

PGE2 抑制肿瘤坏死因子诱导的成骨细胞凋亡

杨周岐 孟芮 王哲 张维 商澎*

(空间生物实验模拟技术重点实验室, 西北工业大学生命学院特殊环境生物物理学研究所, 西安 710072)

摘要 前列腺素E2(PGE2)通过自分泌或旁分泌方式调节成骨细胞的增殖和分化。本文以小鼠原代成骨细胞和成骨样细胞 MC3T3-E1 为实验材料, 研究了 PGE2 对肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导的成骨细胞凋亡的调节作用。检测发现, 振荡型流体剪切力(OFSS)刺激可诱导成骨细胞内环氧合酶 2(COX-2)表达升高, 进而促进 PGE2 合成, 并抑制 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡。COX-2 选择性活性抑制剂 NS-398 显著促进 TNF- α 诱导的成骨细胞内半胱天冬酶 3(caspase-3)的激活, 且呈时间依赖性。Hoechst 33258/PI 染色检测发现, NS-398 促使 TNF- α 诱导的成骨细胞膜通透性进一步增强, 核染色质浓缩加剧, 而 PGE2 可显著抑制这一效应。Caspase-3 活性检测证实, NS-398 显著促进 TNF- α 诱导的成骨细胞内 caspase-3 活性增强, 外源性 PGE2 可有效对抗该效应。这些结果表明, 内源性和外源性 PGE2 可抑制 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡发生。

关键词 前列腺素 E2; 成骨细胞; 凋亡; 肿瘤坏死因子- α

成骨细胞骨形成作用与破骨细胞骨吸收作用之间的代谢平衡, 决定着骨骼系统的动态重塑过程, 因此, 研究成骨细胞的功能调控对骨骼系统健康的维持具有重要意义。成骨细胞功能受多种因素调节, 如力学信号、细胞因子、生长因子、激素分泌及骨骼微环境改变等^[1]。其中, 前列腺素(prostaglandin E2, PGE2)作为一种重要的细胞生长调节因子, 其对骨组织细胞功能的调节作用已受到广泛关注和研究。

细胞内 PGE2 的产生是以膜甘油磷酸为前体, 由环氧合酶(cyclooxygenase, COX)COX-1、COX-2 及前列腺素 E 合成酶 2(prostaglandin E synthetase 2, PGES2)等催化合成。在应激条件下, 骨组织细胞内增多的 PGE2 主要由 COX-2 途径合成^[2,3]。体内实验表明, 系统性给服 PGE2 可促进大鼠骨髓基质细胞分化和骨质沉积, 且对成年大鼠骨髓基质细胞成骨分化有更显著的促进作用^[4]。PGE2 通过 EP4/cAMP/PKA 途径抑制破骨细胞骨吸收活性, 且这种抑制作用呈剂量和时间依赖性^[5]。COX-2 基因敲除可促进小鼠颅骨成骨细胞的增殖, 但对细胞凋亡无显著影响。外源性 PGE2 可抑制野生型小鼠成骨细胞增殖并促进分化, 而使用 COX-2 活性抑制剂可促进其增殖^[6]。COX-2 过表达可抑制人骨肉瘤细胞(Saos-2)的增殖并促进其凋亡的发生^[7], 抑制 COX-2 活性可促使小鼠胚胎干细胞发生凋亡, 而外源性 PGE2 的加入可明显抑制这一效应^[8]。进一步研究显示, PGE2 通过与 EP4

受体结合促进大鼠骨髓基质细胞增殖和分化, 且鞘氨醇激酶活性增强, 同时 caspase-3 和 caspase-8 活性被抑制, 从而抑制茚甲新诱导的骨髓基质干细胞凋亡^[9]。COX-2 表达升高或加入外源性 PGE2 可抑制辐射诱导的上皮/表皮细胞凋亡发生^[10,11]。

这些研究表明, PGE2 通过自分泌和旁分泌方式调节成骨及其前体细胞增殖和分化, 而 PGE2 对细胞凋亡的调节作用, 由于所用细胞来源、类型及凋亡诱导方式不同, 结论并不一致。本文采用肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 结合放线菌酮(cycloheximide, CHX)诱导成骨细胞凋亡, 以半胱天冬酶 3(cysteine-aspartic proteases 3, caspase-3)激活为细胞凋亡检测标志, 研究了 PGE2 对小鼠原代及成骨细胞系凋亡的调节作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与凋亡诱导

颅骨成骨细胞分离与鉴定^[12,13]: 取出生 3~5 天乳鼠 10~12 只, 氯仿麻醉处死, 75% 酒精灭菌后取颅骨剪碎, 37℃ 震荡条件下 0.2% 胶原酶 P(Roche)结合 0.25% 胰酶依次消化 5 min、15 min 及 25 min, 收集后 2 次消化细胞。原代细胞经氮四唑蓝 / 对甲苯胺

收稿日期: 2010-07-23 接受日期: 2010-10-26

国家自然科学基金(No.30970689)资助项目

* 通讯作者。Tel: 029-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

蓝(NBT/BCIP)染色法进行鉴定,发现绝大多数细胞碱性磷酸酶表达阳性(图片未显示)。原代细胞和MC3T3-E1细胞采用10% FBS(Hyclone)+1% 双抗的MEM培养。

