

动态压力作用下微囊化软骨细胞差异蛋白质组学研究

任利玲^{1*} 冯雪² 马东洋³ 余占海¹ 陈富林⁴ 丁寅^{2*}

(¹兰州大学口腔医学院, 兰州 730000; ²第四军医大学口腔医院正畸科, 西安 710032;

³兰州军区总医院口腔颌面外科, 兰州 730052; ⁴西北大学生命科学院组织工程中心, 西安 710000)

摘要 应力作用下软骨细胞代谢和功能的改变是导致软骨组织不断生长改建的主要原因。但目前, 动态压力作用下调控软骨细胞生物学行为变化的分子机制尚不清楚。该研究借助于蛋白质组学技术, 通过给海藻酸盐三维培养的软骨细胞施加0.2 MPa、0.66 Hz动态压力持续作用4 h, 比较加压组和未加压组蛋白表达的变化。结果10个蛋白点发生了变化: 2个在加压培养后表达消失, 2个在加压培养后出现表达, 6个表达增强。进一步通过质谱分析和蛋白鉴定识别出6个有意义的蛋白质, 分别是: prolyl 4-hydroxylase alpha I、pyruvate kinase、L-lactate dehydrogenase A、prolyl 4-hydroxylase subunit β 、destrin isoform和 α enolase。为今后深入研究这些差异蛋白在软骨细胞受压力刺激后代谢和功能变化的生物学作用奠定了基础。

关键词 软骨细胞; 海藻酸盐; 压力; 差异蛋白质组学

在日常的人类生理活动中, 关节软骨不断承受着各种力学刺激, 影响着软骨的生长代谢。许多动物实验证实适当的力学环境是一个生理性的刺激因素, 可以引导和形成正常的有功能的关节表面软骨。对不同力学环境下生长期狗的关节进行比较发现, 制动和负重两种情况下结果完全不同, 负重条件下的力学刺激明显加速了关节软骨的成熟, 而制动条件下关节软骨明显退变, 证实了关节受力在关节软骨生长变厚塑形过程中起到了刺激性作用。在成年动物关节中, 肢体制动会导致关节软骨组织蛋白多糖含量减少, 而轻度的活动可以刺激基质合成^[1]。以上结果表明, 力学刺激对关节软骨发育、增殖、成熟及基质合成均具有重要的作用。

为了阐明力学刺激对关节软骨及软骨细胞的作用, 国内外学者尝试了从动物体内模型到组织、细胞、分子水平等体外实验的不同研究方法。他们认为力学环境对软骨细胞生长、分化、表型的表达、对移植软骨的生成过程及修复组织的生物学特性有非常重要的作用。但是, 调控软骨细胞力学信号转导的力学及生化过程仍未能彻底阐明。这种调控途径的完全认识将是理解维持软骨细胞外基质的正常生理过程和导致关节疾病(如骨性关节炎)的病理过程的基础。

目前, 蛋白质组学已成为生命科学研究的前沿, 它的发展极大地促进了对软骨组织代谢和软骨退

行性病变发生的研究。通过蛋白质组学技术研究力学刺激对软骨细胞调节作用的研究才刚刚展开。Lammi等^[2]通过蛋白质组学分析首次发现高静水压抑制了蛋白的合成部分是由于降低了细胞内真核延伸因子-2的表达^[3]。Ruiz-Romero等^[4]借助双向电泳技术研究了人软骨肉瘤细胞系在牵张力作用下蛋白的磷酸化改变。结果发现周期性牵张2 h增加了膜突蛋白的表达, 延伸因子eEF1D和leprecan磷酸化, 而延伸因子eEF1B的磷酸化在牵张后减少。进一步研究显示, 牵张诱导了MAP激酶通路的细胞外信号调节激酶的磷酸化, 但并未诱导磷脂酰肌醇激酶磷酸化。由此认为, 蛋白质组学的方法揭示了软骨肉瘤细胞在牵张力作用下诱导的特异性磷酸化改变。

