

基底拉伸应变对小鼠成骨细胞 Runx2 表达的影响

宫元伟 闫玉仙 张媛 张西正

中图分类号: Q274 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)03-0185-05

摘要: 目的 研究基底拉伸应变对小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞 Runx2 表达的影响。方法 实验随机分为 0 $\mu\epsilon$ 、1000 $\mu\epsilon$ 、1500 $\mu\epsilon$ 、2000 $\mu\epsilon$ 、2500 $\mu\epsilon$ 、5000 $\mu\epsilon$ 六组,采用卫生装备研究所自行研制的细胞基底应变加载装置对细胞进行加载,Western blot 检测不同应变对成骨细胞 Runx2 蛋白表达的影响。此外采用 Real-time PCR 检测 0 $\mu\epsilon$ 、2500 $\mu\epsilon$ 、5000 $\mu\epsilon$ 三种强度应变对成骨细胞 Runx2 mRNA 表达的影响。结果 Western blot 结果显示:1500 $\mu\epsilon$ 、2000 $\mu\epsilon$ 、2500 $\mu\epsilon$ 组与 0 $\mu\epsilon$ 组相比 Runx2 蛋白表达显著增强($P < 0.01$);5000 $\mu\epsilon$ 组与 0 $\mu\epsilon$ 组相比 Runx2 蛋白表达显著降低($P < 0.01$);Real-time PCR 结果显示:2500 $\mu\epsilon$ 组与 0 $\mu\epsilon$ 组相比 Runx2 mRNA 表达显著降低($P < 0.01$);5000 $\mu\epsilon$ 组与 0 $\mu\epsilon$ 组相比 Runx2 mRNA 表达显著增加($P < 0.01$)。结论 ①生理强度的拉伸应变可显著增加 MC3T3-E1 细胞 Runx2 蛋白的表达,并且呈剂量依赖性,超生理强度 5000 $\mu\epsilon$ 显著降低 Runx2 蛋白表达。②同样强度的拉伸应变刺激下,Runx2 基因表达与蛋白表达并不一致。

关键词: 基底拉伸应变; Runx2; 成骨细胞

The effect of substrate-stretching strain on the expression of Runx2 in mouse osteoblasts GONG Yuanwei, YAN Yuxian, ZHANG Yuan, et al. Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China

Corresponding author: ZHANG Zhengxi, Email: gyuanw@163.com

Abstract: **Objective** To study the effect of substrate-stretching strain on the expression of Runx-2 by mouse MC3T3-E1 osteoblasts. **Methods** Six experimental groups were randomized divided to 0 $\mu\epsilon$, 1000 $\mu\epsilon$, 1500 $\mu\epsilon$, 2000 $\mu\epsilon$, 2500 $\mu\epsilon$, and 5000 $\mu\epsilon$ groups. The cells were loaded with substrate-stretching strain loading system. Runx-2 protein expression in cells with different strain groups was detected using western blotting. Runx-2 mRNA expression in cells subjected to 0 $\mu\epsilon$, 2500 $\mu\epsilon$, and 5000 $\mu\epsilon$ substrate-stretching strain was detected using real-time PCR. **Results** Western blotting results showed that the expressions of Runx-2 protein were significantly increased in 1500 $\mu\epsilon$, 2000 $\mu\epsilon$, and 2500 $\mu\epsilon$ groups, and decreased in 5000 $\mu\epsilon$ group, comparing to that in 0 $\mu\epsilon$ group ($P < 0.01$). Real-time PCR results showed that the expression of Runx-2 mRNA was significantly decreased in 2500 $\mu\epsilon$ group, and increased in 5000 $\mu\epsilon$ group, comparing to that in 0 $\mu\epsilon$ group ($P < 0.01$). **Conclusion** (1) Expression of Runx2 protein in MC3T3-E1 cells could be up-regulated under physiological strain and the regulation was magnitude-dependent. The expression was down-regulated when the strain magnitude was beyond physiological load at 5000 $\mu\epsilon$. (2) Expression of Runx2 mRNA was not consistent with the expression of the protein under the same strain magnitude.

