

林蛙油提取物对过氧化氢诱导 MC3T3-E1 损伤的保护

兰兴成¹, 曲晓波¹, 罗从雷², 陈锡俊¹, 曹占鸿¹, 王继凤¹, 修志儒¹, 阚默¹,
杨擎¹, 李娜¹, 石晓征¹, 韩冬¹, 李晓华^{1*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130017; 2. 临沂市质量监督信息所, 临沂 276000)

摘要: **目的** 研究林蛙油提取物(rana oil extract, ROE)对过氧化氢致小鼠成骨细胞(MC3T3-E1)损伤的保护作用。**方法** 采用MTT方法检测细胞活力, 筛选林蛙油提取物促MC3T3-E1细胞生长的最佳给药浓度和时间, Western blotting法检测骨形态发生蛋白-2(BMP2)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin)、Runt 相关转录因子 2(Runx2)蛋白表达。应用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测骨生长相关基因的表达。**结果** 经过MTT法筛选, 400 $\mu\text{g/mL}$ 、24 h为ROE的最佳给药浓度及时间, 与空白对照组比较, 模型对照组MC3T3-E1细胞ALP蛋白表达水平降低($P<0.05$), Runx2、BMP2、Osteocalcin表达明显降低($P<0.01$)。与模型对照组比较, ROE给药组中ALP、BMP2蛋白表达水平升高($P<0.05$) Osteocalcin、Runx2蛋白表达水平明显升高($P<0.01$), 与空白组比较, 模型组ALP、Runx2、BMP2基因表达均下调($P<0.05$), Osteocalcin显著下调($P<0.01$); 与模型组比较, ROE给药组ALP、Runx2基因表达均上调($P<0.05$), BMP2、Osteocalcin基因表达显著下调($P<0.01$)。**结论** ROE可以调控骨代谢基因和蛋白的表达水平, 对 H_2O_2 损伤的MC3T3-E1老年型骨质疏松模型有一定的保护作用。

关键词: 林蛙油提取物; 成骨细胞 MC3T3-E1; 骨质疏松; 过氧化氢

Protection of rana oil extract on hydrogen peroxide-induced MC3T3-E1 injury

LAN Xing-Cheng¹, QU Xiao-Bo¹, LUO Cong-Lei², CHEN Xi-Jun¹, CAO Zhan-Hong¹, WANG Ji-Feng¹,
XIU Zhi-Ru¹, KAN Mo¹, YANG Qing¹, LI Na¹, SHI Xiao-Zheng¹, HAN Dong¹, LI Xiao-Hua^{1*}

(1. School of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130017, China;
2. Linyi City Quality Supervision Information Institute, Linyi 276000, China)

ABSTRACT: Objective To study the protective effect of rana oil extract (ROE) on the injury of mouse osteoblasts (MC3T3-E1) induced by hydrogen peroxide. **Methods** MTT assay was used to detect cell viability. The best concentration and time of MC3T3-E1 cell growth were screened by rana oil extract. Bone morphogenetic protein-2

基金项目: 吉林省科学研究规划项目(JJKH20181266KJ); 吉林省中医药科技项目(2018024); 吉林省卫生与健康青年科技骨干培养计划项目(20182043)

Fund: Supported by Jilin Province Scientific Research Planning Project (JJKH20181266KJ); Jilin Province Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project (2018024); Jilin Province Health and Health Youth Science and Technology Key Management Project (20182043)

***通讯作者:** 李晓华, 博士, 主要研究方向为中药学及分子药理学研究。E-mail: xiaohua130319@163.com

***Corresponding author:** LI Xiao-Hua, Ph.D, School of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130017, China. E-mail: xiaohua130319@163.com

(BMP2) and alkaline phosphatase (ALP) were detected by Western blotting. Osteocalcin and Runx2-related transcription factor 2 (Runx2) protein expression. The expression of bone growth related genes was detected by RT-PCR. **Results** After MTT assay, 400 $\mu\text{g/mL}$ and 24 h were the optimal concentration and time of ROE. Compared with the blank control group, the expression of ALP protein in MC3T3-E1 cells was decreased ($P<0.05$), Runx2. The expression of BMP2 and Osteocalcin was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model control group, the expression levels of ALP and BMP2 in the ROE administration group were increased ($P<0.05$), and the expression levels of Osteocalcin and Runx2 protein were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the blank group, the model group ALP, Runx2 and BMP2 gene expressions were down-regulated ($P<0.05$). Osteocalcin was significantly down-regulated ($P<0.01$). Compared with the model group, ALP and Runx2 gene expressions were up-regulated in ROE-administered group ($P<0.05$). BMP2 and Osteocalcin gene expression were significantly down-regulated ($P<0.01$). **Conclusion** ROE can regulate the expression levels of bone metabolism genes and proteins and has a certain protective effect on the MC3T3-E1 senile osteoporosis model damaged by H_2O_2 .

