

网络出版时间:2016/1/28 14:23:10 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160128.1423.012.html

成骨细胞特异性识别多肽 对人成骨细胞增殖和矿化影响的实验研究

钱海燕,陈慧敏,杜明亮,吴明月,李全利

摘要 目的 观察成骨细胞特异性识别多肽对人颅骨成骨细胞(HCO)增殖和矿化作用的影响。方法 体外常规培养人颅骨成骨细胞,分为5个实验组(10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L)以及空白对照组,MTT法检测细胞的增殖,紫外分光光度法检测细胞碱性磷酸酶(ALP)的表达,茜素红染色及半定量分析检测细胞矿化程度,RT-QPCR法检测细胞骨钙素(OCN)mRNA的表达。结果 此浓度范围内的特异性多肽对成骨细胞增殖有促进作用($P < 0.05$),最大效应浓度是 10^{-5} mol/L;能增加ALP活性($P < 0.05$),最大效应浓度是 10^{-4} mol/L。通过茜素红染色观察和半定量分析,14、21 d实验组钙盐沉积量高于对照组,半定量分析结果显示浓度 10^{-5} mol/L时,吸光度(OD)值最高,但差异无统计学意义;RT-QPCR法显示14、21 d实验组OCN mRNA表达量均高于对照组($P < 0.05$)。结论 10^{-8} ~ 10^{-4} mol/L浓度范围的成骨细胞特异性识别多肽能够促进人颅骨成骨细胞的增殖和

矿化,且在 10^{-5} mol/L浓度促进成骨细胞增殖及矿化相关蛋白表达最为显著。

关键词 成骨细胞特异性识别多肽;人颅骨成骨细胞;增殖;矿化

中图分类号 R 318-33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0337-04

成骨细胞是骨组织中的重要细胞,骨愈合过程中的新骨形成主要是由成骨细胞参与完成。临床上牙拔除后牙槽骨的愈合以及牙种植体植入颌骨后骨结合的形成,皆需要进行以成骨为主的组织修复,因此,成骨细胞成为骨组织修复研究领域中最关注的细胞之一。而通过体外实验研究诸如生长因子等相关生物活性分子对成骨细胞增殖矿化的调控,对于了解其在骨形成中的作用及其应用具有重要意义^[1]。该研究采用的成骨细胞特异性识别多肽,是课题组前期的研究成果,即以人的颅骨成骨细胞为阳性靶细胞,对噬菌体展示十二肽库进行全细胞差减筛选,获得与人成骨细胞特异性结合多肽,其氨基酸序列为:VLAVPWSEPGYL。该研究的目的在于探讨成骨细胞特异性识别多肽对人成骨细胞增殖和矿

2015-12-21 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81170993)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:钱海燕,女,硕士研究生;

吴明月,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail:wumingyue321@126.com

Acidic extracellular microenvironment promotes PC-3 cell migration and enhances the activity of Rac1

Gao Li¹, Tan Ning², Zhang Tianyu¹, et al

(¹Dept of Urology, The Affiliated Hospital, Guilin Medical College, Guilin 541004;

²The Center of Science Research, Guilin Medical College, Guilin 541004)

Abstract **Objective** To investigate whether tumor acidic-microenvironment can promote the migration of human prostatic carcinoma cell PC-3. **Methods** PC-3 cells were cultured in media with different pH values (pH 7.4, pH 7.0, pH 6.6). Invasion and migration assay were utilized to analyze the metastasis of PC-3 cells *in vitro*. F-actin fluorescence staining was performed and observed by laser confocal scanning microscope. The activation of Rac1 was examined by western blot. **Results** Acidic microenvironment could enhance the capacity of PC-3 cell migration and invasion remarkably ($P < 0.01$). Meantime, the intensity of F-actin significantly was increased and the activity of Rac1 was up-regulated. **Conclusion** The results suggest that acidic microenvironment may be involved in cancer metastasis and play an important role in promotion of cancer metastasis.

