

氨基葡萄糖盐酸盐及其衍生物对斑马鱼骨骼损伤修复的比较研究

张文娟¹, 许璟瑾¹, 姚丽云¹, 李秀敏¹, 潘裕添¹, 薛钰^{1,2*}

(1. 闽南师范大学福建省菌类活性物质工程技术研究中心, 福建 漳州 363000;

2. 膜生物学国家重点实验室, 北京 100101)

【摘要】 目的 探究氨基葡萄糖盐酸盐(glucosamine hydrochloride, GAH)及其结构相似的衍生物对斑马鱼骨骼损伤的修复作用, 并比较 GAH 与阿仑膦酸钠片对骨骼损伤的预防效果。**方法** 将斑马鱼胚胎暴露在相同浓度下(0.1%, 1 mg/mL)的 GAH、葡萄糖、甘露醇、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺溶液中, 观察其对胚胎发育的影响。将枸橼酸铁铵(ferric ammonium citrate, FAC)诱导的骨质疏松症斑马鱼幼鱼暴露在 0.1% 的 GAH、葡萄糖、甘露醇、半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺溶液中, 利用茜素红、阿尔新蓝染色法观察骨骼的修复状况。同时, 通过茜素红染色法比较 GAH 与阿仑膦酸钠片(alendronate sodium, AL)对骨质疏松的预防作用。**结果** 相同浓度的不同药物对斑马鱼发育影响的大小依次为葡萄糖 < 甘露醇 < GAH < N-乙酰葡萄糖胺 < 半乳糖; 染色结果表明, 与其他药物相比, GAH 对斑马鱼骨骼损伤的修复有显著性差异, 且对骨骼损伤的预防作用比 AL 更好。**结论** GAH 对斑马鱼骨骼损伤的修复有更好的治疗效果, 且对骨质疏松有一定预防作用。同时本研究为斑马鱼模型在天然骨质疏松药物的筛选和产品开发的应用提供了研究基础和思路。

【关键词】 氨基葡萄糖盐酸盐; 糖类衍生物; 骨骼修复; 骨骼染色

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018)12-0009-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.002

Comparison of the effect of glucosamine hydrochloride and its derivatives on the skeletal repair in zebrafish

ZHANG Wenjuan¹, XU Jingjin¹, YAO Liyun¹, LI Xiumin¹, Pan Yutian¹, XUE Yu^{1,2*}

(1. Fujian Engineering Technology Research Center of Mushroom Industry, Minnan Normal University,

Zhangzhou 363000, China; 2. State Key Laboratory of Membrane Biology, Beijing 100101)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to explore the reparative effects of glucosamine hydrochloride (GAH) and its derivatives on skeletal damage in zebrafish, and compare the preventive effects of GAH and alendronate sodium (AL), a drug known to be effective against osteoporosis. **Methods** Zebrafish embryos were exposed to various agents (GAH, glucose, mannitol, galactose, and acetylglucosamine) at the same concentration (0.1%, 1 mg/mL), and the mortality and phenotype were analyzed. Furthermore, a zebrafish model of osteoporosis induced by ferric ammonium citrate (FAC) was treated with the above agents to assess their reparative effects on the damaged skeleton examined using alizarin red and alcian blue staining. We also compared the preventive effects of GAH and AL on osteoporosis zebrafish.

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金(31501174); 2017 年福建省高校杰出青年科研人才培养计划项目; 福建省自然科学基金(2015J05070); 福建省教育厅科技项目(JA15306)。

【作者简介】 张文娟(1991—), 女, 硕士, 研究方向: 化学生物学。E-mail: zhwenjuan1106@163.com

【通信作者】 薛钰(1986—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 细胞与发育生物学。E-mail: xueyu0614@163.com

Results After treatment with GAH and its derivatives, the trend of their effects on embryonic development was glucose < mannitol < GAH < acetylglucosamine < galactose. Skeletal staining showed that GAH had the optimal reparative effect on FAC-induced osteoporosis in zebrafish and a better preventive effect than AL on FAC-induced skeletal damage.

Conclusions Compared with other agents, GAH has an excellent reparative effect on zebrafish bone damage and a good preventive effect on osteoporosis in zebrafish. This study provides the foundation and approaches for screening of natural anti-osteoporosis drugs and product development using the zebrafish model.

