

8-异戊烯基柑橘素促进体外培养成骨细胞成熟矿化的研究*

明磊国 陈克明** 葛宝丰 翟远坤

(兰州军区兰州总医院骨科研究所, 兰州 730050)

摘要 研究 8-异戊烯基柑橘素对体外培养大鼠颅骨成骨细胞(rat skull osteoblasts, ROB)的分化成熟及生物矿化的影响。取新生大鼠颅骨多次酶消化法得到成骨细胞, 培养于含 10% FBS 的 MEM 培养液中, 3 天后首次换液, 待细胞铺满皿底传代培养。以碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)为检测指标, 96 孔板梯度筛选作用最佳浓度, 在最佳浓度作用并成骨性诱导培养的第 3、6、9、12 天测 ALP 活性、钙盐沉积量; 第 12 天进行 ALP 和钙化结节组织化学染色及计数; 成骨性诱导后不同时间点提取 Total RNA, RT real-time PCR 法检测成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、成骨相关转录因子 Osterix、Runx-2 和骨形态发生蛋白-2(BMP-2)的基因表达情况; 成骨性诱导的第 4、8、12 天裂解获得细胞总蛋白, 蛋白质印迹法检测人 I 型胶原蛋白(COL-I)的蛋白质表达量。研究结果表明: 1×10^{-6} mol/L 能显著促进成骨细胞的成熟分化, 表现为提高 ROB 的 ALP 活性、促进钙盐沉积、增加钙化结节数量; 提高 bFGF、IGF-1、Osterix、Runx-2 和 BMP-2 mRNA 表达水平; 促进 COL-I 的合成。由此可知浓度为 1×10^{-6} mol/L 8-异戊烯基柑橘素能显著促进 ROB 的分化成熟及生物矿化, 证明 8-异戊烯基柑橘素能促进成骨细胞的分化成熟及生物矿化, 作为促进骨修复和抗骨质疏松的有效成分具有较大的药用价值。

关键词 骨质疏松, 成骨细胞, 分化, 增殖, 8-异戊烯基柑橘素, 矿化

学科分类号 R-332, R-284.1, R-329.24, R-681.053.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00495

长期以来, 人们发现妇女在采摘啤酒花的过程中常会发生生理周期紊乱现象, 但一直不明原因, 近年来才发现其与劳作环境中的雌激素水平有关, 是啤酒花中的雌激素样活性成分影响了女性的生理周期, 其中广泛存在于啤酒花中的 8-异戊烯基柑橘素是导致此现象的罪魁祸首。几年来 Milligan 等^[1-3]报道, 8-异戊烯基柑橘素的确具有植物雌激素样作用, 可以作为雌激素的替代品使用。而植物雌激素作为抗骨质疏松替代疗法的药物被广泛使用, 其效果也已得到临床证实。本文研究了 8-异戊烯基柑橘素对体外培养成骨细胞分化成熟和生物矿化的影响, 以探明其是否具有抗骨质疏松活性及抗骨质疏松药用开发潜力和其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

20g 左右新生 SD 大鼠 12 只(甘肃中医学院实

验动物中心提供, 合格证号 SCXK(甘)2004-0006-152); 8-异戊烯基柑橘素(Enzo, 385-025-M005, USA); MEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司); 胰蛋白酶、II 型胶原酶、 α -萘基磷酸钠、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、磷酸化抗坏血酸、脱脂奶粉、Gly、Tirs、BSA(Sigma 公司); 碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)、骨钙素 ELISA 检测试剂盒(ids, UK); 钙盐沉积量检测试剂盒(BioVision, USA); RNAiso Reagent、反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶, Easy Dilution 稀释液均由 Takara 公司提供; 引物由 Takara 公司设计合成; 抗体 COL-I (abcam), β -actin、山羊抗鼠辣根标

* 甘肃省科技重大专项计划资助项目(092nkDA025)。

** 通讯联系人。

Tel: 0931-8994327, E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-09-26, 接受日期: 2011-03-11

