

毛洪运,刘雨彤,赵心月,等. 斑马鱼快速骨质疏松模型方法的建立与优化 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(5): 547-556.
MAO H Y, LIU Y T, ZHAO X Y, et al. Establishment and optimization of rapid model of osteoporosis in zebrafish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(5): 547-556.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.05.001

斑马鱼快速骨质疏松模型方法的建立与优化

毛洪运^{1,2},刘雨彤²,赵心月²,姜德利²,王晓仪²,
赵珂璇²,华永庆^{1,2,3*},许惠琴^{2,3*}

(1. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,南京 210023;2. 南京中医药大学药学院,南京 210023;3. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室,南京 210023)

【摘要】目的 本文通过比较常见斑马鱼骨质疏松 (osteoporosis, OP) 模型不同建立方法,优化建立一种快速、稳定、灵敏的造模方法。**方法** 采用铁过载及泼尼松龙 (prednisolone, Pred) 诱导 OP 模型,观察骨形成情况及动物死亡率,分组为:空白对照组 (Control 组)、模型组 (包括 FAC 组和 Pred 组)、阳性对照组 (AC 组)。铁过载诱导法采用枸橼酸铁铵 (ammonium ferric citrate, FAC) 为造模药物。Pred 诱导法有 Pred-3 受精后天数 (day post fertilization, dpf) 法,造模时间为 3 ~ 9 dpf;Pred-5 dpf 法,造模时间为 5 ~ 10 dpf;Pred 撤药法,3 dpf 开始造模,7 ~ 9 dpf 每天撤去 1/3 造模药物。进而比较常用药物阿尔法骨化醇 (alfacalcidol, AC)、骨化三醇 (calcitriol, CA)、阿仑膦酸钠 (alendronate, AL) 抗 OP 效应,选择稳定、灵敏的阳性药,并进一步对不同染色方法及染色条件进行优化。**结果** FAC 在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下未能观察到对骨形成的显著影响。骨节数及第一椎骨长度结果显示,与 Control 组比较,Pred-3 dpf 诱导法 Pred 组均降低,具有显著性差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),但斑马鱼死亡率较高;Pred-5 dpf 法无显著性差异;Pred 撤药法 Pred 组均降低,具有显著性差异 ($P < 0.01$),且无死亡。给予 AC、CA、AL 后均具有抗 OP 作用,CA 抗 OP 作用更为灵敏、稳定。茜素红 (alizarin red, ARS) 染色参数优化结果显示,染色浓度为 0.02%,染色 2 h, 0.5% KOH 和甘油分别以 (3 : 1, 3 h) 和 (1 : 1, 14 h) 洗涤条件为最佳。染色对比结果显示,钙黄绿素对骨节部位染色较为灵敏,ARS 则对第一椎骨处染色较为灵敏。**结论** 采用 Pred 撤药法可诱导建立快速、稳定、灵敏的斑马鱼 OP 模型,是研究 OP 的稳定可靠模型。

【关键词】 斑马鱼;骨质疏松;泼尼松龙;茜素红;骨化三醇

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 05-0547-10

Establishment and optimization of rapid model of osteoporosis in zebrafish

MAO Hongyun^{1,2}, LIU Yutong², ZHAO Xinyue², JIANG Deli², WANG Xiaoyi²,
ZHAO Kexuan², HUA Yongqing^{1,2,3*}, XU Huiqin^{2,3*}

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China;
2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210023, China)
Corresponding author: HUA Yongqing. E-mail: hua_yq@njucm.edu.cn; XU Huiqin. E-mail: 300008@njucm.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金 (81473390), 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (20KJA360001), 贵州省科技计划项目 ([2020] 4Y090), 贵阳市科技重大项目 ([2020]-18-4)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81473390), the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (20KJA360001), the Science and Technology Program of Guizhou Province ([2020] 4Y090), the Guiyang Science and Technology Plan Project ([2020]-18-4).

【作者简介】 毛洪运,男,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学。Email: hymao97@163.com

【通信作者】 华永庆,男,副研究员,研究方向:中药内分泌药理研究。Email: hua_yq@njucm.edu.cn;

许惠琴,女,教授,博士生导师,研究方向:中药内分泌药理学。Email: 300008@njucm.edu.cn。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To establish a fast, stable, and sensitive zebrafish model of osteoporosis (OP) using different method. **Methods** OP models were induced by iron overload or prednisolone (Pred), and bone formation and mortality were observed. The groups were divided into: Control group, model group (include FAC group and Pred group), and positive control group (AC group). Ammonium ferric citrate was used as the model drug in the iron-overload induction method. For the Pred induction models, the modeling time for the Pred-3 days post-fertilization (dpf) method was 3 ~ 9 dpf, the modeling time for the Pred-5 dpf method was 5 ~ 10 dpf, and Pred was administered from 3 dpf and removed from 7 ~ 9 dpf for the Pred withdrawal method. To compare the anti-osteoporosis (OP) effects of commonly used drugs such as Alfacalcidol (AC), Calcitriol (CA), and Alendronate (AL), it's important to select a stable and sensitive positive control drug and to further optimize different staining methods and conditions. **Results** There was no significant effect of ammonium ferric citrate 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on bone formation. Bone formation and the length of the first vertebra were significantly decreased in the Pred group induced by Pred-3 dpf compared with those in the control group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), but zebrafish mortality was higher. There was no significant difference between the Pred-5 dpf method, but bone formation was significantly reduced in the Pred withdrawal group ($P < 0.01$), with no mortality. Alfacalcidol, calcitriol, and alendronate all had anti-OP effects, with CA having the most sensitive and stable anti-OP effect. Alizarin red staining showed that the optimal dye parameters were 0.02% concentration for dyeing 2 h, with washing in 0.5% KOH and glycerol under the conditions of a 3:1 ratio for 3 h followed by a 1:1 ratio for 14 h. The result of staining showed that calcein was more sensitive for staining bone nodes and ARS staining was more sensitive for staining the first vertebra. **Conclusions** The Pred withdrawal method can be used to establish a rapid, stable, and sensitive OP model in zebrafish as a reliable model for studying OP.

[Keywords] zebrafish; osteoporosis; prednisolone; alizarin red; calcitriol

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨量减少,骨脆性增加为特征的全身性骨骼疾病^[1]。当前人口老龄化趋势日益加重,OP 临床治疗药物仍不能满足需求。OP 防治药物的研发成为当前药物研究热点问题。然而,现有以小鼠、大鼠为对象的 OP 模型,存在造模耗时长、药物用量大、筛选效率低等问题。采用新兴的模式生物斑马鱼建立 OP 模型日益受到关注^[2]。斑马鱼因其体积小、胚胎透明、易于大规模饲养、繁殖能力强和实验周期短,被认为是药物在体活性筛选的理想模型^[3-4]。斑马鱼属硬骨鱼类,与人类在骨骼发育过程中的基因、信号通路有高度同源性,且与其他动物模型相比,更易于观察骨骼发育,非常适合用于骨骼研究。

斑马鱼 OP 模型主要有糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)类 OP 模型,金属离子超载 OP 模型等。GCs 是一类免疫抑制药,如泼尼松龙(prednisolone, Pred)、地塞米松等,长期使用可抑制成骨细胞(osteoblasts, OBs)的增殖及分化而引起骨代谢异常^[5],从而诱发 OP^[6],是斑马鱼 OP 模型建立的常用工具药物。在胚胎期,骨形成过程变化迅速,在合适的观察窗口期进行骨形成观察更加有利于发现药物的不同作用。目前对于 GCs 诱导的斑马鱼幼鱼 OP 模型造模时间及观察时间,不同文章

