

# 生长因子网络调节对骨形成作用的研究

## IV. PDGF 对人胚成骨样细胞增殖及分化的影响

田卫东 王大章 乔 鞠 陈伟辉

**摘要** 目的: 研究不同剂量血小板衍生性生长因子(PDGF)对人胚成骨样细胞增殖与分化的影响。方法: 实验分为4组, 每组6孔, 每组分别加入浓度为0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml的PDGF, 每组均设空白对照, 在实验后第1, 3, 5, 7天分别检测人胚成骨样细胞<sup>3</sup>H-TdR 和<sup>3</sup>H-Proline 的掺入量, 以及碱性磷酸酶合成量。结果: PDGF 对人胚成骨样细胞的DNA 合成有明显的促进作用, 0.1~ 10 ng/ml PDGF 刺激成骨样细胞合成DNA 的作用最强, PDGF 对人胚成骨样细胞胶原蛋白和碱性磷酸酶合成没有明显的促进和抑制作用。结论: PDGF 在骨形成过程中不起主要作用或需与其它因子共同作用。

**关键词** 血小板衍生性生长因子 人胚成骨样细胞 增殖与分化

血小板衍生性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是通过二硫键连接两个亚基(A, B 链)组成分子量为30~ 35 kD 的多肽, 在凝血过程中由血小板释放出来又称为创伤因子或损伤激素, PDGF 直接或间接地参与创伤修复过程的炎症反应、组织和细胞分化与增殖过程。PDGF 可刺激多种细胞的DNA 合成、复制及细胞蛋白质的合成。PDGF 刺激结缔组织细胞生长的机制, 目前认为是PDGF 与生长调节素(sam atom ed in)和其它生长因子相互协同作用的结果。有实验表明, 某些表达C-sis 原癌基因的骨肉瘤细胞及非转化的成骨细胞可以产生PDGF 样活性物质, 但在骨组织培养物中一直未能检测出PDGF。此外, 骨中PDGF 样多肽主要分布在细胞膜上, 很少分泌到胞外介质中, 这一点也不同于其它分泌型生长因子。因此, 骨基质中与骨和软骨代谢有密切关系的PDGF 来源尚不清楚, 对PDGF 在骨形成中的作用及其机制也不清。本研究利用体外培养的人胚成骨样细胞, 从时间- 效应和剂量- 效应两个方面考察PDGF 对人胚成骨样细胞胶原蛋白合成的作用及其特点。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

PDGF 购自 G B C O B R L U S A, <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶脱氧核苷(<sup>3</sup>H-TdR)和<sup>3</sup>H-脯氨酸(<sup>3</sup>H-Proline)购自中国原子能研究所。

#### 1.2 方法

人胚成骨样细胞分离培养见参考文献1。

1.2.1 实验分组 实验组按PDGF 的不同剂量分为4组, PDGF 终含量为0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml 和100 ng/ml, 每组6个孔, 各组均设空白对照组, 培养1, 3, 5, 7 d 后, 用下列方法检测。

1.2.2 检测指标 人胚成骨样细胞DNA、胶原蛋白及碱性磷酸酶合成的检测方法见参考文献1。

1.2.3 统计分析 统计分析方法参见参考文献1。

### 2 结 果

#### 2.1 PDGF 对人胚成骨样细胞DNA 合成的作用

在人胚成骨样细胞中加入PDGF 培养1 d 后, PDGF 对成骨样细胞的DNA 合成无明显影响, 3 d 后, PDGF 刺激成骨样细胞的DNA 合成明显增加, 培养5 d 后, PDGF 刺激成骨样细胞DNA 合成的作用达到最大, 7 d 后, PDGF 的作用明显减弱。作用特点: PDGF 含量在0.1~ 10 ng/ml 时呈剂量依赖性, PDGF 含量达100 ng/ml 时, 其促进成骨样细胞增殖的作用反而减弱(图1, 2)。

#### 2.2 PDGF 对人胚成骨样细胞胶原蛋白合成作用

加入PDGF 1 d 后, 不同含量的PDGF 对人胚成骨样细胞胶原蛋白合成均无明显影响, 3~ 7 d 后, PDGF 对成骨样细胞胶原蛋白合成的影响不明显。5 d 后10 ng/ml PDGF 对胶原蛋白合成有一定

国家教委博士点基金及CMB 基金资助课题(编号CMBY-9401)

