

甲状旁腺素、胰岛素样生长因子-1 可加速成骨样细胞 ROS17/2.8 增殖周期的进程*

白秀英 李平凤 杜国光

(北京医科大学生物化学与分子生物学系 北京 100083)

李刚

(海南医学院蛋白质核酸研究室 570102)

甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)的经典作用是调节体液的钙磷代谢。随着甲状旁腺素在骨质疏松症病因、治疗和预防中作用的认识日益深入,PTH 促骨形成作用越来越受到重视^[1],但其机理迄今未明。本文以成骨样细胞 ROS17/2.8 为研究对象,以对促细胞增殖具有普遍意义的胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)为阳性对照,就 PTH 对成骨细胞增殖周期进程进行了研究,以求在细胞生物学和分子生物学水平上探讨 PTH 促成骨细胞增殖的机理。

材料与方 法

1. 材料

大鼠成骨样细胞株 ROS17/2.8 为美国哈佛医学院麻省总医院内分泌室赠送。Ham F12 培养基,胎牛血清为 Gibco 产品;rPTH(1-34)美国哈佛医学院麻省总医院内分泌室赠送,IGF-1 由美国 Whittier 研究所, San Diego, Nicholas Ling 博士赠送;NBT、BCIP 为 Sigma 产品;SDS、Tris 为 BioRad 产品;丙烯酰胺、双丙烯酰胺为 Serva 产品; [³H]-TdR 购自中国上海原子能研究所; [^α-³²P]-dCTP 购自中国北京亚辉生物工程公司;抗 Cyclin E 单抗、抗 Cyclin A 单抗为美国 Oncogene Science 产品;羊抗鼠 IgG-ALP 为 Sigma 产品;其余试剂为进口分装或国产分析纯试剂。

2. 方法

(1) 细胞培养^[2] 成骨样细胞 ROS17/2.8 培养于含 5%胎牛血清的 HamF12 培养液中,置 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,隔天换液,用胰酶/EDTA 消化液分散细胞,进行传代培养。

(2) [³H]-TdR 参入 DNA^[3] 成骨样细胞 ROS17/2.8 按 3.5×10⁴/cm² 密度接种于 24 孔板,在含 5%胎牛血清的 HamF12 培养液中培养 24 小时。换成无血清培养液 24 小时后,用 PTH10⁻⁹mol/L 或

IGF-110⁻⁹mol/L 处理细胞,对照组加 0.1%BSA。在处理结束前 4 小时,加入 [³H]-TdR1μCi/孔,继续培养(参入)4 小时。用胰酶/EDTA 消化液消化细胞,将细胞抽吸到玻璃纤维膜上,反复淋洗,烘干,加闪烁液测 cpm。结果以四重复的 cpm 均数±标准误表示。

(3) 流式细胞仪分析细胞周期^[4] 成骨样细胞 ROS17/2.8 按 3.5×10⁴/cm² 密度接种于细胞培养瓶中,细胞培养、饥饿同步化处理及因子处理见(2)。加入 20μg/ml 的 RNase,37℃保温 30 分钟,细胞过 200 目尼龙网筛。单细胞悬浮于 PBS 中,加入 5%碘化丙锭 200μl,室温染色 2 分钟,以 FACS-420 流式细胞仪分析。结果以三重复的细胞百分数均数±标准误表示。

(4) Western blot 分析检测 cyclin E 和 cyclin A 的表达^[5] 成骨样细胞 ROS17/2.8 按 3.5×10⁴/cm² 密度接种于细胞培养瓶中,细胞培养、饥饿同步化处理及因子处理见(2)。处理结束后刮下细胞进行裂解,裂解物用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,按常规进行 Western blot 分析,分别用抗 cyclin E 单抗及抗 cyclin A 单抗检测 cyclin E 和 cyclin A 的表达。免疫印迹结果进行光密度扫描,结果以积分光密度值 I.O.D. 表示。

结果与讨论

1. 结果

(1) PTH、IGF-1 对 [³H]-TdR 参入 DNA 的影响

[³H]-TdR 参入 DNA 反映了细胞中 DNA 合成的现状。如图 1 所示,成骨样细胞 ROS17/2.8 经 PTH 或 IGF-1 处理后,细胞 DNA 的合成增强。在 24 小时及 30 小时时,与对照组相比,PTH 处理组 [³H]-TdR 参入分别增加 105.07%和 60.96%;IGF-1 处理组 [³H]-TdR 参入分别增加 120.14%和 58.98%。经统计学

