

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102600156 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201210016072. 6

(22) 申请日 2012. 01. 18

(73) 专利权人 杭州环特生物科技有限公司

地址 311231 浙江省杭州市萧山区钱江农场
(浙江省农业高科技示范园区)

(72) 发明人 李春启 朱晓宇 朱凤 郭胜亚

(51) Int. Cl.

A61K 31/473(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

审查员 魏永燕

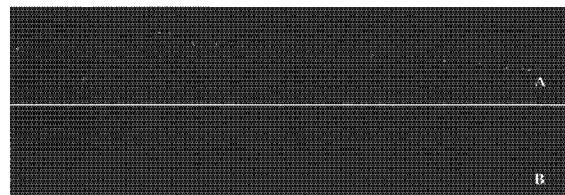
权利要求书1页 说明书17页 附图9页

(54) 发明名称

斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法，并利用该动物模型筛选多发性硬化症治疗药物或评价化合物诱导的神经髓鞘损伤的方法。主要包括：斑马鱼选取，化合物处理，整体斑马鱼免疫荧光染色，图像分析和 / 或微孔板分析，统计学分析几个步骤。本发明的方法具有经济、简便、快速、高效、化合物用量少等优点，可实现体内高通量筛选多发性硬化症治疗药物的目的，并对加速多发性硬化症治疗药物的研发进程及多发性硬化症患者的治疗意义重大。



1. 一种活体斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 斑马鱼选取

挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中;

(2) 化合物处理

移除微孔板中的培养液,设置多个实验组:若干个不同浓度的诱导剂处理组和1个空白对照组,每个实验组根据微孔板的规格分别加入相同体积的相应溶液,然后恒温培养;

(3) 整体斑马鱼免疫荧光染色;

(4) 图像分析和 / 或微孔板分析;

(5) 统计学分析;

所述步骤(2)中的诱导剂为溴化乙锭;

所述步骤(1)中斑马鱼为2dpf的斑马鱼,所述步骤(2)中斑马鱼培养时间为96小时,所述步骤(2)中空白对照组使用的溶液为斑马鱼养殖用水;

所述步骤(3)整体斑马鱼免疫荧光染色包括以下步骤:

1) 固定;

2) 水化;

3) 加入封闭液,室温下轻轻摇晃;

4) 将斑马鱼与兔抗斑马鱼神经髓鞘蛋白抗体共同4℃静置孵育过夜;

5) PBST清洗;

6) 加入FITC标记的羊抗兔IgG二抗,室温孵育,避光;

7) PBST清洗。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤(4)图像分析具体步骤为:整体斑马鱼免疫荧光染色结束后,显微镜拍照并保存,一方面通过观察斑马鱼髓鞘荧光强度来定性评价,另一方面利用软件进行图像分析,计算斑马鱼髓鞘荧光强度;所述步骤(4)微孔板分析具体步骤为:整体斑马鱼免疫荧光染色后,将斑马鱼转入96孔板中,每孔1尾,然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度,定量评价化合物对髓鞘再生的影响或化合物诱导的髓鞘损伤。

斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物筛选（评价）领域，具体涉及一种简便、经济、高通量的斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法，并利用该动物模型筛选多发性硬化症治疗药物或评价化合物诱导的神经髓鞘损伤的方法。

背景技术

[0002] 多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 是以中枢神经系统白质脱髓鞘病变为特点的自身免疫病，可能是遗传易感个体与环境因素作用而发生的神经免疫过程，由于其发病率较高，成慢性病程和倾向于年轻人罹患，而成为最重要的神经系统疾病之一^[1]。流行病学显示该病在北美洲约有 40 万例患者，我国约有 6.5 万例患者，全球的患者超过 100 万例，女性患者多于男性，多发于 20-40 岁年龄段的人群^[2]。MS 新药研发是国际主要制药公司新药研发的重点项目之一。尽管目前临床已经有多种 MS 治疗药物，包括激素类、免疫调节类、免疫抑制类、他汀类药物等，但是这些药物对 MS 的疗效有限，且毒副作用大，费用高，因此迫切需要研发新的 MS 治疗药物^[3]。

[0003] MS 病理损伤机制与 T 细胞介导的自身免疫反应，胆碱能神经的功能异常，胞浆型磷脂酶 A2、激肽释放酶等酶的激活和大量自由基释放等密切相关^[4]。传统医学认为 MS 是由 T 细胞介导的自身免疫性疾病，即人体对其自身组织发动免疫攻击而造成发病。MS 的动物模型实验性变态反应性脑脊髓炎 (experimental allergic encephalomyelitis, EAE) 也证实激活的 T 细胞启动了 MS 的炎性过程导致脱髓鞘等病变，并伴随炎症细胞侵润和炎性介质释放，产生大量自由基、细胞因子及趋化因子等活性物质。这些活性物质可以直接成为发病的原因或加重因素，导致中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 血管及组织的完整性破坏和功能异常^[2-5]。

[0004] EAE 的临床表现及病理改变与急性多发性硬化症极其相似，因而成为研究 MS 免疫病理学机制及其实验性治疗的最佳动物模型^[6]。EAE 是一种人工诱导的中枢神经系统特异性自身免疫疾病，可以在多种动物品系中诱导产生。EAE 可以通过主动免疫脊髓组织匀浆诱导产生，或经免疫弗氏完全佐剂乳化的髓鞘抗原蛋白如髓鞘碱性蛋白、蛋白脂蛋白或髓鞘少突胶质细胞糖蛋白，也可经被动注入髓鞘抗原反应活性的 T 细胞诱导产生^[7-14]。虽然 EAE 是经典的研究 MS 的方法，但该模型实验周期长、操作复杂、成本高、特异性不强、重复性差、且无法实现高通量药物筛选的目的。

[0005] 目前还没有合适的研究髓鞘的体外细胞模型。有研究曾采用背根神经节 (DOG) 神经元和少突胶质细胞联合培养的方法来探索髓鞘形成过程中生长因子对髓鞘形成的影响^[15-16]。但细胞联合培养体系的建立耗时较长，方法不稳定，重复性差，尚不适宜进行体外高通量 MS 治疗药物筛选，并且体外细胞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^[17]。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多发性硬化症治疗药物的动物模型具有重要意义。

[0006] 斑马鱼是一种新颖的模式生物。与传统的体内和体外筛选模型相比较，活体斑马

鱼筛选模型具有诸多优势,克服了原有体外模型在吸收、分布、代谢和排泄环节验证的欠缺及传统体内筛选模型实验周期长、操作复杂、成本高的弊端。斑马鱼是一种脊椎动物,与人类基因的相似度高达85%左右,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^[18]。更重要的是,斑马鱼模型具有与生俱来的优点^[18-19]:①饲养成本低,性成熟周期短;②繁殖能力强,一尾雌鱼每次可产200~300枚卵;③生长发育速度快,在受精后24小时(24hpf),斑马鱼主要的组织器官原基已形成,可为研究提供大量的样本和较短的实验周期;④胚胎及幼鱼透明,体外受精,体外发育,可直接观察,并可同时分析多个器官系统;⑤胚胎有可以提供营养的卵黄,第一周内不需喂食,可避免化合物处理时化合物与食物成份的相互作用;⑥胚胎体积小,幼鱼体长只有1-4mm,能够在一个标准的6、12、24、48或96孔板内进行分析;⑦给药方式简单:溶于水的小分子物质可直接经皮肤、鳃及消化系统进入斑马鱼体内;不溶于水的物质、大分子物质及蛋白质可进行显微注射。因此斑马鱼可作为很好的评价与筛选药物的高通量体内脊椎动物模型。

[0007] 研究表明斑马鱼的髓鞘少突胶质细胞的结构特性和细胞谱系关系与哺乳动物具有高度的可比性^[20-23]。斑马鱼体内与髓鞘形成相关的基因(如dm20基因,mbp基因和P0基因等)与哺乳动物具有很好的同源性^[23]。尽管这些基因与哺乳动物有些不同,但高度保守的基因序列足够表达出功能类似的蛋白(表1)^[24]。斑马鱼大约发育到2dpf时大脑内紧凑型髓鞘已经形成,在此之前,斑马鱼少突胶质细胞中与髓鞘形成相关的三大基因呈共同表达^[24]。

[0008] 表1 斑马鱼与哺乳动物中与髓鞘相关的主要蛋白的比较

蛋白	描述	哺乳动物		斑马鱼	
		中枢神经系统	外周神经系统	中枢神经系统	外周神经系统
[0009]	PLP/DM 20	髓鞘功能蛋白,维持髓鞘结构;高疏水转运蛋白	有,是由35个不同的氨基酸组成的主要髓鞘剪接变异体	无	有,存在一对同源基因Dmα1和Dmα2,Dmα2与哺乳动物具有高度同源性,与P0和Mbp在少突胶质细胞中共同表达
	MBP	髓鞘粘附蛋白	有,是髓鞘的主要组成部分	有,是髓鞘的主要组成部分	有,是髓鞘的主要组成部分;与P0和Dmα2在少突胶质细胞中共同表达
	P0	细胞粘附免疫球蛋白	无	有,是髓鞘的主要组成部分	是,但作为细胞粘附蛋白在外周神经系统中不是主要的

[0010] 目前国内外尚未见斑马鱼多发性硬化症模型的报道。大多数作者利用斑马鱼研究髓鞘的结构和功能、髓鞘形成过程或对与髓鞘形成相关的因子进行遗传学分析^[25-30]。转

基因斑马鱼是现今研究髓鞘生物学功能的热点,如 p1p:EGFP 系和 oligo2:EGFP 系,这几种转基因斑马鱼的少突胶质细胞系都能表达 EGFP 荧光蛋白^[17]。 Buckley 等^[17,31]利用正常 oligo2:EGFP 系转基因荧光斑马鱼筛选出 80 种能够改变髓鞘少突胶质细胞数目的化合物,其中能增加少突细胞数量的化合物可作为髓鞘形成促进剂。然而,转基因荧光斑马鱼为髓鞘正常的斑马鱼,与 MS 时脱髓鞘的病理改变完全不同,因此,利用正常转基因髓鞘荧光斑马鱼筛选到的髓鞘形成促进剂对 MS 的治疗不一定有效。

