

多花黄精多糖对斑马鱼 2 型糖尿病合并骨质疏松症模型的药效学研究

曹语珈¹, 王 凯^{2#}, 王子丽¹, 边金焕³, 安礼友³, 许舒雯^{2*}, 龚祝南^{1,3*}

1. 南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210046

2. 安徽省科学技术研究院, 安徽 合肥 230031

3. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046

摘要: **目的** 研究多花黄精多糖对斑马鱼幼鱼 2 型糖尿病合并骨质疏松症的作用。**方法** 用链脲佐菌素和泼尼松龙建立斑马鱼幼鱼 2 型糖尿病合并骨质疏松症模型, 设置对照组、模型组、二甲双胍+依替膦酸二钠组和多花黄精多糖 (60、120、240 $\mu\text{g/mL}$) 组, 考察药物对斑马鱼早期发育毒性的影响; 采用试剂盒测定各组幼鱼组织的糖含量; 采用茜素红染色法考察各组斑马鱼头骨矿化面积和骨密度; 采用 qRT-PCR 法检测各组斑马鱼骨质疏松相关基因 Runx 家族转录因子 2b (Runx family transcription factor 2b, *Runx2b*)、Sp7 转录因子 (Sp7 transcription factor, *Sp7*)、I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (collagen type I $\alpha 2$, *col1a2*)、富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白因子 (cysteine-rich acidic secreted protein, *sparc*) 和维生素 D 受体 b (vitamin D receptor b, *vdrb*) mRNA 表达情况。**结果** 显微注射链脲佐菌素和浸泡泼尼松龙能够提高幼鱼组织糖浓度, 降低头骨矿化面积和骨密度。与模型组比较, 多花黄精多糖显著上调斑马鱼幼鱼 2 型糖尿病合并骨质疏松症模型 *Runx2b*、*Sp7*、*vdrb*、*sparc*、*col1a2* mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 多花黄精多糖对斑马鱼幼鱼 2 型糖尿病合并骨质疏松症模型有较好的降血糖及抗骨质疏松症作用。

关键词: 斑马鱼; 多花黄精; 多糖; 糖尿病; 骨质疏松

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)21-6545-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.012

Pharmacodynamics study of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneura* on zebrafish model with type 2 diabetic and osteoporosis

CAO Yu-jia¹, WANG Kai², WANG Zi-li¹, BIAN Jin-huan³, AN Li-you³, XU Shu-wen², GONG Zhu-nan^{1,3}

1. School of Food and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

2. Anhui Academy of Science and Technology, Hefei 230031, China

3. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To study the effect of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneura* (PSP) on type 2 diabetes and osteoporosis in juvenile zebrafish. **Methods** A zebrafish juvenile type 2 diabetes model with osteoporosis was established with streptozotocin and prednisolone, which were divided into control group, model group, metformin + etidronate disodium group and PSP (60, 120, 240 $\mu\text{g/mL}$) groups, the effect of drugs on early developmental toxicity of zebrafish was investigated; Kit was used to determine the sugar content of juvenile fish tissues in each group; Alizarin red staining method was used to investigate the mineralized area and bone mineral density in bones of zebrafish in each group; qRT-PCR was used to detect osteoporosis-related genes Runx family transcription factor 2b (*Runx2b*), Sp7 transcription factor (*Sp7*), type I collagen $\alpha 2$ (*col1a2*), cysteine-rich acidic secreted protein (*sparc*) and vitamin D receptor b (*vdrb*) mRNA expressions in zebrafish. **Results** Microinjection of streptozotocin and immersion of prednisolone increased the sugar concentration of juvenile fish tissues, reduced the mineralized area and bone density of skull.

收稿日期: 2021-04-13

基金项目: 安徽省博士后研究人员科研活动经费资助项目 (2020A396); 安徽省 2020 年度中央引导地方科技发展专项项目 (202007d06020007)

作者简介: 曹语珈 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学。Tel: 13814780060 E-mail: caoyujiaguodong@hotmail.com

*通信作者: 许舒雯, 研究员。E-mail: shuwne_xu@163.com

龚祝南, 教授, 硕士生导师。E-mail: gongzhunan@njnu.edu.cn

#共同第一作者: 王 凯 (1987—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为数据分析、科研管理。

Tel: 17730201081 E-mail: woyun_2002@163.com

Compared with model group, PSP significantly up-regulated mRNA expression levels of *Runx2b*, *Sp7*, *vdrb*, *sparc* and *col1a2* in zebrafish juvenile type 2 diabetes mellitus with osteoporosis model ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). **Conclusion** PSP has a good hypoglycemic and anti-osteoporosis effect on zebrafish juvenile with type 2 diabetes and osteoporosis.

