

# 成骨生长肽( OGP<sub>10-14</sub> )在不同微重力条件下生物学活性的研究

刘俊丽 周学慧 张军 司少艳 宋淑军 冯凯 景青萍 张建中

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108( 2012 )07-0596-04

**摘要:** 目的 成骨生长肽( osteogenic growth peptide, OGP<sub>10-14</sub> )在不同重力条件下对成骨细胞增殖、分化的影响。方法 利用 MTT 实验和 alkaline phosphatase( ALP )实验分别测定 OGP<sub>10-14</sub> 在不同重力条件下对成骨细胞的增殖、分化效应。结果 在正常条件下,  $10^{-12}$  mol/L 及  $10^{-8}$  mol/L OGP<sub>10-14</sub> 能够显著促进成骨细胞的增殖(  $P < 0.05$  ), 最大效应浓度是  $10^{-12}$  mol/L, 而且  $10^{-12}$  mol/L 的 OGP<sub>10-14</sub> 显著促进成骨细胞的 ALP 活性。在微重力条件下,  $10^{-8}$  mol/L OGP<sub>10-14</sub> 诱导 48 h 后, 促进细胞增殖作用最强。结论 在不同重力条件下,  $10^{-8}$  mol/L OGP<sub>10-14</sub> 对成骨细胞的增殖与分化具有促进作用。在正常条件下,  $10^{-12}$  mol/L 的 OGP<sub>10-14</sub> 显著促进成骨细胞的 ALP 活性。

**关键词:** 成骨生长肽; 不同微重力条件; 成骨细胞; 生物学活性

**Biological activity of osteogenic growth peptide ( OGP<sub>10-14</sub> ) under different microgravities** LIU

Junli, ZHOU Xuehui, ZHANG Jun, et al. Department of Pathology and Experimental Medicine, 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China

Corresponding author: ZHANG Jianzhong, Email: zhangjz55@sina.com

**Abstract: Objective** To explore the effect of osteogenic growth peptide ( OGP<sub>10-14</sub> ) on the proliferation and differentiation of osteoblasts under different microgravities. **Methods** The effects of OGP<sub>10-14</sub> on the proliferation and differentiation of osteoblasts were measured using MTT and ALP test under different microgravities. **Results** The proliferation of osteoblasts was effectively promoted by OGP<sub>10-14</sub> at the concentrations of  $10^{-8}$  mol / L and  $10^{-12}$  mol / L (  $p < 0.05$  ) in normal environment, and the maximum effective concentration was  $10^{-12}$  mol / L. OGP<sub>10-14</sub> at the concentration of  $10^{-12}$  mol/L could significantly promote ALP activity. The proliferation of osteoblasts was effectively promoted by OGP<sub>10-14</sub> at the concentration of  $10^{-8}$  mol/L after induced in microgravitic environment for 48 hours. **Conclusion** OGP<sub>10-14</sub> at the concentration of  $10^{-8}$  mol/L can promote the proliferation and differentiation under different microgravity environment. OGP<sub>10-14</sub> at concentration of  $10^{-12}$  mol/L can significantly promote ALP activity under the normal condition.

**Key words:** OGP<sub>10-14</sub>; Different microgravity; Osteoblasts; Bioactivity

微重力条件下成骨细胞分化功能降低,进而直接导致成骨细胞数量减少、活性降低,最终引起骨的丢失,但是其具体机制尚不完全清楚<sup>[1]</sup>。成骨生长肽( Osteogenic growth peptide, OGP )是一种多肽类生长因子,其中 OGP<sub>10-14</sub> 具有与全长相同的生理活性,在体外实验中能促进成骨细胞样细胞增殖,提

高碱性磷酸酶( alkaline phosphatase, ALP )的活性<sup>[2]</sup>。但由于不同文献报道的 OGP<sub>10-14</sub> 在体外促进成骨细胞样细胞增殖分化的效应浓度不同<sup>[3,4,5]</sup>,因此在本实验中需参照文献筛选最佳效应浓度,利用 MTT 实验和 ALP 实验分别测定 OGP<sub>10-14</sub> 在不同重力条件下对成骨细胞的增殖、分化的效应,为进一步研究模拟微重力条件下抑制骨丢失的药物筛选提供条件。

