

# 降钙素基因相关肽对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响

廉凯<sup>1</sup> 杜靖远<sup>2</sup> 张银刚<sup>2</sup>

(1. 第四军医大学西京医院全军骨科研究所, 陕西 西安 710032; 2. 华中科技大学同济医学院协和医院骨科, 湖北 武汉)

**【摘要】** 目的 探讨外源性降钙素基因相关肽(CGRP)对大鼠颅盖骨来源成骨细胞的影响,以进一步了解 CGRP 促进成骨的作用机制。方法 利用二次酶消化法培养的成骨细胞,加入含不同浓度 CGRP 的条件培养液,24 小时后通过 MTT 比色,<sup>3</sup>H-TdR 掺入以及细胞内碱性磷酸酶(ALP)含量的测定来观察 CGRP 对成骨细胞增殖和分化的影响。结果 CGRP 可以明显促进成骨细胞增殖,而且作用呈剂量依赖性。CGRP 对细胞内 ALP 含量无明显影响。结论 CGRP 能够直接作用于成骨细胞并通过促进其增殖而有利于骨形成。

**【关键词】** 降钙素基因相关肽; 成骨细胞; 骨再生

**The effects of calcitonin gene relate peptide on proliferation and differentiation of rat osteoblasts** LIAN Kai, DU Jing-yuan, ZHANG Yin-gang. *Institute of Orthopaedics of Chinese PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Shan xi xi'an 710032.*

**【Abstract】 Objective** To explicate the effects of exogenous calcitonin gene related peptide(CGRP) on rat osteoblasts in vitro, and to investigate the mechanism by which CGRP promotes bone formation. **Methods** The osteoblasts were isolated from newborn rat calvaria by sequential enzyme digestion, and the secondary cells were treated with different concentrations of CGRP respectively. After 24 hours of incubation, the effects of CGRP on proliferation and differentiation of osteoblasts were observed with MTT assay, <sup>3</sup>H-TdR incorporation and the determination of intracellular ALPase activity. **Results** CGRP could stimulate the proliferation of osteoblasts in dose dependent manner, but was unable to affect the intracellular ALPase activity of osteoblasts. **Conclusion** CGRP can act directly on osteoblasts and increase bone formation by stimulating the proliferation of osteoblasts, but it does not promote the differentiation of osteoblasts.

**【Key words】** Calcitonin gene related peptide; Osteoblast; Bone regeneration

大量的实验研究和临床观察发现<sup>[1,2]</sup>, 神经系统紊乱可以导致骨结构的异常如过度骨痂生长、骨质疏松等,但作用机制有待深入探讨。近年来研究表明<sup>[3]</sup>, 骨组织中肽能神经纤维释放的神经肽可以直接作用于骨细胞,从而介导神经系统在骨形成和骨吸收中的调节作用。降钙素基因相关肽(CGRP)作为最丰富的一种神经肽,其对成骨细胞的调节作用正逐渐引起人们的重视,但其作用结果尚有争议。本实验利用体外培养方法来观察 CGRP 对新生大鼠成骨细胞增殖和分化的影响,以期探讨其促进骨形成作用的可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 新生大鼠颅盖骨成骨细胞的分离和培养** 采用二次胶原酶消化培养方法,将 1 天龄新生 SD 大鼠(同济医大实验动物中心提供)置入 75% 酒精中浸泡消毒 5min, 无菌操作下完整取出颅盖骨,清理洗涤干净后用 0.1% I 型胶原酶(Sigma 产品)分别于室温静置、37℃ 剪碎振荡消化 30min 和 20min,

收集第二次消化的细胞悬液,1000r/min 离心 10min,弃上清,用少量含 20% 胎牛血清(FBS)的 DMEM(Gibco 产品)培养液(含青霉素和链霉素各 100u/ml)将细胞吹打均匀,按  $1 \times 10^5$ /ml 个接种于培养瓶中,置 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 湿度培养箱,2~3 天换液一次,至 7~9 天细胞汇合后用 0.25% 胰蛋白酶(Gibco 产品)消化传代。本实验所用成骨细胞均为第二代细胞。传代培养用液为含 10% FBS 的 DMEM 培养液,内含 50μg/ml 抗坏血酸(Sigma 产品)。

