

鹿茸寡肽的制备及其促成骨细胞的增殖作用

王 华^{1,2}, 林 喆³, 刘 强², 蔡明军², 徐 力¹, 张学忠¹

(1. 吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130021;

2. 吉林大学中日联谊医院, 长春 130033; 3. 长春中医药大学中医药与生物工程研究开发中心, 长春 130117)

摘要 从梅花鹿鹿茸中提取了天然鹿茸总多肽(VATP). 在进一步分离纯化的过程中, 筛选出具有促成骨细胞增殖的高活性肽组分(VAP-B), 并通过制备型 HPLC 对其纯化, 得到了分子量分布约为 200 ~ 600 的小肽活性组分(VAP-B₂). 细胞周期分析结果表明, 鹿茸肽 VAP-B₂ 组分促进了人成骨肉瘤细胞 OS-732 的周期转化, 使其细胞周期 S 期细胞指数明显增加, 即表现为 S 期 DNA 含量明显提高. 碱性磷酸酶(ALP)活性检测结果表明, 随着鹿茸肽 VAP-B₂ 剂量的增加, ALP 的活性明显增加. 这与成骨细胞增殖分化及成熟过程中, 细胞的周期性变化和骨形成标志物碱性磷酸酶水平的明显增高相符.

关键词 梅花鹿鹿茸; 鹿茸肽; 分离与纯化; 生理活性; 成骨细胞

中图分类号 Q514; O629

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)09-1791-06

鹿茸取自梅花鹿(*Cervus Nippon Temminck*)尚未角化的幼角.《本草纲目》中记载:鹿茸“生精补髓, 养血益阳, 强筋健骨”. 鹿茸含有多种生物活性物质, 能够促进机体的生长发育和新陈代谢^[1], 增强机体的免疫功能^[2,3], 对神经系统和心血管系统具有良好的调节作用, 对骨折及创伤愈合有促进作用^[4~6]. 它能在短期内迅速生长发育成具有成骨、造血、神经与表皮生长、生毛与血管发育的综合器官, 说明鹿茸在骨化之前贮存了大量的生长因子^[7]. 临床上鹿茸被用于多种疾病的治疗, 并取得了良好的效果.

据已有报道, 从马鹿茸中分离得到的分子量范围分别为 1000 ~ 3000 和 1000 ~ 9000 的活性多肽组分具有促进软骨细胞分裂的作用^[8]. 但有关来自梅花鹿茸的多肽是否对成骨细胞具有调节作用迄今还未见报道.

本文从梅花鹿鹿茸中提取天然鹿茸总多肽, 并在进一步系列分离纯化的过程中, 对所获得的组分进行生理活性的细胞学检验, 筛选出高活性的组分. 最后通过制备型 HPLC 对其纯化, 得到了分子量分布约为 200 ~ 600 的小肽活性组分. 研究鹿茸总多肽组分和小肽组分对成骨样细胞增殖活力的影响, 旨在揭示鹿茸寡肽是否能促成骨细胞的增殖, 为探讨其作用机理和开发治疗骨质疏松症的鹿茸寡肽药物提供依据.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

新鲜的梅花鹿(*Cervus Nippon Temminck*)鹿茸购自吉林省东丰县; 人成骨肉瘤细胞系 OS-732 (Human osteosarcoma cell line OS-732)由吉林大学中日联谊医院中心实验室提供; 胎牛血清、RNA 酶、IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 和 MTT (四唑盐, 商品名为噻唑蓝)均购自 Sigma 公司; SephadexG-25 购自 Pharmacia 公司; 其它试剂均为分析纯或色谱纯.

收稿日期: 2008-02-29.

基金项目: 国家中医药管理局科学基金(批准号: 2004ZDZX003)和吉林省科学技术厅科研基金(批准号: 200705288)资助.

联系人简介: 张学忠, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学与酶工程研究. E-mail: zhangxz@mail.jlu.edu.cn

徐 力, 女, 博士, 教授, 主要从事酶工程与纳米技术研究. E-mail: xuli@jlu.edu.cn

高速冷冻离心机(CR-26H, 日本日立公司); 超滤器; 冷冻干燥机; 高效液相色谱仪(L-6200, 日本日立公司); Qstar 液相-串联质谱-飞行时间质谱系统(Qstar, 美国生物应用公司); 制备型高压液相色谱仪(SPD-10A, 岛津公司); 自动流式细胞分析仪(ELITE, 日本 COULTER 公司); 自动酶标仪(EXL800, 美国 BIO-TEK 公司); 倒置显微镜(IMT-2, 日本奥林帕斯公司); CO₂ 培养箱[CPD-172(a) 日本平泽公司].

