

# 卵黄高磷蛋白磷酸肽及其钙螯合物在双细胞共培养体系中对成骨细胞分化的促进作用

周聪聪, 赵梦蝶, 李松明, 马美湖, 金永国, 黄茜\*

(华中农业大学食品科学技术学院, 蛋品加工技术国家地方联合工程中心, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 研究了卵黄高磷蛋白磷酸肽 (Phosvitin Phosphopeptide, PPP) 及其钙螯合物 (PPP-Ca) 在成骨细胞 (MC3T3-E1) 和破骨前体细胞 (RAW264.7) 共培养体系中对成骨细胞分化的调节作用。对细胞毒性、碱性磷酸酶 (AKP)、抗酒石酸性磷酸酶 (TRAP) 的活性和 TRAP 染色进行分析; 用 RT-PCR 技术进一步探究成骨细胞 RANKL/OPG 通路相关蛋白的 mRNA 表达情况。结果发现, PPP 和 PPP-Ca 可以使 MC3T3-E1 体系中的 AKP 活性分别增加 9.5% 和 12.7%; PPP 和 PPP-Ca 的加入可以使 MC3T3-E1 体系中 OPG 基因 mRNA 的表达量从 0.92 分别提升至 1.25 和 1.39、使 RANKL 基因 mRNA 的表达量从 1.00 分别提升至 1.23 和 1.45。该研究结果表明, PPP 和 PPP-Ca 可有效促进成骨细胞的分化。实验结果为进一步探索磷酸肽在多细胞模型体系中的作用提供了研究基础, 同时为磷酸肽的功能活性开发提供理论依据。

**关键词:** 卵黄高磷蛋白磷酸肽; 肽钙螯合物; 共培养; 成骨细胞

文章编号: 1673-9078(2022)12-154-160

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.1443

## Phosvitin Phosphopeptide and Its Calcium Chelate Promote Osteoblast Differentiation in A Double Cell Co-culture System

ZHOU Congcong, ZHAO Mengdie, LI Songming, MA Meihu, JIN Yongguo, HUANG Xi\*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, National Research and Development Center for Egg Processing, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** The regulatory effects of phosvitin phosphopeptide (PPP) and its calcium chelate (PPP-Ca) on osteoblast differentiation in the co-culture system of osteoblast (MC3T3-E1) and osteoclast precursor (RAW264.7) were investigated. Cytotoxicity, alkaline phosphatase (AKP) activity, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity and TRAP staining were analyzed. The mRNA expressions of RANKL/OPG pathway-related proteins in osteoblasts were further studied by RT-PCR. The results showed that PPP and PPP-Ca increased the AKP activity in the MC3T3-E1 system by 9.5% and 12.7%, respectively. In the MC3T3-E1 system, PPP and PPP-ca increased the mRNA expression levels from 0.92 to 1.25 and 1.39, respectively, for OPG, and from 1.00 to 1.23 and 1.45, respectively for RANKL. The results of this study showed that PPP and PPP-ca could effectively promote the differentiation of osteoblasts. The experimental results provide a research basis for further exploration of the role of phosphopeptides in the multi-cell model system and the development of functional activity of phosphopeptides.

**Key words:** phosvitin phosphopeptides; calcium peptide chelate; co-culture; osteoblast

引文格式:

周聪聪, 赵梦蝶, 李松明, 等. 卵黄高磷蛋白磷酸肽及其钙螯合物在双细胞共培养体系中对成骨细胞分化的促进作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(12): 154-160

ZHOU Congcong, ZHAO Mengdie, LI Songming, et al. Phosvitin phosphopeptide and its calcium chelate promote osteoblast differentiation in a double cell co-culture system [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 154-160

收稿日期: 2021-12-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072237); 环境食品学鸡肉加工项目中央高校基本科研业务费项目 (2662020SPPY006)

作者简介: 周聪聪 (1999-) 男, 硕士生, 研究方向: 蛋品加工, E-mail: 18872860005@163.com

通讯作者: 黄茜 (1984-) 女, 教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: huangxi@mail.hzau.edu.cn

骨组织作为人体结构的重要组成部分,对人体健康具有重要意义,而骨质疏松症是目前最常见的骨骼病变。骨质疏松是一种以骨密度减少、骨脆性增加为特征,容易引起骨折的全身性骨病。据报道,年龄在50岁以上的人群,有近20%的人患有骨质疏松症等骨骼疾病,且发病率一直呈现上升趋势<sup>[1]</sup>。可以通过增加成骨细胞活性与抑制破骨细胞活性来改善骨质疏松的病理状态<sup>[2]</sup>。

研究发现,骨髓基质干细胞、成骨细胞和破骨细胞在骨组织的正常生长和代谢中有重要作用,它们会形成一个动态平衡的生物过程,即成骨细胞分泌特征因子调节如:胶原蛋白、碱性磷酸酶、骨钙素和其他骨基质蛋白来诱导骨生成和破骨细胞相关因子调节诱导骨吸收<sup>[3-5]</sup>,在这个过程中,若生骨量少于被吸收骨量,骨总量丢失,则会引起骨质疏松症<sup>[6]</sup>。这些过程受到雌激素、核因子 $\kappa$ B受体激活配体(RANKL)/骨保护素(OPG)通路、活性氧(ROS)、多种生长因子和其他相关激酶信号转导通路的调控<sup>[7]</sup>。