因此, 本研究借助于蛋白质组学技术, 通过给体外三维培养的软骨细胞施以生理性动态压力, 首次寻找和发现动态压力作用下调控软骨细胞代谢和功能改变的特定的蛋白质分子, 为软骨改建机理的更深入研究提供依据。

收稿日期: 2011-08-16 接受日期: 2011-09-21

国家自然科学基金(No.30870594)和兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(No.LZUJBKY-2010-141)资助项目

*通讯作者。Tel: 0931-8995013, E-mail: renlidd@hotmail.com; Tel: 029-84776132, E-mail: yding@fmmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 兔关节软骨细胞的分离、培养及鉴定

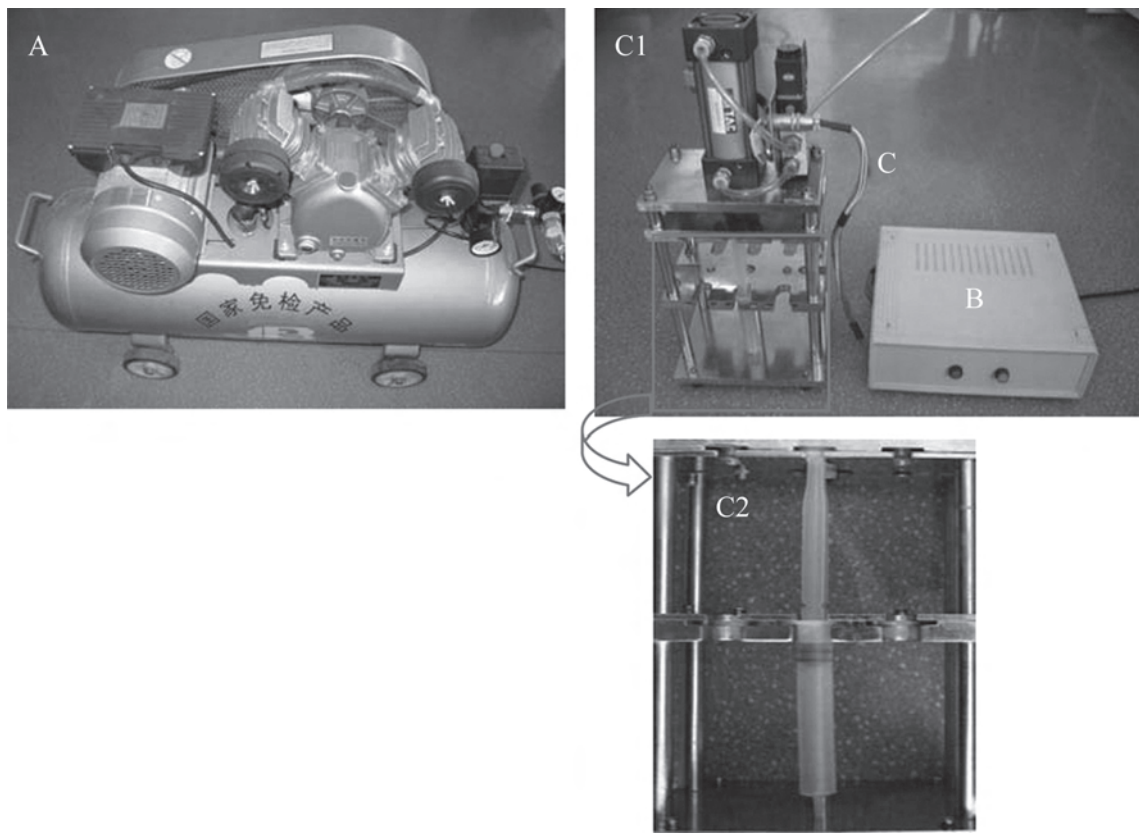
本实验已获得动物实验管理委员会的批准, 并符合有关动物实验管理条例发布的实验动物应用和保护指南。取出生后4周龄新西兰大耳白兔(第四军医大学实验动物中心提供), 耳缘静脉栓塞法处死后, 无菌条件下解剖分离兔下肢关节软骨, 仔细剥离去除表面的纤维组织, 暴露呈半透明状的关节软骨。用12#手术尖刀片切取软骨中央部分至接近软骨下骨。将其切碎成约 1 mm^3 大小。0.1 mol/L PBS反复冲洗, 加入1 g/L II型胶原酶, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床消化16 h, 200目滤网过滤去除未消化的组织, $1\ 000\times\text{g}$ 离心5 min弃上清, 加入PBS洗去胶原酶, 用血细胞计数板计数, 按 $1.0\times 10^5/\text{mL}$ 浓度接种于10 cm培养皿中, 加入含10% FBS、100 U/mL青霉素的DMEM, 静置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、含5% CO_2 的孵箱内培养。甲苯胺蓝染色鉴定。

