



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103301480 B

(45)授权公告日 2019.11.08

(21)申请号 201310181252.4

(22)申请日 2013.05.15

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103301480 A

(43)申请公布日 2013.09.18

(73)专利权人 杭州环特生物科技股份有限公司  
地址 310052 浙江省杭州市滨江区江陵路  
88号5幢1楼A区

(72)发明人 周娟 郭胜亚 李春启

(51)Int.Cl.  
A61K 49/00(2006.01)

(56)对比文件  
CN 102845335 A,2013.01.02,  
A. HOLMBERG et al..Ontogeny of  
intestinal motility in correlation to  
neuronal development in zebrafish embryos  
and larvae.《Journal of Fish Biology》  
.2003,第63卷

Anna Holmberg et al..TTX-sensitive  
and TTX-insensitive control of  
spontaneous gut motility in the  
developing zebrafish (*Danio rerio*)  
larvae.《THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL  
BIOLOGY》.2007,第210卷

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

S D Fowler et al..Application of Nile  
red, a fluorescent hydrophobic probe, for  
the detection of neutral lipid deposits  
in tissue sections: comparison with oil  
red O.《Journal of Histochemistry &  
Cytochemistry》.1985,第33卷(第8期),

审查员 张丽芳

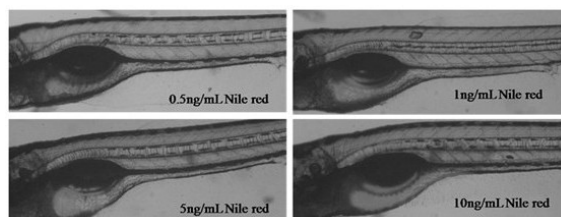
权利要求书1页 说明书12页 附图6页

## (54)发明名称

建立斑马鱼肠蠕动模型及筛选促胃肠动力  
药物的方法

## (57)摘要

本发明属于药物筛选领域,具体涉及一种斑  
马鱼肠蠕动模型的建立方法及筛选促胃肠动力  
药物的方法,包括(1)斑马鱼选取;(2)模型诱导  
及化合物处理;(3)荧光显微镜定量分析。本发明  
首次应用一种荧光染料尼罗红来研究胃肠道蠕  
动情况,这个新的研究方法是对现有研究模型的  
一大补充,因其可操作性、非侵入性、简单、快捷,  
此肠蠕动模型对于高通量筛选促胃肠动力化合  
物有重要价值。



1. 一种斑马鱼肠蠕动模型的建立方法,其特征在于,包括下述步骤:

(1) 斑马鱼选取

选取受精后5天的正常发育斑马鱼,放入微孔板中;

(2) 荧光染料处理

移除微孔板中的养殖用水,设置若干实验组,每个实验组均加入10ng/mL的尼罗红溶液,于28℃恒温孵育16h;

(3) 移除染料

移除微孔板中的荧光染料,清洗三次后,加入养殖用水,接着将微孔板于28℃恒温培养;

(4) 荧光显微镜定量分析

移除微孔板中的液体,加入浓度为0.64mM的甲磺酸麻醉斑马鱼,用3%甲基纤维素胶侧位固定于双凹载玻片上后,接着置于荧光显微镜下对肠道部位进行拍照并保存,再利用图像处理软件进行图像分析,计算肠道荧光强度,促肠蠕动排空率的计算公式如下:

$$\text{促肠蠕动排空率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{药物处理组染色强度}}{\text{模型组染色强度}} \right) \times 100\%;$$

对计算结果进行统计学处理,根据统计学处理结果,判断已建立了斑马鱼肠蠕动模型。

2. 一种如权利要求1所述的建立方法得到的斑马鱼肠蠕动模型的用途,其特征在于,所述模型用于评价或筛选促胃肠动力药物。

3. 一种用如权利要求1所述的建立方法得到的斑马鱼肠蠕动模型评价或筛选促胃肠动力药物的方法,其特征在于,包括下述步骤:

(1) 斑马鱼选取

选取受精后5天的正常发育斑马鱼,放入微孔板中;

(2) 荧光染料处理

移除微孔板中的养殖用水,设置若干实验组,每个实验组均加入10ng/mL的尼罗红溶液,于28℃恒温孵育16h;

(3) 化合物处理

移除微孔板中的荧光染料,然后按照待测化合物处理组、促肠蠕动药物阳性对照组、溶剂对照组、模型组,根据微孔板的规格分别加入相应的待测化合物溶液、促肠蠕动药物、溶剂、养殖用水,接着将微孔板于28℃下恒温培养6h;

(4) 荧光显微镜定量分析

移除微孔板中的液体,加入浓度为0.64mM的甲磺酸麻醉斑马鱼,用3%甲基纤维素胶侧位固定于双凹载玻片上后,接着置于荧光显微镜下对肠道部位进行拍照并保存,再利用图像处理软件进行图像分析,计算肠道荧光强度,促肠蠕动排空率的计算公式如下:

$$\text{促肠蠕动排空率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{药物处理组染色强度}}{\text{模型组染色强度}} \right) \times 100\%;$$

对计算结果进行统计学处理,根据统计学处理结果,评价或筛选待测化合物的功效。

4. 根据权利要求3所述的评价或筛选促胃肠动力药物的方法,其特征在于,所述的步骤(3)中促肠蠕动药物为30μg/mL的吗丁啉。

## 建立斑马鱼肠蠕动模型及筛选促胃肠动力药物的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物筛选(评价)领域,具体涉及一种简便、经济、快速、高效、高通量的斑马鱼肠蠕动模型的建立方法,并且利用该动物模型筛选促胃肠动力药物和评价药物对肠蠕动的促进作用。

### 背景技术

[0002] 胃肠动力障碍性疾病是临床常见病,日常医疗工作中,约50%患者因消化道症状就诊,其中30%-40%最终确诊为胃肠动力障碍,如胃食管反流病(GERD)、功能性消化不良(FD)、胃轻瘫、假性肠梗阻、肠易激综合征及慢性便秘等<sup>[[i]]</sup>。胃肠动力障碍包括胃肠收缩无力,节律紊乱和异常方向收缩。虽然这些疾病有功能性或者器质性的原因,但应用促胃肠动力药物来恢复或增加已减弱的胃肠运动功能是这类疾病治疗的主要措施<sup>[[ii]]</sup>。

