



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101968484 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 201010296696.9

(22) 申请日 2010.09.29

(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区)

(72) 发明人 彭恩泽

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公
司 33109

代理人 林宝堂

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101448952 A, 2009.06.03,

CN 101810866 A, 2010.08.25,

吴治晴等. 分离和冷冻处理对牛性控精液线
粒体膜电位的影响. 《繁殖生理》. 2010, 第 46 卷
(第 1 期),

Choong Yong Ung et. al.. Mercury-induced

hepatotoxicity in zebrafish:in vivo
mechanistic insights from transcriptome
analysis, phenotype anchoring and
targeted gene expression validation. 《BMC
Genomics》. 2010, 第 11 卷

Serbedzija GN et.al.. Zebrafish
angiogenesis:A new model for drug
screening. 《angiogenesis》. 1999, 第 3 卷 (第
4 期),

Dirk M. Hentschel et. al.. Acute renal
failure in zebrafish: a novel system to
study a complex disease. 《Am. J. Physiol.
Renal. Physiol》. 2004, 第 288 卷 (第 5 期),

审查员 刘文瀚

权利要求书2页 说明书20页 附图5页

(54) 发明名称

一种利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方
法

(57) 摘要

本发明涉及化合物检测领域,具体涉及一种
利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,主要
包括斑马鱼选取、化合物处理、染色处理和定量/
定性分析几个步骤,其中所述的染色处理是指将
经过化合物处理后的斑马鱼采用 JC-1 或 DASPEI
作为染色剂在 28℃下染色处理 0.5-1 个小时。本
发明弥补了现有技术无法实现体内检测线粒体损
伤的不足,提供了一种方便快捷、经济实用的利用
斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的体内实验分析方
法,具有高通量、特异性强的特点。

1. 一种利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,主要包括以下步骤:

(1) 斑马鱼选取

选取受精后 2-7 天的正常发育的斑马鱼,放入微孔板中,

(2) 化合物处理

A 方案:移除微孔板中的养殖用水,然后按照待测化合物处理组、线粒体损伤阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组,根据微孔板的规格分别加入相应的待测化合物溶液、线粒体损伤诱导剂溶液、溶剂、养殖用水,然后微孔板于 28°C 下恒温培养 6-72 小时,其中:待测化合物溶液浓度为 0.1-1000 μ M,或者

B 方案:移除微孔板中的养殖用水,然后按照待测化合物组合处理组、线粒体损伤模型组、线粒体保护阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组,根据微孔板的规格分别加入相应的待测化合物+线粒体损伤诱导剂的混合溶液、线粒体损伤诱导剂溶液、线粒体损伤诱导剂+线粒体保护剂的混合溶液、溶剂、养殖用水,然后微孔板于 28°C 下恒温培养 6-72 小时,其中:待测化合物溶液浓度为 0.1-1000 μ M,

所述的溶剂为体积浓度为 0.1% 的二甲基亚砜,

(3) JC-1 或 DASPEI 染色处理

将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色作为背景组,另外一组与其他组进行染色处理,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

A、移除微孔板中的液体,根据微孔板的规格加入 10 μ M JC-1 或 1mM DASPEI;

B、将微孔板置于 28°C 恒温中培养 0.5-1 小时;

C、移除微孔板中的液体,用养殖用水清洗;

D、微孔板中根据微孔板的规格加入养殖用水,于 28°C 恒温中培养 5min;

E、重复实验操作 D) 2-3 次;

F、将斑马鱼转入新的微孔板中,移除微孔板中的液体,根据微孔板的规格加入养殖用水,

(4) 荧光酶标仪定量分析或 / 和荧光显微镜定性分析。

2. 根据权利要求 1 所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其特征在于:所述的步骤(1) 斑马鱼选取受精 4 天后的斑马鱼;所述的步骤(2) 化合物处理中微孔板于 28°C 下恒温培养 24 小时。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其特征在于:所述的步骤(1) 斑马鱼选取采用解剖显微镜。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其特征在于:所述的微孔板选用 6-96 孔的微孔板。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其特征在于:所述的步骤(2)采用 A 方案进行化合物处理后,步骤(4)荧光酶标仪定量分析按下述方法操作:

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 488nm,在 590nm 处或 515nm 处采集发射光的荧光强度,按下述公式计算线粒体损伤率:

$$\text{线粒体损伤率} = \left(1 - \frac{\text{化合物处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{溶剂组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%。$$

6. 根据权利要求1或2所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其特征在于:所述的步骤(2)采用B方案进行化合物处理后,步骤(4)荧光酶标仪定量分析按下述方法操作:

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488nm,在530nm处采集发射光的荧光强度,按下述公式计算线粒体损伤保护率:

$$\text{线粒体损伤保护率} = \left(1 - \frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%。$$

7. 根据权利要求1或2所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其特征在于:所述的步骤(4)荧光显微镜定性分析按下述方法操作:

将斑马鱼转入新的微孔板后,移除微孔板中的养殖用水,根据微孔板规格加入浓度为0.64mM的甲磺酸,用3%甲基纤维素胶固定后,置于荧光显微镜下观察荧光颜色。

一种利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化合物(化学品)检测领域,具体涉及一种简单、经济、高通量实现利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法。

背景技术

[0002] 线粒体是真核细胞内重要的细胞器,参与细胞内三羧酸循环、脂肪酸代谢、氧化磷酸化等多种重要的生理和生化过程。线粒体在细胞凋亡中起重要的枢纽作用,线粒体中一系列的代谢过程与细胞凋亡密切相关,如氧自由基的过度产生、细胞色素 C 的释放、线粒体膜通透性转换孔的异常开放等。线粒体膜具有多种离子通道可介导离子转运,离子通道的调节可能影响线粒体甚至细胞的功能。线粒体损伤一方面可直接导致线粒体病,另一方面与神经退行性疾病、肿瘤、衰老等息息相关^[1]。

[0003] 线粒体介导的细胞凋亡途径主要过程是细胞色素 C、Smac 蛋白、凋亡诱导因子和核酸内切酶从线粒体释放。其中促凋亡亚族(Bax)是 p53 激活转录的产物,可以促进或诱导线粒体凋亡因子的释放从而促进凋亡。在正常情况下这些蛋白是位于细胞的非线粒体组分,一旦细胞受到凋亡诱导剂的诱导,它们就以线粒体作为靶细胞器而向线粒体转位,对凋亡进行调控。凋亡诱导剂诱导细胞凋亡时,线粒体膜通透性增强,线粒体内的各种蛋白被释放出来,包括细胞色素 C。细胞色素 C 进入细胞质中与凋亡蛋白激活因子 Apaf-1 及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-9 (Caspase-9) 前体形成凋亡小体,在细胞质中存在的脱氧三磷酸腺苷(dATP)的共同作用下,活化 Caspase-9 前体,启动 Caspase 级联,最终诱导细胞产生凋亡^[2-3]。线粒体在细胞凋亡中的重要性还在于它与 Bcl-2 基因家族之间的关系。很多 Bcl-2 家族的蛋白如 Bcl-2、Bax、Bcl-x1 等都定位于线粒体膜上。

[0004] 神经退行性疾病(Degenerative disease of the central nervous system, ND)是一组以原发性神经元变性为基础的慢性进行性神经系统疾病。该类疾病主要包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、Huntington 舞蹈病(Huntington disease)、不同类型脊髓小脑共济失调(spinal cerebellar ataxias)、多发性硬化(multiple sclerosis, MS)、多发性肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)及脊髓肌萎缩症(spinal muscular atrophy)等。神经退行性病共同的病理机制之一是神经细胞的凋亡,因此可通过阻断神经细胞退行性改变的线粒体介导的细胞凋亡过程筛选防治神经退行性病变的药物^[4-6]。

[0005] 线粒体介导肿瘤细胞凋亡的主要途径是通过线粒体膜通透性改变,介导凋亡因子的释放。有体外实验证明,线粒体 DNA 突变可削弱正常呼吸功能,释放高水平的活性氧(reactive oxygen species, ROS),从而激活细胞凋亡及对核基因组的损伤^[7-9]。抗肿瘤药物作用于线粒体,可导致线粒体通透性转换孔开放,线粒体膜电位下降或消失,继而呼吸链脱耦联,谷胱甘肽耗竭,ROS 产生及细胞色素 C 和诱导因子释放,并诱导肿瘤细胞凋亡。

[0006] 衰老的发展过程与线粒体功能异常密切相关^[10]。自由基学说是具有代表性的衰老学说之一。线粒体作为细胞呼吸和氧化的中心,也是产生活性氧的重要场所^[11]。正常机

体内 ROS 的产生与消除处于动态平衡,但随着机体年龄的增加,这种平衡被打破,抗氧化活性递减,氧自由基产生增多并积累。过多的氧自由基可通过过氧化作用攻击线粒体膜,导致线粒体膜通透性改变,线粒体膜电位下降或消失,最终诱导细胞凋亡。

[0007] 研究发现许多药物或毒物的作用靶点位于线粒体膜或线粒体内膜复合物,其药理或毒理作用主要通过调节线粒体呼吸链功能、代谢酶活性、膜通透性来实现,药物或毒物能损伤线粒体结构、酶或 DNA 合成^[12-14]。因此,可通过检测线粒体损伤来评价化合物毒性和筛选新药。

[0008] 线粒体损伤的检测包括对线粒体膜通透性转换孔的检测、膜磷脂的检测、膜电位的检测及线粒体 DNA 的损伤检测。目前线粒体损伤的检测方法主要是建立在细胞水平或分子水平基础上。细胞凋亡过程中线粒体损伤的检测方法主要有以下几种^[15]：

[0009] (1)免疫印迹法:通过不同免疫印迹法,测定不同细胞成分中细胞色素 C、AIF 等蛋白分布。此方法处理量相对较低,且需亚细胞结构线粒体的分离。该方法实验过程操作复杂,难以避免非特异性影响,容易产生假阳性或假阴性结果。

