

相同摩尔浓度下淫羊藿苷及朝藿定 C 单体在斑马鱼骨质疏松模型中的活性研究

黄 觅^{1,2} 冯 晶¹ 钟再选³ 何舜平³ 舒玉琴³ 贺江燕³ 王 瑛²

摘要 目的 用泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型评价相同摩尔浓度下淫羊藿苷和朝藿定 C 单体的抗斑马鱼骨质疏松作用。**方法** 将受精后 4 日的斑马鱼胚胎分为 S 组(0.5%二甲亚砜 DMSO)、A 组(泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO)、B 组(2 IU/L 鲑降钙素, 泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO)、C 组(淫羊藿苷 1.5 $\mu\text{mol/L}$, 泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO)、D 组(淫羊藿苷 15 $\mu\text{mol/L}$, 泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO)、E 组(淫羊藿苷 150 $\mu\text{mol/L}$, 泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO)、F 组(朝藿定 C 1.5 $\mu\text{mol/L}$, 泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO)、G 组(朝藿定 C 15 $\mu\text{mol/L}$, 泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO)、H 组(朝藿定 C 150 $\mu\text{mol/L}$, 泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO)。所有培养液均含有 0.5% DMSO。将各组幼鱼放置与 24 孔板中, 每日更换培养液, 在恒温环境 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 培养至第 9 天处死, 以茜素红染色。用显微镜对斑马鱼颅骨腹侧进行观察, 定量分析将成像染色区域。**结果** 与 S 组比较, A 组骨矿化累计光密度值降低($P < 0.01$); B 组骨矿化累计光密度值升高($P < 0.01$)。而 C、D、E 组随浓度增加矿化面积呈微弱的递增趋势($P < 0.05$)。与 A 组比较, B 组累计光密度值增高明显, 差异有统计学意义($P < 0.01$), C、D 组差异无统计学意义($P > 0.05$), 而 E 组明显升高($P < 0.05$)。F、G 组随浓度增加, 矿化面积呈递增趋势, 颅骨染色累计光密度值升高($P < 0.05$), H 组内斑马鱼胚胎无存活。E、F、G 组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。S 组斑马鱼头颅骨染色清晰, 脊椎骨及两旁鳃骨染色清晰。A 组在相同染色区域的强度明显减少。B 组在相同条件下呈现骨组织成骨加快, 矿化面积明显增多, 骨组织深染等特点。C、D、E、F、G 组, 在染色中颅骨矿化程度逐渐增加, 椎骨及两侧鳃骨矿化面积及染色强度递增, 以椎骨改变最为显著, 但均未达到 B 组的染色强度。**结论** 斑马鱼骨质疏松模型是一种简单、高效的中药成分筛选模型, 低浓度朝藿定 C 在该模型中的活性优于淫羊藿苷, 高浓度朝藿定 C 的可能毒性作用还需要深入研究。

关键词 斑马鱼; 淫羊藿苷; 朝藿定 C; 鲑降钙素; 泼尼松龙; 骨质疏松

Activity Study of Icaritin and Epimedin C Monomer under the Same Molarity in Osteoporosis Zebrafish Model HUANG Mi^{1,2}, FENG Jing¹, ZHONG Zai-xuan³, HE Shun-ping³, SHU Yu-qin³, HE Jiang-yan³, and WANG Ying² 1 Department of Orthopedics, Wuhan First Hospital, Wuhan (430022); 2 Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou (510650); 3 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan (430072)

ABSTRACT Objective To evaluate anti-osteoporotic activity of icaritin and Epimedin C monomer under the same molarity in prednisolone-induced osteoporosis zebrafish. **Methods** Zebrafish larvae after 4-day fertilization were divided into group S [0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO)], A (25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone, 0.5% DMSO), B (2 IU/L salmon calcitonin, 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone, 0.5% DMSO), C (1.5 $\mu\text{mol/L}$ icaritin, 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone, 0.5% DMSO), D (15 $\mu\text{mol/L}$ icaritin, 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone, 0.5% DMSO), E (150 $\mu\text{mol/L}$ icaritin, 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone, 0.5% DMSO), F (1.5 $\mu\text{mol/L}$ Epimedin C,