1.2 鹿茸肽的提取、分离及纯化

鹿茸肽提取: 取新鲜的梅花鹿鹿茸 1 kg, 剁成小块(1 cm³ 左右), 用预冷的蒸馏水(4 °C) 冲洗至无色, 绞碎, 经胶体磨匀浆, 匀浆过程中不断添加预冷的匀浆液 5000 mL(0.05 mol/L, pH = 4.0 的 HAC-NaAc 缓冲液); 以转速 9000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 加入体积分数为 95% 的乙醇使其终质量分数达到 65%, 于 4 °C 放置并搅拌(1 次/30 min), 4 h 后以 8000 r/min 的转速离心 20 min, 取上清液于 55 °C 真空旋转蒸发, 回收乙醇. 冻干后得到鹿茸粗提物, 于 -20 °C 保存.

鹿茸多肽凝胶过滤层析分离: 取鹿茸粗提物冻干品 100 mg, 用 10 mL 蒸馏水溶解. 取 2 mL 溶解液加样到 Sephadex G-25 凝胶过滤色谱柱(16 mm × 1000 mm) 上, 流动相为蒸馏水, 流速为 1 mL/min, 洗脱过程用分光光度计监测, 检测波长为 280 nm. 分别收集洗脱峰, 冷冻干燥.

制备型-HPLC 纯化: 取洗脱峰 VAP-B 冻干品用蒸馏水溶解, 过膜后进样, 得到 2 个洗脱峰, 冷冻干燥. 层析条件: Shim-pack PRC-DOS(L) C₁₈ 柱(50 mm × 250 mm); 流动相: V(甲醇): V[水(0.1% TFA, 质量分数)] = 10:90; 流速: 30 mL/min; 进样量: 5 mL 200 mg/mL 溶液; 检测波长: 280 nm.

1.3 鹿茸多肽理化性质分析

蛋白含量测定采用 Folin-酚法^[9]. 以牛血清白蛋白为标准蛋白, 绘制标准曲线; 相对分子量采用飞行时间质谱法(MS TOF)测定, 检测方式: 飞行时间; 进样量流速: 10 μL/min.

1.4 鹿茸多肽生理活性检测

1.4.1 鹿茸多肽对人成骨肉瘤细胞(OS-732)增殖作用的影响 取 OS-732 细胞, 按每孔 3 × 10⁵ 个细胞种植于 6 孔板中. 细胞贴壁 24 h 后, 更换为含有鹿茸肽组分 VAP-B₂(50 mg/L) 的 IMDM 培养液, 对照组更换基础培养液, 置于 37 °C 含体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中, 分别于第 2 天、第 4 天和第 6 天测 MTT, 绘制生长曲线, 并按下式计算增殖率:

$$\text{细胞增殖率} = [(A_{492\text{实验组}} - A_{492\text{对照组}}) / A_{492\text{对照组}}] \times 100\%$$

MTT 检验^[10,11]: 取 OS-732 细胞, 按每孔 8 × 10³ 个细胞种植于 96 孔板, 每孔 0.2 mL. 细胞贴壁 24 h 后, 更换含不同浓度鹿茸肽的 IMDM 培养液 0.2 mL, 使鹿茸肽终质量浓度为 50 和 100 mg/L, 对照组用基础培养液培养, 共 6 个样, 4 个浓度组, 每组设 5 个复孔. 加鹿茸肽后 24, 48, 72 h 进行 MTT 测定. 培养结束前 4 h, 向每孔加入 MTT 20 μL. 培养结束后, 吸去培养液, 每孔加入 200 μL DMSO. 振荡 10 min, 使结晶全部溶解, 用自动酶标仪在 492 nm 波长下测定各孔吸光度值(A).

