

· 药物研究 ·

珍珠粉对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化、矿化及骨相关基因表达的影响

王凯 魏博 谭佳妮 季晖*

中国药科大学药理教研室, 南京 210009

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 06-0666-07

摘要: **目的** 研究珍珠粉对 MC3T3-E1 细胞成骨增殖、分化、间质矿化及凋亡的影响,并初步探讨其作用机制。**方法** 在体外培养的 MC3T3-E1 细胞中分别加入珍珠粉和低钙珍珠粉,采用 MTT 法及碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)试剂盒检测其对 MC3T3-E1 细胞增殖及分化的影响;Von Kossa 染色法观察矿化结节的形成;RT-PCR 检测细胞中转录因子(Runt-related transcription factor II, Runx2)、骨钙素(Osteocalcin, OC)、骨保护因子(Osteoprotegerin, OPG)及核因子- κ B 受体活化因子配体(Receptor activator of NK- κ B ligand, RANKL)mRNA 的表达;流式细胞术检测血清饥饿诱导的细胞凋亡。**结果** 珍珠粉及低钙珍珠粉在一定浓度范围内,能促进 MC3T3-E1 细胞成熟期的 ALP 合成分泌和矿化结节的形成,并对 Runx2 及 OC 基因表达具有明显促进作用,可降低 RANKL/OPG 的比率,明显改善血清饥饿诱导的成骨细胞凋亡。**结论** 珍珠粉及低钙珍珠粉对 MC3T3-E1 细胞分化成熟过程有显著的促进作用,前者作用显著强于后者,说明珍珠粉中钙成分对 MC3T3-E1 细胞分化成熟起到主要作用。

关键词: 珍珠粉;MC3T3-E1 细胞;成骨活性**Effect of pearl powder on the proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3-E1 cells and the expression of bone related genes in the cells**

WANG Kai, WEI Bo, TAN Jiani, JI Hui

Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: JI Hui, Email: huijicpu@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of pearl powder on the osteogenic proliferation, differentiation, interstitial mineralization, and apoptosis in MC3T3-E1 cells, and to explore the potential mechanisms. **Methods** MC3T3-E1 cells were cultured with pearl powder or low-calcium pearl powder *in vitro*. The osteogenic proliferation was determined using MTT method. And the differentiation was determined using alkaline phosphatase (ALP) kit. The formation of mineralized nodules was observed using von Kossa staining. The mRNA expression of Runt-related transcription factor II (Runx2), osteocalcin (OC), osteoprotegerin (OPG), and receptor activator of NK- κ B ligand (RANKL) was detected using RT-PCR. The cell apoptosis induced by serum deprivation was detected using flow cytometry. **Results** In a certain range of concentration, pearl powder and low-calcium pearl powder could significantly increase the secretion of ALP and the formation of mineralized nodules, and markedly improve the mRNA expression of Runx2 and OC in MC3T3-E1 cells. Furthermore, pearl powder and low calcium pearl powder could significantly decrease the RANKL/OPG ratio, and ameliorate the apoptosis of the osteoblasts induced by serum deprivation. **Conclusion** Both pearl powder and low calcium pearl powder can promote the differentiation and maturation in MC3T3-E1 cells. And the effect of pearl powder is much stronger, suggesting a critical role of calcium contained in pearl powder in regulating the osteogenic proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells.

Key words: Pearl powder; MC3T3-E1 cell; Osteogenic activity

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是指骨量减少、骨组织微观结构退变,以致骨的脆性增高而骨折危险性

增加的一种全身骨病。目前用于治疗骨质疏松的药物主要分为两大类:促骨形成药物和抑制骨吸收药物,两者均能减少骨折发生率、增加骨矿密度,但是相关的不良反应和高昂的费用限制了它们的使用。

*通讯作者: 季晖, Email: Huijicpu@163.com

珍珠作为一种名贵的中药材,在我国的应用已有几千年的历史。珍珠粉有很高的药用价值,主要成分为碳酸钙、蛋白质、水分及包括铁、铝、镁、锌、硒、铜、钾、锰、锶、锗等多种微量元素及多种氨基酸。董娜等^[1]利用原子吸收光谱法测定珍珠粉中的微量元素发现,其中的钙含量最高(377.084 mg/g),是主要成分,锰、锶、铁、钠的含量也较为丰富,而锌、锰、铜的含量较少。据资料报道^[2-5],珍珠粉中富含的钙元素和多种微量元素,对骨量减少和骨小梁变细、断裂等病理改变有明显改善作用。本文观察了珍珠粉以及低钙珍珠粉对 MC3T3-E1 细胞的增殖、分化、矿化和凋亡的作用,并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 药物及试剂