[0010] (2)酶联免疫吸附测定:利用特定商品试剂盒对亚细胞分布进行测定,敏感性较高,但需要亚细胞结构分离。该方法实验操作复杂,容易造成细胞损伤,且不能反映药物在生物整体的吸收、分布、代谢与排泄,不能反映药物在体内的真实情况。

[0011] (3)细胞转染:利用绿色荧光蛋白(green-fluorescence protein, GFP)标记的编码膜间蛋白的 cDNA 转染细胞,该方法虽然可应用于活细胞,且进行动态观察,但过程较为复杂,处理量低。

[0012] (4)免疫荧光或共聚焦显微镜:经固定及渗透化处理的细胞,先后与一抗及二抗反应,相应的二抗上进行荧光标记,荧光显微镜观察。可利用活性 caspase 抗体和核对比染色检测凋亡过程的进行。但此方法样本处理量较低,且不同膜间蛋白释放过程的动力学有所不同,易产生假阴性结果。

[0013] (5)电子/免疫电子显微镜:可观察凋亡细胞的超微结构,从而直接观察线粒体外膜破裂及局部内膜疝出。该方法样本处理量很低,很难进行定量分析,且不能检测外膜完整性未破坏时发生的透化现象。

[0014] (6)细胞荧光测定:利用荧光活化细胞分选系统(fluorescence activated cell sorting, FACS)进行测定。首先应用低浓度洋地黄选择性将细胞膜透化,引起胞质细胞色素 C 外漏并被清除。再经过固定,免疫标记及细胞荧光测定。正常细胞的细胞色素 C 维持在线粒体膜间隙中,呈现出强荧光,而如细胞色素 C 从外膜漏出,则荧光信号较弱。此方法可用于大量样本量的处理且无需亚细胞分离,但实验过程较为复杂,处理过程中需不断优化。

[0015] 但是,上述无论是细胞水平还是分子水平的线粒体损伤检测,都属于体外实验检测,且存在很多缺陷:

[0016] (1)细胞水平的检测采取细胞培养的方式,该方法虽然有效、所需费用较低,但体外细胞缺少了生物整体的代谢循环转换和体内的循环分布,不能真正反映整体生物活性;

[0017] (2)分子水平的检测需将线粒体分离,同样缺少了药物在生物体内的吸收、分布、代谢及排泄过程,不能反映药物在体内的真实情况;

[0018] (3)线粒体在分离过程中会造成不同程度的损伤,相对纯度较低;

[0019] (4)离体线粒体酶活性较低,生物学功能较差;

- [0020] (5) 难以避免非特异性影响,从而产生假阳性或假阴性结果;
- [0021] (6) 样本容量低,不能进行高通量筛选,难于定量分析;
- [0022] (7) 实验重复性差,特异性较差,敏感性较差;
- [0023] (8) 实验操作复杂,实验周期长;
- [0024] (9) 实验费用较高。

[0025] 目前尚未见线粒体损伤检测的体内实验报道,利用斑马鱼检测线粒体损伤的研究亦很少。Zhang YZ 等^[18]利用共聚焦显微镜结合 JC-1 荧光染色法检测了斑马鱼卵子发生过程中的线粒体行为,该研究首先将成年雌性斑马鱼卵巢离体,经化合物处理后制成早期卵母细胞悬液,再经线粒体荧光染料染色后置于共聚焦显微镜下观察研究。该研究是用来观察斑马鱼卵子发生过程中的线粒体行为,并非是对线粒体损伤的检测,不能用来评价化合物的线粒体毒性,也不能用来筛选线粒体靶向化合物。公开号为 CN1866025A 的中国发明,公开一种斑马鱼胚胎模型检测抗新生血管生成蛋白因子或促新生血管生成蛋白因子活性的方法,但该发明并非靶向线粒体筛选化合物。

[0026] JC-1 (碘化四氯代四乙基苯咪唑羧花青) 是一种碳氰化合物类阳离子荧光染料,能进入活细胞内与线粒体内膜特异性结合。JC-1 是很好的电压依赖性荧光染料,目前被认为是最可靠最敏感的线粒体膜电位特异性的荧光染色剂。其原理是:正常线粒体膜电位较高,JC-1 聚集在线粒体的基质中形成聚合物,激发光 488nm 时的最大发射波长为 590nm,可以产生红色荧光;损伤线粒体膜电位降低,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体,激发光 488nm 时最大发射波长为 530nm,可以产生绿色荧光^[16-17]。因此,可通过检测红绿荧光强度来表示线粒体膜电位的变化。此外,本发明也可以采用活细胞内线粒体荧光染料 DASPEI (2, 4- 二甲基氨基苯乙烯基 -N- 乙基吡啶鎓碘化物) 作为染色剂,其在激发光 488nm,发射光 515nm 时可产生绿色荧光。

[0027] 线粒体经过 JC-1 染色后的检测方法主要是采用流式细胞仪、荧光酶标仪或激光共聚焦显微镜等^[19-22] 仪器进行分析研究。但目前采用这些方法的研究仍处于体外实验阶段,且建立在细胞水平基础上。这些方法虽然有效,但实验操作复杂,实验费用较高,难以避免非特异性影响,从而产生假阳性或假阴性结果,最重要的是体外细胞缺少了生物整体的代谢循环转换和体内的循环分布,不能真正反映整体生物活性。

发明内容

[0028] 为了克服上述现有技术线粒体损伤检测方法所存在的缺陷和不足,发明人经过研究,旨在提供了一种方便快捷、经济实用的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的体内实验分析方法。

[0029] 具体来讲,本发明的技术方案如下:

[0030] 发明概述

[0031] 一种利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,主要包括以下步骤:

[0032] (1) 斑马鱼选取

[0033] 选取受精后 2-7 天的正常发育的斑马鱼,放入微孔板中,

[0034] (2) 化合物处理

[0035] A 方案:移除微孔板中的养殖用水,然后按照待测化合物处理组、线粒体损伤阳性

对照组、溶剂对照组、空白对照组,根据微孔板的规格分别加入相应的待测化合物溶液、线粒体损伤诱导剂溶液、溶剂、养殖用水,然后微孔板于 28°C 下恒温培养 6-72 h(小时),其中:待测化合物溶液浓度为 0.1-1000 μ M,或者

[0036] B 方案:移除微孔板中的养殖用水,然后按照待测化合物组合处理组、线粒体损伤模型组、线粒体保护阳性对照组、溶剂对照组、空白对照组,根据微孔板的规格分别加入相应的待测化合物+线粒体损伤诱导剂的混合溶液、线粒体损伤诱导剂溶液、线粒体损伤诱导剂+线粒体保护剂的混合溶液、溶剂、养殖用水,然后微孔板于 28°C 下恒温培养 6-72 h(小时),其中:待测化合物溶液浓度为 0.1-1000 μ M,

[0037] (3) JC-1 或 DASPEI 染色处理

[0038] 将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色作为背景组,另外一组与其他组进行染色处理,步骤如下:

[0039] A、移除微孔板中的液体,根据微孔板的规格加入 10 μ M JC-1 或 1mM DASPEI;

[0040] B、将微孔板置于 28°C 恒温中培养 0.5-1 h(小时);

[0041] C、移除微孔板中的液体,用养殖用水清洗;

[0042] D、微孔板中根据微孔板的规格加入养殖用水,于 28°C 恒温中培养 5min(分钟);

[0043] E、重复实验操作 D) 2-3 次;

[0044] F、将斑马鱼转入新的微孔板中,移除微孔板中的液体,根据微孔板的规格加入养殖用水,

[0045] (4) 多功能微孔板分析仪定量分析或 / 和荧光显微镜定性分析。

[0046] 本发明利用活体斑马鱼荧光染色法检测线粒体靶向化合物。JC-1 的原理是:正常线粒体膜电位较高,JC-1 聚集在线粒体的基质中形成聚合物,激发光 488nm 时的最大发射波长为 590nm,可以产生红色荧光;损伤线粒体膜电位降低,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体,激发光 488nm 时最大发射波长为 530nm,可以产生绿色荧光。因此,可通过检测红绿荧光强度来表示线粒体膜电位的变化。此外,本发明也可以采用活细胞内线粒体荧光染料 DASPEI 作为染色剂,其在激发光 488nm,发射光 515nm 时可产生绿色荧光。

[0047] 作为优选,根据本发明所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其中:所述的步骤(1)斑马鱼选取受精 4 天后的斑马鱼;所述的步骤(2)化合物处理中微孔板于 28°C 下恒温培养 24h。在该条件下,线粒体损伤诱导剂可导致最大程度的线粒体损伤。

[0048] 作为优选,根据本发明所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其中:所述的步骤(3)染色处理的整个染色过程需避光操作。避光的理由是避免荧光见光消退。

[0049] 作为优选,根据本发明所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其中:所述的步骤(1)斑马鱼选取采用解剖显微镜。优选的理由是解剖显微镜下能更准确地挑选发育正常的斑马鱼,利于下一步化合物处理,有利于检测结果。

[0050] 作为优选,根据本发明所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其中:所述的微孔板选用 6-96 孔的微孔板。选择这些规格微孔板的理由是研究发现,本发明的斑马鱼适宜在一个标准的 6、12、24、48 或 96 孔板内进行分析。

[0051] 作为优选,根据本发明所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其中:所述的步骤(2)采用 A 方案进行化合物处理后,步骤(4)多功能微孔板分析仪定量分析按下述方法操作:

[0052] 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 488nm,在 590nm 处(JC-1 为染色剂)或 515nm 处(DASPEI 为染色剂)采集发射光的荧光强度,按下述公式计算线粒体损伤率:

$$[0053] \quad \text{线粒体损伤率} = \left(1 - \frac{\text{化合物处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{溶剂组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}\right) \times 100\%。$$

