

## 葛根素干预小鼠成骨细胞分化相关特征性蛋白mRNA的表达

袁斯远<sup>1</sup>, 孔蓓蓓<sup>2</sup>, 盛彤<sup>1</sup>, 王新祥<sup>1</sup>, 张允岭<sup>1</sup>, 刘雪梅<sup>1</sup>, 马涛<sup>1</sup>, 郑宏<sup>1</sup>, 闫妍<sup>1</sup>, 刘连起<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北京中医药大学东方医院, 北京市 100078; <sup>2</sup>北京中医药大学基础医学院, 北京市 100029)

### 文章亮点:

- 1 来源于药食同源植物葛根活性成分葛根素对骨质疏松症防治作用进行了多方面的研究, 但关于葛根素在细胞分子水平机制的研究不多。
- 2 实验结果显示葛根素能够通过影响早期碱性磷酸酶、中期骨涎蛋白与骨桥蛋白以及晚期骨钙素 4 种成骨细胞分化相关特征性蛋白 mRNA 表达, 促进成骨细胞的分化, 这可能是葛根素抗骨质疏松的重要细胞分子机制之一。

### 关键词:

组织构建; 骨组织工程; 葛根素; 成骨细胞; 细胞分化; 碱性磷酸酶; 骨涎蛋白; 骨桥蛋白; 骨钙素; 骨质疏松; 体外实验; 国家自然科学基金

### 主题词:

成骨细胞; 碱性磷酸酶; 骨桥蛋白; 骨钙素; 骨质疏松

### 基金资助:

国家自然科学基金资助项目(30873290)

### 摘要

**背景:** 研究证实葛根素对小鼠卵巢以及与睾丸切除所致骨质疏松具有很好的防治作用, 但关于葛根素对成骨细胞分化的影响却少有报道。

**目的:** 观察葛根素对成骨细胞碱性磷酸酶 mRNA、骨涎蛋白 mRNA、骨桥蛋白 mRNA 以及骨钙素 mRNA 表达的影响情况。

**方法:** 体外培养小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 细胞, 随机分为 3 组。空白对照组仅更换培养基; 葛根素组更换为含有葛根素  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 培养基; 雌二醇组更换为含有雌二醇  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 培养基。RT-PCR 法测定 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶、骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨钙素 mRNA 的表达

**结果与结论:** 葛根素和雌二醇能够延长碱性磷酸酶表达时间, 在第 12 天达到高峰; 葛根素和雌二醇在第 10 天和第 12 天能够增加骨涎蛋白 mRNA 的表达。葛根素和雌二醇在第 5 天和第 12 天能够减少骨桥蛋白的表达; 葛根素和雌二醇在第 10 天和第 12 天能够增强骨钙素表达。结果表明葛根素能够通过影响成骨细胞分化相关特征性蛋白 mRNA 表达, 促进成骨细胞的分化, 可能是葛根素抗骨质疏松的重要的细胞分子机制之一。

袁斯远, 孔蓓蓓, 盛彤, 王新祥, 张允岭, 刘雪梅, 马涛, 郑宏, 闫妍, 刘连起. 葛根素干预小鼠成骨细胞分化相关特征性蛋白 mRNA 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(42):6732-6736.

## Puerarin effects on the mRNA expression of osteoblast differentiation-related proteins

Yuan Si-yuan<sup>1</sup>, Kong Bei-bei<sup>2</sup>, Sheng Tong<sup>1</sup>, Wang Xin-xiang<sup>1</sup>, Zhang Yun-ling<sup>1</sup>, Liu Xue-mei<sup>1</sup>, Ma Tao<sup>1</sup>, Zheng Hong<sup>1</sup>, Yan Yan<sup>1</sup>, Liu Lian-qi<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; <sup>2</sup>School of Basic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Experimental studies have showed that puerarin has an obvious protective effect on osteoporosis in ovariectomized and orchietomized mice. But the influence of puerarin in the molecular level in the process of osteoblast differentiation is seldom reported.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of puerarin on the mRNA expression of alkaline phosphatase, bone sialoprotein, osteopontin and osteocalcin in osteoblasts.