[0003] 临床上常用的促胃肠动力药有四代。第一代如甲氧氯普胺,商品名为胃复安、灭吐灵,是具有胆碱能特征的多巴胺受体拮抗剂。甲氧氯普胺有较多的中枢性副反应,早期用于治疗上消化道动力障碍如功能性消化不良、胃轻瘫等,目前已经被二代,第三代及第四代促动力药所代替。但由于胃复安有注射剂,并有止吐作用,临床上目前多作为止吐药使用<sup>[[iii]]</sup>。第二代促动力药是多潘立酮,商品名为吗丁琳,为外周多巴胺受体阻滞剂<sup>[[iv]]</sup>,临床应用广泛。第三代是西沙必利,是一种化学结构上取代了烷化苯丙咪哇的甲氢氯普胺,近年临床发现在西沙必利高敏患者中可出现Q-T间期延长或导致尖端扭转性室性心动过速<sup>[[v]]</sup>,对于其在临床进一步应用,还存在着很大的争议。第四代为莫沙必利,为非选择性5-HT<sub>4</sub>受体激动剂,是新型促胃肠动力药物,安全、有效,临床正在广泛使用<sup>[[vi]]</sup>。目前最新的胃肠动力药为替加色罗和伊托必利,分别为5-HT<sub>4</sub>受体部分激动剂和多巴胺受体阻滞剂<sup>[[vii]]</sup>,另一种促动力药为红霉素,具有胃动素样的促动力效应,在促胃肠动力方面是研究的热点<sup>[[viii]]</sup>,但由于其上腹痛、恶心、呕吐等不良反应明显,限制了其临床应用。

[0004] 现代社会生活节奏加快、饮食结构改变等诸因素导致我国胃肠动力低下发病人群日益增多,开发胃肠动力药物具有广阔的市场潜力。药物筛选是发现、开发药物过程中一个重要的环节,实验动物肠蠕动模型的建立对评价与筛选胃肠动力药物至关重要。胃肠内容物的蠕动是胃肠平滑肌细胞、肠神经系统(ENS)、外在神经系统、Cajal间质细胞、肠粘膜、内分泌激素系统一起综合作用的结果<sup>[[ix]]</sup>。由于其复杂性,胃肠蠕动模型面临许多挑战。体外细胞实验缺少组织器官结构,不能准确的模拟胃肠运动。大鼠、猪等离体器官,缺少周围神经反馈,也不能准确模拟胃肠运动<sup>[[x],[xi]]</sup>。哺乳动物实验利用影像技术来观察胃肠动力,费时费力且价格昂贵<sup>[[xii],[xiii]]</sup>。建立一种高通量、易操作的胃肠动力评价实验动物模型对新药研发和基础研究均十分迫切。

[0005] 斑马鱼是一种脊椎动物,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>[[xiv]]</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>[[xv],[xvi]]</sup>。斑马鱼胃肠道在解剖学和细胞功能方面和人类相似,由内皮细胞、结缔组织、环状肌、外纵肌组成<sup>[[xvii]]</sup>。研究者已成功的应用斑马鱼研究胃肠道生理功能<sup>[[xviii]]</sup>。

[0006] 尼罗红(9-二乙氨基-5H-苯并[α]吩恶嗪-5-酮)是一种荧光染料,可以标记活体细胞培养中巨噬细胞、平滑肌细胞中的脂滴<sup>[[xix]]</sup>。因其无毒性,尼罗红染料在脂肪代谢疾病模型中广泛应用于活体染色<sup>[[xx]]</sup>。当斑马鱼卵暴露于尼罗红溶液中,富含脂肪的组织卵黄囊能被结合,在荧光显微镜下清晰的显示。当斑马鱼5-6天时,大部分卵黄囊被吸收,斑马鱼开始自发的胃肠蠕动摄食<sup>[[xxi],[xxii],[xxiii]]</sup>。因此,我们可以观察到肠道中尼罗红的充盈情况,而不被其它组织所干扰,并且其不被体内吸收<sup>[[xxiv]]</sup>。

[0007] 本发明首次应用一种荧光染料尼罗红,根据其在斑马鱼胃肠道蠕动情况来评价促胃肠动力药物药效。这个新的研究方法是对现有研究模型的一大补充,因其可操作性、非侵入性,此肠蠕动模型对于高通量筛选促胃肠动力化合物有重要价值。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的首先在于提供一种建立斑马鱼胃肠蠕动模型的方法,第二个目的提供一种应用斑马鱼胃肠蠕动模型筛选促胃肠动力药物的方法。本发明可以方便、快速、高效和高通量实现对促胃肠动力药物的定量评价。为实现本发明的目的,发明人提供如下技术方案:

[0009] 发明概述

[0010] 发明人首先提供了一种建立斑马鱼胃肠蠕动模型的方法,包括下述步骤:

[0011] (1)斑马鱼选取

[0012] 选取受精后4-6天的正常发育的斑马鱼,放入微孔板中;

[0013] (2)染料处理

[0014] 移除微孔板中的养殖用水,设置多个实验组:每个实验组根据微孔板的规格加入染料,然后恒温孵育2-24 h。

[0015] (3)移除染料

[0016] 移除微孔板中的染料,清洗三次后,加入养殖用水,接着将微孔板于恒温培养。

[0017] (4)荧光显微镜定量分析;

[0018] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型的方法,其中,

[0019] 所述的步骤(1)中挑选的斑马鱼为受精后5天的斑马鱼。

[0020] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型的方法,其中,

[0021] 所述的养殖用水符合下述规格:溶解氧质量容量浓度为6-8 mg/L、水温为28℃、pH为7.2-7.6、总硬度为200-250mg/L。

[0022] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型的方法,其中,

[0023] 所述的染料为尼罗红(Nile red),浓度为10ng/mL。

[0024] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型的方法,其中,

[0025] 所述的步骤(2)中斑马鱼培养时间为16小时。

[0026] 作为优选,根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型的方法,其中,所述的荧

光显微镜定量分析按照下述方法操作：

[0027] 移除微孔板中的液体，根据微孔板规格加入浓度为0.64mM的甲磺酸麻斑马鱼，用3%甲基纤维素胶侧位固定于双凹载玻片上后，接着置于荧光显微镜下对肠道部位进行拍照并保存，再利用图像处理软件进行图像分析，计算肠道荧光强度。促肠蠕动排空率计算公式如下：

$$[0028] \quad \text{促肠蠕动排空率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{药物处理组染色强度}}{\text{模型组染色强度}} \right) \times 100\%$$

[0029] 发明人还提供了一种建立斑马鱼肠蠕动模型筛选促胃肠动力药物的方法，包括下述步骤：

[0030] (1) 斑马鱼选取

[0031] 选取受精后4-6天的正常发育的斑马鱼，放入微孔板中；

[0032] (2) 染料处理

[0033] 移除微孔板中的养殖用水，设置多个实验组：每个实验组根据微孔板的规格加入染料，然后恒温孵育2-24 h。

[0034] (3) 化合物处理

[0035] 移除微孔板中的荧光染液，然后按照待测化合物处理组、促肠蠕动阳性对照组、溶剂对照组、模型组，根据微孔板的规格分别加入相应的待测化合物溶液、促胃肠动力药物、溶剂、养殖用水，接着将微孔板于28℃下恒温培养6小时，其中，促胃肠动力药物为浓度为30 μg/mL的吗丁啉溶液，溶剂为浓度为0.1%的二甲基亚砜。