珍珠粉(浙江长生鸟珍珠生物科技有限公司);MTT、Triton X-100(美国 Amresco 公司); β -甘油磷酸钠、维生素 C(美国 Sigma 公司); α -MEM 培养基、胎牛血清 FBS(美国 Gibco 公司);MC3T3-E1 细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);碱性磷酸酶(ALP)、考马斯亮蓝测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(美国 BD Pharmingen 公司)。

1.2 药物处理及分组

1.2.1 药物前处理:取珍珠粉用 1 mol/L HCl 溶解,模拟人体胃肠道消化过程,用 PBS 缓冲液稀释到一定浓度,作为珍珠粉原液。另取定量珍珠粉原液,加入硫酸钠溶液,完全沉淀钙离子,作为低钙珍珠粉溶液。采用原子吸收光谱法测定珍珠粉和低钙珍珠粉中钙离子浓度。结果显示,50 μ g/mL 珍珠粉和低钙珍珠粉中钙离子浓度分别为 18.81 μ g/mL 和 1.89 μ g/mL,前者为后者的 9.95 倍。

1.2.2 分组及受试药配制:设正常对照组(Control),珍珠粉组(Pearl Powder, PP)和低钙珍珠粉组(Low Calcium Pearl Powder, LCa-PP)。珍珠粉和低钙珍珠粉分别用 PBS 缓冲液稀释到一定浓度,0.45 μ m 微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 保存。临用前用细胞培养基配成所需浓度(5 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养:MC3T3-E1 细胞用 10% FBS α -MEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。每 2 天更换培养基,待细胞铺满培养瓶时,用

0.25% 胰酶消化,做传代培养。

1.3.2 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响:指数生长期的 MC3T3-E1 细胞按 1×10^4 个/mL 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,10% FBS α -MEM 培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养^[6]。24 h 后换以 5% FBS α -MEM 培养液,同时按照分组加入 5% FBS α -MEM 作为 Control 组,受试药物 PP(5 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL),LCa-PP(5 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL),每组 6 孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μ g/mL, 5 mg/mL 的 MTT,4 h 后小心吸弃培养液,再在每孔加入 150 μ L DMSO(分析纯),于酶联免疫检测仪上 570 nm 波长处测各孔吸光度值,结果用 OD₅₇₀ 表示。实验重复 3 次^[7]。

1.3.3 对 MC3T3-E1 细胞内 ALP 活性的影响:细胞按 1×10^5 个/mL 密度接种于 24 孔板,每孔 1 mL,10% FBS 的 α -MEM 培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。待细胞融合 80% 后,换以成骨诱导培养基。成骨诱导培养基组成:5% FBS α -MEM 培养液,50 μ g/mL 维生素 C,10 mmol/L β -甘油磷酸钠。同时按照分组加入 5% FBS α -MEM 作为 Control 组,受试药物 PP(50 μ g/mL),LCa-PP(50 μ g/mL),每组 6 孔,连续给药 14 d。给药结束后,吸弃培养液,加入 1% Triton X-100 溶液 200 μ L,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 1h 以裂解细胞,然后按 ALP 检测试剂盒及考马斯亮蓝蛋白定量法分别测定 ALP 值和蛋白含量,并计算出细胞内碱性磷酸酶的活性^[8-9]。

1.3.4 对 MC3T3-E1 细胞钙化结节形成的影响(Von Kossa 法^[10]):MC3T3-E1 细胞以 1×10^5 /mL 密度接种于 24 孔板,10% FBS α -MEM 培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。待细胞融合 80% 后,换以 5% FBS α -MEM 培养液,同时加入 50 μ g/mL 维生素 C 及 10 mmol/L β -甘油磷酸钠,并按照实验分组加入 5% FBS α -MEM 作为 Control 组,受试药物 PP(50 μ g/mL),LCa-PP(50 μ g/mL),每组 6 孔,2 天换液 1 次。于第 28 天先用冰 PBS 洗细胞 2 遍,加入 5% 的 AgNO₃ 溶液,于紫外灯下照射 1 h。将 AgNO₃ 溶液吸出,细胞用蒸馏水洗 3 遍,加入 5% 的 Na₂S₂O₃ 溶液,5 min 后将细胞用蒸馏水洗 2 遍,1% 的中性红溶液染色 5 min,细胞用蒸馏水洗 2 遍以移除多余的染液,低倍光镜下(200 $\times$)观察矿化结节染色情况并拍照。实验重复 3 次。

