

β -酪蛋白磷酸调控成骨细胞功能的分子途径

屈思宇¹, 林倩如¹, 刘果^{1,2}, 李俊³, 陈宇立³, 曹庸^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

(2. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510224) (3. 广东华活之光生物科技有限公司, 广东肇庆 526238)

摘要: β -酪蛋白磷酸肽 (β -Casein Phosphopeptides, β -CPP) 是一类来源于 β -酪蛋白的生物活性肽, 具有良好的钙结合能力, 在促进骨健康方面具有潜在应用价值。该研究利用酶法制备 β -CPP, 探讨其对成骨细胞 (Osteoblast: MC3T3-E1) 增殖、分化和矿化的作用, 并通过转录组学分析其作用机制。结果表明, 当 β -CPP 质量浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 作用 MC3T3-E1 细胞 72 h 后, 细胞的增殖率显著增长至 128.43% ($P<0.05$)。处理 7 d 后, 碱性磷酸酶活性较空白组提高 2.17 倍, 21 d 后矿化率较空白组提高 2.15 倍, 表明 β -CPP 显著增强了 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶活性和细胞外基质的矿化能力 ($P<0.05$)。RNA-seq 结果显示, β -CPP 处理的 MC3T3-E1 细胞中存在 476 个差异表达基因, 其中 258 个基因上调, 218 个基因下调。基因本体论 (GO) 分析表明, 差异基因主要参与生物过程的调控。KEGG 通路富集分析显示, TGF- β 和 PI3K-Akt 等信号通路参与了 MC3T3-E1 细胞的增殖过程。该研究揭示了 β -CPP 对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化的促进作用, 为 β -CPP 在骨健康和功能性食品中的应用提供了理论依据。

关键词: β -CPP; MC3T3-E1 细胞; 增殖; 分化; 矿化; 转录组学

文章编号: 1673-9078(2026)06-170-177

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0327

Molecular Pathway of β -Casein Phosphate Regulating Osteoblast Function

QU Siyu¹, LIN Qianru¹, LIU Guo^{1,2}, LI Jun³, CHEN Yuli³, CAO Yong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China) (2. College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510224, China)

(3. Guangdong Huahuo Zhiguang Biotechnology Co. Ltd., Zhaoqing 526238, China)

Abstract: β -Casein phosphopeptides (β -CPP), a class of bioactive peptides derived from β -casein, possess excellent calcium-binding capacity and have potential applications in promoting bone health. In this study, β -CPP was prepared through enzymatic hydrolysis to investigate its effects on the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts (MC3T3-E1), with its mechanism of action being analyzed through transcriptomics. MC3T3-E1 cell proliferation rate significantly increased to 128.43% after treating with $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ β -CPP for 72 h ($P<0.05$). The alkaline phosphatase activity and mineralization rate of the β -CPP-treated cells were 2.17 and 2.15 times higher than that of the control cells after 7 and 21 days, respectively, demonstrating that β -CPP significantly enhanced alkaline phosphatase activity and extracellular matrix mineralization in MC3T3-E1 cells ($P<0.05$). RNA-seq results revealed 476 differentially expressed genes in β -CPP-treated MC3T3-E1 cells, including 258 upregulated and 218 downregulated genes. Gene Ontology analysis indicated that the differentially expressed genes were primarily involved in the

引文格式:

屈思宇, 林倩如, 刘果, 等. β -酪蛋白磷酸调控成骨细胞功能的分子途径[J]. 现代食品科技, 2026, 42(6): 170-177.

QU Siyu, LIN Qianru, LIU Guo, et al. Molecular pathway of β -casein phosphate regulating osteoblast function [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 170-177.

收稿日期: 2025-03-08; 修回日期: 2025-05-24; 接受日期: 2025-05-25

基金项目: 广东省功能食品活性物重点实验室 (2018B030322010)

作者简介: 屈思宇 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 487614964@qq.com

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物的分离纯化鉴定及活性, E-mail: caoyong2181@scau.cn

regulation of biological processes. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analysis showed that signaling pathways such as TGF- β and PI3K-Akt were involved in MC3T3-E1 cell differentiation. This study revealed that β -CPP promotes MC3T3-E1 cell proliferation, differentiation, and mineralization, providing a theoretical basis for β -CPP application in bone health and functional foods.

Key words: β -casein phosphopeptide; MC3T3-E1 osteoblast; proliferation; differentiation; mineralization; transcriptomics

骨质疏松症和骨缺损是当今全球范围内日益严重的健康问题,其发病率逐年上升。骨质疏松症不仅导致骨密度下降和骨微结构退化,还显著增加骨折风险,严重影响患者的生活质量^[1]。传统的治疗方法,如药物治疗和手术干预,虽在一定程度上能够缓解症状,但仍存在疗效有限、副作用明显以及成本高昂等问题^[2]。因此,开发新型的骨修复材料或功能性成分以促进骨形成和骨再生具有重要的现实意义。

