

利用斑马鱼模型评价川续断皂苷 V 和 VI 的抗骨质疏松活性

王长梅¹, 景莉君^{1,2}, 韦英杰^{1,2*}, 贾晓斌¹

(¹中国中医科学院江苏分院 江苏省中医药研究院,南京 210028; ²南京中医药大学附属江苏省中西医结合医院,南京 210028)

摘要 为探讨斑马鱼模型评价中药微量成分在体抗骨质疏松活性的适用性与合理性,以25 μmol/L 泼尼松龙诱导的斑马鱼幼鱼骨质疏松模型考察川续断皂苷V和川续断皂苷VI抗骨质疏松活性。采用茜素红对斑马鱼幼鱼骨骼染色,并以显微检测、数码成像方法定量分析骨骼染色区域。结果25 μmol/L 泼尼松龙使斑马鱼骨量显著丢失,与模型组比较,川续断皂苷V和川续断皂苷VI及依替膦酸二钠阳性药均能阻止泼尼松龙诱导的斑马鱼骨量丢失,提示斑马鱼模型成功评价了微量川续断皂苷V和川续断皂苷VI的抗骨质疏松活性,具有在体化、微板化,简单、高效的特点。

关键词 斑马鱼;骨质疏松;川续断皂苷V;川续断皂苷VI;泼尼松龙

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2014)01–0088–04

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20140116

Evaluation of antiosteoporotic activity for micro-amount asperosaponins V and VI by on the osteoporosis model using zebrafish

WANG Changmei¹, JING Lijun^{1,2}, WEI Yingjie^{1,2*}, JIA Xiaobin¹

¹ Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Science, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; ² Nanjing University of Chinese Medicine, Affiliated Jiangsu Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract To explore the applicability and rationality of zebrafish model for the evaluation of *in vivo* anti-osteoporosis activity of micro-amount of components from traditional Chinese medicine, zebrafish larvae osteoporosis model induced by 25 μmol/L prednisolone was used to test the anti-osteoporosis activity of asperosaponins V and VI. Zebrafish bones were stained with alizarin red, and quantitative analysis of the stained area was performed by microscopic inspection and digital imaging methods to reflect the amount of zebrafish head skeleton mineralization. The results indicated that 25 μmol/L prednisolone could make zebrafish bone lose significantly, and that compared with the model group, asperosaponins V and VI and etidronate disodium could prevent such loss induced by prednisolone. The results suggested that zebrafish model could be used in evaluating anti-steoporosis activity of micro-amount of asperosaponins V and VI, which has advantages of being *in vivo*, micro plate, simple and highly efficient.

Key words zebrafish; osteoporosis; asperosaponin VI; asperosaponin V; prednisolone

This study was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2011866); the National Natural Science Foundation of China (No. 30973978); and the Foundation for High-Level Talent in Six Areas of Jiangsu Province (No. 2013-YY006).

骨质疏松是一种骨密度低、微结构退化、导致低创伤性骨折的风险增高的常见复杂疾病。我国采用中草药防治骨质疏松的历史已有千余年。但现有评价模型制约中药抗骨质疏松活性成分的高效

筛选。例如,传统在体动物实验存在工作强度大、耗时长、灵敏度低、用样量大等缺点,不利于微量成分的评价;体外细胞模型实验作用环节单一,难以体现在体综合效应。近年来斑马鱼作为药效和毒性筛选

* 收稿日期 2013-08-28 *通信作者 Tel:025–85637809 E-mail:wyj970@163.com

基金项目 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2011866);国家自然科学基金资助项目(No. 30973978);江苏省“六才人才高峰”资助项目(No. 2013-YY006)

模型得到广泛应用,斑马鱼骨骼的发育机制与哺乳动物具有高度同源性,为建立斑马鱼骨质疏松、骨关节炎等模型提供了生理及遗传学依据^[1-3]。本课题组前期借鉴 Fleming 等^[1-2]研究用地塞米松和泼尼松诱导并建立斑马鱼骨质疏松新模型,并用以验证依替膦酸二钠(etidronate disodium, ED)、鲑鱼降钙素的抗骨质疏松活性^[4-5]。该模型能否有效用于中药成分特别是微量成分的抗骨质疏松活性评价,对实现中药抗骨质疏松活性成分的高效筛选具有重要价值。

续断(*Dipsacus asper* Wall. ex Henry)是一种传统的抗骨质疏松中草药,对骨质疏松症防治有确切疗效,其中续断皂苷类成分是主要壮骨成分^[6],其主要皂苷川续断皂苷VI具有促进大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞增殖和分化的作用,增加骨形态发生蛋白-2(BMP-2)的合成来增加骨形成,并激活p38 和细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)信号转导通路^[7-8]。由于受化合物数量的限制,其他微量川续断皂苷的抗骨质疏松活性尚未明确。本文采用斑马鱼骨质疏松模型考察活性、机制明确的川续断皂苷VI和活性尚不明确的川续断皂苷V的活性,探讨该模型评价中药微量成分抗骨质疏松活性的合理性与适用性。

