

泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松模型的建立*

□王长梅 韦英杰** 贾晓斌**

(江苏大学药学院 镇江 212013)

(江苏省中医药研究院/国家中医药管理局中药口服释药系统重点研究室 南京 210028)

蔡雪婷 孙 娥 宋 捷

(江苏省中医药研究院/国家中医药管理局中药口服释药系统重点研究室 南京 210028)

摘 要 本文首次采用斑马鱼为模型动物,以糖皮质激素泼尼松龙为造模用药,建立一种快速、高效的骨质疏松新动物模型。选用受精后 4 d 或 5 d 的幼鱼暴露于不同浓度泼尼松龙溶液中,同时设 0.5% DMSO 溶媒阴性对照组,28.5℃下在 24 孔板中培养 5 d,至斑马鱼颅骨形成。采用茜素红对培养至 9 d 或 10 d 的斑马鱼骨骼进行染色,以显微检测、数码成像方法定量分析骨骼染色区域。与溶媒阴性对照组相比,2.5, 10, 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙组的斑马鱼骨骼染色面积和染色光密度值显著减少,提示泼尼松龙使斑马鱼骨骼矿化量和骨密度显著降低,成功诱导斑马鱼骨质疏松。并用该模型成功验证鲑鱼降钙素和依替膦酸二钠防治骨质疏松的作用。

关键词 斑马鱼 泼尼松龙 骨质疏松 鲑鱼降钙素 依替膦酸二钠

doi: 10.11842/wst.2013.03.028 中图分类号 R274 文献标识码 A

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨组织显微结构异常和骨折危险性增加为特征的一类病征,由于西药存在长期应用副作用大等缺陷,中药治疗骨质疏松的功效正日益受到重视。但壮骨中药及其成分特别是量微成分的活性评价却不能高效进行,主要存在两个瓶颈问题:一是模型问题。现有动物骨质疏松模型耗时长,用样量大,劳动强度大,活性筛选

效率低^[1~4];现有细胞模型作用环节单一,成本高,原代培养难度大,一般的实验室不能进行。二是化合物的数量问题。由于中药成分复杂,很难分离到能满足体内研究的足量化合物,大量的量微成分只能通过细胞模型进行筛选。因此,现有骨质疏松模型难以实现对壮骨中药及其成分的高效、灵敏、高通量的筛选。建立具有体内、外优势,可用于量微成分壮骨效应评价的骨质疏松新模型具有重要意义。

斑马鱼是近年来被广泛用于建立疾病模型和

收稿日期:2012-08-26

修回日期:2012-09-14

* 江苏省科学技术厅自然科学基金项目(BK2011866)“模式生物斑马鱼壮骨效应评价模型的建立与应用研究”,负责人:韦英杰;国家自然科学基金委面上项目(30973978):“基于模式生物斑马鱼模型的中药代谢研究新方法的建立”,负责人:韦英杰;国家自然科学基金委面上项目(81274088):“基于体内自组装胶束形成机制的羊脂油聚淫羊藿增效机理研究”,负责人:贾晓斌。

** 通讯作者:韦英杰,副研究员,主要研究方向:中药物质基础与质量控制;贾晓斌,研究员,主要研究方向:方剂物质基础与现代中药制剂创新研究以及中药 ADME/Tox 技术平台及其在中药研究中的应用。

药物发现的重要模式生物^[5-7],其在骨骼方面的研究具有生理及遗传学依据:和哺乳动物一样,斑马鱼的骨骼是从3种胚胎干细胞系发育而来,已有研究表明斑马鱼幼鱼骨包含骨形成和骨吸收活动所需的细胞,属较完整体系。骨骼形成机制包括软骨内骨化和膜内骨化,其过程都受到一系列包括转录因子和激素在内的复杂机制的严格调控,参与调控的关键基因,如 *runx2*, *osteonectin*, *osteoprogenin* 等与哺乳动物的相关基因具有高度的同源性^[8-10]。斑马鱼个体小、易于饲养、发育快速、性成熟期短、繁殖力强,胚胎在母体外透明发育,易于观察和操作,品系资源丰富,且斑马鱼给药量少,实验耗时短,可进行微孔板形成的高通量筛选。