1.4.2 细胞周期分析 取 OS-732 细胞, 按每孔 3 × 10⁵ 个细胞种植于 6 孔板中. 细胞贴壁 24 h 后, 更换为含有 50 mg/L 鹿茸多肽的 IMDM 培养液, 对照组更换基础培养基, 置于 37 °C 含体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中, 48 h 后离心收获细胞, 用体积分数为 70% 的冷乙醇固定. 24 h 后以 500 r/min 的速度离心 10 min, 弃去上清液(除去乙醇), 沉淀用 PBS(磷酸缓冲液)清洗 3 次, 以 1500 r/min 的速度离心 5 min, 弃去上清液. 向沉淀中加入 0.2 mL PBS, 用 350 目筛网滤过后, 加入 100 mL RNA 酶, 置于 37 °C 水浴中放置 30 min, 加入 400 μL 的碘化吡啶(PI)混匀, 放入 4 °C 冰箱中冷藏 30 min, 上机检测.

1.4.3 碱性磷酸酶(ALP)活性的检测 采用改良 Gomori 钙-钴法检测细胞内碱性磷酸酶的活性^[12]. 取 OS-732 细胞, 按每孔 4 × 10⁴ 个细胞接种于 6 孔细胞培养板, 孔板内置经处理的盖玻片进行细胞爬片. 细胞贴壁后, 更换为含有 50 和 100 mg/L 鹿茸肽的 IMDM 培养液, 对照组更换为基础培养基, 置于 37 °C 含体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中培养. 24 h 后弃掉培养液, 加入体积分数为 95% 的乙醇固定 10 min, 用蒸馏水冲洗 2 次, 再加入到孵育液(含质量分数为 3% 的 β-甘油磷酸钠 5 mL, 含质量分数为 2% 的巴比妥钠 5 mL, 蒸馏水 10 mL, 质量分数为 2% 的氯化钙 10 mL, 质量分数为 2% 的硫酸镁 1 mL) 中, 于 37 °C 孵育 4 h. 用水冲洗 2 次, 在质量分数为 2% 的硝酸钴中浸 5 min, 再在质量分数为 1% 的硫化

铵中浸 2 min, 用水冲洗、晾干. 取细胞爬片, 在显微镜下随机选择视野观察染色情况并拍照.

1.5 统计学处理

实验数据以标准偏差形式 $x \pm s$ 表示, 并应用 SPSS/PC 统计软件进行 NOVA 统计学分析.

2 结果与讨论

2.1 鹿茸总多肽的分离与纯化

提取得到的鹿茸总多肽(VATP)粗提物呈黄白色粉末状, 且易溶于水. 经 Sephadex G-25 柱分离, 共获得 5 个洗脱峰(VAP-A, VAP-B, VAP-C, VAP-D 和 VAP-E, 见图 1). 所得样品用 MTT 法进行检测考察其对成骨样细胞增殖活力的影响. 发现鹿茸肽组分 VAP-B 的活性明显高于其它 4 个组分, 冻干后, 鹿茸肽组分 VAP-B 呈淡黄色粉末状, 易溶于水.

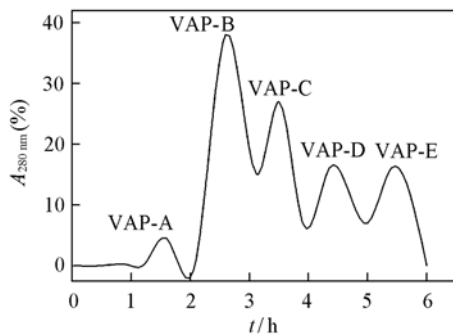


Fig. 1 Sephadex G-25 chromatograph profile of VATP of velvet antlers of sika deer

Chromatograph condition: the column, Sephadex G-25 (16 mm × 1000 mm); the flow phase: distilled water; the flow rate: 1 mL/min; the monitor wavelength: 280 nm.

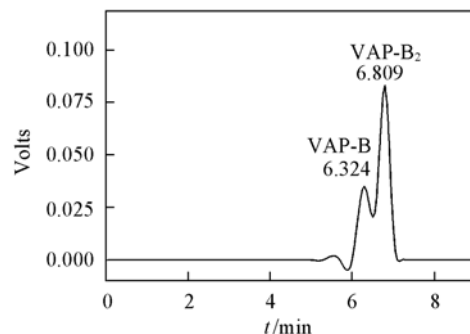


Fig. 2 Preparative HPLC chromatograph profile of VAP-B

Chromatograph condition: the column: Shim-pack PRC-DOS(L) C₁₈ (50 mm × 250 mm); the flow phase: V(methanol): V[water(0.1% TFA)] = 10:90; the flow rate: 30 mL/min; the monitor wavelength: 280 nm.