[0011] 溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB) 是一种高度灵敏的荧光染色剂,用于观察琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶中的 DNA,它可以嵌入到碱基分子中导致错配。文献报告溴化乙锭 (EB) 能诱发啮齿类动物神经脱髓鞘^[17]。我们发现用 EB 处理斑马鱼,也能诱导斑马鱼脑脊髓神经细胞髓鞘损伤 (见图 1)。本发明首先利用 EB 诱导斑马鱼中枢神经脱髓鞘,产生斑马鱼 MS 模型,然后利用该模型筛选 MS 治疗药物或评价化合物诱导的神经髓鞘病变。

[0012] MBP (Myelin basic protein, MBP) 是由成熟少突胶质细胞合成分泌的神经髓鞘特有的膜蛋白,是维持神经元及轴突髓鞘结构和功能稳定的重要物质基础,是反映中枢神经系统实质性损害,特别是髓鞘脱失变化特异敏感的指标^[32]。MBP 也是斑马鱼髓鞘的主要组成部分 (表 1)。本发明采用整体斑马鱼免疫荧光染色方法 (zebrafish whole mount immunofluorescent staining),结合定量图像分析和高通量微孔板分析技术,对 MS 斑马鱼髓鞘进行定量,评价化合物对髓鞘形成的影响,筛选潜在的 MS 治疗药物。整体斑马鱼免疫荧光染色方法的原理是特异性抗原抗体反应。本发明一抗为兔抗斑马鱼神经髓鞘蛋白抗 (anti-MBP)。用化合物处理斑马鱼一段时间后,首先将斑马鱼用 Dent's 固定液 (甲醇 : DMSO = 4 : 1) 固定,水化封闭后加入 anti-MBP 一抗与斑马鱼体内的 MBP 结合后,再加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG(H+L) 二抗与 anti-MBP 一抗结合,然后利用荧光显微镜拍照或利用酶标仪收集数据,对数据进行统计学处理,从而筛选出多发性硬化症的治疗药物或评价化合物诱导的神经髓鞘损伤。从图 1 中可以看出,未处理组斑马鱼髓鞘荧光很强,而 EB 处理组斑马鱼髓鞘荧光减弱或消失。推广开来,若某种化合物能够增加 EB 诱导的斑马鱼髓鞘荧光强度,则该化合物可作为潜在的多发性硬化治疗药。此外,本发明中斑马鱼多发性硬化症模型还可用来评价化合物诱导的髓鞘损伤,其原理是该种化合物诱导斑马鱼髓鞘荧光减弱或消失。

发明内容

[0013] 为了克服上述现有技术存在的缺陷和不足,发明人经过研究,旨在提供一种活体斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法,同时提供一种利用该模型筛选多发性硬化症治疗药物和评价化合物诱导的髓鞘损伤的方法。本发明提供的方法具有简便、快速、经济、高效、高通量等优点。

[0014] 本发明是通过以下技术方案来实现的:

[0015] 一种活体斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0016] (1) 斑马鱼选取

[0017] 挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中;

[0018] (2) 化合物处理

[0019] 移除微孔板中的培养液,设置多个实验组:若干个不同浓度的诱导剂处理组和 1

个空白对照组,每个实验组根据微孔板的规格分别加入相同体积的相应溶液,然后恒温培养;

[0020] (3) 整体斑马鱼免疫荧光染色;

[0021] (4) 图像分析和 / 或微孔板分析;

[0022] (5) 统计学分析。

[0023] 优选的,所述步骤(2)中的诱导剂为溴化乙锭(EB)。

[0024] 一种评价或筛选多发性硬化症治疗药物的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0025] (1) 斑马鱼选取

[0026] 挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中;

[0027] (2) 化合物处理

[0028] 移除微孔板中的培养液,设置多个实验组:若干个化合物组合处理组、1个模型组、1个阳性对照组、1个溶剂对照组和1个空白对照组,每个实验组根据微孔板的规格分别加入相同体积的相应溶液,然后恒温培养;

[0029] (3) 整体斑马鱼免疫荧光染色;

[0030] (4) 图像分析和 / 或微孔板分析;

[0031] (5) 统计学分析。

[0032] 优选的,步骤(2)中化合物组合处理组加入的溶液为EB和待测化合物的混合溶液,模型组加入的溶液为EB溶液,阳性对照组加入的溶液为EB和多发性硬化症治疗药物的混合溶液,溶剂对照组中加入的溶液为0.1%的DMSO。

[0033] 一种评价化合物诱导的髓鞘损伤的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0034] (1) 斑马鱼选取

[0035] 挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中;

[0036] (2) 化合物处理

[0037] 移除微孔板中的培养液,设置多个实验组:若干个待测化合物处理组、1个髓鞘损伤阳性对照组、1个溶剂对照组和1个空白对照组,每个实验组根据微孔板的规格分别加入相同体积的相应溶液,然后恒温培养;

[0038] (3) 整体斑马鱼免疫荧光染色;

[0039] (4) 图像分析和 / 或微孔板分析;

[0040] (5) 统计学分析。

[0041] 优选的,步骤(2)中待测化合物处理组加入的溶液为待测化合物溶液,髓鞘损伤阳性对照组中加入的溶液为EB溶液,溶剂对照组中加入的溶液为0.1%的DMSO。

[0042] 优选的,本发明的所有方法中,步骤(1)中斑马鱼为2dpf的斑马鱼。

[0043] 优选的,本发明的所有方法中,步骤(2)中斑马鱼培养时间为96小时(h)。

[0044] 优选的,本发明的所有方法中,步骤(2)中空白对照组使用的溶液为斑马鱼养殖用水。

[0045] 优选的,本发明的所有方法中,步骤(3)整体斑马鱼免疫荧光染色包括以下步骤:

[0046] 1) 固定;

[0047] 2) 水化;

[0048] 3) 加入封闭液,室温下轻轻摇晃;

[0049] 4) 将斑马鱼与兔抗斑马鱼神经髓鞘蛋白抗体 (anti-MBP) 共同 4℃ 静置孵育过夜；

[0050] 5) PBST 清洗；

[0051] 6) 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗，室温孵育，避光；

[0052] 7) PBST 清洗。

[0053] 优选的，本发明所有方法中，步骤(4)图像分析具体步骤为：整体斑马鱼免疫荧光染色结束后，显微镜拍照并保存，一方面通过观察斑马鱼髓鞘荧光强度来定性评价，另一方面利用软件进行图像分析，计算斑马鱼髓鞘荧光强度；所述步骤(4)微孔板分析具体步骤为：整体斑马鱼免疫荧光染色后，将斑马鱼转入 96 孔板中，每孔 1 尾，然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。

[0054] 优选的，本发明的所有方法中，步骤(5)统计学分析步骤为：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。

[0055] 本发明提供的斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法及其应用不仅可通过图像分析定性与定量筛选多发性硬化症治疗药物或评价化合物诱导的髓鞘损伤，而且可通过基于微孔板的酶标仪检测技术实现高通量筛选与评价的目的。与以往的模型相比，本发明具有如下优点：

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 5) 简便 - 实验过程操作简单，斑马鱼经药物处理、染色后便可进行定量与定性分析，而传统实验操作过程复杂，容易产生假阳性结果。

[0061] 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 72h 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 24-48h 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 9) 直观性强 - 胚胎及幼鱼透明，可直接置于荧光显微镜下观察对比各实验组斑马鱼荧光强度。

[0065] 10) 敏感性高 - 本发明用很低浓度的溴化乙锭 (EB) 即可诱导斑马鱼产生神经髓鞘损伤。

[0066] 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。

[0067] 应用活体斑马鱼模型进行多发性硬化症治疗药物的筛选与药效评价具有可靠、快速、高效、低廉、高性价比等优点, 可实现体内高通量筛选多发性硬化症治疗药物的目的。本发明对加速多发性硬化症治疗药物的研发进程及多发性硬化症患者的治疗意义重大。

[0068] 发明详述

[0069] 本发明的目的在于提供一种活体斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法, 同时提供一种利用该模型筛选多发性硬化症治疗药物和评价化合物诱导的髓鞘损伤的方法。本发明提供的方法具有简便、快速、经济、高效、高通量等优点。

[0070] 一、本发明提供一种活体斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法, 设计方案为:

[0071] 1 斑马鱼选取

[0072] 取 4 ~ 5 对斑马鱼亲本交配, 按照 Westerfield^[33] 的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察, 挑取发育正常的斑马鱼移入 6、12、24、48、96 或 384 孔微孔板中, 根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0073] 2 化合物处理

[0074] 设置 6 个实验组 :5 个诱导剂处理组、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°C; pH 为 7.2~7.6; 总硬度为 200~250mg/L, 下同), 诱导剂处理组中加入一定体积 (根据微孔板规格而定) 浓度分别为 10 μM、25 μM、50 μM、75 μM、100 μM 髓鞘损伤诱导剂 EB; 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°C 恒温培养箱中培养。

[0075] 3 整体斑马鱼免疫荧光染色

[0076] 1) 固定

[0077] 化合物处理结束后, 利用 Dent's 固定液 (甲醇 : DMSO = 4 : 1) 固定胚胎, 室温 3 小时 (h) 以上或者 4°C 过夜, 然后转移至 100% 的甲醇中, -20°C 放置不少于 1h。

[0078] 2) 水化

[0079] ① 将样品从 -20°C 的冰箱中取出, 室温放置 5 分钟 (min);

[0080] ② 逐步水化至 100% PBST (含 0.1% 吐温的磷酸盐缓冲液);

[0081] i 75% 甲醇 / 25% PBST, 室温, 5min, 轻轻摇晃

[0082] ii 50% 甲醇 / 50% PBST, 室温, 5min, 轻轻摇晃

[0083] iii 25% 甲醇 / 75% PBST, 室温, 5min, 轻轻摇晃

[0084] iv 100% PBST, 室温 3 次, 每次 5min, 轻轻摇晃

[0085] 3) 加入封闭液, 室温 3h, 轻轻摇晃;

[0086] 4) 将斑马鱼与兔抗斑马鱼神经髓鞘蛋白抗体 (anti-MBP) 共同 4°C 静置孵育过夜;

[0087] 5) PBST 清洗 15min, 轻轻摇晃, 重复 4 次;

[0088] 6) 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG (H+L) 二抗, 室温孵育 2h, 避光;

