基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0148-04

体外骨对甲状旁腺激素相关蛋白 -141 的双相反应

段炳南,邓锡云,黄 河,张建湘
(中南大学湘雅基础医学院组织学与胚胎学系,长沙 410013)

【摘 要】目的:通过体外器官培养系统,探讨甲状旁腺激素相关蛋白(Parathyroid hormone-related protein,PTHrP)在新骨生成和骨组织破坏方面的效应。方法:将全长 PTHrP(-36~+141)cDNA 克隆进真核表达载体 pcDNA3.1(+),并用重组质粒 pcDNA3.1-PTHrP 转染 LCC15-MB 乳腺癌细胞,在体外器官培养系统里加不同浓度含 PTHrP 的条件培养上清液培养小鼠颅盖骨。通过组织学方法检测 PTHrP141 在新骨形成和骨组织破坏方面的效应。结果:转染的乳腺癌细胞产生的 PTHrP 在低剂量时诱导骨的形成,而高剂量时诱导骨的再吸。结论:PTHrP 在新骨的形成和骨组织的破坏方面因其浓度的不同而具有不同效应。

【关键词】甲状旁腺激素相关蛋白;颅盖骨;成骨细胞;破骨细胞
【中国图书分类法分类号】R331;Q453 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-21

Biphasic responses of bone to parathyroid hormone-related protein-141 in vitro

DUAN Bing-nan, et al
(*Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Central South University*)

【Abstract】*Objective*: To determine the role of PTHrP in new bone formation and bone destruction and the mechanisms involved. *Methods*: LCC15-MB breast cancer cells were transfected with full-length PTHrP-141 cDNA, and the conditioned medium was collected and cultured with mouse calvarial bones in an in vitro organ culture system. The effects of 1PTHrP-141 on new bone formation and bone destruction were examined by histological examination. *Results*: PTHrP produced from transfected breast cancer cells induced new bone formation at lower doses and bone resorption at higher concentrations. *Conclusion*: These results provide direct evidence that PTHrP plays a biphasic role in bone remodeling depending on the concentration administered.

【Key words】Parathyroid hormone-related protein; Calvarial bone; Osteoblast; Osteoclast

骨骼系统是恶性肿瘤细胞转移最常见的部位之一。肿瘤细胞骨转移病理类型通常包括溶骨型和成骨型,且常常是其中一种类型占优势,如乳腺癌和肺癌的骨转移多为溶骨型,而前列腺癌骨转移通常是成骨型[1]。然而,不管肿瘤细胞骨转移是哪一类病理类型,骨的吸收和新骨的形成都显著增加,甲状旁腺激素相关蛋白(Parathyroid hormone-related protein,PTHrP)在调节这一过程起到关键作用[2,3]。至于其具体调节机制,目前国内外鲜见报道。本文利用条件培养液与小鼠的颅盖骨一起培养,通过组织学方法检测 PTHr P141 在新骨形成和骨组织破坏方面的效应,为研究肿瘤的骨转移病理机制提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

总 RNA 提取试剂 TRIZOL、Taq polymerase 购自 Invitrogen 公司;质粒提取试剂盒为美国 Omega 公司产品;RT-PCR 仪为美国 MJ 公司生产的 opticon monitor2。

1.2 细胞培养

建立股骨转移乳腺癌细胞株(LCC15-MB),它们几乎不表达或微量表达 PTHrP[4];具成骨特性的人骨肉瘤细胞株(Saos-2)在添加了胎牛血清和抗生素的达尔伯克培养基中置于 5% CO_2 的培养箱内常规培养;HARA 肺癌细胞在添加了 10%胎牛血清和抗生素的 RPMI-1640 培养液中培养[5],作为 PTHrP-141cDNA 来源。

作者介绍:段炳南(1968-),男,讲师,博士,研究方向:心血管及骨的发生。
通讯作者:张建湘,男,教授,E-mail:zhangjianxiang51@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助(30671104, 30670024)。

