

[文章编号] 1000-1182(2015)03-0234-04

神经生长因子调控降钙素基因相关肽的表达及对MG-63细胞增殖的影响

孙嵩 高强国 张纲 谭颖徽

第三军医大学新桥医院口腔颌面外科, 重庆 400037

[摘要] **目的** 探讨创伤愈合过程中神经生长因子 (NGF) 调控降钙素基因相关肽 (CGRP) 的表达, 以及影响 MG-63 细胞增殖的作用机制。**方法** 加入不同质量浓度的 NGF 刺激 MG-63 细胞, 1、2、3、4 d 后收集样本, 采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测 CGRP 的表达, 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-QPCR) 检测 CGRP mRNA 的表达, 采用细胞计数法 (CCK-8) 检测 MG-63 细胞的增殖; 在 MG-63 细胞中加入 NGF 受体阻断剂, 采用 RT-QPCR 和 CCK-8 检测 CGRP mRNA 的表达及 MG-63 细胞的增殖效率。**结果** 在 NGF 作用下, MG-63 细胞分泌的 CGRP 表达量明显上调, 随 NGF 质量浓度升高, CGRP 表达量也相应升高, 具有浓度依赖性, CGRP 表达量随 NGF 作用时间延长也相应增加 ($P < 0.05$); 随 NGF 质量浓度升高和作用时间延长, MG-63 细胞的增殖效率也相应增加 ($P < 0.05$)。加入 NGF 受体阻断剂后此作用相应减弱 ($P < 0.05$)。**结论** 在创伤愈合过程中 NGF 能通过上调 CGRP 的表达量影响 MG-63 细胞的增殖, 从而促进创伤愈合。

[关键词] 神经生长因子; 降钙素基因相关肽; 细胞增殖

[中图分类号] Q 51 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2015.03.004

Experimental study on the effects of the nerve growth factor regulating calcitonin gene-related peptide in promoting the proliferation of MG-63 in vitro Sun Song, Gao Qiangguo, Zhang Gang, Tan Yinghui. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the nerve growth factor (NGF) regulating the expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in promoting the proliferation of osteoblast-like cell (MG-63) and thus illustrate the mechanism of the NGF in wound healing. **Methods** Different concentrations of NGF were used to stimulate MG-63. The expression of CGRP was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-QPCR) and enzyme-linked immunosorbent assay after 1, 2, 3, and 4 days. The proliferation of MG-63 was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). The expression of CGRP mRNA and the proliferation of MG-63 were then detected by RT-QPCR and CCK-8 after adding the NGF receptor blocker. **Results** Compared with the blank control group, the expression of CGRP significantly increased by stimulating the NGF. The expression of CGRP was positively related to the concentration of NGF ($P < 0.05$). Moreover, the expression of CGRP increased by prolonging the NGF stimulation time. The proliferation of MG-63 increased after stimulating the NGF ($P < 0.05$). After adding the NGF receptor blocker, the expression of CGRP and the proliferation of MG-63 correspondingly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** NGF can up-regulate the expression of CGRP and increase the proliferation of MG-63. Therefore, NGF plays a significant role in wound healing.

[Key words] nerve growth factor; calcitonin gene-related peptide; cell proliferation

颌骨的骨创伤愈合是一个连续的生理过程, 包括血肿中细胞迁移, 血管生成以及骨痂的改建等^[1],

同时也包括在骨细胞增殖和分化过程中细胞因子的调控, 骨诱导, 分子信号传导作用等, 是一个多因素参与的修复过程。本课题组在前期研究^[2]中发现, 降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 在下颌骨缺损的愈合过程中起着重要的作用, 如 CGRP 能通过调节成骨细胞中骨保护素 (os-

[收稿日期] 2015-01-05; **[修回日期]** 2015-03-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81277098)

