

· 论 著 ·

# 不同剂量的甲状旁腺素对成骨细胞分化的不同作用的实验研究

田野<sup>1\*</sup> 徐莹<sup>2</sup> 付勤<sup>1</sup>

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

中图分类号: R329 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 06-0614-05

**摘要:** 目的 探讨不同剂量的甲状旁腺素(PTH)对成骨细胞分化过程的影响。方法 培养 MC3T3-E1 成骨前体细胞,给与不同浓度的 PTH 处理细胞,real-time PCR 方法,检测细胞内成骨因子基因 mRNA 的表达;碱性磷酸酶(ALP)染色方法,检测细胞内 ALP 的分泌;Alizarin Red 染色方法,检测细胞内成骨钙化作用。结果 1 nmol/L 浓度的 PTH 和 10 nmol/L 浓度的 PTH 都具有明显的促进成骨细胞分化的作用,以 10 nmol/L 浓度的 PTH 的作用更强。100 nmol/L 较高浓度的 PTH 没有明显促进成骨细胞分化的作用。结论 不同剂量的 PTH 对成骨细胞的分化作用,具有不同的影响。

**关键词:** 甲状旁腺素;成骨细胞;分化;剂量

## Effect of the different dose of parathyroid hormone on osteoblast differentiation: an experimental study

TIAN Ye<sup>1</sup>, XU Ying<sup>2</sup>, FU Qin<sup>1</sup>

1. Department of Orthopedics, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

2. Department of Anesthesiology, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

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

**Abstract: Objective** To investigate the effect of the different dose of parathyroid hormone (PTH) on osteoblast differentiation.

**Methods** MC3T3-E1 cells were cultured. Different dose of PTH was added to the medium. The mRNA expression of osteoblastic markers was determined using real-time PCR. The secretion of alkaline phosphatase (ALP) in the cells was detected using ALP staining method. The mineralization was detected using Alizarin red staining. **Results** Compared with the control, both 1nM PTH and 10nM PTH could significantly stimulate the osteoblast differentiation, and the effect of 10 nmol/L PTH was much stronger. But no significant stimulating effect of 100nmol/L PTH on the osteoblast differentiation was observed. **Conclusion**

Different dose of parathyroid hormone exerts different effect on the osteoblast differentiation.

**Key words:** Parathyroid hormone; Osteoblast; Differentiation; Dose

人类甲状旁腺素(PTH)是含有84个氨基酸的多肽蛋白,具有调节血钙、血磷,维持细胞外液内环境的作用。其人工合成体PTH1-34,为含有34个PTH N端氨基酸序列的相似分子片段,PTH1-34能够与PTH受体结合而发挥相同的生物学作用<sup>[1]</sup>。研究表明,高剂量的给与PTH能够抑制骨的形成,而低剂量的间断给与则更有利于骨的形成。这种合成作用包括改善骨小梁微细结构,并通过刺激松质

骨和皮质骨中的新骨生成,增加骨量,提高骨强度,并促进骨折愈合<sup>[2]</sup>。经证实PTH和PTHrP可防止间充质干细胞过度消耗,促进骨痂形成,并使之扩大。由于PTH以软骨基因和成骨前体细胞为信号目标,并且两种细胞在骨折愈合中发挥重要的作用,因此PTH本身起着促进骨折愈合的作用<sup>[3,4]</sup>。

有研究表明,虽然间断给与PTH可以明显促进成骨细胞的成熟分化,但是这种作用的大小却与PTH的剂量有很大相关性的<sup>[5]</sup>。目前证明,在PTH作用于成骨细胞的过程中,其激活了多条信号通路,因此PTH发挥生理作用的机制是呈网状结构的;伴

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2013021052)

