



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101646941 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 11

(21) 申请号 200780049451. 2

(22) 申请日 2007. 01. 08

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2009. 07. 07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2007/000035 2007. 01. 08

(87) PCT国际申请的公布数据
W02008/086646 EN 2008. 07. 24

(73) 专利权人 香港城市大学
地址 中国香港九龙

(72) 发明人 郑淑娴 陈保国

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 权陆军 付磊

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006. 01)
A61B 5/02 (2006. 01)

(56) 对比文件
US 20030161787 A1, 2003. 08. 28, 摘要、第
23 段、实施例 1、权利要求 1-8.
CN 15413334 A, 2004. 10. 27, 全文.

Thorsten Schwerte 等. understanding
cardiovascular physiology in zebrafish and
Xenopus larvae: the use of microtechniques.
《comparative biochemistry and physiology
part A》. 2003, 第 135 卷摘要、第 133-134 页 3. 1、
3. 2、第 141-142 页 6.

审查员 罗洋

权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54) 发明名称

使用硬骨鱼体内筛选心脏毒性剂的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种使用硬骨鱼胚胎和幼体, 基
于观察心搏率和心节律的改变来针对心脏毒性筛
选试剂的方法。本发明还涉及一种对硬骨鱼中与
心脏功能有关的基因的鉴定方法。

1. 一种鉴定试剂干涉心搏率和心搏节律能力的方法,该方法包括:
 - a. 将透明的硬骨鱼在含有测试试剂的培养基中温育;
 - b. 将透明的硬骨鱼在用含测试试剂的培养基浸泡的载玻片上固定化;
 - c. 对尾部移动的血细胞的循环录像;
 - d. 通过图像分析软件用视频图像分析方法分析尾部移动的血细胞的循环的录像,在这里在每个图像帧中的移动的血细胞被检测并定量;从部分视频或完整视频中的每个图像帧中都获得一系列的数据点,再使用功率谱分析这一系列的数据点,通过分析可以获得心搏率和心脏节律性指数,所述心脏节律性指数计算为基本频率值的功率值与完整谱总功率值的比。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述透明的硬骨鱼是指斑马鱼。
3. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (a) 包括至少从受精后 2 天开始温育透明的硬骨鱼的受精卵。
4. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (a) 将透明的硬骨鱼在含有待测试剂的温育培养基中再温育 4 个小时。
5. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (b) 包括将透明的硬骨鱼胚胎或幼体固定化在固定化培养基中。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述固定化培养基选自琼脂糖、琼脂或甲基纤维素。
7. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (c) 包括对胚胎或幼体身体尾部的血液循环进行至少 20 秒的录像记录。
8. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (d) 的分析方法能计算出血细胞在分析的时间间隔内行进的距离,且因而计算血细胞的速度。
9. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (d) 进一步包括通过计算血细胞出现两次最大速度之间的时间间隔计算心搏率的算法。
10. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (d) 进一步包括对血细胞速度数据点的数学分析以获取频率信息和功率谱信息。

使用硬骨鱼体内筛选心脏毒性剂的方法

[0001] 背景——发明领域

[0002] 心律失常,是指心搏过快(心搏过速)、过慢或不规则(心搏徐缓)的一组状况,是一种威胁生命的医学紧急情况,其引起心搏停止和猝死(Kleber 和 Rudy. 2004)。先天性或获得性心律失常的通常起因是遗传的和化学/疾病诱导的心律的扰动。超过 50 种治疗化合物已表现出诱导意外的心律失常的可能,且其中的一些已在市场上被撤回。心律失常目前被认为是用于预测新治疗化合物的人体安全性的重要的风险要素。因此,药物管理机构现在增加了对治疗化合物引起心律失常的潜在可能性的关注,且对促进心律失常的评估的管理建议已经发行(Stockbridge 和 Throckmorton. 2004)。

