

受体介导的凝血酶对成骨细胞增殖及分化的作用

宋淑军 Pagel CN Pike RN Mackie EJ

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)01-0020-03

摘要:目的 通过凝血酶对成骨细胞的增殖及分化作用的研究来探讨受体介导的凝血酶的功能。方法 原代成骨细胞分别取自于蛋白酶激活受体 (protease-activated receptor, PAR)-1 敲除鼠和野生对照鼠的头颅骨。并利用凝血酶,人工合成的 PAR-1 或 PAR-4 特异性激活短肽对细胞进行处理,通过对 5-溴-2-脱氧尿嘧啶的嵌入及细胞碱性磷酸酶活性的测定探讨 PAR-1 或 PAR-4 激活对细胞增殖和分化的影响。结果 在野生鼠成骨细胞,凝血酶及 PAR-1 激活肽均能促进的细胞增殖和降低碱性磷酸酶的活性,但 PAR-4 激活肽却无这些作用。然而在 PAR-1 敲除鼠的成骨细胞无论是凝血酶还是 PAR-4 激活肽均不能改变细胞的增殖及碱性磷酸酶的活性。结论 本研究结果表明凝血酶促进成骨细胞增殖及抑制其分化是通过 PAR-1 介导的。其他凝血酶受体并不具有此作用。

关键词:凝血酶;蛋白酶激活受体;成骨细胞;增殖;分化

Receptors mediating effects of thrombin on osteoblast proliferation and differentiation SONG Shujun*, Pagel CN, Pike RN, et al. * Department of Pathology and Laboratory, PLA 306 Hospital, 9 An Xiang Bei Li, De Wai, Beijing 100101, China

Abstract: **Objective** To understand the receptor mediating roles of thrombin on osteoblasts the effect of thrombin on osteoblast proliferation and differentiation was studied. **Methods** Primary mouse calvarial osteoblasts from protease-activated receptor (PAR)-1-null and wild-type mice, and synthetic peptides that specifically activate PAR-1 (TFLLR-NH₂) and PAR-4 (AYPGKF-NH₂) were used. Cells were treated with these receptor agonists and cell proliferation and differentiation were tested by 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation assay and alkaline phosphatase (ALP) activity respectively. **Results** Both the PAR-1-activating peptide and thrombin stimulated incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine and reduced alkaline phosphatase activity in cells from wild-type mice. The PAR-4-activating peptide, however, had no effect on either alkaline phosphatase activity or proliferation in these cells. Neither thrombin nor PAR-4-activating peptide was able to affect osteoblast proliferation or alkaline phosphatase activity in cells isolated from PAR-1-null mice. **Conclusions** The results demonstrate that thrombin stimulates proliferation and inhibits differentiation of osteoblasts through activation of PAR-1. Other thrombin receptors do not appear to be involved in these effects.

Key words: Thrombin; Protease-activated receptor; Osteoblast; Proliferation; Differentiation

成骨细胞是负责骨形成的细胞。凝血酶是一种多功能丝氨酸蛋白酶,对多种细胞具有激素样的功能。凝血酶所致的细胞反应多数是通过其受体介导。至今已经发现了 3 种凝血酶受体,分别为蛋白酶激

活受体 (protease-activated receptor, PAR)-1, -3 和 -4^[1-3]。凝血酶可以促进细胞的增殖及抑制碱性磷酸酶(成骨细胞分化的标志物)的活性,抑制细胞的凋亡^[4,5]。PAR 的激活机理是凝血酶对 PAR 氨基末端进行蛋白水解,从而产生一个新的氨基末端,此末端作为配基可以使受体本身激活,而诱导细胞内的生物信息^[6]。因此,氨基酸序列和配基一致的人工合成短肽(激活肽),同样可激活 PAR 而不需要蛋白裂解。本研究的目的是利用特异性的 PAR-1 和 PAR-4