1.3.5 对血清饥饿诱导的细胞凋亡的影响:取指数生长期 MC3T3-E1 细胞以 1×10^5 /mL 密度接种于 6 孔板,10% FBS α -MEM 培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和

湿度培养箱中培养 24 h 后用 PBS 液洗 3 次,再加无血清培养基并同时按照分组加入受试药物 PP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LCa-PP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 以等量的 1% FBS α -MEM 培养液作为正常对照组 (Normal), 不含血清的 α -MEM 培养液作为血清饥饿组 (Control)。继续培养 48 h 后收集细胞,加入 Annexin V/FITC 和 PI 于流式细胞仪上检测细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.3.6 对 MC3T3-E1 细胞中骨相关基因表达的影响:取指数生长期 MC3T3-E1 细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板,10% FBS α -MEM 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养。待细胞融合 80% 后,换以 5% FBS α -MEM 培养液,同时加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素 C 及 10 mmol/L β -甘油磷酸钠,并按照实验分组加入 5% FBS α -MEM 作为 Control 组,受试药物 PP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LCa-PP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2 d 换液 1 次。培养 21 d 后,去掉培养基,提取总 RNA,用紫外分光光度仪检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光度以估计总 RNA 的量和纯度。反转录过程按反转录 PCR 试剂盒说明书操作。Realtime-PCR 采用 Light Cycler System (Roche Diagnostics) 使用 SYBR[®] Green 作为 DNA-特异性结合染料。PCR 反应总体积为 10 μL ,包括:1 μL cDNA 样本,10 pmol 引物 (见 Tab. 1),和 Quantitect[®] SYBR[®] Green master mix 试剂。反应程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,40 循环各 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。以 GAPDH 作为内参,采用 ΔCt 法计算各个基因的相对表达水平。

Table 1 Summary of the gene-specific PCR primer sequences, and the length of production used in the experiments

Gene	Primer sequences (5'→3')	Product size (bp)
GAPDH	GTTTCTCTCCTGCGACTTCA TAGGGCCTCTCTTGCTCACT	220
RANKL	GAAGGGTTGGACACCTGAATGC TCGTCAGACCGAGAAGTGCT	128
OPG	TCCTGGCACCTACCTAAACAGCA ACACTGGGTGCAATACACA	125
OC	TTCTGCTCACTCTGCTGACC AGACCACTCCAGCACAACTC	203
Runx2	TCGTCAGACCGAGAAGTGCT TTC AAGTGGCCGGGAGCTA	231

1.4 统计学处理

所有数据均以平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示,采用 SPSS 软件统计单因素方差分析方法进行分析,组间比较采用 Dunnett's test 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

如图 Fig. 1 所示,与 Control 组相比,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PP 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LCa-PP 在 24 h 作用范围内对 MC3T3-E1 细胞具有显著性的促增殖作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

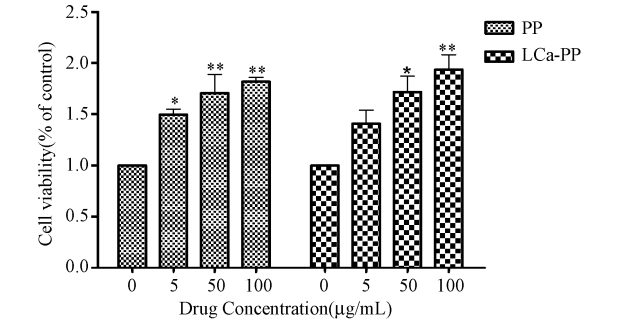


Fig. 1 Effect of the treatment with PP and LCa-PP on the proliferation of MC3T3-E1 cells. Cells were treated with a range of 5 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h, and the proliferation rate was assessed using MTT method. Values were expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Control. This assay was performed in triplicate

