

石斛多糖 DOP-1-1 的制备及其体外促进骨形成的机制

申雄成¹, 蔡小军¹, 董革辉¹, 黄家恺¹, 张晗祥², 何 斌¹

摘要 目的 制备石斛多糖(DOP-1-1)并探讨其对前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化作用。方法 从铁皮石斛多糖(DOP)中系统分离纯化获得了一种均质多糖(DOP-1-1),并通过高效凝胶渗透色谱法、单糖分析、红外光谱、甲基化分析、GC-MS 和核磁共振光谱研究了 DOP-1-1 的结构。体外实验分别通过 MTT 法、ALP 活性测定和茜素红 S 染色检测 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化的影响。同时,采用 Western blot 测定 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞中骨相关蛋白质(Pin1、BMP2、RUNX2)的表达影响。结果

DOP-1-1 是一种均质多糖,其相对分子量为 3 611,由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成。DOP-1-1 在低浓度下促进成骨细胞增殖的活性,其中 2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ DOP-1-1 的作用相当于阳性对照 17 β -雌二醇(E2)。与对照组比较,E2 和 DOP-1-1 (4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$)使 MC3T3-E1 细胞中 ALP 活性和矿化率增加($P < 0.01$)。特别是,DOP-1-1 (8.0 $\mu\text{mol/L}$)的 ALP 活性和矿化率高于阳性对照 E2 ($P < 0.001$)。此外,DOP-1-1 组 MC3T3-E1 细胞中 Pin1、BMP2、RUNX2 蛋白表达高于对照组($P < 0.05$)。结论 DOP-1-1 体外能促进 MC3T3-E1 细胞的增殖、分化和矿化,作用机制与激活 Pin1/BMP2 信号通路相关。

关键词 铁皮石斛多糖;结构鉴定;前成骨细胞;多肽脯氨酰顺反异构酶;骨形态发生蛋白-2

中图分类号 R 318

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1360-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.004

骨质疏松症是一种慢性代谢性骨病,主要发生于绝经后妇女和老年人,严重威胁公众健康^[1]。目前,预防和治疗骨质疏松的临床药物大部分副作用严重^[2]。因此,有必要开发出有效且副作用较小的治疗骨质疏松症药物。近年来,多糖作为一种具有

巨大结构多样性和广泛药理活性的生物大分子,在医药界引起了极大的关注^[3]。最近研究显示铁皮石斛多糖(dendrobium officinale polysaccharides, DOP)抑制破骨细胞相关基因的表达,并抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化,表明其可能有助于成骨^[4]。然而,DOP 中确切的生物活性成分仍不清楚。因此,有必要对 DOP 进行系统研究,包括活性成分提取、纯化、结构表征和生物活性分析。该研究通过分离纯化 DOP 得到一种水溶性多糖(DOP-1-1),并对其结构进行表征,然后体外研究其对小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞的增殖、分化和矿化作用。

1 材料与方法

1.1 材料与化学试剂 铁皮石斛购自北京同仁堂(集团)有限责任公司;纤维素 DEAE-52 和 Sephadex G-75 购自美国 GE Healthcare 公司;17 β -雌二醇(E2)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;胰蛋白酶、II 型胶原酶、FBS 和 α -MEM 购自美国 Gibco BRL 公司。使用的所有其他试剂均为分析级。

1.2 石斛粗多糖的提取 铁皮石斛原球茎(15.0 kg)用去离子水以 1:10 的质量比浸泡 6 h,并在 90 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 3 次,3 h/次。真空过滤后,合并所有提取物,浓缩,加入 95% 乙醇至终浓度 70% 沉淀,静置 48 h。以 2 000 r/min 离心 15 min 后,获得沉淀并表示为石斛粗多糖。石斛粗多糖的多糖含量通过苯酚-硫酸法测定。

1.3 DOP-1-1 的纯化、均一性和分子量测定 将石斛粗多糖(1.2 kg)重新溶解在 2 L 去离子水中,然后移入分液漏斗中,将 400 ml Sevag 试剂[1-丁醇:三氯甲烷(v/v)=1:4]加入到分液漏斗中并剧烈摇晃。分离和浓缩混合物的上清液,透析(截止相对分子量 1 000)并冻干以获得 DOP。将 10 ml DOP 水溶液(25 mg/ml)加载到 DEAE-52-纤维素层析柱(ϕ 2.5 $\times$ 40 cm)上,用去离子水洗脱得到 DOP-1。用苯酚-硫酸法得到洗脱曲线。浓缩后,将主要部分进一步加载到 Sephadex G-75 凝胶柱(ϕ 1.6 $\times$ 100 cm)上,用蒸馏水洗脱得到 DOP-1-1,得率为 17.2%,多

