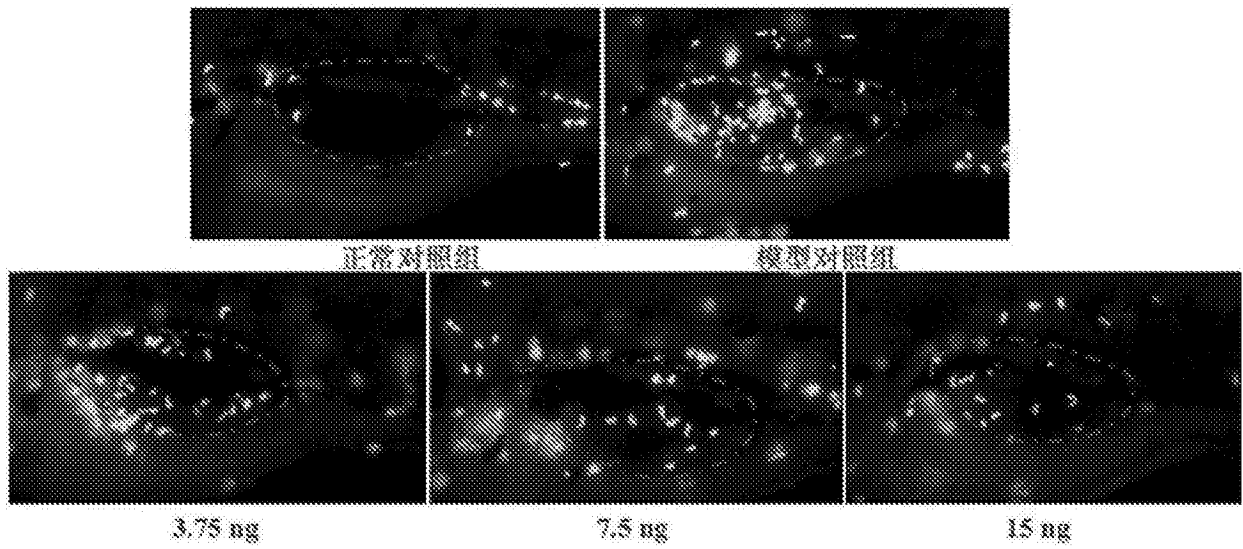


图18

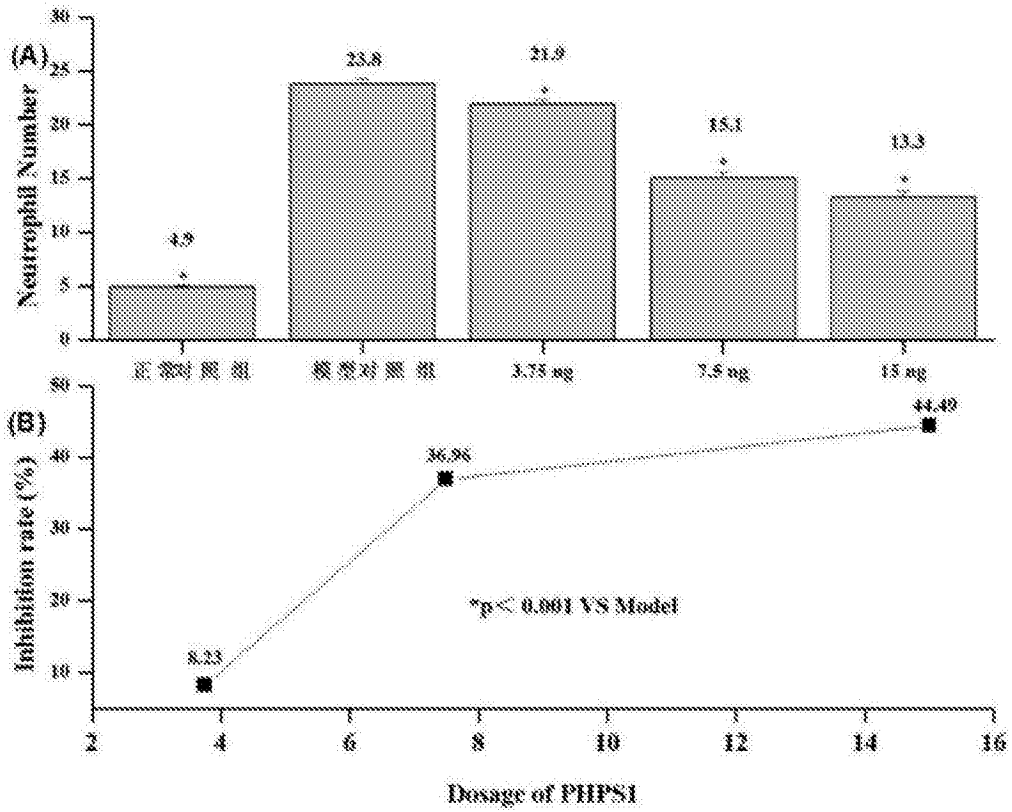


图19