*国家自然科学基金资助项目(39760077)。

处理有差异($P < 0.05$)或有显著差异($P < 0.01$)。

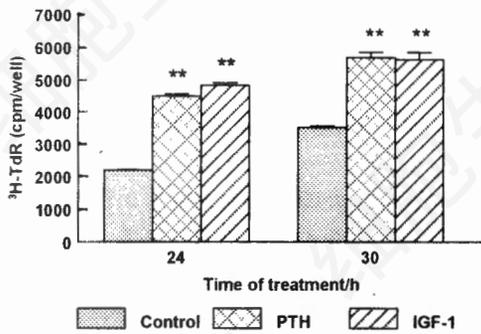


图1 PTH(10^{-9} mol/L)或IGF-1(10^{-9} mol/L)对成骨样细胞 ROS17/2.8 中 [^3H]-TdR 参入的影响

细胞培养、饥饿同步化、因子处理、细胞收集及液闪计数见材料和方法。数值为四重复的均数 \pm SE,结果资料以每孔、每分钟的衰变量表示(cpm);与对照组相比,** $P < 0.01$ 。

(2) PTH、IGF-1 对细胞周期进程的影响

如图2所示,PTH及IGF-1处理的成骨样细胞 ROS17/2.8,经流式细胞仪分析显示,在细胞周期进程上有差别。PTH或IGF-1处理细胞24小时,与对照相比, G_1 期细胞均降低约35%,S期和 G_2+M 期细胞均分别增加24%和78%。经统计学处理,有差异($P < 0.05$)或有显著差异($P < 0.01$);对照组细胞表现为 G_1 期阻滞。

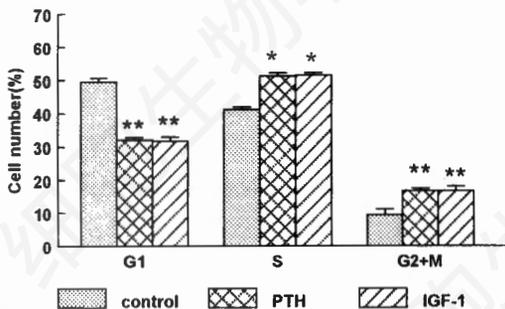


图2 PTH(10^{-9} mol/L)或IGF-1(10^{-9} mol/L)对成骨样细胞 ROS17/2.8 细胞周期的影响

细胞培养、饥饿同步化、因子处理及上机(FACS-420)分析见材料和方法。数值为三重复的均数 \pm SE,结果资料以各时相细胞百分比表示;与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

(3) PTH、IGF-1 对 cyclin E 和 cyclin A 表达的影响

如图3、图4所示,经PTH或IGF-1处理后,成骨样细胞 ROS17/2.8 的 cyclin E 和 cyclin A 表达均呈增高趋势。PTH处理组,在12小时及18小时时,cyclin E 的表达较对照组分别增加109.29%及68.35%,见图3;在18小时及36小时时,cyclin A 的表达与对照组相比分别增加109.06%及93.07%,见图4。IGF-1处理组,在12小时时,cyclin E 的表达较对照组增加83.45%,18小时峰值较12小时时低,与对照组相比减少15.3%,见图3;在18小时及36小时,cyclin A 的表达较对照组分别增加123.39%及159.43%,见图4。在图3中,据文献报道,近49KD的那条带为未磷酸化的 cyclin E,近85KD的那条带为磷酸化的 cyclin E。

2. 讨论

我们实验组前期的实验结果表明,PTH确实能够促进成骨细胞 ROS17/2.8 增殖^[6]。细胞增殖是通过细胞周期实现的。尽管细胞增殖最直观和最终的结果是细胞数目的增加,值得注意的是,在这最终现象出现之前,已有许多指征表明细胞处于增殖状态。细胞增殖加速时,细胞周期时间缩短,表现为各期时相提前,S期(DNA合成期)所占细胞百分率增加, G_1 期所占细胞百分率则相应减少。当细胞周期各时相提前时,其物质基础——cyclin的合成相应也要提前。为了研究PTH对成骨细胞增殖周期的影响,我们首先用 [^3H]-TdR 参入法观察了成骨样细胞 ROS17/2.8 在饥饿同步化后第一个增殖周期的变化。测定结果表明,增殖周期延长到48小时,与在成纤维细胞中观察的结果是相同的^[7], [^3H]-TdR 参入从18小时出现,高峰期为24小时到30小时,在48小时前后 [^3H]-TdR 参入维持在基线水平。大约在60小时,又出现新的参入,说明细胞已进入下一个周期的S期(以上结果资料未出示)。据此,我们设计了 [^3H]-TdR 参入、流式细胞仪分析及 cyclin A 和 cyclin E 分析的时间点。实验证实 PTH 或