报道的方法不一^[7-8],本课题组前期研究也发现连续给予 GCs 后斑马鱼死亡率较高,因此本研究模拟临床用药方法,采用逐步撤药法研究 OP 模型。在铁超载环境中,骨组织铁含量升高可导致氧化应激损伤,从而抑制成骨细胞增殖和矿化^[9],铁超载还可促进破骨细胞(osteoclasts, OCs)分化和骨吸收功能^[10]。因此,“铁过载”可抑制成骨细胞和促进破骨细胞生物学功能从而导致骨矿化、骨形成能力下降,最终引起 OP^[11]。目前关于“铁超载”在斑马鱼整体模型上的研究较少^[12-13],尚不能体现其特点,能否用于药物研究仍需要进一步探索。因此本研究试图通过比较铁过载及 Pred 诱导的 OP 模型,加以选择后进行优化,建立快速、稳定且灵敏度高的斑马鱼 OP 模型,为进一步 OP 药物的研发提供工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 月龄清洁级野生 AB 品系斑马鱼,雌雄各 20 尾,购自南京一树梨花生物科技有限公司。饲养于南京中医药大学实验动物中心【SYXK(苏)2023-0077】,斑马鱼饲养条件为昼:夜 = 14 h:10 h,饲养环境严格按照《实验用斑马鱼饲养技术条件》江苏

省地方标准。成年斑马鱼养殖于循环的斑马鱼专用养殖系统中,实验用斑马鱼幼鱼为 4 月龄雌雄斑马鱼交配产卵所得,前 1 d 晚上取健康斑马鱼以雌雄 1 : 1 放入繁殖缸,隔板并保持黑暗环境,第 2 天早上光照开始时去除隔板交配繁殖,收集受精卵,于含 0.5 mg/L 亚甲蓝养殖水(电导率:400 ~ 800 $\mu\text{m/s}$, pH = 7 ~ 8)中,置于全自动控温控光人工气候培养箱中培养,温度 $28.5 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$,湿度 60% ~ 80%。产卵当天即为 0 受精后天数(days post fertilization, dpf)用于后续实验。所有的实验操作都严格遵守《实验动物管理与使用指南》且都经南京中医药大学动物管理和使用委员会批准(ACU220105)。

1.1.2 主要试剂与仪器

枸橼酸铁铵(ammonium ferric citrate, FAC),上海源叶生物科技有限公司,批号:N12GS167295;二甲基亚砜(DMSO),上海麦克林生化科技有限公司,批号:C12804515;钙黄绿素,上海源叶生物科技有限公司,批号:K22A9C68341;泼尼松龙,上海源叶生物科技有限公司,批号:T20J7H9291;阿仑膦酸钠片(alendronate, AL),Savio Industrial S. r. L(Italy),批号:UO10043;骨化三醇软胶囊(calcitriol, CA),正大制药(青岛)有限公司,批号:2111111;阿法骨化醇片(alfacalcidol, AC),重庆药友制药有限责任公司,批号:21072010;丙三醇,国药集团化学试剂有限公司,批号:0220105;茜素红染色液(alizarin red, ARS),雷根生物技术有限公司,批号:0120A22;4%多聚甲醛(perfluorinated ammonium trichloride, PFA),Biosharp,批号:21348860;氢氧化钾(KOH),上海阿拉丁生化科技有限公司,批号:K1729014;过氧化氢(H_2O_2),阿拉丁生化科技有限公司,批号:H112520。体视荧光显微镜(型号:M205FA,德国

Leica);人工气候培养箱(型号:RGL-P160B,中国合肥达斯卡特生物科技有限公司);斑马鱼循环养殖系统(型号:ZF-104,中国南京一树梨花生物科技有限公司);涡旋仪(型号:VORTEX20,德国 IKA 公司)。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼幼鱼 OP 造模方法比较

(1)FAC 诱导斑马鱼幼鱼 OP:建立 FAC 诱导斑马鱼幼鱼 OP 模型^[12-14],方法流程如图 1A 所示。2 dpf 时对斑马鱼幼鱼进行随机分组,分为空白对照组 1(Control-1 组)、模型组 1(FAC 组)和阳性对照组 1(AC-1 组),每组 3 孔,每孔 15 条,置于 12 孔板中,每孔 3 mL 体系,Control-1 组给予含 0.2% DMSO 空白培养基,FAC 组及 AC-1 组加入 500 $\mu\text{g/mL}$ FAC 连续培养 4 d,每 12 h 半数更换培养液。6 dpf 弃造模液,Control-1 组仍给予空白培养基,FAC 组更换为空白培养基,AC-1 组更换为 $5 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$ AC 培养基,培养 4 d,每天半数换液,并喂食草履虫(每 12 h 1 次),于 10 dpf 时进行钙黄绿素染色,通过体视荧光显微镜进行拍照观察。

(2)Pred-3 dpf 造模法诱导斑马鱼幼鱼 OP:建立 Pred-3 dpf 造模法诱导的斑马鱼幼鱼 OP 模型^[15],方法流程如图 1B 所示。于 3 dpf 时对斑马鱼幼鱼进行随机分组,分为空白对照组 2(Control-2 组)、模型组 2(Pred-1 组)和阳性对照组 2(AC-2 组),每组 3 孔,每孔 15 条,置于 12 孔板中,每孔为 3 mL 体系,Control-2 组给予含 0.2% DMSO 空白培养基,Pred-1 组及 AC-2 组给予 10 $\mu\text{mol/L}$ Pred 造模液,连续培养 2 d。5 dpf 时,Control-2 组仍给予空白培养基,Pred-1 组给予 Pred 造模液,AC-2 组给予 $5 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$ 的 AC 溶液(含 0.2% DMSO,

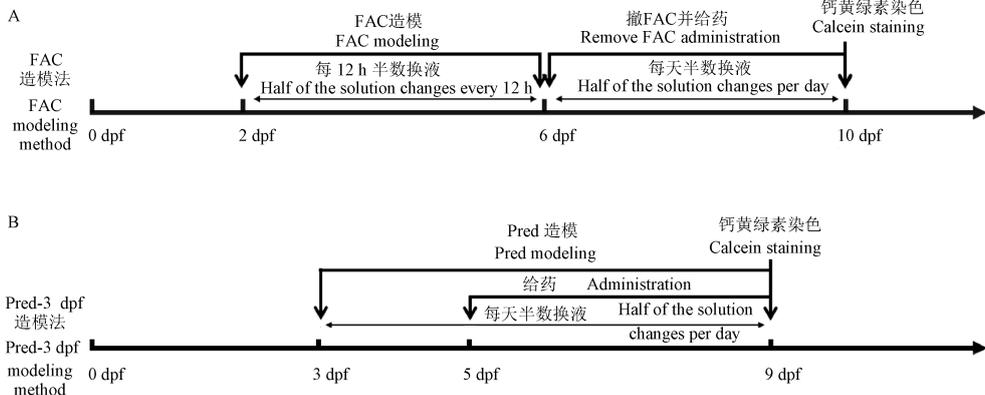


图 1 FAC 造模法与 Pred-3 dpf 造模方法流程

Figure 1 Modeling process of FAC and Pred-3 dpf methods

10 $\mu\text{mol/L}$ Pred), 连续给药至 9 dpf, 每天半数更换相应含药培养基, 并喂食草履虫(每 12 h 1 次), 于 9 dpf 时进行钙黄绿素染色, 通过体视荧光显微镜进行拍照观察。