本研究以糖皮质激素泼尼松龙为模型药,诱导并建立斑马鱼骨质疏松模型,为高速筛选防治骨质疏松的中药及其量微成分提供简单、高效、高通量的生物模型。

一、材料与方法

1. 材料

斑马成鱼(南京大学模式动物研究所);泼尼松龙(苏州亚科化学试剂股份有限公司,批号:YK2012020101),鲑鱼降钙素注射液(诺华制药,批号:S0172),依替膦酸二钠(中国药品生物制品鉴定所,批号:101174-201001),茜素红S(郑州四季化工产品有限公司,批号:Sj20110806),多聚甲醛(成都市科龙化工试剂厂,批号:20100504),MS-222(批号:A0288328);ZEISS 荧光倒置显微镜 Axioobserver.A1(蔡司光学仪器国际贸易有限公司);生化培养箱 SPX-80(宁波海曙赛福实验仪器厂)。

2. 方法

(1) 斑马鱼胚胎收集和培养。

控制斑马鱼成鱼日夜节律,昼夜时间控制在14 h:10 h,收集受精卵,置于培养皿中,加入培养基($5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$, $0.17\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KCl}$, $0.33\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaCl}_2$, $0.33\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgSO}_4$, 5%~10%亚甲基蓝^[11])。置于恒温培养箱中培养,温度(28.5 ± 0.5)℃。

(2) 药物配制。

精密称取泼尼松龙适量,加入少量 DMSO 使其溶解,用培养基配制成 1, 2.5, 10, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DMSO 的溶液。

(3) 斑马鱼鱼龄选择。

与其他脊椎动物一样,斑马鱼的骨骼是从3种胚胎干细胞系发育而来,在受精3 d后,头部骨骼开始发育,最初的中轴骨骼骨化出现在幼鱼阶段的后期(受精后7 d或9 d)。故选择受精后3~9 d头骨骨骼发育的体积小幼鱼(长3~4 mm),可以在50 μL 液体中存活,使得微量成分高通量筛选成为可能。

(4) 给药方法。

常见斑马鱼给药方式有显微注射和暴露两种。显微注射难度高,设备要求高,技术难以掌握。而将斑马鱼暴露于含药的培养基中,则斑马鱼易通过皮肤和腔道吸收药物,且斑马鱼幼鱼对 DMSO 耐受性好^[12],难溶药物可用 DMSO 配制,方法简单、可行、易控。

(5) 斑马鱼骨质疏松模型建立。

将受精后3 d的斑马鱼胚胎放入盛有胚胎培养基的24孔板中,5条幼鱼/孔/1mL培养基,分为模型组(泼尼松龙)和阴性对照组,每组做2份。从4 d或5 d开始加入药物,吸净24孔板里的培养基后迅速加入溶液,溶媒 DMSO 的浓度为0.5%,将24孔板密封放入28.5℃恒温培养箱中培养。每天将每个孔里的溶液用移液枪吸出一半,更换新溶液,培养9~10 d。

(6) 斑马鱼茜素红染色。

将培养至9~10 d的斑马鱼胚胎置于MS-222中麻醉致死^[13],去除MS-222溶液,加入4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定,然后使用茜素红S对斑马鱼进行染色^[14, 15]。

(7) 矿化骨骼的定量分析。

用 ZEISS 荧光倒置显微镜观察茜素红染色的斑马鱼头骨腹面,用 AxioVisionRel.4.6 成像软件采集图像(100倍),所有的图像均采用相同的光强度和曝光设置。用专业图像分析软件 Image pro plus 6.0 计算茜素红染色区域面积和累积光密度(Integrated Optical Density, IOD),以分别反应骨矿化量和骨密度。用 Excel 软件计算平均值($\bar{x}$),标准偏差(SD),并进行t检验。

(8) 斑马鱼骨骼染色的显微检测。

对斑马鱼幼鱼骨骼染色后,将1条幼鱼用荧光倒置显微镜观察,捕获、采集图像。再将幼鱼转移到新的孔中,重新定位后再次进行图像的捕获、采集。重复5次。用图像分析软件计算染色面积和 IOD。

计算 $\bar{x}$ 、SD 及变异系数 (CV)。

(9) 鲑鱼降钙素对泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松的防治作用。

按照“(5)”项下方法,取斑马鱼 5d 胚胎置 24 孔板,分成 5 组,10 个胚胎/组/2 孔,1 组给予 0.5% DMSO 阴性对照,其余 4 组给予 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙, 28.5°C 恒温培养 48 h,将其中 3 组分别换为含 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙 0.83, 1.66, 8.3 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的鲑鱼降钙素溶液,每天换药,培养至第 10 d。然后按照“(6)”和“(7)”项下方法进行茜素红染色,采集图像并计算染色面积和累积光密度。