Key words: zebrafish; *Polygonatum cyrtoneura* Hua; polysaccharide; type 2 diabetes; osteoporosis

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢紊乱性疾病^[1], 高血糖可增加晚期糖基化终端产物的蓄积, 抑制成骨细胞的形成, 激活破骨细胞, 成骨细胞和破骨细胞的平衡被打破, 影响骨的正常形成, 从而导致骨质疏松的发生, 因此 2 型糖尿病患者很容易产生骨质疏松这一并发症^[2-3]。现代医学采用降糖、促进骨生成、抗氧化等常规治疗, 均存在不足与局限, 而中药治疗具有显著的潜力和优势, 正逐渐被接受和使用。黄精系药食同源的多年生草本植物, 具有补气养阴、健脾、润肺、益肾之效^[4]。现代药理学研究表明, 黄精的主要成分黄精多糖具有降血糖、调血脂、抗肿瘤、抑菌、抗炎、抗病毒、增强免疫等作用^[5]。多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua 属天门冬科黄精属植物, 与滇黄精、黄精一同收录于《中国药典》2020 年版^[6]。目前, 多花黄精多糖的降血糖合并骨质疏松症研究鲜有报道。

本研究通过分析多花黄精多糖对 2 型糖尿病合并骨质疏松症斑马鱼幼鱼模型的组织糖含量、骨骼矿化面积、积累光密度^[7]和骨代谢相关因子表达等影响, 来评价多花黄精多糖对糖尿病合并骨质疏松的作用, 以期为后续研究提供参考。

1 材料

1.1 动物

AB 系野生型斑马鱼购自上海费曦生物科技有限公司。

1.2 药材

黄精于 2016 年 7 月采自安徽省青阳县九华山地区, 经南京师范大学生命科学院龚祝南教授鉴定为天门冬科植物多花黄精 *P. cyrtoneura* Hua 的根茎。

1.3 药品与试剂

多花黄精多糖(批号 20191113)由安徽省科学技术研究院提供; *Runx* 家族转录因子 2b (*Runx* family transcription factor 2b, *Runx2b*)、*Sp7* 转录因子 (*Sp7* transcription factor, *Sp7*)、I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (collagen type I $\alpha 2$, *col1a2*)、富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白质因子 (cysteine-rich acidic secreted protein, *sparc*)、维生素 D 受体 b (vitamin D receptor b, *vdrb*)、 β -actin 引物由生工生物工程(上海)股

份有限公司合成; 链脲佐菌素(批号 20191022)购自广州赛国生物科技有限公司; 泼尼松龙(批号 c10788051)、盐酸二甲双胍(批号 c10440628)购自上海麦克林生化科技有限公司; 依替膦酸二钠(批号 20191015)购自中国药品生物制品检定所; 茜素红 S(批号 20191203)、柠檬酸(批号 20190409)购自国药集团化学试剂有限公司; 柠檬酸钠(批号 190311-1)购自西陇科学股份有限公司; QuantiChrom™ Glucose Assay Kit 葡萄糖测试盒购自北京群晓科苑生物技术有限公司。

1.4 仪器

恒温光照培养箱(宁波东南仪器有限公司); IM-9B 型手动斑马鱼显微注射泵(日本 Narishige 公司); qRT-PCR 仪(瑞士 Roche 公司); EVOS 新型显微镜细胞成像系统(美国 Life Technologies 公司)。

2 方法

2.1 多花黄精多糖的制备

多花黄精经洗净烘干, 切片, 粉碎成 60 目, 备用。取 0.5 kg 多花黄精粉末加入 5 倍量水, 85 °C 水浴回流提取 2 次, 2 h/次, 滤过, 取滤液, 恒温水浴浓缩至一定体积, 滤过除渣。所得滤液加 3 倍量 100%乙醇, 于 4 °C 放置 24 h, 抽滤后减压干燥得沉淀, 冷冻干燥所得粉末即为黄精粗多糖。由安徽省科学技术研究院提取并检测, 采用苯酚硫酸法测定多花黄精粗多糖的质量分数为 63.7%^[8]。

2.2 实验培养液及药液的制备

2.2.1 10×E3 斑马鱼胚胎培养液的制备 称取 NaCl 1 462.5 mg、KCl 63.325 mg、CaCl₂ 242.583 mg、MgSO₄ 198 mg, 加入适量单蒸水溶解, 超声 20 min, 待全部溶解后移入 500 mL 量瓶中, 定容, 于 4 °C 保存备用, 后续用单蒸水稀释 10 倍使用。

