

淫羊藿次苷 II 通过 p38MAPK 调控成骨细胞护骨素表达的体外研究

龚一昕¹, 刘尚全^{1,2}, 袁媛², 张维娜¹

摘要 目的 观察淫羊藿次苷 II (ICA II) 对大鼠成骨细胞 (OBs) 护骨素 (OPG) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 表达水平的影响, 探讨 ICA II 治疗骨质疏松症的相关机制。方法 原代培养 OBs, 分为对照组、ICA II 组、混合组 (ICA II + p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580)、抑制剂组 (SB203580) 组。PNPP 法检测各组 OBs 碱性磷酸酶 (ALP) 活性, Western blot 法检测 p38MAPK 蛋白、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK)、OPG 蛋白水平, RT-PCR 法检测各组 OPG mRNA 水平。结果 与对照组比较, ICA II 组 ALP 活性显著上调 ($P < 0.01$), 混合组 ALP 活性较 ICA II 组下降 ($P < 0.05$); ICA II 组 p-p38MAPK 水平较对照组显著升高 ($P < 0.01$), 混合组 p-p38MAPK 水平较 ICA II 组明显降低 ($P < 0.01$); 各组间总 p38MAPK 表达量无明显差异; ICA II 组 OPG 分泌水平较对照组明显上调 ($P < 0.01$), 混合组 OPG 蛋白分泌与 ICA II 组相比明显受抑制 ($P < 0.01$); ICA II 组 OPG mRNA 水平较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 混合组 OPG mRNA 水平较 ICA II 组下降 ($P < 0.05$)。结论 ICA II 可促进成骨细胞分化和上调成骨细胞 OPG 表达, p38MAPK 信号通路可能参与这一过程。

关键词 淫羊藿次苷 II; 成骨细胞; 护骨素; p38MAPK; 骨质疏松

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1790-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.016

骨质疏松是一种以骨量减少、骨组织微结构退化性改变、骨强度降低为特征的全身代谢性骨病。淫羊藿 (*Herba Epimedii*) 系小檗科 (*Berberidaceae*) 淫羊藿属 (*Epimedii*) 植物, 是中医治疗骨质疏松方剂中使用频率最高的中草药之一^[1]。主要成分淫羊藿苷 (*Icariin*, ICA) 在肠道内脱去糖基生成淫羊藿次苷 II (*Icariside* II, ICA II), 以 ICA II 的形式吸收并发挥作用^[2]。p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinase, p38MAPK) 是真核细胞信号转导调控机制中分布最广、介导胞外信号引起胞内反应的重要信号系统, 可能是成骨细胞的活化、增殖、分化的关键信号通路之一^[3]。该研究通过体外培养大鼠成骨细胞 (osteoblasts, OBs), 观察 ICA II 对大鼠 OBs 的碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 水平、护骨素 (osteoprotegerin, OPG) 表达的影响, 同时应用 p38MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 进行干预, 探讨 ICA II 对 OBs 的作用及其与 p38MAPK 信号通路的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料 出生 24 h 以内的新生 SD 大鼠 (SPF 级) 购自安徽医科大学动物实验中心; 淫羊藿药材

cartilage. **Results** Compared with the control group, knee cartilages of operation groups after 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks were rough, contained erosion, defects, cracks and osteophyte formation from the early to the late stage of OA. There were statistically significant differences in Mankin score between the random two groups ($P < 0.01$), and damage gradually increased. There was statistical significance in synovium score among the groups ($P < 0.01$), and the inflammation gradually decreased. MAC deposited around the cartilage cell membrane in immunohistochemistry. There was no MAC in the synovial membrane basically. The results of Western blot showed that there was a MAC band in the experimental group, while the control group not. **Conclusion** MAC is expressed in cartilage of rats with osteoarthritis, and the complement system may be a new direction for the diagnosis and treatment of osteoarthritis.

