

# rhPTH1-34 对成骨细胞增殖及 BMP-7、BMP-9 基因表达的影响

徐峰 董进

中图分类号: R361<sup>+</sup>.3 文献标识码: B 文章编号: 1006-7108(2011)06-0489-04

**摘要:** 目的 研究重组人甲状旁腺激素 1-34(rhPTH1-34)对成骨细胞增殖及 BMP-7、BMP-9 基因表达的影响。方法 通过不同剂量的重组人甲状旁腺素(rhPTH1-34)( $0, 10^{-11}, 10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}$  mol/L)间歇性(24 h/周期,前 12 h rhPTH1-34 干预)刺激体外培养的成骨细胞,用噻唑蓝(MTT)法检测细胞的增殖能力,RT-PCR 法检测成骨细胞 BMP-7、BMP-9 基因的表达。结果 间歇性小剂量 rhPTH1-34 可明显促进成骨细胞的增殖能力及增强 BMP-7、BMP-9 基因的表达。结论 间歇性小剂量 rhPTH1-34 可促进成骨细胞增殖,可能与 BMP-7、BMP-9 基因表达相关。

**关键词:** 重组人甲状旁腺激素 1-34(rhPTH1-34); 成骨细胞; 增殖; BMP-7; BMP-9

**Effect of recombinant human PTH 1-34 on the proliferation of osteoblasts and the gene expression of bone morphogenetic protein-7 and bone morphogenetic protein-9** XU Feng, DONG Jin. Department of Endocrinology, The First Clinical Medical School, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: XU Feng, Email: 995116313@qq.com

**Abstract: Objective** To study the effect of recombinant human parathyroid hormone (rhPTH1-34) on the proliferation of osteoblasts and the gene expression of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) and bone morphogenetic protein-9 (BMP-9). **Methods** Cultured osteoblasts were treated with different concentrations of rhPTH1-34 ( $0, 10^{-11}, 10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8},$  and  $10^{-7}$  mol/L), at the first 12h of a 24h interval. Cell proliferation was assessed using MTT colorimetric assay. The expression of BMP-7 and BMP-9 genes was examined with semi-quantitative RT-PCR. **Results** rhPTH1-34 promoted osteoblast proliferation ( $P < 0.01$ ) and increased the expression of BMP-7 and BMP-9 genes with low dose and intermittent administration. **Conclusion** Low dose and intermittent administration of rhPTH1-34 induced osteoblast proliferation, probably in association with the expression of BMP-7 and BMP-9.

**Key words:** rhPTH1-34; Osteoblasts; Proliferation; BMP-7; BMP-9

人甲状旁腺素是由甲状旁腺分泌的 84 个氨基酸多肽,是主要的骨代谢调节激素之一。其氨基酸末端 1-34 肽具有 1-84 完整的全部生物学活性。研究表明,改造后的 rhPTH1-34 具有更高的稳定性和更好的活性,且具有更多多向性的生物学功能<sup>[1]</sup>。本实验通过 rhPTH1-34 间歇性刺激成骨细胞,观察 rhPTH1-34 对成骨细胞增殖及 BMP-7、BMP-9 基因表达的影响,探讨 rhPTH1-34 对骨代谢的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

rhPTH1-34, DMEM 培养基(GIBCO 公司),胎牛血清(杭州四季青生物制剂公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司)寡核苷酸引物,Trizol 提取试剂盒, dNTP, M-MLV 逆转录酶, PCRmarker, DNA 聚合酶, 引物, Beta 引物(上海生工),分子光度计(U-2001, HITACHI, 日本), PCR 热循环仪(Gene Amp9600, PE 公司, 美国),垂直电泳槽(Bio-Rad 公司, 美国),电泳仪(Bio-Rad/PAC200, 美国)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 成骨细胞的培养:**采用酶消化法分离并纯化

作者单位: 030001 太原,山西医科大学第一临床医学院内分泌科

通讯作者: 徐峰, Email: 995116313@qq.com

乳鼠颅盖骨成骨细胞,计数后以适当的密度接种于含有 DMEM 培养瓶中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养,24 h 换液 1 次,以后隔 2~3 d 换液并观察细胞的生长情况,待细胞融合达 80% 以上,用 2.5% 胰蛋白酶消化、传代。

**1.2.2 成骨细胞的鉴定:**取第三代成骨细胞进行爬片,待细胞长满盖玻片后,用 PBS 进行冲洗,95% 乙醇固定 5~10 min,行碱性磷酸酶(ALP)染色。取第五代成骨细胞接种于 6 孔板中,用含有 15% 胎牛血清的 DMEM 液培养,隔 3 d 进行换液 1 次,待 15~20 d 后,行茜素红染色。

**1.2.3 rhPTH1-34 对成骨细胞增殖影响的测定(MTT法):**取第三代成骨细胞接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 48 h 后,实验组加入含有不同浓度的 rhPTH1-34 (0、10<sup>-11</sup>、10<sup>-10</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-7</sup> mol/L) 的无血清 DMEM 液继续孵育 24 h,设置 8 个重复孔。实验结束前 4 h 加入 MTT 液 20 μL,继续孵育 4 h。吸弃上清液加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min,在 490 nm 波长处检测每个孔吸光度值(OD 值)。

**1.2.4 rhPTH1-34 对成骨细胞 BMP-7、BMP-9 基因表达影响的测定:**不同浓度的 rhPTH1-34 作用于成骨细胞 24 h 后,应用 Trizol 提取细胞总 RNA 后,用半定量 RT-PCR 方法检测 BMP-7、BMP-9 基因的表达。

(1) cDNA 第一链合成:采用 TAKARA RNA-PCR Kit (AMV) Ver30 试剂盒,10 μL 反应体系,样本 RNA 5 μL,随即引物 91 μL,DEPG-水 6 μL 离心混匀,70℃,5 min 后置于冰上,加入 5 × buffer 4 μL, RNA inhibitor 1 μL, DNTP2 μL 离心混匀,25℃,5 min,在加反转录酶 1 μL,按 25℃ 10 min,42℃ 60 min,72℃ 10 min 进行。

(2) PCR 的步骤:PCR 扩增 BMP-7、BMP-9 的同时扩增 Gapdh 作为内参。引物序列为: BMP-7 上

游引物: 5-gaaacagcagcagtgacca-3 下游引物 5-ggtggcggtcatgtaggag-3 PCR 产物为 165 bp。扩增条件:94℃ 变性 20s,56℃ 退火 20s,72℃ 延伸 20s 32 次循环; BMP-9 上游引物 5-gaggcagttcaggacctcag-3 下游引物 5-cttaggcaggagacggctcag-3 PCR 产物为 180 bp 扩增条件:94℃ 变性 20s,58℃ 退火 20s,72℃ 延伸 20s 32 次循环; Gapdh 上游引物 5-tgaacgggaagctcactgg-3 下游引物 5-tccaccacctgttctgga-3 PCR 产物为 307 bp 扩增条件:94℃ 变性 20s,56℃ 退火 20s,72℃ 延伸 20s 32 次循环。

(3) PCR 产物鉴定与分析:取 PCR 扩增产物点样于琼脂凝胶上电泳检测,紫外线箱中观察并记录。产物鉴定以 PCRmaker 为标准,通过凝胶成像分析仪对目的基因和参照基因条带进行像素值测定,并算出两者比值。

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计学软件对实验数据进行处理分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间两两比较用 LSD-T 检验。 $P < 0.01$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成骨细胞的鉴定结果

成骨细胞 ALP 染色呈阳性反应,胞浆呈灰黑色,茜素红染色呈红色阳性钙化结节。鉴定证实为成骨细胞。

### 2.2 rhPTH1-34 对成骨细胞增殖的影响

不同浓度的 rhPTH1-34 (0、10<sup>-11</sup>、10<sup>-10</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-7</sup> mol/L) 作用于成骨细胞 24 h 后,结果显示:间歇小剂量给予 rhPTH1-34 可促进成骨细胞增殖,浓度为 10<sup>-9</sup> mol/L 时,显微镜下观察成骨细胞数目明显增加,且 OD 值显著增高。对照组与实验组,实验组组间比较,均有显著性统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (见表 1)。

表 1 不同浓度 rhPTH1-34 对成骨细胞增殖的影响 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

时间(h)	0 mol/L	10 <sup>-11</sup> mol/L	10 <sup>-10</sup> mol/L	10 <sup>-9</sup> mol/L	10 <sup>-8</sup> mol/L	10 <sup>-7</sup> mol/L
24	0.401 ± 0.062	0.426 ± 0.026	0.437 ± 0.039	0.590 ± 0.029	0.502 ± 0.106	0.471 ± 0.028

注:实验组与对照组比较  $P < 0.01$ ; 实验组间比较  $P < 0.01$

### 2.3 rhPTH1-34 对成骨细胞 BMP-7、BMP-9 基因表达的影响

不同浓度的 rhPTH1-34 (0、10<sup>-11</sup>、10<sup>-10</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-7</sup> mol/L) 作用于成骨细胞 24 h 后,用 RT-PCR 方法测定 BMP-7、BMP-9 基因的表达。结果显

万方数据

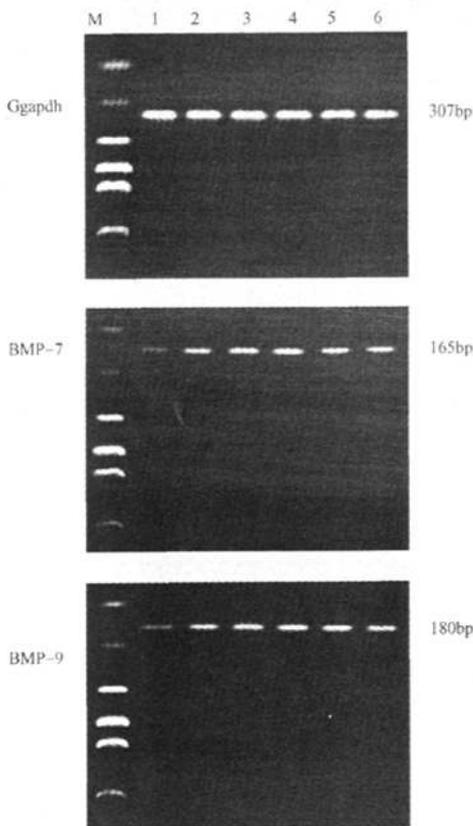
示:间歇小剂量给予 rhPTH1-34 可促进成骨细胞 BMP-7、BMP-9 基因表达的能力,浓度为 10<sup>-9</sup> mol/L 时,成骨细胞 BMP-7、BMP-9 基因表达明显升高,且光密度比值显著增高。对照组与实验组,实验组组间比较,均有显著性统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (见表

2,图1)。

**表2** 不同浓度 rhPTH1-34 对成骨细胞 BMP-7、BMP-9 基因表达的灰度值

浓度 (mol/L)	BMP-7 灰度值	BMP-9 灰度值
0	0.815 ± 0.007	0.205 ± 0.007
10 <sup>-11</sup>	0.785 ± 0.007	0.605 ± 0.212
10 <sup>-10</sup>	0.835 ± 0.007	0.645 ± 0.007
10 <sup>-9</sup>	0.910 ± 0.014	0.730 ± 0.014
10 <sup>-8</sup>	0.795 ± 0.007	0.605 ± 0.021
10 <sup>-7</sup>	0.610 ± 0.014	0.520 ± 0.014

注:灰度值为目的基因(BMP-7、BMP-9)与参照基因(Gapdh)的比值;实验组与对照组比较, $P < 0.01$ ;实验组间比较, $P < 0.01$



**图1** 不同浓度 rhPTH1-34 对成骨细胞 BMP-7、BMP-9 基因表达的影响

Gapdh 代表内参, M 代表 marker, 1 代表对照组, 2、3、4、5、6 代表实验组, 分别为 10<sup>-11</sup>、10<sup>-10</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-7</sup> mol/L

### 3 讨论

早在 30 年代,发现间歇性使用 PTH 可促进骨形成,但其作用机制仍不完全明确,推断可能与 PTH 对成骨细胞的调节有关。近年来随着研究的不断深入,证实其 1-34 氨基酸肽具有完整的生物活性。且

随着骨质疏松病因、治疗和预防的研究进展,改造后的 rhPTH1-34 促进骨形成的作用更是得到了广泛的关注<sup>[2]</sup>。研究表明骨形成是成骨细胞和破骨细胞在多种因子存在的微环境中共同作用的结果,而多种因子在促进骨形成的过程中发挥着举足轻重的地位。

本实验通过不同浓度的 rhPTH1-34 刺激成骨细胞 24 h 后,结果表明,间歇小剂量给予 rhPTH1-34,可促进成骨细胞增殖及 BMP-7、BMP-9 基因表达的能力,而浓度为 10<sup>-9</sup> mol/L 时,其增殖能力明显升高,BMP-7、BMP-9 基因表达显著增强。通过这一结果可以推测间歇小剂量 rhPTH1-34 可能是通过 BMP-7、BMP-9 基因表达的增强来促进成骨细胞的增殖及分化。

BMPs 家族因具有独特的异位骨诱导活性而被发现并被命名为骨形态发生蛋白。是研究骨形成的主要细胞因子之一。从早期的胚胎发育到器官发育等身体发育的各个阶段都发挥了重要作用<sup>[3]</sup>。BMP-7 又称作骨形成蛋白-1 是骨形态发生蛋白家族中的一员,转移生长因子(TGF-β)超家族成员之一。主要在骨、肾组织中表达,特别在骨发育和骨折愈合过程中高表达<sup>[4]</sup>。BMP-7 具有广泛的生物学功能,其诱导骨形成作用最为突出,在体内可通过膜内成骨和软骨内化骨两种方式诱导成骨,而软骨内化骨为其主要成骨方式<sup>[4]</sup>。最近研究显示将重组人 BMP-7(rhBMP-7)以 Algipore 和 bio-ossblock 为载体,植入动物的下颏骨缺损区。在实验侧发现有大量新骨形成,而在对照侧无新骨形成<sup>[5]</sup>。此试验充分证明,BMP-7 具有较强的诱导成骨作用。Lee 等也发现在骨骼发育和修补及重构过程中,BMP 家族诱导分化间充质细胞进入成骨细胞,提高 MPCs 分化与成骨细胞的成骨作用。而在此过程中 BMP-7 扮演重要角色。二者结论均显示 BMP-7 在促进骨形成中发挥重要作用。本实验得出结论间歇性小剂量 rhPTH1-34 刺激成骨细胞可以促进成骨细胞增殖及成骨细胞 BMP-7 基因的表达,由此可以推断 BMP-7 基因表达的增强可能促进了成骨细胞的增殖及骨形成。那么 BMP-7 是如何发挥作用呢?据文献报道,TGF-β 具有促进有丝分裂,成骨细胞增殖及分化功能。此外 PTH1-34 也可上调体外培养的人成骨细胞的 TGF-β 基因转录的水平。有实验显示,给予体外培养的大鼠成骨细胞间歇和持续性 PTH1-34 刺激 3 个周期(48 h/周期),发现间歇性 PTH1-34 刺激可促进 TGF-β 基因转录,而持续性 PTH1-34 刺

激可抑制 TGF- $\beta$  基因转录。这充分说明, TGF- $\beta$  可能参与了介导 PTH1-34 的促成骨作用。而 BMP-7 作为 TGF- $\beta$  家族成员之一也具有相同功能, 且可能也是通过 PTH1-34 上调 BMP-7 基因转录而促成骨细胞增殖及分化。

BMP-9 也是 BMPs 家族中发挥重要作用的一员, 其在成骨细胞分化中是最具潜能的诱导因子之一。在近期研究中, Ifelm 等<sup>[6,8]</sup> 发现应用重组的腺病毒载体表达嵌合的 BMP-9 基因显示有明显的诱导成骨效应。Dumont 等<sup>[9]</sup> 最近也研究表明人骨髓间充质干细胞体外复合 BMP-9 能有效地在啮齿类诱导脊柱融合。以上实验充分说明 BMP-9 在成骨作用方面发挥着重要作用, 然而 BMP-9 介导的成骨信号转导机制尚不明确, 而且 rhPTH(1-34) 是如何通过增强 BMP-9 的表达来促进骨形成的机制也需要进一步的深入研究。但目前 BMP-9 仍可以做为一种有效的骨形成物质。

综上所述, rhPTH1-34 可以通过多种因子的协同作用, 促进成骨细胞的增殖及分化。而其作用机理需要更过深入的研究。

#### 【参 考 文 献】

[1] Feng Jiao, Liu Yan-hua, Xiao Yun, et al. A novel human parathyroid hormone (1-34) analog for the treatment of

osteoporosis. *Peptides*, 2009, 30 (6):1173.

- [2] Whitfield J, Fmorley P, Willick GE, et al. Comparison of the ability of recombinant human parathyroid hormone rhPTH(1-84) and rhPTH(1-34) to stimulate femoral trabecular bone growth in ovariectomized rats. *Calcified tissue int*, 1997, 60: 26-29.
- [3] Oconnor MB, Umulis D, Othmer HC, et al. Shaping BMP morphogen gradient in the drosophila embryo and pupalwing development, 2006, 133(2):183-193.
- [4] Hai jman A, Dsouza RN, Bronckers AL, et al. BMP-7 (BMP-7) affects mRNA expression of type I, II, X collagen, and matrixglu protein in ossifying long bones *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 1997, 12 (11):18215-18231.
- [5] 陈雅娟, 张彦定. 骨形态发生蛋白的骨诱导活性及其应用研究现状. *中国药物与临床*, 2003, 3(4):277.
- [6] Morgan EF, Mason ZD, Bishop G, et al. Combined effects of recombinant human BMP-7 (rhBMP-7) and parathyroid hormone (1-34) in metaphyseal bone healing. *Cell Physiol*, 2008, 43(6): 1031-1038.
- [7] Varady P, Li JZ, Cunningham M, et al. Morphologic analysis of BMP-9 gene therapy induced osteogenesis. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(9):697-710.
- [8] Helm GA, Alden TD, Beres EJ, et al. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent. *J Neuro Surg*, 2000, 92(suppl):191-196.
- [9] Vonbunob A, Cho KW. Intracellular bmps signaling at ioninvertebrates: pathway or net work. *Devboil*, 2001, 269(7):1-14.

(收稿日期:2010-12-06)

(上接第 473 页)

#### 【参 考 文 献】

[1] Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 2002, 359:2018-2026.

[2] Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S. Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res*, 2007, 22:1-6.

[3] Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*, 2005, 11: 76-81.

[4] Chambers TJ. *J Pathol*, 2000, 192: 4-13.

[5] Martin TJ, Rodan GA. Coupling of bone resorption and formation during bone remodeling. In *Osteoporosis* (Marcus, R. et al., eds), Academic Press, 2001, pp. 361-372.

[6] Mundy GR. Hormonal factors which regulate bone resorption. In

*Handbook of Experimental Pharmacology: Physiology and Pharmacology of Bone* (Vol. 107) (Mundy, G. R. and Martin, T. J., eds), Springer-Verlag, 2003, pp. 215-238.

- [7] Howard GA, et al. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad. Sci U S A*, 1981, 78:3204-3208.
- [8] Bennett CN, Longo KA, Wrig WS, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3324-3329.
- [9] Lecka Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 2002, 143: 2376-2384.

(收稿日期:2011-02-09)