卵黄高磷蛋白(PV)是磷酸化程度最高的蛋白质。由于卵生动物的胚胎骨骼在发育过程中所需要的磷元素主要由卵内的卵黄提供,因此卵黄高磷蛋白PV与卵生动物的骨矿化过程关系密切。PV经过酶解后形成的一种短肽物质是卵黄高磷蛋白磷酸肽(PPP),PPP因其多聚阴离子的结构表现出独特的金属螯合、抗氧化、乳化等特性<sup>[8]</sup>。已有实验证明PPP可显著提高生长期大鼠的钙吸收<sup>[9]</sup>。牛奶中的酪蛋白磷酸肽(CPP)作为一种已知的磷酸肽补钙制剂,能够促进婴幼儿对钙元素的吸收,作为一种新型功能性食品添加剂,已被广泛添加到婴幼儿奶粉和保健食品当中<sup>[10]</sup>。PV是自然界中磷酸化程度最高的蛋白质,更多的磷酸基团使PPP具有比CPP更强的持钙能力<sup>[11]</sup>。目前,PPP的研究还处在实验室阶段,有望发展成为一种新型的食品添加剂。

前期实验室已证实PV和PPP能促进MC3T3-E1细胞增殖、分化和矿化结节的形成<sup>[12]</sup>。还研究了PV对破骨前体细胞RAW264.7的作用机制,主要是通过下调TRAP的分泌活性来影响RAW264.7细胞分化形成破骨细胞<sup>[13]</sup>。但关于PV和PPP在成骨细胞和破骨细胞共培养体系中作用还未见报道。通过测定 AKP、TRAP 因子的分泌,以及成骨细胞中 RANKL/OPG 通路的 RT-PCR 表达量,进一步研究 PPP 和 PPP-Ca 在共培养体系中对成骨细胞分化的影响。为在细胞水平上更好的模拟体内骨细胞相互作用的微环境,本研究建立了 MC3T3-E1-RAW264.7 细胞共培养体系,以便进一步探索 PPP 和 PPP-Ca 在共培养体系中对成骨细胞分化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 原料

PV 由实验室制得。成骨细胞(MC3T3-E1 cells)和破骨前体细胞(RAW264.7 cells),由武汉普诺赛生命科技有限公司提供。

#### 1.1.2 试剂与药品

医用酒精、KBr、NaOH、CaCl<sub>2</sub>, 国药集团化学试剂有限公司;青霉素、链霉素、 $\alpha$ -DMEM 培养基,美国 HYCLONE 公司;胰蛋白酶(EC 3.4.4.4)、磷酸二氢钾、HEPES、MTT、二甲基亚砷,美国 SIGMA 公司;胎牛血清、0.25%胰酶-EDTA,澳洲 GIBCO 公司;TRAP 染液、TRAP 活性试剂盒、碱性磷酸酶(AKP)试剂盒,南京建成生物有限公司。

#### 1.1.3 仪器与设备

HERAcell 1501 二氧化碳培养箱,德国 Thermo Scientific 公司;IX71 荧光倒置显微镜,日本 Olympus 公司;MS104S/01 分析天平,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;iMark 酶标仪,联想生物科技有限公司;TDL-50B 台式低速离心机,上海安亭科学仪器厂;Option S7 超纯水系统,英国 ELGA 公司;DL-CJ-2ND 超净工作台,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;HH-4 数显电子恒温水浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司;EDC-810 RT-PCR 仪,东胜创新生物科技有限公司;QuantStudio 6 实时荧光定量 PCR 仪,ABI;Nano-100 微量分光光度计,杭州奥盛仪器有限公司;LS-100HD 高压灭菌锅,江阴滨江医疗设备有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 溶液配制

细胞冻存液:按照 DMEM:胎牛血清:DMSO=6:3:1 的体积比配制,现配现用。

完全培养基(m/m):89%的 DMEM,10%的胎牛血清,1%的双抗(100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素)。0.22  $\mu$ m 无菌滤膜过滤,4  $^{\circ}$ C 储存。

成骨分化培养基:含有 50  $\mu$ g/mL 的 L-抗坏血酸和 10 mmol/L 的  $\beta$ -甘油磷酸钠的完全培养基。

#### 1.2.2 PV、PPP、PPP-Ca 的制备

PV 的提取参照文献方法,主要为加入 2 倍体积的蒸馏水稀释蛋黄液后,离心分离,收集下层沉淀。用 4 倍质量体积比的  $m=10\%$  NaCl 和 0.06 mol/L NaOH (pH 值 11.3~11.5) 溶液均质沉淀 5 min,再用 5 mol/L HCl 调节 pH 值到 3.5~4.0,加入 3 倍体积的水离心,收集