[0054] 作为优选,根据本发明所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其中:所述的步骤(2)采用 B 方案进行化合物处理后,步骤(4)多功能微孔板分析仪定量分析按下述方法操作:

[0055] 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 488nm,在 530nm 处(JC-1 为染色剂)采集发射光的荧光强度,按下述公式计算线粒体损伤保护率:

$$[0056] \quad \text{线粒体损伤保护率} = \left(1 - \frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}\right) \times 100\%。$$

[0057] 作为优选,根据本发明所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其中:所述的步骤(4)荧光显微镜定性分析按下述方法操作:

[0058] 移除微孔板中的液体,加入浓度为 0.64mM 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荧光颜色。JC-1 原理是:在荧光显微镜下,JC-1 在正常线粒体内形成多聚体,产生红色荧光;在损伤线粒体内以单体形式存在,产生绿色荧光。DASPEI 原理是:在荧光显微镜下,正常线粒体内产生较明亮的绿色荧光,损伤线粒体内绿色荧光较正常线粒体变暗或消失。

[0059] 作为优选,根据本发明所述的利用斑马鱼筛选线粒体靶向化合物的方法,其中:所述的步骤(2)化合物处理中的溶剂为体积浓度为 0.1% 的二甲基亚砷。

[0060] 本发明的检测方法一方面避免了细胞水平和分子水平上线粒体损伤检测方法的缺陷,可以真实反映药物在活体内的代谢循环转换和体内的循环分布,包括药物的吸收、分布、代谢、排泄,能够真正反映药物的整体生物活性;另一方面活体斑马鱼具有与生俱来的优点^[23-24]:

[0061] 1) 饲养成本低,性成熟周期短;

[0062] 2) 繁殖能力强,一尾雌鱼每次可产 200 ~ 300 枚卵;

[0063] 3) 生长发育速度快,在受精 24h 后,斑马鱼主要的组织器官原基已形成,可为
[0064] 研究提供大量的样本和较短的实验周期;

[0065] 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
[0066] 官系统;

[0067] 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;

[0068] 6) 胚胎很小,幼鱼体长只有 1-4 mm,能够在一个标准的 6、12、24、48 或 96

[0069] 孔板内进行分析;

[0070] 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。

[0071] 发明详述

[0072] 主要仪器与试剂：

[0073] 碘化四氯代四乙基苯咪唑羰花青(JC-1) 荧光染料购自荷兰 Leiden 公司(Molecular Probes Europe);2,4-二甲基氨基苯乙烯基-N-乙基吡啶鎓碘化物(2-[4-(Dimethylamino)styryl]-1-ethylpyridinium iodide, DASPEI)、甲磺酸(ethyl-m-aminobenzoate methanesulfonate, MESAB)、甲基纤维素胶(methyl cellulose)、星孢菌素(staurosporine)和依托泊苷(etoposide)均购自美国 sigma 公司。其他试剂由北京鼎国昌盛科技有限公司提供。

[0074] 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)。

[0075] 1、确定斑马鱼最佳处理阶段

[0076] (1) 斑马鱼选取

[0077] 将 2dpf、3dpf、4dpf、5dpf、6dpf、7dpf 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个 48 孔板中,每孔 10 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。)

[0078] (2) 化合物处理

[0079] 设置 6 个实验组(每组分别为 2dpf、3dpf、4dpf、5dpf、6dpf、7dpf 的斑马鱼),每个实验组包括 1 个线粒体损伤诱导剂处理组、1 个溶剂对照组、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),线粒体损伤诱导剂处理组中加入 1mL 50 μM 星孢菌素;溶剂对照组中加入 1mL 浓度为 0.1% 的 DMSO;空白对照组中加入 1mL 养殖用水,于 28℃ 恒温培养箱中培养。

[0080] (3) 染色处理

[0081] 将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色,作为背景组;将另外一组溶剂组、线粒体损伤诱导剂处理组、空白对照组染色。选用 JC-1 作为染色剂,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0082] A、移除微孔板中的液体,用移液枪吸取 1mL 10 μM JC-1 于微孔板中;

[0083] B、将微孔板置于 28℃ 恒温培养箱中培养 1h;

[0084] C、取出微孔板,移除微孔板中的液体,用养殖用水快速清洗 3 遍;

[0085] D、微孔板中加入 1mL 养殖用水,于 28℃ 恒温培养箱中培养 5min;

[0086] E、重复实验操作 D) 2 次;

[0087] F、将斑马鱼转入新的 48 孔板中,每孔 1 尾,移除微孔板中的液体,加入 350 μL 养殖用水。

[0088] (4) 定量分析

[0089] 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 488nm,在 590nm 处采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。线粒体损伤率计算公式为:

[0090]

$$\text{线粒体损伤率} = \left(1 - \frac{\text{诱导剂处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{溶剂组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}\right) \times 100\%$$

[0091] 实验数据以 $\bar{X} \pm SE$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 Student's t 检验进行统计学处理。统计学处理结果显示:2dpf、3dpf、4dpf、5dpf、6dpf、7dpf 的斑马鱼线粒体损伤率分别为 $(49.24 \pm 2.37)\%$, $(64.02 \pm 7.67)\%$, $(68.75 \pm 4.18)\%$, $(56.34 \pm 3.74)\%$, $(49.28 \pm 3.48)\%$, $(45.78 \pm 3.34)\%$ (见图 1),这表明随着斑马鱼年龄的增加,线粒体损伤诱导剂对斑马鱼造成的线粒体损伤率先增高后降低,4dpf 的斑马鱼线粒体损伤率最高。通过方差分析,线粒体损伤诱导剂处理组的线粒体损伤率高于溶剂对照组,差异有统计学意义 ($p < 0.05$),且 4dpf 斑马鱼 p 值最小。

[0092] (5) 定性分析

[0093] 移除微孔板中的液体,加入 350 μ L 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荧光颜色。在荧光显微镜下,JC-1 在对照组内形成多聚体,产生红色荧光;在线粒体损伤细胞内以单体形式存在,产生绿色荧光。随着斑马鱼年龄的增加,线粒体损伤诱导剂处理组绿色荧光先变亮后变暗,4dpf 的斑马鱼绿色荧光最亮。因此,定性确定将 4dpf 的斑马鱼作为化合物最佳处理阶段。

[0094] 2、确定化合物最佳处理时间长度

[0095] (1) 斑马鱼选取

[0096] 将 4dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼分别移入五个 48 孔板中,每孔 10 尾。

[0097] (2) 化合物处理

[0098] 每个微孔板设置 1 个线粒体损伤诱导剂处理组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,线粒体损伤诱导剂处理组中加入 1mL 50 μ M 星孢菌素;溶剂对照组中加入 1mL 浓度为 0.1% 的 DMSO;空白对照组中加入 1mL 养殖用水。将五个微孔板放入 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中分别培养 6h、12h、24h、48h、72h。

[0099] (3) 染色处理

[0100] 将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色,作为背景组;将另外一组溶剂组、线粒体损伤诱导剂处理组、空白对照组染色,选用 JC-1 作为染色剂,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0101] A、移除微孔板中的液体,用移液枪吸取 1mL 10 μ M JC-1 于微孔板中;

[0102] B、将微孔板置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 1h;

[0103] C、取出微孔板,移除微孔板中的液体,用养殖用水快速清洗 3 遍;

[0104] D、微孔板中加入 1mL 养殖用水,于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 5min;

[0105] E、重复实验操作 D) 2 次;

[0106] F、将斑马鱼转入新的 48 孔板中,每孔 1 尾,移除微孔板中的液体,加入 350 μ L 养殖用水。

[0107] (4) 定量分析

[0108] 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 488nm,在 590nm 处采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。线粒体损伤率计算公式为:

[0109]

$$\text{线粒体损伤率} = \left(1 - \frac{\text{诱导剂处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{溶剂组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%$$

[0110] 实验数据以 $\bar{X} \pm SE$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 Student' s t 检验进行统计学处理。统计学处理结果显示:线粒体损伤诱导剂处理 6h、12h、24h、48h、72h 的斑马鱼线粒体损伤率分别为 $(8.89 \pm 1.96)\%$ 、 $(24.44 \pm 1.17)\%$ 、 $(55.57 \pm 2.10)\%$ 、 $(56.78 \pm 1.93)\%$ 、 $(57.11 \pm 1.68)\%$ (见图 2),这表明随着处理时间的延长,线粒体损伤率先增高后逐渐减缓。通过方差分析,线粒体损伤诱导剂处理组处理 12h、24h、48h、72h 的线粒体损伤率高于溶剂对照组,差异有统计学意义 ($p < 0.05$),而线粒体损伤诱导剂处理组处理 24h、48h、72h 之间无统计学差异,因此选择最短处理时间 24h 作为化合物最佳处理时间。不同化合物最佳处理时间也不相同,需要具体化合物具体分析,本发明按照线粒体损伤诱导剂的最佳处理时间长度进行实验。

[0111] (5) 定性分析

[0112] 移除微孔板中的液体,加入 $350 \mu\text{L}$ 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荧光颜色。在荧光显微镜下,JC-1 在对照组内形成多聚体,产生红色荧光;在线粒体损伤细胞内以单体形式存在,产生绿色荧光。随着处理时间的延长,线粒体损伤诱导剂处理组绿色荧光逐渐变亮,处理 24h 绿色荧光强度达最大,48h 和 72h 未见明显增强。因此,定性确定 24h 为化合物最佳处理时间长度。

[0113] 3、基于上述斑马鱼最佳处理阶段和化合物最佳处理时间长度,本发明主要从化合物对线粒体损伤和对线粒体保护两个角度进行评价

[0114] 3.1 筛选损伤线粒体的线粒体靶向化合物

[0115] (1) 斑马鱼选取

[0116] 取 4~5 对斑马鱼亲本交配,按照 Westerfield^[25] 的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段(即 4dpf)的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入 6,12,24,48 或 96 孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0117] (2) 化合物处理

