

Thời gian sốc nhiệt và mức độ tổn thương xương của ấu trùng cá medaka chuyển gen *rankl*: HSE: CFP dòng c1c8 làm mô hình bệnh loãng xương

Trần Thị Thùy Trang, Phạm Văn Cường, Phạm Thị Thanh,
Hà Thị Minh Tâm, Trần Đức Long, Tô Thanh Thúy*

*Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Cá medaka (*Oryzias latipes*) chuyển gen *rankl*:HSE:CFP được dùng làm mô hình bệnh để tìm ra hoạt chất chống loãng xương. Ở mô hình cá này, gen chuyển *rankl* mã hóa cho protein Rankl - yếu tố kích thích hình thành và biệt hóa tế bào hủy xương, được điều khiển bởi promoter cảm ứng nhiệt nên khi ấu trùng cá bị sốc nhiệt 39°C, Rankl ngoại sinh biểu hiện làm tế bào hủy xương hình thành và hoạt động, phá hủy xương (nhất là các xương cung thân kinh của các đốt sống) tạo nên kiểu hình giống loãng xương. Với các nghiên cứu sử dụng dòng cá này cho việc sàng lọc hoạt chất chống loãng xương, mức độ tổn thương xương của cá là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá tác dụng của chất. Mức độ tổn thương xương có thể được điều chỉnh bởi thời gian sốc nhiệt, tuy nhiên mối quan hệ giữa hai yếu tố này hiện vẫn chưa được làm rõ. Để tìm ra điều này chúng tôi chia ấu trùng cá *rankl*:HSE:CFP dòng c1c8 ở 9 ngày tuổi thành các nhóm và sốc nhiệt ở 39°C với 5 khoảng thời gian là 30, 60, 75, 90 và 120 phút, sau đó đánh giá mức độ tổn thương xương khi cá 11 ngày tuổi dựa vào chỉ số khoáng hóa I_m của chúng. Kết quả đã xác định được các mức độ tổn thương xương ở cá tương ứng với các khoảng thời gian nghiên cứu trên là 33, 62, 65, 79 và 93% và khẳng định được mối tương quan thuận chặt giữa mức độ tổn thương xương cũng như tương quan nghịch chặt giữa chỉ số khoáng hóa với thời gian sốc nhiệt. Đây là những dữ liệu quan trọng giúp xây dựng các quy trình phù hợp cho nghiên cứu về loãng xương tiếp theo sử dụng dòng cá này.

Từ khóa: Medaka, loãng xương, chuyển gen, RANKL, thời gian sốc nhiệt.

1. Mở đầu

Loãng xương là bệnh về xương phổ biến, đặc trưng bởi sự suy giảm mật độ và cấu trúc xương. Để tìm hiểu về cơ chế của bệnh, tìm ra

thuốc và liệu pháp chữa trị bệnh, rất nhiều nghiên cứu đã được tiến hành trên mô hình động vật có vú [1-3]. Gần đây, một số nhóm nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh cá medaka (*Oryzias latipes*) cũng là một mô hình rất tốt cho nghiên cứu về xương do có cơ chế phân tử và tế bào của các quá trình phát triển và tái tạo xương khá tương đồng so với người. Bệnh loãng xương gây ra do hoạt động hủy

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-988738016.

Email: tothanhtuy_sinh@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4617>

xương lân át tạo xương, hay do suy giảm hormon estrogen trong quá trình già hóa; bệnh xương đá do suy giảm số lượng và chức năng của tế bào hủy xương cũng được ghi nhận ở cá [4-6]. Thêm vào đó, cá medaka có những đặc điểm của động vật mô hình vượt trội so với động vật có vú: kích thước nhỏ, chi phí nuôi dưỡng thấp, thời gian trưởng thành sinh dục ngắn, thụ tinh ngoài, phôi nhỏ trong suốt giúp dễ quan sát tế bào xương *in vivo* [7]. Đặc biệt, việc biến đổi hệ gen để tạo cá chuyển gen hay đột biến làm mô hình bệnh và nghiên cứu về bệnh có thể thực hiện dễ dàng [5, 6, 8-13].

