

文章编号:1004-7220(2010)06-0428-05

张应力对成骨分化骨髓间充质干细胞 ODF mRNA 表达的影响

江凌勇^{1,2}, 赵志河², 王 军², 樊瑜波³

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔颌面外科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011;

2. 四川大学华西口腔医院正畸科, 口腔疾病研究国家重点实验室, 成都 610041;

3. 北京航空航天大学 生物医学工程学院, 北京 100191)

摘要: **目的** 观察大鼠骨髓间充质干细胞骨向诱导分化来源的成骨细胞在张应力刺激下破骨细胞分化因子(osteoclast differentiation factor, ODF)基因表达的变化,探讨正畸牙移动骨改建过程中成骨细胞调控破骨细胞分化成熟的机制。**方法** 分离培养大鼠股骨骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞,采用膜式动态张应力加载体系按张应力大小及作用方式不同分为静态1、3、5 kPa组,动态3、5 kPa组(频率0.017 Hz)及对照不加力组6个实验组和按不同作用时间分为0、3、6、9、12、24和48 h 7个时间段进行体外细胞加力,RT-PCR技术检测不同强度、不同性质、不同作用时间张应力对成骨细胞 ODF mRNA 表达的影响。**结果** 张应力刺激抑制成骨细胞 ODF 的表达,静态张应力的抑制效应弱;抑制作用与刺激强度无明显关系;ODF mRNA 在动态张应力作用6 h后表达逐渐下降,9 h后显著下降,之后维持在一较低水平,48 h最低,具有时效性。**结论** 机械张应力刺激通过抑制成骨细胞 ODF mRNA 的表达限制破骨细胞的分化成熟。

关键词: 张应力;骨髓间充质干细胞;成骨细胞;破骨细胞分化因子;基因表达

中图分类号: R783 **文献标志码:** A

Effects of mechanical tensile stress on the expression of ODF mRNA in osteoblasts differentiated from rBMSCs in vitro

JIANG Ling-yong^{1,2}, ZHAO Zhi-He², WANG Jun², FAN Yu-bo³ (1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China; 2. Department of Orthodontics, West China Hospital of Stomatology, State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between mechanical tensile stress and the expression of ODF mRNA in osteoblasts differentiated from rBMSCs, and elucidate the mechanism for osteoclastogenesis regulated by osteoblasts in bone modeling and remodeling during the process of orthodontic tooth movement. **Method** rBMSCs-derived osteoblasts were isolated and cultured in vitro, and subjected to static mechanical tensile stress of 1, 3, 5 kPa or dynamic tensile stress of 3, 5 kPa at 0.017 Hz using the cellular tensile-stress system for 24 h. The control groups were subjected without any strain. Cells were collected in 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h respectively after stress loading. The expression patterns of ICAM-1 mRNA were examined by semiquantitative RT-PCR assay. **Results** ODF mRNA level significantly decreased after dynamic tensile strain, compared with the control groups; the effects of inhibition did not positively correlated with the magnitude of strain; the expression of ODF

收稿日期:2010-11-06; 修回日期:2010-11-22

作者简介:江凌勇(1978-),男,主治医师,研究方向:口腔颌面正畸。

通讯作者:王军,副教授, Tel:(028)85503477; E-mail:wangjunv@163.com。

mRNA gradually decreased at 6 h, significantly decreased at 9 h, then slightly rebounded and still stayed at a considerably lower level, reached the minimum transcription at 48 h. **Conclusions** The mechanical tensile strain can regulate osteoclastogenesis by inhibiting the expression of ODF in osteoblasts derived from rBMSCs. It could lead to a better understanding of the molecular basis for osteoblast-osteoclast communication in bone resorption induced by the application of mechanical strain during the orthodontic tooth movement.

Key words : Tensile stress; Mesenchymal stem cells; Osteoblasts; Osteoclast differentiation factor(ODF); Gene expression