[0118] 设置 8 个实验组:5 个待测化合物处理组、1 个线粒体损伤阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,5 个待测化合物处理组中分别加入一定体积(根据微孔板规格而定)浓度分别为 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $1000 \mu\text{M}$ 的待测化合物溶液;阳性对照组中加入等体积线粒体损伤诱导剂 $50 \mu\text{M}$ 星孢菌素(staurosporine)或 $50 \mu\text{M}$ 依托泊苷(etoposide);溶剂对照组中加入等体积溶剂(一般为 0.1% 的 DMSO);空白对照组中加入等体积养殖用水。按照最佳处理时间长度于 28°C 恒温培养箱中培养 24h。

[0119] (3) 染色处理

[0120] 将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色,作为背景组;将另外一组溶剂组、化合物处理组、阳性对照组、空白对照组染色,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0121] A、移除微孔板中的液体,用移液枪吸取等体积 $10 \mu\text{M}$ JC-1 或 1mM DASPEI 于微孔板中;

- [0122] B、将微孔板置于 28℃ 恒温培养箱中培养 1h；
- [0123] C、取出微孔板，移除微孔板中的液体，用养殖用水快速清洗 3 遍；
- [0124] D、微孔板中加入等体积养殖用水，于 28℃ 恒温培养箱中培养 5min；
- [0125] E、重复实验操作 D) 2-3 次；
- [0126] F、将斑马鱼转入新的 48 或 96 孔板中，每孔 1 尾，移除微孔板中的液体，加入 350 μL (48 孔板) 或 150 μL (96 孔板) 养殖用水。
- [0127] (4) 定量分析
- [0128] 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 488nm，在 590nm 处 (JC-1 为染色剂) 或 515nm 处 (DASPEI 为染色剂) 采集发射光的荧光强度，试验重复 3 次取其平均值。线粒体损伤率计算公式为：

[0129]

$$\text{线粒体损伤率} = \left(1 - \frac{\text{化合物处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{溶剂组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%$$

[0130] 例如：若在激发光 488nm，发射光 590nm 时采集到的溶剂组荧光强度为 550，化合物处理组荧光强度分别为 500、450、350、250、230，阳性对照组荧光强度为 200，背景组荧光强度为 50，则根据计算公式得：阳性对照组线粒体损伤率为 70%，化合物处理组线粒体损伤率分别为 10%、20%、40%、60%、64% (见图 3)。

[0131] 实验数据以 $\bar{X} \pm SE$ 表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 Student's t 检验进行统计学处理。根据统计学处理结果可定量评价化合物毒性。

[0132] (5) 定性分析

[0133] 移除微孔板中的液体，加入 350 μL (48 孔板) 或 150 μL (96 孔板) 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荧光颜色。

[0134] JC-1 作为染色剂：溶剂对照组和空白对照组中线粒体正常可观察到红色荧光；阳性对照组中线粒体损伤可观察到绿色荧光；通过观察化合物处理组是否产生绿色荧光可判断该化合物能否造成线粒体损伤。DASPEI 作为染色剂：溶剂对照组和空白对照组中线粒体正常可观察到较明亮的绿色荧光；阳性对照组中线粒体损伤可观察到绿色荧光变暗；通过观察化合物处理组绿色荧光是否变暗可判断该化合物能否造成线粒体损伤。通过观察对比荧光颜色明亮度可定性评价化合物毒性。

[0135] 3.2 筛选保护线粒体的线粒体靶向化合物

[0136] (1) 斑马鱼选取

[0137] 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 或 96 孔板中，根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0138] (2) 化合物处理

[0139] 设置 9 个实验组：5 个待测化合物组合处理组、1 个线粒体损伤模型组、1 个线粒体保护阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水，5 个待测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) 的线粒体损伤诱导剂 +0.1 μM、1 μM、10 μM、100 μM、1000 μM 的待测化合物溶液；线粒体损伤模型组中加入线粒

体损伤诱导剂；阳性对照组中加入线粒体损伤诱导剂 + 线粒体保护剂；溶剂对照组中加入等体积浓度为 0.1% 的 DMSO；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 24h。

[0140] 本发明待测化合物组合处理组除了采用上述同时添加两种物质(线粒体损伤诱导剂 + 待测化合物)的方式,另外,本步骤的待测化合物组合处理组也可采用以下两种方式处理:

[0141] 第一:加入线粒体损伤诱导剂 6 ~ 24h 后,再加入终浓度分别为 0.1 μM、1 μM、10 μM、100 μM、1000 μM 的待测化合物溶液;(适用于筛选治疗药)

[0142] 第二:首先加入终浓度分别为 0.1 μM、1 μM、10 μM、100 μM、1000 μM 的待测化合物溶液 6 ~ 24h 后,再加入线粒体损伤诱导剂。(适用于筛选预防药)

[0143] (3) 染色处理

[0144] 将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色,作为背景组;将另外一组溶剂组、待测化合物组合处理组、线粒体损伤模型组、阳性对照组、空白对照组染色,染色过程同 3.1 筛选损伤线粒体的靶向线粒体化合物中步骤(3) JC-1 染色。

[0145] (4) 定量分析

[0146] 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 488nm,在 530nm 处(JC-1 为染色剂)采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。线粒体损伤保护率计算公式为:

[0147]
$$\text{线粒体损伤保护率} = \left(1 - \frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%$$

[0148] 例如:若在激发光 488nm,发射光 530nm 时采集到的线粒体损伤模型组荧光强度为 450,待测化合物组合处理组荧光强度分别为 400、350、300、200、180,背景组荧光强度为 50,阳性对照组荧光强度为 170,则根据计算公式得:阳性对照组线粒体损伤保护率为 70%,待测化合物组合处理组线粒体损伤保护率分别为 12.5%、25%、37.5%、62.5%、67.5%(见图 4)。

[0149] 实验数据以 $\bar{X} \pm SE$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 Student' s t 检验进行统计学处理。根据统计学处理结果可定量筛选新药。

[0150] (5) 定性分析

[0151] 移除微孔板中的液体,加入 350 μL (48 孔板)或 150 μL (96 孔板)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,再置于荧光显微镜下观察荧光颜色。溶剂对照组和空白对照组中线粒体正常可观察到红色荧光;线粒体损伤模型组中线粒体损伤可观察到绿色荧光;将待测化合物处理组与线粒体损伤模型组中的绿色荧光明亮度进行对比,若待测化合物处理组较线粒体损伤模型组中绿色荧光变暗或消失,可判断该化合物能够挽救线粒体损伤。

[0152] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0153] 本发明作为一种活体内评价环境毒性和筛选新药的方法,具有简便、快速、经济、高效、高通量等优点。与传统的体外筛选模型相较,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、成本高的弊端。与线虫、果蝇相比,斑马鱼是一种脊椎动物,与人类基因高度相似,经

英国专家的基因预测发现,斑马鱼的基因与人类基因的相似度高达 70% ~ 80%,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^[24]。具体地说,本发明具有如下优点:

[0154] (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,预测性好。

[0155] (2) 高通量—斑马鱼胚胎很小,幼鱼只有 1-4 毫米,能够在一个标准的 6, 12, 24, 48 或 96 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全自动化实验的理想体内筛选模型。

[0156] (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。

[0157] (4) 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。

[0158] (5) 简便—实验过程操作简单,斑马鱼经药物处理、染色后便可置于多功能微孔板分析仪及荧光显微镜下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。

[0159] (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。

[0160] (7) 高效—斑马鱼与人类基因高度相似,实验结果可比性强。经英国专家的基因测序发现,斑马鱼的基因与人类基因的相似度高达 70-80%,斑马鱼的生理和新陈代谢系统的构成与哺乳类动物极为相似,因此,斑马鱼筛选实验结果的可比性(comparable)与哺乳类动物相比可达 80% 以上。

[0161] (8) 可预测性好—斑马鱼与人类基因高度相似,药物筛选结果可预测性好。斑马鱼的基因与人类基因的相似度高达 70-80%。因此,斑马鱼筛选模型比其他筛选模型能更好的预测药物在人体内的吸收、分布、代谢与排泄过程,能真正反映药物在人体内的生理环境。

[0162] (9) 敏感性高—线粒体膜电位对维持线粒体的正常功能是必需的,是评价线粒体功能的敏感指标。线粒体膜电位降低或消失是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,一旦线粒体膜电位剧变,细胞凋亡将不可逆转。因此,本发明利用 JC-1 或 DASPRI 荧光染色法检测线粒体膜电位敏感性很高。

[0163] (10) 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。

[0164] (11) 特异性强—将药物或毒性靶向性的传送到线粒体将比非靶向的实验结果特异性更强。

附图说明

[0165] 图 1 是本发明斑马鱼不同发育阶段的线粒体损伤率变化曲线图。

[0166] 图 2 是本发明化合物处理中不同处理时间长度的线粒体损伤率变化曲线图。

- [0167] 图 3 是本发明不同浓度损伤线粒体化合物的线粒体损伤率变化曲线图。
- [0168] 图 4 是本发明不同浓度保护线粒体化合物的线粒体损伤保护率变化曲线图。
- [0169] 图 5 是本发明实施例 1 不同浓度阿霉素的线粒体损伤率变化曲线图。
- [0170] 图 6 是本发明实施例 2 不同浓度农利灵的线粒体损伤率变化曲线图。
- [0171] 图 7 是本发明实施例 3 不同浓度替尼泊苷的线粒体损伤率变化曲线图。
- [0172] 图 8 是本发明实施例 4 不同浓度双嘧达莫的线粒体损伤保护率变化曲线图。
- [0173] 图 9 是本发明实施例 5 不同浓度丹酚酸 B 的线粒体损伤保护率变化曲线图。

