

文章编号:1004-7220(2010)06-0406-06

# 机械牵张应力刺激成骨细胞的差异蛋白质组学研究

李菲菲<sup>1</sup>, 丁寅<sup>1</sup>, 冯雪<sup>1</sup>, 王欢<sup>1</sup>, 陈富林<sup>2</sup>, 李立文<sup>2</sup>

(1. 第四军医大学口腔医学院 正畸科, 西安 710032;

2. 西北大学 生命科学学院组织工程实验室, 西安 710069)

**摘要:**目的 应用蛋白质组学方法分析人成骨样细胞 Saos-2 在牵张应力作用下蛋白质表达的差异, 为更全面地阐明成骨细胞对牵张应力的反应机制提供分子基础。方法 将 Saos-2 分为加力组与对照组, 采用 Flexcell 牵张应力加载系统, 用 12% 大小的应力值进行力学刺激 24 h 后, 应用蛋白质双向凝胶电泳分离蛋白样品, 质谱技术鉴定差异表达蛋白点, 并用生物信息学分析差异蛋白参与的生物学过程和主要功能。结果 对照组和加力组分别得到 (1031 ± 41) 和 (928 ± 25) 个蛋白质点, 质谱鉴定出肽酰脯氨酰异构酶 A 样 3、线粒体 ATP 合成酶、抗氧化蛋白 1、丝切蛋白 1、蛋白磷酸酶 1、延伸因子 2 等 17 个表达增高的差异蛋白质, 涉及应激反应、能量代谢、细胞增殖、细胞骨架重建、信号转导及成骨分化等生物学功能。结论 成骨细胞在机械牵张应力作用下蛋白表达发生显著变化, 这些差异蛋白参与了成骨细胞力学反应机制的不同过程。

**关键词:** 机械牵张应力; 成骨细胞; 蛋白质组学; 细胞增殖; 信号转导

中图分类号: R3 文献标志码: A

## Differential proteomic analysis on osteoblasts stimulated by mechanical strain

LI Fei-fei<sup>1</sup>, DING Yin<sup>1</sup>, FENG Xue<sup>1</sup>, WANG Huan<sup>1</sup>, CHEN Fu-lin<sup>2</sup>, LI Li-wen<sup>2</sup> (1. Department of Orthodontics, School of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Lab of Tissue Engineering, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract; Objective** To identify the differentially expressed proteins and clarify the major proteins involved in the molecular mechanism of osteoblasts under mechanical strain loading. **Method** Saos-2 osteoblastic cells were subjected to 12% elongation for 24 hours by using Flexcell strain loading system. Proteins extracted from Saos-2 cells were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Differential expressed protein spots among groups were submitted to matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) assay and peptide mass fingerprinting (PMF) identification. The Swiss-Prot and NCBI databases were used to obtain further information about proteins identified. **Results** Saos-2 stimulated by mechanical strain showed a significant difference in 2-DE system compared with the control group. A total of (1031 ± 41) or (928 ± 25) protein spots were resolved by 2-DE of controls or experimental groups extractions respectively. 17 significant up-regulated proteins were identified. These associated proteins fell into 6 groups, including stress reaction, energy metabolism, cell proliferation, reconstruction of cytoskeleton, signaling and osteogenesis. **Conclusions** The Saos-2 can express differential proteins stimulated by mechanical strains and these proteins may play an important role in molecular mechanism of osteoblasts under mechanical strain loading.

**Key words:** Mechanical strain; Osteoblastic cells; Proteomics; Cell proliferation; Signal transduction

收稿日期:2010-11-06; 修回日期:2010-11-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30870594)。

作者简介:李菲菲(1977-),女,主治医师、讲师,研究方向:口腔正畸生物力学。

通讯作者:丁寅,主任医师、教授, Tel: (029) 84776138; E-mail: dingyin@fmmu.edu.cn; 冯雪,副主任医师、副教授, Tel: (029) 84776136; E-mail: fengsnow2000@yahoo.com.cn。