近年来,生物活性肽因其独特的生理功能和良好的生物相容性受到广泛关注。其中,来源于乳蛋白的CPPs因富含磷酸丝氨酸基团,能够与钙离子形成稳定的复合物,可以增强钙的生物利用度。研究表明,CPPs能够调节钙的代谢^[3],还促进成骨细胞增殖、分化和矿化,在促进骨健康方面具有潜在的应用价值^[4]。在本团队之前的研究中,从CPPs中分离出5个肽:P1(含1个磷酸基)、P2(含2个磷酸基)、P3(含1个磷酸基)、P4(含1个磷酸基)和P5(含4个磷酸基),P5在增强肠道钙吸收方面的活性强于其他4个活性肽^[5]。更重要的是,P5可以显著减少大鼠尿钙的流失,增加股骨长度和骨钙含量。在此研究的基础上,Zhong等^[6]发现CPPs(残基1-25)P5中的磷酸化结构可以刺激MC3T3-E1细胞的成骨活性,能显著促进MC3T3-E1细胞增殖、分化和矿化。P5来源于 β -酪蛋白, β -酪蛋白酶解制备得到的 β -CPP对成骨细胞的影响及机制未有研究。

成骨细胞是骨形成和骨再生的关键细胞,其增殖、分化和矿化能力直接影响骨组织的修复与再生。研究 β -CPP对成骨细胞的影响,不仅有助于揭示其在骨修复中的作用机制,还能为开发基于 β -CPP的骨修复材料或功能性成分提供理论依据。此外,通过转录组学分析,可以全面解析 β -CPP调控成骨细胞功能的分子网络,为进一步优化其应用提供科学支持。

基于以上背景,该研究以 β -CPP为研究对象,研究其对成骨细胞增殖、分化和矿化的影响,利用转录组学研究其作用机制,探究 β -CPP对成骨细胞的影响及其作用机制。为 β -CPP作为一种潜在的成骨活性成分及其成骨机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 原料

β -酪蛋白由广东华活之光生物科技有限公司提供。

1.1.2 主要实验试剂

MC3T3-E1细胞,购自中国科学院上海生物科学研究所细胞资源中心;胎牛血清、 α -MEM培养基、青霉素、链霉素、体积分数0.25%的胰蛋白酶、PBS,均购自澳洲Gibco公司;MTT、二甲基亚砜,购于美国SIGMA公司; β -甘油磷酸二钠、L-抗坏血酸、氯代十六烷基吡啶,购于上海麦克林生物化学公司;碱性磷酸酶检测试剂盒、BCA蛋白检测试剂盒,购于上海碧云天生物技术公司;胰蛋白酶、茜素红染液、多聚甲醛,购于上海源叶生物科技有限公司;盐酸、氢氧化钠、氯化钙、乙醇等其他试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器与设备

DELTA320 pH计,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;AL104电子天平,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;DK-S24磁力水浴搅拌锅,上海森信试验仪器有限公司;DW-86L388超低温冰箱,青岛海尔冰箱有限公司;5417R高速冷冻离心机,Eppendorf公司;FD-1PF真空冷冻干燥机,北京德天佑科技发展有限公司;CCL-170B-8二氧化碳培养箱,新加坡艺思高科技有限公司;SW-CJ-2FD超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;XPV-25C/25D显微镜,上海普丹光学仪器有限公司;Enspire2300多功能酶标仪,美国PerkinElmer公司。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配制

完全培养基(比例均为体积分数):89%的 α -MEM,10%的胎牛血清,1%的双抗($100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素),混合均匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存。

分化培养基:含有质量浓度 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的L-抗坏

血酸 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 β -甘油磷酸钠的完全培养基。全程需在无菌条件下进行,混合均匀, 4°C 保存,避免反复冻融。

1.2.2 β -CPP的制备

参考前期研究^[7],利用胰蛋白酶对 β -酪蛋白进行酶解。酶解结束后 90°C 水浴,灭酶 30 min。酶解液冷却至室温。调节 pH 值至 4.6, $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min。取上清液,调节 pH 值至 6.8,加入体积分数 0.6% 的 CaCl_2 搅拌溶解,加入无水乙醇至体系中乙醇终体积分数为 50%,在 4°C 放置 12 h;离心收集沉淀,冷冻干燥即为 β -CPP。

1.2.3 细胞培养

MC3T3-E1 细胞培养于完全培养基,于 37°C , 5% CO_2 (V/V) 培养箱中培养,隔天更换培养基。当细胞在培养瓶中达到约为 80% 的覆盖面积时,以 1:3 的比例进行传代培养。

1.2.4 细胞增殖率的测定

采用 MTT 法检测细胞增殖情况。将细胞以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板中,培养 24 h。然后更换含不同质量浓度 β -CPP (0 、 10 、 50 、 100 、 200 、 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的完全培养基,分别培养 24、48 和 72 h。培养结束后,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液,避光孵育 4 h。随后,去除 MTT 溶液,每孔中加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO 溶液。在摇床缓慢摇晃 10 min 后,使用酶标仪在 570 nm 波长处测量吸光度。按式 (1) 进行计算。

$$B = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A_s ——实验组吸光度值;

A_c ——对照组吸光度值;

