

· 论著 ·

不同牵张应力对成骨细胞 MC3T3-E1 分化及 Wnt 信号转导通路的影响研究

陈熙^{1,2} 郭健民¹ 元宇¹ 张玲莉¹ 吴隽璇¹ 孙忠广¹ 陈炳霖¹ 邹军^{3*}

1. 上海体育学院运动科学学院, 上海 200438

2. 温州医科大学体育科学学院, 温州 325035

3. 上海体育学院发展规划处, 上海 200438

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 01-0009-05

摘要: **目的** 研究不同强度和时间的机械牵张应力刺激对成骨细胞的分化及 Wnt 信号转导通路的影响。**方法** 采用 Flexcell-FX5000 细胞加力系统, 分别采用 3%, 6%, 12% 的形变幅度的正弦波对 MC3T3 细胞进行牵张应力干预, 0.5 Hz 的频率, 时间分别为 2, 4, 8 h。干预结束后分别检测细胞的 ALP 活性; 提取细胞总 RNA 后采用 Real time-PCR 分别检测骨钙蛋白 (Osteocalcin, OC)、Runx2、Osterix、Wnt1、 β -catenin、DKK-1 mRNA 的表达; 提取细胞总蛋白后采用 Western blot 法分别检测 Wnt1、 β -catenin 和 Phosphor-33/37- β -catenin 的蛋白表达量。**结果** 3% 和 6% 强度牵张干预后, 成骨细胞 ALP 活性升高, OC、Runx2、Osterix、Wnt1、 β -catenin mRNA 表达升高, 而 DKK-1 mRNA 表达下降。6% 的效应高于 3%, 且干预 4 h 后升高幅度最大。12% 强度牵张干预后, 成骨细胞的 ALP 活性和 OC mRNA 表达水平下降。Wnt1、 β -catenin 和 Phosphor-33/37- β -catenin 蛋白表达水平与上述 mRNA 表达水平相符。**结论** 中小强度的牵张刺激可以上调 Wnt 信号转导通路, 促进成骨细胞分化, 而大强度及长时间连续干预则无成骨分化作用, 甚至有抑制作用。

关键词: 牵张应力; 成骨细胞; 细胞分化; Wnt 信号转导通路

The effect of mechanical strain on the differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts and the Wnt signaling pathway

CHEN Xi^{1,2}, GUO Jianmin¹, YUAN Yu¹, ZHANG Lingli¹, WU Junni¹, SUN Zhongguang¹, CHEN Binglin¹, ZOU Jun³

Corresponding author: ZOU Jun, Email: zoujun777@126.com

Abstract: **Objective** To study the effect of different magnitude and duration of mechanical strain on osteoblast differentiation and the Wnt signaling pathway. **Methods** Osteoblast cell line MC3T3 was used in this study. The cells were subjected to strain loading of 0.5Hz, magnitude of 3%, 6%, and 12%, and duration of 2, 4, 8h, respectively. Alkaline phosphatase (ALP) activity was measured immediately after all the mechanical loading. Real-time PCR was used to detect osteocalcin (OC), Runx2, osterix, Wnt1, β -catenin, and DKK-1 mRNA. Western blotting was used to detect protein level of Wnt1, β -catenin, and phosphor-33/37- β -catenin. **Results** ALP activity and expression of OC, Runx2, Osterix, Wnt1, and β -catenin mRNA increased after 3% and 6% strain, but the DKK-1 mRNA decreased. The efficacy of 6% was greater than that of 3%, and 4h mechanical strain was greater than other duration. However, 12% strain reduced the ALP activity and OC mRNA expression. The protein expression of Wnt1 and the ratio of β -catenin/P- β -catenin was in accordant with mRNA expression. **Conclusion** Moderate and low mechanical strain increases osteoblast differentiation mediated by the Wnt signal pathway, while unsuitable mechanical stimulus such as high magnitude or long-term duration has no effect on or even inhibits the differentiation of osteoblasts.