[Keywords] glucosamine hydrochloride (GAH); GAH derivatives; skeletal repair; skeletal staining

氨基葡萄糖盐酸盐 (glucosamine hydrochloride, GAH) 又名葡糖胺盐酸盐, 是天然氨基单糖衍生物之一, 而氨基葡萄糖是软骨基质中合成蛋白聚糖所必需的重要成分^[1-2]。前期的研究表明, GAH 对斑马鱼骨骼的发育及损伤有明显的促进及修复作用。

而与 GAH 有类似结构的糖类及衍生物有很多, 如: 葡萄糖 (glucose, Glu); 葡萄糖的同分异构体 D-半乳糖 (D-Galactose, Gal); 由葡萄糖的同分异构体甘露糖加氢而得到的甘露醇 (mannitol, Man); 与 GAH 类似的氨基糖衍生物 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, NAG)^[3-5]。本文以斑马鱼为模型, 探索比较 GAH 及其衍生物对斑马鱼幼鱼骨骼损伤修复及预防的效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物

TU 品系斑马鱼, 由清华大学生命科学学院孟安明课题组惠赠。饲养于本课题组的斑马鱼水循环养殖系统中, 斑马鱼的养殖和繁殖参照标准方法^[6-7]。将性成熟 (3 月龄) 的雌雄斑马鱼放入交配缸中, 插入隔板; 次日清晨拨开挡板待交配产卵, 斑马鱼胚胎在受精后 30 min 内收集, 洗涤后放入 90 mm 培养皿, 加入 Holfreter 水 (0.05 g/L KCl, 0.1 g/L CaCl₂, 0.025 g/L NaHCO₃, 3.5 g/L NaCl) 培养于 28℃ 恒温培养箱中, 在体式显微镜下挑选发育正常胚胎, 用于试验。动物实验遵循 3R 原则。

1.2 实验药物及仪器

本研究所用 GAH 药物是从双孢蘑菇中提取所得, 与传统从虾蟹壳来源相比, 避免了过敏、呕吐等不良反应, 扩大了适用人群。葡萄糖和甘露醇 (AMRESCO); D-半乳糖溶液 (国药集团); N-乙酰葡萄糖溶液 (上海源聚生物科技有限公司); 阿仑膦酸钠片 (默沙东制药); 枸橼酸铁铵 (Sigma, F5879-100G)。

AUY320 日本岛津电子分析天平 (上海仪田精

密仪器有限公司); PYX-280-A 生化培养箱 (科力仪器有限公司); ZD-9550 转移摇床 (海门其林贝尔); MS-H-S 磁力搅拌器 (武汉华科达实验设备有限公司); Nikon SMZ18 体式荧光显微镜 (日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 胚胎的药物处理

以 6 孔板为实验容器, 每孔 50 枚胚胎, 根据前期的实验条件及已有的研究报道^[8], 选用 0.1% (1 mg/mL) 的工作浓度, 将斑马鱼受精后 0.75 h 的胚胎分别暴露在葡萄糖溶液 (Glu)、甘露醇溶液 (Man)、D-半乳糖溶液 (Gal)、N-乙酰葡萄糖胺溶液 (NAG) 和 GAH 溶液中, 以未加药组即 Holfreter 水培养为对照, 每个处理组至少 50 枚胚胎, 每 12 h 更换一次溶液, 同时设置 3 个平行样。观察斑马鱼胚胎发育到 36 h 的生长状况及死亡情况。

1.3.2 阿尔新蓝和茜素红染色

阿尔新蓝染色是一种能够特异性地染色软骨细胞胞外基质的染料, 发育生物学研究中一般使用该染色方法检测胚胎骨骼的形成和软骨的发育情况^[9-10]。茜素红能与骨骼中钙离子以螯合方式形成复合物, 可识别骨的钙盐成分, 与骨中的钙结节产生显色反应, 因此可用来检测鱼的骨形态和骨密度^[11]。阿尔新蓝和茜素红染色方法参考文献^[12]。染色完成后, 观察斑马鱼骨骼的修复状况, 并拍照记录。

1.3.3 不同药物对斑马鱼骨质疏松症的修复作用分组

收集 48 hpf (hours post-fertilization) 的斑马鱼幼鱼, 分为对照组 (WT, 正常的养鱼水培养至第 10 天); FAC 组 (500 μg/mL FAC 培养至第 10 天); Man 组 (FAC 培养 4 d, 再换成 0.1% 甘露醇溶液培养 4 d); Glu 组 (FAC 培养 4 d, 再换成 0.1% 葡萄糖溶液培养 4 d); NAG 组 (FAC 培养 4 d, 再换成 0.1% N-乙酰葡萄糖胺溶液培养 4 d); Gal 组 (FAC 培养 4 d, 再换成 0.1% 半乳糖溶液培养 4 d); GAH 组 (FAC 培养 4 d, 再换成 0.1% GAH 培养 4 d), 共 7 组。对

