

· 实验研究 ·

β -连环蛋白介导流体剪切力对成骨细胞增殖影响的实验研究*

王海明 夏亚一** 何万庆 汪 静

(兰州大学第二医院骨科研究所, 兰州 730030)

【摘要】 目的 探讨 β -连环蛋白(β -catenin)和细胞周期素 D1(cyclin D1)在流体剪切力促进小鼠胚胎成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞增殖过程中的作用。 方法 通过流体小室系统对体外培养成骨细胞爬片施加不同强度及时间梯度的流体剪切力,应用免疫荧光双标记法检测不同大小及时间流体剪切力作用下体外培养 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin 及 cyclin D1 的表达;利用流式细胞技术检测增殖指数,分析 β -catenin 介导下流体剪切力对 MC3T3-E1 细胞 $G_1 \rightarrow S$ 期转化的影响。 结果 中等大小的流体剪切力(12 dyn/cm^2)作用下 MC3T3-E1 细胞中 β -catenin 及 cyclin D1 的表达较静置组、低应力组(6 dyn/cm^2)和高应力组(18 dyn/cm^2)明显增多($F=4.26, P=0.022$; $F=6.59, P=0.004$),增殖指数也显著升高($F=5.84, P=0.037$),且 β -catenin 与 cyclin D1 的表达呈正相关关系($r=0.65, P<0.05$)。 结论 流体剪切力通过引起 β -catenin 在胞浆内积聚,进而核转位发挥转录因子的作用,引起目标蛋白 cyclin D1 表达增加,在 $G_1 \rightarrow S$ 期转化过程中发挥了重要作用。中等大小的流体剪切力有显著促进细胞增殖作用。

【关键词】 流体剪切应力; β -连环蛋白; cyclin D1; 免疫荧光; 增殖指数

中图分类号:R329.2*8

文献标识:A

文章编号:1009-6604(2010)05-0435-04

Influence of Fluid Shear Stress on β -catenin-mediated Osteoblast Proliferation Wang Haiming, Xia Yayi, He Wanqing, et al. Research Institute of Orthopaedics, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China

【Abstract】 **Objective** To explore the roles of β -catenin and cyclin D1 play in fluid shear stress (FSS) induced proliferation of mouse pre-osteoblast cell line (MC3T3-E1). **Methods** We used double-label immunofluorescence method to detect the expression of β -catenin and cyclin D1 in MC3Ts-E1 under different intensities of FSS (6, 12, and 18 dyn/cm^2 respectively) at different time points (15, 30, and 60 minutes). The ability of proliferation of these cells (from G_1 to S stage) was studied by calculating proliferation index (PI) determined by flow cytometry. **Results** The expressions of β -catenin and cyclin D1 induced by Fss at 12 dyn/cm^2 were significantly higher than those at 6 and 18 dyn/cm^2 ($F=4.26, P=0.022$; $F=6.59, P=0.004$). Meanwhile, the PI in 12 dyn/cm^2 group increased significantly ($F=5.84, P=0.037$), showing a positive correlation with the expressions of β -catenin and cyclin D1 ($r=0.65, P<0.05$). **Conclusions** FSS induces β -catenin accumulation in cytoplasm, which then translocates into the nucleus, playing a role as transcription factor to increase the expression of targeted protein cyclin D1. β -catenin cooperated with cyclin D1 plays an important role in $G_1 \rightarrow S$ transition in MC3T3-E1 proliferation. Moderate FSS is an optimization that can promote proliferation of MC3T3-E1.