基金项目: 总装后勤部课题资助项目

作者单位: 100101 北京,解放军第 306 医院

通讯作者: 张军, Email: zhangjz55@sina.com

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

小鼠前成骨细胞系 MC3T3 - E1 为美国 ATCC 公司产品,本室保存。DMEM 培养基和优质胎牛血清购自 Gibco 公司,二甲基亚砷 (Dimethylsulphoxide, DMSO),胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,MTT 购自美国 Genview 公司,青霉素、链霉素购自华北制药公司,其他试剂均为市售分析纯,OGP<sub>10-14</sub> (H-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly-OH) 由上海生物工程化学合成。

本实验所用仪器为 HERAcell150 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (贺力氏公司,德国),IMT-2 型倒置显微镜 (奥林巴斯公司,日本),550 型酶联免疫检测仪 (BIORAD 公司,美国);耗材为培养皿,96 孔培养板 (Constar 公司,美国)等。

## 1.2 方法

### 1.2.1 小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞的常规培养与传代

取冻存的小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞进行复苏,用含 100 mL/L 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素、100U/mL 链霉素的 DMEM 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件的恒温培养箱内培养,根据生长情况定期传代,采用第 3 次传代后 24h 的细胞进行实验。

### 1.2.2 OGP<sub>10-14</sub> 对成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖及 ALP 活性的影响

将第 3 次传代的成骨细胞 MC3T3-E1 分为 6 组,实验组: 10<sup>-5</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-12</sup> mol/L OGP 组,阴性对照组仅加入含 PBS 的 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。将传代细胞按每孔 4000 个/100 μl 分别接种于 3 个 96 孔细胞培养板中,按上述分组方案分为 6 组,每组设 8 个复孔。24 h 细胞贴壁后换液,分别加入上述相应药物置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件恒温培养箱内培养。在 2、3、4 d 三个时间段,分别在所需检测的培养孔内每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,37 °C 继续孵育 4 h,终止培养,小心吸取孔内培养上清液,每孔加入 100 μL 二甲基亚砷 DMSO,振荡 10 min。选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值 D490。

将上述吸取的培养上清液按 ALP 试剂使用说明,处理收集样品,在分光光度计上测定各孔吸光度值,计算细胞培养液中 ALP 活性。

### 1.2.3 SMG 条件下 MC3T3-E1 细胞的培养

本实验采用双向多样本微重力效应模拟技术平台 (以下称回转器),建立了模拟微重力成骨细胞 MC3T3-E1 的培养模型。先将玻片置于六孔板

中,以 2 × 10<sup>5</sup> 个/玻片细胞密度接种玻片,每个玻片 0.6 ml 细胞悬液,将六孔板置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 4h,每孔加 10% FBS 的 DMEM 培养基 2 ml 培养 24 h;然后将容器中先加入培养基,浸没支架,用镊子将玻片固定在支架上,每个容器 4 个玻片。补充细胞培养液充满整个容器,用 5 ml 注射器排净气泡,封口膜密封容器口。最后将实验组容器安置在回转位置,设定转速为 30 r/min,对照组置于 37°C 培养箱内培养。

### 1.2.4 统计学处理

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS10.0 软件,录入各组 D (490) 值及 ALP 活性值,对计量数据进行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 OGP<sub>10-14</sub> 对成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

为了明确 10<sup>-5</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-12</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 在正常条件下对成骨细胞增殖的影响,分别将成骨细胞 MC3T3-E1 在水平条件下培养 48 h,72 h,96 h,MTT 检测结果发现,OGP<sub>10-14</sub> 诱导 3d 后,不同浓度 OGP<sub>10-14</sub> 组细胞的吸光度值均高于对照组,当 OGP<sub>10-14</sub> 浓度在 10<sup>-8</sup> mol/L 时,能显著促进细胞的增殖活动 ( $P < 0.05$ );在各实验组中,OGP<sub>10-14</sub> 诱导 4d 后,当成骨生长肽浓度为 10<sup>-12</sup> mol/L 时,促进细胞增殖作用最强,与其他实验组比较,差异具有显著性意义 ( $P < 0.01$ ),表明 10<sup>-8</sup> mol/L,10<sup>-12</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 对成骨细胞的增殖具有促进作用 (表 1)。