正畸牙移动依赖于成骨细胞和破骨细胞介导的牙槽骨改建。骨形成取决于成骨细胞分泌成骨蛋白和骨基质矿化的速度,而骨吸收主要受限于牙周局部分化成熟破骨细胞的补充速度。目前研究认为成骨细胞在骨改建机制中处于“中心调控地位”^[1]。成骨细胞不仅是骨形成的效应细胞,而且在介导和调控破骨细胞分化和破骨细胞性骨吸收中也发挥重要作用。许多促进骨吸收因子作用于成骨细胞,由其通过多种途径传递信息给破骨细胞及其前体细胞,促进或抑制骨吸收^[2]。骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞在其骨向诱导分化中通过表达分泌一系列破骨细胞分化调控蛋白参与破骨细胞分化成熟及功能调节^[3]。其中破骨细胞分化因子(osteoclast differentiation factor, ODF)通过与破骨前体的细胞 RANK (Receptor Activator of NF- κ B)受体蛋白结合,刺激破骨细胞分化^[4-5]。研究表明 ODF 直接参与破骨细胞的分化发育和功能调节,是介导 IL-1、PTH 等多种刺激因子诱导破骨细胞生成及功能信号传导的最终因子^[6-7]。本研究旨在通过机械张应力对骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞 ODF mRNA 表达的影响,探讨由应力介导的正畸牙移动骨改建过程中成骨细胞对破骨细胞的分化成熟调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6 周龄 Sprague-Dawley 雄性大鼠,由四川大学华西医学中心实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM 粉剂(Gibco);胰蛋白酶(Gibco);新生小牛血清(成都哈里生物有限公司); β -甘油磷酸钠(β -GP)、地塞米松(Dex)、抗坏血酸磷酸盐(AsAp)、六偶氮副品红等酶组化试剂均购自 Sigma 公司;骨钙素放免试剂盒及兔抗大鼠骨钙素单克隆抗体(解放军总医院东亚免疫研究所);TRIZOL Reagent(Invitrogen);TaKaRa One Step RNA PCR Kit(大连宝生物工程有限公司);ODF 上下游

引物(上海生物化工公司合成);琼脂糖(Promega);其余试剂均为国产分析纯或进口分装。

1.1.3 主要仪器 二氧化碳恒温孵箱(SANYO);倒置相差显微镜(OLYMPUS);超净工作台(NU-AIRE);超低温离心机(日本);PCR 循环仪(PE9600);电泳仪(Bio-Rad);图象扫描系统(Bio-Rad);医用硅胶膜(化工部有机硅中心,成都);膜式动态张应力-体外细胞培养体系(由本课题组与四川工业学院机械工程系自动化控制教研室联合开发设计:静态张应力输出采用液压差原理,用力学公式 $P = \rho gh$ 来进行计算;动态张应力以调速器调控输出液压的频率 0 ~ 13 次/min,以调节液压泵底盘旋转角度控制传动杆伸缩幅度调节输出动态应力的幅度 0 ~ 39.2 N/次)(见图 1)。

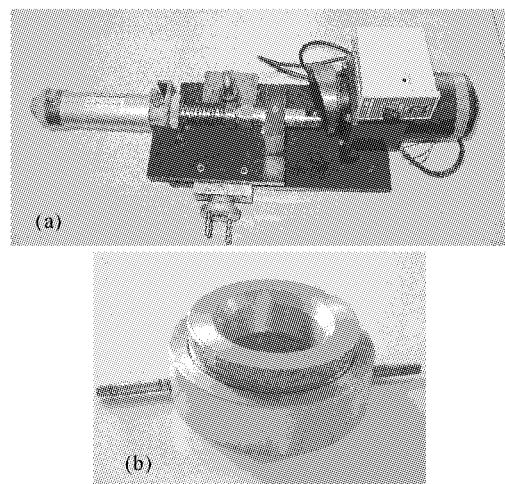


图 1 膜式动态张应力加载系统 (a) 动态张应力输出设备, (b) 细胞培养小室

Fig.1 Mechanical strain loading system (a) Cell culture chamber, (b) Dynamic tensile stress output unit

1.2 实验方法

1.2.1 rBMSCs 的分离、培养及成骨诱导分化、鉴定 参照 Friedenstien 等^[8]的方法,采用全骨髓法培养大鼠骨髓基质干细胞,当成簇细胞克隆融汇接

近瓶底 80 % 时进行第 1 次传代;细胞传至第 4 代时换用含有成骨细胞诱导剂的培养基(0.05 mmol/L AsAp、10 mmol/L β -GP、10⁻⁸ mol/L Dex) 培养。rBMSCs 骨向诱导分化过程中定期收集细胞及培养液,制备细胞爬片,采用酶组化法检测碱性磷酸酶(ALP)活性和放射免疫法测定骨钙素(OC)的分泌进行成骨细胞鉴定;同时结合 Von Kossa 染色检测细胞外钙结节的沉积。