Key words: Substrate-stretching strain; Runx2; Osteoblasts

早在一个世纪以前,人们就已经发现机械应力

在骨重建中的重要作用。大量的研究结果表明,卧床、制动和失重等缺乏机械应力刺激时,将使骨基质蛋白的合成、矿物质的含量和骨形成减少,骨吸收活动加强;而增加机械应力刺激后可促进骨形成,抑制骨吸收^[1,2]。然而,骨组织受到机械应力后,体内骨

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(10832012)
作者单位: 300161 天津,军事医学科学院卫生装备研究所
通讯作者: 张西正, Email: gyuanw@163.com

组织细胞如何应答机械应力刺激,并将刺激信号转导进入细胞内,从而调节骨改建的细胞机制尚未清楚认识。目前的研究结果表明,细胞对机械应力的反应在很大程度上依赖于其所受机械应力的。Runx2 是成骨分化特异性转录因子,参与了成骨细胞多种信号转导途径,可通过与骨代谢相关的多种细胞因子相互作用而调控成骨细胞的分化及活性。本文采用不同强度的力学刺激作用于小鼠 MC3T3-E1 细胞系,检测成骨关键基因 Runx2 在基因和蛋白水平的表达变化,为进一步研究成骨细胞响应力学刺激的分子机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用的小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 由协和医科大学基础研究所提供;α-MEM 培养基, Gibco 公司;胎牛血清,上海尚宝生物公司;100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素, Gibco 公司;TIANScrip RT Kit (cDNA 第一链合成试剂盒),天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Green 荧光染料,ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验装置:采用军事医学科学院卫生装备研究所自行研制的细胞基底应变加载装置(专利号:ZL200920250218.7)。加载原理可简化成如下力学模型(图1)。

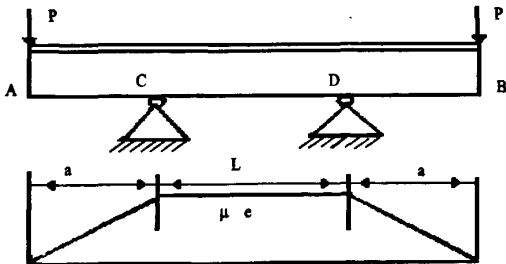


图1 基底拉伸应变加载装置模型图

1.2.2 细胞培养:小鼠 MC3T3-E1 培养于 10% 胎牛血清的 α-MEM 完全培养液中,细胞置 5% 二氧化碳、95% 湿度 37℃ 孵箱中培养。每 3 天更换 1 次培养液,用 0.25% 的胰酶消化传代培养。

1.2.3 Western blot 检测 Runx2 蛋白表达:取长满瓶壁的小鼠 MC3T3-E1 细胞,加入 PBS 平衡盐清洗 2 遍,0.25% 胰蛋白酶消化 5 min,按照 1×10^5 /ml 密度细胞悬液接种于培养单元的培养小室;放置于

CO₂ 培养箱中培养 24 h,待其完全贴壁。根据本实验室前期拉伸时效和量效条件的摸索,将接种的细胞随机分为 0 με、1000 με、1500 με、2000 με、2500 με、5000 με 组,最佳拉伸时间和频率为 1 次/d,每次 1 h,连续 3 d,频率为 0.5 Hz。按照上述分组对培养小室内的细胞进行拉伸,拉伸结束,每组各收集 4 培养小室细胞,加 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法进行定量,每次上样 30 μg。实验做三次生物学重复。显影后将条带扫描至计算机中,用 ImageJ 凝胶分析软件对显影条带进行半定量分析,AU ($D_{area} \cdot D_{density}$) 代表条带的面积和灰度值,Runx2/β-actin 的 AU 比值表示蛋白的相对含量。

1.2.4 Real-time PCR 检测细胞 Runx2 mRNA 表达:取上述分组中 0 με、2500 με、5000 με 组对培养小室内的细胞进行拉伸,拉伸结束,每组各收集 2 培养小室细胞,提取细胞总 RNA,用核酸定量仪测定其在 260、280 nm 处 OD 值,以确定核酸的纯度及浓度,调整浓度至 1 μg/μl, $A_{260/280}$ 比值在 1.8 ~ 2.0 表示 RNA 纯度较高。并按试剂盒说明逆转录成 cDNA。Runx2、GAPDH 引物序列有北京生工生物技术有限公司合成。Runx-2 引物序列:上游引物 5'-AAGTCGGTGCAAACCTTCT-3',下游引物 5'-TCTCGGTGG CTGGTAGTGA-3';GAPDH 引物序列:上游引物 5'-GGTCGGTGTGAACGGATTGG-3',下游引物 5'-ATGTAGGCC ATGAGGTCCACC-3'。采用相对定量 $\Delta\Delta Ct$ 法,选用 SYBR 染料进行 PCR 反应,PCR 反应体系(20 μl)如下:Fast SYBR Green Master Mix(2 ×), 10 μl;5 μM 上下游引物混合物,1 μl;cDNA 模板,1 μl;ddH₂O,8 μl。Runx2、GAPDH PCR 反应参数如下:预变性,95℃,20 s;变性,95℃ 3 s,退火、延伸,60℃,30 s,循环 40 次。实验采取每个样品设三个复孔,做三次生物学重复。