记酶(中杉金桥公司); BCA 蛋白质定量试剂盒(北京博奥森公司)。

1.2 成骨细胞分离

将乳鼠脱臼处死置于 75%酒精中浸泡 5 min, 迅速取其颅骨并去除骨膜及结缔组织, PBS 洗 3 次; 将骨片剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的碎片后转移至培养瓶中, 加 0.25%胰酶 2~3 ml, 水浴 37℃ 消化 2 次(每次 10 min), 弃去上清液; 用 0.1% 的 II 型胶原酶 2~3 ml, 水浴 37℃ 消化 10 min 并弃上清液; 用 0.1% 的 II 型胶原酶 3 ml, 水浴 37℃ 消化 4 次, 每次 20 min, 收集上清液并合并于 5 ml 含血清培养基以中止消化; 150 目细胞筛过滤后以 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入培养液(含 10%FBS 的 MEM, 含青霉素、链霉素各 100 U/ml)吹散成均匀的细胞悬液, 计数。

1.3 成骨细胞培养

将细胞悬液以 2×10^4 /ml 接种于大培养皿(Nunc)中培养, 每皿加 8 ml 培养液, 置于饱和湿度、37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。每 72 h 换培养液一次, 培养至细胞汇合成单层后, 胰蛋白酶消化传代(P₁代)。用于化合物最适浓度检测的细胞接种于 96 孔板, 每孔 100 μl; 用于碱性磷酸酶(ALP)组织化学染色、钙化结节茜素红组织化学染色和计数、钙含量和骨钙素测定、提取总 RNA 和总蛋白的成骨细胞均接种于中培养皿中, 每皿 4 ml; 用于 ALP 活性测定的细胞接种于 24 孔板中, 每孔 0.5 ml, 平行做 4 孔。

1.4 8-异戊烯基柑橘素的作用最适浓度确定

P₁代细胞以 3×10^7 /L 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μl。72 h 后成骨性诱导并以 1×10^{-1} mol/L、 1×10^{-2} mol/L、 1×10^{-3} mol/L、 1×10^{-4} mol/L 浓度的 8-异戊烯基柑橘素 1 ml/L 进行干预, 对照组加入不含 8-异戊烯基柑橘素的载体溶液(DMSO)1 ml/L, 每组平行做 8 孔。每 72 h 更换培养液一次, 于诱导培养的第 12 天进行 ALP 活性测定, 96 孔板中每孔加入缓冲液和基质液各 25 μl, 37℃ 水浴 15 min, 每孔加入显色液 75 μl, 充分混匀后在酶标仪上测定 490 nm 处的吸光度(A)值。

1.5 成骨性分化分析

将传代培养细胞分为两组进行成骨性诱导培养, 培养基内含 10%FBS 的 DMEM、 1×10^{-7} mmol/L 地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠和 50 mg/L ASAP。一组加入终浓度为 1×10^{-6} mol/L 的 8-异戊烯基柑橘素, 作为实验组, 另一组仅加入等体积的

8-异戊烯基柑橘素载体溶液(DMSO), 作为对照。常规 72 h 更换培养液一次, 进行如下指标分析。

1.5.1 不同时间点 ALP 活性测定。P₁代细胞以 5×10^8 /L 接种于 24 孔板, 每孔加 0.5 ml, 培养 3 天待细胞铺满孔底后更换诱导培养基, 实验组培养液中 8-异戊烯基柑橘素的浓度为 1×10^{-6} mol/L, 与对照组同时培养的第 3、6、9、12 天分别进行 ALP 活性测定, 24 孔板中每孔加入缓冲液和基质液各 0.2 ml, 37℃ 水浴 15 min, 每孔加入显色液 0.6 ml, 充分混匀后于紫外分光光度计上测定 507 nm 处的吸光度(A)值。用酚标准作标准并将检测值换算为每 15 min/mg 蛋白质反应所产生的酚单位。

1.5.2 ALP 组织化学染色。成骨性诱导培养 12 天后弃培养液, PBS 洗 2 次, 加 10%福尔马林固定 2 min, 随即进行 ALP 组织化学染色。具体方法为: 将 α-萘基磷酸钠和固蓝 RR 各 25 mg 溶于 pH 8.9 的巴比妥-盐酸缓冲液 25 ml 中, 摇匀后每孔 1 ml 加入 12 孔板各孔中, 待出现阳性结果后, 停止染色, 照相并用 Image-Pro Plus 6.0 扫描计数和计算阳性克隆的面积。

1.5.3 骨钙素分泌量测定。分别收集成骨性诱导后 0~3 天、3~6 天、6~9 天、9~12 天细胞更换培养液时的旧培养液 1 ml, -20℃ 保存; 标准曲线制备及样品测定方法按说明书操作; 于酶标仪上 450 nm 处测定 A 值, 并通过标准曲线计算样品中骨钙素含量。

