

嘉南藥理科技大學 100 年度教師專題研究計畫成果報告書

in vitro 方式評估中草藥對斑馬魚胚胎骨骼
發育機制的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：CN10022

執行期間：100 年 1 月 1 日至 100 年 12 月 31 日

計畫主持人：陳玟雅

執行單位：生物科技系

中華民國 一〇一 年 二 月



四、研究計畫成果

(一)摘要

關鍵詞: 斑馬魚、反轉錄聚合酶鏈鎖反應、阿爾新藍染色法、茜素紅染色法、鈣黃綠素染色法

治療骨疾病的藥物有些是小分子抑制劑，作用於破骨細胞形成的信號路徑關鍵性角色上，透過拮抗作用而抑制蝕骨細胞的形成與活化，避免骨質流失。所以尋找有效的藥物成分積極地作用於促進骨質形成，或另一面消極的減緩骨質吸收，兩者都具有疾病治療的應用價值。本研究為建立骨質疾病治療用藥的斑馬魚藥物檢測平台，以不同藥物劑量刺激斑馬魚胚胎，觀察影響發育型態的變化效果，並採用 *in vitro* 方式以 RT-PCR 之半定量分析法評估藥物對斑馬魚胚胎骨頭發育相關基因表現量的影響，另一方面也以雙重染色法觀察藥物造成幼魚骨骼發育的影響，包括軟骨的阿爾新藍染色法與硬骨的茜素紅染色法等，此外也以綠螢光的鈣黃綠素染色法進一步評估藥物對於幼魚活體骨骼的鈣質影響。評估植物藥活性成分作用於胚胎成骨與蝕骨發育之影響。證明相關藥物是否兼具有抑制蝕骨細胞分化作用，潛在應用於骨質疏鬆症及骨骼疾病治療的可行性，以作為開發治療藥物之參考。

Certain of small molecule inhibitors that used for the bone related disease treatment have been proven their key roles involving in the osteoclast synthesis pathway; particularly they exhibit abilities to inhibit the osteoclastogenesis and activation of osteoclast through antagonist so as to prevent the bone loss. Hence, looking the effective drugs to enhance the bone synthesis in one hand and decreasing the bone reabsorbing at the other hand, both can prove the value for the treatment of osteoporosis. In this study, different active component form Chinese herbs medicine, such as the Sesamol will be *in vivo* evaluated directly by the zebrafish embryonic development so as to find out 1) if the active component can act on the osteoclasts via the action of the osteoblast differentiation pathway; or 2) the active component can directly act on the maturing and the differentiation of the osteoclasts. By using the RT-PCR and LC50 to determine the dose effect and the optimal time line for the treatment of the active component will preliminary applied so as to evaluate the effectiveness come from the osteoblast and osteoclasts pathways. To the end, this study will elucidate the potential of the Chinese herbs medicine as the drug in the treatment of the osteoporosis.



(二)研究背景

治療骨疾病的藥物有些是小分子抑制劑，作用於破骨細胞形成的信號路徑關鍵性角色上，透過拮抗作用而抑制蝕骨細胞的形成與活化，避免骨質流失。所以尋找有效的藥物成分積極地作用於促進骨質形成，或另一面消極的減緩骨質吸收，兩者都具有疾病治療的應用價值。成骨細胞分化和骨形成時，骨形態發生蛋白 (BMP) 扮演重要的角色。因此，能夠激活骨形態發生蛋白的組成會是發展抗骨質疏鬆藥物的良好目標。目前治療骨質疏鬆的藥物包括 bisphosphonates、calcitonin、estrogen、vitamin D analogues 和 ipriflavone 等。這些藥劑最主要是將蝕骨細胞抗骨吸收的功能予以抑制，進而延緩骨質流失(Schelonka *et al*, 2001)，但是對於增加或恢復骨密度的影響是有限的，仍然需要積極發展促進骨質形成的藥物。

