论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0262-04

重组人甲状旁腺激素1-34促进小鼠间充质干细胞增殖及骨向分化

易玲娴,翁土军,苏 楠,何启芬,罗凤涛,陈 林 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,创伤,烧伤与复合伤国家重点实验室)

【摘要】 **目的** 研究重组人甲状旁腺激素1-34[recombinant human parathyroid hormone1-34, rhPTH(1-34)]间断处理对小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cell,BMSC)增殖以及骨向分化的影响,进一步探讨rhPTH(1-34)促骨形成的机制。**方法** 无菌条件下分离6~8周的C3H雄性小鼠BMSC,传代培养,10 nmol/L rhPTH(1-34)间断处理或者Vehicle处理,MTT检测细胞增殖;BMSC成骨诱导后,分别在3、6、9 d进行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)染色和活性测定;RT-PCR检测成骨细胞功能标志基因核心结合因子α1(core binding factor α1,Cbfα1)、骨桥蛋白(osteopontin, OP)、骨钙素蛋白(osteocalcin, OC)的表达水平;Western blot检测p-Erk1/2,p-P38信号通路。**结果** rhPTH(1-34)间断处理促进BMSC增殖;诱导9 d时与对照组比较,显著增加ALP活性[D(405)/D(562):(0.625±0.049) *vs* (0.543±0.038),($P<0.05$)];显著增加成骨功能相关基因Cbfα1(增加186.6%,$P<0.01$),OC(增加210.5%,$P<0.01$),OP mRNA(增加5.5%,$P<0.05$)的表达水平;p-Erk1/2,p-P38水平均增加。**结论** rhPTH(1-34)间断处理通过激活下游的p-Erk1/2和p-P38通路,促进BMSC增殖,增强其向成骨细胞分化,使成骨细胞数量和活性增加,从而增加骨形成达到治疗骨质疏松的目的。

【关键词】 甲状旁腺激素;间充质干细胞;成骨细胞;骨形成

【中图法分类号】 R322.71;R329.28;R394.2 **【文献标志码】** A

Recombinant human parathyroid hormone 1-34 treatment promotes proliferation of bone marrow stromal cells in mice and their differentiation to osteoblasts

Yi Lingxian, Weng Tujun, Su Nan, He Qifen, Luo Fengtao, Chen Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of recombinant human parathyroid hormone 1-34 (rhPTH 1-34) intermittent treatment on proliferation of bone marrow stromal cells (BMSC) and their differentiation to osteoblasts as well as its mechanism underlying bone formation. **Methods** BMSC, isolated from C3H male mice at the age of 6 – 8 weeks, were subcultured and treated with 10 nmol/L rhPTH 1-34 intermittently or with vehicle. Proliferation of BMSC was detected by MTT assay. BMSC were stained with alkaline phophatase (ALP) and ALP activity was assayed on days 3, 6 and 9 after they were differentiated to osteoblasts. Expressions of core binding factor α 1 (Cbfα1), osteocalcin(OC) and osteopontin (OP) were detected by RT-PCR. Erk1/2 and P38 signals were detected by Western blot analysis. **Results** rhPTH 1-34 intermittent treatment promoted the proliferation of BMSC, increased the ALP activity more significantly in treatment group than in control group on day 9 after BMSC were differentiated to osteoblasts (0.625±0.049 *vs* 0.543±0.038, $P<0.05$), and the expression levels of osteogenic markers including Cbfα1, OC and OP for 186.6%, 210.5%, and 5.5%, respectively ($P<0.05$). The p-Erk1/2 and p-P38 signals were activated after rhPTH1-34 treatment. **Conclusion** rhPTH 1-34 intermittent treatment can increase the proliferation of BMSC, differentiation of BMSC to osteoblasts, and the number and activity of osteoblasts by activating the p-Erk1/2 and p-P38 signals.