1.2.2 rBMSCs 骨向分化来源的成骨细胞应力加载

无菌条件下,将成骨诱导分化的 rBMSCs(第 4 代)诱导培养 5 d 后以 5×10^5 个/小室接种于医用硅胶膜上(5% CO₂、37 °C 静置培养 24 h)待细胞自然贴壁于硅胶膜上后开始加载应力。研究张应力对成骨细胞 ODF mRNA 表达的量效关系:以 24 h 为加载时间按张应力大小及作用方式不同,依次分为对照组(不加力)和静态 1、3、5 kPa 组以及动态 3 kPa 组(频率为 1 次/min;应力幅度 3 kPa - 0 - 3 kPa)、动态 5 kPa 组(频率为 1 次/分;应力幅度 5 kPa - 2 kPa - 5 kPa)共 6 组;研究张应力对成骨细胞 ODF mRNA 表达的时效关系:以动态 3 kPa 为加载应力按作用时间不同分别在 0、3、6、9、12、24 和 48 h 共计 7 个作用时间段进行收样检测。

1.2.3 应力加载下 rBMSCs 骨向分化来源的成骨细胞 ODF mRNA 的测定

细胞总 RNA 的提取:按照 TRIZOL 试剂说明书提取细胞总 RNA。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR 一步法)引物设计见表 1。参照 One Step RNA PCR 试剂盒提供的程序进行 RT-PCR 扩增。总反应体系 20 μ L,包括:RNA 模板 1 μ g,10 \times Buffer 2 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L,10 mmol/L dNTP 0.8 μ L,RNase Inhibitor (40 UP μ L) 0.4 μ L, TaqDNA 聚合酶 0.7 μ L,AMV 逆转录酶 0.7 μ L,上下游引物各 1 μ L,RNase Free d H₂O 8 μ L。

表 1 ODF 及内对照 β -actin 引物设计

Tab.1 Primer sequences of ODF and β -actin

| Primers | Primer Sequence (5' - 3') | Predicted fragment size (bp) |
|----------------|--------------------------------------|------------------------------|
| ODF | Sense 5'-agactactaagagacgtggc-3' | 354 bp |
| | Antisense 5'-tgcaggttcacagcgaatgt-3' | |
| β -actin | Sense 5'-gcaccactttctacaatg-3' | 195 bp |
| | Antisense 5'-ccatcacaatgocagtgta-3' | |

PCR 扩增反应条件,ICAM-1:逆转录 50 °C 15 min,变性 94 °C 4 min,PCR 循环条件为 94 °C 30 s—56 °C 30 s—72 °C 30 s,72 °C 延伸 5 min(共 30 个循环); β -actin:逆转录 50 °C 15 min,变性 94 °C 4 min,扩增 94 °C 30 s—52 °C 30 s—72 °C 30 s,72 °C 延伸 5 min(共 30 个循环)。

1.2.4 凝胶电泳及图像分析

PCR 扩增产物在 1.5 % 琼脂糖作凝胶电泳,凝胶扫描自动分析仪上对扩增带(ODF:354 bp、 β -actin:195 bp)进行灰度分析,测出扩增带曲线下面积的灰度值 A_{ODF} 、 $A_{\beta-actin}$,用目的条带与内参照条带的比值 $A_{ODF}/A_{\beta-actin}$ 表示 ODF mRNA 的相对含量。

1.3 统计学方法

采用单因素方差分析对各组 ODF mRNA 表达的差异进行检验,SNK-q 法进行两两比较($P < 0.05$ 有统计学意义)。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞骨向诱导分化来源的成骨细胞鉴定

研究组已证实诱导培养后的 rMSCs 具有典型的成骨细胞生物学特性^[9]。

2.2 张应力刺激下成骨细胞 ICAM-1mRNA 的表达

rBMSCs 骨向分化来源的成骨细胞在机械张应力作用下,RT-PCR 检测的凝胶电泳结果显示单一条带,在不同强度、不同性质、不同作用时间下均有 ODF mRNA 的表达。共进行 3 次独立的实验,均得到以上结果(见图 2)。

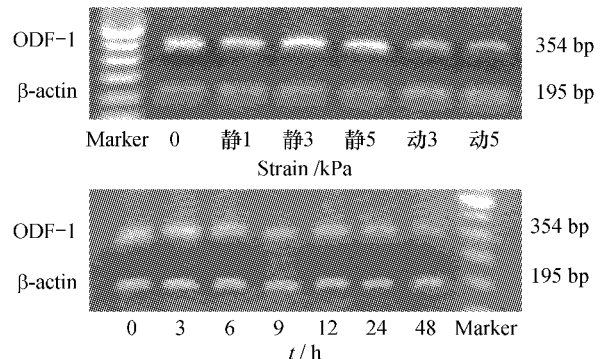


图 2 rBMSCs 骨向分化来源的成骨细胞机械张应力刺激后 ODF mRNA 的表达

Fig.2 Expression of ODF mRNA in rBMSCs - derived osteoblasts after mechanical dynamic or static tension loading with different magnitude and duration of strain