[0089] 7) PBST 清洗 15min, 轻轻摇晃, 重复 4 次。

[0090] 4 图像分析

[0091] 整体斑马鱼免疫荧光染色结束后,利用立体荧光显微镜拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼髓鞘荧光强度定性确定斑马鱼多发性硬化症模型(见图2),另一方面利用尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件进行图像定量分析,计算斑马鱼髓鞘荧光强度。髓鞘损伤率计算公式如下:

[0092]

$$\text{髓鞘损伤率} (\%) = \left(1 - \frac{\text{诱导剂处理组荧光强度}}{\text{空白对照组荧光强度}} \right) \times 100\% \quad (\text{a})$$

[0093] 例如:空白对照组荧光强度为100000,诱导剂处理组荧光强度分别为80000、60000、40000、20000、10000,则根据计算公式得:诱导剂处理组髓鞘损伤率分别为20%、40%、60%、80%、90%(见图3)。

[0094] 5 微孔板分析

[0095] 或整体斑马鱼免疫荧光染色后,将斑马鱼转入96孔板中,每孔1尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为495nm,在520nm处采集发射光的荧光强度,试验重复3次取其平均值。髓鞘损伤率计算公式见(a)。

[0096] 6 统计学分析

[0097] 利用JMP8.0软件对上述图像分析和微孔板分析所得的髓鞘损伤率进行统计分析。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确定斑马鱼多发性硬化症模型。

[0098] 二:本发明还提供一种评价或筛选多发性硬化症治疗药物的方法,设计方案为:

[0099] 1 斑马鱼选取

[0100] 将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入6、12、24、48、96或384孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0101] 2 化合物处理

[0102] 设置9个实验组:5个化合物组合处理组、1个模型组、1个阳性对照组、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)的髓鞘损伤诱导剂EB+0.1μM、1μM、10μM、100μM、1000μM的待测化合物溶液;模型组中加入诱导剂EB;阳性对照组中加入诱导剂EB+多发性硬化症治疗药物;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。

[0103] 本发明化合物组合处理组除了采用上述同时添加两种物质(诱导剂+待测化合物)的方式,另外,本步骤的化合物组合处理组也可采用以下两种方式处理:

[0104] 第一:加入诱导剂48~72h后,再加入终浓度分别为0.1μM、1μM、10μM、100μM、1000μM的待测化合物溶液;(适用于评价与筛选多发性硬化症治疗药)

[0105] 第二:首先加入终浓度分别为0.1μM、1μM、10μM、100μM、1000μM的待测化合物溶液6~24h后,再加入诱导剂。(适用于评价与筛选多发性硬化症预防药)

[0106] 3 整体斑马鱼免疫荧光染色

[0107] 方法同发明一中的整体斑马鱼免疫荧光染色步骤部分。

[0108] 4 微孔板分析

[0109] 整体斑马鱼免疫荧光染色后,将斑马鱼转入 96 孔板中,每孔 1 尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为 495nm,在 520nm 处采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。髓鞘恢复率计算公式如下:

[0110]

$$\text{髓鞘恢复率} (\%) = \left(\frac{\text{化合物组合处理组荧光强度} - \text{模型组荧光强度}}{\text{溶剂对照组荧光强度} - \text{模型组荧光强度}} \right) \times 100\% \text{ (b)}$$

[0111] 例如:空白对照组与溶剂对照组斑马鱼髓鞘荧光强度均为 10000,阳性对照组荧光强度为 7000,模型组荧光强度为 2000,化合物组合处理组荧光强度分别为 4000、5000、6000、7000、8000,则根据计算公式得:阳性对照组髓鞘恢复率为 62.5%,5 个化合物组合处理组髓鞘恢复率分别为 25%、37.5%、50%、62.5%、75% (如图 4)。

[0112] 5 图像分析

[0113] 或整体斑马鱼免疫荧光染色后,利用立体荧光显微镜拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼髓鞘荧光强度定性评价与筛选多发性硬化症治疗药物 (见图 5),另一方面利用尼康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像定量分析,计算斑马鱼髓鞘荧光强度。髓鞘恢复率计算公式见 (b)。

[0114] 6 统计学分析

[0115] 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评价与筛选多发性硬化症治疗药物。

[0116] 三:本发明还提供一种评价化合物诱导的髓鞘损伤的方法,设计方案为:

[0117] 1 斑马鱼选取

[0118] 将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入 6、12、24、48、96 或 384 孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0119] 2 化合物处理

[0120] 设置 8 个实验组:5 个待测化合物处理组、1 个髓鞘损伤阳性对照组、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,待测化合物处理组中加入一定体积 (根据微孔板规格而定) 浓度分别为 0.1 μM 、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1000 μM 待测化合物;髓鞘损伤阳性对照组中加入髓鞘损伤诱导剂 EB;溶剂对照组中加入等体积 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°C 恒温培养箱中培养。

[0121] 3 整体斑马鱼免疫荧光染色

[0122] 方法同发明一中的整体斑马鱼免疫荧光染色步骤部分。

[0123] 4 微孔板分析

[0124] 整体斑马鱼免疫荧光染色后,将斑马鱼转入 96 孔板中,每孔 1 尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。髓鞘损伤率计算公式见 (a)。

[0125] 5 图像分析

[0126] 或整体斑马鱼免疫荧光染色后,利用立体荧光显微镜拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼髓鞘荧光强度定性评价化合物诱导的髓鞘损伤 (如图 2),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,计算斑马鱼髓鞘荧光强度。髓鞘损伤率计算公式见 (a)。

[0127] 6 统计学分析

[0128] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm SE$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 为差异性显著。根据统计学处理结果评价化合物诱导的髓鞘损伤程度。

附图说明

[0129] 图 1 为本发明 EB 诱导的神经髓鞘损伤图谱。A 为未处理组, B 为 EB 处理组。

[0130] 图 2 为本发明定性确定斑马鱼多发性硬化症图谱。A 为空白对照组, 斑马鱼髓鞘荧光强度很强; B 为诱导剂处理组, 经诱导剂 EB 处理后, 斑马鱼髓鞘损伤, 荧光强度减弱甚至消失。

[0131] 图 3 为本发明浓度依赖的 EB 诱导的髓鞘损伤率。

[0132] 图 4 为本发明依赖待测化合物浓度的髓鞘恢复率。

[0133] 图 5 为本发明定性评价多发性硬化症治疗药物的药效学图谱。A 为空白对照组; B 为溶剂对照组; C 为模型组, 斑马鱼髓鞘荧光强度显著减弱; D 为阳性对照组; E 为化合物组合处理组。D 和 E 中的斑马鱼经多发性硬化症治疗药物处理后, 荧光强度明显增强。

[0134] 图 6 为本发明定性确定斑马鱼最佳发育阶段图谱。A 为空白对照组, 斑马鱼髓鞘荧光强度很强; B 为 2dpf 斑马鱼, 经诱导剂 EB 处理后, 斑马鱼髓鞘损伤, 荧光强度消失。

[0135] 图 7 为本发明不同发育阶段时 EB 诱导的斑马鱼髓鞘损伤率。*2dpf 与 3dpf 和 4dpf 相比, $p < 0.05$ 。

[0136] 图 8 为本发明不同处理时间长度下的斑马鱼髓鞘损伤率。*96h 与 72h 相比, $p < 0.05$; **96h 与 48h 相比, $p < 0.01$; ***96h 与 24h 和 12h 相比, $p < 0.001$ 。

[0137] 图 9 为本发明斑马鱼经 75 μM EB 处理后的整体斑马鱼免疫荧光染色图谱。A 为空白对照组; B 为 75 μM EB 处理组, 与空白对照组相比, 荧光强度显著减弱。

[0138] 图 10 为本发明依赖 EB 浓度的斑马鱼髓鞘损伤率(图像分析)。*75 μM 与 50 μM 相比, $p < 0.05$; **75 μM 与 25 μM 和 10 μM 相比, $p < 0.01$ 。

[0139] 图 11 为本发明依赖 EB 浓度的斑马鱼髓鞘损伤率(微孔板分析)。*75 μM 与 50 μM 相比, $p < 0.05$; **75 μM 与 25 μM 和 10 μM 相比, $p < 0.01$ 。

[0140] 图 12 为本发明定性评价 T3/T4 的药效学图谱。A 为空白对照组; B 为溶剂对照组; C 为模型组, 斑马鱼髓鞘荧光强度显著减弱; D 为 10nM T3/T4 处理组, 斑马鱼经 T3/T4 治疗后, 荧光强度明显增强。

[0141] 图 13 为本发明 T3/T4 浓度依赖的斑马鱼髓鞘恢复率。*0.1nM 组与溶剂对照组相比, $p < 0.05$; **1nM 组与溶剂对照组相比, $p < 0.01$; ***10nM、100nM 和 1000nM 与溶剂对照组相比, $p < 0.001$ 。

[0142] 图 14 为本发明定性评价甲基强的松龙的药效学图谱。A 为空白对照组; B 为溶剂对照组; C 为模型组, 斑马鱼髓鞘荧光强度显著减弱; D 为阳性对照组; E 为 100 μM 甲基强的松龙处理组。D 和 E 中的斑马鱼经多发性硬化治疗药物处理后, 荧光强度明显增强。

[0143] 图 15 为本发明甲基强的松龙浓度依赖的髓鞘恢复率。*1 μM 组与溶剂对照组相比, $p < 0.05$; **10 μM 组与溶剂对照组相比, $p < 0.01$; ***100 μM 、1000 μM 和 阳性对照组与溶剂对照组相比, $p < 0.001$ 。

[0144] 图 16 为本发明地塞米松浓度依赖的髓鞘恢复率。*1 μM 和 10 μM 组与溶剂对照组相比, $p < 0.05$; **100 μM 与 1000 μM 组与溶剂对照组相比, $p < 0.01$; *** 阳性对照组与溶剂对照组相比, $p < 0.001$ 。

[0145] 图 17 为本发明定性评价 LPC 诱导的髓鞘损伤图谱。A 为空白对照组; B 为溶剂对照组; C 为模型组; D 为 1000 μM LPC 处理组。C 和 D 中的斑马鱼经髓鞘损伤诱导剂处理后, 荧光强度明显减弱或消失。