【Key words】 parathyroid hormone; bone marrow stromal cells; osteoblast; bone formation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30530410). Corresponding author: Chen Lin, Tel: 86-23-68757041, E-mail: linchen70@163.com

甲状旁腺激素(parathyroid hormone,PTH)是由84个氨基酸残基组成的多肽,其对骨骼具有双重作用。重组人甲状旁腺激素1-34[recombinant human parathy-

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目(30530410)

【通信作者】 陈 林,电话:(023)68757041,E-mail:linchen70@163.com

roid hormone1-34, rhPTH(1-34)]为天然PTH的N端34个氨基酸残基,具有天然PTH的生物活性。目前,间断PTH处理成为国内外研究的热点,其促进骨形成的作用可以用于治疗骨质疏松以及骨性关节炎[1-2],但在国内尚处于临床前研究阶段,其具体的作用机制还不明确。骨髓中包含有成骨细胞和破骨细胞前体,作为骨髓中的主体骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cell,BMSC)可以向成骨细胞和破骨细胞分化[3],从而影响骨骼的代谢。本实验采用间断rhPTH(1-34)处理小鼠BMSC,观察其对BMSC的增殖以及向成骨细胞分化的影响,从分子水平探讨rhPTH(1-34)间断处理促进骨形成的作用,探明PTH促进骨形成的机制,为其在临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

改良型α-MEM培养基(HyClone公司),优质胎牛血清(FBS,Gibco公司),rhPTH(1-34)、β-磷酸甘油、地塞米松、ALP试剂盒、β-actin单克隆抗体、MTT、维生素C(Sigma公司),SYBR ExScript™ RT-PCR试剂盒、RNA反转试剂盒(TaKaRa公司),Trizol(Invitrogen公司),引物由上海生工公司合成,抗Erk1/2、p-Erk1/2、P38、p-P38多克隆抗体(Cell signal technology),蛋白酶抑制剂(Roche公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSC原代培养及接种 20只6~8周龄SPF级C3H雄性小鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),体质量为25~27 g,随机分成两组,无菌条件下分离出胫、股骨,然后用含有10% FBS的α-MEM培养基将骨髓细胞冲入培养皿中,反复吹打使细胞分散成单个细胞悬浮液。将细胞置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养,24 h细胞首次换液,每3天换液1次;待细胞长满后传代接种。细胞用0.25%的胰酶消化下来,按5000个/孔接种于96孔板,用于检测细胞增生;按8×10^5个/孔接种于60 mm^2的培养皿中,用于细胞蛋白的提取;按4×10^5个/孔接种于6孔板,用于细胞RNA的提取;按8×10^4个/孔接种于24孔板,用于细胞ALP活性检测与染色,实验均重复3次。

1.2.2 PTH处理 细胞按以下3种不同的方法进行处理[4]。A法:用于细胞增生的检测。以48 h为1个循环,细胞用完全培养基培养,在前6 h用10 nmol/L rhPTH(1-34)(处理组)或者Vehicle(0.001%乙酸和0.001% BSA)(对照组)处理,其余42 h不处理。B法:用于细胞ALP活性检测及染色。细胞培养基中加入成骨诱导剂(0.01 mol/L β-磷酸甘油,50 μg/ml维生素C、10^{-8}mol/L地塞米松),其余同A法。C法:用于细胞蛋白和RNA的提取。细胞用B法培养7 d后,血清饥饿24 h,然后用10 nmol/L rhPTH(1-34)或者Vehicle处理6 h后提取细胞蛋白和RNA。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖 按A法进行细胞培养,20 μl MTT(5 mg/ml)于第44小时加入待测的孔中,在37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内继续孵育4 h,选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值[D(490)值]。

1.2.4 细胞ALP活性检测及染色 按B法处理细胞,于第3、6、9天用细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl,2 mmol/L $MgCl_2$,0.05% Triton X-100,pH 8.2)提取总蛋白,用BCA试剂盒在562 nm处波长处测定总蛋白的D(562)值,用ALP试剂盒在酶联免疫检测仪405 nm处测定ALP的D(405)值,然后取每个样本的D(405)/D(562)值。用ALP试剂盒对处理后的细胞进行ALP染色。