[0036] (4) 荧光显微镜定量分析；

[0037] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型筛选促肠动力药

[0038] 物的方法，其中，所述的步骤(1)中挑选的斑马鱼为受精后5天的斑马鱼。

[0039] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型筛选促肠蠕动药

[0040] 物的方法，其中，所述的养殖用水符合下述规格：溶解氧质量容量浓度为6-8 mg/L、水温为28℃、pH为7.2-7.6、总硬度为200-250mg/L。

[0041] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型筛选促肠动力药

[0042] 物的方法，其中，所述的荧光染料为尼罗红(Nile red)，浓度为10ng/mL。

[0043] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型筛选促肠动力药

[0044] 物的方法，其中，所述的步骤(2)中斑马鱼培养时间为16小时。

[0045] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型筛选促肠动力药

[0046] 物的方法，其中，所述的步骤(3)中斑马鱼培养时间为6小时。

[0047] 作为优选，根据本发明所述的一种建立斑马鱼肠蠕动模型筛选促肠动力药

[0048] 物的方法，其中，所述的荧光显微镜定量分析按照下述方法操作：

[0049] 移除微孔板中的液体，根据微孔板规格加入浓度为0.64mM的甲磺酸麻斑马鱼，用3%甲基纤维素胶侧位固定于双凹载玻片上后，接着置于荧光显微镜下对肠道部位进行拍照并保存，再利用图像处理软件进行图像分析，计算肠道荧光强度。促肠蠕动排空率计算公式如下：

$$[0050] \quad \text{促肠蠕动排空率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{药物处理组染色强度}}{\text{模型组染色强度}}\right) \times 100\%$$

[0051] 发明详述

[0052] 试剂及仪器:

[0053] 甲基纤维素胶(methyl cellulose)、吗丁啉、莫沙必利、二甲基亚砷购自美国 sigma公司; Nile red购自百灵威公司; ,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)。

[0054] 一、建立斑马鱼肠蠕动模型的方法, 设计方案为:

[0055] (一) 确定尼罗红(Nile red)最佳浓度

[0056] 1 斑马鱼选取

[0057] 取4~5对斑马鱼亲本交配, 按照Westerfield<sup>[[xxv]]</sup>的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段(5dpf, 是指斑马鱼受精后5天)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微孔板中, 每孔放入30条数量的斑马鱼。

[0058] 处理

[0059] 设置4个实验组: 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), 4个实验组中加入一定体积(根据微孔板规格而定)浓度分别为0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL Nile red染液。按照最佳处理时间长度于28℃恒温培养箱中培养。

[0060] 确定Nile red最佳浓度

[0061] 移除微孔板中的染色液, 用养殖用水快速清洗3遍, 将斑马鱼转入新的微孔板中, 加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸麻醉斑马鱼, 用3%甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼肠道充盈情况。

[0062] 通过观察对比Nile red处理组中斑马鱼肠道充盈情况, 10ng/mL Nile red处理组充盈最多, 且各尾鱼肠道充盈均一性优于其它浓度组(如图1), 因此选择10ng/mL Nile red作为最佳处理浓度。

[0063] (二) 确定斑马鱼最佳处理阶段

[0064] 1 斑马鱼选取

[0065] 将4dpf、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2dpf是指斑马鱼受精后两天。)

[0066] 2 Nile red处理

[0067] 设置3个实验组(每组分别为4dpf、5dpf、6dpf的斑马鱼), 移除微孔板中的养殖用水, 3个实验组中分别加入3mL浓度为10ng/mL Nile red染液。于28℃恒温培养箱中恒温培养。

[0068] 确定斑马鱼最佳处理阶段

[0069] 移除微孔板中的染色液, 用养殖用水快速清洗3遍, 将斑马鱼转入新的微孔板中, 加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸麻醉斑马鱼, 用3%甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下观察各年龄组斑马鱼肠道充盈情况。

[0070] 通过观察对比各年龄组斑马鱼肠道充盈情况无明显差异(如图2), 从图2可以看出

4dpf斑马鱼因卵黄囊未完全吸收影响结果(上图),6dpf斑马鱼因卵黄囊完全吸收导致身体瘦小(下图),因此,定性确定将5dpf的斑马鱼作为化合物最佳处理阶段。

[0071] (三)确定nile red最佳处理时间

[0072] 1 斑马鱼选取

[0073] 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。

[0074] 处理

[0075] 设置5个实验组:移除微孔板中的养殖用水,5个实验组加入3mL 10ng/mL的Nile red染液,将微孔板放入28℃恒温培养箱分别培养2h、4h、8h、16h、24h。

[0076] 确定nile red最佳处理时间

[0077] 移除微孔板中的染色液,用养殖用水快速清洗3遍,将斑马鱼转入新的微孔板中,加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸麻醉斑马鱼,用3%甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下观察的实验组斑马鱼肠道充盈情况。

[0078] 随着处理时间的延长,2h、4h、8h、16h斑马鱼肠道充盈增加;16h、24h时斑马鱼肠道充盈完全,两者无明显差异(如图3)。因此,定性确定处理16h作为Nile red最佳处理时间。

[0079] (四)确定化合物最佳处理时间

[0080] 1 斑马鱼选取

[0081] 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2个6孔板中,每孔30尾。

[0082] 处理

[0083] 设置2个实验组: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),2个实验组加入3mL 10ng/mL的Nile red染液,将微孔板放入28℃恒温培养箱分别培养16h。

[0084] 化合物处理

[0085] 设置2个实验组:1个促胃肠动力药物吗丁啉组、1个模型组。移除微孔板中的Nile red染液,用养殖用水快速清洗3遍,将斑马鱼转入新的微孔板中,促胃肠动力药物组中加入3mL 30μg/mL促胃肠动力药物吗丁啉;模型组中加入3mL养殖用水。将微孔板放入28℃恒温培养箱分别培养1、2、4、6、9、24、30h。

