

基于斑马鱼模型的朝鲜淫羊藿抗骨质疏松活性部位筛选

詹扬^{1,2}, 韦英杰^{1,2*}, 孙娥¹, 王丹丹^{1,2}, 景莉君¹, 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, 国家中医药管理局中药口服释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028
2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

摘要: **目的** 利用泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型筛选朝鲜淫羊藿抗骨质疏松活性部位, 探讨斑马鱼骨质疏松模型的适用性与合理性。**方法** 将受精后4 d的斑马鱼幼鱼暴露在25 μmol/L泼尼松龙模型药物组, 含25 μmol/L泼尼松龙的15 μg/mL依替膦酸二钠阳性药物组, 0.5% DMSO 溶媒对照组、含25 μmol/L泼尼松龙的朝鲜淫羊藿总提物(生药0.1、1.0、10.0、100.0 μg/mL)及其大孔树脂水及30%、50%、70%、90%乙醇洗脱部位(生药1.0、10.0、100.0、1 000.0 μg/mL)溶液组, 28.5 °C下在24孔板中培养, 每天换液至第9天处死。采用茜素红对各组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** 与对照组相比, 模型组斑马鱼头部骨骼染色面积和染色光密度值显著减少; 与模型组比较, 除朝鲜淫羊藿大孔树脂水洗脱部位外, 朝鲜淫羊藿总提物及30%、50%、70%、90%乙醇洗脱部位的斑马鱼头部骨骼染色面积和染色光密度值显著增加。色谱分析表明30%、50%、70%、90%乙醇分离部位主要含黄酮类成分和少量非黄酮类化合物。**结论** 斑马鱼骨质疏松模型成功用于高效筛选朝鲜淫羊藿的抗骨质疏松活性部位, 具简单、高效及可操作性强的优势。

关键词: 斑马鱼; 骨质疏松; 朝鲜淫羊藿; 活性部位; 筛选

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)14-2036-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.015

Screening on antiosteoporotic active parts of *Epimedium koreanum* based on zebrafish model

ZHAN Yang^{1,2}, WEI Ying-jie^{1,2}, SUN E¹, WANG Dan-dan^{1,2}, JING Li-jun¹, JIA Xiao-bin¹

1. Key Laboratory of Oral Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Science, Nanjing 210028, China
2. Department of Pharmaceutics, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: Objective Prednisolone-induced osteoporosis model using zebrafish was used to screen the antiosteoporotic active parts of *Epimedium koreanum*, and to investigate the applicability and rationality of the zebrafish model of osteoporosis. **Methods** Zebrafish larva at 4 d post fertilization were exposed with 25 μmol/L prednisolone (model group), 15 μg/mL etidronate disodium with 25 μmol/L prednisolone (positive group), 0.5% DMSO (vehicle control group), *E. koreanum* extracts (crude drug 0.1, 1.0, 10.0, and 100.0 μg/mL) with 25 μmol/L prednisolone, and their water and 30%, 50%, 70%, and 90% ethanol elution parts of macroporous resin (crude drug 1.0, 10.0, 100.0, and 1 000.0 μg/mL). All groups were incubated in 24-well plates (28.5 °C) for 9 d until execution, and then zebrafish skeleton was anesthetized and fixed for staining with alizarin red. Quantitative analysis of the stained area was performed by microscopic inspection and digital imaging methods to reflect the amount of zebrafish head skeleton mineralization. **Results** The head skeleton mineral area and integrated optical density (IOD) of 25 μmol/L prednisolone model group were significantly decreased when compared with vehicle control group, and *E. koreanum* extract and its 30%, 50%, 70%, and 90% ethanol elution parts of macroporous resin could rescue the further bone loss of zebrafish induced by prednisolone when compared with model group. HPLC analysis indicated that the components of 30%, 50%, 70%, and 90% ethanol elution parts of macroporous resin mainly included flavonoids and minor nonflavonoids components. **Conclusion** This novel osteoporosis zebrafish model is successfully used to screen the antiosteoporotic active parts of *E. koreanum*, which has the advantages of simplicity, high efficiency, and easy to perform.

