



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103191097 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201310105671. X

(22) 申请日 2013. 03. 29

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 曾文峰 张春玲 梁伟

(51) Int. Cl.

A61K 31/352(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

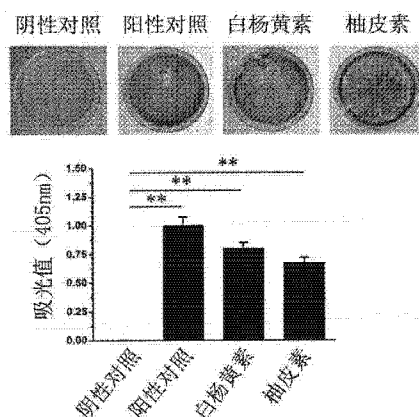
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

黄酮类小分子在预防及治疗骨吸收相关疾病中的应用

(57) 摘要

本申请涉及一种黄酮类小分子,尤其是白杨黄素和柚皮素在促进由 Runx2、Osx、Col1A1、OCN、OPN、ALP、Fra1、NF- κ B1 调节的骨质生成和分化过程,以及治疗与炎性因子 TNF- α 介导的炎性骨吸收相关疾病中的应用。



1. 一种黄酮类小分子化合物或其药用制剂在制备促进成骨分化的药物或治疗炎症因子造成的成骨分化抑制 / 炎性骨吸收相关疾病的药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在於,所述的黄酮类小分子化合物为:白杨黄素、柚皮素。
3. 如权利要求 2 所述的应用,其特征在於,所述的促进成骨分化,通过白杨黄素或柚皮素调节成骨分化相关的基因完成。
4. 如权利要求 3 所述的应用,其特征在於,所述的基因包括但不限于:Runx2、Osx、Col1A1、OCN、OPN、ALP、Fral。
5. 如权利要求 2 所述的应用,其特征在於,所述的治疗炎症因子造成的成骨分化抑制 / 炎性骨吸收相关疾病,通过白杨黄素或柚皮素调节受炎症因子诱导的成骨分化负调控或骨吸收诱导基因完成。
6. 如权利要求 5 所述的应用,其特征在於,所述的基因包括但不限于:NF-kB1。
7. 如权利要求 1-6 任一所述的应用,其特征在於,所述的炎症因子包括但不限于:TNF- α 。
8. 如权利要求 1-6 任一所述的应用,其特征在於,所述的与炎症因子造成的成骨分化抑制 / 炎性骨吸收相关疾病包括但不限于:女性绝经后雌激素缺乏引起的骨吸收,慢性炎症导致的骨吸收(其中慢性炎症包括风湿、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、炎性肠道病、银屑病性关节炎、脂泻病、囊胞性纤维症、慢性阻塞性肺病以及牙周炎),癌症骨转移后造成的骨质减少症状等。
9. 如权利要求 1-6 任一所述的应用,其特征在於,所述黄酮类小分子化合物药用制剂是指,以黄酮类小分子化合物为有效成分,加入常规辅料,通过常规工艺制备获得的片剂、胶囊剂、注射剂、散剂等。

黄酮类小分子在预防及治疗骨吸收相关疾病中的应用

技术领域

[0001] 本申请涉及一种黄酮类小分子尤其是白杨黄素和柚皮素在促进骨质生成,以及治疗与炎性骨吸收相关疾病中的应用。

背景技术

[0002] 骨组织是一种活的组织,它一直处于持续自我更新状态中。骨组织的自我更新对于人体血液中钙含量以及维持骨质的强韧具有重要的生理意义。其特点是骨吸收(由破骨细胞执行)和骨形成(由成骨细胞执行)的动态平衡,该平衡在人成年后形成,每个周期大约 90-130 天。而这个平衡一旦被打破就会引发各种疾病,例如骨折,牙周病和帕哲氏病等等。骨吸收的临床表现为骨质减少,以及骨折几率升高。骨吸收是最常见的一种疾病,而且在年长的人群中,特别是绝经后的女性中发病率很高。据统计约 40% 50 岁及以上的女性有过骨折的经历。

[0003] 骨形成主要是由成骨细胞来执行的,成骨细胞由骨髓间充质干细胞在激素(例如雄激素、雌激素、副甲状腺激素等)和生长因子(例如转化生长因子 beta, 骨形态蛋白, 胰岛素样生长因子 1 以及维生素 C、D 等)的作用下分化而来,最终成为成熟的骨细胞参与新骨的形成。在整个成骨分化过程中,两个转录因子:Runx2 和 Osterix(Osx)起到了决定分化方向的重要作用,其下游的 Col1A1(一型胶原),OCN(骨钙素),OPN(骨桥连接素)是成骨细胞成熟的标志基因,其蛋白产物是骨组织中最丰富的胶原蛋白和非胶原蛋白组分。此外,ALP(碱性磷酸酶)的活性在成骨分化的过程中也会有升高。通常情况下 Runx2 和 Osterix 也会和其他转录因子协同作用,对成骨分化造成影响,例如 AP-1 家族成员 Fra1 对它们起到正调控的作用,而 NF- κ B 则起到负调控的作用。特别是在炎症环境下,例如 LPS 可以通过激活成骨细胞中的转录因子 NF- κ B 直接对成骨相关转录因子 Runx2 或 Osx 起到抑制作用,此为初级效应;或者也可以通过 NF- κ B 来促进 TNF- α 的快速表达,然后 TNF- α 通过自分泌或旁分泌途径对成骨细胞本身的 Runx2 转录因子行使负调控作用,此为次级效应。在炎症状况中两种效应兼具,使得成骨细胞的成骨分化收到抑制。

