

硫酸乙酰肝素通过 PKC 促进大鼠成骨细胞的增殖

宋淑军 张建中 贾桂玥

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)05-0322-03

摘要: 目的 探讨硫酸乙酰肝素对大鼠成骨细胞增殖功能的影响和可能机制。方法 采用酶消化法分离新生大鼠颅骨的成骨细胞,采用不同浓度的硫酸乙酰肝素作用于成骨细胞,并用不同信号传导抑制剂进行预处理,细胞增殖的检测采用 5-溴-2'-脱氧尿嘧啶嵌入测定试剂盒。结果 外源性硫酸乙酰肝素呈剂量依赖性的促进大鼠成骨细胞 5-溴-2'-脱氧尿嘧啶的嵌入率,这一功能可以完全被蛋白激酶 (protein kinase)-PKC 的抑制剂 calphostin C 阻断,而细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase; ERK) 或 p38 的抑制剂并无此作用。结论 硫酸乙酰肝素可能通过 PKC 介导促进成骨细胞增殖。

关键词: 硫酸乙酰肝素; 成骨细胞; 增殖; 抑制剂

Heparan sulfate stimulates rat osteoblast proliferation through protein kinase C SONG Shujun, ZHANG Jianzhong, JIA Guiyue. The Department of Pathology and Laboratory PLA 306 Hospital, Beijing 100101, China

Corresponding author: SONG Shujun, Email: shuj80@gmail.com

Abstract: Objective Osteoblasts are responsible for bone formation during fracture healing. Proliferation of osteoblasts is critical component in bone repair. The aim of this study is to investigate the effects of heparan sulfate on osteoblast proliferation and the mechanism. **Methods** Primary rat calvarial osteoblasts were obtained from digestion of new born rat calvariae. Osteoblasts were treated by varying concentrations of heparan sulfate. In some experiments, cells were pre-treated by different inhibitors of cell signaling pathway. Cell proliferation were tested by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay. **Results** Exogenous application of heparan sulfate to cultures of primary rat osteoblasts stimulated incorporation of BrdU in a dose dependent manner. Furthermore, This effects could be completely abolished by blocking protein kinase C signaling using an inhibitor calphostin C. However, blocking ERK or p38 signaling pathway had no effects on heparan sulfate-induced up-regulation of BrdU incorporation. **Conclusion** The results suggest that heparan sulfate, through PKC-signaling pathway, stimulates rat osteoblast proliferation.

Key words: Heparan sulfate; Osteoblast; Proliferation; Inhibitor

硫酸乙酰肝素对股骨损伤的愈合显示有促进作用^[1],但其机制尚不清楚。硫酸乙酰肝素是存在于细胞外的氨基多糖,其可以和包括生长因子在内的多种生物活性物质结合,而参与细胞功能及活性的调节,硫酸乙酰肝素又被称为肝素结合性生长因子的辅助受体^[2]。硫酸乙酰肝素有可能通过与内源

性的促骨形成因子相互作用而调节成骨细胞的功能。成骨细胞是骨折愈合过程中负责骨形成的重要细胞,成骨细胞增殖是骨折愈合不可缺少的组成部分,因此探讨硫酸乙酰肝素对成骨细胞增殖的影响及其作用机制对了解其在骨折愈合中的作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

5-溴-2'-脱氧尿嘧啶 (5-bromo-2'-deoxyuridine;

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、张建中);中国人民解放军总装备部司令部门诊部(贾桂玥)

通讯作者: 宋淑军, Email: shuj80@gmail.com

BrdU) 细胞增殖检测试剂盒购于 Roche, 细胞培养所用物品均购自 Invitrogen, 源于牛肾脏的硫酸乙酰肝素购自 Sigma, 信号通路抑制剂均购自 Calbiochem, 1000 倍终浓度的抑制剂溶于 DMSO 中, 实验使用相同浓度的 DMSO 作为对照。

1.2 原代大鼠成骨细胞的分离及培养

取新生 24 h 以内的大鼠颅盖骨, 采用胶原酶系列消化法得到大鼠原代成骨细胞^[3]。消化所得细胞培育至近汇合, 胰酶消化后接种植在相应的培养器皿中用于各种实验。使用 DMEM 细胞培养液, 并含有 10% 小牛血清, 庆大霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 两性霉素 B (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 L-谷氨酸 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。细胞培养在 37 $^{\circ}\text{C}$, 含 5% 的 CO_2 培养箱。

1.3 细胞增殖的检测

采用 BrdU 细胞增殖检测试剂盒, 在细胞增殖过程中 BrdU 可以取代胸腺嘧啶镶嵌到细胞 DNA 中, 因此 BrdU 细胞嵌入率可以间接反应细胞增殖情况。成骨细胞 (5000/ cm^2) 被接种在 96 孔板中, 待长至 80% 融合时, 无血清培养 24 h, 然后用不同浓度的硫酸乙酰肝素 (共分为 4 组: 不含硫酸乙酰肝素组为对照组、硫酸乙酰肝素 5 ng/ml、50 ng/ml 和 500 ng/ml 处理组) 在无血清细胞培养基中处理细胞 72 h, 在处理的最后 24 h 使用 BrdU 标记增殖细胞, 然后固定细胞, 并按照试剂盒说明, 使用直接免疫过氧化物酶法对嵌入细胞 BrdU 进行检测, 四甲基联苯胺为底物, 用酶标仪检测波长为 450 nm 处的吸光度。

1.4 不同信号传导抑制剂处理细胞

在另一部分实验中, 细胞种植情况同 1.3, 而在无血清培养的最后 2 h, 细胞分别用不同信号传导抑制剂预处理, 然后使用 50 ng/ml 硫酸乙酰肝素和相应信号传导抑制剂同时在无血清细胞培养基中继续处理细胞 72 h, 在处理的最后 24 h 使用 BrdU 标记增殖细胞, 细胞增殖的检测同 1.3。所用信号传导抑制剂分别包括 p42/44 或 ERK 信号传导抑制剂 (PD98059, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$), p38 信号传导抑制剂 (SB203580, 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 和 PKC 信号传导抑制剂 (calphostin C; 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 同时设无抑制剂对照。

1.5 统计学处理

采用双尾非成对 t 检验法比较处理组和对照组间细胞 BrdU 的嵌入率, P 值 < 0.05 , 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硫酸乙酰肝素对成骨细胞增殖的影响

硫酸乙酰肝素对大鼠成骨细胞增殖影响通过 BrdU 细胞增殖试剂盒进行检测。结果显示硫酸乙酰肝素呈剂量依赖性的增加细胞 BrdU 的嵌入率, 与对照组比较, 硫酸乙酰肝素 5 ng/ml 即可显著促进成骨细胞的增殖, 表现为 BrdU 细胞的嵌入率增加约为 58%, 统计学检测差异有统计学意义 ($t = 2.57$, $P < 0.01$), 50 ng/ml 处理组显示促进成骨细胞增殖的功能最强, BrdU 细胞的嵌入率较对照组增加约 104%, ($t = 2.45$, $P < 0.01$), 此后继续增加硫酸乙酰肝素的浓度至 500 ng/ml, BrdU 的嵌入率并无进一步增加。

2.2 不同的信号通路抑制剂对硫酸乙酰肝素诱导成骨细胞增殖的影响

为了进一步了解细胞生长信号传递 ERK 在硫酸乙酰肝素诱导成骨细胞增殖中的作用, 本研究使用 ERK 信号通路抑制剂 PD98059 阻止 ERK 的激活, 结果表明 PD98059 并不能阻止硫酸乙酰肝素诱导的成骨细胞 BrdU 嵌入率的增加 ($P > 0.05$), 说明 ERK 信号通路并不参与硫酸乙酰肝素诱导的成骨细胞增殖。进一步使用 p38 抑制剂 (SB203580) 和 PKC 抑制剂 (calphostin C) 处理细胞, 发现只有 calphostin C 的使用可以完全阻断硫酸乙酰肝素诱导的成骨细胞 BrdU 嵌入的增加, 说明硫酸乙酰肝素刺激成骨细胞的增殖是通过 PKC 这一信号通路介导的, 而 ERK 和 p38 似乎并未参与。

3 讨论

每年有数百万的骨折发生, 其中部分患者骨折不能自行愈合或延迟愈合, 这些不正常的骨折愈合常常造成功能障碍, 因此改善骨折治疗、提高骨折的愈合速率在临床上具有非常重要的意义。多种生长因子, 特别是肝素结合性生长因子, 如成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、对骨形成及骨折愈合有明显的促进作用^[4], 但由于生长因子容易被蛋白酶降解失活而影响其临床效果, 在动物实验和临床实验中成功治疗骨折所用生长因子的浓度明显高于正常组织和体外实验所用的浓度^[5-6], 过高的生长因子可能有致癌效应。硫酸乙酰肝素可以和包括生长因子在内的多种生物活性物质结合, 这种结合不仅可以保护生长因子免受各种蛋白酶的降解, 而且还可以促进生长因子与其受体结合而产生生物效应, 因此硫酸乙酰肝素作为生长因子的辅助受体, 可能是一种有潜力的新型治疗药物。

最近文献报道硫酸乙酰肝素可以促进大鼠骨髓

基质干细胞^[7]和平滑肌细胞的增殖^[8],本实验结果显示硫酸乙酰肝素可以促进大鼠成骨细胞的增殖,说明硫酸乙酰肝素可能是多种细胞的促分裂因子。硫酸乙酰肝素做为肝素结合性生长因子的辅助受体,它的使用有可能通过与内源性的促骨形成因子,如纤维细胞生长因子(FGF)、骨形态发生蛋白等相互作用而调节成骨细胞的功能,促进成骨细胞增殖,有利于成骨细胞数量的快速积累和扩充,促进骨折愈合,在骨生物医学工程领域可能具有一定的应用前景。硫酸乙酰肝素除了促进成骨细胞的增殖,最近研究还发现其可促进成骨细胞的前身细胞-骨髓基质干细胞的增殖,以及干细胞向成骨细胞的分化^[7],因此硫酸乙酰肝素可能从多层次促进成骨细胞数量的积累,这对骨折的愈合具有重要的意义。

硫酸乙酰肝素是许多肝素结合性生长因子的辅助受体,其中 FGF-2 是肝素结合性生长因子的典型代表,可以刺激许多细胞包括成骨细胞的增殖,而 ERK 是 FGF-2 刺激细胞增殖的主要信号通路^[9],所以硫酸乙酰肝素作为 FGF-2 的辅助受体有可能通过 ERK 信号通路影响成骨细胞的增殖。为了解不同细胞传导信号通路在硫酸乙酰肝素诱导的成骨细胞增殖中的作用,使用不同的细胞信号通路抑制剂处理细胞,结果显示,ERK 和 p38 抑制剂的使用对硫酸乙酰肝素诱导的成骨细胞的增殖并无影响。说明 ERK 和 p38 信号通路可能并不参与硫酸乙酰肝素诱导的成骨细胞增殖,或是作用较小而被掩盖。但在大鼠骨髓基质干细胞实验中 PD98059 使用对硫酸乙酰肝素诱导的骨髓基质干细胞增殖具有微弱抑制的作用^[7]。说明硫酸乙酰肝素对不同的细胞其诱导增殖的机理不同。实验结果还显示 PKC 抑制剂的使用则可完全阻断硫酸乙酰肝素促成骨细胞增殖的作用,说明 PKC 是硫酸乙酰肝素诱导成骨细胞增殖的主要信号通路,进一步揭示了硫酸乙酰肝素对大鼠成骨细胞增殖作用的影响机制。PKC 是分布非常广泛的磷脂依赖性的酶,参与多种细胞功能有关的信号转导,包括细胞增殖、分化凋亡等^[10],PKC 还可以介导许多生长因子诱导细胞增殖,如表皮生长因子诱导的鸡原生殖细胞增殖^[11]、血小板衍生长因子诱导血管内皮细胞增殖^[12]、肝细胞生长因子诱导的上皮细胞的增殖^[13]等。说明 PKC 的激活参与多种细胞功能的调节。

本实验结果证实硫酸乙酰肝素通过 PKC 介导

促进大鼠成骨细胞的增殖,有利于成骨细胞数量的扩充,其有可能成为一种促骨折愈合的新型治疗药物。

【参 考 文 献】

- [1] Jackson RA, McDonald MM, Nurcombe V, et al. The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a rat fracture model. *J Orthop Res*, 2006, 24 (4) :636-644.
- [2] Turnbull J, Powell A, Guimond S. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol*, 2001, 11 (2) :75-82.
- [3] Song SJ, Pagel CN, Pike RN, et al. Studies on the receptors mediating responses of osteoblasts to thrombin. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005,37 (1) :206-213.
- [4] Vladimirov BS, Dimitrov SA. Growth factors-importance and possibilities for enhancement of the healing process in bone fractures. *Folia Med (Plovdiv)*, 2004, 46 (2) :11-17.
- [5] Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, et al. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am*, 2003,85-A (8) :1425-1435.
- [6] Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, et al. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res*, 2003,18 (10) :1842-1853.
- [7] Dombrowski C, Song SJ, Chuan P, et al. Heparan Sulfate Mediates the proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2009,18 (4) :661-670.
- [8] Tran-Lundmark K, Tran PK, Paulsson-Berne G, et al. Heparan sulfate in perlecan promotes mouse atherosclerosis: roles in lipid permeability, lipid retention, and smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*, 2008,103 (1) :43-52.
- [9] Bonfini L, Migliaccio E, Pelicci G, et al. Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci*, 1996,21 (7) :257-261.
- [10] Reyland ME. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci*, 2009, 14: 2386-2399.
- [11] Ge C, Yu M, Petite JN, et al. Epidermal growth factor-induced proliferation of chicken primordial germ cells: involvement of calcium/protein kinase C and NFKB1. *Biol Reprod*, 2009, 80 (3) :528-536.
- [12] Simon F, Stutzin A. Protein kinase C-mediated phosphorylation of p47 phox modulates platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ generation and cell proliferation in human umbilical vein endothelial cells. *Endothelium*, 2008,15 (4) :175-188.
- [13] Sharma GD, Kakazu A, Bazan HE. Protein kinase C alpha and epsilon differentially modulate hepatocyte growth factor-induced epithelial proliferation and migration. *Exp Eye Res*, 2007, 85 (2) :289-297.

(收稿日期:2010-01-14)