KEY WORDS: rana oil extract; osteoblast MC3T3-E1; osteoporosis; hydrogen peroxide

1 引言

林蛙油(*ranae oviductus*, RO)是中国林蛙雌蛙输卵管干燥品,被赞为东北三宝之一。RO 具有“补肾益精、润肺养阴”之功效。现代药理学研究表明 RO 中具有一定的雌激素,具有抗骨质疏松^[1]、延缓衰老^[2,3]、抗疲劳^[4,5]、改善神经衰弱^[6]、提高机体免疫力^[7]等药理作用。RO 主要化学成分分为蛋白质、脂肪酸、磷脂、维生素及一些微量元素,同时还含有多种其他生物活性成分,是一种名贵滋补珍品。

骨质疏松(osteoporosis, OP)是临床上一种常见的疾病,多发于中老年人,现代药理学研究证实氧化应激与多种老年性疾病的发生机制有关,如骨质疏松,研究表明,氧化应激可使机体的炎症因子升高,能增强破骨细胞骨吸收能力,导致骨吸收和骨形成失衡,骨量降低,增加 OP 发生率,骨质疏松的主要病理特征是骨量减少,骨组织微观结构破坏,因此,研究成骨细胞氧化应激机制对于预防骨质疏松有重要意义。

据不完全统计,目前我国 OP 患者已超过 9000 万,严重影响着患病人群的身心健康。随着全球老龄化的加速,世界各国在防治 OP 的财政投入也越来越多^[8,9]。基于肾主骨、骨生髓理论,补肾类中药有防治 OP 的作用,传统中医理论认为林蛙油具有“补肾益精、化精添髓”之功效。具有一定的抗骨质疏松活性^[10]。日本学者 Jayusman 等^[11]从新生 C57BL/6 小鼠颅顶骨中分离培养了一株成骨细胞株 MC3T3-E1,该细胞株具备体外培养成骨细胞的各种生物学特性,可作为一个良好的成骨细胞体外模型系统^[12,13]研究骨质疏松的发病机制。骨质疏松发病机制与成骨细胞活性密切相关,现代药理学研究表明成骨细胞衰老会影响其活性,进而影响骨代谢,引发骨质疏松^[14]氧化应激与骨质疏松存在密切联系。 H_2O_2 可诱导细胞衰老的发生,称为刺激诱导的细胞衰老,本研究利用小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 建立 H_2O_2

诱导的衰老性骨质疏松模型^[15],结果证实林蛙油提取物对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 具有一定的保护作用。

骨代谢平衡是通过调节破骨细胞的再吸收和成骨细胞的骨形成之间的平衡得以实现。骨质疏松症(osteoporosis, OP)是指骨量减少,骨脆性增加的一类骨代谢疾病^[16]。多发于中老年人^[17]。随着老龄化的加速,OP 将成为一个增加医疗负担的世界性问题^[18,19]。OP 发病的主要原因是成骨细胞骨形成不足导致骨重建失衡,成骨细胞是骨代谢的主要功能细胞,最终形成的骨量很大程度上取决于其增殖分化程度。成骨能力下降或骨吸收加快是 OP 的主要病理基础^[20],成骨细胞的增生是骨折愈合的基础,所以促进成骨细胞的增殖、分化,改善成骨细胞功能,进而调节骨重建,可达到治疗 OP 的目的。

由于 OP 集中发生在老年人群中,本研究尝试用过氧化氢引起成骨细胞衰老,间接诱发骨质疏松。基于林蛙油补肾益精的药性理论林蛙油具有较强的抗氧化能力,氧化应激是引发骨质疏松的重要因素。本研究观察林蛙油提取物在体外对 MC3T3-E1 细胞的影响及对过氧化氢(H_2O_2)诱导 MC3T3-E1 细胞氧化损伤的保护作用,为其防治骨质疏松症提供一定的实验依据。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 细胞系

MC3T3-E1 细胞,小鼠前成骨细胞,购于中科院上海细胞研究所,由长春中医药大学吉林省人参科学研究院分子药理实验室冻存。

2.1.2 主要试剂

林蛙油药材产地为吉林省靖宇县三道湖镇浆源林蛙养殖厂,经长春中医药大学中药鉴定教研室姜大成教授鉴定为林蛙油正品。ROE 为分子药理实验室自制冻干品,使

用前用 DMEM 高糖培养液稀释配制所需浓度工作液。ALP 抗体(美国 OminmAbs 公司, 批号 OM212503); Osteocalcin 抗体(美国 Proteintech 公司, 批号 23418-1-AP); Runx2 抗体(美国 Proteintech 公司, 批号 12600-1-AP); β -actin(美国 Proteintech 公司, 批号 66009-1-Ig)。H₂O₂(北京化工厂, 批号 20160218); 噻唑蓝(美国 Amresco 公司, 批号 40201ES80); DMEM(美国 Corning 公司, 批号 10-040-CVR); 组织细胞裂解液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 批号 WB-0061); 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号 FB15015)。