Key words acidic extracellular microenvironment; human prostatic cancer; migration; actin; Rac1

化功能的影响,摸索出成骨细胞特异性识别多肽体外促进人成骨细胞增殖矿化的最佳有效浓度,为该特异性多肽的进一步研究及应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 α -MEM 培养基、胎牛血清(美国 HyClone 公司);成骨细胞特异性识别多肽(上海科肽生物科技有限公司);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);碱性磷酸酶试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司);MTT 试剂盒(中国索莱宝生物科技有限公司);茜素红染液、氯化十六烷基吡啶(美国 Sigma 公司);SYBR Premix Ex TaqII 染料法荧光定量试剂盒、One Step RNA PCR Kit 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);塑料培养瓶培养板(美国 Corning 公司);CO₂ 孵箱(美国 Thermo 公司);双人双面超净工作台(苏州净化设备厂);酶标仪(美国 Bio-tek 公司);荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);移液器(德国 Eppendorf 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人颅骨成骨细胞株购于上海抚生实验有限公司,10% FBS 的 α -MEM 培养基常规培养,细胞融合约 80%~90%时,1:2 比例传代,每 3 d 换液一次。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖 实验组:特异性多肽用 10% FBS 的 α -MEM 培养基配成 5 个浓度组,即 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L。对照组:10% FBS 的 α -MEM 培养基培养。细胞消化后, 8×10^4 个/ml 的细胞密度接种于 96 孔板中,24 h 后实验组更换含多肽培养液继续培养,于 4、7 d 取出 96 孔板,进行 MTT 检测,酶标仪 490 nm 波长下测各孔吸光度(optical density, OD)值。

1.2.3 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测 分组同上。细胞消化后, 8×10^4 个/ml 的细胞密度接种于 6 孔板中,24 h 后实验组更换含多肽培养液继续培养,于 4、7 d 取出 6 孔板,按照 ALP 检测试剂盒步骤检测。将 ALP 活性除以细胞总蛋白即可得到单位蛋白含量的相对 ALP 活性。

1.2.4 茜素红染色及半定量分析检测细胞钙化程度 分组同上。细胞消化后, 8×10^4 个/ml 的细胞密度接种于 24 孔板中,24 h 后实验组更换含多肽培养液继续培养,于 14、21 d 取出 24 孔板,PBS 冲洗,4% 多聚甲醛固定,1% 茜素红染色,扫描仪扫描照片。每孔加入氯化十六烷基吡啶,室温下放置 30 min。待茜素红溶解后,酶标仪 562 nm 波长下测 OD

值。

1.2.5 RT-QPCR 检测细胞 OCN mRNA 的表达 分组同上。细胞消化后, 8×10^4 个/ml 的细胞密度接种于 6 孔板中,24 h 后实验组更换含多肽培养液继续培养,于 14、21 d 取出 6 孔板,按照 TRIzol RNA 提取试剂盒提取每组样本 RNA,One Step RNA PCR Kit 说明书进行逆转录。RT-QPCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成并经质量检测, β -actin 上游序列及下游序列分别是 5'-CCTGGCACCACAGC-ACAAT-3' 和 5'-GGCCCGACTCGTCATAC-3'; OCN 上游序列及下游序列分别是 5'-ATGAGAGCCCTCA-CACTCCT-3' 和 5'-CTTGGACACAAAGGCTGCAC-3'。使用 SYBR Premix Ex Taq II 染料法荧光定量试剂盒进行 RT-QPCR 检测,配成 20 μ l 反应体系:SYBR Premix Ex TaqII 10 μ l,ROX DYE II 0.4 μ l、上下游引物各 0.8 μ l,cDNA 2 μ l,ddH₂O 6 μ l。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,进一步分析采用 LSD 法进行多重比较。

2 结果

2.1 MTT 法检测成骨细胞增值 第 4、7 天,实验组 OD 值均高于对照组,差异均有统计学意义($F = 3.368, 60.778, P < 0.05$),且第 7 天实验组浓度为 10^{-5} mol/L 时,OD 值最高,并与其他实验组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 ALP 相对活性检测结果 第 4 天,实验组与对照组比较,差异无统计学意义($F = 2.704$)。第 7 天,实验组与对照组比较,差异有统计学意义($F = 32.449, P < 0.05$),且实验组浓度为 10^{-4} mol/L 时,ALP 相对活性最高,并与其他实验组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 茜素红染色及半定量分析 第 14、21 天,实验组钙盐沉积量多于对照组,见图 1、2。半定量分析

