

水解蛋黄粉改善鼠骨代谢和生长的研究

吴 静^{1,2}, 宋兴安³, 堀江健二³, 金武祚³, 刘立明^{1,*}

(1.江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122;

2.江南大学医药学院, 江苏 无锡 214122; 3.日本富尔玛株式会社(PFI), 日本 京都 6158245)

摘 要: 以小鼠成骨细胞株MC3T3-E1、大鼠破骨细胞和大鼠为实验模型, 通过测定碱性磷酸酶(ALP)活性、抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色、骨溶蚀陷窝和5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)荧光染色等多种骨代谢生化指标, 研究源于鸡蛋蛋黄的水解蛋黄粉改善骨代谢的生理作用机制。结果表明: 水解蛋黄粉通过促进成骨细胞生长、抑制破骨细胞分化与破坏、提高骨端生长板细胞活性等机制改善骨代谢、促进骨骼生长。

关键词: 水解蛋黄粉; 骨代谢; 成骨细胞; 破骨细胞

Promoting Effect of Bonepep on Bone Metabolism and Growth

WU Jing^{1,2}, SONG Xing-an³, HORIE Kenji³, KIM Mujo³, LIU Li-ming^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

3. Pharma Foods International Co. Ltd., Kyoto 6158245, Japan)

Abstract: The purpose of this study was to elucidate the promoting effect of Bonepep, bioactive peptides derived from egg yolk on bone metabolism and growth and its physiological mechanism. For this, mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells, isolated rat osteoclast and rats were used and alkaline phosphatase (ALP) activity measurement, TRAP staining, bone erosion lacunae and BrdU staining were carried out in this study. It was found that Bonepep improved bone metabolism and growth through many different mechanisms such as promotion of osteoblast growth, inhibition of osteoclast growth and differentiation and enhancement of bone cell activity.

Key words: Bonepep; bone metabolism; osteoblast; osteoclast

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)23-0327-04

人们都向往和追求高品质的健康生活, 而骨质健康是所有健康问题的根本。比如婴幼儿的发育、儿童的成长以及中老年人的骨质疏松症等都牵涉到骨质健康的问题^[1]。骨质疏松症是一种以骨组织显微结构受损、骨矿成分和骨基质等比例不断减少、骨质变薄、骨小梁数量减少, 脆性增加和骨折危险度升高为特征的全身骨代谢障碍的疾病^[2]。它是一种病因多元、多环节发病、与增龄和性别密切相关的渐进性、全身性、代谢性骨病。好发于绝经后女性和中老年人群。随着中国“老龄化”的进程不断加快, 骨质疏松症的发病率愈来愈高^[3], 预计到2050年将有超过4亿老龄人口, 占总人口的30%以上。如何保持良好的骨质健康, 已成为现代人面临的最重要的健康课题, 而与此相关的功能性食品将会发挥应有的作用。

老年性骨质疏松的治疗分为药物和非药物治疗: 药物治疗包括骨矿化药物、骨吸收抑制剂、骨形成促进剂以及中医药; 非药物治疗包括运动疗法、物理疗法和食

物疗法^[4]。前期研究发现来源于鸡蛋蛋黄的骨代谢改善物质——水解蛋黄粉能够促进骨形成与抑制骨吸收的作用^[5-6], 但是关于其在细胞水平的生理活性以及作用机理尚未了解, 本实验在细胞水平上详尽研究水解蛋黄粉对成骨细胞、破骨细胞和破骨细胞的影响, 为揭示水解蛋黄粉的生理功能提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与动物

本研究中采用的受试材料水解蛋黄粉, 采用日本富尔玛株式会社(PFI)生产的水解蛋黄粉。MC3T3-E1细胞株由日本Cell-bank提供。

新生24h内SD大鼠10只, 雌雄和大小不限, 购自苏州大学实验动物中心; 3周龄SPF级纯系雄性SD大鼠50只, 体重(226±26)g, 购自中国医学科学院放射医学研究所。

收稿日期: 2010-09-26

作者简介: 吴静(1981—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为药理药代学。E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn

*通信作者: 刘立明(1976—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物制造。E-mail: mingli@jiangnan.edu.cn

肺泡巨噬细胞(AM)取自苏州大学实验动物中心Wistar大鼠肺灌洗液,

DMEM培养基、胰蛋白酶 美国Gibco公司;胎牛血清(FCS) 杭州四季青生物材料有限公司;碱性磷酸酶试剂盒 南京建成生物制品公司;抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU) 美国Sigma公司;噻唑蓝(MTT) 华美公司;Eagle培养液 上海典微生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

CO₂培养箱 日本Sanyo公司;酶联免疫检测仪 国营华东电子管厂;Leitz 1600锯式切片机 德国Leitz公司;S520扫描电镜 日本日立公司。

1.3 细胞培养与MTT法检测细胞增殖

MC3T3-E1细胞复苏后,用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM将细胞接种于培养瓶中,在37℃、5%二氧化碳及饱和湿度条件下培养,每3d更换1次培养液,细胞长满后,用0.25%胰酶消化后传代小鼠成骨样细胞株MC3T3-E1细胞^[7-8]。调整细胞密度为 5×10^8 个/L,接种于96孔板,每孔100 μ L,24h后,换含不同质量浓度水解蛋黄粉的DMEM培养液培养,药物质量浓度分别为0.1、1mg/mL,对照组为不含水解蛋黄粉的DMEM培养液,每组设3个重复孔继续孵育72h,细胞培养终止前每孔加入MTT(终质量浓度5 g/L),孵育4h后吸出孔内上清液,每孔加入150 μ L DMSO,振荡20min,在570nm波长处检测各组OD值^[9]。

$$\text{细胞增殖率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{处理组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100$$

1.4 碱性磷酸酶的活性检测

调整细胞密度为 5×10^8 个/L,接种于96孔板,每孔100 μ L,24h后,换含不同质量浓度水解蛋黄粉的DMEM培养液培养,药物质量浓度分别为0.1、1mg/mL,对照组为不含水解蛋黄粉的DMEM培养液,每组设3个重复孔,继续孵育72h,于细胞培养终止前每孔加入PBS液冲洗3次,胰酶消化,每孔加入3mL培养基终止消化,混匀离心,弃上清液加入5mL PBS,混匀离心,弃上清液,加入80 μ L PBS液混匀后存于-20℃冰箱待检。以正常培养的细胞作对照,每组设3个复孔。

检测之前反复冻融细胞3次,超声裂解,在酶联免疫检测仪上选择405nm波长测定吸光度(A),换算求出样本中碱性磷酸酶活性(nkat/L)。取标准牛血清白蛋白,稀释成1g/L,采用梯度稀释方法,得到25、50、75、100、125、150、175、200mg/L梯度稀释液,样本取1 μ L稀释100倍,加入显色剂考马斯亮蓝1mL,测定595nm波长处吸光度,做标准曲线,计算样本总蛋白质量浓度。最后计算出各实验组中的每毫克蛋白中相对的碱性磷酸酶活性值。

1.5 破骨细胞分离

1)首先蒸馏水冲洗新生24h内SD大鼠体后断颈处死,75%乙醇浸泡2min;2)无菌条件下,取四肢长骨置于冷PBS液中;3)用眼科剪和眼科镊分离出股骨、胫骨和肱骨,尽量清除骨周围的软组织及骨膜;4)切除骨两端的骨髓,骨干部分用冷Medium199培养液清洗2次,再将其放入盛有含10% PBS的冷Medium 199培养液的玻璃培养皿中;5)用手术刀片将骨干部分轻轻快速刮碎,移入10mL离心管中;6)用圆头滴管反复吹打上述含有骨碎片及分离细胞的培养液3min左右,使附着在骨碎片上的破骨细胞冲入培养液中,再静置30s,待骨碎片沉降后,取上层细胞悬液备用。

1.6 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色

破骨细胞培养至第6天终止培养。用4% NaNO₂、50mmol/L酒石酸钠、0.1mol/L醋酸钾(pH5.0)及AS-BI酸性磷酸盐溶液染色。于光学显微镜下计数多个核TRAP阳性破骨细胞^[10],用于破骨细胞分化研究。