[0146] 图 18 为本发明 LPC 浓度依赖的斑马鱼髓鞘损伤率图。*1 μM 和 10 μM 组与溶剂对照组相比, $p < 0.05$; 100 μM 和 1000 μM 组与溶剂对照组相比, $p < 0.01$; *** 髓鞘损伤阳性对照组与溶剂对照组相比, $p < 0.001$ 。

具体实施方式

[0147] 以下实施例是为了进一步说明本发明提供的活体斑马鱼多发性硬化症模型的实施方式和用途。实施例是为了解释而不是以任何方式限制本发明的范围, 本领域技术人员在权利要求的范围内所做出的某些改变和调整也应认为属于本发明的范围。

[0148] 试剂及仪器

[0149] 溴化乙锭 (EB) 和 L- 甲状腺素钠 (T3/T4) 购自上海晶纯实业有限公司, 其他试剂均由北京鼎国昌盛科技有限公司提供。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); 行为分析仪 (V3, ViewPoint Life Sciences, 法国)。

[0150] 实施例 1 确定斑马鱼最佳发育阶段

[0151] 1 斑马鱼选取

[0152] 斑马鱼发育到 2dpf 时, 大脑内髓鞘开始形成^[17]。将 2dpf、3dpf、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。)

[0153] 2 化合物处理

[0154] 设置 3 个实验组 (每组分别为 2dpf、3dpf、4dpf 的斑马鱼), 每个实验组包括 1 个诱导剂处理组、1 个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水, 诱导剂处理组中加入 3mL 75 μM 的 EB; 空白对照组中加入 3mL 养殖用水, 于 28°C 恒温培养箱中培养 96h。

[0155] 3 整体斑马鱼免疫荧光染色

[0156] 方法同发明一中的整体斑马鱼免疫荧光染色步骤部分。

[0157] 4 图像分析

[0158] 整体斑马鱼免疫荧光染色结束后, 利用立体荧光显微镜拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼髓鞘荧光强度定性确定斑马鱼最佳发育阶段, 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, 计算斑马鱼髓鞘荧光强度。髓鞘损伤率计算公式见 (a)。

[0159] 空白对照组斑马鱼髓鞘荧光染色正常。随着斑马鱼年龄的增加, 诱导剂处理组斑马鱼髓鞘损伤程度不断降低, 2dpf 斑马鱼髓鞘损伤程度最大 (见图 6)。统计学处理结果显示: 2dpf、3dpf、4dpf 的斑马鱼髓鞘损伤率分别为 (69.97 ± 3.69) %、(45.18 ± 2.98) %、

(30.39±1.23)% (见图7),这表明随着斑马鱼年龄的增加,髓鞘损伤率逐渐降低,2dpf的斑马鱼髓鞘损伤率最高。通过方差分析,诱导剂处理组的髓鞘损伤率明显高于空白对照组,差异有统计学意义 ($p < 0.05$) ;2dpf的斑马鱼与3dpf和4dpf的斑马鱼髓鞘损伤率相比, $p < 0.05$ 。

[0160] 实施例2确定化合物最佳处理时间长度

[0161] 1 斑马鱼选取

[0162] 将2dpf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。

[0163] 2 化合物处理

[0164] 设置5个实验组,每个实验组包括1个EB处理组、1个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,EB处理组中加入3mL 75μM的EB;空白对照组中加入等体积的养殖用水。将五个微孔板放入28℃恒温培养箱中分别培养12h、24h、48h、72h、96h。

[0165] 3 整体斑马鱼免疫荧光染色

[0166] 方法同发明一中的整体斑马鱼免疫荧光染色步骤部分。

[0167] 4 微孔板分析

[0168] 整体斑马鱼免疫荧光染色后,将斑马鱼转入96孔板中,每孔1尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为495nm,在520nm处采集发射光的荧光强度,试验重复3次取其平均值。髓鞘损伤率计算公式见(a)。

[0169] 统计学处理结果显示:EB处理12h、24h、48h、72h、96h的髓鞘损伤率分别为(10.25±1.33)%、(21.18±1.39)%、(31.45±3.21)%、(48.58±2.59)%、(69.97±1.67)% (见图8),这表明随着处理时间的延长,EB诱导的斑马鱼髓鞘损伤率不断增高,诱导剂处理组处理96h后的斑马鱼髓鞘损伤率与空白对照组相比,差异具有统计学意义 ($p < 0.05$) ;96h与72h、48h、24h和12h相比,差异具有统计学意义 ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 或 $p < 0.001$)。因此,选择处理96h作为化合物最佳处理时间长度。不同化合物最佳处理时间长度也不相同,需要具体化合物具体分析。

[0170] 实施例3活体斑马鱼多发性硬化症模型的建立方法

[0171] 基于实施例1和2中的斑马鱼最佳发育阶段和化合物最佳处理时间长度,通过优化EB的浓度建立活体斑马鱼多发性硬化症模型。设计方案如下:

[0172] 1 斑马鱼选取

[0173] 将2dpf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12孔板中,每孔20尾。

[0174] 2 化合物处理

[0175] 设置6个实验组:5个诱导剂处理组、1个空白对照组。移除微孔板中的养殖用水,诱导剂处理组中加入2mL浓度分别为10μM、25μM、50μM、75μM、100μM的EB;空白对照组中加入等体积的养殖用水,于28℃恒温培养箱中培养96h。

[0176] 3 整体斑马鱼免疫荧光染色

[0177] 方法同发明一中的整体斑马鱼免疫荧光染色步骤部分。

[0178] 4 图像分析

[0179] 整体斑马鱼免疫荧光染色后,利用立体荧光显微镜拍照并保存(见图9)。利用尼

康 NIS-Elements D3.10 高级图像处理软件进行图像分析,计算斑马鱼髓鞘荧光强度。髓鞘损伤率计算公式见 (a)。

[0180] 统计学处理结果显示:5个诱导剂处理组的斑马鱼髓鞘损伤率分别为 $(20.37 \pm 2.35)\%$ 、 $(33.15 \pm 3.02)\%$ 、 $(51.02 \pm 2.15)\%$ 、 $(64.16 \pm 3.23)\%$ 、 $(65.12 \pm 2.12)\%$ (见图 10)。这表明随着 EB 浓度的增加,髓鞘损伤率先增高后逐渐减缓。通过方差分析,浓度为 $75\mu M$ 和 $100\mu M$ 的诱导剂处理组髓鞘损伤率显著高于溶剂对照组,差异有统计学意义 ($p < 0.05$),而 $75\mu M$ 和 $100\mu M$ 的诱导剂处理组之间无统计学差异 ($p > 0.05$), $75\mu M$ 与 $50\mu M$ 、 $25\mu M$ 和 $10\mu M$ 相比,差异具有统计学意义 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。

[0181] 5 微孔板分析

[0182] 整体斑马鱼免疫荧光染色后,将斑马鱼转入 96 孔板中,每孔 1 尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。将激发光设置为 $495nm$,在 $520nm$ 处采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。髓鞘损伤率计算公式见 (a)。

[0183] 统计学处理结果显示:5个诱导剂处理组的斑马鱼髓鞘损伤率分别为 $(21.01 \pm 1.36)\%$ 、 $(31.22 \pm 4.51)\%$ 、 $(49.89 \pm 1.99)\%$ 、 $(70.17 \pm 2.55)\%$ 、 $(71.44 \pm 3.33)\%$ (见图 11)。这表明随着 EB 浓度的增加,髓鞘损伤率先增高后逐渐减缓。通过方差分析,浓度为 $75\mu M$ 和 $100\mu M$ 的诱导剂处理组髓鞘损伤率显著高于溶剂对照组,差异有统计学意义 ($p < 0.05$),而 $75\mu M$ 和 $100\mu M$ 的诱导剂处理组之间无统计学差异 ($p > 0.05$), $75\mu M$ 与 $50\mu M$ 、 $25\mu M$ 和 $10\mu M$ 相比,差异具有统计学意义 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。图像分析与微孔板分析结果一致,因此将 $75\mu M$ EMB 处理组确定为斑马鱼多发性硬化症模型组。

[0184] 实施例 4 验证斑马鱼多发性硬化症模型

[0185] L- 甲状腺素钠 (T3/T4) 可用于治疗多发性硬化症^[34]。本实施例是利用已知的多发性硬化症治疗药物 (T3/T4) 验证实施例 3 建立的斑马鱼多发性硬化症模型。

[0186] 1 斑马鱼选取

[0187] 将 2dpf 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 24 孔板中,每孔 10 尾。

[0188] 2 化合物处理

[0189] 设置 8 个实验组:5 个化合物组合处理组、1 个模型组、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,化合物组合处理组中加入 1mL 终浓度为 $75\mu M$ 的 EB+ 浓度分别为 $0.1nM$ 、 $1nM$ 、 $10nM$ 、 $100nM$ 、 $1000nM$ 的 L- 甲状腺素钠 (T3/T4);模型组中加入 1mL $75\mu M$ 的 EB;溶剂对照组中加入 1mL 0.1% DMSO;空白对照组中加入 1mL 养殖用水,于 $28^{\circ}C$ 恒温培养箱中处理 96h。

[0190] 3 整体免疫荧光染色

[0191] 方法同发明一中的整体免疫荧光染色步骤部分。

[0192] 4 图像分析

[0193] 整体免疫荧光染色后,利用立体荧光显微镜拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼髓鞘荧光强度定性评价 T3/T4(见图 12);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,计算斑马鱼髓鞘荧光强度。髓鞘恢复率计算公式见 (b)。统计学处理结果显示:5 个化合物组合处理组的斑马鱼髓鞘恢

复率分别为 $(22.11 \pm 1.36)\%$ 、 $(34.22 \pm 1.56)\%$ 、 $(57.63 \pm 2.36)\%$ 、 $(58.16 \pm 1.58)\%$ 、 $(58.03 \pm 2.14)\%$ （见图 13）。这表明随着 T3/T4 浓度的增加，髓鞘恢复率先增高后逐渐减缓。通过方差分析，5 个 T3/T4 浓度组与溶剂对照组相比，差异有统计学意义 ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 或 $p < 0.001$)。