1.5.4 钙盐沉积量测定。在中培养皿中分别于成骨性诱导培养第 3、6、9、12 天进行钙含量测定。具体方法: 弃培养液, PBS 洗 2 次, 加 1 mol/L 的 HCl 每皿 2 ml, 吹起贴壁细胞并超声波破碎, 在摇床上摇动过夜后 1 000 r/min 离心 10 min 并收集上清液。标准曲线制备及样品的测定方法按说明书操作, 于酶标仪上 570 nm 处测定 A 值, 并通过标准曲线计算每皿样品中钙盐沉积量。

1.5.5 茜素红组织化学染色。成骨性诱导培养第 12 天, 进行茜素红染色, 具体方法如下: 弃培养液, PBS 洗 2 次, 加入 pH 8.9、0.1%的茜素红染色液, 中培养皿中每皿 3 ml, 37℃ 水浴 1 h, 观察结果、照相并用 Image-Pro Plus 6.0 扫描计数和计算阳性克隆的面积。

1.5.6 人 I 型胶原蛋白(COL-I)蛋白质印迹分析。成骨性诱导培养第 4、8、12 天提取细胞总蛋白, 进行蛋白质印迹分析。4℃ 预冷的 PBS 漂洗 2 遍后, 加入 500 μl 的细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl

pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L 抑蛋白酶肽, 1% 吐温-20, 0.5% 去氧胆酸钠、1% SDS)于冰上静置 30 min 使细胞充分裂解。4℃, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 用 BCA 法进行总蛋白浓度的测定。95℃ 变性 4 min, 各组取含 50 μg 蛋白质样品, 经 15%SDS-PAGE 分离后, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 2%脱脂奶粉室温下摇床振荡封闭 2 h, 然后加入 β-actin 和 I 型胶原的一抗(均为 1:1 000 稀释), 4℃ 过夜; 次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000 稀释) 37℃ 孵育 2 h。每进行下一步实验前 PVDF 膜均用 4℃ 预冷的 PBST 摇床漂洗 3 次, 每次 10 min。用增强化学发光法检测目的蛋白, X 光片的曝光时间视实验效果而定, 灰度值使用 Image-Pro plus 6.0 软件扫描测定。

1.5.7 RT-real time PCR 分析。成骨性诱导前 12 h 实验组加入终浓度为 1×10^{-6} mol/L 的 8-异戊烯基

柑橘素, 对照组加入等体积的 8-异戊烯基柑橘素载体溶液。分别在成骨性诱导培养 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h, 提取总 RNA, 检测成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、成骨相关转录因子 Osterix、Runx-2、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)及 COL- I 的 mRNA 表达水平。所用引物均委托宝生物(大连)公司根据 GenBank 所发布的序列设计并合成(表 1), 总 RNA 的提取采用 Trizol 一步法进行, 紫外分光光度计检测浓度, 并用 1%甲醛变性琼脂糖电泳检测其完整性。调整总 RNA 的浓度至 50 μg/L, 取 2 μl 将其逆转录为 cDNA。逆转录体系、PCR 扩增体系及反应条件均参照说明书设定。以标本中所提取的高浓度、高纯度 RNA 逆转录后得到的 cDNA 作为标准品, 经等比稀释后, 进行 PCR 反应制备标准曲线。经内参校正, 求得目的基因的相对表达水平。

Table 1 The primer sequence of RT-real time PCR

Gene	Primer sequence	Product length/bp
FGF	Forward 5' AAGCAGAAGAGAGAGGAGTTG 3'	154
	Reverse 5' CGGTAAGTGTGTAGTTATTGG 3'	
OSX	Forward 5' GCCTACTTACCCGCTCTGACTTT 3'	131
	Reverse 5' GCCCACTATTGCCAACTGC 3'	
Runx-2	Forward 5' GCACCCAGCCCATATAAGA 3'	165
	Reverse 5' TTGGAGCAAGGAGAACCC 3'	
IGF-1	Forward 5' TTCAGTTCGTGTGTGGACCAAG 3'	120
	Reverse 5' GATCACAGCTCCGGAAGCAA 3'	
BMP-2	Forward 5' ACCGTGCTCAGCTTCCATCAC 3'	156
	Reverse 5' TTCCTGCATTTGTTCCCGAAA 3'	
GAPDH	Forward 5' GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG 3'	143
	Reverse 5' ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA 3'	

1.6 统计学处理

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS17.0 软件处理数据, 采用单因素方差分析和有重复测量的方差分析法进行数据统计, 显著性差异采用 *F* 检验, $P < 0.05$ 为差异显著、 $P < 0.01$ 为差异极显著, 有统计学意义。