[0003] 背景知识和现有技术描述

[0004] 心律失常的细胞电生理学基础是由于离子通道阻塞,从而导致复极化的延迟和 QT 间隔的延长, Q 点与 T 点之间的间隔更长的 ECG 的特征(Keating 和 Sanguinetti. 2001; Roden 等人, 2002)。因为 hERG(人 ether-à-go-go-related 基因)是大多数引起心律失常的非心脏类药物的靶(Abriel 等人. 2004; Joshi 等人. 2004),所以 hERG 受到了特别的关注,该基因编码快激活延迟整流钾通道的孔形成性 α 亚单元。该通道负责让钾流复极化,所述钾流因为强的内向整流而区别于其他流。该通道的抑制,不管是通过外源化合物还是由于遗传突变,增加了心脏肌细胞中动作电位复极化的持续时间,从而导致心律失常。然而,心律失常不仅仅是因为 hERG 的功能失常,还因为其他离子通道的功能失常,例如钠通道和钙通道。因此,重点被放在通过高灵敏的和特异的实验模型对有任何意外的心脏毒性作用的新治疗化合物在临床前的筛选上(Joshi 等人, 2004)。

[0005] 传统上,膜片钳电生理学被认为是测量离子通道活性的“黄金标准”(Fermini 和 Fossa. 2003)。膜片钳允许在全细胞模型中直接和实时地监控在施用测试化合物期间离子通道的活性。然而,这是一种低通量的方法并且需要高度纯熟的操作员。虽然近期发展了其他先进的筛选技术来增加通量程度,但是所有这些技术都是基于体外细胞培养模型的。使用体外模型的缺点是在体外系统中无法模拟体内存在的复杂生理环境。一些心脏电生理学的生物学问题无法简单地通过体外测定得到解决。在这种情况下已采用了体内模型,包括豚鼠、狗和灵长类动物。在麻醉的动物中在一定范围的渐增剂量上连续记录 ECG 来测定任何心率失常的出现。而且,由于道德问题和成本效率,它们并没有被广泛使用。因此有需要发展一种低成本且高效率的新技术。

[0006] 斑马鱼已经作为模型在发育生物学研究、毒理学研究以及药学研究中使用。斑马鱼体内生物测定结合了与哺乳动物体内测定相比的高通量和与体外测定相比的高相关性的优点。近来,已有两篇论证斑马鱼对已熟知的诱导人类心率失常的化合物有相似的生理学反应的文章发表(Langheinrich 等人, 2003; Milan 等人, 2003)。而且, hERG 的直向同源物被克隆,并在孔区域以及环核苷酸结合区域的蛋白质序列中表现出高度的相似性,其中一些心脏毒性化合物与所述区域结合(Langheinrich 等人, 2003)。另外,在 zERG 中的突变显出与人类相似的心率失常表型。这些结果提示斑马鱼可能可以被用作筛选有心脏毒性的化合物的模型。

[0007] 已经开发了在斑马鱼中测量心脏功能的方法。但是,这些方法通常低通量、耗时且是劳动密集型的。最简单的方法是在常规光学显微镜或立体显微镜下用秒表对每分钟心搏数进行计数 (Langheinrich 等人,2003)。已开发了对心脏的数字影片的图象分析方法 (Milan 等人,2003)。测量心脏特定区域的平均像素强度。对这些数据进行快速傅里叶变换来确定心搏率。除心搏率之外,还发展了其他心脏参数如心输出量、血流动力学及电特性 ((Schwerte 和 Fritsche. 2003) 综述)。心输出量是心脏生理学的重要参数,能通过经由拍摄搏动的心室计算心动周期期间的心室体积非侵入性地在透明的斑马鱼胚胎中进行测定。体积计算公式需要心室的轴长,该轴长可以通过手工或借助计算机程序自动画出心室轮廓来获得。由血压确定的血流动力学能使用伺服零位微压 (servo-nullmicropressure) 系统测量。在该系统中,充满高浓度氯化钠溶液的玻璃毛细管被使用显微操作器插入目标血管中。血管中压力的变化会移动血浆与氯化钠溶液之间的界面,从而导致在玻璃毛细管中的电极的电阻发生变化。近来,已开发了对斑马鱼胚胎中电特性进行测量的方法 (Forouhar 等人,2004)。在该方法中,将 5 天大的胚胎沿它们背腹侧方向放置,且两根电极通过显微操作器确定好位置,一个放置在心脏外的体表,而另一个参考电极放置在周围的溶液中。然而,这些方法同样是耗时和劳动密集型的,特别在样品制备步骤中,从而使它们不适合高通量的研究。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及使用硬骨鱼作为模型来筛选有任何心脏毒性作用的试剂的方法,这种毒性作用特指心搏率和心搏节律的改变。将硬骨鱼的胚胎或幼体浸泡在含有测试试剂的培养基中一段特定的时间。接着,将硬骨鱼用琼脂糖、琼脂或是甲基纤维素固定。血细胞的循环通过装配有连接到诸如 VCR 记录仪、数码摄像机或个人电脑的记录设备的数码相机的显微镜进行录像。血液循环的录像然后通过图像分析软件用视频图像分析方法分析,在这里在每个图像帧 (video frame) 中的移动的血细胞被检测并定量。从部分视频或完整视频中的每个图像帧中都获得一系列的数据点。再使用功率谱分析对这一系列的数据点进行分析,通过分析可以获得心搏率和心搏节律的定量参数。我们的实验结果显示,通过本发明计算出的心搏率与通过直接检查心脏获得的心搏率相等。而且,我们的结果还显示心搏节律的定量参数,即通过本发明计算所得的心脏节律性指数,与心搏节律的规则性负相关。