2.2 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

细胞在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素 C、10 mmol/L β -甘油磷酸钠的培养液中连续诱导培养给药 14 d 后处理。Fig. 2 显示,与 Control 组相比,PP 组和 LCa-PP 组 ALP 活力分别增加了 92.77% ($p < 0.001$)、34.63% ($P < 0.01$)。提示对处于成熟期的成骨细胞,PP 和 LCa-PP 均能显著促进其分泌 ALP,进而促进骨骼钙化,然而,两组之间存在显著性差异 ($P < 0.001$),PP 作用效果明显强于 LCa-PP。

2.3 对 MC3T3-E1 细胞矿化结节形成的影响

MC3T3-E1 细胞在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素 C、10 mmol/L β -甘油磷酸钠的培养液中诱导培养给药 28 d 后进行 Von Kossa 染色,可见矿化结节生成,Von Kossa 染色后呈现大小、形态不一的黑色阳性结节 (Fig. 3)。与 Control 组相比较,PP 组和 LCa-PP 组的矿化结节数均明显增多,但是 PP 组明显多于 LCa-PP 组。

2.4 对血清饥饿诱导的细胞凋亡的影响

由 Fig. 4 可见,MC3T3-E1 细胞在无血清培养液中培养 48 h 后细胞出现明显的凋亡,而 PP 组、LCa-PP 组成骨细胞总凋亡率与 Control 组相比分别下降了 43.53%、35.22%,具有极显著差异 ($P < 0.001$)。

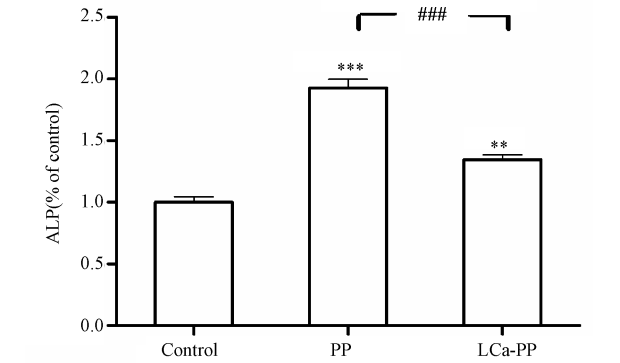


Fig. 2 Effect of the treatment with PP and LCa-PP on differentiation of MC3T3-E1 cells. ALP activity of MC3T3-E1 cells after continuous treatment with 50 μg/mL PP, 50 μg/mL Ca-PP, or vehicle for 14 days. Values were expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control, ### $P < 0.001$ compared with PP. This assay was performed in triplicate

2.5 对 MC3T3-E1 细胞 OPG mRNA 与 RANKL mRNA 表达量的影响

RT-PCR 结果(Fig. 5)显示,各组受试药处理成骨细胞 21d 后,与 Control 组相比,PP 组和 LCa-PP 组的 OPG mRNA 表达量高达 3.57 倍和 2.80 倍,具有极显著性差异($P < 0.001$),但是 RANKL mRNA 的表达量各组的增加幅度相对较小,PP 组为 1.36 倍,LCa-PP 组 1.51 倍。结果显示,PP 组和 LCa-PP 组对增加 OPG 的表达作用强于对 RANKL 的作用。然而与 Control 组相比,RANKL/OPG 的比值(Fig. 5 C),PP 组和 LCa-PP 组都显著性降低($P < 0.001$),并且两组间存在显著性差异($P < 0.01$),PP 组作用强于 LCa-PP 组。

2.6 对 MC3T3-E1 细胞 OC mRNA 和 Runx2 mRNA 表达量的影响

RT-PCR 结果(Fig. 5)显示,各组受试药处理细

胞 21 天后,与 Control 组相比,在 Runx2 的 mRNA 表达量上,PP 组和 LCa-PP 组明显升高,差异具有显著性($P < 0.001, P < 0.05$),提示 PP 组和 LCa-PP 组均可以促进 MC3T3-E1 细胞的早期分化,且两组存在显著性差异($P < 0.01$),PP 组作用强于 LCa-PP 组。同样 PP 组和 LCa-PP 组均可显著性升高 OC mRNA 的表达量($P < 0.001, P < 0.05$)。提示两组可以显著促进成熟成骨细胞的分化与骨形成,其中 PP 组效果最明显,LCa-PP 组次之,两组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨论