Tô Thanh Thúy và cộng sự tại Đại học Quốc gia Singapore đã tạo ra dòng cá chuyển gen *rankl:HSE:CFP* biểu hiện đồng thời Rankl (*Receptor activator of nuclear factor kappa-β ligand*) ngoại sinh và protein phát huỳnh quang CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng nhiệt hoạt động hai chiều dùng làm mô hình loãng xương [6]. Rankl là yếu tố kích thích hình thành, biệt hóa và hoạt động của tế bào hủy xương. Khi cá bị sốc nhiệt, Rankl ngoại sinh được biểu hiện, kích thích sự hình thành và hoạt động của tế bào hủy xương làm cho mô xương bị phá hủy, tạo kiểu hình giống loãng xương [6]. Hoạt động của tế bào hủy xương có thể quan sát được sau khi sốc nhiệt cá chuyển gen kép *rankl:HSE:CFP/ctsk:mCherry* là con lai của cá *rankl:HSE:CFP* với cá chuyển gen *ctsk:mCherry* biểu hiện huỳnh quang màu đỏ của mCherry ở tế bào hủy xương [6], do vậy mật độ huỳnh quang mCherry có thể phản ánh mức độ tổn thương xương của cá này.

Cá *rankl:HSE:CFP* đã được tiếp nhận từ Đại học quốc gia Singapore, nuôi, duy trì ổn định và lai tách thành một số dòng (subline) đồng nhất về di truyền với gen chuyển (trong đó có dòng c1c8 [14] được dùng cho nghiên cứu này) ở phòng thí nghiệm của chúng tôi tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN cho các nghiên cứu về loãng xương và sàng lọc chất chống loãng xương. Do vậy, các quy trình để tạo ra các kiểu hình loãng xương dựa trên các mức độ tổn thương xương tạo được trên mỗi dòng cá là

không thể thiếu khi tiến hành nghiên cứu. Các mức độ biểu hiện Rankl ngoại sinh dẫn đến các mức độ tổn thương xương khác nhau có thể được tạo ra bởi việc thay đổi thời gian sốc nhiệt. Việc tìm ra mối tương quan giữa thời gian sốc nhiệt và mức độ tổn thương xương ở mỗi dòng cá (ở nghiên cứu này là dòng c1c8) là rất quan trọng cho việc thiết lập quy trình sử dụng dòng cá này làm mô hình nghiên cứu bệnh loãng xương.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên cá medaka chuyển gen *rankl:HSE:CFP* dòng c1c8 [6, 14], cá chuyển gen *ctsk:mCherry* và cá chủng đại nhận được từ Đại học quốc gia Singapore [6].

2.2. Phương pháp duy trì và chăm sóc cá medaka

Cá được nuôi, duy trì dựa vào các quy trình tiêu chuẩn trên các phòng thí nghiệm trên thế giới [7] và phương pháp chúng tôi thiết lập được dựa trên điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam [14-16].

2.3. Phương pháp sốc nhiệt tạo kiểu hình loãng xương

Kiểu hình loãng xương trên cá được tạo ra dựa trên cơ sở của phương pháp và qui trình đã được mô tả bởi Tô Thanh Thúy và cộng sự [6]. Ấu trùng cá *rankl:HSE:CFP* 9 ngày tuổi được chia thành 6 nhóm: 1 nhóm đối chứng không sốc nhiệt và 5 nhóm được sốc nhiệt ở 5 khoảng thời gian: 30, 60, 75, 90 hoặc 120 phút; mức độ loãng xương được phân tích lúc ấu trùng được 11 ngày tuổi.

2.4. Phương pháp nhuộm xương cá

Ấu trùng cá 11 ngày tuổi, 2 ngày sau sốc nhiệt được nhuộm bằng thuốc nhuộm Alizarin red (Sigma A5533) như đã được công bố [6].

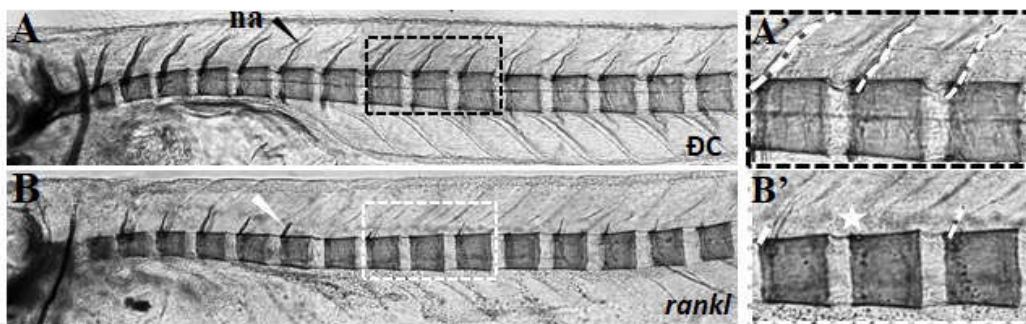
2.5. Kỹ thuật chụp và xử lý hình ảnh

Chụp huỳnh quang ấu trùng cá sông: ấu trùng đã sốc nhiệt được xử lý như công bố trước đây của chúng tôi [6], chụp bằng máy chụp ảnh Optika lắp với kính hiển vi Zeiss Stemi 2000-C kết hợp với bộ kit huỳnh quang (Lumos Technology Co. Ltd.).