Key words: zebrafish; osteoporosis; *Epimedium koreanum* Nakai; bioactive parts; screening

收稿日期: 2013-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973978, 81274088); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2011866, BK20141507, BK2011866); 江苏省第十批“六大人才高峰”(2013-YY006)

作者简介: 詹扬(1989—), 女, 硕士研究生。Tel: 15905168720 E-mail: ZY20071101@163.com

*通信作者 韦英杰(1970—), 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中药物质基础与质量控制研究。Tel: (025)85637809 E-mail: wyj970@163.com

我国拥有丰富、种类繁多的壮骨中药资源,中药成分相比化学药副作用小,但其具有复杂的药用形式,除单体化合物外,有效部位、提取物等均为由大量化学成分构成的复杂成分体系,为壮骨中药药效筛选带来了很大困难。斑马鱼与哺乳动物骨骼生长发育的分子机制高度相似,而且近年来越来越多的调节哺乳动物骨骼发育关键基因的同源基因在斑马鱼基因组中被发现^[1],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^[2-3]。本课题组用地塞米松和泼尼松龙诱导并建立斑马鱼骨质疏松模型,并用其验证依替膦酸二钠(etidronate disodium, Eti)、鲑鱼降钙素的抗骨质疏松活性^[4-5]。该模型具有在体化、微板化,简单、高效的特点,其能否有效用于中药抗骨质疏松活性筛选,相关实验支持具有重要意义。

淫羊藿 *Epimedii Folium* 是一种传统知名的补肾壮骨中药,现代研究表明其对骨质疏松症的防治疗效确切,其中淫羊藿黄酮类成分为主要壮骨成分^[6-8]。本研究选择朝鲜淫羊藿为代表中药,以泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型评价朝鲜淫羊藿提取物及其大孔树脂分离不同部位的抗骨质疏松活性,以探讨该模型用于中药抗骨质疏松活性筛选的合理性与适用性。

1 材料与仪器

朝鲜淫羊藿(亳州市千草药业饮片厂提供,批号 20080829),经南京中医药大学吴德康教授鉴定为朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 的干燥叶;淫羊藿苷(中国食品药品检定研究院,批号 110737-200415);朝藿定 A、B、C 和宝藿苷 I(自制^[9-10],经 HPLC 检测质量分数均 $\geq 98\%$);泼尼松龙(苏州亚科化学试剂股份有限公司,批号 YK2012020101);依替膦酸二钠(中国食品药品检定研究院,批号 101174-201001);二甲基亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司,批号 20120331);多聚甲醛(成都市科龙化工试剂厂,批号 20100504);间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222, Acros Organics,批号 A0288328);茜素红 S(郑州四季化工产品有限公司,批号 Sj20110806);D-101 大孔吸附树脂(天津农药股份有限公司树脂分公司);水为 Milli-Q system 高纯水(Millipore, Bedford, MA, 美国);乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司),其余试剂均为分析纯。

ZEISS 荧光倒置显微镜 AxioVision Rel 4.8 (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);Image Pro Plus 6.0 专业图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司);Agilent 1100 型系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

斑马鱼成鱼由南京大学模式动物研究所提供,来自德国 *tuebingen* 品系。

2 方法

2.1 药物溶液的配制

2 500 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙储备液配制:精密称取泼尼松龙 9.13 mg,加入 DMSO 1.5 mL,用培养基^[4]稀释并定容至 10 mL,即得。

25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙溶液配制:取 2 500 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙储备液 0.5 mL,加入适量 DMSO 后,用培养基稀释并定容至 50 mL,得 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙溶液。