培养 10 d 的 7 组幼鱼进行阿尔新蓝染色和茜素红染色。

1.3.4 GAH 和阿伦磷酸钠对骨质疏松症的预防作用分组

收集 24 hpf 的斑马鱼胚胎,分成 4 组,分别为对照组(CTR):正常的养鱼水培养至第 10 天;CTR + FAC 组:先用 H₂O 培养 5 d,再用 500 μg/mL FAC 培养 4 d;AL + FAC 组:先用 0.1% AL 培养 5 d,之后用 FAC 培养 4 d;GAH + FAC 组:先用 0.1% GAH 培养 5 d,再换成 FAC 培养 4 d。对培养 10 d 的 4 组进行茜素红染色。

1.4 统计学方法

用体式荧光显微镜观察阿尔新蓝和茜素红染色的斑马鱼骨骼染色即发育情况,所有的图像均采用相同的光强度和曝光设置。用图像分析软件 Image pro plus 6.0 计算阿尔新蓝染色区域的面积,以反映骨骼的软骨形成量^[13],并计算茜素红染色区域的面积和累积光密度(OD),以分别反映骨骼的矿化量和骨密度^[14-15];采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验分析组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 相同浓度下不同药物对斑马鱼胚胎发育的影响

与对照组相比,半乳糖与 N-乙酰葡萄糖胺溶液的斑马鱼胚胎死亡率最高,且发育有明显的延缓;葡萄糖与甘露醇对斑马鱼胚胎的影响较小,与对照组的死亡率基本相同,发育速度正常;GAH 的死亡率为 22%,发育正常且一致。总体分析对斑马鱼胚胎发育影响的大小依次为葡萄糖 < 甘露醇 < GAH < N-乙酰葡萄糖胺 < 半乳糖。(图 1)

2.2 不同药物对斑马鱼骨质疏松症的修复作用

2.2.1 对软骨损伤的修复比较

通过阿尔新蓝染色检测不同处理组的软骨发育状况,与 FAC 组相比,Man 组和 Glu 组染色基本一致,其骨骼染色没有变化;Gal 组和 NAG 组,在副蝶骨、角舌骨、腭方骨及角鳃骨等部位的染色与 Glu 组和 Man 组相比加深,且 Gal 组比 NAG 组的染色更深;而 GAH 组的整个头部骨骼染色明显加深,与对照组较为接近。(图 2a ~ g)

统计分析结果显示,Glu 组、Man 组、NAG 组的染色面积与 FAC 组相比差异无显著性($P >$

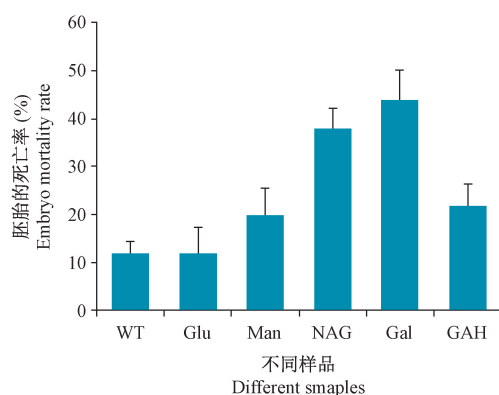


图 1 相同浓度的不同样品对斑马鱼胚胎死亡率的影响 ($n \geq 50$)

Figure 1 Embryo mortality rate at the same concentration of various agents

0.05); Gal 组的染色面积显著性增加($P < 0.01$); GAH 组的染色面积显著增加($P < 0.001$),表明 GAH 对斑马鱼软骨的损伤修复效果最好。(图 2 h)