2 结 果

2.1 8-异戊烯基柑橘素对 ROB 的作用最佳浓度结果

实验组与对照组之间采用配对 *t* 检验的分析法

进行数据统计分析。成骨细胞标志酶 ALP 活性越强, 则 490 nm 的 *A* 值就越高; 由表 2 可知, 不同浓

Table 2 Effect of 8-prenylnaringenin on ALP activity in rat osteoblast cultures

Group	Repeated sample size	<i>A</i> ₄₉₀
1×10^{-4} mol/L	6	0.8479 ± 0.1712
1×10^{-5} mol/L	6	$1.4873 \pm 0.2544^*$
1×10^{-6} mol/L	6	$2.7281 \pm 0.2642^{**}$
1×10^{-7} mol/L	6	$1.8535 \pm 0.2524^*$
Control	6	1.2833 ± 0.1637

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

度梯度的 8- 异戊烯基柑橘素干预大鼠颅骨成骨细胞 (ROB) 后, 结合细胞形态学观察发现, 1×10^{-4} mol/L 对细胞有较大的毒性, 其余三组均有促进 ALP 活性的功能, 其中 1×10^{-6} mol/L 组显著高于对照组和 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-5} mol/L 组, 差异有统计学意义。同时也说明了终浓度为 1×10^{-6} mol/L 时, 8- 异戊烯基柑橘素对 ROB 作用效果最明显, 是其最适作用浓度。

2.2 8-异戊烯基柑橘素对 ROB 的 ALP 活性影响

由图 1 可见, 成骨性诱导从 3 天开始 8- 异戊烯基柑橘素实验组在各时间点的 ALP 活性均高于对照组; 第 6、9 天 ALP 活性上升最快, 12 天达到最大值, 两组变化趋势一致但实验组明显高于对照组, 且差异显著有统计学意义。

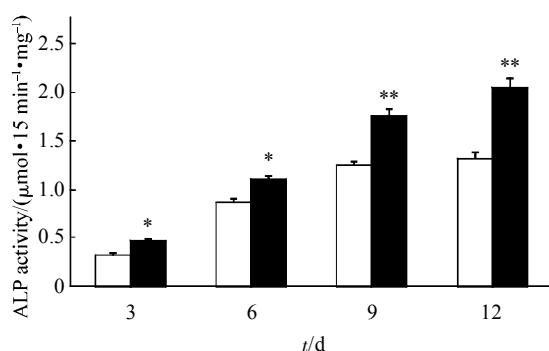


Fig. 1 Effect of 8-prenylaringenin on ALP activity in rat osteoblast cultures

□ : Control; ■ : 8-Prenylaringenin. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, $n = 4$)

2.3 8-异戊烯基柑橘素 ALP 阳性克隆形成效率的影响

成骨性诱导第 12 天的 ALP 组化染色结果 (图 2) 表明, 8- 异戊烯基柑橘素实验组 ALP 阳性克隆子数目及克隆子 (CFU-f_{ALP}) 所占皿底的面积明显

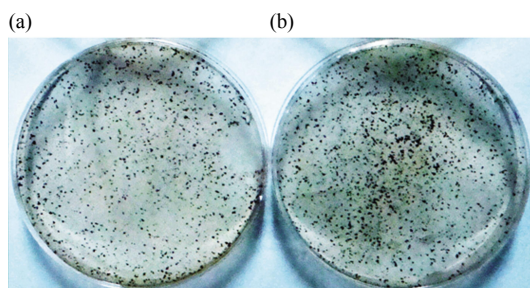


Fig. 2 Effect of 8-prenylaringenin on CFU-f_{ALP} forming efficiency

(a) Control; (b) 8-Prenylaringenin.