机械力学刺激是骨代谢的重要调节因素,适宜的牵张应力刺激可以在正畸牙移动、牵张成骨以及骨折修复等许多临床治疗中刺激骨组织自身的生长与重建,达到形成新骨的目的<sup>[1]</sup>。力学刺激在调节成骨细胞多种生理功能中都发挥着关键作用,牵张应力转化为生物信号的过程涉及到的分子和反应很多,但以往报道一般是利用 RNA 干扰、抗体免疫沉淀、蛋白质印迹法等来针对某条信号通路的某几种蛋白进行研究,无法全面地阐述这个错综复杂的信号转导网络。而蛋白质组学是在整体上研究细胞内蛋白质的组成及其活动规律的一门学科,通过差异蛋白质组研究可以筛选并识别参与细胞生命活动过程的重要蛋白质,为深入探索其机制提供信息<sup>[2]</sup>。本研究即针对成骨细胞力学信号转导过程的复杂性,选择采用蛋白质组学技术,通过比较成骨细胞受到机械牵张应力前后蛋白质表达谱的变化,鉴定并分析差异蛋白的主要功能及所参与的生物学过程,以进一步明确牵张力通过哪些关键蛋白质调控成骨细胞的信号转导过程,为了解应力状态下骨改建的力学生物信号通路提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要设备

IPGphor 等电聚焦系统、垂直电泳槽、电泳仪,凝胶分析软件 (ImageMaster 2D Elite) (GE 公司,美国);MALDI-TOF 质谱仪 (Bruker 公司,德国),倒置显微镜、双目光学显微镜及显微照相系统 (Nikon 公司,日本);CO<sub>2</sub> 孵箱 (Binder 公司,德国);超净工作台 (四达公司,中国);体外牵张应力加载细胞培养体系为西北大学生命科学学院冯雪教授研制的培养细胞机械牵拉加载系统 (国家自然科学基金项目:30170245)。

#### 1.1.2 主要试剂

DMEM 培养基 (Invitrogen 公司,美国);胎牛血清 (四季青生物制品研究所,中国);6 孔弹性基底膜细胞培养板 (Flexcell 公司,美国);固相 pH 梯度胶条 (pH 3 ~ 10, 13 cm)、尿素 (Urea)、CHAPS、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、碘乙酰胺 (IAA)、二硫苏糖醇 (DTT)、硫脲、十二烷基硫酸钠 (SDS)、TEMED、2D clean-up kit、2D QuantKit (Amersham Pharmacia

Biotech 公司,美国);甲基双丙烯酰胺、丙烯酰胺、过硫酸胺、硝酸银、碳酸钠、甘油、甘氨酸 (BBI 公司,美国),胰蛋白酶、三氟乙酸、乙腈 (Sigma 公司,美国),其他试剂为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人成骨样细胞 Saos-2 的培养和加载处理

Saos-2 常规培养于体积分数为 10 % 的 DMEM (含有 10 % 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素),在 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 培养箱中贴壁生长。将 Saos-2 接种于 Flexcell 弹性培养板上,利用细胞牵张应力加载系统进行加载,根据文献和预实验结果选择如下参数<sup>[3]</sup>:细胞受牵拉后的变形幅度为 12 %,牵拉频率为 6 周期/min,加载时间为 24 h,将实验分为加力组与对照组。对照组在整个培养期间不加力。

#### 1.2.2 双向凝胶电泳

裂解细胞后将产物以 12 000 r/min、4 °C 离心 1 h,取上清采用 Bradford 法测定蛋白质含量。根据所测样品浓度取上述样品 50 μL 加入水化缓冲液至总体积 250 μL,转移到水化槽中。取 IPG 胶条转移入一向等电聚焦电泳槽,按下述步骤进行电泳:30 V, 12 h;100 V, 1 h;200 V, 1 h;500 V, 1 h;1 kV, 1 h;梯度 8 kV, 3 h,电泳总伏时数为 65.5 kV·h。电泳完毕后取出胶条置于含 DTT 的平衡缓冲液中平衡,将平衡好的胶条放入预先制备好的 SDS-PAGE 凝胶中,进行二向电泳。10 mA 电泳 15 min 后加大电流至 20 mA 直至溴酚蓝前沿距离玻璃板下缘 0.5 cm 时停止电泳。凝胶行硝酸银染色。

#### 1.2.3 凝胶图像分析

图像扫描仪经强度矫正后,透射扫描双向凝胶,不同分组的 3 次电泳凝胶图像经背景消减、斑点检测与配比,得到标准胶,所得图谱借助图像分析软件 ImageMaster 2DElite 进行详细分析,比较蛋白斑点差异。根据斑点的位置、大小、形状等参数,图像分析软件自动将不同图谱中的相同蛋白点匹配,不能匹配的蛋白斑点视为差异点,加力组与对照组蛋白点比值 > 2 或 < 0.5 的被认为有显著差异。

