

# 重组人甲状旁腺素相关蛋白 PTHrP1-86 对骨质疏松大鼠治疗作用的实验研究

郭刚 刘新宇 梁东春 张瑞 张镜宇

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)01-0013-03

**摘要:**目的 探讨重组人甲状旁腺素相关蛋白 PTHrP1-86 对骨质疏松大鼠的骨同化作用。方法 用摘除大鼠双侧卵巢的方式制备骨质疏松模型(OVX),去势手术16周后,测定大鼠腰椎骨密度,确认动物模型造模成功。实验动物分为8个组,给药后测定骨密度、骨钙素、骨形态计量学、骨生物力学等指标,初步评价重组人甲状旁腺素相关蛋白 PTHrP1-86 对骨质疏松大鼠的骨同化作用。结果 重组人甲状旁腺素相关蛋白 PTHrP1-86 可使骨转换加快,促进新骨生成,使骨的力学性能提高,抗弯曲强度提高,抗变形能力增强,韧性增高,脆性降低,不易发生断裂。结论 PTHrP1-86 能有效提高骨的抗骨折能力,对治疗和预防骨质疏松有一定疗效。同时证明该动物实验方法行之有效,可以很好地测定 PTHrP 对骨质疏松的治疗作用,并可以此为依据开始一期临床实验。

**关键词:** 人甲状旁腺素相关蛋白; 骨同化作用; 骨密度; 骨形态计量学; 骨生物力学

## Study of treating effect to osteoporosis of recombinant human parathyroid hormone related protein 1-86

GUO Gang, LIU Xinyu, LIANG Dongchun, et al. Institute of Endocrinology, Tianjin 300070, China

**Abstract:** **Objective** Mensurate the osseous assimilation of human PTHrP1-86 with animal test. **Methods** Produce the model of emasculated animals and send medicine. Mensurate biomechanical, bone metrology and biochemical indexes which reflect the bone reconstruction to understand the influence of PTHrP on the osteoblast interaction, and to confirm the bioactivity of different fragments. **Results** The experimental results confirm that PTHrP1-86 can accelerate the bone conversion and the formation of new bone, improve the mechanical ability, the bending resistance, metaphosis resistance, and the tenacity, and reduce the frangibility, leading to harder breakage, demonstrating that PTHrP1-86 can efficiently improve the fraction resistance, and can treat and prevent osteoporosis. **Conclusions** PTHrP1-86 can efficiently improve the fraction resistance, and can treat and prevent osteoporosis.

**Key words:** Parathyroid hormone related protein; Osseous assimilation; Bone density; Bone morphometry; Bone biomechanics

重组人甲状旁腺素相关蛋白 PTHrP 被认为是 PTH 家族的第二个激素<sup>[1]</sup>。PTHrP 与 PTH 氨基酸序列的 N 端序列有很大的相似性<sup>[2]</sup>。经研究证实, PTHrP N 端片断与 PTH 作用于共同的受体——PTH1 型受体(PTH1R),在调节钙磷代谢中具有相似的作用。然而,随着对其研究的深入,研究人员发现二者无论是在基因结构还是在生理功能上都存在着极大

的差异,PTH 和 PTHrP 缺乏或过量分泌所引起出的临床表现也迥然不同。

本实验室建立了人甲状旁腺素相关蛋白 1-86 (PTHrP1-86)基因大肠杆菌及毕赤酵母的高效表达系统及 rhPTHrP1-86 的纯化方法,Western blotting 鉴定了表达产物并使用 UMR106 细胞测定所制备的 rhPTHrP1-86 对 cAMP 生成的刺激作用。初步证明了 PTHrP 对骨质疏松的治疗作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组和制模

雌性 SD 大鼠 160 只,12 周龄,体重 225 ~ 308 g,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970348);天津市自然科学基金重点资助项目(993804211)

作者单位:300070,天津医科大学代谢病医院,内分泌研究所,卫生部及天津市“激素与发育重点实验室”

通讯作者:郭刚,Email:guogangtj@163.com

平均(262.87 ± 18.68) g, 购自北京大学医学部实验动物科学部(合格证编号:0034797), 动物级别为二级(清洁级)。试验期间动物自由饮水, 进食。

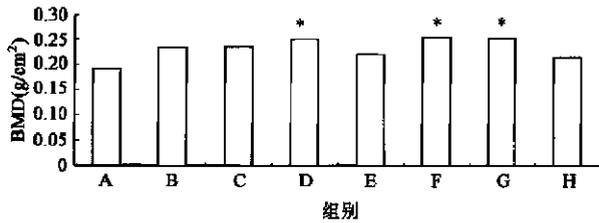
所选动物按体重分层, 遵循随机原则分为 8 组: 假手术组(A 组)、阴性对照组(B 组)、PTH1-34 高剂量组(C 组)、PTH1-34 低剂量组(D 组)、PTHrP1-141 高剂量组(E 组)、PTHrP1-141 低剂量组(F 组)、PTHrP1-86 高剂量组(G 组)和 PTHrP1-86 低剂量组(H 组)。每组 20 只, 除假手术组外, 其余各组均行去势手术。去势动物模型的制备: 见文献[3]。