骨量的维持取决于骨形成和骨吸收的动态平衡,该平衡失调将引发骨代谢性疾病^[11]。成骨细胞来源于间质前体细胞,是骨发生和骨形成的物质基础,可合成和分泌 20 余种胶原与非胶原蛋白质以及一些骨代谢的局部调节因子,在骨重建中生成类骨质并促进类骨质的矿化,形成的新骨质修补破骨细胞骨吸收形成的陷窝,并且可以分泌细胞因子调节破骨细胞分化^[12,13],因此在骨不断的更新活动中是最重要的功能细胞之一。由于成骨细胞决定骨形成并维持成骨细胞和破骨细胞的平衡,成骨细胞成骨功能减退会导致新骨形成减少,对骨吸收陷窝的修补能力减弱,造成骨小梁变细、薄弱、穿孔,骨皮质出现多孔性变化。因此研究药物对成骨细胞增殖及分化作用的影响,对于观察药物的疗效并探索其作用途径和机制具有重要意义。本文通过检测细胞增殖、ALP 活性、矿化结节形成、无血清凋亡作用以及骨相关基因表达来考察珍珠粉对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化的影响。结果显示,珍珠粉及低钙珍珠粉在对 MC3T3-E1 细胞分化成熟过程中有显著性地促进作用,并且两者存在显著差异,前者作用效果显著强于后者。

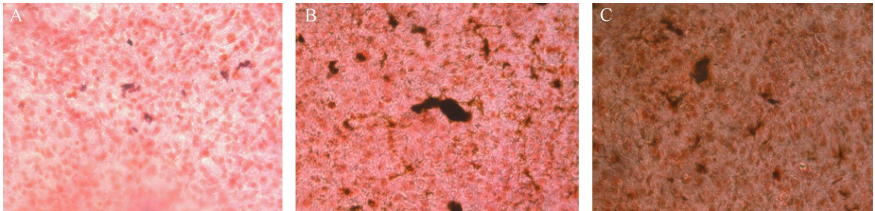


Fig. 3 Effect of the treatment with PP and LCa-PP on the mineralization of MC3T3-E1 cells (200 ×). von Kossa staining was performed after cells were continuously treated with 50 μg/mL PP (B), 50 μg/mL LCa-PP (C), or control vehicle (A) for 28 days. The calcium containing area was stained as black in color. The number of mineralized nodule was obviously increased in 50 μg/mL PP and 50 μg/mL LCa-PP treatment group than that in control group