1 材 料

1.1 试 剂

川续断皂苷 VI 对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111685-200401),川续断皂苷 V 为作者从续断中分离、纯化得到,光谱数据与文献报道一致^[9-10],纯度经 HPLC-ELSD 检测大于 98% (结构式见图 1);依替膦酸二钠(中国药品生物制品检定所);泼尼松龙(苏州亚科化学试剂股份有限公司,批号 YK2012020101);二甲亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司);多聚甲醛(成都市科龙化工试剂厂,批号 20100504);MS-222(美国 Acros Organics 公司,批号 A0288328);茜素红 S(郑州四季化工产品有限公司);水为 Milli-Q system 高纯水(美国 Millipore 公司);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

Axioobserver. A1 荧光倒置显微镜(蔡司光学仪器国际贸易有限公司);SPX-80 生化培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);Image-Pro Plus 6.0 专业

图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)。

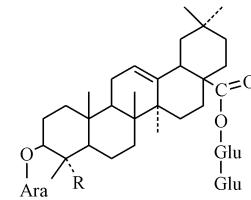


Figure 1 Structural formula of asperosaponin V ($R = \text{CH}_3$) and asperosaponin VI ($R = \text{CH}_2\text{OH}$)

1.3 动 物

斑马鱼成鱼由南京大学模式动物研究所提供,来自德国 tubingen 品系。

2 方 法

2.1 药物溶液的配制

泼尼松龙溶液配制:精密称取泼尼松龙 45.3 mg,加入 DMSO 6.5 mL,用培养基^[11]稀释并定容至 50 mL,即得 2.5 mmol/L 泼尼松龙储备液。临用前用培养基稀释 100 倍,即得 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 泼尼松龙溶液。

含泼尼松龙的川续断皂苷 VI (asperosaponin VI) 和川续断皂苷 V (asperosaponin V) 溶液配制:分别精密称取川续断皂苷 VI 2.32 mg 和川续断皂苷 V 2.28 mg,用适量 DMSO 溶解定容至 10 mL,分别得到 250 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 川续断皂苷 VI 和 V 储备液。取川续断皂苷 VI 和 V 储备液适量,各再加入 2.5 mmol/L 泼尼松龙储备液 100 μL 至 10 mL 量瓶,用培养基分别依次稀释配制成含 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 泼尼松龙的 0.008, 0.04, 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的川续断皂苷 VI 和 V 溶液。

含泼尼松龙的依替膦酸二钠溶液配制:精密称取依替膦酸二钠 15 mg,用超纯水溶解定容至 10 mL,即得 1 500 mg/L 的储备液。取上述依替膦酸二钠储备液适量,加入适量泼尼松龙储备液,并用培养基稀释配制成含 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 泼尼松龙的 30 mg/L 依替膦酸二钠溶液。

2.2 斑马鱼幼鱼的固定、骨骼染色与分析方法

斑马鱼的胚胎收集与培养、鱼龄选择、给药方式方法及其头部骨骼的茜素红染色方法参考前期研究^[4-5],在斑马鱼幼鱼培养至受精后 10 d(10 dpf),麻醉处死后用 4% 多聚甲醛固定后,采用 1% KOH 配制的含 3% H_2O_2 的漂白剂将幼鱼漂白至眼部色素清除后,采用茜素红对斑马鱼幼鱼头部骨骼染色,

再用梯度比分别为3:1、1:1、1:3的1% KOH 和甘油的混合溶液将幼鱼透明化,最后将幼鱼保存于纯甘油中。使用显微镜拍摄幼鱼头部腹面照,然后采用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 将幼鱼头部骨骼染色面积和累积光密度进行分析计算,以反映骨矿化量。

2.3 给药与数据处理

取受精后5天(5 dpf)的斑马鱼幼鱼分成5组置24孔板,每组2孔,每孔10条幼鱼,1组给予0.5% DMSO 阴性对照,其余4组给予25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙模型药,置于恒温培养箱中28.5 °C 培养,48 h 后,将其中3组模型药分别换为含25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙不同浓度川续断皂苷VI和川续断皂苷V溶液以及含25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙的30 mg/L 依替膦酸二钠溶液(阳性药物组),每个浓度组做3份,每天换药,培养至10 dpf;然后将各组斑马鱼按照“2.2”项下方法进行骨矿化量分析。用 EXCEL 软件计算平均值、标准偏差及变异系数($n=5 \sim 7$),*t*-test 比较各组差异。斑马鱼幼鱼体内卵黄囊含丰富的营养可供培养9~10 dpf 无需喂食。