### 1.2 给药过程

术后 20 周后, 每日经颈背部皮下给药 1 次, 持续给药 6 周。各组给药如下: 假手术组给溶媒, 阴性对照组给溶媒, PTH1-34 高剂量组给 PTH1-34 (40 nmol/kg 体重), PTH1-34 低剂量组给 PTH1-34 (5 nmol/kg 体重), PTHrP1-141 高剂量组给 PTHrP1-141 (40 nmol/kg 体重), PTHrP1-141 低剂量组给 PTHrP1-141 (5 nmol/kg 体重), PTHrP1-86 高剂量组给 PTHrP1-86 (40 nmol/kg 体重), PTHrP1-86 低剂量组给 PTHrP1-86 (5 nmol/kg 体重)。给药结束前 10 天和给药结束前 3 天分别经腹腔注射四环素标记。给药结束后, 经股动脉放血处死动物。

## 2 结果

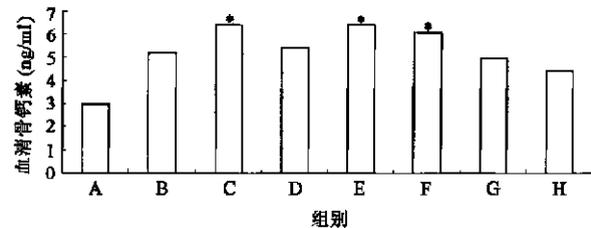
### 2.1 PTHrP 对大鼠骨密度值的影响(图 1)



与去势组比较 \*  $P < 0.05$

图 1 PTHrP 对大鼠骨密度值的影响

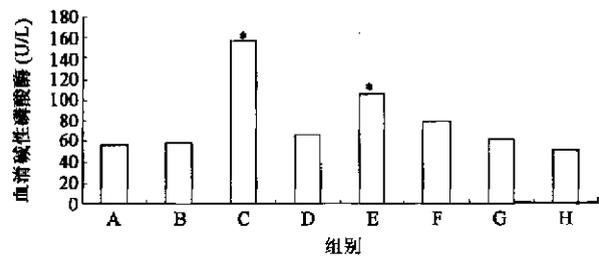
### 2.2 PTHrP 对大鼠血清骨钙素水平的影响(图 2)



与去势组比较 \*  $P < 0.05$

图 2 PTHrP 对大鼠血清骨钙素水平的影响

### 2.3 PTHrP 对大鼠血清碱性磷酸酶的影响(图 3)



与去势组比较 \*  $P < 0.05$

图 3 PTHrP 对大鼠血清碱性磷酸酶的影响

### 2.4 PTHrP 对成骨作用的影响——生物力学试验

在 WDW-10KN 微机控制电子万能试验机做三点弯曲实验, 加载点位于股骨干上 1/3 处, 两侧支点标距为 20 mm, 试验机匀速加载, 加载速度为 2 mm/min。完成了大鼠股骨最大应力、最大载荷、最大变形能力、伸长率、骨体积、单标记表体积、双标记表体积、单双标记表体积比、类骨质表体积、类骨质宽度、吸收表面积、矿化时间、骨重建时间等指标的检测。

去势组各项力学指标显著降低, 而 PTHrP1-86 组的结构力学和材料力学指标显著增高, 说明 PTHrP1-86 可使骨的力学性能提高, 抗弯曲强度高, 抗变形能力增强, 韧性增高, 脆性降低, 不易发生断裂。证明 PTHrP1-86 能有效提高骨的抗骨折能力, 对治疗和预防骨质疏松有一定疗效。

## 3 讨论

由于 PTHrP 有着广泛的应用前景, 对其研究也日趋增多<sup>[4-7]</sup>。获得 PTHrP 蛋白/多肽片段是对其进行研究的前提。国外有些学者通过多肽合成仪直接合成蛋白/多肽片断。但此种方法价格昂贵, 且不适用于较长片断的合成。与之相比, 基因工程的方法具有其明显优势: 产量高, 成本经济, 并且不受片段长度限制, 因此广为采用。我们的目的是大量表达 PTHrP1-86, 本实验设计为以人基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 PTHrP 基因。蛋白质在体外稳定高效的表达需要借助表达系统。原核细胞表达系统是迄今为止基因工程中应用最广泛的, 也是人们了解最深入的表达体系。以大肠杆菌作为表达蛋白质的宿主菌体, 不仅成本低廉、操作简单、易于控制, 而且通常可以获得比较满意的表达量。PTHrP 翻译后不需要糖基化、二硫键的形成等特殊修饰过程, 可以尝试原核表达系统进行表达。