Key words: Mechanical strain; Osteoblasts; Differentiation; Wnt singling pathway

基金项目: 国家自然科学基金项目(81170323), 上海体育学院研究生教育创新计划(yjscx2015007), 上海市人类运动能力开发与保障重点实验室(上海体育学院)(11DZ2261100)

* 通讯作者: 邹军, Email: zoujun777@126.com

在人体内, 成骨细胞和破骨细胞的动态平衡维持了体内的骨量^[1]。机械应力刺激则是其平衡的重要调节因素, 在骨生长和骨重建过程中发挥着重要的作用。较多的研究指出, 各种机械应力如剪切力、牵张力、压力等都可以对骨细胞以及成骨细胞进

行刺激,并促进成骨增殖和分化^[2,4]。但是不同的应力强度,频率及刺激时间对成骨细胞的影响也不同,不适宜的牵张力则不利于成骨分化,甚至还会引起细胞凋亡^[5]。另外,研究也指出,Wnt 信号转导通路在骨的生长发育以及应力影响成骨分化中具有重要作用^[1,6]。因此,本研究采用不同强度和时间对 MC3T3-E1 细胞进行机械牵张干预,观察牵张应力对成骨细胞分化及 Wnt 信号转导通路的影响,探讨促进成骨分化的适宜机械牵张应力及其机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与主要试剂

Flexcell-FX5000 细胞力学系统;细胞培养箱 (Thermo, USA);荧光定量 PCR 仪 (ABI StepOne 7300, USA);蛋白电泳仪 (BioRad, USA);酶联免疫检测仪 (BioTek, USA); α -MEM (Hyclone, USA);胎牛血清 (FBS) (Gibco, Australia);0.25% 胰酶、青霉素、链霉素、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒 (碧云天);抗坏血酸 L、 β -甘油磷酸钠 (Sigma, USA);Trizol、逆转录试剂盒;SYBR 荧光定量试剂盒 (Takara, 宝生物); β -actin、Phosphor-33/37- β -catenin (cell signal technology, USA);Wnt1、 β -catenin (abcam, USA);引物合成于上海生物工程技术服务公司。

1.2 细胞培养

成骨细胞系 MC3T3-E1 (ATCC, CRL-2594) 复苏后采用 α -MEM 培养液 (含 10% FBS + 100 U/ml 青霉素 + 0.1 mg/ml 链霉素),在 37℃,5% CO₂ 的培养箱中进行常规细胞培养。每 3 天换一次液,细胞长至 70~80% 融合时进行传代。

1.3 施加牵张应力

生长良好的 MC3T3-E1 细胞,在胰酶消化后进行重悬,调整至 1×10^5 浓度接种于 Flexcell 公司生产的底部具有弹性膜的专用 6 孔板 (BioFlex © Plate 弹性膜 6 孔板),正常培养 2d 后,换成含诱导分化剂的培养液 (含抗坏血酸 L、 β -甘油磷酸钠) 后对细胞进行牵张应力的干预 (Flexcell-FX5000 tension System, USA)。分别采用 3%,6%,12% 的形变幅度的正弦波,0.5 Hz 的频率,牵拉时间分别为 2,4,8 h,对照组细胞不进行干预正常培养。在实验结束后即刻收集细胞。每组 3 个孔,实验重复 3 次以上。

1.4 ALP 活性测定

牵张应力干预结束后吸除孔内培养液,PBS 洗

涤 3 次,每孔加入的 0.2% TritonX-100 2ml 裂解细胞后置于 4℃ 过夜制备样本,按照 ALP 检测试剂盒说明检测 ALP 活性;每孔取 10 ul 细胞裂解液放入 96 孔细胞培养板 (以加 PBS 的空白管做空白对照),之后分别加入 40 ul 检测缓冲液和 50 ul 显色底物,混匀后于 37℃ 孵育 10 min,加入 100 ul 反应终止液终止反应。在 405 nm 波长下测定吸光度值 (BioTek 酶标仪),并减去空白对照管吸光度值后进行统计分析。

1.5 Real time-PCR 分析

采用 Trizol 提取每孔细胞的总 RNA,测定 RNA 浓度后按照逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA,然后对 cDNA 进行 SYBR 荧光定量扩增分别检测骨钙蛋白 (Osteocalcin, OC)、Runx2、Osterix、Wnt1、 β -catenin、DKK-1、GAPDH mRNA 的表达 (各基因引物设计见表 1),采用两步法行 40 个循环。每个样本设 3 个复孔,取均值得出 Ct 值,以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出所有指标 mRNA 的相对表达量。