1.3 表达 PTHrP 的细胞株及条件培养基的制备

通过 RT-PCR 对 HARA 细胞中抽提出来的总 RNA 进行逆转录，得到全长 PTHrP(-36~+141)cDNA(GenBank accession number NM_198965)，使用高保真 Taq 酶进行扩增。上游引物 5'-CTATAGGCTAGCGAGACGATGCAGCGGAGA-3'，下游引物：5'-CTATAGCTCGAGTCAATGCCTCCGTGA ATC-3'。下划线序列为 *Nhe* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 限制性酶切位点，整个序列被克隆进表达载体 pcDNA3.1(+)，而后者则由 CMV 启动子来控制（Invitrogen）。通过 QIAGEN 小量制备试剂盒来制备 pcDNA3.1-PTHrP 重组质粒，并通过 DNA 序列测定来确定核苷酸序列的准确性。利用 Effectene 转染试剂将 pcDNA3.1-PTHrP 转染至 LCC15-MB 乳腺癌细胞，从而产生稳定的细胞株 LCC15/PTHrP，表达人类 PTHrP。载体 pcDNA3.1 也转染至 LCC15-MB 细胞，所产生的细胞株 LCC15/pcDNA 作为对照。两株细胞通过含有 1 000 μg/ml 的 G418 进行筛选，并保存在含有 10%胎牛血清和 400 μg/ml G418 的达尔伯克培养基中。用 5 ml 不含血清和抗生素的培养液在 T75 烧瓶里培养亚融合转染细胞 48 h，离心弃去细胞碎片，收集条件培养液，分装，-80℃保存，备用。

1.4 RT-PCR 检测 PTHrP 和 PTHrP 受体 1（Parathyroid hormone receptor 1，PTHR1）mRNA 的表达

参照文献[6]通过 RT-PCR 来评价 PTHrP-141mRNA 在转染的 LCC15-MB 细胞中表达，PTHrP-141 和 PTHrP 受体 1 扩增产物大小分别是 501 bp 和 167 bp。应用另一对 PTHR1 引物（上游：5'-AGGAACAGATCTTCCTGCTGC A-3'；下游：5'-TGCATGTGGATGTAGTTGCGCGT-3'）来检测 PTHrP 受体的表达。循环条件：94℃变性 2 min，30 个循环 94℃，30 s，55 ℃，30 s，72℃ 1 min。RT-PCR 产物通过凝胶电泳和溴化乙锭染色分析。

1.5 免疫共沉淀-Western Blot 分析 PTHrP 的产量

从融合性转染 LCC15-MB 细胞收集条件培养液用 1 μg/ml 抗甲状旁腺激素相关蛋白抗体（Ab-2，Calbiochem）4℃孵育 2 h，并与蛋白 G 琼脂糖珠子（Sigma）免疫共沉淀 4℃旋转 2 h。沉淀物用 1×冰冷裂解液（15%甘油，50 mmol/L Tris-HCl，pH7.4，1% NP-40 200 mmol/L NaCl，5 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/L PMSF，1×蛋白酶抑制因子）。用 1.5XSDS 样本缓冲液（1X：62.5 mmol/L Tris-HCl，pH 6.8，2% SDS，10%甘油，50 mmol/L DTT，0.01%溴酚蓝），将溶细胞产物从珠子上释放出来，煮沸 5 min，在 15%甘氨酸凝胶上分离，转至聚偏氟乙烯膜（PVDF）上。膜用一抗封闭、吸干，再用辣根过氧化物酶接合的二抗孵育后用电化学发光法检测。

