

彭伟, 张文娟, 薛钰. 斑马鱼作为骨骼疾病模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 248-253.

Peng W, Zhang WJ, Xue Y. Research progress of zebrafish models of bone diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 248-253.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.019

斑马鱼作为骨骼疾病模型的研究进展

彭伟¹, 张文娟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】 斑马鱼作为一种优良的动物模型已被广泛应用于人类相关疾病机理及药物筛选的研究。由于斑马鱼骨骼发育过程和调控机制与哺乳动物高度保守, 目前已成功构建斑马鱼骨骼疾病模型。本文首先介绍斑马鱼骨骼发育过程和分子调控机制, 并对斑马鱼模型骨骼研究的基本方法及在骨骼药物筛选中的研究现状进行分析和总结, 以期对斑马鱼作为骨骼疾病模型进行药物筛选或基础研究提供参考。

【关键词】 斑马鱼; 骨骼疾病模型; 分子机制; 染色方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 02-0248-06

Research progress of zebrafish models of bone diseases

PENG Wei¹, ZHANG Wenjuan¹, 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)
Corresponding author: XUE Yu. E-mail: xueyu0614@163.com

【Abstract】 Zebrafish has been widely used as an animal model for human disease research and drug screening. Bone disease models have been successfully established in zebrafish because of its highly conserved molecular mechanism of osteogenesis with mammals. Here, we introduce the processes and regulatory networks of zebrafish osteogenesis, and then summarize the classical method for zebrafish bone research and the research status of drug screening for bone diseases. This information will provide a reference for drug screening and basic research using zebrafish bone disease models.

【Keywords】 zebrafish; bone disease model; molecular mechanism; bone staining

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

斑马鱼(zebrafish)是一种源自于印度东部的淡水硬骨鱼, 体长约 3 ~ 4 cm, 属辐鳍亚纲(Actinopterygii), 鲤科(Cyprinidae), 短担尼鱼属(Danio rerio)^[1]。由于其体表具有如斑马一样的纵向相间条纹, 因此得名斑马鱼。斑马鱼与人类基因组相似度高达 87%^[2], 其组织器官发育与哺乳动物在发育起源及过程等方面都有较高同源性。斑马

鱼以其体型小巧、易于饲养、胚胎透明、发育周期短且繁殖能力强等优势被作为重要的脊椎动物模型进行科学研究。目前, 基因编辑、转基因、遗传诱导等实验技术已成功在斑马鱼模型中得以应用, 学者们通过这些实验手段发现了数以千计的基因, 并且证明了其基因功能。这些研究发现使得斑马鱼不仅在生物学, 在临床医学、环境毒理学及心理学领

【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。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31501174), and Fujian Provincial University for Outstanding Youth Scientific Research Personnel Training Program of 2017.

【作者简介】 彭伟(1996—)男, 硕士, 研究方向: 化学生物学。Email: 2776238223@qq.com

【通信作者】 薛钰(1986—)女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 斑马鱼疾病模型构建及药物筛选。Email: xueyu0614@163.com

域都得以广泛应用^[3]。

1 斑马鱼的骨骼发育

斑马鱼的骨骼发育与其他脊椎动物骨骼发育过程极其相似,骨骼都是由软骨和硬骨两种不同的组织所组成,是由三种不同的胚胎细胞系分化而来。颅面骨骼由颅神经嵴细胞分化形成,中轴骨骼从中轴中胚层(体节)衍生而来,四肢骨骼则是侧板中胚层细胞的产物^[4]。软骨由软骨细胞形成,硬骨由成骨细胞和破骨细胞组成。软骨细胞和成骨细胞具有共同的起源,即间充质细胞,而破骨细胞则起源于髓单核细胞系^[5]。

间充质细胞(mesenchymal cells)在特定的骨化部位聚集是骨骼发育起始的标志,这一现象被称为骨骼的形态发生(skeletal morphogenesis),骨骼发育的命运由其决定。当满足骨骼发育所需条件时,聚集的间充质细胞由于骨化作用而成为骨骼。膜内骨化(intramembranous ossification)和软骨内骨化(endochondral ossification)是脊椎动物成骨的两种方式。膜内骨化的代表是颅骨的形成,其成骨细胞由间充质细胞直接分化而成,并形成骨骼;软骨内骨化成骨必须先形成软骨模板,成骨细胞和破骨细胞随后会将其替代而成熟^[6]。