2.2.2 500 μg/mL 链脲佐菌素母液的制备 称取 0.015 g 链脲佐菌素粉末, 加入适量纯净水溶解, 超声 5 min, 保存备用。

2.2.3 1 mg/mL 盐酸二甲双胍母液的制备 称取 0.025 g 盐酸二甲双胍粉末, 加入适量纯净水溶解, 超声 5 min, 保存备用。

2.2.4 120 μg/mL 泼尼松龙母液的制备 称取 2.6 mg

泼尼松龙粉末，滴加微量二甲基亚砜（DMSO）使其溶解后，再加入适量纯净水，磁力搅拌器搅拌 3 min，保存备用。

2.2.5 180 $\mu\text{g/mL}$ 依替膦酸二钠母液的制备 称取 6.3 mg 依替膦酸二钠固体，加入适量纯净水溶解，超声 5 min，保存备用。

2.2.6 480 $\mu\text{g/mL}$ 多花黄精多糖母液的制备 称取 16.8 mg 多花黄精多糖粉末，加入适量纯净水溶解，超声 10 min，保存备用。

2.3 药物对斑马鱼早期发育毒性的影响

挑选受精后第 2 天（2 dpf）的斑马鱼胚胎，置 24 孔板，每孔 6 个胚胎，设置对照组、链脲佐菌素（50、100、200、300、400、500 $\mu\text{g/mL}$ ）、泼尼松龙（5、10、20、40、80、120 $\mu\text{g/mL}$ ）、二甲双胍（50、100、200、400、800、1000 $\mu\text{g/mL}$ ）、依替膦酸二钠（30、60、90、120、150、180 $\mu\text{g/mL}$ ）和多花黄精多糖（80、160、240、320、400、480 $\mu\text{g/mL}$ ）组，设置 3 个平行复孔，于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养。每 3 天换 1 次液，给药周期为 8 d，每 8 小时观察幼鱼的状态，发现死亡的鱼卵或幼鱼及时挑出，4 dpf 通过 EVOS 新型显微镜细胞成像系统观察斑马鱼给药后的形态变化，计算胚胎孵化率和死亡率，绘制最佳“死亡率-浓度”效应曲线，用 GraphPad Prism 6.0 软件拟合得出半数致死浓度（half lethal concentration, LC_{50} ）值^[9]。

胚胎孵化率 = 孵化的胚胎数量 / 总胚胎数量

胚胎死亡率 = 死亡胚胎数量 / 总胚胎数量

2.4 斑马鱼幼鱼 2 型糖尿病合并骨质疏松症模型的建立和给药

选择 2 dpf 的斑马鱼胚胎放置在琼脂糖鱼卵固定板上，采用显微注射方式在卵黄囊部位注射 2 nL 链脲佐菌素（200 $\mu\text{g/mL}$ ），注射完成的胚胎立即放回 E3 培养液，以免停留时间过久导致胚胎死亡，影响死亡率。注射后每 8 小时观察，移除脱下的卵黄膜，4 dpf 后转移到 24 孔板中（6 尾/孔）并采用

直接浸泡泼尼松龙（10 $\mu\text{g/mL}$ ）方式造模。置 24 孔板，6 尾/孔，设置对照组、模型组、二甲双胍（150 $\mu\text{g/mL}$ ）+依替膦酸二钠（30 $\mu\text{g/mL}$ ）组和多花黄精多糖（60、120、240 $\mu\text{g/mL}$ ）组，每组 90~100 尾。培养周期为 4 d，隔 2 d 换新液体，直至 8 dpf。

2.5 幼鱼组织的糖含量测定

由于无法在幼鱼身上获得血液样本，因此测定整个鱼体匀浆中的糖含量。给药后 4 dpf 和 8 dpf 的斑马鱼幼鱼每组各取 30 尾，加入 200 μL 冰 PBS 溶液充分研磨，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min，采用 QuantiChrom™ Glucose Assay Kit 葡萄糖测试盒进行测定。

2.6 斑马鱼矿化骨骼定量分析

取培养至 8 dpf 的斑马鱼幼鱼置于培养皿中，加入 4% 多聚甲醛，4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜；用磷酸盐吐温缓冲液（PBST）洗 3 遍，用 0.5% KOH 和 3% H_2O_2 的漂白剂脱色 30 min 至斑马鱼无黑色素，去除漂白剂后，加入 4% 多聚甲醛，4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜；PBST 清洗 3 次，甲醇梯度洗脱，置换 20% DMSO-80% 甲醇，于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存；4 h 后复水和染色，用 PBST 洗 3 遍，于 0.5% KOH 配制的茜素红染液中染色过夜，室温避光孵育 12 h 以上，去除染色液，用 PBST 洗 3 遍，再更换为 80% 甘油，避光保存，于显微镜下拍照，采用 Image pro plus 6.0 软件分析头部骨骼染色面积和骨密度。

