

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-02-012

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

EGCG 联合力学刺激对成骨细胞增殖与分化的影响

祝英文^{ab}, 黄海玲^{ab}, 李亚楠^{ab}, 胡婷婷^{ab}, 韩标^{ab}, 郭勇^{ab}

(桂林医学院 a.智能医学与生物技术学院, b.广西高校生物化学与分子生物学重点实验室, 桂林 541199)

摘要 目的 探究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)联合力学刺激(MS)对成骨细胞增殖分化的诱导作用。方法 实验分为对照组、EGCG 组、MS 组、EGCG+MS 组;采用 MTT 法检测 EGCG 对成骨细胞的增殖活性;采用茜素红染色法检测 EGCG 对成骨细胞矿化的影响;采用四点弯曲力学加载装置向细胞施加力学载荷,应用碱性磷酸酶(ALP)测试盒检测 ALP 活性;采用免疫印迹法检测成骨细胞 runt 相关转录因子-2(Runx-2)和 I 型胶原蛋白(Col-I)的表达。结果 浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG 对成骨细胞的增殖作用最明显,差异有统计学意义($P<0.05$);EGCG 组的矿化结节数量多于对照组,与单一 EGCG 组和 MS 组相比,EGCG+MS 组 ALP 活性明显提高,Runx-2 和 Col-I 蛋白的表达增加($P<0.05$)。结论 EGCG 联合力学刺激增强了成骨细胞 ALP 活性以及 Runx-2 和 Col-I 蛋白的表达,成骨细胞的增殖与分化能力增加。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯;成骨细胞;力学刺激;成骨分化

中图分类号: R318.01

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)02-0081-06

Effects of epigallocatechin-3-gallate coupled with mechanical stimulation on the proliferation and differentiation of osteoblast

ZHU Yingwen^{ab}, HUANG Hailing^{ab}, LI Yanan^{ab}, HU Tingting^{ab}, HAN Biao^{ab}, GUO Yong^{ab}

(a. College of Intelligent Medicine & Biotechnology, b. Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology of Guangxi Institutions of Higher Learning, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract Objective To investigate the effect of epigallocatechin gallate (EGCG) coupled with mechanical stimulation (MS) on the proliferation and differentiation in osteoblasts. **Methods** The osteoblasts were divided into control group, EGCG group, MS group, and EGCG+MS group. The proliferation of osteoblasts was detected by MTT assay. The mineralisation of osteoblasts were detected by alizarin red staining method. The mechanical load was applied to the cells by a four-point bending mechanical loading device, and the Alkaline Phosphatase (ALP) Test Kit was used to detect the ALP activity. The protein expressions of runt-related transcription factor-2 (Runx-2) and collagen type I (Col-I) in osteoblasts were detected by western blot. **Results** EGCG at a concentration of 30 $\mu\text{mol/L}$

基金项目: 国家自然科学基金项目(32071309, 11202113); 广西自然科学基金项目(2019JJB140312)。

第一作者: 祝英文, 硕士研究生, 研究方向为生物力学与组织工程。

通信作者: 郭勇, guoyong74@163.com。

had the most pronounced proliferative effect on osteoblasts, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The number of mineralised nodules in the EGCG group was greater than that in the control group. Compared with the single EGCG or MS groups, the ALP activity, in the EGCG+MS group was significantly increased and the protein expressions of Runx-2 and Col-I in the EGCG+MS group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** EGCG-coupled mechanical stimulation enhances the ALP activity, up-regulates the expressions of Runx-2 and Col-I proteins in osteoblasts, and promotes osteoblasts' proliferation and differentiation.

Keywords: epigallocatechin gallate; osteoblast; mechanical stimulation; osteogenic differentiation

骨质疏松症是一种骨骼系统疾病,其特征是骨吸收增强导致骨质流失、骨组织微结构退化,骨骼变得脆弱,进而发生骨折风险增加^[1-2]。骨重建是一个不断有新骨形成和旧骨分解吸收的动态过程,这个过程受激素、代谢和力学刺激影响^[3-4]。适当的力学刺激在维持骨的量、密度及骨的生物力学稳定等方面有不可替代的作用^[5]。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是茶叶的主要成分之一,是儿茶素中含量最多、药理作用最强的化合物^[6]。EGCG具有多种生物学功能,如抗氧化、抗炎、抗癌、抗感染等生物活性^[7-9]。EGCG可通过抑制氧化应激作用而促进成骨细胞分化^[10-12],也可促进骨髓间充质干细胞的成骨分化,增强成骨细胞的骨形成^[13]。研究^[14]表明,茶多酚可减轻雌激素缺乏导致的骨质流失并改善骨的微结构,降低骨质疏松的发生率。

