

Forskolin 处理真鲷胚胎条件的研究

谭训刚^{1, 2, 3}, 杜少军³, 张培军¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. Center of Marine Biotechnology, University of Maryland Biotechnology Institute, Baltimore, MD USA 21202)

摘要: 研究 Forskolin 处理真鲷胚胎的条件。对加药时期以及 Forskolin 浓度进行了优化, 得到了处理真鲷胚胎的加药时期为受精后 6 h, Forskolin 的浓度为 0.01mmol/L 和 0.02mmol/L, 在此条件下处理过的胚胎体节由正常的 V 型变成 U 型。该研究结果将有利于研究 Hh 信号对真鲷成肌因子的影响。

关键词: Forskolin; 真鲷; U-型体节; 胚胎; 浓度

中图分类号: Q952; Q954.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)04-0005-07

Forskolin 是一种双萜类药物, 分子式为 $C_{22}H_{34}O_7$, 化学名称 7 β -Acetoxy-8, 13-epoxy-1 α , 6 β , 9 α -trihydroxy-labd-14-ene-11-one, 又称为 Colforsin。分子量为 410u。它是在印度一种植物 (Coleus) 中发现的, 当地以该植物治疗一些疾病, 经研究发现起作用的重要成分是 Forskolin, 它重要的功能是调节体内的 cAMP 的量^[1, 2]。cAMP 作为体内第二信使, 是细胞调节重要的物质之一。利用该药物的特性已经将其应用于神经系统、激素、肌肉、以及肌肉和神经系统之间的关系等所有与 cAMP 有关的研究之中。

与鱼类有关的研究大多以斑马鱼为模型进行的, 斑马鱼的卵透明, 可以清晰地观察到胚胎的发育情况。斑马鱼肌肉前体细胞靠近脊索表明脊索信号可能在其发育过程中具有一定的作用。脊索信号系统中有 hedgehog (Hh) 中的 Sonic hedgehog (Shh) 信号系统以及影响 Hh 信号的依靠 cAMP 的蛋白酶 (PKA)——一个脊椎动物和果蝇中的拮抗剂^[3, 4]。在所有已经研究的物种中 PKA 的激活可以抑制 Hh 信号系统, 抑制 PKA 可以模拟 Hh 信号^[4, 5]。PKA 的激活可以通过药物比如 Forskolin 激活胞内 cAMP 水平^[6, 7]进行。在斑马鱼中已经证明 Forskolin 可以抑制 Hh 信号^[8], 从而影响慢肌的发育。在这些 Hh 信号被抑制的胚胎中出现一个表型: 通常的 V 型体节变成 U 型。

根据多种生物研究的结果推测真鲷中应该存在同样的信号系统, 但尚无有关研究报道。为了研究该系统在真鲷中的作用, Forskolin 被用来处理真鲷胚胎。并对 Forskolin 处理真鲷胚胎的条件进行了优化, 获得其最佳的处理条件。

1 材料与方法

成熟的真鲷 (*Sparus aurata*) 在美国马里兰州生物

技术中心海洋研究所真鲷饲养系统中饲养。所得胚胎在室温 25~27°C 下培养, 每一个培养皿加 5mL 海水, 100 颗卵以及对应的药品。每一实验采用 3 次重复。Forskolin 溶解于 4% 二基甲砒。Leica 解剖镜。

2 结果

Forskolin 含有一定毒性, 可以通过浓度以及加药的时期对胚胎发育进行影响。因此浓度以及加药的时期必须确定下来, 否则胚胎不会正常发育或者 Forskolin 对胚胎没有作用。加药的时期以及 Forskolin 浓度根据室温下处理 14h 后, 胚胎出现的表型率 (U 型胚胎) 以及胚胎的死亡率。根据 Barresi 等^[8]在斑马鱼中确定的时期及浓度, 真鲷胚胎的时期及浓度的确定通过 3 步骤完成: 一是大范围浓度的确定, 二是浓度及时期的确定, 三是准确浓度的确定。

