

· 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

调节骨代谢和重建的重要因素,能引起流动电位和流体剪切力(flow shear stress, FSS)的产生^[3]。有研究认为 FSS 通过刺激 OB 的代谢活动来增加骨形成和骨重塑^[4]。本实验旨在从凋亡的角度探讨 FSS 对 TNF- α 诱导的小鼠成骨样细胞株(MC3T3-E1 细胞)凋亡及半胱氨酸蛋白激酶 9(caspase 9)和凋亡蛋白酶活化因子 1(Apaf-1)蛋白表达的影响,进一步了解应力调节骨组织的改建过程。

1 材料与方法

1.1 材料

必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium, DMEM)(Gibico, USA),胎牛血清(兰州宝信),青链双抗(上海生博),0.25%胰酶(Gibico, USA),四甲基偶氮唑蓝(MTT, Sigma),II 型胶原酶(Sigma),鼠尾胶原(Sigma),TNF- α (Peprotech, USA, 鼠源性),caspase 9(Bioworld),Apaf-1 抗体(Bioworld),膜联蛋白(Annexin) V/PI 凋亡试剂盒(MultiScience),流式小室(自制),蠕动泵(上海金达),倒置相差显微镜(Olympus),荧光显微镜(Olympus),电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MC3T3-E1 购于中国医学科学院,维持在含 10% 胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养基和 100 U/ml 青链双抗、37 °C、5% CO₂ 的环境中。每隔 2 ~ 3 天换液一次,细胞生长面积达 80% ~ 90% 时可爬片。爬片后的细胞一般经一次换液生长 3 ~ 5 天后即可生长融合至 80% ~ 90%。此时盖玻片上每个实验的细胞处于增殖期非生长分化阶段,可作为实验的材料进行干预。

1.2.2 细胞凋亡的诱导 TNF- α 10 ng/ml \times 4 h 能明显诱导 OB 凋亡^[5,6]。利用爬片细胞诱导其凋亡后可进行后续实验。

1.2.3 加载 FSS 液流装置包括平行板流式小室和再循环液流回路,在细胞单层上产生层状液流,蠕动泵驱使培养基通过小室通道。平行板流式小室和流动回路系统模拟细胞受到稳定平行的 FSS (12 dyn/cm²),实验在 37 °C、5% CO₂ 和 30 ml DMEN 单纯培养液和抗生素中进行。应力加载装置设计参考文献^[4,7]。将 MC3T3-E1 分为 TNF- α 干预组(实验组)和无 TNF- α 干预组(对照组),每组各 6 个盖玻片,爬片细胞融合至 80% ~ 90% 后可进行 TNF- α (10 ng/ml)干预 4 h 诱导细胞凋亡,然后 4 个实验组分别加载 12 dyn/cm² FSS 作用 0, 15, 30, 60 min, 此时爬片细胞作为最终的实验材料进行相应的实验检测。每个实验方法重复 2 次。静置培养不加力组

细胞保持在和其他实验组相同的条件下培养。

1.2.4 细胞凋亡检测 用 Annexin V/PI 试剂盒荧光显微镜和流式细胞技术(FACS)检测凋亡。具体操作按照试剂盒说明书。

1.2.5 细胞增殖能力检测 MC3T3-E1 细胞在 TNF- α 和 FSS 干预后消化计数等量(每孔 10⁴/ml),在 96 孔板培养过夜。加入 10 μ l MTT 溶液(5 mg/ml),37 °C 培育 4 h,加入 150 μ l 二甲基亚砷(DMSO)震荡 10 min,在 570 nm 酶标仪阅读吸光度值(A)。每一组重复五孔取其平均值,对照组应用新鲜的培养基,其他步骤与实验组相同。增殖抑制率 = (1 - A 实验组/A 对照组) \times 100%。

1.2.6 caspase 9 和 Apaf-1 蛋白表达检测 采用免疫印迹法(western blotting)测定。根据实验设计的分组方案,将处理后的细胞用 Repa 缓冲液裂解得到总蛋白,蛋白浓度的定量利用 Bradford 法。将样本以相同蛋白量置于非连续缓冲系统垂直平行电泳,分离胶为 12%,电泳分离转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,标记合适的 caspase 9 (46 \times 10³ Da)和 Apaf-1 (130 \times 10³ Da)抗体, TBST 洗膜 3 次,一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 缓冲液洗膜 3 次,加 1:1000 辣根过氧化物(HRP)结合抗兔二抗(北京中杉金桥),室温孵育 30 ~ 60 min,ECM 显色液显色,暗室曝光。薄层扫描仪测定印迹区带的光密度值。