(3) Pred-5 dpf 造模法诱导斑马鱼幼鱼 OP: 建立 Pred-5 dpf 造模法诱导的斑马鱼幼鱼 OP 模型^[16], 方法流程如图 2A 所示。于 5 dpf 时对斑马鱼幼鱼进行分组, 随机分为空白对照组 3 (Control-3 组)、模型组 3 (Pred-2 组)、阳性对照组 3 (AC-3 组), 每组 2 孔, 每孔 15 条, 置于 12 孔板中, 每孔 3 mL 体系, Control-3 组给予含 0.2% DMSO 空白培养基, Pred-2 组给予 10 $\mu\text{mol/L}$ Pred 造模液, AC-3 组给予 5×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$ 的 AC 溶液(含 0.2% DMSO, 10 $\mu\text{mol/L}$ Pred), 连续培养 5 d, 每天半数更换相应含药培养基, 并喂食草履虫(每 12 h 1 次), 于 10 dpf 时进行钙黄绿素染色, 通过体视荧光显微镜进行拍照观察。

(4) Pred-撤药法诱导斑马鱼幼鱼 OP: 建立 Pred-撤药法诱导的斑马鱼幼鱼 OP 模型, 方法流程如图 2B 所示。于 3 dpf 时对斑马鱼幼鱼进行随机分组, 分为空白对照组 4 (Control-4 组)、模型组 4 (Pred-3 组)、阳性对照组 4 (AC-4 组), 每组 2 孔, 每孔 15 条, 置于 12 孔板中, 每孔 3 mL 体系, Control-4 组给予含 0.2% DMSO 空白培养基, Pred-3 组、AC-4 组加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Pred 造模液连续培养 2 d。5 dpf 时给药, Control-4 组给予空白培养基, Pred-3 组给予 Pred 造模液, AC-4 组给予 5×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$ 的 AC 溶液(含 0.2% DMSO, 10 $\mu\text{mol/L}$ Pred), 连续给药 2 d, 7 dpf 时, Pred-3 组、AC-4 组撤 1 mL 药液后, 各加入 1 mL 不含 Pred 的相应药液(除不含 Pred 外其余组成不变); 8 dpf 再次撤去 1 mL, 加入 1 mL 不含 Pred 的相应药液。5 dpf 开始每天喂食草履虫(每 12 h 1 次), 于 9 dpf 时进行钙黄绿素染色, 使用体视荧光显微镜进行拍照观察。

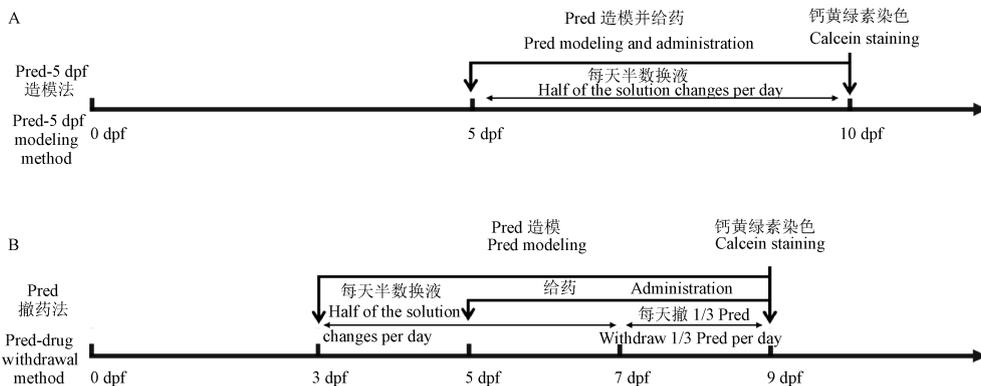


图 2 Pred-5 dpf 造模法及 Pred-撤药法造模方法流程

Figure 2 Modeling process of Pred-5 dpf and Pred-drug withdrawal methods

1.2.2 不同阳性药对斑马鱼幼鱼 OP 模型的效应观察

临床常用治疗 OP 的药物有阿尔法骨化醇(alfacalcidol, AC)、骨化三醇(calcitriol, CA)、阿仑膦酸钠(alendronate, AL)^[15,17-19]等。通过斑马鱼幼鱼 OP 模型, 观察斑马鱼骨形成情况, 比较 3 种抗 OP 药物的药效。

将 3 dpf 斑马鱼幼鱼随机分为 Control 组、Pred (10 $\mu\text{mol/L}$) 组、AC 不同剂量组(0.75 $\times 10^{-6}$ 、1.5 $\times 10^{-6}$ 、3 $\times 10^{-6}$ 、6 $\times 10^{-6}$ 、12 $\times 10^{-6}$ $\mu\text{g/mL}$)、CA 不同剂量组(0.75 $\times 10^{-6}$ 、1.5 $\times 10^{-6}$ 、3 $\times 10^{-6}$ 、6 $\times 10^{-6}$ 、12 $\times 10^{-6}$ $\mu\text{g/mL}$)、AL 不同剂量组(0.625、1.25、2.5、5、10 $\mu\text{g/mL}$), 每组 1 孔, 每孔 15 条, 置于 12 孔板中, 分别给予 3 mL 胚胎培养基。培养至 3 dpf 给予 Pred 开始造模, Control 组给予含 0.2% DMSO 的

空白培养基, Pred 组及各浓度给药组分别给予 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pred。保持每孔 3 mL 溶液体系, 以上各组各孔每天换液 1 mL。培养至 5 dpf 开始给药, AC、CA、AL 各剂量组加入含 10 $\mu\text{mol/L}$ Pred 的相应给药浓度药液继续培养 2 d。7 dpf 开始撤 Pred, 每天撤 1/3 体系培养基, 更换等体积不含 Pred 的相应含药培养基, 继续培养至 9 dpf, 钙黄绿素染色, 通过体视荧光显微镜进行拍照观察。统计斑马鱼荧光骨节数目、第一椎骨长度, 评价各药干预斑马鱼 OP 的作用。

1.2.3 斑马鱼幼鱼骨形成情况观察方法比较

(1) 钙黄绿素染色方法: 对斑马幼鱼进行钙黄绿素(0.2%, pH = 7)染色, 每孔加染色剂 1 mL 避光染色 1 h, 于避光环境下将染色剂吸出, 用人工海水多次漂洗, 洗净染液, 至洗涤液澄清透明后再以

