

文章编号:1004-7220(2017)05-0464-05

频率对拉伸应变诱导成骨细胞凋亡的影响

孟凡¹, 李辉², 叶梓¹, 李伟鑫¹, 刘璐¹

(1. 武警后勤学院, 天津 300309; 2. 武警陕西总队 铜川支队卫生队, 铜川 727100)

摘要: **目的** 考察频率对拉伸应变诱导成骨细胞凋亡的影响。**方法** 采用 Flexcell 力学加载系统对小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 施加 1% 双轴拉伸应变刺激, 频率分别为 1、2、3、4、5 Hz, 每天加载 1 h, 间歇性拉伸 8 d; 通过测定乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测细胞死亡率; 采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术观察细胞凋亡情况; 实时 PCR 检测细胞凋亡标志基因 caspase-3、-9 以及 Bcl-2、Bax 基因水平; Western blotting 检测 caspase-3、-9 蛋白表达。**结果** 不同加载频率对成骨细胞 LDH 活性无影响; 不同频率下流式细胞术总体凋亡率无显著性差异, 但是 2 Hz 频率可诱导成骨细胞早期凋亡。2 Hz 拉伸应变可明显上调 caspase-3、-9 基因和蛋白表达, 上调 Bax/Bcl2 蛋白比值。**结论** 1% 双轴拉伸应变刺激下 1~5 Hz 频率不能引起成骨细胞凋亡和死亡, 但 2 Hz 频率可诱导成骨细胞早期凋亡, 且通过上调 Bax/Bcl-2 表达实现的。

关键词: 成骨细胞; 拉伸应变; 细胞凋亡; 频率

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.05.012

Effects of frequency on osteoblast apoptosis induced by tensile strain

MENG Fan¹, LI Hui², YE Zi¹, LI Wei-xin¹, LIU Lu¹ (1. Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China; 2. Tongchuan Health Team, Shaanxi Armed Police Corps, Tongchuan 727100, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of frequency on osteoblast apoptosis induced by tensile strain.

Methods MC3T3-E1 cells were applied with 1% biaxial tensile strain at the frequency of 1, 2, 3, 4, 5 Hz, respectively for 1 hour per day in 8 days. The survival rate of the cells was determined by activity of lactate dehydrogenase (LDH). Annexin V-FITC/PI Flow cytometry was used to test cell apoptosis. Real-time RT-PCR was used to detect the gene level of apoptosis markers caspase-3, -9 as well as Bcl-2 and Bax, and Western blotting was used to test protein expressions of caspase-3, -9. **Results** Different loading frequencies had no effect on osteoblast activity of LDH. There was no significant difference in the total apoptosis rate of flow cytometry at different frequencies. However, the frequency of 2 Hz could induce early osteoblast apoptosis. Tensile strain at the frequency of 2 Hz could significantly increase the expression of caspase-3, -9 gene and protein, and induce cell apoptosis with the up-regulation of the Bax/Bcl-2. **Conclusions** Osteoblast apoptosis and death cannot be induced by 1% biaxial tensile strain at the frequency of 1-5 Hz, but the frequency of 2 Hz can induce the early apoptosis of osteoblasts by up-regulating the expression of Bax/Bcl-2.

Key words: Osteoblasts; Tensile strain; Cell apoptosis; Frequency

随着武警部队担负维稳、处突、反恐任务的加重, 军事训练和体能训练作为提高部队战斗力的重

要保证越来越趋于严格化、规范化, 训练伤的发生率也随之增长。作为最常见的一种训练伤, 疲劳性骨

收稿日期: 2016-10-16; 修回日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (11302262)。

通信作者: 刘璐, 讲师, E-mail: netingcat@163.com。

折又称应力性骨折,它是骨骼的某一部分受到反复、持续外力和长期积累损伤而引起的慢性骨折^[1-3]。在较小冲击力反复作用下,骨小梁不断发生微小损伤,当这些损伤不断积累,超过机体的修复能力时,会最终导致骨折。当应力作用于骨时,骨会发生适应性的塑形改变,从而激活破骨过程(旧骨的吸收)和成骨过程(新骨的形成)^[4]。当骨吸收过程超过骨形成过程,骨质就会变得疏松,易于骨折。如果去除应力作用,使松质骨得以休息,则成骨过程与破骨过程趋于平衡,骨质疏松和微损伤即得以恢复和愈合;如果应力作用继续存在,则骨微损伤逐渐加重,导致完全骨折的发生^[5]。