1.2.7 统计学分析 采用 SPSS16.0 软件包进行分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异采用单因素方差分析(ANOVA),多重比较用 LSD。相关应用非参数相关分析法 Spearman 秩相关, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α 诱导 OB 凋亡的证据

如图 1 所示,正常细胞(A、B) Annexin V/PI 标记胞膜淡染,核未红染,细胞形态正常,应用 TNF- α 后(C、D)胞膜呈增强的绿色荧光环,细胞变圆,核也未深染,为细胞凋亡的表现。同时, FACS(图 2A)检测早期凋亡细胞占总数的 81.33% (此值为两次实验 FACS 分析结果取其平均值所得,下同)。

2.2 FSS 对凋亡的 OB 增殖的影响

MTT 实验结果显示, TNF- α 能引起明显的 MC3T3-E1 细胞活力的降低, A 值由对照组的 0.9342 \pm 0.0244 下降到 0.4848 \pm 0.0173,而加载 FSS 后 A 值逐渐升高($P < 0.01$),随着 FSS 时间的延长,增殖抑制率逐渐下降且具有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

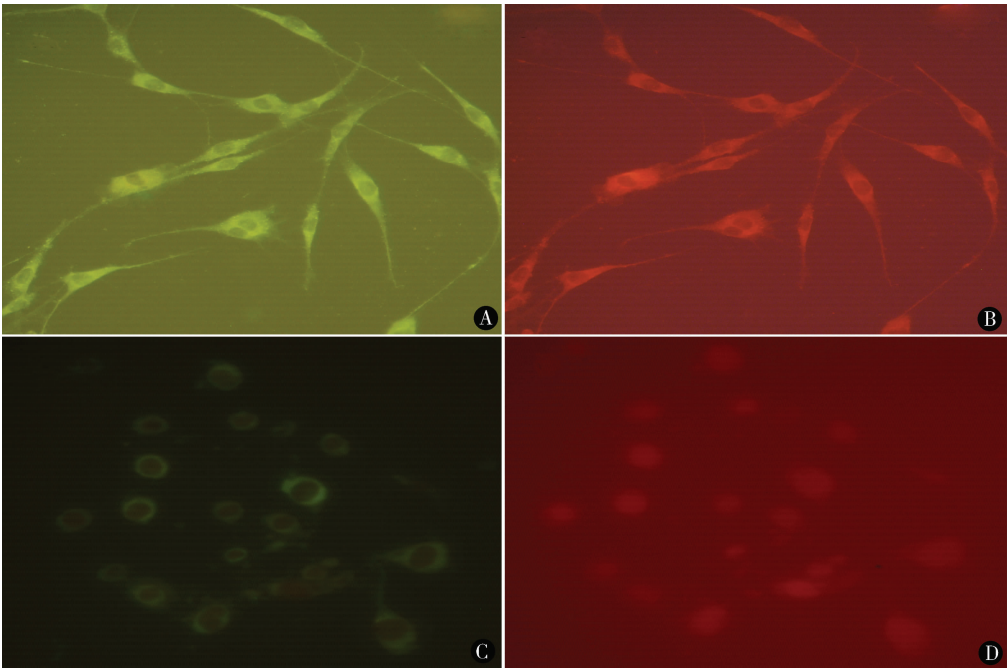


图 1 在 TNF-α 10 ng/ml × 4 h 后利用 Annexin V/PI 双标记荧光显微镜观察 TNF-α 诱导的 MC3T3-E1 凋亡,与正常细胞 (A、B) 相比,凋亡细胞 (C、D) 胞膜出现荧光环。A 是正常细胞 Annexin V 染色胞膜淡蓝色;C 是凋亡细胞 Annexin V 染色胞膜呈增强的绿色荧光环且细胞变圆;B、D 分别是正常细胞和凋亡细胞 PI 染色未见胞核深染,胞膜完整 (× 20)