1.2 海藻酸盐复合软骨细胞小球的形成

当P1代软骨细胞长满至培养皿底80%~90%时, 以 $1\times 10^7/\text{mL}$ 密度将其重悬于20 g/L低粘滞性无菌海藻酸钠溶液1 mL中, 充分吹打混匀, 用27-gauge针头逐滴滴入102 mmol/L的氯化钙溶液中, 室温下静置10 min, 用9 g/L氯化钠溶液冲洗三次, 形成直径1 mm左右的藻酸钙软骨细胞凝胶小球。每个小球内约含 2×10^4 个细胞。将形成的藻酸钙软骨细胞凝胶小球悬浮于DMEM培养液中, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的孵箱内, 隔天换液。

1.3 动态压缩装置构建

压力加载装置模拟了Sharma等^[5]研制的静水压加载系统, 并在此基础上加以改进, 能同时进行八个注射器内的细胞加压, 并可以按不同时间点进行分组加载。整个系统由充气装置、加压装置和气流调控装置(图1)三部分组成。加压装置包括加压板和驱



A: 充气装置(空气压缩机); B: 气流调控装置; C: 加压装置(C1: 驱动头; C2: 加压板)。

A: air compressor; B: driver cum control unit; C: loading unit (C1: driver head; C2: compression plate).

图1 压力加载系统组成

Fig.1 Dynamic compression unit

动头两部分。工作时,将复合有软骨细胞的海藻酸盐凝胶小球置于注射器内。加入一定量含10%胎牛血清的培养液。将注射器固定在加载系统中。充气装置(空气压缩机)将气体压入气流调控装置,在其中调节气流大小,然后将气流分配到驱动系统,驱动加载系统中的活塞板运动。活塞板带动注射器活塞运动,通过压缩空气作用于培养介质,由液体产生的静水压作用于细胞。

1.4 加载条件

幼兔(体重约 0.5 kg)关节表面积约为 0.5 cm²。静水压作用在每一个关节表面的力将是: $P=(0.5 \times 9.8) / (0.5 \times 10^{-4} \times 4) = 2.45 \times 10^4 \text{ N/m}^2$ 或 0.024 MPa。已知行走时,关节受力将达到静止时的5~10倍,因此,每个关节受力将是0.12~0.24 MPa^[5]。

1.5 实验分组

实验分加压组和对照组。实验组选取2%海藻酸盐凝胶小球包裹的软骨细胞在培养的第三天进行实验。取200个小球,每管50个分置于加压针管内,并加入含10%胎牛血清的DMEM培养液2 mL,为控制恒定的pH范围,在培养液中加入HEPES,使pH值为7.3。将注射器安装到加载装置中,将加载装置放于37 °C恒温箱内,给予0.2 MPa、0.66 Hz周期性静水压,持续4 h^[5]。对照组为在24孔培养板内常规培养三天的2%海藻酸盐凝胶小球包裹的软骨细胞,并在实验当天继续培养4 h。