朝鲜淫羊藿总提取物(以下简称总提物):称取朝鲜淫羊藿药材 100 g,用 80%乙醇提取 2 次,每次 3 h,滤过合并提取液,回收乙醇并浓缩至 100 mL,即得到生药 1 g/mL 总提物,备用。临用前配制成含 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙的生药 0.1、1.0、10.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的总提物溶液,各溶液均含 0.5% DMSO。

总提物的大孔树脂分离部位(以下简称分离部位)制备:取适量 D-101 树脂装柱,先用 95%乙醇冲洗,再用纯水冲洗至无醇味,上样 5 mL 总提物(相当于 5 g 生药),依次用水及 30%、50%、70%、90%乙醇洗脱,每个梯度冲 5 个柱体积,分别接收各部分的溶液,浓缩至无醇味。临用前,将水及 30%、50%、70%、90%乙醇洗脱部位分别用培养基配制成含 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙的 1.0、10.0、100.0、1 000.0 $\mu\text{g/mL}$ 溶液(质量浓度以生药计),各溶液均含 0.5% DMSO。

2.2 总提物及分离部位的色谱分析

色谱条件:Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Agilent)和 C₁₈ 预柱(12.5 mm \times 4.6mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱程序:0~10 min, 10%~23% A; 10~35 min 23%~26% A; 35~65 min, 26%~48% A; 65~80 min, 48%~80% A; 80~85 min, 80%~100% A; 85~90 min, 100% A;进样量 20 μL ;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 272 nm;运行时间 90 min。

总提取物及分离部位供试液：取“2.1”项下 1.0 g/mL 的总提取物适量以及水和 30%、50%、70%、90%乙醇分离部位，用 90%甲醇分别配制成相当于生药 0.01 g/mL 的供试液，进样 20 μ L 进行色谱分析。

2.3 朝鲜淫羊藿对泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松防治作用

取受精后 4 d 斑马鱼幼鱼置 24 孔板，随机分为对照组（0.5% DMSO），泼尼松龙（25 μ mol/L）模型组，含 25 μ mol/L 泼尼松龙的依替磷酸二钠阳性对照组，含 25 μ mol/L 泼尼松龙的总提取物（生药 0.1、1.0、10.0、100.0 μ g/mL）组，含 25 μ mol/L 泼尼松龙的水和 30%、50%、70%、90%乙醇分离部位（生药 1.0、10.0、100.0、1 000.0 μ g/mL）组，每组设 3 个孔，每孔 6 条幼鱼。28.5 $^{\circ}$ C 恒温培养，每天换药，培养至受精后 9 d，将各组斑马鱼用 MS-222 麻醉处死，多聚甲醛固定后进行茜素红染色，用 ZEISS 荧光倒置显微镜采集图像，用专业图像处理软件 Image Pro Plus 6.0 计算骨骼染色面积和累积光密度，进行骨矿化定量分析。

2.4 数据分析

统计分析应用 SPSS 16.0 软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 One-Way ANOVA 分析。各组间两两比较采用 LSD 法， $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果与分析

3.1 HPLC 色谱分析结果

总提取物及分离部位的 HPLC 色谱图见图 1。根据已知文献结合部分对照品对照^[11-12]，推测 30%乙醇部位以非黄酮类成分为主，如木脂素类及 9, 10-二氢菲类成分，50%乙醇洗脱部位以二糖和三糖的黄酮苷类成分为主，如朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷，70%乙醇部位以单糖和二糖的黄酮苷类为主，如宝藿苷 I，90%乙醇部位则以单糖的黄酮苷类为主。

3.2 总提取物对泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松的防治作用

各组受精后 9 d 斑马鱼的腹面头骨茜素红染色的显微成像图见图 2。从图中可以看出模型组较对照组斑马鱼头骨茜素红染色矿化面积显著减少，说明泼尼松龙成功诱导斑马鱼骨质疏松；依替磷酸二钠组较模型组斑马鱼头骨茜素红染色矿化面积显著增多，依替磷酸二钠作为阳性药物可对抗泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松。