表 1 FSS 对 TNF-α 诱导凋亡的 MC3T3-E1 的增殖作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	吸光度值	增殖抑制率 (%)
对照组①	0.9342 ± 0.0244	0
TNF-α + FSS 0 min 组②	0.4848 ± 0.0173	0.4811 ± 0.0092
TNF-α + FSS 15 min 组③	0.6738 ± 0.0199	0.3303 ± 0.1275
TNF-α + FSS 30 min 组④	0.7486 ± 0.0289	0.1966 ± 0.0278
TNF-α + FSS 60 min 组⑤	0.8366 ± 0.0304	0.1044 ± 0.0305
F 值	138.857	29.857
P 值	< 0.01	< 0.01
组间比较	各组间均 P = 0.000	$P_{2-3} = 0.003, P_{3-4} = 0.006$ $P_{4-5} = 0.045$, 余均 P = 0.000

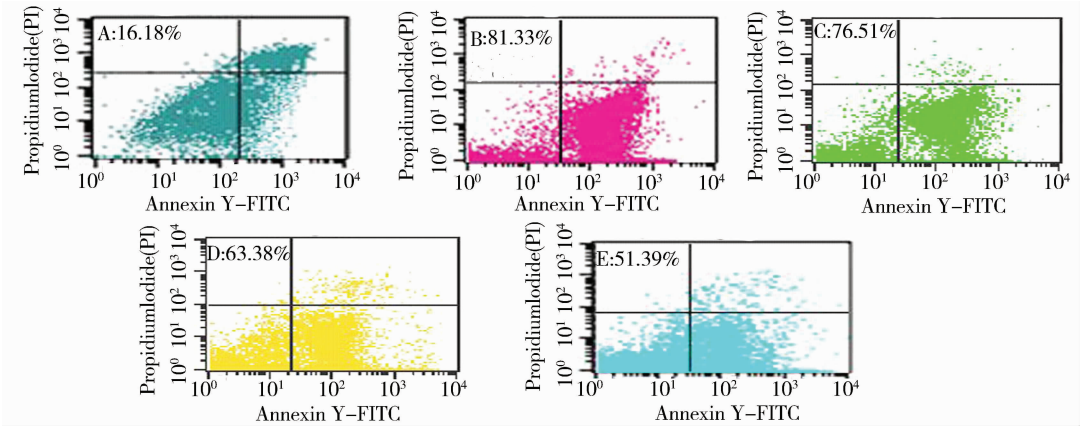


图 2 Annexin V/PI 标记法, FACS 检测 FSS 对 TNF-α 诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡的散点图 (右下象限代表凋亡细胞, An⁺PI⁺)
A: 对照组; B: 0 min 组; C: 15 min 组; D: 30 min 组; E: 60 min 组

2.3 FSS 抑制 TNF- α 诱导的凋亡

Annexin V/PI 双标记 FACS 定量检测结果显示:TNF- α 引起细胞凋亡率达 81.33%,随着 FSS 的延长,凋亡局域的细胞数量呈明显下降趋势,表现明显的时间相关性,Spearman 秩相关分析显示相关系数 $r = -0.986, P = 0.014$,FSS 时间与凋亡率有显著的负相关关系。其中 FSS 在对照组,15,30,60 min 的凋亡率平均值分别为 16.18%,76.51%,63.38%,51.39% (图 2),各组间 ($n = 5$) ANOVA 分析 $F = 1.976, P = 0.000$,LSD 两两比较各组 $P = 0.000$,差异有明显的统计学意义(图 3)。

2.4 FSS 对 TNF- α 诱导 OB 凋亡相关基因 caspase 9 和 Apaf-1 表达的影响

结果见图 4。凋亡的细胞即 0 min 组与对照组相比 caspase 9 和 Apaf-1 蛋白大量表达,FSS 在 15,

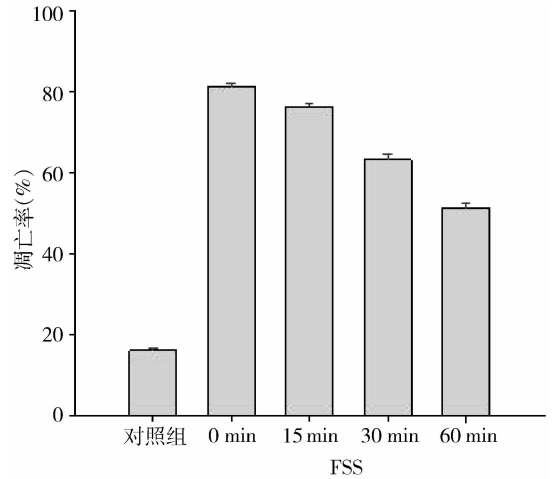


图 3 FACS 分析不同时间 FSS 对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 的凋亡率。处理组与对照组及各处理组之间 $P < 0.01$