**METHODS:** The MC3T3-E1 cells from mice cultured *in vitro* were randomly divided into control group, puerarin group ( $10^{-6}$  mol/L puerarin) and estradiol group ( $10^{-7}$  mol/L estradiol) to observe the effects of puerarin on the differentiation of osteoblasts. mRNA expression of alkaline phosphatase, bone sialoprotein, osteopontin and osteocalcin in MC3T3-E1 cells was determined using RT-PCR method.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Puerarin and estradiol both could prolong the expression of alkaline phosphatase that reached the peak at 12 days. Puerarin and estradiol strengthened the mRNA expression of bone sialoprotein at 10 and 12 days, reduced expression of osteopontin at 5 and 12 days, and increased expression of osteocalcin at 10 and 12 days. These results reveal that puerarin can induce the differentiation of cultured osteoblasts by influencing osteoblast differentiation-related protein mRNA expressions, which may be one of the important molecular mechanisms of puerarin for prevention of osteoporosis.

袁斯远, 男, 1990 年生, 江西省丰城市人, 汉族, 北京中医药大学在读硕士, 主要从事中药药理研究。

通讯作者: 刘连起, 硕士, 副教授, 北京中医药大学基础医学院, 北京市 100029

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.42.002  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)42-06732-05

稿件接受: 2014-09-19

Yuan Si-yuan, Studying for master's degree, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Corresponding author: Liu Lian-qi, Master, Associate professor, School of Basic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Accepted: 2014-09-19

**Subject headings:** osteoblasts; alkaline phosphatase; osteopontin; osteocalcin; osteoporosis

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 30873290

Yuan SY, Kong BB, Sheng T, Wang XX, Zhang YL, Liu XM, Ma T, Zheng H, Yan Y, Liu LQ. Puerarin effects on the mRNA expression of osteoblast differentiation-related proteins. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(42): 6732-6736.

## 0 引言 Introduction

植物性雌激素对成骨细胞的增殖与分化具有重要影响。实验研究表明葛根对卵巢与睾丸切除小鼠所致骨质疏松具有明显防治作用<sup>[1-2]</sup>。葛根素为葛根中所含主要植物性雌激素之一<sup>[3]</sup>, 研究证实葛根素对卵巢以及与睾丸切除小鼠所致骨质疏松亦具有很好的防治作用<sup>[4-10]</sup>, 但关于葛根素对成骨细胞分化的影响却少有报道。原发性骨质疏松症(以下简称骨质疏松症)是与人口老龄化关系最为密切的疾病之一, 是老年人的常见病和多发病, 是以骨量减少、骨组织结构退化为特征、导致骨脆性增高及骨折危险性增加的一种全身性代谢性骨病。2011中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会在《原发性骨质疏松症诊治指南》中指出, 全国2006年在50岁以上人群中约有6 944万人患有骨质疏松症, 约有2亿1千万人存在低骨量<sup>[11]</sup>。随着中国人均寿命的延长和人口结构的改变, 其发病率呈上升趋势。骨质疏松症不仅是我国, 并已成为全球性的一个严重的公共卫生问题, 被称为无声无息的流行病。

世界各国特别是在发达国家由于社会老龄化更为严重, 因此对骨质疏松症预防与治疗措施从科学研究到企业新药开发都进行了大量的投入。药物方面目前用于预防和治疗骨质疏松症的西药种类较多, 钙剂、激素替代疗法、选择性雌激素受体调节剂、降钙素、双膦酸盐等, 另外新研发药物也层出不穷, 如锍盐, 重组人甲状旁腺激素(PTH)药物-特立帕肽等, 这些药物以衡量骨质疏松症诊断与疗效的骨密度作为标准来说, 疗效确切。但随着应用的日益广泛, 逐渐有一些严重的不良反应报道, 如双膦酸盐用药后骨折修复的延迟、下颌骨坏死、非典型骨折发生率增加等, 其安全性也重新引起了人们的关注<sup>[12-14]</sup>; 同时由于存在对患者其他症状或体征不能有效改善, 或生活质量得不到提高等问题, 因此并不能很好满足临床的需要。安全、有效并具多靶点整体调节优势的预防和治疗骨质疏松症的中药或天然药物, 成为当今医药科学研究的热点之一。