3 结果

3.1 川续断皂苷VI对抗泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松的作用

与DMSO组相比,25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙模型组的矿化面积和累积光密度存在极显著性差异($P < 0.001$),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,30 mg/L 依替膦酸二钠(ED)可显著性阻止斑马鱼骨量丢失;川续断皂苷VI组随着川续断皂苷VI浓度的增加,矿化面积和IOD均呈增加的趋势,当川续断皂苷VI浓度为0.008 $\mu\text{mol/L}$ 和0.04 $\mu\text{mol/L}$ 时,矿化面积显著性增加($P < 0.05$),浓度增加至1 $\mu\text{mol/L}$ 时,矿化面积极显著性增加($P < 0.01$);累积光密度在川续断皂苷VI浓度为0.04 $\mu\text{mol/L}$ (图2)和1 $\mu\text{mol/L}$ 时均呈极显著性增加,提示川续断皂苷VI可防止并阻止泼尼松龙诱导的斑马鱼骨量丢失。结果见图3。

3.2 川续断皂苷V对泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松的作用

与DMSO组相比,25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙模型组的矿化面积和累积光密度存在极显著性差异($P < 0.001$),提示泼尼松龙成功诱导斑马鱼骨质疏松。

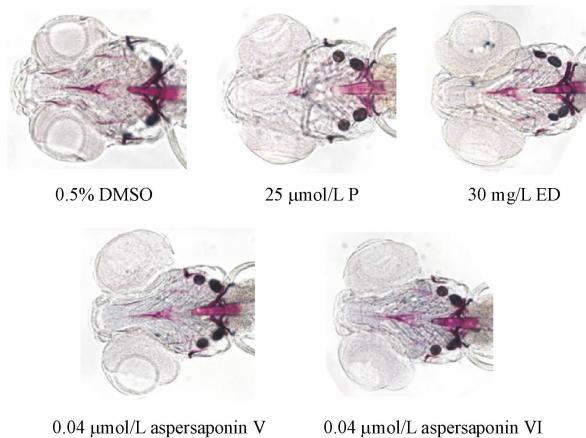


Figure 2 Ventral view of zebrafish treated with 0.5% DMSO, 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone (P), 30 mg/L etidronate disodium (ED), 0.04 $\mu\text{mol/L}$ asperosaponin V and 0.04 $\mu\text{mol/L}$ asperosaponin VI in the presence of 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone

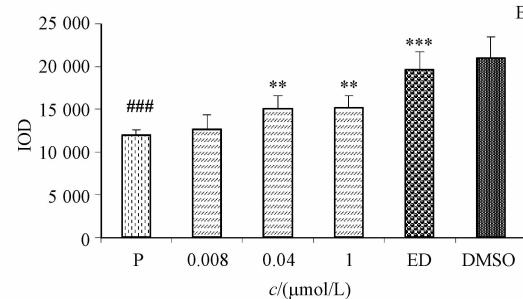
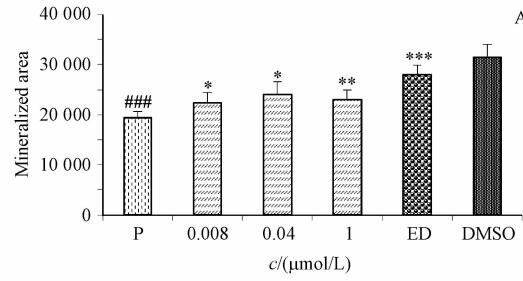


Figure 3 Effect of asperosaponin VI on mineralized area (A) and integrated optical density (IOD) (B) of zebrafish larval Zebrafish larval treated with asperosaponin VI from 7 dpf to 10 dpf, following 48 h exposure to 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisone alone, at 10 dpf larval was fixed and stained with alizarin red

$P < 0.001$ vs 0.5% DMSO control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisone group

与泼尼松龙模型组比,30 mg/L ED 可显著性阻止斑马鱼骨量丢失;川续断皂苷V 在 0.008 $\mu\text{mol/L}$ 时,鱼矿化面积显著增加($P < 0.05$),当浓度增加到 0.04 $\mu\text{mol/L}$ 时,矿化面积和IOD 均低于 0.04 $\mu\text{mol/L}$ 川续断皂苷V,但仍呈显著性($P < 0.05$),说明川