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院

促进作用,而其它含量组在不同实验时间内对成骨样细胞合成胶原蛋白无明显影响(图3,4)。

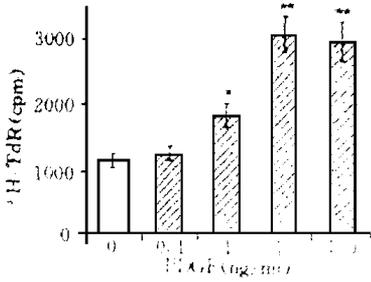


图1 第5天时不同剂量PDGF对人胚成骨样细胞<sup>3</sup>H-TdR掺入量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  (以下各图同)

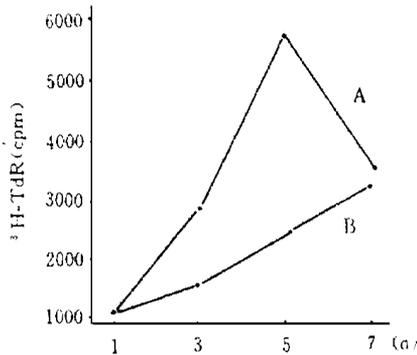


图2 各实验期10 ng/ml PDGF对人胚成骨样细胞<sup>3</sup>H-TdR掺入量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

A 实验组 B 对照组(以下各图同)

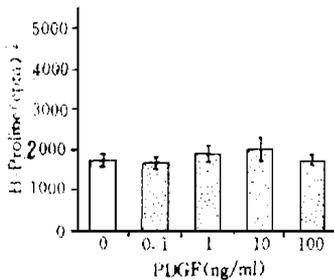


图3 第5天时不同剂量PDGF对人胚成骨样细胞<sup>3</sup>H-Proline掺入量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

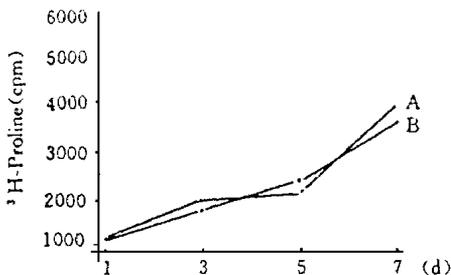


图4 各实验期10 ng/ml PDGF对人胚成骨样细胞<sup>3</sup>H-Proline掺入量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.3 PDGF对人胚成骨样细胞碱性磷酸酶合成的

### 作用

加入不同剂量PDGF,1 d后,PDGF对人胚成骨样细胞碱性磷酸酶(ALP)无明显影响。3 d和5 d后,PDGF对成骨样细胞合成ALP有一定的促进作用,其作用并不随PDGF的剂量增加而增强。7 d后,所有实验组ALP含量与对照组接近(图5,6)。

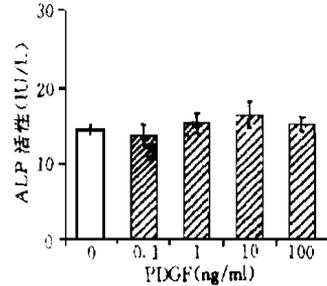


图5 第5天时不同剂量PDGF对人胚成骨样细胞ALP含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

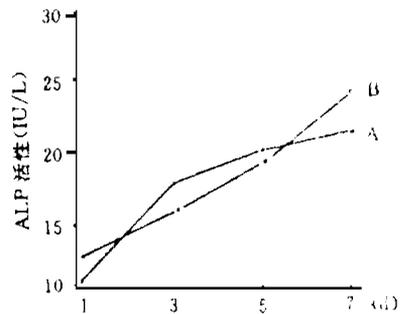


图6 各实验期10 ng/ml PDGF对人胚成骨样细胞ALP含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

PDGF是血小板产生的众多细胞生长因子中最主要的一种,正常人每个血小板约含1000个PDGF分子。当血小板激活时,PDGF便与血小板第IV因子、 $\beta$ 球蛋白等一起释放出来,在血清中的含量为15~20 ng/ml<sup>2,3</sup>。PDGF对所有起源于中胚层的细胞均有致丝裂活性,但在全身结缔组织细胞与PDGF的反应并不是依靠循环血中的PDGF来发挥作用,而是PDGF的局部合成与分泌的效应。现已证实<sup>3,4</sup>,体内除血小板外,激活的巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞和平滑肌细胞等均可在PDGF基因转录因子的调控下产生PDGF。进一步的研究发现<sup>5</sup>,人和牛骨组织提取物中有PDGF样因子,并确认成骨细胞也能合成PDGF,在骨基质中含量为50  $\mu\text{g/g}$ 。由此推测,PDGF对成骨细胞代谢及功能的调节发挥着一定的作用。