表 1 不同浓度成骨生长肽对 MC3T3-E1 增殖的影响 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

药物浓度 (mol·L <sup>-1</sup> )	2 d	3 d	4 d
10 <sup>-5</sup>	0.39 ± 0.05	0.48 ± 0.04	0.72 ± 0.12
10 <sup>-8</sup>	0.39 ± 0.03	0.62 ± 0.12 *	0.73 ± 0.09 *
10 <sup>-9</sup>	0.39 ± 0.04	0.50 ± 0.08	0.70 ± 0.10
10 <sup>-11</sup>	0.39 ± 0.06	0.53 ± 0.06	0.67 ± 0.08
10 <sup>-12</sup>	0.45 ± 0.09	0.55 ± 0.14	0.81 ± 0.06 **
对照	0.39 ± 0.03	0.45 ± 0.07	0.68 ± 0.05

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 2.2 OGP<sub>10-14</sub> 对成骨细胞 MC3T3-E1 ALP 活性的影响

为了明确 10<sup>-5</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-12</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 在正常条件下对成骨细胞分化的影响,加入不同浓度的 OGP<sub>10-14</sub> 作用于 MC3T3-E1,在培养 2 d 后,ALP 活性的检测结果表明 10<sup>-12</sup> mol/L,10<sup>-8</sup> mol/L 浓度,OGP<sub>10-14</sub> 的 ALP 活性显著高于对照组 ( $P <$

0.05);3 d后当 OGP<sub>10-14</sub>浓度为 10<sup>-12</sup> mol/L 时,细胞内 ALP 活性最高,与其他实验组及对照组相比,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ),但培养 4 d 后各实验组与对照组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 不同浓度成骨生长肽作用于 MC3T3-E1 后 ALP 的变化( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

药物浓度(mol · L <sup>-1</sup> )	2 d	3 d	4 d
10 <sup>-5</sup>	0.03 ± 0.01	0.017 ± 0.00	0.03 ± 0.01
10 <sup>-8</sup>	0.04 ± 0.02 **	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02
10 <sup>-9</sup>	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.04	0.02 ± 0.00
10 <sup>-11</sup>	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.024 ± 0.01
10 <sup>-12</sup>	0.035 ± 0.00 *	0.04 ± 0.02 **	0.029 ± 0.01
对照	0.02 ± 0.01	0.029 ± 0.01	0.03 ± 0.01

与对照组比较, \*\* $P < 0.01$

### 2.3 SMG 条件下 OGP<sub>10-14</sub> 对成骨细胞系 MC3T3-E1 增殖的影响

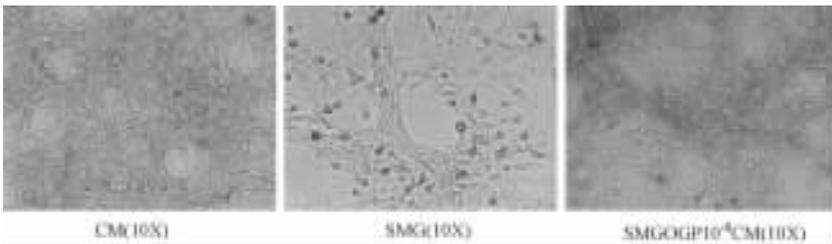


图 1 SMG 条件下 OGP<sub>10-14</sub> 作用于成骨细胞系 MC3T3-E1 培养 48h 后形态学观察

表 3 SMG 条件下,不同浓度 OGP<sub>10-14</sub> 对 MC3T3-E1 增殖的影响( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