【Key Words】 Fluid shear stress; β -catenin; Cyclin D; Immunofluorescence; Proliferation Index

流体剪切应力作为影响骨组织代谢及调节骨细胞功能与形态的重要因素,近年来成为研究热点。临床上,关节部位手术后的局部制动及长期卧床缺少应力刺激时,骨基质的合成及骨的形成减少,而经过康复期合适的应力刺激后,将促进骨的形成,抑制骨的吸收。最近研究表明^[1],在骨细胞应力信号传导过程、目的基因的表达调控等方面,wnt 信号通路

发挥了重要的作用。同时,wnt 信号传导通路在调节成骨活性及骨细胞功能方面的重要性近年来也逐渐被人们认识。研究表明,在流体剪切应力促进成骨细胞增殖的相关下游分子中,细胞周期素 D1(cyclin D1)是早期表达的蛋白^[2],而 cyclin D1 又是调控细胞周期的重要因子,是增殖周期的调控点 $G_1 \rightarrow S$ 期转化的重要正性调控因子。本实验通过自

* 基金项目:甘肃省自然科学基金(096RJZA068)

** 通讯作者,E-mail:xiayayi@yahoo.com.cn

制的流体小室系统对体外培养的单层 MC3T3-E1 细胞爬片施加精确可控的流体剪切力,通过低、中、高 3 个水平的应力,分别在 15、30、60 min 后通过免疫荧光双标记法检测应力作用下 β -连环蛋白 (β -catenin) 和 cyclin D1 的表达,应用流式细胞技术检测相应细胞的增殖指数,通过这种量-效关系阐明 β -catenin 在流体剪切应力促进细胞增殖中的作用,并寻找最佳的促进细胞增殖的应力大小及作用时间。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12 培养液 (Gibico, USA), 胎牛血清 (兰州尚宝), 青霉素/链霉素双抗 (华北制药), 0.25% 胰酶 (Gibico, USA), II 型胶原酶 (Sigma, USA), I 型鼠尾胶原 (生友生物), 鼠源性非磷酸化的抗 β -catenin 多克隆抗体 (Upstate, USA), 兔抗鼠 cyclin D1 抗体 (Abzoom, USA), 异硫氰荧光素 (FITC) 标记山羊抗小鼠二抗 (中杉金桥), 罗丹明 (RBITC) 标记山羊抗兔二抗 (中杉金桥), CO₂ 细胞培养箱 (上海力康), 荧光显微镜 (Olympus, 日本), 图像分析测量软件 Image-pro-plus6.0 (Media cybernetics 公司, 美国)。

流体小室系统由两块有机玻璃平板和一块胶垫构成。精密蠕动泵购自上海金达生化仪器公司。灌流液黏滞系数由中石油兰州石油化工分公司检测。流体剪切力 $\tau = 6\eta Q/H^2W$ [η : 灌流液的黏滞系数 (dyn/cm^2); Q : 单位时间内流经流室的灌流流量 (cm^3/s); H : 流室高度 (cm); W : 流室宽度 (cm)]。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及爬片 小鼠胚胎成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞用 DMEM/F12 培养液培养, 内含 10% 胎牛血清, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 U/ml。细胞每 3 天换液 1 次, 细胞达 100% 融合时, 用 0.25% 胰酶 - 0.1% II 型胶原酶消化, 按 5×10^5 个细胞接种至 25 cm^2 培养瓶中传代培养。

用 10 ml 0.006 mol/L 乙酸溶解 200 μl 鼠尾胶原配置成包被液, 在自制的泡槽中包被 20 mm \times 50 mm 盖玻片约 30 min, 捞出玻片在紫外灯下照射 1 h 晾干, 用 PBS 清洗残留的包被液, 然后紫外线灯下照射 3 h, 取两张制备好的盖玻片置于直径 100 mm 的培养皿内, 将消化好的细胞按 1×10^6 个细胞均匀接种至盖玻片上, 置于 CO₂ 培养箱, 4 h 后待细胞完全贴壁加入含血清的完全培养基继续培养。取第 10 代状态相同的 90% 融合细胞爬片进行相关实验。