研究发现,人在正常走路时,骨组织受到的应变在 0.001 以下,而在从事骑马等剧烈运动时,应变在 0.005 以上^[6]。战士在训练中,肌肉疲劳使肌肉的缓冲功能减弱,应力集中于某一部位,局部骨组织不断承受增加的应力,故推测战士训练伤导致的应力性骨折是持续性力学过载环境对骨骼损伤和危害的主要原因。然而目前这方面的研究鲜有报道,而且在过载环境下不同频率阈值的力学生物学效应也尚未清楚阐明。

细胞凋亡是调控机体生长发育、维持内环境稳定的重要组成部分^[7]。研究发现,介导细胞最终凋亡的有线粒体、内质网和死亡受体 3 种途径^[8];涉及一系列蛋白,如 caspase 家族蛋白、Bcl-2 家族蛋白和 p53 蛋白、存活素(survivin)^[9]。有多种基因参与其基因调控,Bcl-2/Bax 比值上调,抑制细胞凋亡;Bcl-2/Bax 比值下调,促进细胞凋亡^[10]。Bcl-2/Bax 比值是决定 cyt C 释放和 caspase 激活的关键^[11]。基于此,本文探讨在 1% 拉伸应变过载环境下不同频率对成骨细胞凋亡^[12]的影响,以期进一步阐明疲劳性骨损伤的生物力学机制,为战士训练伤的救治和防护提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞系由协和医科大学基础医学研究所提供; α -MEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素(美国 Gibco 公司),Annexin V FITC 细胞凋亡检测试剂盒

(天津三箭生物技术有限公司),PI 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),乳酸脱氢酶检测试剂盒(南京建成公司),兔抗 caspase-3(武汉博士德生物工程有限公司),兔抗 caspase-9(北京博奥森生物技术有限公司),TIAN Script RT 试剂盒 cDNA 第一链合成试剂(北京天根生化科技有限公司),GAPDH(上海生工生物工程公司);Flexcell 细胞培养板,FX-5000 Flexcell 力学加载仪,BD FACSCalibur 流式细胞仪。

1.2 细胞的培养与力学加载

小鼠 MC3T3-E1 细胞培养于 10% 胎牛血清的 α -MEM 完全培养液中,细胞置 5% CO₂、95% 湿度、37 °C 孵箱中培养。每 3 d 更换 1 次培养液,用 0.25% 胰酶消化传代培养。将细胞以 1×10^5 /mL 的密度接种于力学加载系统 Flexcell 6 孔板中,每孔 3 mL 培养基,放置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h。选择 1% 双向拉伸模式,频率分别为 1、2、3、4、5 Hz,每天加载 1 h,间歇性拉伸 8 d。对照组细胞正常条件下培养。

1.3 乳酸脱氢酶外漏量的检测

将每组上清液取出,按照乳酸脱氢酶测定试剂盒(南京建成)的方法测定乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)活性,在酶标仪上用波长 450 nm 处测定 OD 值,所得吸光度计算公式为:

$$\text{LDH 活性(U/L)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度(0.2 mmol/L)}$$

1.4 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术

Annexin V-FITC/PI 流式细胞术为常规实验室检测细胞凋亡的方法^[13]。收集细胞,用预冷的 PBS 清洗细胞 1 次,然后用缓冲液重悬细胞,调整细胞浓度为 10⁶ 个/mL;取 100 μ L 细胞悬液,加入 5 μ L Annexin V 及 5 μ L PI;轻轻混匀,室温避光孵育 15 min;加入 400 μ L 缓冲液,上机检测。

1.5 实时 RT-PCR 法检测 caspase-3、-9、Bax 和 Bcl2 mRNA 水平

拉伸结束后收集细胞,用 Trizol 试剂裂解,用核酸定量仪测定其在 260 和 280 nm 处 OD 值,以确定核酸的纯度及浓度,调整浓度至 1 g/L,A260/A280 比值为 1.8 ~ 2.0,表示 RNA 纯度较高。按试剂盒说明逆转录成 cDNA。取 1 μ g cDNA 进行 PCR 反