基金项目: 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室开放课题; 武汉市卫计委课题(No. WX16C40)

作者单位: 1. 武汉市第一医院骨科(武汉 430022); 2. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与利用重点实验室, 广东省应用植物学重点实验室(广州 510650); 3. 中国科学院水生生物研究所(武汉 430072)

通讯作者: 王 瑛, Tel: 137097038842, E-mail: yingwang@scib.ac.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2016.08.0986

25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone, 0.5% DMSO), G (15 $\mu\text{mol/L}$ Epimedin C, 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone, 0.5% DMSO), H (150 $\mu\text{mol/L}$ Epimedin C, 25 $\mu\text{mol/L}$ prednisolone, 0.5% DMSO). All culture solution contained 0.5% DMSO. All the young fishes were grown in a 24-well plate. The culture medium was changed every day. They were cultured in a incubator box at 28.5 $^{\circ}\text{C}$ and killed at day 9. Zebrafish skeleton was stained with alizarin red. The stained Zebrafish ventral skull was observed using microscope, and mineralized area was quantitatively analyzed. Results Compared with group S, accumulative integrated optical density (IOD) of the mineralized area significantly decreased in group A ($P < 0.01$); accumulative IOD of the mineralized area significantly increased in group B ($P < 0.01$). The accumulative IOD of the mineralized area showed weakly increasing tendency in group C, D, and E along with increased concentration ($P < 0.05$). Compared with group A, accumulative IOD obviously increased in group B with statistical difference ($P < 0.01$), but with no statistical difference as compared with group C or group D ($P > 0.05$). Statistical difference existed in accumulative IOD between group A and group E ($P < 0.05$). The mineralized area showed increasing tendency in group F and group G along with increased concentration ($P < 0.05$), and accumulative IOD obviously increased as well ($P < 0.05$). No Zebrafish embryo survived in group H. There was no statistical difference in Zebrafish embryo survival among group E, F, or G ($P > 0.05$). The staining of Zebrafish skull was clearly seen in group S, with vertebrae and bilateral branchial skeleton clearly seen. The intensity of staining in the same area was obviously attenuated in group A. The osteogenesis was speeded up under the same condition in group B, with obviously enlarged mineralized area and more darkly stained bone tissue. The mineralization of skull was gradually increasing during the staining process in group C, D, E, F, and G. The mineralized area and the intensity of staining were gradually enhanced, and changes of vertebrae were most obviously seen in group C, D, E, F, and G, but they were not arrived at the stained intensity level in group B. Conclusions Osteoporosis Zebrafish model is a simple and efficient model for screening bioactive ingredients of Chinese herbs. The activity of Epimedin C at low concentration was better than icariin in this model. But possible toxicity of Epimedin C at high concentration needs to be further studied.

KEYWORDS Zebrafish; icariin; Epimedin C; salmon calcitonin; prednisolone; osteoporosis

骨质疏松症是一种骨密度及骨质量减少,骨强度下降导致骨折风险升高的骨骼疾病。随着我国社会老龄化进程加快,脆性骨折的患病率逐年升高,时刻威胁着越来越多的中老年人的健康。我国传统中草药防治骨质疏松的历史由来已久,特别是传统中草药淫羊藿,其抗骨质疏松作用已被广泛应用于临床^[1]。草药淫羊藿的主要成分中以淫羊藿苷及朝藿定 C 单体的含量较高,但因其产地及品种的差异,单体成分含量的不同,不利于药效的控制^[2]。与此同时,我国中草药传统的动物实验模式耗时长、费用高、实验强度大、无法进行高通量的微量成分筛选及评价。斑马鱼因其与哺乳动物基因具有高度同源性,近年来逐渐成为药效及毒性筛选的研究热点^[3]。本研究结合斑马鱼药物筛选模型的优势,对淫羊藿提纯后的单体进行药效研究,旨在完善斑马鱼骨质疏松模型,了解中草药淫羊藿主要成分淫羊藿苷及朝藿定 C 的抗骨质疏松活性。

