

文章编号:1004-7220(2009)03-0223-05

周期性张应变作用下成骨细胞凋亡的体外研究

李 暄¹, 张晓玲², 沈 刚¹, 唐国华¹

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔正畸科;上海市口腔医学重点实验室 上海 200011;

2. 中国科学院上海生命科学研究院/上海交通大学医学院健康科学研究所,上海 200025)

摘要:目的 研究周期性张应变对体外培养的成骨细胞凋亡作用及其与细胞增殖和细胞分化之间的关系。方法 酶消化法分离培养新生SD大鼠颅顶骨成骨细胞,P2-P4代成骨细胞培养2 d和4 d后,用无血清培养法诱导成骨细胞凋亡,同时使用Flexcell 4000™细胞应变加载系统分别对细胞施加72 h变形率为6%和13.6%的等轴周期性张应变。根据总培养时间分为5 d和7 d两组。运用流式细胞技术对成骨细胞凋亡水平进行检测,同时进行细胞计数及碱性磷酸酶(ALP)蛋白含量检测。结果 与不加力的对照组相比,6%周期性张应变使成骨细胞凋亡率有不同程度的降低并伴随细胞数量增加;而在13.6%的周期性张应变下,成骨细胞凋亡率增加的同时,细胞数量有不同程度地降低;而相同培养时间下,5 d组细胞对6%的周期性张应变更加敏感,而7 d组细胞对13.6%的周期性张应变更加敏感。ALP活性在两种张应变刺激作用下均有所下降。结论 周期性张应变对成骨细胞的凋亡具有影响,不同力值的周期性张应变可通过促进或抑制细胞凋亡的方式调控成骨细胞的活性。

关键词: 周期性张应变;成骨细胞;细胞凋亡;细胞增殖;细胞分化

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

Study on osteoblast apoptosis in response to mechanical stretch in vitro

LI Xuan¹, ZHANG Xiao-ling², SHEN Gang¹, TANG Guo-hua¹. (1. Department of Orthodontics, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Stomatology. Shanghai 200011, China; 2. Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences Chinese Academy of Sciences and Shanghai Jiaotong University School of Medicine. Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of mechanical stretch force on the apoptosis, proliferation and differentiation of osteoblast cultured in vitro. **Method** Rat calvarial osteoblasts passage 2 to 4 were used and cell apoptosis was induced by serum starvation after 2 or 4 days of static culture. The osteoblasts were then subjected to cyclic equibiaxial stretch forces for 72 hours using Flexcell 4000™ strain unit. Apoptotic levels of the osteoblasts were quantified by flowcytometer right after the stretch application. The cell number and alkaline phosphatase (ALP) activity were also evaluated. **Result** 6% elongation of stretch force led to a decrease of apoptosis rate with an increase of cell number, in which cells stretched after 2 days culture were more sensitive, showing a 45% decrease of apoptosis rate and 34% increase of cell number. 13.6% elongation of stretch force elicited an increase of osteoblast apoptosis while the cell population was decreased, in which cells stretched after 4 days culture were more significantly affected, showing a 192% increase of apoptosis rate and 64% decrease of cell population. ALP activity was declined upon the two force loading magnitudes.

收稿日期:2008-11-05;修回日期:2009-01-21

基金项目:国家自然科学基金项目(30500572);上海科学技术委员会项目(080222771100);上海市重点学科建设项目(S30206)

作者简介:李暄(1980-),女,研究方向:口腔生物力学。

通讯作者:唐国华,Tel:(021)232741699;E-mail:tangg@graduate.hku.hk。

Conclusions Stretching force can affect apoptosis in osteoblast culture. Different force loading magnitudes could control the osteoblast activity by accelerating or restraining the osteoblast apoptosis.

Key words: Mechanical stretch; Osteoblast; Apoptosis; Proliferation; Differentiation

细胞凋亡(apoptosis)是有核细胞在体内因素触发下,启动自身内部机制,通过激活内源性DNA内切酶引起细胞主动的程序性死亡过程。细胞凋亡和细胞的生长、增殖、分化一样,对维持机体内环境稳定具有重要的生物学意义。成骨细胞体外培养显示在矿化期有成骨细胞凋亡发生^[1],并且凋亡数随着基质的钙化而逐步增多^[2,3]。同时,成骨细胞凋亡也参与了骨生长改建的过程,在颅骨快速生长期的骨缝边缘、骨折愈合期和牵张成骨过程中均有成骨细胞凋亡的发生^[4-6]。有研究认为,早期出现在骨改建区域的成骨细胞中50%~70%无法分化为成熟的骨细胞参与成骨,这些成骨细胞是通过细胞凋亡消失的^[7]。近来的研究证实,外界应力对成骨细胞的凋亡有影响,流体剪切力可抑制TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡^[8]。而牵张力会促进成骨细胞的凋亡^[9]。然而,目前机械力对成骨细胞凋亡影响的研究结果尚不明了,也缺乏不同牵张力对成骨细胞凋亡调控机制的研究。