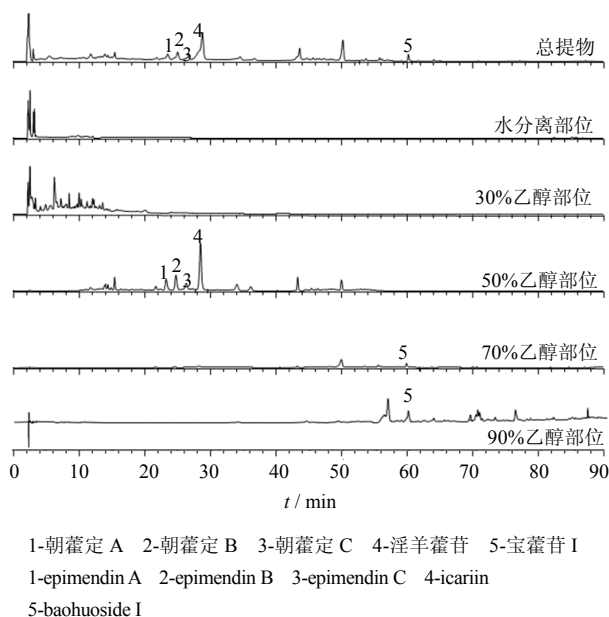


图 1 朝鲜淫羊藿总提取物及分离部位 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of total extract and parts from *E. koreanum*

总提取物组斑马鱼头骨茜素红染色矿化面积与模型组比较相对增加。由定量分析结果（图 3）可见，与模型组比较，总提取物 100.0 μ g/mL 时，斑马鱼头骨染色面积之和及累积光密度显著升高（ $P < 0.05$ ），提示 100.0 μ g/mL 总提取物可对抗泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松。

3.3 分离部位对泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松的防治作用

从图 2 中可以看出除水分离部位组外，30%、50%、70%、90%乙醇分离部位组斑马鱼头骨矿化面积及累积光密度较模型组相对增加。

各组斑马鱼受精后 9 d 腹面头骨茜素红染色的矿化面积之和及累积光密度值见图 3。可以看出 30%乙醇部位 1.0 μ g/mL 组的累积光密度值、50%乙醇部位 10.0、1 000.0 μ g/mL 组矿化面积之和及累积光密度值、70%乙醇部位 100.0 μ g/mL 组矿化面积之和及累积光密度值、90%乙醇部位 100.0 μ g/mL 组矿化面积之和及累积光密度值与模型组相比具有显著性差异（ $P < 0.05$ ）；30%乙醇部位 10.0 μ g/mL 组的累积光密度值、50%乙醇部位 100.0 μ g/mL 组矿化面积之和及累积光密度值、70%乙醇部位 10.0 μ g/mL 组矿化面积之和及累积光密度值、90%乙醇部位 1 000.0 μ g/mL 组矿化面积之和及累积光密度值与模型组相比具有极显著性差异（ $P < 0.01$ 、0.001）。结果提示除了水洗部位外，30%、50%、70%、90%乙醇分离部位均可阻止泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松。

