

· 基础研究 ·

动态压应力促进大鼠成骨细胞成熟分化的基因水平研究

田林强 郭风劲 虞姬哲 陈安民

【摘要】目的 观察不同强度压应力刺激对大鼠成骨细胞骨桥蛋白(OPN)、核结合因子 $\alpha 1$ (Runx2)、骨钙素(OC)、Osterix、碱性磷酸酶(ALP)及骨形态发生蛋白2(BMP-2)mRNA表达的影响。**方法** 采用酶消化法从胎鼠颅骨中提取成骨细胞,经体外扩增后采用ALP染色及茜素红染色法对纯化后的细胞进行鉴定;将所培养成骨细胞按随机数字表法分为对照组、20 mmHg实验组、50 mmHg实验组及100 mmHg实验组,分别置于压力加载装置中给予不同强度(压应力强度分别为0、20、50和100 mmHg)压应力刺激。于压应力刺激24 h后采用实时定量PCR技术检测各组细胞OPN、Runx2、OC、Osterix、ALP及BMP-2 mRNA表达情况。**结果** 成骨细胞在20 mmHg压应力刺激下,其OPN、Runx2、OC、BMP-2及ALP mRNA表达均较对照组明显升高($P < 0.05$),Osterix mRNA表达亦较对照组增强,但组间差异无统计学意义($P > 0.05$);在50 mmHg压应力刺激下,成骨细胞OPN、Runx2、OC、Osterix、BMP-2和ALP mRNA表达亦较对照组进一步增高($P < 0.05$);在100 mmHg压应力刺激下,成骨细胞OPN、Runx2、OC、Osterix、BMP-2及ALP mRNA表达虽较对照组有所增强,但此时组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 一定强度范围的压应力刺激能够促进成骨细胞OPN、Runx2、OC、Osterix、ALP及BMP-2 mRNA表达,这可能是压应力刺激促进骨折愈合的重要机制之一。

【关键词】 压应力; 成骨细胞; 骨桥蛋白; 骨钙素; 碱性磷酸酶

A genetic study of dynamic compressive stress promoting proliferation and differentiation of rat osteoblasts

TIAN Lin-qiang, GUO Feng-jin, YU Ji-zhe, CHEN An-min. Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: CHEN An-min, Email: amchen@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the impacts of dynamic compressive stress on the mRNA expression of osteopontin (OPN), runt related gene 2 (Runx2), osteocalcin (OC), osterix, alkaline phosphatase (ALP) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in the osteoblasts of Sprague-Dawley (SD) rats. **Methods** Osteoblasts extracted from skull periosteum tissue of neonatal SD rats were digested using trypsin and collagenase I, then were subcultured and amplified in vitro. ALP staining and alizarin red staining were performed to identify the purified cells. The cells were treated with compressive stress at 20, 50 or 100 mmHg for 24 h. The expression levels of OPN, Runx-2, OC, osterix, ALP and BMP-2 were measured and quantitatively analysed using a real-time quantitative polymerase chain reaction. **Results** Under 20 mmHg of dynamic compressive stress the expression levels of OPN, Runx2, OC, osterix, ALP and BMP-2 all were elevated compared with the control group. The peak expression occurred under 50 mmHg pressure. The expression levels did not change significantly compared with the control group under 100 mmHg pressure. **Conclusions** Moderate dynamic compressive stress can promote the expression of OPN, Runx-2, OC, osterix, ALP and BMP-2 mRNA in osteoblasts, which might be an important mechanism for promoting the union of fractures.

【Key words】 Compressive stress; Osteoblasts; Osteopontin; Osteocalcin; Alkaline phosphatase

目前研究发现,机械应力刺激对骨折愈合过程具有重要影响,如动态压应力刺激能够促进骨折愈合^[1],但其作用机制尚未明确。本研究在体外分离、纯化成骨细胞基础上,通过给予不同强度压应力刺激

观察其对细胞成骨相关因子 mRNA 表达的影响,从而在基因水平上探讨动态压应力刺激对成骨细胞分化的作用机制。

材料与方法

一、主要实验材料

1. 主要仪器:包括 Subgreen 和八联管(日本Toyoba公司)、Real-time PCR 仪(美国 Bio Rad 公司)、细胞培养箱(Heal Force HF240 型)、倒置相差显微镜(Nikon

