

成骨细胞中激活剂蛋白-1 家族成员 对流体剪切力的响应

朱赴东, 赵士芳

(浙江大学医学院附属口腔医院 口腔颌面外科, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的 研究激活剂蛋白-1 家族成员 FosB, c-Fos, c-Jun, JunD, JunB, Fra-1 和 Fra-2 对不同大小的流体剪切力的生理响应。方法 对新生 SD 大鼠颅盖骨中分离出的成骨细胞施加流体剪切力, 分成 4 组, 每组加载的水平剪切力大小分别为 0.8 Pa, 1.2 Pa, 1.4 Pa 及 1.6 Pa。每组在加载剪切力 0 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min 后分别用逆转录聚合酶链反应测试 FosB, c-Fos, c-Jun, JunD, JunB, Fra-1 和 Fra-2 mRNA 的表达。结果 FosB, c-Fos, c-Jun, JunD 和 JunB 在水平剪切力加载 15 min 时表达明显增高 ($P < 0.05$), Fra-1 和 Fra-2 在流体剪切力刺激后都有增高, 但是各个时间组之间却没有统计学差异 ($P > 0.05$)。当剪切力为 1.2 Pa 时, FosB, c-Fos, c-Jun, JunD 和 JunB mRNA 表达明显高于其他各组 and 空白对照组 ($P < 0.05$)。结论 FosB, c-Fos, c-Jun, JunD, JunB, Fra-1 和 Fra-2 等参与了力学刺激引发细胞响应的过程。当成骨细胞受到外界力学刺激后, 激活剂蛋白-1 在外界信号刺激引起的信息传递级联反应中起重要的耦联作用, 充当核内第三信使和基因转录调控的分子开关。

[关键词] 流体剪切力; 成骨细胞; 激活剂蛋白-1

[中图分类号] R 780.2 **[文献标识码]** A

Activating Protein-1 Members in Response to Changes of Wall-shear Stress in Osteoblastic Cells ZHU Fu-dong, ZHAO Shi-fang. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital, School of Stomatology, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective** To observe activating protein-1 (AP-1) members in response to changes of wall-shear stress in osteoblastic cells *in vitro*. **Methods** Isolated and purified osteoblastic cells from the calvaria of newborn SD rats were cultured and subcultured. The third generation cells were subjected to wall-shear stress of 0.8 Pa, 1.2 Pa, 1.4 Pa and 1.6 Pa separately. Gene expression of the seven AP-1 members were studied before (0 h) and 10 min, 15 min, 30 min, 60 min after treated with wall-shear stress. **Results** The expression of FosB, c-Fos, c-Jun, JunD and JunB mRNA increased transiently after application of 1.2 Pa wall-shear stress in osteoblastic cells compared to 0.8 Pa, 1.4 Pa and 1.6 Pa stress, and peaked at 15 min. **Conclusion** Mechanical environment changes in osteoblastic cells induced a dramatic induction of most of the AP-1 members.

[Key words] wall-shear stress; osteoblastic cells; activating protein-1

应力对骨的生长、吸收和重建起调节作用。大量研究表明失重状态会导致骨吸收增加¹, 增加骨骼载荷可以促进骨形成并降低骨吸收², 这些在环境应力改变下引起的骨量改变主要是由成骨细胞系产生³。而在临床上无论是口腔正畸治疗中通过在牙齿上施加力的作用, 使牙槽骨进行生物改建, 还是牵张成骨术中骨组织和成骨细胞受到牵引力的作用, 骨组织得到拉伸等都是机械信号作用于机体后最终转变为生物学效应的结果。成骨细胞受到外界机械信号后是如何将信号传导入胞内, 又如何相应地调节其生理功能来适应外界的力学环境, 对这些问题的研究将有助