表 1 各基因引物设计

Table 1 Design of gene primers

基因名称	引物序列 (5'-3')
OC	上游 CAGGGAGGCACTGACTCTTC
	下游 AGTGTGGAAGTGTGGAGTT
Runx2	上游 GGTGAACCTCTTGCCCTCGTC
	下游 AGTCCGAACCTCTCTGTGCT
Osterix	上游 TGGTACACGGCAGGCATCCA
	下游 GGAGCAACGTCAGATGGGTAAGT
Wnt1	上游 ACAGCGTTCATCTCGCAATCACC
	下游 AAATCGTTGTTGTCAGTGCAGCCC
β -catenin	上游 CCCAGTCCCTCAGCAAGA
	下游 CCCTCTAAGCCCTAGTCA
Dkk-1	上游 ACTACCAGCCCTACCATTCG
	下游 CTTGGACCAGAAGTGTCTTGC
GAPDH	上游 GACAACCTTTGGCATTGTGGA
	下游 ATGCAGGGATGATGTTCTTGC

1.6 Western blot 检测

牵拉干预结束后加 4℃ 预冷的 PBS 洗 3 次,每孔加入 100 ul 的 RIPA (碧云天) 裂解液后用刮刀收集细胞于 EP 管,之后于 4℃ 冰上裂解细胞 30 min,12000 rpm 4℃ 离心 10 min,提取上清液即为细胞总蛋白,采用 BCA 试剂盒对蛋白浓度测定并调平蛋白浓度,与 SDS-PAGE 上样缓冲液 (6×) 按 5:1 混合,100℃ 煮沸 10 min,分装后 -20℃ 保存。进行 Western blot 检测时采用 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶使蛋白分离后,以 300 mA 恒电流转 2 h。PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,一抗于 4℃ 孵育过

夜,TBST 洗三次后采用 HRP 结合的二抗室温孵育 2 h,TBST 洗三次后采用 ECL 发光液于暗室显影,并用胶片进行扫描后保存。采用 image J 软件对所有条带进行灰度值分析。

1.7 统计学分析

所有实验数据采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析,结果以均数 ± 标准差表示,先用双因素方差分析强度和时间因素对成骨分化的作用,再采用单因素方差分析分别对时间因素和强度因素进行分析,用 Bonferroni 法进行组间两两比较。以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

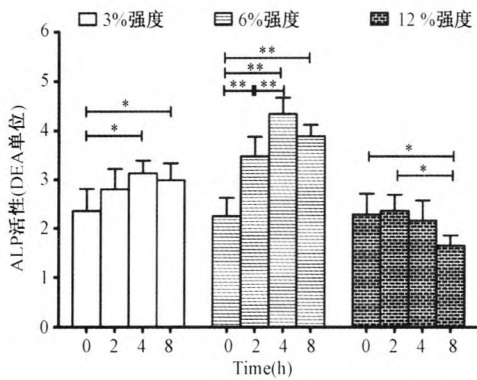


图 1 各强度组不同时间连续牵拉干预后 ALP 活性值
Fig.1 ALP results in different mechanical loading and duration groups

2 结果

2.1 ALP 活性

如图 1 所示,3% 和 6% 强度的牵拉均可以增加 MC3T3 细胞的 ALP 活性,其中 6% 强度的应力刺激 ALP 活性升高的幅度更大,而 12% 强度的牵拉组的 ALP 活性出现下降的趋势,在 8 h 连续干预时有统计学差异。在时间效应上,3% 和 6% 强度组均在 4 h 时 ALP 活性达到峰值,8 h 时略有下降。

2.2 mRNA 表达水平变化

如图 2 所示,3% 和 6% 强度的连续牵拉干预可使成骨细胞 OC 和 Runx2 的 mRNA 表达增加,6% 强度增加的幅度大于 3% 强度。6% 强度的牵拉干预还可以使 Osterix mRNA 的表达增加,而 3% 强度无统计学差异。在时间效应上,两组 OC、Runx2 和 Osterix mRNA 表达的峰值均在 4 h 时。另外 12% 强度的连续牵拉干预后 Runx2 和 Osterix mRNA 的表达没有统计学差异,而 OC mRNA 的表达减少了,在 4-8 h 的干预后减少的幅度最大。

如图 3 所示,3% 和 6% 强度的连续牵拉干预后,成骨细胞 Wnt1 和 β -catenin 的 mRNA 表达均升高,6% 强度组的升高幅度大于 3% 强度组,且在 4h 时升高的幅度最大;DKK-1 mRNA 的表达则降低了,6% 强度时 2 h 就开始有显著下降,而 3% 强度时则到 4 h 时有统计学差异。12% 强度牵拉干预后 Wnt1、 β -