2.1.3 仪器

IIFINITE M200 pro 型酶标仪(瑞士 TECAN 公司); EPS301 型蛋白电泳系统(美国 GE 公司); FHB100 型制冰机(上海比朗公司); Omega Lum C 型凝胶成像仪(美国 Aplegen 公司); Colibei 型超微量紫外分光光度计(德国伯赫公司); 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司); 倒置显微镜(德国 Leica 公司)

2.2 实验方法

2.2.1 林蛙油蛋白水解酶的选择

精密称取 44 份哈蟆油粉末, 每份重量为 1 g, 随机分成 4 组, 分别置于小烧杯中编号: X 组(1-11)。按 1:100(*m/V*) 加入纯水, 待哈蟆油吸水完全膨胀后, 匀浆、加热煮沸。按照表 1 中酶的最适 pH 和温度, 调整匀浆液 pH 值, 设置水浴温度。按 1000 U/g 酶用量分别加入碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶进行水解。各组 1~12 号样品对应的水解时间为 0、10、20、30、40、50、60、120、180、240、300 min, 每个样品达到水解时间后, 冷却至室温, 立即用黏度计测定其黏度值。根据酶解后黏度值和酶解时间评价 4 种水解酶对哈蟆油的酶解效率, 确定最佳蛋白水解酶。

表 1 4 种蛋白水解酶最适 pH 和温度
Table 1 Optimal pH and temperature for four proteolytic enzyme

最适条件	碱性蛋白酶	木瓜蛋白酶	胰蛋白酶	胃蛋白酶
pH	8.3	7.5	7.5	2.5
温度/℃	55	55	37.5	37.5

2.2.2 ROE 的制备

精密称取 100 g 哈蟆油粉末, 按 2.2.1 中实验方法和筛选的最佳蛋白酶、酶解条件进行制备。将酶解液在 4℃条件下, 以 10000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。合并上清液, 冷冻干燥 48 h, 收集冻干品, 即得 ROE。

2.2.3 MTT 法筛选最佳给药浓度及时间

将 MC3T3-E1 细胞用 DMEM 培养基(10%胎牛血清, 1%双抗)放入含有 5 mL 培养液、5%CO₂、37℃培养箱中培养, 每 2 d 换 1 次液, 待细胞处于对数生长期时将

MC3T3-E1 细胞以每孔 5×10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板中, 分为空白对照组、模型对照组、林蛙油提取物给药组。每组细胞 5 复孔, 将林蛙油提取物依次配制成浓度为 10、50、100、200、400、500 μg/mL; 加药培养 24、48 h 后, 除空白对照组外均给予过氧化氢 400 μmol/L 孵育细胞 4 h, 造模结束每孔加入 20 μL thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT), 孵育 4 h, 结束后吸去培养液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO), 振荡 10 min, 使结晶完全溶解, 测定 OD₄₉₀ 值。

2.2.4 Western-blotting 法检测骨代谢相关蛋白表达

1) 蛋白样品的制备

将 MC3T3-E1 细胞以每孔 5×10⁵ 个/mL 均匀接种于六孔板中, 每孔接种 2 mL, 设置空白组、模型组、林蛙油提取物给药组, 每组 1 个复孔, 每孔加入 2 mL DMEM 高糖培养液(10%胎牛血清, 1%双抗), 待细胞处于对数生长期时, 称取 2 mg 林蛙油提取物于 2 mL 培养液中, 混匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 制成浓度为 1 mg/mL 林蛙油提取物母液, 用培养液将母液稀释至 400 μg/mL, 吸出六孔板中给药组培养液, 每孔加 2 mL 浓度为 400 μg/mL 林蛙油提取物培养液, 培养 24 h 后, 除空白对照组外均给予 2 mL 浓度为 400 μmol/L 过氧化氢培养液, 孵育细胞 4 h。将组织细胞裂解液放置室温, 弃掉六孔板中的培养液, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗 2~3 遍。MC3T3-E1 细胞经上述方法处理后胰酶消化收集, 按照试剂盒说明书, 按 99:1(*V/V*)加入适量的组织细胞裂解液和苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 然后用移液器反复吹打, 使裂解液与细胞接触充分, 全程操作冰浴。

2) Western-blotting 实验

将提取的各组蛋白进行 SDS-PAGE 垂直电泳, 根据目的蛋白相对分子质量制备 12%分离胶, 5%浓缩胶, 将配好的胶放入电泳槽中, 加入电极缓冲液, 将预处理的蛋白和 Marker 依次加入孔中, 空白孔用上样缓冲液填充, 上层浓缩胶 90 V 恒压 30 min, 下层分离胶 110 V 恒压 110 min, 进行电泳, 然后电转至 PVDFC 膜上, 转膜后用 TBST 洗涤 3 次, 脱脂奶粉封闭 1 h, 再用 TBST 洗涤 3 次。将膜放入稀释好的 β -actin、ALP、Runx2、Osteocalcin、BMP2 抗体中, 4℃孵育过夜。重复上述洗涤操作, 将膜转移至二抗中室温孵育 1 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 采用化学发光法(electrochemical reaction, ECL)显色, 最后在凝胶成像仪中显影检测, 用 ImageJ 软件分析内参、目的蛋白的灰度值。