[作者简介] 孙嵩, 硕士, E-mail: 307736593@qq.com

[通信作者] 谭颖徽, 教授, 博士, E-mail: tanyh@yahoo.com

teoprotegerin, OPG)和核因子- κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)mRNA的表达从而间接影响骨代谢等。CGRP可调节成骨细胞内皮型一氧化氮合酶的表达从而调节成骨细胞的增殖分化^[3]。本课题组同样发现,神经系统也可以调节骨创伤的愈合过程,如下齿槽神经损伤能影响骨痂生成和矿化成骨量^[4]。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是最早发现的神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)家族成员,在神经系统的发育和修复进程中起到重要的作用,同时在骨折修复中也扮演着重要角色。NGF存在于骨形成细胞中,通过上调成骨细胞活性,引导神经长入骨痂来促进骨的愈合^[5]。在神经系统与骨代谢的关系中,NGF能否影响CGRP等信号肽的释放以及影响途径还少有研究。本研究通过NGF刺激MG-63细胞检测CGRP的表达状况,探讨NGF对骨修复过程中神经递质CGRP的影响以及对MG-63增殖的作用,旨在加深对骨创伤愈合机制的认识,为治疗颌骨骨创伤愈合提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人骨肉瘤细胞MG-63细胞株(ATCC公司,美国);NGF、NGF酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂(Peprotech公司,美国);高糖DMEM培养基、优质小牛血清(Hyclone公司,美国),琼脂糖(上海生物科技有限公司),Trizol RNA提取液(宝生物工程大连有限公司);实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-QPCR)试剂盒(Thermo公司,美国)。

本实验采用第2代MG-63细胞,接种细胞密度为每孔 2×10^5 个,NGF质量浓度梯度为0、10、30、100 ng·mL⁻¹,收集样本时间分别为1、2、3、4 d。

1.2 ELISA法测定CGRP的表达

将MG-63细胞以每毫升 2×10^5 个细胞的密度接种于24孔板,每孔1 mL,每组设复孔2个,收集上清液时间分别为1、2、3、4 d,严格按照ELISA试剂盒说明操作,每组实验重复3次,于酶标仪上测定A₄₅₀值,建立标准曲线,分析并计算CGRP质量浓度。

1.3 RT-QPCR法测定CGRP mRNA的表达

用Trizol提取法提取MG-63细胞总RNA,经微量分光光度计和10 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳确定A₂₆₀/A₂₈₀值为1.8~2.0,取1 g样本按照逆转录试剂盒说明书的步骤合成cDNA。RT-QPCR条件:37 ℃, 15 min;

85 ℃, 5 s。将cDNA对倍稀释3次后作为模板,在荧光定量聚合酶链反应仪上测定样本的表达结果,所用引物由上海英俊公司合成。CGRP上游引物:5'-ATGCAGCACCATTTCAGGTCTG-3', CGRP下游引物:5'-CCAGCCGATGAGTCACACAG-3'。总反应体系为25 μ L: SYBR Premix EX Taq (TaKaRa公司,日本) 12.5 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O补至25 μ L。反应条件为:95 ℃ 5 min; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 40个循环。反应结束仪器自动生成循环阈(cycle threshold, Ct)值,用各组mRNA与内参基因的Ct值的差值(Δ Ct)表示各组mRNA的相对表达量。

1.4 加入NGF受体阻断剂后MG-63细胞中CGRP mRNA的表达

将1 mL细胞液接种于16孔板中,细胞密度为每孔 2×10^5 个,加10 μ L不同质量浓度NGF(0、10、30、100 ng·mL⁻¹)作用1、2、3、4 d后,加50 ng·mL⁻¹ NGF受体阻断剂PD98059 200 μ L培养24 h,用RT-QPCR检测MG-63细胞分泌CGRP mRNA的情况。

1.5 细胞计数(cell counting kit-8, CCK-8)法测定MG-63细胞增殖情况

NGF对MG-63细胞增殖的作用:将1 mL细胞液接种于16孔板中,细胞密度每孔 2×10^5 个,加入10 μ L不同质量浓度NGF(0、10、30、100 ng·mL⁻¹)培养1、2、3、4 d后弃上清液,每孔加入CCK-8溶液10 μ L和90 μ L PBS,振荡混匀后继续孵育2 h,测定450 nm波长下的吸光度值,每组实验重复3次,以单独MG-63细胞为空白对照。