2022-04-30 接收

基金项目:遵义市科技计划项目(编号:遵市科合 HZ 字[2020]236 号);贵州省卫生健康委科学技术基金项目(编号:gzwj2019-1-195)

作者单位:¹ 遵义医科大学第三附属医院(遵义市第一人民医院)骨科,遵义 563000

² 遵义医科大学附属医院,遵义 563000

作者简介:申雄成,男,主治医师;

何 斌,男,博士,主任医师,责任作者, E-mail: hechunjun199204@163.com

糖含量为 81.4%。

在配备 Waters 2414 示差折光检测器(美国 Waters 公司)的 Agilent 1260 HPLC 系统(美国 Agilent 公司)上通过高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)测量 DOP-1-1 的均匀性和分子量。使用 TSK-GEL G-5000PWXL 凝胶柱(日本 Tosoh Biosep 公司),双蒸水作为流动相,流速为 0.4 ml/min。使用葡聚糖 T 系列标准品(葡聚糖 T400、T300、T200、T125、T45、T20、T10 和 T5)绘制标准曲线,用于计算 DOP-1-1 的相对分子量。

1.4 DOP-1-1 的化学结构分析 将干燥的 KBr (140 mg)和 DOP-1-1 (2 mg)的混合物研磨并压成颗粒。使用 FT-IR 光谱仪记录 DOP-1-1 在 4 000 ~ 400 cm^{-1} 波数范围内红外光谱图。

DOP-1-1 (5 mg)在 2 ml 三氟乙酸(3 mol/L)中 120 $^{\circ}\text{C}$ 水解 6 h,释放单糖成分,减压蒸发。然后,将水解样品用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化,并在配备 ZORBAX Eclipse XDB C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)的 Agilent 1260 HPLC 系统进行分析。此外,标准单糖的混合物也进行了类似的处理。

对 DOP-1-1 进行多次甲基化,直至通过红外光谱仪检测到反应产物的羟基伸缩带消失。将 DOP-1-1 (8 mg)溶于 5 ml 二甲基亚砜(DMSO),然后与 DMSO-NaOH 溶液(600 mg NaOH 溶于 5 ml DMSO)混合。随后,样品在冰浴中冷却,缓慢滴加 500 μl CH_3I ,超声处理 0.5 h(3 次)。DOP-1-1 的甲基化产物在 2 ml, 3 mol TFA 中于 120 $^{\circ}\text{C}$ 水解 6 h,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下用 20 mg 硼氢化钠还原 30 min,最后用 2 ml 吡啶和 2 ml 乙酸酐在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h,得到部分甲基化的糖醇乙酸酯,最后在 GC-MS 系统(GCMSQP 2010, 日本 Shimadzu 公司)上分析以确定糖苷键的类型。

1.5 核磁共振波谱分析 DOP-1-1 (60 mg)溶解在 750 μl D_2O 中,并以 9 000 r/min 离心 5 min。在 Bruker AV-500 光谱仪(德国 Bremen 公司)上进行核磁共振(NMR)光谱分析, ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 频率分别为 500 MHz 和 125 MHz。此外,使用 Bruker 软件提供的标准脉冲序列和参数记录二维(2D) NMR 光谱(HSQC 和 HMBC)。

1.6 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 MC3T3-E1 细胞接种在常规生长培养基(α -MEM 培养基,含有 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素),并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中培养。使用 CCK-8 试剂盒评估 DOP-1-1 对 MC3T3-E1

细胞增殖的影响。将 MC3T3-E1 细胞稀释至 1×10^4 个/ml,接种到 96 孔板上并培养 24 h,然后加入不同浓度 DOP-1-1 (0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$),再培养 48 h。此外,孔中分别加入或不加入 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ E2 作为阳性或空白对照。加入 CCK-8(日本 Dojindo Kumamoto 公司)溶液(10 $\mu\text{l}/\text{孔}$)后,将细胞培养板进一步孵育 1 h。最后,用微孔板分光光度计在 450 nm 处读取每个孔的吸光度。根据以下公式计算增殖率(W): $W = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{blank}} \times 100\%$,其中 A 是 5 次重复实验的平均吸光度。

1.7 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞分化的影响 将 MC3T3-E1 细胞(1.5×10^5 个/ml)接种在 24 孔培养板上并培养 48 h。然后,将培养基改变为含有常规生长培养基的骨质发生分化培养基(osteogenic differentiation medium, ODM),其含有 10 mmol/L β -甘油磷酸盐和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗坏血酸。将细胞分为以下几组:对照组(仅加入 ODM),阳性对照组(加入含有 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ E2 的 ODM),以及不同浓度 DOP-1-1 处理组(加入含有不同浓度 DOP-1-1 的 ODM)。在第 8 天,分别使用碱性磷酸酶检测试剂盒(上海 Beyotime 公司)和 BCA 蛋白质定量试剂盒(美国 Sigma 公司)测定 ALP 活性和总蛋白质含量,然后将 ALP 含量标准化。