[0004] 骨吸收则主要有破骨细胞来执行。破骨细胞是指一类定居在骨组织中的巨噬细胞/单核细胞,由骨髓来源的干细胞分化而成。慢性炎症环境会导致系统性骨吸收以及较高的骨折风险。这些慢性炎症包括风湿、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、炎性肠道病、银屑病性关节炎、脂泻病、囊胞性纤维症、慢性阻塞性肺病以及牙周炎。炎症是指机体对外界刺激的一种有序的反应。这种外界刺激可以是来自病原体的感染入侵,也可以是组织器官的机械损伤。炎症反应本身具有非常重要的生理意义,而且促炎性细胞因子(炎症因子)在炎症过程中扮演着十分重要的角色,它们能通过自分泌/旁分泌途径影响细胞分化,并诱导其它炎症因子、急性期反应非细胞因子的炎症介质以及蛋白酶的产生,而这些产物大多能够参与各种组织的降解,其中就包括骨组织。炎症因子中, TNF- α , IL-1 和 IL-6 都可以增强破骨细胞的分化和活化。

[0005] 此外, TNF- α 还能够通过与其受体结合,通过激活泛素化途径抑制 Runx2 的活性,

最终抑制成骨细胞的分化。

[0006] 综上所述,炎症因子可以影响骨吸收和骨形成的平衡向骨吸收的方向偏移,最终导致系统性骨吸收的产生。

[0007] 黄酮类化合物(flavonoids)是一类存在于自然界的、具有2-苯基色原酮(flavone)结构的化合物。它们分子中有一个酮式羰基,第一位上的氧原子具碱性,能与强酸成盐,其羟基衍生物多具黄色,故又称黄碱素或黄酮。黄酮类化合物的发现和药用历史十分悠久,早在上世纪30年代初,即有报道通过乙醇提取柠檬皮获得由黄酮组成的混合物柠檬素对于败血症有很好的治疗和预防效果。时至今日,在多个领域都有使用黄酮类化合物作为治疗和预防药物的报道和研究,例如芦丁、槲皮素、葛根素等有明显的扩冠作用;木犀草素、黄芩苷、黄芩素等有一定的抗菌作用;槲皮素、二氢槲皮素、桑色素、山柰酚等具有抗病毒作用等等,对于黄酮类化合物的抗炎、抗肿瘤效果,也有很多报道。但是,对于黄酮类小分子对于成骨细胞分化的诱导功能,以及其在逆转炎症因子引起的骨吸收/成骨细胞成骨分化抑制的功能,尚未有相关报道。

发明内容

[0008] 本发明涉及一种黄酮类小分子化合物及其药用制剂对成骨分化过程的促进作用,以及对炎症因子造成的成骨分化抑制和炎性骨吸收的抑制作用。

[0009] 本发明所述的黄酮类小分子化合物为:白杨黄素、柚皮素。

[0010] 本发明所述的对成骨分化过程的促进作用,通过调节成骨分化相关的基因完成,所述的基因包括但不限于:Runx2、Osx、Col1A1、OCN、OPN、ALP、Fra1、NF- κ B1。

[0011] 本发明所述的细胞炎症因子包括但不限于:TNF- α 。

[0012] 本发明所述的与炎症因子造成的成骨分化抑制和炎性骨吸收的具体疾病为:女性绝经后雌激素缺乏引起的骨吸收,慢性炎症导致的骨吸收(包括慢性炎症包括风湿、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、炎性肠道病、银屑病性关节炎、脂泻病、囊胞性纤维症、慢性阻塞性肺病以及牙周炎),癌症骨转移后造成的骨质减少症状等。

[0013] 本发明所述的黄酮类小分子化合物药用制剂是指,以黄酮类小分子化合物为有效成分,加入常规辅料,通过常规工艺制备获得的片剂、胶囊剂、注射剂、散剂等。

附图说明

[0014] 图1. 白杨黄素、柚皮素能显著促进小鼠成骨细胞系MC3T3-E1的成骨分化。25 μ M白杨黄素或100 μ M柚皮素处理小鼠成骨细胞系MC3T3-E1 14天后,使用茜素红染料对细胞的成骨结节进行染色鉴定,并通过溶剂(乙酸:甘油=5:1)溶解,测量405nm吸光值定量(图1)。