1.2.5 RNA的提取和RT-PCR检测 按C法处理细胞后,用Trizol法提取细胞总RNA。测量每个样本RNA的浓度之后,分装,保存于-70 ℃备用。按TaKaRa反转录试剂盒操作说明书进行反转。得到的cDNA用于RT-PCR,以cyclophilin A为内参。PCR反应体系及扩增条件参照定量PCR反应试剂盒说明书进行,每次做3个复孔,每个基因重复3次。扩增条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,57 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,40个循环(扩增);95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s。定量PCR仪自动给出溶解曲线分析,得到扩增曲线、溶解曲线和样本的循环阈(cycle threshold,Ct)值。每份标本目的基因的表达强度用其对应的cyclophilin A基因的量进行校正,即△Ct为目标基因相对于内参基因的表达强度,$\triangle Ct = Ct_{目标基因} - Ct_{cyclophilin\ A}$。定量PCR所需引物如表1[5]。

表1 目的基因的引物序列

引物名称	引物序列	退火温度
Cyclophilin-A	正义5′-CGAGCTCTGAGCACTGGAGA-3′	57 ℃
	反义5′-TGGCGTGTAAAGTCACCACC-3′	
Cbfα1	正义5′-CCTGAACTCTGCACCAAGTC-3′	57 ℃
	反义5′-GAGGTGGCAGTGTCATCATC-3′	
Osteocalcein	正义5′-GCAGCATTACGACCCAAGAT-3′	57 ℃
	反义5′-CATGATTGCACTCCCTGAAG-3′	
Osteopontin	正义5′-TGCACCCAGATCCTATAGCC-3′	57 ℃
	反义5′-TGTGGTCATGGCTTTCATTG-3′	

1.2.6 细胞总蛋白提取及Western blot检测 按C法处理细胞后,提取细胞蛋白。用BCA法检测蛋白浓度后,进行Western blot检测。经过SDS-PAGE电泳后,将蛋白转移到PVDF膜上,用8%的封闭液封闭1 h后,一抗于37 ℃孵育1 h,或者4 ℃过夜。一抗为β-actin单克隆抗体(1∶5 000),Erk1/2,p-Erk1/2,P38,p-P38多克隆抗体(1∶1 000),用TBST冲洗数次后,加二抗于37 ℃孵育1 h,抗兔或抗鼠(1∶5 000),TBST冲洗数次后,用化学发光试剂检测细胞信号。

1.3 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行独立样本t检验(双侧)。

2 结果

2.1 rhPTH(1-34)对BMSC增生的影响

rhPTH(1-34)处理1、2 d,处理组D(490)值高于对照组,差异无统计学意义($P>0.05$)。处理3、4 d时,处理组D(490)值显著高于对照组(分别为5.9%和11.9%,$P<0.05$)。见表2。

说明 rhPTH(1-34)可以促进 BMSC 的增殖。

表2 两组细胞在不同处理情况下每天的 D(490)值($\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d
对照组	0.106 ± 0.013	0.130 ± 0.020	0.186 ± 0.008	0.226 ± 0.021
rhPTH(1-34)处理组	0.112 ± 0.010	0.138 ± 0.023	0.197 ± 0.010[a]	0.253 ± 0.038[a]

a:P < 0.05,与对照组比较

2.2 rhPTH(1-34)对 ALP 的影响

rhPTH(1-34)处理 3、6 d 时处理组与对照组 D(405)/D(562)没有显著差异(P > 0.05),处理 9 d 时处理组 D(405)/D(562)显著高于对照组(15.1%,P < 0.05)。rhPTH(1-34)处理 ALP 染色增强(图 1,表 3)。提示 rhPTH(1-34)可以增加 ALP 活性。