上清液。超滤脱盐,离心后将上清液冻干得到PV<sup>[14]</sup>。

前期实验室已通过单因素实验确定了嗜热菌蛋白酶的加酶量2 000 U/g、酶解时间24 h、复合酶解顺序(先胰蛋白酶后嗜热菌蛋白酶复合酶解)时钙螯合率最高并优化了PPP-Ca的螯合条件(pH值9.5,肽钙比7:1)<sup>[15]</sup>。PPP的制备参照文献方法并加以修改,通过高温中压(HTMP)对PV溶液进行预处理。配制10 mg/mL的PV溶液,调节pH值6.5后利用高压灭菌设备对PV进行HTMP处理,HTMP预处理的条件:温度121 ℃、压力0.1 MPa、时间30 min<sup>[16]</sup>。选择胰蛋白酶和嗜热菌蛋白酶复合酶解制备PPP,按照酶与底物比为1:50(m/m)加入胰蛋白酶,调节pH值8.0,在37 ℃下酶解8 h。随后样品在100 ℃下水浴灭酶10 min。灭酶后再用嗜热菌蛋白酶对PV进行酶解,按照酶与蛋白比为2 000 U/g加入胰蛋白酶,调节pH值6.8,在68 ℃下酶解24 h。进一步在100 ℃下水浴灭酶10 min后冻干得到PPP。

将冻干后得到的PPP溶于去离子水,配制成10 mg/mL的溶液,以多肽与钙质量比7:1的比例加入0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub>混匀,调节pH值9.5,室温下反应30 min得到PPP-Ca。

### 1.2.3 细胞培养

对MC3T3-E1,加入 $m=0.25\%$ 胰酶37 ℃消化3 min,用完全培养基终止消化;对RAW264.7,加入完全培养基,用细胞刮刀将贴壁的RAW264.7细胞刮下,后续两种细胞分别按照1:2比例分瓶,补加3 mL完全培养基,于37 ℃ CO<sub>2</sub>培养箱中培养。细胞复苏后培养3~5代,此时细胞活力上升,处于生长对数期,可进行实验操作。

### 1.2.4 MTT法测细胞毒性

试验分为四组:①空白组:培养液+MTT溶液;②对照组:培养液+MTT溶液+细胞;③给药组1:PPP(1、2、4、8 mg/mL)+培养液+MTT溶液+细胞;④给药组2:PPP-Ca(1、2、4、8 mg/mL)+培养液+MTT溶液+细胞。

取对数生长期的MC3T3-E1和RAW264.7细胞,以每毫升 $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 个的细胞悬浊液100 μL放入96孔培养板中,放置在37 ℃,5% CO<sub>2</sub>,湿度90%的培养箱中培育24 h,细胞贴壁后换液,分别加入含有不同质量浓度的样品的培养基100 μL(添加样品前经0.22 μm滤膜过滤)。培养24 h结束后,吸弃旧培养基,每孔加入含有0.5 mg/mL的MTT的无血清培养液MEM 200 μL,继续培养4 h后,尽可能的吸去上清液,每孔加入150 μL DMSO,室温下在摇床上震荡10 min,充分混匀并溶解蓝紫色的甲贲颗粒。在酶联免疫检测仪上选择570 nm波长,测定各孔吸光度值。实验重复3次,取平均值。按以下公式计算细胞增殖率( $B$ , %):

$$B = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$A_s$ ——实验组吸光度值;

$A_c$ ——对照组吸光度值;

$A_b$ ——空白组吸光度值。

### 1.2.5 MC3T3-E1与RAW264.7共培养的建立

用含成骨诱导剂(抗坏血酸50 μg/mL、β-甘油磷酸钠10 mmol/L)以及 $m=10\%$ 胎牛血清、 $m=1\%$ 青霉素和 $m=1\%$ 链霉素的DMEM培养基培养,置于37 ℃含体积分数5% CO<sub>2</sub>的培养箱中。隔天换液1次,待分化为成熟的成骨细胞。

MC3T3-E1细胞与RAW264.7细胞以1:1(成骨细胞的种植密度为每毫升 $5 \times 10^4$ 个,破骨细胞为每毫升 $5 \times 10^4$ 个)和2:1(成骨细胞的种植密度为每毫升 $1 \times 10^5$ 个,破骨细胞为每毫升 $5 \times 10^4$ 个)的比例共同接种于6孔板。置于37 ℃含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中。成骨细胞分泌的RANKL因子能促使RAW264.7单核巨噬细胞向多核的破骨细胞分化,培养7 d,对破骨细胞进行鉴定。

### 1.2.6 破骨细胞的鉴定

按照TRAP染色试剂盒说明书进行染色,将细胞用PBS缓冲液冲洗后晾干,TRAP固定液4 ℃固定30 s~3 min,水洗,放置3 min,加入TRAP孵育液,置于37 ℃温箱,避光侵染45~60 min,水洗。苏木素复染3 min,水洗,晾干,镜下观察。TRAP能够将破骨细胞的细胞质染为酒红色,鉴定为破骨细胞。