1.6 免疫放射沉淀测定

通过免疫放射沉淀测定（IRMA）来检测条件培养基中由 LCC15/PTHrP 和 LCC15/pcDNA 细胞 PTHrP-141 的分泌[7]。

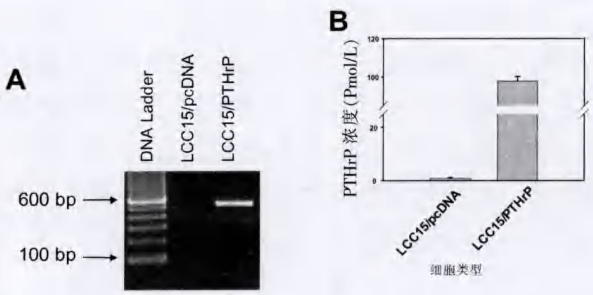
1.7 小鼠颅盖骨在含有 PTHrP 条件培养基（CM）中的培养

所有的颅盖骨取自 4 日龄 BL6 小鼠，方法步骤参照文献[7]。颅骨盖在 12 孔板中加入添加了 50 μg/ml 硫酸双生霉素和 0.1%的放射免疫级牛血清白蛋白的 1 ml BGJb（Invitrogen）介质中培养。培养第 3 d，用从 LCC15/PTHrP 细胞收集的不同稀释浓度的培养液（在 1 ml 骨培养基中分别含有 0 μl，10 μl，50 μl，200 μl 的条件培养液）连续培养 7 d，每天换相同培养液。

2 结 果

2.1 转染后 LCC15-MB 细胞的 PTHrP 的产量

为确定 PTHrP-141 在转染细胞中的表达，我们测定了从转染 LCC15-MB 细胞获得的 PTHrP-141 的 RNA（mRNA）和 CM（蛋白）来确定 PTHrP 的产量。在 LCC15-MB 细胞中检测到高水平的 PTHrP mRNA（图 1）和蛋白（图 1B），而以载体转染的 LCC15-MB 细胞中却没有检测到 PTHrP mRNA 和蛋白。通过免疫放射分析测定转染的 LCC15-MB 细胞PTHrP 的分泌量，与 LCC15/pcDNA 细胞（0.86±0.48）pmol/L，mean±SD）相比，在 LCC15/PTHrP 细胞中显著增高（98±2.3）pmol/L，mean±SD）。



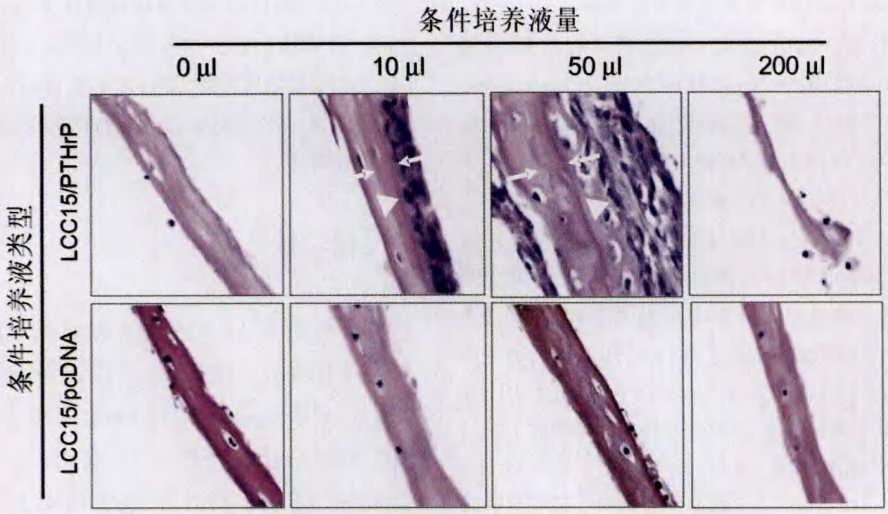
A. 用 RT-PCR 法可在 LCC15/PTHrP 检测到 PTHrP 的表达，而 LCC15/pcDNA 中未见 PTHrP 的表达。

B. 免疫沉淀 -Western 印迹法证实 LCC15/PTHrP 条件培养基中 PTHrP 的表达。

图 1 转化的 LCC15-MB 细胞分泌 PTHrP

2.2 LCC15-MB 细胞分泌 PTHrP 引起新骨形成及骨质重吸收的变化

从 LCC15/PTHrP 细胞制备的 CM 在小鼠颅骨器官培养基中刺激新骨的形成和骨的重吸收主要依赖其所使用的剂量（图 2）。在低剂量 CM 下（10~15 μl/ml，PTHrP 的终浓度约 1~5 pmol/L），新生骨增生的区域和在培养的颅盖骨里成骨细胞的数量比原始骨都显著增加。反之，在高剂量（200 μl/ml，终浓度约为 20 pmol/L）PTHrP 下引起颅盖骨的广泛破坏（图 2，上组）。而从载体转染细胞制备的 CM 对骨形成和骨质破坏均没有变化。



