

均匀双轴机械刺激对成骨细胞 COX-2 表达的影响

孟书聪 赵曼 董晓敏 肖军军 王稚英 王兴

【摘要】 目的 探讨均匀双轴机械刺激对 SD 大鼠乳鼠成骨细胞环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达的影响。**方法** 设计了均匀双轴机械刺激模型,对成骨细胞给予不同时间(2,4 和 8 h)和不同强度(20 000 microstrain, 100 000 microstrain, 200 000 microstrain)的机械刺激。利用免疫细胞化学和 Western blot 检测均匀双轴机械刺激对成骨细胞 COX-2 表达的影响。**结果** 免疫细胞化学显示 COX-2 表达主要位于胞质,在核周聚集明显,Western blot 检测 2 h 机械刺激无显著增多,4 和 8 h 机械刺激后 COX-2 的表达显著上调,但随刺激强度增加 4 h 的表达逐渐增多,8 h 的逐渐降低,与免疫细胞化学结果一致。**结论** 均匀双轴机械刺激在一定时间和强度范围内能促进大鼠乳鼠成骨细胞 COX-2 的表达。

【关键词】 均匀双轴; 机械刺激; 成骨细胞; COX-2

Effects of biaxial mechanical stimulation on cyclooxygenase-2 expression in rat primary osteoblasts MENG Shucong, ZHAO Man, DONG Xiaomin, et al. Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China

【Abstract】 Objective To study the effects of uniform biaxial mechanical stimulation on cyclooxygenase (COX-2) expression in SD rat primary osteoblasts. **Methods** A new uniform biaxial mechanical stimulation model has been designed for the first time. The isolated rat primary osteoblasts were exposed to uniform biaxial mechanical stimulation at different intensities (20 000, 100 000 and 200 000 microstrains) for different time periods (2, 4 and 8 h). The expression changes of COX-2 protein caused by respective mechanical stimulation were detected by immunocytochemistry and Western blotting. **Results** The expression of COX-2 did not increase significantly after mechanical stimulation for two hours, but was upregulated after four hour and eight hour stimulation, while in the control groups, nearly no COX-2 was expressed. In addition, the expression of COX-2 in four-hour stimulated group increased while in the eight-hour group decreased with increasing stimulation. **Conclusion** Uniform biaxial mechanical stimulation at a certain time period and intensity promotes the expression of COX-2 in rat primary osteoblasts.

【Key words】 Uniform biaxial; Mechanical stimulation; Osteoblasts; COX-2

机械刺激能启动成骨细胞的机械信号传导通路,经过一系列的分子事件,对相关基因和蛋白的表达进行调节导致骨重建^[1]。在此过程中作为机械刺激敏感基因和早期快反应基因的 COX-2 表达上调^[2]。依据此原理以往建立了许多的机械刺激模型^[3-5],如重力(gravity)、张力(tension)、压力(compressinn)、减切力(shear)等,它们虽然都能快速的诱导 COX-2 基因的表达^[6]和成骨细胞的增殖与分化,但却存在着一个共同的缺点即对培养的细胞不能达

到完全均匀的牵拉。本实验采用一种新型的均匀双轴机械刺激模型,能对培养的细胞产生均匀的机械牵拉刺激,同时我们通过不同的机械刺激时间和强度对成骨细胞 COX-2 表达的调节作用,对机械刺激调节骨重塑的作用机制进行了探索。

材料和方法

1. 动物和试剂

24 h 内出生的 SD 大鼠乳鼠,DMEM 培养基(Gibicol),胎牛血清(Hyclone),免抗大鼠 COX-2 多抗(Santa Cruz),辣根酶标记的羊抗兔 IgG(Santa Cruz),DAB 试剂盒(Histostain™-Plus Kits 北京中山公司);Hoefel MinivVe 垂直电泳仪(Amersham Pharmacia),石

基金项目:教育部教育振兴行动计划特殊专项基金资助(985)

作者单位:100083 北京大学医学部细胞生物与遗传学系(孟书聪、赵曼、董晓敏、肖军军),口腔医学院(王稚英、王兴)