应。引物序列见表1。以 GAPDH 为内参,PCR 反应体系 (25 μL) 为: $2 \times \text{Taq}$ 反应混合液 12.5 μL , 5 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , 超纯水 9.5 μL 。反应参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 、退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、延伸 1 min, 35 个循环, 终延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequence used in real-time-PCR

基因	引物序列 (5'-3')	产物大小/bps
caspase-3	上游 TCTGACTGGAAGCCGAAAC	68
NM-009810.3	下游 GCAAGCCATCTCTCACTA	
caspase-9	上游 CCAGTGCCTCATCATCAACA	96
NM-015733.5	下游 TCGTTCTTTCACCTCCACCAT	
Bax	上游 ATGCGTCCACCAAGAAGC	126
NM-007527.3	下游 CAGTTGAAGTTGCCATCAGC	
Bcl-2	上游 AGCCTGAGAGCAACCAAT	121
NM-009741.5	下游 AGCGACGAGAGAAGTCATCC	

1.6 Western blotting 检测

加载结束 12 h 后, 各组样品加入 Radio Immunoprecipitation Assay (不完全裂解缓冲液 1 mL, 苯甲磺酰氯 10 μL , 现用现配) 裂解液 150 μL , 冰上裂解 30 min, 低温离心机离心 15 min (12 kg, 4 $^{\circ}\text{C}$), 取上清蛋白样品, 进行 BCA 蛋白定量 (康维试剂)。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白检测 caspase-3、-9 (GAPDH 为内参), PVDF 膜 (miliopore) 转移蛋白, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 兔抗 caspase-3 抗体 (1:200)、兔抗 caspase-9 抗体 (1:200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBS-T 漂洗 3 次, 用辣根酶标记二抗孵育, TBS-T 缓冲液漂洗后化学发光显色, 凝胶成像仪显示条带。

1.7 统计学处理

以上实验均重复 3 次, 采用 SPSS 19.0 统计学软件对实验数据进行统计学分析。数据用均数 \pm 标准差表示, 组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞分析结果

不同频率力学拉伸结束后收集细胞, 经 Annexin V-FITC 和 PI 双染后进行流式细胞术分析。图 1 (a)、(b) 所示分别为 2 Hz 拉伸应变下 FSC-H 和

FL1-H 分析图。左下象限代表正常细胞 (Annexin-V 和 PI 染色均为阴性), 右下象限代表早期凋亡细胞 (Annexin-V 染色阳性 PI 染色阴性), 右上象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞 (Annexin-V 和 PI 染色均为阳性), 左上象限代表细胞收集过程中出现的损伤细胞 (Annexin-V 染色阴性 PI 染色阳性)。由不同频率下流式统计分析图可见, 总体凋亡率 (Q2 + Q3, 包括坏死细胞) 在 1% 拉伸应变刺激下对照组和 1、2、3、4、5 Hz 组没有明显不同, 但是对于早期凋亡率 (Q3) 来说, 2 Hz 组较对照组显著升高, 提示 2 Hz 频率可诱导成骨细胞早期凋亡 [见图 1(c)、(d)]。

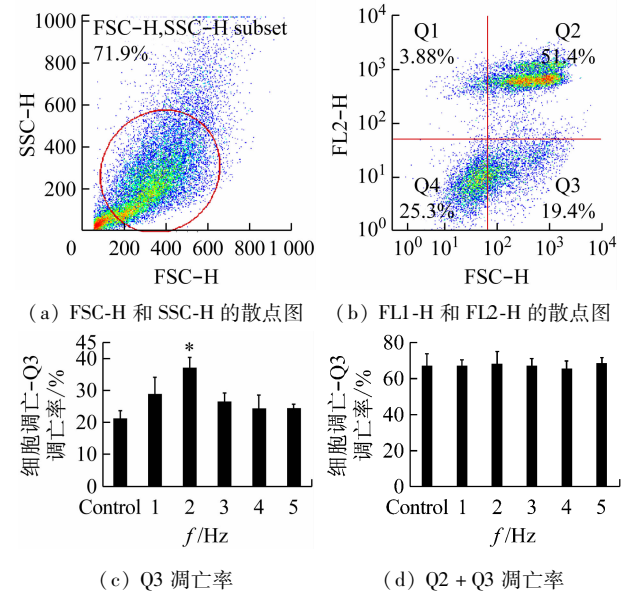


图1 流式细胞术检测力学拉伸后 MC3T3-E1 细胞在不同频率下凋亡差异 (* 与对照组相比, $P < 0.05$)