Key words osteoarthritis; complement; membrane attack complex; cartilage; synovial membrane

2016-07-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30840106)

作者单位: ¹安徽医科大学第三附属医院内分泌科, 合肥 230061

²合肥市滨湖医院中心实验室, 合肥 230601

作者简介: 龚一昕, 女, 硕士研究生;

刘尚全, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 52100325@qq.com

购自安徽国投中药材市场; DMEM 购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司; Taq 酶及引物由上海生物工程有限公司合成; 胶回收试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; OPG 定量检测试剂盒购自美国 R&D 公司; 抗鼠 p-p38MAPK 单克隆抗体、抗鼠 p38MAPK 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司; 辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; p38MAPK 抑制剂 SB203580 购自美国 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 ICA II 的提取和配置 取 500 g 淫羊藿, 煎煮过滤后减压浓缩, 装入大孔吸附树脂柱, 用乙醇洗脱得洗脱液, 用水-乙酸乙酯系统萃取。加乙醇过滤, 滤液 4 °C 冷藏过夜, 结晶析出沉淀合并洗脱液得 ICA II。

1.2.2 大鼠 OBs 的培养与分组 取出生 24 h 以内的 SD 大鼠, 将头盖骨剪碎, 用 0.25% 胰蛋白酶和 0.1% 的 II 型胶原酶消化, 培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 液 (Glu 5.5 mmol/L 低糖培养液) 中, 置 37 °C、5% CO₂ 恒温孵育箱中培养。将细胞接种于 6 孔板, 随机分组。对照组: DMEM 培养液; ICA II 组: 加入前期研究体外实验中得出的最适浓度 20 ng/dl ICA II^[4]; 混合组: 以 10 μmol/L SB203580^[5] 预培养 1 h 后加入终浓度 20 ng/dl ICA II; 抑制剂 (SB203580) 组: 10 μmol/L SB203580。培养 48 h 后, 分别收集细胞和上清液。

1.2.3 pNPP 法测定 ALP 活性 将 OBs 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μl。培养 48 h 后, 收集细胞上清液, 按照 ALP 检测试剂盒 (pNPP 微板法) 说明书处理各组样品, 酶标仪 520 nm 波长下测定光密度 (optical density, OD) 值。试验结果采用 ALP 活性率来评价细胞 ALP 活性。

1.2.4 Western blot 法检测 p38MAPK、p-p38MAPK、OPG 蛋白的表达 弃培养液, 用 PBS 漂洗 2 遍后, 加入细胞裂解液静置于冰上裂解 30 min。4 °C、12 000 r/min 冷冻离心 5 min, 取上清液, BCA 法对蛋白浓度进行定量。取各组蛋白经 15% 聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 电泳后转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温下摇床震荡封闭 2 h。加入 p-p38MAPK、p38MAPK、兔抗鼠 OPG 抗体和 β-actin 一抗孵育过夜。次日 TBST 漂洗 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 37 °C 孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, 用化学发光法检测目的蛋白。

1.2.5 RT-PCR 法测定 OBs 中 OPG mRNA 表达

TRIzol 法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度仪检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 比值 (A₂₆₀/A₂₈₀) 在 1.6 ~ 1.8, 计算 RNA 浓度。取 2 μg 总 RNA 按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。构建 20 μl 反应体系。逆转录产物分别进行 OPG 及管家基因 (β-actin) 的扩增。使用 Primer Premier 设计引物, 上海生物工程有限公司合成特异性引物。OPG 引物序列 F: 5'-CGAGTGATGAATGCCGTGA-3', R: 5'-TTCTGAAGTAGCAGGAGGC-3', 反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 63 °C 退火 50 s, 进行 30 个循环后, 终末 72 °C 延伸 10 min。以 β-actin 为内参照, 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 1 min, 进行 30 个循环后, 终末 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物在含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 在紫外成像仪观察结果。以 OPG/β-actin 条带 OD 比值表示 OPG mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据间的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, 相关性分析采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 pNPP 法检测各组大鼠 OBs 的 ALP 活性 与对照组比较, ICA II 组 OBs 在浓度 20 ng/dl 的 ICA II 刺激下细胞 ALP 活性显著提高 (3.96 ± 0.08 U/gprot vs 2.64 ± 0.06 U/gprot, P < 0.01); 与 ICA II 组比较, SB203580 预先干预的混合组 ALP 活性明显下降 (3.28 ± 0.11 U/gprot vs 3.96 ± 0.08 U/gprot, P < 0.05); 抑制剂组 ALP 活性减少 (2.28 ± 0.08 U/gprot vs 2.64 ± 0.06 U/gprot, P < 0.05)。见图 1。