A_b ——空白组吸光度值。

1.2.5 碱性磷酸酶活性的测定

MC3T3-E1 细胞以每孔 5×10^5 个细胞接种于 12 孔板中培养。24 h 后,更换含有不同质量浓度的 β -CPP (0 、 10 、 50 、 100 、 200 、 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的分化培养基培养细胞。培养基隔天更换。7 d 后,收集细胞。按照 BCA 蛋白检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司)和碱性磷酸酶检测试剂盒中说明书(上海碧云天生物技术公司),测定细胞碱性磷酸酶活性。按式 (2) 进行计算。

$$D = \frac{D_s}{D_c} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D_s ——实验组碱性磷酸酶活性;

D_c ——对照组碱性磷酸酶活性。

1.2.6 成骨细胞矿化实验

细胞操作同 1.2.5,培养 21 d 后,用 PBS 洗涤细胞,加入 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min 后,用 PBS 冲洗细胞然后用茜素红染料染色 5 min。染色结束后,用 PBS 洗涤细胞显微镜下观察细胞,并拍照。

用 10% (m/V) 十六烷基吡啶氯溶解染色钙结节,用酶标仪在 562 nm 波长下测定提取的溶解溶液的吸光值进行定量。按式 (1) 进行计算。

1.2.7 RNA测序和数据分析

将 MC3T3-E1 细胞以每孔 1×10^6 个细胞的密度接种于 6 孔板中。培养 24 h 后,弃置培养基,改用含有质量浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -CPP 的分化培养基。7 d 后,提取总 RNA。转录组测序和分析由诺禾致源生物技术有限公司进行。通过 Agilent 2100 bioanalyzer 对 RNA 样品进行严格质控,精确检测 RNA 完整性。转录组测序是基于 Illumina 测序平台,使用 Oligo dT 磁珠从总 RNA 中富集 mRNA。在片段化之后,使用随机六聚体引物合成第一链 cDNA,随后进行第二链 cDNA 的合成。经过末端修复、加 A 尾、接头连接、片段选择、扩增和纯化后,文库准备就绪。文库构建完成后,先使用 Qubit2.0 Fluorometer 进行初步定量,稀释文库至 $1.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,随后使用 Agilent 2100 bioanalyzer 对文库的 insert size 进行检测,insert size 符合预期后,qRT-PCR 对文库有效浓度进行准确定量(文库有效浓度高于 $1.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$),以保证文库质量。库检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina 测序。差异表达分析使用 DESeq (2012) R 软件包进行。以 $P < 0.05$ 和 fold change > 2 为显著差异表达的阈值。对差异基因进行层次聚类分析,分析不同组和样本的基因表达模式。利用基于超几何分布的 R,分别对差异基因进行 GO 富集和 KEGG 途径富集分析。

1.3 数据统计与分析

所有试验均重复 3 次,使用 Origin 2021 和 SPSS 27.0 软件进行数据统计和显著性分析, $P < 0.05$ 被认为具有显著差异。并使用 Origin 2021 制作图表。

2 结果与讨论

2.1 细胞增殖率实验

MTT 是一种黄色水溶性化合物,可被线粒体酶还原为不溶于水的紫色甲臞结晶,经 DMSO 溶解后形成紫色溶液,通过酶标仪在 570 nm 测定吸光度以评

估细胞增殖和活力, 广泛应用于细胞生物学和药理学研究^[8]。在不同质量浓度的 β -CPP作用下, 成骨细胞的MTT实验结果如图1所示。 β -CPP处理24、48和72 h后, MC3T3-E1细胞的增殖率均显著高于空白组($P < 0.05$)。质量浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时细胞增殖效果最强, 其中24 h时为空白对照组的1.27倍, 48 h时为空白对照组的1.31倍, 72 h时为空白对照组的1.33倍。这表明, β -CPP对MC3T3-E1细胞的增殖有积极作用。选取 β -CPP质量浓度10、50、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行后续实验。