[0086] 确定化合物最佳处理时间

[0087] 移除微孔板中的液体,加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸麻醉斑马鱼,用3%甲基纤维素胶将斑马鱼固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下对肠道进行拍照并保存(见图4、5)。从图4可看出,模型组促排空率在6h-30h基本保持水平,而促胃肠动力药物在6h时肠道荧光强度与模型组相比有统计学差异,6h-30h促排空率直线上升。利用Image J 高级图像处理软件进行图像分析,计算肠道荧光强度。促肠蠕动排空率计算公式如下:

$$[0088] \quad \text{促肠蠕动排空率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{药物处理组染色强度}}{\text{模型组染色强度}}\right) \times 100\%$$

[0089] 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。

[0090] 统计学处理结果显示:吗丁啉组处理1、2、4、6、9、24、30h的斑马鱼促肠蠕动排空率

率分别为36%、37%、58%、61%、64%、69%(见图4),这表明随着处理时间的延长,斑马鱼促肠蠕动排空率逐渐增高。通过方差分析,促胃肠动力药物处理组处理6h、9h、24h、30h的促肠蠕动排空率显著高于模型组,差异有统计学意义( $p < 0.05$ ),结合实验操作方便性,选择处理6h作为化合物最佳处理时间。不同化合物最佳处理时间也可能不相同,需要具体化合物具体分析,本发明按照此促胃肠动力药物的最佳处理时间进行实验。

[0091] 二、建立斑马鱼肠蠕动模型筛选和评价促胃肠动力药物的方法,设计方案为:

[0092] 1 斑马鱼选取

[0093] 将处于最佳处理阶段(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孔微孔板中,每孔放入30条斑马鱼。

[0094] 处理

[0095] 设置6个实验组:3个待测化合物处理组,1个阳性对照组、1个溶剂对照组,1个模型组,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),6个实验组加入3mL 10ng/mL的Nile red染液,将微孔板放入28℃恒温培养箱培养16h。

[0096] 化合物处理

[0097] 设置6个实验组:3个待测化合物处理组(莫沙必利),1个阳性对照组(吗丁啉)、1个溶剂对照组,1个模型组,移除微孔板中的Nile red染液,用养殖用水快速清洗3遍,将斑马鱼转入新的微孔板中,莫沙必利处理加入一定体积(根据微孔板规格而定)浓度为MNLC(最大非致死浓度为10 $\mu$ g/mL)、1/3MNLC(3 $\mu$ g/mL)、1/10MNLC(1 $\mu$ g/mL)的待测化学药物。促肠蠕动阳性对照组加入促胃肠动力药物吗丁啉,溶剂对照组加入等体积0.1%二甲基亚砷溶液,模型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。

[0098] 定量分析

[0099] 移除微孔板中的液体,加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸麻醉斑马鱼,用3%甲基纤维素胶将斑马鱼侧位固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下对肠道进行拍照并保存(见图6)。从图6可看出,模型组肠道染色强度很高(上),促肠蠕动阳性对照组由于促蠕动作用,肠道荧光强度减弱(中),化学药物处理组由于促蠕动作用,肠道荧光强度减弱(下),利用Image J 高级图像处理软件进行图像分析,计算肠道荧光强度(如图7)。从图7可以看出,模型组肠道染色强度很高,促肠蠕动阳性对照组荧光强度值降至很低,化学药物处理组荧光强度值降至很低。促肠蠕动排空率计算公式如下:

$$[0100] \quad \text{促肠蠕动排空率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{药物处理组染色强度}}{\text{模型组染色强度}}\right) \times 100\%$$

[0101] 例如:我们评价了莫沙必利(设置3个浓度,分别为1 $\mu$ g/mL、3 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL)的对肠蠕动的促进作用,促排空率分别为8.7%、31%、81.9%,与溶剂组相比,中、高浓度均有显著性差异( $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ )。

[0102] 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(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评价促肠动力药效。

[0103] 本发明与现有技术相比,具有以下优点:

[0104] 本发明提供的肠蠕动模型具有制作简便、快速、成功率高、重复性好且稳定可靠等



优点,降低了肠蠕动模型制作成本,提高了实验研究结果的可靠性。本发明不仅提供一种活体斑马鱼肠蠕动模型的建立方法,同时提供一种利用该模型筛选促胃肠动力药物的方法。与传统的动物模型相比,本发明建立的活体斑马鱼肠蠕动模型具有简便、快速、经济、高效、高通量等优点。具体地说,本发明具有如下优点:

[0105] 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。

[0106] 2)高通量——斑马鱼幼鱼很小,只有1-4毫米,能够在一个标准的6,12,24,48,96或384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筛选的理想模型。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 5)简便——实验过程操作简单,斑马鱼经药物处理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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 9)直观性强——胚胎及幼鱼透明,可直接置于显微镜下观察促肠蠕动情况。

[0114] 10)敏感性高——

[0115] 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。

## 附图说明

[0116] 图1是本发明不同浓度荧光染料充盈后肠道荧光图谱

[0117] 图2是本发明不同年龄组斑马鱼肠道充盈后荧光图谱

[0118] 图3是本发明不同处理时间后斑马鱼肠道荧光图谱

[0119] 图4是本发明吗丁啉处理不同时间后斑马鱼促肠蠕动排空率

[0120] 图5是本发明吗丁啉处理不同时间后斑马鱼肠道荧光图谱

[0121] 图6是本发明不同浓度莫沙必利处理后斑马鱼肠道荧光图谱

[0122] 图7是本发明不同浓度莫沙必利处理后斑马鱼促肠蠕动排空率,注:0-模型组,1-溶剂组,2-1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莫沙必利组,3-3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莫沙必利组,4-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莫沙必利组,5-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吗丁啉组。

[0123] 图8是本发明吗丁啉处理6h处理后斑马鱼肠道荧光图谱

[0124] 图9是本发明不同浓度吗丁啉处理6h后斑马鱼促肠蠕动排空率,注:0-模型组,1-溶剂组,2-3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吗丁啉组,3-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吗丁啉组,4-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吗丁啉组。

[0125] 图10是本发明硫酸镁处理6h处理后斑马鱼肠道荧光图谱

[0126] 图11是本发明不同浓度硫酸镁处理6h后斑马鱼促肠蠕动排空率,注:0-模型组,1-溶剂组,2-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸镁组,3-600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸镁组,4-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸镁组,5-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吗丁啉组。

## 具体实施方式

[0127] 下面结合实施例,更具体的说明本发明的内容。应当理解,本发明的实施并不局限于下面的实施例,对本发明所做的任何形式上的变通和/或改变都将落入本发明保护范围。

[0128] 在本发明中,若非特指,所有的设备和原料等均可从市场购得或是本行业常用的。下述实施例中的方法,若无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0129] 试剂及仪器:

[0130] 甲基纤维素胶(methyl cellulose)、吗丁啉、硫酸镁、二甲基亚砷购自美国sigma公司;Nile red购自百灵威公司;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)。

