

流体剪切力影响成骨细胞生物学功能及分化机制的研究

吕群松,程浩,吴兴达,张延芳* (广东医科大学生物医学工程学院,广东湛江 524023)

摘要:目的 探讨流体剪切力(FSS)作用下成骨细胞生物学功能及分化机制。方法 4组大鼠成骨细胞分别施加0、30、60和120 min FSS(12 dyn/cm^2)刺激,免疫荧光染色后观察FSS刺激成骨细胞不同时间后的细胞骨架变化,采用Image J软件计算细胞分形维数,比较细胞内部复杂程度;使用 Ca^{2+} 试剂盒检测钙响应,碱性磷酸酶(ALP)试剂盒检测ALP活性;Real-time PCR检测FSS刺激不同时间后成骨细胞的BMP2、Runx2、Osterix(Osx)基因表达;Western blot检测FSS刺激不同时间后成骨细胞的BMP2、Runx2、Osx蛋白表达水平,采用Quantity one进行光密度分析。结果 12 dyn/cm^2 FSS刺激成骨细胞可引起细胞骨架形态、微丝丰富度及细胞复杂程度的变化,以60 min最明显。与0 min组相比,细胞 Ca^{2+} 浓度在FSS刺激30 min后明显升高,延续至60 min为高峰平台期($P<0.05$),120 min后 Ca^{2+} 浓度回落;60 min组的BMP2、Runx2、Osx基因和蛋白表达水平均明显上调($P<0.01$);ALP活性升高,在刺激60 min时最为明显($P<0.05$)。结论 12 dyn/cm^2 FSS刺激能改善成骨细胞生物学功能,促进BMP2、Runx2、Osx基因及其蛋白表达上调;能通过改变成骨细胞骨架促进 Ca^{2+} 浓度升高,进而激活与分化高度相关的BMP2-Runx2-Osx信号通路,提高成骨细胞分化标志物ALP活性。

关键词:成骨细胞;流体剪切力;细胞骨架;成骨分化

中图分类号:Q 786

文献标志码:A

文章编号:2096-3610(2024)02-0135-06

Study on the influences of fluid shear stress on the biological functions and differentiation mechanism of osteoblast

LV Qun-song, CHENG Hao, WU Xing-da, ZHANG Yan-fang* (Guangdong Medical University, School of Biomedical Engineering, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To investigate the biological function and differentiation mechanism of osteoblast under fluid shear force (FSS). Methods Four groups of OB were subjected to FSS stimulation for 0, 30, 60 and 120 min, respectively. The cytoskeleton changes of OB after FSS stimulation for different time were observed by using immunofluorescence staining. The fractal dimension of the cells was calculated by Image J software to compare the intracellular complexity. Ca^{2+} response was detected by related kit and changes of cell cycle were detected by flow cytometry. ALP activity was detected by Alkaline phosphatase (AKP/ALP) test kits. The expressions of BMP2, Runx2 and Osterix (Osx) were determined by reverse transcription-PCR, real time PCR and Western blot after different time of FSS stimulation. Quantity one was applied for optical density analysis. Results Osteoblasts stimulated by 12 dyn/cm^2 FSS can induce changes in cytoskeleton morphology, microfilament richness and cell complexity, the most obvious at 60 min. Compared with the 0 min group, the cellular Ca^{2+} concentration increased significantly after 30 min of FSS stimulation, and continued to reach the peak plateau stage at 60 min ($P<0.05$), and the Ca^{2+} concentration decreased after 120 min. The expression levels of BMP2, Runx2 and Osx genes and proteins in 60 min group were significantly up-regulated ($P<0.01$). The activity of ALP was increased and the most obvious at 60 min of stimulation ($P<0.05$). Conclusions FSS stimulation with 12 dyn/cm^2 can improve the cellular biological functions of OB, promote the expressions of BMP2, Runx2 and Osx in mRNA and protein levels. FSS stimulation promotes the increase of Ca^{2+} concentration by changing the OB skeleton, and then activates the BMP2-Runx2-Osx signaling pathway, which is highly related to differentiation, improve the activity of ALP, a marker of OB differentiation.