[0015] 图2. 白杨黄素、柚皮素能显著升高碱性磷酸酶ALP的活性。25 μ M白杨黄素或100 μ M柚皮素处理小鼠成骨细胞系MC3T3-E1 72小时后,通过蛋白裂解液(10% SDS)裂解细胞后,与底物(1.0mg/ml p-Nitrophenyl phosphate,0.2M Tris buffer and 5mM magnesium chloride)反应30分钟后检测405nm吸光值(图2)。

[0016] 图3. 白杨黄素、柚皮素能显著升高成骨分化相关转录因子Runx2和Osx的表达。25 μ M白杨黄素或100 μ M柚皮素处理小鼠成骨细胞系MC3T3-E1 24小时后,通过实时定量

PCR 检测 Runx2 和 Osx 的相对基因表达量 (图 3)。

[0017] 图 4. 白杨黄素、柚皮素能显著升高成骨分化指标基因和 BMP4 的表达。25 μ M 白杨黄素、100 μ M 柚皮素处理小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 48 小时后,通过实时定量 PCR 检测 Col1A1、OCN、OPN 和 BMP4 的相对基因表达量 (图 4)。

[0018] 图 5. 人原代牙周膜细胞的间充质来源鉴定。人原代牙周膜细胞表面的标志物蛋白 Stro-1, CD146, CD29, CD105, CD34 和 CD45 通过流式细胞术检测其表达量 (图 5)。

[0019] 图 6. 白杨黄素、柚皮素能显著促进人原代牙周膜细胞的成骨分化。25 μ M 白杨黄素或 100 μ M 柚皮素处理人原代牙周膜细胞 21 天后,使用茜素红染料对细胞的成骨结节进行染色鉴定 (图 6)。

[0020] 图 7. 在炎症状态下白杨黄素、柚皮素对转录因子 Fra-1 和 NF- κ B1 的影响。阴性对照、阳性对照、25 μ M 白杨黄素、100 μ M 柚皮素 (在有或没有 LPS100ng/ml 处理 24 小时的情况下) 小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 中 Fra-1 和 NF- κ B1 相对基因表达量的影响 (图 7)。

[0021] 图 8. 在炎症状态下白杨黄素、柚皮素对小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 成骨分化的影响。阴性对照、阳性对照、25 μ M 白杨黄素、100 μ M 柚皮素 (在有或没有 LPS100ng/ml 处理 14 天的情况下) 对小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 成骨分化的影响通过茜素红染色显示 (图 8)。

具体实施方式

[0022] 实验材料:

[0023] 高糖 DMEM 培养基 (购自 GIBCO 公司);胎牛血清 (FBS, 购自 GIBCO 公司);LPS (脂多糖, 购自 Sigma-Aldrich);I 型胶原酶 (购自 GIBCO 公司) 和 Dispase 混合溶液 (上海佳和生物科技有限公司);PE 标记的抗 Stro-1 抗体, PE 标记的抗 CD146 抗体, PE 标记的抗 CD29 抗体, PE 标记的抗 CD105 抗体, PE 标记的抗 CD34 抗体和 PE 标记的抗 CD45 抗体 (购自 eBioscience 公司);cDNA 合成试剂盒以及实时定量 PCR 试剂盒 (购自全式金公司);柚皮素 (Nar), 购自陕西惠科有限公司, 纯度 > 98%;白杨黄素 (Chrysin), 购自 Sigma-Aldrich 公司;其余试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司或国产分析纯。

[0024] 实施例 1. 白杨黄素、柚皮素对小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 的成骨分化作用

[0025] (1)、MC3T3-E1 细胞系的维持培养:

[0026] MC3T3-E1 细胞系购自 ATCC, 编号 CRL-2593TM。初试接种密度为 $3 \times 10^4 / \text{cm}^2$, 接种到 Corning T25 细胞培养瓶 (底面积为 25cm^2) 中, 培养基为高糖 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清);培养环境为 37°C , 5% CO_2 。当细胞贴壁生长到 90% 弥合度时, 用浓度为 0.25% 的胰酶于 37°C 消化 5 分钟, 中和胰酶活性后, 离心收取细胞待用。

[0027] (2)、成骨细胞分化诱导培养:

[0028] 将密度为 8×10^3 细胞 / 皿的 MC3T3-E1 细胞种到直径为 6cm 的细胞培养皿中, 依据不同的处理将细胞分成以下几组:

[0029] ①阴性对照:细胞在高糖 DMEM (含 10% FBS) 培养基中培养;

[0030] ②阳性对照:细胞在 OPM 培养基 (高糖 DMEM, 含 10% FBS、50 μ M β -磷酸甘油和 10mM 抗坏血酸) 中培养;

[0031] ③白杨黄素处理组 (高糖 DMEM, 含 10% FBS、25 μ M Chrysin);