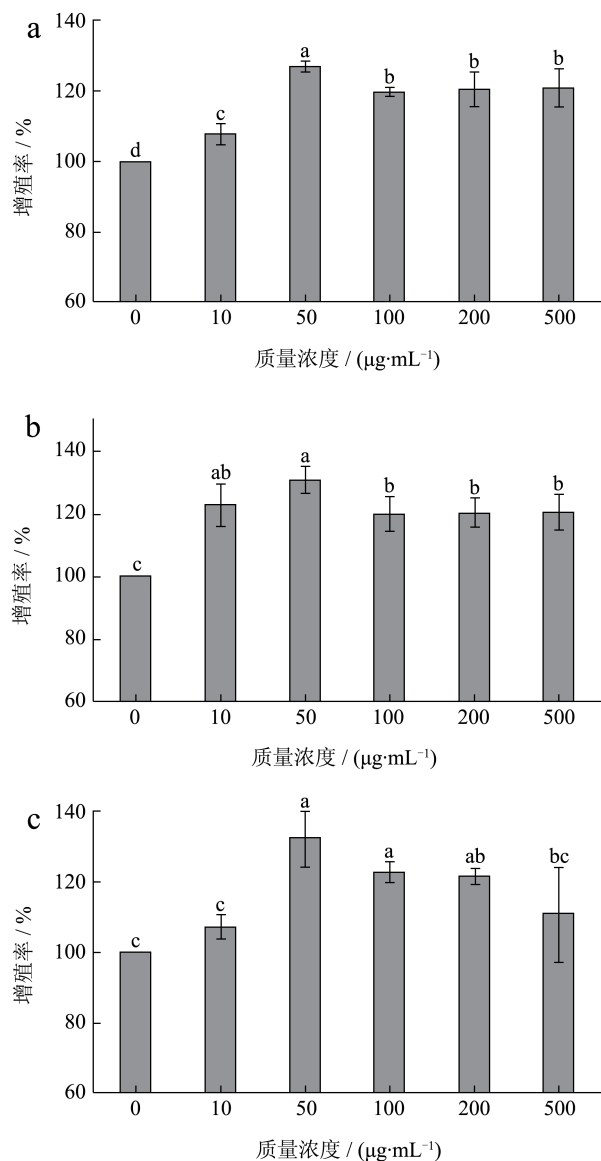


图1 β -CPP处理对MC3T3-E1细胞的增殖率影响

Fig.1 Effect of β -CPP treatment on the proliferation rate of MC3T3-E1 cells

注: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 72 h。不同字母表示具有显著差异, $P < 0.05$ 。下图同。

徐豪伟等^[9]用 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 南极磷虾蛋白消化产物上清液处理MC3T3-E1细胞72 h, 细胞增殖率约为

120%。Huang等^[10]发现与空白对照组相比, $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPP-Ca处理的MC3T3-E1细胞的增殖在24、48和72 h时分别增加了21.65%、26.43%和28.43%。 β -CPP在较低浓度下即可达到更好的效果, 说明 β -CPP可能具有更强的促进MC3T3-E1细胞增殖的能力。

2.2 碱性磷酸酶活性实验

根据2.1实验结果, 选择选取 β -CPP质量浓度10、50、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行后续实验。成骨细胞分化是骨形成的关键过程, 碱性磷酸酶活性是评估其分化程度的重要指标。碱性磷酸酶由成骨细胞分泌, 通过水解磷酸酯释放无机磷酸盐, 促进羟基磷灰石形成, 驱动骨基质矿化^[11]。研究表明, 碱性磷酸酶活性在分化早期显著升高, 通过检测碱性磷酸酶活性, 可量化成骨细胞分化水平, 为相关研究提供重要依据^[12]。 β -CPP对MC3T3-E1细胞分化的影响如图2所示。与空白组相比, β -CPP处理后的MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶活性均显著增加($P < 0.05$), 在 β -CPP浓度为 $10\sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时碱性磷酸酶活性逐渐增强, 在 β -CPP浓度为 $50\sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时碱性磷酸酶活性减弱, 在 β -CPP质量浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时碱性磷酸酶活性最强, 是空白处理组的2.17倍。

Qiu等^[13]将CPP静电吸附到PEEK表面得到CPP改性的PEEK (PEEK-CPP) 样品, 作用于成骨细胞后发现, CPP修饰后, PEEK-CPP的碱性磷酸酶活性约为未修饰的两倍左右。这表明, PEEK-CPP标本上的CPP层可以增强MC3T3-E1细胞的体外成骨分化。Huang等^[10]研究了CPP-Ca对MC3T3-E1细胞增殖、分化和矿化的影响。质量浓度 $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CPP-Ca处理后MC3T3-E1细胞的碱性磷酸酶活性约为空白处理组的1.53倍。本研究发现质量浓度 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ β -CPP的碱性磷酸酶活性是空白处理组的2.17倍。这说明, β -CPP比CPP-Ca有着更强的诱导MC3T3-E1细胞分化的能力。