凋亡诱导^[12]: 细胞按150个/mm²接种于60 mm培养皿,采用10% FBS(Hyclone)+1% 双抗的MEM(Gibco)于37℃、5% CO₂条件培养24 h至70%~80%融合。更换培养基,以0.5% FBS+1% 双抗的MEM培养过夜。加入TNF- α (PeproTech)/CHX(Sigma),终浓度为10 ng/ml和10 μ g/ml,37℃、5% CO₂条件诱导处理。预实验显示原代成骨细胞诱导6 h(MC3T3-E1诱导4 h)后,显微镜下可见明显的凋亡细胞,且检测到活化的caspase-3片段。因此针对不同细胞,我们选取不同的凋亡诱导时间:原代细胞诱导6 h,成骨样细胞MC3T3-E1诱导处理4 h。

1.2 MTT 实验

MC3T3-E1细胞按150个/mm²接种于96孔板,采用10% FBS+1% 双抗的MEM于37℃、5% CO₂条件培养24 h至80%融合,分别加入NS-398(Alexis,终浓度10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L和80 mmol/L)和PGE2(Sigma,终浓度5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L和40 mmol/L),于37℃、5% CO₂条件孵育12 h,加入MTT(终浓度0.5 mg/ml)继续孵育4 h。吸除培养基,加入200 μ l DMSO溶解,490 nm波长测定OD值。

1.3 流体加载实验及后续凋亡诱导

MC3T3-E1细胞按150个/mm²接种于75 mm \times 38 mm载玻片,用10% FBS+1% 双抗的MEM于37℃、5% CO₂条件培养24 h后,换为0.5% FBS+1% 双抗的MEM于37℃、5% CO₂条件继续培养过夜。将接种细胞的载玻片置于特殊设计的平行板腔室中,以0.5% FBS+1% 双抗的MEM为流体介质。注入流体后加上盖板密闭,腔室一端接口经软管连接1 ml进样器,进样器置于特殊设计的驱动装置上,微型泵驱动进样器往复运动;腔室另一端接口连接软管开放置于培养箱,加载振荡型流体剪切力(oscillatory fluid shear stress, OFSS, 12 dyn/cm², 1 Hz)刺激一定时间。对照组细胞采用同样培养条件,但不施加流体刺激。流体刺激完成后,取出载玻片放入含TNF- α /CHX(终浓度10 ng/ml和10 μ g/ml)的MEM诱导处理4 h,2 \times 裂解液提取蛋白样品,-20℃保存。

1.4 Western 印迹

2 \times 裂解液配制:取10 ml 4 \times 裂解液(1 ml 20% SDS,2 ml 甘油,500 μ l β -巯基乙醇,2.5 ml Tris-HCl

pH 6.8,300 μ l 1%溴酚蓝乙醇溶液,加水至10 ml),与等体积尿素溶液(0.1 mol/L NaH₂PO₄,0.01 mol/L Tris,8 mol/L 尿素,pH 8.0)混合。氨基黑法测定总蛋白浓度,20 μ g/孔上样,SDS-PAGE胶分离、转膜,5%脱脂奶粉(TBST)封闭30 min,一抗、二抗孵育,ECL化学发光检测。所用一抗:COX-2 (Santa Cruz),caspase-3 (intact/cleaved, Cell Signal),ph-histone (Cell Signal),vinculin (Sigma),GAPDH (Santa Cruz)。二抗:GAM-HRP、GAR-HRP及DAG-HRP (Jackson Immuno Res)。采用Fuji LAS-3000(Fujifilm)进行膜成像扫描,Multi Gauge V2.3软件用于图像分析。

1.5 Hoechst+PI 双染检测凋亡

MC3T3-E1细胞以150个/mm²接种于35 mm培养皿,10% FBS+1% 双抗的MEM于37℃、5% CO₂条件培养24 h至~80%融合,更换培养基为0.5% FBS+1% 双抗的MEM,NS-398(20 mmol/L)和PGE2(5 mmol/L)预处理1 h后,加入TNF- α /CHX进行诱导处理。为观察到明显的核变化,我们适当延长后续的TNF- α /CHX诱导处理时间至6 h。诱导处理完成后,依次进行Hoechst 33258(终浓度5 μ g/ml)染色15 min,碘化丙啶(PI,终浓度10 μ g/ml)染色10 min,PBS冲洗后用4℃预冷的多聚甲醛固定15 min,PBS冲洗后,倒置荧光显微镜(Leica DMIL)下观察拍照。

1.6 Caspase-3 活性检测

MC3T3-E1细胞按150个/mm²接种于铺有多聚赖氨酸(Sigma)的不透明96孔板,10% FBS+1% 双抗的MEM于37℃、5% CO₂条件培养24 h,更换培养基为0.5% FBS+1% 双抗的MEM,加入NS-398(20 mmol/L)和PGE2(5 mmol/L)预处理1 h后加TNF- α /CHX(终浓度10 ng/ml和10 μ g/ml)诱导处理6 h。按照caspase-3活性检测试剂盒(ApoLive-Glo multiplex assay, Promega)说明,依次加入试剂,酶标仪检测细胞活性(荧光,400_{Ex}/505_{Em})和caspase-3活性(化学发光)。

1.7 数据处理

采用t-test检验对Western结果进行统计分析, χ^2 检验用于分析Hoechst/PI染色后凋亡细胞比例。 $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 OFSS 促进成骨细胞内 COX-2 表达、抑制 TNF- α 诱导的 caspase-3 激活