(10) 依替膦酸二钠对泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松的防治作用。

按照“(9)”项下方法,模型建立 48 h 后,将其中 3 组分别换为含 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙的 2.5, 15, 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的依替膦酸二钠溶液,每天换药,培养至第 9 d。然后按照“(6)”和“(7)”方法进行染色,采集图像并计算染色面积和累积光密度。

二、结果与分析

1. 斑马鱼骨骼染色与定量分析重复性结果

斑马鱼幼鱼用茜素红染色后,头骨骨骼部分呈红色,而非骨组织耳石部分呈棕黑色。重复性试验

结果良好:红色染色面积之和的 $\bar{x}$ 为 30 893.17, SD 为 732.8, CV 为 2.37% ($n=5$); 红色染色部分 IOD $\bar{x}$ 为 18 836.1, SD 为 595.03, CV 为 3.15% ($n=5$)。

2. 泼尼松龙对斑马鱼幼鱼骨矿化的影响

泼尼松龙组与阴性对照组斑马鱼茜素红染色显微成像见图 1, 与阴性对照组比,可见 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙组的茜素红染色面积和染色强度明显减少。

用专业图像软件计算的染色面积(骨矿化面积)和 IOD 见图 2 和图 3。与阴性对照组相比,低浓度泼尼松龙($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对斑马鱼骨矿化面积影响不明显,随着泼尼松龙浓度的增加,骨矿化面积呈显著降低趋势,当泼尼松龙浓度为 2.5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼骨骼矿化量与溶媒阴性对照组(0.5% DMSO)相比呈显著性降低($P<0.01$);当泼尼松龙浓度提高至 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,这种差异呈极显著性($P<0.001$)。提示 2.5~25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙可诱导斑马鱼骨骼矿化量显著降低,且呈浓度依赖性。泼尼松龙对 IOD 的影响与其对骨矿化面积的影响相似,随着泼尼松龙浓度的增加也呈现降低趋势。与阴性对照组相比,低浓度泼尼松龙组($2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 IOD 值有显著性降低($P<0.05$),当浓度增加 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,IOD 值显著性降低($P<0.01$),当浓度提高至 25

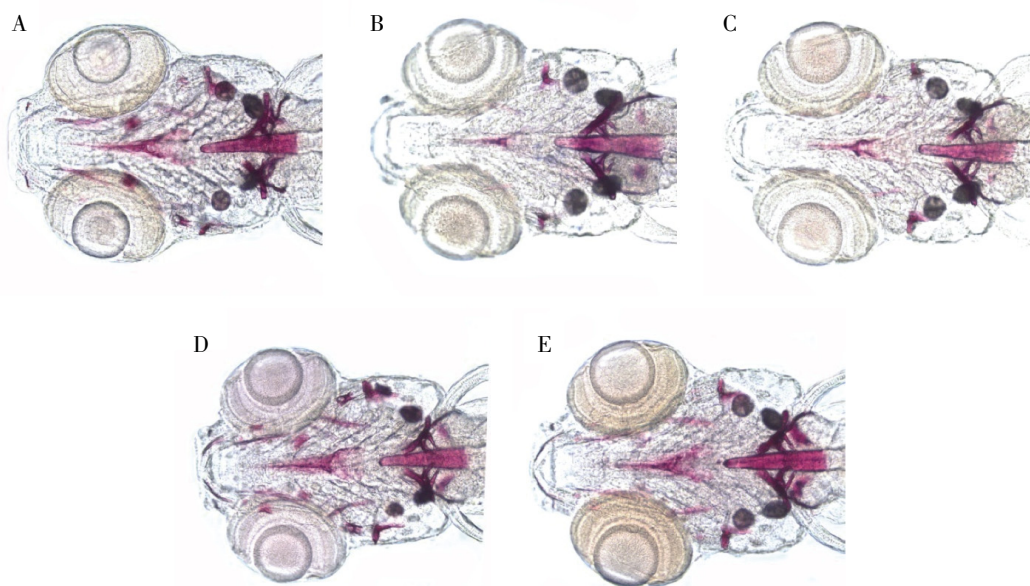


图 1 茜素红染色的斑马鱼幼鱼头骨

注:A. 0.5% DMSO 阴性对照组(9 d) B. $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙组 C. $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙组(9 d) D. $8.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲑鱼降钙素组(10 d) E. $30 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 依替膦酸二钠组(9 d)。