非类固醇类、具有弱雌激素样作用称为植物雌激素的植物来源的化合物, 不仅对女性闭经后骨质疏松症具有明显的防治作用, 而且对一些常见的老年病, 如心血管疾病、更年期综合征、和与性激素有关的肿瘤都有一定的防治作用, 而受到人们广泛的关注<sup>[15]</sup>。异黄酮是植物雌激素中最主要的一类化合物, 食品中作为主要植物雌激素来源的大豆异黄酮对骨质疏松症的防治作用已经进行了众多研究<sup>[16-20]</sup>。作为同科植物的葛根比大豆含有更为丰富的异黄酮, 它是一种常用传统中药, 为药、食两用的天然植物。

葛根始载于《神农本草经》谓其主要作用为: “主消渴、身大热、呕吐、诸痹、起阴气、解诸毒。”

作者以前报道了葛根对卵巢与睾丸切除小鼠所致骨质疏松具有显著防治作用<sup>[21-22]</sup>。葛根素为葛根中所含的主要活性成分。近年体外实验表明, 葛根素能促进成骨细胞增殖<sup>[23-29]</sup>; 在成骨细胞分化方面的指标方面, 研究以增加成骨细胞碱性磷酸酶活性研究为多, 未见更多深入研究。本实验以成骨细胞分化为研究对象, 应用葛根素对其进行干预, 并以雌二醇为阳性对照, 观察葛根素对成骨细胞分化相关蛋白mRNA表达(碱性磷酸酶、骨涎蛋白、骨桥蛋白以及骨钙素的mRNA), 探讨葛根素调节骨代谢的细胞分子机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 分组对照观察、细胞学实验。

**时间及地点:** 实验于2011年9月至2013年5月在北京中医药大学东方医院实验中心完成。

**材料:**

**实验细胞:** 小鼠成骨细胞株MC3T3-E1(小鼠颅顶前骨细胞亚克隆14)购自中国科学院细胞库。

葛根素对小鼠成骨细胞分化相关特征性蛋白mRNA表达的影响实验药物与试剂:

药物与试剂	来源
葛根素标准品	中国药品生物制品检定所
胎牛血清	NWL0508 公司
SV Total RNA Isolation System	Promega
RNARever Tra-Plus™ 试剂盒	日本 TOYOBO 公司
DNA Marker C 与 6xLoading Buffer	北京赛百盛生物工程公司

**实验方法:**

**成骨细胞分化实验:**

细胞培养: 将MC3T3-E1细胞接种于75 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 每瓶加入体积分数10%胎牛血清a-MEM培养基10 mL(含1%青霉素及链霉素溶液), 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

实验分组: 待细胞生长密度达70%–80%时进行传代。然后将细胞悬液以每孔1×10<sup>6</sup>个细胞接种于6孔板中, 加入含体积分数10%胎牛血清a-MEM 5 mL, 培养24 h后, 分为空白对照组, 葛根素组与阳性对照药雌二醇组3组, 每组3孔, 除空白对照组仅更换培养基外, 葛根素组与雌二醇组分别更换为含有葛根素1×10<sup>-6</sup> mol/L与雌二醇1×10<sup>-7</sup> mol/L培养基, 3 d更换培养液1次。

**RT-PCR法测定MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶、骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨钙素mRNA的表达:** 在加药后5, 7, 10, 12 d后, 用SV Total RNA Isolation System提取总RNA后, 用紫外分光光度仪测定260 nm和280 nm处的吸光度, 计算总RNA含量和纯度。使用Primer 3.0软件, 计算机辅助所设计小鼠成骨细胞碱性磷酸酶、骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨钙素mRNA及作为参照基因GAPDH引物后, 由北京赛百盛生物工程公司合成, 各个碱基序列见表1。按ReverTra-Plus™试剂盒说明进行基因扩增。PCR反应条件为95 °C, 预变性2 min, 然后98 °C, 10 s; 52 °C, 30 s; 68 °C, 40 s, 30个循环。PCR产物在1%琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像系统进行扫描, 用Gel-Pro Analyzer 3.0分析软件, 分析各扩增条带的吸光度值, 与参照基因GAPDH条带吸光度值进行对比, 计算相对吸光度。