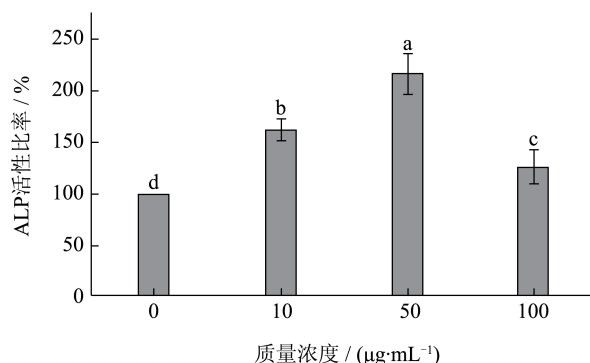


图2 β -CPP对MC3T3-E1细胞ALP活性的影响

Fig.2 Effect of β -CPP on ALP activity in MC3T3-E1 cells

2.3 矿化实验

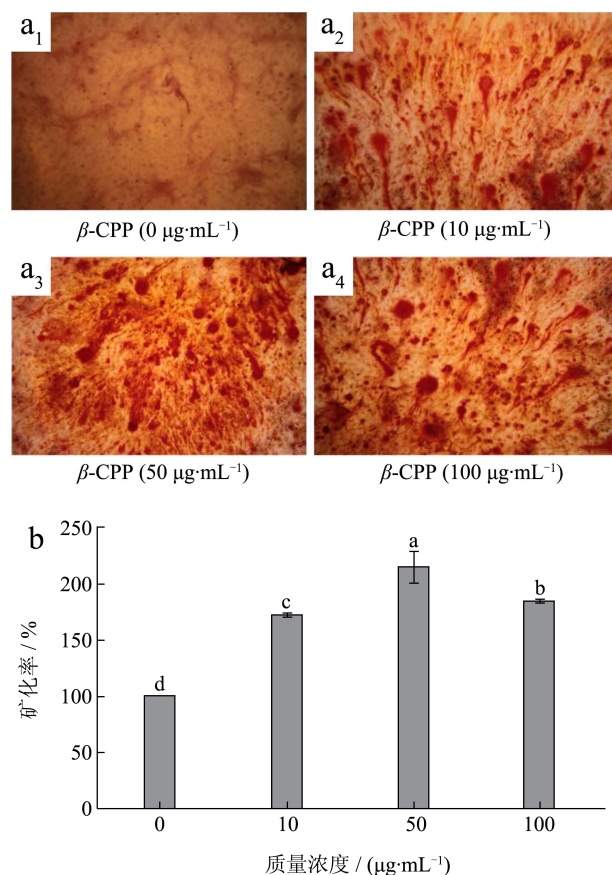


图3 β-CPP对MC3T3-E1细胞矿化的影响

Fig.3 Effect of β-CPP on mineralization of MC3T3-E1 cells

注: (a) 茜素红染色结果; (b) 茜素红染色定量分析。

茜素红染色是评估成骨细胞矿化情况的经典方法,因其特异性强、操作简便而被广泛应用。茜素红能与钙离子特异性结合,形成红色复合物,从而直观地标记矿化结节^[14]。β-CPP对MC3T3-E1细胞矿化的影响如图3所示。(图3a)。相比于对照组,经β-CPP处理的MC3T3-E1细胞有明显的矿化结节产生,形状多呈圆形,少数呈不规则形,且呈浓度依赖性。表明β-CPP能够促进成骨细胞矿化。利用氯代十六烷基吡啶对矿化结节进行定量分析,结果如图3b所示。氯代十六烷基吡啶能够溶解茜素红显色,利用这一特性对矿化结晶进行定量分析。通过定量分析染色结果,可以准确反映成骨细胞分泌的钙盐沉积程度,进而评估矿化能力^[15]。与空白组相比,β-CPP处理后的MC3T3-E1细胞矿化率均显著增加($P < 0.05$),在β-CPP浓度为10~50 μg·mL⁻¹时矿化率逐渐升高,在β-CPP浓度为50~100 μg·mL⁻¹时矿化率降低,在β-CPP质量浓度为50 μg·mL⁻¹时矿化率最高,是空白处理组的2.15倍。

Wu等^[16]研究猪骨教员肽(CP)、磷酸化CP(PCP)、CP-钙螯合物(CP-Ca)和PCP-Ca对MC3T3-E1细

胞的增殖、分化和矿化的影响。结果发现,质量浓度500 μg·mL⁻¹的CP、PCP、CP-Ca和PCP-Ca的矿化率分别是空白组的1.54倍、2.09倍、3.27倍和3.82倍。这些结果表明,磷酸化处理和螯合钙均能提高胶原蛋白肽对MC3T3-E1增殖、分化和矿化的促进作用,且具有协同作用($P < 0.05$)。Huang等^[10]制备CPP-Ca螯合物,发现它在体外对MC3T3-E1细胞的增殖、分化和矿化有积极影响。质量浓度250 μg·mL⁻¹ CPP-Ca处理后MC3T3-E1细胞的矿化钙结节是空白组的1.73倍。本研究质量浓度50 μg·mL⁻¹ β-CPP的矿化率能达到空白处理组的2.17倍。这说明,β-CPP比CP、CPP-Ca有着更强的诱导MC3T3-E1细胞矿化的能力。

2.4 RNA测序及结果分析

RNA测序(Ribonucleic Acid Sequencing, RNA-seq)的核心是基因表达差异的显著性分析,使用统计学方法,比较两个条件或多个条件下的基因表达差异,从中找出与条件相关的特异性基因,然后进一步分析这些特异性基因的生物意义,分析过程包括质控、比对、定量、差异显著性分析、功能富集等环节。

2.4.1 差异基因分析

本研究在经β-CPP处理的MC3T3-E1细胞中筛选出476个差异基因 [$P < 0.05$ 和 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 0$],其中258个上调基因,218个下调基因。如图4所示。

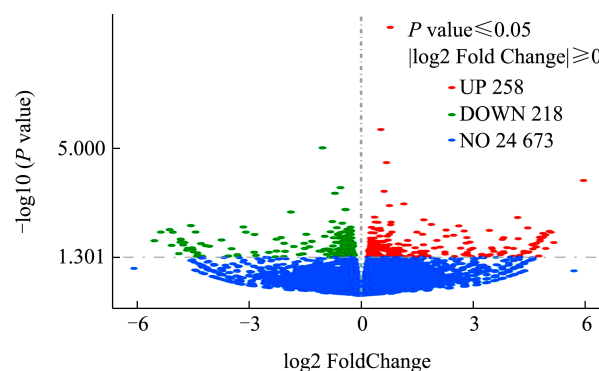


图4 差异基因火山图

Fig.4 Differential gene volcano map

注: 绿点代表下调的基因, 红点代表上调的基因, 蓝点代表基因中没有显著的双重差异。

2.4.2 GO功能富集分析

将差异基因进行GO功能富集分析,结果如图5所示差异基因主要在生物过程的调控中发挥重要作用。

差异基因参与的生物过程主要有细胞对干扰素β、γ的反应、上皮细胞增殖、垂体发育、DNA复制起始和对其他生物的防御反应。细胞对干扰素β的反应是细胞在IFN-β刺激下激活的一系列抗病毒、免疫调节和炎