于进一步探索骨组织对外界力学环境的响应, 为骨组织工程和临床治疗提供新的理论依据。本实验旨在通过研究激活剂蛋白-1 (activating protein-1, AP-1) 家族对不同大小流体剪切力的生理响应, 探索成骨细胞受力后的早期反应。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

DMEM (GIBCO 公司, 美国), Trizol (BBI 公司, 美国), 逆转录试剂盒 (Fermentas 公司, 美国), Taq DNA 聚合酶、100 bp DNA Marker (TaKaRa 公司, 日本), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), Biofuge 低温超速离心机 (Heraeus 公司, 德国), PCR 仪 (Eppendorf 公司, 德国), 凝胶成像分析系统 (Bio-RAD 公司, 美国)。

[收稿日期 2005-02-22; 修回日期 2005-08-04]

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目 (491060-N20078)

[作者简介] 朱赴东 (1977-), 男, 浙江人, 博士研究生

[通讯作者] 赵士芳, Tel: 0571-87217388

1.2 成骨细胞的培养和鉴定

取新生 1 d 的 SD 无菌级大鼠(雌雄不限,由浙江大学实验动物中心提供),无菌操作下取颅盖骨,剔除粘附的骨膜、血管和结缔组织,剪碎,经 0.25 % 胰蛋白酶 37 °C 消化 15 min,每 3 min 振荡 1 次,弃去消化液,再以 0.1 % II 型胶原酶 37 °C、水平震荡下消化 60 min,消化液 1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,接种于含 10 % FBS 的 DMEM 培养液的培养瓶中,置 37 °C、5 % CO₂ 孵育箱中培养,24 h 换液,以后每 3 d 换液 1 次,待细胞铺满培养瓶时,用 0.25 % 胰蛋白酶消化,并传代培养,所用实验细胞均为第 3 代细胞。可用 Von Kossa 染色法区分成骨细胞与其他细胞⁴。染色后在显微镜下观察发现有明显的棕黄色结节形成,表明体外培养的成骨细胞具有分泌钙质的能力,符合成骨细胞的表型。

1.3 细胞加力装置

液体加载实验装置的剖面图见图 1。装置由上下两层有机玻璃制成,下层中央有一个 1 cm × 1 cm × 0.02 cm 的正方形槽,可放置长满成骨细胞的盖玻片。此槽上方有一个 6 cm × 1.35 cm × 0.04 cm 的长方形槽,与上层有机玻璃共同形成液体流动的通道,通道两端各开一个口用于注入和流出液体。此液体是由灌流系统提供的具有一定剪切力的液流。

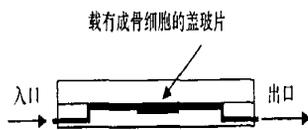


图 1 液体加载实验装置剖面图

Fig 1 The cutaway view of wall-shear stress system

1.4 加力分组

将第 3 代成骨细胞以 2×10^4 个/立方厘米的密度接种在 1 cm × 1 cm 的盖玻片上,并置于培养小皿中,加入 5 ml 含 10 % FBS 的 DMEM 培养液,培养 24 h,使细胞贴壁并融合生长。加力前将盖玻片转移到含 0.5 % FBS 的 DMEM 培养液中 4 h。然后将盖玻片置入流室系统中央的正方形槽中,分为 4 组,每组加载的水平剪切力分别为 0.8 Pa, 1.2 Pa, 1.4 Pa 及 1.6 Pa。每组剪切力水平的加载时间为 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 每个时间段实验重复 6 次。另一个未加载的盖玻片作空白对照 (0 min)。

1.5 AP-1 表达的检测

1.5.1 细胞总 RNA 的提取和纯度测定

按 Trizol 试剂说明提取细胞总 RNA。从中取 1 μ l 加入 199 μ l 0.1 % DEPC 水中,以 0.1 % DEPC 水为对照在分光光度计上测 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值 A_{260} 及 A_{280} 。RNA 纯度以 A_{260}/A_{280} 表示。