1.2.5 统计学处理:采用 SPSS11.5 统计软件进行统计学分析。数据用($\bar{x} \pm s$)表示,各组均数的比较行单因素方差分析(ANOVA),用最小显著差异法(LSD)作两两比较, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 不同基底拉伸应变对成骨细胞

Runx2 蛋白表达的影响:1500 με、2000 με、2500 με 组与 0 με 组相比 Runx2 蛋白表达显著增强($p < 0.01$);5000 με 组与 0 με 组相比 Runx2 蛋白表达显著降低($p < 0.01$)(图2,3)。

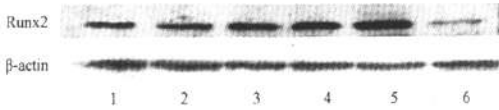


图2 Runx2的western blot检测

(1-6分别为0 $\mu\epsilon$, 1000 $\mu\epsilon$, 1500 $\mu\epsilon$, 2000 $\mu\epsilon$, 2500 $\mu\epsilon$, 5000 $\mu\epsilon$)

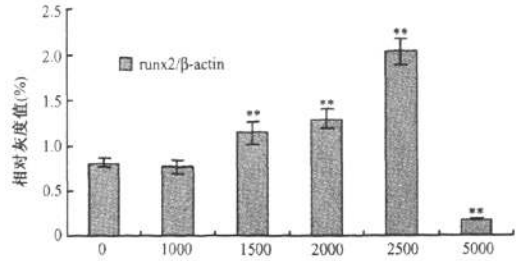


图3 不同应变对Runx2蛋白表达的影响

(* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\epsilon$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\epsilon$)

2.2 不同基底拉伸应变对成骨细胞

Runx2 mRNA的影响:本实验中,通过扩增曲线和融解曲线(图4),可以看出Runx2, GAPDH这两个基因都能有效扩增并且具有非常高的特异性。

2500 $\mu\epsilon$ 组与0 $\mu\epsilon$ 组相比Runx2 mRNA表达显著降低($P < 0.01$);5000 $\mu\epsilon$ 组与0 $\mu\epsilon$ 组相比Runx2 mRNA表达显著增强($P < 0.01$)(图5)。

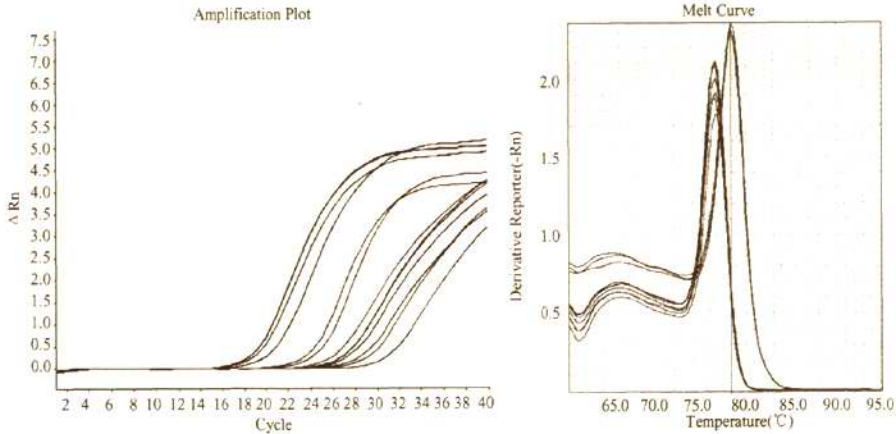


图4 Real-time PCR的扩增曲线和溶解曲线

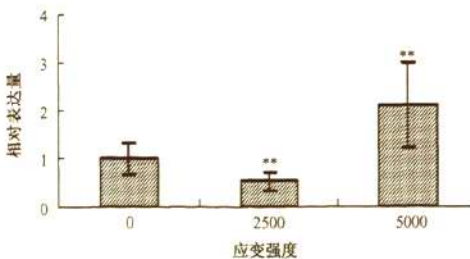


图5 不同应变对成骨细胞Runx2 mRNA表达的影响

(* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\epsilon$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\epsilon$)