将分离得到的鹿茸肽组分 VAP-B 经制备型 HPLC 纯化, 共获得 2 个洗脱峰(VAP-B₁ 和 VAP-B₂, 见图 2). 收集各洗脱峰, 浓缩, 测定蛋白质含量, 再经 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌. 所得样品用 MTT 法检测其对成骨样细胞增殖活力的影响. 发现图 2 中保留时间为 6.809 min 的鹿茸肽组分 VAP-B₂ 的活性明显高于保留时间为 6.324 min 的鹿茸肽组分 VAP-B₁. 组分 VAP-B₂ 经冻干后呈白色絮状, 极易溶于水.

对经制备型 HPLC 纯化的鹿茸肽组分 VAP-B₂ 进行了质谱分析, 结果见图 3. 由图 3 可知鹿茸肽组分 VAP-B₂ 的分子量分布约为 200 ~ 600. 在本实验条件下所获得的具有成骨样细胞增殖活力的鹿茸肽是分子量仅为几百的小肽. 这一结果明显地不同于文献[8]结果.

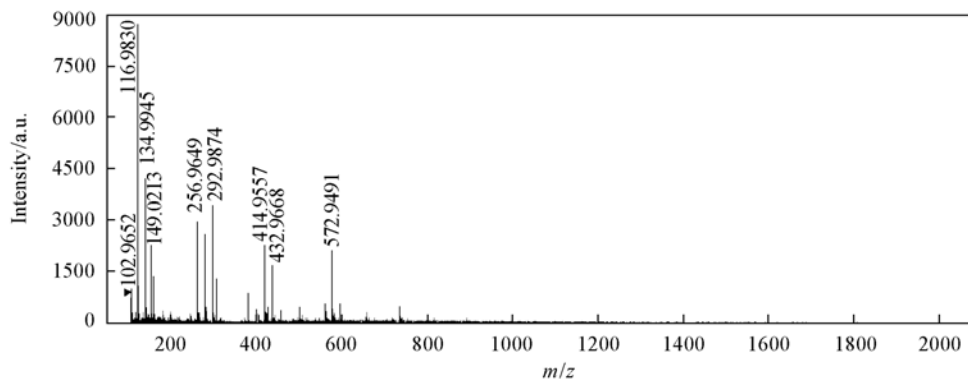


Fig. 3 MS profile of VAP-B₂

2.2 鹿茸多肽生理活性

2.2.1 成骨样细胞形态学 人成骨肉瘤细胞(OS-732)培养 24 h 后的形态图如图 4 所示. 在倒置显微

镜下可见细胞贴壁生长,呈三角形、纺锤形等多种形态.形态相似的细胞成堆出现,胞浆伸展,并伸出2~4个突起,有的突起已相互联结.1~2 d后,细胞呈指数增长,细胞体积增大,胞浆丰富,可见较多细胞分裂相.3~4 d后,细胞融合呈铺石状排列,大多呈立方形.加入鹿茸肽组分 VAP-B₂ 后,细胞形态改变不明显,但细胞生长较快,尤其以 50 和 100 mg/L 鹿茸肽更为明显.

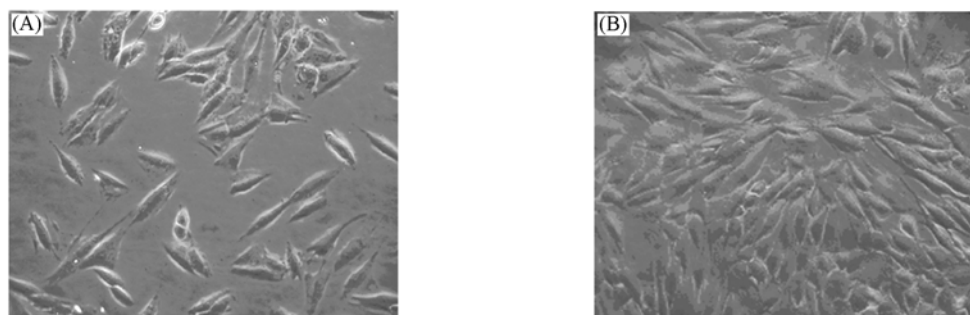


Fig. 4 Morphology of the human osteosarcoma cells OS-732

(A) Control group; (B) testing group with VAP-B₂ (50 mg/L).