表3 两组细胞在不同处理情况下的 ALP 活性($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	6 d	9 d
对照组	0.217 ± 0.056	0.322 ± 0.020	0.543 ± 0.038
rhPTH(1-34)处理组	0.231 ± 0.036	0.348 ± 0.010	0.625 ± 0.049[a]

a:P < 0.05,与对照组比较

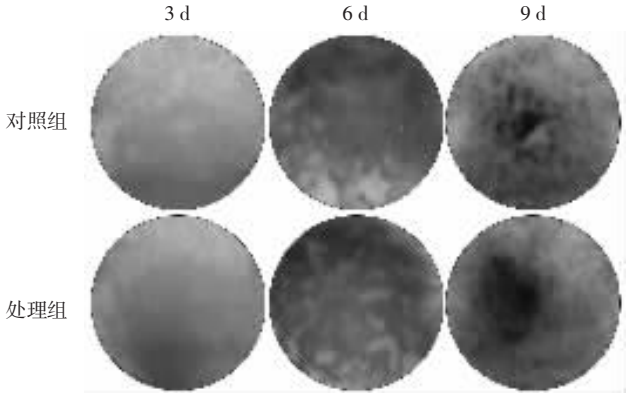


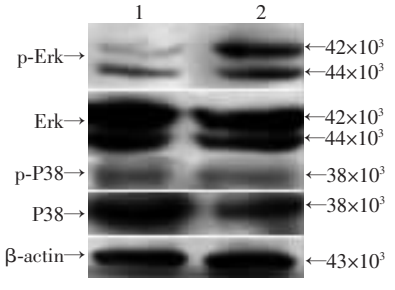
图1 rhPTH(1-34)处理 BMSC 3、6、9 d 细胞 ALP 染色变化

2.3 rhPTH(1-34)对成骨细胞分化相关基因 mRNA 表达的影响

间断 rhPTH(1-34)使 OP 表达增加了 5.5%(1.055 ± 0.033,P < 0.05),Cbfα1,OC 表达分别增加了 186.6%(2.846 ± 0.034,P < 0.01)和 210.5%(3.105 ± 0.642,P < 0.01),具有统计学意义。

2.4 rhPTH(1-34)对 Erk1/2 和 P38 途径的影响

BMSC 诱导 7 d 后,Western blot 检测显示 rhPTH(1-34)可以增加 Erk1/2 和 P38 的磷酸化水平。见图 2。



1:对照组,2:处理组

图2 rhPTH(1-34)对 Erk1/2 和 P38 磷酸化水平的影响

3 讨论

随着人口的老年化,骨质疏松的发病率显著增加,严重威胁中老年人的健康和生活。PTH 作为美国食品和药物管理局(food and drug administration,FDA)批准治疗骨质疏松的唯一促骨合成类药[6],在国内尚处于临床前阶段,其作用机制备受关注。PTH 对骨骼具有双重作用,大剂量连续处理可以促进骨吸收,小剂量间断处理主要促进骨形成[7]。PTH 主要通过 PTH 受体 1(PTHR1)发挥作用,PTHR1 属于 G 蛋白偶联的受体,PTH/PTHR1 主要调节下游 cAMP/PKA 及 PLC/PKC 信号途径[8],其对 MAPK 信号途径的作用具有细胞特异性而且十分复杂。研究表明 PTH 既可以激活又可以抑制 MAPK 信号,其作用与 PKA、PKC 以及 PI3K 有关[9]。本研究采用 Western blot 发现 rhPTH(1-34)间断处理 BMSC 可以激活 Erk1/2-MAPK 以及 P38-MAPK 信号通路。以往的研究表明 Erk1/2 与 P38 的激活与 ALP,OC 的表达及矿化有关[10]。Cbfα1 是间充质干细胞向成骨细胞分化的早期标记分子;OP,OC 是成骨细胞分化成熟的标志分子;ALP 是成骨细胞功能成熟的标志分子[11]。本实验观察了 rhPTH(1-34)间断处理对成骨细胞相关基因表达以及 ALP 活性的影响,结果表明 rhPTH(1-34)可以显著增加 Cbfα1(186.6%,P < 0.01)、OC(210.5%,P < 0.01)、OP(5.5%,P < 0.05)的表达,BMSC 诱导 3、6 d 时 ALP 活性没有显著变化,但在 9 d 时 ALP 活性显著增加(15.1%),说明 rhPTH(1-34)可以使成骨细胞活性显著增加。PTH 的促骨合成信号通路中有多个分子参与,如 Wnt、TGFβ、IGF1、BMP、FGF2 等,并且具有细胞特异性[12-16]。研究表明用 PTH 间断处理 FGF2 +/+ 小鼠颅骨成骨细胞(COB)其 Cbfα1 的表达增加,CyclinD1-cdk4/6 蛋白表达增加,但是在 FGF2 −/− 小鼠中没有变化[16]。在多种成骨细胞系中,包括 ROS17/2.8、MG63、$SaOs_2$ 以及 UMR106 细胞,研究者只在 UMR106 细胞中观察到 PTH 对 ALP 活性的影响,而且作用很小,并且 P38 抑制剂在这些细胞中的作用也很弱[17]。体外实验表明在 MC3T3-E1 细胞中 Erk 和 JNK 的激活可以抑制 Smad3 诱导的 ALP 的活性和成骨细胞的矿化,P38 的激活却可以促进这个过程[18]。骨骼的发育通过膜内成骨和软骨内成骨两种方式完成:四肢骨通过软骨内骨形成,颅骨通过膜内成骨来实现[19]。BMSC 是长骨骨髓的主要成分。本实验通过用 rhPTH(1-34)间断处理来研究其对 BMSC 生物学的影响,发现其可以促进 BMSC 的增殖以及骨向分化,提示在 PTH 促进四肢骨合成中成骨细胞的数量增加可以通过促进 BMSC 的增殖以及向成骨细胞分化来实现。