[0032] ④柚皮素处理组 (高糖 DMEM, 含 10% FBS、100 μ M Nar)。

[0033] 培养过程中,每隔3天,更换相应组对应的新鲜的培养基,到第14天时终止诱导培养。

[0034] (3)、茜素红染色鉴定成骨诱导效果:

[0035] 所有组的细胞,首先弃掉培养基,用预冷的 pH7.4 磷酸缓冲液 (PBS) 冲洗细胞 3 次,接着 4% 多聚甲醛在常温将细胞固定 30 分钟,之后再用预冷的 pH7.4 磷酸缓冲液冲洗细胞 3 次,弃去 PBS 后加入 2% (w/v%) 茜素红染料 (1ml/皿) 常温染色 5-10 分钟。当染色步骤结束后用预冷的 pH7.4 磷酸缓冲液冲洗 3 次,并用相机拍照。其中 2% (w/v%) 茜素红染料的配制:茜素红粉末 (Sigma A5533) 2g 溶于 100ml 去离子水中,用 1M 盐酸将溶液的 pH 调节到 4.1-4.3,使茜素红粉末充分溶解,如果过酸需要用 0.5% 氨水将 pH 调回 4.1-4.3。溶液经过滤后待用,若放置超过一个月,需检查 pH 值。

[0036] 对茜素红染色结果进行定量处理:将溶剂 (乙酸:甘油 = 5:1 体积比) 加入到培养皿里 (1ml/皿),使细胞中的茜素红染料溶解出来。然后将溶剂转移到 1.5ml 的 EP 管中,通过 3000g 离心 5 分钟去除细胞碎片,上清液再转移到 96 孔板后,置于酶标仪中检测相应的 405nm 处吸光值。最后进行数据统计。

[0037] 若 MC3T3-E1 细胞发生成骨分化并成熟,细胞内的钙离子会聚集并形成成骨结节,而这些成骨结节是可以通过特异性化学染料 (茜素红) 来检测的。阳性对照组中使用的 OPM 培养基是已知的可以诱导成骨细胞分化成熟的培养基。实验结果见图 1,可见,白杨黄素和柚皮素均能诱导小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 的成骨分化,其诱导结果和阳性对照组类似,而阴性对照组无明显的诱导成骨分化结果。

[0038] (4)、碱性磷酸酶活性检测:

[0039] 将密度为 5×10^3 / 孔的细胞种到 96 孔细胞培养板中,当细胞贴壁生长到 90% 弥合度时,将细胞培养液替换成上述阴性对照、阳性对照、白杨黄素、柚皮素组培养基,继续培养 3 天;将培养液弃去,先用预冷的 PBS 冲洗细胞两次,然后在常温下用 0.01% SDS 裂解细胞 30 分钟,14000g 离心获得细胞裂解液的上清部分待用;

[0040] 将该上清液与底物反应液 (2mM 氯化镁,0.5M AMP,pH10 的反应液中含有 9mM p-硝基苯酚磷酸盐) 于常温进行反应 30 分钟,之后用 0.2N 氢氧化钠中和反应。整个反应体系置于酶标仪中读取 405nm 处吸光值,检测结果见图 2。

[0041] 在成骨细胞的成骨分化过程中细胞内的碱性磷酸酶活性 (ALP) 显著上升,通过检测白杨黄素和柚皮素处理 MC3T3-E1 细胞 72 小时后细胞内的碱性磷酸酶活性,发现相对与阴性对照组均有显著升高,而与阳性对照组类似。

[0042] (5)、转录因子 Runx2、Osx,成骨分化的标志性基因 Col1A1、OCN、OPN 以及 BMP 家族成员 BMP4 的表达量检测:

[0043] 将密度为 2×10^5 细胞 / 皿的 MC3T3-E1 细胞种到直径为 6cm 的细胞培养皿中,依据不同的处理将细胞分成以下几组:

[0044] ①阴性对照:细胞在高糖 DMEM (含 10% FBS) 培养基中培养;

[0045] ②阳性对照:细胞在 OPM 培养基 (高糖 DMEM,含 10% FBS、50 μ M β -磷酸甘油和 10mM 抗坏血酸) 中培养;

[0046] ③白杨黄素处理组 (高糖 DMEM,含 10% FBS、25 μ M Chrysin);

[0047] ④柚皮素处理组 (高糖 DMEM,含 10% FBS、100 μ M Nar)。

[0048] 各种处理进行 24 小时后,用预冷的 PBS 冲洗细胞两次,每孔加入 1ml Trizol 试剂溶解细胞,然后用氯仿 / 异丙醇抽提法收集 RNA。之后将 RNA 定量并按照每个实验组 4 μ gRNA 的量反转录成 cDNA,应用到后面的实时定量 PCR 实验中,检测 Runx2、Osx、Col1A1、OCN、OPN 和 BMP4 的表达量。该实验选取 GAPDH 作为内参基因。