将运动与药物治疗有效地联合起来是改善骨质疏松症的有效手段^[15-17]。成骨细胞是感应运动力学信号的主要效应细胞,并将力学信号转变为生物学信号,诱导骨形成^[18-19]。研究^[20-22]结果显示,应用四点弯曲力学加载装置向成骨细胞施加强度为 2 500 μe 、频率为 0.5 Hz 的周期应变载荷,可上调成骨细胞 ALP、Runx-2 和 I 型胶原蛋白 Col-I 基因的表达,促进成骨细胞的增殖和分化。成骨细胞矿化是骨组织独有的特征和新骨形成的重要环节,矿化标志物能够直接反映成骨的形成情况^[23]。本研究旨在探讨茶多酚 EGCG 联合力学刺激对成骨细胞增殖与分化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器

前成骨细胞购自上海通派生物科技有限公司; epigallocatechin gallate 购自上海 MedChemExpress LLC 公司;胎牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;DMSO 试剂、蛋白酶抑制剂、碱性磷酸酶染色液、胰酶蛋白购自美国 Sigma 公司;MTT 购自上海蓝季生物公司;RIPA 裂解液、超敏 ECL 化学发光试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所; β -actin、RUNX-2、COL-1A1 一抗(兔单抗)、二抗(山羊抗兔)购自武汉 ABclonal 公司;成骨细胞矿化结节染色液购自北京雷根生物技术有限公司;碱性磷酸酶测试盒购自南京建成生物工程研究所;四点弯曲力学加载设备购自中国人民解放军军事医学科学院。

1.2 方法

1.2.1 常用试剂准备 EGCG 母液:将 22.9 mg EGCG 粉剂溶于 0.5 mL DMSO 溶液,制成浓度为 100 mmol/L 的 EGCG 母液。5 mg/mL 的 MTT 溶液:取 50 mg MTT 加入 10 mL PBS 缓冲液,充分溶解、混匀,配成 5 mg/mL 的 MTT 溶液。

1.2.2 成骨细胞培养 成骨细胞复苏后,接种于含 10%胎牛血清、1%青霉素和 1%链霉素的 DMEM 培养基(完全 DMEM 培养基),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 实验设对照组和 3 个 EGCG 浓度组。取对数生长期的成骨细胞,以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h 后,弃掉培养基。实验组用完全 DMEM 培养基培养,3 个 EGCG 浓度组用完全 DMEM 培养基和浓度分别为 15、30 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG 培养。培养 72 h 后,加入 50 μL 配制好的 MTT 试

剂,孵育4 h后,弃上清液,随后加入150 μL DMSO溶液,振荡摇匀,使用酶标仪检测,检测波长为490 nm。

1.2.4 茜素红染色检测成骨细胞的矿化能力 取生长状况良好的成骨细胞以 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,培养24 h后,实验组加入含EGCG的完全DMEM培养基培养,EGCG浓度为30 $\mu\text{mol/L}$,对照组只加入完全DMEM培养基培养,3 d更换培养基1次,并对细胞进行观察;培养14 d后,用PBS缓冲液洗细胞2次,之后使用4%的聚甲醛溶液在常温下固定细胞15 min;弃固定液,用PBS冲洗2遍;加入茜素红染色覆盖细胞,孵育30 min后,用双蒸馏水洗3次后,使用显微镜观察,记录实验数据。

1.2.5 细胞加载实验 实验分为4组:对照组,EGCG组(30 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG干预),MS组(力学加载),EGCG+MS组(30 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG干预和力学加载)。将生长状态良好的成骨细胞以 2×10^5 个/孔接种于4点弯曲细胞加载装置的培养小室中,轻轻混匀,置于37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 细胞培养箱中培养。待细胞生长至融合时,EGCG组和EGCG+MS组用含30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG的完全DMEM培养基培养,对照组和MS组只用完全DMEM培养基培养。培养2 h后,将对照组和EGCG组放置培养箱上层,向MS组和EGCG+MS组施加2 500 μe 、0.5 Hz的周期性张应变,持续时间1 h,连续加载3 d。