1.8 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞矿化的影响 参考文献方法^[5],监测 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞钙化沉积物的影响。将细胞(1.5×10^5 个/ml)接种到 12 孔培养板上并培养 72 h。将细胞分为以下几组:对照组(仅加入 ODM),阳性对照组(加入含有 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ E2 的 ODM),以及不同浓度 DOP-1-1 处理组(加入含有不同浓度 DOP-1-1 的 ODM)。培养 20 d 后,用 10% 福尔马林固定细胞 30 min,并用 1.0% 茜素红 S 染色 30 min。将细胞冲洗后,获得 MC3T3-E1 细胞的钙化沉积物的图像。最后,每个孔加入 10% (v/v) 氯化十六烷基吡啶鎓,通过微孔板分光光度计在 562 nm 下检测吸光度值,以定量钙化沉积物。

1.9 Western blot 测定 将 MC3T3-E1 细胞接种到 6 孔培养板上(6×10^4 个/ml)并培养 48 h,将培养基替换为 ODM。然后用 4.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DOP-1-1 处理细胞 6 d。收集细胞,加入 RIPA 缓冲液(美国 Thermo 公司)裂解,并使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。将相等量的蛋白质裂解物加载到 10% SDS-PAGE 凝胶上进行分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司)中。将膜

在 3% BSA 中封闭 2 h, 用含有 0.1% 吐温 20 的 PBS 洗涤, 并在 4 °C 下与 Pin1 (1 : 1 000)、BMP2 (1 : 1 000)、RUNX2 (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 2 000) 一抗孵育过夜, 均购自英国 Abcam 公司。12 h 后, 将膜与 HRP 缀合的二抗孵育 60 min, 并通过增强化学发光检测条带, 使用 Image J 软件对蛋白质水平进行光密度测定。

1.10 统计学处理 研究结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析采用单因素方差分析 (ANOVA) 或 Student's *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DOP-1-1 的分离纯化、均一性、分子量和化学结构分析 图 1A 显示了 DOP-1-1 的 HPGPC 谱图, 显示了一个单一且对称的峰, 表明 DOP-1-1 是均一的多糖。根据标准曲线, DOP-1-1 的平均分子量计算值为 3 611。图 1B 中显示了 FT-IR 光谱分析鉴定 DOP-1-1 的特征官能团。DOP-1-1 的 -OH 和 C-

H 拉伸振动引起 $3\,390\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,930\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带, -OH 变形振动引起 $1\,628\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带, $1\,200 \sim 1\,000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的所有吸收带表明存在吡喃糖环。在 DOP-1-1 的 IR 光谱中存在 933 cm^{-1} 和 761 cm^{-1} 的吸收带均归化吡喃糖的不对称拉伸振动。图 2 显示了 DOP-1-1 的单糖组成分析的 HPLC 光谱。与标准单糖的保留时间比较, DOP-1-1 由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成。通过水解 DOP-1-1 的甲基化产物并乙酰化, 得到部分甲基化阿尔迪醇乙酸酯 (partially methylated alditol acetates, PMAA)。GCMS 是一种分析 PMAA 的强大工具, 可以提供有关 DOP-1-1 的糖苷酰基信息, 见表 1。

2.2 DOP-1-1 的核磁共振波谱分析 在 DOP-1-1 的 HSQC 光谱中, 在 5.32/99.7、5.14/91.8、4.89/98.5、5.26/100.0 和 4.59/95.7 ppm 处观察到 5 个相关峰异谱区 (图 3A)。上述分析结果表明, DOP-1-1 中有 5 个糖残基, 分别命名为 A、B、D、E 和 F, 与甲基化和 GC-MS 分析结果一致。因此, 通过 GC-MS