已发表结果表明,单向流体剪切力刺激促使成骨细胞内COX-2表达及PGE2分泌增加^[14]。然而,由

于成骨细胞对单向流与振荡型流体刺激的反应并不一致^[15], 我们通过预实验首先检测了 OFSS 刺激 0.5 h、1 h、2 h、4 h 及 6 h 后, MC3T3-E1 细胞内 COX-2 的表达变化。结果表明, OFSS 刺激 4 h 促使细胞内 COX-2 表达显著升高(图 1A 和图 1B), 随流体刺激时间的延长, 后续升高并不明显。这一现象在原代成骨细胞内也得到证实(图片未显示)。此外, 我们及其它实验室的结果也表明, 流体刺激诱导成骨细胞 PGE2 分泌升高, 在采用 COX-2 抑制剂 NS-398 后, 流体诱导的成骨细胞内 PGE2 分泌增多被有效抑制^[14, 16], 这说明流体刺激诱导的 PGE2 升高主要来源于胞内 COX-2 合成途径。因此, 在检测 OFSS 引起的 COX-2 表达及内源性 PGE2 分泌是否与成骨细胞凋亡发生有关时, 我们选用了 4 h 流体刺激时间点。检测结果显示, MC3T3-E1 细胞 OFSS 刺激 4 h, 并采用 TNF- α 继续诱导处理 4 h 后, 流体处理组细胞内 TNF- α 诱导的 caspase-3 激活被显著抑制(图 1C 和图 1D), 且核内组蛋白(histone)的磷酸化也被有效抑制(图 1E 和图 1F), 表明流体刺激可对抗 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡发生。

2.2 NS-398 和 PGE2 对细胞的影响

为鉴定 COX-2 选择性抑制剂 NS-398 和 PGE2 对细胞的影响并确定合适使用浓度, 采用 MTT 法检测了不同浓度 NS-398 和 PGE2 对 MC3T3-E1 细胞活性的影响。NS-398 和 PGE2 处理 12 h 后, NS-398 促使成骨细胞活性显著下降, 且呈一定的剂量依赖性。此外, 5 mmol/L PGE2 促使成骨细胞活性增强, 当进一步加大剂量, 细胞活性有所下降, 且与对照组无显著差异(图 2)。这种细胞活性的变化由细胞增殖还是凋亡变化引起, 有待后续检测结果的证实。

2.3 NS-398 促进 TNF- α 诱导的原代成骨细胞内 caspase-3 的激活

预实验结果表明, 原代成骨细胞经 TNF- α 诱导处理 6 h 后显微镜下可见明显凋亡特征的细胞, 且检测到活化的 caspase-3 片段。考虑到 TNF- α 诱导处理需要 6 h 的时间, 我们选用了 NS-398 预处理 1 h 和持续处理 7 h(预处理 1 h+ 后续 6 h)2 个时间点, 检测了 NS-398 抑制 COX-2 活性对细胞凋亡的影响是否具有时间依赖性。