每次 20 min 避光重复漂洗 3 次,通过体视荧光显微镜进行拍照观察,全程在室温下避光操作。

(2) 茜素红 (alizarin red, ARS) 染色方法: 选取 9 dpf 的健康斑马鱼幼鱼置于 MS-222 麻醉进行安乐处死^[20], 于 4% PFA 固定 2 h; 后置于 50% 乙醇中 10 min; 弃乙醇, pH = 7.5 的 ARS 染色液染色, 浓度分别为 0.2%、0.02%, 染色时间分别为 1、2、3、12 h; 弃染色液并用纯净水洗净, 加入新鲜配制的 3% H₂O₂ 和 2% KOH 等体积混合漂白液, 漂洗 2 h; 弃漂白液, 加入 0.5% KOH 和甘油 (3:1) 的混合溶液, 分别漂洗 1、2、3、4、5 h; 再置于 0.5% KOH 和甘油 (1:1) 的混合溶液中分别漂洗 10、14 h, 后更换为 0.5% KOH 和甘油 (1:3) 的混合溶液漂洗, 最后更换甘油保存^[8,21-22], 通过体视荧光显微镜进行拍照观察。

(3) 钙黄绿素与 ARS 染色方法比较: 选取 9 dpf 的健康斑马鱼幼鱼使用钙黄绿素进行染色, 染色后于体视荧光显微镜下拍照观察其骨形成情况; 将拍照后的斑马鱼幼鱼收集, 4% PFA 固定 2 h, 选择“1.2.3(2)”中筛选得到的 ARS 最佳染色参数进行

染色, 并于体视荧光显微镜下观察骨形成情况, 比较两种染色方法对斑马鱼骨骼的染色效果, 以第一椎骨荧光强度对比度为指标。

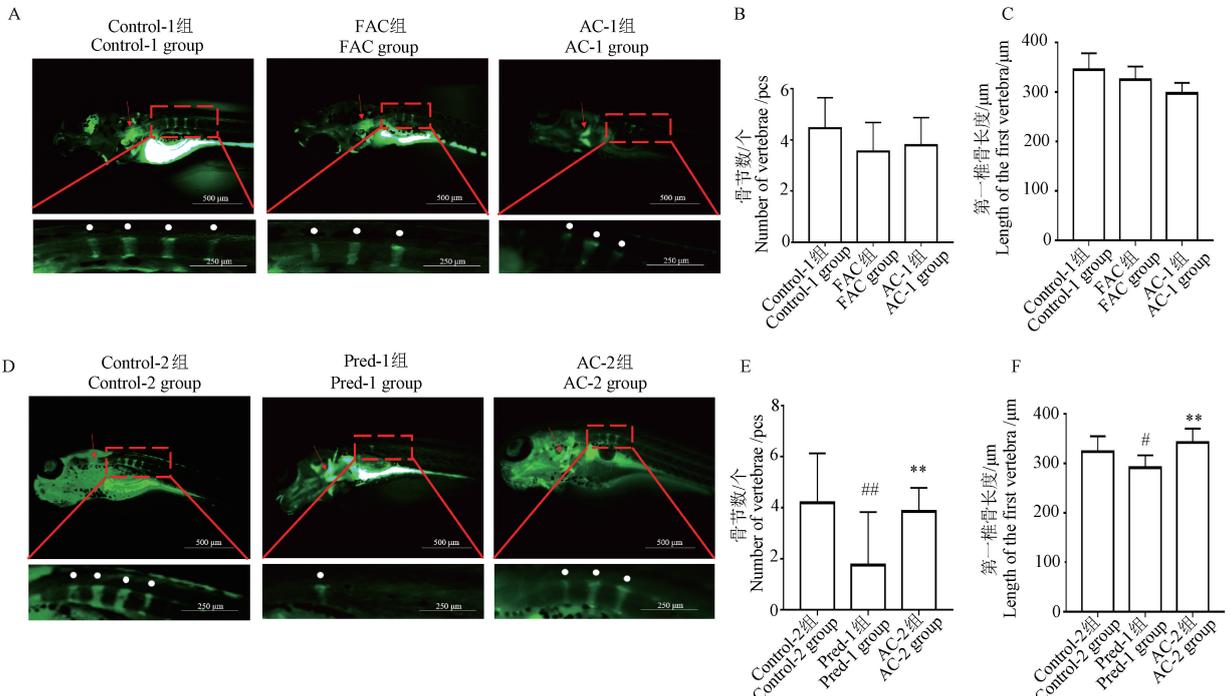
1.3 统计学分析

采用 Image Pro Plus 6.0 进行图片分析和作图。所有定量数据均以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有统计分析均使用 Graph Pad Prism 7.0 软件进行, 统计方法采用单因素方差分析进行组间 Dunnett's 多重比较, 两独立样本比较采用 *t* 检验分析; 计数资料以百分率 (%) 表示, 采用 χ^2 检验进行组间百分率的比较, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 FAC 与 Pred-3 dpf 诱导的斑马鱼幼鱼 OP 造模方法比较

以骨节数和第一椎骨长度为主要指标, 结果发现, FAC 造模法 FAC 组斑马鱼骨节数和第一椎骨长度均无显著性差异 (见图 3A, 3B, 3C), 且死亡率高 44.45%, AC-1 组死亡率为 53.33%, 未见显著改



注: A: FAC 造模法中斑马鱼骨形成情况 (钙黄绿色染色); B: FAC 造模法中斑马鱼骨节数; C: FAC 造模法中斑马鱼第一椎骨长度; D: Pred-3 dpf 造模法中斑马鱼骨形成情况 (钙黄绿色染色); E: Pred-3 dpf 造模法中斑马鱼骨节数; F: Pred-3 dpf 造模法中斑马鱼第一椎骨长度; 红色箭头: 第一椎骨; 与 Control-2 组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; 与 Pred-1 组相比, $^{**}P < 0.01$ 。

图 3 FAC 和 Pred-3 dpf 造模方法对斑马鱼幼鱼骨形成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 11 \sim 15$)

Note. A. Bone formation of zebrafish in FAC modeling. B. Number of vertebrae of zebrafish in FAC. C. Length of the first vertebra of zebrafish in FAC. D. Bone formation of zebrafish in Pred-3 dpf modeling. E. Number of vertebrae of zebrafish in Pred-3 dpf. F. Length of the first vertebra of zebrafish in Pred-3 dpf. Red arrow, First vertebra. Compared with Control-2 group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$. Compared with Pred-1 group, $^{**}P < 0.01$.

Figure 3 Effect of FAC and Pred-3 dpf modeling methods on bone formation of juvenile zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 11 \sim 15$)

善;且实验过程中换液繁琐,铁盐易产生络合物沉淀会影响造模药浓度及斑马鱼幼鱼生长。

Pred-3 dpf 造模法 Pred-1 组斑马鱼骨节数和第一椎骨长度均降低,具有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),表明造模成功,但其斑马鱼死亡率也较高,达 31.11%;在 Pred-3 dpf 造模法中,与 Pred-1 组相比,AC-2 组骨节数和第一椎骨长度均增加,具有显著性差异($P < 0.01$) (见图 3D, 3E, 3F),斑马鱼死亡率为 20%,具有一定改善作用。

上述研究结果表明, Pred-3 dpf 造模法比 FAC 造模方法更加稳定、灵敏,但 Pred-3 dpf 造模实验依旧存在各组斑马鱼骨节数较少、造模药给药时间较长、过分抑制生长、死亡率依旧偏高等问题,需进一步进行优化。因此本研究参照相关报道^[16]进一步设计了 Pred-5 dpf 造模法及增加了 Pred 撤药造模法。

