

成骨生长肽调节鼠胚颅盖骨成骨细胞样细胞酶活性的观察

李群 王智兴 朱雅萍

摘要 目的 观察成骨生长肽(Osteogenic growth peptide,简称 OGP)对 SD 大鼠鼠胚颅盖骨成骨细胞样细胞酶活性的影响。方法 无菌条件下培养鼠胚颅盖骨成骨细胞样细胞,分为不加 OGP 的对照组和加 OGP 的用药组,用药组在 $10^{-12}\text{M} \sim 10^{-8}\text{M}$ OGP 浓度范围内,再分为三组(分别为 OGP 浓度 10^{-12}M 、 10^{-10}M 、 10^{-8}M),收集以上四组细胞及细胞培养液,测定它们的碱性磷酸酶及酸性磷酸酶活性。结果 用药组的碱性磷酸酶活性均显著地高于对照组($P < 0.01 \sim 0.05$,用药组 OGP 10^{-8}M 浓度、培养 7 天的细胞培养液中碱性磷酸酶活性为 $0.82 \pm 0.16\text{U/L}$,而对照组同样条件活性为 $0.23 \pm 0.10\text{U/L}$),且随着 OGP 浓度的升高碱性磷酸酶活性也升高,而酸性磷酸酶用药组与对照组无显著差异。结论 OGP 能促进成骨细胞样细胞分泌碱性磷酸酶。

关键词 成骨生长肽 成骨细胞样细胞 碱性磷酸酶

Regulatory role of osteogenic growth peptide on enzyme activity of osteoblast-like cells in rats

Li Qun, Wang Zhixing, Zhu Yaping

Department of Orthopedics, Ruijin Hospital, Shanghai Medical University, and Shanghai Institute of Traumatology and Orthopedics, Shanghai 200025, China

Abstract **Objective** To investigate the regulatory role of osteogenic growth peptide (OGP) on enzyme activity of osteoblast-like cells in rats. **Methods** The isolated osteoblastic cells from calvaria of newborn rats were cultured *in vitro*. Cultured osteoblastic-like cells were divided into two groups: one group was added with OGP, the other was added with DMEM as the control group. The experimental group was further divided into three subgroups (10^{-8}M , 10^{-10}M and 10^{-12}M OGP). The activities of alkaline phosphatase and acid phosphatase in these 4 groups were determined. **Results** The activities of alkaline phosphatase in cells and extracellular matrix of the experimental group were significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$, $0.82 \pm 0.16\text{U/L}$ for OGP 10^{-8}M group on 7th culture day in extracellular matrix and $0.23 \pm 0.10\text{U/L}$ for the control group). No change in activities of acid phosphatase in osteoblast-like cells and extracellular matrix between the control group and the experimented group was observed. The alkaline phosphatase activities of cells and extracellular matrix in the experimental group were gradually upregulated with increasing concentrations of OGP from 10^{-12}M to 10^{-8}M in range. **Conclusion** OGP can enhance alkaline phosphatase activity in osteoblast-like cells, thereby promoting osteogenic effect.

Key words Alkaline phosphatase Osteogenic-like cells Osteogenic growth peptide

成骨生长肽(Osteogenic growth peptide, 简称 OGP)是新近发现的具有促进成骨作用和刺激造血的多肽类因子,在骨形成和骨髓造血方面有独特的作用,目前正日益成为研究的热点。本文通过 OGP 对 SD 大鼠鼠胚颅盖骨成骨细胞样细胞酶活性影响的观察,证实 OGP 能促进成骨细胞样细胞分泌碱性磷酸酶,而且不同浓度的 OGP 对细胞的促分泌作用也有差异,为 OGP 在治疗和预防骨质疏松方面提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物

出生 24 小时内的 SD 大鼠,本研究所动物房提供。

1.2 试剂及仪器

对硝基苯酯二钠盐(上海丽珠东风生物技术有限公司);

成骨生长肽(SIGMA 公司);胎牛血清(中科院上海生物制品研究所);7530 紫外可见分光光度计(上海分析仪器三厂);Hitachi 52D 高速离心机(日本日立公司);Olympus AHB7 研究显微镜(日本 Olympus 公司);Olympus 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);E spec BNA-311 二氧化碳培养箱。