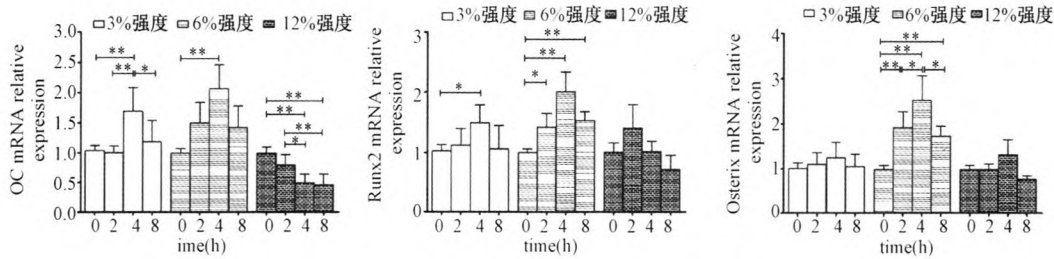


图 2 各强度组不同时间牵拉干预后 OC、Runx2 和 Osterix mRNA 的相对表达
Fig.2 The expression of OC, Runx2 and Osterix mRNA in different mechanical loading and duration groups.

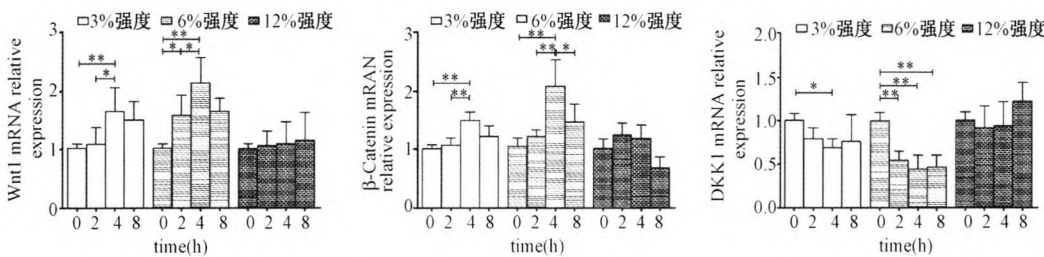


图 3 各强度组不同时间牵拉干预后 Wnt1、 β -catenin 和 DKK-1 mRNA 的相对表达
Fig.3 The expression of Wnt1, β -catenin, and DKK-1 mRNA in different mechanical loading and duration groups.

catenin 和 DKK-1 mRNA 的表达均无显著性差异。

2.3 蛋白表达水平变化

如图4所示,3%和6%强度的连续牵拉干预后,成骨细胞的 Wnt1 和 β -catenin 的蛋白均增加了, P- β -catenin 蛋白(失活状态的 β -catenin)则出现下

降趋势,故 β -catenin/P- β -catenin 的比值显著升高,且6%强度增加的幅度大于3%强度,4小时干预的增加幅度最大。12%强度干预后,成骨细胞的 Wnt1 蛋白和 β -catenin/P- β -catenin 的比值均出现下降趋势,在4h和8h干预后差异有统计学意义。

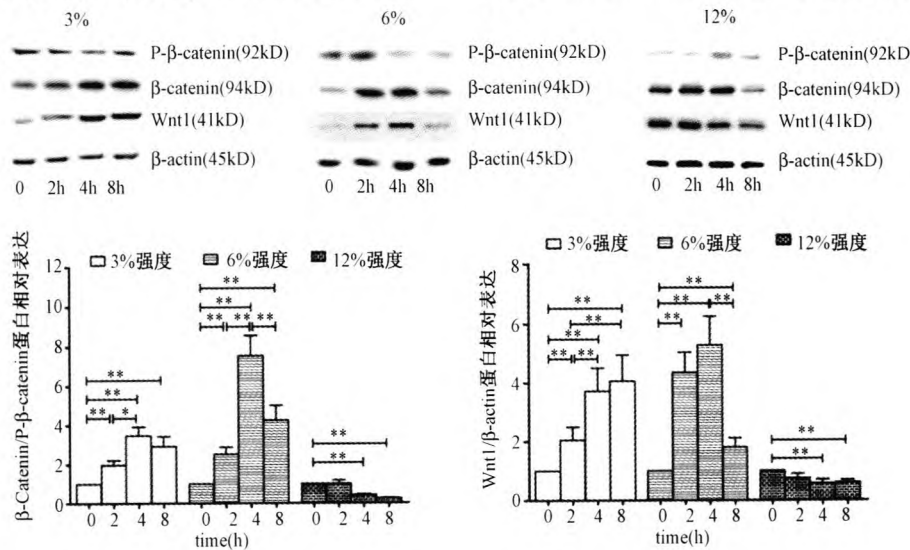


图4 各强度组不同时间牵拉干预后 Western blot 代表图和蛋白相对表达量

Fig. 4 The protein expression and representing Western blot chart in different mechanical loading and duration groups