[0049] 白杨黄素、柚皮素处理 MC3T3-E1 细胞 24 小时后,主要控制分化的转录因子 Runx2 和 Osx 的表达量均出现了显著升高,说明白杨黄素和柚皮素处理的细胞已经进入了成骨分化的程序(图 3)。

[0050] 白杨黄素、柚皮素处理 MC3T3-E1 细胞 48 小时后,成骨分化的标志性基因 Col1A1、OCN、OPN 的表达量在 48 小时后出现明显的上调,证明白杨黄素处理的细胞在这段时间内已经开始大量合成骨组织所需要的胶原或非胶原蛋白成分(图 4)。

[0051] 此外能够显著刺激成骨细胞分化的 BMP 家族成员 BMP4 在白杨黄素、柚皮素的作用下,在 MC3T3-E1 细胞中显著高表达(图 4),也映证白杨黄素、柚皮素对成骨细胞分化的全方位促进作用。

[0052] 实施例 2. 白杨黄素、柚皮素对人原代牙周膜细胞的成骨分化作用

[0053] 牙槽骨是牙齿的支撑组织。牙齿嵌入牙槽骨的部分外周包裹了一层牙周膜纤维状细胞(简称:牙周膜细胞),当牙槽骨收到损伤(机械损伤或炎性损伤)后,牙周膜细胞会分化成骨细胞对受损部位进行修复。这群细胞的来源是间充质干细胞,具有分化成骨细胞,软骨细胞以及脂肪细胞的能力。在牙周疾病,如牙周炎或根尖周炎,引起的牙槽骨炎性环境中牙周膜细胞的成骨分化能力被削弱,炎性骨吸收增强。

[0054] (1) 人原代牙周膜细胞的获取:

[0055] 选取因正畸需要拔除的健康前磨牙或第三磨牙 5 颗,患者知情同意。PBS 冲洗后,无菌条件下,眼科剪锐性分离根中 1/3 的牙周组织。将其剪成约 1mm³ 小组织块,置于 3mg/ml 的 I 型胶原酶和 4mg/ml 的 Dispase 混合溶液中 37 $^{\circ}$ C 消化一小时后,过细胞筛。将细胞悬液分别放置于 6 孔细胞培养板中,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,待细胞生长达 80% 弥合度时,0.25% 胰酶消化传代。采用有限稀释法,以 1×10^4 / 皿的细胞密度接种于 10cm 培养皿,获得纯化的多克隆人原代牙周膜细胞。

[0056] (2) 人原代牙周膜细胞的鉴定:

[0057] 将 2×10^5 个人原代牙周膜细胞通过 0.25% 胰酶消化下来,500g/ 分钟离心 5 分钟,收取细胞,然后分别用 PE 标记的抗 Stro-1 抗体,PE 标记的抗 CD146 抗体,PE 标记的抗 CD29 抗体,PE 标记的抗 CD105 抗体,PE 标记的抗 CD34 抗体和 PE 标记的抗 CD45 抗体对细胞进行表面抗原的染色。所有抗体用量为 0.5ug/100 万细胞,将抗体和细胞混合好后置于冰上染色 30 分钟。染色完成后将细胞清洗 3 次,上流式细胞仪检测各个表面标志蛋白的表达量(图 5)。结果显示间充质来源的表面标志物 Stro1-1, CD146, CD29 和 CD105 高表达,而骨髓来源的表面标志物 CD34 和 CD45 低表达,充分证明了人原代牙周膜细胞的来源及可能的分化潜力。

[0058] (3) 人原代牙周膜细胞的成骨分化诱导:

[0059] 使用含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液作为维持培养液培养所述人原代牙周膜细胞。

[0060] 阳性对照的成骨诱导液由维持培养液加入 10nM 地塞米松,50 μ M 抗坏血酸和 10mM

beta- 磷酸甘油；

[0061] 25 μ M 白杨黄素和 100 μ M 柚皮素分别加入到维持培养液中。

[0062] 将 1×10^4 / 皿的细胞接种于直径 6cm 的细胞培养皿中, 次日将培养液更换为所述阳性成骨诱导液或所述添加了白杨黄素或柚皮素的维持培养液进行成骨分化诱导, 每三天换液一次直到第 21 天结束分化。

[0063] 按照实施例 1 所记载的茜素红染色鉴定成骨分化诱导结果。结果显示白杨黄素和柚皮素都可以显著促进人原代牙周膜细胞的成骨分化 (图 6)。

[0064] 实施例 3. 柚皮素、白杨黄素缓解炎症环境对小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 成骨分化的抑制作用。

[0065] 很多跟骨吸收相关的慢性炎症环境是由细胞表面 To11 样受体家族蛋白介导的炎症反应, 肥胖患者体内的自由脂肪酸, 感染患者体内的内毒素脂多糖 (LPS), 肿瘤患者体内大量凋亡细胞释放的核酸片段等, 都可以激活 To11 样受体家族蛋白介导的炎症反应, 释放炎症因子 TNF- α 。