2.2.5 Real-time PCR 测定 ALP、Osteocalcin、BMP2 及 Runx2 表达

根据引物设计基本原则, 利用 Primer5.0 软件设计引物序列如下(表 2)。用高纯度总 RNA 快速提取试剂盒, 分别从空白组、模型组、林蛙油提取物给药组细胞中提取总 RNA, 配制 10%的琼脂糖凝胶电泳, 加 2 μL 溴化乙锭(ethidium

bromide, EB)染料, 取 4 μL RNA 于上样孔中, 设置核酸电泳条件 150 V、15 min, 所得胶片用凝胶成像仪成像。

配制 PCR 反应液, 按照以下程序进行 RT-PCR 实验, 预变性: 95 °C, 30 s, 1 次循环; PCR: 95 °C, 3 s, 60 °C, 30 s, 40 个循环; Melt Curve stage。反应结束后采集扩增曲线和融解曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各组基因的 mRNA 相对表达量。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequences

基因	引物序列	产物长度/bp
ALP	上游 GAGAAGCCACATGCCGTA	151
	下游 TGCGAATGGGAACAGGAT	
Runx2	上游 CCTCTGACTTCTGCCTCTGG	92
	下游 ATGAAATGCTTGGAAGTGC	
Osteocalcin	上游 CCGCCTACAAACGCATCTAT	147
	下游 CAGGGCAGAGAGAGAGGACA	
BMP2	上游	102
	GCGAATTCATGGTGGCCGGACCCG	
	CTGT	
	下游	
	CGGGATCCACGACACCCGAGCCCT	
	CCACA	
β -actin	上游 TTCGTTGCCGGTCCACACCC	81
	下游 GCTTTGCACATGCCGGAGCC	

2.2.6 统计学方法

采用 SPSS Statistics 25.0 统计学软件进行数据分析,

计量资料数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 不同蛋白酶对哈蟆油黏度的影响

通过考察 44 份样品的黏度值变化情况可知(见表 3), 碱性蛋白酶的酶解效果和酶解效率最佳, 加入碱性蛋白酶 30 min 后黏度值由初始黏度值 3241.2 mPa·s 骤降为 8.77 mPa·s, 且基本维持不变。胰蛋白酶的酶解效果次之, 酶解 2 h 后黏度值基本维持在 46.8 mPa·s 左右。木瓜蛋白酶的酶解效率一般, 酶解前的黏度值为 3245.7 mPa·s, 酶解 2 h 后黏度值基本维持在 246.9 mPa·s。而胃蛋白酶加入前, 将哈蟆油匀浆液的 pH 值调整为 2.5, 此时的黏度值已经骤降到 150.1 mPa·s, 虽然加入胃蛋白酶水解后哈蟆油的最终黏度为 10.4 mPa·s, 哈蟆油黏度的变化可能受酸性条件影响较大, 故 ORPH 的制备选用碱性蛋白酶水解。

3.2 最佳给药浓度、给药时间的筛选

与空白对照组相比, 模型对照组细胞增殖作用明显降低($P<0.01$); 与模型对照组比较, ROE 给药组 400 μg/mL 作用 24 h 后, 细胞增殖作用显著升高($P<0.01$), 选取有效浓度的最低剂量即 400 μg/mL, 作用时间 24 h 时用于后续指标检测, 见表 4。

表 3 不同水解酶不同水解时间哈蟆油黏度变化表(黏度)
Table 3 Viscosity change table of different hydrolyzed enzymes in different hydrolysis time (viscosity: mPa·s)

样品编号	酶解时间/min	碱性蛋白酶组/mPa·s	木瓜蛋白酶组/mPa·s	胰蛋白酶组/mPa·s	胃蛋白酶组/mPa·s
1	0	3241.2	3245.7	3239.2	150.1
2	10	1253.4	2719.1	1417.7	133.2
3	20	249.8	2202.2	1126.2	118.7
4	30	8.77	1995.8	587.8	92.2
5	40	8.75	1834.9	311.4	84.2
6	50	8.75	1647.1	201.7	76.4
7	60	8.71	586.1	126.5	45.3
8	120	8.68	246.9	46.8	10.6
9	180	8.56	245.8	46.6	10.4
10	240	8.56	245.6	46.6	10.4
11	300	8.56	245.6	46.5	10.4

表 4 不同浓度 ROE 对 MC3T3-E1 细胞抗凋亡作用 24、48 h 筛选(n=6)