3 讨论

成骨细胞来源于多潜能间充质骨源细胞,其既是应力感受细胞,又是应力效应细胞。成骨细胞受应力作用后,通过多种信号途径,如钙相关通路、

BMP/Smads、MAPK、Wnt-catenin通路等,可以调节成骨细胞自身及破骨细胞的分化及功能,实现骨代谢平衡^[3,4]。

Runx2是Runx转录因子家族中的重要成员,在成骨细胞分化、功能表达等过程中起了重要的作用。Runx2基因的突变和缺失可导致骨骼发育障碍等一系列疾病的发生^[6]。Runx2是调节成骨细胞生成的关键因子,Enomoto等^[5]使用目的基因敲除的办法,发现Runx2^{-/-}的小鼠不能有效地分化为成骨细胞,膜内和软骨内骨化均不能发生。Runx2不仅调节成骨细胞的分化,而且还调节成熟的成骨细胞形成骨,研究证实^[7]Runx2能促进骨细胞外基质蛋白的合成。

Runx2转录因子的表达也是受多种细胞因子、激素和内源活性物质的调节控制。力学拉伸刺激可增加骨形态发生蛋白(BMP)的表达,而在骨形态发

生蛋白(BMP)信号通路活化时 Runx2 和受体调节的 Smads 相互作用,协同调节目的基因的表达,使间充质骨原细胞成骨向分化^[8];另外骨形态发生蛋白也可使成骨细胞的 Runx2 表达上调,不过是通过 Dlx1 介导的间接调节^[9]。Jessop 等^[10,11]证实拉伸应变增强核内的 Runx2 结合 DNA 的活性。Wnt 信号通路也是力学转导通路之一,其抑制基因 sFRP1 被敲除的小鼠,表现为 Runx2 启动子活性增加,mRNA 含量上升 7~8 倍,并且骨钙素(Osteocalcin)的表达也明显上升^[12,13]。综上可知 Runx2 是成骨细胞机械刺激的重要靶点,许多分子可激活或者增强其转录活性。

本实验室前期实验已证实:生理范围内 2000 μe 和 2500 μe 基底拉伸应变可以明显促进成骨细胞增殖活性和 ALP 分泌。超生理范围 5000 μe 基底拉伸可抑制细胞的增殖和 ALP 分泌。本实验研究显示:生理剂量 1500 μe 、2000 μe 、2500 μe 的拉伸应变可显著增 MC3T3-E1 细胞 Runx2 蛋白的表达,超生理剂量 5000 μe 显著降低 Runx2 蛋白表达;从 Runx2 的生物作用来说,这与前期实验结果一致。Ziros 等^[14]对 hPDL 成骨细胞施加拉伸,作用 0.5 h 开始 Runx2 mRNA 的表达显著增加,核内的 Runx2 蛋白在 6 h 后才明显增加。Mehrotra 等^[15]在实验中对 MC3T3-E1 细胞施加流体剪切力,作用 0.5 h 后 Runx2 mRNA 和蛋白表达未发生显著性变化。以上说明力学刺激对成骨细胞 Runx2 的影响还与实验条件的控制,如所用细胞来源、加载应力的性质、大小等因素相关,分析应力的作用效应时有必要考虑这些因素的干扰。

本实验对成骨细胞施加 2500 μe 、5000 μe 载荷时,Runx2 mRNA 的表达与蛋白表达不一致。2500 μe 组与 0 μe 组相比 Runx2 mRNA 表达降低,而 Runx2 蛋白表达增加,可能是 Runx2 自身负反馈调控机制的作用,在该基因的 5' 端的表达调控序列中具有至少 3 个自身结合位点,只要有一个完整自身结合位点存在,过量表达的 Runx2 蛋白就可以反馈地抑制该基因的表达^[16]。5000 μe 组与 0 μe 组相比 Runx2 mRNA 表达增强,可能因为实验中的力学加载方式是间歇性的,超生理应变的 5000 μe 并没有对细胞形成不可逆的损伤,在第三天的一小时力学刺激后,仍可引起细胞 Runx2 mRNA 的较大变化。Runx2 是否通过负反馈的方式抑制其过量表达,这个问题还有待进一步的研究证实。

Runx2 作为成骨细胞的特异转录因子,对骨组

织的形成和重建起重要作用。同时 Runx2 作为成骨细胞机械刺激的重要靶点,对其感受力学刺激后基因表达调控的分子机制的进一步研究,将有助于应用药物联合锻炼来防治骨折和骨质疏松等疾病。