\* 通讯作者: 田野, Email: tianyecmu2h@sina.com

随给与剂量的不同,各条信号通路所发挥的生理作用也不尽相同,这使得不同剂量的 PTH 促进成骨细胞分化的作用强弱不等<sup>[6]</sup>。

有研究表明,大剂量的 PTH 对成骨细胞分化具有明显的抑制作用,只有较低剂量的 PTH 才具有促进成骨细胞分化的作用,但是具体的作用浓度还不完全清楚<sup>[7]</sup>。本研究利用 MC3T3-E1 离体细胞系,经间断给与不同浓度 PTH 处理后,利用 RT-PCR、ALP 染色和 Alizarin Red 染色等方法,检测 PTH 是否具有促进成骨细胞分化的作用,及其不同剂量的 PTH 对成骨细胞分化的不同影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

MC3T3-E1 细胞系 (Sigma-Aldrich Co. LLC; 99072810, 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,美国); $\alpha$ -MEM 培养基 (Gibco 公司,美国);碱性磷酸酶 (ALP) 染色 one-step 试剂 (Pierce 公司,美国);Alizarin Red 染色剂 (北京索莱宝科技有限公司,中国);RNeasy 试剂盒 (Qiagen 公司,美国);逆转录试剂盒 (Invitrogen 公司,美国);SYBR Green (Applied Biosystems 公司,美国)。

### 1.2 细胞培养和分组

将 MC3T3-E1 细胞培养于  $\alpha$ -MEM 培养液中,其内加入 10% 胎牛血清、1% 青霉素/庆大霉素溶液、5 mmol/L L-Glutamine,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度孵育箱中培养,至细胞 70% ~ 80% 融合时,开始分别以生理盐水、1 nmol/L PTH、10 nmol/L PTH 和 100 nmol/L PTH 处理细胞,每次以生理盐水或 PTH 处理细胞 6 h,然后更换细胞培养液,至 48 h 后,再次以 PTH 处理细胞 6 h,然后再次更换细胞培养液,48 h 为 1 个循环,共 3 个循环。

将细胞分为 4 组:盐水对照组:与 PTH 组相同体积,相同温度,相同给药方式的生理盐水处理细胞;1 nmol/L PTH 组:以 1 nmol/L PTH 处理细胞;10 nmol/L PTH 组:以 10 nmol/L PTH 处理细胞;100 nmol/L PTH 组:以 100 nmol/L PTH 处理细胞。

### 1.3 检测指标

**1.3.1 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  $\mu$ 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: TGACCTTCTCTCC TCCATCC, Antisense: CTCCTGGGAGTCTCATCCT; Runx2: Sense: GGAATGATGAGAATA, Antisense: ACCGTCCAC TGTCAC TTT; OC: Sense: TGCTTGTGA CGAGCTATCAG, Antisense: GAGGACAGGGAG GATCAAGT; Bsp: Sense: CAGAAGTGGATGAA AACGAG, Antisense: CCGTGGCGAGGTGGTCCCAT;  $\beta$ -actin: Sense: AGATGTGGATCAGCAAGCAG; Antisense: GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA. 反应条件为:95 °C 预变性 15 min 后,95 °C 变性 20 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 45 个循环,于 72 °C 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  $\beta$ -actin 为内参基因,通过 PCR 仪 RotorGene 分析软件进行定量分析。

**1.3.2 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 20 min;吸除福尔马林,PBS 清洗 2 次,加入 ALP one-step 染色剂,于 37 °C 条件下孵育 45 min;吸除染色剂,PBS 清洗 2 次,室温下自然干燥过夜。

**1.3.3 Alizarin Red 染色:**彻底吸除细胞培养液,蒸馏水清洗 3 次;以 4 °C 10% 中性福尔马林固定细胞 20 min;吸除福尔马林,蒸馏水清洗 3 次;加入 Alizarin Red 染色剂,于室温下染色 30 min;吸除染色剂,蒸馏水清洗 3 次;脱水干燥:加入乙醇脱水,室温下自然干燥过夜。