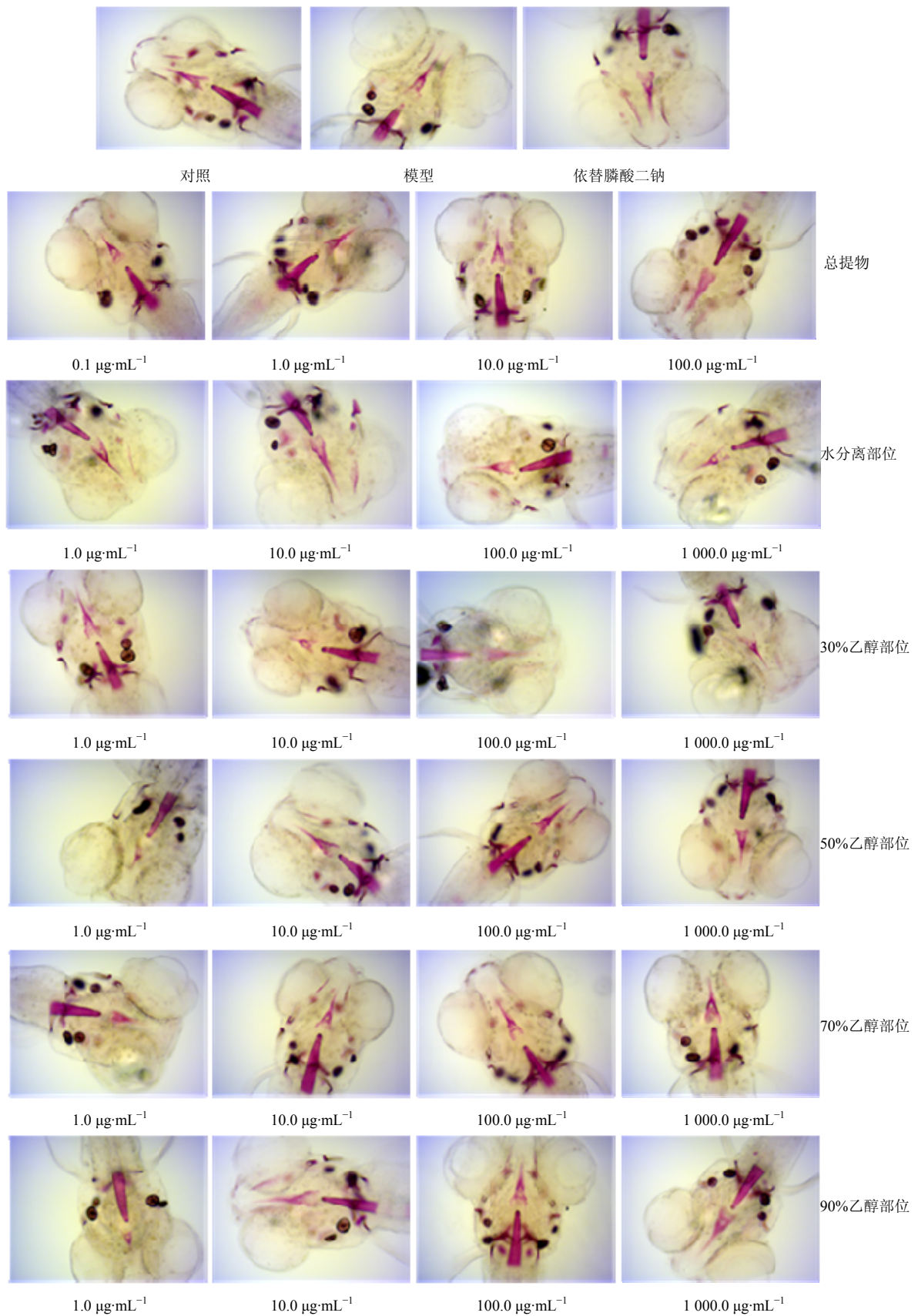