1.7 象牙薄片制备与处理

取直径1.5cm的象牙毛胚1只,用锯式切片机横向切成直径6mm,厚度50 μ m薄片,置蒸馏水中超声波清洗10min \times 3次,自然晾干,紫外线照射后保存于4℃环境中备用。

不同质量浓度的水解蛋黄粉与破骨细胞共培养培养15d后,吸取上层细胞悬液均匀接种于预置有象牙薄片的16孔培养板中,每组4孔,未处理空白组添加不含细胞的培养液,对照组添加未含有水解蛋黄粉的细胞悬液。每孔加全培养液至1mL,37℃、5% CO₂环境中培养5h,以Medium 199培养液冲去未贴壁的细胞,更换共培养液继续培养,3d换液1次。以上处理用于骨溶蚀陷窝研究。

1.8 骨骼生长测定

选取3周龄清洁级纯系雄性SD大鼠用普通饲料喂养4周后,强行灌喂0.8g/d的水解蛋黄粉饲料6d,腹腔里注射荧光基质-四环素,第8天进行荧光基质-四环素第2次注射,第10天麻醉大鼠致死,完整剥离出胫骨,用游标卡尺测量胫骨近端关节面和远端关节面之间的距离,即为喂食10d的胫骨长度,取其3次测量的平均值。此外,在喂食56d与60d时分别注射荧光基质-四环素,60d后测定胫骨生长长度。胫骨伸长度是将取出的胫骨做成骨切片,对四环素进行免疫荧光染色,计量荧光带和生长板之间的距离来测定2d间的胫骨伸长度。

1.9 BrdU标记检测

SD大鼠胫骨细胞悬液100 μ L/孔,加入AM上清液10 μ L/孔,于96孔培养板中,置体积分数为5% CO₂ 37℃培养32~48h。加入BrdU标记液10 μ L/孔,继续培养6h,小心吸弃含标记液的培养液,用含10%血清Eagle培养液250 μ L/孔洗涤细胞1次后换预冷固定液200 μ L/孔于-20℃

固定细胞30min, 同上洗涤细胞3次, 加入核酸酶工作液100 μ L/孔放置37 $^{\circ}$ C、30min, PBS 洗涤细胞3次, 加入抗BrdU-PoD Fab片段工作液100 μ L/孔置37 $^{\circ}$ C、30min, 弃上述工作液, 用PBS洗涤细胞3次, 加入过氧化物酶底物100 μ L/孔, 用底物增强剂室温裂解至阳性样品呈现绿色, 酶标仪于490nm处测定吸光度。

1.10 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 标准差表示。使用SPSS 11.5进行软件处理, 采用单因素方差分析处理组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义, $P < 0.001$ 为差异有极显著统计学意义。

2 结果与分析

2.1 水解蛋黄粉促进成骨细胞增殖与ALP活性

表1 水解蛋黄粉对小鼠成骨样细胞株MC3T3-E1增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 1 Proliferation-promoting effect of Bonepep on MC3T3-E1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 组别 | 水解蛋黄粉添加量/(mg/mL) | 细胞增殖率/% |
|------|------------------|---------------|
| 对照组 | 0 | 102 \pm 13 |
| 实验组1 | 0.1 | 123 \pm 16 |
| 实验组2 | 1.0 | 165 \pm 14* |

注: *. 与对照组相比, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。

在小鼠胚胎成骨细胞MC3T3-E1中加入质量浓度为0.1mg/mL和1.0mg/mL的水解蛋黄粉, 于5%CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度下的CO₂培养箱中培养72h, 以研究水解蛋黄粉对成骨细胞增殖的影响, 结果如表1所示。以未添加水解蛋黄粉为对照组, 添加0.1mg/mL和1.0mg/mL的细胞MC3T3-E1增殖率分别提高了21%和63% ($P < 0.05$)。结果表明, 一定剂量的水解蛋黄粉能够促进成骨细胞MC3T3-E1的增殖。