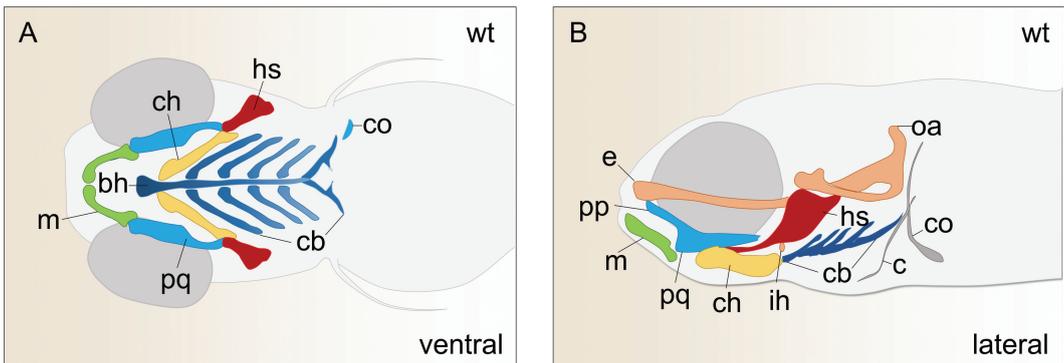
1.1 斑马鱼的头骨发育

斑马鱼与多数高等脊椎动物一样,也存在软骨内骨化和膜内骨化两种骨化方式^[7]。其中,斑马鱼大部分的头部骨骼是由软骨内骨化发育产生。斑马鱼头部的骨骼结构如图 1 所示,一般 5d 的幼鱼头

部骨骼(脑颅)由软骨、脑颅、咽骨架构成,围绕着感觉器官;大脑则是由筛骨板块(e)、骨小梁(t)、附脊索(pc)和枕拱门(oa)组成(图 1)。咽骨架是由下颌和鳃连接的咽拱门等组成。第一个咽弓(下颌弓)来自于下颌,由两个元素组成,腭方骨(pq)代表上颌,麦克尔软骨(m)形成下颌(图 1)。第二个(舌)弓是由舌骨下颌弓(hs)和角舌骨(ch)组成,角舌骨(ceratohyal)不是直接与舌骨下颌弓连接的,而是与茎舌骨(ih)直接连接起来。鳃连接的拱门是由角鳃骨(cb)和鳃下骨组成(图 1B)。鳃下骨位于角鳃骨的中间,连接腹侧中线的基鳃软骨(图 1B)。头部骨骼骨化的一般顺序为:角鳃骨(cb),孔盖(op),副蝶骨(ps),鳃条骨(br),脊索(nc),其中孔盖骨骨化开始于受精后第 3 天的未来球窝附近的间充质和舌颌软骨衔接处,副蝶骨从第 4 天开始骨化^[8-9]。头盖骨通过膜内骨化的方式进行钙化,虽然头部骨骼会大面积的形成,但是软骨在软骨内骨化的作用下发育成骨骼这一过程,要一直延续到斑马鱼的成年阶段,成年斑马鱼的头盖骨由 74 块颅骨组成,至少需要 70 d 才能发育完成^[10-11]。

1.2 斑马鱼的脊柱及鱼鳍的发育

斑马鱼的脊椎骨骼是通过软骨内骨化的方式形成,即脊椎内的骨骼先形成软骨,然后再发生骨化,此发育过程也是按照从头到尾的顺序分体节形成的^[12]。斑马鱼的脊椎骨分为尾椎和尾前椎,其脊椎是由很多的椎间盘和椎体组成,每一节脊椎骨都呈两凹型,其结构又可细分为脊椎、神经弧和血管弧。斑马鱼的脊椎是由位于中间体节的韦伯尔发