2.2 Pred 诱导斑马鱼幼鱼 OP 模型方法优化

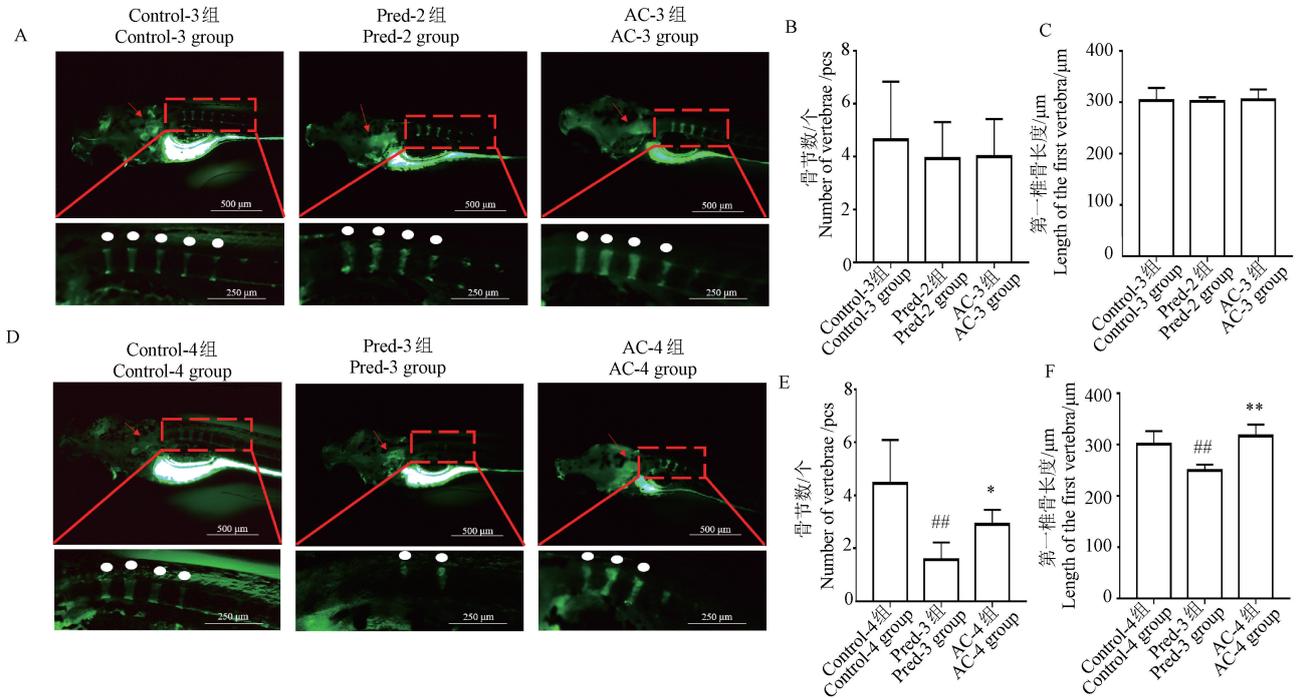
以骨节数和第一椎骨长度为主要指标。Pred-5

dpf 造模法 Pred-2 组斑马鱼骨节数和第一椎骨长度均无显著性差异;与 Pred-2 组相比,AC-3 组骨节数和第一椎骨长度无显著性差异 (见图 4A, 4B, 4C)。各组别斑马鱼死亡率均低至 3.33%。Pred 撤药法 Pred-3 组骨节数和第一椎骨长度均减少,达 64.7%和 17.08%,具有显著性差异($P < 0.01$);与 Pred-3 组相比,AC-4 组骨节数和第一椎骨长度均升高,达 85.17%和 27.02%,具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 4D, 4E, 4F),且未见死亡。

上述研究结果表明, Pred 撤药法更加灵敏,能在保证造模成功的同时降低死亡率。

2.3 干预 OP 斑马鱼模型的正性药物选择

通过比较不同浓度 AC、CA、AL 对 OP 模型斑马鱼的作用,统计斑马鱼幼鱼荧光骨节数、第一椎骨长度。AC 组斑马鱼幼鱼染色结果显示,与 Control 组比较, Pred 组斑马鱼骨节数及第一椎骨长度均降低,具有显著性差异($P < 0.01$);与 Pred 组比较,随着 AC 剂量的增加,骨节数和第一椎骨长度均依赖



注: A: Pred-5 dpf 造模法中斑马鱼骨形成情况(钙黄绿色染色); B: Pred-5 dpf 造模法中斑马鱼骨节数统计; C: Pred-5 dpf 造模法中斑马鱼第一椎骨长度统计; D: Pred-撤药法中斑马鱼骨形成情况(钙黄绿色染色); E: Pred-撤药法中斑马鱼骨节数统计; F: Pred-撤药法中斑马鱼第一椎骨长度统计; 红色箭头所指为第一椎骨; 与 Control 组相比, $## P < 0.01$; 与 Pred 组相比, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。

图 4 Pred-5 dpf 和 Pred-撤药法对斑马鱼幼鱼骨形成的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 11 \sim 15$)

Note. A. Bone formation of zebrafish in Pred-5 dpf modeling. B. Number of vertebrae of zebrafish in Pred-5 dpf. C. Length of the first vertebra of zebrafish in Pred-5 dpf. D. Bone formation of zebrafish in Pred-drug withdrawal. E. Number of vertebrae of zebrafish in Pred-drug withdrawal. F. Length of the first vertebra of zebrafish in Pred-drug withdrawal. Red arrow, First vertebra. Compared with Control group, $## P < 0.01$. Compared with Pred group, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$.

Figure 4 Effect of Pred-5 dpf and Pred-drug withdrawal methods on bone formation of juvenile zebrafish($\bar{x} \pm s$, $n = 11 \sim 15$)

性增加,浓度在 6×10^{-6} 、 12×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时骨节数和第一椎骨长度均增加,具有显著性差异 ($P < 0.05$) (见图 5A,5B)。

CA 组斑马鱼幼鱼染色结果显示,与 Control 组比较, Pred 组斑马鱼骨节数及第一椎骨长度均降低,具有显著性差异 ($P < 0.05$); 与 Pred 组比较, $1.5 \times 10^{-6} \sim 6 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ CA 呈剂量依赖性促进斑马鱼第一椎骨和骨节的生长; 3×10^{-6} 、 6×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$ CA 可增加斑马鱼骨节数和第一椎骨长度,具有显著性差异 ($P < 0.05$) (见图 5C,5D)。

AL 组斑马鱼幼鱼染色结果显示,与 Control 组比较, Pred 组斑马鱼骨节数及第一椎骨长度降低,具有显著性差异 ($P < 0.01$); 与 Pred 组相比, 0.625 、 1.25 、 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AL 组骨节数目呈剂量依赖性增加,且 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AL 组具有显著性差异 ($P < 0.01$), 浓度在 1.25 、 2.5 、 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时第一椎骨长度