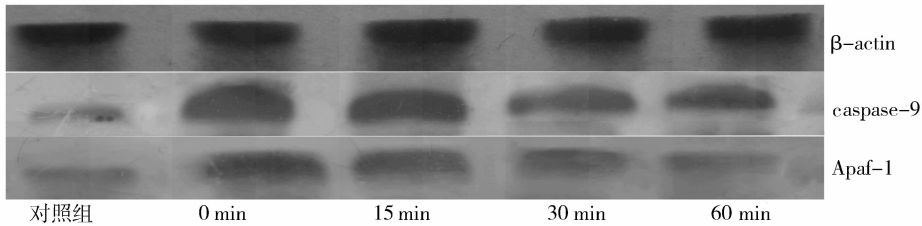


图 4 不同时间 FSS 对 TNF- α 诱导 MC3T3-E1 caspase 9 和 Apaf-1 蛋白表达的影响。0 分钟表达最多,随着 FSS 时间延长,两者表达逐渐降低

30,60 min 时蛋白的表达量逐渐降低。

3 讨论

在活体内骨形成位点的 OB 数目受 OB 凋亡的影响,成骨细胞凋亡在骨中是一个重要事件,大约 70% 最初出现在骨重建的位点,被认为经历凋亡,剩余的 OB 形成骨细胞/骨衬里细胞^[8]。延长 OB 寿命的信号或许对骨的生长和重建具有明显的影响。大量研究表明,在众多的调节因素中,机械应力起着非常重要的作用。有研究认为 OB 感受骨的负重是通过液体流动产生的剪切力而不是通过机械张力,这些物理力可能是影响 OB 代谢和骨改建的外部信号^[4]。而 TNF- α 是一个致炎性细胞因子,是单核细胞分泌的,在异常骨改建和骨病中有重要的作用。因此,研究 FSS 对 TNF- α 诱导 OB 凋亡的影响有利于深入理解骨的形成和改建。

细胞凋亡是由多因素调控的正常生理现象,在胚胎发育、机体内环境稳定和疾病发生中起着重要的调节作用^[9]。在凋亡的信号传导中有两条途径:一是死亡受体通路,如通过 FAS 和 TNFR1/2;另一条是线粒体通路。caspase 9 和 Apaf-1 是线粒体通路中的关键蛋白,二者是决定细胞死亡或存活的重

要因素。Apaf-1 作为一种重要的凋亡激活剂,近来已在小鼠基因敲除实验中得到证实,Apaf-1 基因缺失的小鼠其胚胎发育畸形的数量和范围远超过 caspase 3 或 caspase 9 基因缺失的小鼠^[10]。凋亡早期胞膜呈现明显增强的绿色荧光环,核不红染,绿色荧光环是磷脂酰丝氨酸 (PS),PS 易位被认为是凋亡的标志,在凋亡早期 PS 从膜内转到磷脂膜外层,PS 暴露的功能作为巨噬细胞对将要死亡细胞吞噬特异性识别的标志,它的检测或许是比测组蛋白相关的 DNA 片段水平更敏感的方法^[11]。小鸡 OB 无血清培养的 OB 胞膜外面的 PS 明显增多,在 FSS 后 PS 减少明显说明废用促进细胞凋亡且 FSS 促进细胞存活^[12]。本实验应用 Annexin V/PI 免疫荧光显微镜观察 TNF- α 能诱导 OB 胞膜 PS 明显增加即引起凋亡,同时 FACS 观察早期凋亡细胞数占 81.33%,这些与以前研究是一致的^[13]。许多研究表明,适当大小的剪切力刺激能促进 OB 增殖、总蛋白产物和 DNA 合成^[14],MTT 能评价细胞线粒体活性,MTT 在活细胞通过线粒体脱氢酶被分裂转化成绿色甲瓖且能被 DMSO 溶解,从而间接反映活细胞数量。本实验 MTT 法显示 FSS 能通过抑制细胞的凋亡增加细胞活力;免疫印迹法检测 caspase 9 和