2.7 qRT-PCR 检测骨质疏松相关基因 mRNA 表达

从对照组、模型组、二甲双胍+依替膦酸二钠组和多花黄精多糖（60、120、240 $\mu\text{g/mL}$ ）组选取 25 尾 8 dpf 斑马鱼幼鱼，按照试剂盒说明书提取斑马鱼组织总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

2.8 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 GraphPad Prism 6.0、Image Pro Plus 6.0 和 Photoscape 软件进行分析和作图，模型组和给药组间采用单因素方差分析。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
<i>β-actin</i>	CAAACGAACGACCAACCTAAAC	GTTAGACAACCTACCTCCCTTTCC
<i>Runx2b</i>	GCCAAACGCAGATTACAGATCC	GAGTGGTGGAGTGAACCGAC
<i>Sp7</i>	CTACCACCGGGAGGTCTTCT	TGCGAGGCTTTACCGTACAC
<i>col1a2</i>	CAAGGAGTCTGCATGTCGGT	TCCCTTAGGACCCCTCTCAC
<i>sparc</i>	AAGCCATTGAGGTCGTGGAG	TGTTAGTGCCGCAGACATGC
<i>vdrb</i>	TTTCACGCTTCAGACCTCCAG	AAGCCCTGCTCCTGGTACAT

3 结果

3.1 斑马鱼早期发育死亡率和孵化率

选取 2 dpf 斑马鱼胚胎给药, 培养 7 d 得出链脲佐菌素、泼尼松龙、二甲双胍、依替膦酸二钠和多花黄精多糖对斑马鱼幼鱼的 LC_{50} (表 2)。从图 1 可以看出, 480 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多花黄精多糖给药后斑马鱼很快死亡, 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多花黄精多糖给药 5 d 后斑

表 2 各药物对斑马鱼幼鱼的 LC_{50} 值 (6 dpf)

Table 2 LC_{50} value of drugs to zebrafish juvenile (6 dpf)

药物	$LC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
链脲佐菌素	243.8
二甲双胍	640.0
泼尼松龙	33.51
依替膦酸二钠	122.8
多花黄精多糖	295.8

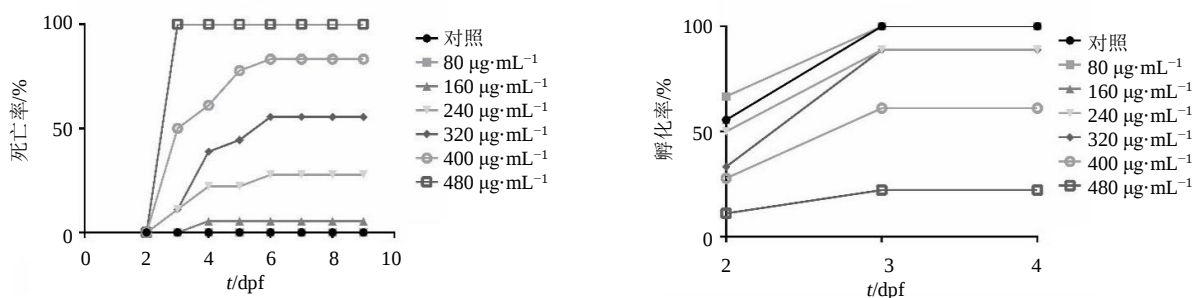


图 1 多花黄精多糖对斑马鱼死亡率和孵化率的影响

Fig. 1 Effect of polysaccharide from *P. cyrtoneura* on mortality and hatching rate of zebrafish

马鱼出现明显死亡且死亡率较低, 并且在 6 dpf 之后死亡率保持不变; 斑马鱼孵化率在 3~4 dpf 时保持不变。

3.2 多花黄精多糖对斑马鱼幼鱼形态和心脏毒性的影响

4 dpf 斑马鱼鱼卵已经发育成熟, 幼鱼将从绒毛膜中孵化出, 同时心脏已经发育^[10], 因此选择 4 dpf 时间点进行毒性暴露和心脏毒性分析。图 2 清晰地