症调控反应。这一过程主要通过 JAK-STAT 信号通路实现，并涉及多种干扰素刺激基因的表达，对维持机体免疫稳态和抵抗病原体感染至关重要^[17]。上皮细胞增殖是上皮细胞通过细胞分裂增加数量的过程，受生长因子、信号通路和细胞周期蛋白的精确调控，这一过程在组织发育、修复和稳态维持中起关键作用。垂体发育是垂体从胚胎期到成熟期的形成和功能建立过程，涉及 Rathke 囊的形成、细胞分化、激素分泌功能的建立以及 BMP、FGF 和 Wnt 等信号通路和转录因子的精确调控^[18]。

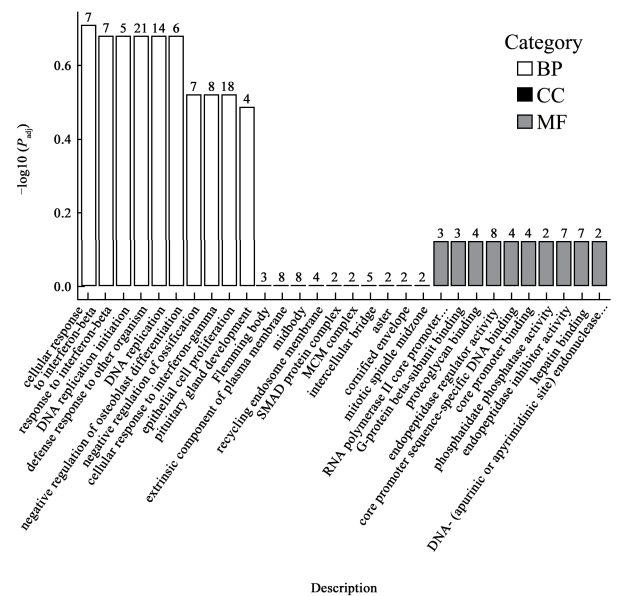


图 5 GO 富集分析柱状图

Fig.5 GO enrichment analysis bar diagram

2.4.3 KEGG通路富集分析

从 KEGG 富集结果中，选取最显著的 20 个 KEGG 通路绘制散点图进行展示，上调和下调的差异基因中前 20 个显著富集的通路分别如图 6a、6b 所示。从图中可以看出，显著上调的通路是 TGF- β 信号通路、ECM-受体相互作用、PI3K-Akt 信号通路、Notch 信号通路等。显著下调和富集的途径包括戊糖和葡萄糖醛酸互变、DNA 复制、抗坏血酸和醛糖代谢、细胞周期、细胞凋亡等。

在成骨细胞增殖和分化的早期阶段，TGF- β 与细胞表面的受体结合，激活下游的 SMAD2/3 信号通路，一旦被激活，SMAD2 和 SMAD3 就会易位到细胞核，在那里它们会影响关键成骨基因的转录，促进成骨细胞的增殖来启动成骨过程^[19]。ECM-受体相互作用指的是细胞通过特定的细胞表面受体（如整合素）与细胞外基质（ECM）之间动态且复杂的通讯^[20]。已有多篇文献报道 ECM-受体相互作用已被证实与成骨机制密切相关^[21-23]。PI3K 是一类重要的激酶，包括三类分子（I、II、III）。AKT 是一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶，

由大约 480 个氨基酸残基组成，是 PI3K 的主要下游效应分子之一，可通过直接磷酸化各种转录因子（如 NF- κ B 和 mTOR）参与多种生命活动过程的调节^[24]。研究表明，PI3K 可以通过激活 AKT 抑制成骨细胞凋亡，并通过 Wnt-3a 进一步激活 PI3K-Akt 信号通路，影响骨形成和骨细胞的存活，控制骨密度的平衡^[25]。Notch 信号通路也被证实可以调节成骨细胞分化和骨稳态^[26]。在骨细胞中，Notch1 的存在导致特定的结果，包括通过上调 OPG 和下调 SOST 来抑制骨吸收，最终导致 Wnt 信号的激活增加^[27]。此外，Notch1 通过下调 SOST 和 Dkk1（Dickkopf Wnt 信号通路抑制剂 1）来增加骨细胞中 Wnt/ β -catenin 的活性^[28]。