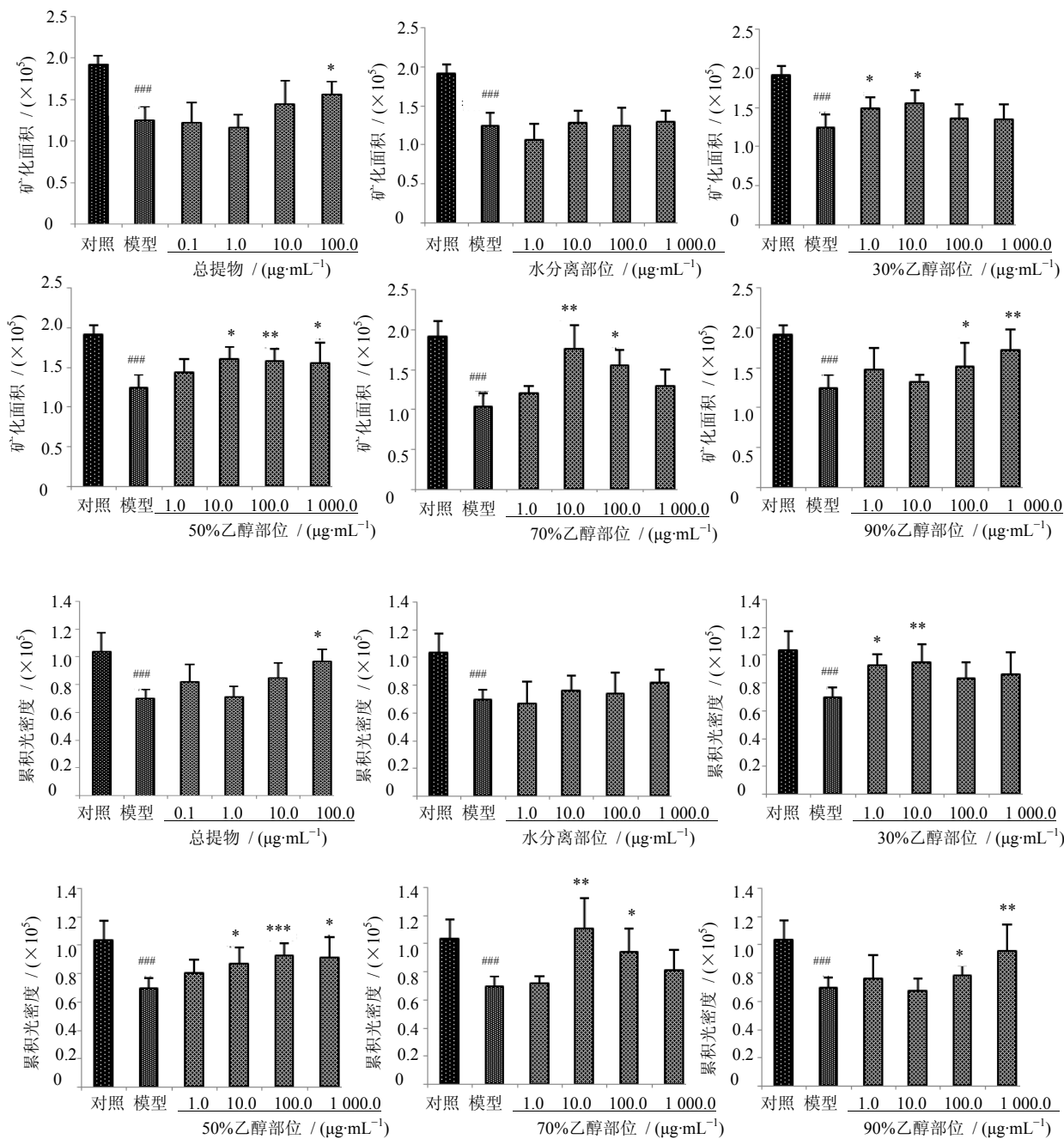