**主要观察指标:** 葛根素对MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶、骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨钙素基因mRNA表达的影响。

**统计学分析:** 数据采用SPSS 20.0统计软件完成。数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析和组间t检验,  $P < 0.05$ 即认为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 葛根素对MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶、骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨钙素基因mRNA表达的影响** 空白对照组、葛根素与雌二醇分别作用于小鼠成骨细胞5, 7, 10, 12 d, 提取总RNA后, 用表1所示引物RT-PCR法对成骨细胞分化相关蛋白碱性磷酸酶、骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨钙素mRNA以及参照基因GAPDH mRNA进行扩增, 电泳结果见图1。

**2.2 葛根素对MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶mRNA表达的影响** 如图1碱性磷酸酶行所示, 空白对照组小鼠成骨细胞碱性磷酸酶mRNA在5, 7, 10, 12 d均有表达, 随时间推移表达增强, 第10天达高峰后下降。葛根素和雌二醇能够延长其表达时间, 在第12天达到高峰。凝胶成像后相对吸光度的分析结果见表2, 第12天葛根素和雌二醇能增加碱性磷酸酶mRNA表达量, 与对照组相比差异有显著性意义。葛根素与雌二醇相比作用较弱, 差异有显著性意义。

**2.3 葛根素对MC3T3-E1细胞骨涎蛋白mRNA表达的影响** 如图1骨涎蛋白行所示, 空白对照组小鼠成骨细胞骨涎蛋白mRNA在5, 7, 10, 12 d均有表达, 随时间推移表达增强, 第12天到达高峰。葛根素和雌二醇在第10和12天能增加其表达。凝胶成像后相对吸光度分析结果见表3, 在第10和12天葛根素和雌二醇能增加骨涎蛋白mRNA表达量, 与对照组比差异有显著性意义。葛根素与雌二醇作用相当。

**2.4 葛根素对MC3T3-E1细胞骨桥蛋白mRNA表达的影响** 如图1骨桥蛋白行所示, 空白对照组小鼠成骨细胞骨桥蛋白mRNA在5, 7, 10, 12 d均有表达, 随时间推移表达增强, 第10天达高峰后下降。葛根素和雌二醇在第5和12天能减少其表达, 但不影响在接近高峰期的第10天与达高

峰第12天的表达。凝胶成像后相对吸光度分析结果见表4。

**2.5 葛根素对MC3T3-E1细胞骨钙素mRNA表达的影响** 如图1骨钙素行所示, 对照组小鼠成骨细胞骨钙素mRNA在第5与7天未见表达, 在第10与12天出现表达。葛根素和雌二醇在第10天和第12天能够增强其表达。凝胶成像后相对吸光度的分析结果见表5, 在第10天葛根素和雌二醇能增加骨钙素mRNA表达量, 与对照组相比差异有显著性意义。在第12天葛根素与雌二醇仍能增加骨钙素mRNA表达量, 其中葛根素与对照相比差异无显著性意义, 雌二醇组与对照组相比差异有显著性意义。

## 3 讨论 Discussion

多项动物体内实验研究结果表明葛根素具有抗骨质疏松作用。黄延玲等<sup>[4]</sup>发现葛根素对卵巢摘除大鼠的骨吸收具有抑制作用、对骨密度具有增加作用; 黄彤等<sup>[9]</sup>报道葛根素对去卵巢大鼠的骨密度和骨强度有较好的改善作用; 李海等<sup>[10]</sup>应用葛根素干预去卵巢大鼠和铅中毒大鼠发现葛根素能够明显提高骨组织骨钙、磷的含量以及使骨量增加, 骨小梁变粗, 变密等。作者以前研究也表明葛根素对性激素缺乏导致的小鼠骨密度和骨量下降有很好的防治作用<sup>[30]</sup>。葛根素抗骨质疏松作用明确, 但对葛根素防治骨质疏松的细胞分子机制研究较少, 特别是涉及成骨细胞分化相关特征性蛋白表达未有研究。本实验选用成骨细胞为研究对象, 葛根素对其进行干预, 并以雌二醇为阳性对照, 观察葛根素对成骨细胞分化指标的影响, 通过检测碱性磷酸酶、骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨钙素的mRNA表达情况, 从细胞分子水平研究葛根素对体外成骨细胞分化的影响。在先期检测葛根素对成骨细胞增殖及碱性磷酸酶活性的实验研究中, 检测了 $10^{-7}$  mol/L- $10^{-5}$  mol/L葛根素对小鼠成骨细胞增殖及碱性磷酸酶活性, 其中以 $10^{-6}$  mol/L葛根素作用最强, 据此采用 $10^{-6}$  mol/L葛根素浓度用于本实验研究。