注: A: 腹面观; B: 侧面观。(bh) 舌骨体; (ch) 角舌骨; (co) 对肩胛骨喙突; (cb) 角鳃骨; (c) 匙骨; (e) 筛骨板; (hs) 舌骨下颌弓; (m) 麦克尔软骨; (oa) 枕弓; (pp) 腭方蝶突骨; (pq) 腭方骨。

图 1 斑马鱼头部骨骼结构

Note. A, Ventral view. B, Lateral view. (bh) basihyal. (ch) ceratohyal. (co) coracoids of pectoral girdle. (cb) ceratobranchial. (c) cleithrum. (e) ethmoid plate. (hs) hyosymplectic. (m) Meckel's cartilage. (oa) occipital arch. (pp) pterygoid process of the palatoquadrate. (pq) palatoquadrate.

Figure 1 Structure of the zebrafish head bone

生器起始发生,然后骨化的范围分别向头部和尾部两个方向延伸。最初的脊椎在 7 d 形成,是在脊索之上,作为矿物质的沉淀而存在,开始于背部的区域并且向腹部延伸。最早形成的是第 3、4、5、6 脊椎,之后是第 1、2 脊椎,到了第 23 天,所有脊椎形成。除了最后端形成 urostyle 的脊椎,所有结构均已钙化。斑马鱼的鳍由背鳍、腹鳍、胸鳍、臀鳍和尾鳍组成。当斑马鱼发育到第 19 天时,其尾翼已形成所有的辐射条、尾下骨、软骨尾上骨。背翼和肛翼也已形成并矿化,然而,胸鳍的骨翼形成刚刚开始^[11-13]。斑马鱼与爬行动物的软骨内骨化方式不同,最为明显的区别是其鳞质鳍条的发育不经过软骨细胞而是由胶原基质直接矿化而成。由于斑马鱼具有鱼鳍透明,生长具有时空的连续性和方向性,通过控温可减慢生物矿化速度等独特优势,且鱼鳍发育的分子机制与哺乳动物骨骼极为相似,调控发育的关键生长因子如包括骨形成蛋白在内的 TGF β 家族起到关键作用。越来越多的学者更偏好于利用鱼鳍尤其是尾鳍再生作为骨骼损伤修复模型进行科学研究。

2 斑马鱼骨骼发育的分子机制

脊椎动物进化过程中骨骼发育机制高度保守,斑马鱼骨骼发育同样起始于间充质细胞,间充质细胞分化为成骨细胞之后,成骨细胞在形成骨骼过程中需经历增殖、成熟、矿化和凋亡四个阶段。在整个骨骼发育过程中,涉及众多的调控因子包括转录因子、激素、生长因子、细胞基质因子等的参与,此外还受到一系列细胞信号通路的精密调控^[14]。一些众所周知的调控哺乳动物成骨细胞分化的相关基因家族,如:Hedgehog、Runx 和 Dlx 基因家族的成员在斑马鱼骨形成过程中也表达^[15-19]。在斑马鱼成骨细胞形成分化的早期,Rux2a 和 Runx2b 在分化的最早期表达,Osx 在分化中期表达,成熟阶段分化主要通过骨基质蛋白 Coll1a 和骨结合素 (osn, osteonectin) 的表达,BMP 和 Wnt 信号在成骨细胞分化过程中像在哺乳动物中一样也发挥作用。

研究表明,Sox9 家族参与了骨骼发育调控,斑马鱼中有 Sox9a 和 Sox9b,在胚胎的发育过程中,它们都在软骨形成区域表达,Sox9 在硬骨鱼和四足软骨形成过程中的功能是保守的。Sox9 基因的上游序列位点突变会导致斑马鱼软骨形成异常而导致短指等骨骼发育异常的症状。Sox9 早于间叶细胞

