

取试剂提取总蛋白,离心取上清,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, - 80 °C 保存。提取液中加入 5 × SDS 上样缓冲液,100 °C 变性 5 min,蛋白上样每孔含 60 μg 蛋白,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜 3 h,5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h。一抗 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 5 min × 3 次,二抗山羊抗兔 HRP 37 °C 孵育 2 h,TBST 洗膜 5 min × 3 次。凝胶成像仪中 ECL 发光显色并照相。实验结果采用 Quantity one 软件分析,扫描吸光度(A)。采用所测 p-JNK 蛋白条带与 JNK 条带的吸光度比值来表示 p-JNK 蛋白的表达水平。

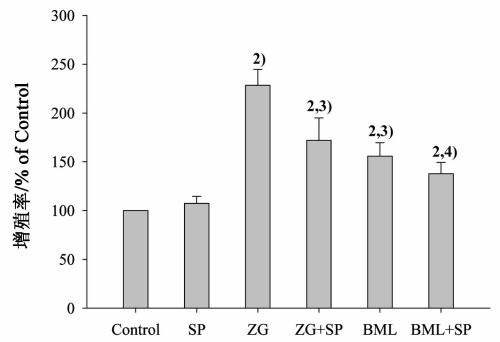
2.5 实时荧光定量 PCR 法 (Real Time RT-PCR) 分析 细胞培养及给药同 2.4。采用 RNAiso Plus 试剂盒提取细胞总 RNA,用超微量紫外分析系统测定总 RNA 浓度。采用 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒,取 5 μL 总 RNA 模板 (200 μg · L⁻¹),加入 5 μL 反应体系,PCR 仪中去除基因组 DNA,反应条件为 42 °C,2 min;4 °C 保存。将 RT 反应液加到已去除基因组 DNA 的 PCR 反应管中,10 μL/管,PCR 仪中 RT 反应条件为 37 °C,15 min;85 °C,5 s;4 °C 保存。采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒,取 4 μL 对照品 cDNA,5 倍梯度稀释对照品 cDNA,稀释 6 个梯度;取 4 μL 样品 cDNA,5 倍稀释各组 cDNA 样品。加入 PCR 反应液,23 μL/管,再加入 2 μL cDNA (NTC 加入 2 μL EASY Dilution)。Real Time PCR 仪反应条件为 95 °C,2 min;95 °C,30 s,60 °C,30 s (40 个循环)。用 MxPro 软件对结果进行分析。

2.6 统计分析 计量数据采用 SPSS 10.0 软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 One-Way ANOVA 进行分析,组间两两比较,采用 LSD 或 SNK 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 JNK 抑制剂对左归丸含药血清干预 MC3T3-E1 成骨前体细胞增殖作用的影响 与 Control 组比较,ZG 组和 BML 组均显著促进 MC3T3-E1 成骨前体细胞增殖 ($P < 0.01$);与 ZG 组比较,ZG + SP 组促进 MC3T3-E1 成骨前体细胞增殖的作用明显减弱 ($P < 0.01$),且 ZG 组显著优于 BML 组 ($P < 0.01$);与 BML 组比较,BML + SP 组抑制 MC3T3-E1 成骨前体细胞增殖 ($P < 0.05$) (图 1)。

3.2 JNK 抑制剂对左归丸含药血清干预 MC3T3-E1 成骨前体细胞 JNK 蛋白磷酸化表达的影响 与 Control 组比较,ZG 组和 BML 组均显著上调 MC3T3-



与 Control 组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 ZG 组比较³⁾ $P < 0.01$;与 BML 组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ (图 2 ~ 3 同)。

图 1 JNK 抑制剂对左归丸含药血清干预 MC3T3-E1 成骨前体细胞增殖作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

E1 成骨前体细胞 JNK 蛋白的磷酸化表达 ($P < 0.01$);与 ZG 组比较,ZG + SP 组对 JNK 蛋白的磷酸化诱导作用明显减弱 ($P < 0.01$),且 ZG 组显著优于 BML 组 ($P < 0.01$);与 BML 组比较,BML + SP 组显著下调 JNK 蛋白的磷酸化表达水平 ($P < 0.01$) (图 2)。

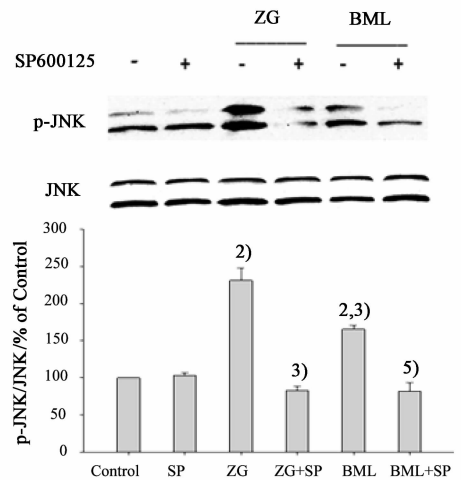


图 2 JNK 抑制剂对左归丸含药血清干预 MC3T3-E1 成骨前体细胞 JNK 蛋白磷酸化表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 JNK 抑制剂对左归丸含药血清干预 MC3T3-E1 成骨前体细胞 Runx2 mRNA 表达的影响 与 Control 组比较,SP 组下调 MC3T3-E1 成骨前体细胞 Runx2 mRNA 表达 ($P < 0.05$),ZG 和 BML 组均显著上调 Runx2 mRNA 表达 ($P < 0.01$);与 ZG 组比较,ZG + SP 组对左归丸含药血清诱导的 MC3T3-E1 成骨前体细胞 Runx2 mRNA 高表达的影响不显著,且 ZG 组与 BML 组之间没有显著性差异;与 BML 组比较,BML + SP 组对倍美力诱导的 MC3T3-E1 成骨前体细胞 Runx2 mRNA 高表达的影响不显著 (图 3)。

4 讨论

肾虚是 PMOP 的主要病机之一,补肾方药能够