表2 水解蛋黄粉对细胞株MC3T3-E1中碱性磷酸酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 2 Activating effect of Bonepep on alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

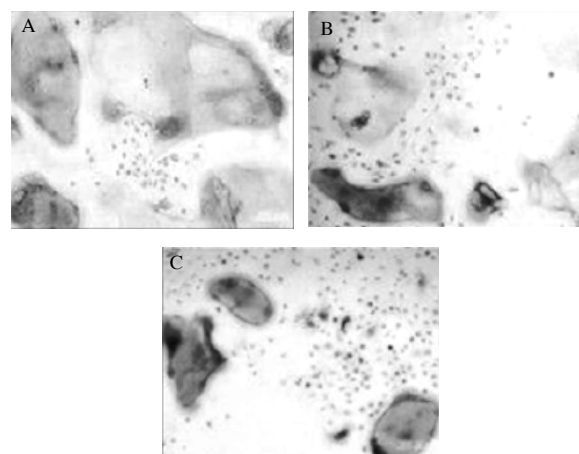
| 组别 | 水解蛋黄粉添加量/(mg/mL) | ALP活性/(U/mg pro) |
|------|------------------|------------------|
| 对照组 | 0 | 148 \pm 28 |
| 实验组1 | 0.1 | 305 \pm 2** |
| 实验组2 | 1 | 450 \pm 26*** |

注: **. 与对照组相比, 有较显著性差异 ($P < 0.01$); ***. 与对照组相比, 有极显著性差异 ($P < 0.001$)。

水解蛋黄粉对MC3T3-E1细胞株中表征成骨细胞代谢(造骨)的主要指标骨碱性磷酸酶(ALP)活性^[11]的影响如表2所示。0.1mg/mL和1.0mg/mL水解蛋黄粉作用于MC3T3-E1细胞72h后, 碱性磷酸酶(ALP)活性分别提高了103.3% ($P < 0.01$)与200.1% ($P < 0.001$)。通常, 成骨细胞前体产生细胞外基质蛋白质, 包括 型胶原蛋白, 然后在分化为成骨细胞的过程中产生ALP和骨钙蛋白。因此, ALP活性是表征MC3T3-E1细胞分化的主要指标。前

期研究表明, 一定剂量的水解蛋黄粉能促进成骨细胞的增殖, 且较高质量浓度(1mg/mL)的水解蛋黄粉比低质量浓度(0.1mg/mL)效果更为显著, 其原因在于, 水解蛋黄粉通过提高成骨细胞代谢活力的方式促进骨增殖。

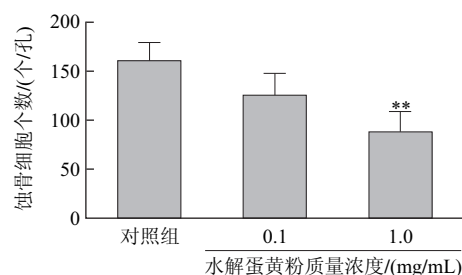
2.2 水解蛋黄粉抑制破骨细胞分化



A. 对照组; B. 0.1mg/mL剂量组; C. 1mg/mL剂量组。

图1 水解蛋黄粉对破骨细胞分化的抑制效果图($\times 100$)

Fig.1 SEM observation of inhibitory effect of Bonepep on osteoclastic differentiation($\times 100$)



**. 与对照组相比, 有较显著性差异 ($P < 0.01$)。

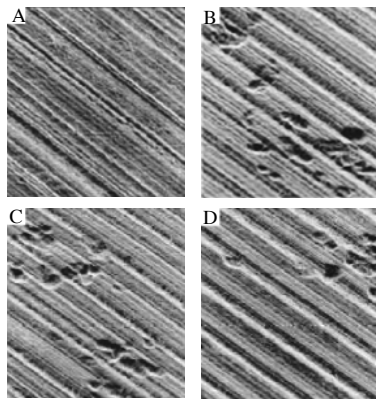
图2 不同质量浓度水解蛋黄粉对破骨细胞分化的抑制效果($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig.2 Inhibitory effect of Bonepep on osteoclast differentiation($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

