

持续给予 hPTH1-34 对体外成骨细胞增殖与分化的影响

隋立 张凯 王毅 邢国胜 赵文君 盛莉 杨军

摘要：目的 研究持续给予人甲状旁腺激素(human parathyroid hormone, hPTH) 1-34 对体外培养成骨细胞增殖与分化的干预作用。方法 体外培养乳鼠成骨细胞, 将细胞分为空白培养液对照组和 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hPTH(1-34) 3 个不同剂量的给药组。每 48 h 换 1 次液, 换液时采用 MTT 法进行细胞增殖测定, 同时检测细胞裂解液中的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 和骨钙素(bone gla protein, BGP) 的水平, 持续培养 6 d。结果 持续给予 hPTH1-34 作用 48 h 后, 各给药组的 MTT 均明显高于对照组且各给药组间差异均有显著性($P < 0.05$), 至第 6 天时各给药组则均明显低于对照组($P < 0.05$)。ALP 和 BGP 测定结果显示持续给予 hPTH1-34 作用 48 h 后, 10^{-6} $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTH 给药组的 BGP 含量明显高于对照组($P < 0.01$), 其余各组 ALP 及 BGP 含量与对照组比较差异虽无显著性, 但均值高于对照组, 至第 6 天各给药组均明显低于对照组($P < 0.05$)。结论 持续给予 hPTH(1-34) 对体外培养成骨细胞增殖与分化的影响与作用的时间和给药浓度密切相关。短期持续用药有促进作用, 并且在 $10^{-6} \sim 10^{-8}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内呈剂量依赖性; 长期持续用药抑制成骨细胞的增殖与分化, 给药浓度越高抑制作用越强。

关键词：甲状旁腺激素；成骨细胞；碱性磷酸酶；骨钙素

The effects of continuous stimulation with different doses of human parathyroid hormone 1-34 fragment on osteoblast SUI Li, ZHANG Kai, WANG Yi, XING Guosheng, ZHAO Wenjun, SHENG Li, YANG Jun. Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

Abstract : Objective To observe the effects of continuous stimulation with different doses of human parathyroid hormone 1-34 fragment (hPTH 1-34) on osteoblast. **Methods** The osteoblast from sucking rat was cultured and divided into PTH group and control group. Doses of 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hPTH1-34 were supplemented respectively. Cell proliferation was measured by MTT method. Alkaline phosphatase (ALP) and bone gla protein (BGP) concentration inside cells were measured by chemical and radioimmunoassay methods. **Results** After 48 hours treated, the level of MTT was higher in PTH groups than that in control group ($P < 0.05$), and there was significantly difference among PTH groups ($P < 0.05$); on the 6th day, the level of MTT was lower in PTH groups ($P < 0.05$ vs. control). After 48 hours treated, the BGP level in 10^{-6} $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTH group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$); on the 6th day, the level of ALP and BGP were lower in PTH groups ($P < 0.05$ vs. control). **Conclusion** Continuous stimulation with hPTH 1-34 could improve the proliferation and differentiation of osteoblast *in vitro* pronouncedly in a short period, but inhibit when it stimulates the osteoblast for a long period. The effect depends on the doses of hPTH1-34 in a certain range.

Key words : Parathyroid hormone ; Osteoblast ; Alkaline phosphatase ; Bone gla protein

甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)是维持机体钙磷代谢平衡的一种重要的调钙激素, 可精细调节骨骼的合成和分解代谢, 对成骨细胞和破骨细

胞分化、成熟及凋亡均发挥重要作用。成骨细胞是骨组织中惟一有 PTH 受体的细胞^[1], 因此 PTH 对成骨细胞的作用成为研究 PTH 治疗骨质疏松机制的热点。近年来已有研究发现, PTH 相关蛋白能有效地促进骨骼合成^[2]。基因重组合成的人甲状旁腺激素 1-34(hPTH1-34)是最早人工合成、具有 PTH 全分子活性的氨基端片段。本研究采用不同剂量的

基金项目：天津市面上项目课题(05YFJMJC07600)

作者单位：300211 天津, 天津医院

通讯作者：隋立, Email : sensiya@163.com

hPTH 1-34 于体外持续作用乳鼠成骨细胞,观察其对成骨细胞增殖与分化的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生乳鼠由天津市药物研究所提供。

1.1.2 试剂 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)速率法测定试剂盒由英国 Randox 公司提供。骨钙素(bone gla protein, BGP)放免试剂盒由北京华英生物技术研究所提供。