2.3 张应力刺激与成骨细胞 ODF 表达水平的剂量效应关系

动态张应力刺激明显抑制成骨细胞 ODF mRNA 的表达,均有统计学差异(见图 3)。且抑制作用与刺激强度无明显关系;同时可以看到动态张应力的抑制效应强于相对应的静态张应力,即动态 5、3 kPa 组分别强于静态 3、5 kPa 组。

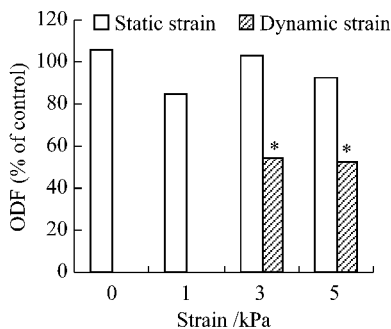


图3 张应力刺激与 ODF 表达的剂量效应关系
Fig.3 Dose - effect relationship between expression of ODF mRNA and mechanical strain(* $P < 0.05$)

2.4 张应力刺激与成骨细胞 ODF 表达水平的时效关系

动态张应力对 ODF mRNA 表达的抑制效应在 6 h 后表达即显著降低,并逐渐下降至 9 h,之后维持在一较低水平,48 h 最低,具有时效性。结果显示均有统计学差异(见图 4)。

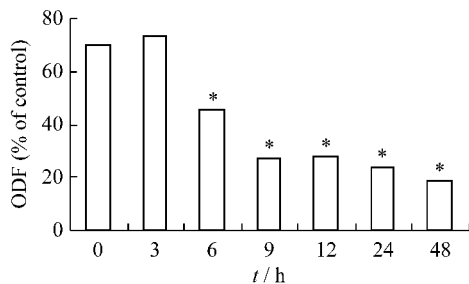


图4 张应力刺激与 ODF 表达的时效关系
Fig.4 Time-effect relationship between expression of ODF mRNA and mechanical strain(* $P < 0.05$)

3 讨论

本实验所采用的膜式动态张应力-体外细胞培养系统是近年来学者们使用较多的一种体外细胞加力装置,其设计原理:将体外培养的细胞种植于生物膜上,通过生物膜隔开细胞培养小室与液压小

室,利用液体的静张力或交变应力使生物膜发生弹性变形,贴附于生物膜上的细胞因此受到相应张应力或交变应力。可以在模拟生理环境下长时间施加相应的应力,研究应力刺激作用下细胞的一系列代谢、增殖以及形态、运动的变化,为基础、临床研究提供相关实验依据。既可对细胞加载静态张应力,又可加载动态张应力。本研究的加力系统借鉴 BioFlex 的设计原理,采用的硅胶膜厚度为 0.2 mm,直径 60 mm,以期产生更加理想的张应力,大大改善了以往膜应变不一致现象^[10]。可以更好地模拟体内的生理水平,对体外细胞模拟施加机械力刺激并进行精确的控制。

选择体外细胞应力为 1、3、5 kPa 的载荷是通过文献和基于预实验。Yamaguchi 等^[11]认为 9% ~ 24% 的细胞变形量可以模拟正畸力状态下的牙周膜受力后细胞的应变状态。国内韩文利^[12]的研究则认为选择 0.5% ~ 8% 的应变变量较合适,目前尚存在分歧。近年来关于成骨细胞加力与 BioFlex 的文献,所选刺激强度普遍较低,一般控制在 8% 以内^[13]。通过预实验测定在 1、3、5 kPa 3 个载荷下本研究培养小室的硅胶膜变形率分别为 2%、5%、7%,在 2% ~ 7% 拉伸状态下观察发现细胞贴壁生长情况良好,符合实验要求。故选用 1、3、5 kPa 的应力载荷。

破骨细胞来源于骨髓或造血组织的单核细胞,与巨噬细胞有共同的前体,在特定条件下融合成多核细胞。多数研究认为成骨细胞在发挥其成骨功能的同时,又参与调控破骨细胞分化成熟。1981 年, Rodan 和 Martin 首次提出成骨细胞参与破骨细胞形成的假说^[14]。1988 年,日本学者 Takahashi 等^[15]在此理论上建立了骨吸收刺激因子作用下脾细胞和成骨细胞/骨髓基质细胞的共培养体系,成功诱导形成了破骨样细胞(osteoclast-like cells, OCLs)。成骨细胞/骨髓基质细胞和破骨前体细胞间的相互作用是 OCLs 形成的关键。其效应依赖于两者之间黏附作用机制。成骨细胞可表达多种黏附分子,其中 ICAM-1 在破骨细胞形成过程中起重要作用。Tanka 等^[16]采用磁株分离技术研究发现 ICAM-1 + 成骨细胞对破骨前体细胞有高度的亲和力,本课题组已证实张应力刺激通过调控 ICAM-1 这一黏附分子抑制破骨细胞的分化成熟^[9]。对张应力与破骨细胞分化间的关系进行了一个初步的探索。