结果表明, 单独使用 NS-398 预处理 1 h 和持续

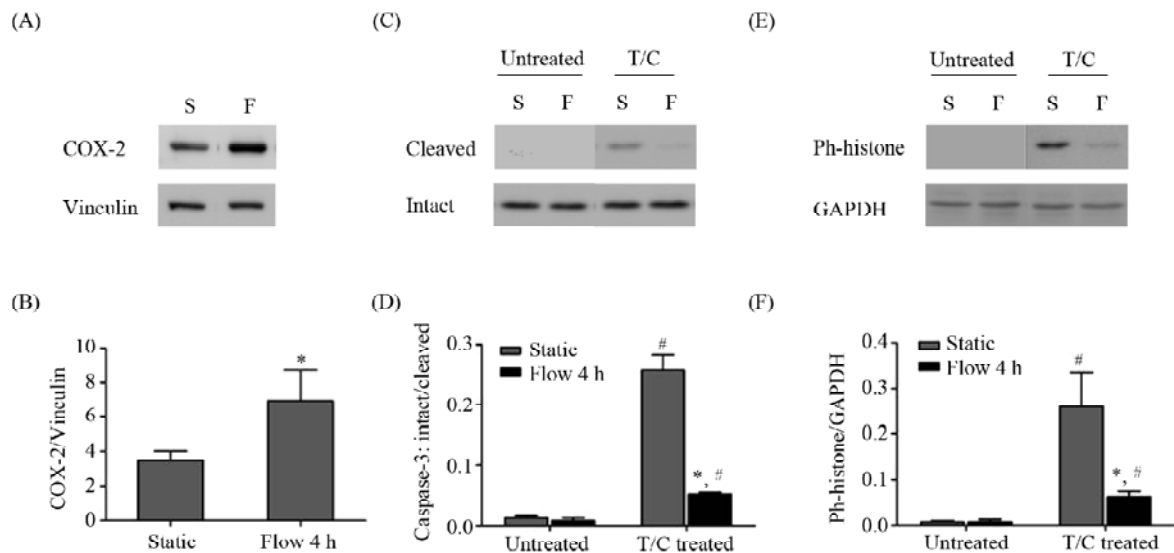


图1 免疫印迹检测流体刺激和 TNF- α 处理诱导成骨细胞内 COX-2 表达、caspase-3 活化及 histone 的磷酸化水平

A, C, E: 流体剪切力刺激 4 h 后, 在用 TNF- α /CHX 继续诱导 4 h 或未诱导处理的情况下, 通过免疫印迹实验检测 MC3T3-E1 细胞内 COX-2 表达、caspase-3 活化及 histone 的磷酸化, vinculin, caspase-3 前体及 GAPDH 分别用作内参。S 或 F: 静止组或流体处理组; T/C: TNF- α /CHX(终浓度 10 ng/ml 和 10 μ g/ml)诱导处理。B, D, F: 图 A、C 及 E 中各条带的定量分析, 每组样品 $n=3$ 。* $P<0.05$ 代表与静止组比较差异具有显著性; # $P<0.01$ 代表与未处理组比较差异具有显著性。

Fig. 1 Immunoblot assay for testing OFSS-induced expressions of COX-2, activated caspase-3 and phosphorylated histone in TNF α -treated or untreated MC3T3-E1 osteoblasts

A, C, E: MC3T3-E1 osteoblasts were subjected to 4 h OFSS stimulation followed by another 4 h TNF- α /CHX treatment or untreated. Immunoblot assay was employed to detect the expressions of COX-2, cleaved caspase-3 or phosphorylated histone, which was normalized to vinculin, intact caspase-3 or GAPDH respectively. S or F: static or 4 h flow; T/C: TNF- α /CHX (final concentration 10 ng/ml and 10 μ g/ml) treatment. B, D, F: quantification of immunoblots in A, C or E, $n=3$. * $P<0.05$ vs static; # $P<0.01$ vs T/C untreated.

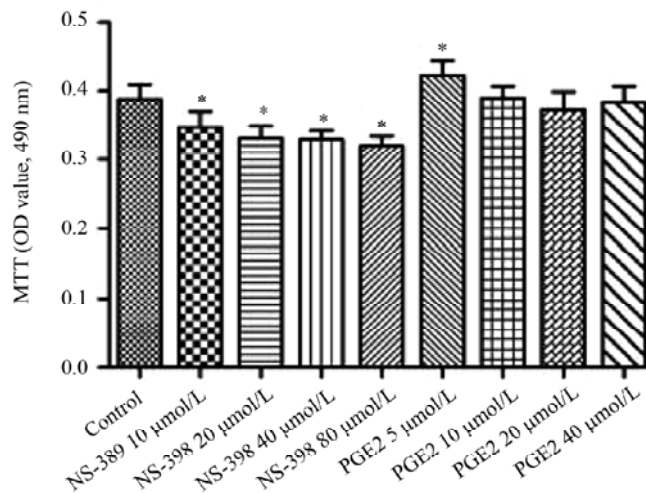


图2 MTT分析检测NS-398和PGE2对成骨样细胞MC3T3-E1活性的影响

采用不同浓度的NS-398(10 mmol/L, 20 mmol/L, 40 mmol/L, 80 mmol/L)或PGE2(5 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L, 40 mmol/L)处理MC3T3-E1成骨样细胞12 h后, MTT法检测细胞活性的变化, 每组样品 $n=3$ 。* $P<0.01$ 代表与对照组比较差异具有显著性。

Fig. 2 MTT assay for detecting the activity of MC3T3-E1 cells treated with different concentrations of NS-398 or PGE2

MC3T3-E1 osteoblasts were treated with different concentrations of NS-398 (10 mmol/L, 20 mmol/L, 40 mmol/L, 80 mmol/L) or PGE2 (5 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L, 40 mmol/L) for 12 h, then MTT assay was employed to detect the change of cell activity, $n=3$. * $P<0.01$ vs control.

处理7 h并未引起成骨细胞内caspase-3明显激活(图3C和图3D)。然而, NS-398预处理1 h可明显促进后续TNF- α 诱导的成骨细胞内caspase-3的活化(图3A和图3B), 且随着NS-398处理时间延长至7 h对caspase-3的激活作用更显著(图3C和图3D)。表明抑制COX-2活性, 进而抑制内源性PGE2合成对TNF- α 诱导的细胞凋亡具有显著促进作用, 且NS-398处理对TNF- α 诱导的细胞凋亡促进作用具有时间依赖性。

2.4 Hoechst-PI双染检测成骨细胞凋亡

MC3T3-E1成骨细胞经NS-398或PGE2预处理1 h, 并采用TNF- α /CHX继续诱导处理6 h后, 显微镜下观察, 诱导组可见具有明显凋亡特征的皱缩或漂浮细胞。Hoechst 33258+PI双染检测发现, NS-398处理促进TNF- α /CHX诱导的成骨细胞凋亡比例明显上升, 细胞膜通透性显著增强, 核染色质浓缩更加明显(图4A), 加入外源性PGE2可有效抑制这一效应(图4B)。这些结果进一步证明, 外源性PGE2也可有效对抗TNF- α /CHX诱导的成骨细胞凋亡。

2.5 Caspase-3活性检测

Caspase-3的激活是细胞进入凋亡程序的重要标志^[12,17]。为此, 采用caspase-3活性检测试剂盒, 检测了NS-398、PGE2预处理1 h及后续TNF- α /CHX诱导处理6 h后, 成骨细胞内caspase-3的活性。数