进行凝聚,软骨细胞发生分化时表达,并能够直接调控 Col2a1, Colla2 等对软骨形成有关键作用的胶原蛋白的形成,因此其在软骨分化的启动阶段发挥重要的作用。有研究证明,Sox9 与骨形成发生蛋白 (BMP) 相互作用,调控软骨的形成过程^[20-21]。锌指转录因子 Osterix (Osx) 是哺乳动物骨髓充质祖细胞系的关键调节因子,在硬骨鱼中,膜内骨化和软骨成骨之前 Osx 开始表达,Osx 在成骨细胞中表达而不是软骨细胞,作为成骨细胞分化程度的一个重要标志^[22-23]。斑马鱼拥有硬骨鱼家族的 8 个 Dlx 基因,其在斑马鱼头部骨骼发育中有着重要作用,在头部的副蝶骨,鳃弓及孔盖等部位有表达^[24-25]。Runx2 是成骨细胞和肥大的软骨细胞的关键调节因子,在软骨发育早期,调控骨基质相关基因如 Col10a1 的表达,Runx2 过量表达会影响成骨细胞成熟并导致骨质减少,因此,在骨细胞分化过程中起着负调控作用^[26]。

Hedgehog 信号调控细胞分化,增殖和细胞寿命,其在骨骼形成过程中的作用是保守的,促进骨膜前体细胞向成骨细胞分化。Shh 是 Hedgehog 家族成员,有研究显示,Shh 在斑马鱼神经嵴细胞运动中诱导中线上的前体细胞分化成软骨细胞^[9],Hedgehog 信号通路在鳃盖早期形成的过程中调节骨形成^[20]。Wnt 信号在成骨细胞分化中起着重要作用,可以阻止成骨细胞向软骨细胞分化。有研究表明,Wnt 信号与 BMP 信号相互作用共同调控斑马鱼背部腹鳍和颅面骨的发育^[27]。转化生长因子 TGF β 是多功能转化因子,由许多骨骼中的细胞产生,大量存在于骨基质中,TGF β 调节骨细胞的吸收活性及破骨细胞的形成。

3 斑马鱼骨骼的经典染色方法

斑马鱼作为骨骼研究的模式动物已被广泛的应用在骨骼领域,目前对研究斑马鱼骨骼模型的方法有经典的骨骼染色和医学上的影像学检测等。经典的骨骼染色法有:组织固定染色,活体荧光染色,其中活体荧光染色主要用于斑马鱼幼鱼的骨骼钙化及成鱼的尾鳍再生研究,而显微 CT 及双能 X 光吸收法常用于成鱼的骨骼结构、骨密度分析中,下面就这些研究方法及其优缺点做一概述:经典的骨骼染色方法有茜素红染色 (alizarin red),阿尔新蓝染色 (alcian blue),钙黄绿素染色 (calcein) 等方法,详情可见参考文献^[28];其中 alizarin red 是针对

斑马鱼的硬骨染色,其原理是利用骨骼中丰富的钙盐成分和茜素红可整合骨骼中钙离子的特点,从而可通过茜素红与骨中的钙结节引起的明显显色现象来检测鱼的骨形态和骨密度^[7]。alcian blue 是专用于对软骨细胞外基质进行染色的染料,利用此染色手段可检测胚胎的骨骼形成和软骨的发育情况,是发育生物学研究中常用的一种方法^[29]。calcein 是利用化合物与骨骼中的钙化离子结合在荧光的照射下发出绿色荧光,以标示骨骼钙化程度^[30]。alizarin red 在实验过程的前期要经过固定、脱色和脱水处理,实验步骤较多,耗时较长。alcian blue 在实验过程的后期也同样要经过一系列程序,消化-脱色-漂白等,过程繁琐,且每一步都要掌握好时间,防止消化、漂白时间过长,使实验样品损坏。calcein 在实验过程中,染色时间短且反应灵敏,但染色过程一定要避光处理,后期要用大量的清水将染色液清洗干净,防止对荧光信号产生影响。显微 CT 及双能 X 线吸收法用于成鱼的骨骼结构,及骨密度分析中,能够更精准的评价骨的质量,更适用骨质疏松症的早期检测。此外,碱性磷酸酶(ALP)染色与抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色可以分别用来鉴定斑马鱼的成骨细胞与破骨细胞^[31],碱性磷酸酶是成骨细胞早期分化的特征指标,成纤维细胞极少有 ALP,因此可采用 ALP 染色来鉴定成骨细胞;特异的 TRAP 染色酶活性部位呈红色阳性颗粒,分布于破骨细胞胞质内,核为阴性。