墨半干式转印仪 (Amersham Pharmacia), 凝胶成像系统 (Biostep GmbH)。

2. 成骨细胞培养与鉴定

无菌条件下取出 24 h 内的 SD 大鼠乳鼠的颅骨, 去除骨膜及软组织, 用 PBS 冲洗骨片并剪碎, 1 mg/ml 胶原酶 37℃ 消化 8 ~ 12 min 后, 用含 10% (V/V) 胎牛血清的 DMEM 培养液吹打消化的骨片, 收集上清离心 1000 r/min × 5 min, 再用上述培养液重悬细胞, 移至培养瓶中, 在 37℃, 体积分数为 5% (V/V) 的 CO₂ 孵箱中培养。24 h 后换液, 视细胞生长情况每 2 ~ 3 天换液 1 次, 直至细胞长满。经差相贴壁法获得纯化的成骨细胞, 通过细胞形态观察、改良 Gomori 钙钴法显示碱性磷酸酶 (ALP)、细胞骨钙素免疫细胞化学染色等鉴定成骨细胞。取纯化后 3 ~ 5 代的成骨细胞进行实验。

3. 均匀双轴机械刺激模型

本实验采用的是一种根据临床牵张术特点设计的机械力直接牵拉的模型, 是由钛合金支架和硅胶膜制成^[6], 对细胞生长均无不良影响, 目前这两种生物材料在医学上得到广泛应用。该模型中将硅胶膜用钛合金螺丝固定于钛合金制成的支架上, 呈火柴盒样 3 cm × 5 cm, 支架上固定有螺旋杆, 通过调节该螺旋杆可以牵拉有弹性的硅胶膜, 从而对生长于硅胶膜上的成骨细胞产生一个均匀双向的机械牵拉刺激。该模型使用前用超声清洗 2 h 以上, PBS 冲洗干净, 经 75% 的酒精浸泡消毒 1 ~ 2 h 后, 紫外灯照射 3 ~ 4 h 后晾干。使用 I 型胶原蛋白包被模型的硅胶膜 20 ~ 30 min 以增加细胞的附着力。使用 0.25% 胰酶消化细胞, 加血清培养基终止反应, 细胞计数 5×10^6 /ml, 制备成单细胞悬液加入模型内, 培养过夜, 次日倒置显微镜下观察细胞铺展至 90% 以上时进行实验。均匀双向牵拉刺激强度分为 20 000 microstrain 组, 100 000 microstrain 组, 200 000 microstrain 组和未受刺激的对照组, 各级同步培养并同步牵拉刺激 4 h 后取样。

4. 免疫组化

依照 DAB 试剂盒 (Histostain™-Plus Kits 北京中山公司生产) 说明进行操作, 倒置相差显微镜下观察并拍摄。

5. Western blot

PBS 冲洗各组细胞, 加入 50 μ l 裂解液 (50 mmol/L Tris, [pH7.5], 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L EDTA, 0.5% NP40, 1 mmol/L PMSF, 20 μ g/ml Aprotinin) 冰育 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min 转移

