

· 论 著 ·

GLP-1 受体激动剂艾塞那肽对 MG-63 细胞增殖及成骨分化的影响

李颖¹ 王潇丽¹ 王军² 徐丽丽¹ 杨乃龙^{1*} 郭道瑞³

1. 青岛大学附属医院内分泌科, 青岛 266000

2. 中国人民解放军第 401 医院, 青岛 266000

3. 青岛市开发区人民医院骨科, 青岛 266000

中图分类号: [R34] 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 04-0443-04

摘要: 目的 探讨 GLP-1 受体激动剂艾塞那肽 (Exenatide) 对人成骨肉瘤 MG-63 细胞株增殖及成骨分化的作用。方法 将 MG-63 细胞制成单细胞悬液, 接种于细胞培养板, 分别用不同浓度的艾塞那肽 (0 mol/L , 10^{-9} mol/L , 10^{-8} mol/L , 10^{-7} mol/L) 处理细胞, 24 h 后采用 CCK-8 比色法检测 MG-63 细胞增殖率, 并将艾塞那肽处理后的细胞裂解并取上清, 使用碱性磷酸酶测定试剂盒测定 AKP 活力。结果 (1) 艾塞那肽可促进 MG-63 细胞增殖 ($P < 0.05$), 但随着 GLP-1 受体激动剂浓度升高, 细胞增殖程度降低 ($P < 0.05$), 低浓度的艾塞那肽 (10^{-9} mol/L) 促增殖能力最强。(2) 艾塞那肽不同浓度处理后各组 AKP 活力增加 ($P < 0.05$), 而且低浓度的艾塞那肽 (10^{-9} mol/L) 升高 AKP 活力最明显 ($P < 0.05$)。结论 艾塞那肽能促进人成骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖及成骨分化, 且低浓度的艾塞那肽 (10^{-9} mol/L) 促增殖分化能力最强。

关键词: 胰高血糖素样肽-1 受体激动剂; MG-63 细胞; 细胞增殖; 成骨分化

Effect of glucagon like peptide-1 agonist exenatide on the proliferation and osteoblastic differentiation by MG63 cells

LI Ying¹, WANG Xiaoli¹, Wang Jun², XU Lili¹, YANG Nailong^{1*}, GUO Daorui³

1. Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000

2. Department of Endocrinology, the Chinese People's Liberation Army 401st Hospital, Qingdao 266000

3. Department of Orthopedics, the People's Hospital of Qingdao Development Zones, Qingdao 266000, China

Corresponding author: YANG Nailong, Email: nailongy@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of GLP-1 receptor agonist, exenatide, on the proliferation and osteoblastic differentiation by the human osteosarcoma MG63 cells. **Methods** Different concentrations of exenatide (0 mol/L , 10^{-9} mol/L , 10^{-8} mol/L , and 10^{-7} mol/L , respectively) were added to MG63 cells cultured *in vitro*. Cell proliferation was measured with cell counting kit-8 (CCK-8) after 24 h. Moreover, the supernatants of exenatide-treated MG63 cells were collected. AKP activity was tested using AKP kit. **Results** (1) Exenatide promoted proliferation of MG63 cells ($P < 0.05$). With the increase of the concentration, the proliferation rate of MG63 cells declined ($P < 0.05$). The most stimulation effect was achieved at the concentration of 10^{-9} mol/L . (2) The AKP activity of MG63 cells increased after treatment with exenatide, and the effect was the most obvious at the lower the concentration of exenatide ($P < 0.05$). **Conclusion** Exenatide promotes proliferation and osteoblastic differentiation by human osteosarcoma MG63 cells. Exenatide at the lower concentration (10^{-9} mol/L) has the strongest effect on promoting the proliferation and differentiation.