Table 4 Anti-apoptotic effects of different concentrations of ROE on MC3T3-E1 cells for 24 h, 48 h screening (n=6)		
组别	OD 值 24 h	OD 值 48 h
空白对照组	0.3877±0.0171	0.3809±0.0118
模型对照组	0.1662±0.0074 ^{△△}	0.1591±0.0062 ^{△△}
ROE 10 μg/mL	0.1838±0.0189	0.1616±0.0101
ROE 50 μg/mL	0.1858±0.0187	0.1621±0.0185
ROE 100 μg/mL	0.1926±0.0122	0.1788±0.0165
ROE 200 μg/mL	0.2145±0.0120 [*]	0.1751±0.0171 [*]
ROE 400 μg/mL	0.2538±0.0110 ^{**}	0.1786±0.0246 [*]
ROE 500 μg/mL	0.1938±0.0026 [*]	0.1808±0.0136 [*]

注：与空白对照组比较，^{△△}表示极显著差异， $P<0.01$ ；与模型对照组比较，^{*}表示显著差异， $P<0.05$ ，^{**}表示极显著差异， $P<0.01$ 。

3.3 ROE 对 H₂O₂ 损伤 MC3T3-E1 细胞形态的影响

如图 1 所示，在显微镜下，观察可见，空白对照组细胞呈梭形，模型对照组细胞数量减少，胞体皱缩，与模型对照组比较，ROE 给药组细胞数量增多，细胞的皱缩现象有所改善；400 μg/mL 给药组胞体皱缩现象明显改善。

3.4 ROE 对 H₂O₂ 损伤 MC3T3-E1 细胞骨代谢相关蛋白表达水平的影响

与空白对照组相比，模型对照组 ALP、Runx2、Osteocalcin、BMP2 表达明显减少($P<0.05$ ， $P<0.01$)与模型对照组相比，ROE 给药组 ALP、Runx2、Osteocalcin、BMP2 表达明显增加($P<0.05$ ， $P<0.01$)，故 ROE 可以调控骨代谢相关蛋白的表达，影响骨代谢，初步证实 ROE 可能具有一定的抗骨质疏松活性。用 ImageJ 软件分析内参、目的蛋白的灰度值，见图 2，表 5。

3.5 ROE 对 H₂O₂ 损伤 MC3T3-E1 细胞骨代谢相关基因表达水平的影响

各组细胞总 RNA 电泳检测图谱见图 3。采用 2^{-ΔΔCt} 法统计各组 ALP、Osteocalcin、Runx2、及 BMP2 mRNA 表达量(见表 6)。与空白组相比，模型组 ALP mRNA 相对表达量均下调($P<0.05$)，Osteocalcin、Runx2、BMP2 mRNA 相对表达量均显著性下调($P<0.01$)，与模型组相比，ROE 给药组 ALP、BMP2 mRNA 相对表达量均上调($P<0.05$)。Osteocalcin、Runx2 mRNA 相对表达量均显著性上调($P<0.01$)故 ROE 可以调控骨代谢相关基因的活性，保护过氧化氢损伤的 MC3T3-E1 细胞活性，初步证实 ROE 可能具有一定的抗骨质疏松活性。

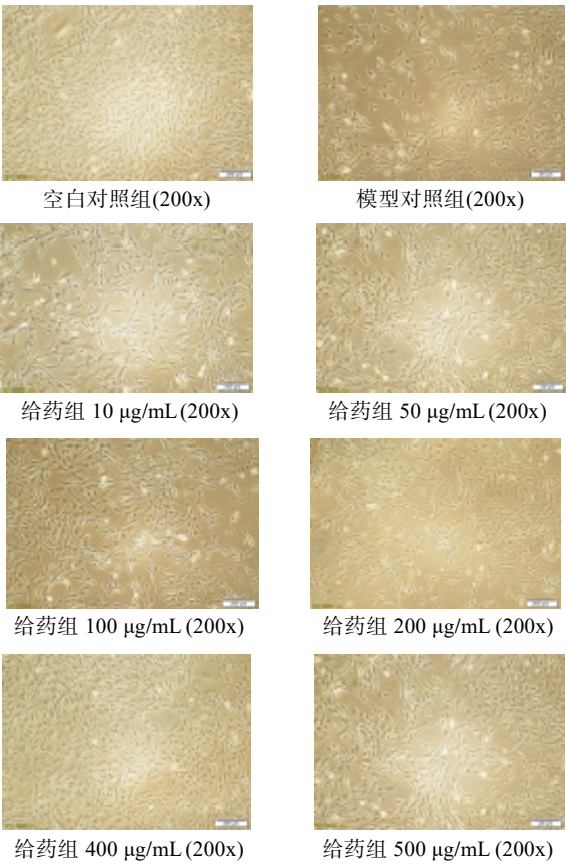


图 1 林蛙油提取物对过氧化氢损伤 MC3T3-E1 细胞形态的影响
Fig.1 Effect of rana oil extract on the morphology of MC3T3-E1 cells damaged by hydrogen peroxide