2.2 Western blot 法检测各组 OBs 的 p-p38MAPK、p38MAPK、OPG 表达水平 ICA II 组 p-p38MAPK 水平为对照组的 2.23 倍 (P < 0.01), 混合组与 ICA II 组比较 p-p38MAPK 表达明显减少 (P < 0.01)。抑制剂组与对照组、混合组与抑制剂组间的差异均有统计学意义 (P < 0.05)。各组数据显示, p38MAPK 总量差异无统计学意义。ICA II 组 OBs 上清液 OPG 水平与对照组比较明显升高, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。混合组 ICA II 和 SB203580 共同作用时, 后者可以抑制 p38MAPK 通路, 使 OPG 的表达显著下降 (P < 0.01)。混合组与抑制剂组 (P < 0.01)、抑制剂组与对照组 (P < 0.05) 之间的差异均具有统计学意义。对照组与混

合组之间的差异无统计学意义。见图2、表1。

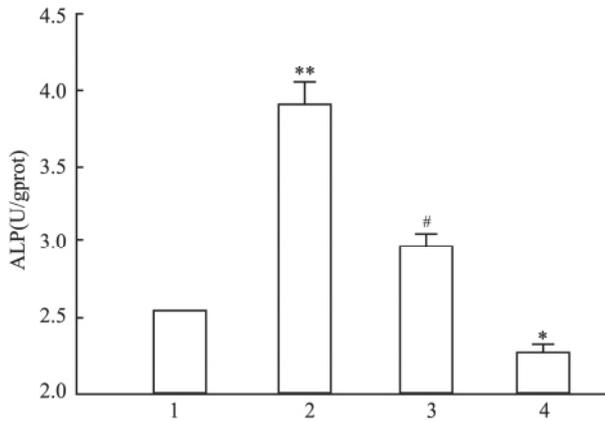


图1 各组 OBs ALP 活性

1: 对照组; 2: ICA II 组; 3: 混合组; 4: 抑制剂组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ICA II 组比较: # $P < 0.05$

2.3 PCR 法检测各组大鼠 OBs 的 OPG mRNA 的表达 对照组 OBs 低水平表达 OPG mRNA (0.70 ± 0.06), ICA II 组 OPG mRNA 的表达是对照组的 2.51 倍 (1.76 ± 0.09 vs 0.70 ± 0.06 , $P < 0.01$); 混合组的吸光度值较 ICA II 组明显降低 (1.22 ± 0.06 vs 1.79 ± 0.09 , $P < 0.05$)。抑制剂组 OPG mRNA 的表达与对照组相比明显受抑制 (0.21 ± 0.06 vs 0.70 ± 0.06 , $P < 0.05$)。见图3。

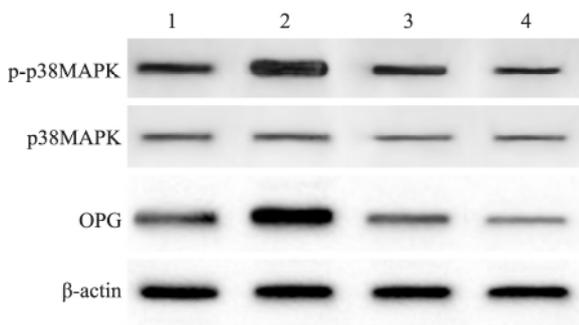


图2 各组 OBs p38MAPK、p-p38MAPK、OPG 相对表达量

1: 对照组; 2: ICA II 组; 3: 混合组; 4: 抑制剂组

表1 各组 OBs p-p38MAPK、p38MAPK、OPG 相对表达量 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-p38MAPK	p38MAPK	OPG
对照	0.48 ± 0.11	0.98 ± 0.05	0.57 ± 0.03
ICA II	$1.07 \pm 0.10^{**}$	1.01 ± 0.08	$1.13 \pm 0.08^{**}$
混合	$0.62 \pm 0.07^{##}$	0.99 ± 0.12	$0.89 \pm 0.07^{##}$
抑制剂	$0.15 \pm 0.06^*$	0.97 ± 0.07	$0.21 \pm 0.05^*$

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ICA II 组比较: ## $P < 0.01$

2.4 相关性分析 根据 Pearson 相关分析, OBs 内 p-p38MAPK 水平与 ALP 水平 ($r = 0.668$, $P < 0.05$)、

OPG 蛋白表达水平 ($r = 0.795$, $P < 0.01$)、OPG mRNA 水平 ($r = 0.695$, $P < 0.05$) 水平呈正相关性。