傳統製藥公司在開發早期多用體外實驗來判斷化合物的活性和選擇性，體外實驗只能反映某一方面，一個通過體外測試的化合物常因選擇性或生物可用度不好而前工盡棄。現代藥物檢測已發展出利用斑馬魚胚胎作為鑑定選擇化合物作用的一個有效工具。例如 Dorsomorphin 一種骨形態發生蛋白 I 型受體(BMP type I receptors)的小分子抑制劑，抑制 BMP 信號的效果比對其他轉化生長因子 TGF- β 、激活素的配體優先(Hao *et al*, 2010)，被用在研究治療性的骨重塑修飾、異位性骨化症 heterotopic ossification (在軟組織內有異常生成的骨組織)、和鐵質的恒定(Hong *et al*, 2009a; Hong, 2009)。

植物天然物的類黃酮 (flavonoids) 廣泛存在各種植物中，作為植物的色素及防禦成份。許多的 flavonoids，包括木質素異(daidzein)、金雀異黃酮(genistein)、豆黃素異黃酮(biochanin A)、槲皮素(quercetin)、黃豆素異黃酮(glycitein)和山奈酚(kaempferol)，都曾被證實可以誘導成骨細胞的分化(Yoshida *et al*, 2001; Jia *et al*, 2003; Notoya *et al*, 2004; Prouillet *et al*, 2004; Lee *et al*, 2005; Morris *et al*, 2006)，這些研究顯示多攝取水果和蔬菜，對於預防骨質疏鬆症是有幫助。此外，成骨細胞的 BMP-2 可使維生素 D 受體的表達水平上調，而 $1\alpha,25$ -二羥維生素 D(3) [$1,25(\text{OH})(2)\text{D}(3)$]藉由成骨細胞的 BMP-2 使細胞核因子 κB 受體活化因子配體 RANKL 表達水平上調，調節老鼠的破骨細胞分化形成(Tachi *et al*, 2010)。本研究發展治療骨質疾病藥物的体外與活體研究分析平台，證明植物藥活性成分應



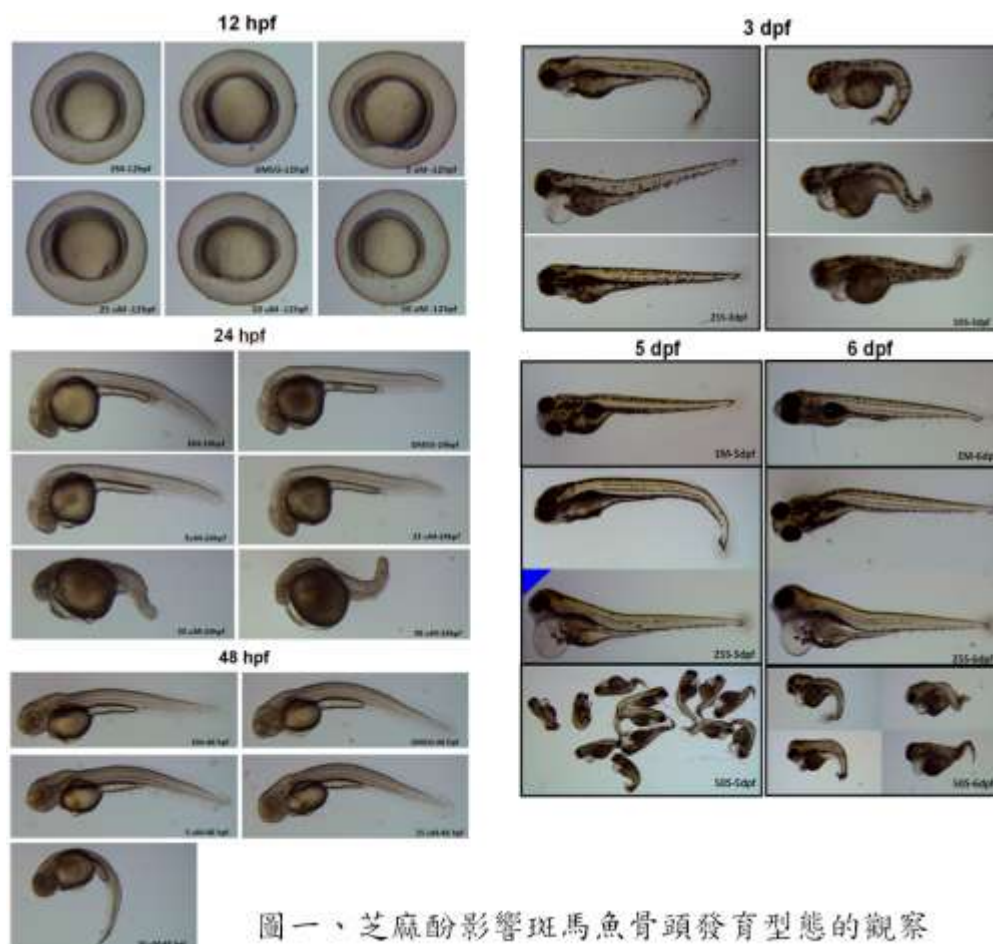
用於骨質疏鬆症及骨骼疾病治療的可行性。針對相關藥物對斑馬魚胚胎發育的分子機制進行評估。