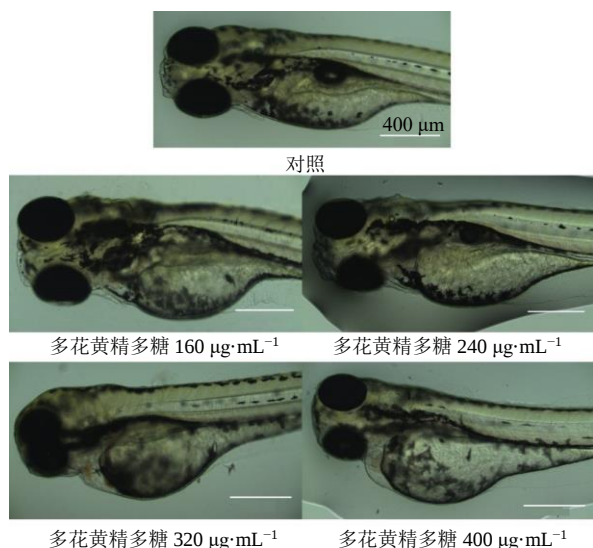


图 2 多花黄精多糖对斑马鱼幼鱼形态和心脏毒性的影响 ($\times 10$)

Fig. 2 Effect of polysaccharide from *P. cyrtoneura* on malformation and cardiotoxicity of zebrafish juvenile ($\times 10$)

展示了不同质量浓度多花黄精多糖给药后斑马鱼幼鱼形态和心脏组织形态变化。发育异常的斑马鱼的腹部或腹部周围会发生水肿或出血现象, 造成身体畸形包括脊柱弯曲和折尾等, 同时斑马鱼幼鱼心脏组织形态发生异常, 心包囊肿等症状逐渐加重。从图中可以看出, 与对照组比较, 多花黄精多糖 (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组斑马鱼出现轻微腹部水肿和心脏毒性, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多花黄精多糖组斑马鱼水肿和心包囊肿明显, 呈剂量相关性。结合 LC_{50} 值, 后续实验多花黄精多糖给药质量浓度为 60~240 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 避免影响斑马鱼幼鱼发育异常和死亡。

3.3 多花黄精多糖对幼鱼组织糖含量的影响

使用 QuantiChrom™ Glucose Assay Kit 葡萄糖测试盒检测组织糖含量。在 0~300 mg/dL 内, 斑马鱼幼鱼组织糖含量与吸光度呈现良好的线性关系, 得到的标准曲线回归方程: $Y=0.0009X+0.001$, $r=0.9999$; 其中, X 是葡萄糖测试盒中对照品溶液的质量浓度, Y 是吸光度。

当模型组斑马鱼的血糖水平高于对照组 3 倍时, 可认为糖尿病斑马鱼造模成功^[11-12]。如图 3 所示, 2 dpf 斑马鱼胚胎注射链脲佐菌素后, 4 dpf 模型组斑马鱼幼鱼的组织糖含量为 3.457 nmol/尾, 明显高于对照组的 1.063 nmol/尾, 为对照组的 3.25 倍。泼尼松龙浸泡给药后 8 dpf 模型组糖含量为 3.068 nmol/尾, 为对照组的 2.88 倍, 表明给予泼尼松龙

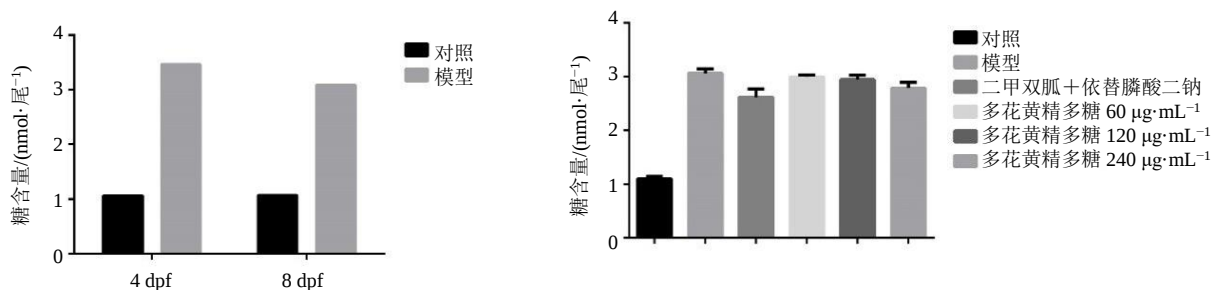


图 3 多花黄精多糖对幼鱼组织糖含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of polysaccharide from *P. cyrtonema* on sugar concentration of zebrafish juvenile ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

后，斑马鱼幼鱼达到 2 型糖尿病的检测标准，因此斑马鱼幼鱼 2 型糖尿病模型构建成功。

与模型组比较，二甲双胍+依替膦酸二钠组和多花黄精多糖 (60、120、240 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组斑马鱼组织糖含量有降低的趋势，且呈剂量相关性。由于高剂量多花黄精多糖对幼鱼会有形态和心脏毒性，未能进一步加大给药浓度充分验证其降糖作用。