1.6 蛋白质组织学分析

1.6.1 细胞总蛋白提取、定量及双向电泳分离蛋白 分别将加压组和对照组小球用溶解液(55 mmol/L EDTA, 10 mmol/L HEPES溶于三蒸水中,逐滴加入NaOH调节pH值到7.4,高温蒸汽灭菌备用,4 °C冰箱储存)溶解凝胶,离心,释放出软骨细胞;然后加入200 μL细胞裂解液,摇动混匀;置于-80 °C冷冻10 min,取出后加入2×DTT(0.1 g DTT溶于250 μL纯水中)20 μL;在涡流混悬仪上反复振荡3次,每次间隔5 min至完全混匀;将EP管置于高速离心机内,16 000×g,4 °C,离心60 min;离心后上清分装储存于0.15 mL EP管中。取出蛋白标准品(5 mg/mL BSA)绘制标准曲线进行蛋白定量。双向电泳采用12.5%聚丙烯酰胺凝胶(SDS-

PAGE),根据样品的蛋白浓度计算所需的上样体积量,加水化液至250 μL使上样量达到50 μL,IEF为pH值3~10的非线性胶条(电泳条件:30 V/12 h,100 V/1 h,200 V/1 h,500 V/1 h,1 000 V/1 h,8 000 V/3 h,8 000 V/65 500 Vh),电泳至溴酚蓝距离胶下沿0.5 cm,取出凝胶,然后银染、扫描,获得图谱。由于双向电泳技术程序繁琐,操作复杂,不同的温度、盐离子浓度、电压上的微小变化都会导致最终图像上的较大差异,甚至不同商品批次的IPG胶条作同样的样品得到的结果也会出现差异。因此,在得到差异点后,我们对同一样品又进行了2次重复试验,以确定稳定性差异的存在。

1.6.2 蛋白质点数据分析 使用ImageMaster2D软件进行凝胶图像的数据分析。包括背景消减、点检测、匹配、强度校正、背景的扣除。蛋白质点的匹配按照Corbett^[6]方法测量和计算蛋白质斑点的位置重复性,蛋白质点的量表示为构成这个点的所有像素强度值的总和,并用相对百分含量(即一个蛋白质点的像素值量占胶内看家蛋白像素值的百分比)进行校正。

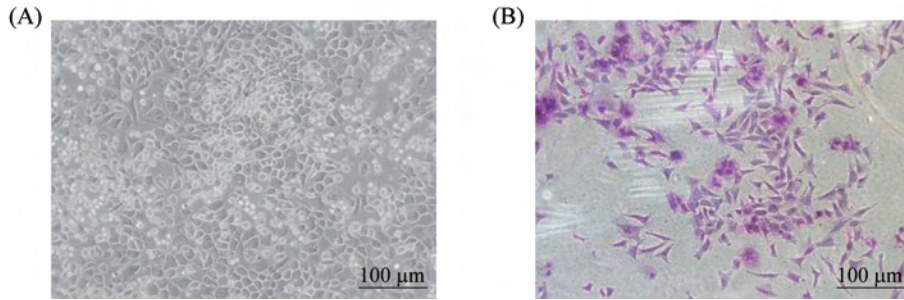
1.6.3 质谱分析 取差异最大的蛋白点作质谱分析。运用胰蛋白酶胶内酶切技术分解成蛋白肽段,结合基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对肽段进行测定,产生肽质量指纹图谱。

1.6.4 蛋白质鉴定数据库检索 利用MALDI-TOF-MS得到的原始文件,以Mascot作为搜索引擎,选择Swiss-Prot和NCBI nr作为目标数据库来确定蛋白质的最后归属。

2 结果

2.1 软骨细胞生长及鉴定

24 h后细胞贴壁呈短梭形或多角形。随着时间延长,贴壁细胞逐渐增多,细胞密度逐渐增大,细胞主要为多角形或鹅卵石样,细胞折光性好,立体感强,呈不规则立体“铺路石”样(图2A)。细胞爬片甲苯胺蓝染色,软骨细胞内有蓝紫色异染颗粒,细胞周围也有少量异染颗粒,表明细胞分泌大量氨基多糖(图2B)。