(三) 研究成果

in vitro 方式評估中草藥對斑馬魚胚胎發育的分子機制

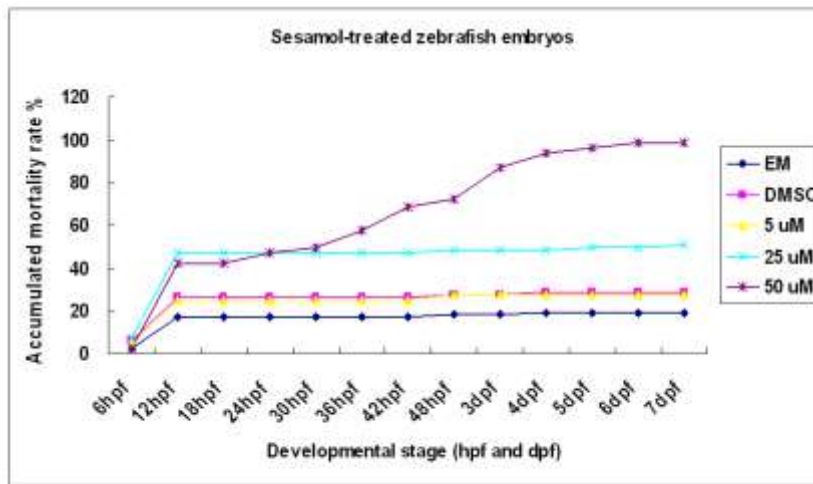
一、不同藥物劑量濃度、不同時間長度等刺激由斑馬魚胚胎發育外觀進行觀察

收集雄魚和雌魚體外受精方式產下的受精卵於4hpf添加芝麻活性成分sesamol藥物。以0~50uM不同劑量濃度、不同時間長度等刺激。藥物作用時間為受精後12、24、30、48 hpf和孵化後1~5 dph。以28°C恆溫培養。先由斑馬魚胚胎發育外觀進行觀察，確認不同劑量處理下各藥物處理組發生畸形與否及特徵(圖一)。型態觀察發現低劑量藥物及佐劑組(DMSO)與未處理組一樣，對胚胎發育並無明顯的影響。但是高劑量組(50uM)則明顯造成背腹體軸發育的異常，在24hpf的胚胎尾部發育有扭曲現象。甚至在魚苗孵化後(53hpf)累積致死率會增高至80%(圖二)。中劑量組(25uM)對胚胎發育有輕微的影響，部份影響一些幼魚心臟的發育，輕度影響魚體尾部型態的發育；而低劑量組(5uM)效果與未處理組相同。



圖一、芝麻酚影響斑馬魚骨頭發育型態的觀察





圖二、不同藥物劑量對於斑馬魚存活的影響

二、 RT-PCR半定量法偵測藥物刺激胚胎蝕骨細胞分化作用相關基因表現量。

從 NCBI 基因庫與 ZFIN 網站收尋成骨細胞基因(如表一) : collagen、OCN、BMP2b、BMP4、 β -catenin；蝕骨細胞相關基因如 TRAP、CTSK、NFATc1，另以 β -actin 基因做為內部對照組，設計各基因 PCR 反應的引子。分別收集斑馬魚胚胎的 total RNA，進行反轉錄合成 cDNA 後再進行 PCR 分析。偵測各基因的 PCR 黏結溫度及反應產物(如表二)。RT-PCR 進行基因表現檢測發現蝕骨相關基因 CTSK 表現點在 24hpf 即可偵測，由 30hpf 開始隨著藥劑劑量增加 CTSK 和 TRAP 基因表現量亦增加(圖三)。同樣偵測 sesamol 對於成骨相關基因 BMP 的表現量之影響，發現藥物對於 24hpf 胚胎的 BMP4 抑制作用比對 BMP2b 強(圖四)，隨著藥物劑量的提高會造成 24~48hpf 胚胎的 BMP2b 表現量被抑制。而且受 BMP 路徑調控的下游相關指標基因 OCN 及 Col1 的表現量亦隨著藥物劑量增加而下調。