显高于对照组, 差异显著有统计学意义 (表 3)。

Table 3 Effect of 8-prenylaringenin on CFU-f_{ALP} forming efficiency

Group	Repeat sample size	Number of CFU-f _{ALP}	Total area of CFU-f _{ALP} (mm ² /dish)
8-Prenylaringenin	4	864.15 ± 28.68*	537.67 ± 30.43**
Control	4	531.75 ± 10.25	388.74 ± 24.88

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

2.4 8-异戊烯基柑橘素对 ROB 分泌骨钙素的影响

由图 3 可知, ROB 成骨性诱导后, 8- 异戊烯基柑橘素实验组骨钙素含量均高于对照组, 特别是第 3~9 天骨钙素分泌最活跃, 说明 ROB 的成骨活动最强烈, 且差异显著有统计学意义。

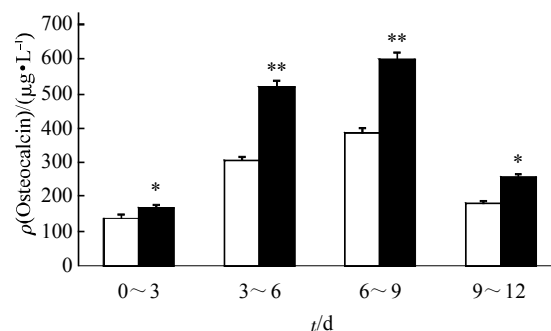


Fig. 3 Effect of 8-prenylaringenin on osteocalcin secretion in rat osteoblast cultures

□ : Control; ■ : 8-Prenylaringenin. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, $n = 4$)

2.5 8-异戊烯基柑橘素对 ROB 钙盐沉积量的影响

由图 4 可知, 诱导第 3 天细胞开始出现较小的

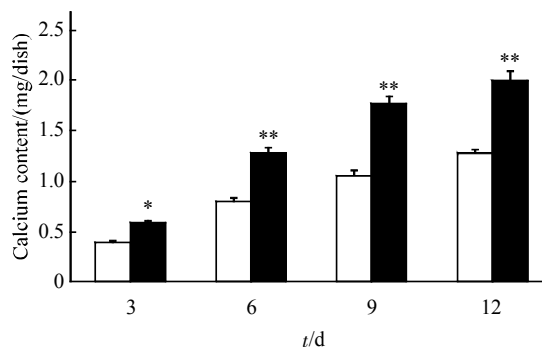


Fig. 4 Effect of 8-prenylaringenin on calcium deposition in rat osteoblast cultures

□ : Control; ■ : 8-Prenylaringenin. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, $n = 4$)

钙化颗粒,以后细胞成骨活动明显增强,钙化结节逐渐增大变多,随时间增长钙盐含量逐渐上升,尤其是第6~12天沉积量明显增强,第12天达到最高.8-异戊烯基柑橘素实验组显著高于对照组,从第6天开始实验组是对照组的1.5倍以上,且差异显著有统计学意义.

2.6 8-异戊烯基柑橘素对钙化结节形成效率的影响

第12天的茜素红组化染色结果表明,钙化结节染色结果呈阳性(图5),8-异戊烯基柑橘素实验组的钙化结节(CFU-f_{Ca})数目及其所占皿底的表面积明显高于对照组,差异显著有统计学意义(表4).

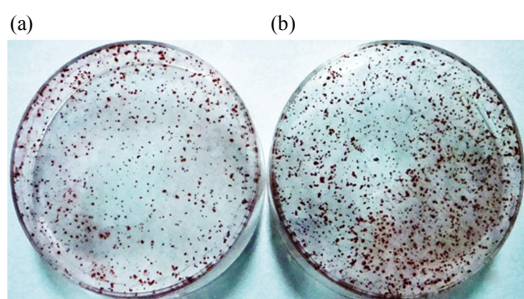


Fig. 5 Effect of 8-prenylningerin on CFU-f_{Ca} forming efficiency
(a) Control. (b) 8-Prenylningerin.

Table 4 Effect of 8-prenylningerin on CFU-f_{Ca} forming efficiency

Group	Repeat sample size	Number of CFU-f _{Ca}	Total area of CFU-f _{Ca} (mm ² /dish)
8-Prenylningerin	4	1319.25 ± 63.75**	572.89 ± 23.747**
Control	4	731.44 ± 42.25	340.68 ± 22.168

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

2.7 8-异戊烯基柑橘素对 COL- I 表达的影响

由图6可知,ROB成骨性诱导后,COL- I 随

时间的增加不断积累,对照组与实验组的变化趋势一致,但8-异戊烯基柑橘素实验组骨钙素含量均高于对照组,从第4天开始就有明显差异,第12天差异最显著,实验组是对照组的1.66倍,各检测时间点差异显著有统计学意义.