本研究通过Flexcell 4000™细胞应变加载系统对大鼠颅顶骨成骨细胞施加周期性张应变,运用流式细胞仪对凋亡水平进行检测,同时评价成骨细胞增殖和分化情况,研究周期性张应变作用下成骨细胞凋亡的变化,并分析其与细胞增殖和分化的关系,从而分析周期性张应变对成骨细胞凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 原代成骨细胞体外分离和检测

取新生(<24 h)SD大鼠,无菌条件下获取颅顶骨,采用次序性酶消化法分离成骨细胞,加入含体积分数10% FBS的MEM培养基,接种于75 cm²培养瓶,次日吸去残留骨片后隔日换液,细胞90%汇合时传为P1代。取P2代细胞,培养1周后多数细胞表现为碱性磷酸酶染色阳性;经含 β -甘油磷酸钠和抗坏血酸的培养基培养,2周后可形成明显的矿化结节,茜素红染色为鲜红色,证实所获成骨细胞具有体外成骨功能。本实验采用P2~P4代的成骨细胞作为研究对象。

1.2 成骨细胞培养和周期性张应变加载

采用Flexcell 4000™细胞应变加载系统(Flexcell公司,美国)培养和加载成骨细胞。将同一代次的成骨细胞以 1×10^5 /孔接种于细胞加力板,分别培养2 d和4 d后,更换至无血清培养液,施加变形率为6%或13.6%的周期性张应变,频率为0.5 Hz,连续加载72 h。根据总培养时间分为5 d组(培养2 d后加力)和7 d组(培养4 d后加力),对照组采用相同培养方式,但不加力。

1.3 流式细胞仪检测成骨细胞凋亡

细胞加力后即刻收获细胞,运用Annexin V-FITC/PI(BD Pharmingen,美国)双染色法及流式细胞技术检测细胞凋亡。将培养7 d对照组的凋亡率作为100%,分别计算其余各组的凋亡比率。

1.4 成骨细胞计数

细胞加力后即刻使用胰酶消化,1 000 r/min离心5 min去除培养液,PBS重悬制备为单细胞悬液,使用血球计数板(上海精密科学仪器有限公司,中国)进行细胞计数,每个样品计数3次,取均值。

1.5 碱性磷酸酶(ALP)活性测试

细胞加力结束即刻收获细胞,使用pNPP法(对硝基苯磷酸二钠,Sigma,美国)测定ALP蛋白含量,BCA蛋白含量测定试剂盒(PIERCE,美国)测定样品总蛋白,两者相除即代表样本ALP的活性。将7 d对照组的ALP活性作为100,分别计算其余各组的ALP水平。

1.6 统计学分析

以上所有实验均重复3次,应用SAS 6.0软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行配对t检验。

2 结果

2.1 周期性张应变作用后早期细胞凋亡分析

在无血清的培养液中,对照组成骨细胞呈现一定的凋亡比率,其中7 d组细胞凋亡率明显比5 d组低($P < 0.05$)。相同周期性张应变作用下,6%的周期性张应变作用72 h后,5组成骨细胞凋亡率为

对照组的 55%, 两者有显著差异 ($P < 0.05$)。而在 13.6% 的周期性张应变作用下, 7 d 组成骨细胞凋亡有显著增加 ($P < 0.01$), 为对照组的 292%。而相同培养时间的成骨细胞, 5 d 组虽然在 13.6% 的周期性张应变作用下其细胞凋亡率较 6% 的周期性张应变作用下有所上升, 但两者差异无统计学意义。而 7 d 组在 13.6% 的周期性张应变作用下, 成骨细胞凋亡率较 6% 的周期性张应变作用下有明显上升 ($P < 0.01$)。

