

成骨生长肽对不同血清浓度下 OPG^{-/-}小鼠骨髓基质细胞增殖和分化作用

郭常军¹ 费琴明^{1△} 张 键¹ 陈统一¹ 崔大敷²

¹复旦大学附属中山医院骨科 上海 200032;

²中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

【摘要】 目的 研究合成成骨生长肽(synthetic osteogenic growth peptide, sOGP)对在不同血清浓度条件下 OPG^{-/-}小鼠骨髓基质细胞(bone marrow derived stroma cells, BMSCs)的增殖和分化作用。**方法** 取 OPG^{-/-}小鼠股骨,分离骨髓基质细胞进行体外培养。在各自培养条件下分为实验组(OGP组)、空白对照组(CON组)和阳性对照组(bone morphogenetic protein-2 group, BMP-2组),倒置相差显微镜下观察细胞形态变化、MTT法测定细胞增殖率、PNPP法测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的表达。**结果** OGP在含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的LG-DMEM和矿化液的培养条件下,对 OPG^{-/-}小鼠 BMSCs 起到增殖作用,在第3、5天均高于 CON组和 BMP-2组($P < 0.05$);OGP组对 ALP表达的影响与 CON组相似,而与 BMP-2组存在较大差异,BMP-2组在所有不同血清浓度条件下的第3、5天 ALP活性均高于 CON组和 OGP组($P < 0.05$)。**结论** OGP组对 OPG^{-/-}小鼠 BMSCs 的增殖作用要求较高血清浓度的体外培养条件,但在 ALP的分化活性方面弱于 BMP-2组。

【关键词】 成骨生长肽; OPG^{-/-}小鼠; 骨髓基质细胞; 增殖; 分化

【中图分类号】 Q 813 **【文献标志码】** A

Effect of synthetic osteogenic growth peptide on proliferation and differentiation of OPG^{-/-} BMSCs in different serum concentration

GUO Chang-jun¹, FEI Qin-ming^{1△}, ZHANG Jian¹, CHEN Tong-yi¹, CUI Da-fu²

¹Department of Orthopaedics, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,

Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of synthetic osteogenic growth peptide (sOGP) on proliferation and differentiation of the cultured bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) of OPG (osteoprotegerin) gene knockout mouse. **Methods** Cultured adherent BMSCs (from OPG^{-/-} mouse femoral bone) were used in the study. BMSCs were divided into OGP, CON (control) and BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) groups. Morphological changes were observed under inverted phase contrast microscope, proliferation curves were obtained by MTT method, and the expression of alkaline phosphatase was detected by PNPP method. **Results** OGP promoted the proliferation of BMSCs, which increased more significantly in the OGP group than in the other two groups ($P < 0.05$, MTT curves) when cells were cultured in LG-DMEM with 10% FBS (fetal bovine serum) medium supplemented with 1×10^{-8} mol/L dexamethasone, 1×10^{-2} mol/L β -glycerophosphate and 50 μ g/mL ascorbic acid on the 3rd and 5th days. The effect of OGP on ALP expression was similar to the CON group, but inferior to the BMP-2 group. ALP expression of BMSCs in BMP-2 group increased significantly in the other two groups ($P < 0.05$) on the 3rd and 5th days in different serum concentrations. **Conclusions** High serum concentration of sOGP promotes the proliferation of OPG^{-/-} BMSCs, however, its effect on ALP expression was inferior to BMP-2.

【Key words】 osteogenic growth peptide; OPG^{-/-} mouse; mesenchymal stem cells; proliferation; differentiation

成骨生长肽(osteogenic growth peptide, OGP)是以色列学者 Bab 等^[1]在研究骨髓再生过程中出现全身骨量增加现象时发现的一种多肽,在体外它具有促进成骨细胞增殖、分化、成熟的作用,在体内也能促进全身骨量的增加。OGP 可通过自分泌/旁分泌机制调控体外培养细胞的增殖,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性和基质矿化;体内试验表明 OGP 可调控 I 型胶原和成纤维生长因子受体的表达水平^[2],在卵巢切除的雌性小鼠骨质疏松模型中,给予皮下注射 OGP 后,可以逆转骨小梁中的骨量丢失^[3]。我科与中科院上海生化所合作通过固相肽合成法人工合成了成骨生长肽(synthetic osteogenic growth peptide, sOGP)^[4]。