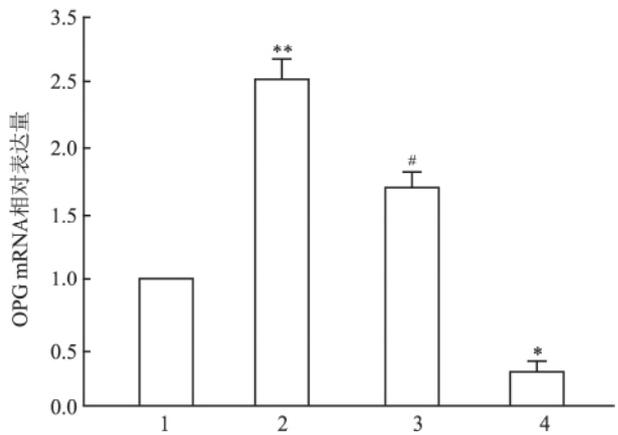
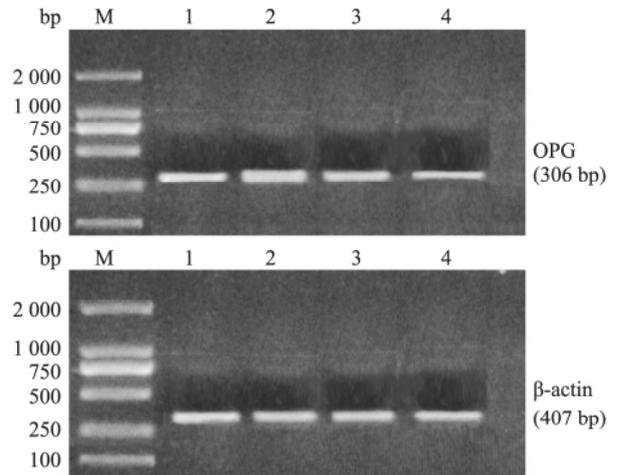


图3 各组 OBs OPG mRNA 相对表达量

1: 对照组; 2: ICA II 组; 3: 混合组; 4: 抑制剂组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ICA II 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松的发病与 OBs 和破骨细胞 (osteoclasts, OCs) 平衡遭到破坏密切相关^[6]。OPG 与其配体 NF- κ B 配体受体 (receptor or activator of NF- κ B ligand, RANKL) 以及破骨膜上的 NF- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 3 者共同构成 OPG-RANKL-RANK 轴, 维持和调节 OBs 和 OCs 的动态平衡^[7-8]。研究^[9-10]表明, RANKL 与 RANK 结合促进 OCs 形成, OBs 分泌 OPG 竞争性结合 RANKL, 使 RANKL 失去结合 RANK 的机会, 诱导 OCs 凋亡, 促进 OBs 增殖分化, 发挥对抗骨质疏松的作用。Yasuda et al^[11]发现, OPG 基因敲除处理的小鼠出现骨质疏松症状, 镜下见小鼠的皮质骨和骨小梁结构明显减少, 提示 OPG 的调控与骨质疏松的防治有密切联系。因此促进 OPG 的表达、诱导 OCs 凋

亡、促进 OBs 的增殖分化成为了骨质疏松防治的重要切入点。ALP 是 OBs 分化的早期标志物之一^[12]。本实验采用 20 ng/dl ICA II 作用于原代培养大鼠 OBs 表明 ICA II 干预后明显上调 OPG 的表达和 ALP 活性,提示 ICA II 有促进 OBs 分化的效应。推测 ICA II 的促成骨作用可能是通过上调 OPG/RANKL 比值,抑制 OCs 成熟实现的。

一切生物学效应的核心环节是细胞信号传递。中药对 OBs 增殖分化涉及的通路包括 cAMP、MAPK、BMP-Smad 等^[13]。MAPKs 信号途径包括细胞外调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38MAPK^[14]。已有文献^[15]报道 ICA 可逆转糖皮质激素对 OBs 增殖分化的抑制作用,并且这一效应与 MAPK/ERK 信号途径密切相关。正常情况下 OBs 的 p38MAPK 是以去磷酸化状态存在,受到外界因素刺激时可发生磷酸化而被激活。本实验显示经 ICA II 刺激后,各组 p38MAPK 总量差异无统计学意义,而 p-p38MAPK 含量明显增加,可见在 ICA II 的干预下 p38MAPK 通路被激活,p38MAPK 抑制剂 SB203580 干预后,ICA II 刺激的 p38MAPK 磷酸化程度以及 OPG 表达的效应均被明显抑制。推测 ICA II 治疗骨质疏松的机制可能与其激活 p38MAPK 信号通路、影响骨代谢、调节 OPG/RANKL/RANK 系统有关。