Key words: osteoblast; fluid shear stress; cytoskeleton; osteoblast differentiation

收稿日期:2023-12-01

基金项目:东莞市医疗卫生重点课题(2012105102006),东莞市医疗卫生一般课题(201210515200001)

作者简介:吕群松(1979-),男,学士,实验师, E-mail:lvqunsong@gdmu.edu.cn

通信作者:张延芳(1965-),女,博士,教授, E-mail:123334553@qq.com

随着中国人口老龄化加剧,骨质疏松发病率逐年增加。研究发现,骨结构的完整性与骨量的保持是在动态骨重建过程中进行的,在此过程中机械应力起着非常重要的作用^[1-2]。而作用于骨骼细胞上的各种机械应力中,骨骼基质形变所引起的细胞外液体流动形成的流体剪切力(FSS)是骨骼细胞所感受到的主要应力^[3-7]。当层流FSS作用于成骨细胞时, Ca^{2+} 通道与细胞的增殖密切相关^[8-10]。FSS能够迅速促进成骨细胞内 Ca^{2+} 和NO的合成以及苏氨酸激酶(Akt)的激活,而Akt蛋白激酶的激活能够刺激成骨细胞的增殖与存活^[11]。骨形态蛋白(BMP)信号转导通路是普遍存在于多细胞真核生物中的一条重要途径,它能促进成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)基因表达、促进成骨分化及快速成骨反应^[12]。Runt-related gene2(Runx2)/Core-binding factor 1(Cbfa1)是成骨细胞分化和骨形成的重要转录因子,可在前成骨细胞、成骨细胞、前软骨细胞和前肥大软骨细胞中表达^[13]。Osterix(Osx)也称为Sp7,是一种具有锌指结构的成骨细胞特异性转录因子,对成骨细胞分化至关重要^[14]。BMP信号转导通路可通过经典BMP-Samd5/Samd8信号通路或非经典BMP-丝裂原活化激酶(MAPK)信号通路激活Osx转录,从而促进成骨细胞分化^[15-16]。本实验通过研究FSS作用下成骨细胞细胞骨架、 Ca^{2+} 响应、分化标志物ALP活性、与成骨细胞分化密切相关的基因及其蛋白表达的变化,阐明FSS对成骨细胞生物学功能的影响、成骨细胞分化的作用机制及BMP2-Runx2-Osx信号通路的关系,为力学刺激防治骨质疏松提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料与仪器

DMEM培养基(美国Gibco公司),新生牛血清(杭州四季青),0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司)等。超净工作台,PCR仪(德国Eppendorf公司),TS100双目倒置式生物显微镜,细胞培养箱,平行板流室装置(四川大学华西中心生物医学工程研究室),荧光显微镜,酶标仪,分光光度计等。

1.2 成骨细胞培养

取新生大鼠(72 h内)14只,分离出颅盖骨,经过胶原酶消化法处理后获得细胞悬液,将细胞悬液接种于培养瓶中,置于5% CO_2 , 37℃细胞培养箱中培养,待细胞单层覆盖培养瓶瓶底面积达75%以上时传代。将第3代成骨细胞消化后制成细胞悬液,调整细胞密度为105个/mL,定量接种到载玻片上,吹打均匀的细

胞悬液铺满整个载玻片且不渗出玻片。静置30 min后再在培养皿中加入完全培养液漫过玻片,培养大约2 d细胞爬满玻片,获得实验用成骨细胞。

1.3 爬片细胞FSS加载与分组

FSS加载系统由蠕动泵、硅胶导管、储液瓶、平行平板流动腔组成。在超净工作台中取出爬满细胞的载玻片,细胞面向上嵌入流体小室凹槽中,使用电动移液器在储液瓶中加入60 mL培养液。整个装置组装完成后,启动蠕动泵提供12 dyn/cm²的FSS,运用免疫荧光技术观察。根据受力时间将细胞分为4组:0、30、60和120 min。

1.4 实验与检测

1.4.1 免疫荧光实验 加载结束取出载玻片经过PBS清洗,多聚甲醛固定,聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)漂洗,罗丹明标记的鬼笔环肽(Rhodamine-phalloidin)对细胞骨架着色,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)对细胞核染色,封片,采用Image J软件分析FSS刺激0、30、60、120 min后的成骨细胞免疫荧光图像,从拍摄的细胞荧光图像中分割出单个细胞的图像,每组选择20个细胞进行检测。