Ấu trùng cá đã nhuộm được xử lý như qui trình đã được miêu tả trước đây [6, 14, 15], chụp ảnh bằng máy Optika với kính hiển vi Axioplanz Zeiss VMI0070. Hình ảnh được phân tích nhờ phần mềm Image J.

2.6. Phương pháp đánh giá mức độ khoáng hóa và tổn thương xương cá

Mức độ khoáng hóa của mỗi ấu trùng cá được xác định dựa trên cơ sở của phương pháp đã được Watson và cộng sự công bố năm 2017 [17] và được thay đổi cho phù hợp với nghiên cứu này bằng cách định lượng tương đối gián tiếp thông qua chỉ số khoáng hóa xương I_m . I_m được tính là tổng độ dài các xương cung thân kinh mặt bên trái của 15 đốt sống đầu tiên của ấu trùng cá được đo bằng phần mềm Image J (Hình 1).



Hình 1. Minh họa cách đo chiều dài cung xương thân kinh của ấu trùng cá bằng phần mềm Image J.

Hình ảnh nhuộm xương bằng alizarin red 15 đốt sống đầu tiên của ấu trùng cá đối chứng với các xương cung thân kinh (na) nguyên vẹn (chỉ bằng đầu mũi tên đen) (A) và cá bị sốc nhiệt có các cung xương thân kinh bị tổn thương (đầu mũi tên trắng) (B). A', B': Hình minh họa việc đo chiều dài các cung xương thân kinh ở các đốt sống được đánh dấu trong các ô ở A, B tương ứng. Dấu sao chỉ cung thân kinh bị phá hủy hoàn toàn.

Chỉ số khoáng hóa của mỗi nhóm cá thí nghiệm được đại diện bằng giá trị I_m trung bình của nhóm. Giá trị I_m tương quan ngược với mức độ tổn thương xương của cá. Mức độ tổn thương xương I_d (%) được tính bằng công thức:

$$I_d = \left(\frac{I_m \text{ nhóm đối chứng} - I_m \text{ nhóm sốc nhiệt}}{I_m \text{ nhóm đối chứng}} \right) \times 100\%$$

Có thể hiểu mức độ tổn thương xương của cá là số phần trăm xương cá được sốc nhiệt (đại diện bằng chỉ số I_m) bị mất so với cá đối chứng.

2.7. Phương pháp phân tích thống kê

Kiểm định ANOVA-một nhân tố và T-test được sử dụng để so sánh giá trị I_m trung bình của các nhóm ấu trùng cá sốc nhiệt và nhóm đối chứng. ANOVA và T-test được tính dựa vào phần mềm Graphad và đồ thị biểu diễn tương quan được vẽ sử dụng Excel 2010.

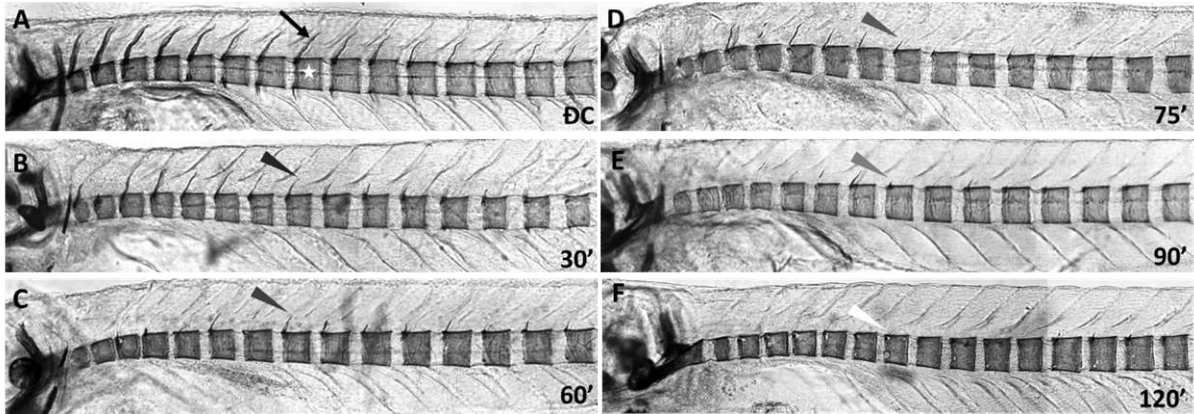
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Các kiểu hình tổn thương xương của cá gây ra bởi các thời gian sốc nhiệt