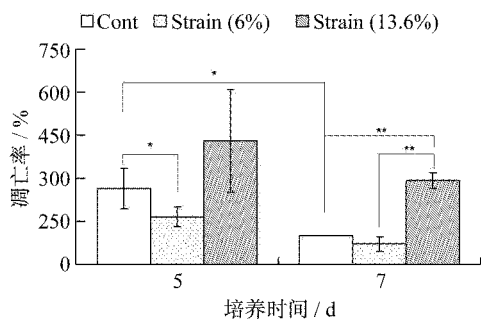


图1 周期性应变力作用下大鼠成骨细胞凋亡的定量分析 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.1 Percentage of the apoptotic rat osteoblast cultures after 72 h of stretch loading (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

2.2 周期性张应变作用后成骨细胞数量变化

相同的周期性张应变作用下, 6% 的张应变使得成骨细胞数有明显增加, 其中, 5 d 组的细胞数为对照组的 134% ($P < 0.01$)。而在 13.6% 的张应变作用下, 成骨细胞数显著减少, 其中, 7 d 组的数量为对照组的 36% ($P < 0.01$)。而相同培养时间下, 5 d 组在 6% 的周期性张应变作用下细胞数明显高于 13.6% 的张应变作用下的细胞数 ($P < 0.01$), 7 d 组也呈现相同趋势, 并且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 周期性张应变作用后成骨细胞 ALP 活性变化

相同的周期性张应变作用下, 6% 的张应变作用 72 h 后, 5 d 组成骨细胞的 ALP 活性较对照组有显著下降 ($P < 0.01$)。在 13.6% 的张应变作用下, 7 d 组成骨细胞的 ALP 活性降幅更加明显, 加力组仅为对照组的 31%。而在相同培养时间, 5 d 组和 7 d 组的成骨细胞在不同张应变作用下, ALP 活性无明显差异。

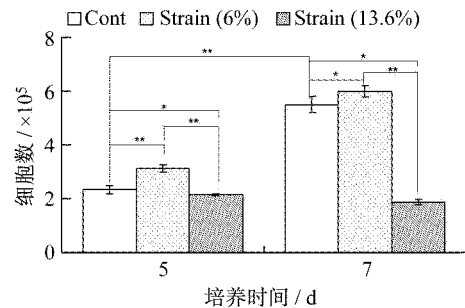


图2 周期性应变力作用下大鼠成骨细胞计数 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.2 Cell number of the rat osteoblast cultures after 72h of stretch loading (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

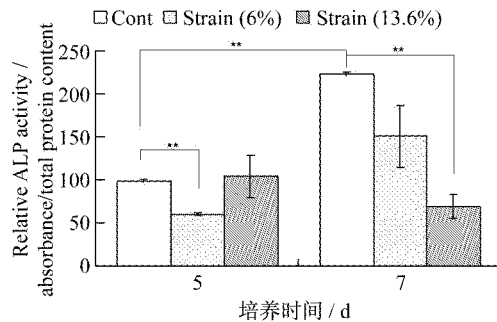


图3 牵张力作用下大鼠成骨细胞 ALP 活性定量分析 (** $P < 0.01$)

Fig.3 Relative ALP activity of the rat osteoblast cultures after 72h of stretch loading (** $P < 0.01$)

3 讨论

在外界机械力刺激下, 成骨细胞的反应是骨组织发生适应性改建的基础^[10]。成骨细胞体外应力加载为研究成骨细胞对机械力的生物学反应提供了可能。然而, 以往国内外学者使用的机械力加载装置大相径庭, 使用的加力方式(如力值大小、加力时间、加力频率等)也各不相同, 导致研究结果不一致^[11-14]。本实验采用 Flexcell 4000™ 细胞应变加载系统, 对成骨细胞施加均匀的等轴牵张力。

在众多的机械力中研究较多的是周期性张应变, 因为越来越多的实验证实周期性张应变是有效促进成骨细胞活性和功能的力学刺激, 有较大的临床研究背景和应用价值。然而, 以往的研究大多注重于观察周期性张应变对成骨细胞增殖或分化的影响^[12-14]。近来的研究表明, 成骨细胞凋亡在机械力诱导的骨再生或骨改建中同样发挥着重要作用^[15]。

Weyts 等^[9]对人胚胎成骨细胞系施加 72 h 的周期性应变力中也发现,细胞凋亡率增加,但认为成骨细胞凋亡与牵张力值无明显相关性。

本实验根据原代成骨细胞的生长曲线,选用对数生长期的开始和结束两个时间点(2 d 和 4 d)的细胞进行力学加载分析。首先以无血清培养的方法诱导成骨细胞凋亡,同时在此基础上施加周期性应变力,从而研究周期性应变力对成骨细胞凋亡的影响。刘大为等^[16]将机械牵张力刺激划分为高(21%)、中(14%)和低(7%)牵张力三个级别,结果发现7%牵张力作用对成骨细胞 OPN 的抑制程度小于14%的牵张力刺激,而高牵张力(21%)作用下弹力膜 12 h 后破裂。根据此划分方法,本实验采用了6%和 13.6%两个张应变参数。同时,以往研究认为,小于 24 h 的力学刺激对成骨细胞凋亡作用不明确^[9],1 Hz 以上的作用频率会增加张应变作用过程中的流体剪切效应,故本研究采用 0.5 Hz 的频率对细胞加载 72 h 的周期性张应变进行研究。