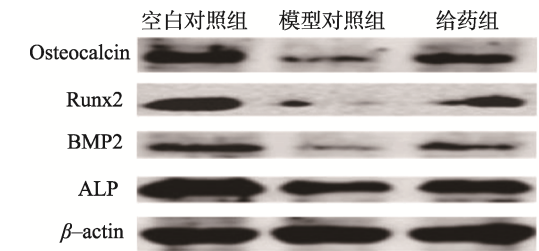
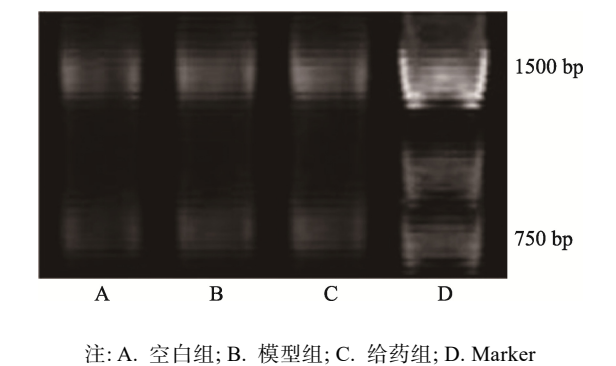


图 2 各组 MC3T3-E1 骨代谢相关蛋白表达
Fig.2 Expression of bone metabolism related proteins in MC3T3-E1 of each group

表 5 各组 ALP、Osteocalcin、Runx2、及 BMP2 蛋白相对表达(n=3)

Table 5 Relative expression of ALP, Osteocalcin, Runx2, and BMP2 proteins in each group (n=3)				
组别	ALP	Runx2	BMP2	Osteocalcin
空白组	1.02±0.05	0.68±0.45	0.74±0.05	0.78±0.08
模型组	0.64±0.06 [△]	0.15±0.02 ^{△△}	0.10±0.03 ^{△△}	0.20±0.17 ^{△△}
ROE 400 μg/mL 组	0.74±0.03 [*]	0.46±0.33 ^{**}	0.46±0.11 [*]	0.50±0.25 ^{**}

注：与空白对照组比较，[△]表示极显著差异， $P<0.05$ ，^{△△}表示极显著差异， $P<0.01$ ，与模型对照组比较，^{*}表示显著差异， $P<0.05$ ，^{**}表示极显著差异， $P<0.01$ 。



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 给药组; D. Marker
图 3 各组细胞总 RNA 核酸电泳图

Fig.3 Total RNA nucleic acid electropherogram of each group of cells

表 6 各组 ALP、Osteocalcin、Runx2、及 BMP2 mRNA 表达量
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 6 mRNA expression levels of ALP, Osteocalcin, Runx2, and BMP2 in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)				
组别	ALP	Runx2	BMP2	Osteocalcin
空白组	1	1	1	1
模型组	0.53±0.21 [△]	0.42±0.17 [△]	0.41±0.17 [△]	0.39±0.16 ^{△△}
给药组	0.81±0.13 [*]	0.63±0.12 [*]	0.83±0.12 ^{**}	0.79±0.12 ^{**}

注: 与空白对照组比较, [△]表示极显著差异, $P<0.05$, ^{△△}表示极显著差异, $P<0.01$, 与模型对照组比较, ^{*}表示显著差异, $P<0.05$, ^{**}表示极显著差异, $P<0.01$ 。

4 讨论与结论

ALP^[21]是成骨细胞分化成熟的早期标志, 是参与骨代谢的重要蛋白质, 它能分解基质中的磷酸酯, 促进羟基磷灰石的形成, 局部沉积后基质钙化, ALP 可水解焦磷酸以达到解除骨形成抑制的目的^[22]。本实验结果证实 ROE 诱导成骨细胞培养 24 h 后, 可以明显增强 ALP 蛋白表达, 表明 ROE 可以刺激成骨细胞早期分化。

Runx2^[23]属于 Runt 结构域基因家族, 能够特异性的识别并结合许多靶基因启动子上的 PyGpyGGtPy 序列, 作为一种成骨细胞特异性转录因子, 参与影响靶基因转录, 是成骨细胞分化和功能的关键因子。同时 Runx2 作为成骨细胞早期分化的标志性的基因, 可以诱导或促进骨基质蛋白基因的表达, 使已分化的其他类型的细胞向成骨细胞方向分化^[24]。本研究结果证实 ROE 对 Runx2 的表达有一定的促进作用, 说明 ROE 可促进成骨细胞分化。

Osteocalcin^[25]主要分布于细胞外基质, 是由成骨细胞合成的一种非胶原蛋白, 对骨基质钙化非常重要, 能直接反映骨形成和骨细胞活性, 是成骨细胞晚期分化的标志, 同时, Osteocalcin 是骨转换中特异性生化指标, 成骨细胞的功能衰退, 合成 Osteocalcin 减少, 进而引发骨质疏松,