据显示, NS-398单独处理7 h对caspase-3活性无显著影响。当使用NS-398预处理1 h可明显促进TNF- α /CHX诱导的caspase-3活性增强, 加入外源性PGE2可显著抑制这一效应。这些结果进一步证实, 外源性PGE2对TNF- α /CHX诱导的成骨细胞凋亡有显著抑制作用。

3 讨论

PGE2是一种重要的细胞生长和调节因子, 在体内多个组织均发挥着重要的调节作用^[18]。对骨组织来说, PGE2主要由成骨细胞和骨细胞产生, 并通过自分泌和旁分泌方式调节成骨及其前体细胞、破骨细胞和骨细胞功能及细胞间通讯^[12,19]。研究表明, PGE2促进成骨及其前体细胞的分化和增殖, 从而促进骨质形成。而PGE2对骨组织细胞凋亡的调节作用, 由于所用细胞类型及凋亡诱导方式不同, 目前还无一致结论。本文以小鼠原代颅骨成骨细胞和成骨样细胞MC3T3-E1为对象, 通过多种实验检测发现, 内源性和外源性PGE2均可有效抑制TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡发生。

细胞内PGE2的产生是以膜甘油磷酸为前体, 由COX-1、COX-2及前列腺素E酶2(prostaglandin E synthetase 2, PGES2)等催化合成^[2,18]。在应激条件下, 骨组织细胞内增多的PGE2主要由COX-2途径合

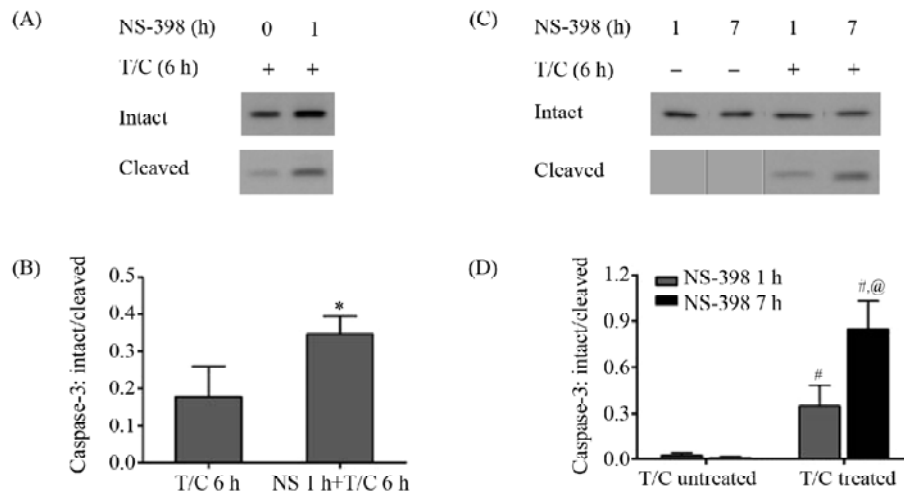


图3 免疫印迹检测 NS-398 对 TNF- α 诱导的原代成骨细胞内 caspase-3 活化片段表达的影响

A: 正常培养或经 20 mmol/L NS-398 预处理成骨细胞 1 h 后, 换用含 TNF- α /CHX 的培养基继续诱导 6 h, 免疫印迹实验检测胞内 caspase-3 活化片段; C: 原代成骨细胞经 20 mmol/L NS-398 预处理 1 h 后, 换为含 TNF- α /CHX 的培养基或含 TNF- α /CHX 和 20 mmol/L NS-398 的培养基继续诱导 6 h, 免疫印迹实验检测胞内 caspase-3 活化片段; B, D: 图 A 和 C 中各条带的定量分析, 每组样品 $n=3$ 。T/C: TNF- α /CHX 诱导(终浓度 10 ng/ml 和 10 μ g/ml); Intact 或 Cleaved: 未活化或活化的 caspase-3。* $P<0.05$; # $P<0.01$ 代表与未处理组比较; @ $P<0.05$ 代表与 1 h NS-398 处理组比较。

Fig. 3 Immunoblot assay for detecting the effect of NS-398 on TNF α -induced caspase-3 activation in primary mouse osteoblasts

A: the primary osteoblasts were subjected to 1 h pretreatment with 20 mmol/L NS-398 or unpretreatment followed by 6 h TNF- α /CHX induction; C: after pretreated with 20 mmol/L NS-398 for 1 h, the primary osteoblasts were then continuously treated in the media containing TNF- α /CHX or in the media containing both TNF- α /CHX and 20 mmol/L NS-398 for 6 h. Immunoblot assay was performed to detect the activation of caspase-3 in cells; B, D: quantification of immunoblots in A and C, $n=3$. T/C: TNF- α /CHX treatment (final concentration 10 ng/ml and 10 μ g/ml). * $P<0.05$ vs unpretreated; # $P<0.01$ vs T/C untreated; @ $P<0.05$ vs 1 h NS-398 pretreated.