3.4 斑马鱼矿化骨骼定量分析

各组 8 dpf 斑马鱼腹面头骨茜素红染色的显微成像见图 4，斑马鱼头骨矿化面积和骨密度见图 5。与对照组相比，模型组斑马鱼头骨矿化面积和骨密度显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)，表明链脲佐菌素+泼尼松龙成功诱导了糖尿病斑马鱼骨质疏松模型。与模型组比较，多花黄精多糖组斑马鱼头骨矿化面积和骨密度显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，且呈剂量相关性。

3.5 qRT-PCR 检测成骨细胞基因 mRNA 表达

如图 6 所示，与对照组比较，模型组斑马鱼 *Runx2b*、*Sp7*、*vdrb*、*sparc*、*col1a2* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)；与模型组比较，多花黄精多糖组 *Runx2b*、*Sp7*、*vdrb*、*sparc*、*col1a2* mRNA 表达水平平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，且呈剂量相关性。

4 讨论

2 型糖尿病患者的血糖比正常人偏高^[13]，一方面由于外周血管粥样硬化使血供明显减少，易出现肢体坏疽，运动负荷减小，严重影响骨质量；另一方面糖尿病微血管病变^[14]，造成骨组织的血液不能正常供应，血液内营养障碍，影响骨质量和骨密度，这些都会使骨质疏松发生的风险随之增加。降糖药物主要影响 2 型糖尿病患者血糖水平，但对机体除血糖外的其他指标也有一定影响。自从研究人员发