将与水解蛋黄粉共培养6d的破骨细胞按试剂盒所述步骤进行TRAP染色, 发现对照组或添加水解蛋黄粉的实验组均可见TRAP染色阳性细胞(图1A~C)。光镜(100倍)条件下对TRAP(抗酒石酸酸性磷酸酶)阳性多核细胞进行计数, 结果显示, 破骨细胞形成数随着水解蛋黄粉质量浓度的增加而逐渐减少, 且呈一定的剂量关系(图2)。TRAP是成熟破骨细胞、活化巨噬细胞和树突状细胞共同作用产生的一种糖蛋白。薛延^[11]和肖恩等^[12]的研究表明, 在骨吸收的过程中, 破骨细胞活跃并大量分泌TRAP, TRAP水平是表征破骨细胞功能、判断骨吸收的敏感特异性指标^[13]。前期研究发现, 使用绝经后骨质疏松症模型小鼠(OVX, 卵巢摘除), 确认水解蛋黄粉抑制破骨细胞分化因子(RANKL)诱导下的破骨细胞分化^[6]。本研究从细胞水平(破骨细胞)上证实源于鸡蛋的多肽物质水解蛋黄粉能够有效地抑制破骨细胞分化。

2.3 水解蛋黄粉对骨溶蚀的抑制作用

陷窝观察是评价体外培养破骨细胞功能的可靠方法之一,多在扫描电镜下进行。陷窝数是指采用计算机图像分析系统对随机拍摄的同一批次陷窝照片中相同陷窝面积内的坑洞数。将水解蛋黄粉与破骨细胞培养15d后,通过扫描电镜观察(300倍)象牙薄片(直径6mm)并计量象牙薄片上骨溶蚀作用所导致的陷窝个数^[14]。发现对照组明显的骨吸收陷窝(图3),在添加0.1mg/mL水解蛋黄粉也未能有效地抑制骨溶蚀作用,而添加1.0mg/mL水解蛋黄粉的实验组几乎未观察到陷窝,表3表明较高浓度的水解蛋黄粉显著抑制了骨溶蚀的发生(坑洞数减少62.5%, $P < 0.01$)。



A. 未处理组; B. 对照组; C. 0.1mg/mL组; D. 1mg/mL组。

图3 扫描电镜观察水解蛋黄粉对破骨细胞骨溶蚀抑制作用($\times 100$)

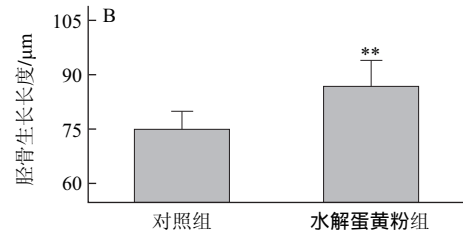
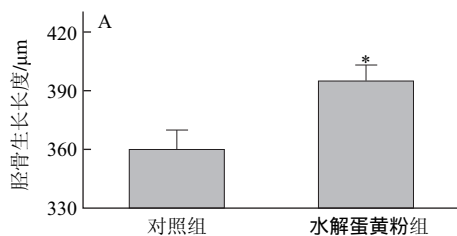
Fig.3 SEM observation of inhibitory effect of Bonepepon osteoclastic bone resorption ($\times 100$)

表3 水解蛋黄粉对破骨细胞骨溶蚀作用的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

| 组别 | 水解蛋黄粉添加量/(mg/mL) | 坑洞数/(10^3 Pits/disc) |
|------|------------------|-------------------------|
| 未处理组 | 0 | 0 |
| 对照组 | 0 | 8 ± 0.3 |
| 实验组1 | 0.1 | 8 ± 0.5 |
| 实验组2 | 1 | 3 ± 0.2 |