[0194] 实施例 5 通过图像分析评价甲基强的松龙的药效学

[0195] 甲基强的松龙可用于治疗多发性硬化症^[35]。本实施例是利用斑马鱼模型定量评价甲基强的松龙对多发性硬化症的治疗效果。

[0196] 1 斑马鱼选取

[0197] 将 2dpf 的斑马鱼置于解剖显微镜下观察，挑取发育正常的斑马鱼移入 48 孔板中，每孔 3 尾。

[0198] 2 化合物处理

[0199] 设置 9 个实验组：5 个化合物组合处理组、1 个模型组、1 个阳性对照组、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，化合物组合处理组中加入 300 μL 终浓度为 75 μM 的 EB+ 浓度分别为 0.1 μM 、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1000 μM 的甲基强的松龙；模型组中加入 300 μL 75 μM 的 EB；阳性对照组中加入 300 μL 10nM 的 T3/T4；溶剂对照组中加入 300 μL 0.1% DMSO；空白对照组中加入 300 μL 养殖用水，于 28°C 恒温培养箱中处理 96h。

[0200] 3 整体免疫荧光染色

[0201] 方法同发明一中的整体免疫荧光染色步骤部分。

[0202] 4 图像分析

[0203] 整体免疫荧光染色后，利用立体荧光显微镜拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度定性评价甲基强的松龙（见图 14），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，计算斑马鱼髓鞘荧光强度。髓鞘恢复率计算公式见 (b)。统计学处理结果显示：阳性对照组的髓鞘恢复率为 $(49.74 \pm 4.12)\%$ ；5 个化合物组合处理组的髓鞘恢复率分别为 $(18.55 \pm 3.22)\%$ 、 $(29.56 \pm 1.79)\%$ 、 $(39.44 \pm 2.33)\%$ 、 $(51.45 \pm 2.41)\%$ 、 $(52.11 \pm 2.33)\%$ （见图 15）。这表明随着甲基强的松龙浓度的增加，髓鞘恢复率先增高后逐渐减缓。通过方差分析，浓度为 1 μM 、10 μM 、100 μM 和 1000 μM 组与溶剂对照组相比，差异有统计学意义 ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 或 $p < 0.001$)。

[0204] 实施例 6 通过微孔板分析评价地塞米松的药效学

[0205] 地塞米松可用于治疗多发性硬化症^[36]。本实施例是利用斑马鱼模型定量评价地塞米松对多发性硬化症的治疗效果。

[0206] 1 斑马鱼选取

[0207] 将 2dpf 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 24 孔板中，每孔 10 尾。

[0208] 2 化合物处理

[0209] 设置 9 个实验组：5 个化合物组合处理组、1 个模型组、1 个阳性对照组、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，化合物组合处理组中加入 1mL 终浓度为 75 μM 的 EB+ 浓度分别为 0.1 μM 、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1000 μM 的地塞米松；模型组中加入 1mL 75 μM 的 EB；阳性对照组中加入 1mL 10nM 的 T3/T4；溶剂对照组中加入 1mL 0.1% DMSO；空白对照组中加入 1mL 养殖用水，于 28°C 恒温培养箱中处理 96h。

[0210] 3 整体免疫荧光染色

[0211] 方法同发明一中的整体免疫荧光染色步骤部分。

[0212] 4 微孔板分析

[0213] 整体免疫荧光染色后,将斑马鱼转入 96 孔板中,每孔 1 尾。将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度。激发光设置为 495nm,在 520nm 处采集发射光的荧光强度,试验重复 3 次取其平均值。髓鞘恢复率计算公式见 (b)。统计学处理结果显示:阳性对照组的髓鞘恢复率为 (52.24±1.87) %;5 个化合物组合处理组的髓鞘恢复率分别为 (14.36±2.45) %、(20.63±1.85) %、(26.22±2.66) %、(36.23±1.78) %、(36.56±3.25) % (见图 16)。这表明随着地塞米松浓度的增加,髓鞘恢复率先增高后逐渐减缓。通过方差分析,浓度为 1 μM、10 μM、100 μM 和 1000 μM 组与溶剂对照组相比,差异有统计学意义 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。

[0214] 实施例 7 评价 L- 溶血卵磷脂 (LPC) 诱导的髓鞘损伤

[0215] L- 溶血卵磷脂 (LPC) 能溶解髓鞘,导致机体产生局灶性脱髓鞘病变 [37-39]。本实施例是利用斑马鱼多发性硬化症模型来定性和定量评价 LPC 诱导的髓鞘损伤程度。

[0216] 1 斑马鱼选取

[0217] 将 2dpf 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。

[0218] 2 化合物处理

[0219] 设置 8 个实验组:5 个化合物处理组、1 个髓鞘损伤阳性对照组、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,化合物处理组中加入 3mL 浓度分别为 0.1 μM、1 μM、10 μM、100 μM、1000 μM 的 L- 溶血卵磷脂 (LPC);髓鞘损伤阳性对照组中加入 3mL 75 μM 的 EB;溶剂对照组中加入 3mL 0.1% DMSO;空白对照组中加入 3mL 养殖用水,于 28°C 恒温培养箱中处理 96h。

[0220] 3 整体免疫荧光染色

[0221] 方法同发明一中的整体免疫荧光染色步骤部分。

[0222] 4 图像分析

[0223] 整体免疫荧光染色后,利用立体荧光显微镜拍照并保存。一方面通过观察对比各实验组斑马鱼髓鞘荧光强度定性评价 LPC 诱导的髓鞘损伤 (见图 17),另一方面进行图像分析,计算斑马鱼髓鞘荧光强度。髓鞘损伤率计算公式见 (a)。统计学处理结果显示:阳性对照组的髓鞘损伤率为 (65.24±3.88) %;5 个 LPC 处理组的髓鞘损伤率分别为 (13.78±2.45) %、(21.56±1.58) %、(26.42±2.37) %、(30.75±4.53) %、(34.63±4.11) % (见图 18)。这表明随着 LPC 浓度的增加,髓鞘损伤率先增高后逐渐减缓。通过方差分析,浓度为 1 μM、10 μM、100 μM 和 1000 μM 的 LPC 组与溶剂对照组相比,差异有统计学意义 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。

[0224] 由上述优选实施例可见:本发明提供的活体斑马鱼模型能够简便、快速、经济、高效、高通量、准确地评价与筛选多发性硬化症治疗药物。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。

[0225] 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。

[0226] 参考文献

[0227] [1]Zamvil SS, Steinman L.Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis[J].Neuron, 2003, 38(5) :685–688.

[0228] [2] 王光辉,王顺和. 多发性硬化的治疗进展 [J]. 医学综述,2005,11(6) :517–519.

[0229] [3] 单敏,杨明研,冯文勇. 多发性硬化的药物治疗进展 [J]. 当代医学,2010, 16(36) :1009–4393.

[0230] [4]Kelly JS. Experimental medicines in multiple sclerosis and compassionate use[J]. Clinical opinions, 2009, 39 :35–37.

[0231] [5]Franklin RJM, ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS :from biology to therapy[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2008, 9 :839–855.

[0232] [6] 吴凤岚,王正毅,刘爱莲. 神经干细胞在多发性硬化症动物模型中的研究进展 [J]. 医学综述,2008,14(19) :2881–2884.

[0233] [7]Einstein O, Grigoriadis N, Mizrachi-Kol R, et al. Transplanted neural precursor cells reduce brain inflammation to attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Experimental Neurology, 2006, 198 :275–284.

[0234] [8]Einstein O, Fainstein N, Vaknin I, et al. Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression[J]. Ann. Neurol, 2007, 61 :209–218.

[0235] [9]Pluchino, S. , Quattrini, A. , Brambilla, E. , Gritti, A. , Salani, G. , Dina, G. , Galli, R. , DelCarro, U. , Amadio, S. , Bergami, A. et al. (2003). Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. Nature, 422 :688–694.

[0236] [10]Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, et al. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism[J]. Nature, 2005, 436 :266–271.

[0237] [11]McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, et al. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis[J]. Nature Medicine, 2005, 11 :335–339.

[0238] [12]Dubois-Dalcq M, ffrench-Constant C, Franklin RJM. Enhancing central nervous system remyelination in multiple sclerosis[J]. Neuron, 2005, 48 :9–12.

[0239] [13]Friese MA, Montalban X, Willcox N, et al. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis[J]. Brain, 2006, 129 :1940–1952.

[0240] [14]Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models:70 years of merits and culprits

in experimental autoimmune encephalomyelitis research[J]. Brain, 2006, 129(8) : 1953-1971.

[0241] [15] Chan JR, Watkins TA, Cosgaya JM, et al. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes[J]. Neuron, 2004, 43(2) : 183-191.

[0242] [16] Wang Z, Colognato H, ffrench-Constant C. Contrasting effects of mitogenic growth factors on myelination in neuron-oligodendrocyte co-cultures[J]. Glia, 2007, 55(5) :537-545.

[0243] [17] Buckley CE, Goldsmith P, Franklin RJM. Zebrafish myelination : a transparent model for remyelination ? [J]. Disease Model & Mechanisms, 2008, 1(4-5) :221-228.

[0244] [18] McGrath P, Li CQ. Zebrafish : a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J]. Drug Discover Today, 2008, 13(9) :394-401.

[0245] [19] 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.

[0246] [20] Jeserich G, Klempahn K, Pfeiffer M. Features and functions of oligodendrocytes and myelin proteins of lower vertebrate species[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2008, 35(1) :117-126.

[0247] [21] Jeserich G, Stratmann A. In vitro differentiation of trout oligodendrocytes : evidence for an A2B5-positive origin[J]. Developmental Brain Research, 1992, 67(1) :27-35.

[0248] [22] Jeserich G, Waehneldt TV. Characterization of antibodies against major fish CNS myelin proteins : immunoblot analysis and immunohistochemical localization of 36K and IP2 proteins in trout nerve tissue[J]. Journal of Neuroscience Research, 1986 :15(2) :147-158.

[0249] [23] Sivron T, Cohen A, Duvdevani R, et al. Glial response to axonal injury : in vitro manifestation and implication for regeneration[J]. Glia, 1990, 3(4) : 267-276.

[0250] [24] Brosamle C, Halpern ME. Characterization of myelination in the developing zebrafish[J]. Glia, 2002, 39(1) :47-57.

[0251] [25] Pogoda HM, Sternheim N, Lyons DA, et al. A genetic screen identifies genes essential for development of myelinated axons in zebrafish[J]. Development Biology, 2006, 298(1) :118-131.