续断皂苷V可防止并阻止泼尼松龙诱导的斑马鱼骨量丢失。结果见图4。

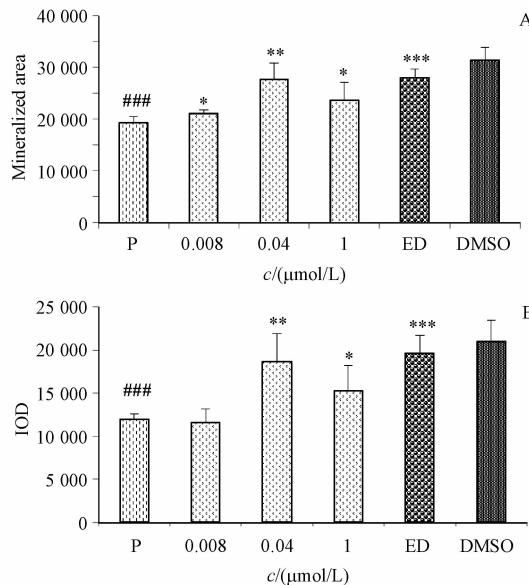


Figure 4 Effect of asperosaponin V on mineralized area (A) and IOD (B) of zebrafish larval

Zebrafish larval treated with asperosaponin V from 7 dpf to 10 dpf, following 48 h exposure to 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ prednisone alone, at 10 dpf larval was fixed and stained with alizarin red

$P < 0.001$ vs 0.5% DMSO control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ prednisone group

4 讨 论

斑马鱼幼鱼头骨发育包含骨形成和骨吸收的较完整体系^[1], 斑马鱼骨质疏松模型是一种介于单细胞和整体哺乳动物之间的在体模式动物模型, 可作为细胞实验和常规动物实验评价之间的桥梁, 体积小而有完整骨骼, 可实现微量成分的在体、微板形式的高效评价。这对开发我国丰富的中药资源, 尤其是从某些微量成分中发现结构新颖、活性独特的抗骨质疏松先导化合物具有重要意义, 值得进一步研究和推广。

本研究用该模型评价了作用与机制研究相对明确的川续断皂苷VI的抗骨质疏松活性, 结果与现有大鼠骨质疏松模型和细胞模型报道的结论具一致性^[7-8], 在此基础上, 进一步应用该模型成功评价了作用与机制尚不明确的川续断皂苷V的抗骨质疏松活性, 提示该模型用于中药微量成分抗骨质疏松评价具可行性与合理性。进一步对川续断皂苷VI和川续断皂苷V的抗斑马鱼骨质疏松作用进

行了比较, 在 0.04 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度时, 与川续断皂苷VI相比, 川续断皂苷V对斑马鱼 IOD 的影响有显著性增加作用($P < 0.05$), 提示斑马鱼骨质疏松模型有望用于微量成分抗骨质疏松活性的构效关系研究。

参 考 文 献

- Fleming A, Sato M, Goldsmith P. High-throughput *in vivo* screening for bone anabolic compounds with zebrafish [J]. *J Biomol Screen*, 2005, **10**(8):823–831.
- Barrett R, Chappell C, Quick M, et al. A rapid, high content, *in vivo* model of glucocorticoid - induced osteoporosis[J]. *Biotechnol J*, 2006, **1**(6):651 – 655.
- Kim SN, Bae SJ, Kwak HB, et al. *In vitro* and *in vivo* osteogenic activity of licochalcone A[J]. *Amino Acids*, 2012, **42**(4):1455 – 1465.
- Wei YJ, Wang CM, Cai XT, et al. Establishment of zebrafish osteopenia model induced by dexamethasone [J]. *Acta Pharm Sin(药学学报)*, 2013, **48**(2):255 – 260.
- Wang CM, Wei YJ, Jia XB, et al. The zebrafish model of osteoporosis induced by prednisolone[J]. *World Sci Tech-Modern Trad Chin Med(世界科学技术-中医药现代化)*, 2013, **15**(3):509 – 514.
- Wei YJ, Jia XB, Fan HW, et al. Chromatographic fingerprint of *Dipsacus asper* and analysis by HPLC-MS [J]. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2011, **36**(2):169 – 174.
- Wu MS, Zhao SZ, Ren LZ, et al. Experimental study of akebia saponin D on the differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells to osteoblasts *in vitro* via induction [J]. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)*, 2012, **28**(2):222 – 226.
- Niu Y, Li Y, Huang H, et al. Asperosaponin VI, a saponin component from *Dipsacus asper* Wall, induces osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway [J]. *Phytother Res*, 2011, **25**(11):1700 – 1706.
- Zhang YW, Xue Z. Studies on the chemical constituents of *Dipsacus asper* Wall[J]. *Acta Pharm Sin(药学学报)*, 1991, **26**(9):676 – 681.
- Zhang YW, Xue Z. New triterpenoid glycosides from *Dipsacus asper* Wall[J]. *Acta Pharm Sin(药学学报)*, 1991, **26**(12):911 – 917.
- Brand M, Granato M, Nusslein-Volhard C. Keeping and raising zebrafish [M]//Nusslein-Volhard C, Dahm, R. *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 2002: 7 – 37.