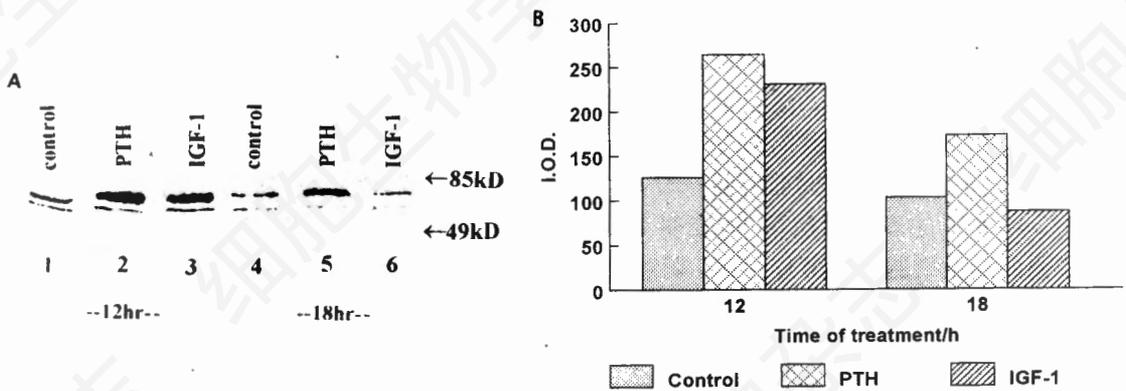


图 3 PTH(10^{-8} mol/L)或 IGF-1(10^{-8} mol/L)对成骨样细胞 ROS17/2.8 中 cyclin E 的影响
细胞培养、饥饿同步化、因子处理及 Western blot 分析见材料和方法。A. Western blot 分析 B. 印迹光密度扫描。

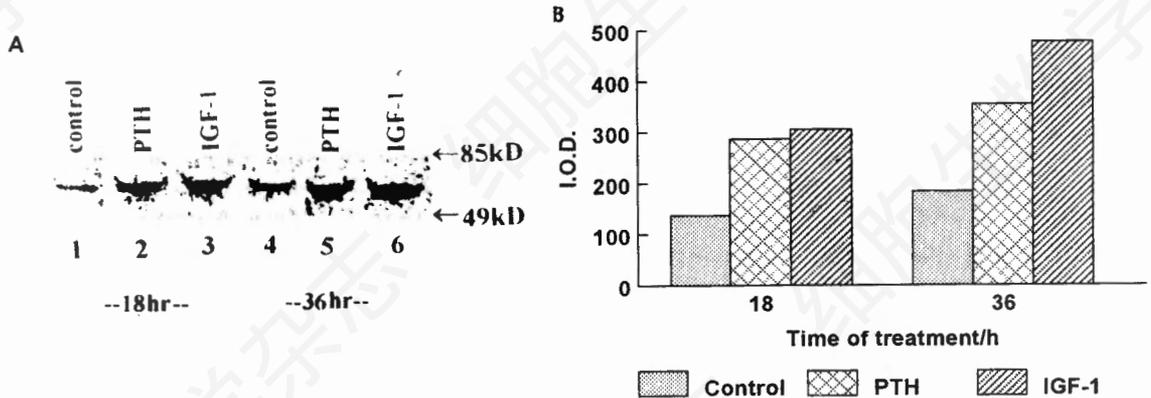


图 4 PTH(10^{-8} mol/L)或 IGF-1(10^{-8} mol/L)对成骨样细胞 ROS17/2.8 中 cyclin A 的影响
细胞培养、饥饿同步化、因子处理及 Western blot 分析见材料和方法。A. Western blot 分析。B. 印迹光密度扫描。

IGF-1 均能促进 [3 H]-TdR 参入成骨样细胞 ROS17/2.8。从流式细胞仪分析细胞周期各时相的结果看,经 PTH 或 IGF-1 处理后的成骨样细胞 ROS17/2.8,在 24 小时与对照组相比,其 S 期细胞比例均趋增加,这与 [3 H]-TdR 参入的结果是一致的;G₂+M 期细胞比例增加,G₁ 期细胞比例下降,这说明细胞处于旺盛的分裂状态。对照组中 G₁ 期细胞比例较 PTH 处理组或 IGF-1 处理组为高,S 期及 G₂+M 期细胞比例均低,这说明对照组细胞群出现 G₁ 期阻滞,细胞分裂状态不佳。