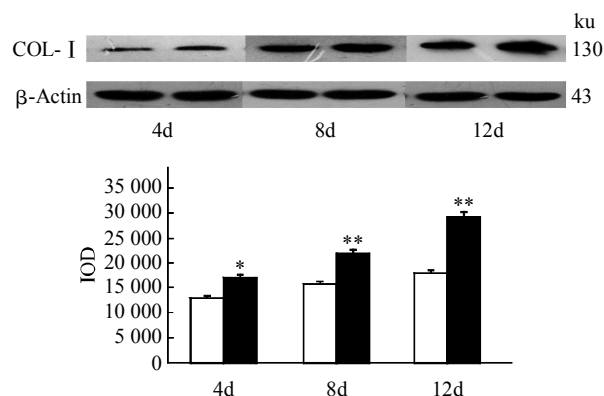


Fig. 6 Effect of 8-prenylningerin on type I collagen expression in rat osteoblast cultures

□: Control; ■: 8-Prenylningerin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

2.8 8-异戊烯基柑橘素对 bFGF, IGF-1, Osterix, Runx-2 和 BMP-2 基因表达水平的影响

bFGF, IGF-1, Osterix, Runx-2, BMP-2, GAPDH 的溶解曲线均只见一个特异性峰,表明引物的特异性好.各基因的扩增曲线都呈“S”型,说明扩增效率较高.每个样本平行做3组($n = 3$),数据分析采用有重复测量的方差分析法处理,各基因相对表达量分析结果如下:

2.8.1 bFGF. 该基因表达在诱导后持续上升,在24 h达到最高值,此后表达量有下降趋势,但对照组的下降速度要明显快于实验组,差异显著有统计学意义,说明药物的作用使得此基因稳定持续表达的时间明显长于对照组(表5).

Table 5 Effect of 8-prenylningerin on mRNA expression of bFGF

Group	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
8-Prenylningerin	1.868 ± 0.022*	2.813 ± 0.047*	5.377 ± 0.057*	8.772 ± 0.057**	8.284 ± 0.074**	4.563 ± 0.051**
Control	1.442 ± 0.034	2.558 ± 0.035	5.181 ± 0.039	8.167 ± 0.069	4.772 ± 0.034	1.542 ± 0.012

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

2.8.2 IGF- I. 该基因表达在成骨性诱导后6 h达到最大值,在测定的不同时间点,8-异戊烯基柑橘素均明显提高 IGF- I mRNA 的水平,且在未诱

导条件下也能促进该因子的表达,与对照组相比,差异具有统计学意义(表6).

Table 6 Effect of 8-prenylnaringenin on mRNA expression of IGF- I

Group	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
8-Prenylnaringenin	1.323 ± 0.021*	2.568 ± 0.041**	1.374 ± 0.027*	0.917 ± 0.038*	0.652 ± 0.014	0.511 ± 0.043*
Control	1.144 ± 0.014	1.223 ± 0.026	0.916 ± 0.016	0.865 ± 0.033	0.628 ± 0.017	0.412 ± 0.022

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

2.8.3 Osterix. 对照组 Osterix 的表达在诱导 24 h 时达到较高值, 随着时间的延长均有所下降; 实验组在诱导后该基因的表达趋势一致, 但从 12~24 h

过程中实验组是对照组的 3 倍以上. 实验组各时间点均显著高于对照组, 差异显著有统计学意义(表 7).

Table 7 Effect of 8-prenylnaringenin on mRNA expression of OSX

Group	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
8-Prenylnaringenin	8.894 ± 0.474*	14.467 ± 0.364**	44.284 ± 0.912**	84.436 ± 0.773**	48.582 ± 0.681**	34.057 ± 0.483**
Control	4.192 ± 0.241	6.317 ± 0.291	13.684 ± 0.484	23.627 ± 0.511	14.331 ± 0.394	8.828 ± 0.272

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

2.8.4 Runx-2. 该基因表达量在诱导后 0~48 h 逐步上升, 48 h 达到最大值, 之后开始下降, 实验组与对照组基因表达量的变化一致. 实验组在诱导后

的表达量均显著高于对照组, 表达量是对照组的 3~5 倍, 差异显著具有统计学意义(表 8).

Table 8 Effect of 8-prenylnaringenin on mRNA expression of Runx-2

Group	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
8-Prenylnaringenin	1.799 ± 0.027	8.874 ± 0.106**	15.392 ± 0.102**	18.558 ± 0.437**	64.833 ± 0.805**	17.437 ± 0.223**
Control	1.782 ± 0.034	1.875 ± 0.043	3.687 ± 0.134	4.577 ± 0.096	19.221 ± 0.761	6.825 ± 0.341

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

2.8.5 BMP-2. 该基因表达量在诱导后 6 h 达到最大值, 在 0~12 h 实验组和对照组相比较是其 2 倍以上, 24~48 h 前后随着时间的延长其表达量有所下

降但仍然高于对照组, 到 72 h 其表达量相差不大; 证明对 BMP-2 的上调主要集中在加药或加药诱导的前期(表 9).