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.03.006

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科

通信作者:陈安民,Email:amchen@tjh.tjmu.edu.cn

Eclipse TE2000-S 型)、体外细胞开放式压力程控培养装置(专利号:CN201065407)。

2. 主要试剂:包括逆转录试剂盒(广州东盛生物科技有限公司提供)、DMEM/F-12 培养基(美国 Hyclone 公司)、胎牛血清(美国 Gibco 公司)、胰蛋白酶、I 型胶原酶(美国 Sigma 公司)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(南京建成生物有限公司提供)等。

3. 实验动物:共选取 6 只新生 24 h 清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,由华中科技大学同济医院实验动物中心提供。

二、成骨细胞培养及处理

1. 成骨细胞取材:参照陈筠等^[2]介绍的细胞取材方法,在无菌条件下处死新生大鼠,取其颅盖顶骨,刮除骨膜及结缔组织,剪成 1 mm³ 大小碎块,经 D-Hanks 液冲洗 3 次后,分别置于等量 0.25% 胰酶和 0.1% I 型胶原酶中震荡消化 30 min,随后离心(离心半径 75 mm, 800 r/min, 5 min)更换消化液,反复消化数次后,将含有细胞的消化液以离心半径 75 mm, 800 r/min 离心 5 min,弃上清液,将沉淀用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基重悬,种植于培养瓶内,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3~4 d 换液 1 次,待细胞铺满瓶底 80% 时进行传代。传代时以 0.25% 胰蛋白酶进行消化,当细胞变圆且有少部分细胞脱壁时倒掉消化液,连续传代 5 次,取第 5 代细胞用于实验研究。

2. 成骨细胞鉴定:①采用 ALP 试剂盒进行染色,将所培养细胞按 10⁶ 个/孔接种于放置有盖玻片的 6 孔板中,培养 2 d 后弃培养基,经 4% 多聚甲醛液固定 30 min,再用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤 3 次,每次 10 min,加入适量染色工作液,室温避光孵育 1~4 h,弃染色液后用 PBS 液洗涤,终止染色;于倒置显微镜下计数 ALP 阳性细胞数量。②取培养 10 d 的细胞,用 PBS 液冲洗 2 遍后加入 4% 多聚甲醛固定 10 min,弃多聚甲醛,经 PBS 液冲洗 2 遍后加入 pH 值为 8.3 的 0.1% 茜素红 Tris-HCl 染液,37 ℃ 孵育 1 h 后流水冲洗,再次加入固定液后进行细胞形态学观察。

3. 细胞分组及处理:将体外培养的第 5 代成骨细胞分为对照组、20 mmHg 实验组、50 mmHg 实验组及 100 mmHg 实验组,每组 3 个样本。参照祁军等^[3]介绍的方法进行动态压应力刺激,将上述各组细胞按 1 × 10⁵ 个/瓶种植在 50 ml 一次性培养瓶内,培养 2~3 d,待细胞铺满瓶底 70%~80% 时,将各组细胞置入压力加载装置内,分别给予 0、20、50 和 100 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 压应力刺激,持续 24 h。

4. 成骨相关基因检测:采用 Trizol 试剂一步法提

取各组细胞总 RNA (具体操作步骤参照试剂盒说明书),选用分光光度计检测样品浓度及纯度,取 1 μg 总 RNA 经实时定量多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)处理后得到 cDNA;引物由美国 Invitrogen 公司提供,其中 β-actin 上游引物序列为 5'-ACCTCTAT-GCCAACACAGTGC-3',下游引物序列为 5'-AGCCAC-CAATCCACACAGAG-3';骨桥蛋白(osteopontin, OPN)上游引物序列为 5'-GATGAACAGTATCCCGATGCC-3',下游引物序列为 5'-CCCTCTGCTTATACTCCTTGGAC-3';核心结合因子/Runx2 (core binding factor-α1, Cbf-α1)上游引物序列为 5'-CTACTCTGCCGAGC-TACGAAAT-3',下游引物序列为 5'-TCTGTCTGTGCCT-TCTTGTTTC-3';骨钙素(osteocalcin, OC)上游引物序列为 5'-GGAGGGCAGTAAGGTGGTGA-3',下游引物序列为 5'-GAAGCCAATGTGCTCCGC-3';Osterix 上游引物序列为 5'-CTGGGAAAAGGAGGCACAAAG-3',下游引物序列为 5'-GGGTGGGTAGTCATTGGCATAG-3';ALP 上游引物序列为 5'-CCTGGACCTCATCAGCATTT-3',下游引物序列为 5'-AGGGAAGGGTCAGTCAGGTT-3';骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2)上游引物序列为 5'-CAGCGAGTTTGAGTTGAGG-3',下游引物序列为 5'-CGGTACAGGTGCGACATAT-3'。采用 SYBRGreen 荧光定量试剂盒进行 PCR 反应,反应体系为 20 μl;反应扩增条件如下:95 ℃ 预变性 3 min, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火延伸 30 s,共进行 40 个扩增循环,最后检测上述各项指标 CT 值,目标基因表达量采用 2^{-ΔΔCT} 法计算^[4]。