### 1.4 统计学处理

Real-time 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 不同浓度的 PTH 对 MC3T3-E1 细胞内成骨因子 mRNA 表达的不同影响

经 1 nmol/L 浓度和 10 nmol/L 浓度的 PTH 每日处理 MC3T3E1 细胞 6 h,48 h 为 1 个循环,共 3 个循环后,细胞内 ALP、OC、Bsp 和 Runx2 等各个成骨因子 mRNA 的表达增强,与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。与以上两个浓度的 PTH 形成对比,经 100 nmol/L 浓度的 PTH 处理 MC3T3E1 细胞后,细胞内 ALP、OC、Bsp 和 Runx2 等各个成骨因子 mRNA 的表达仅略有增强,但与对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 1)。另外,10 nmol/L 浓度的 PTH 与其他两个浓度的 PTH

相比,提高细胞内各个成骨因子 mRNA 的表达程度最高。

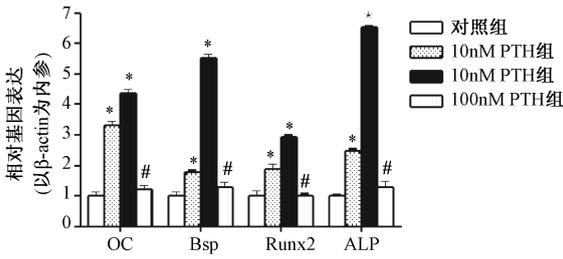


图1 不同剂量的 PTH 对细胞内成骨因子 mRNA 表达的不同影响

\* 代表与对照组相比差异有统计学意义 (P < 0.05)
# 代表与对照组相比差异无统计学意义 (P > 0.05)

Fig.1 Effect of the different dose of PTH on the mRNA expression of osteoblastic markers

\* compared with control group (P < 0.05);
# compared with control group (P > 0.05)

2.2 不同浓度的 PTH 对 MC3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶染色强度的不同影响

经 1 nmol/L 浓度的 PTH 和 10 nmol/L 浓度的 PTH 每日处理 MC3T3E1 细胞 6 h,48 h 为 1 个循环,共 3 个循环后,细胞内碱性磷酸酶染色强度与对照组相比,明显提高;而 10 nmol/L 浓度的 PTH 对于碱

性磷酸酶染色强度的促进作用,则明显强于 1 nmol/L PTH 的作用(图 2)。经 100 nmol/L 浓度的 PTH 每日处理 MC3T3E1 细胞 6 h,48 h 为 1 个循环,共 3 个循环后,细胞内碱性磷酸酶染色强度与对照组相比,无明显提高(图 2)。

2.3 不同浓度的 PTH 对 MC3T3-E1 细胞内 Alizarin Red 染色强度的不同影响

经 1 nmol/L 浓度的 PTH 和 10 nmol/L 浓度的 PTH 每日处理 MC3T3E1 细胞 6 h,48 h 为 1 个循环,共 3 个循环后,细胞内 Alizarin Red 染色强度与对照组相比,明显提高;而 10 nmol/L 浓度的 PTH 对于 Alizarin Red 染色强度的促进作用,则明显强于 1 nmol/L PTH 的作用(图 3)。经 100 nmol/L 浓度的 PTH 每日处理 MC3T3E1 细胞 6 h,48 h 为 1 个循环,共 3 个循环后,细胞内 Alizarin Red 染色强度与对照组相比,无明显提高(图 3)。

3 讨论

在有关 PTH 的很多报道中,研究者更多的关注于 PTH 对于细胞的作用效果和机制。目前较一致的观点认为,间断性给与 PTH 的确具有促进成骨细胞分化的作用[8,9],但是较少有人关注于具体的药物浓度问题,而这恰恰是实验当中需要特别了解和