具体实施方式

[0174] 下面结合实施例,更具体地说明本发明的内容。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。

[0175] 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。若无特别指明,实施例采用的方法为本领域通用技术。

[0176] 主要仪器和试剂说明:

[0177] 碘化四氯代四乙基苯咪唑羰花青(JC-1) 荧光染料购自荷兰 Leiden 公司(Molecular Probes Europe);2,4-二甲基氨基苯乙烯基-N-乙基吡啶鎓碘化物(2-[4-(Dimethylamino)styryl]-1-ethylpyridinium iodide, DASPEI)、甲磺酸(ethyl-m-aminobenzoate methanesulfonate, MESAB)、甲基纤维素胶(methyl cellulose)、星孢菌素(staurosporine)和依托泊苷(etoposide)均购自美国 sigma 公司。其他试剂由北京鼎国昌盛科技有限公司提供。

[0178] 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)。

[0179] 实施例中的养殖用水符合: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。

[0180] 实施例 1 靶向线粒体评价药物毒性

[0181] 本实施例按下述步骤进行:

[0182] (1) 斑马鱼选取

[0183] 将 4dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼分别移入 48 孔板中,每孔 10 尾。

[0184] (2) 化合物处理

[0185] 设置 8 个实验组:5 个待测药物处理组、1 个线粒体损伤阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,5 个待测药物处理组中分别加入 1mL 浓度分别为 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M 阿霉素^[26]溶液;阳性对照组中加入 1mL 浓度为 50 μ M 的依托泊苷溶液;溶剂对照组中加入 1mL 浓度为 0.1% 的 DMSO;空白对照组中加入 1mL 养殖用水。于 28℃ 恒温培养箱中培养 24h。

[0186] (3) 染色处理

[0187] 将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色,作为背景组;将另外一组溶剂组、

待测药物处理组、阳性对照组、空白对照组染色,选用 JC-1 作为染色剂,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0188] A、移除微孔板中的液体,用移液枪吸取 1mL 10 μ M JC-1 于微孔板中;

[0189] B、将微孔板置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 1h;

[0190] C、取出微孔板,移除微孔板中的液体,用养殖用水快速清洗 3 遍;

[0191] D、微孔板中加入 1mL 养殖用水,于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 5min;

[0192] E、重复实验操作 D) 2 次;

[0193] F、将斑马鱼转入新的 48 孔板中,每孔 1 尾,移除微孔板中的液体,加入 350 μ L 养殖用水。

[0194] (4) 定量分析

[0195] 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 488nm,在 590nm 处采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。线粒体损伤率计算公式为:

[0196]

$$\text{线粒体损伤率} = \left(1 - \frac{\text{化合物处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{溶剂组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%$$

[0197] 实验数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 Student' s t 检验进行统计学处理。通过统计学处理结果可定量评价药物毒性。

[0198] 按照上述公式计算,统计学处理结果显示阳性对照组线粒体损伤率为 (69.11 \pm 1.68)%,5 个待测药物处理组线粒体损伤率分别为 (26.47 \pm 0.69)%、(49.57 \pm 1.07)%、(60.51 \pm 2.01)%、(63.97 \pm 1.36)%、(64.56 \pm 2.57)% (见图 5)。待测药物处理组与溶剂对照组相比差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。

[0199] (5) 定性分析

[0200] 移除微孔板中的液体,加入 350 μ L 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荧光颜色。

[0201] 溶剂对照组和空白对照组中线粒体正常观察到红色荧光;阳性对照组中线粒体损伤观察到绿色荧光;待测药物处理组线粒体损伤观察到绿色荧光,可判断阿霉素造成了线粒体损伤。因此,通过观察对比荧光颜色明亮度可定性评价药物毒性。

[0202] 实施例 2 靶向线粒体评价环境毒性化合物

[0203] 本实施例按下述步骤进行:

[0204] (1) 斑马鱼选取

[0205] 将 4dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入 48 孔板中,每孔 10 尾。

[0206] (2) 化合物处理

[0207] 设置 8 个实验组:5 个待测环境毒性化合物处理组、1 个线粒体损伤阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,5 个待测环境毒性化合物处理组中分别加入 1mL 浓度分别为 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M 环境毒性化合物农利灵^[27]溶液;阳性对照组中加入 1mL 浓度为 50 μ M 的星孢菌素溶液;溶剂对照组中加入 1mL 浓度为 0.1% 的 DMSO;空白对照组中加入 1mL 养殖用水。于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24h。

[0208] (3) 染色处理

[0209] 将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色,作为背景组;将另外一组溶剂组、待测环境毒性化合物处理组、阳性对照组、空白对照组染色,选用 DASPEI 作为染色剂,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0210] A、移除微孔板中的液体,用移液枪吸取 1mL 1mM DASPEI 于微孔板中;

[0211] B、将微孔板置于 28℃ 恒温培养箱中培养 0.5h;

[0212] C、取出微孔板,移除微孔板中的液体,用养殖用水快速清洗 3 遍;

[0213] D、微孔板中加入 1mL 养殖用水,于 28℃ 恒温培养箱中培养 5min;

[0214] E、重复实验操作 D) 3 次;

[0215] F、将斑马鱼转入新的 48 孔板中,每孔 1 尾,移除微孔板中的液体,加入 350 μ L 养殖用水。

[0216] (4) 定量分析

[0217] 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 488nm,在 515nm 处采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。线粒体损伤率计算公式为:

[0218]

$$\text{线粒体损伤率} = \left(1 - \frac{\text{化合物处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{溶剂组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%$$

[0219] 实验数据以 $\bar{X} \pm SE$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 Student' s t 检验进行统计学处理。通过统计学处理结果可定量评价环境毒性化合物。

[0220] 按照上述公式计算,统计学处理结果显示阳性对照组线粒体损伤率为 (69.11 \pm 1.68)%,5 个待测环境毒性化合物处理组线粒体损伤率分别为 (23.21 \pm 2.35)%(43.92 \pm 3.17)%(52.61 \pm 2.01)%(63.16 \pm 2.27)%(65.31 \pm 1.83)% (见图 6)。待测环境毒性化合物处理组与溶剂对照组相比差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。

[0221] (5) 定性分析

[0222] 移除微孔板中的液体,加入 350 μ L 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荧光颜色。

[0223] 溶剂对照组和空白对照组中线粒体正常可观察到较明亮的绿色荧光;阳性对照组中线粒体损伤可观察到绿色荧光变暗;待测环境毒性化合物处理组绿色荧光变暗,可判断农利灵造成了线粒体损伤。通过观察对比荧光颜色明亮度可定性评价环境毒性化合物。

[0224] 实施例 3 靶向线粒体筛选抗肿瘤药物

[0225] 线粒体可介导肿瘤细胞的凋亡。抗肿瘤药物作用于线粒体,导致线粒体通透性转换孔开放,线粒体膜电位下降或消失,继而呼吸链脱耦联,谷胱甘肽耗竭,ROS 产生及细胞色素 C 和诱导因子释放,并诱导肿瘤细胞凋亡。因此,线粒体毒性化合物有可能被用作潜在的抗癌药。

[0226] 本实施例按下述步骤进行:

[0227] (1) 斑马鱼选取

[0228] 将 4dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入 96 孔板中,每孔 1 尾。

[0229] (2) 化合物处理

[0230] 设置 8 个实验组：5 个候选抗肿瘤药物处理组、1 个线粒体损伤阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水，5 个候选抗肿瘤药物处理组中分别加入 150 μ L 浓度分别为 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M 候选抗肿瘤药物替尼泊昔^[28]溶液；阳性对照组中加入 150 μ L 浓度为 50 μ M 的依托泊苷溶液；溶剂对照组中加入 150 μ L 浓度为 0.1% 的 DMSO；空白对照组中加入 150 μ L 养殖用水。于 28°C 恒温培养箱中培养 24h。

[0231] (3) 染色处理

[0232] 将溶剂对照组随机分为两组，其中一组不染色，作为背景组；将另外一组溶剂组、候选抗肿瘤药物处理组、阳性对照组、空白对照组染色，选用 JC-1 作为染色剂，整个染色过程需避光操作，步骤如下：

[0233] A、移除微孔板中的液体，用移液枪吸取 150 μ L 10 μ M JC-1 于微孔板中；

[0234] B、将微孔板置于 28°C 恒温培养箱中培养 1h；

[0235] C、取出微孔板，移除微孔板中的液体，用养殖用水快速清洗 3 遍；

[0236] D、微孔板中加入 150 μ L 养殖用水，于 28°C 恒温培养箱中培养 5min；

[0237] E、重复实验操作 D) 2 次；

[0238] F、将斑马鱼转入新的 96 孔板中，移除微孔板中的液体，加入 150 μ L 养殖用水。

[0239] (4) 定量分析

[0240] 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 488nm，在 590nm 处采集发射光的荧光强度，试验重复 3 次取其平均值。线粒体损伤率计算公式为：

[0241]

$$\text{线粒体损伤率} = \left(1 - \frac{\text{候选药物处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{溶剂组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%$$

[0242] 实验数据以 $\bar{X} \pm SE$ 表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 Student' s t 检验进行统计学处理。通过统计学处理结果可定量筛选抗肿瘤药物。

[0243] 按照上述公式计算，统计学处理结果显示阳性对照组线粒体损伤率为 (69.11 \pm 1.68) %，5 个候选抗肿瘤药物处理组线粒体损伤率分别为 (20.22 \pm 1.33) %、(38.55 \pm 3.04) %、(52.19 \pm 2.12) %、(66.42 \pm 2.17) %、(67.31 \pm 1.83) % (见图 7)。候选抗肿瘤药物处理组与溶剂对照组相比差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。

[0244] (5) 定性分析

[0245] 移除微孔板中的液体，加入 150 μ L 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荧光颜色。通过观察对比荧光颜色明亮度可定性筛选抗肿瘤药物。