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞, 负责骨基质的合成、分泌和矿化, 是由具备多向分化潜能的间充质细胞分化而来, 只有分化完全、成熟的成骨细胞才具有矿化能力, 形成新骨。许多因素如激素、细胞因子与药物等, 能够通过影响成骨细胞分化, 进而影响新骨的形成。碱性磷酸酶是骨形成所必需的酶, 是成骨细胞分化成熟和功能的早期标志<sup>[31]</sup>, 是最常见的评价骨形成的指标。实验结果显示, 葛根素和雌二醇能够延长碱性磷酸酶mRNA表达时间, 并能增加碱性磷酸酶其表达量。

骨涎蛋白是高度硫酸化、磷酸化酸性糖蛋白, 与骨桥蛋白同为小整合素结合配体N端连结蛋白(small integrin-binding ligand. N-linked glycoprotein, SIBLING)家族成员之一<sup>[32]</sup>, 主要由成骨细胞分泌合成, 对钙和羟基磷灰石有较高的亲和力<sup>[33]</sup>。它作为一种骨基质非胶原蛋白, 在成骨细胞分化过程中表达, 在骨基质矿化中必不可少。骨桥蛋白在骨基质的吸收, 矿化及维持骨组织完整性中起重要

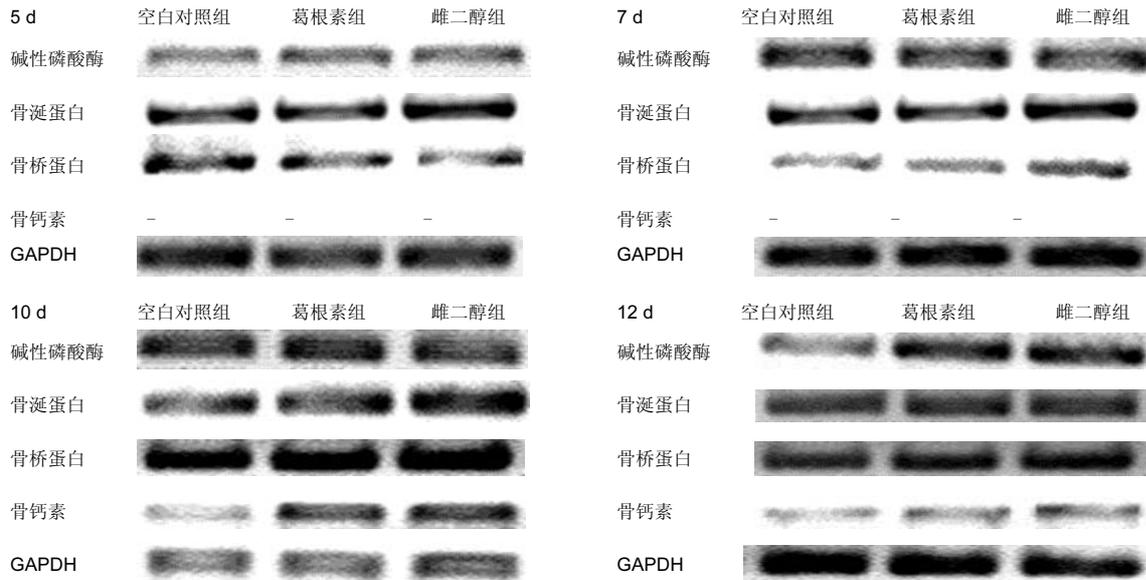


图 1 RT-PCR 法检测成骨细胞碱性磷酸酶、骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨钙素 mRNA 的扩增