Fig.1 Differences in apoptosis of MC3T3-E1 cells after mechanical stretch at different frequencies detected by flow cytometry (a) Scatter diagram of FSC-H and SSC-H, (b) Scatter diagram of FL1-H and FL2-H, (c) Apoptosis rate of Q3, (d) Apoptosis rate of Q2 and Q3

2.2 LDH 外漏量检测结果

细胞膜破裂后, LDH 释放到培养基中, 检测 LDH 外漏量, 即考察细胞死亡率。在 1% 拉伸应变刺激下, 对照组和 1、2、3、4、5 Hz 组对 MC3T3-E1 细胞死亡没有明显影响 (见图 2)。其结果与流式细胞术结果一致。

2.3 实时 RT-PCR 检测细胞凋亡 caspase-3、-9 和 BAX/BCL-2 基因水平

与对照组相比, 1、2、5 Hz 拉伸应变可上调 caspase-3 基因水平 ($P < 0.05$), 然而除了 2 Hz 拉伸

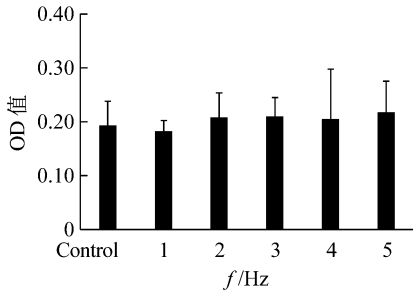


图2 LDH 外漏量检测 MC3T3-E1 细胞在不同频率下的死亡率
 Fig.2 Survival rate of MC3T3-E1 cells at different frequencies detected by external leakage of LDH

应变的 caspase-9 基因水平和对照组持平外,其他各组均显著下降,但 1、2 Hz 组仍然比其他拉伸应变组表达量高,提示 caspase-3、-9 基因表达具有时序性,但是 1、2 Hz 组较其他各频率组均高表达。Bcl-2/Bax 比率是启动细胞凋亡的“分子开关”。1、2 Hz 组均可显著上调 Bax 和 Bcl2 水平 ($P < 0.05$),但 Bax 升高量较 Bcl2 大。因此,2 Hz 组 Bax/Bcl2 较对照组显著性升高 ($P < 0.05$),提示 2 Hz 拉伸应变开启了线粒体外膜各种通道,细胞趋于凋亡状态(见图 3)。

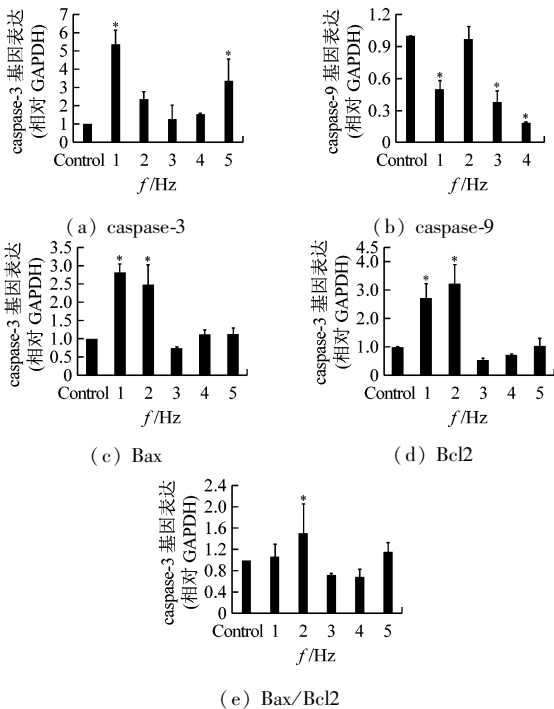


图3 不同频率拉伸应变对成骨细胞凋亡基因的影响
 Fig.3 Influences of tensile stretch at different frequencies on osteoblast apoptosis genes (a) Caspase-3, (b) Caspase-9, (c) Bax, (d) Bcl2, (e) Bax/Bcl2