### 1.2.7 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性测定

接种后,每2 d更换新鲜培养基一次并添加不同浓度的PPP和PPP-Ca,共培养7 d后,收集细胞培养液,1 000 r/min离心10 min,去除细胞沉淀后,进行抗酒石酸酸性磷酸酶活性检测。按照试剂盒说明书操作,依次加入检测缓冲液、显色底物和培养基上清,充分混匀后37 ℃下反应30 min,取出加入终止液终止其反应,于530 nm处,光径1 cm,测定其吸光度。

$$u = \frac{OD_1 - OD_0}{\varepsilon} \times \frac{1}{l \times t} \times \frac{V_0}{V_1} \quad (2)$$

式中:

$u$ ——TRAP活力, U/L;

$\varepsilon$ ——呈色物微摩尔消光系数,为 $12.8 \times 10^3 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;

$l$ ——比色光径, cm;

$t$ ——反应时间, s;

$V_0$ ——反应液总体积, L;

$V_1$ ——取样量, L;

$OD_1$ ——测定OD值;

$OD_0$ ——对照OD值。

### 1.2.8 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, AKP) 活性检测

选择共培养 7 d 后, 收集细胞培养液上清, 1 000 r/min 离心 10 min 去除细胞沉淀后, 进行 AKP 活性检测。按照 AKP 活性试剂盒说明书操作, 依次加入检测缓冲液、显色底物和培养基上清, 充分混匀后 37 °C 下孵育 30 min, 取出加入终止液终止其反应, 于 405 nm 处测定其吸光度。

### 1.2.9 MC3T3-E1 成骨细胞和 RAW264.7 巨噬细胞共培养系统的蛋白基因 RT-PCR

首先通过 Trizol 法提取 RNA, 在细胞样品中加入 1 mL Trizol 试剂, 用枪吹打混匀, 移至无 RNase 的 1.5 mL EP 管中, 裂解 10 min。按照试剂盒说明书提取总 RNA 后, 放于 -80 °C 冰箱内保存以备。接着 RT 逆转录成 cDNA, 最后实时荧光定量 PCR 检测。基因检测使用引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequence

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	PCR Products
<i>β-actin</i>	Forward	CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240 bp
	Reverse	TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	
<i>Mus RANKL</i>	Forward	ATGAAAGGAGGGAGCACGAA	168 bp
	Reverse	GAAAGCCCCAAAGTACGTCG	
<i>Mus OPG</i>	Forward	CCTGCCTGGGAAGAAGATCA	227 bp
	Reverse	TTGTGAAGCTGTGCAGGAAC	

### 1.2.10 数据处理

所有试验数据采用 SPSS Statistics 软件进行单因素方差分析, 采用邓肯分析法进行差异性分析,  $p < 0.05$  为差异显著。使用 Origin 软件作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞毒性试验

从图 1 可知, MC3T3-E1 细胞 (a) 在经过 PPP 处理 24 h 后, 细胞活性分别为 95.53%、95.25%、94.79%、92.93%, 经过 PPP-Ca 处理后, 细胞活性分别为 94.49%、93.11%、93.00%、92.68%; RAW264.7 细胞 (b) 在经过 PPP 处理后, 细胞活性分别为 95.35%、95.70%、92.88%、92.23%, 经过 PPP-Ca 处理后, 细胞活性分别为 96.78%、95.70%、93.10%、92.82%。细胞活性均呈现下降趋势, 但两种细胞的细胞活性均高于 85%, 说明 PPP 和 PPP-Ca 对 MC3T3-E1 细胞和 RAW264.7 细胞没有明显的毒性作用, 可用于后续试验。

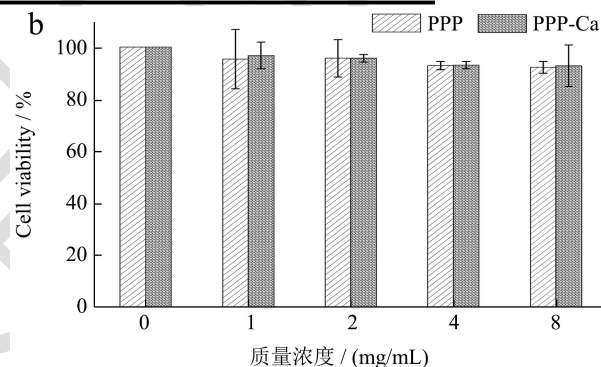
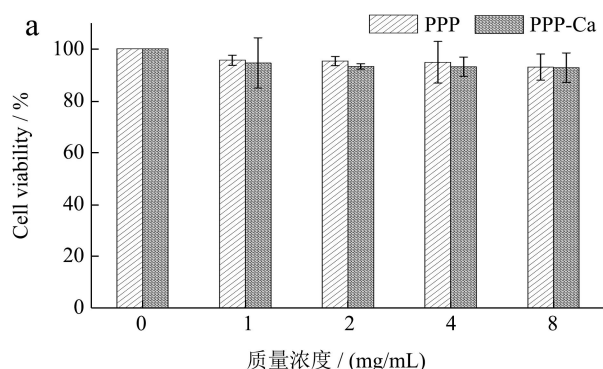