Figure 1 Expression of alkaline phosphatase, bone sialoprotein, osteopontin and osteocalcin mRNA in osteoblasts detected using RT-PCR  
 图注: 葛根素和雌二醇能够延长碱性磷酸酶表达时间, 在第 12 天达到高峰; 葛根素和雌二醇在第 10 天和第 12 天能够增加骨涎蛋白 mRNA 的表达。葛根素和雌二醇在第 5 天和第 12 天能够减少骨桥蛋白的表达; 葛根素和雌二醇在第 10 天和第 12 天能够增强骨钙素表达。

表 1 RT-PCR 引物的碱基序列表

Table 1 Primer sequences of RT-PCR

基因名称	基因编号	引物序列	PCR 产物(bp)
碱性磷酸酶	NM_007431.3	5'-aac tga tgt gga ata cga act gg-3' 5'-gtc aag gtg tct ttc tgg gat gt-3'	626
骨涎蛋白	NM_008318.3	5'-ggg agg cag tga ctc ttc ag-3' 5'-ggt cct tct gca cct gct tc-3'	483
骨桥蛋白	NM_009263.3	5'-ccc ggt gaa agt gac tga tt-3' 5'-agg tcc tca tct gtg gca tc-3'	471
骨钙素	NM_031368.4	5'-ctt ggt gca cac cta gca ga-3' 5'-ctt gca ggg cag aga gag ag-3'	404
GAPDH	NM_008084.2	5'-tgt tcc tac ccc caa tgt gt-3' 5'-ccc tgt tgc tgt agc cgt at-3'	269

表 3 葛根素对不同时间点 MC3T3-E1 细胞骨涎蛋白 mRNA 表达的影响

Table 3 Effect of puerarin on mRNA expression of bone sialoprotein in MC3T3-E1 cells at different time ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	5 d	7 d	10 d	12 d
空白对照组	0.63±0.05	0.76±0.06	0.99±0.25	1.32±0.13
葛根素组	0.68±0.04	0.88±0.08	1.44±0.17 <sup>ab</sup>	1.65±0.12 <sup>ab</sup>
雌二醇组	0.71±0.04	0.87±0.10	1.32±0.31 <sup>a</sup>	1.56±0.21 <sup>a</sup>

表注: 空白对照组细胞骨涎蛋白 mRNA 随时间推移表达增强, 第 12 天表达达到高峰。葛根素和雌二醇在第 10 天和第 12 天能够增加表达。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与雌二醇组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

作用。骨涎蛋白与骨桥蛋白是反映成骨细胞分化程度的中期指标, 实验显示, 在成骨细胞分化中期的第 7-10 天, 葛根素组和雌二醇能够增加骨涎蛋白 mRNA 表达, 而对骨桥蛋白 mRNA 表达没有明显影响。

骨钙素是主要由成熟成骨细胞合成的一种骨基质非胶原蛋白, 占骨非胶原蛋白的 10%-20%, 是含量最丰富的骨

表 2 葛根素对不同时间点 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶 mRNA 表达的影响

Table 2 Effect of puerarin on mRNA expression of alkaline phosphatase in MC3T3-E1 cells at different time ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	5 d	7 d	10 d	12 d
空白对照组	0.67±0.05	0.77±0.06	1.20±0.15	0.70±0.04
葛根素组	0.68±0.05	0.83±0.08	1.20±0.11	1.44±0.31 <sup>ab</sup>
雌二醇组	0.69±0.05	0.90±0.02	1.18±0.16	1.70±0.14 <sup>a</sup>

表注: 空白对照组细胞碱性磷酸酶 mRNA 随时间推移表达增强, 第 10 天的表达达到高峰后下降。葛根素和雌二醇能够延长其表达时间, 在第 12 天达到高峰。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与雌二醇组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 4 葛根素对不同时间点 MC3T3-E1 细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

Table 4 Effect of puerarin on mRNA expression of osteopontin in MC3T3-E1 cells at different time ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	5 d	7 d	10 d	12 d
空白对照组	0.73±0.04	0.82±0.06	1.34±0.19	1.05±0.09
葛根素组	0.41±0.03 <sup>ab</sup>	0.81±0.05	1.41±0.30	0.81±0.05 <sup>ab</sup>
雌二醇组	0.35±0.05 <sup>a</sup>	0.82±0.05	1.44±0.29	0.79±0.04 <sup>a</sup>