4 斑马鱼模型在骨骼药物筛选中的应用

利用斑马鱼作为骨骼模型进行骨骼疾病研究时,首先需要构建斑马鱼骨骼损伤疾病症状,如骨质疏松症。有多种类型的药物可诱导构建骨质疏松模型,常用的药物有糖皮质激素类,如:泼尼松龙,地塞米松;还有药物如维甲酸,枸橼酸铁胺(FAC)等多种药物,还可以对斑马鱼的鱼鳍进行机械性损伤,来模拟人类的骨骼创伤,如:骨折。另外,斑马鱼的尾鳍再生能力也为骨骼研究带来新的方向,本文对利用药物胁迫斑马鱼构建骨质疏松症的研究进行总结和分析。

韦英杰等^[32]通过泼尼松龙构建的骨丢失模型对接骨汤促进骨生成的作用进行评价;李淼等^[33]利用斑马鱼模型来评价地塞米松磷酸钠的毒性及其对斑马鱼骨骼的影响;陈斌等利用高铁胁迫诱导斑马鱼骨质疏松症;此外,还可以通过控制营养的摄

取等方法来构建骨质疏松模型^[34-38]。就上述各种方法构建的模型而言,评价指标一般是一致的,有骨密度的测定,骨形态的计量学等。泼尼松龙和地塞米松诱导的骨质疏松症更接近与人类长期或者在年轻时期长时间使用激素来治疗疾病时,后期就会引发无菌性股骨头坏死,但在使用糖皮质激素造模时应把握好剂量,合适的剂量既可以有效引起骨量丢失,又不会因免疫抑制过强导致斑马鱼死亡。而 FAC 所诱导的骨质疏松症更接近与在过度失血的情况下补血过盛,导致铁过载的病人,FAC 药物在使用时,要现配现用,否则会有沉淀产生会导致斑马鱼死亡。

上述药物诱导的模型已经被广泛的应用于筛选治疗骨质疏松的药物,王长梅等^[39]以泼尼松龙诱导的斑马鱼幼鱼骨质疏松模型考察川续断皂苷 V 和川续断皂苷 VI 抗骨质疏松活性;韦英杰等^[40]以地塞米松诱导的斑马鱼幼鱼骨质疏松模型对西药依替膦酸二钠的抗骨质疏松活性进行评价,王晗课题组以 FAC 引发的骨质疏松症去评价去铁胺对骨质疏松症的治疗作用。前期本课题组的研究结果也表明,在高铁环境下能成功构建斑马鱼成鱼骨质疏松模型,并证实了临床药物阿仑膦酸钠通过 Bmp 信号修复骨骼的损伤^[41]。由上述的报道可知,药物诱导斑马鱼的骨质疏松症模型已成功应用于药物筛选中。

5 结语

目前,斑马鱼以其独特优势,成为日益受重视的一种模式生物,尤其在药物的高通量筛选中的应用。随着斑马鱼骨骼发育机理的不断探索,斑马鱼骨骼研究相关方法和技术日益完善,进一步促使斑马鱼作为骨骼疾病模型被研究者所使用。斑马鱼骨骼模型能高效、快速、低成本、高通量的对治疗骨骼疾病相关药物进行筛选,并且结果可信度高。虽然斑马鱼作为新兴的模式生物,还有许多发育和遗传机理尚未研究透彻,但对于研究骨骼发育和其相关疾病,斑马鱼骨骼模型是研究者的优选之一,斑马鱼骨骼模型具有广阔的科研和商业前景。

参 考 文 献(References)

- [1] 杜武,许加星,张娟,等. 药物非临床毒代动力学研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2012,26(6): 903-906.
Du W, Xu JX, Zhang J, et al. Progress in nonclinical toxicokinetics in drugs [J]. Chin J Pharm Toxicol, 2012, 26(6): 903-906.