3 讨论

在人体内,骨对机械应力刺激具有适应作用,在应力高的区域则骨形成大于骨吸收,相反在减少应力的作用下,则会引起人体骨量的丢失,如长期卧床病人,宇航员,减肥等^[7],因此,机械力学刺激对骨代谢具有重要的调节作用。较多的研究指出,骨髓间充质干细胞、成骨细胞和骨细胞都可以感受外界的机械应力刺激,并做出应答^[8-10]。而机械应力的方式、刺激强度大小、频率等均会对细胞产生不同的影响。近些年,国内外采用牵张应力对成骨细胞进行机械干预成为研究的热点,故本研究采用牵张力为干预方式,采用了国际上公认的 Flexcell 细胞应力加载系统对细胞进行周期性牵张应力刺激。

本次研究发现,在中低强度(3%-6%强度)的应力刺激可以促进 MC3T3 细胞 ALP 的分泌,同时促进 OC、Runx2、Osterix mRNA 的表达。ALP 的是成骨细胞早期分化的标志,OC 是成骨细胞向矿化发生期分化的标记之一,是其晚期分化的标志,说明中低强度的牵张应力刺激可以促进成骨细胞的分化。Runx2 和 Osterix 则是成骨细胞分化所必需的关键转录因子,在骨髓间充质干细胞向成骨分化的过程中扮演了重要的角色^[11, 12]。本次研究中,Runx2 和

Osterix 的 mRNA 表达水平的升高也说明了牵张应力有较好促进成骨分化作用,与 Zhong 等人的研究结果一致^[4]。

高强度(12%)牵张应力刺激后 MC3T3 细胞的 ALP 分泌减少,OC mRNA 表达水平下降,提示高强度的机械刺激不利于成骨细胞分化。Koike 等对 ST2 细胞系进行牵张应力干预后也发现,高强度应力(10%和15%)刺激后细胞的 ALP 活性出现下降趋势^[13]。Jacobs 等对 HOB 成骨细胞系进行 10% 的牵张应力干预也发现细胞的 ALP 活性下降,OPG mRNA 表达下降^[14],与本次实验结果一致。但李菲菲等的研究也发现,12% 的牵张应力刺激可以促进 Sao-2 成骨细胞系 ALP 活性和 OC mRNA 的表达增加,促进成骨分化^[15]。考虑可能是不同细胞系对应力刺激的敏感性和耐受性不同,因此细胞适应的生理刺激强度也会因细胞的不同而有所变化。

另外,有研究指出高频率牵张应力会使成骨细胞分化减少,故本研究采用 0.5Hz 的实验方案^[16]。时间效应上,本次研究显示中小强度牵张应力干预 2h,4h 时,成骨细胞的分化随着干预时间的增加而增加,但是 8h 牵张干预后比起 4h 干预各项成骨分化指标均呈现下降趋势,原因可能是长时间机械应力刺激可能会超过细胞所能承受的生理刺激范围,

有部分细胞出现凋亡甚至死亡的现象。而在 12% 强度牵张应力刺激后,成骨细胞分化的各项指标随着时间的增加下降。Koike 等对 ST2 细胞进行 24h 和 48h 的连续干预后也发现,5%、10% 和 15% 强度牵张应力均使细胞的 Runx2 表达减少^[13],与本次研究结果一致。

有研究指出,多个细胞信号传导通路参与了成骨细胞分化的过程,其中经典 Wnt 信号转导通路通过上调细胞内 β -catenin 的活性,在成骨细胞和骨髓间充质干细胞的成骨分化过程中发挥着极为重要的作用^[1]。如稳定表达 Wnt1、Wnt3a 可促进 C3H10T1/2 细胞系的增殖,并诱导上调成骨细胞 ALP 的活性^[17]。Phosphor-33/37- β -catenin 则是 β -catenin 的失活状态,故常用 β -catenin/Phosphor-33/37- β -catenin 的比值来反映 Wnt 信号路通的激活状态。DKK-1 可以通过和 Lrp5/6 结合竞争性抑制 Wnt 蛋白,下调 Wnt 信号通路,从而抑制成骨细胞的增殖和分化^[18]。