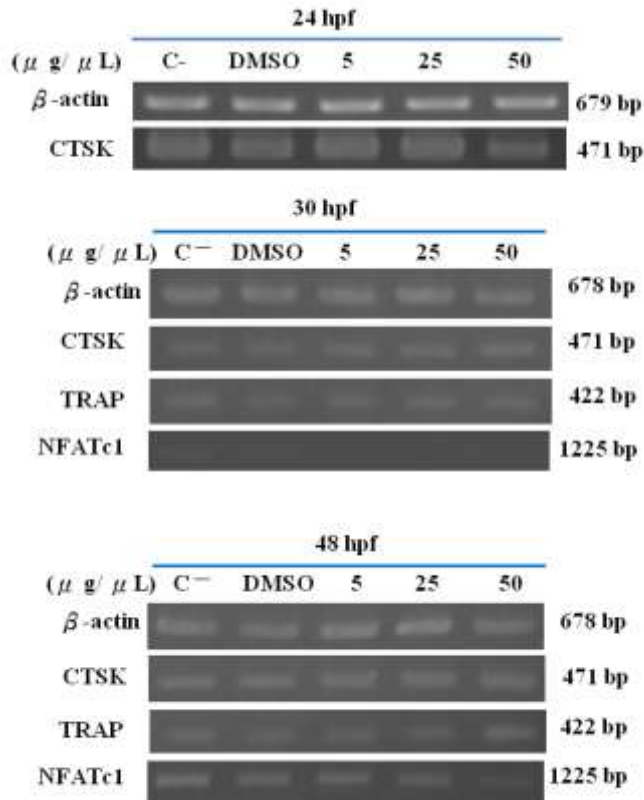
表一、斑馬魚成骨與蝕骨相關基因及其胚胎發育期各基因表現時間點

no.	Gene Name	Wild-type Stages
1	collagen type I	Segmentation: 1-4 somites to Adult
2	OCN	Pharyngula: Prim-5 to Juvenile: Days 30-44
3	BMP2b	Blastula: Sphere to Adult
4	BMP4	Blastula: Sphere to Adult
5	β -catenin	Zygote: 1-cell to Adult
6	TRAP	No data available
7	CTSK	Gastrula: 50%-epiboly to Hatching: Long-pec
8	NFATc1	No data available
9	β -actin	Zygote: 1-cell to Adult