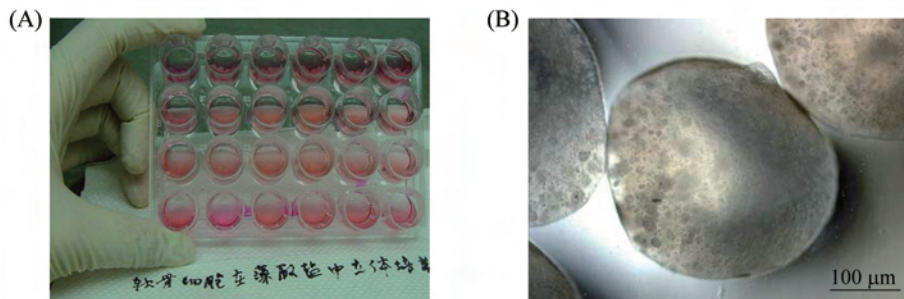
A: 培养的关节软骨细胞, 镜下呈多角形或短梭形; B: 软骨细胞甲苯胺蓝染色。

A: typical image of chondrocytes used in the experiment (phase contrast microscope) shows cobble-stone appearance; B: toluidine blue staining.

图2 软骨细胞生长及鉴定

Fig.2 Cultured chondrocytes growth and identification

2.2 藻酸盐复合软骨细胞小球的形成(图3)



A: 海藻酸盐复合软骨细胞凝胶小球置于24孔培养板, 加入DMEM培养基孵育; B: 镜下可见小球呈半透明状, 细胞在小球中呈团簇状, 以小球周边为甚。

A: chondrocytes encapsulated in alginate beads were cultured in 24-well plates; B: chondrocytes clusters-like growth in alginate beads.

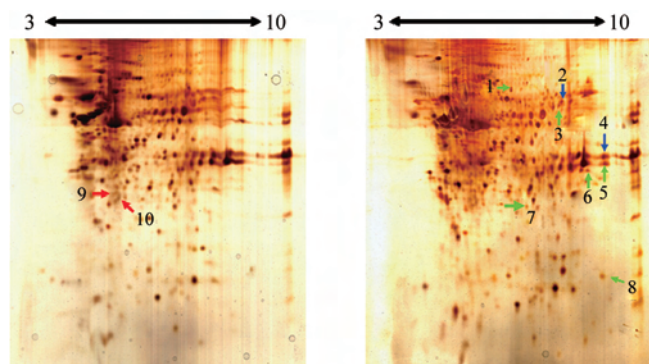
图3 藻酸盐复合软骨细胞小球形成

Fig.3 Chondrocytes encapsulation in alginate beads

2.3 二维电泳图谱的建立

利用ImageMaster2D软件对动态压力作用下海藻酸盐微囊化培养的兔关节软骨细胞及配对的未加压组软骨细胞的双向凝胶电泳图谱进行分析匹配, 对照组检测到1 632±54个蛋白点, 加压组检

测到1 698±13个蛋白点。分别将对对照组和加压组的凝胶图像合成后进行比较。通过软件分析并结合手工比对, 筛选出差异表达的蛋白质点共10个(认为校正后点的表达量相差3倍以上的点为差异蛋白质点)(图4)。



绿箭头代表表达增强点, 蓝箭头代表新增点, 红箭头代表消失点。

Green arrows indicated the up-regulated spots, blue arrows showed the new appearance spots and red arrow means disappeared spots.