[0131] 实施例1 建立斑马鱼肠蠕动模型的方法

[0132] 基于斑马鱼最佳处理阶段、nile red化合物最佳处理时间长度和浓度和化合物最佳处理时间长度,设计方案如下:

[0133] 1 斑马鱼选取

[0134] 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6孔板中,每孔30尾。

[0135] 处理

[0136] 设置5个实验组:移除微孔板中的养殖用水,5个实验组加入3mL 10ng/mL的Nile red染液,将微孔板放入28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱分别培养16h。

[0137] 化合物处理

[0138] 设置5个实验组:3个浓度吗丁啉组、1个溶剂对照组、1个模型组。移除微孔板中的Nile red染液,用养殖用水快速清洗3遍,将斑马鱼转入新的微孔板中,促胃肠动力药物组中加入1mL浓度分别为3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MNL)促胃肠动力药物吗丁啉;溶剂对照组加入1mL的0.1%二甲基亚砷;模型组中加入1mL的养殖用水。于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养6h。

[0139] 定量分析

[0140] 移除微孔板中的液体,加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸麻醉斑马鱼,用3%甲基纤维素胶将斑马鱼侧位固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下对肠道进行拍照并保存(见图8)。从图可看出,模型组肠道染色强度很高(左图),30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吗丁啉处理组由于促肠蠕动作用,肠道荧光强度减弱(右图),利用Image J 高级图像处理软件进行图像分析,计算肠道荧光强度.促肠蠕动排空率计算公式如下:

[0141] 促肠蠕动排空率 (%) =  $(1 - \frac{\text{药物处理组染色强度}}{\text{模型组染色强度}}) \times 100\%$

[0142] 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评价的促肠蠕动排空率。统计学处理结果显示: 3个浓度吗丁啉促胃肠动力药物处理组的斑马鱼促肠蠕动排空率为7.4%、15%、39.4% (见图9), 这表明随着吗丁啉浓度的增加, 促肠蠕动排空率增高, 通过方差分析, 浓度为30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的促胃肠动力药物组促肠蠕动排空率显著高于溶剂对照组, 均有显著性差异 ( $p < 0.01$ ), 而3、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吗丁啉组无统计学差异 ( $p > 0.05$ ), 因此, 定量确定将30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吗丁啉处理组作为斑马鱼促肠蠕动阳性药物组。

[0143] 实施例2 利用活体斑马鱼筛选促胃肠动力药物的方法

[0144] 1 斑马鱼选取

[0145] 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6孔板中, 每孔30尾。

[0146] 处理

[0147] 设置6个实验组: 移除微孔板中的养殖用水, 6个实验组加入3mL 10ng/mL的Nile red染液, 将微孔板放入28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱分别培养16h。

[0148] 化合物处理

[0149] 设置6个实验组: 3个浓度待测化合物处理组, 1个阳性对照组、1个溶剂对照组, 1个模型组, 移除微孔板中的Nile red染液, 用养殖用水快速清洗3遍, 将斑马鱼转入新的微孔板中, 3个化合物处理加入浓度为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (MNLC) 的硫酸镁溶液。促肠蠕动阳性对照组加入10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莫沙必利, 溶剂对照组加入150 $\mu\text{L}$  0.1%二甲基亚砷溶液, 模型组中加入150 $\mu\text{L}$ 养殖用水, 于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养6h。

[0150] 定量分析

[0151] 移除微孔板中的液体, 加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸麻醉斑马鱼, 用3%甲基纤维素胶将斑马鱼侧位固定于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下对肠道进行拍照并保存 (见图10)。从图可以看出模型组肠道荧光强度高 (上图); 促肠蠕动阳性对照组由于促肠蠕动作用, 肠道荧光强度减弱 (中图), 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸镁溶液由于促肠蠕动作用, 肠道荧光强度减弱 (下图)。利用Image J 高级图像处理软件进行图像分析, 计算肠道荧光强度。促肠蠕动排空率计算公式如下:

$$[0152] \quad \text{促肠蠕动排空率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{药物处理组染色强度}}{\text{模型组染色强度}} \right) \times 100\%$$

[0153] 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评价吗丁啉的促肠蠕动性, 统计学处理结果显示: 促肠蠕动阳性对照组促肠蠕动排空率为39.4%, 化学药物处理组硫酸镁处理的促肠蠕动排空率分别为13.3%、5.7%、74.1% (见图11), 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组与溶剂对照组相比差异有统计学意义 ( $p < 0.01$ )。

[0154] 由上述优选实施例可见: 本发明提供的活体斑马鱼促肠蠕动模型能够简便、快速、经济、高效、高通量、准确地筛选促胃肠动力药物。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。

[0155] 工业实用性

[0156] 应用活体斑马鱼促肠蠕动模型进行促胃肠动力药物筛选与药效评价具有可靠、快

速、高效、高性价比等优点,可实现促胃肠动力药物体内筛选高通量的目的。本发明对加速促胃肠动力药物的研发进程意义重大。

[0157] 上述优选实施例只是用于说明和解释本发明的内容,并不构成对本发明的限制。尽管发明人已经对本发明的技术方案做了较为详细的列举,但是本领域技术人员根据发明内容部分和实施例所揭示的内容,能对所描述的具体实施例做各种各样的修改和/或补充或采用类似的方法来替代是显然的,并能实现本发明的技术效果,因此,此处不再一一赘述。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。

#### [0158] 参考文献

[0159] [[i]] Benedicte Y De Winter, Joris G De Man. Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: Effect on gastrointestinal motility. *World J Gastroenterol*. 2010 November 28; 16(44): 5523-5535.

[0160] [[ii]] A-Lan Lee, Choong-Bai Kim. . *J Korean Surg Soc*. 2012; 82(3): 149-155.

[0161] [[iii]] Ozucelik DN, Karaca MA, Sivri B. Effectiveness of pre-emptive metoclopramide infusion in alleviating pain, discomfort and nausea associated with nasogastric tube insertion: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Clin Pract*. 2005 Dec;59(12):1422-7.

[0162] [[iv]] Camilleri M, Parkman HP, Shafi MA, et al. Clinical guideline: management of gastroparesis. *Am J Gastroenterol*. 2013 Jan;108(1):18-37.

[0163] [[v]] Di Veroli GY, Davies MR, Zhang H, et al. High-throughput screening of drug-binding dynamics to HERG improves early drug safety assessment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Jan 1;304(1):H104-17.

[0164] [[vi]] Uchida M, Yamato S, Shimizu K, et al. Dual Role of Mosapride Citrate Hydrate on the Gastric Emptying Evaluated by the Breath Test in Conscious Rats. *J Pharmacol Sci*. 2013 Mar 20.