【参 考 文 献】

- [1] Frost HM. Structural adaptations to mechanical usage: Redefining Wolff law; the bone remodeling problem. *Anat Rec*, 1990, 226 (4): 403-422.
- [2] Wayne AO, Helmke BP, Blackman BR, et al. Mechanisms of Mechanotransduction. *Developmental Cell*, 2006, 10: 11-20.
- [3] Papachroni KK, Karatzas DN, Papavasiliou KA, et al. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends in Molecular Medicine*, 2009, 15(5): 208-216.
- [4] Rubin J, Rubin C, Jacobs CR, et al. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene*, 2006, 367: 1-16.
- [5] Enomoto H, Furuichi T, Zanmama A, et al. RUNX2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. *J Cell Sci*, 2004, 117 (Pt 3): 417-425.
- [6] Zaidi SK, Pande S, Pratap J, et al. Runx2 deficiency and defective subnuclear targeting bypass senescence to promote immortalization and tumorigenic potential. *PANS*, 2007, 104 (50): 19861-19866.
- [7] Komor IT. Regulation of skeletal development by the RUNX family of transcription factors. *J Cell Biochem*, 2005, 95 (3): 445-453.
- [8] Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF- β superfamily and Runx proteins. *Oncogene*, 2004, 23: 4232-4237.
- [9] Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF- β 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *JBiol Chem*, 2003, 278: 34387-34394.
- [10] Jessop HL, Rawlinson SCF, Pitsillides AA, et al. Mechanical Strain and Fluid Movement Both Activate Extracellular Regulated Kinase (ERK) in Osteoblast-like Cells but via Different Signaling Pathways. *Bone*, 2002, 31: 186-194.
- [11] Ziros PG, Rojas Gil AP, Tassos G, et al. The Bone-specific Transcriptional Regulator Cbfa1 is a Target of Mechanical Signals in Osteoblastic Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(26): 23934-23941.
- [12] Gaur T, Lengner C J, Hovhannisyan H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating RUNX2 gene expression. *J Biol Chem*, 2005, 280 (39): 33132-33140.
- [13] Armstrong, VJ, Muzylak M, Sinters A, et al. Wnt/b-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor- α . *J Biol Chem*, 2007, 282: 20715-20727.
- [14] Ziros PG, Rojas Gil AP, Georgakopoulos T, et al. The Bone-specific Transcriptional Regulator Cbfa1 Is a Target of Mechanical

Signals in Osteoblastic Cells. J Biol Chem, 2002, 277 (26): 23934-23941.

[15] Mehrotra M, Saegusa M, Voznesensky O, et al. Role of Cbfa1/Runx2 in the fluid shear stress induction of COX-2 in osteoblasts. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 341: 1225-1230.

[16] Drissi H, Luc Q, Shakoor I R, et al. Transcriptional autoregulation of the bone related CBFa1/RUNX2 gene. J Cell Physiol, 2000, 184 (3): 341-350.

(收稿日期: 2010-09-06)

(上接英文目录)

Investigation of bone mineral density and the incidence of osteoporosis in healthy Manchus, Han, and Korean nationalities in Dandong area	239
<i>ZHANG Xiaomei, LI Jinji, WU Yaoqiang, et al.</i>	
Analysis of bone mineral density measured with QUS and SPA in 14851 residents aged 20-80 years old in Yuxi	243
<i>LIN Ming, JIN Pingyan, SUN Tianming</i>	
Study on the correlation between the alteration of bone mass and bone metabolic markers in residents aged more than 20 years old in Nanchang	249
<i>TU Ping, DENG Bo, XU Dingbo, et al.</i>	
Analysis of peripheral bone mineral content measurement results in the elderly of Jilin province	253
<i>LIU Lize, GAO Lei, DENG Xiaoming, et al.</i>	
The epidemiological investigation of the bone mineral density in She and Han nationalities in Fujian region	256
<i>WANG Guorong, YANG Junhua, ZHANG Zhihai, et al.</i>	
Research progress in biomechanical models using demineralized osteoporotic vertebra body	259
<i>CUI Yi, WU Zixiang, LIU Da, et al.</i>	
Research progress of finite element analysis in osteoporotic hip fracture	264
<i>WANG Yilian, LI Chunwen, ZHENG Tingting, et al.</i>	
New research progress in effects of statins on osteoporosis	268
<i>ZHANG Yue, CHEN Sijiao, WANG Haiping, et al.</i>	
Study progress between bone metabolism and iron metabolism of correlated index	272
<i>ZHAO Liping, XU Youjia</i>	
Two important signal transduction pathways in bone formation.	275
<i>MING Leiguo, CHEN Keming</i>	