Cyclin 是随细胞周期各时相进展,在各时相周期表达、降解的一类蛋白质,它们的表达和

降解与细胞周期进程密切相关^[8-10]。从我们的检测结果可以看出,PTH 和 IGF-1 均可以促进 cyclin E 及 cyclin A 的表达。至于 18 小时时,IGF-1 处理组出现 cyclin E 的表达却较对照组为低的现象,我们认为这或许是由于 IGF-1 有较强的促细胞增殖作用,使细胞周期(G₁ 期)缩短,细胞周期各时相提前,而我们的测定时段正处于 cyclin E 大量降解时所致。对照组细胞由于缺乏足够的生长因子刺激,由静止状态(G₀ 期)进入启动状态(G₁ 期)的细胞数较少,cyclin E 的表达较低,在 18 小时时,进入分裂状态的细胞开始进入 S 期,cyclin E 的表达进一步降低;而 PTH 处理组较对照组进入启动状态的

细胞多, cyclin E 的表达量相应增高, 在 18 小时时仍维持在较高的表达水平。IGF-1 处理组, 在 18 小时时, cyclin E 的表达已低于对照组, 这正说明了 IGF-1 推动细胞周期进展较快; cyclin E 的表达高峰在 12 小时前的某一刻, 在 18 小时时 cyclin E 的表达已趋低下, 表明 IGF-1 具有较强的刺激细胞增殖的作用 (G_1 期缩短)。cyclin A 为 G_2 期的主要细胞周期蛋白, 细胞趋于增殖状态时, 其合成速度必然增加。本实验观察到在 18 小时及 36 小时时, PTH 处理组及 IGF-1 处理组的 Cyclin A 表达均较对照组为高, 体现了 PTH 和 IGF-1 对细胞增殖有促进作用。

综上所述, PTH 可促进 $^3\text{H-TdR}$ 参入 DNA、加速细胞周期进程及增加 G_1 期和 G_2 期 cyclin 的表达, 均支持 PTH 可促进成骨样细胞 ROS17/2.8 的增殖周期进程。

摘 要

甲状旁腺素 (parathyroid hormone, PTH) 不仅在调节钙磷代谢中可促进骨发生破骨细胞性溶骨, 也可促进骨的合成代谢作用。近年发现 PTH 还可促进成骨细胞的增殖分化。其细胞生物学和分子生物学机理尚待研究。本实验以成骨样细胞 ROS17/2.8 为研究材料, 以胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-

1) 为细胞增殖的阳性对照, 检测了 PTH 对 DNA 合成、细胞周期进程及 cyclin E 和 cyclin A 的表达, 以求探讨 PTH 促成骨细胞增殖时对细胞周期的影响。结果表明, PTH 可促进 DNA 合成, 改变细胞周期各时相细胞比例及增加 cyclin E 和 cyclin A 的表达。该结果提示 PTH 可加速成骨细胞增殖周期的进程。

关键词: 甲状旁腺素 胰岛素样生长因子-1 细胞周期 成骨样细胞

参 考 文 献

- [1] Whitfield JP, et al., 1997, *Calcifield. Tissue. Int.* 60:26-29.
- [2] Robert J, et al., 1980, *Endocrinology*, 107: 1494-1503.
- [3] Sabatini M, et al., 1996, *Bone*, 18:59-65.
- [4] Suzanne M, et al., 1991, *Endocrinology*, 128:2752-2760.
- [5] Ausubel FM, et al., 1992, *Short Protocols in Molecular Biology* (2nd, ed), Published by Gene Publishing Associates and John Wiley Sons.
- [6] 白秀英等, 生化杂志, 1998.
- [7] 蔡家新等, 生化杂志, 1994, 10(2): 218-221.
- [8] Paul Nurse., 1994, *Cell*, 79:547-550.
- [9] Dou, Q-P, et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1493-1499.
- [10] Wimmel, A et al., 1994, *Oncogene*, 9:995-997.