目前认为成骨细胞是通过分泌表达破骨细胞分化因子(osteoclast differentiation factor, ODF)^[17]、破骨分化抑制因子(osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)^[18]、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF 或 CSF-1)^[19]等多种细胞因子来实现对破骨细胞分化和功能的调节。近年来研究表明,ODF 可能是介导多种刺激因子诱导破骨细胞生成及功能信号传导的最终因子^[17]。破骨细胞的分化依赖于转录因子(nuclear factor κ B, NF- κ B)和受体蛋白(receptor activator of NF- κ B, RANK)的激活,故 ODF 又名 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand)^[20], ODF 与破骨前体的细胞 RANK 受体蛋白结合,刺激破骨细胞分化^[21]。可以明确,ODF 参与破骨细胞形成的全部过程,包括分化、融合和激活及生存^[20]。

本研究进一步对不同强度、不同性质、不同作用时间张应力对成骨细胞 ODF mRNA 表达的影响进行了研究。从剂量效应和时间效应两方面探讨了张应力刺激对成骨细胞 ODF 表达的影响。结果显示,动态张应力刺激明显抑制成骨细胞 ODF mRNA 的表达,且抑制作用与刺激强度无明显关系;同时可以看到动态张应力的抑制效应强于相对应的静态张应力,即动态 5、3 kPa 组分别强于静态 3、5kPa 组。动态张应力对 ODF mRNA 表达的抑制效应呈现时效性。Rubin 等^[22]对体外培养的骨髓细胞加载张应力,结果发现张应力刺激对破骨细胞形成有抑制作用,抑制最明显的加力组破骨细胞的数量仅为对照组的 50%。虽然本研究在加载力值、持续时间等方面与其研究有所不同,但结果趋势一致。即机械张应力刺激通过调控成骨细胞分泌的破骨细胞分化蛋白的表达抑制破骨细胞的分化成熟。ODF 在其中起了重要的作用。

4 结语

本研究选取了骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞,探讨了机械张应力对 ODF mRNA 的表达变化,提示张应力刺激通过调控 ODF 这一破骨细胞分化因子抑制破骨细胞的分化成熟。为进一步明确由应力介导的正畸牙移动骨改建过程中成骨细胞对破骨细胞的分化成熟调控机制提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] Lundberg P, Lie A, Bjurholm A, *et al.* Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts[J]. *Bone*, 2000, 27(6): 803-810.
- [2] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, *et al.* The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(1): 2-12.
- [3] Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats[J]. *Cell Tissue Res*, 1988, 254(2): 317-330.
- [4] Yashuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al.* A. Novel Molecular Mechanism Modulating Osteoclast Differentiation and Function[J]. *Bone*, 1999, 25(1): 109-113.
- [5] Shiotani A, Takami M, Itoh K, *et al.* Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NF κ B ligand and osteoprotegerin[J]. *Anat Rec* 2002, 268(2): 137-146.
- [6] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. *Cell*, 1997, 89(2): 309-519.
- [7] Wong BR, Rho J, Arron J, *et al.* TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(40): 25190-25194.
- [8] Friedenstein AJ, Latzinik NV, Gorskaya YF, *et al.* Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells[J]. *Bone Miner*, 1992, 18(3): 199-213.
- [9] 江凌勇,赵志河,王军,等. 张应力对骨髓间充质干细胞骨向分化来源成骨细胞 ICAM-1 基因表达的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2006, 37(3): 438-441.
- [10] Brown TD. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro - a review[J]. *Journal of Biomechanics*, 2000, 33: 3-14.
- [11] Yamaguchi M, Shimizu N, Shibata Y, *et al.* Effects of different magnitudes of tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells[J]. *J Dent Res*, 1996, 75(3): 889-894.
- [12] 韩文利. 拉伸应力应变对人牙周膜成纤维细胞增殖及代谢影响的研究[D]. 华西医科大学硕士学位论文, 1999.
- [13] Rubin J, Murphy TC, Fan X, *et al.* Mechanical strain inhibits RANKL expression through activation of ERK1/2 in bone marrow stromal cells[J]. *Journal Bone and Mineral Research*, 2002, 17: 1452-1460.