2.4 水解蛋黄粉对骨骼生长的促进作用

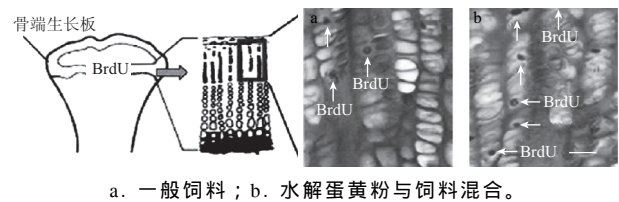
SD大鼠骨骼生长测定结果见图4。喂食ED₅₀(9.6mg/kg)20倍剂量水解蛋黄粉能够有效地增加胫骨生长长度,其中喂食10d提高9.7%($P < 0.05$),喂食60d提高16%($P < 0.01$)。同时采用BrdU荧光染色法分析骨细胞受刺激情况和核内DNA变化情况,结果见图5。发现喂食水解蛋黄粉后骨端生长板细胞核内BrdU明显增多,表明细胞受到刺激,且水解蛋黄粉显著增强了骨端生长板细胞活性。



A. 喂食10d; B. 喂食60d; *,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$); **,与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$)。

图4 喂食不同时间水解蛋黄粉对SD大鼠骨骼生长的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig.4 Activating effect of oral administration of Bonepep for different days on bone growth activity in SD rats ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)



a. 一般饲料; b. 水解蛋黄粉与饲料混合。

图5 BrdU荧光染色法水解蛋黄粉对骨生长活性的影响

Fig.5 Examination of activating effect of oral administration of Bonepep on bone growth activity in SD rats by BrdU staining

3 结论

在治疗和预防骨质疏松症等骨关联疾病时,在日常生活中服用功能性食品,调整骨代谢的平衡的做法要比直接摄取医疗用医药品更加健康。本研究在细胞水平上,对骨代谢种生化指标(ALP活性、TRAP染色、骨溶蚀陷窝和BrdU荧光染色等)进行分析检测,确认了水解蛋黄粉对改善骨代谢的积极作用,为水解蛋黄粉的推广应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] 常璟宇. 新资源食品: 水解蛋黄粉[J]. 中国食品, 2011(9): 65.
- [2] 康铁鑫, 王道全, 刘忠厚. 针灸治疗骨质疏松症的临床研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(9): 701-708.
- [3] 杨文星, 罗炳杰. 36例外伤性脾破裂的诊治体会[J]. 广西医学, 2000, 22(6): 1349-1350.
- [4] 许洁, 赵东宝, 刘文斌. 老年性骨质疏松症的防治进展[J]. 中国全科医学, 2010, 13(11): 1246-1248.
- [5] LEEM K H, KIM M G, KIM H M, et al. Effects of egg yolk proteins on the longitudinal bone growth of adolescent male rats[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(11): 2388-2390.
- [6] SONG M Y, SAUCHI Y K, YUN S S, et al. Development of bonepep bone metabolism-improving ingredient derived from egg yolk[J]. China Food Activities, 2010, 1: 187-190.
- [7] 陈虹, 姚航平, 林军. 杜仲叶提取物对MC3T3-E1细胞增殖作用的实验研究[J]. 浙江医学, 2010, 32(11): 1654-1656.
- [8] 侯进, 熊晓云, 弥曼. xy9902对MC3T3-E1细胞的增殖和分化作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(5): 529-532.
- [9] 贺晋栋, 王东, 孙海钰, 等. 不同浓度瘦素对乳鼠成骨细胞增殖及VEGmRA表达的影响[J]. 中国现代医生, 2011, 49(3): 6-8.
- [10] 吴学宾, 陈建新, 周越, 等. 免疫抑制剂环孢素A对鼠骨代谢的生物学效应[J]. 首都医科大学学报, 2008, 29(2): 133-136.
- [11] 薛延. 老年骨质疏松患者骨代谢标志物的检测与应用[J]. 中国老年医学杂志, 2006, 25(6): 410-413.
- [12] 肖恩, 孟萍. 骨质疏松骨代谢生化指标的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(3): 212-216.
- [13] 张楠, 章秋. 骨代谢生化指标在骨质疏松症中的应用[J]. 安徽医药, 2011, 15(4): 401-403.
- [14] 邹志勇, 林晓明. 乳清碱性蛋白对骨代谢影响的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2008(7): 62-64.