2.2.2 鹿茸肽对成骨样细胞增殖活力的影响 以不同浓度和不同组分的鹿茸肽作用于成骨样细胞后进行 MTT 实验,结果分别列于表 1 和表 2 中.可见鹿茸总多肽(VATP)和鹿茸肽 VAP-B 组放置 24 h 后,其细胞活力逐渐增长,其中鹿茸总多肽和鹿茸肽 VAP-B(50 和 100 mg/L)可明显促进成骨样细胞增殖,与对照组比较有显著差异.鹿茸肽 VAP-B 作用于成骨样细胞 48 h 及 72 h,有同样的变化,且细胞增殖更加明显.而其它鹿茸肽组分对成骨样细胞增殖与对照组比较无统计学意义.

Table 1 Effects of VATP and VAP-A—E on proliferation of human osteosarcoma cells($x \pm s$, $n = 5$)

Group	Absorbance					
	24 h		48 h		72 h	
	50 mg/L	100 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
Control	0.108 ± 0.009	0.108 ± 0.009	0.142 ± 0.012	0.142 ± 0.012	0.167 ± 0.014	0.167 ± 0.014
VAP-A	0.094 ± 0.008	0.097 ± 0.015	0.143 ± 0.015	0.124 ± 0.013	0.156 ± 0.071	0.160 ± 0.020
VAP-B	0.172 ± 0.016*	0.218 ± 0.011*	0.210 ± 0.013*	0.277 ± 0.017*	0.247 ± 0.011*	0.320 ± 0.018*
VAP-C	0.095 ± 0.011	0.101 ± 0.013	0.155 ± 0.074	0.143 ± 0.017	0.155 ± 0.074	0.147 ± 0.013
VAP-D	0.111 ± 0.009	0.112 ± 0.014	0.140 ± 0.071	0.151 ± 0.008	0.144 ± 0.049	0.159 ± 0.012
VAP-E	0.111 ± 0.015	0.122 ± 0.077	0.151 ± 0.011	0.132 ± 0.048	0.159 ± 0.067	0.150 ± 0.021
VATP	0.152 ± 0.009*	0.176 ± 0.011*	0.189 ± 0.009*	0.236 ± 0.016*	0.236 ± 0.016*	0.280 ± 0.014*

* Comparison with the control group, $P < 0.01$.

Table 2 Effects of VAP-B₁ and VAP-B₂ on proliferation of human osteosarcoma cells($x \pm s$, $n = 5$)

Group/(mg · L ⁻¹)	Absorbance					
	24 h		48 h		72 h	
	VAP-B ₁	VAP-B ₂	VAP-B ₁	VAP-B ₂	VAP-B ₁	VAP-B ₂
Control	0.106 ± 0.011	0.106 ± 0.011	0.130 ± 0.008	0.130 ± 0.008	0.171 ± 0.012	0.171 ± 0.012
25	0.097 ± 0.007	0.141 ± 0.011*	0.114 ± 0.014	0.160 ± 0.004	0.166 ± 0.019	0.198 ± 0.008
50	0.096 ± 0.008	0.167 ± 0.013*	0.155 ± 0.074	0.186 ± 0.004*	0.170 ± 0.010	0.237 ± 0.024*
100	0.102 ± 0.007	0.218 ± 0.011*	0.120 ± 0.009	0.240 ± 0.033*	0.184 ± 0.006	0.330 ± 0.018*

* Comparison with the control group, $P < 0.01$.

对于鹿茸多肽 VAP-B₁ 和 VAP-B₂ 来说, VAP-B₂ 组分放置 24 h 后,其细胞活力逐渐增长,其中 VAP-B₂ 组分质量浓度为 25, 50 和 100 mg/L 时可明显促进成骨样细胞增殖,与对照组比较有显著差异,且随浓度和时间增加呈线性增长,含鹿茸多肽 VAP-B₂ 的 50 和 100 mg/L 组分作用于成骨样细胞 48 h 及 72 h 时则有同样的变化,且细胞增殖更加明显.而 VAP-B₁ 组分对成骨样细胞增殖与对照组比较无统计学意义.