图 1 不同质量浓度 PPP 和 PPP-Ca 对 MC3T3-E1 (a) 细胞和 RAW264.7 (b) 细胞的细胞毒性作用

Fig.1 Cytotoxic effects of different concentrations of PPP and PPP-Ca on MC3T3-E1 (a) cells and RAW264.7 cells (b)

### 2.2 抗酒石酸酸性磷酸酶染色

倒置显微镜观察发现 MC3T3-E1 细胞的细胞形态是贴壁的纤维状, 而 RAW264.7 细胞在未分化前是圆形, 分化后形成破骨细胞。进行 TRAP 染色可以观察到 RAW264.7 细胞分化形成破骨细胞的形态变化。

如图 2 所示, MC3T3-E1 细胞和 RAW264.7 细胞的共培养体系中, RAW264.7 细胞体积增大, 分化形成破骨细胞。这是由于 MC3T3-E1 分泌的 RANKL 因子可以通过 OPG/RANKL/RANK 通路将信号传递给 RAW264.7 细胞, 进而调节 RAW264.7 细胞的分化, 促使 RAW264.7 单核的巨噬细胞向多核的破骨细胞分化。介怡琳<sup>[17]</sup>也发现了类似的现象: TRAP 染色后, 细胞的体积变大, 有三个以上的细胞核, 有棕褐色的颗粒出现在细胞质中。杨兴等<sup>[18]</sup>也观察到了在共培养体系建

立后, RAW264.7 细胞发生融合, 体积变大, 分化为了破骨细胞。

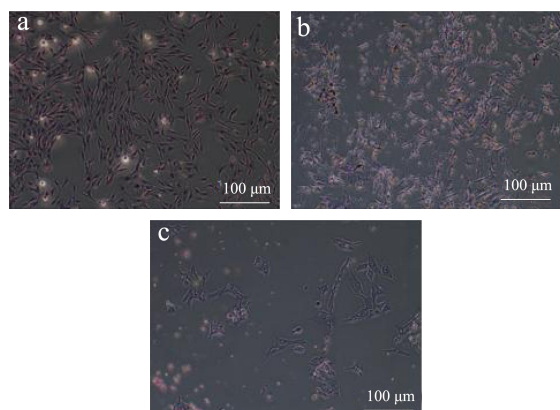


图2 MC3T3-E1 细胞和 RAW264.7 细胞共培养的 TRAP 染色  
Fig.2 TRAP staining of MC3T3-E1 cells and RAW264.7 cells co-cultured

注: 图 a 为 MC3T3-E1 细胞; 图 b 为 MC3T3-E1 细胞 + RAW264.7 细胞 (2:1); 图 c 为 MC3T3-E1 细胞 + RAW264.7 细胞 (1:1)。

### 2.3 碱性磷酸酶活性测定

碱性磷酸酶 (AKP) 是成骨细胞早期分化阶段分泌的标志酶, 在分化后期可水解有机磷酸酯释放出游离磷酸盐与钙结合促进骨矿化的形成<sup>[19]</sup>。成骨细胞 AKP 活性检测结果如图 3 所示, 在单一 MC3T3-E1 成骨细胞中, PPP 和 PPP-Ca 组的 AKP 活性分别为 2.07 金氏单位/100 mL 和 2.13 金氏单位/100 mL, 显著高于对照组的 1.89 金氏单位/100 mL, 这表明 PPP 和 PPP-Ca 处理可以促进成骨细胞 AKP 的分泌。一方面, PPP 和 PPP-Ca 中更多的磷酸基团增强了与 MC3T3-E1 细胞的相互作用, 并通过 MC3T3-E1 细胞表面受体介导的方式触发了信号的转化, 刺激成骨细胞分化; 另一方面, 这可能是因为  $\text{Ca}^{2+}$  与 PPP 表面的磷酸基团结合, 并与为 MC3T3-E1 细胞发生相互作用, 为细胞矿化提供了大量的成核位点, 从而加速了 MC3T3-E1 细胞的矿化<sup>[12]</sup>。类似的研究发现, 加入 0.1、0.3、1.0 mg/mL 的卵黄高磷蛋白后, 碱性磷酸酶表达增加<sup>[20]</sup>。在 MC3T3-E1 细胞与 RAW264.7 细胞 (1:1) 的共培养体系中, 对照组的 AKP 活性为 2.06 金氏单位/100 mL, 经过 PPP 和 PPP-Ca 处理的 AKP 活性上升到 2.39 金氏单位/100 mL 和 2.79 金氏单位/100 mL。MC3T3-E1 细胞与 RAW264.7 细胞 (2:1) 的共培养体系中, AKP 活性表现出相同的趋势。这说明, PPP 和 PPP-Ca 可能通过增加 AKP 的活性, 进而诱导共培育体系中 MC3T3-E1 细胞分化, 并有利于后期的矿化。单一 MC3T3-E1 细胞和 MC3T3-E1 细胞与 RAW264.7 细胞