综上所述，rhPTH(1-34)间断处理可以促进BMSC的增殖以及骨向分化，从而促进骨形成，这个过程可能是通过激活Erk1/2和P38信号来实现的。本研究为后续进一步应用特异性阻断剂研究其具体机制奠定了基础，并为临床应用提供了实验依据。

参考文献：

[1] Jilka R L. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH[J]. Bone, 2007, 40(6): 1434-1446.
[2] Chang J K, Chang L H, Hung S H, *et al*. Parathyroid hormone 1-34 inhibits terminal differentiation of human articular chondrocytes and osteoarthritis progression in rats[J]. Arthitis Rheum, 2009, 60(10): 3049-3060.
[3] Menaa C, Kurihara N, Roodman G D. CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency[J]. Biochem Biophy Res Commun, 2000, 267(3): 943-946.
[4] Zhang K, Chen J, Wang M, *et al*. The expression of insulin-like growth factor-I mRNA and polypeptide in rat osteoblasts with exposure to parathyroid hormone[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(12): 1916-1922.
[5] 谢杨丽，苏楠，金旻，等. 外源性甲状旁腺激素对小鼠骨折愈合的影响[J]. 第三军医大学报，2010，32(10)：1003-1007.
[6] Pettway G J, Meganck J A, Koh A J, *et al*. Parathyroid hormone mediates bone growth through the regulation of osteoblast proliferation and differentiation[J]. Bone, 2008, 42(4): 806-818.
[7] Datta N S, Abou-Samra A B. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts[J]. Cell Signal, 2009, 21(8): 1245-1254.
[8] 李剑，魏启幼. PTH/PTHrP对骨代谢调节机制的研究进展[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册，2004，24(1)：54-57.
[9] Murrills R J, Andrews J L, Samuel R L, *et al*. Parathyroid hormone synergizes with non-cyclic AMP pathways to activate the cyclic AMP response element[J]. J Cell Biochem, 2009, 106(5): 887-895.
[10] Rey A, Manen D, Rizzoli R, *et al*. Evidences for a role of p38 MAP kinase in the stimulation of alkaline phosphatase and matrix mineralization induced by parathyroid hormone in osteoblastic cells[J]. Bone, 2007, 41(1): 59-67.
[11] 金慰芳，于志峰，高建军，等. PTH对骨髓细胞骨代谢相关基因表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志，2005，11(3)：286-288.
[12] Bodine P V, Seestaller-Wehr L, Kharode Y P, *et al*. Bone anabolic effects of parathyroid hormone are blunted by deletion of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1[J]. J Cell Physiol, 2007, 210(2): 352-357.
[13] Yin J J, Selander K, Chirgwin J M, *et al*. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development[J]. J Clin Invest, 1999, 103(2): 197-206.
[14] Miyakoshi N, Kasukawa Y, Linkhart T A, *et al*. Evidence that the anabolic effects of PTH on bone require IGF-I in growing mice[J]. Endocrinology, 2001, 142(10): 4349-4356.
[15] Kempen D H, Lu L, Hefferan T E, *et al*. Enhanced bone morphogenetic protein-2-induced ectopic and orthotopic bone formation by intermittent parathyroid hormone(1-34) administration[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(12): 3769-3777.
[16] Sabbieti M G, Agas D, Xiao L, *et al*. Endogenous FGF-2 is critically important in PTH anabolic effects on bone[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(1): 143-151.
[17] Murshed M, Harmey D, Millan J L, *et al*. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone[J]. Genes Dev, 2005, 19(9): 1093-1104.
[18] Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, *et al*. Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor beta negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(39): 36024-36031.
[19] 苏楠，陈林. FGFR3在骨骼发育和疾病中作用的研究进展[J]. 国际遗传学杂志，2006，29(3)：222-225，230.