材料与方法

1 动物 斑马鱼胚胎(3 日)135 个,国家斑马鱼

资源中心,AB 系。

2 试剂 淫羊藿苷(成都普思生物科技有限公司,批号:PS13012801),朝藿定 C(成都普思生物科技有限公司,批号:PS09070601),鲑降钙素注射液(美国诺华公司,批号:S0239);泼尼松龙(大连美仑生物技术有限公司,批号:MB1191),二甲亚砜(DMSO,上海生工生物工程有限公司,批号: SJ1029B10012J),多聚甲醛(Sigma,批号: 81980),茜素红 S(生工生物工程股份有限公司,批号:LJ0221B2413J),高纯水(LBCONCO),卵水(含 0.006%的海盐),KOH 等其他分析纯试剂。

3 仪器 荧光显微镜(OLYMPUS-SZX16),成像软件(DP controller),恒温培养箱(Ruihua-HP150 S,武汉瑞华仪器设备有限公司),搅拌器(IKARR-CMAG HS4),分析天平(METTLER TOLEDO-AL104),图像分析软件 Image pro plus 6.0 (IPP)(Media Cybernetics)。

4 药物卵水培养液配制 以含有 0.006%海盐,

1 ppm 亚甲蓝的卵水配置各组培养液。各组溶液配置如下:溶液 S:0.5% DMSO (S 组);溶液 A:泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO (A 组);溶液 B:2 IU/L 鲑降钙素,泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO (B 组);溶液 C:淫羊藿苷 1.5 $\mu\text{mol/L}$,泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO (C 组);溶液 D:淫羊藿苷 15 $\mu\text{mol/L}$,泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO (D 组);溶液 E:淫羊藿苷 150 $\mu\text{mol/L}$,泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO (E 组);溶液 F:朝藿定 C 1.5 $\mu\text{mol/L}$,泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO (F 组);溶液 G:朝藿定 C 15 $\mu\text{mol/L}$,泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO (G 组);溶液 H:朝藿定 C 150 $\mu\text{mol/L}$,泼尼松龙 25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5% DMSO (H 组)。

5 饲养及给药方法 成功取卵后,人工挑选受精后第 3 日已破膜、发育正常的斑马鱼胚胎放入 24 孔培养板中,每 5 条为放入 1 孔内,3 孔为 1 组,每孔内给予卵水 1.5 mL,第 4 日开始每日定时更换预先配置好的各组培养液,每次更换培养液 1 mL,无需添加其他食物。将培养板置入 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,培养至第 9 日处死。

6 斑马鱼胚胎观察 25 $^{\circ}\text{C}$ 常温下将处死后的斑马鱼胚胎放入 4% 的多聚甲醛缓冲液中固定 4 h,洗净后加入无水甲醇脱水 24 h。以含 0.5% 氢氧化钾及 3% 的过氧化氢溶液浸泡,并置于摇床上进行脱色处理约 10 min,至斑马鱼表面色斑完全褪去。以 0.5% 氢氧化钾冲洗干净,分组放入含有 1% 氢氧化钾的茜素红 S 染色剂中染色 1 h^[4]。再次以 0.5% 氢氧化钾冲洗,洗净后将斑马鱼胚胎分组置于装有甘油的培养皿中比较。

7 图像分析 荧光显微镜观察每组斑马鱼头骨腹面,并以 DP controller 软件在手动模式下白平衡,iso:800,exposure:1/100,放大 250 倍下进行图像采集。用专业图像软件 IPP 对斑马鱼头骨染色区域的累积光密度进行采集分析,量化斑马鱼胚胎的骨矿化程度。

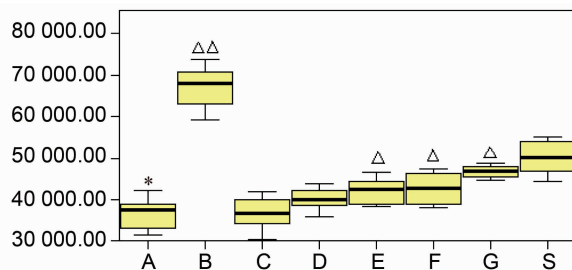
8 统计学方法 用 SPSS 统计学软件进行统计学分析,独立样本 Kruskal-Wallis 检验。