1.3 成骨细胞样细胞培养

出生 24 小时内的 SD 大鼠,无菌条件下,剥离颅盖骨,先用 Hank 液冲洗剥离组织数次,再用剪刀减碎后,用 0.25%胰蛋白酶消化约 10 分钟,弃去消化液,碎骨片再用胰蛋白酶消化数分钟后,过滤,过滤液经过离心后,取沉淀细胞加入血清终止消化,即是第一次的细胞。将上清液倒入尚未完全消化的碎骨片中,继续消化后,如上所述重复 3 次,收集所有细胞,合并计数,按酶活性制定 1.5×10^4 细胞数/cm² 的密度种于培养瓶中,对照组用 DMEM 作培养液,实验组在 DMEM 液中加入 OGP,使 OGP 浓度分别为 10^{-12} M、 10^{-10} M、 10^{-8} M,上述细胞分置于 37℃5%CO₂ 培养箱内培养,每 3 天换液 1 次,

约两周传代 1 次。第 2 次传代后,分别于培养第 3、7、10、14、21 天收集细胞及培养液,测定其酶活力。

1.4 OGP 制备

OGP 按 Greenberg^[1]方法制备获得,纯度达 99%,称一定量 OGP 制备成贮存液,置冰箱冷冻室内保存,用时解冻后,稀释成不同浓度或将其直接加入 DMEM 培养液中,用于细胞培养液。

1.5 细胞观察 应用 Olympus 倒置显微镜观察培养细胞的形态、生长情况,并摄影记录,培养成功再进行测定。

1.6 酶活性测定

酶活性测定采用蔡武城等^[2]方法。

1)碱性磷酸酶:以 37℃,pH10.0,在 10 mmol/L 对一硝基酚磷酸酯(NPP)存在条件下,每分钟催化生成 1μmol 对硝基酚的酶量为一个酶活性单位(U)

2)酸性磷酸酶:以 35℃,PH5.0,在 1.2 mmol/L 对一硝基酚磷酸酯(NPP)存在条件下,每分钟催化生成 1μmol 对硝基酚的酶量为一个酶活性单位(U)

1.7 统计学处理 结果以 $\bar{X} \pm S$ 表示,统计方法采用 *t* 检验。

2 结果

分别测定四组细胞培养第 3、7、10、14 和 21 天的细胞内及培养液中的碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的活力。详见附表及附图。

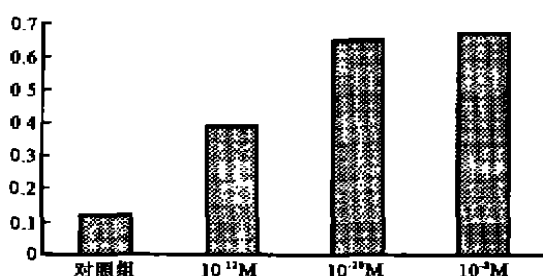


图1 培养14天四组细胞的碱性磷酸酶活性

3 讨论

早在1969年 Amsel 等^[3]就发现去骨髓再生之前存在骨形成相,即骨髓腔中暂时性骨小梁形成。后来 Bad^[4,1]证实愈合的骨髓组织能产生促进成骨细胞增殖的生长因子活性,并分离、纯化得到一个由14个氨基酸组成的小肽,命名为成骨生长肽。研究证实成骨生长肽在体外能促进成骨细胞分化,增殖和增加骨基质矿化;在体内能促进造血,刺激造血基质的微循环,促进机体成骨作用,提高骨小梁密度。

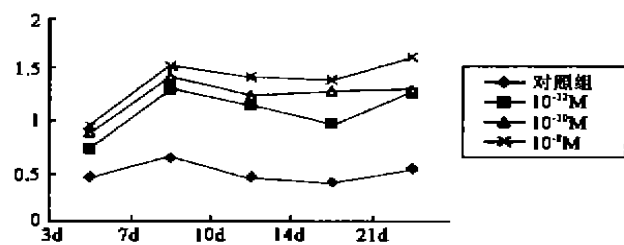


图2 不同培养时间四组细胞内的碱性磷酸酶活性

表1 酸性磷酸酶活性

组别	例数 n	时间 (天数)	培养液中
对照组	6	7	0.14±0.04
	6	10	0.16±0.06
	6	14	0.16±0.05
OGP10 ⁻⁸ M 实验组	6	7	0.16±0.07
	6	10	0.20±0.05
	6	14	0.18±0.04

注:结果显示酸性磷酸酶活力实验组与对照组无显著差异。

本研究通过鼠胚颅盖骨成骨细胞样细胞观察,证实培养液中加入 OGP 后的用药组,不论 OGP 在培养液中的浓度如何,在培养早期都有碱性磷酸酶分泌,且碱性磷酸酶活力在细胞内7天 OGP10⁻¹²M 浓度用药组为1.30±0.19U/L;对照组相同条件为0.62±0.19U/L;在细胞培养液内7天 OGP10⁻⁸M 浓度用药组为0.82±0.16U/L;对照组相同条件为0.23±0.10U/L,均显著地高于对照组($P<0.01\sim0.05$)。鼠胚