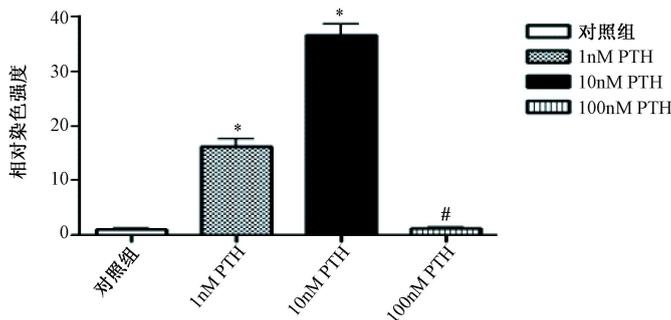
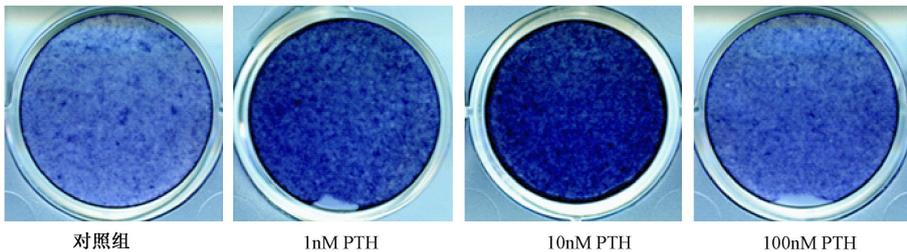


图2 不同浓度的 PTH 对 MC3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶染色的影响

\* 代表与对照组相比差异有统计学意义 (P < 0.05)
# 代表与对照组相比差异无统计学意义 (P > 0.05)

Fig.2 Effect of the different dose of PTH on ALP staining in MC3T3-E1 cells

\* compared with control group (P < 0.05);
# compared with control group (P > 0.05)

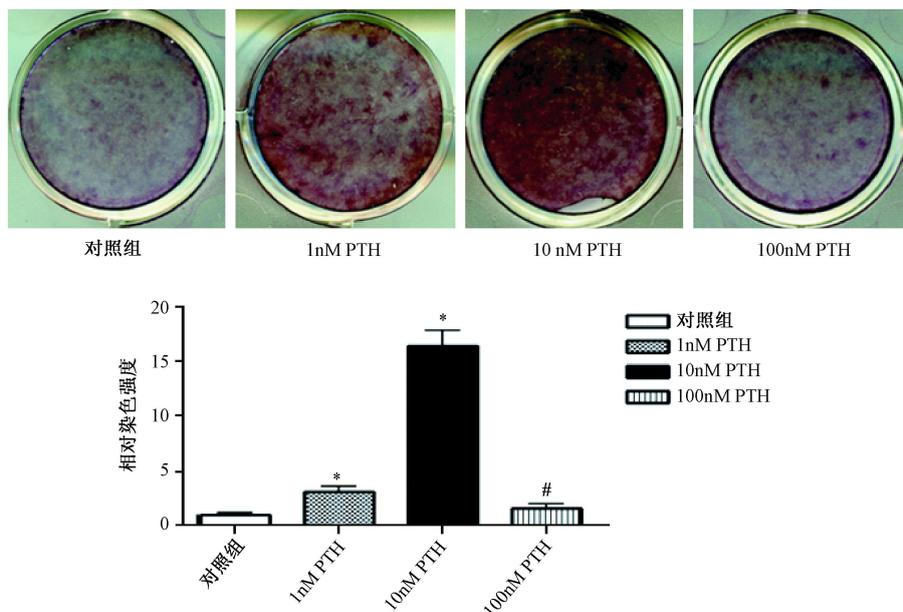


图3 不同浓度的 PTH 对 MC3T3-E1 细胞内 Alizarin Red 染色的影响

\* 代表与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )

# 代表与对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )

Fig. 3 Effect of the different dose of PTH on Alizarin staining in MC3T3-E1 cells

\* compared with control group ( $P < 0.05$ );

