

儿童配方奶粉对 Caco-2 细胞钙转运及对成骨细胞增殖、矿化的影响

何泽琪¹, 林倩如¹, 黄文¹, 刘果^{1,2}, 贺丽苹¹, 苗建银¹, 曹庸^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642) (2. 华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642)

摘要: 为评价某市售儿童成长配方奶粉的补钙和促进骨骼生长能力, 以常见市售纯牛奶 A 作为对照, 运用人结肠腺癌细胞 (Caco-2) 单层模型, 研究其对钙离子转运的作用; 运用成骨细胞 (MC3T3-E1) 矿化模型, 研究其对成骨细胞增殖与矿化的影响。Caco-2 细胞模型结果表明, 各剂量组儿童配方奶粉组的钙转运量均高于市售纯牛奶 A, 但相较空白组无显著性差异 ($p < 0.05$)。成骨细胞增殖实验结果表明, 5~50 $\mu\text{g/mL}$ 的儿童配方奶粉对成骨细胞均有促进增殖作用, 增殖速度均在 30% 以上; 并测定细胞碱性磷酸酶活性, 当儿童配方奶粉质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 酶活达 7.79 U/g 蛋白, 相较空白组显著提高 ($p < 0.01$), 较市售纯牛奶 A 的效果更稳定。成骨细胞矿化结果表明, 5~50 $\mu\text{g/mL}$ 儿童配方奶粉能显著促进成骨细胞产生矿化结晶, 50 $\mu\text{g/mL}$ 时茜素红吸光值均为 0.180, 对比空白组提高 50% 以上, 较市售纯牛奶 A 矿化程度更稳定。综上实验结果, 儿童配方奶粉虽对钙在小肠上皮的转运吸收无明显促进作用, 但很可能通过促进骨生长而对儿童生长发育起作用。

关键词: Caco-2 细胞; 钙转运; MC3T3-E1 成骨细胞; 矿化

文章编号: 1673-9078(2022)10-56-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.0014

Effects of A Powdered Toddler Formula on Calcium Transport in Caco-2 Cells and Osteoblast Proliferation and Mineralization

HE Zeqi¹, LIN Qianru¹, HUANG Wen¹, LIU Guo^{1,2}, HE Liping¹, MIAO Jianyin¹, CAO Yong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangdong Natural Active Object Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China) (2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A commercial available children's growth formula was compared with regular commercially available pure dairy milk (control milk A) in terms of their abilities to promote bone growth. Additionally, its effect on calcium transport was evaluated using a human colon adenocarcinoma cell (Caco-2) monolayer model, and its effects on osteoblast proliferation and mineralization was examined with MC3T3-E1 cells. With regard to the promotion of calcium transport, the Caco-2 cell monolayer model showed that commercially available children's growth formula outperformed control milk A at the various doses tested, but its effect did not differ significantly from that of the blank group ($p < 0.05$). The osteoblast proliferation assay showed that 5~50 $\mu\text{g/mL}$ of commercially available children's growth formula could promote the proliferation of osteoblasts, with a proliferation rate of more than 30%. Moreover, in osteoblasts treated with 50 $\mu\text{g/mL}$ of commercially available children's growth formula, the alkaline phosphatase activity was 7.79 U/g of protein, which was significantly higher than that in the blank group ($p < 0.01$).

引文格式:

何泽琪, 林倩如, 黄文, 等. 儿童配方奶粉对 Caco-2 细胞钙转运及对成骨细胞增殖、矿化的影响[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 56-61

HE Zeqi, LIN Qianru, HUANG Wen, et al. Effects of a powdered toddler formula on calcium transport in caco-2 cells and osteoblast proliferation and mineralization [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(10): 56-61

收稿日期: 2022-01-06

基金项目: 广东省自然科学基金-面上项目 (2020A1515010371)

作者简介: 何泽琪 (1996-), 女, 博士, 研究方向: 天然活性物分离纯化, 活性评价及作用机制, E-mail: 2190863578@qq.com; 共同第一作者: 林倩如 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 天然活性物分离纯化, 活性评价及作用机制, E-mail: lingqr@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物的分离纯化鉴定及活性, E-mail: caoyong2181@scau.cn