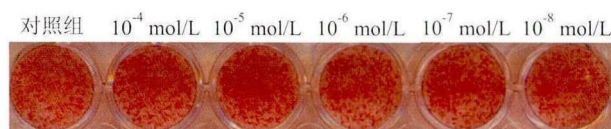


图 1 第 14 天茜素红染色扫描照片

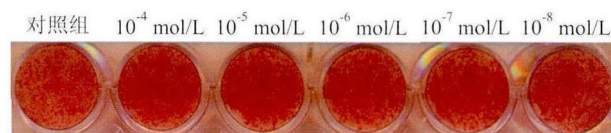


图 2 第 21 天茜素红染色扫描照片

表1 实验组与对照组吸光度值及 ALP 相对活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 (mol/L)	OD 值		ALP 相对活性	
	第 4 天	第 7 天	第 4 天	第 7 天
对照组	0.437 ± 0.012	0.515 ± 0.013	0.150 ± 0.009	0.197 ± 0.008
10 ⁻⁴	0.468 ± 0.004 *	0.655 ± 0.020 **	0.196 ± 0.021	0.301 ± 0.016 ***
10 ⁻⁵	0.486 ± 0.022 **	0.782 ± 0.016 ***	0.181 ± 0.027	0.223 ± 0.002 *
10 ⁻⁶	0.482 ± 0.027 **	0.608 ± 0.025 **	0.164 ± 0.014	0.244 ± 0.013 **
10 ⁻⁷	0.479 ± 0.009 *	0.723 ± 0.013 **	0.186 ± 0.016	0.250 ± 0.014 **
10 ⁻⁸	0.471 ± 0.016 *	0.602 ± 0.033 **	0.174 ± 0.008	0.189 ± 0.016

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同一指标其他实验组比较: # $P < 0.05$

表2 第14、21天实验组与对照组茜素红半定量结果及骨钙素 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 (mol/L)	茜素红半定量结果		骨钙素 mRNA 表达水平	
	第 14 天	第 21 天	第 14 天	第 21 天
对照组	0.467 ± 0.009	0.540 ± 0.027	1.000	1.000
10 ⁻⁴	0.469 ± 0.045	0.568 ± 0.034	5.072 ± 1.455 *	9.132 ± 1.350 *
10 ⁻⁵	0.529 ± 0.048	0.603 ± 0.030	10.812 ± 1.916 **	28.038 ± 2.053 **
10 ⁻⁶	0.506 ± 0.045	0.571 ± 0.010	5.246 ± 1.789 **	33.715 ± 3.560 ***
10 ⁻⁷	0.477 ± 0.019	0.553 ± 0.037	6.139 ± 2.23 **	15.462 ± 1.390 **
10 ⁻⁸	0.488 ± 0.013	0.550 ± 0.013	5.766 ± 1.579 **	16.064 ± 2.600 **

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同一指标其他实验组比较: # $P < 0.05$

结果,实验组浓度为 10⁻⁵ mol/L 时,OD 值最高,但可能由于样本量过小,差异无统计学意义($F = 1.499, 2.044$),见表 2。

2.4 RT-QPCR 法检测骨钙素(osteocalcin, OCN) mRNA 的表达水平 第 14、21 天,实验组成骨细胞骨钙素 mRNA 的表达量约是对照组的 5 ~ 13 和 10 ~ 35 倍,差异有统计学意义($F = 10.72, 94.871, P < 0.05$)。21 d 实验组浓度为 10⁻⁶ mol/L 时,与其他实验组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

成骨细胞是参与骨生成、生长、吸收、代谢的关键细胞,骨组织的形成主要是由成骨细胞分泌类骨质,类骨质再进一步成熟并继发矿化形成新骨,在整个过程中经历细胞增殖、胞外基质成熟、矿化和细胞凋亡四个阶段^[2-3]。骨的代谢过程受到体内许多因素的调节,如钙、磷、镁、内分泌激素和维生素等,其中,存在于骨基质中的各种生长因子在骨形成、吸收和重建中发挥着至关重要的作用,历来备受广大学者关注。目前,国内外学者对各种骨代谢相关生长因子对成骨细胞和骨髓基质细胞增殖、分化的影响做了大量的研究,也取得了一定的进展,但是这些生长因子在免疫原性、修饰易变性、体内易酶解等方面存在着各自的不足^[4-5]。因此,获得一种生物学性能更加优越的生物活性分子,成为当前研究热点。而成骨细胞的早期趋化、增殖的性能,对于临床上骨

缺损后的骨愈合以及牙种植的骨结合均具有特别重要的意义^[6]。本研究采用的成骨细胞特异性识别多肽,是基于噬菌体展示技术,对噬菌体展示十二肽库进行全细胞差减筛选,获得的与人成骨细胞特异性结合的弱亲水性多肽结构,氨基酸序列为 VLAVPWSEPGYL,其结构简单、易消毒储存、较蛋白质更易设计和修饰、具有良好的生物相容性^[7-9]。