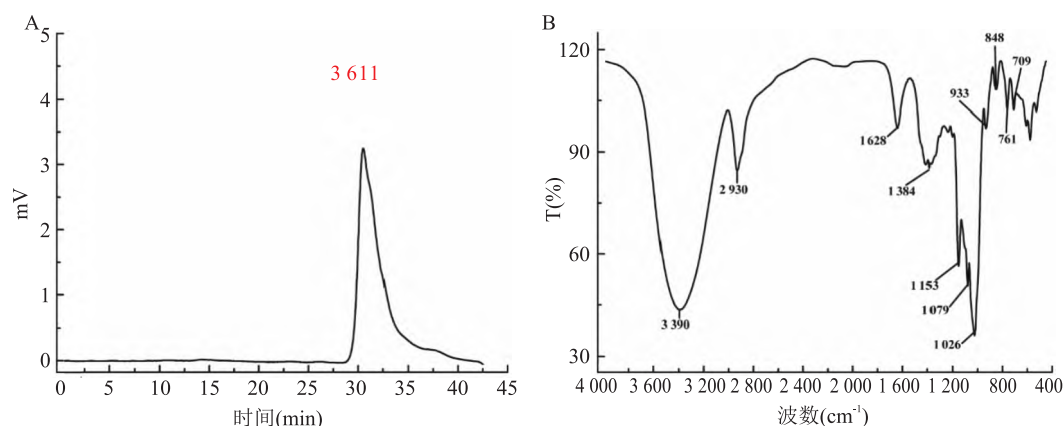


图 1 DOP-1-1 的分离纯化、均一性、分子量和化学结构分析

A: HPGPC 色谱图; B: FT-IR 光谱图

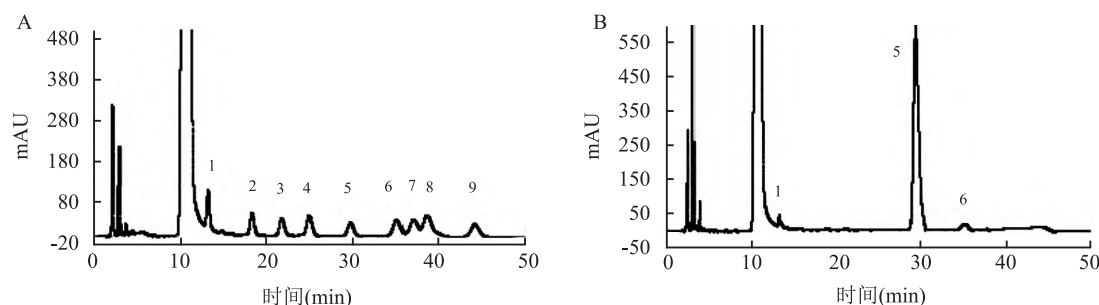


图 2 DOP-1-1 的单糖组分分析

A: PMP-PRO-HPLC 分析 9 种标准单糖; B: PMP-PRO-HPLC 分析 DOP-1-1 的单糖组分; 1: 甘露糖; 2: 鼠李糖; 3: 葡萄糖酸; 4: 半乳糖; 5: 葡萄糖; 6: 半乳糖; 7: 木糖; 8: 阿拉伯糖; 9: 岩藻糖

表 1 DOP-1-1 的 GC-MS 甲基化分析数据

PMAA	连接类型	摩尔比率	质量碎片 (m/z)
1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-galactitol	→6)-D-Gal-(1→	1	43, 71, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189, 233
1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol	D-Glc-(1→	1	43, 71, 87, 101, 113, 117, 129, 145, 161, 205
1,3,5,6-tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-D-mannitol	→3,6)-D-Man-(1→	1	43, 85, 87, 117, 129, 143, 185, 231, 305
1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-D-glucitol	→4)-D-Glc-(1→	19	43, 71, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 161, 173, 203, 233
1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol	→6)-D-Glc-(1→	2	43, 85, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189, 233

分析和 NMR 分析相结合,获得了残基 A、B、D、E 和 F 的质子和碳化学位移,见表 2。最后,对 DOP-1-1 的 HMBC 谱进行了分析,以获得糖残基间的连锁位点和序列信息。A 残基在 HSQC 谱的异谱区显示出最强的相关信号,两个强相关峰位于 HMBC 光谱中 5.32/76.9 和 3.58/99.7 ppm 处,见图 3B。同时,GC-MS 分析表明(1→4)键合葡萄糖占总糖残量的 63.6%。因此,根据所有证据,确认 A 残基为(1→4)-连接葡萄糖。此外,交叉峰在 4.89/67.1 (DH1/EC6)、5.32/70.2 (AH1/DC6)、4.89/70.2 (DH1/DC6)、3.58/95.7 (AH4/FC1)、3.77/99.7 (FH3/AC1)、3.74/76.9 (FH6/AC4)、5.14/99.7 (BH1/AC1)和 3.58/100.0 (AH4/EC1) ppm,表明 E 残基的 C-6 与 D 残基的 O-1 相连,D 残基的 C-6 与 A 残基的 O-1 相连,D 残基的 C-6 与 D 残基的 O-1 相连,F 残基的 C-1 与 A 残基的 O-4 相连,A 残基的 C-1 与 F 残基的 O-3 相连,A 残基的 C-4 与 F 残基的 O-6 相连,残基 A 的 C-1 与残基 B 的 O-1 相连,残基 E 的 C-1 与残基 A 的 O-4 相连。最后,通过相对分子量、单糖分析、甲基化分析和 NMR 数据的组合,得到 DOP-1-1 的推测结构,见图 4。