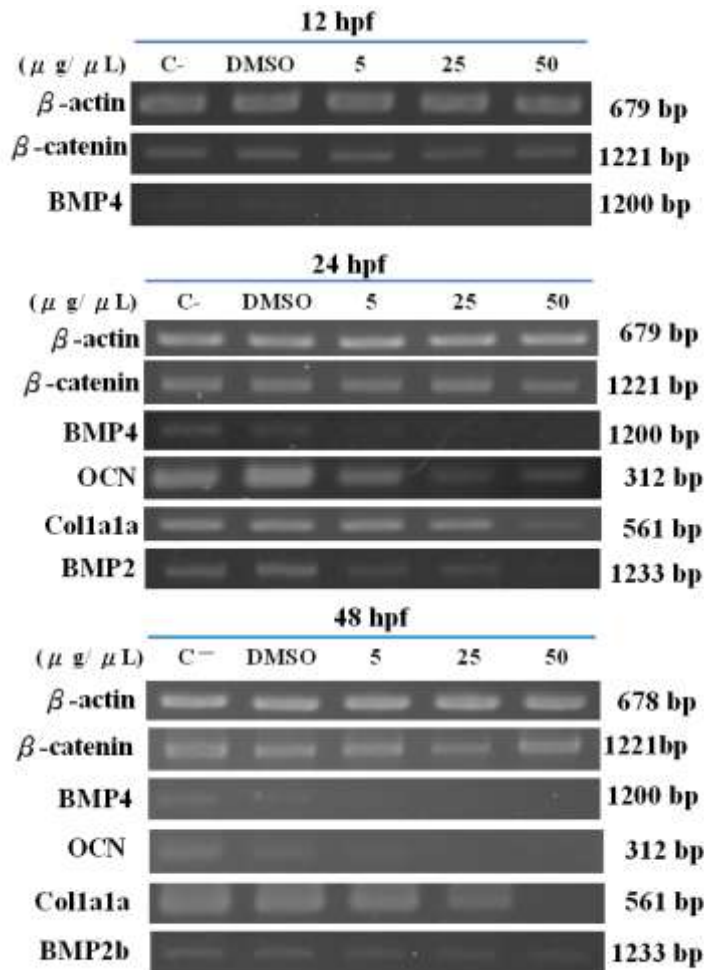
表二、成骨與蝕骨相關基因的RT-PCR大小與黏接反應的溫度

genes	PCR products (bp)	Annealing temp. (°C)
β -actin	679	56
β -catenin	1221	56
BMP4	1200	58
BMP2	1233	62
OCN	312	58
Colla1a	561	56
CTSK	471	58
TRAP	422	58
NFATc1	1225	56





圖三、芝麻酚對斑馬魚胚胎發育期蝕骨基因表現的影響

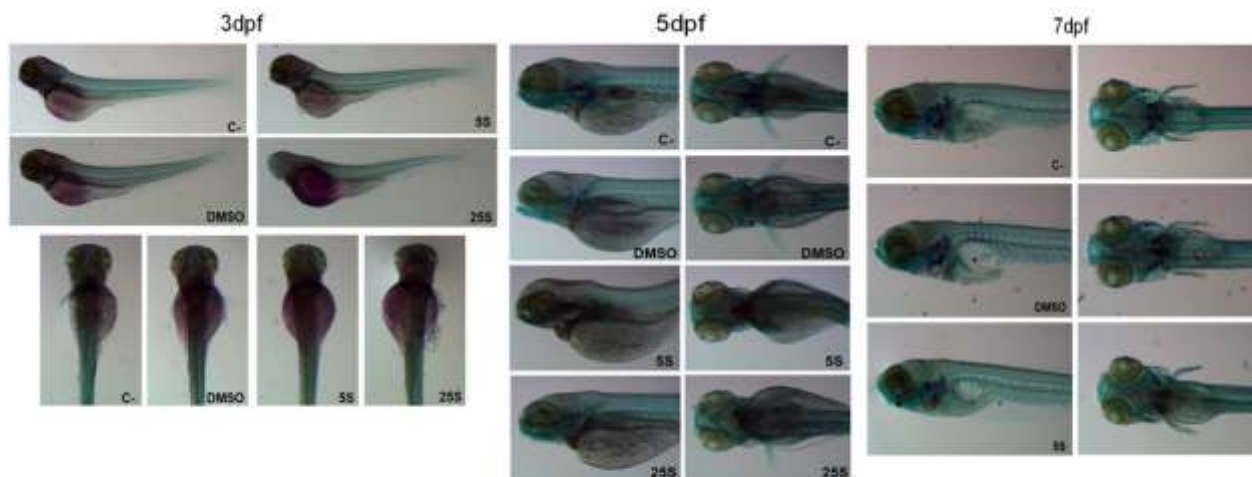


圖四、芝麻酚對斑馬魚胚胎發育期成骨基因表現的影響



三、斑馬魚幼魚軟骨與硬骨的阿爾新藍(Alcian Blue Staining)及茜素紅雙染色法(Alizarin Red Staining) (Walker & Kimmel, 2007)。

將孵化的幼魚骨骼染色，可以和對照組比較骨骼發育的差異性(圖五)，軟骨被染成藍綠色，包括篩板(ethmoid plate, EP)、骨小梁(trabeculae, TR)、米克爾氏軟骨(Meckel's Cartilage, MC)、方腭(顎)骨(palatoquadrate, PQ)、角舌軟骨(ceratohyal cartilage, CHC)、舌頷軟骨(hyosymplectic cartilage, HMC)；與硬骨部位可被染成紅色包括副蝶骨(parasphenoid, PS)、後頭骨(occipitals, OC)、脊索(notochord, NC)、顎骨(maxilla, Max)、齒骨(dentary, Den)、內翼骨(entopterygoid, EN)、鰓條骨(branchiostegal rays, BRs)、鰓蓋骨(opercle, OP)、舌頷骨(hyomandibular bone, HMB)、角舌骨(ceratohyal bone, CHB)、角鰓骨(ceratobranchial, CB)。結果中、高劑量組雖然造成發育異常，但是發育初期形成的脊椎在 7dpf 皆可發育，因此可以繼續追蹤藥物長期作用對脊椎骨骼的影響。