1.1.3 主要仪器设备 :东芝 TBA-120 FR 全自动生化分析仪。SN-697 型全自动双探头放射免疫 γ 计数器,由上海核所光电仪器有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 新生乳鼠成骨细胞的分离培养与接种 :无菌条件下取出生 24 h 之内的乳鼠颅骨,去除骨膜及周围组织,用 Hank's 液冲洗 2 次后剪碎。37℃ 酶消化液作用 20 min(0.25% 胰酶和 0.1% I 型胶原酶交替进行 3 次),分离出单个细胞。收集细胞悬浮于含 10% FBS 的 1640 培养液中,种植于 75 mL 培养瓶中,于 37℃ CO₂ 孵箱中培养。取二代培养的细胞,以 5×10^4 个细胞/mL 密度接种至 96 孔板中,100 μ L/孔,用于 PTH 组和对照组 MTT 的测定 ;以 1×10^5 个细胞/mL 密度接种至 24 孔板中,1.5 mL/孔,用于 PTH 组和对照组 ALP 及 BGP 的测定,置 37℃ CO₂ 孵箱中培养 24 h。

1.2.2 给药方法 :用含 10% FBS 的 1640 培养液分别配制浓度为 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} mol·L⁻¹ 的 PTH 实验用药。于接种 24 h 后加入不同浓度 hPTH1-34 培养液持续作用,每 48 h 换 1 次液,持续培养 6 d。空白对照组加入含有 10% FBS 的 1640 培养液。

1.2.3 细胞增殖测定(MTT 法) :待测细胞培养板每孔加入 15 μ L MTT(5.0 g·L⁻¹),37℃ 培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,室温振荡 10 min,570 nm 下测定 OD 值。

1.2.4 ALP 及 BGP 的测定 测定细胞裂解液中 ALP 及 BGP 的水平。ALP 采用自动生化分析仪测定, BGP 采用放射免疫分析,均严格按照试剂盒操作说明和要求进行测定,结果均以蛋白值进行校正。细胞蛋白质总量采用考马斯亮兰法检测。

1.3 统计学处理

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学处理,组间比较采用 *F* 检验。以 *P* <

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 持续给予 hPTH 1-34 对成骨细胞增殖的影响

MTT 测定结果显示,给药后第 2 天各给药组均明显高于对照组(*P* < 0.05),hPTH 1-34 高剂量组刺激作用明显大于低剂量组,差异有显著性(*P* < 0.05) 第 4 天对照组与各给药组之间差异均无显著性 至第 6 天 10^{-6} mol·L⁻¹ PTH 给药组明显低于对照组(*P* < 0.05,见表 1)。

表 1 不同剂量给药组不同作用时间下对成骨细胞增殖的影响(OD, $\bar{x} \pm s$)

组别	作用时间		
	第 2 天	第 4 天	第 6 天
对照组	0.5213 $\pm$ 0.1099	0.7663 $\pm$ 0.1169	2.6213 $\pm$ 0.2681
10^{-6} mol·L ⁻¹ 组	0.8976 $\pm$ 0.1115**	0.8431 $\pm$ 0.0484	2.3896 $\pm$ 0.1393*
10^{-7} mol·L ⁻¹ 组	0.7722 $\pm$ 0.1050**#	0.8410 $\pm$ 0.1038	2.4720 $\pm$ 0.0803
10^{-8} mol·L ⁻¹ 组	0.6450 $\pm$ 0.0363*## Δ	0.7650 $\pm$ 0.0363	2.4693 $\pm$ 0.1377
<i>P</i> 值	0.000	0.207	0.158

注 :与对照组比较* *P* < 0.05,** *P* < 0.01 ;与 10^{-6} mol·L⁻¹ PTH 给药组比较# *P* < 0.05,## *P* < 0.01 ;与 10^{-7} mol·L⁻¹ PTH 给药组比较 Δ *P* < 0.05

2.2 持续给予 hPTH 1-34 对成骨细胞分化的影响

ALP 测定结果显示 :给药后第 2 天各给药组均值高于对照组,但差异无显著性(*P* > 0.05) 第 4 天 10^{-6} 、 10^{-7} mol·L⁻¹ PTH 给药组均明显低于对照组(*P* < 0.05), 10^{-6} mol·L⁻¹ PTH 给药组明显低于 10^{-8} mol·L⁻¹ PTH 给药组(*P* < 0.05) 至第 6 天各给药组均明显低于对照组(*P* < 0.01,见表 2)。

表 2 不同剂量给药组不同时间 ALP 的水平(U·L⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	作用时间		
	第 2 天	第 4 天	第 6 天
对照组	0.0662 $\pm$ 0.0895	0.0683 $\pm$ 0.0116	0.0715 $\pm$ 0.0204
10^{-6} mol·L ⁻¹ 组	0.1037 $\pm$ 0.0252	0.0424 $\pm$ 0.0162**	0.0200 $\pm$ 0.0055**
10^{-7} mol·L ⁻¹ 组	0.0744 $\pm$ 0.0442	0.0486 $\pm$ 0.0075*	0.0320 $\pm$ 0.0055**
10^{-8} mol·L ⁻¹ 组	0.0746 $\pm$ 0.0146	0.0618 $\pm$ 0.0066#	0.0366 $\pm$ 0.0046**#
<i>P</i> 值	0.264	0.024	0.000