本研究结果显示,3% 和 6% 强度的牵拉可以促进成骨细胞 Wnt1 和 β -catenin mRNA 的表达,并且减少 DKK-1 mRNA 的表达。而 12% 强度的牵拉刺激后这三项指标则均无显著性变化。提示 3% 和 6% 强度牵张刺激可以上调 MC3T3 细胞 Wnt 信号转导通路,而 12% 强度则无该效应,甚至 DKK-1 mRNA 表达水平略有上升。Wnt1 蛋白表达以及 β -catenin/P- β -catenin 比值的结果与 PCR 结果相符,显示牵张应力刺激上调了 Wnt 信号转导通路,且上调的强度和时效应与成骨细胞分化的各项指标相一致,提示机械应力(牵张力)可能通过上调细胞内 Wnt 信号转导通路,促进成骨细胞分化。

综上所述,中小强度的牵张应力刺激可以上调 MC3T3 细胞的 Wnt 信号转导通路,促进细胞成骨分化,以 6% 强度,4 h 干预时效果最为显著;大强度(12%)或者长时间(8h)则不利于细胞成骨分化,甚至还有抑制作用。

【参 考 文 献】

- [1] Canalis E. Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches[J]. Nat Rev Endocrinol, 2013. 9(10): 575-83.
- [2] Thompson WR, CT Rubin, and J. Rubin. Mechanical regulation of signaling pathways in bone[J]. Gene, 2012. 503(2):179-93.
- [3] Ehnes DD, FD Price, NG. Shrive, et al. Embryonic stem cell-derived osteocytes are capable of responding to mechanical oscillatory hydrostatic pressure[J]. J Biomech, 2015. 48(10): 1915-21.
- [4] Zhong Z, XL Zeng, JH Ni, et al. Comparison of the biological response of osteoblasts after tension and compression[J]. Eur J Orthod, 2013. 35(1):59-65.
- [5] Priam S, C Bougault, X Houard, et al. Identification of soluble 14-3-3 as a novel subchondral bone mediator involved in cartilage degradation in osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 2013. 65(7):1831-42.
- [6] Tu X, Y Rhee, KW Condon, et al. Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading[J]. Bone, 2012. 50(1):209-17.
- [7] Carmelie G, L Vico, and R Bouillon, Space flight: a challenge for normal bone homeostasis[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2001. 11(1-3):131-44.
- [8] Liu C, Y Zhao, WY Cheung, et al. Effects of cyclic hydraulic pressure on osteocytes[J]. Bone, 2010. 46(5):1449-56.
- [9] Matziolis D, J Tuischer, G Matziolis, et al. Osteogenic predifferentiation of human bone marrow-derived stem cells by short-term mechanical stimulation[J]. Open Orthop J, 2011. 5: 1-6.
- [10] Vazquez M, BA Evans, D Riccardi, et al. A new method to investigate how mechanical loading of osteocytes controls osteoblasts[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. 5:208.
- [11] Enomoto H, T Furuichi, A Zanma, et al. Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro[J]. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 3):417-25.
- [12] Nakashima K, X Zhou, G Kunkel, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2002. 108(1):17-29.
- [13] Koike M, H Shimokawa, Z Kanno, et al. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2[J]. J Bone Miner Metab, 2005. 23(3):219-25.
- [14] Jacobs C, S Grimm, T Ziebart, et al. Osteogenic differentiation of periodontal fibroblasts is dependent on the strength of mechanical strain[J]. Arch Oral Biol, 2013. 58(7):896-904.
- [15] 李菲菲, 丁寅, 陈富林, 等. 机械牵张应力对成骨细胞增殖和分化影响的初步研究[J]. 口腔医学研究, 2012(06):507-512.
- [16] Kaspar D, W Seidl, C Neidlinger-Wilke, et al. Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity[J]. J Biomech, 2000. 33(1):45-51.
- [17] Jackson A, B Vayssiere, T Garcia, et al. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells[J]. Bone, 2005. 36(4):585-98.
- [18] Ke HZ, WG Richards, X Li, et al. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases[J]. Endocr Rev, 2012. 33(5):747-83.

(收稿日期: 2015-09-05)