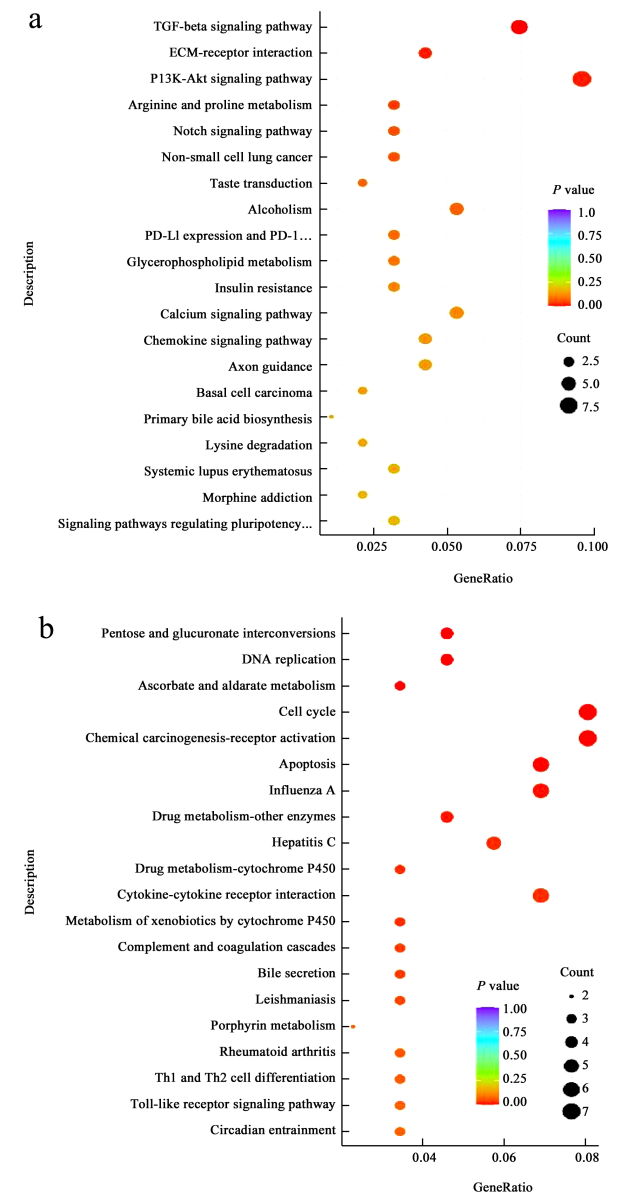


图 6 DEGs 的富集通路的前 20 位 KEGG 富集通路分析散点图

Fig.6 Scatter plots of the top 20 KEGG enrichment pathways for DEGs enrichment pathways

注：(a) 上调；(b) 下调。

研究表明,乳铁蛋白可以通过刺激成骨前细胞中的转化生长因子 β (TGF- β) 信号传导来达到促进成骨细胞增殖的作用^[29]。Liu 等^[30]发现,适当的高葡萄糖浓度 (15.5 mmol·L⁻¹) 可通过激活 MC3T3-E1 细胞中的 PI3K/Akt 通路来增加成骨分化,表明 PI3K/Akt 通路在 MC3T3-E1 细胞的生理过程中起重要作用。这些与本文实验结果类似。 β -CPP 可能通过 TGF- β 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、戊糖和葡萄糖醛酸互变和 DNA 复制等通路促进成骨细胞生长。

3 结论

本研究系统探讨了 β -CPP 对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖、分化和矿化的影响及其分子机制。研究结果表明, β -CPP 在 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下能够显著促进成骨细胞的增殖,作用 24、48 和 72 h 后分别使细胞增殖率达到 126.78%、130.92% 和 132.52%。同时, β -CPP 显著提高了成骨细胞的碱性磷酸酶活性,使其达到空白组的 2.17 倍,并显著增强了细胞外基质的矿化能力,矿化率为空白组的 2.15 倍。转录组学结果表明, β -CPP 处理的 MC3T3-E1 细胞中存在 476 个差异表达基因,其中 258 个基因上调,218 个基因下调。基因本体论 (GO) 分析表明,差异基因主要参与生物过程的调控。KEGG 通路富集分析显示, β -CPP 通过上调 TGF- β 和 PI3K-Akt 等信号通路,下调戊糖和葡萄糖醛酸互变和抗坏血酸和醛糖代谢等通路参与 MC3T3-E1 细胞的分化过程。

综上所述, β -CPP 通过调控关键信号通路促进成骨细胞分化,揭示了其在骨组织工程和功能食品中的潜在应用价值。本研究不仅丰富了乳蛋白衍生肽的生理功能研究,还为开发新型骨修复材料或功能性成分提供了重要的理论依据。