本研究中 RT-PCR 实验结果显示 ROE 均可以上调 Runx2 和 Osteocalcin 的基因表达($P<0.01$), 表明 ROE 可以增强成骨细胞的分化。

BMP2^[26]是 TGF- β 家族成员之一, 骨组织含量丰富。BMP2 在骨的诱导和形成方面发挥重要作用, 在骨形成时诱导非分化间叶细胞的有丝分裂, 增加骨细胞中 ALP 活性, 诱导成骨细胞显型的表达。BMP2 的促分化作用主要通过增加细胞内 ALP 活性、Osteocalcin 和胶原蛋白的合成及分泌而发挥作用^[26], 本研究中 Western blotting 结果显示, 与模型对照组相比, ROE 可以升高 BMP2 在成骨细胞中的表达, 促进其分化。

综上所述, 本研究初步证实了 ROE 可以促进 MC3T3-E1 细胞的分化与增殖, 对 H₂O₂ 损伤的 MC3T3-E1 衰老型骨质疏松模型有一定的保护作用。然而, 人体体内环境很复杂, 骨代谢受多种因素影响, 药物可能不仅仅通过作用于成骨细胞影响骨形成, 通过对机体宏观网络的调控同样可以达到目的, 本研究观察了 ROE 对 MC3T3-E1 细胞的增殖、分化的作用, 并对其作用进行初步探讨。下一步将建立去卵巢大鼠股骨双向电泳体系, 基于蛋白质组学系统的评价林蛙油防治绝经后骨质疏松的机理。

参考文献

- [1] 张朋. 林蛙油营养成分和在临床应用综述[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(88): 80–81.
Zhang P. Rana oleifera nutrient composition and clinical application review [J]. World Latest Med Inf, 2018, 18(88): 80–81.
- [2] 王丹彤, 王丹辉. 林蛙油化学成分及药理作用研究[J]. 长春中医药大学学报, 2015, 31(6): 1127–1129.
Wang DT, Wang DH. Study on chemical constituents and pharmacological effects of rana oil [J]. J Changchun Univ Trad Chin Med, 2015, 31(6): 1127–1129.
- [3] 潘黛安, 张鹤, 董颖, 等. 哈蟆油蛋白酶解物抗疲劳功效研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(13): 1–4.
Pan DA, Zhang H, Dong Y, et al. Anti-fatigue effect of hazel oil proteolytics [J]. Food Res Dev, 2016, 37(13): 1–4.
- [4] 李志刚, 王昶. 林蛙油蛋白水解产物对小鼠抗疲劳的作用及其生理机制[J]. 中国学校体育(高等教育), 2017, 4(10): 81–87.
Li ZG, Wang C. Anti-fatigue effect and physiological mechanism of rana oil protein hydrolysate in mice [J]. China School Phys Ed (High Ed), 2017, 4(10): 81–87.
- [5] 姜丽冬, 金鑫, 朴春红, 等. 林蛙油生物活性肽的制备工艺及其抗疲劳研究[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(4): 482–488.
Jiang LD, Jin X, Piao CH, et al. Preparation of rana oil bioactive peptide and its anti-fatigue study [J]. J Jilin Agric Univ, 2016, 38(4): 482–488.
- [6] 徐阳, 单柏宇, 王永生, 等. 不同林蛙油炮制品镇咳、抗疲劳和耐缺氧作用的比较[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(12): 2935–2936.
Xu Y, Shan BY, Wang YS, et al. Comparison of antitussive, anti-fatigue and anti-hypoxia effects of different forest frog oil products [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(12): 2935–2936.