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, IOD 值的降低呈极显著性 ($P < 0.001$)。结果显示 $2.5 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙可诱使斑马鱼骨密度显著降低, 亦呈浓度依赖性。

3. 鲑鱼降钙素对泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松防治作用的结果

用图像分析软件计算的矿化面积和 IOD 的结果见图 4、5, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙模型组与 DMSO 组的矿化面积和 IOD 值存在极显著性差异 ($P < 0.001$), 提示泼尼松龙成功诱导斑马鱼骨质疏松。与泼尼松龙模型组比, 鲑鱼降钙素组随着药物浓度的增加, 矿化面积和 IOD 均呈增加的趋势, 鲑鱼降钙素浓度为 $0.83 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 矿化面积和 IOD 值显著性增加 ($P < 0.01$), 且在 $1.66 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲑鱼降钙素的矿化面积和 $8.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲑鱼降钙素 (图 1. D) 的 IOD 值极显著性增加 ($P < 0.001$), 提示鲑鱼降钙素可防止并扭转泼尼松龙诱导的斑马鱼骨量丢失。

4. 依替膦酸二钠对泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松防治作用的结果

用图像分析软件计算的矿化面积和 IOD 的结果见图 6、7, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 泼尼松龙模型组与 DMSO 组的矿化面积和 IOD 值存在显著性差异 ($P < 0.01$), 提示泼尼松龙成功诱导斑马鱼骨质疏松。与泼尼松龙模型组比, 依替膦酸二钠组随着药物依替膦酸二钠浓度的增加, 矿化面积和 IOD 均呈增加的趋势, 当依替膦酸二钠浓度为 $15, 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1. E) 时, 矿化面积和 IOD 值显著性增加 ($P < 0.01$), 提示依替膦酸二钠可防止并扭转泼尼松龙诱导的斑马鱼骨量丢失。

三、结 论

选择与哺乳动物具有相似骨化机制的幼斑马鱼造模, 灵敏度高, 且适于微孔板形式高通量筛选; 造模用药选择大鼠骨质疏松常用的模型药泼尼松龙; 茜素红通过与骨钙结合, 将骨组织染成红色, 非骨组织耳石部分则呈棕黑色, 图象分析软件可排除其它颜色干扰并仅针对红色染色面积进行定量分析, 以此来量化骨矿化面积, 并以 IOD 反应骨密度的大小, 从而将骨量的检测转化为可读性的客观、准确数据, 利于统计分析。选择临床常用的抗骨质疏松药鲑鱼降钙素、依替膦酸二钠检测斑马鱼骨质疏松模型可用于筛选防治骨质疏松的药物。