Commercially available children's growth formula also exhibited a more stable effect than control milk A in enhancing the alkaline phosphatase activity. The osteoblast mineralization assay revealed that 5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of commercially available children's growth formula could significantly promote the formation of mineralized nodules in the cells. In the osteoblasts treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of commercially available children's growth formula, the Alizarin Red absorbance value (0.180) was 50% higher than that of the blank group, and the degree of mineralization was more stable than that in the osteoblasts treated with control milk A. Collectively, our experimental results demonstrate that although commercially available children's growth formula has no significant effect in promoting calcium transport and uptake in the small intestinal epithelium, it may participate in the growth and development of children by promoting bone growth.

Key words: Caco-2 cells; calcium transport; MC3T3-E1 osteoblasts; mineralization

钙是人体中最丰富的矿物质, 在骨骼形成、肌肉收缩、心脏功能、神经和大脑思维活动中起重要作用^[1]。世界上多数国家都存在儿童低钙摄入问题, 由于膳食结构、食品来源、多谷物饮食习惯等的影响, 目前我国儿童的膳食钙摄入量对于其生长发育和获得最佳峰值骨量是不够的^[2]。研究早已证明儿童低钙期摄入可导致低骨量和骨生长迟缓, 严重的可导致缺钙性佝偻病^[3]。再加上我国儿童蔬菜摄入比例高, 植酸及纤维素摄入量高, 使得儿童钙吸收利用变得更加困难^[2]。同时, 国外大量研究均表明, 补充钙剂可促进骨矿沉积, 并在受到胞外基质的刺激和成骨生长因子的作用后, 可以加速分化进程、不断产生和分泌胞外基质蛋白, 释放碱性磷酸酶等, 加速矿物沉积, 产生新骨^[4]。而在年幼时最大限度地增加骨量, 可以使骨矿含量显著提高, 还可以有效减少由于年龄增加所引发得骨量丢失^[5]。

奶粉作为婴幼儿的主要摄入食品之一, 提供给婴幼儿日常所需营养, 对婴幼儿个体发育至关重要。奶粉中含有多种蛋白, 对婴幼儿骨骼发育影响显著。Caco-2 细胞系自发分化表现出人类小肠上皮细胞的典型结构和功能特征^[6], Caco-2 小肠上皮细胞模型被广泛应用模拟食品、药物吸收研究。成骨细胞是骨组织中形成新骨的功能细胞, 受到刺激或生长因子作用后, 可加速分化进程, 产生新骨, 还可以通过产生骨保护素, 促进骨形成^[4,7]。目前, 利用 Caco-2 和成骨细胞模型评价成品配方奶粉促钙转运及对骨骼健康的研究较少。故本研究拟利用 Caco-2 小肠上皮细胞和 MC3T3-E1 成骨细胞两种模型, 系统评价某种市售儿童配方奶粉促进钙吸收的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 主要实验试剂

Caco-2 细胞购自中国科学院上海生物科学研究所细胞资源中心; MC3T3-E1 成骨细胞购自中国科学院

上海生物科学研究所细胞资源中心; 胎牛血清、MEM 培养基、MEM- α 培养基、青霉素、链霉素、0.25% 体积分数胰蛋白酶、Glutamax、非必需氨基酸、丙酮酸钠, 均购自 Gibco 公司, 盐酸、硝酸等其他试剂均为分析纯。

1.1.2 主要实验材料

某品牌儿童成长配方奶粉 (ZHG), 主要配料: 全脂奶粉、脱盐乳清粉、脱脂奶粉等; 市售纯牛奶 A, 主要配料: 生牛乳。以上两种产品均购自当地市场。

1.1.3 主要仪器与设备

超净工作台、二氧化碳培养箱, Esco; 喷雾干燥, 无锡市现代喷雾干燥设备有限公司; 酶标仪, Enspire; Millicell ERS-2 细胞电阻仪; Wahli 火焰原子吸收光谱仪。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