我们的研究结果显示,不同培养时间下,6%的周期性张应变可以抑制成骨细胞的凋亡,而 13.6%的周期性张应变则促进成骨细胞的凋亡(见图 1),周期性张应变可以调控成骨细胞凋亡的发生,其中力值起到重要作用。同时我们分析认为,成骨细胞的凋亡与细胞数量密切相关。无论是 5 d 组还是 7 d 组,6%周期性应变力下成骨细胞数量有明显增加,而 13.6%周期性应变力下细胞数量显著降低(见图 2),说明适宜的周期性应变力可以促进成骨细胞的增殖,而过大的力值会抑制成骨细胞的生长,这与以往报道一致^[9,17,18]。传统的观点认为,细胞数量的变化主要取决于细胞的增殖情况,本实验结果显示,6%周期性张应变下 5 d 组成骨细胞数量增加了 34%,而细胞凋亡率下降了 45%;同样,13.6%周期性张应变下 7 d 组成骨细胞数量下降了 64%,而细胞凋亡率增加了 192%。这表明,细胞凋亡的发生与细胞增殖一样,也是应力作用下成骨细胞数量变化的结果。由此提示,成骨细胞的凋亡在周期性应变力刺激下的骨改建中发挥着重要作用。

本研究还发现,无论是细胞凋亡还是细胞增殖,在相同培养时间下,培养 2 d 的成骨细胞(5 d 组)对 6%的周期性应变力较敏感,而培养 5 d 后的成骨细胞(7 d 组)对 13.6%周期性张应变的较敏感,提示

周期性张应变对成骨细胞的调控除了与力值密切相关外,还与细胞培养时间有关。同时,成骨细胞培养不同时间后其成熟程度不同,Lynch 等^[1]发现,体外培养的成骨细胞在矿化成熟期才出现较多的凋亡细胞。为了评价细胞分化水平对凋亡发生的影响,我们检测了成骨细胞的 ALP 活性。结果显示,在两种力值的周期性张应变刺激下,成骨细胞 ALP 活性均有所下降。在周期性张应变作用下,成骨细胞凋亡的发生与其分化程度无明显相关性,这支持了 Weyts 等^[9]的研究结果。而不同培养时间下成骨细胞对外力反应的差异,可能是由于处在不同发育阶段时,细胞物理特性的不同所造成的。在相同种板密度条件下,不同培养时间的细胞密度有所不同,其弹性模量也不同。Jaasma 等^[19]发现,细胞核大小、细胞面积或细胞形态与成骨细胞的力学性能均不相关,而融合状态成骨细胞的刚性却是非融合状态的 1.5~1.8 倍,由此指出不同发育阶段成骨细胞的细胞骨架、细胞间的连接、细胞与基质间的连接等结构特征,决定了它们力学反应性能的差异。

综上所述,周期性张应变对成骨细胞的凋亡具有影响。合适的周期性张应变会抑制成骨细胞的凋亡,从而促进细胞的生长;但周期性张应变过大将导致成骨细胞凋亡率的增加,抑制成骨细胞的活性。由此提示,成骨细胞的凋亡在应力介导的骨改建中发挥着重要作用。阐明成骨细胞凋亡的生物学机制,将有助于充分认识临床上骨重建的过程和指导骨质疏松、骨折愈合的综合治疗。通过细胞因子、基因诱导等方法调控成骨细胞的凋亡,可能成为将来治疗骨骼疾病和促进骨重建修复的一条有效途径。

参考文献:

- [1] Lynch MP, Capparelli C, Stein JL, *et al.* Apoptosis during bone-like tissue development in vitro [J]. *J Cell Biochem*, 1998,68(1):31-49.
- [2] Gu Q, Zhu HM, Zhang XJ. Apoptosis of rat osteoblasts in process of calcification in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002,23(9):808-812.
- [3] 覃淑云,韦启后,赵善民,等.成年大鼠成骨细胞体外培养及细胞凋亡的观察[J].*解剖学研究*,2003,25(4):285-286.
- [4] Greenwald JA, Mehrara BJ, Spector JA, *et al.* In vivo modulation of FGF biological activity alters cranial suture fate [J]. *Am J Pathol*, 2001,158 (2):441-452.