**1.2 药物和分组** 大鼠降钙素基因相关肽(rCGRP,即 rCGRPα)为 Sigma 产品,100μg/支。溶于 0.001% 乙酸溶液中配成  $10^{-5}$  mol/L 的贮存液,置于 -30℃ 冰箱中保存。实验前用 DMEM 培养液稀释成所需要的最终浓度。分实验组和对照组,实验组的 rCGRP 浓度分别为  $10^{-7}$  mol/L、 $10^{-8}$  mol/L、 $10^{-9}$  mol/L 和  $10^{-10}$  mol/L,对照组的 rCGRP 浓度为 0mol/L,各组培养液中均不含胎牛血清。

### 1.3 成骨细胞增殖情况检测

**1.3.1 四唑盐 (MTT) 比色分析法** 将第二代成骨细胞用 DMEM 稀释成  $4 \times 10^4$  个/ml, 以 200 $\mu$ l/孔加入 96 孔板, 24h 后换用无血清 DMEM 培养。24h 后换液, 各孔分别加入含不同浓度 CGRP 的条件培养液 200 $\mu$ l, 对照组仅加入同体积的无血清 DMEM。每浓度组 5 孔, 共同培养 24h。然后吸掉培养液, 每孔加入 5g/L MTT (Sigma 产品) 液 25 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4h。弃上清后加入二甲基亚砷溶液 200 $\mu$ l/孔, 充分冲打, 置室温下 2h 后于紫外分光光度计取波长 570nm 进行比色, 测定各孔 OD 值。本实验重复二次。计算实验组和对照组各孔 OD 值与对照组 OD 值均数之比, 以百分数表示其增殖率。

**1.3.2  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶核苷 ( $^3\text{H}$ -TdR) 掺入实验** 将稀释后的细胞悬液按  $2 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔培养板内, 培养 24h 后换无血清 DMEM 继续培养 24h, 然后换液并加入含不同浓度 CGRP 的 DMEM, 每浓度组 6 孔。培养 18h 后, 每孔加入 1 $\mu$ Ci  $^3\text{H}$ -TdR (中科院上海原子能研究所产品), 继续培养 6h, 弃上清, 沉淀部分用 0.1mol/L PBS 洗三次, 每孔内加入 0.1mol/L NaOH 1ml, 4 $^{\circ}$ C 过夜。将溶液收集于闪烁瓶中, 加入闪烁液 5ml, 避光放置 2h 后, 于液体闪烁测量仪测定每孔的放射性 (即 CPM 值)。

**1.4 细胞内碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测** 将细胞按  $2 \times 10^4$  个/孔密度接种于 24 孔板, 24h 改用无血清 DMEM 继续培养 24h, 然后换液并加入不同浓度的 CGRP, 每浓度组 6 孔, 培养 24h 后吸掉培养液并用 0.1mol/L PBS 洗涤。ALP 活性测定: 每孔中加入 0.05% Triton X-100 (Sigma 产品) 200 $\mu$ l 使细胞破裂, 4 $^{\circ}$ C 冰箱内放置 12h, 再吹打 1min, 然后加入 100 $\mu$ l 的对一硝基苯磷酸盐 (底物, 0.75mg/ml, 由北京中生生物公司 ALP 活性检测试剂盒配制), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 加 0.1mol/L NaOH 100 $\mu$ l 终止反应, 于免疫酶联仪 410nm 处测吸光度 (OD 值)。

**1.5 统计学处理** 所有参数均用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用  $t$  检验检测各实验组与对照组间的差异。定  $P < 0.05$  为差异有显著意义,  $P < 0.01$  为差异有极显著意义。