[0066] MC3T3-E1 细胞受到 LPS 刺激后, 类似巨噬细胞, 也可以产生炎症因子, 例如 TNF- α 。之后 MC3T3-E1 细胞的成骨分化受到一定抑制, 而柚皮素或白杨黄素处理, 则可以显著改善 LPS 对 MC3T3-E1 造成的成骨分化抑制作用。

[0067] (1) 柚皮素, 白杨黄素在 LPS 存在的情况下对 Fra1 和 NF- κ B1 的调控

[0068] 对于成骨细胞分化中最重要的转录因子 Runx2 而言, 其转录活性受到 AP-1 家族成员 Fra1 的正调控, 以及 NF- κ B1 对其的负调控。

[0069] 将密度为 8×10^4 / 孔的细胞种到 6 孔细胞培养板中, 所有组别的基础培养基同实施例 1 相同, 即高糖 DMEM (含 10% FBS), 阴性对照和阳性对照培养基也同实施例 1 相同, 共设置 8 组对比实验:

[0070] ①阴性对照;

[0071] ②阳性对照;

[0072] ③白杨黄素单独处理, 白杨黄素浓度为 25 μ M;

[0073] ④柚皮素单独处理, 柚皮素浓度为 100 μ M;

[0074] ⑤阴性对照加 LPS 处理组, LPS 浓度为 100ng/ml;

[0075] ⑥阳性对照加 LPS 处理组, LPS 浓度为 100ng/ml;

[0076] ⑦白杨黄素加 LPS 处理组, 白杨黄素浓度为 25 μ M, LPS 浓度为 100ng/ml;

[0077] ⑧柚皮素加 LPS 处理组, 柚皮素浓度为 25 μ M, LPS 浓度为 100ng/ml;

[0078] 其中柚皮素或白杨黄素预处理时间为 2 小时, LPS 处理时间为 24 小时。

[0079] 处理结束后, 吸掉培养基, 用预冷的 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每孔加入 1ml Trizol 试剂溶解细胞, 然后用氯仿 / 异丙醇抽提法收集 RNA。之后将 RNA 定量并按照每个实验组 4 μ gRNA 的量反转录成 cDNA, 应用到后面的实时定量 PCR 实验中, 检测 Fra1 以及 NF- κ B1 的表达量。该实验选取 GAPDH 作为内参基因。

[0080] 结果显示, 对于 Fra1 来说, 阳性对照 (OPM 培养基) 组能够显著的促进其表达, 但该促进作用被 LPS 显著抑制 (阳性对照 +LPS 处理组), 而无论 LPS 存在与否, 柚皮素或白杨黄素的处理都使 Fra1 表达量有明显的上升, 显示柚皮素或白杨黄素促进 MC3T3-E1 细胞的成骨分化的作用在炎症状态下也可以实现; 而对于 NF- κ B1, LPS 处理使其产生了上调, 阳

性对照 +LPS 处理组难于抑制其表达,而柚皮素或白杨黄素处理则使其恢复到正常状态,而在没有 LPS 的情况下柚皮素或白杨黄素不影响 NF- κ B1 的表达量,说明它们在正常状态下不影响 NF- κ B1,但是在炎症情况下能遏制炎症因素上调 NF- κ B1,从而抑制了炎性骨吸收(图 7)。

[0081] (2) 柚皮素,白杨黄素在 LPS 存在的情况下对 MC3T3-E1 成骨分化的影响

[0082] 通过茜素红染色实验来确定柚皮素和白杨黄素在 LPS 处理的情况下也能改善 LPS 对成骨分化的抑制作用。

[0083] 将密度为 8×10^3 细胞/皿的 MC3T3-E1 细胞种到直径为 6cm 的细胞培养皿中,依据不同的处理将细胞分成以下几组,所有组别的基础培养基同实施例 1 相同,即高糖 DMEM(含 10% FBS),阴性对照和阳性对照培养基也同实施例 1 相同,共设置 8 组对比实验:

[0084] ①阴性对照;

[0085] ②阳性对照;

[0086] ③白杨黄素单独处理,白杨黄素浓度为 $25 \mu\text{M}$;

[0087] ④柚皮素单独处理,柚皮素浓度为 $100 \mu\text{M}$;

[0088] ⑤阴性对照加 LPS 处理组,LPS 浓度为 100ng/ml ;

[0089] ⑥阳性对照加 LPS 处理组,LPS 浓度为 100ng/ml ;

[0090] ⑦白杨黄素加 LPS 处理组,白杨黄素浓度为 $25 \mu\text{M}$,LPS 浓度为 100ng/ml ;

[0091] ⑧柚皮素加 LPS 处理组,白杨黄素浓度为 $25 \mu\text{M}$,LPS 浓度为 100ng/ml ;