#### 1.2.4 蛋白点质谱测定及蛋白生物信息学初步分析

将目的差异蛋白质点从凝胶上切取,经脱色、萃取、脱盐后,使用 MALDI-TOF 质谱仪进行分析,仪器

相应的参数为:激光源 337 nm 波长的激光器,加速电压 25 kV,采用正离子模式和自动获取数据的模式,肽质量指纹图谱(PMF)质量扫描范围为 700 ~ 4 000 Da,图谱用 Bruker 公司专用 peptide calibration standard II 进行外标校正。将获得的蛋白质肽质量指纹数据通过 Mascot 搜索引擎在 NCBI 等数据库中进行检索。Mascot 搜索蛋白得分 > 65,认为有显著差异( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 Saos-2 受牵张应力刺激前后的蛋白质双向凝胶电泳图谱

图 1、2 为分辨率和重复性较好的双向凝胶电泳图谱。

对照组和加力组分别为 ( $1031 \pm 41$ ) 和 ( $928 \pm 25$ ) 个蛋白质点。总蛋白质点在细胞受力后略有减少,两组蛋白电泳基本类似,蛋白点集中分布于 pI6 ~ 10 间的区域,通过软件对差异蛋白点的光密度、点大小以及三维观察等作图像分析,比值 > 2 或 < 0.5 被认为是差异蛋白点。共选取 20 个表达增高的蛋白质点进行酶解和质谱。

### 2.2 质谱分析鉴定差异蛋白

送检的 20 个差异蛋白点出峰情况良好,经 MALDI-TOF 质谱获得了 20 个肽质量指纹谱(PMF),1 号标记蛋白点的肽质量指纹峰谱如图 3 所示。

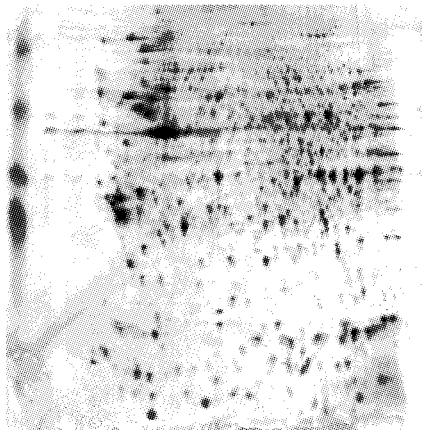


图 1 对照组人成骨样细胞 Saos-2 的总蛋白质双向凝胶电泳图谱(银染)

Fig.1 2- DE patterns of Saos-2 osteoblastic cells of controls (Silver)

进入蛋白数据库鉴定出 17 个差异蛋白质,这些蛋白质的名称、等电点、分子量、功能等详细信息如表 1 所示。

## 3 讨论

正常骨骼处于一个吸收与生长重建的动态平衡状态,力学刺激是维持平衡必不可少的条件之一。成骨细胞可以通过多种途径感受体内外力学刺激,并将其转化为生物化学信号,介导力相关敏感基因的表达,合成各种酶类等活性物质,从而激活信号网络级联反应,促成一系列复杂的生理病理活动<sup>[4]</sup>。本研究建立了人成骨样细胞 Saos-2 受牵张力刺激前后的差异蛋白质电泳图谱,通过对比加载前后蛋白电泳图谱发现,总蛋白质点在细胞受到牵张力后略有减少。两组电泳的蛋白点基本集中分布于 pI6 ~ 10 和相对分子量 MW 20 ~ 100 kD 的范围内。加载后表达显著增高的 17 个蛋白质涉及的生物反应比较复杂,以下对这些差异蛋白进行分类讨论:

(1) 应激反应。肽酰脯氨酰异构酶 A 样 3 在应激反应中参与调节信号转导途径,并影响 RNA 的剪接过程、转录调节、蛋白质翻译,以利于在应激状态下维持一定的细胞形态和功能<sup>[5]</sup>。本研究中肽酰脯氨酰异构酶 A 样 3 的高表达说明有应激反应参与了成骨细胞对于机械牵张加载的反应过程。