成^[2]。在使用 COX-2 选择性活性抑制剂 NS-398 和外源性 PGE2 处理后, MTT 结果显示 NS-398 致成骨细胞活性下降, 且呈一定的剂量依赖趋势, 而 PGE2 对细胞活性有一定促进作用。后续实验也证实, 造成这种细胞活性下降的一个原因是 COX-2 活性抑制对细胞凋亡有促进作用。以往研究发现, 流体力学刺激可显著对抗 TNF- α 诱导的成骨细胞及骨细胞凋亡^[12,20], 而其作用机制未完全阐明。我们及其他一些实验室的结果表明, 力学刺激可显著促进成骨细胞内 COX-2 表达, 且培养基中 PGE2 分泌也明显升高^[14,15,21]。结合本文研究结果, 可以看出, 流体刺激诱导的内源性 PGE2 分泌增加可部分对抗 TNF- α 诱导的细胞凋亡发生。

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中发挥着重要的作用, 其中 caspase-3 为关键的执行分子, 我们在文中以 caspase-3 的激活作为判断细胞进入凋亡程序的主要标志。此外, 细胞内组蛋白 histone 磷酸化可导致核染色质结构变化并发生浓缩, 进而引起细胞凋亡, 因而, 我们通过检测 TNF- α 诱导的成骨细胞内磷酸化组蛋白水平及核结构变化, 也作为判断细胞凋

亡的一个指标。研究表明, 绝经致骨质疏松及类风湿关节炎病人体内 TNF- α 水平升高, 调节成骨细胞及破骨细胞功能, 表明 TNF- α 的分泌有助于骨相关疾病的发生^[22,23]。本实验采用 TNF- α 诱导凋亡, 一定程度上模拟了骨质疏松或骨丢失病人体内病理环境。在使用 TNF- α 诱导细胞凋亡的过程中, 原代成骨细胞与成骨样细胞系 MC3T3-E1 所需处理时间不同, 可能由于原代细胞分泌更多胞外基质, 或其胞膜 TNF- α 受体表达与 MC3T3-E1 有差异, 造成其凋亡诱导需要更长的时间。TNF- α 诱导细胞内 caspase-3 的激活涉及多个信号通路, 包括膜受体途径分子如核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF κ B)^[24]、磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine-specific protein kinase, Akt)^[12,25]、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, Erk)^[26]、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)^[27]及线粒体途径分子如 Bcl-2/Bcl-x1、Bad/Bax 等^[28]的激活或表达变化。PGE2 抑制成骨细胞凋亡作用的发现, 使我们对 PGE2 在体内调节骨形成的机制有了更深入全面的了解, 而 PGE2

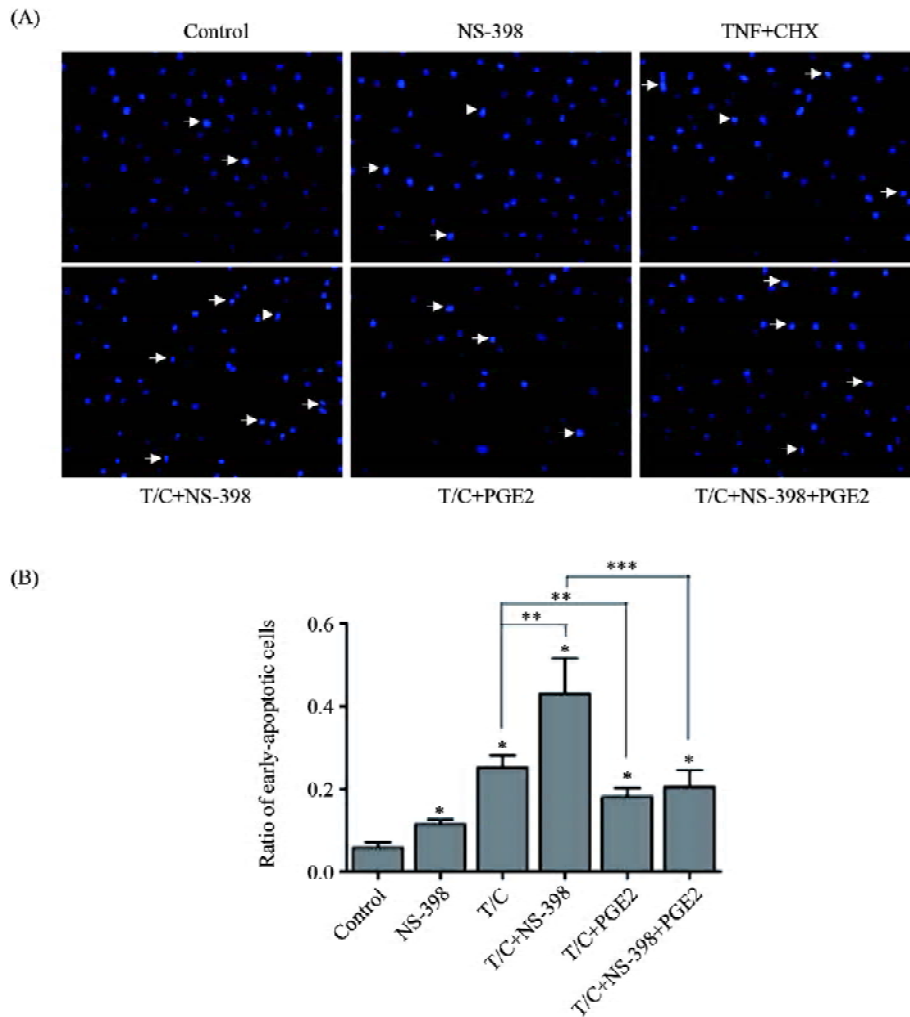


图4 Hoechst 33258/PI染色检测外源性PGE2和NS-398对TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡的影响