NGF受体阻断剂的作用:阻断剂干扰组加入50 ng·mL⁻¹的NGF受体阻断剂200 μ L培养24 h后弃上清液,每孔加入CCK-8溶液10 μ L和90 μ L PBS,振荡混匀后继续孵育2 h,测定450 nm波长下的吸光度值,每组实验重复3次。

1.6 统计学分析

应用SPSS 10.0统计软件采用t检验和单因素方差分析对数据进行分析,检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 NGF刺激MG-63细胞中CGRP的表达

ELISA检测发现, MG-63细胞自身可产生少量的CGRP, NGF可以明显上调MG-63细胞CGRP的分泌($P<0.05$),而且随NGF质量浓度的升高, CGRP的浓度也相应升高(图1)。此外, MG-63细胞上清液中CGRP的浓度随不同质量浓度的NGF作用时间延长也相应增加(图1)。

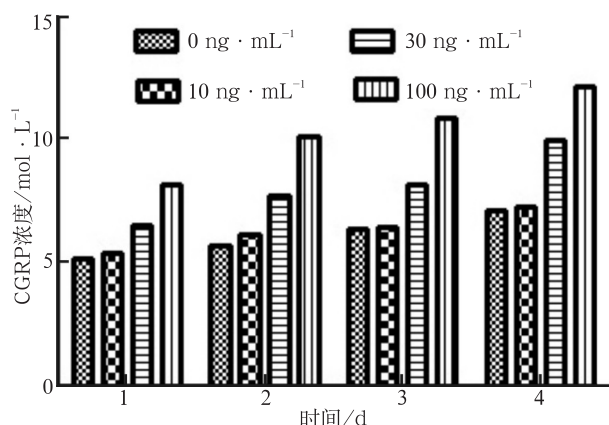


图1 MG-63细胞中CGRP的表达

Fig 1 The expression of CGRP in MG-63

2.2 NGF刺激MG-63细胞中CGRP mRNA的表达

RT-QPCR检测发现, NGF可以明显上调MG-63细胞CGRP mRNA的表达 ($P<0.05$), 而且随NGF质量浓度的升高, 此作用也相应增强 (图2)。此外, MG-63细胞总RNA中CGRP mRNA的表达量随不同质量浓度NGF作用时间的延长也相应增加 ($P<0.05$) (图2), 与ELISA检测结果一致。

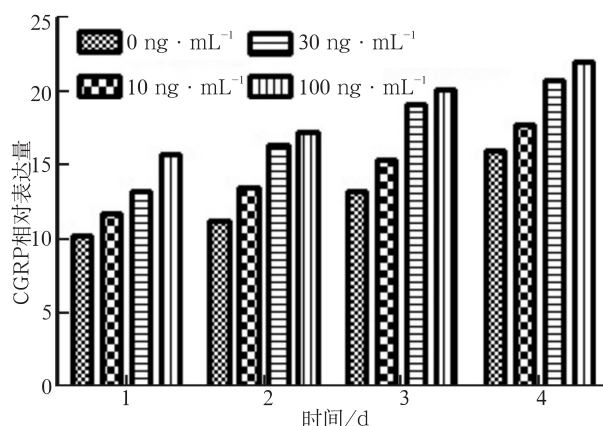


图2 MG-63细胞中CGRP mRNA的表达

Fig 2 The expression of CGRP mRNA in MG-63

2.3 加入NGF受体阻断剂后MG-63细胞CGRP mRNA的表达

RT-QPCR检测发现, 加入NGF阻断剂可以明显降低MG-63细胞分泌的CGRP mRNA ($P<0.05$), 随NGF质量浓度升高, 此作用也相应增强; 第3天NGF阻断剂的干扰作用最强 (图3)。