三、统计学分析

本研究所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,选用 SPSS 15.0 版统计学软件包进行数据分析,各组间数据比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

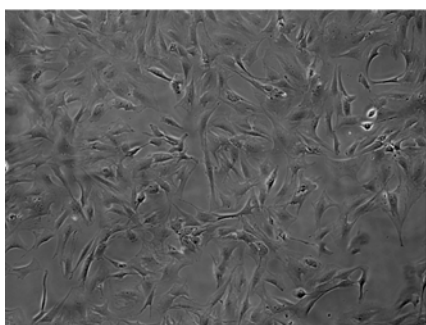
结 果

一、成骨细胞鉴定及形态学观察

通过光镜观察发现,细胞培养 24 h 后呈长梭形、三角形或纺锤形等,细胞胞质透亮、饱满,遮光性弱,圆形或椭圆形细胞核居中或偏于一侧;传代后细胞以三角形为主,呈集落样生长,随着细胞增殖最终可连成片状,详见图 1。采用光镜观察 ALP 染色结果,发现阳性细胞呈梭形,有多个突起,细胞胞质呈深蓝色(图 2),成骨细胞阳性率为 93.2%。茜素红染色可见细胞间质内有大量红色结节沉积(图 3),表明细胞具有明显成骨能力,可确定所培养细胞为成骨细胞。

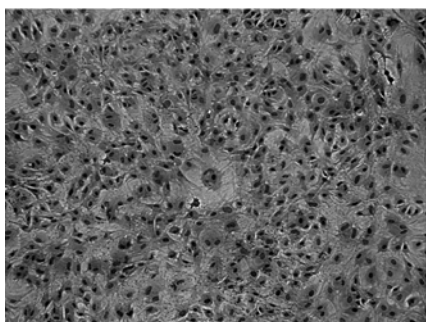
二、不同强度压应力刺激对成骨相关基因 mRNA 表达的影响

成骨细胞经不同强度压应力刺激后,其成骨相关



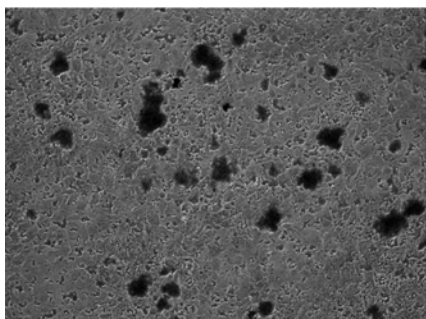
注:可见细胞呈梭形或多角形,遮光性弱,细胞有多个突起并相互间连成片状

图1 细胞培养 24 h 后倒置相差显微镜观察(×100)



注:可见 ALP 阳性细胞胞质呈深灰色,染色细胞数量较多,细胞纯度达 93.2%

图2 培养细胞 ALP 染色结果观察(×100)

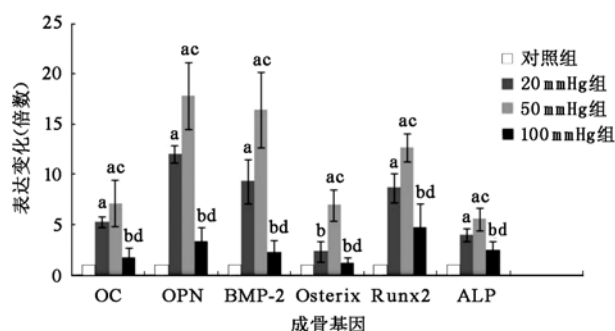


注:可见培养细胞间质内有大量红色矿化结节形成

图3 培养细胞茜素红染色结果观察(×100)