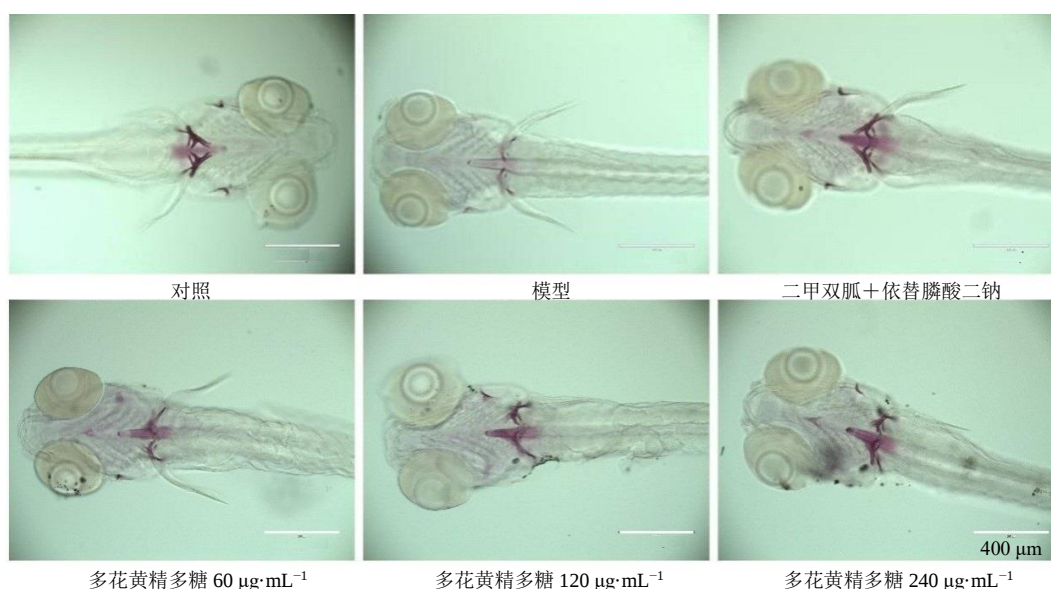
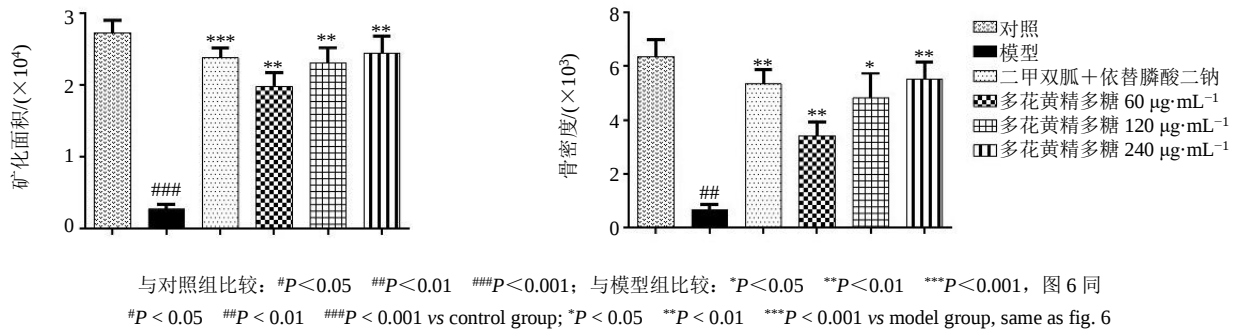
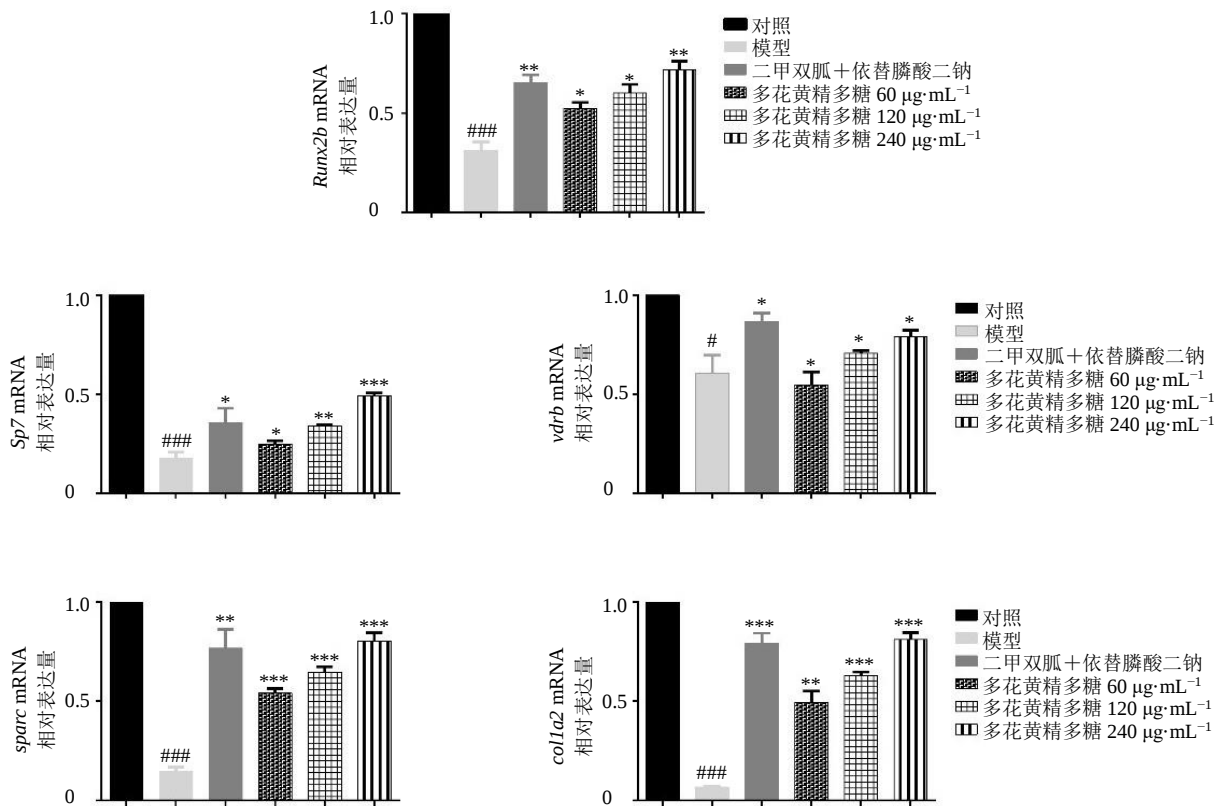


图 4 骨骼染色的显微成像 ($\times 10$)

Fig. 4 Microscopic image of bone staining ($\times 10$)

图 5 多花黄精多糖对斑马鱼矿化面积和骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effect of polysaccharide from *P. cyrtonea* on mineralized area and bone mineral density of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 6 多花黄精多糖对斑马鱼 *Runx2b*、*Sp7*、*vdrb*、*sparc*、*col1a2* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 6 Effect of polysaccharide from *P. cyrtonea* on *Runx2b*, *Sp7*, *vdrb*, *sparc* and *col1a2* mRNA expressions of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

现噻唑烷二酮类降糖药物^[15]有增加骨折的风险后,就广泛开展了大量关于降糖药物和骨代谢及骨密度的临床试验和动物实验。多项研究显示,各类降糖药物在稳定血糖的同时也对骨代谢造成影响,因此预防糖尿病慢性并发症的发生和发展,改善骨代谢对患者有重要作用^[16]。