[0252] [26] Kazakova N, Li H, Mora A, et al. A screen for mutations in zebrafish that affect myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes[J]. Development Biology, 2006, 297(1) :1-13.

[0253] [27] Gahtan E, O'Malley DM. Rapid lesioning of large numbers of identified vertebrate neurons : applications in zebrafish[J]. Journal of Neuroscience Method, 2001, 108(1) :97-110.

- [0254] [28] Gahtan E, O'Malley DM. Visually guided injection of identified reticulospinal neurons in zebrafish :a survey of spinal arborization patterns[J]. The Journal of Comparative Neurology, 2003, 459(2) :186-200.
- [0255] [29] Hale ME, Ritter DA, Fecho JR. A confocal study of spinal interneurons in living larval zebrafish[J]. The Journal of Comparative Neurology, 2001, 437(1) :1-16.
- [0256] [30] Yoshida M, Macklin WB. Oligodendrocyte development and myelination in GFP-transgenic zebrafish[J]. Journal of Neuroscience Research, 2005, 81(1) :1-8.
- [0257] [31] Buckley CE, Marguerie A, Roach AG, et al. Drug reprofiling using zebrafish identifies novel compounds with potential pro-myelination effects[J]. Neuropharmacology, 2010, 59(3) :149-159.
- [0258] [32] Yamazaki Y, Yada K, Morii S, et al. Diagnostic significance of serum neuro-specific enolase and myelin basic protein assay in patients with acute head injury[J]. Surg Neurol, 1995, 43 :267-271.
- [0259] [33] Westerfield M. The Zebrafish Book :A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish[M]. Eugene, Oregon :The University of Oregon Press, 1993.
- [0260] [34] Zhang B, Jiang Y, Yang Y. Correlation between serum thyroxine and complements in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica[J]. Neuroendocrinology Letters, 2008, 29(2) :256-260.
- [0261] [35] 耿同超, 孔凤芹. 大剂量甲基强的松龙冲击治疗多发性硬化(综述)[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2003, 10(3) :191-193.
- [0262] [36] 王平, 樊永平, 张星虎. 多发性硬化的中西医研究进展[J]. 中国医药学报, 2004, 19(5) :303-305.
- [0263] [37] Ousman SS, David S. Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord[J]. Glia, 2000, 30(1) :92-104.
- [0264] [38] Mi S, Miller RH, Lee X, et al. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes[J]. Nature Neuroscience, 2005, 8 :745-751.
- [0265] [39] Kerstetter AE, Padovani-Claudio DA, Bai L, et al. Inhibition of CXCR2signaling promotes recovery in models of multiple sclerosis[J]. Experimental Neurology, 2009, 220(1) :44-56.

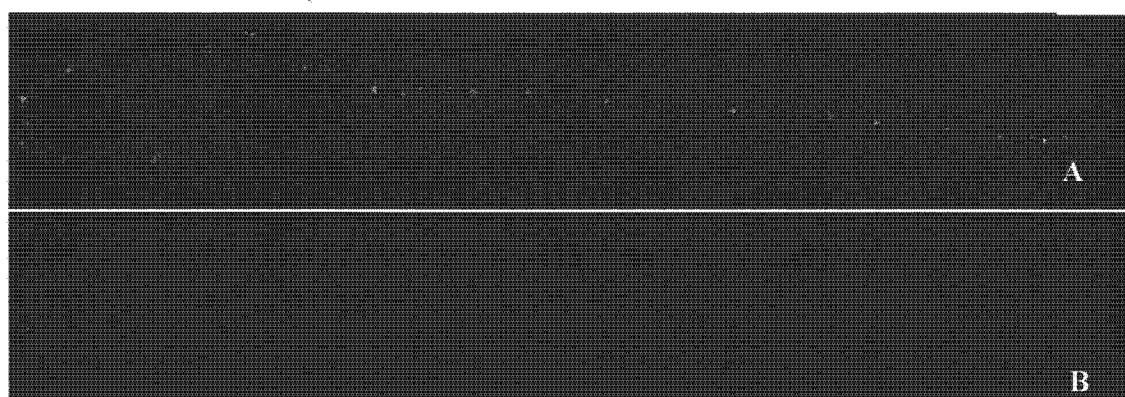


图 1

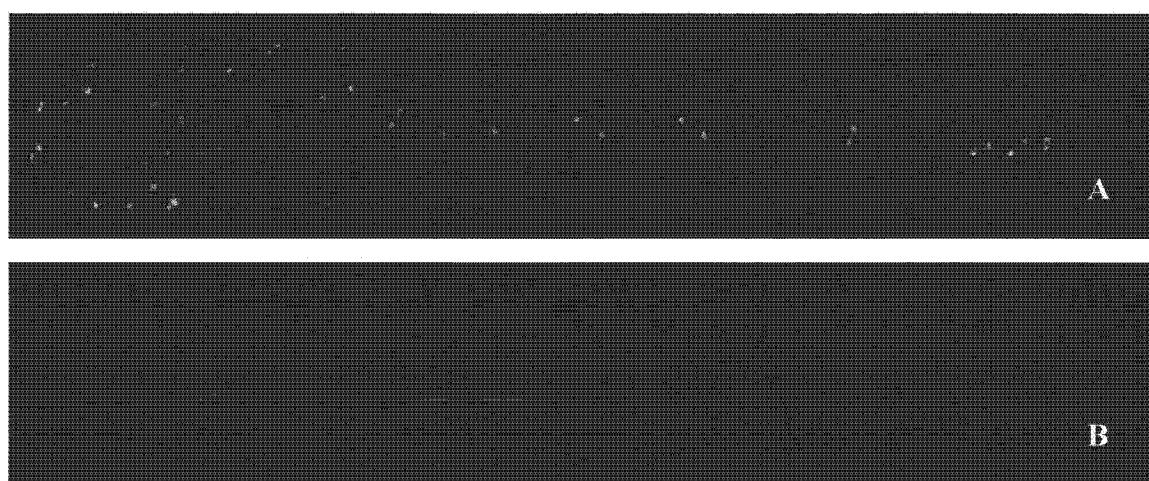


图 2.

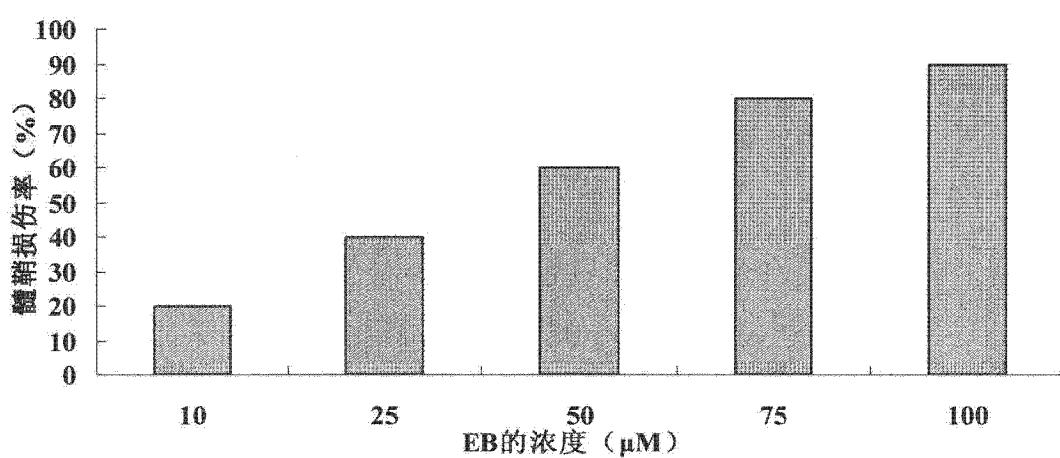


图 3

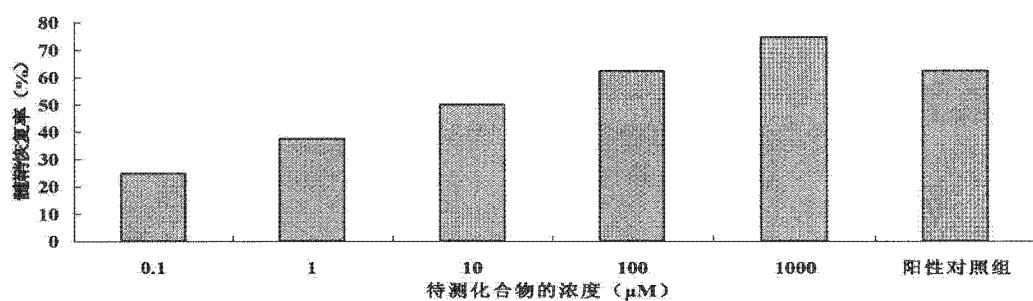


图 4.