2.4 Western blotting 测定 caspase-9、-3 蛋白表达

Western blotting 结果发现,与对照组相比,2 Hz 组 caspase-9、-3 蛋白表达量明显升高 ($P < 0.05$),与实时定量 PCR 结果基本一致,提示 2 Hz 拉伸应变促进细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶表达量的提高,细胞趋于凋亡(见图 4)。

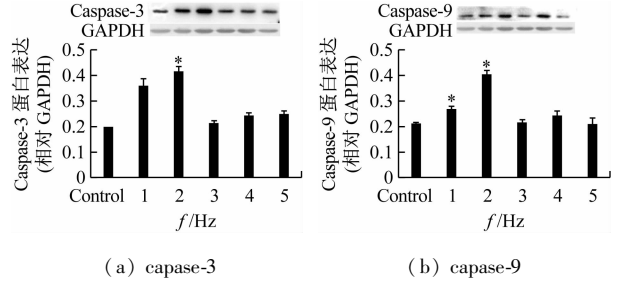


图4 不同频率拉伸应变下 caspase-9、-3 蛋白 Western blotting 分析 (* 与对照组相比, $P < 0.05$)

Fig.4 Western blotting analysis on caspase-9、-3 under tensile strain at different frequencies

(a) Caspase-9, (b) Caspase-3

3 讨论

机械力诱导成骨细胞的力学生物学效应因力的种类、大小、作用时间不同而不同^[14-16]。同为机械拉伸力,因装置力产生的方向不同,其产生的生物学效应也有所不同。Wan 等^[17]采用 4 点弯曲装置(单轴拉伸)在 0.5% 应变下即观察到力对成骨细胞的破坏作用,而韩磊等^[18]利用 Flexcell 装置(双轴拉伸)发现成骨细胞在 1% 应变下促进细胞的增殖和分化。

在影响力学生物学效应的众多因素中,力的大小和作用时间长短研究较为常见。例如,生理性机械力(应变在 0.003 5 以下)短期刺激会促进成骨细胞增殖及其分化^[19],长期则对成骨细胞作用不大^[20]。高频低载(40 Hz、0.3 g)促进成骨细胞增殖和分化^[21],而低频(0.5、2 Hz)振动(低载)不仅促进成骨细胞增殖,还能促进成骨^[22];体内实验发现,走步有 3 种不同频率的作用力^[6]。本文重点考察频率是否能够诱导成骨细胞的凋亡甚至死亡以及低频(1 ~ 5 Hz)、过载(1% 拉伸应变)的力学生物学效应。

Annexin V-FITC 与 PI 匹配使用,可以将凋亡早期和晚期的细胞以及死亡细胞区分开来。本实验发

现,晚期凋亡和死亡细胞在各种频率下没有显著差异,这与LDH外漏量检测细胞死亡率结果一致;与对照组没有明显差异,即1%拉伸应变刺激下加载8 d频率对成骨细胞的晚期凋亡和死亡率无显著影响。Jones^[24]等通过实验发现,衬层细胞应变在0.003~0.018时,频率为1次/d和30次/d的生物学效应无明显差别结果一致,而相对短时间的力学刺激可导致骨的持久适应性反应,这种作用可能与骨基质“应变耐受”有关,即细胞对长时间作用产生类似药物耐药性。

Annexin-V为Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白,能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸(PS)高亲和力和特异性结合。实验中Q3阳性反应即早期凋亡的结果提示,2 Hz拉伸应变较其他频率凋亡程度显著上升。流式结果与caspase-3基因及蛋白表达基本一致,即2 Hz拉伸应变对细胞的损伤最大。虽然频率对成骨细胞晚期凋亡和死亡率基本无影响,但是不同频率对早期凋亡的影响不同。细胞凋亡至死亡尚需一定的过程,力的作用要达到一定的阈值,并且有足够的时间就有可能引起生物学响应。caspase-3的表达即可启动凋亡程序,预想增大力的作用或是延长作用时间会出现损伤更为强烈的生物学效应。疲劳性骨损伤发病的机制可能是这种持续性外力作用对骨骼细微损伤长期累积的结果。