- [7] 李晓华, 陈锡俊, 李娜, 等. 哈蟆油蛋白对骨质疏松预防及 ALP, Osteocalcin, Runx-2 基因表达的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 138–143.
Li XH, Chen XJ, Li N *et al.* Harbin oil protein on osteoporosis prevention and regulation of ALP, Osteocalcin, Runx-2 gene expression [J]. Chin J Exper Formulaol, 2017, 23(20): 138–143.
- [8] Arjmandi BH. The role of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis in ovarian hormone deficiency [J]. J Am Coll Nutr, 2001, 20(5): 398–402.
- [9] 张家国, 徐晓峰, 李明, 等. 银杏叶提取物对糖皮质激素诱导的骨质疏松症大鼠骨密度和骨生物力学的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(4): 461–464, 471.
Zhang JG, Xu XF, Li M *et al.* Effects of *Ginkgo biloba* extract on bone mineral density and bone biomechanics in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Chin J Osteoporosis, 2019, 25(4): 461–464, 471.
- [10] Nelson ER, Wardell SE, Mc Donnell D. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs and oxysterols: Implications for the treatment and prevention of osteoporosis [J]. Bone, 2013, 53(1): 42–50.
- [11] Jayusman PA, Mohamed IN, Shuid AN. The effects of chemical castration with degarelix on bone turnover: densitometric and biomechanics bone properties of male rats [J]. Int J Endocrinol Metabol, 2018, 16(3): 223–229.
- [12] Narloch J, Glinkowski WM. Osteoarthritis changes hip geometry and biomechanics regardless of bone mineral density-A quantitative computed tomography study [J]. J Clin Med, 2019, 16(3): e64038.
- [13] Musculoskeletal Diseases and Conditions-Osteoporosis. Reports from second affiliated Hospital of Kunming Medical University highlight recent findings in osteoporosis (combined treatment of vitamin K and teriparatide on bone metabolism and biomechanics in rats with osteoporosis) [Z]. 2018.
- [14] Newgard CB, Sharpless NE. Coming of age: Molecular drivers of aging and therapeutic opportunities [J]. J Clin Invest, 2013, 123(3): 946–950.
- [15] 徐舜, 黄海姣, 李南红, 等. MicroRNA-33 在过氧化氢诱导 NIH/3T3 细胞衰老模型中的表达及作用[J]. 牡丹江医学院学报, 2015, (5): 1–4.
Xu S, Huang HJ, Li NH, *et al.* Expression and role of MicroRNA-33 in hydrogen peroxide-induced senescence model of NIH/3T3 cells [J]. J Mudanjiang Med Colleg, 2015, (5): 1–4.
- [16] 龚幼波, 张云飞, 张璇. 中药黄芪对骨代谢的影响及相关基础研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(3): 404–407.
Gong YB, Zhang YF, Zhang H. The influence of traditional Chinese medicine Astragalus on bone metabolism and related basic research progress [J]. Chin J Osteoporosis, 2019, 25(3): 404–407.
- [17] Yuthana P, Harishkumar M, Radha M. Anthraquinone glycoside aloin induces osteogenic initiation of MC3T3-E1 cells [J]. Biomol Therap, 2016, 24(2): 123–131.
- [18] 尚先宝. 中医药防治老年骨质疏松骨折研究进展[J]. 医学信息, 2019, 32(11): 45–47.
Shang XB. Advances in research on prevention and treatment of osteoporotic fracture in elderly patients with traditional Chinese medicine [J]. Medl Inform, 2019, 32(11): 45–47.
- [19] 马远征, 王以朋, 刘强, 等. 中国老年骨质疏松诊疗指南(2018)[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(11): 2557–2575.
Ma YZ, Wang YP, Liu Q, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of osteoporosis in China (2018) [J]. Chin J Gerontol, 2019, 39(11): 2557–2575.
- [20] 康荣彬, 吴星, 吴立忠, 等. 强直性脊柱炎患者骨代谢生化指标与 BMP-2、RUNX-2 基因表达的相关性研究[J]. 福建医药杂志, 2018, 40(4): 35–38.
Kang RB, Wu X, Wu LZ, *et al.* Correlation between biochemical markers of bone metabolism and expression of BMP-2 and RUNX-2 genes in patients with ankylosing spondylitis [J]. Fujian Med J, 2018, 40(4): 35–38.
- [21] Marie PJ, Kassem M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets [J]. Eur J Endocrinol, 2011, 165(1): 1–10.
- [22] 张玉英. 老年男性骨质疏松症患者肾阳虚证与总 I 型胶原延长肽和骨钙素的关系[D]. 长清: 山东中医药大学, 2014.
Zhang YY. Relationship between kidney yang deficiency syndrome and total type I collagen elongation peptide and osteocalcin in elderly male patients with osteoporosis [D]. Changqing: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2014.
- [23] Premnath P, Ferrie L, Louie D, *et al.* Absence of p21 (WAF1/CIP1/SDI1) protects against osteopenia and minimizes bone loss after ovariectomy in a mouse model [J]. PLoS One, 2019, 14(4): 120–132.
- [24] Vorland CJ, Lachcik P, Swallow EA, *et al.* Effect of ovariectomy on the progression of chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) in female C57BL/6J mice [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 54–60.
- [25] Ramandeep K, Makula A. Formulation of transdermal nanoemulsion gel drug delivery system of lovastatin and its in vivo characterization in glucocorticoid induced osteoporosis rat model [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2019, (5): 56–62.
- [26] 李安娜. BMP-Smad 信号通路在成骨与破骨细胞生成中的作用[D]. 青岛: 山东大学, 2014.
Li AN. The role of BMP-Smad signaling pathway in osteogenesis and osteoclastogenesis [D]. Qingdao: Shandong University, 2014.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



兰兴成, 硕士, 主要研究方向为中药学及分子药理学研究。
E-mail: 1399325479@qq.com



李晓华, 博士, 主要研究方向为中药学及分子药理学研究。
E-mail: xiaohua130319@163.com