- [5] Mehrara BJ, Mackool RJ, McCarthy JG, et al. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 and receptor-2 in rat cranial sutures [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1998, 102(6):1805-1817.
- [6] 董玉峰,戴克戎. 细胞凋亡与骨重建 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2000, 7(9):894-895.
- [7] Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, et al. Osteoblast programmed cell death: modulation by growth factors and cytokines [J]. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(5):793-802.
- [8] Pavalko FM, Gerard RL, Ponik SM, et al. Fluid shear stress inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: a role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3 [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 194(2):194-205.
- [9] Weyts FA, Bosmans B, Niesing R, et al. Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation [J]. *Calcif Tissue Int*, 2003, 72(4): 505-512.
- [10] 戴克戎. 力学生物学在骨与软骨研究中的应用 [J]. *中华骨科杂志*, 2006, 6: 429-431.
- [11] 孙晓江, 戴克戎, 汤亭亭. 流体剪切应力对骨细胞分子活动的影响 [J]. *医用生物力学杂志*, 2007, 1: 109-114.
- [12] Visconti LA, Yen EHK, Johnson RB. Effect of strain on bone nodule formation by rat osteogenic cells in vitro [J]. *Archives of Oral Biology*, 2004; 49: 485-492.
- [13] Motokawa M, Kaku M, Tohma Y, et al. Effects of cyclic tensile forces on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *J Dent Res*, 2005, 84(5):422-427.
- [14] Tang L, Lin Z, Li YM. Effects of different magnitudes of mechanical strain on osteoblasts in vitro [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 344:122-128.
- [15] Carinci F, Pezzetti F, Spina AM, et al. An in vitro model for dissecting distraction osteogenesis [J]. *J Craniofac Surg*, 2005, 16(1):71-79.
- [16] 刘大为, 傅民魁, 李盛琳, 章魁华, 吴燕婉. 机械牵张作用对 UMR-106 细胞骨桥蛋白 mRNA 和 TGF- β 1 mRNA 表达的影响 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2000, 35(1) 27-30.
- [17] Sanchez-Esteban J, Wang Y, Cicchiello LA et al. Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282:448-456.
- [18] Beltramo E, Berrone E, Giunti S et al., Effects of mechanical stress and high glucose on pericyte proliferation, apoptosis and contractile phenotype [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(4):989-94.
- [19] Jaasma MJ, Jackson WM, and Keaveny TM. The effects of morphology, confluency, and phenotype on whole-cell mechanical behavior [J]. *Ann Biomed Eng*, 2006; 34(5): 759-68.

《骨科生物力学暨力学生物学》征订启事

《骨科生物力学暨力学生物学》一书由山东科学技术出版社出版发行,该书为《Basic Orthopaedics Biomechanics and Mechano-Biology》的中文版,《Basic Orthopaedics Biomechanics and Mechano-Biology》是《Basic Orthopaedics Biomechanics》的第三版,也是首次被译成中文版引进国内。本书的第一版和第二版分别问世于1991年和1997年,早已成为世界生物力学的圣经。两位主编 Van C. Mow(毛昭亮)和 Rik Huiskes 均为享誉世界的生物力学学者, Van C. Mow 现为美国国家工程院院士、国家工程生物工部部主席、美国国家医学科学院院士、哥伦比亚大学生物医学工程系主任,是世界极负盛名的生物力学创始者和奠基人之一; Rik Huiskes 现为《Journal of Biomechanics》杂志的主编。

本书较前两版内容有了重大的更新。多个章节如“骨折固定和骨折愈合的生物力学”、“软骨和骨组织工程的生物力学原则”和“生物材料”均为全新的章节;而对其他多个章节内容亦进行了大幅修订,以反映骨科生物力学和力学生物学领域的最新研究进展和临床应用。相信本书必将成为广大生物力学学者和骨科临床医生的良师益友!

本书主编:[美] Van C. Mow, [荷] Rik Huiskes

本书主译:汤亭亭,裴国献,李旭,白波

主审:戴克戎,郑诚功

定价:120元/本

该书可以直接通过《医用生物力学》编辑部进行订购,编辑部收到汇款后会将书籍和发票一起邮寄给您。联系方式如下:

电话:021-23271133, 传真:021-63137020

电子信箱:shengwulixue@gmail.com 联系人:于志锋