目前全世界约 2 亿人患有骨质疏松症, 其发病率已跃居常见病、多发病的第七位, 现患病人数已超

过2亿人,治疗骨质疏松的药物市场前景非常广阔。三类传统治疗骨质疏松的药物慢慢被淘汰,PTH目前被认为是最有意义最有前景的治疗骨质疏松的基因工程药物。但PTH具有成骨和促进破骨细胞活性的双向性作用,并且在小鼠的动物实验中,发现高剂量的PTH可以诱发骨肉瘤的形成。虽然在临床试验中并未有此发现,但远期效果并未经证实。甲状旁腺素相关肽(parathyroid hormone-related peptide, PTHrP)是在研究恶性高钙血症机制过程中发现的一种多肽。恶性肿瘤患者常出现恶性肿瘤高钙血症综合征(HHM)表现出与甲状旁腺功能亢进相似的临床症状和血液生化改变,但患者血清中甲状旁腺激素(PTH)水平却未明显增高。研究人员于是推测一种生理功能类似于PTH的物质是引起高钙血症的原因。1983年,研究人员证实这种物质不是PTH,而是由肿瘤细胞分泌的另一种与钙磷代谢有关蛋白质<sup>[8]</sup>。1987年,研究人员克隆了这种物质的cDNA,将这种蛋白命名为甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)<sup>[9]</sup>。他有3种原始翻译产物即PTHrP(1-139)、PTHrP(1-141)和PTHrP(1-173),经过翻译后加工和各种激素前体转化酶的作用可以产生多种分泌形式。其中氨基末端分泌形式即PTHrP(1-36)中1~13位的氨基酸与PTH有70%的同源性,结合受体也相同(称为PTH/PTHrP受体,主要是PTH1R),但是他们所引起的受体后效应却不相同<sup>[10]</sup>。在许多组织、细胞中,PTHrP调节细胞的分化、增殖、凋亡和钙转运等过程。随着研究的进一步深入,在多种不同的正常机体组织中均检测到了PTHrP的存在,证实其在大多数组织器官都有所表达,提示其在正常细胞生长分化中的重要性。PTHrP基因被敲除的小鼠在胚胎期发生死亡,不能正常发育,从另一个侧面证实了PTHrP对于机体的生长发育是至关重要的<sup>[11,12]</sup>。目前,国外针对PTHrP作为治疗骨质疏松药物的研究多局限在人工合成短片断PTHrP(1-36)的作用机制及副作用上,针对PTH(1-141)完整肽段进行相应作用机理的研究尚未见报道。PTH具有促进骨形成和促进破骨细胞活性的双重作用<sup>[13-15]</sup>,在做对比试验时PTHrP(1-36)用量为PTH的10倍时,也未发现促进破骨细胞活性的作用。而且我们的PTHrP(1-141)中的107-139片段也有抑制破骨细胞活性的作用,也使我们这一基因工程药物有着无可比拟的优势。PTHrP(1-36)具有促进骨形成的单向性作用,而且我们的PTHrP(1-141)中的107-139片段

也有抑制破骨细胞活性的作用,使得PTHrP(1-141)作为治疗骨质疏松药物有着无可比拟的优势,可代替PTH成为可进行单向促进骨形成的治疗骨质疏松的药物,该药物作为自主开发的基因工程药物经济效益显著,前景广阔。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Strewler GJ. Mechanisms of disease : the physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med*, 2000, 342 :177-185.
- [ 2 ] Orloff JJ, Reddy D, de Papp AE, et al. Parathyroid hormone-related protein as a prohormone : posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev*, 1994, 15 :40-60.
- [ 3 ] 梁晓萍,戴勇,文锦丽,等. 甲状旁腺素 1234 对骨质疏松大鼠治疗作用的实验研究. *中国老年学杂志* 2005, 25(25) :802-804.
- [ 4 ] Strewler GJ, Williams RD, Nissenson RA. Human renal carcinoma cells produce hypercalcemia in the nude mouse and a novel protein recognized by parathyroid hormone receptors. *J Clin Invest*, 1983, 71 : 769-774.
- [ 5 ] Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, et al. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia : cloning and expression. *Science*, 1987, 237 :893-896.
- [ 6 ] Gensure RC, Gardella TJ, Jüppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *N Engl J Med*, 2005, 328 :666-678.
- [ 7 ] Jans DA, Thomas RJ, Gillespie MT. Parathyroid hormone-related protein(PTHrP) : a nucleocytoplasmic shuttling protein with distinct paracrine and intracrine roles. *Vitam Horm*, 2003, 66 :345-384.
- [ 8 ] Maioli E, Fortino V. The complexity of parathyroid hormone-related protein signaling. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61 :257-262.
- [ 9 ] Strewler GJ. Mechanisms of disease : the physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med*, 2000, 342 :177-185.
- [ 10 ] Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, et al. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev*, 1994, 8 :277-289.
- [ 11 ] Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples : effect of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, storage time and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet*, 1993, 31 :321-325.
- [ 12 ] Gensure RC, Gardella TJ, Jüppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *N Engl J Med*, 2005, 328 :666-678.
- [ 13 ] Jans DA, Thomas RJ, Gillespie MT. Parathyroid hormone-related protein(PTHrP) : a nucleocytoplasmic shuttling protein with distinct paracrine and intracrine roles. *Vitam Horm*, 2003, 66 :345-384.
- [ 14 ] Stewart AF. Hypercalcemia associated with cancer. *N Engl J Med*, 2005, 352 :373-379.
- [ 15 ] Maioli E, Fortino V. The complexity of parathyroid hormone-related protein signaling. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61 :257-262.

(收稿日期:2007-02-04)