结 果

各组斑马鱼骨质疏松情况比较(图 1、2)。与 S 组比较,A 组骨矿化累计光密度值降低($P < 0.01$);B 组骨矿化累计光密度值升高($P < 0.01$)。而 C、D、E 组随浓度增加矿化面积呈微弱的递增趋势($P < 0.05$)。与 A 组比较,B 组累计光密度值增高明显 ($P < 0.01$),E、

F、G 组随浓度增加,矿化面积呈递增趋势,颅骨染色累计光密度值升高($P < 0.05$),C、D 组差异无统计学意义($P > 0.05$),H 组内斑马鱼胚胎无存活。E、F、G 组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

S 组斑马鱼头颅骨染色清晰,脊椎骨及两旁鳃骨染色清晰(图 2S)。而 A 组在相同染色区域及强度明显减少(图 2A)。B 组在相同条件下呈现骨组织成骨加快,矿化面积明显增多,骨组织深染等特点(图 2B)。C、D、E、F、G 组,在染色中颅骨矿化程度逐渐增加,椎骨及两侧鳃骨矿化面积及染色强度递增,以椎骨改变最为显著,但均未达到 B 组的染色强度。



注:与 S 组比较,* $P < 0.01$;与 A 组比较, $\Delta P < 0.05$,
 $\Delta\Delta P < 0.01$

图 1 各组斑马鱼骨矿化累计光密度值比较

讨 论

骨质疏松症是一种常见的全身性骨代谢疾病,我国中医药在治疗骨质疏松方面以“补肾壮骨”为理论基础,传统中药淫羊藿广泛用于中成药制剂中,应用于临床多年,疗效显著^[5,6]。但对于其药物学成分及其机理的研究略显不足,目前对中药研究中,由于传统动物模型的局限性,研究主要针对复合制剂的抗骨质疏松药物活性,而对于其单体成分的研究较少;另外,部分学者利用分子生物学技术对细胞进行体外培养,研究其代谢及基因表达等方面取得了一定的进展^[7]。但却无法观察到药物对生物整体结构药性作用。2005 年 Fleming A 首次报道用不同药物培养基对斑马鱼进行饲养,观察不同时期斑马鱼颅骨染色的变化,建立了斑马鱼骨质疏松及药物筛选模型^[8]。因斑马鱼基因与人类基因有高度同源性,在药物疗效筛选方面优势明显,成为世界范围内被广泛认可的实验鱼类^[9-11]。近年来,随着我国对该项技术的引入,并逐步将其应用于传统中药药效成分的筛选中。韦英杰等^[12]以验证了糖皮质激素泼尼松龙及地塞米松建模的可重复性,并在一定范围内斑马鱼的骨密度降低与激素剂量呈浓度依赖性。随后詹扬等^[13]应用该模型