共培养体系之间的 AKP 活性没有太大差异, 表明在成骨细胞早期分化过程中, 破骨前体细胞对成骨细胞并无显著性的影响。

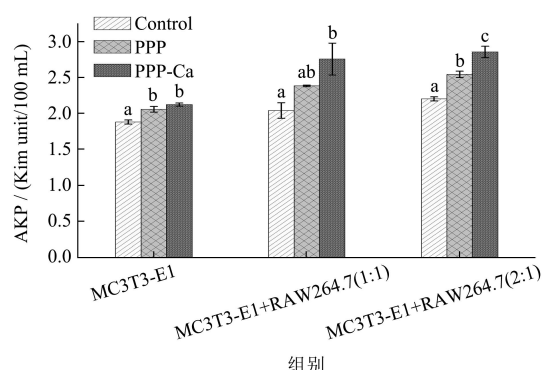


图3 PPP 和 PPP-Ca 对 MC3T3-E1 细胞和 RAW264.7 细胞共培养体系中 AKP 活性的影响

Fig.3 Effect of PPP and PPP-Ca on AKP activity in MC3T3-E1 cells and RAW264.7 cells co-culture system

### 2.4 TRAP 活力测定

破骨前体细胞 RAW264.7 细胞在形成破骨细胞后会分泌 TRAP 酶, 因此, 可用 TRAP 酶活表示破骨细胞活性<sup>[21]</sup>。图 4 表明无论是在单一 RAW264.7 细胞中, 还是 MC3T3-E1 细胞和 RAW264.7 细胞的共培养体系中, 样品处理组的 TRAP 酶活力显著低于对照组, 表明 PPP 和 PPP-Ca, 均可显著降低 TRAP 的活性。有研究表明, PV 同样可以抑制 RAW264.7 的分化, 从而使 TRAP 酶活降低<sup>[13]</sup>。

在单一 RAW264.7 细胞组中, 空白组中对照的 TRAP 活性为 5.78 U/L, 添加 PPP 和 PPP-Ca 的细胞 TRAP 活性下降为 3.01 U/L 和 3.32 U/L, 分别降低了 48% 和 43%。在人体骨重建过程中, MC3T3-E1 细胞能分泌破骨细胞因子<sup>[6]</sup>, 从而影响破骨细胞的生理活性。结果显示, 在 MC3T3-E1 细胞与 RAW264.7 细胞 (1:1) 的共培养体系中, 对照组的 TRAP 值为 4.26 U/L, 低于单一 RAW264.7 细胞的对照组 TRAP 活性, 表明共培育体系中的 MC3T3-E1 细胞会对 RAW264.7 细胞分泌 TRAP 产生影响, 添加了 PPP 和 PPP-Ca 的共培育组, TRAP 值进一步减低到 2.69 U/L 和 2.46 U/L。MC3T3-E1 细胞与 RAW264.7 细胞 (2:1) 的共培养体系中, PPP 和 PPP-Ca 的加入, 使 TRAP 活性从 5.08 U/L 降低至 1.72 U/L 和 1.60 U/L, 降幅达到 66% 和 69%, 比 1:1 体系的降幅更大。类似研究发现, 在 MC3T3-E1 与 RAW264.7 的共培养条件下, 添加不同浓度的牛乳蛋白 (20、100、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 后, 共培养体系中的 TRAP 活性呈现先上升后下降的变化, 20、100、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 TRAP 活性分别为对照组的 187.8%、168.9% 与 25.6%<sup>[22]</sup>。



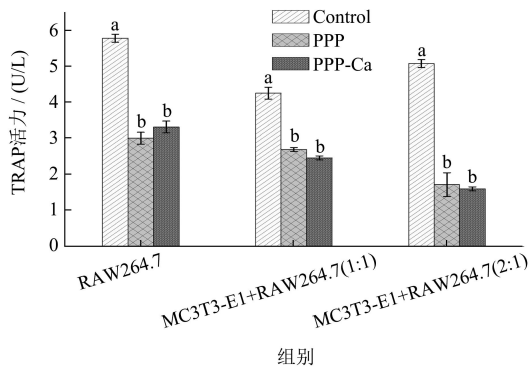


图4 PPP和PPP-Ca对MC3T3-E1细胞和RAW264.7细胞共培养体系中TRAP活性的影响

Fig.4 Effect of PPP and PPP-Ca on TRAP activity in MC3T3-E1 cells and RAW264.7 cells Co-culture system

### 2.5 PPP和PPP-Ca对共培养体系中MC3T3-E1细胞的OPG和RANKL基因mRNA表达的影响

通过RT-PCR技术检测在MC3T3-E1和RAW264.7细胞的共培养体系中成骨细胞骨保护素(OPG)、核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL)基因mRNA表达量<sup>[23]</sup>。图5a中可看出共培养7d后,单一MC3T3-E1细胞组中,PPP和PPP-Ca组的OPG mRNA表达量分别为1.25和1.39,高于对照组0.92,表明PPP和PPP-Ca能促进OPG基因的表达。同样如图5b所示,在单一