2.4 MG-63细胞增殖情况

CKK-8法检测发现, 加入NGF阻断剂后MG-63的细胞增殖效率明显低于其余组 ($P<0.05$), 而加入NGF刺激后MG-63细胞增殖效率明显高于空白对照组 ($P<0.05$), 随NGF质量浓度升高, 此作用也相应增强 (图4)。实验组MG-63细胞增殖效率随NGF作用时间延长也相应增加 ($P<0.05$) (图4)。

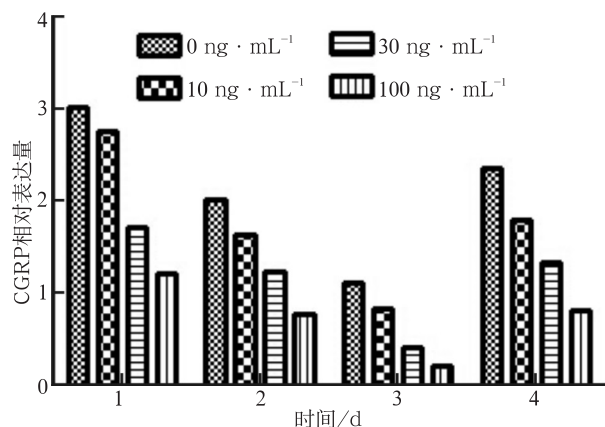


图3 加入NGF阻断剂后MG-63细胞中CGRP mRNA的表达

Fig 3 The expression of CGRP mRNA in MG-63 after added NGF receptor blocker

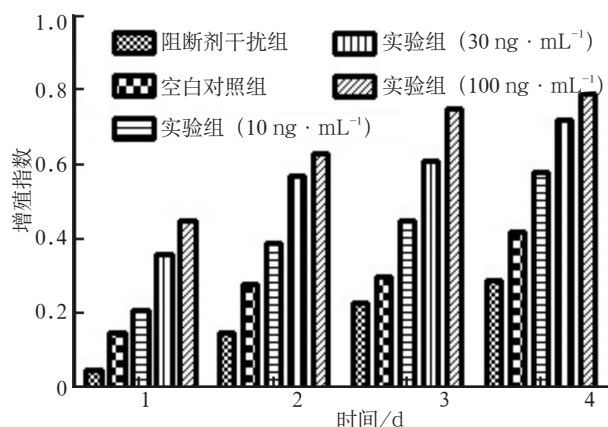


图4 MG-63细胞的增殖效率

Fig 4 The proliferation index of MG-63

3 讨论

CGRP是感觉神经信号分子的重要一员, 因在骨创伤愈合调控中具有重要作用而受到广泛关注。CGRP、P物质、血管活性肠肽等一些神经肽类物质都有促进骨折修复重建的作用, 而CGRP是在骨组织中分布最广泛的一种感觉神经源性神经肽类物质, 存在于口腔颌面部软硬组织, 在颌骨及其骨膜中均发现有大量CGRP阳性神经纤维分布^[6], 在颌骨骨创伤修复重建过程中发挥着重要作用。

CGRP对成骨细胞具有重要的促增殖效应。研究^[7]发现, CGRP可通过增强OPG mRNA的表达促进大鼠成骨细胞的增殖。Imai等^[8]用基因重组培育出能分泌CGRP的转基因大鼠, 通过形态学观察发现其成骨细胞活性大为增强, 说明成骨细胞可以通过自分泌CGRP的方式促进自身和周围细胞的增殖。但是, 也有学者^[9-10]通过检测成骨细胞DNA的合成发现, CGRP对MG-63细胞的增殖有抑制作用。目前

这一领域的主体认识是CGRP能够通过上调成骨样蛋白如碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I型胶原蛋白(collegen I)等成骨活性标志物的表达,促进成骨细胞分化成熟;但是同样有学者报道CGRP对成骨细胞分化具有抑制作用。由此可见,该领域对CGRP和成骨细胞增殖和分化的作用机制的认识尚未完善,观点存在矛盾。