Key words: Glucagon-like peptide-1 receptor agonist; MG63 cells; Cells proliferation; Osteoblast differentiation

近年来肠促胰素与骨代谢的相关研究逐渐成为热点, 其中促胰岛素分泌多肽 (glucose-dependent

insulinotropic polypeptide, GIP) 和胰高血糖素样肽-2 (glucagon-like peptide-2, GLP-2) 参与骨转换代谢的调节^[1]。GIP 既促进骨形成, 又抑制骨重吸收^[2]。近期研究表明^[3], GIP 受体 (GIPR) 缺失能够破坏骨皮质的质量与强度。另外皮下注射 GLP-2 可减少

*通讯作者: 杨乃龙, Email: nailongy@163.com

小鼠循环中骨重吸收的分子标记物水平。健康绝经后女性口服 GLP-2 能够增加髌部及转子的骨密度^[4]。关于 GLP-1 对骨代谢的作用似乎有争议。正常小鼠口服 GLP-1 对骨结构并无影响,但 2 型糖尿病及胰岛素抵抗小鼠服用 GLP-1 后骨质量显著增加^[5]。与 GLP-1 相比, GLP-1 受体激动剂具有类似的生物学作用,且其半衰期更长,与 GLP-1 受体亲和力更高^[6-7]。目前研究提示 GLP-1 受体激动剂具有促进骨形成和抑制骨吸收的双重作用^[8-9],然而关于 GLP-1 受体激动剂对骨吸收影响的研究颇多^[10-11],关于 GLP-1 受体激动剂对骨形成影响的研究相对较少。本研究采用的 MG63 细胞来源于人成骨肉瘤,其特性与未分化的早期成骨细胞表型类似,且研究发现^[12], MG63 细胞高表达 GLP-1 受体并易于获得。故本研究探讨艾塞那肽对 MG63 细胞增殖及成骨分化的影响,进一步完善 GLP-1 受体激动剂与骨代谢相关作用研究,为 GLP-1 受体激动剂的临床应用提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

MG63 细胞(由中南大学湘雅二院骨代谢内分泌研究所提供),高糖-DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶、双抗(Hyclone 公司),地塞米松、L-2-磷酸抗坏血酸、 β -甘油磷酸(Sigma 公司),Cell Counting Kit-8 细胞增殖/毒性检测试剂盒、BCA 法蛋白定量试剂盒及碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司),TRITON-X100(Solarbio 公司),艾塞那肽(标准品,由美国 Lilly 公司提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 MG63 细胞复苏与培养: -80°C 冰箱中取出冻存 MG63 细胞,立即投入 $37^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 恒温水中迅速晃动至冻存液完全缓解。将细胞悬液移至离心管内,加入 5 ml 培养液(含高糖 DMEM,体积分数为 10% 胎牛血清,1% 双抗),轻轻吹打混匀。将细胞悬液经 $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min,弃上清液。向细胞沉淀内加入完全培养液 5 ml,轻轻混匀,将细胞悬液转移至培养瓶内,补足培养液进行培养。复苏第 2 天上午更换培养基,之后每 2 天换液 1 次,待细胞长至 80% ~ 90% 时传代,取细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8 比色法测定细胞增殖率: MG63 单细胞悬液以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μl ,放置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h,待细胞融合至 70%,换用终浓度分别为 0 mol/

L、 10^{-9} mol/L 、 10^{-8} mol/L 、 10^{-7} mol/L 的艾塞那肽培养液继续培养细胞,每孔 100 μl ,每组设置 5 个复孔。36 h 后分别于每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,在 5% CO_2 培养箱内孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 OD 值。

1.2.3 蛋白浓度的测定: MG63 单细胞悬液以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于 24 孔细胞培养板中,每孔 100 μl ,放置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育。10 h 后,待细胞融合度达 70%,换用终浓度分别为 0 mol/L、 10^{-9} mol/L 、 10^{-8} mol/L 、 10^{-7} mol/L 的艾塞那肽培养液培养细胞,每孔 100 μl ,每组设 3 个复孔。36 h 后吸出 24 孔细胞培养板内原培养液, PBS 漂洗 3 次,加入 0.2% Triton-X100 进行裂解,每孔 150 μl 。收集裂解细胞, $1\,000\text{ r/min}$ 4°C 离心 10 min,吸取上清液。在 96 孔板中分别加入双蒸水 10 μl (空白孔)、563 $\mu\text{g/ml}$ 标准品 10 μl (标准孔)、上述上清液各 10 μl (测定孔),空白孔及标准孔设 1 个复孔,测定孔设 2 个复孔。每孔加入工作液 250 μl ,混匀, 37°C 孵育 30 min,酶标仪测定各孔吸光度 OD_{562} 值,并通过以下公式计算总蛋白浓度:

$$\text{总蛋白浓度}(\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times$$

标准品浓度(563 $\mu\text{g/ml}$) $\times$ 样本测试前稀释倍数

1.2.4 AKP 活力测定: 96 孔细胞培养板中取 18 孔,各孔分别加入双蒸水 5 μl (空白孔)、0.1 mg/ml 酚标准应用液 5 μl (标准孔)、不同浓度艾塞那肽(0 mol/L、 10^{-9} mol/L 、 10^{-8} mol/L 、 10^{-7} mol/L) 处理后的上清液各 5 μl (测定孔),空白孔及标准孔设 1 个复孔,测定孔设 4 个复孔。分别于每孔加入缓冲液和基质液各 50 μl ,充分混匀, 37°C 水浴 15 min,加入显色剂 150 μl ,轻轻振摇孔板混匀,波长 520 nm,酶标仪测定各孔吸光度 OD 值。

$$\text{公式计算 AKP 活力: AKP 活力(金氏单位/gprot)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度}(0.02\text{mg/ml}) \div \text{待测样本蛋白浓度}(\text{gprot/ml})$$

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计分析软件分析数据,实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MG63 细胞形态

图 1 为复苏后 MG63 细胞,光镜下细胞贴壁生

长,形态近似梭形,有少量伪足,核仁清晰、大。

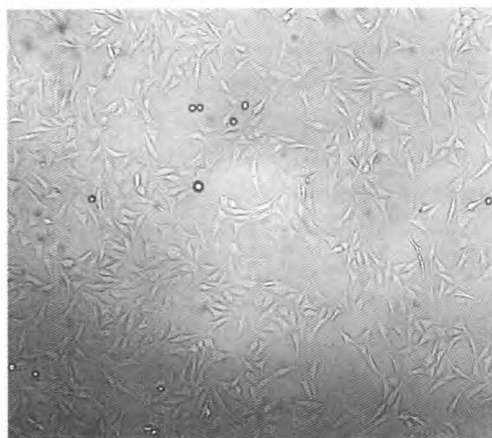


图 1 MG-63 细胞形态观察 (20 ×)

Fig. 1 The morphology of MG63 cells (20 ×)

2.2 艾塞那肽对 MG63 细胞增殖的影响

实验发现,对照组、 10^{-9} mol/L 组、 10^{-8} mol/L 组、 10^{-7} mol/L 组的 OD 值分别为 0.605 ± 0.468 、 0.828 ± 0.272 、 0.748 ± 0.368 、 0.682 ± 0.487 。MG63 细胞增殖率测定与对照组相比,实验组各组 OD 值均显著增高 ($P < 0.05$),且随着 GLP-1 受体激动剂浓度的降低,测定 OD 值逐渐增高,各组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 艾塞那肽对 MG63 细胞成骨分化的影响

实验发现,对照组、 10^{-9} mol/L 组、 10^{-8} mol/L 组、 10^{-7} mol/L 组的 AKP 活力值依次为 7.051 ± 0.995 、 8.036 ± 0.057 、 7.365 ± 0.075 、 7.355 ± 0.113 ,与对照组相比,实验组各组 AKP 活力均显著增高 ($P < 0.05$),且低浓度的艾塞那肽 (10^{-9} mol/L) 促进成骨活性能力高于中高浓度组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