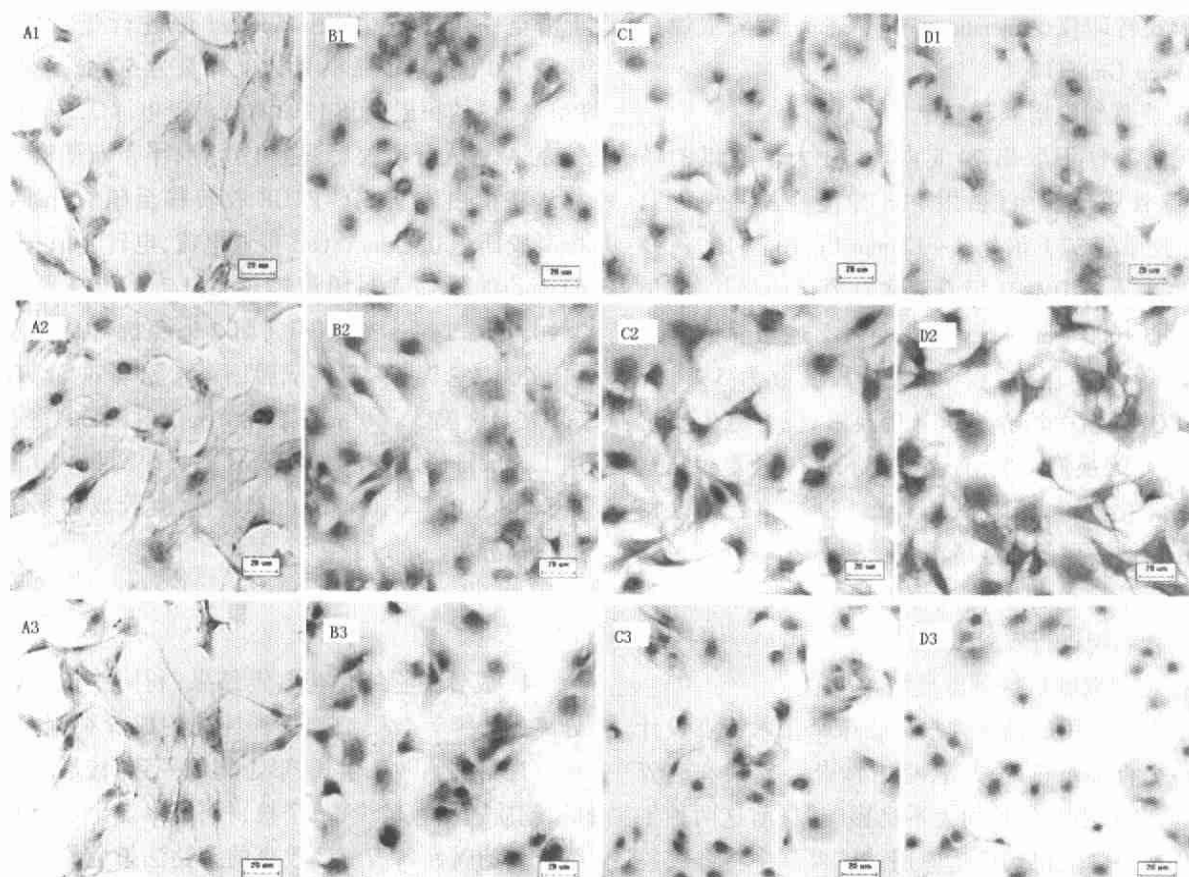
上清至一干净管中, 用 Bradford 法进行蛋白定量。样品 100℃ 煮沸 5 min, 蛋白上样量为 50 μ g, 经 SDS-PAGE 5% 的积层胶和 12% 的分离胶电泳 2.5 h (浓缩胶 80 V 进入分离胶后调至 120 V); 半干石墨电极转移法将蛋白质从 SDS-PAGE 胶转移至硝酸纤维膜, 按凝胶面积 0.75 mA/cm² 接通电流, 电转 2 h; 按 0.1 ml/cm² 的量加入封闭液 [TBS (pH 7.4), 5% 脱脂牛奶, 0.05% Tween-20] 室温封闭 2 h; 兔抗 COX-2 一抗 (1:200) 室温杂交 2 h 后, 用洗膜缓冲液 TBST (pH7.4) 洗膜 3 × 10 min; 羊抗兔 IgG (1:2000) 室温作用 1.5 h, 洗膜缓冲液 TBST (pH 7.4) 冲洗 2 × 10 min, TBS (pH 8.0) 1 × 10 min; ECL 显色, 凝胶成像系统灰度扫描分析。

结 果

1. 成骨细胞纯化与鉴定结果: 利用差相贴壁法分离成纤维等杂质细胞得到纯化的成骨细胞, 显微镜下观察细胞贴壁生长, 形态均匀一致, 梭形或多角形, 胞质透明颗粒少, 单个核, 核仁 1 ~ 2 个。成骨细胞合成的碱性磷酸酶经改良的钙钴法染色呈棕黑色细微颗粒, 阴性对照细胞内无棕黑微粒。骨钙素免疫化学染色鉴定成骨细胞的胞质中有黄褐色阳性着色, 而阴性对照无黄褐着色。

2. 免疫细胞化学观察均匀双轴机械刺激对成骨细胞 COX-2 表达的影响: 均匀双轴机械刺激作用后, 成骨细胞的胞质中出现棕色的颗粒表示 COX-2 蛋白免疫反应呈阳性。2 h 时各刺激强度的 COX-2 表达无明显差别, 机械刺激 4 h 时 COX-2 的表达明显增多, 并随刺激强度的增强成骨细胞体积增大, 数量增多, 并且 COX-2 阳性颗粒增多着色加深; 但当机械刺激 8 h 后 COX-2 的表达虽然比对照组明显上调, 但随刺激强度的增强成骨细胞的体积逐渐缩小变圆, 数量减少, COX-2 阳性颗粒也减少, 而对照组的胞质中无明显着色颗粒, COX-2 蛋白免疫反应呈阴性, 见图 1。