NGF主要通过激活丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号途径而发挥其生物效应^[1],对神经系统生长发育有重要的作用。NGF在骨折愈合过程中也起到一定作用,在骨折愈合进程中可以检测到NGF表达增加^[12]。NGF在骨创伤愈合过程中不仅能促进下齿槽神经的再生,还能促进骨缺损愈合过程中的骨整合^[13]。此外大量的体内和体外研究^[14-15]也报道骨形成细胞中有NGF mRNA的表达。这表明骨创伤愈合过程中,NGF可以通过自分泌和旁分泌的形式参与。

在成骨细胞生物学研究中,采用与成骨细胞生物学行为高度类似的MG-63细胞株来代替成骨细胞进行研究已是常规方法。本研究通过预实验发现,培养5 d后细胞株的活性下降明显,因而采用1~4 d进行研究。在MG-63细胞株培养皿中加入NGF共培养,发现CGRP的表达量明显增高,并且随培养时间延长表达量也相应增加。RT-QPCR检测发现,在相同观测点的CGRP mRNA表达增加,与ELISA法检测结果一致,从基因层面验证了NGF对CGRP表达的上调作用。CCK-8法检测到MG-63细胞的增殖效率也明显增高。在MG-63细胞中加入NGF阻断剂PD98059, CGRP表达量明显减少,3 d时表达量最低, MG-63细胞的增殖效率也显著降低。

综上所述, NGF参与和影响骨创伤修复重建的方式可能是通过上调CGRP表达量从而间接调节骨创伤修复过程;然而NGF上调CGRP表达量的机制和途径尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(3):513-520.
- [2] 徐琳, 谭颖微, 何海涛. 降钙素基因相关肽对兔成骨细胞OPG/RANKL mRNA表达的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21(3):396-399.
- [3] 李焰, 张纲, 王建华, 等. CGRP对兔成骨细胞NO/NOS系统调控的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(3):

456-458.

- [4] 李焰, 张纲, 郑加军, 等. 下齿槽神经缺失对下颌骨骨折愈合影响的实验研究[J]. 西南军医, 2008, 10(1):11-12,14.
- [5] Asaumi K, Nakanishi T, Asahara H, et al. Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing[J]. Bone, 2000, 26(6):625-633.
- [6] Park SH, Sim YB, Kim CH, et al. Role of α -CGRP in the regulation of neurotoxic responses induced by kainic acid in mice[J]. Peptides, 2013, 44:158-162.
- [7] 肖啸, 胡冰. 不同浓度降钙素基因相关肽对大鼠成骨细胞OPG mRNA表达的影响[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(9):106-109.
- [8] Imai S, Matsusue Y. Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone[J]. Microsc Res Tech, 2002, 58(2):61-69.
- [9] Kawase T, Okuda K, Wu CH, et al. Calcitonin gene-related peptide acts as a mitogen for human Gin-1 gingival fibroblasts by activating the MAP kinase signalling pathway[J]. J Periodont Res, 1999, 34(3):160-168.
- [10] Kawase T, Okuda K, Burns DM. Immature human osteoblastic MG63 cells predominantly express a subtype 1-like CGRP receptor that inactivates extracellular signal response kinase by a cAMP-dependent mechanism[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 470(3):125-137.
- [11] Chung CW, Zhang QL, Qiao LY. Endogenous nerve growth factor regulates collagen expression and bladder hypertrophy through Akt and MAPK pathways during cystitis[J]. J Biol Chem, 2010, 285(6):4206-4212.
- [12] Zhuang YF, Li J. Serum EGF and NGF levels of patients with brain injury and limb fracture[J]. Asian Pac J Trop Med, 2013, 6(5):383-386.
- [13] Lee JY, Jahng JW, Kim SM, et al. Simultaneous inferior alveolar nerve regeneration and osseointegration with a nerve growth factor-supplying implant: a preliminary study[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2015, 73(3):410-423.
- [14] Nakanishi T, Takahashi K, Aoki C, et al. Expression of nerve growth factor family neurotrophins in a mouse osteoblastic cell line[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 198(3):891-897.
- [15] García R, Aguiar J, Alberti E, et al. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(3):753-754.

(本文编辑 吴爱华)