基因表达水平均出现明显变化,例如在 20 mmHg 压应力刺激下,成骨细胞 OPN、Runx2、OC、BMP-2 及 ALP mRNA 表达均较对照组显著升高($P < 0.05$),Osterix mRNA 表达亦较对照组有所增强,但组间差异无统计学意义($P > 0.05$);在 50 mmHg 压应力刺激下,成骨细胞 OPN、Runx2、OC、Osterix、BMP-2 及 ALP mRNA 表达均较对照组进一步增强($P < 0.05$),同时也显著高于 20 mmHg 实验组水平($P < 0.05$);在 100 mmHg 压应力刺激下,成骨细胞 OPN、Runx2、OC、Osterix、BMP-2 和 ALP mRNA 表达升高幅度不显著,与对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$);与 50 mmHg 实验组比较,发现 100 mmHg 实验组上述各项指标均呈现明显下降

趋势,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$),具体情况详见图 4。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P > 0.05$;与 20 mmHg 实验组比较,^c $P < 0.05$;与 50 mmHg 实验组比较,^d $P > 0.05$

图4 不同强度压应力刺激对成骨相关基因 mRNA 表达的影响

讨 论

成骨细胞是体内骨形成及骨代谢的主要细胞,其体外培养是研究骨代谢和骨组织工程的重要基础之一。成骨细胞体外培养方法包括间充质干细胞培养法、胫骨骨膜法、组织块培养法和胎鼠颅骨消化法等^[5]。本研究采用乳鼠颅骨消化培养法获取原代细胞,并根据成纤维细胞较成骨细胞对胰酶消化更敏感的特性,适时去掉消化液和悬浮的少量细胞,从而纯化成骨细胞。在经过 5 次传代后,发现成骨细胞纯度达 90% 以上,并具有良好的成骨能力,为后续实验提供了理想的细胞来源。

在成骨细胞的发育成熟过程中,其基因表达变化主要分为三个阶段,分别是细胞增殖期、细胞外基质成熟期及细胞外基质矿化期。在各个阶段中,均有相应基因表达从而调控成骨细胞分化、成熟进程。这些基因的表达产物成为反映该阶段骨代谢水平的特异性指标,通过检测其含量水平,有助于了解成骨细胞处于何种发育阶段;其中 Runx2 表达是成骨细胞开始分化的重要标志,它是骨形成过程中最早和最具特异性的标志基因之一;高表达 Runx2 可激活 OC、OPN、骨涎蛋白的转录及表达,从而促进成骨细胞成熟^[6]。Osterix 是近年来发现的一种含有锌指(zinc finger)结构的骨形成转录因子,它是成骨细胞分化和骨形成过程中不可或缺的重要调节因子^[7];Osterix 能调控许多重要成骨基因表达,如 OC、I 型胶原蛋白、骨桥素及骨涎蛋白等^[7-8]。孙冬梅等^[9]研究发现,在成骨细胞系及非成骨细胞系中,Runx2 均可诱导 Osterix 表达,并且能够上调 Osterix 基因启动子活性,而且在成骨细胞分化过程中,Runx2 能通过上调 Osterix 表达来刺激 I 型胶原基因转录。BMP-2 是转化生长因子 β 超家族中的重要成员之一,在体内通过 Smad 通路诱导成骨细胞分化、成

熟,是目前已知诱导成骨能力最强的细胞因子之一^[10-11],其表达增强可显著促进成骨细胞成熟;另外还有研究表明,BMP-2 可上调机体 Osterix 表达^[12],从而促进成骨细胞矿化及成熟。ALP 高表达是成骨细胞分化的重要标志之一,它通过水解有机磷酸盐而增加局部磷酸盐浓度,促进该处羟基磷灰石结晶形成^[13]。OPN 是高磷酸化的糖蛋白,是细胞外骨基质的主要成分,在骨的矿化形成中发挥重要作用^[14]。OC 是高度保守的小分子活性物质,首先在骨组织中被发现,在骨形成及矿化过程中发挥重要调节作用;在矿化发生阶段,机体 OPN 及 OC 表达均显著增强,OC 的出现即标志着成骨细胞分化成熟^[15]。