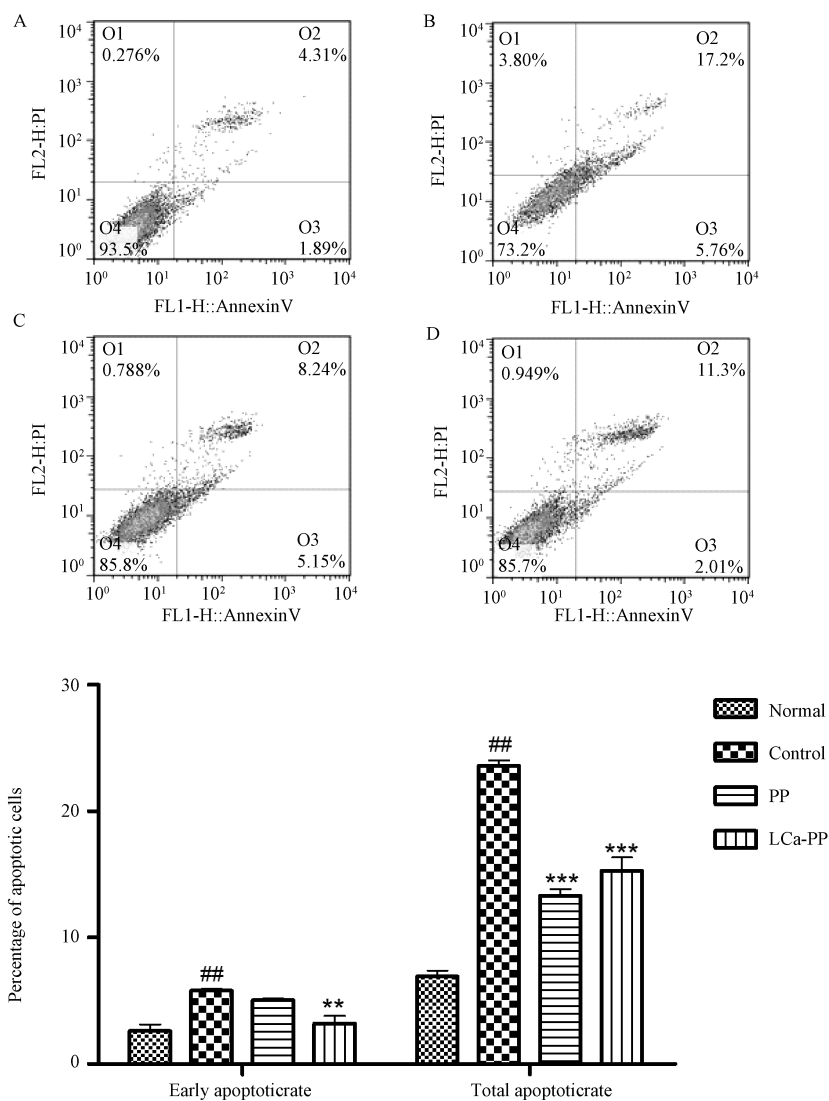


Fig. 4 Effect of the treatment with PP and LCa-PP on serum-deprived induced cell apoptosis. MC3T3-E1 cells were cultured in the presence or absence of 1% FBS for 48 h (Normal (A), Control (B)), respectively, and the serum-deprived cells were also treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PP (C) or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LCa-PP (D) for 48 h. This assay was performed in triplicate. Values were expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ## $P < 0.01$ compared to Normal; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group

ALP 是成骨细胞分化成熟的早期标志, ALP 通过分解基质中的磷酸酯, 使局部磷酸化, 促进羟基磷灰石的形成, 并在局部沉积, 使基质钙化, 同时水解焦磷酸, 解除对骨形成的抑制^[14]。本实验结果显示 PP 和 LCa-PP 均可以于成骨细胞诱导培养 14 天后明显的增强 ALP 的活性, 且 PP 显著强于 LCa-PP ($P < 0.01$), 说明 PP 和 LCa-PP 可以刺激成骨细胞的早期分化进而影响成骨细胞的矿化, 珍珠粉中钙成分起主要促进作用。

ALP 活性的高表达是成骨细胞分化的早期标

志, 矿化则是细胞进一步分化成熟的功能表现。维生素 C 能促进成骨细胞合成 I 型胶原, 而处于成熟期的成骨细胞具有高活性的碱性磷酸酶, 能将底物 β -甘油磷酸钠的磷酸键断裂, 从而提高培养基中无机磷浓度, 促进钙盐沉积在胶原基质中, 因此成骨细胞在含有维生素 C 及 β -甘油磷酸钠的培养基内生长能产生独特的矿化结节, Von Kossa 染色法用于检测钙沉积的传统手段^[10]。本实验中, PP 和 LCa-PP 均可以增加矿化结节的数目和结节斑块的大小, 表明其促进了成骨细胞的分化成熟, 含钙成分的 PP