实验选择国内市场最广泛销售的乳业品牌, 并选取其中最畅销的产品市售纯牛奶 A 作为对照。为确保细胞实验上样量一致, 对市售纯牛奶 A 进行喷雾干燥处理, 喷雾干燥条件为进风温度 180 $^{\circ}\text{C}$, 出风温度 90 $^{\circ}\text{C}$, 雾化器 40 Hz, 恒流泵 50 r/min。市售纯牛奶 A 粉剂保藏于 4 $^{\circ}\text{C}$, 直至开展实验。

1.2.2 钙转运实验

1.2.2.1 Caco-2 单层细胞模型的建立

选择 30~60 代的 Caco-2 细胞建立小肠上皮单层细胞模型。根据中科院细胞库推荐配方, 细胞完全培养基配方为 77% MEM, 20% 胎牛血清, 1% 双抗, 1% Glutamax, 1% 非必需氨基酸和 1% 丙酮酸钠 (比例均为体积分数), 培养环境为 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% 的 CO_2 浓度。待细胞长至 80% 时, 以每毫升 2×10^5 个的密度, 将细胞接种至 12 孔 transwell 转运板上层的小室中, 上层培养基体积为 0.5 mL, 并在下层补充 1.5 mL 完全培养基。培养 21 d, 每 2 d 换液直至细胞形成完整的膜。通过跨膜电阻的检测来确定细胞单层的完整性, 当电阻超过 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 时, 将单层膜用于转运实验。

1.2.2.2 钙转运测定

采用本实验室前期已报道的方法^[8]进行钙转运量的测定,并根据具体实验情况稍作修改。Caco-2 细胞培养 21 d 后弃去培养基,单层细胞立即用 37 °C 的 HBSS (不含钙和镁)清洗两次,然后转移至新的 12 孔板中,与 HBSS 在培养箱中共孵育 30 min。将不同浓度预先混合好的样品加至 transwell 小室上层,儿童配方奶粉加钙螯合物(每孔分别加 50、100、150 μg 样品与 150 μg 钙混合)、纯牛奶 A 粉剂加钙螯合物(每孔 100 μg 样品与 150 μg 钙混合)、CaCl₂ (每孔 150 μg)。在不同的时间点(60、90、120 min),从下层小室收集 0.5 mL HBSS 缓冲液以测量钙离子浓度,同时补充 0.5 mL 新鲜的 HBSS 缓冲液以保持恒定体积。每个时间点的钙浓度使用火焰原子吸收检测。每个孔的钙含量按以下公式计算:

$$B_n = 1.5 * A_n + 0.5 * \sum A_k \quad (1)$$

式中:

B_n ——在各时间点(60、90、120 min)每孔下层 1.5 mL HBSS 缓冲液中钙含量, μg/孔;

1.5——一个常数,代表基底外侧的 1.5 mL HBSS 缓冲液每个孔;

A_n ——在不同时间点在每个孔下层 HBSS 的钙离子浓度,原子吸收测定, μg/mL;

0.5——一个常数,代表从基底外侧收集的 0.5 mL HBSS 缓冲液;

n ——自变量,对于本研究,它可以是 1、2、3,分别代表时间点 60、90 和 120 min。

火焰原子吸收光谱法测定钙离子含量的具体流程同《GB 5009.92-2016 食品安全国家标准食品中钙的测定》中的火焰原子吸收光谱法,选用王水消解法消解样品,王水与样品体积比为 1:1。

1.2.3 成骨细胞实验

购买成骨细胞后,按细胞培养指引对细胞进行复苏、培养、传代。培养基配方为 85% α-MEM 培养基,10%胎牛血清,1%双抗(比例均为体积分数)。考察样品对成骨细胞毒性,筛选适合浓度,进一步考察其对成骨细胞增殖、碱性磷酸酶分泌及矿化的影响。

1.2.3.1 细胞毒性

取第 3 代对数生长期的 MC3T3-E1 细胞,以每毫升 5×10^4 个的密度接种于 96 孔板,每组 6 复孔,每孔 100 μL 完全培养液。待细胞完全贴壁后,去除培养基,分别加入 100 μL 含有 5、10、50、100、200、500 μg/mL 样品的完全培养基;在培养 24 h 后每孔加入 100 μL MTT (0.5 mg/mL),37 °C 避光孵育 4 h,孵育完成后