	24 h( $n = 4$ ) $\bar{x} \pm d$	48 h( $n = 4$ ) $\bar{x} \pm d$	72 h( $n = 4$ ) $\bar{x} \pm d$
SMG	1.058 ± 0.18	0.986 ± 0.170	0.405 ± 0.104 **
SMGOGP10 <sup>-8</sup>	1.128 ± 0.199	1.76 ± 0.333 *	1.218 ± 0.328 *
CM	1.080 ± 0.294	1.184 ± 0.240	0.865 ± 0.174

与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

本实验首先采用 MTT 法观察 10<sup>-5</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-12</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 在正常条件下对成骨细胞增殖的影响,结果发现 10<sup>-12</sup> mol/L 及 10<sup>-8</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 能够显著促进成骨细胞的增殖,但最佳效应浓度与以往报道的结果不同,可能是由于不同的实验室所采用的细胞及具体的实验条件不同所致,在今后的研究中,有待于从 RNA 水平,蛋白质水平及整体水平进行进一步验证。

本实验进一步观察了 OGP<sub>10-14</sub> 对成骨细胞 MC3T3-E1 ALP 活性的影响,结果发现尽管 10<sup>-12</sup> mol/L 及 10<sup>-8</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 能够显著促进成骨细胞

为了明确 SMG 条件下 OGP<sub>10-14</sub> 对成骨细胞系 MC3T3-E1 增殖的影响,加入 10<sup>-8</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub>, 10<sup>-12</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 作用于成骨细胞系 MC3T3-E1, 然后分别将成骨细胞 MC3T3-E1 在水平条件, SMG 条件下培养 24 h, 48 h, 72 h。SMG 条件下培养 48 h, 倒置显微镜观察发现 CM 组, 10<sup>-8</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 处理组 MC3T3-E1 细胞为长梭形, 生长密, 胞体丰满, 胞突细长, 伸展充分; 而 SMG 组细胞生长较稀, 胞体变小, 胞突变短, 伸展不够充分。MTT 实验表明, SMG 条件下, 成骨细胞 MC3T3-E1 增殖受到抑制, OGP<sub>10-14</sub> 诱导 48 h、72 h 后, 10<sup>-8</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 组, 水平对照组细胞的吸光度值均显著高于 SMG 组( $P < 0.01$ ), 但 10<sup>-12</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 吸光度值于 SMG 组相比, 差异不具有显著性。在各实验组中, 10<sup>-8</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 诱导 48 h 后, 促进细胞增殖作用最强。

的分化, 但促进成骨细胞的增殖与分化的时间是不同的, 因为处于增殖旺盛的细胞, 其分化能力大大降低, 这一点与理论相吻合。

本实验根据在正常条件下筛选出的最佳效应浓度进行了模拟微重力条件下对成骨细胞增殖检测, 结果发现 10<sup>-12</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 对成骨细胞的增殖与分化均无显著的促进作用, 而 10<sup>-8</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 能够显著促进成骨细胞的增殖, 但对细胞的分化无显著的促进作用。据文献报道, OGP 是一种多肽类生长因子, 增高细胞 I 型胶原 mRNA 和骨钙素 mRNA 的表达, 增加细胞胶原合成、分泌和钙盐沉积, 提高骨量, 增强骨密度, 促进成骨<sup>[14]</sup>。本实验结果表明 10<sup>-8</sup> mol/L OGP<sub>10-14</sub> 无论在正常条件及微重力条件下均能显著促进成骨细胞系 MC3T3-E1 的增殖, 对 OGP<sub>10-14</sub> 能够促进成骨细胞样细胞增殖的功能是一个有力的佐证。

OGP 通过何种信号通路调节成骨细胞样细胞增殖, 目前尚无明确的确结论, 有研究表明, OGP 以剂量依赖和时间依赖的方式激活 MAPK 信号通路,

从而可能调节 cbfa1 的表达。Cbfa1 是成骨细胞特异性转录因子,属于 runt/Cbfa 转录因子家族,它与成骨细胞特异顺式作用元件结合,激活成骨细胞基因表达,是骨钙素、骨桥素和 I 型胶原等基因表达的重要和直接的调节因子,对于成骨细胞的分化成熟和成骨具有调控功能<sup>[15]</sup>。研究证实 cbfa1 的活性直接受有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路的调节实验发现,OGP 组和 G38I 组细胞 cbfa1 mRNA 表达水平升高,说明药物促进了成骨细胞 cbfa1 的表达,进而调节下游基因的表达和活性,促进成骨<sup>[16]</sup>。