PARATHYROID HORMONE AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 ACCELERATE THE CELL CYCLE PROGRESSION IN OSTEOBLAST-LIKE ROS17/2.8 CELLS

BAI Xiu Ying LI Ping Feng DU Gou Guang

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, 100083)

LI Gang

(Laboratory of Protein and Nucleic Acid, Hainan Medical College, 570102)

Parathyroid hormone (PTH) is usually regarded as calcitropic hormone. Recently its non-classic function has been demonstrated that PTH plays a role in bone anabolism. The purpose of this study was to investigate the effect of PTH on cell cycle progression in osteoblast-like ROS17/2.8 cells, using IGF-1 as a positive control. It showed that in ROS17/2.8 cells either PTH (10^{-8} mol/L) or IGF-1 (10^{-8} mol/L) treatment can enhance $^3\text{H-TdR}$ incorporation 105.1% and 120.1% respectively, increase the percentage of S stage and G_2 +M stage cells, as well as increase the expression of G_1

cyclin (cyclin E) and G₂ cyclin (cyclin A). It suggested that PTH can accelerate the cell cycle progression in osteoblast-like ROS17/2.8 cells.

Key words: PTH IGF-1 Cell cycle Osteoblast-like cell

胎鼠肝脏发育过程中肝窦的形成与成熟

王 群* 张国军** 胡大为*** 陈远耀*

(*白求恩医科大学基础医学院病理解剖教研室 **第一临床学院儿科

***第一临床学院肿瘤科 长春 130021)

成年大鼠肝窦内皮细胞的结构和功能研究得较多,但有关胎鼠肝脏发育过程中肝窦的形成与成熟以及与先存大血管的关系还了解甚少^[1-3]。我们以前建立了一种新的单克隆抗体,SE-S,它仅特异性识别大鼠肝窦内皮细胞,而与肝动脉、门静脉、中央静脉以及其他组织的内皮细胞和非内皮细胞均无交叉反应^[4],因此,认为这种 SE-S 抗原与肝窦内皮细胞的特殊功能相关。为了阐明胎鼠肝脏发育过程中肝窦的形成与成熟,用免疫组织化学和免疫电镜检测了胎鼠肝脏发育的不同时期 SE-S 抗原的表达。

材 料 和 方 法

1. 动物

购买妊娠 14 天的 Fischer344(F344)(Charles River Japan),分别在妊娠的 15-21 天行子宫解剖术获得胎鼠,仔细取出其肝脏,并进行组织学检查。部分肝脏固定于冷丙酮中用于免疫组织化学染色,部分肝脏固定于新鲜配制的过碘酸—赖氨酸—多聚甲醛(PLP)溶液中,用于免疫电镜分析,其余的肝脏经液氮冷冻后储存于-80℃,用于免疫荧光染色。

2. 免疫染色

经丙酮固定的肝脏,石蜡包埋、常规脱蜡、水化,0.3% H₂O₂ 甲醇溶液去除内源性过氧化物酶活性。10% 正常羊血清封闭后,第一抗体用兔抗人第八因子相关抗原(FⅧRAg)抗体和兔抗人纤维连接蛋白(FN)抗体,4℃过夜,第二抗体用过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,室温 1 小时,显色用 DAB,以上各步均经 TBS 10.05mol/L Tris,0.83% NaCl 冲洗,5 分钟×3,苏木素复

染,封片。本试验设空白对照和血清替代对照。所用抗体均购自 DAKO 公司。

用于免疫荧光染色的冰冻切片,丙酮固定,干燥后与 SE-S 室温温育 1 小时,TBS 漂洗后,与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(DAKO)反应,荧光显微镜观察(Nikon CO,Tokyo)。

为了对表达 SE-S 抗原的肝窦长度进行定量分析,随机拍摄不同胎龄(15-21 天)的肝脏照片,以测量阳性肝窦的长度(每一个胎龄组检测 200 个肝窦以上)。

3. 免疫电镜分析

肝组织固定于 PLP 溶液 12 小时,4℃,TBS 冲洗后,制成约 50μm 厚的肝脏切片,与 SE-S 抗体室温作用 12 小时,然后按如前所述的方法进行染色。染色后的切片重新固定于 1% 锇酸溶液中,系列乙醇脱水,环氧树脂包埋,超薄切片经枸橼酸铅复染后,电子显微镜观察。

结 果

1. 肝脏发育的组织学特点

在胎龄 15 天、17 天、19 天和 21 天分别检查 30 个胎肝,组织学观察,15-17 天的胎鼠肝脏结构疏松,富有大量的造血细胞和未成熟的肝细胞,H-E 染色难以分辨出肝窦结构。利用 FN(肝狄氏腔最丰富的细胞外基质成分)免疫反应产物的沉积,在胎龄 15 天时即可清晰显示出已形成的肝窦样结构,19 天时这种结构更加明显,21 天的肝脏,呈灶状分布的造血细胞数量减少,肝细胞胞浆丰富,形态近似成熟肝细胞,此时肝窦的排列与成年鼠非常相似。

2. 肝脏发育过程中 SE-S 抗原的表达特点