表 2 DOP-1-1 在 D₂O 中记录的¹H 和¹³C NMR 化学位移

糖残基	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	H1	H2	H3	H4	H5	H6
→4)-α-D-Glcp-(1→	99.7	71.9	73.2	76.9	72.7	60.4
A	5.32	3.55	3.89	3.58	3.62	3.76/3.76
α-D-Glcp-(1→	91.8	72.1	72.7	72.8	69.3	60.4
B	5.14	3.50	3.60	3.76	3.34	3.77/3.75
→6)-α-D-Glcp-(1→	98.5	70.7	67.9	76.6	71.3	70.2
D	4.89	3.51	3.79	3.89	3.58	3.77
→6)-α-D-Galp-(1→	100.0	72.2	72.9	69.3	72.6	67.1
E	5.26	3.55	3.62	3.64	3.34	3.84
→3,6)-β-D-Manp-(1→	95.7	73.9	76.7	70.8	71.8	-
F	4.59	3.19	3.77	3.95	3.80	3.74

2.3 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞增殖和分化的影响 研究评估了 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞的增殖活性。图 5A 显示了 DOP-1-1 在 2.0、4.0 和 8.0 μmol/L 浓度下的增殖率分别达到 13.80%、20.51%

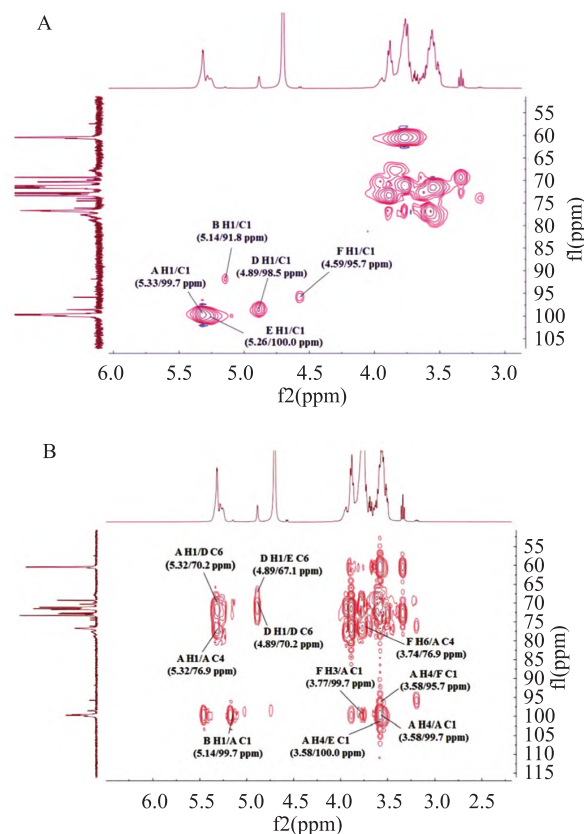
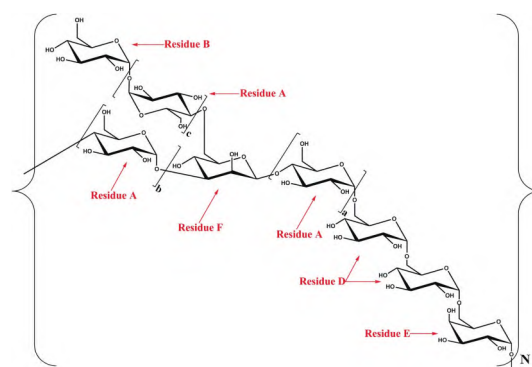
图 3 DOP-1-1 的核磁共振波谱分析
A:HSQC 光谱图;B:HMBC 光谱图

图 4 DOP-1-1 的预测结构

和 7.63%,阳性对照 E2 的增殖率为 18.90%。结果表明 DOP-1-1 在低浓度下促进成骨细胞增殖的活性,其中 DOP-1-1 的 2.0 和 4.0 μmol/L 的作用相当

于阳性对照 E2。因此,选择 2.0、4.0 和 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 DOP-1-1 用于以下研究。

ALP 活性被广泛认为是成骨细胞分化的重要早期标志物。如图 5B 所示,与正常组比较,对照组的 ALP 活性增加($t = 11.678, P < 0.001$),表明成骨培养基可以成功诱导 MC3T3-E1 细胞的矿化。与对照组比较,E2 和 DOP-1-1 (4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$) 均显著提高 ALP 活性($t = 7.480、4.583、9.417, P < 0.01$)。特别是,DOP-1-1 (8.0 $\mu\text{mol/L}$) 的 ALP 活性高于阳性对照 E2 ($t = 3.542, P = 0.025$)。

2.4 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞矿化的影响 矿化结节的形成是成骨细胞的主要功能。如图 6A 所示,与正常组比较,对照组中矿化结节的存在表明成骨培养基可以成功诱导 MC3T3-E1 细胞的矿化。与对照组比较,E2 和 DOP-1-1 (2.0、4.0 和 8.0 $\mu\text{mol/L}$) 提高了矿化率($t = 7.144、6.920、14.315、7.367, P < 0.001$);并且 DOP-1-1 (4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$) 的矿化率高于阳性对照 E2 组(6.532、3.477, $P < 0.05$),见图 6B。因此,DOP-1-1 表现出成骨矿化作用,甚至优于阳性对照 E2。因此,选择 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 DOP-1-1 用于以下研究。