1.5.2 逆转录聚合酶链反应 RNA 反应体系为 50 μ l。引物见表 1。-actin 为内参照,反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 1 min, 退火温度下退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min。

表 1 引物列表

Tab 1 The list of primers of AP-1

引物	产物长度 (bp)	退火温度 (°C)
c-Fos Sense : 5' GCCAGAGCCGGGAGTGGTGAA3 Anti-sense : 5' GGCTTGGCCCTCAGGGTCATT3	433	56.0
FosB Sense : 5' CCTCCGCCGAGTCTCAGTA3 Anti-sense : 5' CTCCTCCGACGGTTC3	479	57.1
Fra-1 Sense : 5' AGACCCGACAAAGTGGAGGAT3 Anti-sense : 5' TGAACAGGGAAAGGAGATGAC3	449	64.0
Fra-2 Sense : 5' TCATCAAGCCCATTAACATT3 Anti-sense : 5' CGGTGAGCCTTGAACAGB	184	56.0
c-Jun Sense : 5' AGCAATGGGCACATCACC3 Anti-sense : 5' TCTCGGCCTCTTCCTCA3	451	59.0
JunB Sense : 5' CAAACTCTGAAACCCACC3 Anti-sense : 5' AAGCCCTCCTGCTCCTC3	300	57.5
JunD Sense : 5' CCGGAGGATGGAAACACC3 Anti-sense : 5' GCCCGTGGACTGGATGA3	344	61.6
-actin Sense : 5' TTGTAACCAACTGGGACGATATGGB Anti-sense : 5' GATCTTGATCTTCATGGTGTAGGB	764	58.0

1.5.3 琼脂糖凝胶电泳

制取 2 % 琼脂糖凝胶,在各加样孔中加入 100 bp DNA Marker、各组 DNA 样品,在紫外灯下观察各条 DNA 分子量标准带完全分开后停止电泳。凝胶成像分析系统中读取各条带的光密度值,计算各样本的光密度值与内参照 -actin 的光密度值的比值,重复 6 次。

1.6 统计方法

应用 SPSS11.0 软件对各时间段加力组与对照组两组之间 AP-1 家族成员的表达进行 χ^2 检验分析;对各组间 AP-1 家族成员的表达用单因素方差分析进行多重比较。

2 结果

2.1 流体剪切力作用的大小和时间长短对成骨细胞中 FosB mRNA 表达的影响

由图 2 可见,受到流体剪切力 10 min 后所有加力组 FosB mRNA 表达均增加,但组间无统计学差异 ($P > 0.05$)。15 min 时,所有加力组 FosB mRNA 表达进一步增加,其中 1.2 Pa 组表达更显著,与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。30 min 时,所有加力组

FosB mRNA 表达均下降,其中 1.4 Pa 组变化更显著,与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。60 min 时各加力组中只有 1.2 Pa 组 FosB mRNA 表达增加,且与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$),各加力组高于对照组,且与 10 min 时表达相近。比较同一加力组不同时间的 FosB mRNA 表达,发现 4 组加力组都是在 15 min 时表达最高,并且与其他时间段有统计学差异 ($P < 0.05$)。

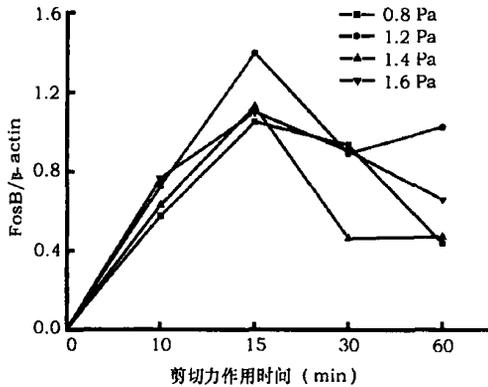


图2 不同时间、不同大小流体剪切力加载于成骨细胞后 FosB mRNA 的表达变化

Fig 2 FosB mRNA expression in various time after treated with different wall-shear stress separately