表注: 空白对照组细胞骨桥蛋白 mRNA 随时间推移表达增强, 第 10 天的表达达到高峰后下降。葛根素和雌二醇在第 5 天和第 12 天能够减少其表达。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与雌二醇组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

非胶原蛋白之一。骨钙素为成熟成骨细胞的标志物, 在矿化出现前, 分泌量随着成骨细胞分化逐渐增加。最近研究表明存储于骨基质骨钙素经破骨细胞脱羧后以低羧化形式 (ucOCN) 释放入血, 最终作用于间质细胞以及胰岛  $\beta$  细胞, 脂肪细胞, 有可能作为一种新的内分泌调节物质, 促进睾酮的生物合成, 调节糖与脂肪代谢, 从而与生殖功能以及糖尿病与肥胖等疾病密切相关<sup>[34]</sup>。本实验结果表明小鼠成骨

表 5 葛根素对不同时间点 MC3T3-E1 细胞骨钙素 mRNA 表达的影响  
Table 5 Effect of puerarin on mRNA expression of osteocalcin in MC3T3-E1 cells at different time ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	5 d	7 d	10 d	12 d
空白对照组	-	-	0.20±0.05	0.22±0.06
葛根素组	-	-	0.57±0.12 <sup>ab</sup>	0.31±0.07
雌二醇组	-	-	0.69±0.22 <sup>a</sup>	0.39±0.06 <sup>a</sup>

表注: 空白对照组小鼠成骨细胞骨钙素 mRNA 在第 5 与 7 天未见表达, 在第 10 与 12 天出现表达。葛根素和雌二醇在第 10 天和第 12 天能够增强其表达。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与雌二醇组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