为了探索 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞的成骨分化作用,通过蛋 Western blot 分析成骨相关蛋白质的表达。如图 6C、D 所示,与正常组比较,对照组 Pin1、BMP2、RUNX2 蛋白表达增加($t = 3.312、3.015、2.742, P = 0.025、0.030、0.037$),而 DOP-1-1

组 Pin1、BMP2、RUNX2 蛋白表达高于对照组($t = 2.904、4.612、4.831, P = 0.032、0.007、0.004$)。

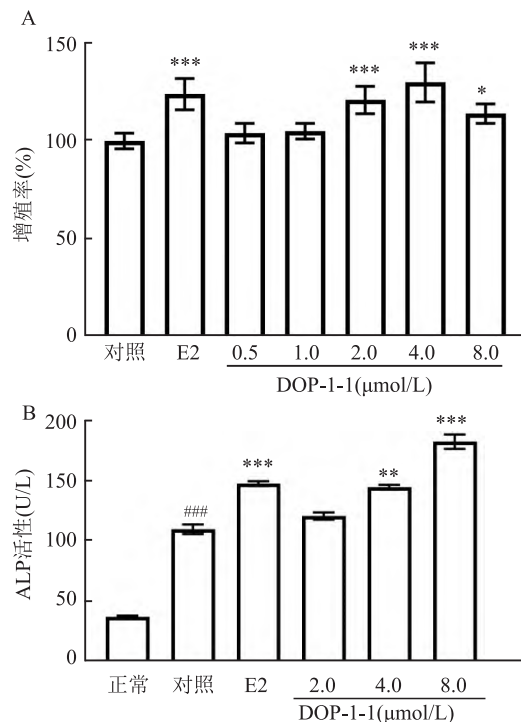


图5 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞增殖和分化的影响($n = 3$)

A: CCK-8 法检测不同浓度 DOP-1-1 处理 MC3T3-E1 细胞的增殖活性;B: 不同浓度 DOP-1-1 处理 MC3T3-E1 细胞的 ALP 活性;与正常组比较:### $P < 0.001$;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 E2 组比较: & $P < 0.05$

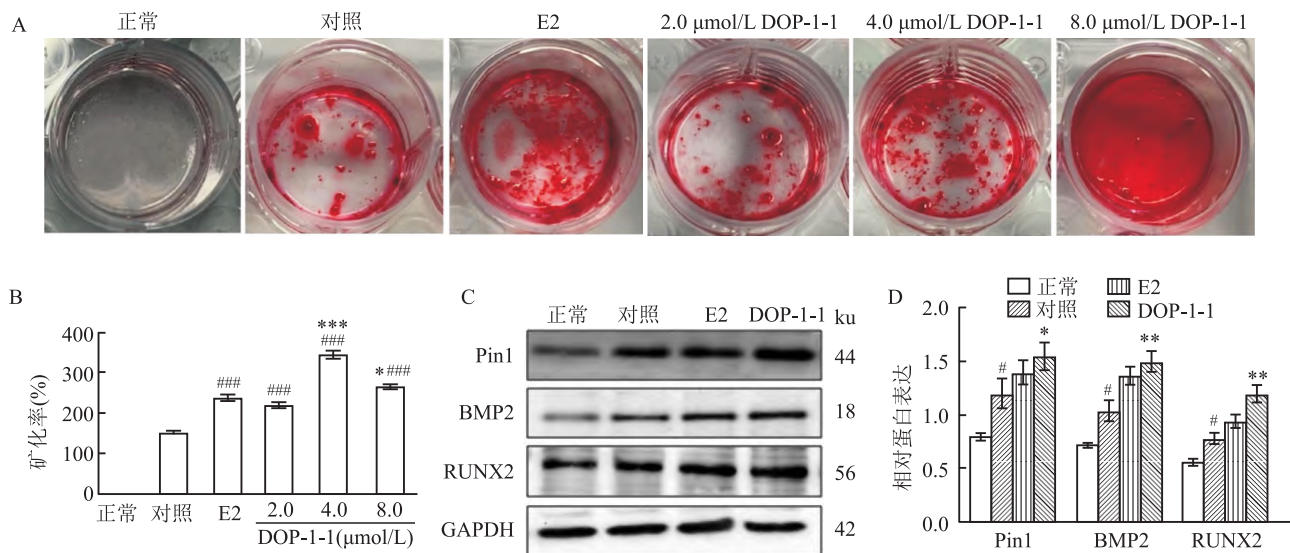


图6 DOP-1-1 对 MC3T3-E1 细胞矿化的影响($n = 3$)