综上所述,ICA II 可激活 p38MAPK 信号通路上调 OPG 表达和刺激成骨分化从而对治疗骨质疏松症有一定的疗效。然而细胞信号转导通路之间有千丝万缕的联系。与 OPG 基因表达调控相关的信号转导途径,各个信号途径之间的相互关系还有待进一步探讨。

参考文献

[1] 马慧萍,贾正平,白孟海,等.淫羊藿总黄酮对大鼠实验性骨质疏松生化学指标的影响[J].中国药理学通报,2003,19(2):187-90.

[2] 邱峰,陈英杰,鹿野美弘,等.淫羊藿苷在大鼠体内的代谢[J].药学学报,1999,34(3):222-36.

[3] Jameel N M, Thirunavukkarasu C, Wu T, et al. p38-MAPK-and caspase-3-mediated superoxide-induced apoptosis of rat hepatic stellate cells: reversal by retinoic acid[J]. J Cell Physiol, 2009, 218(1):157-66.

[4] 王婧吉,郭子宽,刘尚全,等.淫羊藿次甙 II 对小鼠成骨细胞护骨素表达的影响[J].中华内分泌代谢杂志,2011,27(4):337-8.

[5] 王晓辉,汤旭磊. p38MAPK 与新生大鼠成骨细胞的增殖、分化和凋亡[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,37(13):7227-30.

[6] Harda S, Rodan G A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass[J]. Nature, 2003, 423(6937):349-55.

[7] Bekker P J, Holloway D, Nakanishi A, et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(2):348-60.

[8] Gori F, Hofbauer L C, Dunstan C R, et al. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand the support of osteoclast by stromal-osteoblast lineage cells is developmental regulate[J]. Endocrinology, 2000, 141(12):4768-76.

[9] Kostenuik P J. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength[J]. Curr Opin Pharmacol, 2005, 5(6):618-25.

[10] 刘俊栋,顾建红,翟必华,等.骨保护素对体外培养大鼠破骨细胞的影响[J].中国农业科学,2008,41(2):581-6.

[11] Yasuda H. Bone and bone related biochemical examinations. Bone and collagen related metabolites. Receptor activator of NF-kappaB ligand(RANKL)[J]. Clin Calcium, 2006, 16(6):964-70.

[12] 李娟,吴伟康,余克强.不同实验浓度补肾中药血清对人成骨细胞增殖及分化的促进作用[J].中国临床康复,2005,9(19):82-4.

[13] 陈述祥,康乐.中药促进成骨细胞增殖和分化的机制与作用[J].中国组织工程研究,2012,16(7):1299-302.

[14] 刘立萍,任艳玲,李然,等.左归丸含药血清通过 JNK 信号通路诱导 MC3T3 成骨细胞分化的研究[J].中成药,2012,34(8):1433-7.

[15] 刘尚全,杨颖,周丽斌,等.淫羊藿甙逆转地塞米松抑制成骨细胞分化及其机制[J].中华内分泌代谢杂志,2006,22(3):218-21.

Effect of *Icariside* II on the expression of osteoprotegerin in osteoblasts via p38MAPK signaling pathway *in vitro*

Gong Yixin¹, Liu Shangquan^{1,2}, Yuan Yuan², et al

(¹Dept of Endocrinology, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061;

²Central Laboratory, Binhu Hospital of Hefei City, Hefei 230601)

Abstract Objective To observe the effect of *Icariside* II (ICA II) on the expression of osteoprotegerin(OPG) and p38 mitogen-activated protein kinase(p38MAPK) in osteoblasts(OBs), explore the mechanism of ICA II ther-