## 2 结果

**2.1 CGRP 对成骨细胞 MTT 比色测定值的影响** 根据表 1 可以看出,  $10^{-10} \sim 10^{-7}$  mol/L CGRP 均可使 MTT 比色测得的 OD 比值升高, 且呈剂量依赖性。  $10^{-9}$  mol/L、 $10^{-8}$  mol/L 和  $10^{-7}$  mol/L 组的 OD 比值与对照组相比, 差异有显著性 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

**2.2 CGRP 对成骨细胞  $^3\text{H}$ -TdR 掺入值 (CPM) 的影响** 根据表 1 所示, 各浓度组 CGRP 均可使成骨细胞  $^3\text{H}$ -TdR 掺入的 CPM 值升高, 而且亦呈剂量依赖性变化, 尤以  $10^{-8}$  mol/L 和  $10^{-7}$  mol/L 组作用明显, 与对照组相比, 差异有显著意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.3 CGRP 对成骨细胞内 ALP 活性的影响** 由表 1 所示, 低浓度的 CGRP ( $10^{-10}$  mol/L、 $10^{-9}$  mol/L) 对成骨细胞内 ALP 活性有轻度刺激作用, 而高浓度的 CGRP ( $10^{-8}$  mol/L、 $10^{-7}$  mol/L) 则有轻度的抑制作用。但各治疗组与对照组比较, 差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

CGRP 是一种含 37 个氨基酸的多肽, 包括 CGRP $\alpha$  和

表 1 CGRP 对成骨细胞增殖和分化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

CGRP 浓度 (mol/L)	MTT 比色 (OD 比值%)	$^3\text{H}$ -TdR 掺入 (CPM 值)	ALP 活性 (OD 值)
0	100.00 $\pm$ 7.22	2635.47 $\pm$ 524.69	0.404 $\pm$ 0.015
$10^{-10}$	104.51 $\pm$ 5.65	2945.20 $\pm$ 322.45	0.415 $\pm$ 0.019
$10^{-9}$	109.10 $\pm$ 10.79*	3155.80 $\pm$ 508.12	0.421 $\pm$ 0.023
$10^{-8}$	116.33 $\pm$ 9.85**	3304.60 $\pm$ 493.71*	0.388 $\pm$ 0.033
$10^{-7}$	121.47 $\pm$ 12.51**	3403.64 $\pm$ 443.23*	0.392 $\pm$ 0.022

注: ①MTT 比色,  $n = 10$ ;  $^3\text{H}$ -TdR 掺入,  $n = 6$ ; ALP 活性,  $n = 6$

②与对照组相比 \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

CGRP $\beta$  两种类型, 分别编码于 CALC $_1$  基因和 CALC $_2$  基因。在周围神经系统中, CGRP 主要存在于 C 型和 A $_8$  型感觉神经纤维, 其合成来源于脊髓后根神经节内的感觉神经元, 并可以通过轴突传递逆向到达感觉神经末梢<sup>[4]</sup>。CGRP 免疫阳性神经纤维在正常骨组织中主要分布于代谢活跃的区域, 如骨膜、骨髓, 以及骨髓生长板附近的骨软骨结合部, 而且骨髓处的分布远较骨干多<sup>[5]</sup>。CGRP 的释放机制目前尚不十分清楚, 可能与局部的刺激信号以及由此引起的轴突反射有关, 并受到高级中枢的调控。因而骨组织中 CGRP 免疫阳性神经纤维既能感受外界刺激, 又可通过神经末梢去极化释放机制, 对其作出相应的反应, 从而根据需要调整局部的 CGRP 浓度。