2.1 大范围 Forskolin 的浓度的确定

根据 Barresi 等^[8]在斑马鱼的实验确定了一个浓度范围内, 从 0.0001mmol/L 到 0.3mmol/L 选择出 5 个不同的浓度进行试验。

从表 1 可以看出, 在选择浓度范围的时候, 如果 Forskolin 超过 0.1mmol/L, 原肠胚不能完成, 胚胎死亡。Forskolin 的浓度必须低于 0.1mmol/L。

收稿日期: 2004-07-09; 修回日期: 2005-01-13

基金项目: 国家自然科学基金国际合作交流项目 (2003); 国家自然科学基金 (30270692)

作者简介: 谭训刚 (1973-), 男, 山东文登人, 博士, 研究方向: 鱼类发育生物学, E-mail: devbiol@ms.qdio.ac.cn

表1 Forskolin 浓度对真鲷胚胎死亡率的影响

Tab.1 The effect of Forskolin concentration on the rate of death of sea bream embryos

浓度(mmol/L)	死亡率(%)
0.0001	10~13
0.001	15~18
0.01	20~24
0.1	100
0.3	100
C1	8~10
C2	8~10

注:C1为对照1,含有4%二甲亚砜的海水;C2为对照2,海水。表2,3同。

2.2 浓度范围以及加药时期的确定

根据上面的结果以及 Barresi 等^[8]的研究将时期确定在圆顶期(Dome)前后。低于 0.1mmol/L 的浓度用来选择开始处理的时期以及浓度。在室温培育真鲷卵时,圆顶期大约为受精后 5~7h,因此在 3 个浓度(0.0001mmol/L, 0.001mmol/L 和 0.01mmol/L)以及 3 个时期(5, 6, 7h)中确定合适的合适时期以及浓度。从表 2 可以看出在高浓度(0.001mmol/L 和 0.01mmol/L)中,如果加药的时期是受精后 5 h,由于加药时间太早超过 80%的胚胎不能正常发育,很早死亡;如果是受精后 7h,由于加药时间太晚大约 80%的胚胎没有表型出现;如果是受精后 6h,会出现表型,出现的表型为 U-型体节(图 1.B)。在浓度为 0.0001mmol/L 所有的处理中,很少或者没有明显的表型出现。因此,在最后一步,受精后的 6h 加药处理,在 0.001mmol/L 和