2.2 流体剪切力作用的大小和时间长短对成骨细胞中 c-Fos mRNA 表达的影响

由图 3 可见,受到流体剪切力 10 min 后所有加力组 c-Fos mRNA 表达增加,组间无统计学差异 ($P > 0.05$)。15 min 时,所有加力组表达进一步增加,其中 1.2 Pa 组表达更显著,与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。30 min 时,所有加力组 c-Fos mRNA 表达均下降,但 1.2 Pa 组表达仍较其他组高,并与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。60 min 时各加力组表达进一步下降,组间无统计学差异 ($P > 0.05$),但是仍然高于对照组,与 10 min 时表达相近。同时比较同一加力组不同时间的 c-Fos mRNA 表达,4 组都是在 15 min 时表达最高,并且与其他时间段有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.3 流体剪切力作用的大小和时间长短对成骨细胞中 c-Jun mRNA 表达的影响

由图 4 可见,受到流体剪切力 10 min 后所有加力组 c-Jun mRNA 表达增加。15 min 时,所有加力组表达进一步增加,其中 1.2 Pa 组表达更显著,与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。30 min 时,所有加力组 c-Jun mRNA 表达下降,然而 1.2 Pa 组表达仍较其他组高,与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。60 min 时各加力组表达进一步下降,组间无统计学差异 ($P > 0.05$),但是仍然高于对照组,和 10 min 时表达相近。同时比较同一加力组不同时间的 c-Jun mRNA

NA 表达,4 组加力组都是在 15 min 时表达最高,并且与其他时间段有统计学差异 ($P < 0.05$)。

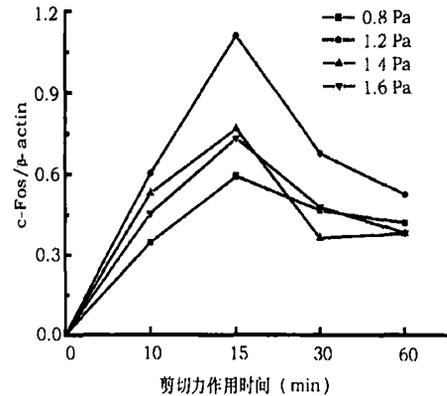


图3 不同时间、不同大小流体剪切力加载于成骨细胞后 c-Fos mRNA 的表达变化

Fig 3 c-Fos mRNA expression in various time after treated with different wall-shear stress separately

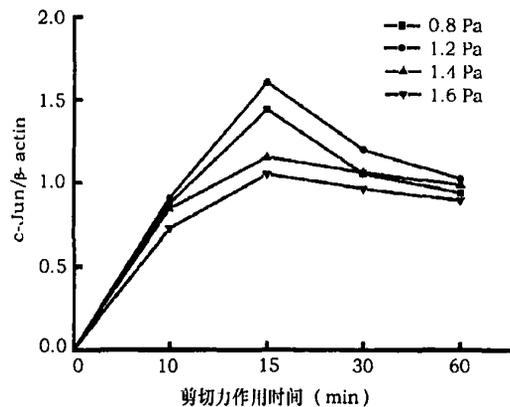


图4 不同时间、不同大小流体剪切力加载于成骨细胞后 c-Jun mRNA 的表达变化

Fig 4 c-Jun mRNA expression in various time after treated with different wall-shear stress separately

2.4 流体剪切力作用的大小和时间长短对成骨细胞中 JunD mRNA 表达的影响

由图 5 可见,受到流体剪切力 10 min 后所有加力组 JunD mRNA 表达增加,组间比较 1.4 Pa 组比较低 ($P < 0.05$)。15 min 时,所有加力组表达进一步增加,其中 1.2 Pa 组表达更显著,与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。30 min 时,所有加力组 JunD mRNA 表达下降,然而 1.2 Pa 组表达仍较其他组高,并与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。60 min 时各加力组表达与 30 min 和 10 min 时表达相近,组间无统计学差异 ($P > 0.05$),但高于对照组。同时比较同一加力组不同时间的 JunD mRNA 表达,4 组都是在 15 min 时表达最高,并且与其他时间段有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.5 流体剪切力作用的大小和时间长短对成骨细胞中 JunB mRNA 表达的影响