终止培养,小心吸去上清培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 5 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光光度值。

1.2.3.2 细胞增殖

取第 3 代对数生长期的 MC3T3-E1 细胞,以每毫升 3×10^4 个的密度接种于 96 孔板,每组 6 复孔,每孔 100 μL 完全培养液。待细胞完全贴壁后,去除培养基,分别加入 100 μL 含有 5、10、50 μg/mL 样品的完全培养基;在培养 72 h 后每孔加入 20 μL MTT(0.5 mg/mL),37 °C 避光孵育 4 h,孵育完成后终止培养,小心吸去上清培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 5 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光光度值。

1.2.3.3 碱性磷酸酶含量测定

取对数生长期的 MC3T3-E1 细胞,以每毫升 2×10^6 个的密度接种于 6 孔板,每组 4 复孔,每孔 2 mL 完全培养液。第二天小心除去培养基,分别加入 2 mL 含有 5、10、50 μg/mL 样品的诱导培养基;隔天换液。第 7 天,小心除去培养基,并用 4 °C 预冷的 PBS 清洗细胞 3 次,用细胞刮刀收集细胞后,使用超声破碎仪裂解细胞(功率 300 W,冰水浴,每 3~5 s 超声 1 次,间隔 4 次,间隔时间 30 s)。BCA 法测定蛋白含量,试剂盒定量,后使用碱性磷酸酶试剂盒测定碱性磷酸酶含量。

1.2.3.4 成骨细胞矿化实验

取生长状态良好的 MC3T3-E1 细胞,用体积分数 0.25%胰酶及体积分数 0.02% EDTA 消化,制成密度为每毫升 1×10^6 个的细胞悬液,接种于 6 孔细胞培养板,每孔接种完全培养基 2 mL,第二天小心除去培养基,分别加入 2 mL 含有 5、10、50 μg/mL 样品的诱导培养基,隔天换液。21 d 后进行茜素红染色。除去培养基,以 4 °C 预冷的 PBS 缓冲液小心漂洗 2 次;注意不要把矿化结节吸掉。预冷的体积分数 4%多聚甲醛室温条件下固定 15 min,去离子水充分冲洗;体积分数 1%茜素红染液室温染色 15 min,使用蒸馏水去染液,并用蒸馏水反复冲洗,直至洗液透明。风干后在倒置显微镜下观察钙结节形成情况并拍照。最后,分别添加 1 mL 100 mmol/L 西吡氯铵溶液,室温放置 1 h,使与钙结合的茜素红充分溶解,用酶标仪测 570 nm 处溶液的吸光值,对矿化结晶进行定量。