目前大量研究发现,成骨细胞在分化成熟过程中受多种外界因素调控^[13,16],其中机械刺激是重要影响因素之一。Kanno 等^[17]采用单轴正弦式牵张应力刺激 MC3T3-E1 成骨样细胞和原代培养的大鼠成骨细胞,发现机械刺激能够通过有丝分裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路和 ERK1/2 信号通路激活 Runx2 活性,促进成骨细胞 ALP、OC 及 Osterix 表达。Kido 等^[18]研究表明,流体剪切力能够刺激成骨细胞白介素 11 表达,从而介导成骨细胞分化,该效应可能是通过 WNT 途径实现的。本研究分别采用不同强度压应力刺激成骨细胞,并观察其成骨相关基因 mRNA 表达的变化情况,结果发现 20 mmHg 压应力刺激能显著促进成骨细胞 OPN、Runx2、OC、Osterix、BMP-2 及 ALP mRNA 表达增强,并且当压应力强度升高至 50 mmHg 时上述指标进一步增强,表明一定强度的压应力刺激可促进成骨细胞成熟;但当压应力刺激强度升高至 100 mmHg 时,上述各项指标表达水平均显著降低,与 50 mmHg 实验组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$),提示并不是压应力刺激强度越高,其促成骨细胞成熟效应就越强,而是在一定强度范围内压应力刺激可显著促进成骨细胞分化与成熟,如压应力刺激强度超出该范围,则促成骨细胞分化效应显著降低,这也为临床医师在制订骨折患者康复训练强度时提供参考依据。

综上所述,本研究结果表明,细胞外压应力强度升高至一定范围内时可显著加速成骨细胞分化,为临床指导骨折患者适当负重提供参考依据。需要注意的是,本研究只是在 RNA 水平上对压应力刺激效应进行了观察,并未检测相应蛋白表达情况,其具体细胞信号通路也尚未明确,这些均有待后续研究进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 任可,张春才,许硕贵,等.持续动态压应力对实验性骨折愈合的

影响.第四军医大学学报,2004,25:41-45.

- [2] 陈筠,尹美珍,李世普.大鼠成骨细胞的原代培养与鉴定.武汉大学学报(医学版),2005,26:560-562.
- [3] 祁军,陈安民,张虹,等.动态压应力对生长板软骨前体干细胞 PTHrP 及细胞外基质 mRNA 表达的影响.中华小儿外科杂志,2010,31:382-386.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 2001,25:402-408.
- [5] 袁月,哈斯达来,祝海霞,等.大鼠胎鼠成骨细胞原代培养方法研究.中国实用口腔杂志,2010,3:619-621.
- [6] Ducy P, Starbuck M, Priemel M, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. Genes Dev, 1999,13:1025-1036.
- [7] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell, 2002,108:17-29.
- [8] Kim B, Kim H, Park H. Runx2 phosphorylation induced by fibroblast growth factor-2/protein kinase C pathways. Proteomics, 2006,6:1166-1174.
- [9] Sun DM, Liu ZB, Zhao Y, et al. Runx2 is involved in regulating osterix promoter activity and gene expression. Progr Biochem Biophys, 2006,33:957-964.
- [10] Ozeki N, Jethanandani P, Nakamura H, et al. Modulation of satellite cell adhesion and motility following BMP2-induced differentiation to osteoblast lineage. Biochem Biophys Res Commun, 2007,353:54-59.
- [11] Balint E, Lapointe D, Drissi H, et al. Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. J Cell Biochem, 2003,89:401-426.
- [12] 潘秋辉,李益广,杨松海,等.骨形态发生蛋白 2 通过 Smad 途径上调 Osterix 的表达.中国生物化学与分子生物学报,2008,24:40-45.
- [13] 彭飞,吴华,郑亚东,等.620 nm 非相干性红光照射对大鼠成骨细胞增殖及分化的影响.中华物理医学与康复杂志,2011,33:332-335.
- [14] Chen J, Singh K, Mukherjee B, et al. Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: evidence for a role for OPN in bone formation and resorption. Matrix, 1993,13:113-123.
- [15] Banerjee A, Burghard RC, Johnson GA, et al. The temporal expression of osteopontin (SPP-1) in the rodent model of alcoholic steatohepatitis: a potential biomarker. Toxicol Pathol, 2006,34:373-384.
- [16] 张学军,张建保,文峻,等.极低频电磁场对成骨细胞增殖及分化的影响.中华物理医学与康复杂志,2006,28:79-81.
- [17] Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, et al. Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts. J Cell Biochem, 2007,101:1266-1277.
- [18] Kido S, Kuriwaka KR, Imamura T, et al. Mechanical stress induces interleukin-1 expression to stimulate osteoblast differentiation. Bone, 2009,45:1125-32.

(修回日期:2012-01-20)

(本文编辑:易浩)