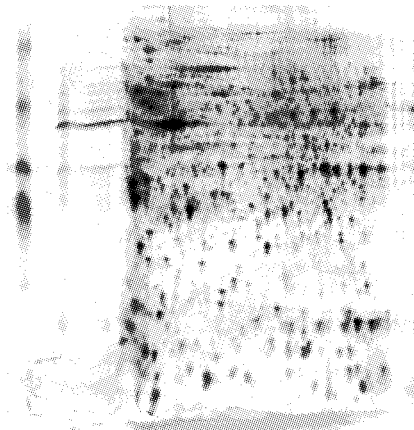


图 2 实验组人成骨样细胞 Saos-2 的总蛋白质双向凝胶电泳图谱(银染)

Fig.2 2- DE patterns of Saos-2 osteoblastic cells stimulated by mechanical strain (Silver)

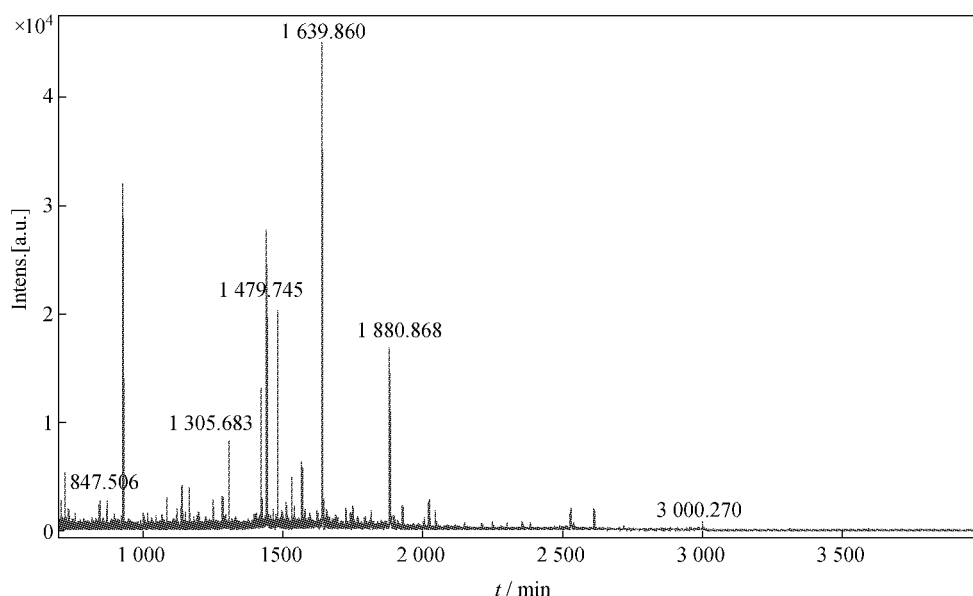


图3 1号标记蛋白点的肽质量指纹峰谱  
 Fig.3 The PMF of No.1 differentially expressed protein

表1 表达上调的差异蛋白点分析及肽指纹图谱鉴定结果  
 Tab.1 The analysis of up-regulated proteins and the results of PMF

编号	蛋白质名称	NCBI 编号	等电点	相对分子质量	功能
1	真核起始因子2	gi138649144	9.30	98 292	成骨
2	延伸因子2	gi14503483	6.41	96 246	成骨
3	膜联蛋白I	gi14502101	6.57	38 918	成骨
4	核有丝分裂蛋白1	gi131455194	6.70	133 596	细胞增殖
5	多聚(rC)结合蛋白1	gi16754994	6.66	37 987	蛋白质合成
6	线粒体ATP合成酶	gi189574029	4.95	48 083	能量代谢
7	抗氧化蛋白1	gi155959887	6.41	19 135	细胞增殖
8	亲环蛋白A	gi11633054	7.82	18 098	信号转导
9	丝切蛋白1	gi15031635	8.22	18 719	细胞骨架重建
10	PPIA 异构酶	gi110863927	7.68	18 229	信号转导
11	透明质酸酶	gi1119612416	8.53	50 744	成骨, 细胞增殖
12	肽酰脯氨酰异构酶A样3	gi114043400	6.29	18 385	应激反应, 信号转导
13	核受体交互作用蛋白1	gi125955639	8.36	127 688	信号转导
14	增强子结合蛋白	gi1440306	8.16	22 455	蛋白质合成
15	$\alpha$ -烯醇化酶	gi139644728	5.87	29 186	能量代谢
16	烯醇酶	gi14503571	7.01	47 481	能量代谢
17	核糖核蛋白E1	gi1460771	6.66	38 015	蛋白质合成