[0246] 溶剂对照组和空白对照组中线粒体正常可观察到红色荧光；阳性对照组中线粒体损伤可观察到绿色荧光；候选抗肿瘤药物处理组产生了绿色荧光，可判断替尼泊昔造成了线粒体损伤。

[0247] 实施例 4 靶向线粒体筛选抗氧化剂

[0248] 氧化性应激反应可引起多种与衰老有关的人类变性疾病，线粒体是负责能量代谢

的细胞内细胞器,是大部分细胞内导致氧化应激的自由基和活性氧类的主要来源。衰老的发展过程与线粒体功能异常密切相关。自由基学说是具有代表性的衰老学说之一。随着机体年龄的增加,抗氧化活性递减,氧自由基产生增多并积累。过多的氧自由基可通过过氧化作用攻击线粒体膜,导致线粒体膜通透性改变,线粒体膜电位下降或消失,最终诱导细胞凋亡。因此,抗氧化剂可被用作潜在的抗衰老药物。

[0249] 本实施例按下述步骤进行:

[0250] (1) 斑马鱼选取

[0251] 将4dpf的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入96孔板中,每孔1尾。

[0252] (2) 化合物处理

[0253] 设置9个实验组:5个待测化合物组合处理组、1个线粒体损伤模型组、1个线粒体保护阳性对照组、1个溶剂对照组、1个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,5个待测化合物组合处理组中分别加入150 μ L脱氧胆酸(氧化应激诱导剂)^[29]+候选抗氧化剂的混合溶液(5个组别中脱氧胆酸终浓度皆为0.5mM,候选抗氧化剂双嘧达莫^[30]的浓度分别为0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M);线粒体损伤模型组中加入150 μ L 0.5mM脱氧胆酸;阳性对照组中加入150 μ L脱氧胆酸+谷胱甘肽(抗氧化剂)^[31]的混合溶液(混合溶液中:脱氧胆酸的浓度为0.5mM、谷胱甘肽的浓度为25 μ M);溶剂对照组中加入150 μ L浓度为0.1%的DMSO;空白对照组中加入150 μ L的养殖用水。于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养24h。

[0254] (3) 染色处理

[0255] 将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色,作为背景组;将待测化合物组合处理组、线粒体损伤模型组、线粒体保护阳性对照组、空白对照组及另一组溶剂组染色,选用JC-1作为染色剂,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0256] A、移除微孔板中的液体,用移液枪吸取150 μ L 10 μ M JC-1于微孔板中;

[0257] B、将微孔板置于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养1h;

[0258] C、取出微孔板,移除微孔板中的液体,用养殖用水快速清洗3遍;

[0259] D、微孔板中加入150 μ L养殖用水,于28 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养5min;

[0260] E、重复实验操作D)2次;

[0261] F、将斑马鱼转入新的96孔板中,每孔1尾,移除微孔板中的液体,加入150 μ L养殖用水。

[0262] (4) 定量分析

[0263] 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488nm,在530nm处采集发射光的荧光强度,试验重复3次取其平均值。线粒体损伤保护率计算公式为:

$$[0264] \quad \text{线粒体损伤保护率} = \left(1 - \frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%。$$

[0265] 实验数据以 $\bar{X} \pm SE$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用Student's t检验进行统计学处理。根据统计学处理结果可定量筛选抗氧化剂。

[0266] 按照上述公式计算,统计学处理结果显示阳性对照组线粒体损伤保护率为

(68.80±0.80)%, 5 个待测化合物组合处理组线粒体损伤保护率分别为(23.16±1.33)%、(35.32±3.04)%、(54.17±2.12)%、(67.14±1.62)%、(68.31±1.83)% (见图 8)。待测化合物组合处理组与线粒体损伤模型组相比差异有统计学意义($p < 0.05$)。

[0267] (5) 定性分析

[0268] 移除微孔板中的液体,加入 150 μ L 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荧光颜色。溶剂对照组和空白对照组为红色荧光,线粒体损伤模型组可观察到绿色荧光。将待测化合物组合处理组与线粒体损伤模型组中的绿色荧光明亮度进行对比即可定性筛选抗氧化剂,本实施例的待测化合物组合处理组的观察结果是:绿色荧光明亮度较线粒体损伤模型组暗,红色荧光明亮度较线粒体损伤模型组亮。

[0269] 实施例 5 靶向线粒体筛选抗神经退行性疾病药物

[0270] 神经退行性疾病是一组以原发性神经元变性为基础的慢性进行性神经系统疾病。该类疾病主要包括阿尔茨海默病、帕金森病、Huntington 舞蹈病、不同类型脊髓小脑共济失调、肌萎缩侧索硬化症及脊髓肌萎缩症等。神经退行性病变的共同的病理机制之一是神经细胞的凋亡,因此可通过阻断神经细胞退行性改变的线粒体介导的细胞凋亡过程筛选防治神经退行性病变的药物。

[0271] 以筛选抗帕金森病药物为例,本实施例按下述步骤进行:

[0272] (1) 斑马鱼选取

[0273] 将 4dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入 96 孔板中,每孔 1 尾。

[0274] (2) 化合物处理

[0275] 设置 9 个实验组:5 个待测化合物组合处理组、1 个线粒体损伤模型组、1 个线粒体保护阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,5 个待测化合物组合处理组中分别加入 150 μ L 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) (帕金森病诱导剂)^[32] + 候选抗帕金森病药物丹酚酸 B^[33] 的混合溶液(5 个混合溶液中:MPTP 的浓度皆为 10 μ g/mL,候选抗帕金森病药物丹酚酸 B 的浓度分别为 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M);线粒体损伤模型组中加入 150 μ L 10 μ g/mL MPTP;阳性对照组中加入 150 μ L 的 MPTP + 丙炔苯丙胺(L-deprenyl) (帕金森病治疗剂)^[32] 的混合溶液(混合溶液中:MPTP 终浓度为 10 μ g/mL,丙炔苯丙胺浓度为 4 μ g/mL);溶剂对照组中加入 150 μ L 浓度为 0.1% 的 DMSO;空白对照组中加入 150 μ L 养殖用水。于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24h。

[0276] (3) 染色处理

[0277] 将溶剂对照组随机分为两组,其中一组不染色,作为背景组;将待测化合物组合处理组、线粒体损伤模型组、阳性对照组、空白对照组及另一组溶剂组染色,选用 JC-1 作为染色剂,整个染色过程需避光操作,步骤如下:

[0278] A、移除微孔板中的液体,用移液枪吸取 150 μ L 10 μ M JC-1 于微孔板中;

[0279] B、将微孔板置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 1h;

[0280] C、取出微孔板,移除微孔板中的液体,用养殖用水快速清洗 3 遍;

[0281] D、微孔板中加入 150 μ L 养殖用水,于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 5min;

[0282] E、重复实验操作 D) 2 次；

[0283] F、将斑马鱼转入新的 96 孔板中，每孔 1 尾，移除微孔板中的液体，加入 150 μ L 养殖用水。

[0284] (4) 定量分析

[0285] 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 488nm，在 530nm 处采集发射光的荧光强度，试验重复 3 次取其平均值。线粒体损伤保护率计算公式为：

$$[0286] \quad \text{线粒体损伤保护率} = \left(1 - \frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度} - \text{背景组荧光强度}} \right) \times 100\%。$$

[0287] 实验数据以 $\bar{X} \pm SE$ 表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 Student' s t 检验进行统计学处理。根据统计学处理结果可定量筛选抗神经退行性疾病药物。

[0288] 根据上述公式计算，统计学处理结果显示阳性对照组线粒体损伤保护率为 (68.80 \pm 0.80) %，5 个待测化合物组合处理组线粒体损伤保护率分别为 (32.15 \pm 1.58) %、(48.41 \pm 2.89) %、(58.93 \pm 3.51) %、(66.43 \pm 2.31) %、(67.65 \pm 2.13) % (见图 9)。待测化合物组合处理组与线粒体损伤模型组相比差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。

[0289] (5) 定性分析

[0290] 移除微孔板中液体，加入 150 μ L 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荧光颜色。溶剂对照组和空白对照组为红色荧光，线粒体损伤模型组可观察到绿色荧光。将待测化合物组合处理组与线粒体损伤模型组中的绿色荧光明亮度进行对比，可定性筛选抗神经退行性疾病药物。本实施例待测化合物组合处理组的观察结果是：绿色荧光明亮度较线粒体损伤模型组暗，红色荧光明亮度较线粒体损伤模型组亮。

[0291] 由上述优选实施例可见：本发明提供的活体斑马鱼荧光染色法能够简便、快速、经济、高效、高通量地准确评价化学物的环境毒性和筛选新药。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。

[0292] 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。

[0293] 参考文献：

[0294] [1] 王运良, 邵凤华, 李平, 等. 线粒体病研究进展 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2007, 10 (8): 137-140.

[0295] [2] Li C. Q., Wogan G. N.. Nitric oxide as a modulator of apoptosis [J]. Cancer letters, 2005, 226 (1): 1-15.

[0296] [3] 刘伟丽, 齐文成. 线粒体在细胞凋亡中作用的研究进展 [J]. 医学综述, 2007, 13 (8): 578-580.