[0092] 培养过程中,每隔 3 天,更换相应组对应的新鲜的培养基,到第 14 天时终止诱导培养。

[0093] 茜素红染色步骤参见实施例 1, (3) 中具体描述。

[0094] 结果显示虽然阳性对照组在 LPS 存在的情况下也出现了成骨分化被抑制的情况,但是柚皮素和白杨黄素处理的组别相对于阴性对照组还是有明显促进成骨分化的现象(图 8)。同时也证明了在 LPS 存在的情况下柚皮素和白杨黄素可以缓解 LPS 对成骨分化的抑制作用。

[0095] 以上为本发明的实施例,需要申明之处在于,上述实施例仅用于帮助本领域技术人员理解本发明的技术方案,不应被理解为对本发明的实际保护范围的限定。

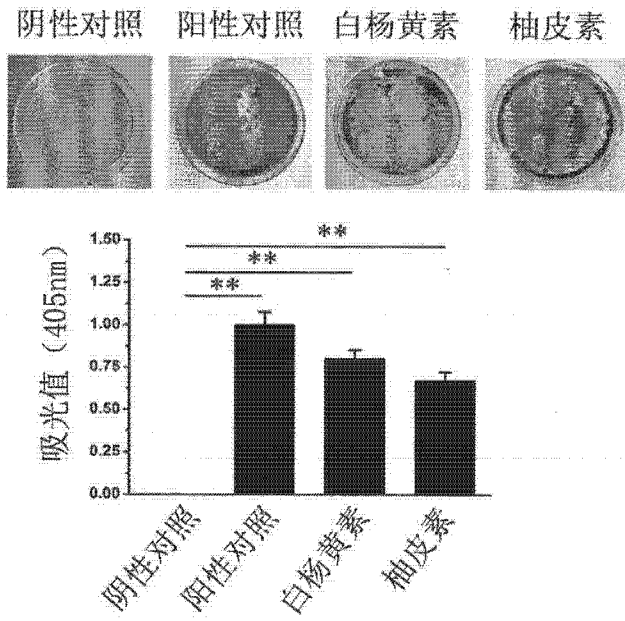


图 1

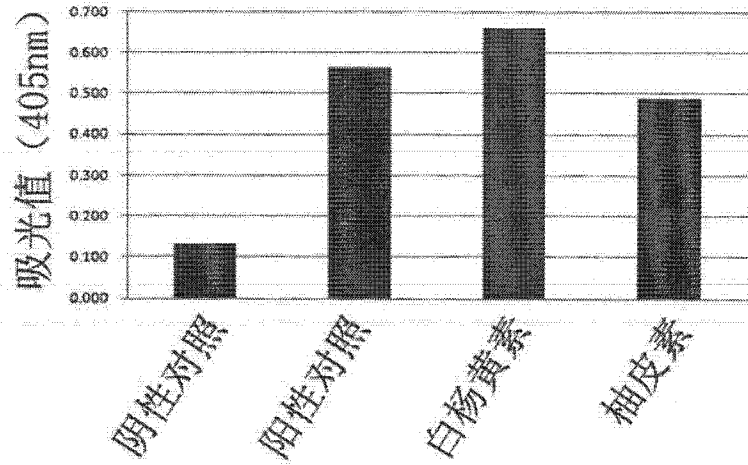


图 2

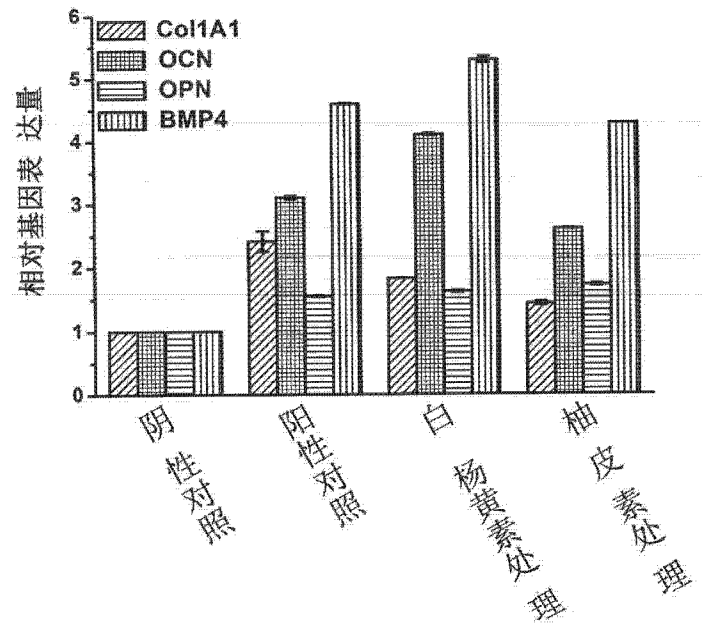
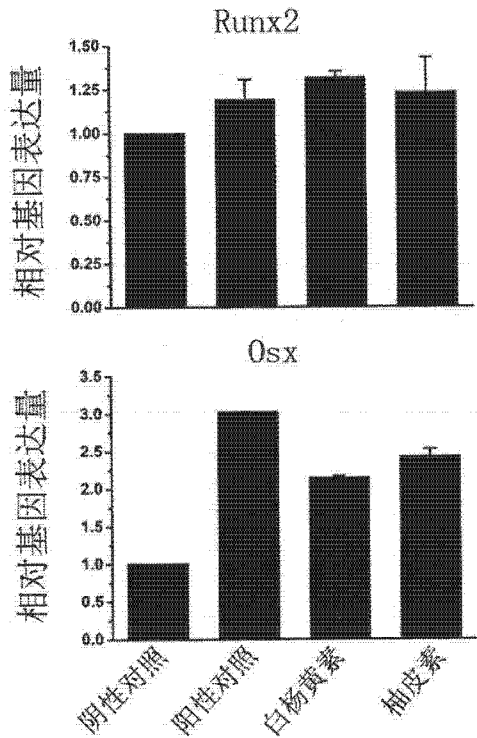