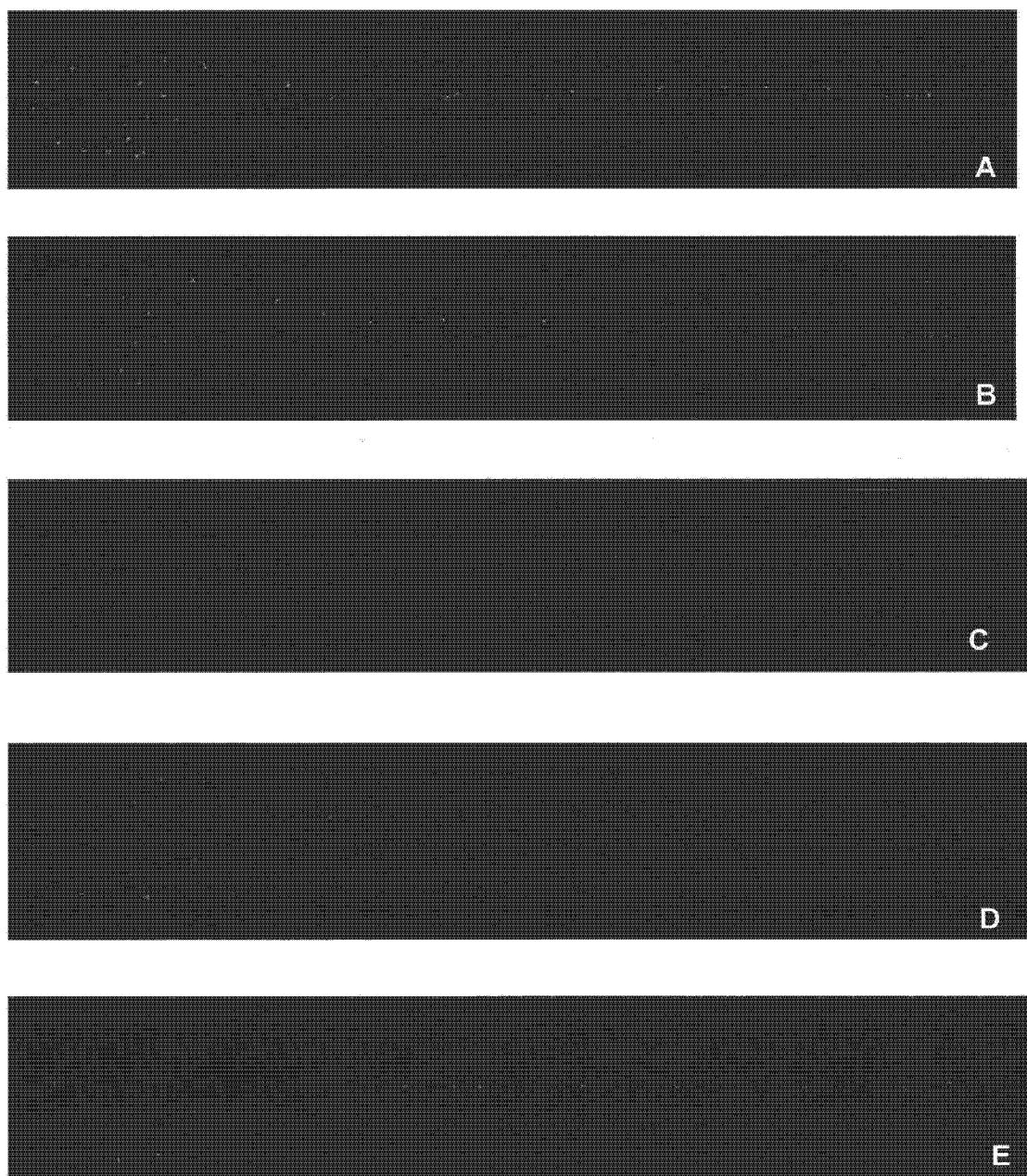


图 5



图 6

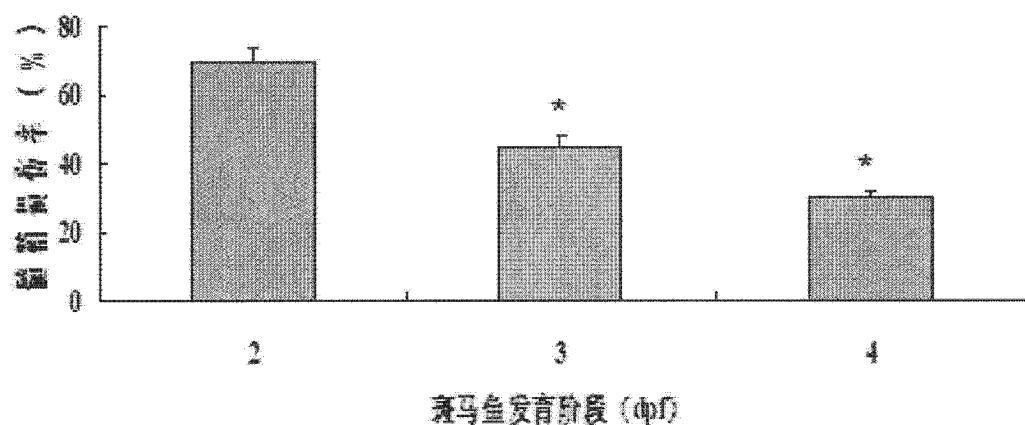


图 7

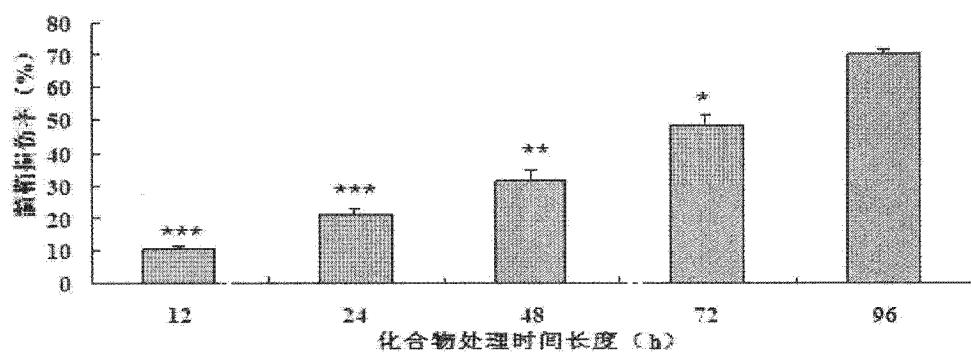


图 8



图 9

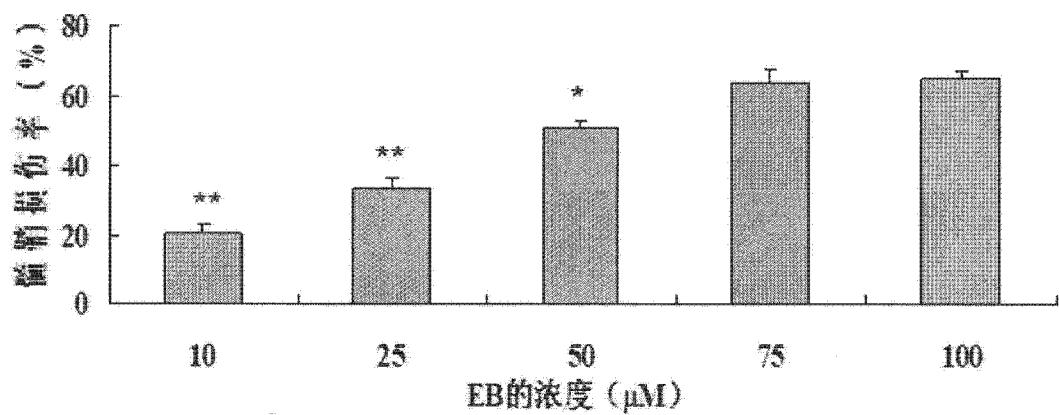


图 10

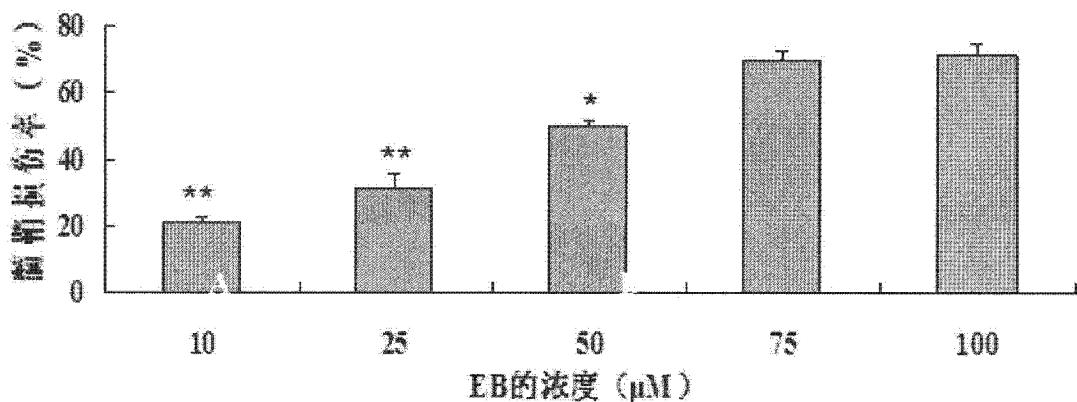


图 11



图 12