Apaf-1 蛋白表达量明显增加,在 FSS 作用后,细胞凋亡率及二者表达量随时间延长逐渐降低,说明 FSS 能够通过抑制 caspase 9 和 Apaf-1 蛋白的表达抑制凋亡,二者是线粒体通路的关键蛋白,说明 FSS 通过抑制线粒体通路抑制了细胞凋亡,间接提示线粒体通路参与了 TNF- α 诱导的细胞凋亡,而以往研究多显示是通过死亡受体通路^[15],可见两条通路可能均参与了 TNF- α 诱导的凋亡机制。TNF- α 诱导凋亡的线粒体机制可能是刺激信号促使线粒体释放细胞色素 C,从线粒体内膜间隙释放入胞质,后者在 dATP/ATP 存在的情况下结合胞浆中信号接头分子 Apaf-1,Apaf-1 寡聚化后募集 caspase 9 前体导致 caspase 9 前体活化和释放,继而活化 caspase 3,启动 caspase 级联反应。本实验利用 MC3T3-E1 证实了在生理水平持续稳定的 FSS(12 dyn/cm²)能明显抑制 TNF- α 诱导凋亡的发展,并且至少是部分通过线粒体通路。

OB 通过 FSS 发挥抗凋亡的准确分子机制研究较少。Dufour 等^[16]利用大鼠鼠尾悬挂模型,研究骨骼不负荷诱导 OB 早期凋亡与 $\alpha 5\beta 1$ 整合蛋白-磷酸化磷脂酰肌醇-3(PI3)激酶相联系。利用 PI3 激酶抑制剂阻止了 FSS 复苏 TNF- α 诱导 OB 凋亡能力,提示 PI3 激酶激活对 FSS 介导的 TNF- α 诱导的凋亡抑制是必需的^[5]。Jilka 等^[8]研究显示凋亡是许多 OB 的主要命运,因为如骨质疏松等骨病能被相对低活性的 OB 及其数量减少引起,所以阻止 OB 凋亡成为一个非常重要的临床目标。本实验 FSS 通过抑制了凋亡的线粒体通路增强了细胞的活力,进一步提示 FSS 是细胞的重要存活因素。目前没有一种负荷模型完全仿制在体内 OB 遭受的应力,同时由于调控细胞凋亡的因素和影响因素很多,有关机械应力对 OB 凋亡相关因子的作用及相互关系有待进一步研究。

参考文献

- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 2003, 74(3):391-401.
- Chae HJ, Chin HY, Lee GY, et al. Carbon monoxide and nitric oxide protect against tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in osteoblasts; HO-1 is necessary to mediate the protection. *Clin Chim*

- Acta, 2006, 365(1-2):270-278.
- Myers KA, Rattner JB, Shrive NG, et al. Osteoblast-like cells and fluid flow: cytoskeleton-dependent shear sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364(2):214-219.
- Stevens HY, Meays DR, Yeh J, et al. COX-2 is necessary for venous ligation-mediated bone adaptation in mice. *Bone*, 2006, 38(1):93-104.
- Pavalko FM, Gerard RL, Ponik SM, et al. Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced apoptosis in osteoblasts; a role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3. *J Cell Physiol*, 2003, 194(2):194-205.
- Son YO, Kook SH, Choi KC, et al. Quercetin accelerates TNF- α -induced apoptosis of MC3T3-E1 osteoblastic cells through caspase-dependent and JNK-mediated pathways. *Eur J Pharmacol*, 2008, 579(1-3):26-33.
- 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.
- Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, et al. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(5):793-802.
- Bran GM, Stern-Straeter J, Hormann K, et al. Apoptosis in bone for tissue engineering. *Arch Med Res*, 2008, 39(5):467-482.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, et al. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell*, 1998, 94(6):727-737.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994, 84(5):1415-1420.
- Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(4):1163-1168.
- Yang YM, Huang WD, Xie QM, et al. Simvastatin attenuates TNF- α -induced growth inhibition and apoptosis in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Inflamm Res*, 2009, 45(26):1129-1131.
- Kuzushima M, Mogi M, Togari A. Cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: involvement of p38MAP kinase. *Arch Oral Biol*, 2006, 51(11):1048-1053.
- Mani A, Zoubin A, Markos R, et al. TNF- α in vivo stimulates apoptosis in fibroblasts through caspase-8 activation and modulates the expression of pro-apoptotic genes. *J Cell Physiol*, 2004, 201(3):341-348.
- Dufour C, Holy X, Marie PJ. Skeletal unloading induces osteoblast apoptosis and targets $\alpha 5\beta 1$ -PI3K-Bcl-2 signaling in rat bone. *Exp Cell Res*, 2007, 313(2):394-403.

(收稿日期:2009-10-29)

(修回日期:2010-02-02)

(责任编辑:王惠群)