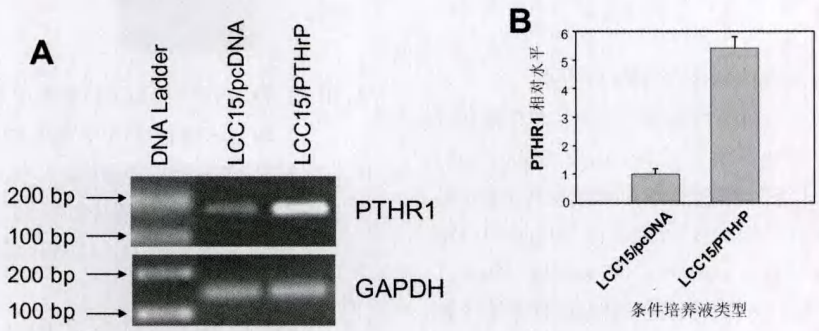
新生小鼠颅盖骨用不同体积的 LCC15/PTHrP 或 LCC15/pcDNA 细胞条件培养基培养 7 d。上排：当用小体积的 LCC15/PTHrP 条件培养基(10 μl/ml 或 50 μl/ml)培养时，可见小鼠颅盖骨新骨形成(↑)、成骨细胞(▲)；用大体积(200 μl/ml)的条件培养基进行培养时可见颅盖骨骨质的破坏。下排：用 PTHrP/pcDNA 的条件培养基进行培养时未见上述现象。

图 2　PTHrP 对小鼠颅盖骨的作用(HE 染色，放大倍数 400×)

2.3　PTHrP 处理诱导成骨细胞的分化

PTHR1 是成骨细胞分化的标志之一，成骨细胞分化时只起暂时调节作用，我们在 mRNA 水平研究了 PTHrP 处理后对 PTHR1 的影响。用从 PTHrP 转染细胞收集的 CM 对骨肉瘤细胞进行处理，能使 PTHR1(RT-PCR 产物大小：167 bp)mRNA 表达显著增加，这与 PTHrP 诱导成骨细胞的分化相一致。但从载体转染细胞收集的 CM 没有观察到这种效应(图 3)。用第二对 PTHR1 的引物扩增后被证实也具有同样的效果。

3　讨　论



LCC15/PTHrP 条件培养基明显诱导 Saos-2 细胞中 PTHR1 的表达，而 LCC15/pcDNA 条件培养基不能诱导

图 3　用条件培养基处理后 Saos-2 细胞中 PTHR1 的 RT-PCR 分析

以往的研究认为 PTHrP 是引起恶性肿瘤体液性高钙血症的原因之一[8]，现有的研究证实 PTHrP 在胎儿和成人的多种组织中有表达[9]。不管在体内或体外，PTHrP 都能通过破骨细胞来抑制骨的重吸收，同时通过诱导成骨细胞的有丝分裂来增加骨的形成。PTHrP 及其受体在小鼠体内的定向灭活导致小鼠整个骨骼的发育缺陷，与围生期的软骨发育不全和死亡相一致。另外，PTHrP 在缺乏甲状旁腺激素的裸鼠体内时，能够增加骨小梁容积，这主要是因为其羧基末端片段具有抑制骨的重吸收和刺激成骨细胞的有丝分裂的作用[10]。

而 Horwitz 等[11]报道相反：持续的 PTHrP 的输入能抑制骨形成以及影响 1,25 $(OH)_2$ 维生素 D 的作用。这些研究表明 PTHrP 对于骨的重建是一个重