圖五、阿爾新藍 (Alcian Blue Staining)與茜素紅 (Alizarin Red Staining)雙染色法觀察斑馬魚幼魚的軟骨與硬骨變化

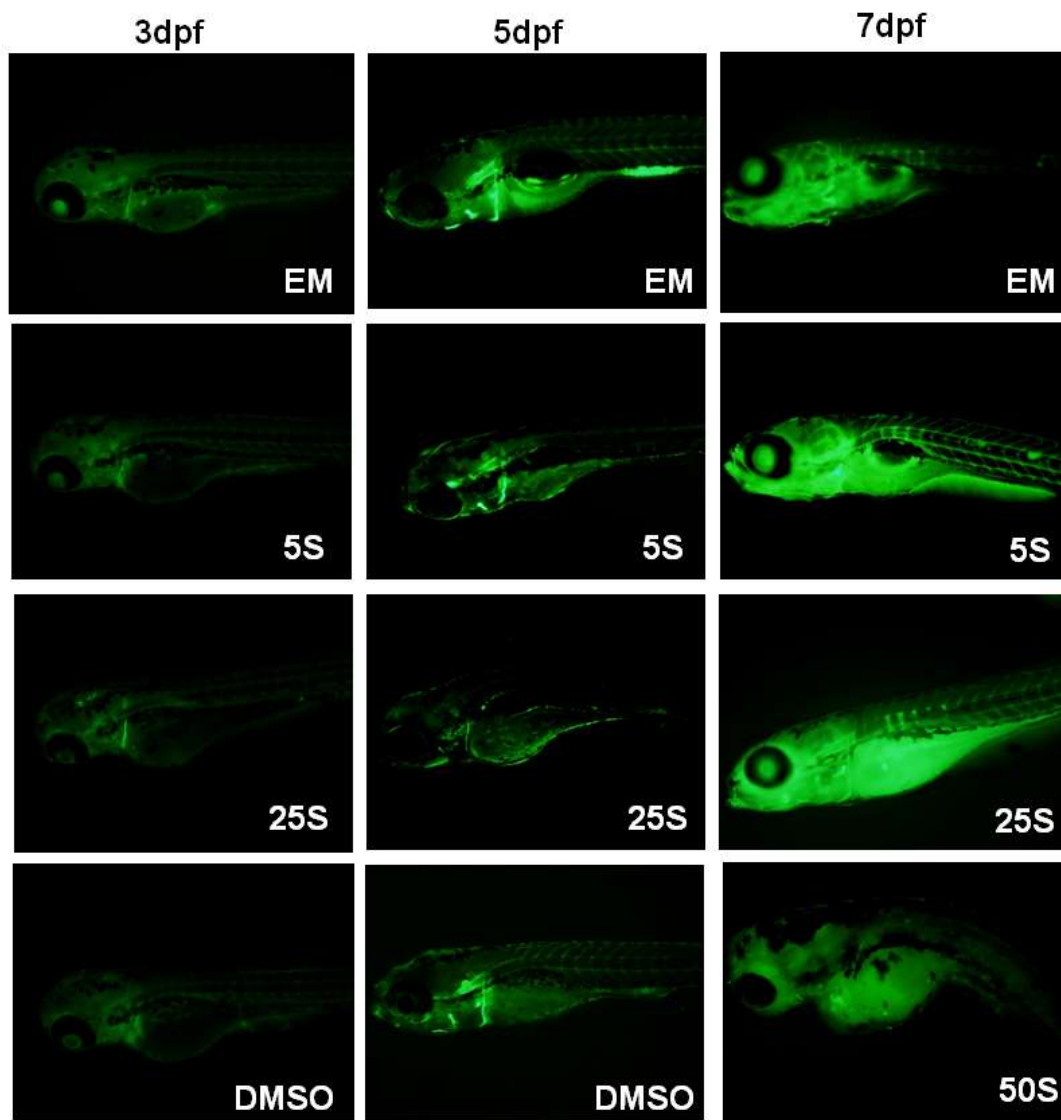
斑馬魚 larvae 放入 24-wells plate 加入 0.5 ml ddH₂O 清洗兩次，再加入 0.5 ml 4% paraformaldehyde/PBS 室溫下輕輕搖晃，固定 2 小時。加入 50% EtOH 浸泡 10 分鐘，換成 0.5 ml Alcian Blue/Alizarin Red Staining Solution (3 ml 0.02% Alcian Blue Working Solution & 0.03 ml 0.5% Alizarin Red Solution was mixed just prior to staining)室溫下輕輕搖晃，染 6 小時。加入 0.5 ml ddH₂O 清洗一次，加入 0.5 ml 1.5% H₂O₂/1% KOH 浸泡 10 分鐘；加入 0.5 ml 20% glycerol/0.25% KOH 室溫下輕輕搖晃 15 分鐘；換成 0.5 ml 50% glycerol/0.25% KOH 室溫下輕輕搖晃 1 小時，顯微鏡下拍照記錄。樣本換成於微量離心管中並加入 1 ml 50% glycerol/0.1% KOH，在 4°C 冰箱保存。