MC3T3-E1培养体系中,PPP和PPP-Ca组的RANKL基因表达量为1.23和1.45,高于对照组1.00。在共培养体系中,OPG的表达量显著低于单一MC3T3-E1细胞体系中的,说明RAW264.7能抑制MC3T3-E1细胞OPG mRNA的表达。这是因为在共培养体系中,受到RAW264.7破骨前体细胞的刺激,成骨细胞分泌RANKL,并通过与破骨前体细胞RAW264.7表面受体RANK结合,刺激破骨细胞的分化,从而影响成骨细胞的增殖。因此,在共培养体系中OPG表达量比单一成骨细胞中低。但相较于共培养的空白对照组,PPP和PPP-Ca仍提高了共培养体系的OPG和RANKL mRNA的表达量,这表明PPP和PPP-Ca在单一体系和共培养体系中均能促进OPG和RANKL的表达。

OPG能抑制破骨细胞的形成和分化,诱导破骨细胞凋亡<sup>[24]</sup>。OPG和RANKL基因mRNA的表达水平能反应出对破骨细胞的调控情况,OPG/RANKL比值高,抑制破骨细胞分化;OPG/RANKL比值低,促进破骨细胞分化<sup>[25]</sup>。此外,共培养体系中,空白组、PPP和PPP-Ca处理下OPG与RANKL的比值为0.09、0.16、0.18,呈现上升的趋势,表明PPP和PPP-Ca处理能够增强对破骨细胞分化的抑制作用。介怡琳的研究表明,卵黄高磷蛋白能通过上调OPG/RANKL的比例从而对RANKL和OPG的表达产生积极影响<sup>[17]</sup>。Li等<sup>[26]</sup>也发现松果菊苷可以通过上调OPG/RANKL的比值来促进成骨细胞的增殖和分化。

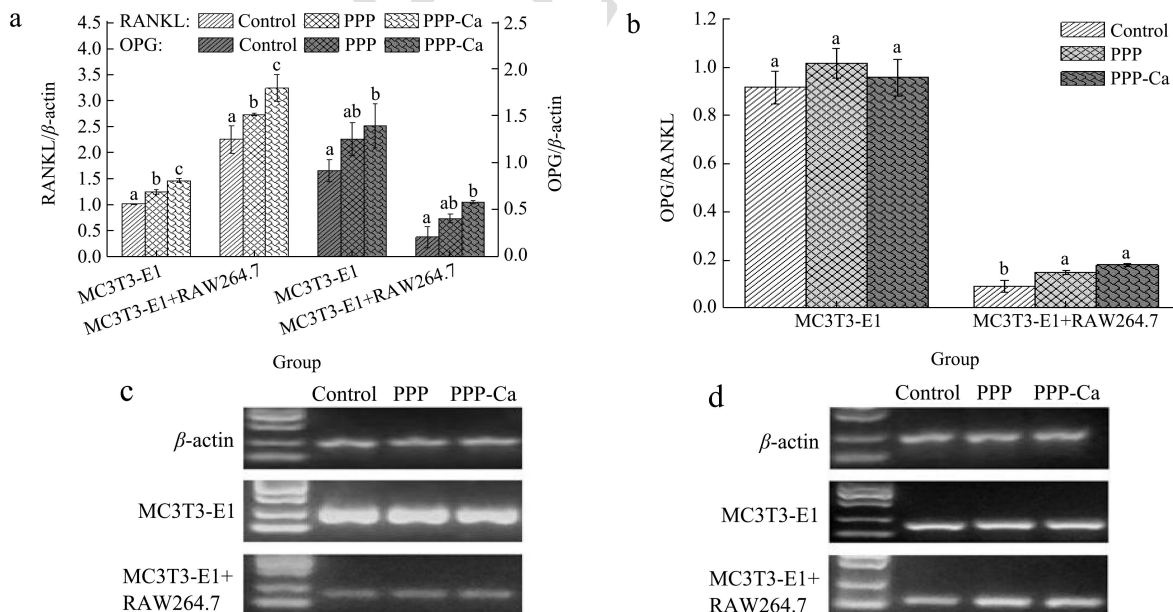


图5 a: PPP和PPP-Ca对MC3T3-E1细胞和RAW264.7细胞共培养体系中成骨细胞中OPG和RANKL mRNA的表达量的影响; b: OPG与RANKL的比值; c: OPG mRNA的电泳图; d: RANKL mRNA的电泳图

Fig.5 a: Effects of PPP and PPP-Ca on the expression of OPG and RANKL mRNA in osteoblast in co-culture system of MC3T3-E1 cells and RAW264.7 cells; b: OPG to RANKL ratio; c: Run plastic figure of OPG mRNA; d: Run plastic figure of RANKL mRNA

### 3 结论

PPP 和 PPP-Ca 可以显著提高单一 MC3T3-E1 体系中的 AKP 活性; 显著降低单一 RAW264.7 体系中的 TRAP 活性。无论是在单一体系还是共培育体系中, PPP 及其钙处理后, 成骨细胞 OPG、RANKL mRNA 的表达量明显提高, 表明磷酸肽及其钙螯合物能促进成骨细胞的分化, 抑制破骨细胞的活性。该研究为进一步探索磷酸肽在多细胞模型体系中的作用提供了研究基础, 同时为磷酸肽的功能活性开发提供理论依据。后期将进一步研究 PPP 和 PPP-Ca 在小肠上皮细胞、成骨细胞和破骨细胞等三细胞体系中的对细胞生理活性的影响, 明确其作用机制。