2.2.3 鹿茸肽 VAP-B₂ 对成骨样细胞的细胞周期的影响 考察了鹿茸肽组分 VAP-B₂ 对成骨样细胞的细胞繁殖周期的影响,流式细胞仪分析结果见图 5.与对照组相比,加入鹿茸多肽 VAP-B₂ 后,促进了人成骨肉瘤细胞 OS-732 的周期转化,细胞周期 S 期细胞指数明显增加,表现为 S 期 DNA 含量上升.这

一实验结果说明鹿茸肽 VAP-B₂ 组分对成骨样细胞有明显的增殖作用。

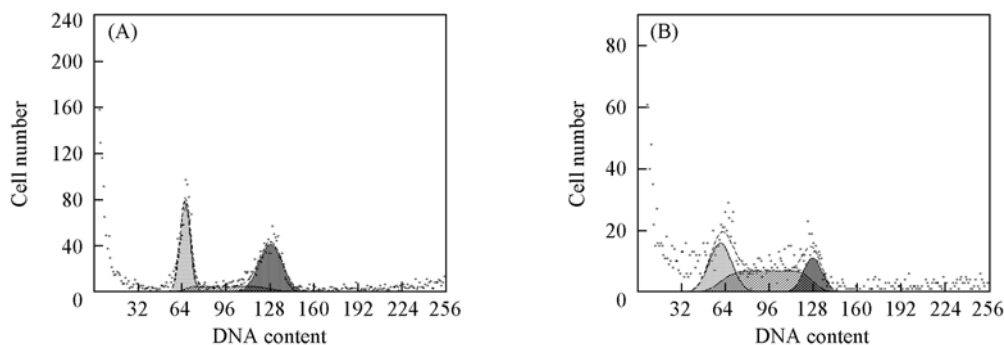


Fig. 5 Flow cytometry test of VAP-B₂

(A) Control group; (B) testing group with VAP-B₂ (50 mg/mL).

2.2.4 细胞内 ALP 活性的检测 鹿茸肽组分 VAP-B₂ 作用于人成骨肉瘤细胞(OS-732)24 h, 采用改良 Gomori 钙-钴法显示细胞内 ALP 活性, 实验结果如图 6 所示. 可见对照组呈淡灰色, 实验组呈灰黑色且密集, 表明实验组 ALP 活性明显高于对照组, 尤以 100 mg/L 组最为明显.

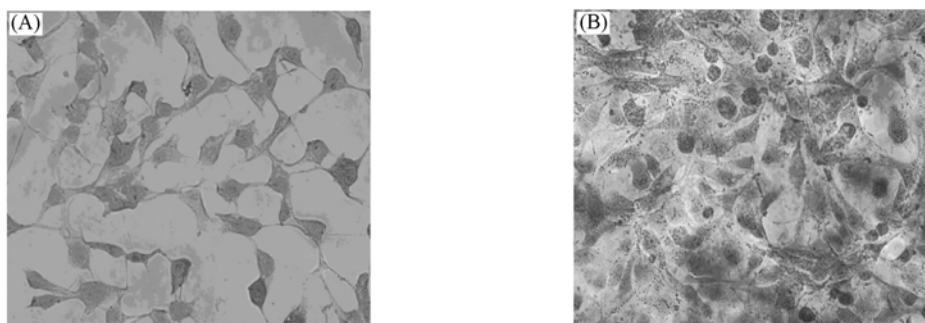


Fig. 6 Effects of VAP-B₂ on ALP activity in human osteosarcoma cells

(A) Control group(400×); (B) VAP-B₂: 100 mg/L(400×).

上述实验结果说明, 鹿茸活性成分 VAP-B₂ 在促进骨细胞增殖的同时, 骨特异性碱性磷酸酶表达也十分活跃.

由于鹿茸含有多种生物活性物质, 临床上鹿茸一直被用于多种疾病的治疗. 1992 年 Bad 等^[13] 从鼠科动物愈合的骨髓组织中分离、纯化得到能够促进成骨肉瘤细胞增殖的成骨生长肽(OGP), 由 14 个氨基酸组成. 随后 Greenberg 等^[14] 从人血清中纯化得到序列与前者完全一样的成骨生长肽. NCBI 蛋白质数据库检测结果显示, 来源于人体或鼠科动物的成骨生长肽, 其分子量均为 2000 以下的肽, 而其它哺乳动物来源的 OGP 还未见报道. 这一结果与 Laemmler^[15] 报道的成骨生长肽(OGP)促进成骨肉瘤细胞增殖的结论相符.

综上所述, 鹿茸中确实含有调节人成骨肉瘤细胞 OS-732 增殖的生物活性因子——鹿茸肽, 本研究所获得的活性组分分子量分布在 200~600 范围内, 属于小肽, 它可能参与了鹿茸的骨质生长与骨化过程的调控, 为鹿茸的临床促进骨质生长、骨化及治疗骨质疏松等作用的深入研究以及筛选具有防治骨质疏松的活性鹿茸因子提供了实验依据.