参考文献

- [1] CHADHA M, CHADDHA R, DIVAKAR H, et al. Osteoporosis: epidemiology, pathogenesis, evaluation and treatment [J]. Open Journal of Orthopedics, 2022, 12(4): 153-182.
- [2] STRAUB D A. Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications [J]. Nutr Clin Pract, 2007, 22(3): 286-296.
- [3] LI H, DUAN S, YUAN P, et al. Preparation of casein phosphopeptides calcium complex and the promotion in calcium cellular uptake through transcellular transport pathway [J]. J Food Biochem, 2021, 45(12): e14001.
- [4] FAGGIANO F, VIGNA-TAGLIANTI F, BURKHART G, et al. The effectiveness of a school-based substance abuse prevention program: 18-month follow-up of the EU-Dap cluster randomized controlled trial [J]. Drug Alcohol Depend, 2010, 108(1-2): 56-64.
- [5] CAO Y, MIAO J, LIU G, et al. Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides enhance calcium and magnesium uptake in Caco-2 cell monolayers [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(11): 2307-2314.
- [6] ZHONG W, HE J, HUANG W, et al. Effect of the phosphorylation structure in casein phosphopeptides on the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts and its mechanism [J]. Food Funct, 2023, 14(22): 10107-10118.
- [7] 刘果.酪蛋白磷酸肽制备、鉴定、促钙吸收活性及机理研究[D].广州:华南农业大学,2018.
- [8] GHASEMI M, TURNBULL T, SEBASTIAN S, et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12827.
- [9] 徐豪伟,林松毅,刘瑶,等.南极磷虾蛋白体外消化产物特性及其成骨活性分析[J].食品科学,2024,45(20):188-197.
- [10] HUANG W, LAO L, DENG Y, et al. Preparation, characterization, and osteogenic activity mechanism of casein phosphopeptide-calcium chelate [J]. Front Nutr, 2022, 9: 960228.
- [11] VIMALRAJ S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization [J]. Gene, 2020, 754: 144855.
- [12] MICHIGAMI T, OZONO K. Roles of phosphate in skeleton [J]. Frontiers in Endocrinology, 2019, 10: 3882.
- [13] QIU P, WANG P, LIU M, et al. Biocompatibility and osteoinductive ability of casein phosphopeptide modified polyetheretherketone [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1100238.
- [14] BERNAR A, GEBETSBERGER J V, BAUER M, et al. Optimization of the alizarin red S assay by enhancing mineralization of osteoblasts [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 723.
- [15] ZAINAL A S H, MEGAT A W R, ABDUL R M, et al. Evaluation of *in vitro* osteoblast and osteoclast differentiation from stem cell: a systematic review of morphological assays and staining techniques [J]. PeerJ, 2024, 12: e17790.
- [16] WU W, HE L, LI C, et al. Phosphorylation of porcine bone collagen peptide to improve its calcium chelating capacity and its effect on promoting the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103701.
- [17] PUTZ E M, MAJOROS A, GOTTHARDT D, et al. Novel non-canonical role of STAT1 in natural killer cell cytotoxicity [J]. OncoImmunology, 2016, 5(9): e1186314.
- [18] ROSENFELD R L, EHRMANN D A. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): The hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited [J]. Endocrine Reviews, 2016, 37(5): 467-520.
- [19] LOH H Y, NORMAN B P, LAI K S, et al. Post-transcriptional regulatory crosstalk between microRNAs and canonical TGF- β /BMP signalling cascades on osteoblast lineage: A comprehensive review [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6423.
- [20] MUNGER J S, HUANG X, KAWAKATSU H, et al. The integrin α v β 6 binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis [J]. Cell, 1999,

- 96(3): 319-328.
- [21] YAO M Y, CHENG S, ZHONG G Q, et al. Enhanced osteogenesis of titanium with nano-Mg(OH)₂ film and a mechanism study via whole genome expression analysis [J]. *BIOACTIVE MATERIALS*, 2021, 6(9): 2729-2741.
- [22] HE S Z, MENG K K, CHEN M X, et al. Transcriptome analysis of egg yolk sialoglycoprotein on osteogenic activity in MC3T3-E1 cells [J]. *Applied Sciences Basel*, 2021, 11(14): 6428.
- [23] ZHENG R Q, ZHANG N, MAO S B, et al. Fast bone regeneration using injectable fully biomimetic organoids with biomineralized and organic microenvironments [J]. *Biomaterials Science*, 2025, 13(2): 486-495.
- [24] 符丹丹, 邵鑫源, 张琦, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨白桦茸防治阿尔兹海默病的潜在作用机制 [J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(14): 228-235.
- [25] XIE X, HU L, MI B, et al. SHIP1 activator AQX-1125 regulates osteogenesis and osteoclastogenesis through PI3K/Akt and NF- κ b signaling [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 826023.
- [26] 黄剑英, 肖晶晶, 刘晓岚, 等. 基于Notch信号通路探讨黄芪皂苷对去势大鼠骨质疏松症的影响 [J]. *湖南中医杂志*, 2025, 41(2): 128-132.
- [27] ZANOTTI S, CANALIS E. Notch signaling and the skeleton [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(3): 223-253.
- [28] PEYMANFAR Y, SU Y W, XIAN C J. Notch2 blockade mitigates methotrexate chemotherapy-induced bone loss and marrow adiposity [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1521.
- [29] LI Y, ZHANG W, REN F, et al. Activation of TGF- β canonical and noncanonical signaling in bovine lactoferrin-induced osteogenic activity of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2880.
- [30] LIU Z, JIANG H, DONG K, et al. Different concentrations of glucose regulate proliferation and osteogenic differentiation of osteoblasts via the PI3 kinase/Akt pathway [J]. *Implant Dent*, 2015, 24(1): 83-91.