Table 9 Effect of 8-prenylnaringenin on mRNA expression of BMP-2

Group	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
8-Prenylnaringenin	1.581 ± 0.014**	2.812 ± 0.027**	1.918 ± 0.038**	1.174 ± 0.044*	0.875 ± 0.058*	0.479 ± 0.048
Control	0.751 ± 0.021	0.955 ± 0.023	0.918 ± 0.044	0.833 ± 0.037	0.775 ± 0.052	0.463 ± 0.036

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

3 讨 论

骨质疏松是一个复杂的生理反应过程, 该过程包括破骨细胞(osteoclast, OC)介导的骨吸收和成骨细胞(osteoblast, OB)介导的骨形成. 骨质疏松最主要的表现就是骨吸收快于骨形成, 导致骨代谢失

衡、骨量丢失、骨密度下降、骨折率升高. 因此骨骼健康与否决定于 OB 和 OC 的相互作用及其平衡. 在这个过程中有多种生长激素和细胞因子参与调节, 包括生长因子 IGF- I、b-FGF 及 BMP^[4-5]和成骨相关转录生长因子 Osterix 及 Runx-2 的参与. 因此, 探究具有雌激素样活性天然产物对 OB 的影

响和骨质疏松的防治具有重要的理论和实践意义。

本文研究了 8-异戊烯基柑橘素对成骨细胞在骨形成过程中的影响, 发现 10^{-6} mol/L 的 8-异戊烯基柑橘素能明显促进其分化成熟和矿化。实验检测了骨形成必需的生长因子 IGF- I、b-FGF 和 BMP-2, 以及成骨相关转录因子 Osterix 和 Runx-2 的基因表达水平。对骨形成的重要标志酶 ALP、骨基质特异性蛋白骨钙素、骨胶原主要成分 COL- I 及钙盐的沉积量也做了比较研究。实验结果表明, 8-异戊烯基柑橘素在促进成骨细胞成骨性分化的过程中不是单一地上调某一种因子, 而是相关因子都有不同程度的提高, 显著上调了上述几种基因的 mRNA 水平, 提高了 ALP 活性, 增加了骨钙素分泌量和 COL- I 水平, 并显著提高了钙盐沉积量和钙化结节数量。说明 8-异戊烯基柑橘素具有明显的促进成骨细胞分化成熟作用。