[0297] [4] 陈茹. 帕金森病研究进展 [J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13 (7): 637-639

- [0298] [5] 成银霞, 杜冠华. 防治神经退行性疾病的药物研究进展 [J]. 中国医药导刊, 2006, 8 (5): 320-322.
- [0299] [6] 辛颖. 线粒体与神经退行性病变 [J]. 医学综述, 2008, 14 (4): 520-521.
- [0300] [7] Hayakawa M., Ogawa T., Sugiyama, et al. Massive conversion of guanosine to 8-hydroxy-guanosine in mouse liver mitochondrial DNA by administration of azidothymidine [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1991, 176(1): 87-93.
- [0301] [8] Bandy B., Davison A.J.. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1990, 8(6): 523-539.
- [0302] [9] Anthony S., Don, Philip J., et al. Mitochondria as cancer drug targets [J]. Trends in Molecular Medicine, 2004, 10(8): 372-378.
- [0303] [10] 陈志蓉. 抗衰老药物的研究进展 [J]. 海峡药学, 2008, 20 (1): 8-11.
- [0304] [11] 孙晓生, 杨柳. 抗衰老机制与药物的研究进展 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26 (6): 593-597.
- [0305] [12] Anders M.W., Robotham J.L., Sheu S.S.. Mitochondria: new drug targets for oxidative stress-induced diseases [J]. Expert Opinion Drug Metabolism & Toxicology, 2006, 2(1): 71-79.
- [0306] [13] Armstrong J.S.. Mitochondrial medicine: pharmacological targeting of mitochondria in disease [J]. British Journal of Pharmacology, 2007, 151(8): 1154-1165.
- [0307] [14] Wallace K.B., Starkov A.A.. Mitochondrial Targets of Drug Toxicity [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2000, 40: 353-388.
- [0308] [15] 安冉, 董强. 凋亡过程中线粒体膜透化的常用检测方法 [J]. 中华脑血管病杂志, 2009, 3 (1): 33-37.
- [0309] [16] Li C.Q., Trudel L.J., Wogan G.N.. Nitric oxide-induced genotoxicity, mitochondrial damage, and apoptosis in human lymphoblastoid cells expressing wild-type and mutant p53 [J]. PANS, 2002, 99(16): 10364-10369.
- [0310] [17] Li C.Q., Trudel L.J., Wogan G.N.. Genotoxicity, mitochondrial damage, and apoptosis in human lymphoblastoid cells exposed to peroxynitrite generated from SIN-1 [J]. Chemical Research in Toxicology, 2002, 15(4): 527-35.
- [0311] [18] Zhang Y.Z., Ouyang Y.C., Hou Y., et al. Mitochondrial behavior during oogenesis in zebrafish: A confocal microscopy analysis [J]. Development, Growth & Differentiation, 2008, 50(3): 189-201.
- [0312] [19] Widlansky M.E., Wang J.L., Shenouda S.M., et al. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes [J]. Translational Research, 2010, 156(1): 15-25.

- [0313] [20] Wu S.Y., Li Y.Y., Xu Y., et al. Macrophage apoptosis associated with *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2010, 48(8): 773-777.
- [0314] [21] Zhao X.J., Huang Y.H., Yu Y.C., et al. GnRH antagonist cetrorelix inhibits mitochondria-dependent apoptosis triggered by chemotherapy in granulosa cells of rats[J]. *Gynecologic Oncology*, 2010, 118(1): 69-75.
- [0315] [22] Cheng W.Y., Tong H.Y., Miller E.W., et al. An integrated imaging approach to the study of oxidative stress generation by mitochondrial dysfunction in living cells[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(7): 902-908.
- [0316] [23] 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.
- [0317] [24] McGrath P., Li C.Q.. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J]. *Drug Discover Today*, 2008, 13(9): 394-401.
- [0318] [25] Westerfield M.. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish*. Eugene, Oregon: The University of Oregon Press, 1993.
- [0319] [26] 刘哲, 宋晓东, 惠汝太, 等. 阿霉素心脏毒性的预防[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2007, 7(6): 379-380.
- [0320] [27] 李秀秀, 杨新军, 闫洪涛. 农利灵对斑马鱼胚胎发育的毒性[J]. *环境与职业医学*, 2008, 25(4): 378-380.
- [0321] [28] 徐荣, 华咏, 钟平, 等. 替尼泊苷和洛莫司汀诱导脑胶质瘤细胞凋亡的机制[J]. *复旦学报*, 2009, 36(6): 692-706.
- [0322] [29] Payne C.M., Weber C., Crowley-Skillicorn, et al. Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF- κ B through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(1): 215-222.
- [0323] [30] Kusmic C., Picano E., Busceti C.L., et al. The antioxidant drug dipyridamole spares the vitamin E and thiols in red blood cells after oxidative stress[J]. *Cardiovascular Research*, 2000, 47: 510-514.
- [0324] [31] Tomas R., Zuzana C., Vladimira M., et al. Glutathione and glutathione assays[J]. *Acta Medical(Hradec Kralove) Suppl*, 2005, 48(1): 15-20.
- [0325] [32] McKinley E.T., Baranowski T.C., Blavo D.O.. Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons[J]. *Molecular Brain Research*, 2005, 141(2): 128-137.
- [0326] [33] 程景丽, 和姬苓, 耿红, 等. 大鼠脑缺血再灌注损伤后尼莫地平对神经细胞凋亡影响的研究[J]. *中国现代医生*, 2010, 48(6): 1-2.