糖尿病可导致骨质量下降,从而增加糖尿病患者骨折风险^[13-14]。Janghorbani 等^[15]的研究显示,T2DM 患者髋骨骨折风险增高,与非 T2DM 患者比,男性风险比为 2.8,女性风险比为 2.1,T1DM 患者髋骨骨折风险则更加显著,RR 达 6.3,此外糖尿病患者非椎体骨折风险亦明显增加^[16]。

GLP-1 受体激动剂是糖尿病药物治疗的新兴药物,除了促进胰岛素分泌及抑制胰高血糖素分泌的作用外,还有减缓胃排空、抑制食欲、对心肌的保护、对神经元细胞的保护、对肝炎症与脂肪变性的改善等作用^[17]。由于糖尿病患者骨质疏松风险的增高,

GLP-1 受体激动剂对于骨代谢的影响也逐渐成为研究热点。目前研究显示,GLP-1 受体可通过直接或间接作用调节骨代谢向骨形成方向转化^[8]。也有研究发现,GLP-1 受体激动剂可通过与甲状腺 C 细胞表面的受体结合促进降钙素分泌,从而抑制骨吸收^[10,18]。Ma 等人^[9]已证明 GLP-1 受体激动剂艾塞那肽可降低卵巢切除小鼠尿钙、尿磷的排泄,减少体内钙的丢失,从而缓解骨质疏松的发展。Yamada 等人^[11]将小鼠 GLP-1 受体激动剂受体基因敲除后发现骨量减少、骨脆性增加、破骨细胞数目增多、骨吸收活性增强。因此,GLP-1 受体激动剂在骨代谢中可能存在促进增殖及抑制吸收的作用。

本实验结果显示 GLP-1 受体激动剂艾塞那肽在一定范围内可促进 MG63 细胞增殖,低浓度作用更强,与之前的研究结果一致^[8]。AKP 活性是成骨细胞分化的功能指标^[19],其活性高低可反映成骨细胞的成熟状况,AKP 活性越高,表明向成骨细胞分化的程度越高^[20]。实验结果中各实验组 AKP 活力较对照组均增高 ($P < 0.05$),提示艾塞那肽对成骨分化有促进作用,与低浓度组相比,中高浓度组的 AKP 活力均显著降低,提示低浓度的艾塞那肽更能促进成骨分化。艾塞那肽可能通过与 MG63 细胞高表达的 GLP-1 受体激动剂受体结合,从而促进其增殖及向成骨细胞分化。

GLP-1 受体激动剂除了降糖作用外,还有减体重、改善血脂代谢、改善骨代谢等多种作用。本研究在体外实验中证明了 GLP-1 受体激动剂可促进 MG63 细胞增殖并促进成骨细胞分化。当然实际临床应用中 GLP-1 受体激动剂能否降低糖尿病患者骨折风险尚有待观察。

【参 考 文 献】

- [1] Wee NK, Baldock PA. The hunger games of skeletal metabolism. Bonekey Rep, 2014, 3:588.
- [2] Xie D, Zhong Q, Ding KH, et al. Glucose-dependent insulinotropic peptide-overexpressing transgenic mice have increased bone mass. Bone, 2007, 40(5):1352-1360.
- [3] Mieczkowska A, Irwin N, Flatt PR, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor deletion leads to reduced bone strength and quality. Bone, 2013, 56(2):337-342.
- [4] Henriksen DB, Alexandersen P, Hartmann B, et al. Four-month treatment with GLP-2 significantly increases hip BMD: a randomized, placebo-controlled, dose-ranging study in postmenopausal women with low BMD. Bone, 2009, 45(5):833-842.