# compared with control group ( $P > 0.05$ )

注意的问题。

有关 PTH 不同浓度的在体实验,目前有部分报道。通过研究 102 例桡骨远端骨折,并给与 PTH 治疗的绝经后妇女,观察骨折愈合的情况。随机分为 3 组,每组 34 例,安慰剂组每天注射安慰剂 8 w,实验组给予 20  $\mu\text{g}$  (治疗骨质疏松症的标准剂量),或 40  $\mu\text{g}$  的 PTH1-34;治疗于骨折后 10 d 内开始,并持续 8 w;每 2 周进行一次临床随访及拍摄 X 光片。动态比较相同时间的安慰剂组和实验组,骨折部位桥梁骨痂的修复情况,结果显示 2 组未见明显差异<sup>[10]</sup>。中泽<sup>[11]</sup>等建立了大鼠骨折愈合模型,每天应用 PTH1-34 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,实验组动物骨痂内软骨量是对照组的 1.4 倍,这种差异在 21 d 后消失,并且骨折完全愈合。Kakar<sup>[12]</sup>等利用大鼠骨折模型,每天给予 PTH 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,该实验证明,PTH 的影响主要是通过软骨细胞,促进骨痂内软骨细胞分化,加速骨折愈合。但是以上这些研究,都没有明确究竟何种剂量或浓度的 PTH 能够发挥最适的作用效能,我们的研究主要是在明确 PTH 的作用的同时,进一步探讨了不同浓度的 PTH 对细胞的不同作用效果。

首先,我们利用 MC3T3-E1 成骨细胞系,通过间断给与不同浓度的 PTH1-34,利用 Real-time PCR 技

术,明确了 PTH 对细胞内各项成骨因子 mRNA 表达的促进作用;更重要的是,我们发现这种作用是与 PTH 的剂量具有相关性的,10 nmol/L 浓度的 PTH 发挥了最大的作用效果。同时,碱性磷酸酶染色结果与 PCR 的结果非常一致,碱性磷酸酶是细胞成骨分化的重要的标志性蛋白,我们发现,无论是在碱性磷酸酶的 mRNA 水平或是在蛋白水平,10 nmol/L 浓度的 PTH 都具有最大的促进其表达的作用。另外,在细胞成骨钙化能力方面,Alizarin Red 染色也显示,10nM 浓度的 PTH 增强其染色强度的作用最强,表明 10nM 浓度的 PTH 促进细胞内成骨钙化的作用最强。

综上所述,本研究一方面证实了间歇性给与 PTH 具有促进成骨细胞分化的作用,另一方面也明确了不同浓度的 PTH 对于成骨细胞的分化,发挥着不同的作用效果。

【 参 考 文 献 】

[ 1 ] Kent GN, Loveridge N, Reeve J, et al. Pharmacokinetics of synthetic human parathyroid hormone 1-34 in man measured by cytochemical bioassay and radioimmunoassay. Clin Sci (Lond), 1985, 68(2):171-177.

梁从板状向杆状转变,结构模型指数增加。在本试验中,饲喂茜草3和6个月后,10%组大鼠的股骨远端骨小梁体积百分比,骨小梁厚度,连接密度,骨小梁数量和股骨远端的骨矿物质密度的水平均显著高于0%组大鼠,而股骨远端的骨小梁分离度和结构模型指数显著低于0%组大鼠。

据此可知,饲喂 $\leq 10\%$ 的茜草,能增加大鼠的体重,6个月内不会对大鼠健康造成损害;饲喂 $\geq 15\%$ 茜草则有可能损伤大鼠的肾脏。饲喂10%的茜草,增加大鼠股骨的长度,增强股骨远端和股骨骨干的显微结构。

### 【参 考 文 献】

[1] Hammond RH, Prof E Storey. Experiments and observations on the growth of bones [J]. Experiments and observations on the growth of bones, 1969, 4(1):291-304.