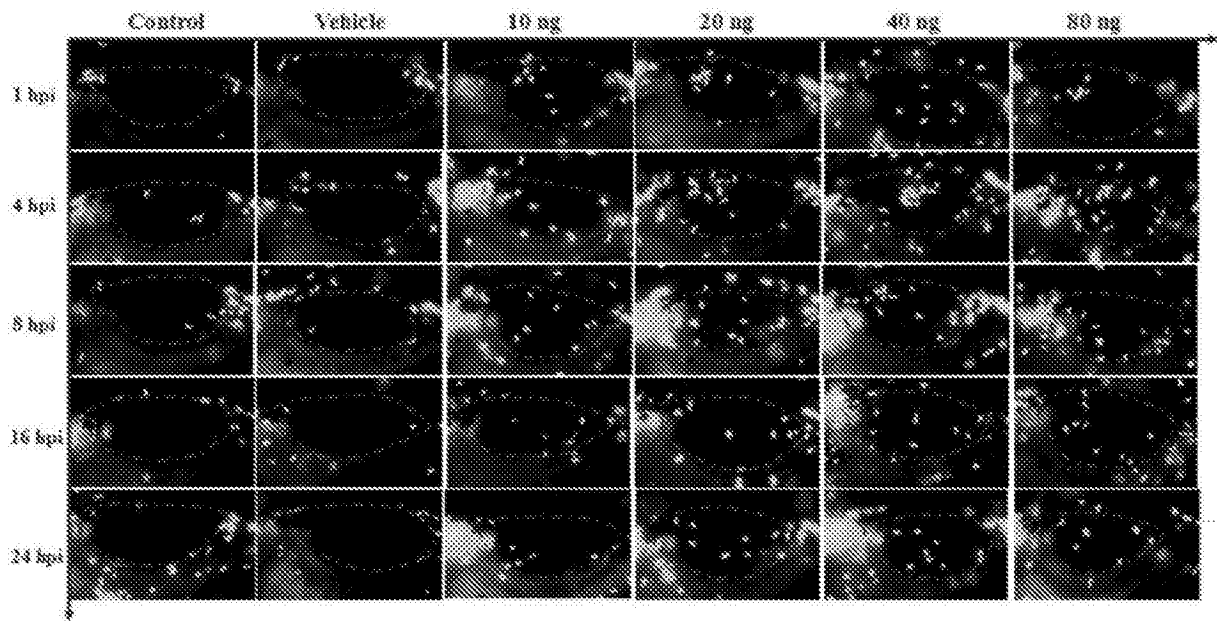


图20

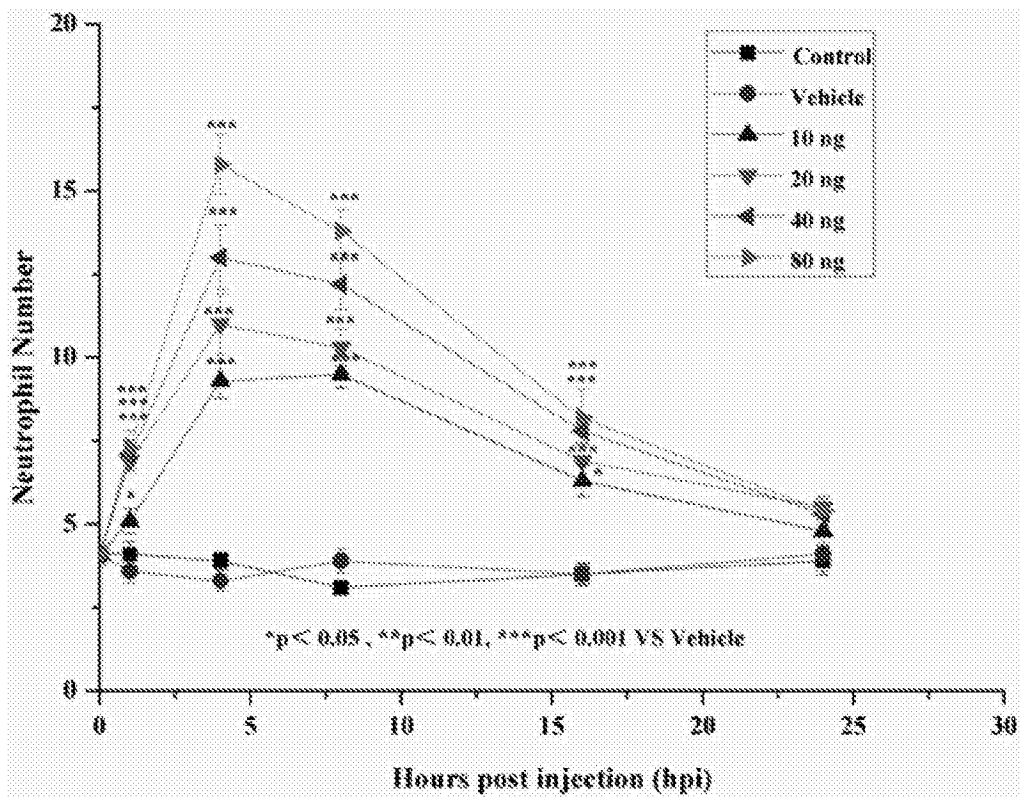


图21