### 参考文献

- [1] Rahnavard Z, Zolfaghari M, Hossein-Nezad A, et al. The incidence of osteoporotic hip fracture: Iranian multicenter osteoporosis study (IMOS) [J]. Research Journal of Biological Sciences, 2009, 4(2): 171-173
- [2] 邓昶,周明旺,付志斌,等.骨质疏松症的中医病因病机及其治疗进展[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(8):1105-1111
- [3] Boyce B F, Rosenberg E, De Papp A E, et al. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease [J]. European Journal of Clinical Investigation, 2012, 42(12): 1332-1341
- [4] Stein G S, Lian J B J E R. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype [J]. Endocrine Reviews, 1993, 14(4): 424-442
- [5] Canalis E, Economides A N, Gazzerro E J E R. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton [J]. Endocrine Reviews, 2003, 24(2): 218-235
- [6] 边竟,龚泰芳,陈文,等.可吸收生物玻璃注射体在骨质疏松大鼠椎体内的支撑及诱导成骨机制[J].中国组织工程研究, 2016,20(16):2310-2316
- [7] Indran I R, Liang R L Z, Min T E, et al. Preclinical studies and clinical evaluation of compounds from the genus *Epimedium* for osteoporosis and bone health [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2016, 162: 188-205
- [8] Samaraweera H, Zhang W G, Lee E J, et al. Egg yolk phosvitin and functional phosphopeptides [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(7): R143-R150
- [9] Zhong Q, Li X, Hu W, et al. Phosvitin phosphopeptide preparation using immobilised trypsin and enhancing calcium absorption in growing rats [J]. Czech Journal of Food Sciences, 2016, 34(4): 325-331
- [10] 葛城,张浩,黄缘,等.高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中酪蛋白磷酸肽的含量[J].食品安全质量检测学报,2021,12(2): 832-838
- [11] Katayama S, Xu X, Fan M Z, et al. Antioxidative stress activity of oligophosphopeptides derived from hen egg yolk phosvitin in Caco-2 cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 773-778
- [12] Jie Y, Li X, Cai Z, et al. Phosphorylation of phosvitin plays a crucial effects on the protein-induced differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 1848-1854
- [13] 介怡琳,李晓云,纪胜男,等.鸡蛋中卵黄高磷蛋白对 RAW264.7 细胞生长及分化的影响[J].中国食品学报,2020, 20(8):29-40
- [14] Samaraweera H, Moon S H, Lee E J, et al. Characterisation of phosvitin phosphopeptides using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2014, 165: 98-103
- [15] 赵梦蝶.卵黄高磷蛋白磷酸肽钙复合物的制备及其促钙吸收机制研究[D].武汉:华中农业大学,2021
- [16] Huang X, Moon S H, Lee J, et al. Effective preparation method of phosphopeptides from phosvitin and the analysis of peptide profiles using tandem mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(51): 14086-14101
- [17] 介怡琳.卵黄高磷蛋白调控骨矿化的功能研究[D].武汉:华中农业大学,2017
- [18] 杨兴,金照凤,张均涛,等.氟砷联合染毒对成骨与破骨细胞共培养体系中 TRAF-6/NF- $\kappa$ B1/NFATc1/TRAP mRNA 表达的影响[J].环境与职业医学,2019,36(1):26-32
- [19] 徐凌.成骨生长肽对成骨细胞和骨髓基质细胞增殖分化影响的研究[D].成都:四川大学,2006
- [20] Chakrabarti S, Ren J, Wu J J N. Phosvitin derived phospho-peptides show better osteogenic potential than intact phosvitin in MC3T3-E1 osteoblastic cells [J]. Nutrients, 2020, 12(10): 2998
- [21] Hayman A R J A. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy [J]. Autoimmunity, 2008, 41(3): 218-223
- [22] 刘猛,樊凤娇,石璞洁,等.不同浓度牛乳铁蛋白对成骨细胞与破骨细胞共培养的影响[J].食品研究与开发,2017,38(24):1-6
- [23] 赵志虎,李风波,马信龙,等.柚皮苷对共培养体系中成骨细胞活性及破骨细胞分化的影响[J].中华老年骨科与康复电子杂志,2015,1(2):13-18
- [24] Zhao M, Li S, Ahn D U, et al. Phosvitin phosphopeptides produced by pressurized hea-trypsin hydrolysis promote the differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells via the OPG/RANKL signaling pathways [J]. Poultry Science, 2021, 100(2): 527-536
- [25] 马宇辉.8-PN 对骨吸收功能影响的体外研究[D].南昌:南昌大学,2011
- [26] LI F, YANG Y, ZHU P, et al. Echinacoside promotes bone regeneration by increasing OPG/RANKL ratio in MC3T3-E1 cells [J]. Fitoterapia, 2012, 83(8): 1443-1450