- [2] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 1995, 203(3): 253-310.
- [3] 方薇, 曾静, 王付利, 等. 模式生物斑马鱼在人类疾病研究中的应用 [J]. *医学信息*, 2010, 5(2): 337-338.
- [4] Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16(1): 191-220.
- [5] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 747-754.
- [6] Yang Y. Skeletal morphogenesis during embryonic development [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009, 19(3): 197-218.
- [7] Javidan Y, Schilling TF. Development of cartilage and bone [J]. *Methods Cell Biol*, 2004, 76: 415-436.
- [8] Borday-Birraux V, Heyden CVD, Debais-Thibaud M, et al. Expression of *Dlx* genes during the development of the zebrafish pharyngeal dentition; evolutionary implications [J]. *Evol Dev*, 2006, 8(2): 130-141.
- [9] Piotrowski T. Jaw and branchial arch mutants in zebrafish II: Anterior arches and cartilage differentiation [J]. *Development*, 1996, 123(1): 345-356.
- [10] 王长梅. 基于斑马鱼模型的中药壮骨效应评价新方法的建立及应用 [D]. 江苏: 江苏大学, 2013.
Wang CM. Development and application of novel method for evaluating of bone-strengthening effect of traditional Chinese medicine based on zebrafish model [D]. Jiangsu: Jiangsu University, 2013.
- [11] Cabbage CC, Mabee PM. Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae) [J]. *J Morphol*, 1996, 229(2): 121-160.
- [12] Du SJ, Frenkel V, Kindschi G, et al. Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein [J]. *Dev Biol*, 2001, 238(2): 239-246.
- [13] 奚洋. 斑马鱼骨骼发育及钙化异常突变体筛选 [D]. 南京: 南开大学, 2012.
Xi Y. Screening of abnormal mutant mutants in zebrafish bone development and calcification [D]. Nanjing: Nanjing University, 2012.
- [14] Renn J, Winkler C. *Osterix-mCherry* transgenic medaka for in vivo imaging of bone formation [J]. *Dev Dyn*, 2009, 238(1): 241-248.
- [15] Felber K, Croucher P, Roehl HH. Hedgehog signalling is required for perichondral osteoblast differentiation in zebrafish [J]. *Mech Dev*, 2011, 128(1-2): 141-152.
- [16] Philia G, Andrew C, Logan C, et al. An ancient neurotrophin receptor code; a single *Runx/Cbfb* complex determines somatosensory neuron fate specification in zebrafish [J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(7): e1006884.
- [17] Yang Y. Skeletal morphogenesis during embryonic development [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009, 19(3): 197-218.
- [18] Hall BK, Miyake T. The membranous skeleton; the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis [J]. *Anat Embryol (Berl)*, 1992, 186(2): 107-124.
- [19] Bird NC, Mabee PM. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae) [J]. *Dev Dyn*, 2003, 228(3): 337-357.
- [20] Lefebwe V, Huang W, Harley VR, et al. *SOX9* is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha 1$ (II) collagen gene [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(4): 2336-2346.
- [21] Tew SR, Peffers MJ, McKay TR, et al. Hyperosmolarity regulates *SOX9* mRNA posttranscriptionally in human articular chondrocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(4): e898-e906.
- [22] Bell DM, Leung KKH, Wheatley SC, et al. *SOX9* directly regulates the type-II collagen gene [J]. *Nat Genetics*, 1997, 16(2): 174-178.
- [23] Miyake T, Hall BK. Development of in vitro organ culture techniques for differentiation and growth of cartilages and bones from teleost fish and comparisons with in vivo skeletal development [J]. *J Exp Zool*, 1994, 268(1): 22-43.
- [24] Verreijdt L, Debais-Thibaud M, Bordaybirraux V, et al. Expression of the *dlx* gene family during formation of the cranial bones in the zebrafish (*Danio rerio*): differential involvement in the visceral skeleton and braincase [J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(5): 1371-1389.
- [25] Lézot F, Thomas BL, Blin-Wakkach C, et al. *Dlx* homeobox gene family expression in osteoclasts [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(3): 779-787.
- [26] Terry A, Kilbey A, Vaillant F, et al. Conservation and expression of an alternative 3' exon of *Runx2* encoding a novel proline-rich C-terminal domain [J]. *Gene*, 2004, 336(1): 115-125.
- [27] Spoorendonk KM, Peterson-Maduro J, Renn J, et al. *Retinoic acid* and *Cyp26b1* are critical regulators of osteogenesis in the axial skeleton [J]. *Development*, 2008, 135(22): 3765-3734.
- [28] 张文娟, 许璟瑾, 姚丽云, 等. 氨基葡萄糖硫酸盐及其衍生物对斑马鱼骨骼损伤修复的比较研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 12(28): 9-14.
Zhang WJ, Xu JJ, Yao LY, et al. Comparison of the effect of glucosamine hydrochloride and its derivatives on the skeletal repair in zebrafish [J]. *Chin J of Comp Med*, 2018, 12(28): 9-14.
- [29] Birkholz DA, Killian ECO, George KM, et al. *Prdm1a* is necessary for posterior pharyngeal arch development in zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 2010, 238(10): 2575-2587.
- [30] Walker MB, Kimmel CB. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae [J]. *Biotech Histochem*, 2007, 82(1): 23-28.
- [31] Filgueira L. Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols [J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(3): 411-414.