(2) 能量代谢。线粒体ATP合成酶是生物体能量代谢的关键酶, Senior<sup>[6]</sup>的研究证明它既行使

ATP合成功能, 又行使ATP水解功能。此外, 烯醇酶是参与糖酵解的一组酶, 在ATP的合成代谢过程

中起重要作用<sup>[7]</sup>。在本研究中,成骨细胞在受力后,脂肪、蛋白质、糖、核酸、核苷酸的代谢过程都需要大量的能量,在这个过程中 ATP 合成酶和烯醇酶高表达可以保证细胞对能量的需要。

(3) 细胞增殖。抗氧化蛋白 1 属于抗氧化蛋白家族,研究表明,它可以从鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 中克隆,显著促进成骨细胞的增殖,因此也被称为造骨细胞特异因子,转录前的上调依赖 PKC 通路,转录后的上调依赖 p38MAPK 通路<sup>[8]</sup>。本研究的结果显示抗氧化蛋白 1 的表达显著增强,这为揭示成骨细胞受到牵张力后发生的增殖分化提供了新的证据。

(4) 细胞骨架重建。丝切蛋白 1 是普遍存在于真核细胞的一种肌动蛋白结合蛋白,其基本功能是在细胞内结合和解聚 F-肌动蛋白,在正常细胞中调节肌动蛋白重组。但在应激的条件下,它可与肌动蛋白形成复合物而改变细胞的功能,刺激细胞表面受体,在细胞内的钙信号调节中起到重要的作用;既可以调节钙离子释放通道的活性,也能够通过其活性协调而间接的调节肌动蛋白骨架的微环境,参与细胞凋亡、胞质分裂等<sup>[9]</sup>。Delorme 等<sup>[10]</sup>的研究发现,活化的丝切蛋白 1 通过接收上游信号,重新组织细胞前端的片足和片层结构,从而调节细胞伸出,促进形成快速的肌动蛋白纤维逆流,并且进一步引起某些目的基因的表达。在本研究中,成骨细胞丝切蛋白 1 的表达在受力后显著增高,该分子作为细胞骨架的结合蛋白,可能调节肌动蛋白骨架的重组,参与成骨细胞的运动、迁移、粘附及钙离子信号通道等信号转导过程;但丝切蛋白 1 与肌动蛋白作用的方式及细胞内信号调节的精细机制值得深入探讨。

(5) 信号转导通路。信号转导中蛋白的磷酸化和脱磷酸化十分重要,分别由蛋白激酶和磷酸酶促成。在本研究中,蛋白磷酸酶 1 表达增高,可能是经丝氨酸苏氨酸蛋白磷酸化途径引起牵拉力对骨细胞的效应合成代谢反应。而核受体交互作用蛋白 1 是一类多功能的核受体调节剂,与机体生长发育、细胞增殖分化,以及体内许多生理代谢过程中的基因表达调控密切相关。调控骨组织改建的很多种性激素和脂溶性维生素都需要与核受体结合才能对成骨细胞、破骨细胞和骨细胞发挥作用。Imai 等<sup>[11]</sup>在成骨

细胞中观察到雌激素通过激活 Src/ERK 通路的核受体来启动信号转导,引起细胞增殖分化的反应。在本实验中核受体交互作用蛋白 1 的增高也提示,在牵张力刺激下可能发生了该信号通路的激活。此外,亲环蛋白 A 通过对 NF- $\kappa$ B 信号通路的调节来调控细胞周期。Shakibaei 等<sup>[12]</sup>研究表明软骨细胞中 NF- $\kappa$ B 可以激活 COX-2 和 MMP-9 的表达,而 COX-2 是与成骨作用相关的重要因子,因此本实验中亲环蛋白 A 的高表达也提示机械应力可能通过激活 NF- $\kappa$ B 通路引起成骨细胞的分化。