Như trình bày ở phần trên, để tạo ra các mức độ tổn thương xương khác nhau trên cá rankl: HSE: CFP, chúng tôi chia ấu trùng cá 9 ngày tuổi thành 1 nhóm không sốc nhiệt và 5 nhóm sốc nhiệt ở các thời gian 30, 60, 75, 90

hoặc 120 phút. Sau 2 ngày, ấu trùng cá 11 ngày tuổi được nhuộm xương bằng Alizarin red - Phần xương khoáng hóa bắt màu tím đỏ. Đại

diện các kiểu hình tổn thương xương của các nhóm cá nghiên cứu được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Hình ảnh nhuộm xương của 15 đốt sống đầu tiên của nhóm cá đối chứng và các nhóm cá bị sốc nhiệt ở các khoảng thời gian nghiên cứu.

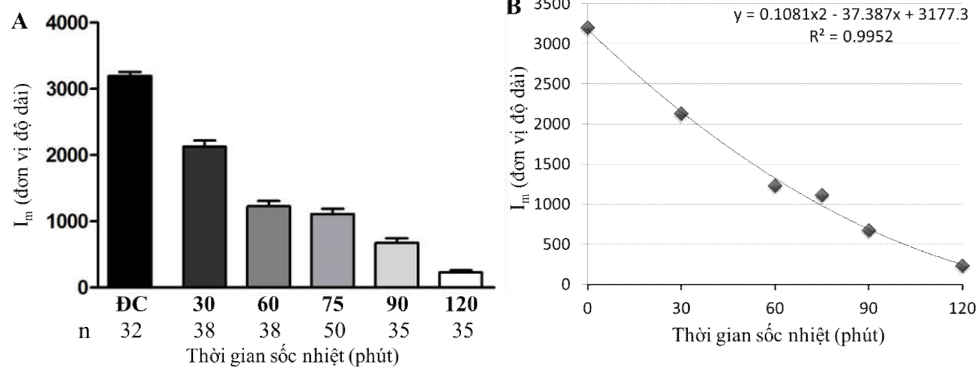
A: Ấu trùng cá không sốc nhiệt có các cấu trúc xương đốt sống gồm thân đốt sống (sao màu trắng) và cung thần kinh còn nguyên vẹn (mũi tên màu đen); B-F: ấu trùng cá sốc nhiệt 30, 60, 75, 90 hoặc 120 phút; mũi tên đen: xương cung thần kinh nguyên vẹn; đầu mũi tên đen: cung thần kinh bị phá hủy một phần, độ đậm/nhạt của màu thể hiện mức độ mất xương; đầu mũi tên trắng: xương cung thần kinh bị phá hủy hoàn toàn.

Hình 2 cho thấy trong khi ấu trùng cá đối chứng có xương còn nguyên vẹn với mỗi đốt sống bao gồm thân đốt sống (dấu sao Hình 2A) và xương cung thần kinh còn nguyên vẹn (mũi tên đen Hình 2A) thì cá ở nhóm bị sốc nhiệt có xương cung thần kinh bị phá hủy ở các mức độ khác nhau (chỉ bởi các đầu mũi tên đen, xám và trắng Hình 2B-F). Ấu trùng cá bị sốc nhiệt 30 phút có các xương cung thần kinh bị phá hủy ít nhất, chỉ mất một phần nhỏ (Hình 2B); cá bị sốc nhiệt 60 và 75 phút có các xương cung thần kinh bị phá hủy nặng hơn (Hình 2C,D) so với nhóm sốc nhiệt 30 phút, thể hiện ở những phần xương còn lại ngắn hơn; ấu trùng cá sốc nhiệt 90 phút có các cung thần kinh bị phá hủy gần như hoàn toàn, chỉ còn lại dấu vết của cung xương ở vài đốt sống (Hình 2E); ấu trùng cá sốc nhiệt 120 phút có kiểu hình tổn thương xương nặng nhất với toàn bộ các cung thần kinh bị mất hoàn toàn (Hình 2F). Chúng tôi nhận thấy kết quả này thống nhất với kết quả chúng tôi đã thực hiện trước đây khi kiểm tra kiểu hình loãng xương của cá thuộc dòng c1c8 sau

khi nó mới được lai tách từ cá *rank1:HSE:CFP* ban đầu [14] về sự đồng đều của kiểu hình tổn thương xương của các cá thể ở cùng điều kiện nhiệt độ và thời gian sốc nhiệt 120 phút [14]. Tổng quát lại kết quả phần này cho thấy xu hướng tương quan thuận giữa mức độ tổn thương xương của ấu trùng cá với thời gian sốc nhiệt.