- [32] 景莉君, 王长梅, 韦英杰, 等. 接骨汤抗泼尼松龙诱导斑马鱼骨丢失的作用研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(5): 1071-1075.
Jin LJ, Wang CM, Wei YJ, et al. Preventive effect of Jie-Gu-Tang on osteoporosis model using zebrafish induced by prednisolone[J]. World Sci Technol-Modern Trad Chin Med Mat Med, 2014, 16(5): 1071-1075.
- [33] 李淼. 地塞米松磷酸钠导致斑马鱼颅面部发育异常的研究[D]. 华中科技大学, 2009.
Li M. Craniofacial dysplasia in zebrafish induced by dexamethasone sodium phosphate [D]. Huazhong University of Science and Technology, 2009.
- [34] Geurtzen K, Knopf F. Adult zebrafish injury models to study the effects of prednisolone in regenerating bone tissue[J]. J Vis Exp, 2018, (140).
- [35] Jiang Y, Chen B, Yan Y, et al. Hecpudin protects against iron overload-induced inhibition of bone formation in zebrafish [J]. Fish Physiol Biochem, 2019, 45(1):365-374.
- [36] He H, Wang C, Tang Q. Possible mechanisms of prednisolone-induced osteoporosis in zebrafish larva [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101:981-987.
- [37] Juliana C, Maria S, Nivaldo N, et al. Inadequate dietary phosphorus levels cause skeletal anomalies and alter osteocalcin gene expression in zebrafish[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2). pii: E364.
- [38] 陈斌, 刘晨, 李光飞, 等. 高铁环境对斑马鱼骨形成的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2013, 6(3): 240-245.
Chen B, Liu C, Li GF, et al. Effect of excess iron on bone formation in zebrafish[J]. Chin J Osteoporosis Bone Miner Res, 2013, 6(3): 240-245.
- [39] 王长梅, 贾晓斌. 利用斑马鱼模型评价川续断皂苷 V 和 VI 的抗骨质疏松活性[J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(1): 88-91.
Wang CM, Jia XB. Evaluation of antiosteoporotic activity for micro-amount asperosaponins V and VI by on the osteoporosis model using zebrafish [J]. J Chin Pharm Univ, 2014, 45(1): 88-91.
- [40] 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(2):255-260.
Wei YJ, Wang CM, Cai XT, et al. Establishment of zebrafish osteopenia model induced by dexamethasone [J]. Acta Pharm Sin, 2013, 23(2): 105-110.
- [41] Zhang W, Xu J, Qiu J, et al. Novel and rapid osteoporosis model established in zebrafish using high iron stress[J]. Biochem Bioph Res Commun, 2018, 496(2):654-660.

[收稿日期] 2019-01-12