

持续性甲状旁腺素抑制成骨细胞分化的实验研究

田野¹ 徐莹² 付勤¹

中国分类号: R329 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)03-0219-04

摘要:目的 探讨持续性给与甲状旁腺素(PTH)对成骨细胞分化过程的抑制作用。方法 培养MC3T3-E1成骨前体细胞,持续性给与PTH处理,碱性磷酸酶(ALP)染色方法,检测细胞内ALP的分泌;免疫荧光方法检测细胞内Osterix(Osx)蛋白的表达;real-time RT-PCR法和Western blot方法检测细胞内成骨因子基因和蛋白的表达。结果 MC3T3-E1成骨前体细胞具有自发向成骨细胞方向分化的特征,与对照组相比,经PTH持续性处理的细胞ALP染色强度明显降低,Osx免疫荧光强度较弱,细胞内成骨因子基因和蛋白的表达亦显著低于对照组。结论 持续性给与PTH具有抑制成骨细胞分化的作用。

关键词: 持续性; 甲状旁腺素; 成骨细胞; 分化

Experimental study of the inhibitory effect of continuous treatment with parathyroid hormone in osteoblast differentiation TIAN Ye¹, XU Ying², FU Qin¹. ¹Department of Orthopedics; ²Department of Anesthesia, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

Corresponding author: TIAN Ye, Email: tianyecmu2h@sina.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of continuous treatment with parathyroid hormone (PTH) to inhibit the osteoblast differentiation. **Methods** MC3T3-E1 cells were cultured in the presence of continuous PTH treatment. Alkaline phosphatase (ALP) staining was performed to detect the ALP protein. Osterix (Osx) expression was detected with immunofluorescence. Real-time PCR and Western blotting were performed to examine the gene and protein expressions of osteoblastic factors. **Results** MC3T3-E1 cells had the characteristic of the spontaneous osteoblast differentiation. Comparing with control group, ALP staining density decreased dramatically in the continuous PTH treatment group. Osx protein expression also decreased. The gene and protein expressions of osteoblastic factors in the treatment group were also lower than those in the control group. **Conclusion** Continuous PTH treatment inhibits osteoblast differentiation.

Key words: Continuous; Parathyroid hormone; Osteoblast; Differentiation

骨质疏松症是常见的全球性疾病,随着我国人口的老齡化,该病的发生率逐年增加^[1]。目前治疗骨质疏松症的药物较多,甲状旁腺素(PTH)是近几年来开始应用的药物,该药物商品名为 Teriparatide,目前已通过FDA认证,临床用于严重骨质疏松症的治疗^[2,3]。有研究表明,间歇给予PTH可以显著提高骨密度和骨强度;但是,持续性给与PTH却可以导致骨质丢失和骨强度的下降^[4]。本研究拟通过

成骨细胞系的培养,在细胞水平阐明,持续性给与PTH对成骨细胞的作用如何,以为临床应用PTH治疗骨质疏松症,提供一定的帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

MC3T3-E1细胞系(这种细胞为小鼠成骨前体细胞,可分化为成熟成骨细胞,目前广泛应用于有关成骨细胞的实验当中);1~34重组人甲状旁腺素(Sigma公司); α -MEM培养基(Gibco公司);碱性磷酸酶(ALP)染色 one-step 试剂(Pierce公司);RNeasy 试剂盒(Qiagen公司);逆转录试剂盒

作者单位: 1. 中国医科大学附属盛京医院脊柱关节骨科, 沈阳 110004; 2. 中国医科大学附属盛京医院麻醉科, 沈阳 110004

通讯作者: 田野, Tel: 18940258942, Email: tianyecmu2h@sina.com

(Invitrogen 公司); SYBR Green (Applied Biosystems 公司); Bsp 兔抗鼠单克隆抗体 (santa cruz biotechnology 公司); Runx2 兔抗鼠单克隆抗体 (abcam 公司); Osteocalcin (OC) 兔抗鼠单克隆抗体 (santa cruz biotechnology 公司); Osx 兔抗鼠单克隆抗体 (abcam 公司); Colla1 兔抗鼠单克隆抗体 (abcam 公司); β -actin 兔抗鼠单克隆抗体 (Sigma 公司); 羊抗兔单克隆抗体 (二抗) (santa cruz biotechnology 公司)。

1.2 细胞培养和分组

将 MC3T3-E1 细胞培养于 α -MEM 培养液中, 其内加入 10% 胎牛血清、1% 青霉素/庆大霉素溶液、5mM L-Glutamine, 置于 37℃、5% CO₂, 饱和湿度孵育箱中培养, 至细胞 60% ~ 70% 融合时, 开始以 PTH 进行处理。

将细胞分为 2 组: 盐水对照组: 0.9% 生理盐水处理细胞, 给药方式同 PTH; PTH 组: 加入 10^{-8} M PTH 持续处理细胞, 每 24h 细胞换液一次。

1.3 检测指标

1.3.1 碱性磷酸酶染色 彻底吸除细胞培养液, PBS 清洗 3 次, 于室温下以 10% 中性福尔马林固定细胞 20min; 吸除福尔马林, PBS 清洗 2 次, 加入 ALP one-step 染色剂, 于 37℃ 条件下孵育 45min; 吸除染色剂, PBS 清洗 2 次, 室温下自然干燥过夜。

1.3.2 RNA 提取和 Real-time RT-PCR 用 RNeasy 试剂盒提取细胞总 RNA, 按逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA, 然后稀释 3 倍, 取 1 μ l 稀释后的 cDNA 进行 Real-time PCR 反应。特异性小鼠引物序列如下: ALP: Sense: TGACCTTCTCTCCTCCATCC, Antisense: CTTCTCTGGGAGTCTCATCCT; Runx2: Sense: GGAATGATGAGAACTA, Antisense: ACCGTCCACTGTCACTTT; OC: Sense: TGCTTGTGACGAGCTATCAG, Antisense: GAGGACAGGGAGGATCAAGT; Osx: Sense: TGGCCATGCTGACTGCAGCC, Antisense: TGGGTAGGCGTCCCCCATGG; Bsp: Sense: CAGAAGTGGATGAAAACGAG, Antisense: CGGTGGCCAGGTGGTCCCAT; Colla1: Sense: GCATGGCCAAGAAGACATCC, Antisense: CCTCGGGTTTCCACGTCTC; β -actin: Sense: AGATGTGGATCAGCAAGCAG, Antisense: GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA。反应条件为: 95℃ 预变性 15min 后, 95℃ 变性 20s, 58℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 45 个循环, 于 72℃ 延伸阶段检测荧光产物, 生成扩增曲线。在同一次反应中, 各组均设 3 个平行重复。以 β -actin 为内参基因, 通过 RotorGene 分析软件进行定量分析。

万方数据

1.3.3 免疫荧光检测 彻底吸除细胞培养液, PBS 清洗 2 次, 室温下 4% 福尔马林固定 15min, 0.1% TritonX-100 通透细胞膜, 0.05% Tween 20 清洗细胞 3 次, 2.5% BSA 封闭 60min, 加入兔抗鼠单克隆抗体 (1:100), 于 4℃ 孵育过夜, 0.05% Tween 20 清洗细胞 3 次, 加入羊抗兔抗体室温下孵育 60min, 用 vectarmount 液固定, 荧光显微镜观察照相。

1.3.4 Western blot 以 Golden lysis buffer 液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 每泳道上样 40 μ g, 经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 转至 PVDF 膜。再加入一抗 (1:1000) 4℃ 孵育过夜, 洗膜后, 加入二抗 (1:3000) 室温下孵育 1h。以 β -actin 为内参基因, Supersignal west Pico 试剂孵育 10min, 曝光 30s, 照相并分析。

1.4 统计学处理

Real-time RT-PCR 结果全部数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析, 各组间比较采用 *t* 检验; 当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 持续性 PTH 处理对 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶 (ALP) 染色强度的影响

自持续性 PTH 处理后 2 日起, 隔日一次进行 ALP 染色。两组细胞 ALP 染色强度均随时间逐渐增强, 表明 MC3T3-E1 细胞具有自发向成骨细胞分化的特点。但是, 我们可以看到, PTH 组细胞的 ALP 染色强度增长缓慢; 而且更重要的是, 持续性 PTH 处理分别于第 2、4 和 6 日, 明显降低了细胞内 ALP 染色的强度, 表明细胞内碱性磷酸酶的合成作用明显受到抑制作用 (图 1)。

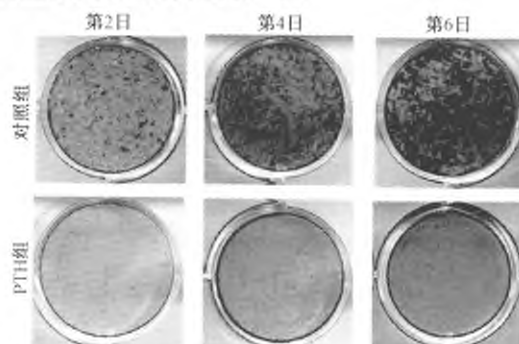


图1 持续性 PTH 对细胞 ALP 染色强度的影响

2.2 持续性 PTH 处理对 MC3T3-E1 细胞内各成骨因子基因表达的影响

与 ALP 染色结果一致, Real-time RT-PCR 结果

显示,对照组细胞内各成骨因子基因表达随时间逐渐增强,表明 MC3T3-E1 细胞具有自发向成骨细胞分化的特点。经持续性 PTH 处理后,细胞内的各个

成骨因子基因表达被抑制。分别于 2、4 和 6 日,两组细胞基因表达差异明显,经统计学分析,有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 2)。

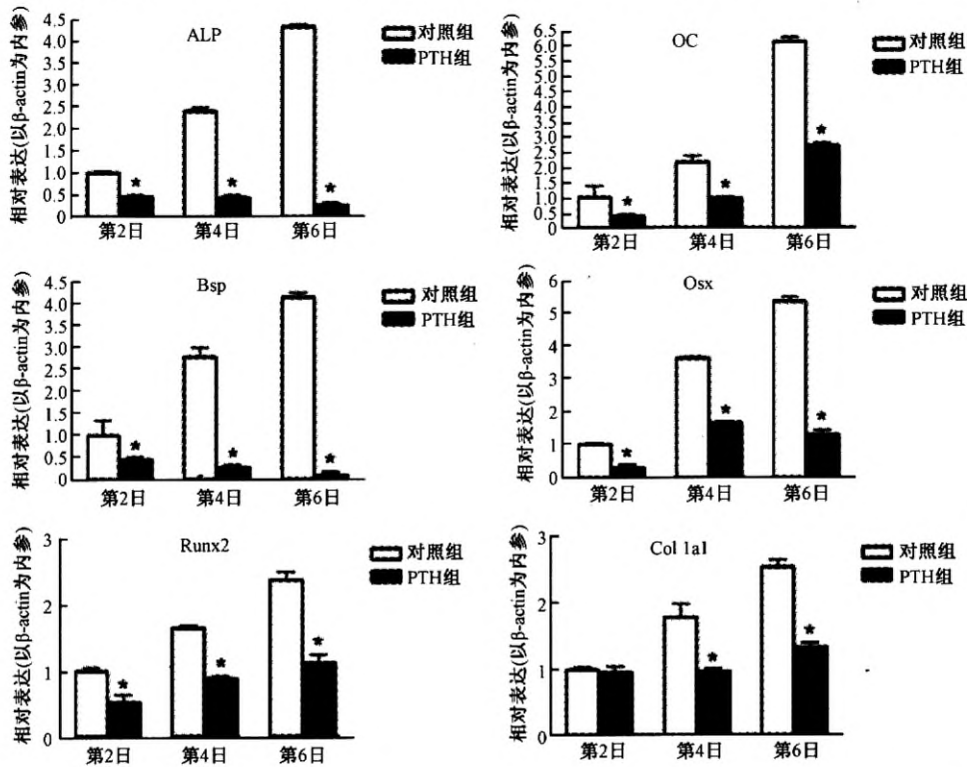


图 2 持续性 PTH 对细胞内成骨因子 mRNA 表达的影响

注: * 代表与对照组相比有统计学意义, $P < 0.05$ 。

2.3 持续性 PTH 处理对 MC3T3-E1 细胞内成骨因子蛋白表达的影响

免疫荧光检测显示 PTH 组 Osx 蛋白表达明显弱于对照组; Westernblot 检测结果表明 PTH 组 OC、Bsp、Runx2 和 Col1a1 的蛋白表达明显低于对照组 (图 3、图 4)。

3 讨论

甲状旁腺素近年来开始应用于临床治疗骨质疏松症的患者,而人类甲状旁腺素 (hPTH) 是含有 84 个氨基酸的多肽蛋白,具有维持细胞外液内环境,调节血钙、血磷等的重要作用^[5-7]。目前通过 FDA 认证,用于治疗具有高危骨折因素的骨质疏松症病人的药物,为其人工合成体 PTH (1~34)。PTH (1~34) 含有 34 个 PTH N 端氨基酸序列相似分子片段,这一部分能够与 PTH 受体结合而发挥相同的生物学作用,本研究即以 PTH (1~34) 为研究药物,探索其对成骨细胞的作用。

目前有关 PTH 对于成骨细胞分化的作用,还存万方数据

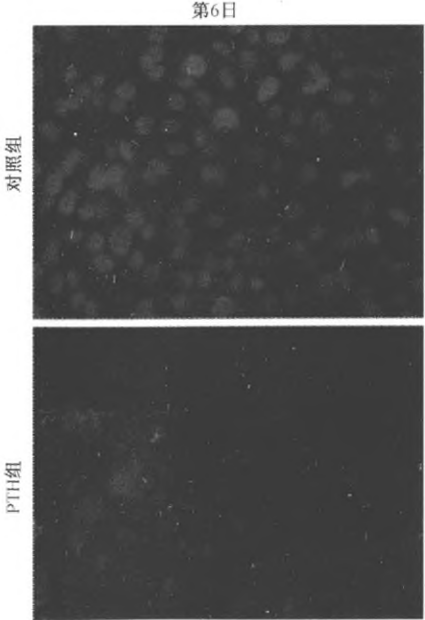


图 3 持续性 PTH 对细胞内 Osx 蛋白表达的影响

在着一定的争议。有研究表明,间歇给与 PTH 能够显著提高骨密度和骨强度,并能够明显促进成骨细

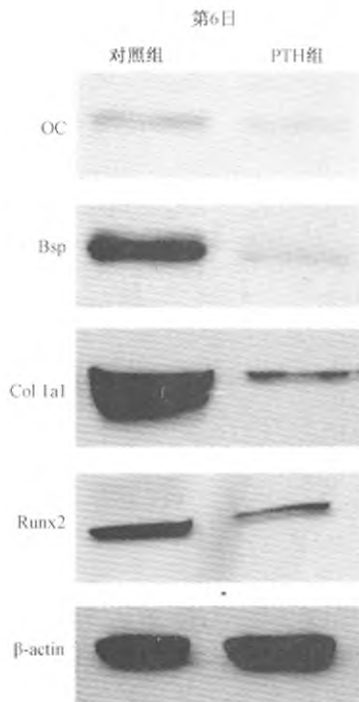


图 4 持续性 PTH 对细胞内成骨因子蛋白表达的影响

胞的分化^[8]。但是在体实验表明,持续性的 PTH 治疗却可以导致骨的分解代谢,造成骨量丢失,骨密度和骨强度的下降。Wang 等就持续性 PTH 和短暂时 PTH 对成骨细胞的作用进行了比较,发现二者的作用存在着一定的区别^[9]。Horwitz 等证实,人体长期注射 PTH 后,机体重新启动了骨吸收的过程,并出现成骨细胞成熟停滞的现象^[10]。而 Yang 等则发现,持续性的 PTH 处理,能够促进大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向的分化^[11]。

我们的研究表明,持续性 PTH 处理后的成骨细胞内碱性磷酸酶的合成明显降低,而后者是细胞成骨作用的重要标志性蛋白。其他诸如 OC、Bsp 和 Col1a1 等因子则是成骨细胞进一步成熟和矿化作用的重要因子^[12],在持续性 PTH 作用下,这些因子的表达都在一定程度上受到抑制;而且,细胞成骨作用在转录水平的两个重要调控基因^[13,14],Runx2 和 Osx 的 mRNA 和蛋白的表达,也由于持续性 PTH 的作用而降低。以上结果都表明,持续性 PTH 处理抑制了成骨细胞的分化作用。

综上所述,成骨细胞经持续性给与 PTH 后,其成骨因子无论在 mRNA 或是蛋白水平的表达,都出现了明显的降低,其成骨分化作用明显受到抑制。本研究在细胞水平阐明持续性 PTH 的作用效果,但

此种效果的具体细胞分子学作用机制,还有待于进一步的研究。

【参考文献】

- [1] Guida G, Iolascon G, Gimigliano F, et al. Development of knowledge about osteoporosis in the world of orthopedics and traumatology. *Aging Clin Exp Res*, 2011, 23(2 Suppl): 8-9.
- [2] Resmini G, Iolascon G. New insights into the role of teriparatide. *Aging Clin Exp Res*, 2011, 23(2 Suppl): 30-32.
- [3] Ito M. Diagnostic imaging of bone metabolism diseases. Diagnostic imaging of treatment in osteoporosis: PTH. *Clin Calcium*, 2011, 21(7): 1067-1073.
- [4] Ejersted C, Andreassen TT, Oxlund H, et al. Human parathyroid hormone (1-34) and (1-84) increase the mechanical strength and thickness of cortical bone in rats. *J Bone Miner Res*, 1993, 8(9): 1097-1101.
- [5] Mosekilde L, Tornvig L, Thomsen JS, et al. Parathyroid hormone and growth hormone have additive or synergetic effect when used as intervention treatment in ovariectomized rats with established osteopenia. *Bone*, 2000, 26(6): 643-651.
- [6] Koh AJ, Demiralp B, Neiva KG, et al. Cells of the osteoclast lineage as mediators of the anabolic actions of parathyroid hormone in bone. *Endocrinology*, 2005, 146(11): 4584-4596.
- [7] Samadfam R, Xia Q, Miao D, et al. Exogenous PTH and endogenous 1, 25-dihydroxyvitamin D are complementary in inducing an anabolic effect on bone. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(8): 1257-1266.
- [8] Hock JM, Gera I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*, 1992, 7(1): 65-72.
- [9] Wang YH, Liu Y, Buhl K, et al. Comparison of the action of transient and continuous PTH on primary osteoblast cultures expressing differentiation stage-specific GFP. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(1): 5-14.
- [10] Horwitz MJ, Tedesco MB, Sereika SM, et al. A 7-day continuous infusion of PTH or PTHrP suppresses bone formation and uncouples bone turnover. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(9): 2287-2297.
- [11] Yang C, Frei H, Burt HM, et al. Effects of continuous and pulsatile PTH treatments on rat bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(4): 791-796.
- [12] Day TF, Yang Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90 Suppl 1: 19-24.
- [13] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29.
- [14] Nishio Y, Dong Y, Paris M, et al. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene*, 2006, 372: 62-70.

(收稿日期: 2011-10-08)

作者: 田野, 徐莹, 付勤, TIAN Ye, XU Ying, FU Qin
作者单位: 田野, 付勤, TIAN Ye, FU Qin(中国医科大学附属盛京医院脊柱关节骨科, 沈阳, 110004), 徐莹, XU Ying(中国医科大学附属盛京医院麻醉科, 沈阳, 110004)
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis
年, 卷(期): 2012, 18(3)

本文读者也读过(10条)

1. 潘凌, 游利, 陈琳, 陈瑾瑜, 彭永德, PAN Ling, YOU Li, CHEN Lin, CHEN Jin-yu, PENG Yong-de 高胆固醇对成骨细胞MG63增殖的影响[期刊论文]-中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志2012, 5(2)
2. 胡雪, HU Xue 电话回访式健康教育在骨科出院患者工作中的体会[期刊论文]-中国骨质疏松杂志2012, 18(6)
3. 何银锋, 赵理平, 赵国阳, 张增利, 林华, 徐又佳, HE Yin-feng, ZHAO Li-ping, ZHAO Guo-yang, ZHANG Zeng-li, LIN Hua, XU You-jia 高铁环境下成骨细胞增殖和凋亡与氧化应激的关系[期刊论文]-中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志2012, 5(2)
4. 李涛, 张平, 刘冰阳, 王志宏, 李璇, 张浩 甲状腺术后症状性低钙血症与甲状旁腺激素及血钙关系的探讨[期刊论文]-临床外科杂志2012, 20(7)
5. 刘明, 潘薇, 陈德才, LIU Ming, PAN Wei, CHEN De-cai 甲状旁腺激素治疗骨质疏松症的研究进展[期刊论文]-中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志2012, 5(2)
6. 丁文鸽, 刘志伟, DING Wenge, LIU Zhiwei 脊髓损伤后骨质疏松小鼠的骨折愈合[期刊论文]-中国骨质疏松杂志2012, 18(6)
7. 范璐, 林华, 陈新, 朱秀芬, 钱程, 黄淑纾 跌倒和髋部骨密度对绝经后妇女骨折风险的影响[期刊论文]-中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志2011, 04(4)
8. 黄晓斌, 仲蕾蕾, HUANG Xiaobin, ZHONG Leilei 钠氢转运蛋白2敲出小鼠破骨细胞分化研究[期刊论文]-中国骨质疏松杂志2012, 18(5)
9. 杨少华, 唐智生, 刘光俊, 叶化, 孔繁荣, 郭昆义, 罗美芳 腰椎间盘突出症与腰椎骨密度的相关性研究[期刊论文]-中国骨质疏松杂志2012, 18(6)
10. 高雅滨, 王彬, GAO Yabin, WANG Bin 骨质疏松症患者腰椎平均BMD与腰椎椎体骨折相关性研究[期刊论文]-中国骨质疏松杂志2012, 18(6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201203007.aspx