细胞骨钙素 mRNA 在培养早期未见表达, 而在晚期的第 10 与 12 天才出现表达, 葛根素和雌二醇能显著增强其表达量。

综上所述, 葛根素能够通过影响成骨细胞分化相关特征性蛋白 mRNA 表达, 促进成骨细胞的成熟, 可能是葛根素抗骨质疏松的重要的细胞分子机制之一。

**作者贡献:** 设计、评估为第一作者和通讯作者, 实施为全体作者, 第一作者成文并对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 没有与相关伦理道德冲突的内容。

**学术术语:** 葛根素-是从豆科植物野葛根中提取的一种单一成份黄酮苷。理化性质: 黄色结晶, 溶于水、甲醇、乙醇、吡啶, 易溶于热水, 难溶于苯、氯仿、乙醚等, 与醋酸镁反应显黄色, 与醋酸铅反应呈黄色沉淀。高含量为白色针状结晶粉末, 属于异黄酮类。具有提高免疫, 增强心肌收缩力, 保护心肌细胞, 降低血压, 具有抗血小板聚集等作用。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- 王新祥, 张允岭, 吴坚, 等. 葛根对骨质疏松模型小鼠骨密度和骨组织构造的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(5): 349-354.
- 王新祥, 张允岭, 吴坚, 等. 葛根对睾丸切除骨质疏松模型小鼠骨密度和骨构造的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7): 1262-1266.
- 尹丽红, 李艳枫, 孟繁琳. 葛根的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(3): 371-373.
- Liu XJ, Mei ZG, Qian JP, et al. Puerarin partly counteracts the inflammatory response after cerebral ischemia/reperfusion via activating the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neural Regene Res.* 2013; 8(34): 3203-3215.
- 黄延玲, 石凤英. 葛根素对去卵巢大鼠骨密度和骨代谢生化指标的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(12): 2307-2309.
- Huh JE, Yang HR, Park DS, et al. Puerariae radix promotes differentiation and mineralization in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Ethnopharmacol.* 2006; 104(3): 345-350.
- 周强, 付庭斌. 葛根素对去卵巢大鼠骨质疏松性骨折愈合的促进作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(27): 45-47.
- 田泉, 汤旭磊, 白孟海, 等. 葛根素对去卵巢大鼠骨质疏松和血脂的作用[J]. 中华老年医学杂志, 2006, 25(7): 543-545.
- 黄彤, 金邦荃, 孙桂菊, 等. 葛根素对去卵巢大鼠骨密度和骨强度的改善[J]. 现代预防医学, 2010, 37(20): 3894-3896.
- 李海, 金花, 黄海玲, 等. 葛根素对去卵巢大鼠和铅中毒大鼠骨组织的影响[J]. 现代预防医学, 2011, 38(18): 3742-3744.
- 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(11): 2-16.
- Colon-Emeric C, Nordsletten L, Olson S, et al. Association between timing of zoledronic acid infusion and hip fracture healing. *Osteoporos Int.* 2010; 12(9): 1669-1673.
- Abrahamsen B, Eiken P, Eastell R. Subtrochanteric and diaphyseal femur fractures in patients treated with alendronate: aregister-based national cohort study. *J Bone Miner Res.* 2009; 24(6): 1095-1102.
- Khan AA, Sándor GK, Dore E, et al. Canadian consensus practice guidelines for bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *J Rheumatol.* 2008; 35(7): 1391-1397.
- 赵学文. 植物性雌激素对妇女疾病治疗中的作用[J]. 南通大学学报: 医学版, 2005, 25(3): 231-232.
- Zhang Y, Chen WF, Lai WP, et al. Soy isoflavones and their bone protective effects. *Inflammopharmacology.* 2008; 16(5): 213-215.
- Atmaca A, Kleerekoper M, Bayraktar M, et al. Soy isoflavones in the management of postmenopausal osteoporosis. *Menopause.* 2008; 15(4 Pt 1): 748-757.
- Wang Q, Ge X, Tian X, et al. Soy isoflavone: The multipurpose phytochemical (Review). *Biomed Rep.* 2013; 1(5): 697-701.
- Lagari VS, Levis S. Phytoestrogens in the prevention of postmenopausal bone loss. *Clin Densitom.* 2013; 16(4): 445-449.
- Uehara M. Isoflavone metabolism and bone-sparing effects of daidzein-metabolites. *Clin Biochem Nutr.* 2013; 52(3): 193-201.
- Xinxiang Wang, Jian Wu et al. Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab.* 2003; 21(5): 268-275.
- 郑高利, 张信岳, 方晓林, 等. 葛根异黄酮对去卵巢大鼠骨密度和骨强度的影响[J]. 中草药, 2001, 32(5): 422-425.
- 华川, 李杨. 葛根素对大鼠成骨细胞增殖分化影响的血清药理学实验[J]. 华北国防医药, 2005, 17(6): 393-395.
- 王久亮, 郑忠志. 葛根素对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 7(36): 7138-7141.
- 臧洪敏, 陈君长. 葛根素对成骨细胞生物学作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(24): 1947-1949.
- 郭辉, 刘奕琛. 葛根素对大鼠成骨细胞代谢调控的机制的实验研究[J]. 现代中医药, 2008, 28(1): 48-50.
- 王昌, 汤旭磊, 陈克明, 等. 葛根素在体外对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(33): 6102-6106.
- 王建华, 潘永梅, 詹文红. 葛根素对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(2): 21-22.
- 王海珍, 俞云飞, 苗志勃. 葛根素对大鼠成骨细胞增殖影响的体外实验研究[J]. 中国医药导报, 2013, 19(3): 77-79.
- 王新祥, 张允岭, 郑宏, 等. 葛根素定量分析及对卵巢切除小鼠骨密度作用[J]. 中国科技论文在线, <http://www.paper.edu.cn>. 201102-82.
- Woldarski KH. Properties and origin of osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res.* 1990; (252): 276-293.
- Fisher IW, Torchia DA, Fohr B, et al. Flexible structure of SIBLING proteins, bone sialoprotein and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 80: 460-465.
- Paz J, Wade K, Kiyoshima T, et al. Tissue and bone cell-specific expression of bone sialoprotein is directed by a 9.0 kb promoter in transgenic mice. *J Matrix Biol.* 2005; 24(5): 341-352.
- 盛彤, 谢培凤, 王新祥, 等. 神经精神因素对骨代谢的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2013, 6(2): 178-183.