3.2. Tương quan nghịch giữa chỉ số khoáng hóa của ấu trùng cá và thời gian sốc nhiệt

Để xác định được mối tương quan giữa thời gian sốc nhiệt và mức độ tổn thương xương của ấu trùng cá, đầu tiên chúng tôi đo và tính chỉ số khoáng hóa I_m của mỗi ấu trùng và tính chỉ số khoáng hóa I_m trung bình của ấu trùng trong mỗi nhóm cá thí nghiệm ($n > 30$). Vì chỉ số khoáng hóa được đại diện bằng tổng chiều dài của 15 cung xương thần kinh nên cá có cung thần kinh bị tổn thương nhẹ sẽ có chỉ số I_m cao và ngược lại. Các kết quả thu được trình bày ở Hình 3.



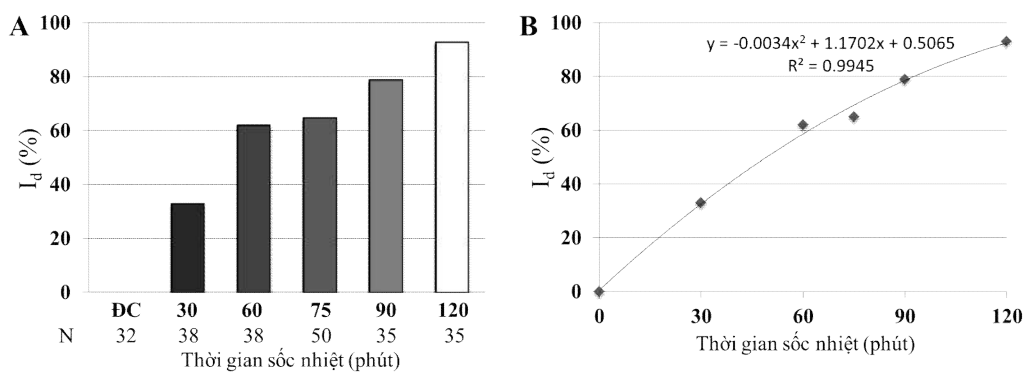
Hình 3. Chỉ số khoáng hóa I_m trung bình các nhóm ấu trùng cá bị sốc nhiệt ở các thời gian nghiên cứu (A) và đường cong tương quan giữa I_m và thời gian sốc nhiệt (B).
 n: số ấu trùng cá của từng nhóm cá thí nghiệm

Nhìn chung chúng tôi thấy chỉ số khoáng hóa I_m có xu hướng giảm khi tăng thời gian sốc nhiệt (Hình 3A). Nhóm cá không bị sốc nhiệt có xương hoàn toàn nguyên vẹn, không bị tổn thương có giá trị I_m trung bình cao nhất. Giữa các nhóm cá bị sốc nhiệt, nhóm bị sốc nhiệt 30 phút có giá trị I_m trung bình cao nhất và nhóm sốc nhiệt 120 phút có giá trị I_m trung bình thấp nhất (Hình 3A). Kiểm định thống kê T-test khẳng định các giá trị I_m này khác nhau có ý nghĩa thống kê so với nhau và so với I_m của nhóm đối chứng ($p < 0.05$) (Hình 3A), chỉ có chỉ số I_m trung bình của nhóm cá bị sốc nhiệt trong 60 phút không khác biệt so với nhóm được sốc nhiệt 75 phút. Thêm vào đó, đồ thị biểu diễn

tương quan cho thấy có mối tương quan nghịch chặt ($OR=0.997$) giữa thời gian sốc nhiệt và chỉ số khoáng hóa của cá theo phương trình bậc hai được biểu diễn ở đường cong ở Hình 3B.

3.3. Tương quan thuận giữa mức độ tổn thương xương cá với thời gian sốc nhiệt

Tiếp theo, chúng tôi tính mức độ tổn thương xương I_d của các nhóm cá bị sốc nhiệt, dựa trên tỷ lệ phần trăm chỉ số khoáng hóa của nó bị mất so với cá đối chứng bằng công thức đã trình bày ở Phần 2.6. Ngược với chỉ số khoáng hóa, mức độ tổn thương xương của các nhóm cá tăng khi thời gian sốc nhiệt tăng (Hình 4A).