1.2.2 细胞爬片加力 将培养有单层成骨细胞的爬片嵌入流室底部的凹槽中, 密封流室后, 由精密蠕

动泵提供 $\tau = 6、12、18 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ 的流体剪切力, 不同大小的应力情况下, 分别施加 15、30、60 min 的应力。储液瓶中装有 25 ml 的灌流液 (无血清的 DMEM/F12), 整个流室系统及加力过程都保持在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温, 循环装置连接 5% CO₂ 以维持灌流液 pH 在 7.2 ~ 7.4 之间。

1.2.3 免疫荧光双标记 按照上述加力大小及加力时间连同空白对照共 10 个水平, 加力组每个水平进行一次加力, 每次一张爬片, 加力完毕后用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% 聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100) 透化去交联 3 min, 其间用 PBS 清洗 3 次, 每次 10 min, 2% 牛血清白蛋白封闭非特异性位点 30 min, PBS 清洗一次, 约 5 min。每张爬片加入 30 μl 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 稀释的非磷酸化的 β -catenin 多克隆抗体 (1:100), 30 μl 2% BSA 稀释的 cyclin D1 抗体 (1:100), 放入湿盒, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 避光下加入 30 μl 2% BSA 稀释的 FITC 标记山羊抗小鼠二抗 (1:100), 30 μl 2% BSA 稀释的 RBITC 标记山羊抗兔二抗 (1:150), 放入湿盒, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。用 PBS 清洗 3 次, 每次 10 min。95% 甘油封片。荧光显微镜下分别在 495 nm, 527 nm 激发光下观察同一视野中 β -catenin 和 cyclin D1 的表达情况并摄像。上述实验重复 3 次。每个水平每张照片选取 3 个不同的视野, 每个视野 50 个细胞, 用 Image-pro-plus 图像分析软件分析各个水平蛋白表达的积分光密度值 (IOD)。

1.2.4 流式细胞仪测增殖指数 按照上述加力大小及加力时间连同空白对照共 10 个水平。加力组每个水平进行 3 次加力, 每次一张爬片, 加力完毕后每个水平的三张爬片置于含 DMEM/F12 培养液 (含 10% FBS) 的培养皿内继续培养。24 h 后不同的实验组终止培养后, 消化, 离心收集细胞, 加入 PBS 洗涤细胞 2 次, 70% 乙醇固定过夜, PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙啶 0.5 ml, RNA 酶 0.5 ml, 染色 20 min, 上机检测, 测出各组细胞 DNA 含量分布及细胞周期所占百分比, 按下述公式计算增殖指数 (proliferation index, PI, %), $\text{PI} = [(S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)] \times 100\%$, 以衡量细胞的分裂增殖能力。上述实验内容每个水平进行 9 次重复试验。

1.2.5 统计学方法 应用 SPSS10.0 统计软件进行分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对不同应力大小及不同时间下 β -catenin 和 cyclin D1 在细胞内的表达的差异性采用完全随机设计资料的方差分析, 进一步两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ (双侧) 为差异有统计学意义。相关性分析用 Pearson 相关进行分析, 运

用 t 检验进行假设检验, $P < 0.05$ 为相关性有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光结果

本实验结果表明,持续 60 min 的 6 dyn/cm^2 的应力可引起 β -catenin 及 cyclin D1 的表达增加。12 dyn/cm^2 的应力在 15 min 时即可出现 β -catenin 的

表达,直至 60 min 达到峰值,18 dyn/cm^2 的应力引起 β -catenin 表达的下降,60 min 时表达最低。运用 cyclin D1 抗体检测与增殖有关的周期蛋白的表达,统计分析各个水平两种蛋白的表达有差异性。不同应力大小及不同时间下 β -catenin 和 cyclin D1 在细胞内的表达情况通过积分光密度值 (IOD) 来分析,IOD 值数据见表 1。

表 1 不同大小应力作用不同时间下 β -catenin 和 cyclin D1 的光密度值 (IOD) 以及增殖指数 (PI) ($n=9, \bar{x} \pm s$)