A: 茜素红 S 染色检测不同浓度 DOP-1-1 处理 MC3T3-E1 细胞的代表性图像;B: 茜素红 S 染色的定量分析;C: Western blot 测定不同浓度 DOP-1-1 处理 MC3T3-E1 细胞中骨相关蛋白质表达;D: 骨相关蛋白质表达的定量分析;与正常组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

先前研究^[4]证实,DOP 抑制破骨细胞相关基因的表达和相关通路蛋白的合成,抑制 RANKL 诱导的 BMMs 的破骨细胞分化,表明 DOP 可能有助于成骨。因此,为了进一步确认 DOP 的生物活性成分,本研究从 DOP 中系统分离纯化获得了一种均质多糖(DOP-1-1),其相对分子量为 3 611。由于结构与活性密切相关,因此研究进一步通过单糖分析、红外光谱、甲基化分析、GC-MS 和核磁共振光谱的组合研究了 DOP-1-1 的结构。首先,单糖组成是多糖最基本的信息,PMP 柱前高效液相色谱法是测定单糖组成的经典方法之一^[6]。先前的研究^[7]表明,成骨活性多糖通常含有甘露糖和半乳糖成分。本研究表明,DOP-1-1 也含有甘露糖和葡萄糖。甲基化/GC-MS 分析可以得到糖残基的组成和相应的百分比。基于单糖组成分析和甲基化分析,核磁共振谱分析可以进一步提供质子和糖残基的碳化学位移、连接位点和序列^[8]。因此,本研究首次确定了 DOP-1-1 的结构特征。

MC3T3-E1 细胞是与成骨细胞分化和矿化相关的研究模型,因为它可以分化并形成含有骨标志物的矿化良好的基质,如 I 型胶原蛋白、ALP 和骨唾液蛋白^[5]。本研究分析显示,DOP-1-1 在低浓度下促进 MC3T3-E1 细胞增殖、分化,其促进作用甚至优于 E2。此外,DOP-1-1 处理的细胞的矿化率增加,甚至比阳性对照 E2 更好。因此,DOP-1-1 可以促进体外成骨细胞的分化和矿化。

Pin1/BMP2 信号通路在激活骨形成基因转录中起重要作用^[9]。Pin1 作为骨细胞分化的主协调器,是一种专门识别磷酸化丝氨酸或苏氨酸与脯氨酸之间肽键的酶。最近研究发现,Pin1^{-/-}小鼠出现发育性骨缺损和矿化减少^[10]。BMP2 是 TGF- β 超家族的成员,在成骨细胞中高度表达并在体外和体内调节成骨细胞分化^[11]。BMP-2 可通过激活 SMAD1/5/8 触发多能间充质细胞分化为成骨细胞谱系^[12]。RUNX2 对成骨细胞分化和骨形成至关重要,RUNX2 通过激活包括骨唾液蛋白、骨桥蛋白和骨钙素在内的末端成骨标记基因,触发前成骨细胞分化为成骨细胞^[13]。本研究中,DOP-1-1 组 Pin1、BMP2、RUNX2 蛋白表达增加,甚至比阳性对照 E2 更好,表明 DOP-1-1 可能通过激活 Pin1 增加 BMP2 的表达和转录活性,BMP2 的表达增加随后刺激了下游骨标记基因 RUNX2 激活,促进了骨形成。

多糖的结构特征如分子量、单糖组成、糖残基类型等,对其生物活性具有重要影响和特殊意义。研究表明,低分子量(分子量 < 5 000)多糖通常表现出相当大的成骨活性^[14]。这项研究表明 DOP-1-1 具有低分子量(3 611),并且还表现出更强的成骨活性。低分子量分子在体内应用中具有更多优势,因为它们更容易被吸收。此外,从牛膝和仙茅中分离的多糖的成骨活性显示出主要存在葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖^[15]。因此,葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖被确定为与成骨活性相关的单糖。本研究发现这些单糖都出现 DOP-1-1 中,这可能是 DOP-1-1 具有更强成骨活性的原因。然而,DOP-1-1 更精确的构效关系仍有待进一步研究。

综上所述,本研究首次确定了 DOP-1-1 的初步结构,并发现其体外能促进 MC3T3-E1 细胞的增殖、分化和矿化,作用机制与激活 Pin1/BMP2 信号通路相关。所有上述研究都表明 DOP-1-1 是一种潜在的天然抗骨质疏松药物,可用于药物治疗。