在研究骨质疏松症的动物模型中,目前大多数是在动物发育过程中诱导造模,比如卵巢切除骨质疏松症模型、药物性骨质疏松症模型等。目前,已经有骨保护素(osteoprotegerin, OPG)基因剔除小鼠导致骨质疏松模型^[5]。2005 年上海南方模式动物中心成功建立了以 129 系小鼠为背景的 OPG^{-/-}小鼠模型,为研究骨质疏松的机制提供了良好的平台。目前对此类模型来源的细胞研究较少,为更好地研究 OGP 对 OPG^{-/-}小鼠骨髓基质细胞(bone marrow derived stroma cell, BMSC)的作用,我们探讨了在不同培养条件下 OGP 的作用效果。

材料和方法

实验动物 8 只健康 OPG^{-/-}小鼠,12 周龄,雄性,体重(25±5)g,由上海南方模式动物中心提供。

主要试剂和仪器 sOGP(中科院上海生化所);骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2, Sigma 公司);LG-DMEM(low glucose-dulbecco modified eagle medium, 美国 Gibco 公司)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 美国 Ibc 公司)、二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 上海思吉生物制品有限公司),十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, 上海思吉生物制品有限公司),0.25%胰蛋白酶;酶标仪(Bio-TekElx800, 美国);倒置相差显微镜(Olympus, 日本),二氧化碳培养箱(Heraeus, 德国)。

骨髓基质原代细胞培养和诱导分化

原代细胞培养与传代 取 12 周龄雄性 OPG^{-/-}小鼠 2 只,颈椎脱位法处死后,于无菌条件下取出双侧股骨,用无菌针管吸取 5 mL 含 10%FBS 的 LG-

DMEM 培养液(包括 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素),冲洗骨髓腔,所得细胞按 1×10⁷/瓶接种于 25 cm² 培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。第 3 天换液,弃悬浮细胞。以后 3 d 换液 1 次,记为 P₀代细胞。待 P₀代细胞生长融合 90%,PBS 冲洗,0.25%胰蛋白酶消化,培养液终止消化,血细胞计数器计数,然后记为 P₁。

BMSCs 的诱导分化 将 P₁细胞按 10⁴/孔接种于 96 孔细胞培养板中,给予 10%FBS 的 LG-DMEM 培养液培养 24 h 更换培养液。设无 FBS、2%FBS、5%FBS 和 10%FBS 4 种培养条件,每种培养条件各有 24 孔。培养液更换为含相应血清浓度+矿化液(1×10⁻⁸ mol/L 地塞米松+1×10⁻² mol/L β-甘油磷酸钠+50 μg/mL L-抗坏血酸),我们将此培养基称为实验用培养基。在每种培养条件下分为实验组(OGP 组)、空白对照组(CON 组)和阳性对照组(BMP-2 组),每组 8 孔,其中 OGP 组的终浓度为 10⁻⁹ mol/L (4%牛血清清蛋白稀释, bovine serum albumin, BSA),CON 组加入等量的 4%BSA, BMP-2 组终浓度为 0.1 μg/mL (4%BSA 稀释)。所有培养液每 2 天换 1 次。在第 1、3、5 天共计 3 个时间段进行观察。

MTT 法测定细胞增殖 按上述方法培养细胞,第 1、3、5 天,分别在所需检测的培养孔内加入 100 μL 无血清改良 eagle 培养基(modified eagle's medium, MEM)培养液和 MTT 的混合液,37℃孵育 4 h,每孔加入 10% SDS 100 μL,37℃孵育 2 h,振荡均匀,酶标仪 570 nm 波长检测吸光度值 D₅₇₀。