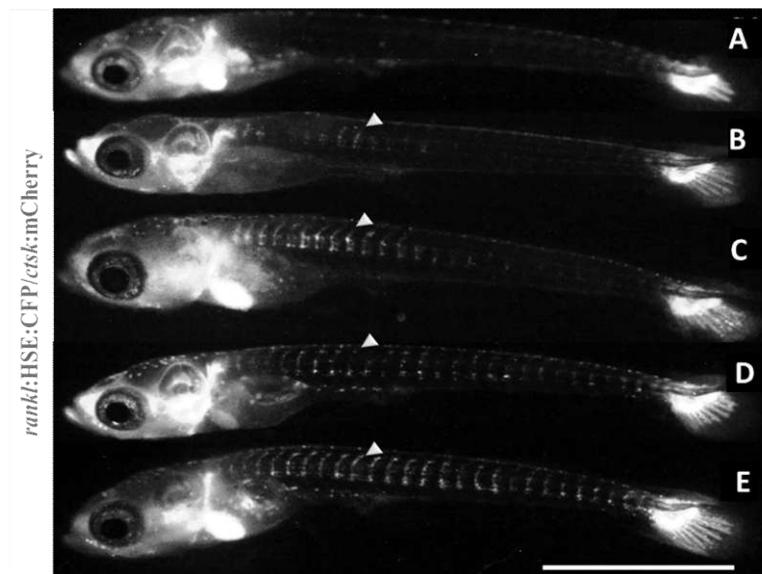
Hình 4. Mức độ mất xương I_d trung bình của ấu trùng cá sốc nhiệt ở các thời gian nghiên cứu (A) và đường cong tương quan giữa I_d và thời gian sốc nhiệt (B).
 n: số ấu trùng cá của từng nhóm cá thí nghiệm

Đồ thị biểu diễn tương quan cho thấy mối tương quan thuận chặt ($OR=0.997$) giữa mức độ mất xương của ấu trùng cá *rankl*:HSE:CFP dòng c1c8 và thời gian sốc nhiệt theo phương trình bậc hai thể hiện bởi đường cong ở Hình 4B.

3.4. Mật độ tín hiệu huỳnh quang mCherry, chỉ thị của tế bào hủy xương ở các nhóm ấu trùng cá sốc nhiệt

Ở phần trên chúng tôi đã xác định được mối tương quan thuận chặt giữa mức độ tổn thương xương của cá *rankl*:HSE:CFP với thời gian sốc nhiệt. Điều này có thể giải thích là do ở cá

này gen chuyển *rankl* hoạt động dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng nhiệt [18] nên cá bị xử lý nhiệt càng lâu thì gen biểu hiện càng mạnh làm hình thành càng nhiều tế bào hủy xương gây nên mức độ tổn thương xương càng mạnh, gợi ý cho chúng tôi kiểm tra mức độ biểu hiện của tế bào hủy xương ở các nhóm cá chuyển gen kép *rankl*:HSE:CFP/*ctsk*:mCherry (là kết quả của phép lai cá *rankl*:HSE:CFP với cá chuyển gen *ctsk*:mCherry, có tế bào hủy xương được đánh dấu bằng tín hiệu huỳnh quang mCherry màu đỏ [6]) sau khi bị sốc nhiệt ở một số thời gian nghiên cứu.



Hình 5. Sự biểu hiện mCherry ở ấu trùng cá chuyển gen kép *rankl*:HSE:CFP/*ctsk*:mCherry 11 ngày tuổi, 2 ngày sau khi bị sốc nhiệt.

Ctrl: ấu trùng cá không sốc nhiệt; 30', 60', 90', 120': ấu trùng cá sốc nhiệt 30, 60, 90 hoặc 120 phút; đầu mũi tên trắng chỉ biểu hiện tín hiệu huỳnh quang mCherry của tế bào hủy xương ở vùng xương cung thân kinh và cột sống của cá.

Đúng như dự đoán, cá chuyển gen kép 11 ngày tuổi, hai ngày sau khi bị sốc nhiệt 39°C ở các thời gian nghiên cứu là 30, 60, 90 hoặc 120 phút đã có biểu hiện huỳnh quang mCherry ở các vùng cung xương thân kinh và đốt sống với các mức độ khác nhau, có xu hướng tăng theo thời gian sốc nhiệt (Hình 5). Điều này giải thích cho mức độ mất xương tăng của các nhóm ấu trùng cá theo thời gian sốc nhiệt và cũng gợi ý cho việc dùng tín hiệu mCherry làm chỉ thị cho mức độ mất xương của cá.