2.2.2 对硬骨损伤的修复比较

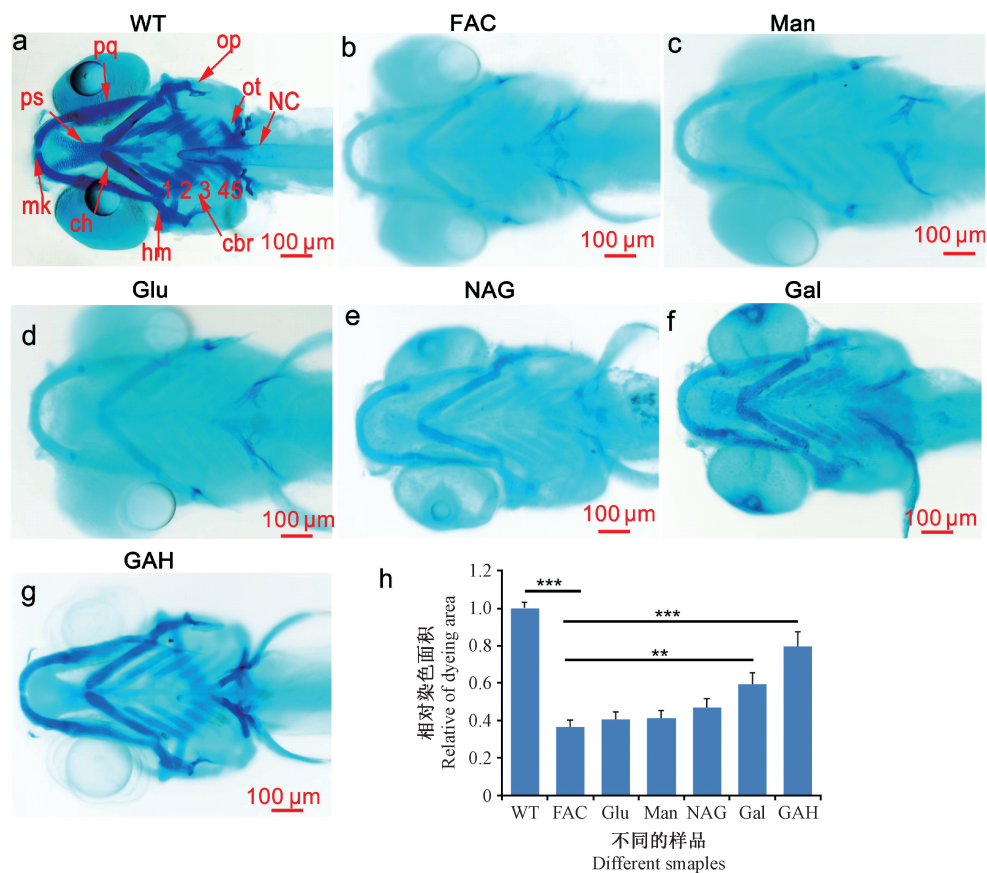
通过茜素红染色观察骨密度及骨形态,结果表明:与 FAC 组相比,Man 组和 Glu 组的基本一致,染色都在其头部的脊索和匙骨稍有加深;Gal 组与 NAG 组的副蝶骨、角舌骨、麦柯耳软骨及匙骨等部位的颜色比 Glu 组和 Man 组深;而 GAH 组的恢复效果最为显著,整个头部的骨骼染色与对照组接近,并且明显能看到两节脊椎。(图 3 a ~ g)

统计结果显示,与 FAC 组相比,Glu 组、Man 组、NAG 组的染色面积无显著性差异($P > 0.05$); Gal 组的染色面积显著性增加($P < 0.01$); GAH 组的染色面积显著增加($P < 0.001$)。

骨密度的变化趋势与染色面积的变化趋势一致。由此说明,GAH 对斑马鱼的骨骼损伤修复效果最好,同时,在后期药物修复的过程中,GAH 组死亡率为零,而 Gal 组与 NAG 组陆续出现死亡,侧面反映了 GAH 的药效温和。(图 3 h ~ i)

2.3 不同药物对骨质疏松症的预防作用

与 CTR 组相比,其它三组的染色深度有不同程度的减弱。CTR + FAC 组中的副蝶骨和脊索的染色信号显著减弱;匙骨、孔盖和鳃条骨等部位的染色区域也明显减小。AL + FAC 组的斑马鱼头部染色整体变浅,染色面积也显著减少,且有明显的残留药物(FAC),只有匙骨、脊索和孔盖可见染色信号。而在 GAH + FAC 组中的麦柯耳软骨、软骨内成骨、孔盖、鳃



注: (ch)角舌骨; (ps)副蝶骨; (mk)麦柯耳软骨; (hm)舌骨下颌弓; (pq)腭方骨; (cbrl-5)角鳃骨; (op)孔盖; (nc)脊索; (ot)耳石。与 FAC 组比较, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

图 2 不同糖类对 FAC 诱导的骨质疏松模型斑马鱼软骨的修复作用 (Bar = 100 μm)

Note. ch; Ceratothyal; ps; Parasphenoid; mk; Meckel's cartilage; hm; Hyomandibula; pq; Palatoquadrate; cbrl-5; Ceratobranchia; op; Operculum. nc; Notochord. ot; Otolith. Compared with the FAC group, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$.

Figure 2 Effect of various agents on the cartilage developmental defects induced by FAC

条骨、舌骨下颌弓和脊椎骨都清晰可见,尤其是匙骨和脊索的染色强度与对照组非常接近,说明经 GAH 处理后,可明显减缓 FAC 引发的骨损伤。(图 4)

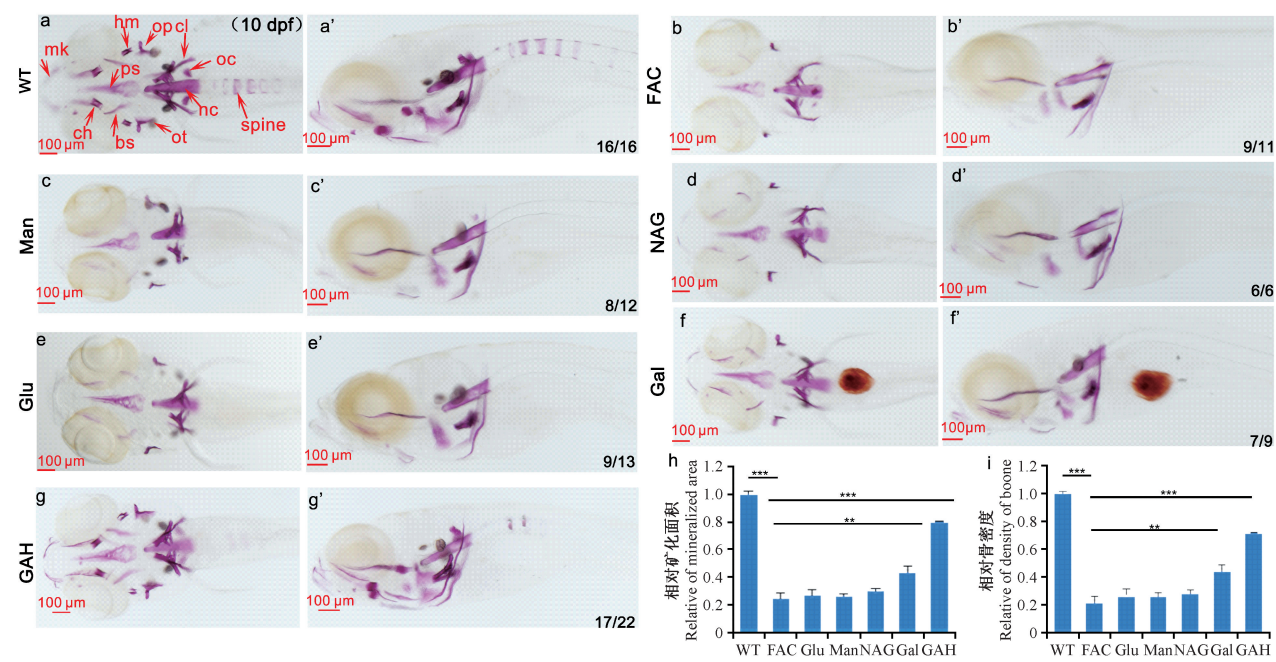
3 讨论

斑马鱼是一种优良的骨骼研究动物模型,它与人类在骨骼发育过程中的基因、信号通路有高度同源性,与其他的动物模型相比,具有个体小适合高通量化学筛选、幼鱼身体透明易于观察骨骼发育的特点,所以近年来以斑马鱼为模型的骨骼研究逐渐成为这一领域的热点^[16-17]。斑马鱼的骨骼发育是一个从头到尾的进程,其整个脊椎发育完成需要 23 d 左右。本研究对发育至第 10 天的斑马鱼幼鱼进行骨骼染色,此时其颅骨已基本形成,脊椎应发育至第 9 脊椎,当用药物 (FAC) 处理后,本该在此时期形成的骨骼出现缺失,导致一系列检测指标下调,

与 Zhang 等^[18]报道的骨质疏松症表型一致。

实验结果表明,对斑马鱼胚胎发育影响的大小依次为:葡萄糖 < 甘露醇 < GAH < N-乙酰葡萄糖胺 < 半乳糖。在相同浓度下,葡萄糖和甘露醇虽对幼鱼的毒副作用小于 GAH,但对骨骼上并没有明显的修复作用,而半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺对幼鱼的毒性及副作用都较大,且其对骨骼修复效果没有 GAH 修复的效果好。所以,GAH 与其衍生物相比,在促进骨骼发育及骨损伤修复有明显优势。