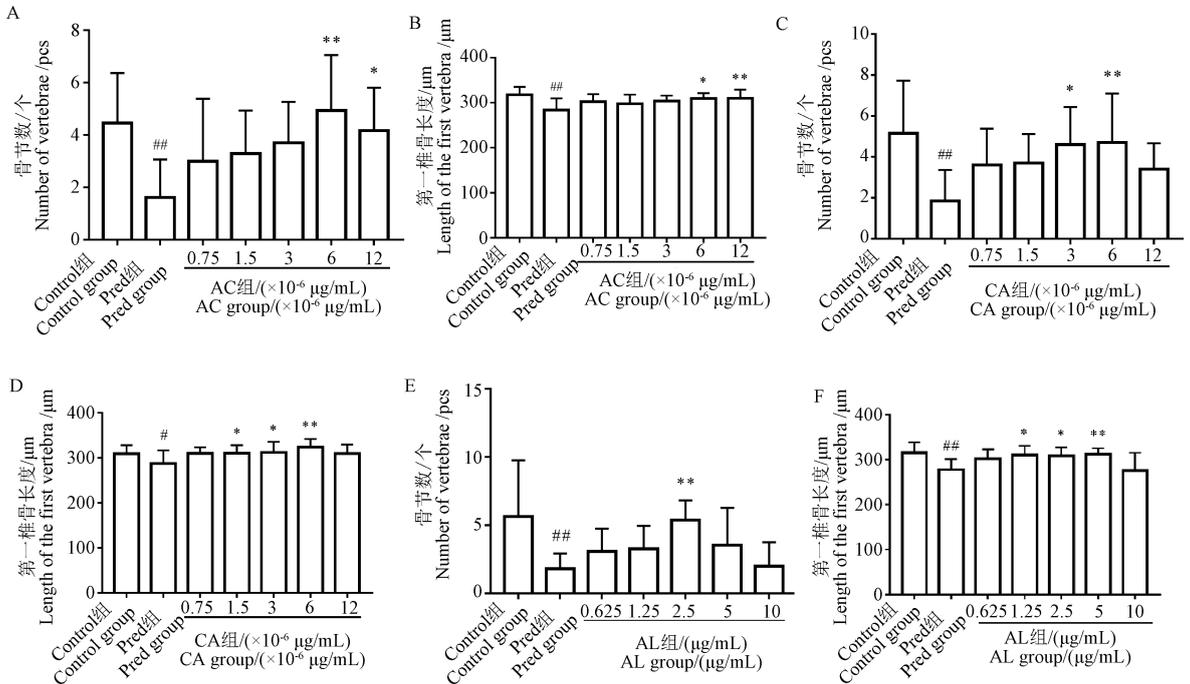
均增加,具有显著性差异 ($P < 0.05$) (见图 5E,5F)。

上述结果表明, AC、CA、AL 对 Pred 诱导的 OP 模型斑马鱼幼鱼骨形成均有促进作用,具有抗 OP 作用。CA 在较低剂量时已体现抗 OP 作用,且呈一定量效关系,因此为斑马鱼幼鱼 OP 模型阳性药物的较优选择。

2.4 斑马鱼幼鱼骨形成观察方法比较

2.4.1 ARS 染色参数比较

实验采用 0.2% 、 0.02% 两种浓度的 ARS 染色方法,结果显示高浓度组骨节及第一椎骨的清晰度在明场下随染色时间延长明显降低,且在荧光下各染色时间段均较低;低浓度组骨节及第一椎骨在明场下各时间段及在荧光下染色 2 h 均较清晰。表明实验选择 0.02% ARS 染色,染色时间 2 h 最为适宜 (见图 6)。

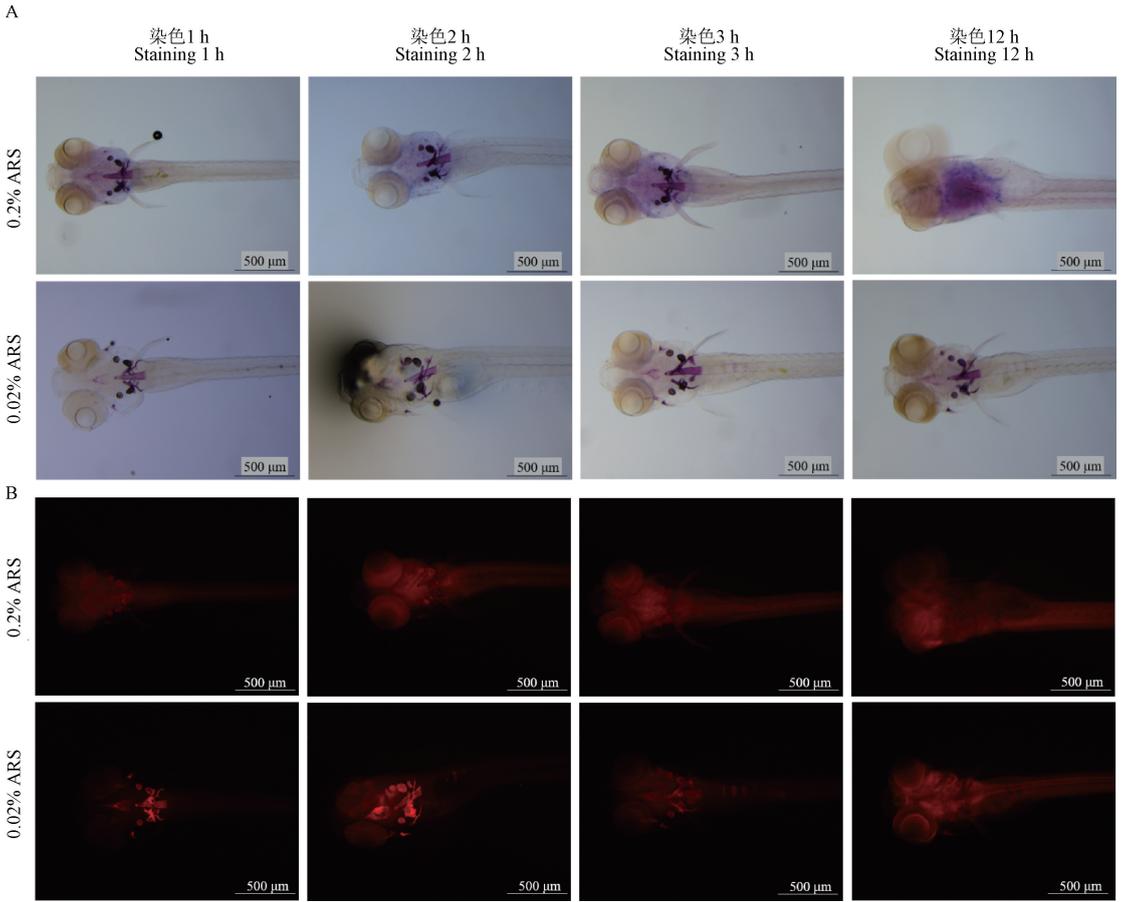


注: A; 不同浓度 AC 组斑马鱼骨节数; B; 不同浓度 AC 组斑马鱼第一椎骨长度; C; 不同浓度 CA 组斑马鱼骨节数; D; 不同浓度 CA 组斑马鱼第一椎骨长度; E; 不同浓度 AL 组斑马鱼骨节数; F; 不同浓度 AL 组斑马鱼第一椎骨长度; 与 Control 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 Pred 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 不同阳性药对 OP 模型斑马鱼幼鱼骨形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)

Note. A. Number of vertebrae of zebrafish in different concentrations of AC groups. B. Length of the first vertebra of zebrafish in different concentrations of AC groups. C. Number of vertebrae of zebrafish in different concentrations of CA groups. D. Length of the first vertebra of zebrafish in different concentrations of CA groups. E. Number of vertebrae of zebrafish in different concentrations of AL groups. F. Length of the first vertebra of zebrafish in different concentrations of AL groups. Compared with Control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with Pred group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Effect of different positive drugs on bone formation of juvenile zebrafish in OP model ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)