(6) 成骨作用。延伸因子 2 属于 G-蛋白超家族,关于基因芯片的研究发现其表达在成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖和矿化过程中发挥重要的调节作用<sup>[13]</sup>,本研究中该因子的高表达说明它可能也参与了细胞受力后的成骨方向分化。真核起始因子 2 是参与真核翻译起始的蛋白质家族中的一员。研究发现,延伸因子 2 基因缺陷的小鼠会发生骨量下降,同时成骨相关的基因如 Runx-2, cyclinD-1 等表达也显著下降<sup>[14]</sup>;而本研究中该因子的高表达说明延伸因子 2 则可能在骨改建中担当重要角色。此外,膜联蛋白 I 可以通过与不同生长因子结合蛋白结合,在 MAPK/ERK 信号通路的上游影响蛋白复合物的形成和活性<sup>[15]</sup>。Byers 等<sup>[16]</sup>实验证实,Cbfa1 蛋白及基因都是 MAPK/ERK 信号通路的关键目标,而 Cbfa1 是调节成骨生长和分化的重要转录因子。在本研究中,膜联蛋白 I 表达显著增高,后续的 Western Blot 实验也证实了这一点,这提示在成骨细胞受到牵张应力之后,膜联蛋白 I 可以调节细胞的增殖、分化并可能通过介导 MAPK/ERK 信号途径来发挥其对 Cbfa1 的调控作用,从而与成骨细胞的钙化密切相关。

大量研究表明,基质、细胞受体、细胞骨架间存在着密切的联系,细胞骨架可以通过细胞跨膜结构的变化来影响细胞内 DNA 的合成、基因的表达以及蛋白质的翻译,并实现相应的生物学功能。因此,可以从本研究鉴定出的差异表达蛋白质入手,探究力学信号在成骨细胞中的传导机制;还可以选择感兴趣的蛋白质作为靶点来干预这个过程,调控牵张应力作用下细胞的增殖和成骨分化效应,为临床工作提供新的思路。

参考文献:

- [1] Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone [J]. *Gene*, 2006, 15 (367): 1-16.
- [2] 李敏,周慧,崔银秋. 蛋白质组学方法在细胞内信号转导研究中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2007,18(2): 336-338.
- [3] 冯雪,陈富林,程兵. 培养细胞机械牵拉加载系统的研制[J]. *临床口腔医学杂志*,2003,19(7):387-389.
- [4] 王红兵,黄岂平,王远亮,等. 机械刺激对成骨细胞粘附、铺展、粘弹性的影响[J]. *医用生物力学*,2000,15(2):107-108.
- [5] Chen AP, Wang GL, Qu ZL, *et al.* Ectopic expression of ThCYP1, a stress-responsive cyclophilin gene from *Thelangiella halophila*, confers salt tolerance in fission yeast and tobacco cells[J]. *Plant Cell Rep*,2007, 26(2): 237-245.
- [6] Senior AE. ATP synthase: motoring to the finish line[J]. *Cell*, 2007, 130(2):220-221.
- [7] Paron I, D'Elia A, D'Ambrosio C, *et al.* A proteomic approach to identify early molecular targets of oxidative stress in human epithelial lens cells [J]. *Biochem*,2004, 378 ( Pt 3): 929-937.
- [8] Ishii T, Yanagawa T. Stress-induced peroxiredoxins. *Subcell Biochem*,2007, 44: 375-384.
- [9] 赵微,苏玉虹,巴彩凤. Cofilin 蛋白功能及活性调节[J]. *中国生物化学与分子生物学报*,2007,23(9):706-710.
- [10] Delorme V, Machacek M, DerMardirossian C, *et al.* Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks[J]. *Dev Cell*,2007,13(5): 646-662.
- [11] Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, *et al.* Regulation of bone metabolism by nuclear receptors[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 310(1-2):3-10.
- [12] Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis [J]. *Biochem Pharmacol*,2007, 73(9): 1434-1445.
- [13] Kitching R, Qi S, Li V, *et al.* Coordinate gene expression patterns during osteoblast maturation and retinoic acid treatment of MC3T3-E1 cells [J], *J Bone Miner Metab*, 2002,20(5): 269-280.
- [14] Wei J, Sheng X, Feng D, *et al.* PERK is essential for neonatal skeletal development to regulate osteoblast proliferation and differentiation[J]. *J Cell Physiol*,2008,217(3): 693-707.
- [15] Rescher U, Gerke V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions [J]. *J Cell Sci*,2004, 117 (13): 2631-2639.
- [16] Byers BA, Pavlath GK, García AJ. Cell-type-dependent up-regulation of in vitro mineralization after overexpression of the osteoblast-specific transcription factor Runx2/Cbfa1 [J]. *J Bone Miner Res*,2002,17(11): 1931-1944.