A: 成骨样细胞MC3T3-E1经20 mmol/L NS-398、5mmol/L PGE2或二者结合使用处理1 h, 再继续使用TNF- α /CHX诱导处理6 h后, Hoechst 33258/PI染色于倒置荧光显微镜下观察(Leica, DMIL)观察细胞核变化。图中箭头表示具有早期凋亡特征的细胞; B: 图A中凋亡细胞比例的定量分析。每组随机选取6张图片, 采用ImageJ软件标记、计算具有典型凋亡特征的细胞比例, 卡方检验用于数据统计分析。T/C: TNF- α /CHX诱导处理(终浓度10 ng/ml和10 μ g/ml)。* P <0.001代表与对照组比较差异具有显著性; ** P <0.01代表与T/C组比较差异具有显著性; *** P <0.01代表与T/C+NS-398组比较差异具有显著性。

Fig. 4 Hoechst 33258/PI staining for testing the effects of exogenous PGE2 or NS-398 on TNF α -induced apoptosis in MC3T3-E1 osteoblasts

A: MC3T3-E1 cells were pretreated with 20 mmol/L NS-398/5 mmol/L PGE2 or both for 1 h followed by 6 h TNF- α /CHX treatment. The change of cell nucleus shape were observed under the converted fluorescence microscope (Leica, DMIL) by Hoechst 33258/PI staining. Arrow representative early apoptotic cells. B: quantification of images in A. For each group six images were applied to count the classic apoptotic cell and total cell with the software Image J (NIH), and the ratio of apoptotic cells was calculated, chi-square test was employed to analyze the data, $n=6$. T/C: TNF- α /CHX treatment (10 ng/ml and 10 μ g/ml). * P <0.001 vs control; ** P <0.01 vs T/C group; *** P <0.01 vs T/C+NS-398 group.

与其受体结合, 如何特异性地影响其中某个或多个信号通路, 进而抑制TNF- α 诱导的caspase-3激活, 还有待进一步实验研究证实。

参考文献(References)

- Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003; 423 (6937): 349-55.
- Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21 (5): 294-301.
- Li L, Pettit AR, Gregory LS, Forwood MR. Regulation of bone biology by prostaglandin endoperoxide H synthases (PGHS): a rose by any other name. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17 (3): 203-16.
- Keila S, Kelner A, Weinreb M. Systemic prostaglandin E2 increases cancellous bone formation and mass in aging rats and stimulates their bone marrow osteogenic capacity *in vivo* and *in vitro*. *J Endocrinol* 2001; 168 (1): 131-9.

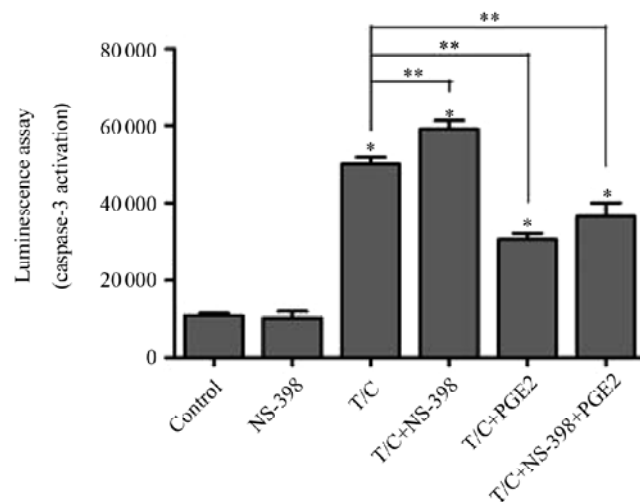


图5 NS-398和PGE2对TNF- α 诱导的成骨样细胞MC3T3-E1内caspase-3活性的影响

成骨样细胞MC3T3-E1经20 mmol/L NS-398、5 mmol/L PGE2或二者结合使用处理1 h,再继续使用TNF- α /CHX诱导处理6 h后,通过化学发光法检测各组细胞内caspase-3的活性(ApoLive-Glo multiplex assay kit),每组样品 $n=3$ 。T/C: TNF- α /CHX诱导处理(终浓度10 ng/ml和10 μ g/ml)。* $P<0.001$ 代表与对照组比较差异具有显著性,** $P<0.001$ 代表与T/C组比较差异具有显著性。

Fig. 5 The effects of NS-398 and PGE2 on the TNF α -induced caspase-3 activation in MC3T3-E1 osteoblasts

MC3T3-E1 cells were pretreated with 20 mmol/L NS-398/5 mmol/L PGE2 or both for 1 h followed by 6 h TNF- α /CHX treatment. The activity of caspase-3 in osteoblasts was detected with ApoLive-Glo multiplex assay kit through chemiluminescence assay, $n=3$. T/C: TNF- α /CHX treatment (10 ng/ml and 10 μ g/ml). * $P<0.001$ vs control; ** $P<0.001$ vs T/C group.