成骨细胞表型是逐步形成的,各种成骨标志物在细胞增殖矿化的各个时期有不同程度的表达^[2-3]。本研究通过体外细胞学实验来检测该特异性多肽在促进成骨方面的生物学性能,分别从细胞增殖实验、成骨细胞增殖早期 ALP 的表达、细胞茜素红染色以及 OCN 的 mRNA 的表达几方面进行研究,结果显示:10⁻⁸ ~ 10⁻⁴ mol/L 浓度范围的特异性多肽能够显著促进成骨细胞增殖和矿化。其中,10⁻⁵ mol/L 浓度的多肽对成骨细胞增殖及矿化的促进作用最为显著。由上可知,一定浓度的特异性识别多肽在成骨细胞生长各阶段对其骨形成的生物学功能皆具有促进作用。

临床上,任何形式骨缺损后的骨愈合以及牙种植体植入颌骨后骨整合的形成,皆需要进行以成骨为主的组织修复,而新骨的形成主要是由成骨细胞完成,因此,促进成骨细胞的增殖、矿化能力,一直是该领域研究的中心问题。研究^[6]表明,种植体周骨细胞向种植体表面迁移、募集、吸附的效率会直接影响骨结合的发生、发展及最终效果。本研究证实,课

题组设计筛选并合成的成骨细胞特异性识别多肽,在一定浓度范围内能够在体外促进成骨细胞的增殖和矿化能力,据分析,其可能机制是该特异性多肽能够促进成骨细胞定向趋化及其增殖,从而最终加速骨愈合及骨结合的发生和发展,其最终的作用机制还有待进一步深入研究。在此实验基础上,课题组拟将 $10^{-8} \sim 10^{-4}$ mol/L 有效浓度的该特异性多肽结合到钛种植体表面,再从体外、体内研究其骨结合的生物学效应,以此为生物材料表面的生物化改性研究提供基础。

参考文献

- [1] Giannobile W V. Periodontal tissue engineering by growth factors [J]. *Bone*, 1996, 19(1): 235-45.
- [2] Florencio-Silva R, Sasso G R, Sasso-Cerri E, et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 421746.
- [3] 徐苓著. 骨质疏松症[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 15-7.
- [4] Birnbaum R S, Bowsher R R, Wiren K M. Changes in IGF-I and-II expression and secretion during the proliferation and differentiation of normal rat osteoblasts[J]. *J Endocrinology*, 1995, 144(2): 251-9.
- [5] Horner A, Bord S, Kemp P, et al. Distribution of platelet-derived growth factor(PDGF) α chain mRNA, protein, and PDGF- α receptor in rapidly forming human bone[J]. *Bone*, 1996, 19(4): 353-62.
- [6] Li J Y, Zheng L W, Ma L, et al. Effect of Fluoride-Modified Titanium Surface on Early Adhesion of Irradiated Osteoblasts[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 219752.
- [7] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-7.
- [8] Ullman C G, Frigotto L, Cooley R N. *In vitro* methods for peptide display and their applications[J]. *Brief Funct Genomics*, 2011, 10(3): 125-34.
- [9] Loi M, Di Paolo D, Soster M, et al. Novel phage display-derived neuroblastoma-targeting peptides potentiate the effect of drug nanocarriers in preclinical settings[J]. *J Control Release*, 2013, 170(2): 233-41.

The experimental study of effect of the peptide that specifically bind to osteoblasts on proliferation and mineralization of human calvarial osteoblasts *in vitro*

Qian Haiyan, Chen Huimin, Du Mingliang, et al

(Stomatologic College & Hospital, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of the peptide that specifically bind to osteoblasts on proliferation and mineralization of human calvarial osteoblasts *in vitro*. **Methods** Human calvarial osteoblasts were routinely cultured which were divided into 6 groups including experimental groups containing the peptide at various concentrations (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} mol/L) and a control group. The proliferative activity was examined by MTT, alkaline phosphatase activity was examined by ultraviolet spectrophotometry, the degree of cell mineralization was examined by alizarin red staining and semi-quantitative analysis, and RT-QPCR test was used to detect RNA level of OCN. **Results** Compared with the control group, the proliferation and alkaline phosphatase activity in different peptide groups were increased ($P < 0.05$), and the maximum response was obtained with 10^{-5} mol/L and 10^{-4} mol/L. Alizarin red staining cells cultured for 14 and 21 d, the deposition of the calcium in experimental group (10^{-5} mol/L) were higher than the control group, but there was no statistically significant difference. The results of RT-QPCR test showed that mRNA level of OCN in experimental groups was much higher than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The peptide that specifically bind to osteoblasts in the concentrations of 10^{-8} mol/L to 10^{-4} mol/L could promote the proliferation and mineralization of human calvarial osteoblasts *in vitro*, and the best concentration is 10^{-5} mol/L.

Key words the peptide that specifically bind to osteoblasts; human calvarial osteoblasts; proliferation; mineralization