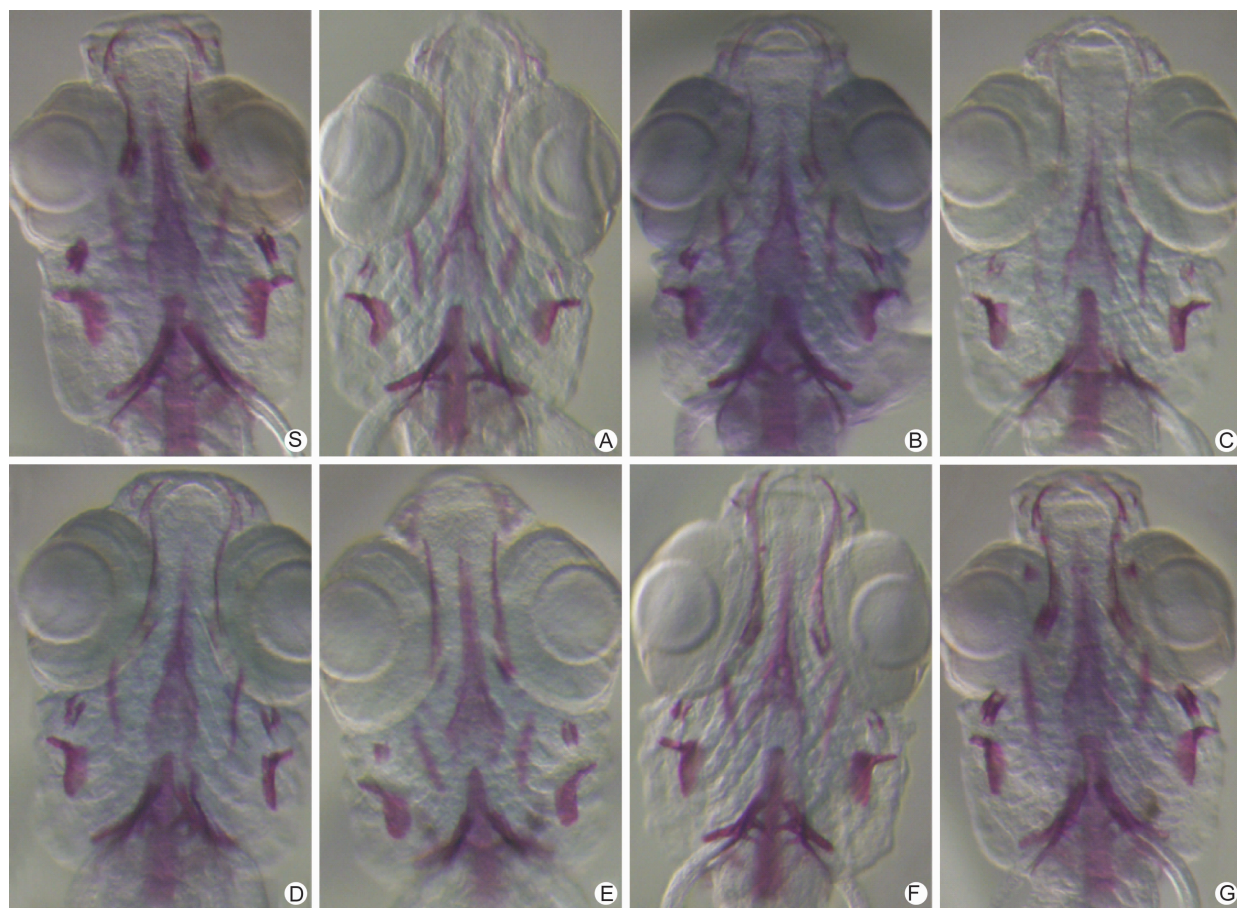


图 2 各组斑马鱼颅骨染色图 (茜素红染色, $\times 250$)

成功的对淫羊藿部分微量成分进行抗骨质疏松活性的评价。随着国内外对高通量筛选鱼类的研究及斑马鱼骨质疏松模型的完善,将会在中药成分筛选和毒性研究中得到进一步的推广和应用。

淫羊藿在中医学临床上的应用在历代中药名典中均有记载。近年来,通过现代分子生物学等技术的大量研究发现,该药物的类雌激素作用具有促骨合成,并抑制破骨细胞作用^[14]。更深入的研究发现,淫羊藿的主要单体成分均具有促进体外培养的成骨细胞增殖和矿化作用,其中以淫羊藿苷及朝藿定 C 的作用较强^[15-17]。

本次研究利用斑马鱼模型对淫羊藿苷及朝藿定 C 单体在相同摩尔浓度下进行抗骨质疏松药效的研究,结果显示淫羊藿苷在 $150 \mu\text{mol/L}$ 浓度下产生显著的抗骨质疏松作用,可对抗 $25 \mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙诱导的骨质疏松,而低浓度的淫羊藿苷无明显作用。朝藿定 C 在 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 浓度下可达到相同作用,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。而当朝藿定 C 浓度提高到 $15 \mu\text{mol/L}$ 时,并未显著提药物疗效,F 组和 G 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示仅在低浓度

下,朝藿定 C 即可对抗 $25 \mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙诱导的骨质疏松,随着浓度的提高,并未对斑马鱼颅骨矿化程度产生明显影响,而更高浓度可能产生致死性的毒性作用。虽然 E 组、F 组及 G 组均可对抗泼尼松龙诱导的骨质疏松,但在 3 组间,其累积光密度反应的矿化能力却未呈现显著性差异($P > 0.05$)。因此,在相同条件下,选择较低浓度的朝藿定 C 单体可能得到更经济,更安全的抗骨质疏松疗效。