GAH 对 FAC 引起的损伤有一定的预防作用,优于阿仑膦酸钠片。同时,在 AL + FAC 组处理过程中出现了较高的死亡率,且后期染色有明显残留物,说明在正常状态下服用阿仑膦酸钠,不仅不能起到预防骨质疏松的作用,反而对正常的机体有损害,此结果为未来 GAH 作为保健品开发,用于骨质疏松预防提供了初步的实验支撑。

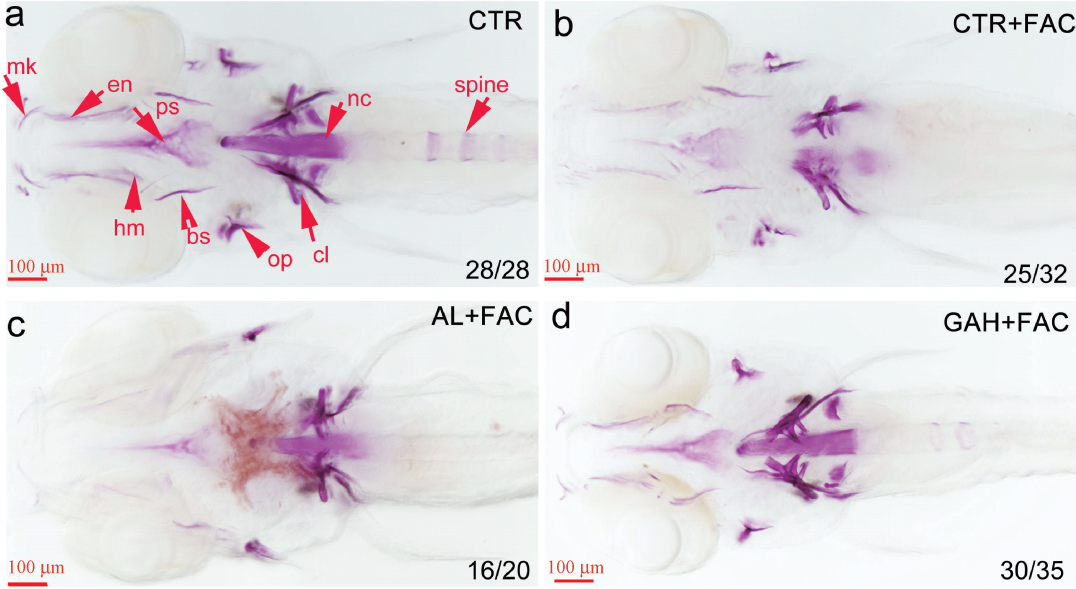


注:(a~g)斑马鱼头骨染色的腹面观;(a'~g')斑马鱼头骨染色的侧面观;(mk)麦柯耳软骨;(hm)舌骨下颌弓;(op)孔盖;(cl)匙骨;(ps)副蝶骨;(oc)枕骨;(ch)角舌骨;(bs)鳃条骨;(ot)耳石;(nc)脊索;(spine)脊椎骨。与FAC组比较,**P<0.01,***P<0.001。

图3 不同糖类对FAC诱导的骨质疏松模型斑马鱼骨骼修复作用的比较(Bar=100 μm)

Note. (a~g) Ventral view of alizarin red stained 10 dpf zebrafish larvae (left column). (a'~g') Lateral view of alizarin red stained 10 dpf zebrafish larvae (right column). Note. mk: Meckel's cartilage; hm: Hyomandibula. op: operculum; cl: Cleithrum; ps: Parasphenoid. oc: Occipital; ch: Ceratohyal; bs: Branchiostegal; ot: Otolith; nc: Notochord. Compared with the FAC group, **P<0.01 and ***P<0.001.

Figure 3 Effect of the various agents on bone developmental defects induced by FAC in larvae



注:(mk)麦柯耳软骨;(en)软骨内成骨;(ps)副蝶骨;(nc)脊索;(cl)匙骨;(op)孔盖;(spine)脊椎骨;(bs)鳃条骨;(hm)舌骨下颌弓。

图4 GAH对骨质疏松的预防作用(Bar=100 μm)

Note. Note. mk: Meckel's cartilage; en: Entochondrostosis; ps: Parasphenoid; nc: Notochord; cl: Cleithrum; op: Operculum; bs: Branchiostegal; hm: Hyomandibula.

Figure 4 Preventive effect of GAH on osteoporosis