[0165] [[vii]] Xuan Huang, Bin Lv, Shuo Zhang, Yi-Hong Fan, Li-Na Meng. . *World J Gastroenterol*. 2012 December 28; 18(48): 7371-7377.

[0166] [[viii]] Narayanan Venkatasubramani, Colin D Rudolph, Manu R Sood. Erythromycin lacks colon prokinetic effect in children with functional gastrointestinal disorders: a retrospective study. *BMC Gastroenterol*. 2008; 8: 38.

[0167] [[ix]] Schemann M. Control of gastrointestinal motility by the ‘gut brain’ - the enteric nervous system. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: S4-6.

[0168] [[x]] Seerden TC, Lammers WJ, De Winter BY, De Man JG, Pelckmans PA. Spatiotemporal electrical and motility mapping of distension-induced propagating oscillations in the murine small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 289:G1043-1051.

- [0169] [[xi]] Hennig GW, Costa M, Chen BN, Brookes SJ. Quantitative analysis of peristalsis in the guinea-pig small intestine using spatio-temporal maps. *J Physiol*. 1999; 517:575-590.
- [0170] [[xii]] Cowan A, Earnest DL, Ligozio G, Rojavin MA. Omeprazole-induced slowing of gastrointestinal transit in mice can be countered with tegaserod. *Eur J Pharmacol* 2005;517: 127-31.
- [0171] [[xiii]] Iwanaga Y, Wen J, Thollander MS et al. Scintigraphic measurement of regional gastrointestinal transit in the dog. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol* 1998; 38:G904-10.
- [0172] [[xiv]] Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Drug Discovery* 2005; 4: 35-44.
- [0173] [[xv]] McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today* . 2008;13:394-401.
- [0174] [[xvi]] Barros, T. P., Alderton, W. K., Reynolds, H. M., Roach, A. G., & Berghmans, S. Zebrafish: An emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 2008; 154, 1400-1413.
- [0175] [[xvii]] A. RICH. A new high-content model system for studies of gastrointestinal transit: the zebrafish. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21, 225-228.
- [0176] [[xviii]] Hoogerwerf WA. Reviews in endocrine & metabolic disorders 2009 Dec; 10(4): 293-300.
- [0177] [[xix]] Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*. 1985; 100 (3): 965-973.
- [0178] [[xx]] Jones KS, Alimov AP, Rilo HL, Jandacek RJ, Woollett LA, Penberthy WT. A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. *Nut Metab*. 2008; 5:23.
- [0179] [[xxi]] Holmberg A, Schwerte T, Fritsche R, et al. Ontogeny of intestinal motility in correlation to neuronal development in zebrafish embryos and larvae. *J Fish Biol* 2003; 63:318-31.
- [0180] [[xxii]] Kuhlman J, Eisen JS. Genetic screen for mutations affecting development and function of the enteric nervous system. *Dev Dyn* 2007; 236: 118-27.
- [0181] [[xxiii]] Holmberg A, Olsson C, Hennig GW. TTX-sensitive and TTX-insensitive control of spontaneous gut motility in the developing zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *J Exp Biol* 2007; 210:1084-91.
- [0182] [[xxiv]] Fowler SD, Greenspan P. Application of Nile red, a

fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem.* 1985; 33 (8):833-836.

[0183] [[xxv]] Holmberg A, Schwerte T, Fritsche R, et al. Ontogeny of intestinal motility in correlation to neuronal development in zebrafish embryos and larvae. *J Fish Biol* 2003; 63:318-31.