注 :与对照组比较* *P* < 0.05,** *P* < 0.01 ;与 10^{-6} mol·L⁻¹ PTH 给药组比较# *P* < 0.05

BGP 测定结果显示 给药后第 2 天 10^{-6} mol·L⁻¹ 剂量给药组明显高于对照组和 10^{-7} 、 10^{-8} mol·L⁻¹ 剂量给药组(*P* < 0.01) ;第 4 天对照组与各给药组之间差异显著性消失 ;至第 6 天各给药组均明显低于对照组(*P* < 0.01), 10^{-6} mol·L⁻¹ PTH 给药组明显低于 10^{-8} mol·L⁻¹ PTH 给药组(*P* < 0.05,见表 3)。

表 3 不同剂量给药组不同时间 BGP 的水平 (ng·mL⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	作用时间		
	第 2 天	第 4 天	第 6 天
对照组	0.0030 ± 0.0006	0.0023 ± 0.0008	0.0048 ± 0.0007
10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹ 组	0.0054 ± 0.0017**	0.0020 ± 0.0005	0.0021 ± 0.0008**
10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹ 组	0.0031 ± 0.0005##	0.0019 ± 0.0003	0.0025 ± 0.0003**
10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹ 组	0.0031 ± 0.0004##	0.0019 ± 0.0003	0.0030 ± 0.0006**#
P 值	0.009	0.716	0.000

注 与对照组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 10⁻⁶ mol·L⁻¹ PTH 给药组比较# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

ALP 是成骨细胞的功能性酶,能够水解有机磷酸酶,使局部磷酸根浓度增高,而且可以破坏钙化抑制剂,在钙盐沉积中起关键性作用^[3]。随着 ALP 活性的提高,钙盐沉积在胶原纤维上,形成钙化结节。因而人们常用细胞中该酶的活性高低来检测成骨细胞的存在和成骨细胞的分化成熟程度。BGP 又称 γ -羧基谷氨酸蛋白,是成骨细胞合成和分泌的一种激素样多肽,是反映骨更新状态和骨形成的一种特异性指标^[4]。BGP 的主要生理功能是保持骨的正常矿化和抑制由于异常的羟磷灰石结晶沉积所致的生长软骨矿化加速。因此研究 PTH 对成骨细胞内 BGP 合成的影响,可部分了解 PTH 对成骨细胞的作用程度。

大量研究表明,PTH 促进骨合成代谢或者分解代谢取决于给药的剂量和持续时间。本研究持续给予 hPTH 1-34 作用 48 h 后,各给药组的 MTT 均明显高于对照组 ($P < 0.05$),10⁻⁶ mol·L⁻¹ PTH 给药组的 BGP 含量明显高于对照组 ($P < 0.01$),其余各组 ALP 及 BGP 含量与对照组比较差异虽无显著性,但均值高于对照组,表明短期持续给予 hPTH 1-34 对体外培养成骨细胞的增殖与分化均有促进作用,并且在 10⁻⁶ ~ 10⁻⁸ mol·L⁻¹ 浓度范围内随着 hPTH 1-34 浓度增高其促进作用也随之增强,呈剂量依赖性。随着用药时间延长,hPTH 1-34 对成骨细胞的促进作用也

随之下降,至第 6 天表现为抑制作用,同样在 10⁻⁶ ~ 10⁻⁸ mol·L⁻¹ 浓度范围内随着 hPTH 1-34 浓度增高其抑制作用也随之增强,呈剂量依赖性。

hPTH 1-34 作为理想的骨形成促进剂,是目前最有前途的新型防治骨质疏松症药物^[5]。Wang 等^[6]研究发现,持续给予 PTH 抑制了成骨细胞分化,而间断应用 PTH 促进成骨细胞分化,ALP 活性增高,矿化小结增多。但短期持续的作用以及不同剂量对成骨细胞增殖分化的影响的相关报道并不多见。本实验研究表明,持续给予 hPTH(1-34)对体外培养成骨细胞增殖与分化的影响与作用的时间和给药浓度密切相关。短期持续用药有促进作用,给药浓度越高促进作用越强;长期持续用药抑制成骨细胞的增殖与分化,同样给药浓度越高抑制作用越强,但其确切的作用机制尚未十分清楚,这有待于我们进一步的研究探索。

【参 考 文 献】

[1] Miao D, He B, Andrew CK, et al. Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. Clin Invest, 2002,109 (9) :1173.

[2] XU J, RONG HQ, JI H, et al. Effect of human parathyroid hormone related protein (PTHrP1-34) on osteoporosis of ovariectomized rats. Chin J Public Health, 2006, 22(2) :199-200. (in Chinese)

[3] Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, et al. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. J Bone Miner Res, 2004, 19(5) :841-852.

[4] Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ, et al. New biochemical marker for bone metabolism. J Clin Inv,1980, 66 :878.

[5] Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med, 2001, 344 : 1434-1441.

[6] Wang YH, Liu YL, Kathy Buhl, et al. Comparison of the Action of Transient and Continuous PTH on Primary Osteoblast Cultures Expressing Differentiation Stage-Specific GFP. J Bone Miner Res, 2005, 20 : 5-14.

(收稿日期:2007-02-26)