1.3 数据统计分析

所有试验均重复 3 次,使用 SPSS 23.0 软件和 Prism 8.4.0 进行数据统计和显著性分析,数据表示为

平均值±标准差 (SD), $p < 0.05$ 被认为具有显著差异。并使用 Prism 8.4.0 及 Origin 2018 制作图表。

2 结果与分析

2.1 钙转运实验

Caco-2 单层模型被广泛运用于模拟物质吸收。将不同浓度的奶粉与钙混合物添加到 transwell 小室上层, 并测定下层中钙的含量, 将 150 $\mu\text{g/mL}$ 的 CaCl_2 (与样品组含钙量相同) 作为对照。Caco-2 单层细胞模型的钙转运实验结果如图 1 所示。由图 1 可知, 随着转运时间的延长, CaCl_2 组和样品组的钙转运含量均有增加。转运 60 min 时, 儿童配方奶粉低剂量样品组 (50 $\mu\text{g/mL}$) 效果最佳, 下层接收液钙离子浓度为 1.09 $\mu\text{g/well}$, 而中剂量组和高剂量组转运的钙离子浓度依次下降, 分别为每孔 0.93 μg 和每孔 0.83 μg 。所有剂量儿童配方奶粉的钙转运量均大于纯牛奶 A 粉剂的钙离子转运浓度 0.82 $\mu\text{g/well}$, 说明 60 min 时儿童配方奶粉的钙离子转运能力优于纯牛奶 A 粉剂, 但各样品钙转运量与空白对照组钙含量 0.89 $\mu\text{g/well}$ 相比, 均无显著性差异 ($p > 0.05$)。转运 90 min 时, 儿童配方奶粉中剂量样品组 (100 $\mu\text{g/mL}$) 钙转运效果最佳, 下层接收液钙离子浓度为每孔 1.38 μg , 其次为高剂量组的每孔 1.36 μg 和低剂量组的每孔 1.32 μg 。同样, 90 min 时儿童配方奶粉各剂量组的钙离子转运能力优于纯牛奶 A 粉剂 (每孔 1.27 μg), 但与空白对照组相比均无显著性差异 ($p > 0.05$)。转运 120 min 时, 下层接收液钙离子含量从高到低分别为儿童配方奶粉中剂量样品组每孔 1.46 μg , 低剂量样品组每孔 1.46 μg , 高剂量样品组和纯牛奶 A 粉剂每孔 1.39 μg , 所有样品组钙离子转运含量与空白对照组 (每孔 1.30 μg) 相比依旧无显著性差异 ($p > 0.05$)。

根据 Caco-2 钙离子转运实验结果, 儿童配方奶粉钙离子转运能力优于纯牛奶 A 粉剂, 但转运 60~120 min 间与同时空白对照组相比, 各剂量下层接收液钙离子含量没有显著性差异。对比其他牛乳促钙吸收物质, 相同钙离子添加剂量和转运时间下, 文献中牛乳酪蛋白促钙吸收肽转运时间为 120 min 时, 下层钙离子浓度为每孔 30~50 μg , 较空白对照 (<10 μg 每孔) 显著提高^[8]。综上所述, 儿童配方奶粉不具有促进钙离子转运的能力。牛乳中的多肽常被发现具有促进钙转运的活性^[9,10]。这可能是由于牛乳多肽, 促钙吸收肽通过与钙通道 TRPV6 的相互作用调节 Caco-2 细胞中的钙摄取^[11], 也可能由于促钙吸收肽刺激细胞

因子 IL-6 的分泌^[11], 也可能是由于样品中促进钙离子转运的有效成分含量差异。

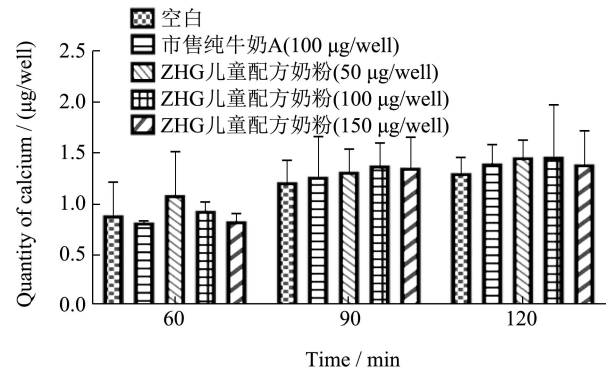


图1 儿童配方奶粉与市售纯牛奶A对各时间段Caco-2细胞钙离子转运量的影响

Fig.1 Effect of children's formula and commercially available pure milk A on calcium ion transport in Caco-2 cells at various time

注: 与 60 min 的样品相比, $*p < 0.05$ 。

2.2 成骨细胞毒性实验

MTT 比色法是一种检测细胞存活和生长的方法, 其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臜 (Formazan) 并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。二甲亚砜 (DMSO) 能溶解细胞中的甲臜, 用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞数量。在不同浓度的奶粉作用下, 成骨细胞的 MTT 毒性实验结果如图 2 所示, 儿童配方奶粉的加样量为 5、10、50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 与对照组比较, 成骨细胞的存活率达到 102.00%~107.64%, 生长状态良好, 对细胞无毒害作用。故选择 5、10、50 $\mu\text{g/mL}$ 作为后续实验样品的低、中、高浓度添加量。