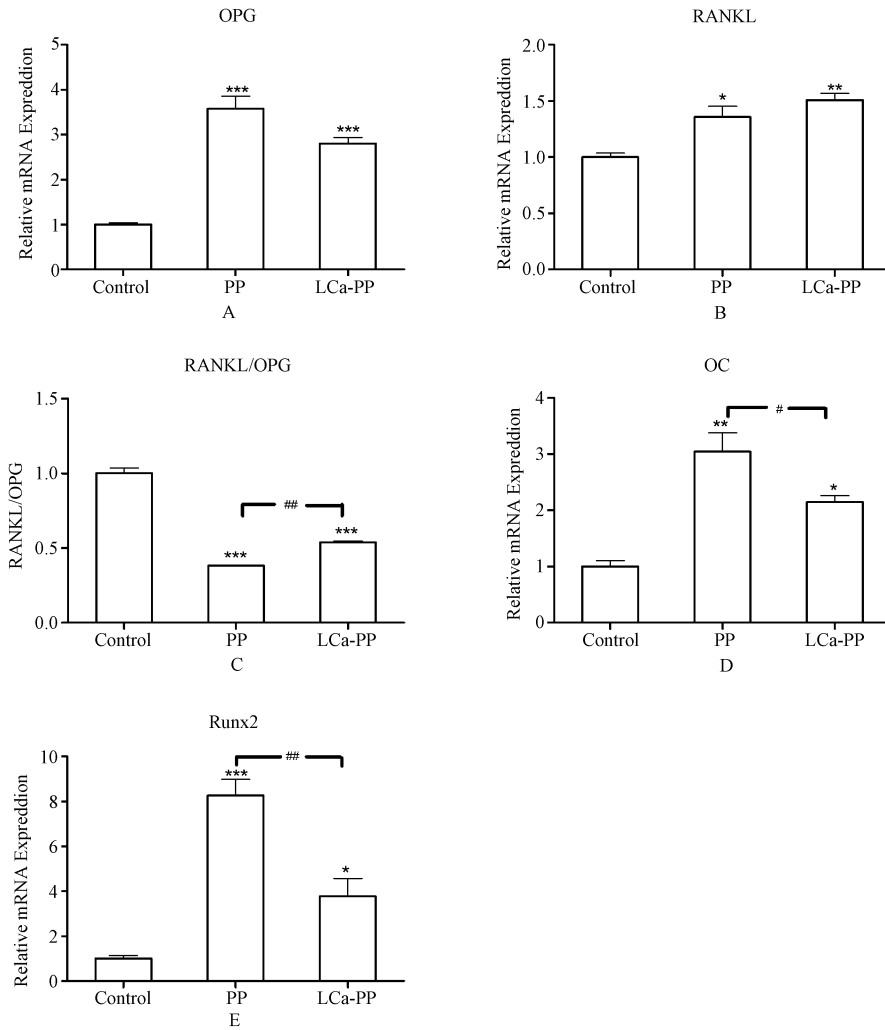


Fig. 5 Effect of the treatment with PP and LCa-PP on the expression of OPG (A), RANKL (B), OC (D) and Runx2 (E) of MC3T3-E1 cells. C represents the ratio of the expression of RANKL and OPG. After 21-d treatment, total RNA was isolated and analyzed using quantitative real-time RT-PCR. Bars represented a relative mRNA expression of tested gene normalized to the levels of GAPDH. Values were expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$ independent PCR analyzes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with PP.

组效果强于去除钙成分的 LCa-PP 组。

成骨细胞凋亡与新骨基质矿化有关,是骨代谢的一个重要过程,大约有 70% 参与骨重建的成骨细胞都会凋亡^[15]。因此,绝经后成骨细胞的异常凋亡也许会导致骨重建的不平衡,从而成为绝经后骨质疏松发生的重要机制。本实验证实 PP 和 LCa-PP 均可以抑制血清饥饿诱导的成骨细胞凋亡,表明两者均具有抗成骨细胞凋亡的作用,两组间不存在显著性差异。

Runx2 属于 Runt 结构域基因家族,是一种成骨细胞特异性转录因子,能够特异性的识别并结合许多靶基因启动子上的 PyGpyGGtPy 序列,影响靶基

因转录。Runx2 主要在成骨细胞和肥大软骨细胞中表达,是成骨细胞分化和功能的关键因子。Runx2 可以诱导或促进骨基质蛋白基因的表达,从而启动未分化的间质细胞或使已分化的其他类型的细胞向成骨细胞方向分化,是成骨细胞早期分化的标志性的基因^[16]。OC 是由成骨细胞合成的一种非胶原蛋白,主要分布于细胞外基质,对骨基质钙化和矿化非常重要,是成骨细胞晚期分化的标志^[17]。RT-PCR 实验结果显示 PP 和 LCa-PP 均可以上调 Runx2 和 OC 的基因表达,说明两者既能够增强成骨细胞的早期分化又能增强其晚期分化,PP 组作用效果强于 LCa-PP 组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

近年来的研究发现,OPG 和 RANKL 是调控破骨细胞激活分化的重要细胞因子,分别属于肿瘤坏死因子受体和肿瘤坏死因子超家族成员。RANKL 与破骨细胞或者其前体细胞表达的一类膜受体—RANK(receptor activator of NF- κ B)受体特异性的结合,诱导前体细胞分化为活性破骨细胞,促进骨吸收^[18]。而 OPG 作为诱饵受体与 RANKL 结合,阻止其与 RANK 结合,从而抑制前体细胞激活为破骨细胞,抑制破骨细胞功能表达,从而拮抗破骨细胞的骨吸收作用^[19],所以又被称之为骨保护素。也就是说破骨细胞的激活和分化主要取决于 RANKL 和 OPG 相对含量的比值。本实验中,PP 和 LCa-PP 能显著性增加 OPG 的基因表达 ($P < 0.001$),但是对 RANKL 的表达增加效果较弱 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。OPG 表达显著增高而 RANKL 水平改变较小,结果就是导致了 RANKL/OPG 比率的明显下降 ($P < 0.001$),从而说明两者不但具有促骨形成作用,同时还可能抑制骨吸收,但两组间存在显著差异 ($P < 0.01$),PP 组强于 LCa-PP 组。