因此,在本研究的斑马鱼模型中,相同摩尔浓度下,朝藿定 C 的药物活性高于淫羊藿苷。但是,在高浓度的朝藿定 C 培养基饲养条件下,H 组斑马鱼胚胎全部死亡,说明高浓度的朝藿定 C 可能具有致死性毒性作用,该潜在的毒性作用还需要深入研究和确认。由于我国传统中药淫羊藿的产地及单体成分的含量差别较大,尚无统一的药效衡量标准,本次研究对于今后淫羊藿产地及品种筛选具有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 张庆涛,张茜,杨柳,等. 骨质疏松症及相关中药淫羊藿研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(15):

2767-2769.

- [2] 吴海洋, 索欢, 王平. 绝经后骨质疏松症的临床中药治疗进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(2): 241-244.
- [3] 许冰洁, 张立将, 李春启, 等. 斑马鱼胚胎评价 5 种药物的发育毒性与模型验证[J]. 中国药理学报, 2016, 32(1): 74-79.
- [4] Kimmel CB, DeLaurier A, Ullmann B, et al. Modes of developmental outgrowth and shaping of a craniofacial bone in Zebrafish [J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9475.
- [5] 邢燕, 毕宏焱, 尹丽梅, 等. 中医药治疗骨质疏松症的进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(12): 1115-1118.
- [6] 徐洁, 王敏智, 车玉梅, 等. 中药有效成分治疗骨质疏松症的基础研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(4): 503-506.
- [7] 韩晨露, 赵勇, 李卫国. 髓源性抑制细胞的体外诱导及其应用[J]. 中国医药生物技术, 2016, 11(1): 52-57.
- [8] Fleming A. High-throughput *in vivo* screening for bone anabolic compounds with Zebrafish [J]. J Biomolec Screening, 2005, 10(8): 823-831.
- [9] Padilla S, Corum D, Padnos B, et al. Zebrafish developmental screening of the Tox Cast (TM) phase 1 chemical library [J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(2): 174-187.
- [10] Yu L, Chen M, Liu Y, et al. Thyroid endocrine disruption in Zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole [J]. Aquat Toxicol, 2013, 138-139: 35-42.
- [11] Han LW, Yuan YQ, He QX, et al. Adaptability of Zebrafish model in activity screening of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2011, 42(10): 2037-2041.
- [12] 韦英杰, 王长梅, 蔡雪婷, 等. 地塞米松影响骨骼发育的斑马鱼模型的建立[J]. 药理学报, 2013, 48(2): 255-260.
- [13] 詹扬, 韦英杰, 王长梅, 等. 基于斑马鱼模型评价微量淫羊藿苷和朝藿定 B 的抗骨质疏松活性[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(1): 30-35.
- [14] 曹春雨, 刘婷, 回练强, 等. 黔岭淫羊藿总黄酮类成分对去势雌性大鼠骨质疏松症的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1913-1917.
- [15] Liu TZ, Chen CY, Yin SJ, et al. Molecular mechanism of cell cycle blockage of hepatoma SK-Hep-1 cells by epimedin C through suppression of mitogen-activated protein kinase activation and increased expression of CDK inhibitors p21C ip1 and p27K ip1 [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(2): 227-235.
- [16] Meng FH, Li YB, Xiong ZL, et al. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim [J]. Phytomedicine, 2005, 12(3): 189-293.
- [17] 文斌, 郭宝林, 陈雪梅, 等. 朝藿定 C 对骨质疏松模型小鼠骨组织形态学的影响[J]. 中国骨肿瘤骨病, 2011, 10(4): 393-396.

(收稿: 2015-07-06 修回: 2016-05-13)

《中国中西医结合杂志》荣获中国科协精品科技期刊项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目实施方案(2015—2017)》, 通过项目申报, 资格审查及专家评审, 分别评选出精品科技期刊 TOP50 项目 50 项, 学术质量提升项目 120 项, 数字出版建设项目 11 项, 集群(联盟)建设项目 11 项, 出版人才培养项目 2 项, 精品科普期刊项目 5 项, 共 199 项。《中国中西医结合杂志》进入 TOP50 项目。