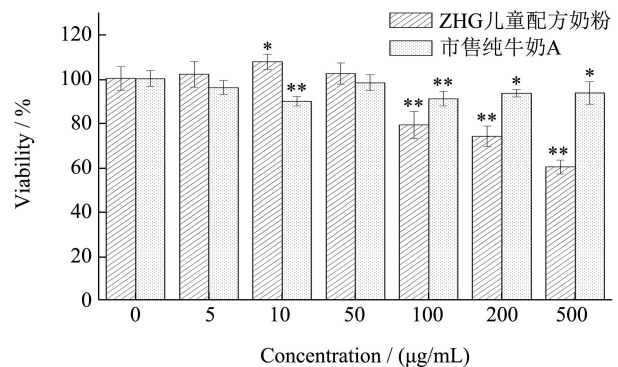


图2 儿童配方奶粉和市售纯牛奶A对成骨细胞的毒性作用
Fig.2 Toxic effects of children's formula and commercially available pure milk A on osteoblasts

注: 与 Control 组相比, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。图 4、6 同。

2.3 样品对成骨细胞增殖的影响

细胞增殖也使用 MTT 法。在不同质量浓度的儿童配方奶粉和市售纯牛奶 A 作用下,成骨细胞的 MTT 实验结果如图 3 所示,在 5、10、50 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,儿童配方奶粉和市售纯牛奶 A 对成骨细胞都有促进增殖作用,其中儿童配方奶粉组的增殖速度均在 25%以上,且在低浓度时已到达最高值,为 31.16%;而市售纯牛奶 A 组的增殖速度为 10%~15%。相同浓度下,儿童配方奶粉促进成骨细胞增殖速度是市售纯牛奶 A 的 1.70~3.00 倍,说明儿童配方奶粉在促进成骨细胞增殖上优于市售纯牛奶 A。

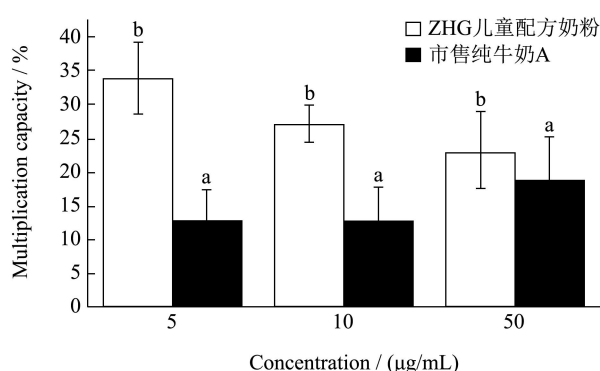


图3 儿童配方奶粉和市售纯牛奶A对成骨细胞增殖的影响(显著性差异 $p < 0.05$)

Fig.3 Effect of children's formula and commercially available pure milk A on osteoblast proliferation

2.4 样品对成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性的影响

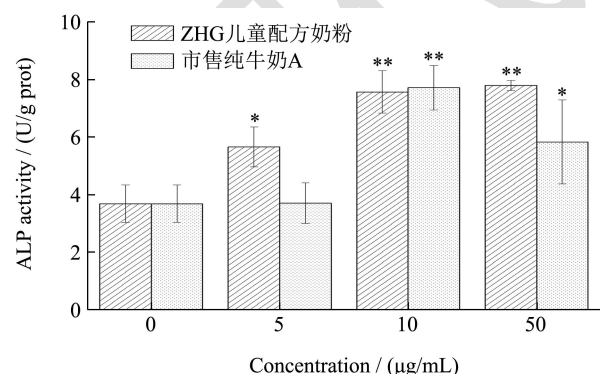


图4 儿童配方奶粉和市售纯牛奶A对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响

Fig.4 Effect of children's formula and commercially available pure milk A on alkaline phosphatase activity in osteoblasts