斑马鱼骨质疏松模型与经典的大鼠骨质疏松

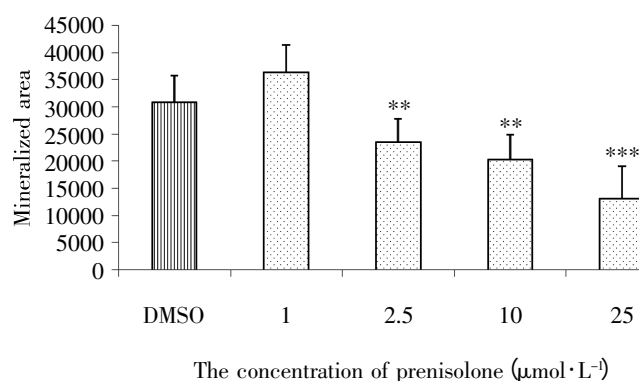


图2 斑马鱼幼鱼暴露于不同浓度泼尼松龙 (4~9 d) 的头骨茜素红染色面积

注: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

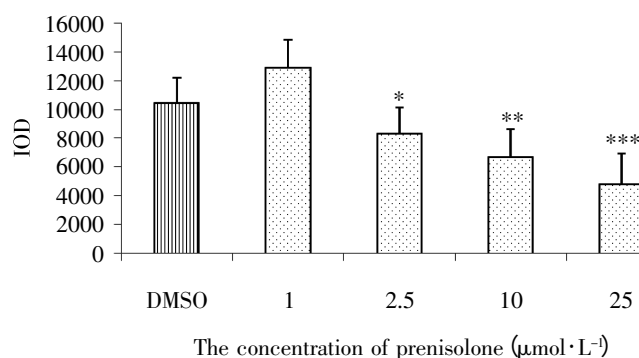


图3 斑马鱼暴露于不同浓度的泼尼松龙中 (4~9 d) 的头骨茜素红染色的累积光密度值

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

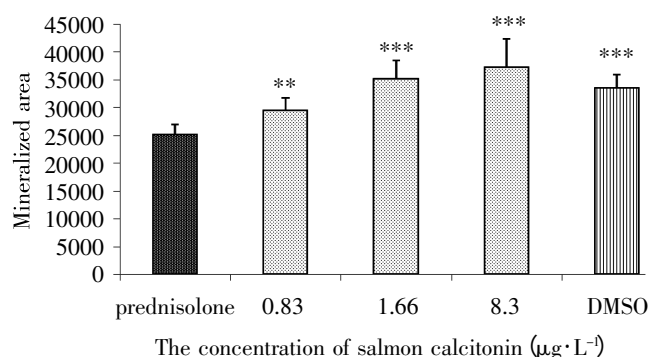


图4 斑马鱼幼鱼经泼尼松龙诱导 48 h 后暴露于鲑鱼降钙素中 (7~10 d) 的头骨茜素红染色矿化面积结果

注: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

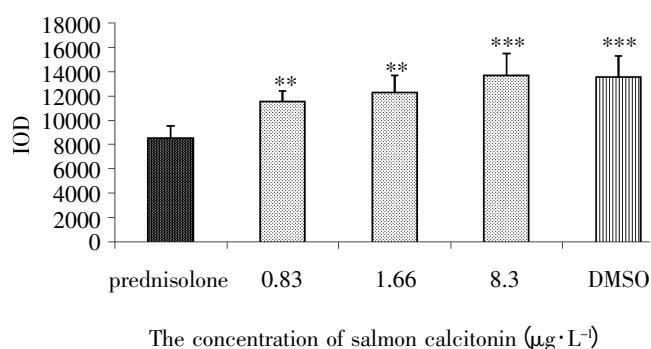


图5 斑马鱼幼鱼经泼尼松龙诱导48 h后暴露于鲑鱼降钙素中(7~10 d)的头骨茜素红染色的累积光密度(IOD)结果
注: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

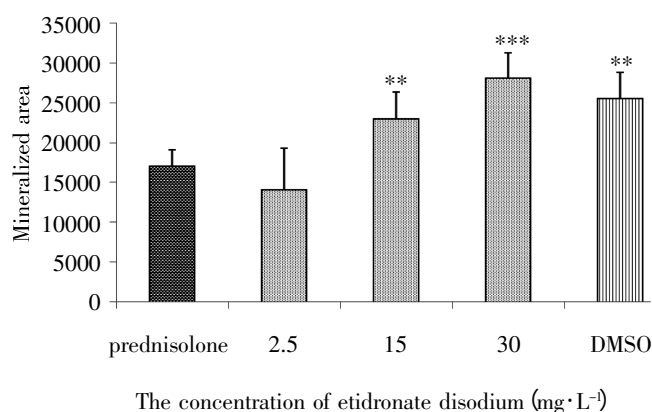


图6 斑马鱼幼鱼经泼尼松龙诱导48 h后暴露于依替磷酸二钠中(6~9 d)的头骨茜素红染色矿化骨骼面积结果
注: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

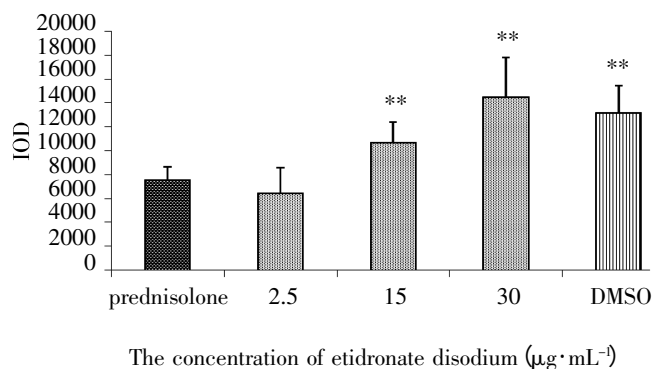


图7 斑马鱼幼鱼经泼尼松龙诱导48 h后暴露于依替磷酸二钠中(6~9 d)的头骨茜素红染色累积光密度(IOD)结果
注: ** $P<0.01$ 。

模型相比,具有实验强度小、用时短、高灵敏、用样量少的特点;此外该模型保持在体动物的完整性,较体外成骨和破骨细胞模型实验条件要求低、成本低,并克服体外实验作用环节单一,难以体现在体综合效应的缺陷。斑马鱼骨质疏松模型是一种简单的、高效的、灵敏的、高通量的新模型,有望为中药及其量微成分的壮骨效应的早期、快速评价提供新方法^[16]。