由图 6 可见,受到流体剪切力 10 min 后所有加力

组 JunB mRNA 表达增加。15 min 时,所有加力组的表达进一步增加,其中 1.2 Pa 组表达更显著,与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。30 min 时,所有加力组 JunB mRNA 表达下降,然而 1.2 Pa 组表达仍较其他组高,并与其他组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。60 min 时各加力组表达进一步下降,组间无统计学差异 ($P > 0.05$),但仍然高于对照组,和 10 min 时表达相近。同时比较同一加力组不同时间的 JunB mRNA 表达,4 组加力组都是在 15 min 时表达最高,并且与其他时间段有统计学差异 ($P < 0.05$)。

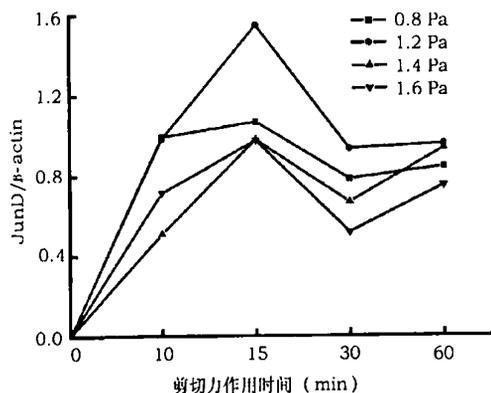


图5 不同时间、不同大小流体剪切力加载于成骨细胞后 JunD mRNA 的表达变化

Fig 5 JunD mRNA expression in various time after treated with different wall-shear stress separately

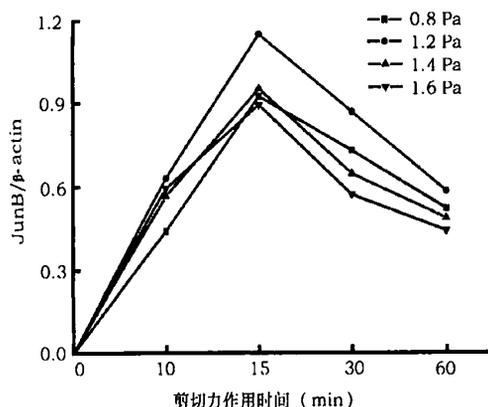


图6 不同时间、不同大小流体剪切力加载成骨细胞后 JunB mRNA 的表达变化

Fig 6 JunB mRNA expression in various time after treated with different wall-shear stress separately

2.6 流体剪切力作用的大小和时间长短对成骨细胞中 Fra-1 mRNA 表达的影响

由图7可见,受到流体剪切力 10 min 后所有加力组 Fra-1 mRNA 表达增加。15 min 时,所有加力组 Fra-1 mRNA 表达较 10 min 组略有下降,30 min 时,所有加力组 Fra-1 mRNA 表达上升,60 min 时 0.8 Pa 和 1.2 Pa 组表达上升,而其余加力组表达下降,组间有统计学差异 ($P < 0.05$),但是仍然高于对照组,和 10 min 时表达相近。

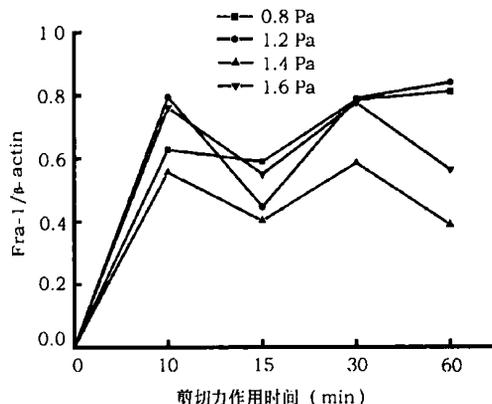


图7 不同时间、不同大小流体剪切力加载于成骨细胞后 Fra-1 mRNA 的表达变化

Fig 7 Fra-1 mRNA expression in various time after treated with different wall-shear stress separately