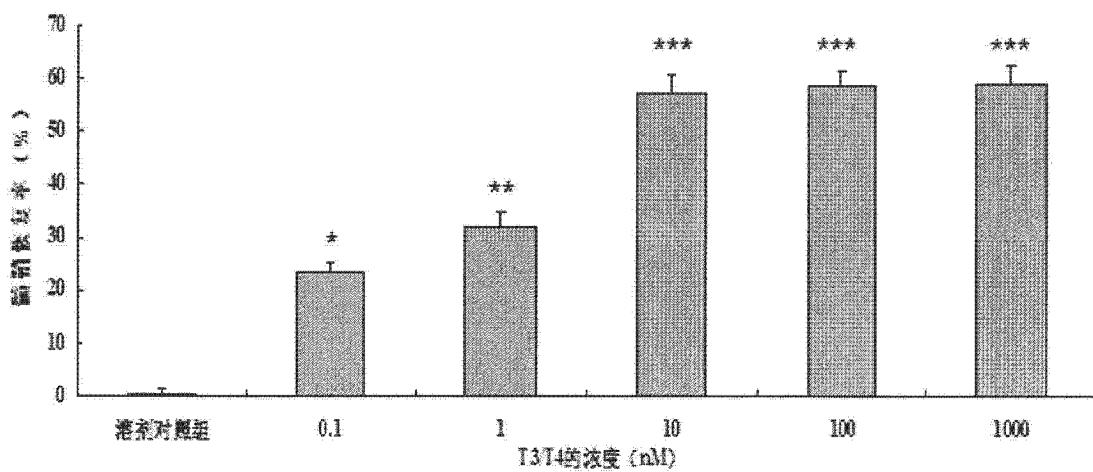


图 13

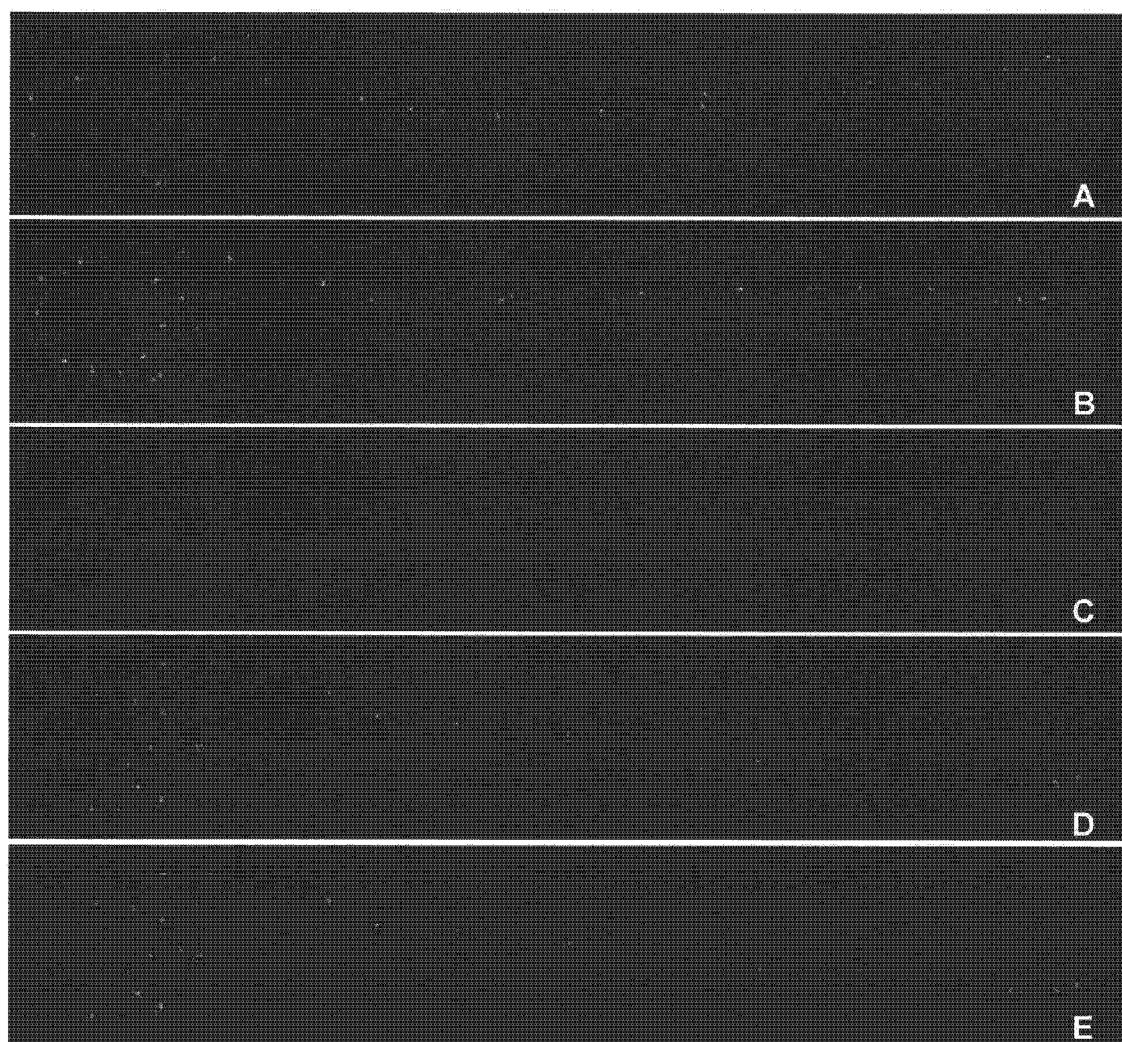


图 14

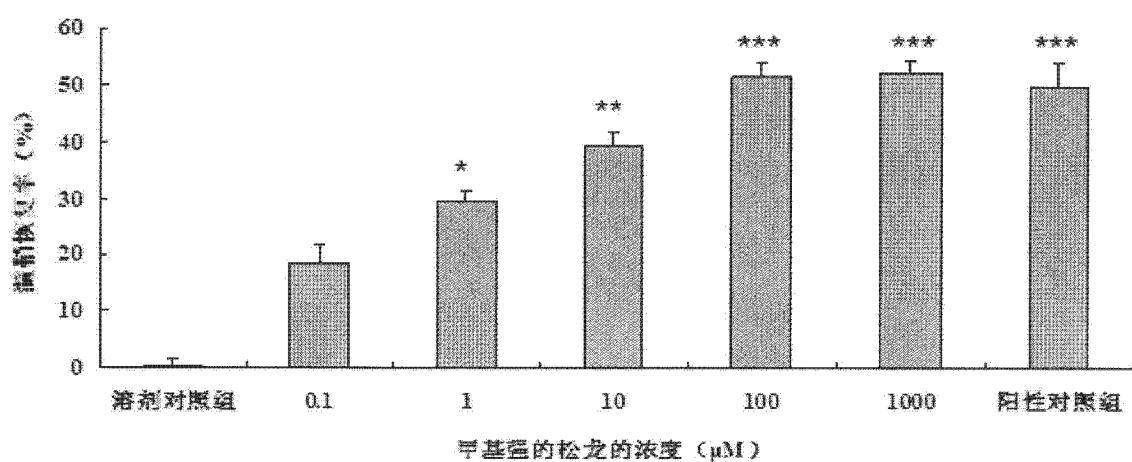


图 15

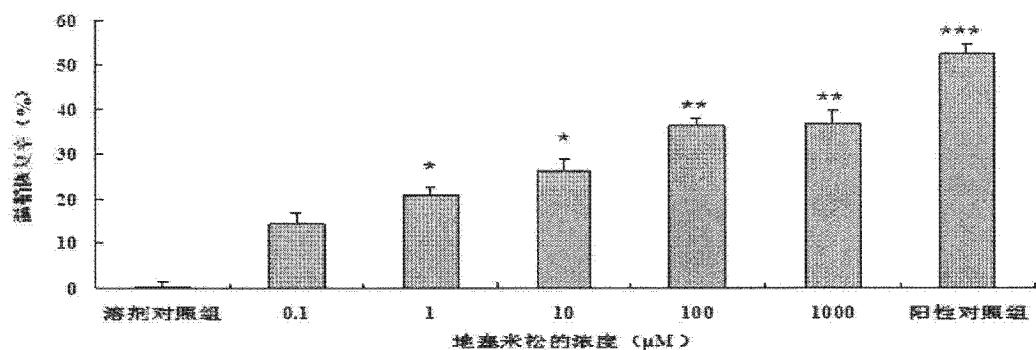


图 16

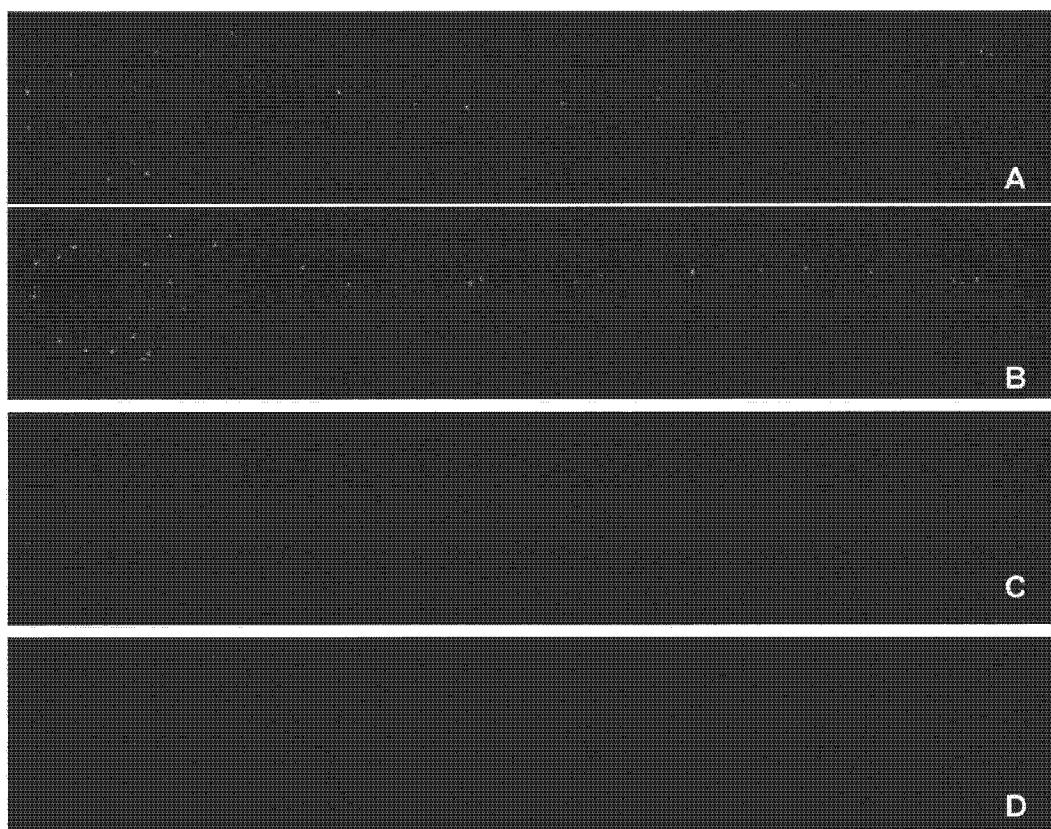


图 17

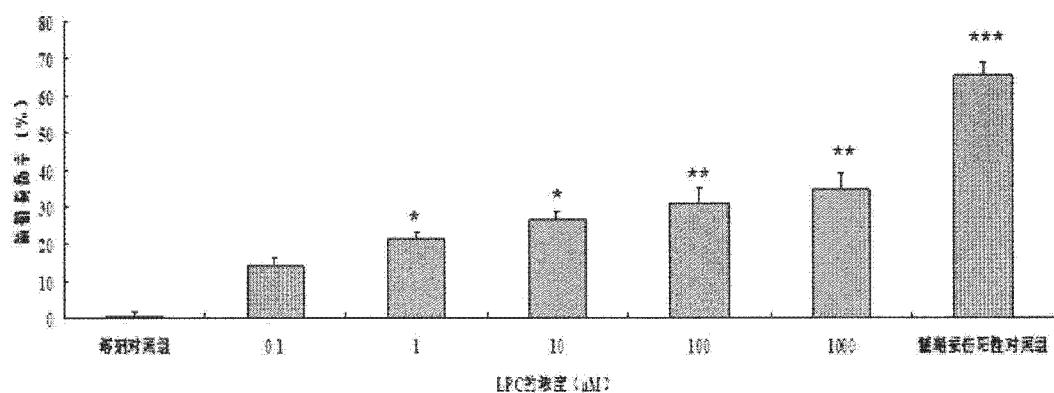


图 18