图 4

图 3

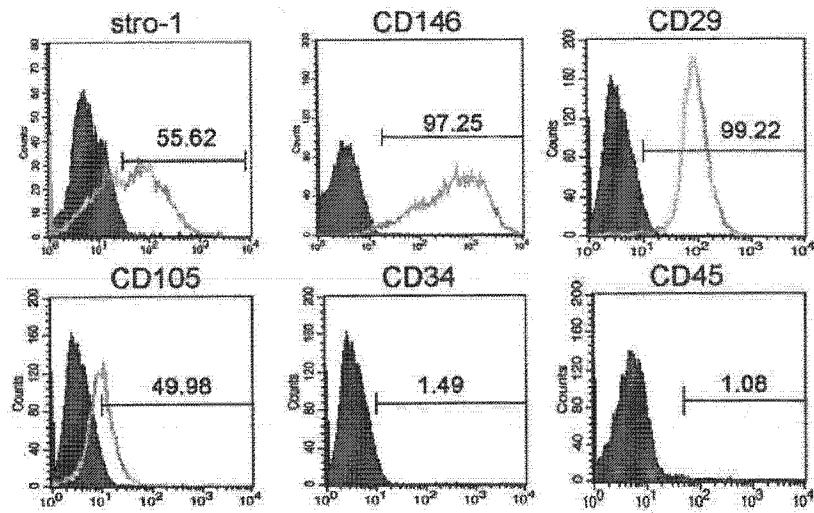


图 5

阴性对照 阳性对照 白杨黄素 柚皮素



图 6

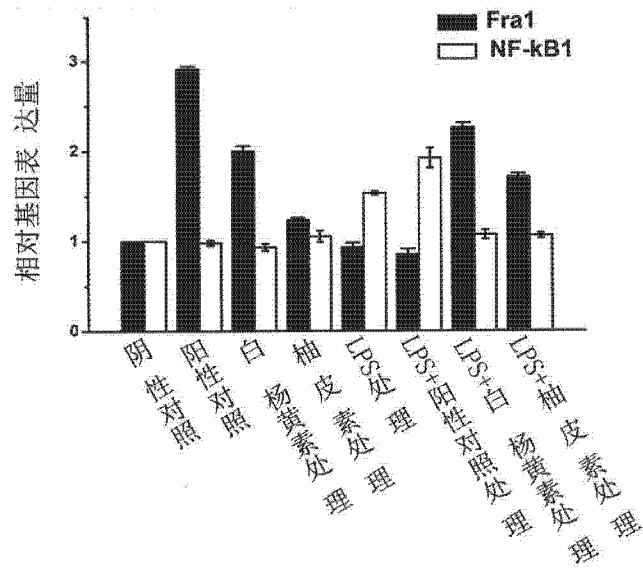


图 7

阴性对照 阳性对照 白杨黄素 柚皮素

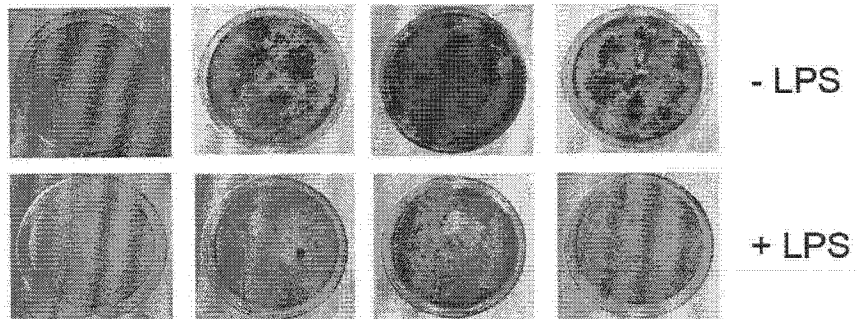


图 8