频率即相同时间下力学加载的次数。本文预想频率越高损伤应越严重,但实验结果表明,2 Hz对成骨细胞有较强损伤效应,其次为1 Hz,而3~5 Hz与对照组相比没有明显变化。推测原因是随着频率的增加,作用于细胞的力不单纯为拉伸应力,还有不同方向的流体剪切力^[24];细胞在一个较为复杂的力学环境中,增强了细胞的耐受能力,损伤反而减小。同样的情况也发生在单轴拉伸力下,应变0.005即为超生理应变;而在双轴拉伸力下,应变0.01仍然可以促进细胞的增殖和分化。

4 结语

频率是力学刺激重要参数。本文通过Flexcell力学加载平台对成骨细胞施加1~5 Hz拉伸应变刺激,结果发现力学刺激作用时间为8 d后,不同加载频率对成骨细胞总体凋亡率和死亡率无显著性差异,但是2 Hz频率的拉伸应变可明显上调

caspase-3、-9基因和蛋白表达,且上调Bax/Bcl2蛋白比值,说明8 d力学刺激可以引起细胞早期凋亡,但是细胞凋亡是有进程的。随着拉伸时间的增加,频率是否成为调控成骨细胞凋亡的重要因素以及其阈值如何,有待进一步探索。

参考文献:

- [1] 任建政,冯永恒,冯晨,等.新兵训练下肢疲劳性骨折的研究[J].武警后勤学院学报(医学版),2004,13(2):106-108.
- [2] 孙普庆,张秋霞,陆阿明.疲劳性骨折发生的生物力学机制[J].中国中医药现代远程教育,2010,8(4):163-164.
- [3] 赵红军,韩晓光,许爱斌,等.军训中下肢应力骨折的机理与防治——附生物力学分析[J].医用生物力学,1996,11(4):244-248.
ZHAO HJ, HAN XG, XU JB, *et al.* The mechanism and management of stress fractures of lower extremity occurred in military training-clinical investigation and biomechanics analysis [J]. J Med Biomech, 1996, 11(4): 244-248.
- [4] KIURU MJ, PIHLAJAMÄKI HK, AHOVUO JA. Bone stress injuries [J]. Acta Radiologica, 2004, 45(3): 317-326.
- [5] ROMANI WA, GIECK JH, PERRIN DH, *et al.* Mechanisms and management of stress fractures in physically active persons [J]. J Athl Train, 2002, 37(3): 306-314.
- [6] TANAKA SM, SUN HB. Walking-induced bone strain stimulates cultured osteoblasts accompanied by the low-magnitude, high frequency components [J]. J Biomech Sci Eng, 2009, 4(3): 434-442
- [7] 张勤丽,牛侨.细胞凋亡机制概述[J].环境与职业医学,2007,24(1):102-107.
- [8] 赵瑞杰,李引乾,王会,等. Caspase家族与细胞凋亡的关系[J].中国畜牧杂志,2010,46(17):73-78.
- [9] 岳原亦,张扬,张一奇. Caspase家族与细胞凋亡[J].中国医疗前沿,2011,6(6):25-26.
- [10] 余国龙,梁晓秋,谢秀梅,等.高血压大鼠心脏肥厚过程中心肌细胞凋亡心肌纤维化动态观察[J].临床心血管病杂志,2002,9(4):322-324.
- [11] KORSMEYER SJ, YIN XM, OLTVAIZ N, *et al.* Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family [J]. Mol Basis Dis, 1995, 1271(1): 63-66.
- [12] 李珣,张晓玲,沈刚,等.周期性张应变作用下成骨细胞凋亡的体外研究[J].医用生物力学,2009,24(3):223-227.
LI H, ZHANG XL, SHEN G, *et al.* Study on osteoblast apoptosis in response to mechanical stretch in vitro [J]. J Med Biomech, 2009, 24(3): 223-227.