图2 各组受精后9 d斑马鱼幼鱼的腹面头骨茜素红染色的显微成像图

Fig. 2 Whole-mount preparations of ventral skull of zebrafish larva at 9 d post fertilization by alizarin red staining



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
 ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs prednisolone group

图3 朝鲜淫羊藿总提物和分离部位对斑马鱼幼鱼头骨茜素红染色面积之和及累积光密度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
 Fig. 3 Effect of total extract and separate fractions of *E. koreanum* on alizarin red staining area and integrated optical density of zebrafish larvae skull ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

本实验以前期研究^[5]为基础,用 25 $\mu\text{mol/L}$ 泼尼松龙诱导斑马鱼骨质疏松。并用该模型评价了传统壮骨中药朝鲜淫羊藿总提物的抗骨质疏松活性,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^[13-14];在此基础上,进一步应用该模型评价了朝鲜淫羊藿总提物的大孔树脂分离不同部位的抗骨质疏松活性,结果表明,除了水洗脱部位无活性外,30%、50%、70%、90%乙醇分离部位均有一定的抗骨质疏松活性,30%乙醇部位以非黄

酮类成分为主, 50%、70%、90%乙醇分离部位主要含黄酮类成分, 提示朝鲜淫羊藿抗骨质疏松活性成分主要为黄酮类成分, 尚含其他如木脂素类及9, 10-二氢菲类等少量成分, 这与最新的朝鲜淫羊藿活性部位筛选报道结论具一致性^[15], 说明斑马鱼模型用于中药抗骨质疏松活性筛选具可行性与合理性。

目前, 利用斑马鱼作为整体动物药效筛选模型已成为斑马鱼研究的热点之一。斑马鱼幼鱼骨骼发育具有骨形成和骨吸收的完整体系, 用泼尼松龙诱导的斑马鱼骨质疏松模型实现在体化、微板化。该模型克服传统哺乳动物骨质疏松模型耗时长、效率差、灵敏度低、用药量大的缺陷, 避免原代骨细胞模型条件苛刻度, 操作复杂, 作用环节单一等不足, 为抗骨质疏松中药的活性筛选提供简单、高效新方法。

参考文献

- [1] Li N, Felber K, Elks P, *et al.* Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation [J]. *Dev Dyn*, 2009, 238(2): 459-466.
- [2] 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.
- [3] Kim S N, Bae S J, Kwak H B, *et al.* *In vitro* and *in vivo* osteogenic activity of licochalcone A [J]. *Amino Acids*, 2012, 42(4): 1455-1465.
- [4] 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]. *药学学报*, 2013, 48(2): 255-260.
- [5] 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.
- [6] Wei H, Zi L L, Yuan L C, *et al.* Effect of icariin on bone formation during distraction osteogenesis in the rabbit mandible [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2011, 40(4): 413-418.
- [7] Zhang G, Wang X L, Sheng H, *et al.* Constitutional flavonoids derived from Epimedium dose-dependently reduce incidence of steroid-associated osteonecrosis not via direct action by themselves on potential cellular targets [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6419.
- [8] 杨 丽, 朱晓峰, 王攀攀, 等. 淫羊藿水提取物对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化的影响及其机制 [J]. *中草药*, 2013, 44(22): 3182-3187.
- [9] 崔 莉, 孙 娥, 王静静, 等. 中压制备系统联合自动纯化系统制备淫羊藿中的朝藿定 A, B, C 对照品 [J]. *南京中医药大学学报*, 2013, 29(1): 60-62.
- [10] 蒋艳荣, 张振海, 孙 娥, 等. 酶解淫羊藿总黄酮制备宝藿昔 I [J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(4): 260-263.
- [11] 朱粉霞, 赵永刚, 贾晓斌, 等. 淫羊藿炮制前后 UPLC-PDA-MS 的指纹图谱研究 [J]. *化学学报*, 2012, 70(5): 635-642.
- [12] 吕 磊, 张 海, 赵 亮, 等. RRLC-TOF/MS 快速鉴别中药淫羊藿中 43 种化学成分 [J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32(3): 306-310.
- [13] Peng S, Zhang G, He Y, *et al.* Epimedium-derived flavonoids promote osteoblastogenesis and suppress adipogenesis in bone marrow stromal cells while exerting an anabolic effect on osteoporotic bone [J]. *Bone*, 2009, 45(3): 534-544.
- [14] 裴玉岩, 张海亮, 刘继光, 等. 淫羊藿对骨质疏松大鼠下颌骨骨量变化的影响 [J]. *医药论坛杂志*, 2010(11): 57-59.
- [15] 江 芳. 朝鲜淫羊藿中抗骨质疏松活性成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.