[0010] 发明详述

[0011] 本发明描述了使用硬骨鱼来筛选有任何心脏毒性作用的试剂的方法,这种毒性作用特指心搏率和心搏节律的改变。

[0012] 硬骨鱼可以是属于硬骨鱼类 (Teleostomi) 亚纲的任何鱼的胚胎或幼体,优选地,如斑马鱼和青鳉,因为当用于心脏毒性测定时,它们相对于其他动物模型提供体外受精和透明的优势。

[0013] 向硬骨鱼暴露试剂可以从受精时开始或从受精后的特定时间开始。暴露的长度可以覆盖从开始暴露到检查时,或在特定长度的暴露时间后紧跟一段恢复时间,在此期间硬骨鱼将被浸泡在不含测试试剂的培养基里。试剂可以溶解于用于浸泡硬骨鱼的水或培养基中。可选地,不溶于水的试剂可以以高浓度溶解于 DMSO 中,且在暴露期间直接加入到浸泡培养基中。

[0014] 在对血细胞循环录像前,硬骨鱼被固定化于表面上,如载玻片或塑料培养皿。固定

化培养基可以是琼脂糖、琼脂或甲基纤维素。使用的最佳琼脂糖或琼脂的浓度是 0.5% (w/v) 或更低。使用的甲基纤维素的浓度是 2-4% (w/v)。硬骨鱼的方向应该是沿它们自发的侧向位置。优选地,在硬骨鱼后尾部的循环对本发明中进行心脏毒性分析而言是理想的。

[0015] 录制成像系统由拥有低放大倍数物镜的显微镜组成,立体显微镜或常规光学显微镜都行(图 1)。显微镜与相机相连,模拟的或数码的都行,所述相机连接记录设备,如 VCR 记录仪、数码摄像机或带有有图像帧抓取器的个人电脑。被记录在诸如 VCR 带或迷你 DV 带这样的介质上,或被记录在个人电脑里的录像被转换回诸如 AVI 或 WMV 格式的可读形式,并储存于个人电脑中以供进一步作录像图像分析。对每个硬骨鱼样品的录像长度应不少于 20 秒。

[0016] 随后通过在自制软件中实现的新算法进行录像图像分析。在这种算法里,从个人电脑中存储的 AVI 或 WMV 格式的录像文件中抓取图像帧,并立即用与它连续的图像帧相减。这种相减是以一个像素一个像素的方式对像素强度值进行的。任何出现在两个连续图像帧的运动都将导致像素强度的差异。因此,相减将揭示在录像中移动的血细胞。相减结果的例子展现在图 2 中。由于每个图像帧之间的时间间隔是恒定的,而有差别像素的量与两图像帧之间血细胞行进的距离相关,所以有差别像素的量能被用来估算血细胞的速度。将有差别像素,即,与连续图像帧中相应的像素有不同像素强度的像素的量,对以秒表示的时间作图,表现出具有规则振动的波形曲线(图 3),从而提示血细胞速度中的振动。