参 考 文 献

- [1] HUO Yu-Shu(霍玉书), HUO Hong(霍虹), Winters W. D., et al.. Tradit. Chin. Drug Res. & Clin. Pharmacol. (中药新药与临床药理)[J], 1997, 8(2): 79—81
- [2] FAN Yu-Lin(范玉林), XING Zeng-Tao(邢增涛), FEI Gong-Qing(卫功庆). J. Econ. Anim. (经济动物学报)[J], 1998, 2(1): 27—31
- [3] DING Chang-Hai(丁长海), WU Cheng-Yi(吴成义). Acta Univ. Med. Anhui(安徽医科大学学报)[J], 1995, 30(1): 4—6
- [4] ZHOU Qiu-Li(周秋丽), GUO Ying-Jie(郭颖洁), WANG Li-Juan(王丽娟), et al.. Acta Pharmacol. Sin. (中国药理学报)[J],

- 1999, **20**(3): 279—282
- [5] GUO Ying-Jie(郭颖洁), ZHOU Qiu-Li(周秋丽), LIU Ping(刘平), *et al.*. *Chin. J. Biochem. Pharm.* (中国生化药物杂志)[J], 1998, **19**(2): 74—76
- [6] WENG Liang(翁梁), ZHOU Qiu-Li(周秋丽), WANG Li-Jian(王丽娟), *et al.*. *Acta Pharm. Sinica*(药学报)[J], 2001, **36**(11): 817—820
- [7] YANG Lu-Lu(杨璐璐), CHI Cheng(迟程). *J. Yunnan Coll. Tradit. Chin.* (云南中医学院学报)[J], 1995, **18**(4): 19—23
- [8] ZHOU Qiu-Li(周秋丽), LIU Yong-Qiang(刘永强), WANG Ying(王颖), *et al.*. *Chin. J. Chin. Mater. Med.* (中国中药杂志)[J], 2001, **26**(10): 699—702
- [9] Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., *et al.*. *J. Biol. Chem.* [J], 1951, **193**: 265—275
- [10] Russell C. A., Vindelov L. L. *J. Immunol. Methods*[J], 1998, **217**(1/2): 165—175
- [11] Mosmann T. *J. Immunol. Meth.* [J], 1983, **65**: 55—65
- [12] DU Zhuo-Min(杜卓民). *Practical Tissue Technology*, 2nd Edition(实用组织学技术, 第二版)[M], Beijing: People's Medical Publishing House, 1998: 321—322
- [13] Bad I., Gazit D., Chorev M., *et al.*. *EMBO J.* [J], 1992, **11**(5): 1867—1873
- [14] Greenberg Z., Chorev M., Muhlrad A., *et al.*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* [J], 1995, **80**(8): 2330—2335
- [15] Laemmli U. K. *Nature*[J], 1970, **227**(259): 680—685

Preparation of Velvet Antlers Small Peptides and Stimulating Effects on Osteosarcoma Cell Proliferation

WANG Hua^{1,2}, LIN Zhe³, LIU Qiang², CAI MING-Jun², XU Li^{1*}, ZHANG Xue-Zhong^{1*}

(1. *Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of the Ministry of Education,*

Jilin University, Changchun 130021, China;

2. *China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, China;*

3. *Research and Exploitation Center of Chinese Medicine and Bioengineering,*

Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract The native total peptides (VATP) were extracted from velvet antlers of sika deer (*Cervus nippon* Temminck). A high active peptide component (VAP-B) stimulating proliferation of a human osteosarcoma cells was isolated from VATP. Finally, a further purified active peptide component (VAP-B₂) with molecular weight distribution from about 200—600 was obtained from VAP-B by preparative HPLC. VAP-B₂ was able to enhance the average content of DNA in S phase. And also the alkali phosphatase (ALP) activity in osteosarcoma cells increased obviously with the increase of VAP-B₂ dosage and treatment time. The results are consistent with cell cycle variation and ALP level as a marker of bond formation during osteocyte proliferation and differentiation, as well as maturity. The results obtained in this study provide a clue to explore a new peptide medicine from velvet antlers for therapy of osteoporosis.

Keywords Velvet antlers of sika deer; Sika deer peptides; Isolation and purification; Physiologic activity; Osteosarcoma cells

(Ed.: H, J, Z)