参考文献

- 张敏,孙付军,虞慧娟,等. 葛藤提取物对糖皮质激素骨质疏松模型大鼠的影响. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(7):589~592.
- 史传道,汶勇军,贾文鹏,等. 抗疏健骨颗粒对糖皮质激素骨质疏松大鼠骨密度和血清 il-6 的影响. 陕西中医学院学报, 2007, 30(5):63~65.
- 戴哲浩. 去卵巢、糖皮质激素、降钙素对雌性大鼠骨强度影响的实验研究. 长沙:中南大学, 2011.
- 吴波,徐冰,黄添友,等. 维 A 酸致大鼠骨质疏松模型与机理研究. 药理学, 1996, 31(4):241~245.
- Kari G, Rodeck U, Dicker A P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 82(1):70~80.
- Penberthy W T, Shafizadeh E, Lin S. The zebrafish as a model for human disease. *Front Biosci*, 2002, 7:d1439~1453.
- 李森. 地塞米松磷酸钠导致斑马鱼颅面部发育异常的研究. 华中科技大学博士学位论文, 2009.
- 李振华,Deepa A,徐燕玲,等. 斑马鱼:新型骨骼研究模式生物. 中药药理与临床, 2010, 26(3):67~71.
- Fleming A. High-throughput *in vivo* screening for bone anabolic compounds with zebrafish. *Journal of Biomolecular Screening*, 2005, 10(8):823~831.
- Li N, Felber K, Elks P, *et al.* Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation. *Dev Dyn*, 2009, 238(2):459~466.
- Brand M, Granato M, Nüsslein-Volhard C. Keeping and raising zebrafish. *Zebrafish*, 2002, 261:7~37.
- Lahnsteiner F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology*, 2008, 69(3):384~396.
- 甘静雯,邱绍扬,许忠能,等. 麻醉剂 MS-222 对斑马鱼行为的影响. 生态科学, 2006, 25(3):236~239.
- Kelly W L, Bryden M M. A modified differential stain for cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuses and small vertebrates. *Stain Technol*, 1983, 58(3):131~134.
- Walker M B, Kimmel C B. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech Histochem*, 2007, 82(1):23~28.
- 韦英杰,王长梅,詹扬,等. 基于模式生物斑马鱼创立中药壮骨效应评价新模型的思路与方法. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(2):196~200.

Zebrafish Model of Osteoporosis Induced by Prednisolone

Wang Changmei^{1, 2}, Wei Yingjie^{1, 2}, Jia Xiaobin^{1, 2}, Cai Xueting², Sun E², Song Jie²

(1. Department of Pharmaceutics, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Key Laboratory of Oral Drug Delivery System of Chinese Materia Medica of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

Abstract: Zebrafish was selected as model animal, and glucocorticoid prednisolone was used as a model compound to develop a rapid and high efficient osteoporosis novel model. A 5-day exposure was given to a series of prednisolone solutions with a range of concentration starting from either 4 days post fertilization (dpf) or 5 dpf. And 0.5% DMSO was selected as the negative solvent control group. All groups were incubated in 24-well plates (28.5°C). Zebrafish at 9 dpf or 10 dpf were stained with alizarin red. Quantitative analysis of the stained area was performed by microscopic inspection and digital imaging methods to reflect the amount of bone mineralization. And the results showed that the prednisolone group at the concentration of $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ can obviously decrease the staining area and the staining optical density values when compared with the negative solvent control group (0.5% DMSO), which suggested that prednisolone can significantly reduce the zebrafish mineralized bone and the bone mineral density. Therefore, osteoporosis model using zebrafish induced by prednisolone was successfully developed. In addition, zebrafish osteoporosis model was successfully used to verify the effect of salmon calcitonin and etidronate disodium in the prevention of osteoporosis.

Keywords: Zebrafish, prednisolone, osteoporosis, salmon calcitonin, etidronate disodium

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 王 晶)