[2] Nakanishi F, Nagasawa Y, Kabaya Y, et al. Characterization of lucidin formation in *Rubia tinctorum* L [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43(10): 921-928.

[3] Dioscoride, Gunther RWT, Goodyer J. The Greek Herbal of Dioscorides: Illustrated by a Byzantine, AD 512 [M]. Hafner Publishing Company, 1968.

[4] Brinkworth RI, Fairlie DP. Hydroxyquinones are competitive non-peptide inhibitors of HIV-1 proteinase [J]. Biochimica et

Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1995, 1253(1): 5-8.

[5] Paff GH, Eksterowicz FC. The selective stoppage of bone growth in tissue culture [J]. The Anatomical Record, 1950, 108(1): 45-55.

[6] Schour I. Measurements of Bone Growth by Alizarine Injections [J]. Experimental Biology and Medicine, 1936, 34(2): 140.

[7] William HH, Dorothy FT, Ulf F, et al. The in vivo inhibition of bone formation by alizarin red S [J]. The Journal of Bone and Joint Surgery (American), 1964, 46(3): 493-508.

[8] Richter D. Vital staining of bones with madder [J]. Biochemical Journal, 1937, 31(4): 591.

[9] Schour I, Hoffman MM, Sarnat BG, et al. Vital Staining of Growing Bones and Teeth With Alizarine Red S [J]. Journal of Dental Research, 1941, 20(5): 411-418.

[10] Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, et al. Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay [J]. Cancer Science, 2009, 100(12): 2261-2267.

[11] Hernandez CJ, Keaveny TM. A biomechanical perspective on bone quality [J]. Bone, 2006, 39:1173-1181.

[12] Dalle Carbonare L, Giannini S. Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength [J]. J Endocrinol Invest, 2004, 27: 99-105.

(收稿日期:2013-08-29,修回日期:2013-10-17)

(上接第617页)

[2] Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, et al. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone micro architecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. J Bone Miner Res, 2001, 16(10):1846-1853.

[3] Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, et al. Growth of factor regulation of fracture repair. J Bone Miner Res, 1999, 14(11):1805-1815.

[4] Simmons DJ. Fracture healing perspectives. Clin Orthop Relat of Res, 1985, 200:100-113.

[5] Ming N, Cheng JT, Rui YF, et al. Dose-dependent enhancement of spinal fusion in rats with teriparatide (PTH[1-34]). Spine, 2012, 37(15):1275-1282.

[6] Van der Horst G, Farih-Sips H, Löwik CW, et al. Multiple mechanisms are involved in inhibition of osteoblast differentiation by PTHrP and PTH in KS483 Cells. J Bone Miner Res, 2005, 20(12): 2233-2244.

[7] Robling AG, Kedlaya R, Ellis SN, et al. Anabolic and catabolic regimens of human parathyroid hormone 1-34 elicit bone- and envelope-specific attenuation of skeletal effects in Sost-deficient mice. Endocrinology, 2011, 152(8): 2963-2975.

[8] Kim SW, Pajevic PD, Selig M, et al. Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. J Bone Miner Res, 2012, 27(10):2075-2084.

[9] Gafni RI, Brahim JS, Andreopoulou P, et al. Daily parathyroid hormone 1-34 replacement therapy for hypoparathyroidism induces marked changes in bone turnover and structure. J Bone Miner Res, 2012, 27(8): 1811-1820.

[10] Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, et al. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. J Bone Miner Res, 2010, 25(2): 404-414.

[11] Nakazawa T, Nakajima A, Shiomi K, et al. Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing. Bone, 2005, 37(5):711-719.

[12] Kakar S, Einhorn TA, Vora S, et al. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. J Bone Miner Res, 2007, 22(12):1903-1912.

(收稿日期:2013-07-09,修回日期:2013-09-23)

# 不同剂量的甲状旁腺素对成骨细胞分化的不同作用的实验研究

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): 2014(6)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201406006.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201406006.aspx)