图4 对照组和加压组软骨细胞的二维凝胶电泳银染图谱

Fig.4 The map of 2D-PAGE unloading group and loading group

2.4 质谱鉴定(表1)

表 1 差异蛋白质点的质谱鉴定结果

Table 1 The identification of different protein spots by mass spectrometric analysis

蛋白质点 Protein spot	鉴定蛋白 Identified protein	序列号 Primary accession number	质谱鉴定分值 Mascot score	分子量 Molecular weight	等电点 Isoelectric point	倍性变化 Fold change	覆盖率 Coverage
1	Prolyl 4-hydroxylase alpha I	gi 114631193	214	51.4	5.66	4.7	44%
2	Pyruvate kinase	gi 2623945	255	58.3	7.96	4.55	48%
3	Mixture	gi 114631613+gi 2623945	244	58.4	6.96	3.93	37%
4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 89573917	160	25.1	8.87	3.98	59%
5	L-lactate dehydrogenase A	gi 189027057	82	36.7	8.15	3.94	25%
6	Prolyl 4-hydroxylase subunit beta	gi 129730	139	57.1	4.77	4.0	30%
7	Alpha enolase	gi 149695415	80	47.5	6.37	4.89	34%
8	Dextrin isoform	gi 5802966	128	18.9	8.06	3.91	83%

3 讨论

以往研究表明,正常人体膝、髌关节所受到的压力在0.1~10 MPa之间,频率约为1 Hz^[7-9],当在密闭容器中通过压缩气体给细胞施加压力超过4 h时,通常会导致加压环境中O₂和CO₂分压发生改变而引起介质中的pH值发生改变,从而引起潜在的细胞损害^[10]。因此,本实验参照Sharma等^[5]的加载条件,选择0.2 MPa、0.66 Hz动态压缩4 h,力图模拟生理水平的关节软骨受力状况,以期在后续的实验中为证明软骨形成及改建机理提供必要条件。

通过双向电泳技术,本实验建立了动态压力作用下微囊化培养的兔关节软骨细胞加压前后的差异蛋白表达谱。结果显示,体外加压立体培养的兔关节软骨细胞与正常条件下体外培养的软骨细胞表达的蛋白存在明显差异,这主要表现为:双向电泳图谱斑点的增减以及部分斑点的染色面积和染色深浅发生了明显变化,提示加压培养的关节软骨细胞蛋白发生了质(蛋白点的缺失、增加)和量(蛋白点染色的深浅、面积的大小)的变化。

与加压前相比,本实验共筛选出了10个加压后稳定表达的差异蛋白点,其中2个在加压培养后表达消失,2个在加压培养后出现表达,6个表达增强。这10个蛋白点所反映出的差异蛋白很可能就是该实验条件下调控工程化关节软骨改建的功能性蛋白质。

进一步结合质谱对酶解产生的肽段进行分析,通过和NCBI蛋白数据库中的数据比较,其中8个蛋白被鉴定出来,依据蛋白可能存在的功能或在细胞

中的角色,将他们分为三类:(1)代谢相关酶:α-烯醇酶(alpha-enolase, ENOA)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, G3PDH)、L-乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase A)、脯氨酰羟化酶α亚单位(prolyl 4-hydroxylase, alpha I subunit)、脯氨酰羟化酶β亚单位(prolyl 4-hydroxylase subunit beta);(2)细胞骨架蛋白dextrin;(3)其他:混合物。

综上,我们看到,在给予海藻酸盐凝胶微囊化培养的兔关节软骨细胞0.2 MPa、频率0.66 Hz的动态压应力持续4 h后,其发生改变的蛋白多数是能量代谢蛋白。这可能是刺激作用于软骨细胞产生反应,进而调节了软骨基质的生物合成和转化。而基质产生的过程是一个耗能的过程且主要来自于糖酵解^[11-12]。研究显示当软骨受到静态载荷或持续高静水压刺激时会引起糖酵解率下降和ATP水平下降。机械压缩对基质转化的影响可能部分是通过软骨细胞ATP转化的影响实现的。正常状态下,软骨细胞ATP的产生和消耗保持平衡以调节软骨基质成分的合成,使关节软骨在总体上保障其细胞数量、形态和功能的稳定。当软骨细胞受到外界的刺激,如压力、低氧、炎症因子的刺激,其代谢活动发生改变,ATP产生不足,因此无氧酵解产生ATP用以支持软骨细胞基质合成和活性是必要的^[13-15],表现为脯氨酰羟化酶、丙酮酸激酶、L-乳酸脱氢酶在实验组高表达。若软骨细胞处于持续低氧、压力环境则细胞不能有效产生软骨基质成分以维持软骨基质的完整,则会