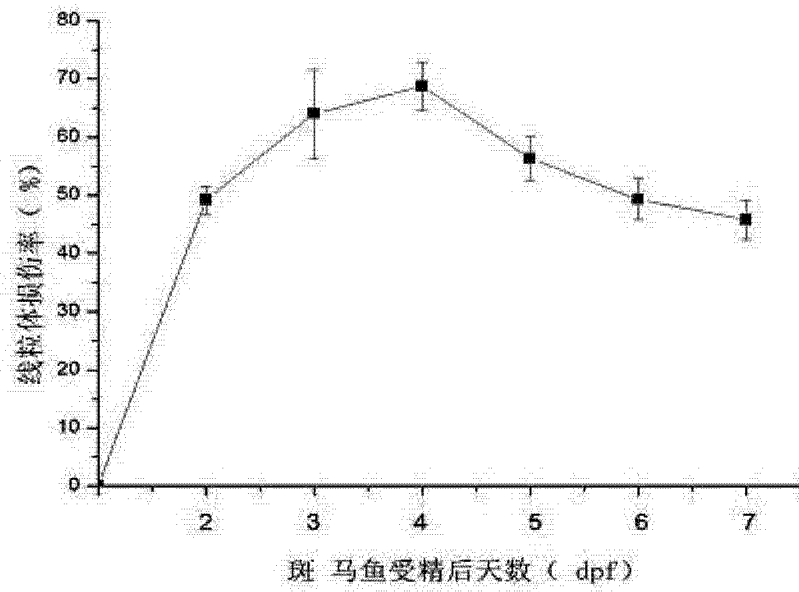


图 1

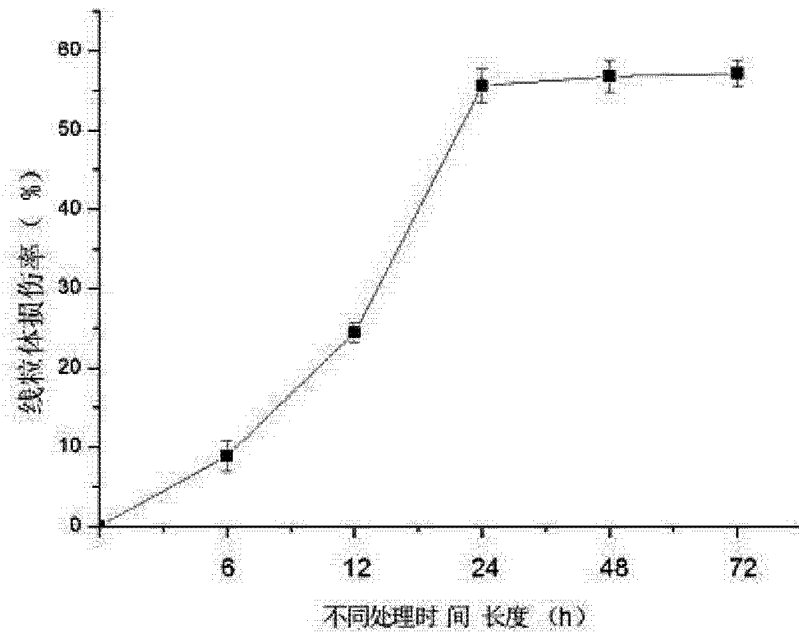


图 2

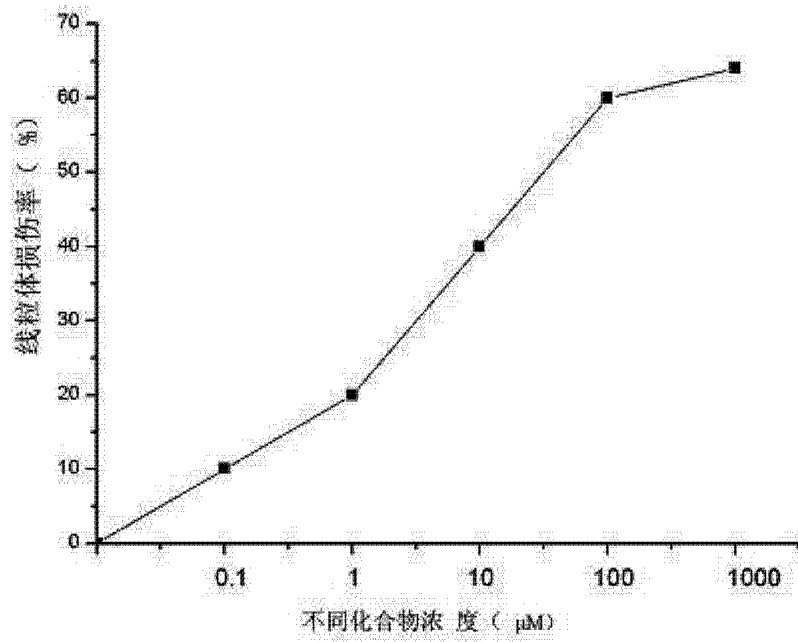


图 3

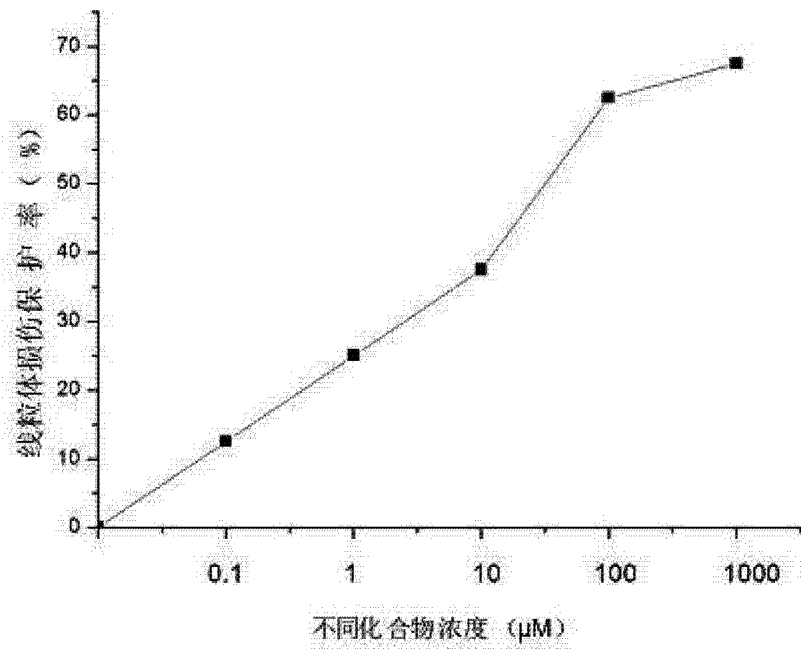


图 4

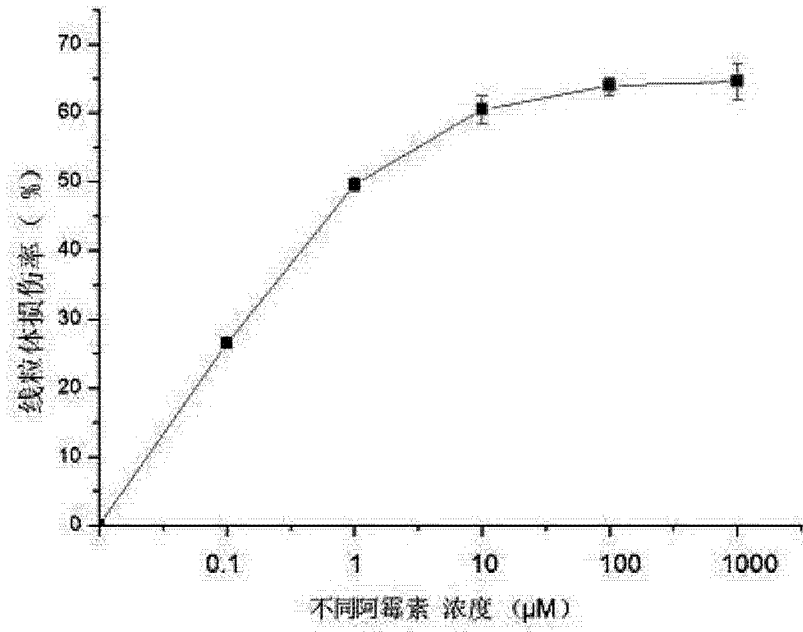


图 5

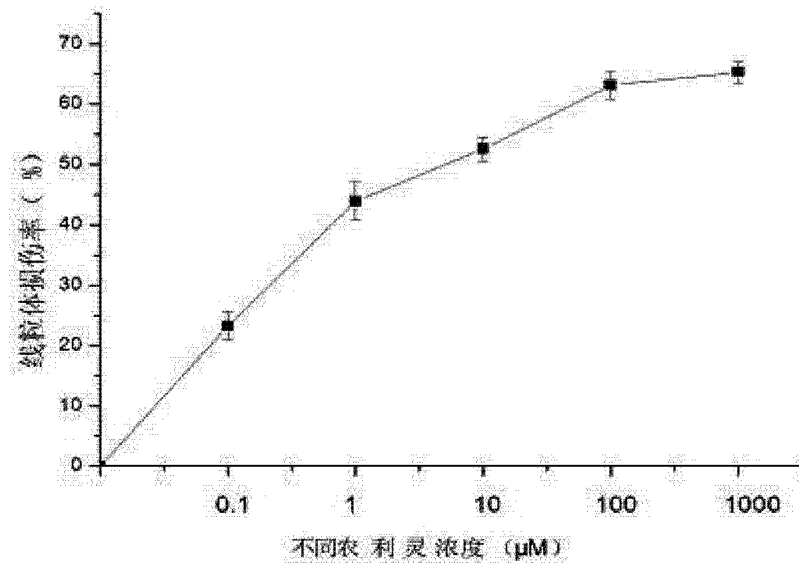


图 6

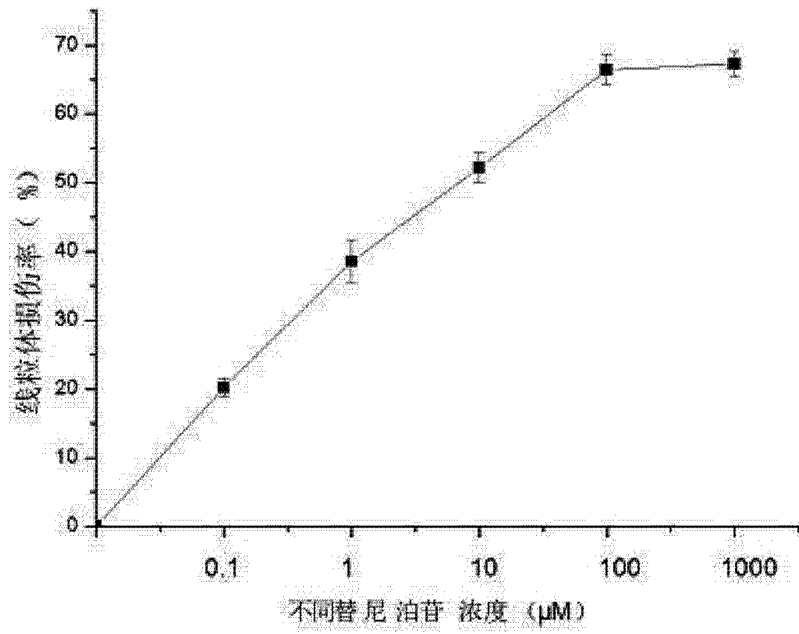


图 7

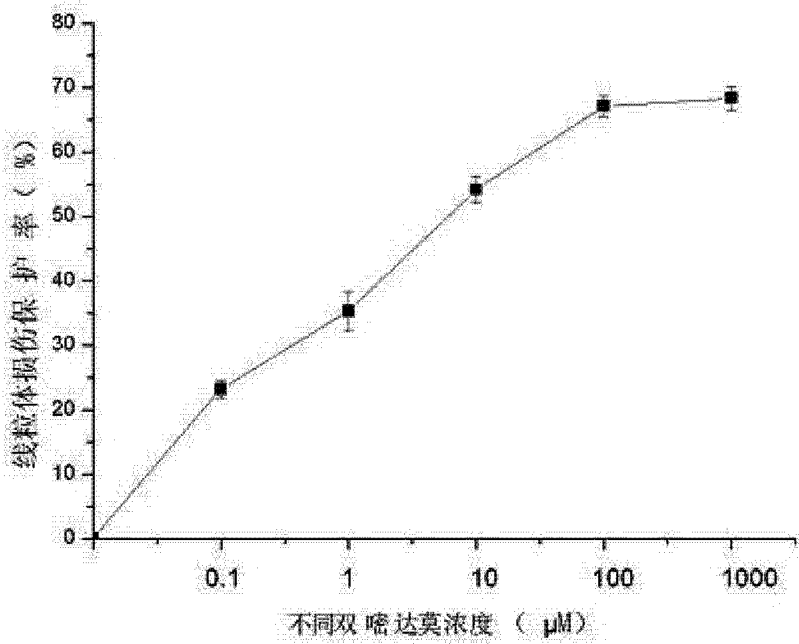


图 8

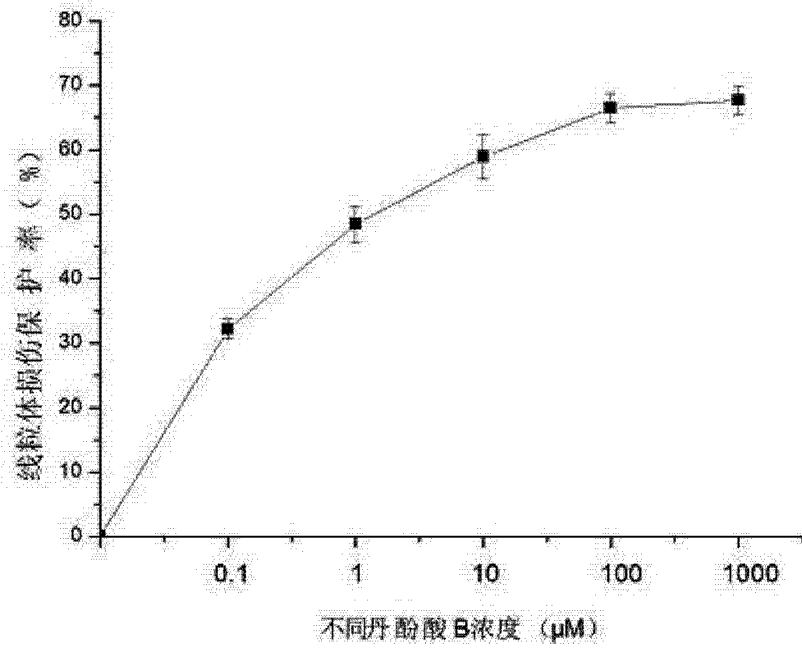


图 9