本实验结果表明: PDGF 对人胚成骨样细胞的 DNA 合成有明显的促进作用, 0. 1~ 10 ng/ml 时作用呈剂量依赖型, 10 ng/ml PDGF 刺激成骨样细胞合成 DNA 的作用最强, 当剂量增至 100 ng/ml, 其作用不但不增强, 反而略有下降。以往的研究发现<sup>6</sup>, 在二倍体成纤维细胞, 3T3 细胞、平滑肌细胞和其它结缔组织细胞表面有 PDGF 的特异性受体, 每个细胞的受体数大约为  $4 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$  个。因此, 本研究认为, 生长因子的最大有效浓度取决于靶细胞表面特异性受体的数量和亲和力大小, 只要达到与受体结合的最佳浓度就要发挥最大效应。同时, PDGF 对成骨样细胞合成 DNA 的作用还存在一个时间效应关系, 在 PDGF 作用的 3~ 5 d 后, 成骨样细胞的 DNA 合成最为明显, 到 7 d 后作用下降。以往对 PDGF 生物学活性的研究表明, PDGF 与其受体结合后的不同时间将表现不同的生物学效应, 而且长时间作用后, 其靶细胞膜上受体数目将明显减少, 生物学效应随之降低。

本实验还发现, PDGF 对人胚成骨样细胞的胶原蛋白和碱性磷酸酶合成没有明显的促进和抑制作用。但有研究报道<sup>7</sup>, PDGF 可刺激胎鼠颅盖骨的非胶原蛋白的合成, 而非胶原蛋白对骨基质的形成与矿化具有一定的作用。PDGF 对非骨源性的成纤维细胞的作用与 IGF 相似, 骨组织中也含有 IGF 多肽, 这可能是 PDGF 通过刺激骨外膜成纤维细胞合成局部骨源性 IGF 多肽。这两种生长因子的协同作用维持正常的骨生长。

PDGF 的另一特征是在低浓度时即可对中性白细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞产生趋化作用, 而其它生长因子却无此作用。这一作用可能是通过 PDGF 作用于靶细胞后使磷脂酰肌醇转变, 释放花生四烯酸, 引发前列腺素物质 (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>) 的释放来完成<sup>8</sup>。实验证实<sup>9</sup>, PDGF 分子的改变可导致活性丧失, 但仍可保持趋化作用, 表明不同的 PDGF 结构决定两种不同的功能。PDGF 的趋化作用在骨愈合的生理过程中很重要, 通过吸引成纤维细胞向

损伤部位迁移, 并诱导其增殖分化以达到骨愈合。总之, PDGF 对正常及病理状态下的创伤修复有肯定的作用, 并具有两个特点: PDGF 的作用依赖其浓度。低浓度时主要起趋化组织修复细胞的作用, 高浓度时主要促进细胞增殖分化。PDGF 与其它生长因子有协同效应。总之, 单一的 PDGF 不能完善其对成骨细胞增殖和分化的调节作用, 还需要其它生长因子的相互协同。

#### 4 参考文献

- 1 田卫东, 王大章, 乔 鞠, 等 生长因子网络调节对骨形成作用的研究 III bFGF 对人胚成骨样细胞增殖及分化的影响 华西口腔医学杂志, 1998, 16: 344
- 2 Deuel TF, Huang JS, Proffitt RT, et al Platelet-derived growth factor-structure, function, and role in normal and transformed cells J Clin Invest, 1984, 74: 669
- 3 Ross R, Vogel A. The biology of platelet-derived growth factor Cell, 1986, 46: 155
- 4 Ross R, Vogel A. Platelet-derived growth factor and its role in health and disease Philos Trans R Soc Lond [Bid] 1990, 32: 155
- 5 Mohan S, Linkhart T, Farley A, et al Identification and quantification of four distinct growth factors stored in human bone matrix J Bone Miner Res, 1987, 2: 44
- 6 Heldin CH, Westermark B, Wasteson A, et al Platelet-derived growth factors: A family of isoforms that bind to two distinct receptors Br Med Bull, 1989, 45: 453
- 7 Canalis E. Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvariae Metabolism, 1981, 30: 970
- 8 Shupnik MA, Antoniades HN, Tashjian AH, et al Platelet-derived growth factor increases prostaglandin production and decreases epidermal growth factor receptor in human osteosarcoma cells Life Sci, 1982, 90: 347
- 9 Williams LT, Antoniades HN, Goetzl EJ, et al Platelet-derived growth factor stimulates mouse 3T3 cell mitogenesis and leukocyte chemotaxis through different structural determinants J Clin Invest, 1983, 72: 1759