1.4.2 钙含量测定 FSS加载完毕后,破碎细胞,配置空白管、标准管、测定管和定值管,在4支试管中都加入MTB试剂(1.0 mL)和碱性溶液(2.0 mL),同时在空白管中加入去离子水,在标准管中加入2.5 mmol/L钙标准液,在测定管中加入样本,在定值管中加入定值血清,混匀,静置5 min后,空白管调零,通过酶标仪(设波长610 nm,1 cm光径)测定各管吸光度。

1.4.3 RT-PCR 引物设计:根据BMP2、Runx2、Osx基因序列,运用PrimeBatch 3软件设计引物,见表1,该引物由Takara公司合成。FSS加载完毕后经过细胞裂解处理,RNA提取与纯化等一系列操作得到样品RNA溶液,于NanoDrop分光光度计测定260和280 nm的吸光度,得到RNA浓度及质量,再使用PCR仪进行RT-PCR实验。

1.4.4 Western blot FSS加载完毕后经过细胞蛋白质的提取,蛋白质浓度测定(BCA法),SDS-PAGE电泳,膜转印,孵育抗体,二抗孵育结束后发光检测,使用Quantity one对蛋白条带进行灰度分析。

1.4.5 ALP活性测定 FSS加载完毕后,用细胞刮将载玻片上的细胞刮下,加入1 mL PBS轻轻吹打,将液体转移至2 mL EP管中,以1 500 r/min转速离心5 min,弃上清,留沉淀细胞待用。破碎细胞:在细胞沉淀中加入一定量(106的细胞一般加0.3~0.5 mL)

的PBS缓冲液,保证超声探头在液面以下,每3~5 s超声1次,间隔4次(每次间隔约30 s)。按表2所示的ALP测定实验操作表进行操作。轻轻振摇孔板摇匀,波长520 nm,酶标仪测定各孔吸光度。

表1 引物的详细信息表

基因名称	引物名称	引物序列(5' to 3')
β-actin	上游引物	TGCTGACAGGATGCAGAAGG
	下游引物	GAGCCACCAATCCACACAGA
BMP2	上游引物	ACCGTGCTCAGCTTCCATCAC
	下游引物	CTATTTCCCAAAGCTTCCTGCATTT
Runx2	上游引物	CATGGCCGGAATGATGAG
	下游引物	TGTGAAGACCGTTATGGTCAAAGTG
Osx	上游引物	GGATGGCGTCCTCTCTGCTT
	下游引物	TGTATGGCTTCTTTGTGCCTCCT

表2 ALP测定实验操作表

	加样孔	测定孔	标准孔	空白孔
试剂				
待测样本/μL	30	—	—	—
0.02 g/L 酚标准应用液/μL	—	30	—	—
双蒸水/μL	—	—	30	—
缓冲液/μL	50	50	50	50
基质液/μL	50	50	50	50
充分混匀 37℃水浴 15 min				
显色剂/μL	150	150	150	150

1.5 统计学处理

数据采用SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析及LSD法检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光显微镜下成骨细胞骨架

细胞骨架主要有微管、微丝、中间丝3种类型, 分别由不同的蛋白单体组装而成。各组成骨细胞的荧光显微镜照片如图1所示, 红色部分是Rhodamine-phalloidin 标记的肌动蛋白丝(F-actin), 主要存在于细胞膜和胞质中; 蓝色荧光是DAPI染料结合染色体DNA发出的, 标记的是细胞核。

在荧光显微镜下观察, 没有加力的细胞为梭型或多角形, 有突起, 为单核细胞。微丝呈束状或放射状聚集在细胞的突起和胞质内, 见图1的0 min组。当加载12 dyn/cm² FSS于成骨细胞30 min时, 微丝呈长梭形且沿着力方向45°排列, 被不同程度的拉伸延长。成骨细胞由于受到力的作用其微丝排列紧密, 沿着一定的方向分布, 荧光较强, 见图1的30 min组。施加FSS 60 min后, 成骨细胞被进一步拉伸, 其排列与受力方向趋