1.2.6 ALP活性检测 进行加载实验的成骨细胞培养72 h后,终止细胞培养,收集细胞培养液于2 mL离心管中,以1 000 r/min离心10 min;取上清液,采用碱性磷酸酶试剂盒进行ALP活性检测,酶标仪检测波长为520 nm。

1.2.7 免疫印迹法检测Runx-2和Col-I蛋白的表达 细胞力学加载实验结束后,细胞继续培养2 h后终止培养,使用细胞裂解液提取总蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒进行总蛋白定量。取总蛋白样品30 μg 与上样缓冲液混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 变性后,进行上样、电泳、转膜、封闭。封闭结束后,将转蛋白膜放入相应的一抗(1:3 000)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;用TBST清洗转蛋白膜3次,每次10 min,然后加入二抗(1:3 000)孵育2 h;用TBST清洗转蛋白膜3次,每次10 min。然后,进行化学发光、显影,观察、分析Runx-2、Col-I蛋

白条带。

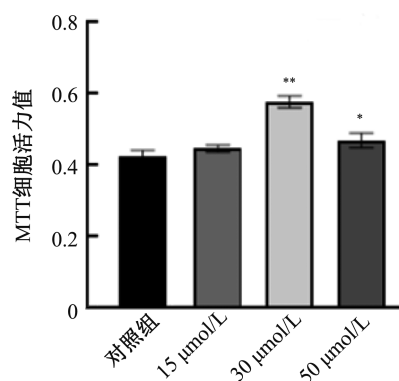
1.3 统计学方法

应用Graph Pad Prism8软件对实验结果进行统计学分析,计量实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG对成骨细胞增殖影响

30 $\mu\text{mol/L}$ 和50 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG均可促进成骨细胞增殖,30 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG促进成骨细胞增殖的效果更好,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图1所示。

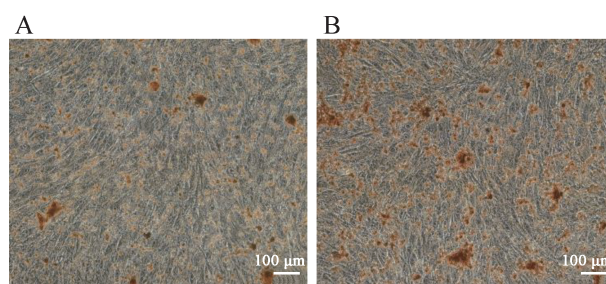


注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图1 EGCG对成骨细胞增殖的影响($n = 5$)

2.2 EGCG对成骨细胞矿化的影响

以30 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG体外培养成骨细胞14 d后,成骨细胞矿化增强,EGCG组深红色的成骨细胞矿化结节明显多于对照组,背景深红色范围更广、更密集,如图2所示。

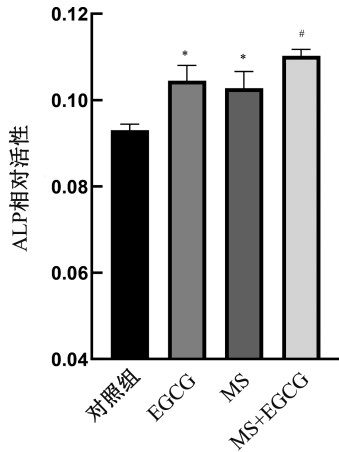


注:A.对照组;B.EGCG组。

图2 EGCG对成骨细胞矿化的影响

2.3 成骨细胞 ALP 活性

加载实验中成骨细胞培养 72 h 后,EGCG 组、MS 组的 ALP 活性高于对照组,EGCG+MS 组 ALP 活性高于 EGCG 组以及 MS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 3 所示。

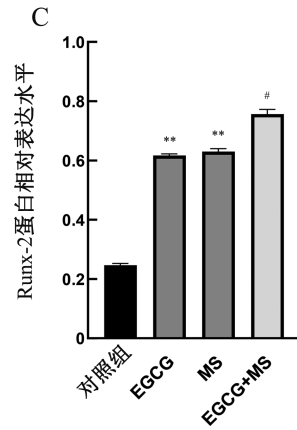
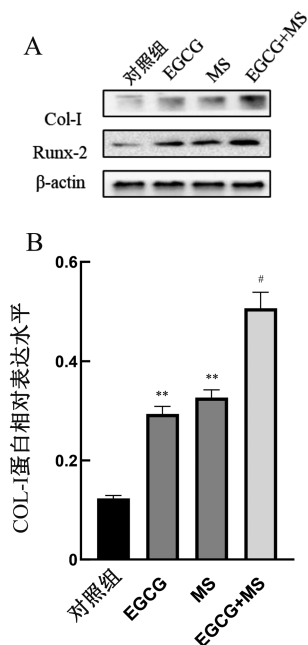


注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 EGCG、MS 组比较,# $P < 0.05$ 。

图 3 力学加载联合 EGCG 对成骨细胞 ALP 活性的影响

2.4 Runx-2 和 Col-I 表达

EGCG 组以及 MS 组成骨细胞分化标志蛋白 Runx-2、Col-I 的表达升高,EGCG+MS 组成骨细胞分化标志蛋白 Runx-2、Col-I 的表达高于 EGCG 组以及 MS 组($P < 0.05$),如图 4 所示。



注:A.免疫印迹检测 Runx-2、Col-I 蛋白表达;B.Runx-2 蛋白表达分析;C.Col-I 蛋白表达分析。与对照组比较,** $P < 0.01$;与 EGCG、MS 组比较,# $P < 0.05$ 。

图 4 力学加载联合 EGCG 对成骨细胞 Runx-2、Col-I 蛋白的表达分析

3 讨论

机械载荷是调节骨骼结构和功能的基本生理因素,缺乏机械载荷会导致骨量流失,而适当的机械力可以刺激骨形成。研究^[24]表明,压缩应力、拉伸应力、流体剪切力等机械应力刺激成骨细胞可产生积极的影响,包括诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化以及促进成骨细胞的增殖分化,进而影响骨重塑过程。适当的力学刺激能够促进成骨细胞的增殖与分化,力学刺激可通过诱导成骨细胞转录因子 Runx-2 的上调,促进成骨细胞分化和骨形成^[25]。

EGCG 是茶多酚中主要的活性物质^[26]。EGCG 可以抑制破骨细胞分化和关键功能基因的表达,抑制骨吸收^[27]。同时,EGCG 可以诱导成骨相关基因 BMP-2、Runx-2、ALP 表达,增强 ALP 活性和成骨细胞的矿化能力^[28]。

本研究采用 4 点弯曲力学加载装置对体外培养成骨细胞施加生理力学载荷,探究 EGCG 联合力学刺激对成骨细胞的影响,采用 MTT 法检测成骨细胞增殖情况。实验表明,30 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG 能显著促进成骨细胞增殖。

ALP 是成骨细胞分化的重要标志物,其活性变化在一定程度上反映了骨代谢情况,力学刺激对成骨细胞 ALP 的分泌具有重要调控作用^[29]。成骨细

胞分泌的 Col-I 蛋白能调节成骨细胞增殖和分化进程,在维持骨组织结构完整以及生物力学特性方面有重要作用^[30]。Runx-2 是一种调节成骨细胞分化的关键蛋白,Runx-2 的缺乏可导致骨骼疾病发生^[31]。Runx-2 通过 Wnt、Dlx5 等信号通路促进骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞,并能增强成骨细胞的骨形成能力^[32]。ALP 活性检测结果显示,EGCG 组和 MS 组的 ALP 活性高于对照组,EGCG+MS 组的 ALP 活性高于 EGCG 组以及 MS 组。Col-I 和 Runx-2 表达以及成骨细胞的矿化程度可以反映成骨细胞的分化情况。本研究中,EGCG 组及 MS 组 Col-I 和 Runx-2 蛋白的表达增加,EGCG+MS 组的 Col-I 和 Runx-2 蛋白的表达高于 EGCG 组及 MS 组,表明 EGCG 耦合力学载荷可提高成骨细胞增殖分化的能力。

4 结论

EGCG 与力学刺激的联合作用可增强成骨细胞的增殖和矿化能力,成骨细胞 ALP 活性更高,Runx-2、Col-I 蛋白的表达更强,表明 EGCG 联合力学与单纯的药物或力学刺激作用方式相比,对成骨细胞的分化效果更好。这为骨质疏松症以及骨骼相关疾病的防治提供了新的思路。