颅盖骨分离细胞是由不同分化阶段的成骨细胞样细胞构成,因此,在培养过程中将表现出不同分化阶段的功能,所以作者用它作为培养模型进行研究。碱性磷酸酶是成骨细胞分化的指标,在碱性环境中骨钙化最活跃,成骨细胞释放的碱性磷酸酶能使无机磷酸盐水解,从而降低磷酸盐浓度,有利于骨的矿化。因此,碱性磷酸酶可以作为反映骨形成的生化标志物。本研究显示,OGP 能显著增加成骨细胞样细胞及培养液的碱性磷酸酶活力($P<0.01\sim0.05$)。Robinson 等报道^[7]OGP 在10⁻⁹M 浓度时能增加人骨髓基质细胞的碱性磷酸酶活性,本实验结果与上述说法有相似之处,说明 OGP 对成人成骨细胞样细胞也有上述结果。

据培养日期分析(见图),实验组在培养3~7天的成骨细胞样细胞的碱性磷酸酶活力开始升高,至10天左右活力有所下降,约21天细胞活性回升,这是细胞周期的影响。

同时在研究中还发现不同 OGP 浓度对成骨细胞样细胞分泌碱性磷酸酶有调节作用。OGP 在10⁻¹²M~10⁻⁸M 浓度范围内,表现为低浓度时分泌抑制,而高浓度时分泌上调(见图)。这与 Greenberg Z^[5]等报道,OGP 对细胞增殖和碱性磷酸酶活性表现为低浓度时抑制,达到某一临界点后则为促进的结论相符合。实验证明,OGP 具有使成骨细胞样细胞分泌碱性磷酸酶增加,与对照组有显著性差异($P<0.01\sim0.05$),且 OGP 的浓度对碱性磷酸酶活力有调节作用。

酸性磷酸酶活性与破骨细胞的活性有关,因而成骨细胞样细胞培养液中的酸性磷酸酶水平反映了破骨细胞的活性和骨吸收的状况。本研究中用 OGP 的实验组的酸性磷酸酶活性与对照组无显著性差异,说明成骨生长肽对成骨细胞样细胞酸性磷酸酶的分泌无影响。骨组织经常处于旧骨被吸收,新骨再形成的骨重建过程。骨质疏松症是由于骨重建过程中骨吸收大于骨的形成^[8],实验表明成骨生长肽具有促成骨作用。

作者在电镜观察中发现,加 OGP 培养的三组细胞粗面内质网比对照组丰富,是代谢旺盛的表现,同时光镜观察用药组的细胞数目明显多于对照组,且有细胞结节产生^[9],也证实了 OGP 具有促进成骨细胞样细胞分泌促成骨成份的作用。因此,OGP 能调节成骨细胞样细胞的成骨作用,促进骨形成。它在治疗骨折,骨质疏松,骨植入和骨髓移植方面的作用,尚在研究起步阶段,有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Greenberg Z, Chorev M, Muhlrad A, et al. Structural and functional characterization of osteogenic growth peptide from human serum: identity with rat and mouse homologs. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80: 2330.
- 2 蔡武城, 李碧羽, 李玉民, 等. 生物化学实验技术教程. 上海: 复旦大学出版社, 1983, 184-186.
- 3 Amsel S, Manistis A, Tavassoli M, et al. The significance of intramedullary cancellous bone formation in the repair of bone marrow tissue. *Anat Rec*, 1969, 164(1): 101.
- 4 Bab I, Gazit D, Muhlrad A, et al. Regenerating bone marrow produces a potent growth-promoting activity to osteogenic cell. *Endocrinology*, 1988, 123: 345.
- 5 Bab I, Gazit D, Chorev M, et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *EMBO J*, 1992, 11: 1867.
- 6 Greenberg Z, Gavish H, Muhlrad A, et al. Isolation of osteogenic growth peptide from osteoblastic MC3T3 E1 cell culture and demonstration of osteogenic growth peptide binding proteins. *J Cell Biochem*, 1997, 65(3): 359-367.
- 7 Robinson D, Bab I, Nevo Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 690.
- 8 Kahn A, Gibbon R, Perkins S, et al. Age-related bone loss. *Clin Orthop*, 1955, 313: 69-75.
- 9 饶寒敏, 王智兴, 李群, 等. 成骨生长肽对体外培养成骨细胞样细胞的促成骨作用. 待发表.