综上所述,实验结果显示珍珠粉和低钙珍珠粉均对体外培养的 MC3T3-E1 细胞的分化成熟过程呈现直接促进作用,珍珠粉作用强于低钙珍珠粉,两组间存在显著差异,说明珍珠粉中钙成分对 MC3T3-E1 细胞分化成熟起到主要作用。然而,人体是一个复杂的环境,骨代谢受多种激素和因子的影响,药物对骨形成的影响可能不仅仅通过其对成骨细胞的直接作用来实现,还可通过对机体宏观网络的调控来完成,其作用途径也有待进一步探讨。

【参 考 文 献】

- [1] Dong Na, et al. Determination of the Trace Element in Pearl Power[J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2011, 39 (1): 315-316.
- [2] Aaseth J, Boivin G, et al. Osteoporosis and trace elements[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2012, 26: 149-152.
- [3] Cui SF, Zhao Y, et al. Effect of Nano Pearl Power on the Calcium Absorption and Utilization in rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2005, 13 (4): 204-207.
- [4] Wu ZH, et al. Experiment Study of Anti-osteoporotic Action of Pearl Calcium Capsules [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2001, 23 (10): 766-768.
- [5] Chen JL, et al. Experiment Study of Anti-osteoporotic Action of Active Protein in Pearl [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2004, 27 (5): 363-365.
- [6] Zhao Y, Zou B, Shi Z, et al. The effect of 3-hydroxybutyrate on the in vitro differentiation of murine osteoblast MC3T3-E1 and in vivo bone formation in ovariectomized rats [J]. Biomaterials, 2007, 28 (20): 3063-3073.
- [7] Prouillet C, Maziere JC, Maziere C, et al. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MC-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2004, 67 (7): 1307-1313.
- [8] Cortizo AM, Sedinsky C, McCarthy AD, et al. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblast in culture [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 536 (1-2): 38-46.
- [9] Guo L, et al. Influence of insulin-like growth factor-I on mouse osteoblast proliferation and alkaline phosphatase activity [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14 (33): 6095-6098.
- [10] Isama K, Tsuchiya T. Enhancing effect of poly (1-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells [J]. Biomaterials, 2003, 24 (19): 3303-3309.
- [11] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. Nature, 2003, 423 (1): 337-342.
- [12] Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass [J]. Nature, 2003, 423 (6937): 349-355.
- [13] Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis [J]. Lancet, 2006, 367 (2): 2010-2018.
- [14] Kim YJ, Lee MH, Wozney JM, et al. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2 [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (49): 50773-50780.
- [15] Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, et al. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines [J]. J Bone Miner Res, 1998, 13 (5): 793-802.
- [16] Yang S, Wei D, Wang D, et al. In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation [J]. J Bone Miner Res, 2003, 18 (4): 705-715.
- [17] Chan BY, Lau KS, Jiang B, et al. Ethanolic extract of Actaea racemosa (black cohosh) potentiates bone nodule formation in MC3T3-E1 preosteoblast cells [J]. Bone, 2008, 43 (3): 567-573.
- [18] Zhong LL, et al. Effects of RANKL/RANK/OPG system on modulation of osteoblasts and osteoclasts [J]. Chin J Osteoporos, 2011, 17 (11): 1010-1013.
- [19] Fouque-Aubert A, Chapurlat R. Influence of RANKL inhibition on immune system in the treatment of bone diseases [J]. Joint Bone Spine, 2008, 75 (1): 5-40.

(收稿日期: 2013-11-18, 修回日期: 2013-12-06)

珍珠粉对 MC3T3-E1细胞增殖、分化、矿化及骨相关基因表达的影响

作者:

[王凯](#), [魏博](#), [谭佳妮](#), [季晖](#), [WANG Kai](#), [WEI Bo](#), [TAN Jiani](#), [JI Hui](#)

作者单位:

[中国药科大学药理教研室, 南京, 210009](#)

刊名:

[中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名:

[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期):

2014(6)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201406018.aspx