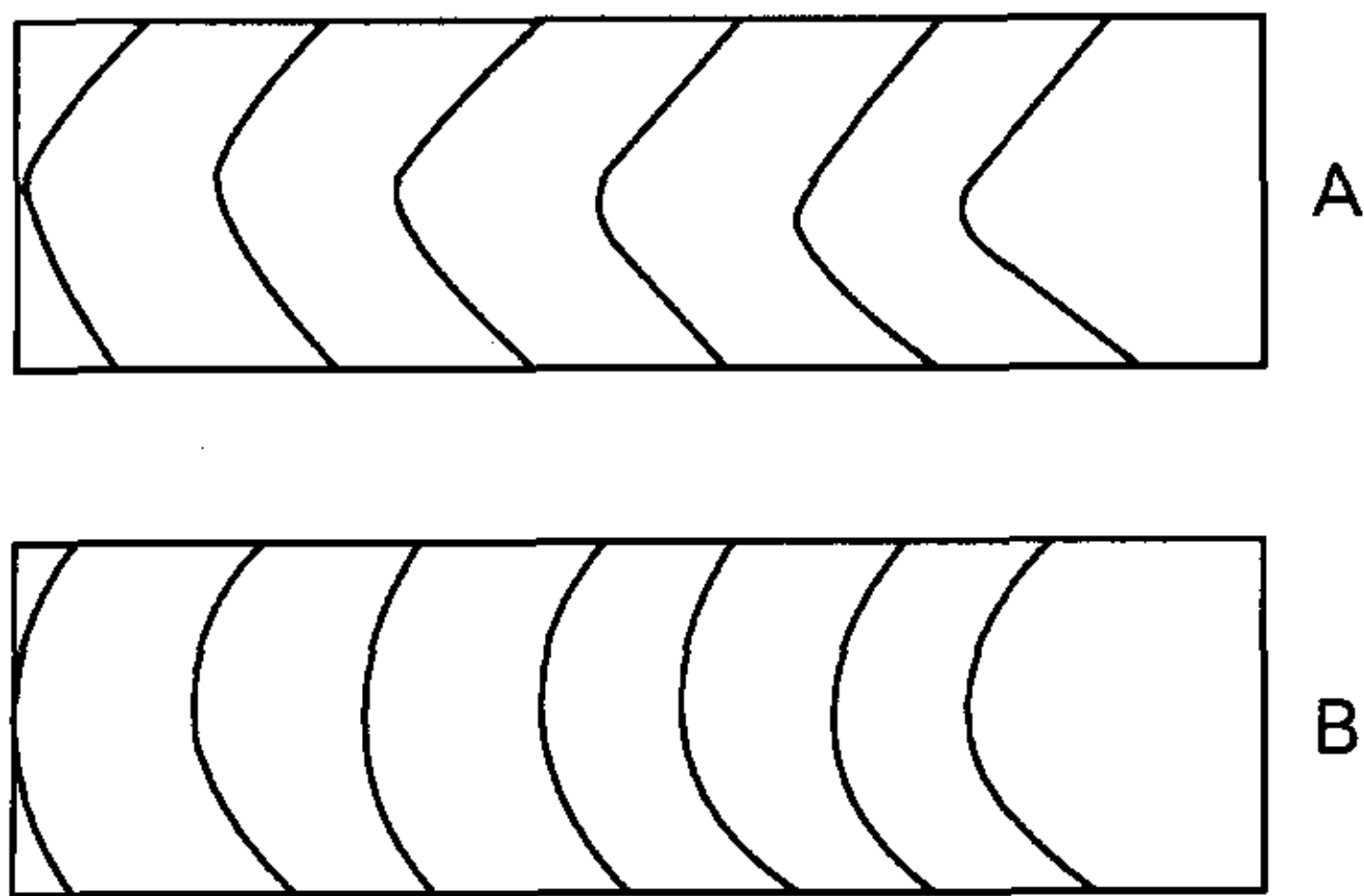


图1 正常真鲷鱼胚胎与处理后胚胎体节形状示意

Fig. 1 The sketch map of somite of normal and treated sea bream embryos

A. 正常胚胎体节形状(V型)的示意图;B. 处理后体节出现的表型(U型)示意

A. the sketch map of somite of normal embryos(V-type); B. the sketch map of somite of treated embryos(U-type)

表2 Forskolin 加入的时期以及浓度对胚胎发育的影响

Tab.2 The effect of the time that Forskolin was added in the medium and the contraction on the development of embryos

受精后时间(h)	浓度(mmol/L)	死亡率(%)	表型率(%)
5	0.0001	15~20	6~8
	0.001	>80	/
	0.01	>80	/
	C1	8~10	0
	C2	8~10	0
	6	0.0001	10~12
0.001		15~17	10~15
0.01		20~21	70~73
C1		8~10	0
C2		8~10	0
7		0.0001	8~10
	0.001	12~14	10~12
	0.01	16~17	10~12
	C1	8~10	0
	C2	8~10	0

注:/ 没有检测。

0.01mmol/L 之间决定 Forskolin 的浓度。

2.3 最终浓度的确定

根据步骤 1 和 2 的结果,设计了 5 个浓度(0.001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02mmol/L)以确定Forskolin 的准确浓度。

根据表 3 的结果,在浓度为 0.01mmol/L 和 0.02mmol/L,大约 80%胚胎表型(U-型体节)相近;10%左右的胚胎死亡;10%左右的胚胎不能正常发育,停留在原肠期,最终死亡。在剩下的 3 个低浓度中,表型率非常低。因此,最后确定 Forskolin 浓度为0.01mmol/L 和 0.02mmol/L;处理的时间为受精后 6 h。

3 讨论

作为 cAMP 激活剂的 Forskolin 能增加胞内腺嘌呤循环激活胞内 cAMP 水平, cAMP 水平的增加激活 PKA 从而抑制 Hh 信号^[6,7]。作为药物 Forskolin 具有一定的毒性,高浓度的 Forskolin 能导致细胞不能正常发育,从而细胞死亡。在实验的过程中,发现由于 Forskolin 的加入,胚胎发育迟缓;在死亡的胚胎中发现其靠近尾侧出的脊索不能闭合,即在尾部出现分叉,该原因可能是胚胎形成胚盾后,胚层继续外包时,尾牙处不能闭合造成的。由此可以看出 Forskolin 处理胚胎的条件必须确定,才能找到一个合适的处理条件,保证胚胎能正常发育,不能死亡,并且出现一定的表型。Hh 信号的缺失可以造成多种发育缺陷,但是大