导致软骨退行性病变发生。

Destrin属于肌动蛋白Actin黏附蛋白ADF家族。有实验证明琼脂糖包埋的软骨细胞受到周期性循环压缩(10 cycles, 1 Hz, 0%~15% strain)持续10分钟, *cofilin*和*destrin*的mRNA表达水平显著上调^[16]。本实验证明海藻酸盐包埋的软骨细胞受到0.2 MPa、0.66 Hz动态压缩4 h后, Destrin的蛋白表达水平增高, 进一步说明细胞骨架蛋白感知外界刺激并对此作出反应。关节软骨是身体内主要的负载组织, 细胞骨架在软骨细胞和细胞外基质之间起到了感知机械刺激的生理连接作用。Actin细胞骨架结构被认为是软骨细胞表型的重要调节者, 它维持了细胞的机械完整性。同时, 由于实验系统的差异, 它在不同的细胞中具有促进或抑制凋亡的作用^[17]。近年来, 又有学者发现肌动蛋白在细胞核中的积累很可能是细胞衰老的新的标志物^[18]。

通过蛋白质组学实验, 我们得到了在0.2 MPa、0.66 Hz的动态压缩持续4 h后, 海藻酸盐微囊化培养关节软骨细胞的差异表达蛋白。但实验所得阳性意义的信息毕竟是有限的, 虽然得到了8个阳性结果, 但调控其表达的上下游关系还不清楚, 其所代表的压力作用下调控关节软骨细胞的信号分子通路也不得而知。同时, 这8个候选蛋白也只是代表了翻译水平的差异, 更深入地对其功能的认识, 还需要进一步探讨研究。

参考文献 (References)