四、幼魚的鈣黃綠素染色法(Larval Calcein Staining)評估藥物對於活體骨骼鈣質的影響 (Javidan & Schilling, 2004)，此染色法可以與茜素紅染色結果比對，驗證藥物影響硬骨形成的效果(圖六)。

研究成果顯示芝麻的活性成分 Sesamol 對於斑馬魚骨骼的發育有抑制效果，我們確實可以利用斑馬魚作為體外檢測模式，建立骨骼用藥的篩選平台。在受精卵發育過程細胞先經過快速增生後再進入細胞分化的作用，胚胎發育過程複雜，包括胚層形成、遷移及器官的形成，複雜而多樣的細胞及組織彼此交互作用，因此藥物對於生物體的影響效果無法靠著單純的細胞株研究而完全的一探究竟。我們以斑馬魚模式生物的骨質形成機制之相關基



因、骨骼成長型態與藥物劑量效應的關連性，檢測藥物對骨質作用的正負效果，此研究可以進一步應用於篩選藥物的可利用性。



圖六、鈣黃綠素染色法(Larval Calcien Staining)評估藥物對於幼魚的活體骨骼鈣質的影響

斑馬魚 larvae 放入 24-wells plate 加入 0.5 ml ddH₂O 清洗兩次，加入 0.5ml 0.2% Calcien Working Solution pH7.5 避光，室溫下浸泡染 10 分鐘；換加 0.5ml ddH₂O 清洗四次；加入 0.5ml ddH₂O 靜置浸泡 10 分鐘，於螢光顯微鏡下(Olympus IX71/ Olympus U-CAMDS)拍照記錄。

(五) 參考文獻

1. Chang JK, Hsu YL, Teng IC, Kuo PL. Piceatannol stimulates osteoblast differentiation that may be mediated by increased bone morphogenetic protein-2 production. *Eur J Pharmacol.* 2006, 551 (1-3):1-9.
2. Hao J, Ho JN, Lewis JA, Karim KA, Daniels RN, Gentry PR, Hopkins CR, Lindsley CW, Hong CC. In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem Biol.* 2010;5(2):245-53.
3. Hie M, Tsukamoto I. Vitamin C-deficiency stimulates osteoclastogenesis with an increase in



RANK expression. *J Nutr Biochem*. 2010.