参考文献

- [1] SAKR H F, AMMAR B, ALKHARUSI A, et al. Resveratrol modulates bone mineral density and bone mineral content in A rat model of male hypogonadism [J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(2): 146-154.
- [2] 严伟,王中汉,刘贺.骨重建失衡导致骨质疏松发生的作用机制及其药物治疗策略[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(30): 4866-4874.
- [3] LI X H, HAN L, NOOKAEW I, et al. Stimulation of Piezo1 by mechanical signals promotes bone anabolism [J]. *Elife*, 2019, 8: e49631.
- [4] WANG Q S, ZHANG X C, LI RX, et al. A comparative study of mechanical strain, icariin and combination stimulations on improving osteoinductive potential via NF-kappaB activation in osteoblast-like cells [J]. *Biomed Eng Online*, 2015, 14: 46.
- [5] LIU P, TU J, WANG W Z, et al. Effects of mechanical stress stimulation on function and expression mechanism of osteoblasts [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 830722.
- [6] KHAN N, MUKHTAR H. Teapolyphenols in promotion of human health [J]. *Nutrients*, 2018, 11(1): 39.
- [7] ALAM M, ALI S, ASHRAF G M, et al. Epigallocatechin 3-gallate: from green tea to cancer therapeutics [J]. *Food Chem*, 2022, 379: 132135.
- [8] 杜伟勤,薛婷.表没食子儿茶素没食子酸酯抗感染特性研究进展 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2022, 34(1): 102-108.
- [9] MCALPINE M D, GITTINGS W, MACNEIL A J, et al. Black and green tea as well as specialty teas increase osteoblast mineralization with varying effectiveness [J]. *J Med Food*, 2021, 24(8): 866-872.
- [10] QIN D, ZHANG H J, ZHANG H F, et al. Anti-osteoporosis effects of osteoking via reducing reactive oxygen species [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 244: 112045.
- [11] SART S, SONG L Q, LI Y. Controlling redox status for stem cell survival, expansion, and differentiation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 105135.
- [12] 梅宏翔,张懿丹,张城浩,等.表没食子儿茶素没食子酸酯在干细胞增殖及成骨分化作用中的研究现状 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2019, 46(4): 431-436.
- [13] HUANG H T, CHENG T L, LIN S Y, et al. Osteoprotective roles of green tea catechins [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(11): 1136.
- [14] CHEN C H, KANG L, LIN R W, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate improves bone microarchitecture in ovariectomized rats [J]. *Menopause*, 2013, 20(6): 687-694.
- [15] REID I R, BILLINGTON E O. Drug therapy for osteoporosis in older adults [J]. *Lancet*, 2022, 399(10329): 1080-1092.
- [16] ZHANG S F, HUANG X X, ZHAO X Y, et al. Effect of exercise on bone mineral density among patients with osteoporosis and osteopenia: a systematic review and network meta-analysis [J]. *J Clin Nurs*, 2022, 31(15/16): 2100-2111.
- [17] SUN W B, ZHANG X N, WANG Z. The role and regulation mechanism of Chinese traditional fitness exercises on the bone and cartilage tissue in patients with osteoporosis: a narrative review [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1071005.
- [18] SUN Y Y, WAN B, WANG R X, et al. Mechanical stimulation on mesenchymal stem cells and surrounding microen-

- vironments in bone regeneration: regulations and applications[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 808303.
- [19] 姚娜, 张瑾, 王龙, 等. 骨质疏松症的中西医结合康复治疗研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2020, 13(7): 657-661.
- [20] 郭勇, 王亮, 汪洋, 等. 长时间力学载荷抑制体外培养骨细胞的增殖和分化[J]. *中国运动医学杂志*, 2015, 34(7): 675-680.
- [21] 王亮. 力学拉伸应变对成骨细胞的影响及其作用机制的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- [22] 王亮. 人骨髓间充质干细胞成骨及成软骨分化中长链非编码 RNA 的初步研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- [23] 宋森. 铝对大鼠成骨细胞矿化过程的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [24] MA Q L, MIRI Z, HAUGEN H J, et al. Significance of mechanical loading in bone fracture healing, bone regeneration, and vascularization[J]. *J Tissue Eng*, 2023, 14: 20417314231172573.
- [25] SOMEMURA S, KUMAI T, YATABE K, et al. Physiomechanical stress directly induces bone formation by activating glucose transporter 1 (glut 1) in osteoblasts, inducing signaling via NAD⁺-dependent deacetylase (sirtuin 1) and runt-related transcription factor 2 (Runx2) [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 9070.
- [26] ALAM M, ALI S, ASHRAF G M, et al. Epigallocatechin-3-gallate: from green tea to cancer therapeutics[J]. *Food Chem*, 2022, 379: 132135.
- [27] NISHIOKU T, KUBO T, KAMADA T, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis via downregulation of NFATc1 and suppression of HO-1-HMGB1-RAGE pathway [J]. *Biomed Res*, 2020, 41(6): 269-277.
- [28] LIN S Y, KANG L, WANG C Z, et al. (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3221.
- [29] 王磊庆, 何咏霖, 廖智鹏, 等. 机械压应力对成骨细胞分化增殖和碱性磷酸酶的影响[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2022, 48(8): 70-75.
- [30] 谢玉, 周诺. I 型胶原诱导骨髓间充质干细胞及成骨细胞的成骨分化机制[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(21): 3417-3423.
- [31] 宫元伟, 闫玉仙, 张媛, 等. 基底拉伸应变对小鼠成骨细胞 Runx2 表达的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2011, 17(3): 185-189.
- [32] KOMORI T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1694.

[收稿日期: 2024-02-02]

[责任编辑: 涂剑, 向秋 英文编辑: 周寿红]