Tổng kết các kết quả của nghiên cứu này, bằng quy trình thí nghiệm như đã trình bày, chúng tôi đã xác định được mối tương quan thuận chặt ($OR=0.997$) giữa mức độ tổn thương xương cũng như tương quan nghịch chặt giữa chỉ số khoáng hóa với thời gian sốc nhiệt của ấu trùng cá *rankl*:HSE:CFP dòng c1c8 và các đường cong tương quan tương ứng. Mức độ tổn thương xương tăng theo thời gian sốc nhiệt có thể được giải thích dựa trên nguyên tắc hoạt động của gen chuyển *rankl* mã hóa cho protein Rankl là yếu tố kích thích hình thành và hoạt

động của tế bào hủy xương của cá [6]. Vì biểu hiện của *rankl* được điều khiển bởi promoter cảm ứng nhiệt [6] nên khi thời gian tiếp xúc với nhiệt độ cao (39°C) càng lâu gen chuyển *rankl* biểu hiện càng mạnh làm cho càng nhiều tế bào hủy xương được tạo ra gây nên mức độ tổn thương xương ở cá càng nặng. Điều này đã được khẳng định dựa trên quan sát mức độ biểu hiện mCherry ở tế bào hủy xương của cá chuyển gen kép *rankl*: HSE: CFP/*ctsk*:mCherry khi bị sốc nhiệt. Các đường cong được tìm ra về mối tương quan giữa mức độ tổn thương xương và giữa chỉ số khoáng hóa với thời gian sốc nhiệt có ý nghĩa rất quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo trên dòng cá này. Dựa trên các đường cong này có thể chọn được thời gian sốc nhiệt cho một mức độ tổn thương xương/mức độ khoáng hóa xương cá nhất định hay cũng có thể “dự báo” mức độ tổn thương/mức độ khoáng hóa xương cá cho một thời gian sốc nhiệt nhất định, qua đó có thể xây dựng được quy trình thí nghiệm phù hợp với từng mục đích nghiên cứu.

3. Kết luận

Cá chuyển gen *rankl*: HSE: CFP dòng c1c8 khi bị sốc nhiệt ở 39°C với các khoảng thời gian 30, 60, 75, 90 hoặc 120 phút có mức độ tổn thương xương tương ứng là 33, 62, 65, 79 hoặc 93%. Mức độ tổn thương xương của ấu trùng cá có mối tương quan thuận chặt (OR=0.997) với thời gian sốc nhiệt ở 39°C, đường cong cho tương quan này được xác định theo phương trình bậc hai.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin cảm ơn PGS.TS Nguyễn Lai Thành, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội và các thành viên trong nhóm nghiên cứu về những giúp đỡ trong quá trình nuôi cá và sử dụng các thiết bị hiển vi, cảm ơn TS. Đỗ Minh Hà đã tư vấn về phương pháp thống kê và định lượng,

cảm ơn Ths. Phạm Thị Bích đã giúp giải quyết các thủ tục tài chính và hành chính cho đề tài. Cá chuyển gen *rankl*: HSE: CFP được giáo sư Christoph Winkler, Đại học Quốc gia Singapore, tặng.

Nghiên cứu này được thực hiện nhờ kinh phí từ đề tài NAFOSTED 106-YS.06-2014.15.

Tài liệu tham khảo

- [1] Baofeng L., Y. Zhi, C. Bei, M. Guolin, Y. Qingshui and L. Jian (2010), “Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid”, *Acta Orthop*, 81 (3), pp. 396-401.
- [2] Halade G.V., M.M. Rahman, P.J. Williams and G. Fernandes (2010), “High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis”, *J Nutr Biochem*, 21 (12), pp. 1162-1169.
- [3] Komori T. (2015), “Animal models for osteoporosis”, *Eur J Pharmacol*, 759, pp. 287-294.
- [4] Shanthanagouda A.H., B.S. Guo, R.R. Ye, L. Chao, M.W. Chiang, G. Singaram, N.K. Cheung, G. Zhang and D.W. Au (2014), “Japanese medaka: a non-mammalian vertebrate model for studying sex and age-related bone metabolism in vivo”, *PLoS One*, 9 (2), pp. e88165.
- [5] To T.T., P.E. Witten, A. Huysseune and C. Winkler (2015), “An adult osteopetrosis model in medaka reveals the importance of osteoclast function for bone remodeling in teleost fish”, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 178, pp. 68-75.
- [6] To T.T., P.E. Witten, J. Renn, D. Bhattacharya, A. Huysseune and C. Winkler (2012), “Rankl-induced osteoclastogenesis leads to loss of mineralization in a medaka osteoporosis model”, *Development*, 139 (1), pp. 141-150.
- [7] Naruse K., Tanaka M., and Takeda H. (2011), *Medaka - A Model for Organogenesis Human Disease and Evolution*, Springer, Japan.
- [8] Grabher C., J. Wittbrodt (2008), “Recent advances in meganuclease-and transposon-mediated transgenesis of medaka and zebrafish”, *Methods Mol Biol*, 461, pp. 521-539.
- [9] Hwang W.Y., Y. Fu, D. Reyon, M.L. Maeder, S.Q. Tsai, J.D. Sander, R.T. Peterson, J.R. Yeh and J.K. Joung (2013), “Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system”, *Nat Biotechnol*, 31 (3), pp. 227-229.