2.7 流体剪切力作用的大小和时间长短对成骨细胞中 Fra-2 mRNA 表达的影响

由图8可见,受到流体剪切力 10 min 后所有加力组 Fra-2 mRNA 表达增加,组间比较 1.4 Pa 组比较低 ($P < 0.05$)。15 min 时,所有加力组表达与 10 min 组相似,30 min 时 0.8 Pa, 1.2 Pa 组表达上升,而其余加力组表达下降。60 min 时,所有加力组表达降为 0。

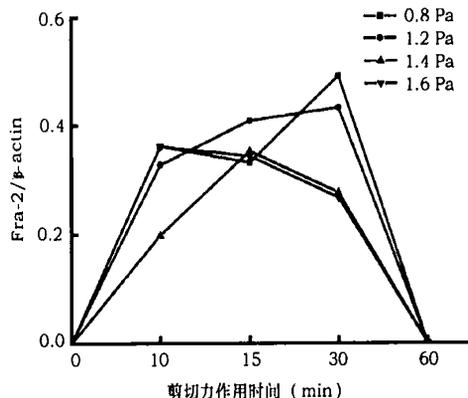


图8 不同时间、不同大小流体剪切力加载于成骨细胞后 Fra-2 mRNA 的表达变化

Fig 8 Fra-2 mRNA expression in various time after treated with different wall-shear stress separately

3 讨论

骨对力学环境的适应能力依赖于成骨细胞对力学环境的响应。许多研究表明液体流动产生的流体剪切力可以刺激细胞增殖,改变 mRNA、蛋白质水平的表达。然而多大的流体剪切力最能有效刺激细胞 mRNA 水平的改变,还没有一个统一的结论。本实验结果表明作用于成骨细胞表面的流体剪切力大小为 1.2 Pa 时最能有效地刺激成骨细胞中 FosB, c-Fos, c-Jun, JunD 和 JunB mRNA 的表达 ($P < 0.05$),这与以往的研究结果有相似之处。但是作用于细胞表面的流体剪切力与口腔正畸治疗中在牙齿上施加的力和牵

张成骨术中骨组织和成骨细胞受到的牵引力之间的关系,仍需要进一步探讨。

此外流体剪切力刺激成骨细胞后,机械刺激如何通过信号通路传导到细胞核内,最终引起细胞增殖、分化的机理还未研究清楚。目前体内以及体外研究发现在骨细胞以及成骨细胞感受外界应力改变的早期,一些即刻早期基因如 AP-1 被激活。

AP-1 是指一类能与许多基因上的 AP-1 结合位点反应元件结合,在细胞的分化、转录和凋亡过程中发挥多种重要作用的蛋白质家族因子。现有的绝大部分研究都只针对于 AP-1 家族的 c-Fos。众多研究表明,成骨细胞在受到牵张力⁵、剪切力⁶、超重⁷、微重力⁸时,c-Fos 在 mRNA 和蛋白质水平的表达均有增强,并可能与 MAPK 通路的激活有关。此外也有一些实验证实 AP-1 家族中除 c-Fos 外其他成员在骨发生过程中的作用。