碱性磷酸酶是成骨细胞胞外基质形成的关键酶,具有磷酸酯酶活性,可以水解天然存在的含磷底物,释放游离磷酸根离子,参与胞外基质的矿化沉积。如

图4所示,在5、10、50 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,儿童配方奶粉能够显著或极显著提高成骨细胞的碱性磷酸酶活性,且呈现浓度依赖,50 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时达到7.79 U/g 蛋白;市售纯牛奶 A 作用质量浓度为,在5 $\mu\text{g/mL}$ 时,对成骨细胞碱性磷酸酶的活性无显著性影响,质量浓度提高至10 $\mu\text{g/mL}$ 时极显著提高酶活性,达到7.71 U/g 蛋白,但在50 $\mu\text{g/mL}$ 时效果降低至5.83 U/g 蛋白。综合实验结果,儿童配方奶粉和市售纯牛奶 A 都对碱性磷酸酶活性有积极影响,且儿童配方奶粉的效果在5~50 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内更加稳定。

2.5 样品对成骨细胞矿化的影响

茜素红染色的原理是茜素红会和钙发生显色反应,产生一种深红色的化合物。诱导后的成骨细胞,其外面沉积的钙结节会被染成深红色。而西吡氯铵能够溶解茜素红显色,利用这一特性对矿化结晶进行定量分析。将培养了21 d后的成骨细胞进行染色,显微镜下观察不同浓度样品培养后的成骨细胞(图5)。发现与对照组比较,儿童配方奶粉和市售纯牛奶 A 作用的成骨细胞有明显的矿化结节产生,形状多呈圆形或椭圆形,少数呈不规则形,而空白对照组结节较少。矿化结节与茜素红染液结合成深红色物质,表明儿童配方奶粉和市售纯牛奶 A 能够促进成骨细胞矿化。进一步利用西吡氯铵对矿化结节进行定量分析,结果如图6所示,添加量为5 $\mu\text{g/mL}$ 时,儿童配方奶粉组、市售纯牛奶 A 组的吸光值均为0.18,表明矿化结节生成量接近。当添加量增大至10 $\mu\text{g/mL}$ 和50 $\mu\text{g/mL}$,市售纯牛奶 A 组的吸光值分别为0.17、0.15,矿化量稍有降低,而儿童配方奶粉组的吸光值均为0.180,促进成骨细胞矿化量随剂量改变无显著变化,相较空白对照组提高50%以上,说明奶粉的作用效果更为稳定。根据实验结果,两种样品在较低浓度下对骨有明显促进作用,但在高浓度下促进作用反而有所下降,与曾祥伟等^[12]的研究结果相一致。

MC3T3-E1 细胞是小鼠颅盖骨细胞的前体细胞,具有成骨细胞形成过程中的生物学特性,包括 ALP 活性和基质成熟及矿化等,已成为体外研究骨质疏松比较有价值的细胞模型^[13]。张伟^[5]也发现牛乳具有促骨生长功能,利用成骨细胞模型证明了乳铁蛋白可以有效促进分化标志物碱性磷酸酶活性以及骨钙素的表达,且能提高骨细胞矿化结节的形成,与本研究结果有类似之处。推测儿童配方奶粉中,可能存在有较高活性的促成骨细胞增殖和矿化的物质,因此具有潜在的增强骨硬度,抗骨质疏松或骨质吸收的效果^[14]。

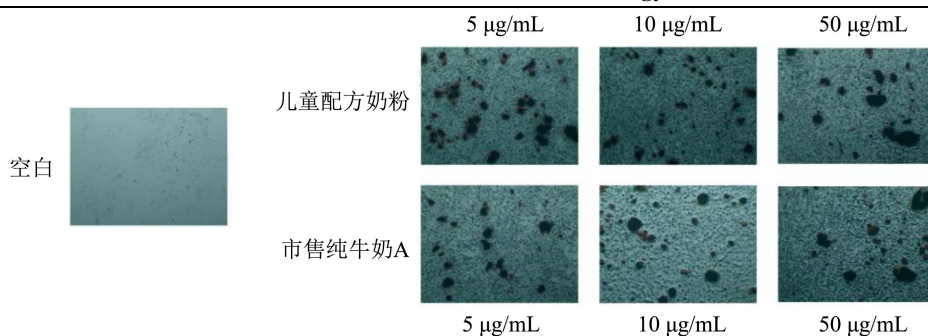


图5 儿童配方奶粉和市售纯牛奶A对成骨细胞矿化结晶的影响(400×)