向一致, 成骨细胞内微丝明显增厚且丰富, 胞质F-actin分布明显增多, 荧光进一步增强, 见图1的60 min组。当施加FSS作用时间达120 min时, 可以看出成骨细胞密度进一步降低, 细胞内分散的深染小颗粒增多, 细胞染色质固缩, 提示已出现细胞损伤, 脱落细胞逐渐增多, 见图1的120 min组。

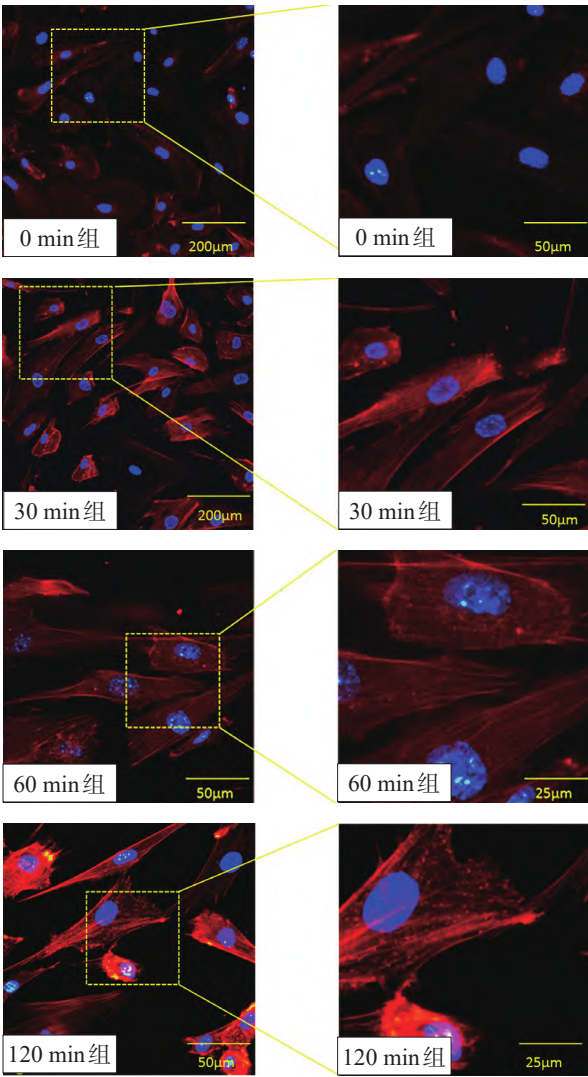


图1 FSS对成骨细胞骨架的影响

2.2 Image J软件分析细胞分形维数情况

从各组成骨细胞的荧光图像中分割出单个细胞的图像, 用Image J软件计算细胞分形维数。每组成骨细胞选择20个细胞进行分析, 统计结果如图2所示, 0 min组细胞的分形维数D为1.66, 各刺激组的细胞分形维数分别为: 30 min组D=1.76, 60 min组D=1.87, 120 min组D=1.71。30 min组相对0 min组D值升高, 60 min组到达峰值, 120 min组相对峰值有所下降, 但仍高于0 min组, 表明FSS可以使细胞分形维数上升, 复杂度升高。

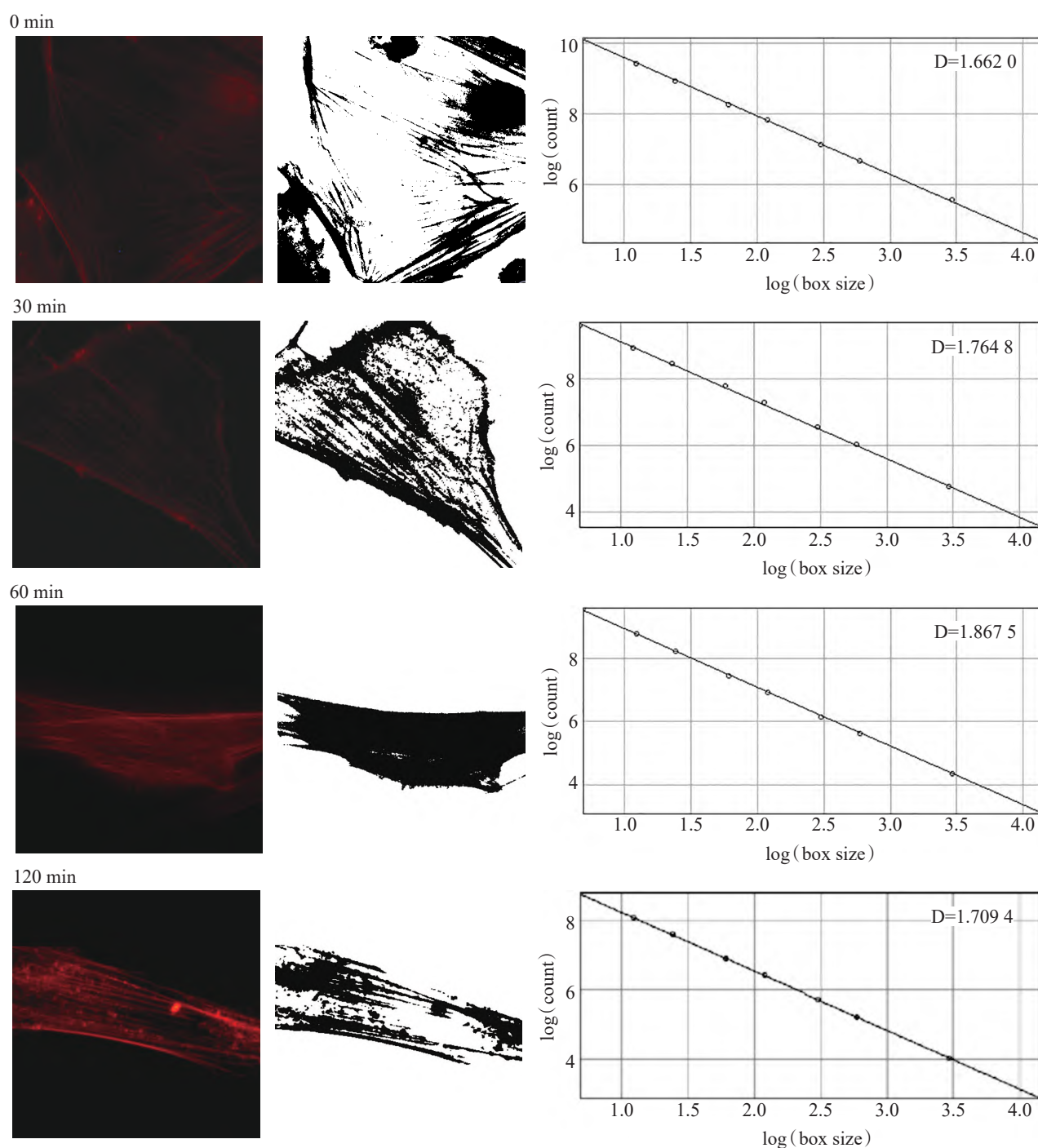


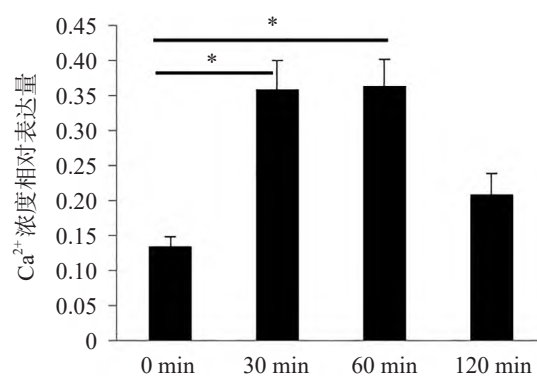
图2 各组细胞分形维数

2.3 FSS刺激下细胞 Ca^{2+} 浓度的变化

图3所示为12 dyn/cm² FSS刺激下细胞 Ca^{2+} 浓度的变化情况。与0 min组相比,刺激30 min后 Ca^{2+} 浓度明显升高,延续至60 min形成 Ca^{2+} 浓度高峰平台期($P<0.05$),但刺激120 min后 Ca^{2+} 浓度回落。

2.4 FSS对BMP2、Runx2、Osx基因表达的影响

加载FSS不同时间后成骨细胞的BMP2、Runx2和Osx基因表达量如图4所示。相比于0 min组, FSS加载30 min后BMP2和Runx2基因的相对表达量显著增加($P<0.05$);加载60 min后BMP2、Runx2、Osx

图3 FSS刺激下细胞 Ca^{2+} 浓度的变化(* $P<0.05$)

基因相对表达进一步增加 ($P<0.01$ 或 0.05); 加载 120 min 后 3 种基因的相对表达量均下降, 其中 BMP2 的相对表达量仍高于 0 min 组 ($P<0.05$)。

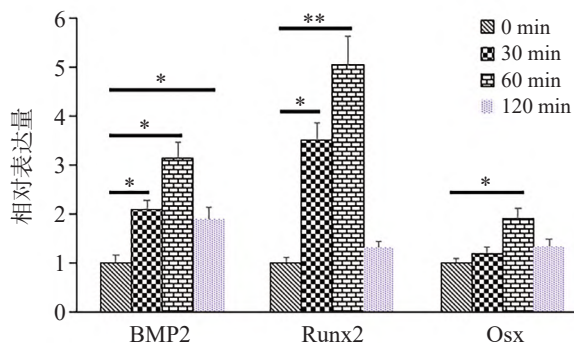
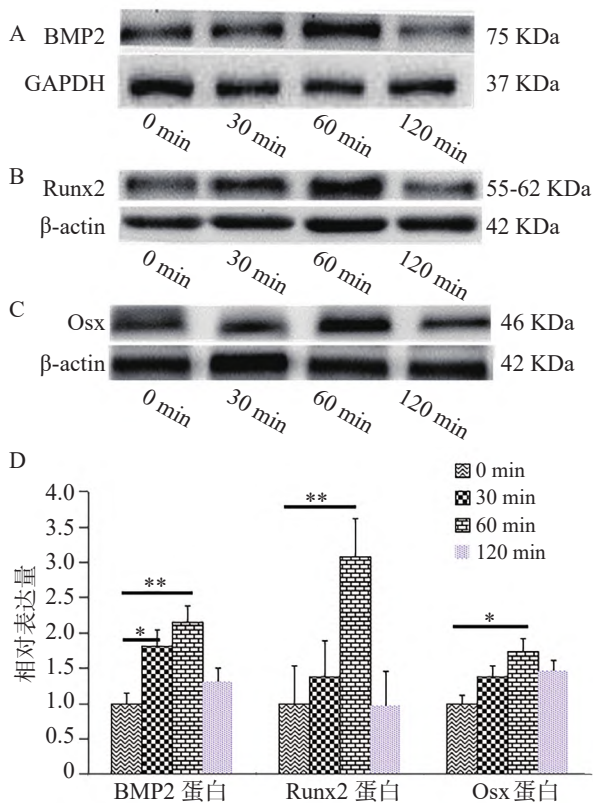


图4 FSS对BMP2、Runx2、Osx基因表达的影响
(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

2.5 FSS对BMP2、Runx2和Osx蛋白相对表达的影响

加载FSS不同时间后, Western blot 检测 BMP2、Runx2 和 Osx 蛋白的表达结果见图 5A、B、C。Quantity one 对 3 种蛋白条带进行相对光密度分析的结果见图 5D。与 0 min 组比较, 30 min 组的 BMP2 蛋白相对表达



A、B、C: Western blot 鉴定; D: Quantity one 分析

图5 FSS对BMP2、Runx2和Osx蛋白相对表达的影响
(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

升高 ($P<0.05$), Runx2 和 Osx 蛋白相对表达量虽有所升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 60 min 组 BMP2、Runx2、Osx 蛋白的相对表达量均明显升高 ($P<0.01$ 或 0.05); 120 min 组 3 种蛋白相对表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.6 FSS作用下ALP活性的变化

当 12 dyn/cm^2 的流体剪应力对成骨细胞分别作用 30、60 和 120 min 后, ALP 活性变化如图 6 所示。与 0 min 组相比, 60 min 组 ALP 活性出现高峰期 ($P<0.05$), 而 30、120 min 组 ALP 活性虽有所升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

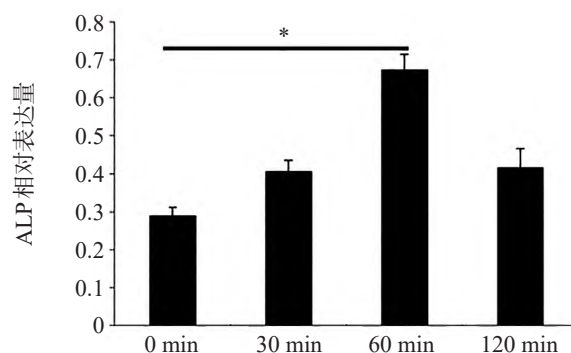


图6 FSS作用下ALP活性的变化 (* $P<0.05$)

3 讨论

本实验使用 2D 灌注式生物反应器由平行平板流动腔与蠕动泵组成。通过调节蠕动泵转速控制培养液流速提供应力强度为 12 dyn/cm^2 的 FSS 连续作用原代成骨细胞, 用 Rhodamine-phalloidin 标记细胞的 F-actin, DAPI 标记细胞核, 利用免疫荧光显微镜技术分析形态变化, 利用 Image J 软件测算细胞分形维数, 定量比较成骨细胞的复杂程度与细胞形态的改变。实验结果提示: 细胞骨架是维持细胞结构和功能的重要物质, 在细胞受到外力刺激时, 细胞微丝结构会发生重排以适应新的环境, 维持细胞的正常形态和功能。细胞骨架是力学信号传导通路中非常重要的一环, 参与细胞生理病理学功能^[17]。研究力学作用下细胞骨架的变化, 特别是微丝的聚合与解聚过程及形态变化有助于信号转导机制的研究, 进而理解细胞生命活动的本质, 揭示临床疾病发病机制, 寻求疾病防治新途径^[18]。

本实验使用 12 dyn/cm^2 FSS 分别刺激成骨细胞 0、30、60、120 min 4 组细胞。结果发现刺激成骨细胞 30 min 即可引起 Ca^{2+} 浓度的显著变化, 提示力学刺激可以调控成骨细胞的基质分泌行为, 从而影响骨的矿化过程。刺激成骨细胞可以快速引起 Ca^{2+} 通道的变化,

钙响应信号不但可以调控成骨细胞的增殖与分化,钙在相邻细胞间的传递也是细胞间通讯和细胞群体行为的重要调控机制^[19]。

利用 Western blotting 技术观察 BMP2、Runx2、Osx 与成骨细胞分化有关的蛋白表达变化, RT-PCR 技术观察 BMP2、Runx2、Osx 相对表达量, 结果表明 12 dyn/cm² FSS 刺激 60 min 可以引起上述 3 种蛋白及基因表达的增加, 在 30 和 120 min 组也可发现上述 3 种蛋白及基因表达的增加但效果不明显, 表明适宜的 FSS 刺激可以有效促进成骨细胞的分化。结合以上实验结果, 我们可以推断出 FSS 刺激可以激活 BMP2-Runx2-Osx 信号通路, 从而有效促进成骨细胞分化。ALP 是在碱性环境下水解多种磷酸酯并具有转磷酸基作用的一组同工酶。骨型 ALP 是成骨细胞产生的一种细胞外酶, 通过水解有机磷酸酯, 使局部 PO₄³⁻ 浓度升高, 促进磷酸钙沉积于胶原纤维表面, 因此 ALP 活性的升高可作为成骨细胞分化成熟的一个典型指标。作为成骨细胞分化的标志, ALP 反映成骨细胞形成骨基质、合成 I 型胶原的能力。本实验使用 12 dyn/cm² FSS 对成骨细胞分别作用 30、60 和 120 min, 30 min 组即表现出 ALP 活性升高, 而当 FSS 作用 60 min 时, ALP 活性出现高峰期, 与 0 min 组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

综上所述, 12 dyn/cm² 的 FSS 刺激能改善成骨细胞的细胞生物学功能, 促进 BMP2、Runx2、Osx 基因及其蛋白表达上调, 并以 60 min 刺激效果最为明显。12 dyn/cm² FSS 可能通过改变成骨细胞骨架, 促进 Ca²⁺ 浓度升高, 进而激活与分化高度相关的 BMP2-Runx2-Osx 信号通路, 提高成骨细胞分化标志物 ALP 的活性, 最终促进成骨。本研究为骨质疏松的防治提供了新思路。

参考文献:

- [1] 王常德, 孜里哈·买赛尔, 康鹏德, 等. 细胞骨架在流体剪切力诱导成骨细胞 COX-2 基因和蛋白表达中的作用[J]. 中国医学物理学杂志, 2017, 34(7): 743-747.
- [2] 雷乐, 张玲莉, 赵一龙, 等. 机械应力对破骨细胞影响的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(8): 1113-1117.
- [3] GURKAN U A, AKKUS O. The mechanical environment of bone marrow: A review [J]. Ann Biomed Eng, 2008, 36(12): 1978-1991.
- [4] 邵敏锋, 徐亚娟, 向映辉, 等. 抑制细胞骨架改建对流体剪切力作用下成骨细胞增殖与分化影响研究[J]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2011, 5(1): 44-51.
- [5] 谢勉姣, 周鹏, 段晶, 等. 流体剪切力促进大鼠髌突软骨细胞凋亡的实验研究[J]. 口腔颌面外科杂志, 2021, 31(2): 69-74.
- [6] 杜田明, 牛旭峰, 樊瑜波. 流体剪切力对骨基质纤维内分级矿化的影响[J]. 医用生物力学, 2021, 36(S01): 152.
- [7] 李晓婷. 流体剪切力作用下间隙连接蛋白 Cx43 在骨改建中的机制初探[J]. 四川医学, 2023, 44(1): 23-27.
- [8] JIA X, YANG J, SONG W, et al. Involvement of large conductance Ca(2+)-activated K (+) channel in laminar shear stress-induced inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation [J]. Pflugers Arch, 2013, 465(2): 221-232.
- [9] 移穷, 刘众成, 刘雪宁, 等. 流体剪切力通过下调 p21 促进 MC3T3-E1 成骨细胞增殖[J]. 医用生物力学, 2023, 38(4): 663-669, 682.
- [10] 裴童, 苏冠月, 李甜甜, 等. 流体剪切力调节的 AnnexinA6 通过自噬促进成骨细胞矿化[J]. 医用生物力学, 2021, 36(S1): 28.
- [11] RANGASWAMI H, SCHWAPPACHER R, TRAN T, et al. Protein kinase G and focal adhesion kinase converge on Src/Akt/beta-catenin signaling module in osteoblast mechanotransduction [J]. J Biol Chem, 2012, 287(25): 21509-21519.
- [12] ZHANG M, YAN Y, LIM Y B, et al. BMP-2 modulates beta-catenin signaling through stimulation of Lrp5 expression and inhibition of beta-TrCP expression in osteoblasts [J]. J Cell Biochem, 2009, 108(4): 896-905.
- [13] 滕元君, 赵良功, 陈少龙, 等. ERK5 信号通路介导流体剪切力对成骨细胞 BMP2、BMP7 mRNA 的表达影响[J]. 中国医学物理学杂志, 2014, 31(1): 4691-4693, 4698.
- [14] LIU Q, LI M, WANG S, et al. Recent advances of osterix transcription factor in osteoblast differentiation and bone formation [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 601224.
- [15] LEONG W F, ZHOU T, LIM G L, et al. Protein palmitoylation regulates osteoblast differentiation through BMP-induced osterix expression [J]. PLoS One, 2009, 4(1): e4135.
- [16] 李成琳, 陈书兰, 任伟伟. 骨形态发生蛋白 2/Osterix 信号通路调控的前成骨细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24): 3581-3587.
- [17] 姚依村, 梁伟国, 叶冬平. 细胞骨架与力学信号传导[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(7): 1109-1114.
- [18] 闫亮, 姜金, 张小辉, 等. 不同加载时间流体剪切力对成骨细胞中 piezo1 机械敏感型蛋白表达的影响[J]. 中国医学物理学杂志, 2018, 35(7): 839-842.
- [19] 丁宁, 姜金, 杨全增, 等. 流体剪切力对破骨细胞的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(9): 1178-1183.

(责任编辑: 李 晓)