表3 Forskolin 浓度对胚胎发育的影响

Tab.3 The effect of Forskolin concentration on the development of embryos

浓度(mmol/L)	死亡率(%)	表型率(%)
0.001	10~12	10~15
0.0025	15~17	30~32
0.005	16~20	40~44
0.01	23~25	75~77
0.02	22~26	74~78
C1	4~6	0
C2	4~6	0

多缺陷常难以在发育过程中观测到,只有通过原位杂交等技术或者胚胎发育成成体后才能观察到。而在肌肉发育的过程中, Hh 信号的缺失导致胚胎的体节由原来的 V-型变成 U-型,该形状在斑马鱼等中出现^[8],并且在解剖镜下可以观察到,因此由该表型的出现率作为检测的标准较易操作。该结果不仅将有助于在真鲷中研究 Hh 信号对肌肉发育的影响,而且对于研究 Hh 信号对其它组织的发育的影响也有帮助。

在本实验中得到的 Forskolin 的浓度与 Barresi 等^[8]不同,这可能由于真鲷的卵和斑马鱼的卵属于不同的类型造成的,由于真鲷的卵属于浮型,含有脂肪颗粒,而斑马鱼的卵属于沉型,不含有脂肪颗粒。脂肪应该较容易吸收有机溶剂, Forskolin 属于有机物,并且脂肪颗粒是真鲷发育过程中营养来源物质,因此可以在体内富集高浓度的药物,是否与此有关需要进

一步研究。处理的时期与 Barresi 等^[8]的相似,都是在圆顶时期前后,过早处理导致胚胎死亡;过晚影响较小,不能出现预期的结果。

参考文献:

[1] Laurenza A, Sutkowski E M, Seamon K B. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1989, 10(11): 442 - 447.

[2] Barber R, Goka T J. Adenylate cyclase activity as a function of Forskolin concentration [J]. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*, 1985, 10(1): 23 - 29.

[3] Hammerschmidt M, Brook A, McMahon A P. The world according to Hedgehog, [J]. *Trends Genet*, 1997, 13 (1): 14 - 21.

[4] Perrimon N. Hedgehog and beyond [J]. *Cell*, 1995, 80: 517 - 520.

[5] Ingham, P W. Transducing Hedgehog: the story so far [J]. *EMBO J*, 1998, 17: 3 505 - 3 511.

[6] Seamon K B, Daly J W. Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP - generating systems [J]. *J Cyclic Nucleotide Res*, 1981, 7: 201 - 224.

[7] Tesmer J J, Sprang S R. The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8: 713 - 719.

[8] Barresi M J, Stickney H L, Devoto S H. The zebrafish slow - muscle - omitted gene product is required for Hedgehog signal transduction and the development of slow muscle identity [J]. *Development*, 2000, 127: 2 189 - 2 199.

The study on the condition of treatment on the embryos of sea bream by Forskolin

TAN Xun - gang^{1,2,3}, DU Shao - Jun³, ZHANG Pei - Jun¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China ; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China ; 3. Center of Marine Biotechnology, University of Maryland Biotechnology Institute, Baltimore, MD USA, 21202.)

Received: Jul., 9, 2004

Key words: forskolin; sea bream; U - type somites; embryos; concentration

Abstract: The condition that affects on the result of treatment on the sea bream embryos by Forskolin was studied. From the study, the concentration of the Forskolin and the stage that embryos were incubated in Forskolin was got. The concentration of Forskolin was 0.01mmol/ L and 0.02mmol/ L; while the stage was 6 hour post fertilization at room temperature. In this condition the embryos were treatment showed a phenotype - U type somites. This study will contribute to the study on the effect of Hh signals on myogenesis in sea bream.

(本文编辑:刘珊珊)