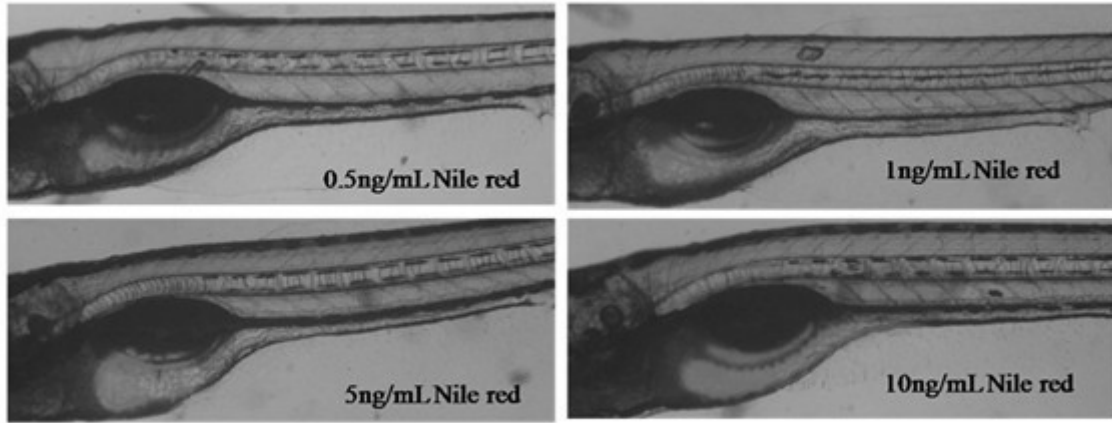


图 1

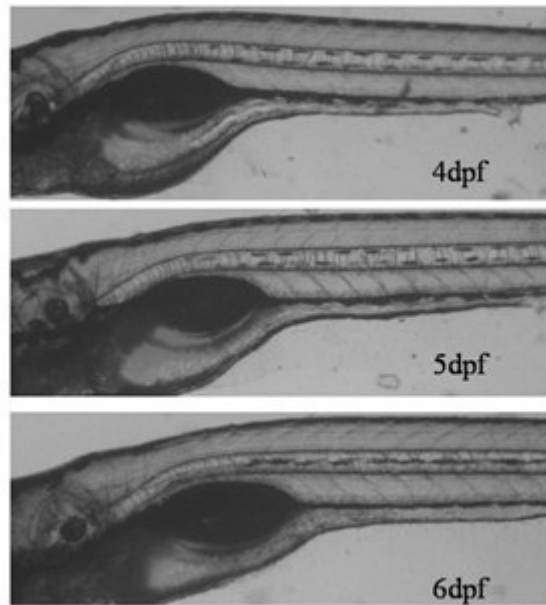


图 2

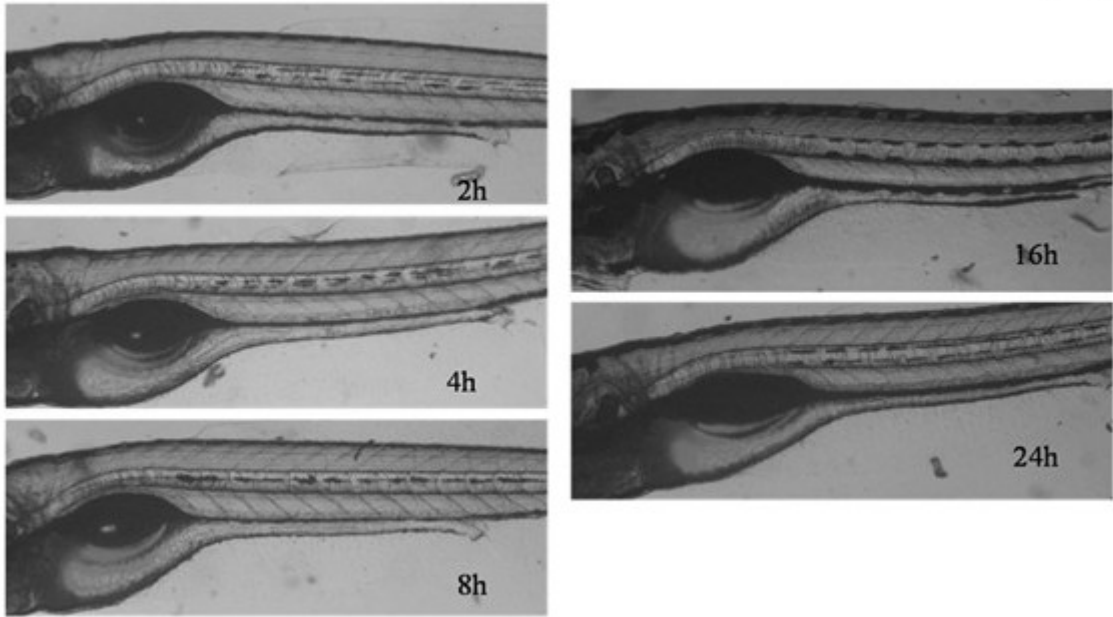


图 3

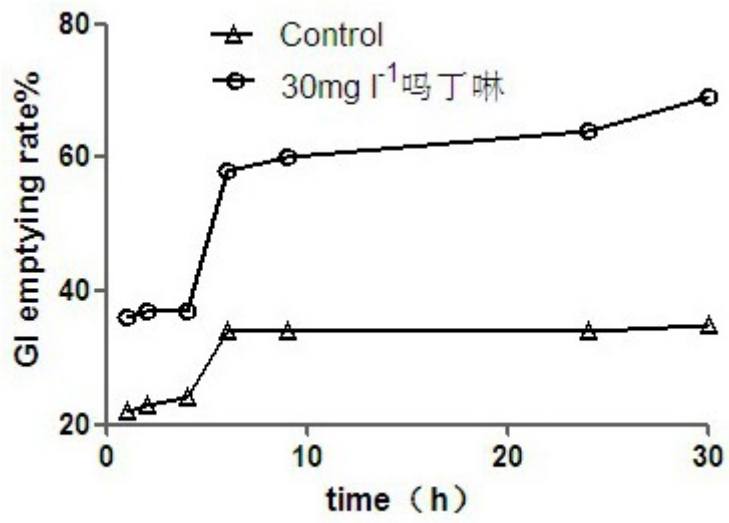


图 4



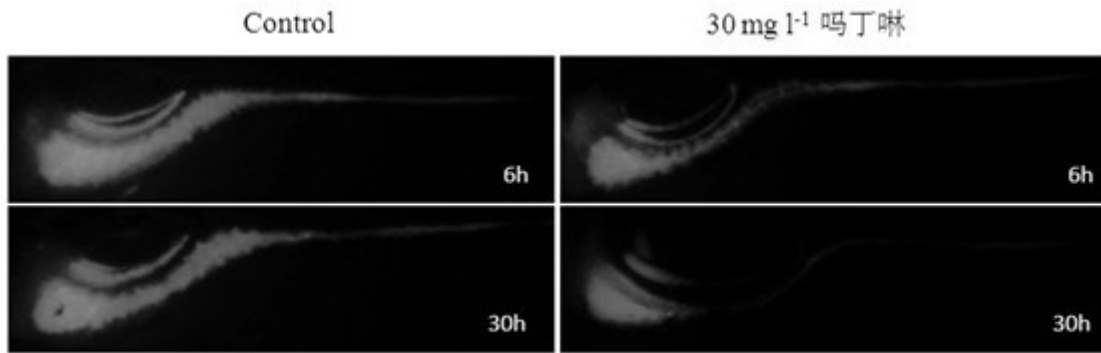


图 5

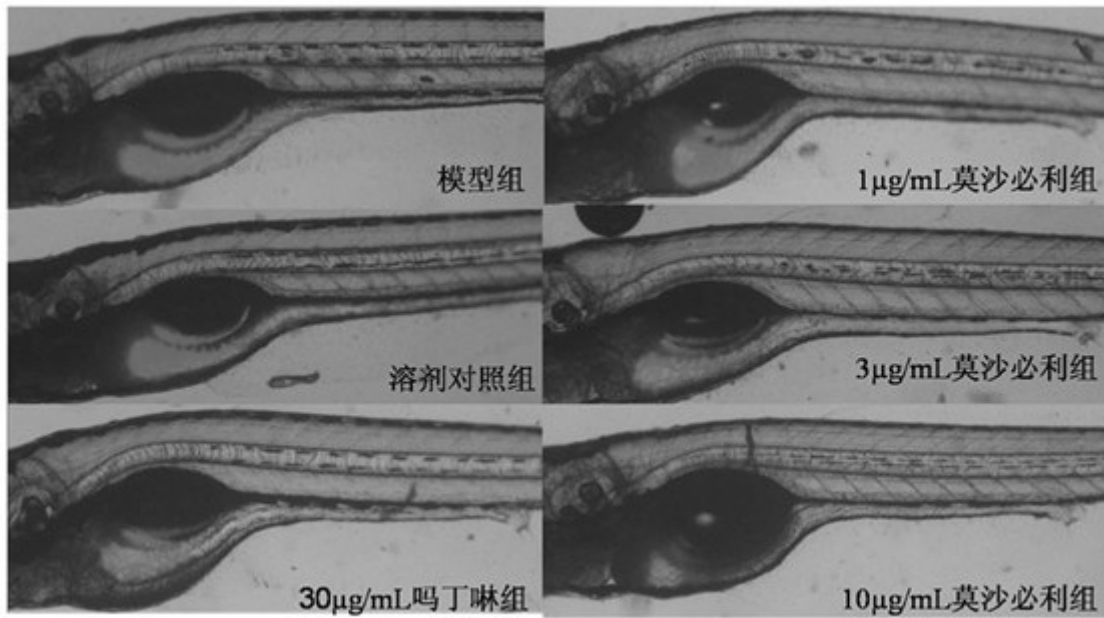