4. Hong CC. Large-scale small-molecule screen using zebrafish embryos. *Methods Mol Biol*. 2009;486:43-55.
5. Hong CC, Yu PB. Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):409-18.
6. Huang RL, Chen CC, Huang YL, Hsieh DJ, Hu CP, Chen CF, Chang C. Osthole increases glycosylation of hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of hepatitis B virus in vitro. *Hepatology*. 1996;24:508-15.
7. Javidan Y, Schilling TF. Development of Cartilage and Bone. *Methods Cell Biol*. 2004;76:415-436.
8. Jia TL, Wang HZ, Xie LP, Wang XY, Zhang RQ. Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol*. 2003;65:709-715.
9. Kleerekoper M. Osteoporosis prevention and therapy: preserving and building strength through bone quality. *Osteoporos Int*. 2006;17(12):1707-1715.
10. Ko FN, Wu TS, Liou MJ, Huang TF and Teng CM. Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by osthole isolated from *Angelica pubescens*. *Eur. J. Pharmacol*. 1992;219:29-34.
11. Kolios L, Daub F, Sehmisch S, Frosch KH, Tezval M, Stuermer KM, Wuttke W, Stuermer EK. Absence of positive effect of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on fracture healing in osteopenic rodent model. *Phytother Res*. 2010, 24(12):1796-806.
12. Kuo PL, Hsu YL, Chang CH, Chang JK. Osthole-mediated cell differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in human osteoblast cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314:1290-1299.
13. Kuo PL, Huang YT, Chang CH, Chang JK. Bone morphogenetic protein-2 and -4 (BMP-2 and -4) mediates fraxetin-induced maturation and differentiation in human osteoblast-like cell lines. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(1):119-24.
14. Lee KH, Choi EM. Biochanin A stimulates osteoblastic differentiation and inhibits hydrogen peroxide-induced production of inflammatory mediators in MC3T3-E1 cells. *Biol Pharm Bull*. 2005;28:1948-1953.
15. Li XX, Hara I, Matsumiya T. Effects of osthole on postmenopausal osteoporosis using ovariectomized rats; comparison to the effects of estradiol. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(6):738-42.
16. Liu JH, Zschocke S, Reininger E and Bauer R, Inhibitory effects of *Angelica pubescens* f. *biserrata* on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, *Planta Med*. 1998;64:525-9.
17. Liu C, Walter TS, Huang P, Zhang S, Zhu X, Wu Y, Wedderburn LR, Tang P, Owens RJ, Stuart DI, Ren J, Gao B. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *J Immunol*. 2010, 184(12):6910-9.
18. Meng F, Xiong Z, Sun Y, Li F. Coumarins from *Cnidium monnieri* (L.) and their proliferation stimulating activity on osteoblast-like UMR106 cells. *Pharmazie*. 2004;59(8):643-5.
19. Molina-Jiménez MF, Sánchez-Reus MI, Cascales M, Andrés D, Benedí J. Effect of fraxetin



- on antioxidant defense and stress proteins in human neuroblastoma cell model of rotenone neurotoxicity. Comparative study with myricetin and N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;209(3):214-25.
20. Morris C, Thorpe J, Ambrosio L, Santin M. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *J Nutr.* 2006;136:1166-1170.
 21. Notoya M, Tsukamoto Y, Nishimura H, Woo JT, Nagai K, Lee IS, Hagiwara H. Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2004;485:89-96.
 22. Prouillet C, Maziere JC, Maziere C, Wattel A, Brazier M, Kamel S. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:1307-1313.
 23. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3318-3325.
 24. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 2000;289:1508-1514.
 25. Schelonka EP, Usher A. Ipriflavone and osteoporosis. *JAMA.* 2001;286:1836-1837.
 26. Tachi K, Takami M, Zhao B, Mochizuki A, Yamada A, Miyamoto Y, Inoue T, Baba K, Kamijo R. Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts. *Cell Tissue Res.* 2010, 342(2):213-20.
 27. Tang DZ, Hou W, Zhou Q, Zhang M, Holz J, Sheu TJ, Li TF, Cheng SD, Shi Q, Harris SE, Chen D, Wang YJ. Osthole stimulates osteoblast differentiation and bone formation by activation of beta-catenin-BMP signaling. *J Bone Miner Res.* 2010, 25(6):1234-45.
 28. Teng CM, Lin CH, Ko N, Wu TS and Huang TF, The relaxant action of osthole isolated from *Angelica pubescens* in guinea-pig trachea, *Naunyn-Schmiedelberg's Arch. Pharm.* 1994;349:202-208.
 29. Yoshida H, Teramoto T, Ikeda K, Yamori Y. Glycitein effect on suppressing the proliferation and stimulating the differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65:1211-1213.
 30. Yu S, Chen K, Li S, Zhang K. In vitro and in vivo studies of the effect of a Chinese herb medicine on osteoclastic bone resorption. *Chin J Dent Res.* 1999, 2(1):7-11.
 31. Walker MB, Kimmel CB. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech Histochem.* 2007;82(1):23-28.