作者单位: 100101 北京,中国人民解放军第 306 医院病理实验科(宋淑军); School of Veterinary Science, University of Melbourne, Australia (Pagel CN; Mackie EJ); Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Australia (Pike RN)。

作者 Email: shujsong@gmail.com

激活肽及 PAR-1 敲除鼠的成骨细胞来研究受体介导的凝血酶在成骨细胞增生及分化中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

PAR-1 激活肽 (TFLLR-NH₂) 和 PAR-4 激活肽 (AYPGKF-NH₂) 由 Auspep (Parkville, Vic., Australia) 合成。5-溴-2'-脱氧尿嘧啶 (5-bromo-2'-deoxyuridine; BrdU) 细胞增殖检测试剂盒购于 Roche (Nutley, NJ, USA), 细胞培养所用物品均购自 Invitrogen (Melbourne, Australia)。PAR-1 基因敲除鼠由澳大利亚 Monash 大学提供。

1.2 原代成骨细胞的分离及培养

从新生 24 h 以内的鼠取下颅顶骨, 采用胶原酶系列消化法得到鼠原代成骨细胞^[7]。消化所得细胞培育至近汇合, 胰酶消化后种植在相应的培养器皿中用于各种实验。细胞培养液使用 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 含有 10% 小牛血清, 庆大霉素 (50 μg/ml), 两性霉素 B (2.5 μg/ml) 和 L-谷氨酸 (300 μg/ml)。细胞培养在 37 °C, 含 5% 的二氧化碳的空气中。

1.3 细胞增殖的检测

采用 BrdU 试剂盒, 在细胞增殖过程中 BrdU 可以取代胸腺嘧啶镶嵌到细胞 DNA 中。成骨细胞被种植在 96 孔板中, 待长至 80% 汇合时, 无血清培养 24 h, 然后分别用凝血酶, PAR-1 激活肽, PAR-4 激活肽, PAR-1 和 PAR-4 激活肽联合处理细胞 24 h。BrdU 标记增殖细胞 4 h, 然后固定细胞并按照试剂盒使用说明进行检测。

1.4 细胞 ALP 活性的测定

细胞碱性磷酸酶活性是骨细胞分化的标志物。ALP 活性的测定可以反映骨细胞的分化程度。经过第一次传代的细胞被种植在 24 孔板 (2 × 10⁴/孔), 待长至汇合时, 无血清培养 24 h, 然后分别用凝血酶, PAR-1 激活肽, PAR-4 激活肽, PAR-1 和 PAR-4 激活肽联合处理细胞 48 h, 并设无血清培养对照组。冲洗细胞后每孔加 100 微升的 PBS 含 0.5% Triton X-100。30 min 后, 从每孔取两个 40 μl 的标本用作 ALP 和蛋白的测定。其测定方法采用 Abraham 等使用的方法^[4]。

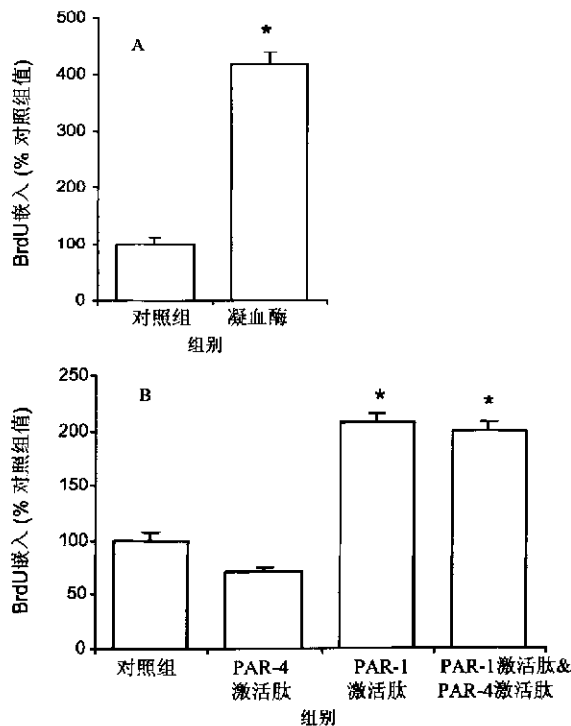
1.5 统计学处理

各项观测指标组间比较均采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 PAR-1 介导的凝血酶促进成骨细胞增殖

为了检测 PAR 的配基对成骨细胞增殖的影响, 100 nmol/L 凝血酶, 100 μmol/L PAR-1 或 PAR-4 激活肽及 100 μmol/L PAR-1 和 PAR-4 激活肽联合使用分别用来处理鼠的成骨细胞, 并设无血清培养对照组。并用 BrdU 试剂盒对细胞的增殖率进行检测, 结果用实验组与对照组吸收度的百分比值来表达。对野生鼠的成骨细胞凝血酶 (图 1A) 或 PAR-1 激活肽 (图 1B) 可以显著增加 BrdU 细胞的嵌入率, 结果差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。而 PAR-4 激活肽 (图 1B) 无论是单独使用还是和 PAR-1 激活肽联合使用均对细胞的增殖无影响。对 PAR-1 敲除鼠的细胞, 凝血酶或 PAR-4 激活肽均无促进细胞增殖的作用。

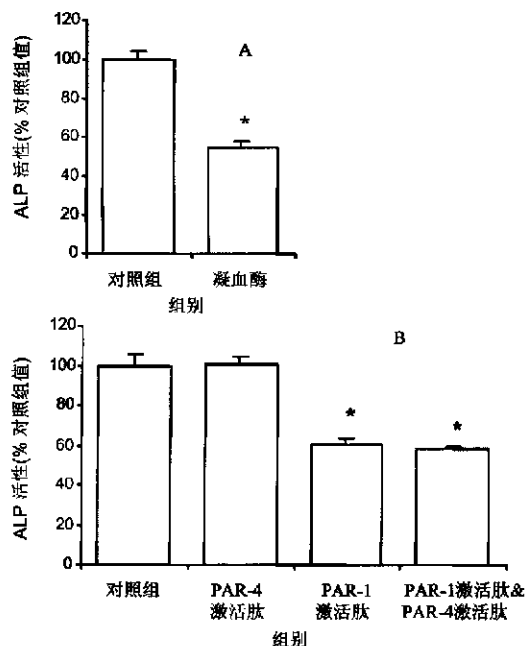


$n = 6$, 与对照组比较 * $P < 0.001$

图 1 凝血酶及 PAR 激活肽对野生鼠成骨细胞 BrdU 嵌入率的影响

2.2 PAR-1 介导的凝血酶对成骨细胞分化的抑制作用

100 nmol/L 凝血酶, 100 μmol/L PAR-1 或 PAR-4 激活肽及 100 μmol/L PAR-1 和 PAR-4 激活肽联合使用处理成骨细胞, 并设无血清培养对照组, 结果用与对照组之百分比表示。凝血酶 (图 2A) 或 PAR-1 激活肽 (图 2B) 均能显著抑制野生鼠成骨细胞 ALP 的活性, 结果差异有统计学意义 (图 2, $P < 0.01$), 然而 PAR-4 激活肽却无此作用 (图 2B)。对 PAR-1 敲除鼠的成骨细胞, 凝血酶及 PAR-4 激活肽均无此作用。



$n = 4$, 与对照组比较 * $P < 0.01$

图2 凝血酶及 PAR 激活肽对野生鼠成骨细胞 ALP 活性的影响

3 讨论

曾有报道原代大鼠成骨细胞及人的成骨样细胞系表达 PAR-1, 而且凝血酶刺激大鼠成骨细胞增殖并抑制其分化, 而且 PAR-1 激活肽 (SFFLRNPSENTFELVPL) 可以模仿凝血酶的这些功能^[4,8], 然而后来发现当时使用的 PAR-1 激活肽 (SFFLRNPSENTFELVPL) 同时可以激活 PAR-2^[9], 且成骨细胞表达 PAR-2, PAR-2 可以被包括胰蛋白酶在内的多种蛋白酶激活, 同时发现 PAR-2 的激活可以导致某些细胞增殖^[10], 因此凝血酶的这些功能有可能通过 PAR-1 或 PAR-2 的介导, 近来发现一种 PAR-1 特异性的激活肽 (TFFLR-NH₂), 所以本研究的目的之一是进一步确定 PAR-1 介导的凝血酶对鼠成骨细胞增殖及分化的功能。此外由于鼠的成骨细胞同时表达 PAR-4, 因此本实验同时探讨 PAR-4 在这些细胞中介导的凝血酶的作用。

结果显示无论是凝血酶还是特异的 PAR-1 激活肽均刺激野生鼠细胞的增殖而抑制 ALP 的活性。然而凝血酶对 PAR-1 敲除鼠的细胞却不具备此功能。这一结果证实 PAR-1 不仅介导凝血酶的这些功能, 而且是凝血酶产生这些功能所必需的。

成骨细胞表达的另一个凝血酶受体 PAR-4, 似乎并不对此起任何作用。本研究并未发现 PAR-4 激活肽对鼠的成骨细胞的增殖及分化产生任何作

用。从前曾有报道 PAR-4 激活肽可以引起成骨细胞的钙离子的转移, 但在 PAR-1 敲除鼠的作用要小于野生对照鼠^[5], 因此我们推测有可能这两个受体之间存在着相互作用。另外, 曾经有报道 PAR-3 可作为 PAR-4 的辅助因子在鼠的血小板中被凝血酶激活, 即 PAR-4 的完全被激活需要 PAR-3 在血小板上的共同表达^[11]。所以, 这种情况有可能在成骨细胞中同样存在, 即 PAR-4 的激活有可能进一步加强 PAR-1 介导的凝血酶诱导成骨细胞增生的作用。为了检测这一可能性的存在, 本实验中使用 PAR-1 和 PAR-4 特异激活肽联合处理细胞, 然而其产生的作用与 PAR-1 特异激活肽单独使用并无差异, 表明在此实验中 PAR-4 并未参与介导凝血酶诱导的成骨细胞增殖及分化功能。但我们并不排除 PAR-4 在除细胞增殖及分化之外的其他功能中起作用。

本实验结果证实在鼠的成骨细胞中, PAR-1 是介导凝血酶产生细胞增殖及抑制细胞分化功能所必需的。PAR-4 则不具备此功能。

【参考文献】

- [1] Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991, 64:1057-1068.
- [2] Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, 1997, 386:502-506.
- [3] Kahn ML, Zheng YW, Huang W, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 1998, 394:690-694.
- [4] Abraham LA, Mackie EJ. Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1. *J Bone Miner Res*, 1999, 14:1320-1329.
- [5] Pagel CN, De Niese MR, Abraham LA, et al. Inhibition of osteoblast apoptosis by thrombin. *Bone*, 2003, 33:733-743.
- [6] Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:11023-11027.
- [7] Martin TJ, Ng KW, Partridge NC, et al. Hormonal influences on bone cells. *Methods Enzymol*, 1987, 145:324-336.
- [8] Abraham LA, Jenkins AL, Stone SR, et al. Expression of the thrombin receptor in developing bone and associated tissues. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:818-827.
- [9] Lerner DJ, Chen M, Tram T, et al. Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J Biol Chem*, 1996, 271:13943-13947.
- [10] Mackie EJ, Pagel CN, Smith R, et al. Protease-activated receptors: a means of converting extracellular proteolysis into intracellular signals. *IUBMB Life*, 2002, 53:277-281.
- [11] Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, et al. Par3 is a cofactor for par4 activation by thrombin. *Nature*, 2000, 404: 609-613.

(收稿日期:2007-07-17)