Wnt3a 和 TCF4 在人卵巢癌中的表达及临床意义

戴 朦^{1,2} 沈国栋^{1,2} 程 民^{1,2} 徐婷娟^{1,2} 翁海燕³ 胡世莲^{1,2} 沈 干^{1,2}

摘要 目的 探讨 Wnt 信号通路中关键蛋白 Wnt3a 和 TCF4 在卵巢癌中的表达水平以及临床意义。方法 ELISA 法检测 10 例卵巢癌患者手术前后和 10 例健康对照者血浆 Wnt3a 浓度, Western blot、qRT-PCR 法检测卵巢癌患者与卵巢良性病变者的卵巢组织 Wnt3a、TCF4 水平。采用 Western blot 法检测卵巢癌细胞株 SKOV3 与 HO8910 中 TCF4 的表达, 采用 dnTCF4 质粒转染技术获得 TCF4 表达下降的 SK-OV3/dnTCF4 细胞, 使用细胞划痕实验比较卵巢癌细胞转移能力。结果 卵巢癌患者血浆 Wnt3a 水平高于健康对照者 ($P < 0.05$), 且术后血浆 Wnt3a 水平低于术前 ($P < 0.05$); 卵巢癌组织中 Wnt3a、TCF4 水平高于卵巢良性病变者 ($P < 0.05$); SKOV3 的 TCF4 表达量高于 HO8910 且转移潜能也明显高于后者 ($P < 0.05$); 将 SKOV3 的 TCF4 敲低, 其转移能力明显减弱 ($P < 0.05$)。结论 Wnt 信号通路参与卵巢癌的发生发展, Wnt3a 和 TCF4 有可能成为监测卵巢癌进展的临床指标之一。

关键词 卵巢癌; Wnt3a; TCF4; 转移

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2016)12 - 1794 - 06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2016.12.017

卵巢恶性肿瘤是当前病死率最高的妇科肿瘤之一^[1], 约 90% 为上皮性, 即卵巢癌。近年来卵巢恶性肿瘤发病率呈上升趋势, 2015 年全球统计结果表明每年约有 24 万新发病例, 15 万死亡病例, 病死率可高达 63%^[2]。卵巢深居盆腔, 起病比较隐匿, 超过 70% 的卵巢恶性肿瘤患者早期缺乏明显的临床表现和有效的诊断技术, 确诊时已是晚期^[3], 这是导致高死亡率的一个主要原因。Wnt 信号通路在卵巢组织的胚胎发育和卵巢细胞增殖、分化及恶性转化过程中起着重要作用^[4-5], 已成为当前研究的热点。经典 Wnt 信号通路的主要组成为 Wnt 分泌蛋白、跨膜受体卷曲蛋白 (Frizzled)、松散蛋白 (dishevelled)、 β -catenin (β -连环蛋白)、糖元合成激酶 3 β (GSK3 β)、结肠腺瘤性息肉蛋白 (APC)、轴蛋白 (axin scaffolding protein)、T-细胞因子 (TCF)、酪蛋白激酶 1 (CK1) 等^[6]。当 Wnt 信号分子与细胞膜上特异性受体 Frizzled 蛋白结合后, Wnt 信号通路被激活, 使 β -catenin 不能被降解复合物磷酸化, 以便在胞质

2016 - 07 - 28 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (编号: 1408085MH167); 安徽省科技攻关项目 (编号: 1301042094)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 老年病科、² 肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室、³ 病理科, 合肥 230001

作者简介: 戴 朦, 女, 硕士研究生;

沈 干, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: shenganustc@163.com

apy in osteoporosis treatment. **Methods** Primary osteoblasts were cultured and randomly separated into four groups: control group, group ICA II, mixed group (ICA II + SB203580), group SB203580 (p38 signaling pathway inhibitor). ALP activity levels were detected by pNPP method. The protein levels of p38MAPK, p-p38MAPK and OPG were measured by Western blot. The expression of OPG mRNAs was detected by RT-PCR. **Results** Group ICA II showed a significant increase in the level of ALP activity ($P < 0.01$), compared to the control group. ALP activity showed a decrease in the mixed group, compared to group ICA II ($P < 0.05$). p-p38MAPK level in group ICA II was remarkably higher than that of the control group ($P < 0.01$). The p-p38MAPK level was significantly decreased in the mixed group ($P < 0.01$). Among all of the groups, the total p38MAPK protein level kept unchanged. The level of OPG in group ICA II was remarkably higher than that of the control group ($P < 0.01$). The mixed group showed a decrease in the expression of OPG, compared to group ICA II ($P < 0.01$). The gene expression level of OPG was significantly upregulated in group ICA II compared to the control group ($P < 0.01$). In the mixed group, the expression of OPG mRNA showed a decrease ($P < 0.05$). **Conclusion** ICA II can stimulate the differentiation of osteoblasts, and promote the expression of OPG in osteoblasts. The process may be related to p38MAPK signaling pathway.

Key words Icariside II; osteoblasts; osteoprotegerin; p38MAPK; osteoporosis