本实验结果表明,在流体剪切力刺激成骨细胞开始 10 min 后,FosB,c-Fos,c-Jun,JunD 和 JunB mRNA 表达水平开始增高,而开始加力 15 min 后即可达到最高峰。此后随着时间的延长,其表达水平逐渐降至 10 min 左右的水平,表明成骨细胞对流体剪切力的反应随着时间的延长,其敏感性也在降低。同时还发现 Fra-1 和 Fra-2 mRNA 在流体剪切力刺激后都有增高,但是各个时间组之间却没有统计学差异 ($P > 0.05$),同时 Fra-2 mRNA 的表达在受到流体剪切力刺激 60 min 后消失。研究结果表明 AP-1 家族中 FosB,c-Fos,c-Jun,JunD,JunB,Fra-1 和 Fra-2 等参与了力学刺激引发细胞响应的过程。但是 mRNA 表达的差异性提示力学刺激信号从胞外传导进入胞内的过程中,各个成员参与着不同的信号传导过程。

研究证实,骨骼内的细胞能够感知生物物理性信号,并加工整合这些信号,将之转化为相应的骨骼结构变化⁹。现在有研究表明核苷酸是骨内重要的局部信号分子^{10,11}。成骨细胞和破骨细胞都是核苷酸通过 P2 受体产生活化作用的靶细胞¹⁰。成骨细胞表面 P2Y1 受体接收力学信号后由 G 蛋白介导的磷脂酰肌醇在磷脂酶 C 催化下产生三磷酸肌醇,后者通过作用于内质网膜上特异的受体使其内部 Ca^{2+} 库释放,引起细胞内 Ca^{2+} 水平增加。

本实验研究结果说明,AP-1 家族成员在成骨细

胞受到外界力学刺激后,在将外界信号刺激引起的信息传递级联反应中起重要的耦联作用,充当核内第三信使和基因转录调控的分子开关。AP-1 与骨的代谢和改建关系密切,其表达的变化直接影响下游长程基因的表达,引起细胞表型的改变,最终产生相应的生物学效应,因此 AP-1 在骨的细胞生物力学领域的作用正日益受到重视。

[参考文献]

- 1] Pavalko FM, Norvell SM, Burr DB, et al. A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes J. J Cell Biochem, 2003, 88(1):104-112.
- 2] Vico L, Collet P, Guignandon A, et al. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts J. Lancet, 2000, 355(9215):1607-1611.
- 3] Mikuni-Takagaki Y, Suzuki Y, Kawase T, et al. Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress J. Endocrinology, 1996, 137(5):2028-2035.
- 4] Calvert J W, Marra KG, Cook L, et al. Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces J. J Biomed Mater Res, 2000, 52(2):279-284.
- 5] Peverali FA, Basdra EK, Papavassiliou AG. Stretch-mediated activation of selective MAPK subtypes and potentiation of AP-1 binding in human osteoblastic cells J. Mol Med, 2001, 7(1):68-78.
- 6] Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, et al. Ca^{2+} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts J. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278(5):C989-C997.
- 7] Granet C, Vico AG, Alexandre C, et al. MAP and src kinases control the induction of AP-1 members in response to changes in mechanical environment in osteoblastic cells J. Cell Signal, 2002, 14(8):679-688.
- 8] Fitzgerald J, Hughes-Fulford M. Mechanically induced c-Fos expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts J. FASEB J, 1999, 13(3):553-557.
- 9] Ke HZ, Qi H, Weidema AF, et al. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption J. Mol Endocrinol, 2003, 17(7):1356-1367.
- 10] Høbertz A, Mahendran S, Burnstock G, et al. ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y2 receptor in bone remodeling J. J Cell Biochem, 2002, 86(3):413-419.
- 11] Kórcok J, Raimundo LN, Ke HZ, et al. Extracellular nucleotides act through P2X7 receptors to activate NF-kappaB in osteoclasts J. J Bone Miner Res, 2004, 19(4):642-651.

(本文编辑 王 晴)

《华西口腔医学杂志》主管单位和主办单位变更的声明

《华西口腔医学杂志》的主管单位由华西医科大学变更为中华人民共和国教育部,主办单位由中华医学会四川分会和华西医科大学变更为四川大学。

《华西口腔医学杂志》编辑部