注:A:明场照片;B:荧光照片。

图 6 ARS 染色浓度及时长比较

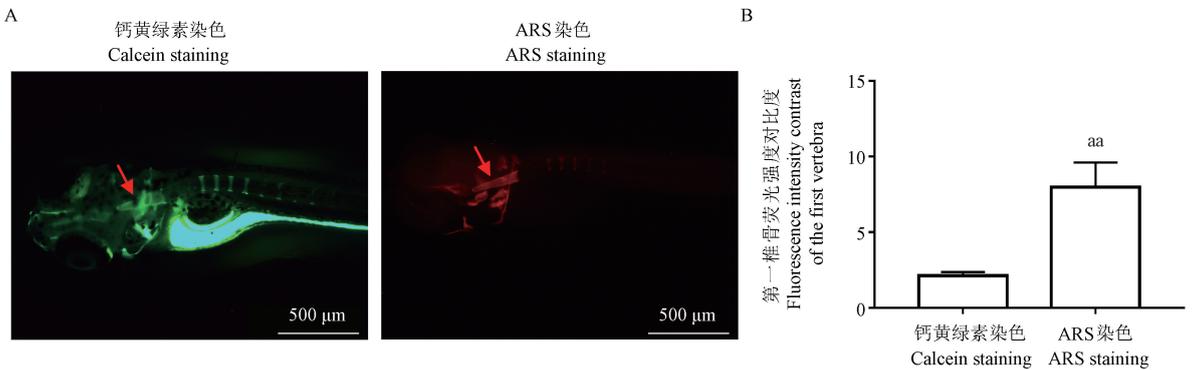
Note. A. Bright field photograph. B. Fluorescent photograph.

Figure 6 Comparison of ARS staining concentration and duration

2.4.2 钙黄绿素与 ARS 染色效果比较

第一椎骨 ARS 染色对比度较钙黄绿素染色升高,具有显著性差异($P < 0.01$) (见图 7)。表明 ARS

对第一椎骨的染色较钙黄绿素灵敏。骨节部位的染色效果显示,ARS 对骨节的染色效果低于钙黄绿素,表明钙黄绿素对骨节部位染色效果较 ARS 灵敏。



注:红色箭头:第一椎骨;与钙黄绿素染色相比,^{aa} $P < 0.01$ 。

图 7 钙黄绿素和 ARS 染色效果比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Red arrow. First vertebra. Compared with calcein staining, ^{aa} $P < 0.01$.

Figure 7 Comparison of calcein and ARS staining efficacy($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3 讨论

斑马鱼作为脊椎动物,其骨形成过程与人类高度相似。幼苗期斑马鱼用于 OP 药物研究具有样品用量少、筛选迅速、准确率高、骨骼易观察等优势,已成为 OP 研究的重要模型生物^[23]。GCs 诱导斑马鱼幼鱼 OP 模型常在 3 dpf 开始给予 Pred 造模,浓度为 10 ~ 25 $\mu\text{mol/L}$ ^[8,24]。但随着浓度升高,斑马鱼死亡率有上升趋势。本研究采用较低浓度进行造模,结果显示 Pred-3 dpf 造模法可成功建立 OP 模型。通过比较 Pred 诱导和 FAC 诱导两种斑马鱼 OP 模型建立方法,发现 Pred-3 dpf 造模法具有优势。为降低死亡率对其进行进一步优化,采用缩短造模时间和模拟临床逐步减量停药的方法^[25],减少 Pred 暴露强度,设计了 Pred-5 dpf 造模法及 Pred-撤药法,结果表明 Pred-撤药法能够稳定建立模型。斑马鱼在 3 dpf 骨骼开始形成^[26],5 dpf 已有部分骨骼形成,因此 5 dpf 时给予 10 $\mu\text{mol/L}$ Pred 进行造模对骨骼的影响不够明显。本研究首次证明 Pred-撤药法既能成功建立 OP 模型,又能显著降低斑马鱼死亡率,且该方法造成的骨形成抑制作用可以被阳性药逆转,因此可以认为 Pred-撤药法是更为稳定可靠的 OP 模型建立方法。

OP 发病机制涉及衰老、激素水平变化、机体代谢变化等多种因素。雌激素水平降低、钙、维生素 D 缺乏等变化可引起 OB 活性降低和破骨细胞(OC)活性升高,从而使骨重塑失衡导致 OP。本研究比较了当前基于斑马鱼模型 OP 研究常用的 3 种阳性药物。双膦酸盐类药物 AL 具有抗骨吸收作用^[27],并可促进 OB 增殖^[28]和分化^[29]、抑制 OB 凋亡^[29-30]。AC 和 CA 是维生素 D 类似物,能够促进肠道对钙的吸收和 OB 活性^[31-32]。在人体内,AC 在肾中被羟基化成 CA。使用维生素 D 类似物的优势在于前药 AC 避免了年龄相关性肝功能下降的影响,而 CA 避免了年龄相关性肝肾功能下降的影响^[33]。本研究表明,在 Pred 诱导的斑马鱼幼鱼 OP 模型中,AC、CA 及 AL 均具有抗 OP 作用,均可作为斑马鱼幼鱼 OP 模型的阳性药。CA 抗 OP 起效剂量更低,不受肝肾功能变化的影响,为斑马鱼幼鱼 OP 模型阳性药物的较优选择。

钙黄绿素可以在斑马鱼体内与钙离子结合,常用于在胚胎发育期标记骨结构^[34]。该方法荧光信号强、染色时间较短,在活体内进行,其能够直观地

观察到新骨生长和骨骼形态结构,是研究骨骼系统的生长和发育、OP、骨折愈合等常用方法。ARS 可通过结合骨骼中丰富的钙结节直接观察骨组织形态结构,显示骨质、骨膜和软骨等组织,能反映斑马鱼骨形成情况,其染色不需在活体中进行,但操作步骤较多、耗时较长。本研究经比较发现,钙黄绿素染色方法对于斑马鱼骨节染色较为灵敏;ARS 染色方法可除去黑色素使鱼体更加透明化,便于第一椎骨的观察。

综上,本研究首次提供了 Pred 逐步撤药造模方法,可以快速、稳定、灵敏地反映药物作用,并对染色方法进行优化,为基于斑马鱼 OP 模型的药理学研究提供了更加可靠、高效的模型工具。

参 考 文 献(References)

- [1] COMPSTON J E, MCCLUNG M R, LESLIE W D. Osteoporosis [J]. *Lancet*, 2019, 393(10169): 364-376.
- [2] DUBALE N M, KAPRON C M, WEST S L. Commentary: zebrafish as a model for osteoporosis-an approach to accelerating progress in drug and exercise-based treatment [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(23): 15866.
- [3] 王成, 龚莉虹, 郭朝成, 等. 模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选中的应用进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(24): 6125-6134.
WANG C, GONG L H, GUO C C, et al. Application progress on model organism zebrafish in screening of pharmacodynamic substances of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(24): 6125-6134.
- [4] GRATACAP R L, WHEELER R T. Utilization of zebrafish for intravital study of eukaryotic pathogen-host interactions [J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 46(1): 108-115.
- [5] GEURTZEN K, VERNET A, FREIDIN A, et al. Immune suppressive and bone inhibitory effects of prednisolone in growing and regenerating zebrafish tissues [J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(12): 2476-2488.
- [6] HE H, WANG C, TANG Q, et al. Possible mechanisms of prednisolone-induced osteoporosis in zebrafish larva [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 981-987.
- [7] 王长梅, 韦英杰, 贾晓斌, 等. 泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松模型的建立 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2013, 15(3): 509-514.
WANG C M, WEI Y J, JIA X B, et al. Zebrafish model of osteoporosis induced by prednisolone [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2013, 15(3): 509-514.
- [8] 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]. *药学报*, 2013, 48(2): 255-260.
WEI Y J, WANG C M, CAI X T, et al. Establishment of zebrafish osteopenia model induced by dexamethasone [J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(2): 255-260.
- [9] XIA D, WU J, XING M, et al. Iron overload threatens the growth of osteoblast cells via inhibiting the PI3K/AKT/FOXO3a/DUSP14 signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 15668-15677.