加力水平	β -catenin 积分光密度值	cyclin D1 积分光密度值	增殖指数 (%)
静置组①	212806.79 \pm 5386.22	312628.52 \pm 7468.61	21.2 \pm 0.7
6 dyn/cm^2 15 min②	257863.45 \pm 7248.17	325502.12 \pm 3590.23	22.4 \pm 0.5
6 dyn/cm^2 30 min③	264498.86 \pm 5175.64	434284.63 \pm 9272.62	24.9 \pm 0.6
6 dyn/cm^2 60 min④	383478.25 \pm 3605.39	565847.41 \pm 1309.88	30.5 \pm 0.7
12 dyn/cm^2 15 min⑤	434080.52 \pm 3463.57	721558.49 \pm 5521.32	33.2 \pm 0.4
12 dyn/cm^2 30 min⑥	511174.85 \pm 2672.63	794416.94 \pm 3463.06	37.1 \pm 0.6
12 dyn/cm^2 60 min⑦	574264.94 \pm 5341.56	894877.76 \pm 6529.28	43.4 \pm 0.2
18 dyn/cm^2 15 min⑧	232311.67 \pm 9493.35	340548.32 \pm 3394.26	19.5 \pm 0.3
18 dyn/cm^2 30 min⑨	203547.13 \pm 3269.38	301748.33 \pm 4764.42	15.8 \pm 0.8
18 dyn/cm^2 60 min⑩	193970.92 \pm 5629.29	269525.59 \pm 1573.44	9.7 \pm 0.5
F, P 值	$F = 4.26, P = 0.022$	$F = 6.59, P = 0.004$	$F = 5.84, P = 0.037$
q, P 值	$q_{2-1} = 1.56, P > 0.05$	$q_{2-1} = 2.28, P > 0.05$	$q_{2-1} = 2.23, P > 0.05$
	$q_{3-1} = 3.27, P > 0.05$	$q_{3-1} = 4.31, P < 0.05$	$q_{3-1} = 3.67, P > 0.05$
	$q_{4-1} = 4.28, P < 0.05$	$q_{4-1} = 4.20, P < 0.05$	$q_{4-1} = 2.01, P < 0.05$
	$q_{5-1} = 3.72, P < 0.05$	$q_{5-1} = 4.39, P < 0.05$	$q_{5-1} = 2.75, P < 0.05$
	$q_{6-1} = 6.45, P < 0.05$	$q_{6-1} = 5.68, P < 0.05$	$q_{6-1} = 5.64, P < 0.05$
	$q_{7-1} = 4.62, P < 0.05$	$q_{7-1} = 4.93, P < 0.05$	$q_{7-1} = 6.42, P < 0.05$
	$q_{8-1} = 2.58, P > 0.05$	$q_{8-1} = 2.92, P > 0.05$	$q_{8-1} = 3.15, P > 0.05$
	$q_{9-1} = 4.17, P < 0.05$	$q_{9-1} = 3.98, P < 0.05$	$q_{9-1} = 5.37, P < 0.05$
	$q_{10-1} = 3.49, P < 0.05$	$q_{10-1} = 4.49, P < 0.05$	$q_{10-1} = 3.91, P < 0.05$

2.2 β -catenin 与 cyclin D1 表达相关性分析

通过绘制散点图观察到,不同强度应力作用不同时间下 β -catenin 和 cyclin D1 的表达有相关性,统计分析相关系数 $r = 0.65, t = 4.50$,查 t 界值表,得 $P < 0.001$ 。表明 β -catenin 和 cyclin D1 的表达呈正相关。

2.3 流式细胞仪增殖指数结果

经流式细胞技术检测,不同应力大小作用不同时间后的增殖指数见表 1。低应力组与对照组相比,在作用 60 min 后出现增殖指数的增加 ($30\% \pm 0.7\%, P < 0.05$),中等大小的应力在 15 min 即可见增殖指数的增加,且随着作用时间的增加,增殖指数不断增加,高应力组出现增殖指数的下降,应力作用 30 min 和 60 min 后差异有显著性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