3. Western blot 检测均匀双轴机械刺激对成骨细胞 COX-2 表达的影响: 给予成骨细胞不同时间 (2, 4 和 8 h) 和不同强度 (20 000 microstrain、100 000 microstrain、200 000 microstrain) 的均匀双轴的机械刺激, 对照 1 和对照 2 分别是生长于培养瓶和硅胶膜上的未给予刺激的成骨细胞, 两者 COX-2 表达几无差别。均匀双轴机械刺激 2 h 后成骨细胞 COX-2 蛋白的表达各强度之间无差异。而在刺激 4 h 和 8 h 后 COX-2 蛋白的表达与对照组相比都显著增加, 而且随着



(1)均匀双轴机械刺激 2 h, (2)均匀双轴机械刺激 4 h, (3)均匀双轴机械刺激 8 h。 (A)对照组, (B)刺激强度 20 000 microstrain, (C)刺激强度 100 000 microstrain, (D)刺激强度 200 000 microstrain

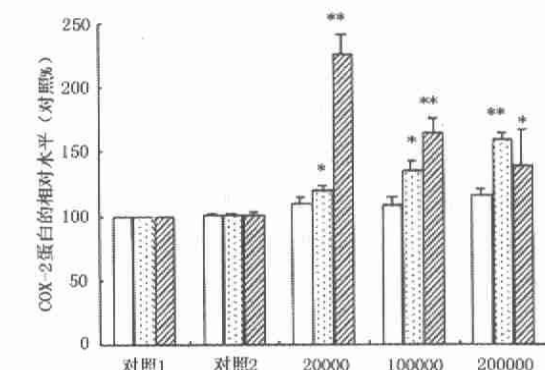
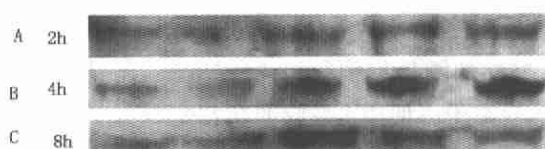
图 1 免疫细胞化学检测成骨细胞均匀双轴机械刺激后 COX-2 的表达

刺激强度的增强 COX-2 蛋白的表达 4 h 的依次增多, 8 h 的则依次减弱, 对凝胶密度灰度结果进行分析, 结果见图 2。

讨 论

COX 有两种异构酶: COX-1 是结构酶, 在大多数组织中都有表达, 而 COX-2 是诱导表达的, 在正常的生理条件下则几乎检测不到。COX 是催化花生四烯酸生成前列腺素 (prostaglandin, PG) 的关键酶^[7]。PG 在骨新陈代谢过程中的作用复杂, 在体外 PGs 可以诱导骨前体细胞分化为破骨细胞或者成骨细胞, 刺激骨吸收或生长, 在体内 PG 特别是 PGE₂ 能刺激成骨细胞增殖和骨形成^[8], 并能调节破骨细胞的分化与功能, 因此机械刺激通过诱导 COX-2 的表达^[9], 调节 PG 的产生, 从而影响骨新陈代谢的整个过程。

本研究利用免疫细胞化学和 Western blot 等方法从形态学, 以及蛋白表达等层次探讨均匀双轴机械刺激与 COX-2 表达的关系。形态学检测表明受均匀双轴机械刺激后表达增高的 COX-2 主要位于



(A)成骨细胞机械刺激 2 h, (B)成骨细胞刺激 4 h, (C)成骨细胞机械刺激 8 h。结果均来自 3 个以上独立的实验采用凝胶密度灰度扫描分析数据。以对照组的百分比描述各组蛋白表达的均数 ± 标准差, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 Western blot 检测均匀双轴不同作用时间刺激强度对 COX-2 蛋白表达的影响

胞质,在核周聚集明显。定量检测中免疫细胞化学和 Western blot 结果一致,发现均匀双轴机械刺激在各时段 COX-2 的表达不同,当均匀双轴机械刺激为 2 h 时,即使最大强度的刺激(200 000 microstrain)也不足以引起成骨细胞 COX-2 蛋白表达发生明显的增加,而当机械刺激的时间超过 4 h 以上(包括 8 h 组)时即使最小的刺激强度(20 000 microstrain)也能促进成骨细胞 COX-2 蛋白的表达,提示了导致成骨细胞 COX-2 表达的增高,机械刺激必需要维持一定的时间,即有一个机械刺激的时间阈值。同时还发现刺激 4 h 组成骨细胞 COX-2 的表达随均匀双轴机械刺激强度的增加而逐渐升高,提示了成骨细胞 COX-2 表达的高低与机械刺激的强度也是密切相关的,即存在一个机械刺激的强度阈值。然而机械刺激作用 8 h 时,成骨细胞 COX-2 的表达与对照组相比虽然有明显的增高,但是随机械刺激的增加而降低,与 4 h 时的趋势正好相反,分析原因可能是因为机械刺激的作用超出生理性的阈值,反而中断了成骨细胞内机械刺激的信号传导通路,不能使成骨细胞 COX-2 的表达继续上调。以上结果揭示了成骨细胞 COX-2 蛋白的表达与均匀双轴机械刺激的强度和作用的时间都有关,并且只有机械刺激的强度(20 000 ~ 200 000 microstrain)和时间(2 ~ 8 h)在适当的范围时才会促进成骨细胞 COX-2 的表达。

本研究初步探讨了均匀双轴机械刺激与成骨细胞 COX-2 表达的关系,发现了一定时间和强度的均

匀双轴机械刺激可以促进体外成骨细胞 COX-2 的表达,希望能对临床的牵引成骨有理论上的支持与揭示。

参 考 文 献

- 1 Meyer U, Terodde M, Joos U, et al. Mechanical stimulation of osteoblasts in cell culture. Mund Kiefer Gesichtschir, 2001, 5: 166-172.
- 2 Hatton JP, Pooran M, Li CF, et al. A short pulse of mechanical force induces gene expression and growth in MC3T3-E1 osteoblasts via an Eax 1/2 pathway. J Bone Miner Res, 2003, 18: 58-66.
- 3 Wadhwa S, Choudhary S, Voznesensky M, et al. Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 297: 46-51.
- 4 Kaspar D, Seidl W, Neidlinger Wilke C, et al. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. J Biomech, 2002, 35: 873-880.
- 5 Sonia K, David JB, William Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation. Bone, 2003, 32: 241-251.
- 6 Ramires PA, Romito A, Cosentino F, et al. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on *in vitro* osteoblasts behaviour. Biomaterials, 2001, 22: 1467-1474.
- 7 Rayond ND, Steven BA, Leslie C, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB, 1998, 12: 1063-1073.
- 8 Nauman EA, Satcher RL, Keaveny TM, et al. Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with short-term increases in PGE2 but no change in mineralization. J Appl Physiol, 2001, 90: 1849-1854.
- 9 Kaspar D, Seidl W, Neidlinger Wilke C, et al. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. J Biomech, 2002, 35: 873-880.

(收稿日期: 2004-04-15)

(上接第 289 页)

度的变化,可以了解、评价药物以及其他因素对骨代谢的作用;骨质疏松是以骨量减少,骨的微结构退化为特征,其微结构的变化从形态学观察主要是由于骨小梁变薄、变细,甚至断裂,因此骨小梁的变化与是否是非常重要的指标。本实验的测定结果显示,小鼠 4 ~ 12 周龄,骨小梁骨密度虽然随着周龄的增长略有提高,但无明显相关性;而且胫骨近端 1.4 mm 处骨密度明显高于 4.0 mm 的部位,并且相对较稳定,证明该部位主要有松质骨组成,此处是了解骨小梁变化的重要部位。检测结果发现(见表 2),骨小梁面积以 8 周龄时为最大,以后逐渐减小,可能与骨有机质和矿物质代谢有关^[4],这有待进一步的研究证

实。

根据上述结果,结合对小鼠进行双侧卵巢切除手术以及手术存活鼠的观察和测定,认为选择 8 ~ 10 周龄的小鼠适宜作为骨质疏松的筛选模型。

参 考 文 献

- 1 Gasser JA. Assessing bone quantity by pQCT. Bone, 1995, 17: 145-154.
- 2 张戈,秦岭, Hong VWY, 等. 成年卵巢切除大鼠模型股骨近端 pQCT 和 DEXA 的相关分析. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8: 135-137.
- 3 贾军宏,刘忠厚. QCT 与 pQCT 在骨质疏松诊断中的临床应用. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9: 172-176.
- 4 陈方,吴铁,崔燎. 不同月龄小鼠骨有机质的矿物质变化的观察. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8: 296-299.

(收稿日期: 2004-03-22)