- [10] YANG J, DONG D, LUO X, et al. Iron overload-induced osteocyte apoptosis stimulates osteoclast differentiation through increasing osteocytic RANKL production *in vitro* [J]. Calcif Tissue Int, 2020, 107(5): 499-509.
- [11] VOSKARIDOU E, TERPOS E. New insights into the pathophysiology and management of osteoporosis in patients with beta thalassaemia [J]. Br J Haematol, 2004, 127(2): 127-139.
- [12] ZHANG W, XU J, QIU J, et al. Novel and rapid osteoporosis model established in zebrafish using high iron stress [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(2): 654-660.
- [13] CHEN B, YAN Y L, LIU C, et al. Therapeutic effect of deferoxamine on iron overload-induced inhibition of osteogenesis in a zebrafish model [J]. Calcif Tissue Int, 2014, 94(3): 353-360.
- [14] 贾婷婷, 雷蕾, 吴歆媛, 等. 二甲双胍对斑马鱼骨骼发育及损伤修复的机制研究 [J]. 遗传, 2022, 44(1): 68-79.
JIA T T, LEI L, WU X Y, et al. Study on the mechanism of metformin on zebrafish skeletal development and damage repair [J]. Hereditas, 2022, 44(1): 68-79.
- [15] YANG F, LIN Z W, HUANG T Y, et al. Ligustilide, a major bioactive component of *Angelica sinensis*, promotes bone formation via the GPR30/EGFR pathway [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6991.
- [16] 陶益, 江恩赐, 姜慧洁, 等. 牛膝炮制品对骨质疏松斑马鱼的影响 [J]. 浙江工业大学学报, 2020, 48(5): 504-507, 525.
TAO Y, JIANG E C, JIANG H J, et al. Effects of raw and salt-processed *Achyranthes bidentata* on osteoporosis in zebrafish [J]. J Zhejiang Univ Technol, 2020, 48(5): 504-507, 525.
- [17] SAITO Y, NAKAMURA S, CHINEN N, et al. Effects of anti-osteoporosis drugs against dexamethasone-induced osteoporosis-like phenotype using a zebrafish scale-regeneration model [J]. J Pharmacol Sci, 2020, 143(2): 117-121.
- [18] YIN H, WANG S, ZHANG Y, et al. Zuogui Pill improves the dexamethasone-induced osteoporosis progression in zebrafish larvae [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 995-999.
- [19] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(3): 281-309.
Chinese Society of Osteoporosis and Bone Mineral Research. Guidelines for the diagnosis and management of primary osteoporosis (2017) [J]. Chin J Osteoporos, 2019, 25(3): 281-309.
- [20] 甘静雯, 邱绍扬, 许忠能, 等. 麻醉剂 MS-222 对斑马鱼行为的影响 [J]. 生态科学, 2006, 25(3): 236-239.
GAN J W, QIU S Y, XU Z N, et al. The effects of MS-222 on behavior of *Danio rerio* [J]. Ecol Sci, 2006, 25(3): 236-239.
- [21] KELLY W L, BRYDEN M M. A modified differential stain for cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuses and small vertebrates [J]. Stain Technol, 1983, 58(3): 131-134.
- [22] FLEMING A, KEYNES R, TANNAHILL D. A central role for the notochord in vertebral patterning [J]. Development, 2004, 131(4): 873-880.
- [23] BERGEN D J M, KAGUE E, HAMMOND C L. Zebrafish as an emerging model for osteoporosis: a primary testing platform for screening new osteo-active compounds [J]. Front Endocrinol, 2019, 10: 6.
- [24] 王曦悦, 张秀艳, 董馨, 等. 斑马鱼骨质疏松模型的研究应用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(6): 901-905, 909.
WANG X Y, ZHANG X Y, DONG X, et al. Research and application of zebrafish osteoporosis model [J]. Chin J Osteoporos, 2021, 27(6): 901-905, 909.
- [25] 季晖. 药理学 [M]. 南京: 东南大学出版社; 2019.
JI H. Pharmacology [M]. Nanjing: South Univ Press; 2019.
- [26] CUBBAGE C C, MABEE P M. Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae) [J]. J Morphol, 1996, 229(2): 121-160.
- [27] PENG M X, JIANG G, HE S, et al. Effects of ginsenoside Rg3 on bone loss, bone mineral density and osteoclast number in glucocorticoid-induced osteoporosis rats, and the likely mechanism of action [J]. Trop J Pharm Res, 2020, 19: 811-815.
- [28] MORELLI S, BILBAO P S, KATZ S, et al. Protein phosphatases: possible bisphosphonate binding sites mediating stimulation of osteoblast proliferation [J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 507(2): 248-253.
- [29] KRÜGER T B, SYVERSEN U, HERLOFSON B B, et al. Targeting a therapeutically relevant concentration of alendronate for *in vitro* studies on osteoblasts [J]. Acta Odontol Scand, 2022, 80(8): 619-625.
- [30] PLOTKIN L I, WEINSTEIN R S, PARFITT A M, et al. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin [J]. J Clin Invest, 1999, 104(10): 1363-1374.
- [31] 沈小利, 张灿芬, 陈璐. 唑来膦酸联合活性维生素 D 及骨化三醇对 2 型糖尿病性骨质疏松症患者骨密度及骨代谢指标的影响 [J]. 浙江医学, 2022, 44(9): 945-949.
SHEN X L, ZHANG C F, CHEN L. Effect of zoledronic acid combined with active vitamin D and calcitriol on bone mineral density and bone metabolic indexes in patients with type 2 diabetic osteoporosis [J]. Zhejiang Med J, 2022, 44(9): 945-949.
- [32] FROLIK C A, DELUCA H F. 1, 25-dihydroxycholecalciferol: the metabolite of vitamin D responsible for increased intestinal calcium transport [J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 147(1): 143-147.
- [33] O' DONNELL S, MOHER D, THOMAS K, et al. Systematic review of the benefits and harms of calcitriol and alfacalcidol for fractures and falls [J]. J Bone Miner Metab, 2008, 26(6): 531-542.
- [34] 尹恒, 王建伟, 马勇, 等. 斑马鱼动物模型在骨骼疾病研究中的应用现状分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(8): 1097-1102.
YIN H, WANG J W, MA Y, et al. Analysis of current situation of zebrafish model in bone research [J]. Chin J Osteoporos, 2018, 24(8): 1097-1102.