（收稿 2010-09-27 修回 2010-10-25）
（编辑 龙 亮）

（上接261页）

后及夜间潮热，多汗，易误解为结核的中毒症状。胸部CT检查提示片块状影，其内密度不均匀，边界不规则，和周围型肺癌类似。有报道奴卡菌病患者可出现胸膜凹陷征和骨质破坏等表现，更难以在影像学上与肺部肿瘤鉴别[3]。

病原学检查为诊断奴卡菌病的金标准。本菌为需氧革兰阳性菌，具有不稳定的抗酸性，用盐酸酒精作较长时间脱色，则失去抗酸性[4]。本菌为需氧菌，营养要求不高，但痰培养口腔菌群生长占优势，使奴卡菌受抑制，故痰培养阳性率相对较低。经胸壁针吸，支气管肺泡灌洗，经纤维支气管镜活检阳性率较高。奴卡菌病首选增效磺胺甲基异恶唑，剂量宜足，一般为半年到一年。联合使用多种药物的疗效并不比单用磺胺药更有效。长期口服磺胺类药物应注意药物副作用，老年患者应酌情减量，碱化尿液，加大饮水量，并密切观察对肾功能的副作用。

本例患者为青年女性，长期务农，无基础疾病，病灶原发且局限于肺部，未合并其他部位感染，临床症状与结核病表现相似，胸部CT与肿瘤难以区别，两次经皮肺穿培养确诊，口服复方新诺明2 g、3次/d，治疗半年，临床治愈。患者无易感因素，病因不明，可能与长期接触土壤、家畜有关。

奴卡菌病患者并不一定具有某种基础疾病或者免疫力低下，正常人群也可发病，病原学检查为其确诊手段，也是主要鉴别方法。疗程足，单药使用即可临床治愈，警惕药物副作用。

参考文献：

[1] Palmer D L, Harvey R L, Wheeler J K. Diagnostic and therapeutic considerations in Nocardia asteroides infection[J]. Medicine(Baltimore), 1974, 53(5): 391-401.
[2] Mootsikapun P, Intarapoka B, Liawnoraset W. Nocardiosis in Srinagarind Hospital, Thailand: review of 70 cases from 1996-2001[J]. Int J Infect Dis, 2005, 9(3): 154-158.
[3] 曾英琅，刘昌华，吴贵华. 奴卡氏菌病误诊为肺泡癌一例[J]. 临床放射学杂志，2003，22(11)：969.
[4] 李仲兴，郑家齐，李家宏. 诊断细菌学[M]. 香港：黄河文化出版社，1992：2772-2781.

（收稿 2010-11-02 修回 2010-12-21）
（编辑 汪勤俭）