本研究利用斑马鱼体型小、易饲养、繁殖周期短等其他模式生物不具备的优点^[17-18]建立 2 型糖尿

病合并骨质疏松症斑马鱼幼鱼模型。通过加入不同浓度的药物观察并统计对斑马鱼生长发育的影响,选择给予链脲佐菌素(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和泼尼松龙(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行造模,通过试剂盒测定斑马鱼组织糖含量后,采用茜素红对斑马鱼矿化骨骼进行固定染色,分析骨矿化面积和骨密度。结果表明,给予链脲佐菌素和泼尼松龙后能够建立 2 型糖尿病合并骨质疏松症斑马鱼幼鱼模型。

黄精是中医临床常用的治疗消渴症较为有效的中药。黄精多糖是黄精的主要有效成分，黄精可入肾经，中医理论认为肾主骨生髓，因此黄精多糖具有应用于治疗骨代谢相关疾病的潜在作用^[19]。本研究利用 2 型糖尿病合并骨质疏松症斑马鱼幼鱼模型研究多花黄精多糖降血糖和抗骨质疏松作用，通过 qRT-PCR 法检测多花黄精多糖对 2 型糖尿病合并骨质疏松症斑马鱼模型成骨细胞标志基因 *Runx2b*、*Sp7*、*vdrb*、*sparc*、*col1a2* mRNA 表达的影响，结果显示，与模型组比较，多花黄精多糖可以通过上调 *Runx2b* 和 *Sp7* mRNA 表达，调控成骨细胞分化过程中转录级联反应，共同加速成骨细胞分化；而 *vdrb* 这种维生素 D 受体转录因子，能调节体内钙或磷酸盐的吸收，多花黄精多糖能够上调 *col1a2* 和 *sparc* mRNA 表达，有助于皮肤、骨骼、肌腱以及其他纤维连接组织。*sparc* 不仅在骨骼组织中引起活跃的矿化作用，还能够促进与游离的钙离子结合。因此，多花黄精多糖能够不同程度地降低 2 型糖尿病合并骨质疏松症斑马鱼组织糖浓度，上调成骨细胞相关因子表达，促进成骨细胞分化，恢复维持骨骼矿化，加快骨重建。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宋超, 刘祖德. 2 型糖尿病并发骨质疏松的机制研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(2): 139-142.
- [2] Liu J M, Zhu D L, Mu Y M, et al. Management of fracture risk in patients with diabetes-Chinese expert consensus [J]. *J Diabetes*, 2019, 11(11): 906-919.
- [3] Evely R S, Bonomo A, Schneider H G, et al. Structural requirements for the action of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) on bone resorption by isolated osteoclasts [J]. *J Bone Miner Res*, 1991, 6(1): 85-93.
- [4] 陈晔, 孙晓生. 黄精的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(3): 328-330.
- [5] 陆建平, 张静, 张艳贞. 黄精多糖的功能活性及应用前景 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 273-278.
- [6] 中国药典 [S]. 一部, 2020: 319-320.
- [7] 陈颖. 抗骨接生软膏药学研究及斑马鱼评价 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [8] 肖小妹, 沈小雄, 张桂生, 等. 黄精多糖对儿童肾病综合征红细胞免疫功能影响的研究 [J]. 赣南医学院学报, 2018, 38(2): 134-136.
- [9] 鲁疆, 王占洋, 袁玉婷, 等. 氯化镉对斑马鱼胚胎的发育毒性 [J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 381-388.
- [10] Kari G, Rodeck U, Dicker A P. Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82(1): 70-80.
- [11] 朱妍, 秦卫松. 糖尿病斑马鱼模型研究进展 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2021, 30(1): 59-63.
- [12] 劳乔聪, 俞航萍, 李春启. 斑马鱼糖尿病模型评价常用降糖药物降糖药效 [J]. 中国药理学通报, 2015(31): 248.
- [13] Alberti K G, Zimmet P Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation [J]. *Diabet Med*, 1998, 15(7): 539-553.
- [14] Colman J R, Twiner M J, Hess P, et al. Teratogenic effects of azaspiracid-1 identified by microinjection of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos [J]. *Toxicol*, 2005, 45(7): 881-890.
- [15] 马长宏, 张翼翔. 噻唑烷二酮类药物对 2 型糖尿病的效果 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(19): 248-250.
- [16] 庄会艳. 噻唑烷二酮类药物的药理作用研究 [J]. 医学食疗与健康, 2019(17): 88.
- [17] Dooley K, Zon L I. Zebrafish: A model system for the study of human disease [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10(3): 252-256.
- [18] 段秀英, 马瑞娇, 张云, 等. 斑马鱼炎症模型及其在中药抗炎领域的应用 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1573-1580.
- [19] 姜程曦, 张铁军, 陈常青, 等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 1-16.

[责任编辑 李亚楠]