应力作用于骨组织中的应力敏感细胞(骨细

胞、成骨细胞)产生牵张力及流体剪切力刺激,进而影响细胞内相关基因的表达,在此过程中流体剪切力占主要地位。骨组织中的骨细胞和成骨细胞通过膜延伸形成树枝状突起,这些突起伸入到矿化基质中的骨小管中,与邻近的骨细胞的突起形成间隙连接(gap junction),骨细胞通过间隙连接构成陷窝-小管系统,是感受机械应力的结构基础。Pavalko 等^[3]检测到骨细胞的陷窝-小管结构可以感受机械负荷引起的小管内流体剪切力,引起细胞膜的形变。目前认为骨细胞感受应力的主要方式是流体剪切力使细胞发生形变,引发局部的电位改变,形成力学和电化学偶联,介导力学信号在细胞内的传导。

采用 Biot^[4]的小孔调节理论来计算,可知生理范围内的骨力学负荷所产生的流动剪切力峰值是 $8 \sim 30 \text{ dyn/cm}^2$,体外实验也证实了此强度范围的应力可以明显地改变骨细胞的生物学特性^[5]。研究表明,不同强度应力对成骨细胞的增殖有影响^[6,7],

同时应力作用下 β -catenin, cyclin D1 的表达发生了显著的变化,提示 β -catenin 在流体剪切力对成骨细胞增殖影响中发挥作用^[8,9]。本试验通过免疫荧光技术观察到,中等大小的流体剪切力(12 dyn/cm^2)作用于成骨细胞表面 30 ~ 60 min 能有效地刺激成骨细胞中 β -catenin 和 cyclin D1 的表达,通过流式细胞技术证实该水平的应力能有效地促进细胞 $G_1 \rightarrow S$ 期转化,是对成骨细胞最适宜的刺激。较高的应力(18 dyn/cm^2)则抑制了成骨细胞的增殖,出现了 $G_1 \rightarrow S$ 期转化的阻滞现象。可见 β -catenin 协同 cyclin D1 在流体剪切力对成骨细胞增殖影响中起重要作用。成骨细胞对低强度的应力敏感性较低,较长时间才能引起成骨细胞的活性改变。中等大小的应力作用较短时间可以有效地促进细胞增殖,较高的应力则过早地表现出对成骨细胞增殖的抑制。不同应力作用下与增殖相关的分子发生了表达变化,提示成骨细胞对应力刺激有精确的调节机制。成骨细胞对应力反应表现为一定的敏感性和适应性,适宜强度的应力可以促进成骨细胞的增殖与分化,且这种适应性呈时间和强度依赖性。

参与应力信号传导的信号途径涉及存在于细胞膜上的跨膜信号分子、敏感离子通道以及胞质内的细胞骨架等, wnt 信号传导通路是普遍存在于多细胞真核生物中的一条保守途径,分布在胞膜及胞浆内的信号分子亦参与了骨细胞机械应力的信号传导。 β -catenin 在细胞内以两种形式存在,即 β -catenin 与 E-钙黏蛋白结合形成复合物,介导细胞间识别和黏附;同时 β -catenin 又是 wnt 信号转导通路的效应分子。在力学信号刺激下, β -catenin 在胞质内积聚进而核转位。本实验运用 β -catenin 抗体特异性与 β -catenin 去磷酸化位点 37 号丝氨酸残基和(或)41 号苏氨酸残基结合,证实了应力作用下处于活化状态的 β -catenin 的表达变化。 β -catenin 需要与 DNA 结合蛋白 T 细胞因子(Tcf)和淋巴细胞增强因子(Lef)结合,在核内共同调控靶基因的表达,从而完成 wnt 信号的传递^[10,11]。

cyclin D1 作为细胞周期调节因子之一是公认的 β -catenin 的靶基因,在 cyclin D1 的启动子区域含有可以和 TCF/LEF 结合的顺式作用元件^[12]。cyclin D1 是细胞周期素的一种,在细胞周期 $G_1 \rightarrow S$ 期转化中起着重要的作用。现认为,细胞由 $G_1 \rightarrow S$ 期转化主要受 G_1 期周期蛋白依赖性激酶(CDK)所控制。周期蛋白 D 主要与 CDK4 和 CDK6 结合并调

节后者的活性。我们实验室研究亦证实了应力作用下 cdk4 和 cdk6 等表达的增强,说明 cyclin-cdk 复合物在流体剪切力促进成骨细胞增殖有重要作用。

体外试验可以通过设计特定的应力加载方式来控制各种变量(应力的不同类型、大小、作用时间以及细胞的不同种系等),以观察细胞对应力的反应,为进行细胞水平科学研究提供精确可靠的依据。但是体内力学环境复杂,如何把体外实验的成果应用到临床疾病治疗和康复训练,将是亟待解决的问题。

参考文献

- 1 Norvell SM, Alvarez M, Bidwell JP, et al. Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 2004, 75(5): 396-404.
- 2 Vlad A, Rohrs S, Klein-Hitpass L, et al. The first five years of the Wnt targetome. *Cell Signal*, 2008, 20(5): 795-802.
- 3 Pavalko FM, Norvell SM, Burr DB, et al. A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes. *J Cell Biochem*, 2003, 88(1): 104-112.
- 4 Williams JL, Iannotti JP, Ham A, et al. Effects of fluid shear stress on bone cells. *Biorheology*, 1994, 31(2): 163-170.
- 5 McGarry JG, Klein-Nulend J, Prendergast PJ. The effect of cytoskeletal disruption on pulsatile fluid flow-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release in osteocytes and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(1): 341-348.
- 6 陈伟辉, 乔 鞠, 罗颂椒, 等. 不同流动剪切力调节大鼠成骨样细胞增殖的体外研究. *华西医学报*, 2001, 32(2): 232-234.
- 7 张成俊, 夏亚一, 王常德, 等. 流体切应力下 SIVA-1 凋亡诱导因子促成骨细胞增殖分化的双向调节作用. *中国微创外科杂志*, 2009, 9(8): 741-746.
- 8 Armstrong VJ, Muzylak M, Sinters A, et al. Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20715-20727.
- 9 Case N, Ma M, Sen B, et al. Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts. *J Biol Chem*, 2008, 283(43): 29196-29205.
- 10 Glass DA 2nd, Karsenty G. Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Top Dev Biol*, 2006, 73: 43-84.
- 11 Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, 2008, 42(4): 606-615.
- 12 Shuttman M, Zhurinsky J, Simcha I, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(10): 5522-5527.

(收稿日期: 2009-10-26)

(修回日期: 2010-01-19)

(责任编辑: 王惠群)

· 实验研究 ·

流体剪切力抑制肿瘤坏死因子 α 诱导鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 凋亡的实验研究*

何万庆 夏亚一** 王海明 张超 李鹏 汪静

(兰州大学第二医院骨科研究所, 兰州 730030)

【摘要】 目的 研究流体剪切力(fluid shear stress, FSS)对肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 凋亡的影响。 **方法** 将 MC3T3-E1 分为 TNF- α 干预组(实验组)和无 TNF- α 干预组(对照组), TNF- α (10 ng/ml) \times 4 h 诱导 MC3T3-E1 凋亡后, 四个实验组分别加载 12 dyn/cm² FSS 作用 0, 15, 30, 60 min。应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、荧光显微镜和流式细胞技术(FACS)检测细胞的增殖能力和凋亡, 免疫印迹法检测半胱氨酸蛋白酶 9 (caspase 9) 和凋亡蛋白酶活化因子 1 (Apaf-1) 蛋白的表达。采用 SPSS16.0 软件包对数据进行单因素方差分析。 **结果** TNF- α (10 ng/ml) \times 4 h 能诱导明显的凋亡信号, FSS (12 dyn/cm²) 能明显抑制这种凋亡, 而且随着刺激时间的增加, 从 0 min 逐渐延长至 60 min, 细胞活性逐渐增加, 凋亡细胞数逐渐减少, 实验组与对照组单因素方差分析及各组间 LSD 两两比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 同时 caspase 9 和 Apaf-1 蛋白的表达也逐渐增加。 **结论** 生理范围的 FSS 能够抑制 TNF- α 诱导的 MC3T3-E1 细胞的凋亡, 作为线粒体通路的关键蛋白, caspase 9 和 Apaf-1 在凋亡时增加而 FSS 后表达减少, 说明 FSS 抑制这种凋亡至少部分是减弱了凋亡的线粒体通路。

【关键词】 成骨样细胞; 细胞凋亡; 流体剪切力; 肿瘤坏死因子 α ; 线粒体通路

中图分类号: R329.2⁺8

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2010)05-0439-05

Fluid Shear Stress Inhibits Apoptosis Induced by TNF- α in Murine Osteoblastic MC3T3-E1 Cell He Wanqing, Xia Yayi, Wang Haiming, et al. Research Institute of Orthopaedics, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of flow shear stress (FSS) on TNF- α -induced apoptosis in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Methods** MC3T3-E1 cells were divided into two groups: TNF- α intervention group (experimental group) and non-TNF- α intervention group (control group). In the experimental group, cell apoptosis was induced by culturing with TNF- α (10 ng/ml) for 4 hours; and then, the MC3T3-E1 cells were stimulated by FSS for 0, 15, 30, or 60 minutes. Afterwards, MTT assay, fluorescence microscopy and flow cytometry were applied to measure the cellular proliferation and apoptosis, and Western blotting was used to detect the expressions of caspase 9 and Apaf-1 protein. Statistical analysis was performed using SPSS16.0 for one way ANOVA. **Results** MC3T3-E1 cells showed significant signs of apoptosis within 4 hours of exposure to TNF- α (10 ng/ml), while FSS (12 dyn/cm²) attenuated this TNF- α -induced apoptosis significantly in a time-dependent manner; the percentage of survival osteoblasts increased with the time of FSS stimulation ($P < 0.05$), meanwhile the expressions of caspase 9 and Apaf-1 protein were raised as well. **Conclusions** FSS set at a physiological range can inhibit the TNF- α -induced apoptosis of MC3T3-E1 cells. The expressions of caspase 9 and Apaf-1 protein, which are key proteins in mitochondrial pathway, increase at apoptosis, but decrease by FSS, indicating that FSS can attenuate, partly at least, the TNF- α -induced mitochondrial pathway of apoptosis.

【Key Words】 Osteoblastic cells; Apoptosis; Flow shear stress; TNF- α ; Mitochondrial pathway

凋亡 (apoptosis/programmed cell death, PCD) 是存活组织中引起不需要细胞死亡的一个生理性过程, 形态学变化有细胞皱缩、染色质凝集、DNA 分裂、细胞表面泡状形成, 最后裂解成凋亡小体, 被巨噬细胞吞噬。肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是一个多效

性促炎性细胞因子, 有凋亡潜能, 能诱导包括成骨细胞在内的许多细胞凋亡。在骨急慢性炎症、骨质疏松、类风湿关节炎和牙周炎等疾病, TNF- α 水平增高^[1,2]。骨大部分成骨细胞 (osteoblast, OB) 负责新骨的沉积, 通常经历凋亡。机械负荷一直被认为是

* 基金项目: 甘肃省自然科学基金 (096RJZA068)

** 通讯作者, E-mail: xiayayi@yahoo.com.cn