[0017] 对从录像图像分析中得到的一系列有差别像素的量的数据分析是用在自制软件中实现的方法进行的。有差别像素的量的数据系列是通过包含功率谱分析来分析的,其中有差别像素的数据系列通过离散傅里叶变换被分解。使用离散傅里叶变换算法(Ferguson, 1979)。功率谱经过傅里叶系列的自相关获得,并对频率值进行作图(图 4)。谱的总功率值被计算出来。具有最低频率值的最高峰(p_{\max})被定义为输入信号的基本频率组分。该频率值与心搏率相等。最高峰值与总功率值的比被当作是心脏节律性指数。所述计算的原理是当输入信号具有围绕基本频率组分变动的频率时,基本频率组分在其功率谱中的峰将较低而它周围的频率组分较高。这样,基本频率组分的功率与总功率的比降低。

[0018] 本实施方案是在 52hpf 的野生型胚胎中测试的。心脏与尾循环被录像用于分析。心搏率通过直接目测计数一分钟中心搏数而确定。另外,通过将功率谱中的基本频率组分乘以 60 计算得出心搏率。计算出的心搏率与通过直接对心脏检查得到的心搏率是相关的(图 5)。另外,心脏节律作为心搏时间间隔的标准差来确定。如果心搏不规则,那么心搏时间间隔的标准差就会增加。心脏节律性指数计算为基本频率值的功率值与完整谱总功率值的比。心脏节律性指数与通过直接对心脏检查得到的心搏时间间隔的标准差是负相关的(图 6),从而提示节律性指数越大心搏节律就越规则。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 成像系统示意图。

[0021] 图 2 图像相减结果示例。

[0022] 图 3 4 秒钟持续时间内有差别像素的图。

[0023] 图 4 说明基本频率组分和它的功率峰值的鉴定以及总功率计算的示意图。

[0024] 图 5 通过功率谱分析从心脏与尾循环测定的心搏率之间的相关性。

[0025] 图 6 通过功率谱分析测定的心脏节律与节律性指数之间的相关性。

[0026] 图 7 通过直接检查心脏和功率谱分析确定的氟哌丁苯诱导的心搏率变化的比较。星号表示对照组和氟哌丁苯组在统计学上显著的差异 ($p < 0.05$)。

[0027] 图 8 通过直接检查心脏和功率谱分析确定的氟哌丁苯诱导的心搏节律性变化的比较。星号表示对照组和氟哌丁苯组在统计学上显著的差异 ($p < 0.05$), 而双星号表示对照组和氟哌丁苯组在统计学上显著的差异 ($p < 0.01$)。

实施例

[0028] 本实施例说明了使用本发明来确定暴露在众所周知的诱导人心率失常的药物——氟哌丁苯下的斑马鱼幼体中心搏率和心脏节律性指数。氟哌丁苯是苯丙甲酮 (butyrophenone) 的衍生物, 有抗紧张剂的性质。心率失常已经与经口使用氟哌丁苯相关 (Henderson 等人, 1991) 而且氟哌丁苯诱导的心率失常的机制涉及 hERG 通道的阻塞 (Suessbrich 等人, 1997)。

[0029] 氟哌丁苯的储备溶液是通过将其溶于 DMSO 中制得的, 终浓度为 2mM。收集斑马鱼卵并将卵放置于卵培养基 (19.3mM NaCl, 0.23mM KCl, 0.13mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2mM $Ca(NO_3)_2$, 1.67mM Hepes (pH 7.2) 中, 在根据生活力分选前在 28.5°C 下放 4 个小时。健康的胚胎然后在 28.5°C 下温育最多 48hpf。将 6 μ l 储备溶液加入 6ml 的含有 20 个健康的 48-hpf 胚胎的卵培养基中。氟哌丁苯的终浓度是 2 μ M, 且 DMSO 的终浓度是 0.1%, 在所述浓度在斑马鱼中未观察到效果。经过 4 小时的温育, 斑马鱼的血液循环通过装有以 S- 视频电缆与数码相机相连的 CCD 相机的立体显微镜被检查和录像。录像被存储在迷你 DV 带上, 并通过数码相机与电脑之间的 i-Link 连接被转移回个人电脑上。录像剪辑以 AVI 格式存储于个人电脑上。图像分析和数据分析都通过我们自制的软件实现的图像分析和数据分析算法进行。