参考文献

- [1] 许云腾,李西海. 从肾-脑-骨轴初探绝经后骨质疏松骨内稳态失衡的机制[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 39-42.
- [2] 黄晋,李建国,谢兴文,等. 中药复方治疗绝经后骨质疏松症的临床研究概况[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(2): 277-80.
- [3] 边亮,陈华国,周欣. 植物多糖的抗肿瘤活性研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 284-91.
- [4] 李汉青,王芳,何家才. 铁皮石斛多糖对 RANKL 诱导的小鼠骨髓单核细胞向破骨细胞分化影响的体外研究[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(6): 825-30.
- [5] 谢映春,涂小林. 体外激活骨细胞 Notch 信号对骨髓基质细胞成骨分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(9): 891-8.
- [6] Li G Q, Chen P F, Zhao Y T, et al. Isolation, structural characterization and anti-oxidant activity of a novel polysaccharide from garlic bolt[J]. Carbohydr Polym, 2021, 267: 118194.
- [7] Chen X, Li T, Qing D, et al. Structural characterization and osteogenic bioactivities of a novel Humulus lupulus polysaccharide[J]. Food Funct, 2020, 11(1): 1165-75.
- [8] Ye Z, Li T, Qing D, et al. Structural elucidation and osteogenic activity of a novel heteropolysaccharide from Alhagi pseudalhagi[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 171: 185-97.
- [9] Kim H J, Kim W J, Ryoo H M. Post-translational regulations of transcriptional activity of RUNX2[J]. Mol Cells, 2020, 43(2): 160-7.
- [10] Islam R, Yoon W J, Ryoo H M. Pin1, the master orchestrator of bone cell differentiation[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(9): 2339-47.

- [11] 代鹏展, 刘 新. BMP-2 骨吸收作用的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(4): 153–6.
- [12] Li Z, Wang W, Xu H, et al. Effects of altered CXCL12/CXCR4 axis on BMP2/Smad/Runx2/Osterix axis and osteogenic gene expressions during osteogenic differentiation of MSCs [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4): 1680–93.
- [13] Yang J X, Xie P, Li Y S, et al. Osteoclast-derived miR-23a-5p-containing exosomes inhibit osteogenic differentiation by regulating Runx2[J]. *Cell Signal*, 2020, 70: 109504.
- [14] Jiang K, Huang D, Zhang D, et al. Investigation of inulins from the roots of *Morinda officinalis* for potential therapeutic application as anti-osteoporosis agent[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt A): 170–9.
- [15] Wang X, Zhang M, Zhang D, et al. Structural elucidation and anti-osteoporosis activities of polysaccharides obtained from *Curculigo orchoides*[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 203: 292–301.

Preparation of *D. officinale* polysaccharides DOP-1-1 and its mechanism of promoting bone formation *in vitro*

Shen Xiongcheng¹, Cai Xiaojun¹, Dong Gehui¹, Huang Jiakai¹, Zhang Hanxiang², He Bin¹

[¹Dept of Orthopedics, The Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University

(The First People's Hospital of Zunyi city), Zunyi 563000;

²Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000]

Abstract Objective Dendrobium polysaccharide (DOP-1-1) was prepared and its effects on the proliferation, differentiation and mineralization of pre-osteoblast MC3T3-E1 cells were investigated. **Methods** A homogeneous polysaccharide (DOP-1-1) was obtained from Dendrobium officinale polysaccharide (DOP) through systematic separation and purification, and the structure of DOP-1-1 was studied by high-performance gel permeation chromatography, monosaccharide analysis, infrared spectroscopy, methylation analysis, GC-MS and NMR spectroscopy. *In vitro* experiments were performed to detect the effects of DOP-1-1 on the proliferation, differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells by MTT method, ALP activity determination and Alizarin Red S staining. At the same time, Western blot was used to determine the effect of DOP-1-1 on the expression of bone-related proteins (Pin1, BMP2, RUNX2) in MC3T3-E1 cells. **Results** DOP-1-1 was a homogeneous polysaccharide with relative molecular weights of 3 611, which was composed of mannose, glucose and galactose. DOP-1-1 had excellent activity of promoting osteoblast proliferation in a low concentration, and the effects of 2.0 and 4.0 $\mu\text{mol/L}$ of DOP-1-1 were equivalent to Positive Control 17 β -estradiol (E2). Compared with the control group, E2 and DOP-1-1 (4.0, 8.0 $\mu\text{mol/L}$) increased the ALP activity and mineralization rate in MC3T3-E1 cells ($P < 0.01$). In particular, the ALP activity and mineralization rate of DOP-1-1 (8.0 $\mu\text{mol/L}$) were higher than those of the positive control E2 ($P < 0.001$). In addition, the expression of Pin1, BMP2, and RUNX2 protein in MC3T3-E1 cells in the DOP-1-1 group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** DOP-1-1 can promote the proliferation, differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells *in vitro*, and its mechanism is related to the activation of Pin1/BMP2 signaling pathway.

Key words *D. officinale* polysaccharides; structural identification; pre-osteoblast; peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1; bone morphogenetic protein-2