PNPP 法测定细胞内 ALP 活性 按上述方法培养细胞,分别在第 1、3、5 天取出相应的板,弃去上清液,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗 2 次,每孔加入二乙醇胺(diethanolamine, DEA)和 PNPP(二者比例 2:1)150 μL,37℃孵育 30 min,然后加入 0.2 mol/L 的 NaOH 50 μL,振荡均匀,酶标仪 405 nm 波长检测吸光度值 D₄₅₀。

统计学分析 数据分析用 STATA 7.0 软件分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组之间数据比较采用 ANOVA,方差不齐时,采用 Kruskal-Wallis 检验,两两比较采用 Bonferroni 法,以 P<0.05 为有统计学意义。

结 果

原代细胞培养 倒置相差显微镜下观察原代培养的骨髓基质干细胞,24 h 后出现贴壁细胞,细胞

呈梭形、星形、梭形多见;第3天可见小梭型贴壁细胞,伴大量小圆细胞;第10天细胞出现汇合,小圆细

胞消失(图1)。

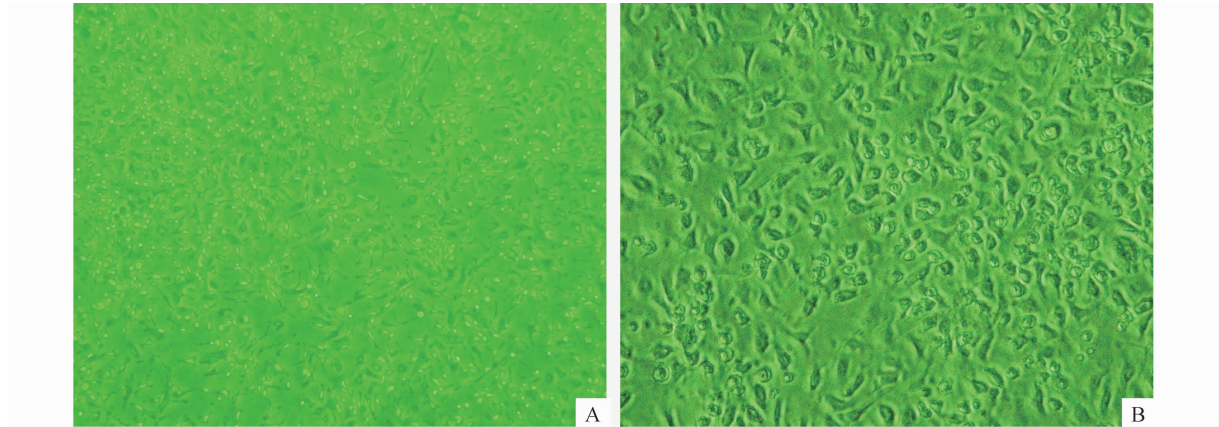


图1 P₀代的 OPG^{-/-}小鼠骨髓基质细胞

Fig 1 Primary BMSCs of OPG^{-/-} knockout mice

A: ×40; B: ×100

BMSCs were cultured in experimental culture medium and were shown at the 10th day after plating.

不同血清浓度 BMSCs 增殖结果 在含有矿化液的培养条件下,我们观察不同血清浓度下 OPG^{-/-}小鼠 BMSCs 的增殖情况。MTT 检测表明,血清浓度越低,细胞增殖越慢,反映到图 2 上第 5 天的 D₅₇₀ 值较小。通过统计学分析,我们发现 OGP 组在含有 10% FBS 的实验用培养基条件下,第 3 天和第 5 天的增殖较 CON 组和 BMP-2 组明显升高(图 2)。其余各组差异均无统计学意义(表 1)。

不同血清浓度活性 ALP 结果 在含有矿化液的培养条件下,我们观察不同血清浓度下 OPG^{-/-}小鼠 BMSCs 的 ALP 结果。在不同血清浓度的培养条件下,测定 D₄₀₅ 值,发现 BMP-2 组在不同培养条件下的第 3 和第 5 天明显高于 CON 和 OGP 组(P<0.05,表 2,3)。而 OGP 组与空白对照组差异无统计学意义。在含有 10% FBS 的实验用培养基下,OGP 对

OPG^{-/-}小鼠 BMSCs 的 ALP 作用结果见图 3。

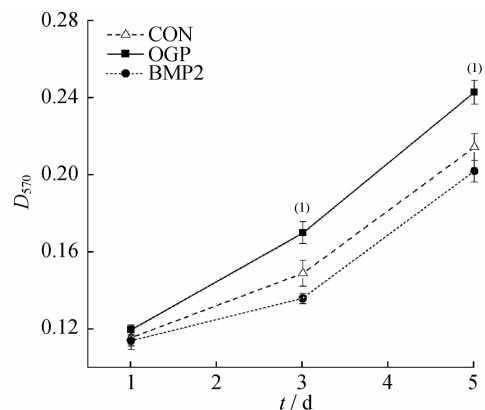


图2 OGP对 OPG^{-/-}小鼠 BMSCs 的增殖作用

Fig 2 Effect of OGP on OPG^{-/-} BMSCs proliferation

P₁ OPG^{-/-} BMSCs were cultured in experimental culture medium supplied with 10% FBS. ⁽¹⁾ vs. CON group, P<0.05.

表1 OGP组和CON组 MTT 结果

Tab 1 Results of MTT between OGP and CON group

Days	0%FBS		2%FBS		5%FBS		10%FBS	
	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
1 st	0.026 7	0.987 0	4.406 0	0.110 5	0.695 4	0.706 0	8.129 0	0.583 0
3 rd	2.050 6	0.359 0	0.283 7	0.868 0	1.557 7	0.459 0	2.132 2	0.003 0
5 th	1.485 8	0.476 0	3.750 2	0.153 0	4.672 6	0.097 0	0.278 0	0.039 0

讨 论

OGP 在促成骨和加速骨折愈合等方面的效果已在一些文献中得到证实^[6-9],但 OGP 对体外培养细胞是否有增殖作用仍然存在争议:Nicole 等^[10]在研究 MC3T3-E1 成骨细胞系中发现 OGP 促进其增

殖;Nidal 等^[11]在研究 MC3T3-E1 成骨细胞系中发现 OGP 通过激活 MAPK 的信号传导通路促进其增殖;Miguel 等^[12]研究推测 OGP 通过激活 ERK1/2 信号传导促进 MC3T3-E1 细胞增殖,并且通过 MEK(ERK1/2 活化酶)阻断剂 PD098059 可以抑制细胞增殖;Letizia 等^[13]在研究 Mo-7e 细胞系时发现 OGP 抑制增殖,促进分化。为更好地探讨 OGP 的

表 2 OGP 组和 CON 组 PNPP 结果

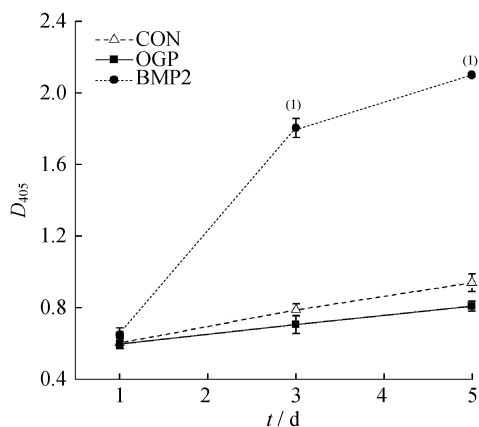
Tab 2 Results of PNPP between OGP and CON group

Days	0%FBS		2%FBS		5%FBS		10%FBS	
	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>
1 st	2.955 9	0.287 0	2.227 2	1.000 0	1.924 1	1.000 0	0.917 1	1.000 0
3 rd	2.344 3	1.000 0	15.648 0	0.430 6	3.447 4	1.000 0	3.075 5	0.157 0
5 th	15.687 0	0.400 5	17.368 0	0.053 7	17.899 0	0.058 0	15.368 0	0.958 1

表 3 BMP-2 组和 CON 组 PNPP 结果

Tab 3 Results of PNPP between BMP-2 and CON group

Days	0%FBS		2%FBS		5%FBS		10%FBS	
	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>
1 st	2.955 9	0.116 0	2.227 2	0.904 0	1.924 1	0.013 0	0.917 1	0.936 0
3 rd	2.344 3	0.000 0	15.648 0	0.000 8	3.447 4	0.000 0	3.075 5	0.000 0
5 th	15.687 0	0.000 8	17.368 0	0.000 8	17.899 0	0.000 8	15.368 0	0.000 8

图 3 OGP 对 OPG^{-/-} BMSCs 的 ALP 作用Fig 3 Effect of OGP on OPG^{-/-} BMSCs ALP

P₁ OPG^{-/-} BMSCs were cultured in experimental culture medium supplied with 10%FBS, ⁽¹⁾ vs. CON group, *P* < 0.05.

增殖作用,我们采用不同血清浓度,研究发现:OGP 对在 5%FBS 以下的血清浓度没有增殖作用,但在 10%FBS 的浓度下观察到第 3 天和第 5 天有增殖作用,这说明 OPG^{-/-} 小鼠 BMSCs 增殖作用的体现需要一定的条件,同时其在 10%FBS 的增殖作用强于 BMP-2 组,当然对于更高浓度的血清我们没有进行试验。我们分析其增殖作用的原因:(1)10%FBS 为体外培养的 OPG^{-/-} 小鼠 BMSCs 提供了所需的营养成分,而较低浓度的血清达不到相应的营养水平;(2)OGP 在较高血清浓度的作用下,结合 β -甘油磷酸钠为细胞提供磷酸根成分^[14],可能激活了细胞周期的一些信号传导通路,如 CyclinA/CDK2,进而促进了细胞周期,目前具体传导途径有待进一步研究。

为研究 OGP 在不同血清浓度下对 OPG^{-/-} 小鼠 BMSCs 诱导分化作用,本实验设置 0~10%的不同浓度血清影响细胞诱导分化,分析 ALP 的活性大

小。ALP 是成骨细胞分化成熟的标志性酶之一,在成骨过程中 ALP 可以水解磷酸酯,为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸,其活性高低一定程度上可以反映出细胞的成骨分化能力^[15]。在体外,由于 BMSCs 是一种多潜能干细胞,具有很强的增殖和自我更新能力,并具有多向分化潜能^[16]。本实验中我们采用 OPG^{-/-} 小鼠,培养所得的 BMSCs 在形态特征和生长特性方面与正常小鼠相比:传至第 3 代的情况下,细胞生长速度很慢,很难融合,故我们选择 P₁ 代细胞进行实验。但在形态上,显微镜下观察未见明显差异。BMSCs 未发现有自动分化的现象,其分化需要适宜的培养条件或诱导剂,目前经典的体外诱导 BMSCs 向成骨方向转化的方案是地塞米松 + β -甘油磷酸钠 + L-抗坏血酸^[15]。我们在研究 OGP 对 OPG^{-/-} 小鼠 BMSCs 的促成骨作用时,发现在含有矿化液的培养条件下,在不同血清浓度条件下与 CON 组的差异均无统计学意义,而 BMP-2 组在不同血清浓度条件下的第 3 天和第 5 天其 ALP 活性均高于 OGP 组。BMP-2 是已上市的具有促成骨作用的药物,而我们的实验结果同样证实了其促分化作用,从而间接证明了实验体系的安全性和可靠性。从结果上看,这与以往 OGP 对体外培养细胞的促分化作用不同^[15,17-19],我们选择的动物模型其成骨活性因破骨活性的增强而继发增强,符合高转换型骨质疏松症表现,而且 OPG^{-/-} 小鼠的 ALP 值明显高于野生型小鼠^[20]。我们推论出现以上结果的原因:(1)ALP 活性测定是大体观察效果,OGP 的促分化作用是否由于在促进 OPG^{-/-} 小鼠 BMSCs 增殖的基础上显现,而我们的观察时间相对较短没有观察到该效果;(2)OGP 是否已使促分化基因如 Runx2 上调^[17],但尚未表现出 ALP 活性增加,具体的基因水平调节尚待测定;(3)OGP 的

促成骨分化作用可能是通过 OPG 基因起作用, OPG 基因敲除后其作用无法体现。

致谢 复旦大学放射医学研究所金慰芳和高建军老师对实验设计进行了指导,徐小雅老师在细胞培养方面进行了指导。

参 考 文 献

- [1] Bab I, Gazit D, Chorev M, *et al.* Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): A novel circulating stimulator of osteoblastic activity[J]. *EMBO*, 1992, 11(5): 1 867 - 1 873.
- [2] Bab I, Chorev M. Osteogenic growth peptide; from concept to drug design[J]. *Biopolymers*, 2002, 66(1): 33 - 48.
- [3] Chen YC, Bab I, Mansur N, *et al.* Structure-bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10 - 14)] [J]. *Peptide Res*, 2000, 56(3): 147 - 156.
- [4] Liu ZH, Shao YC, Chen HH, *et al.* Synthesis of osteogenic growth peptide and its synergetic effect with granulocyte colony stimulating factor[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35(2): 177 - 181.
- [5] Mizuno A, Amizuka N, Irie K, *et al.* Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin [J]. *Biochem and Biophys Res Commun*, 1998, 247(3): 610 - 615.
- [6] Brager MA, Patterson MJ, Connolly JF, *et al.* Osteogenic growth Peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has Local and systemic effects on fracture healing in rats[J]. *J Orthop Res*, 2000, 18(1): 133 - 139.
- [7] Sun YQ, Ashhurst DE. Osteogenic growth peptide enhances the rate of fracture healing in rabbits[J]. *Cell Biol Int*, 1998, 22(4): 313 - 319.
- [8] Gabet Y, Muller R, Regev Er, *et al.* Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties[J]. *Bone*, 2004, 35(1): 65 - 73.
- [9] 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[J]. *生物化学与生物物理学学报*, 2001, 33(4): 415 - 420.
- [10] Moore NM, Lin NJ, Gallant ND, *et al.* The use of immobilized osteogenic growth peptide on gradient substrates synthesized via click chemistry to enhance MC3T3-E1 osteoblast proliferation[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(7): 1 604 - 1 611.
- [11] Gabarin N, Gavish H, Muhlard A, *et al.* Mitogenic G(i) protein-MAP kinase signaling cascade in MC3T3-E1 osteogenic cells: activation by C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10 - 14)] and attenuation of activation by cAMP[J]. *J Cell Biochem*, 2001, 81(4): 594 - 603.
- [12] Miguel SM, Namdar-Attar M, Noh T, *et al.* ERK1/2-activated de novo Mapkapk2 synthesis is essential for osteogenic growth peptide mitogenic signaling in osteoblastic cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(45): 37 495 - 37 502.
- [13] Mattii L, Battolla B, Moscato S, *et al.* The small peptide OGP (10 - 14) acts through Src kinases and RhoA pathways in Mo-7e cells: Morphologic and immunologic evaluation [J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14(6): BR103 - 108.
- [14] Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH, *et al.* Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats[J]. *Cell Tissue Res*, 1988 254(2): 317 - 330.
- [15] 徐杨, 施德源, 陈统一. 合成成骨生长肽对大鼠骨髓基质干细胞的促成骨作用[J]. *复旦学报: 医学版*, 2006, 33(3): 309 - 313.
- [16] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(3): 180 - 192.
- [17] 王璐, 徐凌, 梁星. 成骨生长肽对大鼠骨髓基质细胞增殖分化的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(18): 1 783 - 1 786.
- [18] 王智兴, 李群, 朱亚萍. 成骨生长肽对成骨细胞样细胞的成骨影响[J]. *中华骨科杂志*, 2000, 20(1): 54 - 56.
- [19] 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[J]. *上海医学*, 2008, 31(6): 430 - 433.
- [20] 陈子贤, 盛哲津, 邵云潮, 等. 骨保护素基因敲除小鼠发生骨质疏松症的特征[J]. *复旦学报: 医学版*, 2007, 34(3): 373 - 377.

(收稿日期: 2009 - 12 - 05; 编辑: 王蔚)