Fig.5 Effect of children's formula and commercially available pure milk A on mineralized crystals in osteoblasts (400×)

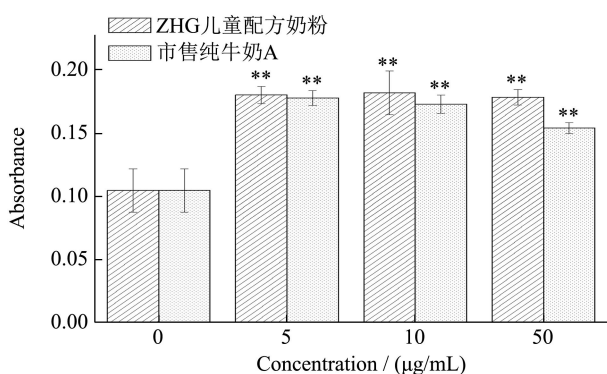


图6 儿童配方奶粉和市售纯牛奶A对成骨细胞矿化的影响

Fig.6 Effect of children's formula and commercially available pure milk A on osteoblast mineralization

3 结论

实验以市售儿童配方奶粉为样品,评价其促进钙离子转运能力及对骨骼健康的作用。发现在体外细胞实验中,儿童配方奶粉虽不能够明显促进钙离子转运,但对成骨细胞增殖和矿化均有正向调节作用,说明其具有潜在的调节儿童骨骼健康作用。

参考文献

[1] 刘玉玉,胡筱波,蔡晓雯,等.白鲢鱼皮胶原蛋白肽钙螯合物的制备及其对Caco-2细胞钙转运的影响[J].食品科技,2020,45(8):138-145

[2] 张放,樊平.儿童生长发育的重要营养-锌与钙研究进展[J].河北医药,2005,6:461-462

[3] 刘成林.儿童补钙研究的进展[C]//第九届全国骨质疏松年会暨第六届全国钙剂年会.中国四川成都,中国骨质疏松杂志,2003:5

[4] Datta H K, Ng W F, Walker J A, et al. The cell biology of bone metabolism [J]. Journal of Clinical Pathology, 2008, 61(5): 577-587

[5] 张伟.牛源乳铁蛋白促进成骨细胞分化的信号转导机制[D].中国农业大学,2014

[6] Regazzo D, Molle D, Gabai G, et al. The (193-209) 17-residues peptide of bovine beta-casein is transported through Caco-2 monolayer [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 54(10): 1428-1435

[7] Lian J B, Stein G S. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation [J]. The Iowa Orthopaedic Journal, 1995, 15: 118-140

[8] Cao Y, Miao J, Liu G, et al. Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides enhance calcium and magnesium uptake in Caco-2 cell monolayers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(11): 2307-2314

[9] Wang B, Li B. Charge and hydrophobicity of casein peptides influence transepithelial transport and bioavailability [J]. Food Chem, 2018, 245: 646-652

[10] Sakurai N, Nishio S, Akiyama Y, et al. Apical-to-basolateral transepithelial transport of cow's milk caseins by intestinal Caco-2 cell monolayers: MS-based quantitation of cellularly degraded alpha- and beta-casein fragments [J]. J Biochem, 2018, 164(2): 113-125

[11] Perego S, Zabeo A, Marasco E, et al. Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco2 cells through their interaction with the TRPV6 calcium channel [J]. J Funct Foods, 2013, 5(2): 847-857

[12] 曾祥伟,冯倩,张莹莹,等.葛根素对MC3T3-E1细胞增殖、分化和矿化及TRPM3 mRNA表达的影响[J].中国药理学通报,2017,33(7):977-982

[13] Lee Y S, Choi E M. Costunolide stimulates the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. International Immunopharmacology, 2011, 11(6): 712-718

[14] 唐琪,陈莉丽,严杰.骨碎补提取物促小鼠成骨细胞株MC3T3-E1细胞增殖、分化和钙化作用的研究[J].中国中药杂志,2004,2:73-77