[0030] 在经过氟哌丁苯的处理后, 心搏率显著降低 (图 7), 与已公布数据相似 (Langheinrich 等人, 2003 ; Milan 等人, 2003)。除心搏率以外, 我们还分析了氟哌丁苯处理后心搏的节律性, 这还没有在任何评估斑马鱼胚胎心脏功能的文章中公布过。通过直接检查心脏测定的每次心搏之间的时间间隔的标准差增加了 (图 8)。与此同时, 经处理的胚胎的心脏节律性指数降低了 (图 8)。

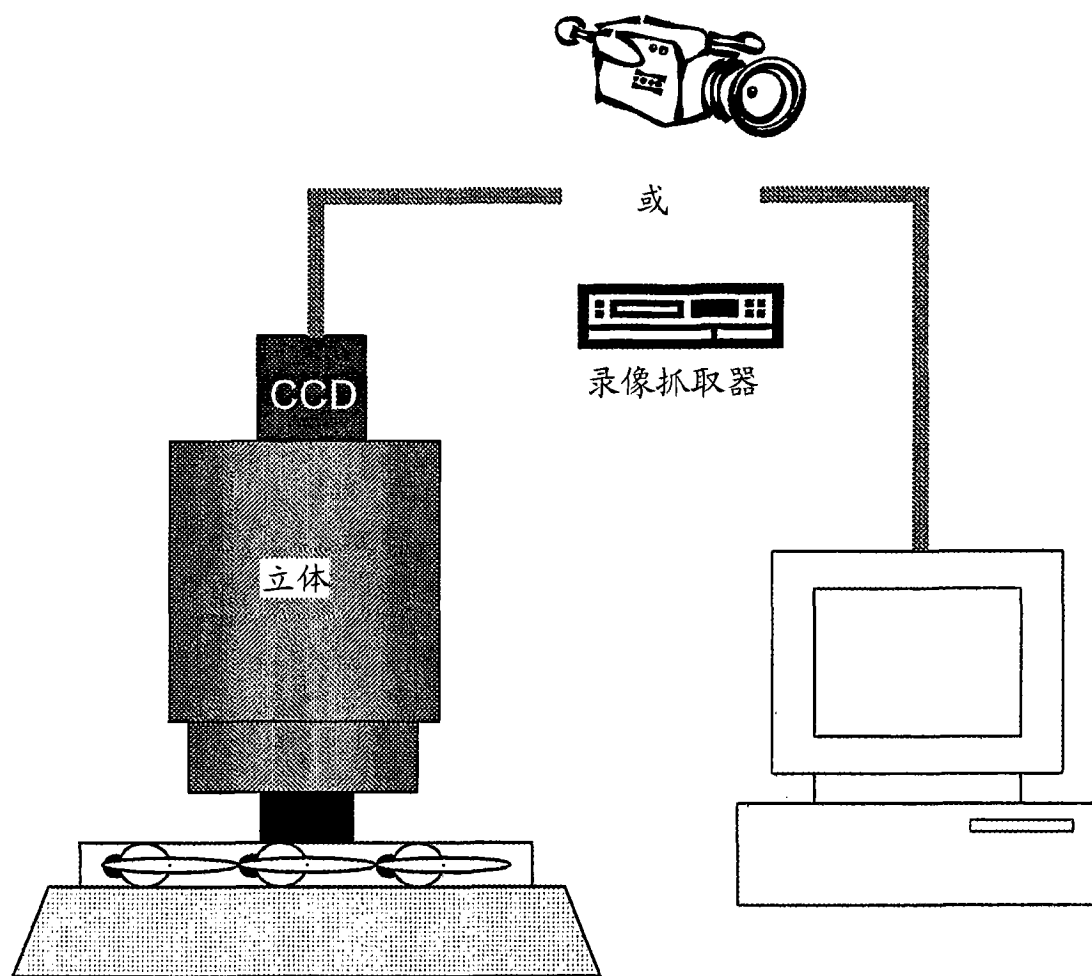


图 1

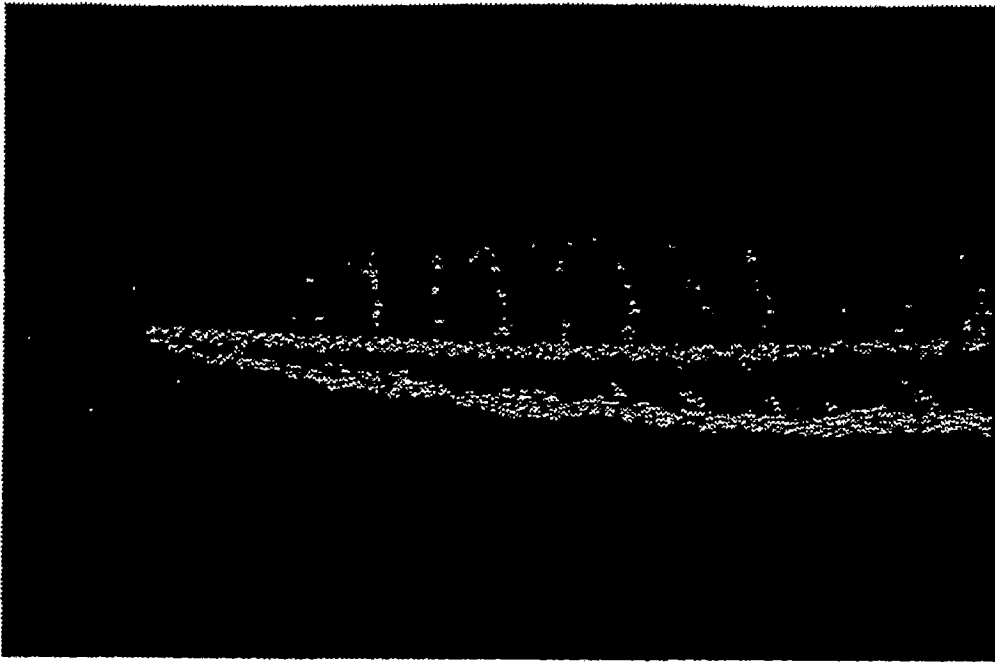