- 1 Heath CA, Magari SR. Mini-review: Mechanical factors affecting cartilage regeneration *in vitro*. *Biotechnol Biol* 1996; 50(4): 430-7.
- 2 Lammi MJ, Elo MA, Sironen RK, Karjalainen HM, Kaarniranta K, Helminen HJ. Hydrostatic pressure-induced changes in cellular protein synthesis. *Biorheology* 2004; 41(3/4): 309-13.
- 3 Elo MA, Karjalainen HM, Sironen RK, Valmu L, Redpath NT, Browne GJ, *et al*. High hydrostatic pressure inhibits the biosynthesis of eukaryotic elongation factor-2. *J Cell Biochem* 2005; 94(3): 497-507.
- 4 Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, Remeseiro S, López-Armada MJ, Blanco FJ. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics* 2008; 8(3): 495-507.
- 5 Sharma G, Saxena RK, Mishra P. Differential effects of cyclic and static pressure on biochemical and morphological properties of chondrocytes from articular cartilage. *Clin Biomech* 2007; 22(2): 248-55.
- 6 Corbett JM, Dunn MJ, Posch A, Görg A. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: An interlaboratory comparison. *Electrophoresis*. 1994;15(8/9): 1205-11.
- 7 Finlay JB, Repo RU. Instrumentation and procedure for the controlled impact of articular cartilage. *IEEE Trans Biomed Eng* 1978; 25: 34-9.
- 8 Hodge WA, Fijan RS, Carlson KL, Burgess RG, Harris WH, Mann RW. Contact pressures in the human hip joint measured *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2879-83.
- 9 Afoke NY, Byers PD, Hutton WC. Contact pressures in the human hip joint. *J Bone Joint Surg Br* 1987; 69: 536-41.
- 10 Toyoda T, Seedhom BB, Yao JQ, Kirkham J, Brookes S, Bonass WA. Hydrostatic pressure modulates proteoglycan metabolism in chondrocytes seeded in agarose. *Arthritis Rheum* 2003; 48(10): 2865-72.
- 11 Baker MS, Feigan J, Lowther DA. The mechanism of chondrocyte H₂O₂ damage. Depletion of intracellular ATP due to suppression of glycolysis caused by oxidation of G3PDH. *J Rheumatol* 1989; 16: 7-14.
- 12 Stockwell RA. *Biology of cartilage cells*. Cambridge University Press, London 1979.
- 13 Hofbauer KH, Gess B, Lohaus C, Meyer HE, Katschinski D, Kurtz A. Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *Eur J Biochem* 2003; 270: 4515-22.
- 14 王友臣, 彭建宇, 许坤, 赵雁, 曹媛媛. 急性颈髓损伤后脊髓细胞能量代谢的变化. *河北医科大学学报* 2005; 26: 91-4.
- 15 Yancik SA, McIlwraith CW, Wagner AE, Trotter GW. Evaluation of creatine kinase and lactate dehydrogenase activities in clinically normal and abnormal equine joints. *Am J Vet Res* 1987; 48(3): 463-6.
- 16 Campbell JJ, Blain EJ, Chowdhury TT, Knight MM. Loading alters actin dynamics and up-regulates cofilin gene expression in chondrocytes. *Biochem Biop Res Commun* 2007; 361: 329-34.
- 17 Kim SJ, Hwang SG, Kim IC, Chun JS. Actin cytoskeletal architecture regulates nitric oxide-induced apoptosis, dedifferentiation, and cyclooxygenase-expression in articular chondrocytes via mitogen-activated protein kinase and protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 2003; 278(43): 42448-56.
- 18 Kwak IH, Kim HS, Choi OR, Ryu MS, Lim IK. Nuclear accumulation of globular actin as a cellular senescence marker. *Cancer Res* 2004; 64(2): 572-80.

Comparative Proteomics Study of Chondrocytes Encapsulated in Alginate under Dynamic Compression

Ren Liling^{1*}, Feng Xue², Ma Dongyang³, Yu Zhanhai¹, Chen Fulin⁴, Ding Yin^{2*}

(¹School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; ²Department of Dental Orthopaedics, School of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; ³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Lanzhou General Hospital Lanzhou Command of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730052, China; ⁴Regeneration Lab of Tissue Engineering, Department of Bioscience, Faculty of Life Science, Northwest University, Xi'an 710000, China)

Abstract Mechanical stresses are known to play important role in articular cartilage functions *in vivo*. However, the molecular events of chondrocytes in response to dynamic stress are still not well understood so far. In the present study, rabbit articular cartilage cells cultured in alginate beads were exposed to 0.2 MPa, 0.66Hz cyclic loadings for 4 hours. The differently expressed proteins involved in chondrocytes cultured in alginate beads under dynamic stress loading and unloading were identified by using comparative proteomics technology. 10 differently expressed proteins were found. In the 10 proteins, there were 6 up-regulated ones, 2 disappeared ones and 2 new appearance. Furthermore, by searching in protein and peptide databases, six meaningful proteins were identified, they were: prolyl 4-hydroxylase alpha I, pyruvate kinase, L-lactate dehydrogenase A, prolyl 4-hydroxylase subunit beta, destrin isoform and alpha enolase. Our research provided fundamental information on the differential expression of protein of chondrocytes cultured in alginate under dynamic stress. However, further studies need to be done to better understand the molecular mechanisms of cartilage remodeling induced by dynamic stress loading.

Key words chondrocytes; alginate; mechanical compression; comparative proteomics

Received: August 16, 2011 Accepted: September 21, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30870594) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No.LZUJBKY-2010-141)

*Corresponding author. Tel: 86-931-8995013, E-mail: renlidd@hotmail.com; Tel: 86-29-84776132, E-mail: yding@fmmu.edu.cn