- 5 Mano M, Arakawa T, Mano H, Nakagawa M, Kaneda T, Kaneko H, *et al.* Prostaglandin E2 directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts mainly through the EP4 receptor. *Calcif Tissue Int* 2000; 67 (1): 85-92.
- 6 Xu Z, Choudhary S, Okada Y, Voznesensky O, Alander C, Raisz L, *et al.* Cyclooxygenase-2 gene disruption promotes proliferation of murine calvarial osteoblasts *in vitro*. *Bone* 2007; 41 (1): 68-76.
- 7 Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, Mehrotra M, Woodard M, Hansen M, *et al.* Overexpression of COX-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66 (13): 6657-64.
- 8 Liou JY, Ellent DP, Lee S, Goldsby J, Ko BS, Matijevic N, *et al.* Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin e2 protects mouse embryonic stem cells from apoptosis. *Stem Cells* 2007; 25 (5): 1096-103.
- 9 Weinreb M, Shamir D, Machwate M, Rodan GA, Harada S, Keila S. Prostaglandin E2 (PGE2) increases the number of rat bone marrow osteogenic stromal cells (BMSC) via binding the EP4 receptor, activating sphingosine kinase and inhibiting caspase activity. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75 (2): 81-90.
- 10 Tessner TG, Muhale F, Riehl TE, Anant S, Stenson WF. Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J Clin Invest* 2004; 114 (11): 1676-85.
- 11 Chun KS, Akunda JK, Langenbach R. Cyclooxygenase-2 inhibits UVB-induced apoptosis in mouse skin by activating the prostaglandin E2 receptors, EP2 and EP4. *Cancer Res* 2007; 67 (5): 2015-21.
- 12 Pavalko FM, Gerard RL, Ponik SM, Gallagher PJ, Jin Y, Norvell SM. Fluid shear stress inhibits TNF-alpha-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.
- 13 Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 228 (1-2): 79-102.
- 14 Norvell SM, Ponik SM, Bowen DK, Gerard R, Pavalko FM. Fluid shear stress induction of COX-2 protein and prostaglandin release in cultured MC3T3-E1 osteoblasts does not require intact microfilaments or microtubules. *J Appl Physiol* 2004; 96 (3): 957-66.
- 15 Ponik SM, Triplett JW, Pavalko FM. Osteoblasts and osteocytes respond differently to oscillatory and unidirectional fluid flow profiles. *J Cell Biochem* 2007; 100 (3): 794-807.
- 16 Arikawa T, Omura K, Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2004; 200 (3): 400-6.
- 17 Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5 (11): 897-907.
- 18 Miller SB. Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36 (1): 37-49.
- 19 Xia X, Batra N, Shi Q, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. Prostaglandin promotion of osteocyte gap junction function through transcriptional regulation of connexin 43 by glycogen synthase kinase 3/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 2010; 30 (1): 206-19.

- 20 Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Bronckers AL, Maltha JC, Von den Hoff JW, *et al.* Fluid shear stress inhibits TNF α -induced osteocyte apoptosis. *J Dent Res* 2006; 85 (10): 905-9.
- 21 Wadhwa S, Godwin SL, Peterson DR, Epstein MA, Raisz LG, Pilbeam CC. Fluid flow induction of cyclo-oxygenase 2 gene expression in osteoblasts is dependent on an extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J Bone Miner Res* 2002; 17 (2): 266-74.
- 22 Yao Z, Li P, Zhang Q, Schwarz EM, Keng P, Arbini A, *et al.* Tumor necrosis factor- α increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J Biol Chem* 2006; 281 (17): 11846-55.
- 23 Rifas L. Bone and cytokines: beyond IL-1, IL-6 and TNF- α . *Calcif Tissue Int* 1999; 64 (1): 1-7.
- 24 Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gelinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Oncogene* 2006; 25 (51): 6800-16.
- 25 Los M, Maddika S, Erb B, Schulze-Osthoff K. Switching Akt: from survival signaling to deadly response. *Bioessays* 2009; 31 (5): 492-5.
- 26 Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* 2001; 276 (19): 16484-90.
- 27 Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X. A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis. *Cell* 2003; 115 (1): 61-70.
- 28 Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21 (6): 871-7.

Prostaglandin E2 Inhibits TNF α -induced Apoptosis in Mouse Osteoblasts

Zhou-Qi Yang, Rui Meng, Zhe Wang, Wei Zhang, Peng Shang*

(Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract Previous studies have revealed that prostaglandin E2(PGE2) regulated the proliferation and differentiation of osteoblasts in the manner of autocrine or paracrine. In this study, the regulatory role of PGE2 on TNF α -induced apoptosis in primary mouse osteoblasts or osteoblast-like MC3T3-E1 cells was investigated. The results demonstrated that oscillatory fluid shear stress (OFSS) promoted the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), stimulated PGE2 secretion in culture media, and inhibited TNF α -induced apoptosis in primary osteoblasts and MC3T3-E1 cells. Application of COX-2 selective inhibitor NS-398 significantly enhanced TNF α -induced activation of caspase-3 in osteoblasts in a time-dependent manner. Hoechst 33258/PI staining experiment showed that NS-398 distinctly increased the membrane permeability and the chromatin condensation in osteoblasts, however, application of PGE2 suppressed this effect. Further investigation indicated that NS-398 increased the activity of caspase-3 induced by TNF- α in osteoblasts, and the addition of exogenous PGE2 in culture media restrained this effect. In conclusion, endogenous and exogenous PGE2 inhibits TNF α -induced apoptosis in mouse osteoblasts.

Key words prostaglandin E2; osteoblast; apoptosis; tumor necrosis factor α

Received: July 23, 2010 Accepted: October 26, 2010

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No.30970689)

*Corresponding author. Tel: 86-29-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn