

PTHrP₁₋₃₄ 对荷瘤小鼠骨代谢及骨生物力学作用的观察

李玉璞 季虹 荣海钦 丁焕发 张勇

中图分类号: R73-37 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)02-0087-05

摘要:目的 研究荷瘤小鼠在甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP₁₋₃₄)的作用下,骨代谢及骨生物力学等指标的变化,同时观察肿瘤生长情况。方法 对照组、模型组、实验组 4 w 龄健康雌性 BALB/c 小鼠各 12 只,模型组和实验组采用乳腺癌组织块悬浊液注射法制备小鼠乳腺癌模型,10 d 后模型组每日予以生理盐水腹腔注射,实验组每日予以 PTHrP₁₋₃₄ 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重腹腔注射。用药 35 d 后行全身骨 X 线扫描观察骨破坏情况、测全身骨密度(BMD)、骨生物力学以及骨代谢相关血清指标[血清 Ca、P、碱性磷酸酶(ALP)、I 型胶原 C-末端交联顶端肽(β -CTX)、骨钙素(BGP)、骨唾液酸蛋白(BSP)]。剥离肿瘤比较两组肿瘤的体积与质量。结果 X 线片显示,与模型组相比,实验组存在明显的溶骨性骨破坏,其中 1 只存在骨折。与对照组和模型组比较,实验组 BMD、生物力学指标显著降低($P < 0.01$)。各组 Ca 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组和模型组比较,实验组 P、 β -CTX、BSP 等反映骨吸收的指标显著升高,总 ALP、BGP 等反映骨形成的指标均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与对照组相比,模型组各指标变化差异无显著性。实验组肿瘤体积和质量显著升高($P < 0.01$)。结论 PTHrP₁₋₃₄ 能够促进小鼠乳腺癌骨转移,造成溶骨性骨破坏,骨量下降、骨强度降低,同时骨破坏释放的因子可能促进肿瘤的生长。

关键词: 乳腺癌; 骨代谢; 溶骨性骨破坏; PTHrP₁₋₃₄; 生物力学

Effects of PTHrP₁₋₃₄ on bone metabolism and biomechanics in mice with breast cancer LI Yupu, JI Hong, RONG Haiqin, et al. Shandong Endocrine and Diabetes Institute, Jinan 250062, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of PTHrP₁₋₃₄ on the bone metabolism and biomechanics in mice with breast cancer, as well as to observe tumor growth. **Methods** 12 female healthy mice in every group were used, including control group, model group and experimental group. The last two groups were designed for establishing mouse model of breast cancer by injecting tumor tissue mass suspension, 10 days later, model group was to be injected with normal saline intraperitoneally every day, while experimental group with PTHrP 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$. After 35 days, take whole body bone X-ray, measure whole body bone mineral density (BMD), the biomechanical parameters and the bone metabolic related indices, such as serum Ca, P, ALP, β -CTX, BGP and BSP. Divest tumor to compare tumor size and weight. **Results** X-ray showed that there were obvious osteolytic bone destruction in experimental group (including 1 fracture). Compared with other two groups, BMD and biomechanical parameters of the experimental group were significantly lower ($P < 0.01$). Serum calcium level of different groups showed no statistical differences ($P > 0.05$). P, β -CTX, BSP levels of experimental group were significantly higher, while ALP and BGP levels were significantly lower compared with the other two group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), but there was no significant difference between control group and model group ($P > 0.05$). The tumor size and weight of experimental group were significantly greater than the model group. **Conclusion** PTHrP₁₋₃₄ can promote breast cancer osteolytic bone metastases, reduce bone mineral density and change the bone

作者单位: 250062 济南 山东省医学科学院(李玉璞) 山东省内分泌与代谢病研究所(季虹、荣海钦、丁焕发、张勇)

通讯作者: 荣海钦, Email: haiqinrong@126.com

biomechanical properties. In addition, some cell factors released during bone destruction may promote tumor growth.

Key words: Breast cancer; Bone metabolism; Osteolytic bone destruction; PTHrP₁₋₃₄; Biomechanics

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,易发生骨转移造成骨破坏,多种因子参与溶骨性骨破坏的形成。诸多研究表明甲状旁腺激素相关蛋白(parathyroid hormone-related protein PTHrP)是主要的破骨细胞活性介导因子之一,其持续大量的表达能够刺激破骨细胞的分化和成熟,不仅促进骨转移,也单独造成溶骨性骨破坏^[1]。但也有学者研究表明 PTHrP 的表达可以改善预后,降低肿瘤骨转移及骨破坏活性^[2]。本实验以小鼠为对象,从骨密度、X线照片、骨生物力学指标、血清骨转换标志物等方面观察 PTHrP₁₋₃₄对荷瘤小鼠骨代谢及骨生物力学的影响,同时观察肿瘤的生长情况,结果显示 PTHrP₁₋₃₄能够促进小鼠乳腺癌骨转移,造成溶骨性骨破坏,骨量下降、骨强度降低,同时骨破坏可能释放某些因子促进肿瘤生长。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

4 w 龄健康雌性 BALB/c 小鼠 42 只,体重(16 ± 2) g (山东大学医学院实验动物中心)。小鼠乳腺癌细胞 MA-782(中国典型培养物保藏中心-武汉大学)。PTHrP₁₋₃₄(上海吉尔生化)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和单细胞悬液的制备:小鼠乳腺癌细胞株 MA-782,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液放入 37℃ CO₂ 培养箱中培养,0.25% 胰蛋白酶消化、传代培养(待培养瓶中细胞 80% ~ 90% 融合时传代),选取状态和活性均较好的细胞吹打成单细胞悬液, PBS 洗净,用 PBS 调节细胞浓度到 1×10^7 个/mL^[3]。

1.2.2 造模:实验前小鼠适应性喂养 1 w 后随机取 4 只作为荷瘤种鼠,采用细胞悬液法制备乳腺癌模型^[3],其余 38 只随机分为 1、2、3 组(1 组 12 只,2、3 组各 13 只)。1 组为正常对照组(对照组),2、3 组采用乳腺癌组织块悬液法制备乳腺癌模型^[3],10 d 后以肿瘤长径大于 4 mm 做为造模成功鼠,两组各随机选取 1 只,剥离肿瘤块做病理切片证实为乳腺癌。最后入选的小鼠每组各 12 只。

1.2.3 动物用药与观察指标:造模 10 d 后开始给药,2 组每日腹腔注射生理盐水(模型组),3 组每日

腹腔注射 PTHrP 400 μg/kg(实验组),每周测量体重,根据体重变化调整药物剂量。连续用药 5 w 后摘眼球取血处死小鼠,留取血清以检测 Ca、P、ALP(日立 7180 全自动生化分析仪),骨钙素(bone gla protein, BGP)(放免法,天津九鼎),I 型胶原 C-末端交联肽(β₂-CTX),骨唾液酸蛋白(bone glaprotein BSP)(ELISA),处死前行全身 X 线照射,观察骨骼破坏情况;行全身骨密度测量,留取腰椎、股骨等标本,用万能材料分析仪行腰椎(L₅)压缩试验及股骨三点弯曲试验。剥离肿瘤测其大小与重量,体积计算方法为: $V = a \times b^2 / 4$ (a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径)。

1.2.4 仪器设备:BMD 的测量选用美国 Norland 公司产 pDEXA 型 BMD 仪(附带小动物扫描软件),仪器测定质控体模的长期变异系数(CV)在 0.29% ~ 0.35% 之间,扫描速度 10 mm/s,扫描宽度 6 cm,扫描间 0.5 mm × 0.5 mm,腰椎压缩和股骨三点弯曲试验采用 AG-1S 日本岛津万能材料试验仪,试验仪载荷测量精度 0.01 N,位移测量精度 0.001 mm,加载速度 2 mm/min,跨距 8 mm。BIO-RAD Model 680 酶标仪(日本);GC-911γ 放射免疫计数器(科大创新公司)。

1.3 统计学处理

计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,率的比较采用四格表资料确切概率法。所有数据应用 SPSS 13.0 统计软件进行处理分析,差异显著性水平为双尾 0.05。

2 结果

2.1 小鼠体重、BMD、肿瘤质量与体积(表 1、2,图 1)

与对照组比较,模型组和实验组小鼠体重增长明显缓慢,实验结束时体重增长总量均显著低于对照组($P < 0.01$),模型组与实验组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组和模型组相比,实验组 BMD 显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),与对照组相比,模型组 BMD 有降低趋势,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,实验组肿瘤生长快、质量、体积大,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠体重($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	初重 (g)	体重总增长 (g)	BMD
对照组	12	16.20 ± 1.64	6.15 ± 1.00	62.43 ± 2.22
模型组	12	15.83 ± 1.57	4.64 ± 1.31 [#]	61.88 ± 2.02
实验组	12	16.11 ± 1.44	3.73 ± 0.87 [#]	54.83 ± 1.93 [#]

注 :与对照组比较 ,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与模型组比较 ,^{**} $P < 0.01$

表 2 荷瘤小鼠肿瘤质量和肿瘤体积($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	肿瘤质量(g)	肿瘤体积(cm^3)
模型组	12	0.859 ± 0.176	297.07 ± 106.70
实验组	12	1.123 ± 0.192 ^{**}	824.18 ± 189.79 ^{**}

注 :与模型组比较 ,^{**} $P < 0.01$

2.2 3 组小鼠全身 X 线骨破坏情况观察(表 3、图 2)

模型组与对照组全身 X 线片观察比较 ,除 1 只

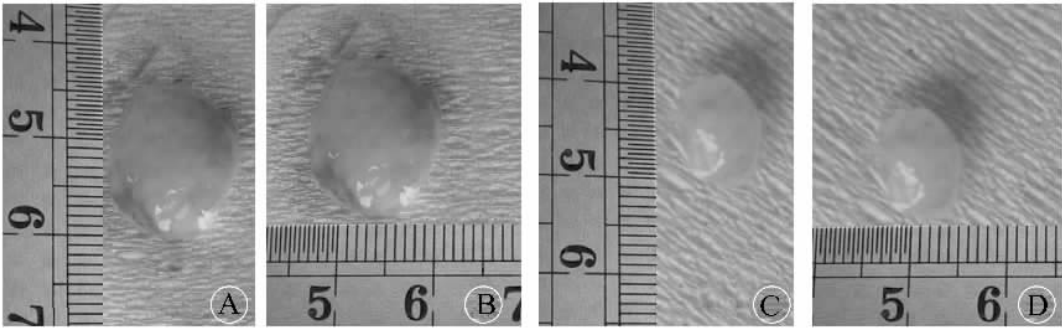


图 1 荷瘤小鼠剥离瘤照片
(A、B 为实验组 ,C、D 为模型组) 实验组明显大于模型组

外其余均未见明显骨破坏现象 ;实验组有 6 只存有明显的溶骨性骨破坏现象 ,以胫骨近端为明显 ,其中 1 只左后肢胫骨骨折。模型组与实验组骨破坏率的比较 ,用四格表资料确切概率法得出结论 :两组荷瘤小鼠骨破坏发生率差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 3 两组荷瘤小鼠溶骨性骨破坏情况(只)

组别	溶骨性骨破坏	无异常	合计	骨破坏率(%)
模型组	1	11	12	8.3
实验组	6	6	12	50 ^{**}
合计	7	17	24	29.2

注 :与模型组比较 ,^{**} $P < 0.01$

2.3 3 组小鼠骨生物力学指标的变化

与对照组和模型组比较 ,实验组小鼠股骨最大载荷、弹性载荷、截面惯性矩、弹性模量、腰椎最大载荷等指标均降低 ,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(表 4)。

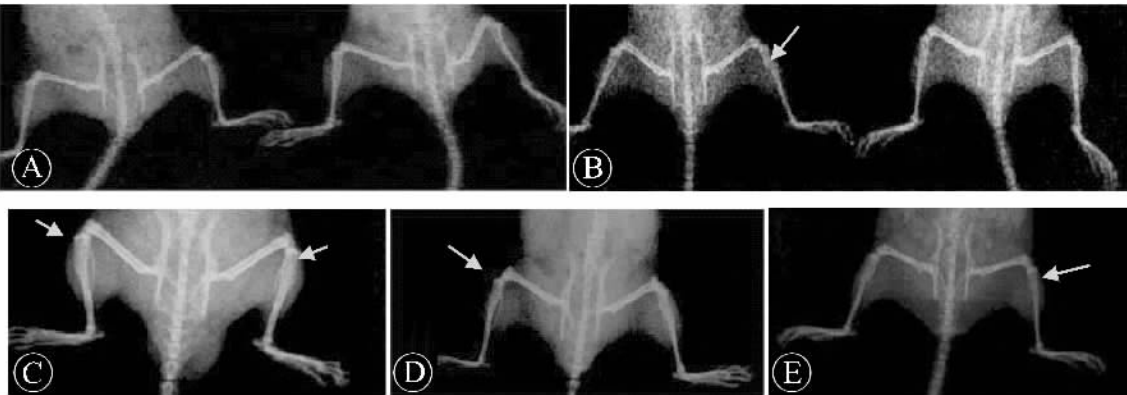


图 2 各组小鼠 X 线照片
(A 为对照组 ,B 为模型组 ,C、D、E 为实验组) 实验组双侧胫骨近段存在明显溶解性骨破坏现象 , E 图示左后肢胫骨中上 1/3 处骨折

表 4 3 组小鼠股骨三点弯曲和腰椎(L₅)压缩试验的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	股骨三点弯曲试验					腰椎压缩试验
		最大载荷 (N)	弹性载荷 (N)	截面惯性矩 (mm ⁴)	弹性模量 (GPa)	最大弯曲应力 (MPa)	最大载荷 (N)
对照组	12	17.23 ± 0.76	14.33 ± 1.54	0.149 ± 0.03	6.88 ± 1.30	147.24 ± 19.61	14.55 ± 3.00
模型组	12	17.38 ± 20.32	14.99 ± 2.23	0.145 ± 0.03	6.01 ± 1.41	151.52 ± 28.03	12.54 ± 2.67
实验组	12	15.10 ± 1.06 ^{##**}	12.65 ± 1.06 ^{##**}	0.120 ± 0.02 ^{##**}	5.08 ± 1.36 ^{##**}	152.02 ± 21.11	9.50 ± 3.17 ^{##**}

注 :与对照组比较 ,[#] $P < 0.01$,与模型组比较 ,^{**} $P < 0.01$

2.4 血清生化指标(表 5)

3 组小鼠间血清 Ca 水平差异均无统计学意义。与对照组和模型组比较 ,实验组血清 P、BSP 等反映骨吸收的指标显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ;血

清总 ALP、BGP 等反映骨形成的指标均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ;与对照组相比 ,模型组血清 P、BSR($P = 0.064$)有升高趋势 ,ALP、BGP 有降低趋势 ,但差异均无统计学意义($P > 0.05$) 。

表 5 各组小鼠血清生化指标变化($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	β-CTX (μg/L)	BSR (ng/L)	ALP IU/L)	BGP (mmol/L)
对照组	12	2.05 ± 0.21	2.03 ± 0.31	0.16 ± 0.15	18.08 ± 0.40	77.32 ± 10.28	6.31 ± 0.31
模型组	12	2.09 ± 0.08	2.19 ± 0.32	0.17 ± 0.13	20.70 ± 4.07	71.06 ± 8.96	5.89 ± 0.53
实验组	12	2.16 ± 0.10	2.67 ± 0.37 ^{##**}	0.27 ± 0.10 ^{##**}	23.79 ± 4.10 ^{##**}	62.19 ± 8.71 ^{##**}	5.21 ± 0.61 ^{##**}

注 :与对照组比较 ,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$,与模型组比较 ,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

3 讨论

在本实验之前进行了预试验 ,分别采用肿瘤细胞悬浊液注射法和肿瘤组织块悬浊液注射法制备小鼠乳腺癌模型 ,以选取较好的荷瘤鼠造模方法。小鼠乳腺癌细胞 MA-782 可以在 BALB/c 小鼠身上成功建立乳腺癌模型 ,肿瘤注射位置为前肢腋下皮下 ,其中采用细胞悬浊液注射法成瘤时间不一 ,且大小不均 ,而肿瘤组织块悬浊液注射法可以形成成瘤时间、大小一致的荷瘤鼠 ,且成瘤率较前者高 ,是研究人类乳腺癌发生、发展、转移等各种机制较理想的动物模型 ,这与孙金忠等^[3]研究报道结果一致。本实验中采取肿瘤组织块悬浊液注射法造模。

PTHrP 是由 Burtis 等^[4]从与高钙血症相关的恶性肿瘤组织中分离出的一种具有全身作用的体液因子 ,对骨具有双重作用 ,与肿瘤骨转移和溶骨性骨破坏也有着密切联系^[1,5,6]。临床资料显示 PTHrP 阳性的乳腺癌患者更容易发生骨转移 ,发生骨转移的乳腺癌患者 90% 表达 PTHrP^[7]。Saito 等^[8]用人类乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 制备出有高骨转移活性的 MDA-5a 亚系 ,制造裸鼠骨转移模型 ,结果显示该细胞高表达 PTHrP、IL-6、IL-8 ,骨转移率高 ,造成严重溶

骨性骨破坏 ,抗人-PTHrP₁₋₃₄ 抗体拮抗后可有效地阻止肿瘤溶骨性骨转移的发生发展。但 Henderson 等^[2,9]研究报道 PTHrP 在乳腺癌原发灶中的表达可以改善预后 ,PTHrP 阳性患者 5 年、10 年存活率均比 PTHrP 阴性患者高 ,不仅降低肿瘤骨转移及骨破坏活性 ,还降低其向其他软组织转移的特性。PTHrP 在癌症骨转移及骨破坏过程中所起的作用未完全明确 ,近年来成为诸多影响肿瘤骨转移因子中的研究热点之一。

本实验应用小鼠乳腺癌细胞 MA-782 和 BALB/c 小鼠制备荷瘤小鼠模型 ,腹腔注射大剂量 PTHrP₁₋₃₄ 进行干预 ,通过对诸多指标的观察比较 ,研究 PTHrP₁₋₃₄ 对荷瘤小鼠骨代谢的影响 ,同时观察肿瘤生长情况。与应用人乳腺癌细胞株和裸鼠比较 ,拥有一个正常的生理环境 ,更接近于人体发病机制。

骨生物力学特征是反映骨质量的重要指标 ,力学性能降低常导致骨折发生率升高^[10]。腰椎最大载荷直接反映松质骨的骨质、结构连续性和皮质骨的强度 ,是对骨质量的综合反映^[11]。弹性模量用以测量骨组织的内在硬度 ,主要反映了骨组织的材料特性。实验组腰椎最大载荷、股骨弹性模量显著低于正常组 ,说明骨组织强度、硬度降低 ,与 BMD 及 X

片骨破坏情况变化一致。表明实验组小鼠由于 PTHrP₁₋₃₄ 的作用,骨量减少,骨强度降低。

血清 Ca、P、 β -CTX、BSP 是反映骨吸收的指标。对乳腺癌患者的研究表明,血清 BSP 增加可以提示早期骨转移^[12]。3 组间 Ca 水平差异无统计学意义,可能和体内复杂的内分泌系统调节有关,使其维持在较稳定的水平。与对照组和模型组相比,实验组 P、 β -CTX、BSP 水平显著升高,表明存在肿瘤骨转移及溶骨性骨吸收,模型组 BSP 有增高趋势,说明肿瘤可能已存在潜在的骨转移,只是过程缓慢,尚未在骨 X 线上显示出来。ALP 主要来源于肝和骨,BGP 是成骨细胞特异性产物,均是成骨细胞活性指标,反映骨形成。本实验结果表明在 PTHrP₁₋₃₄ 的作用下,破骨细胞活性大于成骨细胞活性,骨吸收大于骨形成,造成溶骨性骨破坏。

通过本实验结果可见,单纯的肿瘤对机体、骨转移以及骨代谢的影响并不明显,当体内持续大剂量表达 PTHrP 时,促使了肿瘤骨转移且使得骨代谢紊乱,以吸收性骨破坏为主,同时骨吸收释放的一些因子反过来又促进了肿瘤的生长,实验组肿瘤质量和体积均增大,进而影响了机体的生长发育,体重增长缓慢。表明 PTHrP₁₋₃₄ 与骨转移及溶骨性骨破坏有密切联系,而不是降低肿瘤骨转移及骨破坏活性、改善预后,为研发抗-PTHrP₁₋₃₄ 抗体来改善肿瘤所致的骨代谢紊乱奠定了理论基础。PTHrP 何种片段对肿瘤骨转移及骨代谢影响更大,PTHrP 表达途径的不同对机体影响的差别还有待下一步研究。

【参 考 文 献】

[1] Yoneda T. Cellular and molecular basis of preferential metastasis of breast cancer to bone. J Orthop Sci, 2000, 5(1):75-81.

- [2] Henderson MA, Danks JA, Moseley JM, et al. Parathyroid hormone-related protein production by breast cancers, improved survival, and reduced bone metastases. J Natl Cancer Inst, 2001, 93:234-237.
- [3] Sun Jinzhong, Sun Shengrong, JinHuamin. Comparison of Mice Models of MA782 Breast Cancer Established by Three Different Methods. J Medical Journal of Wuhan University, 2006, 27(3):335-337 (in Chinese).
- [4] Burtis WJ, Wu T, Bunch C, et al. Identification of a novel 17000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. J Biol Chem, 1987, 262(15):7151-7156.
- [5] Horwitz MJ, Tedesco MB, Sereika SM, et al. Safety and tolerability of subcutaneous PTHrP(1-36) in healthy human volunteers: a dose escalation study. Osteoporos Int, 2006, 17(2):225-230.
- [6] Tao Huiren, Wang Quanping, Ming Jingyang, et al. Characteristics of local bone resorption and hypocalcemia induced by PTHrP in mice. Chin J Orthop Trauma, 2004, 6(10):1140-1143 (in Chinese).
- [7] Kozlow W, Guise TA. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005, 10(2):169-180.
- [8] Saito H, Tsunenari T, Onuma E, et al. Humanized monoclonal antibody against parathyroid hormone-related protein suppresses osteolytic bone metastasis of human breast cancer cells derived from MDA-MB-231. Anticancer Res, 2005, 25(6B):3817-3823.
- [9] Henderson MA, Danks JA, Slavin JL, et al. Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predict improved prognosis. Cancer Res, 2006, 66(4):2250-2256.
- [10] Dai RG, Liao EY, Yang C, et al. Microcracks: an alternative index for evaluating bone biomechanical quality. J Bone Miner Metab, 2004, 3:215-223.
- [11] Bikle DD, Sakata T, Leary C, et al. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. J Bone Miner Res, 2002, 17(9):1570-1578.
- [12] Liao Eryuan, Tan Lihua. METABOLIC OSTEOLOGY. Biochemical Markers of Bone Turnover. Part 3 Chapter 13 526-536 (in Chinese).

(收稿日期:2008-10-21)