图 2

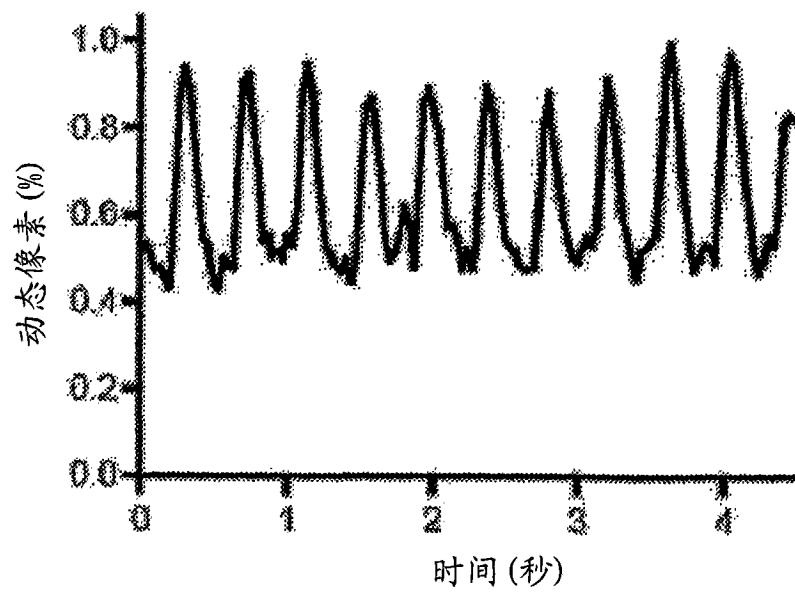


图 3

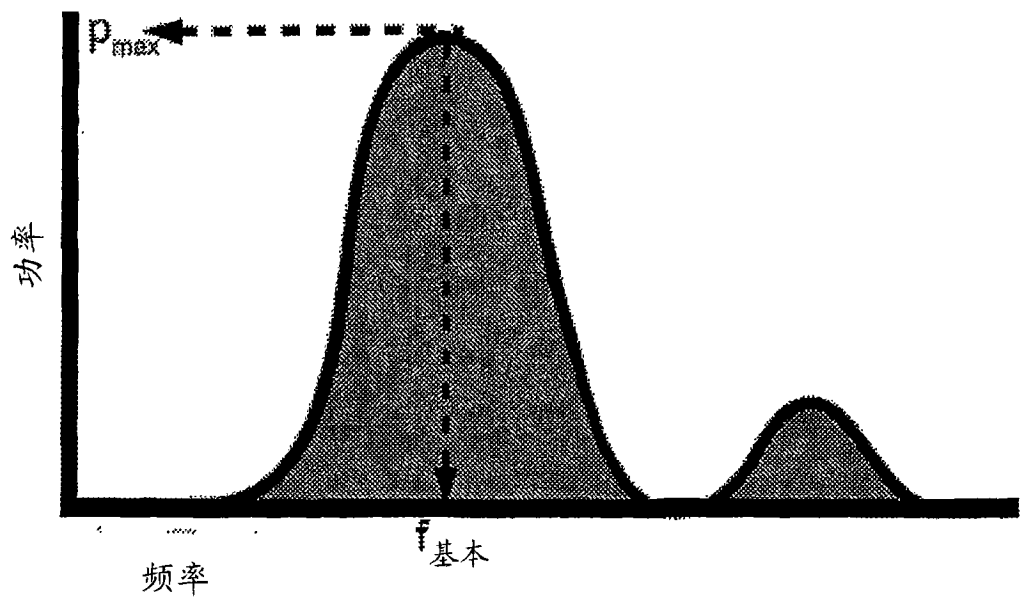


图 4

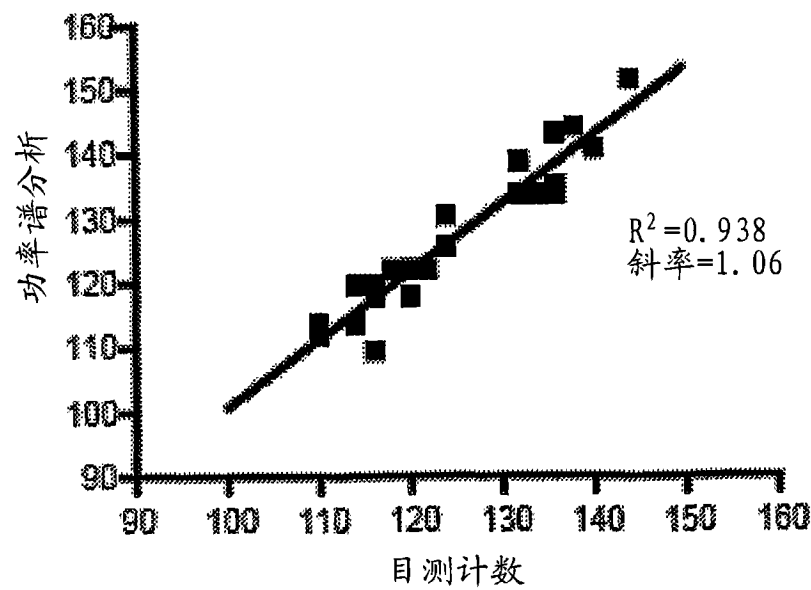


图 5

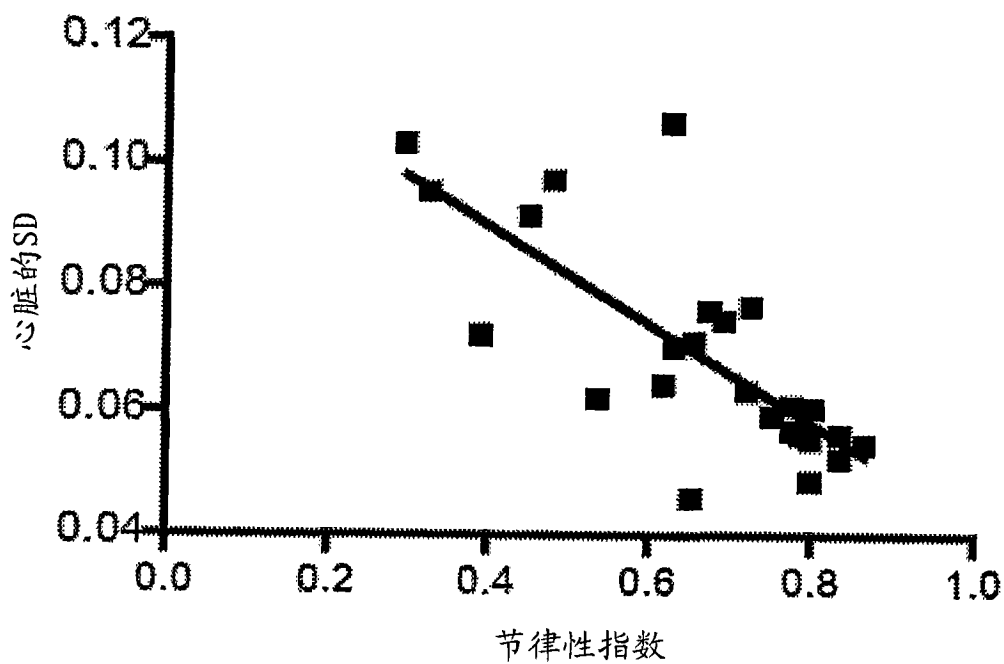


图 6

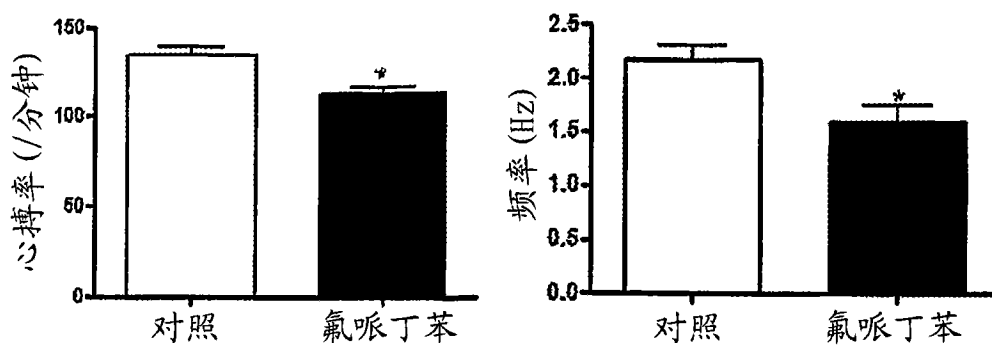


图 7

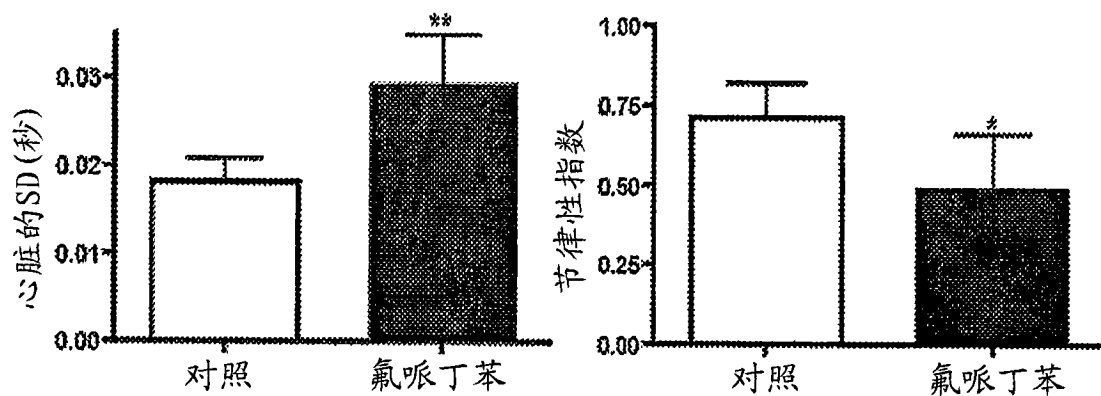


图 8