图 6

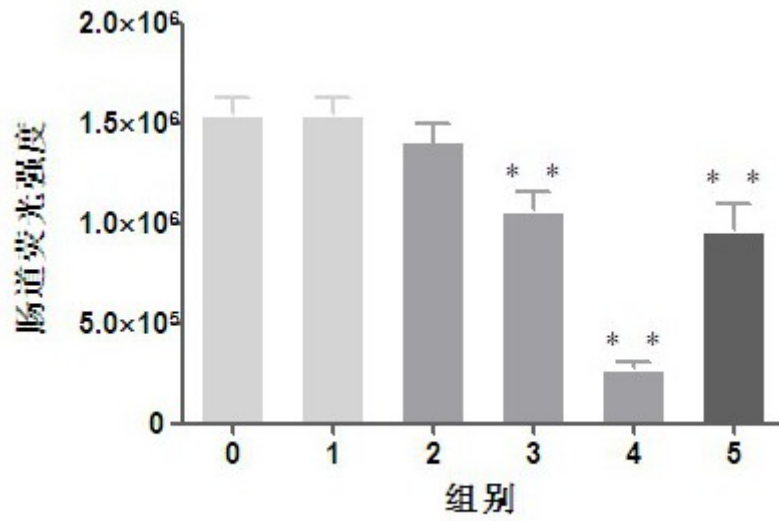


图 7

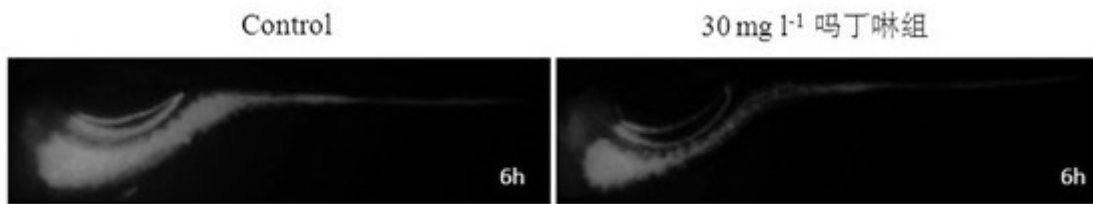


图 8

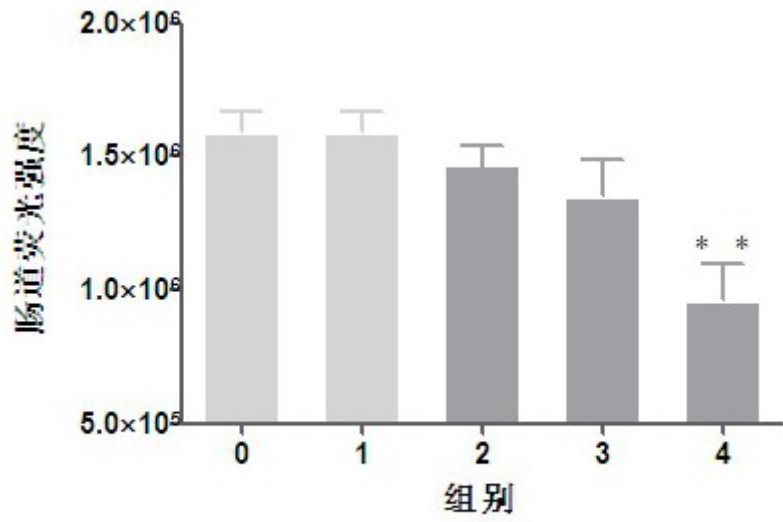


图 9

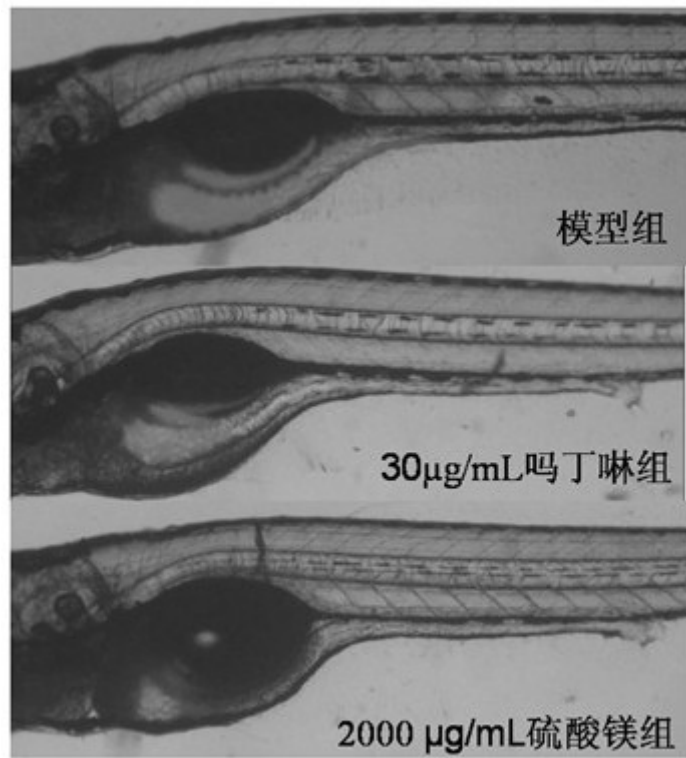


图 10

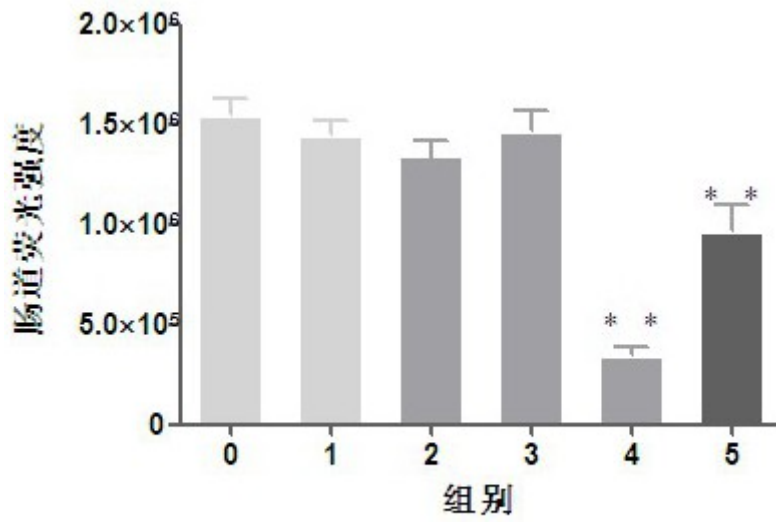


图 11