综上所述,本实验的研究结果为进一步研究模拟微重力条件下抑制骨丢失的药物筛选提供了必要的条件。

#### 【参 考 文 献】

[ 1 ] Roberts WE, Fielder PJ, Rosenoer LML, et al. Nuclear morphometric analysis of osteoblast precursor cells in periodontal ligament, SL23 rats J. Am J Physiol, 1987, 252: R247-R251.  
[ 2 ] Chen YC, Bab I, Mansur N, et al. Structure—bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide OGP. J Pept

Res, 2000, 56: 147-156.

- [ 3 ] 丁晓颖,邱明才,彭永德,等. 成骨生长肽 10~14 及其结构类似物 G48A 对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响. 上海医学, 2008, 31(6): 430-433.  
[ 4 ] 李群,王智兴,朱亚萍. 成骨生长肽对新生大鼠颅盖骨成骨细胞样细胞影响的生化分析. 上海实验动物学, 2000, 20(2): 76-78.  
[ 5 ] 费琴明,崔大敷,陈统一,等. 合成成骨生长肽的体内外成骨活性. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(4): 415-420.  
[ 6 ] Nicole M Moore, Nancy J Lin. The use of immobilized osteogenic growth peptide on gradient substrates synthesized via click chemistry to enhance MC3T3-E1 osteoblast proliferation. Biomaterials, 2010, 31(7): 1604-1611.  
[ 7 ] Chen ZX, Chang M, Peng YL, et al. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. Regul Pept, 2007, 142(1-2): 16-23.  
[ 8 ] Chen Z, Chang M, Peng Y, et al. The small peptide OGP(10-14) acts through Src kinases and RhoA pathways in Mo-7e cells: morphologic and immunologic evaluation. Protein Pept Lett, 2009, 16(9): 1074-1080.

(收稿日期: 2011-09-07)

# 成骨生长肽(OGP10-14)在不同微重力条件下生物学活性的研究

作者: [刘俊丽](#), [周学慧](#), [张军](#), [司少艳](#), [宋淑军](#), [冯凯](#), [景青萍](#), [张建中](#)  
作者单位: [解放军第306医院, 北京, 100101](#)  
刊名: [中国骨质疏松杂志](#)   
英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)  
年, 卷(期): 2012, 18(7)

## 参考文献(8条)

1. [Roberts WE;Fielder PJ;Rosenoer LML Nuclear morphometric analysis of osteoblast precursor cells in periodontal ligament, SL23 rats J 1987](#)
2. [Chen YC;Bab I;Mansur N Structure-bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth pepfide OGP 2000](#)
3. [丁晓颖;邱明才;彭永德 成骨生长肽10~14及其结构类似物G48A对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响 2008\(06\)](#)
4. [李群;王智兴;朱亚萍 成骨生长肽对新生大鼠颅盖骨成骨细胞样细胞影响的生化分析 2000\(02\)](#)
5. [费琴明;崔大敷;陈统一 合成成骨生长肽的体内外成骨活性 2001\(04\)](#)
6. [Nicole M Moore;Nancy J Lin The use of immobilized osteogenic growth peptide on gradient substrates synthesized via click chemistry to enhance MC3T3-E1 osteoblast proliferation 2010\(07\)](#)
7. [Chen ZX;Chang M;Peng YL Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide OGP\(10-14\)\]acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes 2007\(1-2\)](#)
8. [Chen Z;Chang M;Peng Y The small peptide OGP\(10-14\)acts through Src kinases and RhoA pathways in Mo-7e cells:morphologic and immunologic evaluation 2009\(09\)](#)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201207002.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201207002.aspx)