近来研究表明, CGRP 免疫阳性神经纤维的分布规律与局部骨形成的关系极为密切。Aoki 等<sup>[6]</sup>发现, 在大鼠胫骨愈合过程中, CGRP 免疫阳性神经纤维大量出现于骨膜、纤维肉芽组织和新生骨组织中, 而且其增生程度随着骨形成及改建过程而有序地增减。Ekelund 等<sup>[7]</sup>在脱钙骨基质诱导形成的异位骨组织中亦发现 CGRP 免疫阳性神经纤维的分布, 而且该肽能神经纤维的数目与局部骨形成量呈正相关。以上研究提示, 这些增生的感觉神经纤维能于局部释放出远高于血清水平的 CGRP, 从而参与正常骨愈合和异位骨形成过程。CGRP 受体的发现及其在成骨细胞中的存在<sup>[8]</sup>, 使人们逐渐认识到 CGRP 可能直接作用于成骨细胞并促进骨生成, 为此本实验研究了外源性 CGRP 对新生大鼠成骨细胞增殖和分化的影响。MTT 比色分析法可以间接反映活细胞的数目和功能状态,  $^3\text{H}$ -TdR 掺入则能够反映细胞的 DNA 合成代谢过程, 因而二者被广泛应用于检测细胞增殖情况<sup>[9]</sup>。本实验中 MTT 比色和  $^3\text{H}$ -TdR 掺入结果均表明 CGRP 能够明显促进成骨细胞增殖, 而且增强作用呈剂量依赖性。ALP 活性检测却发现, 各浓度组 CGRP 对成骨细胞的分化调节作用不甚明显。

由于细胞的来源、种属以及检测方法和指标的不同, CGRP 对成骨细胞增殖和分化作用的结果尚不完全一致。Shih 等<sup>[10]</sup>利用成年大鼠骨髓干细胞培养发现, CGRP 既能增加骨集落的形成数目, 又可增加骨集落的大小, 而且这种促进作用与 CGRP 浓度呈正相关。因而他们认为 CGRP 可通过刺激干细胞有丝分裂和 (或) 骨祖细胞 (osteoprogenitor cell) 分化来促进骨形成。Michelangioli 等<sup>[11]</sup>在不同种属骨源性成骨细胞培养中发现, CGRP 可以明显刺激细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 的产生, 而 cAMP 水平的高低则与成骨细胞的分泌活性有关。本实验所用成骨细胞来源于新生 SD 鼠颅盖骨, 由

于钙化已经开始,此时的成骨细胞分化可能已经接近成熟,部分失去对 CGRP 分化调节作用的敏感性,因而 CGRP 的促分化作用位点则可能发生在骨祖细胞向成骨细胞转化的过程中。另外,分化调节指标除 ALP 外,尚有骨钙素、骨桥蛋白、骨涎蛋白等,因此,有关 CGRP 对成骨细胞分化调节的详细机制尚有待深入研究。

本实验结果说明,尽管 CGRP 对成骨细胞分化的直接作用有限,但其仍可通过刺激成骨细胞的大量增殖来达到促进骨形成的目的。

参考文献

- 1 Nordsletten T, Madsen JE, Almaas E, et al. The neuronal regulation of fracture healing. *Acta Orthop Scand*, 1994, 65(3): 299-304.
- 2 Szollar SM, Martin EME, Sartoris DJ, et al. Bone mineral density and indexes of bone metabolism in spinal cord injury. *Am J Phys Med Rehabil*, 1998, 77(1): 28-35.
- 3 Kontinen YT, Imai S, Suda A. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. *Acta Orthop Scand*, 1996, 67(6): 632-639.
- 4 Wimalawansa SJ. CGRP and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev*, 1996, 17(5): 533.

- 5 Hara Irie F, Amizuka N, Ozawa H. Immunohistochemical and ultrastructural localization of CGRP positive nerve fibers at the epiphyseal trabeculae facing the growth plate of rat femus. *Bone*, 1996, 18(1): 27-39.
- 6 Aoki M, Tamai K, Saotoma K. Substance P and calcitonin gene related peptideimmunofluorescent nerves in the repair of experimental bone defects. *Int Orthop*, 1994, 18: 317-324.
- 7 Ekelund A, Ahmed M, Bjurholm A, et al. Neuropeptides in heterotopic bone induced by bone matrix in immunosuppressed rats. *Clin Orthop*, 1997, 345: 229-238.
- 8 Comish J, Callon KE, Lin CQ, et al. Comparison of the effects of calcitonin gene related peptide and amylin on osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(8): 1302-1309.
- 9 胡光亮, 杜靖远, 王洪, 等. 补肾密骨液对骨代谢影响的体外实验研究. *中国骨伤*, 2000, 13(2): 83-85.
- 10 Shih C, Bernard GW. Calcitonin gene related peptide enhances bone colony development in vitro. *Clin Orthop*, 1997, 334: 335-344.
- 11 Michelangeli VP, Eletcher AE, Allan EH, et al. Effects of calcitonin gene related peptide on cyclic AMP formation in chicken, rat, and mouse bone cells. *J Bone Miner Res*, 1989, 4(2): 269-272.