- [10] Lin C.Y., C.Y. Chiang and H.J. Tsai (2016), “Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research”, *J Biomed Sci*, 23, pp. 19.
- [11] Renn J., A. Buttner, T.T. To, S.J. Chan and C. Winkler (2013), “A col10a1: nlGFP transgenic line displays putative osteoblast precursors at the medaka notochordal sheath prior to mineralization”, *Dev Biol*, 381 (1), pp. 134-143.
- [12] Seruggia D., L. Montoliu (2014), “The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals”, *Transgenic Res*, 23 (5), pp. 707-716.
- [13] Thermes V., C. Grabher, F. Ristoratore, F. Bourrat, A. Choulika, J. Wittbrodt and J.S. Joly (2002), “I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish”, *Mech Dev*, 118 (1-2), pp. 91-98.
- [14] Phạm Văn Cường, Phạm Thị Thanh, Nguyễn Thúy Hoa, Trần Đức Long, Tô Thanh Thúy (2015), “Tách dòng cá medaka chuyển gen *rankl*: HSE: CFP dùng làm mô hình nghiên cứu bệnh loãng xương”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 31 (4S), pp. 24-34.
- [15] Lại Thị Nguyệt, Phạm Thị Thanh, Phạm Văn Cường, Trần Đức Long, Tô Thanh Thúy (2015), “Tính ổn định của gen chuyển *rankl* ở dòng cá medaka chuyển gen *rankl*:HSE:CFP làm mô hình bệnh loãng xương”, *Tạp chí Sinh lý học Việt Nam*, 19 (2), pp. 10-17.
- [16] Phạm Thị Thanh, Phạm Văn Cường, Trần Đức Long, Tô Thanh Thúy (2016), “Sự phát triển xương của cá Medaka (*Oryzias latipes*) II”, *Tạp chí Sinh lý học Việt Nam*, 20(2), pp. 22-29.
- [17] Watson A.T., A. Planchart, C.J. Mattingly, C. Winkler, D.M. Reif and S.W. Kullman (2017), “From the Cover: Embryonic Exposure to TCDD Impacts Osteogenesis of the Axial Skeleton in Japanese medaka, *Oryzias latipes*”, *Toxicol Sci*, 155 (2), pp. 485-496.
- [18] Bajoghli B., N. Aghaallaei, T. Heimbucher and T. Czerny (2004), “An artificial promoter construct for heat-inducible misexpression during fish embryogenesis”, *Dev Biol*, 271 (2), pp. 416-430.

Heat-Shock Induction Time and Levels of Loss of Bone Mineralization in the Osteoporosis Medaka fish Model *rankl*: HSE: CFP Subline c1c8

Tran Thi Thuy Trang, Pham Van Cuong, Pham Thi Thanh,
Ha Thi Minh Tam, Tran Duc Long, To Thanh Thuy

Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Abstract: The transgenic medaka fish (*Oryzias latipes*) *rankl*: HSE: CFP expressing Rankl, a stimulator for osteoclastogenesis, is used as an osteoporosis model to screen for antiosteoporosis substances. In this fish, *rankl* expression is regulated by a heat inducible promoter. Therefore, upon heatshock at 39°C, the fish expresses ectopic Rankl, which promotes formation and activity of osteoclasts, leading to bone mineralization damage and osteoporosis-like phenotype. However, how the level of mineralization damage depends on heatshock induction time still has been an open question that we aimed to answer in this study. To this end, 9-day-post-fertilization (dpf) *rankl*:HSE:CFP fish larvae of subline c1c8 were divided into 5 groups that were heatshocked at 39°C for 30, 60, 75, 90 or 120 minutes. Level of loss of bone mineralization of fish larvae in each group was assessed at 11dpf by their bone mineralization index. Results showed that levels of bone loss of these fish groups were 33, 62, 65, 79 or 93%, respectively, and correlated well and directly proportional with heat-shock duration. These results provide important data that help establishing procedures and protocols for using the fish in further studies on bone.

Keywords: Medaka, osteoporosis, transgenics, RANKL, heat-shock induction time.