Christoffel 等^[6]报道, 8-异戊烯基柑橘素能够抑制骨质疏松模型大鼠的骨密度下降; Sehmisch 等^[7]比较研究了 8-异戊烯基柑橘素、6-异戊烯基柑橘素、6, 8-异戊烯基柑橘素的抗骨质疏松活性, 发现 8-异戊烯基柑橘素的活性最强; Chen 等^[8-10]和明磊国等^[11-13]研究发现淫羊藿苷和蛇床子素对骨髓间充质干细胞和成骨细胞的分化成熟有明显促进作用。值得注意的是, 淫羊藿苷和蛇床子素的 8 位碳上也带有异戊烯基, 说明此基团与上述化合物的抗骨质疏松活性有密切相关。本实验明确了 8-异戊烯基柑橘素对成骨细胞具有促进分化成熟及生物矿化的作用, 但对其他成骨相关细胞的影响、作用机理、以及分子结构与生理活性的相关性等尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Pepper M S, Hazel S J, Mpel M H, *et al.* 8-Prenylaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Cell Physiology*, 2004, **199**(1): 98-107
- [2] Milligan S, Kalita J, Pocock V, *et al.* Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylaringenin. *Reproduction*, 2002, **123**(4): 235-242
- [3] Bottner M, Christoffel J, Wuttke W. Effects of long-term treatment with 8-prenylaringenin and oral estradiol on the GH-IGF-1 axis and lipid metabolism in rats. *Endocrinology*, 2008, **198**(3): 395-401
- [4] 赵迎泽, 张 燕, 罗进勇. 骨形态发生蛋白 9 诱导成骨相关 TGF β II 型受体的鉴定分析. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(10): 1128-1137
Zhao Y Z, Zhang Y, Luo J Y. *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(10): 1128-1137
- [5] 赵 鹏, 毛英杰, 谷志远. 骨吸收与骨形成耦联中 Eph/ephrin 信号转导的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(9): 1101-1105
Zhao J, Mao Y J, Gu Z Y. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(9): 1101-1105
- [6] Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W. Effects of 8-prenylaringenin on the hypothalamo-pituitary-uterine axis in rats after 3-month treatment. *Endocrinology*, 2006, **188**(10): 397-405
- [7] Sehmisch S, Hammer F, Christoffel J, *et al.* Comparison of the phytohormones genistein, resveratrol and 8-prenylaringenin as agents for preventing osteoporosis. *Planta Med*, 2008, **74**(7): 794-801
- [8] Chen K M, Ge B F, Ma H P, *et al.* The serum of rats administered flavonoid extract from *Epimedium sagittatum* but not the extract itself enhances the development of rat calvarial osteoblast-like cells *in vitro*. *Pharmazie*, 2004, **59**(1): 61-64
- [9] Chen K M, Ge B F, Ma H P, *et al.* Inhibitory effect of total flavonoid extract of *Epimedium sagittatum* on rat osteoporosis induced by ovariectomy. *Chin J Clin Rehab*, 2004, **26**(8): 5681-5683
- [10] Chen K M, Ge B F, Ma H P, *et al.* Icarin, a flavonoid from the herb *Epimedium* enhances the osteogenic differentiation of rat primary bone marrow stromal cells. *Pharmazie*, 2005, **60**(12): 939-942
- [11] 明磊国, 王鸣刚, 陈克明, 等. 淫羊藿苷对体外培养人骨髓基质干细胞增殖与成骨性分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2010, **16**(2): 100-104
Ming L G, Wang M G, Chen K M, *et al.* *Chin J Osteoporos*, 2010, **16**(2): 100-104
- [12] 明磊国, 葛宝丰, 陈克明, 等. 蛇床子素对体外培养骨髓基质干细胞增殖与成骨性分化的影响. *中国药理学通报*, 2010, **26**(8): 1098-1103
Ming L G, Ge B F, Chen K M, *et al.* *Chin Pharm Bull*, 2010, **26**(8): 1098-1103
- [13] 明磊国, 葛宝丰, 陈克明, 等. 蛇床子素对体外培养成骨细胞增殖与成骨性分化的影响. *中国骨伤*, 2010, **23**(9): 42-45
Ming L G, Ge B F, Chen K M, *et al.* *Orthopaedics and Traumatology*, 2010, **23**(9): 42-45

Effects of 8-Prenylnaringenin on Osteoblasts Differentiate and Biomineralization *in vitro**

MING Lei-Guo, CHEN Ke-Ming**, GE Bao-Feng, ZHAI Yuan-Kun

(Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050)

Abstract To investigate the effects of 8-prenylnaringenin on osteoblasts *in vitro* under the conditions of the ability to differentiate and biomineralization. Neonatal SD rat skull was segregated, bone cells were obtained by enzyme digestion and cultured in MEM containing 10% FBS. Three days later the culture medium was changed at the first time, serial subcultivation was proceeded until cells covered with 90% culture dish. The 8-prenylnaringenin final concentration is 1×10^{-6} mol/L. Under the induce condition, the Alkaline phosphatase activity, osteocalcin and calcium salt sediment yield were measured at the 3rd, 6th, 9th, 12th day. At the 12th day, histochemistry dyeing was carried for calcified tubercle and ALP. Total RNA was isolated and the gene expression of bFGF, IGF-1, osterix, BMP-2 and Runx-2 were investigated by RT-real time PCR. 8-Prenylnaringenin significantly advanced osteoblasts to differentiate and biomineralization. Raised the ALP activity and calcium salt sediment yield and osteocalcin and COL- I, increased calcified tubercle amount were manifested. Besides, 8-Prenylnaringenin also can enhance the mRNA level of bFGF, IGF-1, osterix, BMP-2 and Runx-2. The 8-prenylnaringenin with final concentration 1×10^{-6} mol/L can predominantly promote ROB differentiation and biomineralization.

Key words osteoporosis, osteoblasts, differentiation, proliferation, mineralization, 8-prenylnaringenin

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00495

*This work was supported by a grant from Gansu Provincial Science & Technology Department China (092nkDA025).

**Corresponding author.

Tel: 86-931-8994327, E-mail: chkeming@yahoo.com.cn

Received: September 26, 2010 Accepted: March 11, 2011