(收稿: 2001-03-20 编辑: 房世源)

• 短篇报道 •

皮牵引甩臂法治疗肱骨外科颈骨折 48 例

张瑞云 王爱明 邱正国 王伟 王国明  
(攀钢集团公司密地职工医院骨科, 四川 攀枝花 617063)

肱骨外科颈骨折在临床中较为常见, 我院从 1984 年至 1997 年采用皮牵引甩臂法治疗肱骨外科颈骨折 48 例, 取得了较好的临床效果, 现报告如下。

1 临床资料

本组 48 例, 男 30 例, 女 18 例, 年龄最大 73 岁, 最小 6 岁, 平均年龄 44 岁, 左侧 25 例, 右侧 23 例, 外展型骨折 28 例, 内收型骨折 20 例, 伴有患侧肱骨大结节撕脱骨折 2 例, 合并全身其它部位骨折 6 例, 双侧肱骨外科颈骨折 1 例。近半数病人骨折有向前成角。

2 治疗方法

治疗时不需麻醉, 病人坐位或站立位, 患肢自然下垂, 用宽约 6~8cm 的胶布常规做上肢皮牵引, 扩张板下悬吊 1~3kg 重量。皮牵引后, 嘱患者做主动甩臂活动, 病人站立位, 上肢肌肉完全放松, 身体略向患侧倾斜, 开始伤肢在矢状面做前后甩臂运动, 幅度及频率逐渐加大和加快, 2~3 天后在额状面进行左右方向甩臂摆动, 3~4 天后肢体做画圈运动。在做甩臂运动的同时做手指的伸屈活动。平时卧床或睡眠时仍保持皮牵引, 外展型骨折保持中立位及前屈 15°~30° 位牵引, 内收型骨折保持外展 40°~45° 位牵引。治疗 3~4 天后复查 X 光片, 调整牵引重量及甩臂方向。

3 治疗结果

皮牵引甩臂治疗时间一般为 3~4 周, 可达到骨折的临床愈合, 41 例病人获得随访, 随访最长时间 12 年, 最短时间 1 年 6 月, 根据朱氏标准<sup>[1]</sup>评定, 外展型骨折中, 解剖对位 14 例, 近解剖对位 7 例, 功能对位 1 例。内收型骨折中, 解剖对位 11 例, 近解剖对位 6 例, 功能对位 2 例, 获得随访的 41 例病人肩关节功能恢复正常。

4 讨论

肱骨外科颈附近主要由松质骨构成, 局部血运丰富, 肱骨外科颈周围有较多的韧带和肌肉, 不会发生过度牵引及骨折不愈合。

患者做甩臂运动时, 应鼓励患者伤肢肌肉完全放松, 逐渐加大甩臂幅度, 牵引和甩臂使骨折周围肌肉舒缩, 骨折能达到持续自行复位。

肱骨外科颈骨折移位及局部成角较大者, 应予适当的手法复位。外展型骨折可加腋垫协助复位, 向前成角较大者, 可以早期以俯卧位整复骨折, 高龄患者或同时伴有下肢骨折不能坚持或不能进行甩臂者, 可仅做患肢皮牵引, 每天多次改变牵引角度。

参考文献

- 1 朱通伯, 罗怀灿, 杨述华, 等. 皮牵引甩肩法治疗肱骨近端骨折. *中华骨科杂志*, 1998, 6: 402. (收稿: 2000-10-17 编辑: 李为农)