要的调节剂，但是它对骨重建的调节机制我们仍然知之甚少。我们利用动物试验，以免疫放射沉淀测定和组织学方法检测 PTHrP141 在新骨形成和骨组织破坏方面的作用。

本研究发现 PTHrP-141 的剂量依赖性可以导致新生骨的形成以及骨质的破坏。我们收集了转染乳腺癌细胞的 CM 作为 PTHrP 的来源，但出现的结果主要是由于 PTHrP 引起，而不是乳腺癌细胞分泌的其它细胞因子，这可以通过从载体转染细胞收集的 CM 作为所有试验的对照但并没有引起 PTHrP 相似的效用来证实。骨的重建是一个协调的过程，它由一组肿瘤坏死因子受体及其配体家族成员来调节[12]。Miao 等[13]报道：局部释放的 PTHrP 必须在时间和空间上进行紧密调节且只有短暂的高水平的 PTHrP 才能对骨的形成有效，而长期增加局部 PTHrP 水平反而促进破骨细胞的形成。实际上，PTHrP 的分泌是一种可调节的方式，主要依赖于分泌 PTHrP 的细胞的类型，或者是分化细胞的不同状态及癌细胞株的特殊的缺陷类型[14]，其具体的调节机制有待以后进一步研究。

本研究证实：PTHrP 在低浓度时能增加成骨细胞的分化，抑制破骨细胞的激活，从而促进骨的生成。而当 PTHrP 在高浓度时，能诱导破骨细胞的激活，最终导致骨质破坏。这提示 PTHrP 在体外颅骨的重建方面具有双重作用，这为研究 PTHrP 在骨代谢调节机制、癌细胞的骨转移病理机制提供了一定理论依据。

参 考 文 献

[1] Mundy G.R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8): 584-593.

[2] Blair JM, Zhou H, Seibel MJ, et al. Mechanisms of disease: roles of OPG, RANKL andRANK in the pathophysiology of skeletal metastasis[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2006, 3(1):41-49.

[3] Liao J, McCauley LK. Skeletal metastasis: Established and emerging roles of parathyroid hormone related protein (PTHrP)[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(4):559-571.

[4] Thompson E.W, Sung V, Lavigne M, et al. LCC15-MB:a vimentin-positive human breast cancer cell line from a femoral bone metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 1999, 17(3): 193-204.

[5] Iguchi H, Katakami H, Ichinose Y, et al. A case of squamous cell lung carcinoma with high concentration of parathyroid hormone-related peptide in serum and pleural effusion presenting hypercalcemia[J]. Jpn J Cancer Res, 1993, 84(4):419-424.

[6] Richard V, Luchin A, Brena R.M, et al. Quantitative evaluation of alternative promoter usage and 3' splice variants for parathyroid hormone-related protein byreal-time reverse transcription-PCR[J]. Clin Chem, 2003, 49(8):1398-1402.

[7] LeRoy.B.E, Sellers.R.S, Rosol.T.J.Canine prostate stimulates osteoblast function using the endothelin receptors[J]. Prostate, 2004, 59(2): 148-156.

[8] Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, et al. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis[J]. Clin Invest, 1996, 98:1544-1549.

[9] Okoumassoun L, Averill-Bates D, Denizeau F, et al. Parathyroid hormone related protein(PTHrP) inhibits TNFalpha-induced apoptosis by blocking the extrinsic and intrinsic pathways.[J]. J Cell Physiol, 2007, 210 (2):507-516.

[10] Miao D, Li J, Xue Y, et al. Parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice[J]. Endocrinology, 2004, 145: 3554-3562.

[11] Horwitz M.J, Tedesco M.B, Sereika S.M, et al. Continuous PTH and PTHrP infusion causes suppression of bone formation and discordant effects on 1, 25(OH)2 vitamin D[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(10): 1792-1803.

[12] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89: 309-319.

[13] Miao D, He B, Jiang Y, et al. Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent That modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34[J]. Clin Invest, 2005, 115:2402-2411.

[14] Jemtland R, Rian E, Dunstan, CR, et al. Two human osteoblast-like osteosarcoma cell lines show istinct expression and differential regulation of parathyroid hormone-related protein[J]. Bone Miner Res, 1999, 14: 904-914.

（责任编辑：关蕴良）