- [5] Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, et al. Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic, and insulin-resistant states. *Calcif Tissue Int*, 2009, 84 (6) : 453-461.
- [6] Nielsen LL, Young AA, Parkes DG. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. *Regul Pept*, 2004, 117(2): 77-88.
- [7] Eng J, Kleinman WA, Singh L, et al. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem*, 1992, 267(11): 7402-7405.
- [8] Nuche-Berenguer B, Moreno P, Portal-Nunez S, et al. Exendin-4 exerts osteogenic actions in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *Regul Pept*, 2010, 159(1-3): 61-66.
- [9] Ma X, Meng J, Jia M, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(7): 1641-1652.
- [10] Lamari Y, Boissard C, Moukhtar MS, et al. Expression of glucagon-like peptide 1 receptor in a murine C cell line: regulation of calcitonin gene by glucagon-like peptide 1. *FEBS Lett*, 1996, 393(2-3): 248-252.
- [11] Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology*, 2008, 149(2): 574-579.
- [12] Pacheco-Pantoja EL, Ranganath LR, Gallagher JA, et al. Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiol*, 2011, 11: 12.
- [13] Nyman JS, Even JL, Jo CH, et al. Increasing duration of type 1 diabetes perturbs the strength-structure relationship and increases brittleness of bone. *Bone*, 2011, 48(4): 733-740.
- [14] Thrailkill KM, Lumpkin CK, Bunn RC, et al. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 289(5): 735-745.
- [15] Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, et al. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol*, 2007, 166(5): 495-505.
- [16] Melton LJ, Leibson CL, Achenbach SJ, et al. Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(8): 1334-1342.
- [17] Gupta V. Pleiotropic effects of incretins. *Indian J Endocrinol Metab*, 2012, 16 (Suppl 1) : 47-56.
- [18] Crespel A, De Boisvilliers F, Gros L, et al. Effects of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on C cells from rat thyroid and medullary thyroid carcinoma CA-77 cell line. *Endocrinology*, 1996, 137(9): 3674-3680.
- [19] Huang C, Ross PD, Wasnich RD. Short-term and long-term fracture prediction by bone mass measurements: a prospective study. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(1): 107-113.
- [20] Alborzi A, Mac K, Glackin CA, et al. Endochondral and intramembranous fetal bone development: osteoblastic cell proliferation, and expression of alkaline phosphatase, m-twist, and histone H4. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1996, 16(2): 94-106.

(收稿日期: 2015-08-27)

(上接第 409 页)

- [14] Matheson EM, Mainous AG, Carnemolla MA. The association between onion consumption and bone density in perimenopausal and postmenopausal non-Hispanic white women 50 years and older. *Menopause*, 2009, 16(4): 756-759.
- [15] Rassi CM, Lieberherr M, Chaumaz G, et al. Modulation of osteoclastogenesis in porcine bone marrow cultures by quercetin and rutin. *Cell Tissue Res*, 2005, 319: 383-393.
- [16] Tsuji M, Yamamoto H, Sato T, et al. Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*, 2009, 27(6): 673-681.
- [17] Zhu XJ, Wei SQ. Protective effect of quercetin on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Chin J Osteoporos*, 2005, 11(4): 504-508.
- [18] Wang H, Li MC, Yang J, et al. Estronegenic properties of six compounds derived from *Eucommia ulmoides* Oliv, and their differing biological activity through estrogen receptors and β . *Food Chem*, 2011, 129(2): 408-416.
- [19] 胡亚军, 陈克, 李晓红, 等. 重组人生长激素及雌激素对去势大鼠血钙血磷及下颌骨骨密度的影响. *实用口腔医学杂志*, 2010, 26(6): 747-750.
- Hu YJ, Chen K, Li XH, et al. The effects of rh-GH and E2 on calcium and phosphorus in blood serum and bone density of mandible in ovariectomized rats. *J Pract Stomatol*, 2010, 26(6): 747-750. (in Chinese)
- [20] 翁泽斌, 颜翠萍, 吴育, 等. 盐制对杜仲治疗去卵巢大鼠骨质疏松症影响的研究. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(12): 1457-1463.
- Weng ZB, Yan CP, Wu Y, et al. Study of the effect of salt-roast processing product of *Eucommia ulmoides* Oliv. on osteoporosis in ovariectomized rats. *Chin J Osteoporos*, 2014, 20(12): 1457-1463. (in Chinese)

(收稿日期: 2015-10-28)