(1998- 05- 26 收稿)

# The Effects of PDGF on the Proliferation and Differentiation of Human Osteoblast-like Cells

Tian Weidong, Wang Dazhang, Qiao Ju, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

## Abstract

**Objective:** To study the effects of platelet-derived growth factor (PDGF) with separate concentrations on the proliferation and differentiation of osteoblasts. **Methods:** Four experiment groups, each with 6 pores, were divided with 4 gradient concentration of PDGF (0, 1 ng/ml, 10 ng/ml and 100 ng/ml), then the incorporation of <sup>3</sup>H-TdR and <sup>3</sup>H-Proline of osteoblast-like cells and alkaline phosphatase (ALP) content of the cells were tested on the 1st, 3rd, 5th and 7th day. **Results:** PDGF stimulated the synthesis of DNA of osteoblast-like cells, and affected the proliferation of osteoblast-like cells among the 0-10 ng/ml, but produced no significant stimulatory effects on bone collagen synthesis or ALP activity. **Conclusion:** PDGF may be modified by other local growth factors. It isn't important regulator of bone formation.

**Key words:** PDGF human osteoblast-like cell proliferation and differentiation

## 云南白药糊剂治疗复发性口腔溃疡效观察

向培新

作者根据中医活血化瘀、清热、凉血、清心泻火的理论, 采用云南白药糊剂治疗口腔溃疡患者 624 例, 临床效果满意。现报告如下。

### 1 材料和方法

作者自 1996 年 3 月~ 1997 年 4 月于湖北省枝江市口腔医院门诊选择 624 例复发性口腔溃疡患者作为观察对象。其中男 249 例, 女 375 例, 年龄 5~ 62 岁。病史最短 3d, 最长 24 年。间歇发作期间最短 1 月 2 次, 最长 3 月 1 次, 持续时间 5~ 15 d。

取云南白药 1 瓶 (4g, 云南大理制药厂), 加入食用菜油适量。搅拦呈糊状, 用消毒棉签将云南白药糊剂涂布在口腔粘膜溃疡面上。饭前、饭后、睡前各涂药 1 次, 涂药后 2h 内不宜漱口, 直至溃疡愈合为止。

疗效标准分为显效、有效及无效。显效: 涂药 3~ 5d 内, 局部红肿减退, 无疼痛, 溃疡愈合, 间歇期 3 月以上。有效: 涂药 7 d 内, 溃疡数目明显减少, 疼痛减轻, 9 d 左右溃疡愈合, 间歇期 2 月以上。无效: 涂药 7~ 9 d 内, 溃疡数目相对减少, 疼痛减轻, 但仍此愈彼发。间歇期与治疗前无大区别。

### 2 结果

云南白药糊剂治疗 624 例复发性口腔溃疡疗效观察结果见表 1。

表 1 云南白药糊剂治疗 624 例复发性口腔溃疡的治疗效果

项目	男	女	合计	%
显效	192	316	508	81.4
有效	47	49	96	15.4
无效	8	12	20	3.2

### 3 讨论

云南白药有活血化瘀、消肿止痛作用, 能消除血栓, 减轻血管内壁通透性, 阻断或减少病灶纤维素和淋巴细胞的渗出, 从而舒张血管, 改善溃疡局部的血液循环。菜油有清热、泻火、凉血作用, 并有一定的粘性, 有保护创面、减少刺激的作用, 故能促进溃疡愈合。作者采用云南白药糊剂局部治疗 624 例复发性口腔粘膜溃疡, 症状明显减轻, 溃疡愈合快, 间歇性明显延长。

云南白药糊剂药源广, 使用方便, 无毒性, 疗效显著, 有一定的应用价值。

### 4 参考文献

- 1 潘忠堤, 许爱萍, 李毅, 等. 中西医结合治疗复发性口腔溃疡 288 例临床疗效分析. 临床口腔医学杂志, 1997, 13: 56
- 2 胡顺广, 张春兰. 甲硝哒唑、补心丸治疗复发性口腔溃疡 62 例疗效观察. 中华口腔医学杂志, 1994, 29: 331

(1998-06-11 收稿)