

# 机械应力影响鼠骨髓基质细胞骨保护素 /NF- $\kappa$ B 受体活化剂配体 mRNA 表达变化

刘 丽\* 张晓聪 郑茜聪 张烈焚

(浙江大学医学院附属口腔医院修复科, 杭州 310006)

**摘要** 骨保护素/NF- $\kappa$ B受体活化剂配体/NF- $\kappa$ B受体活化剂(OPG/RANKL/RANK)系统对破骨细胞生成、功能起着关键的作用,它的发现是骨生理代谢研究领域的重大进展。为研究生理性机械应力对鼠骨髓基质细胞 OPG/RANKL mRNA 表达变化的影响,进一步探讨机械应力对破骨细胞的影响机制,通过对鼠骨髓基质细胞施加不同时间段的生理性的机械应力,并以 RT-PCR 半定量的方法检测 OPG/RANKL mRNA 表达变化趋势。结果显示随着加力时间的延长(6 h 后)RANKL mRNA 表达减少 34.4%,而 OPG mRNA (9 h 后)表达增加 73%,提示生理性应力能显著影响鼠骨髓基质细胞 OPG/RANKL mRNA 表达变化,从而在一定程度上阐明了生理性应力延缓骨质吸收的内在机制。

**关键词** 生理性应力; 鼠骨髓基质细胞; 骨保护素; NF- $\kappa$ B 受体活化剂配体; RT-PCR

OPG/RANKL/RANK 系统对破骨细胞形成、功能起着关键的作用。NF- $\kappa$ B 受体活化剂配体(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)又称骨保护素配体(osteoprotegerin ligand, OPL),是一种调节骨代谢的重要因子,主要表达在成骨细胞、骨髓基质细胞以及胸腺、淋巴结和脾组织中。研究证明,RANKL 能够促进破骨细胞的分化、成熟和活化<sup>[1,2]</sup>。在巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)存在的前提下,RANKL 与破骨细胞前体上的肿瘤坏死因子超家族成员破骨细胞分化因子受体 NF- $\kappa$ B 受体活化剂(receptor activator of NF- $\kappa$ B, RANK)膜蛋白结合,从而促进破骨细胞前体的分化和成熟<sup>[3]</sup>。而另一种由成骨细胞及骨髓基质细胞分泌的可溶性细胞因子骨保护素(osteoprotegerin, OPG)能与 RANKL 竞争性结合,阻止 RANKL 与 RANK 的结合。由此可见成骨/骨髓基质细胞在破骨细胞分化、成熟和活化中的重要作用<sup>[1]</sup>。

口腔失牙患者的牙槽嵴在得不到生理性力刺激的情况下易发生萎缩,而在经过恰当的患牙修复能显著延缓牙槽骨的萎缩<sup>[4]</sup>。类似的情况,运动员的骨骼通常比常人更加强壮与他们从事的锻炼活动直接相关<sup>[5]</sup>。然而,机械应力与骨代谢之间联系的内在机制并未阐明。

我们采用四点弯曲加力系统给鼠骨髓基质细胞

施加生理范围的机械应力,通过检测鼠骨髓基质细胞 OPG/RANKL mRNA 表达的变化,探讨机械应力对破骨细胞的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

细胞和试剂:清洁级 SD 大鼠(浙江大学医学院动物中心),胎牛血清(杭州四季青生物工程公司), $\alpha$ -MEM 培养基(Gibco),0.25% 胰蛋白酶(杭州拜森生物科技有限公司),肝素(Sigma),TRIzol 试剂(Invitrogen),鼠白血病病毒逆转录酶(MMLV)第一链 cDNA 合成试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司),PCR 扩增试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司),100 bp DNA Ladder,6 $\times$ 上样缓冲液(上海生工生物工程技术有限公司),EB (Sigma),琼脂糖(Sigma)。

主要仪器:细胞培养箱(Forma),四点弯曲细胞加力装置(成都电子科技大学研制,图1),紫外分光光度计(Bio-Rad),低温高速离心机(Backman),PCR 仪器(Applied Biosystems),电泳仪(Bio-RAD),

收稿日期:2005-12-31 接受日期:2006-06-20

国家自然科学基金资助项目(No.30274127)

\* 通讯作者。Tel: 0571-87217225, E-mail: LL225@zju.edu.cn, landminestorm@zju.edu.cn

表 1 RT-PCR 各基因扩增片段应用引物

| 基因     | 引物                                     | 扩增片段长度 |
|--------|----------------------------------------|--------|
| RANKL  | 5'- TTC AGA ATT GCC CGA CCA GTT TTT-3' | 323 bp |
|        | 5'-CCC AGA CAT TTG CAC ACC TCA C-3'    |        |
| OPG    | 5'-GGT AAC GCC CTT CCT CAC ACT CAC-3'  | 311 bp |
|        | 5'-CCT GGT GCT CCT GGA CAT CAT TG-3'   |        |
| β 肌动蛋白 | 5'-CCA GGG TGT GAT GGT GGG AAT G-3'    | 532 bp |
|        | 5'-CGC ACG ATT TCC CTC TCA GCT G-3'    |        |

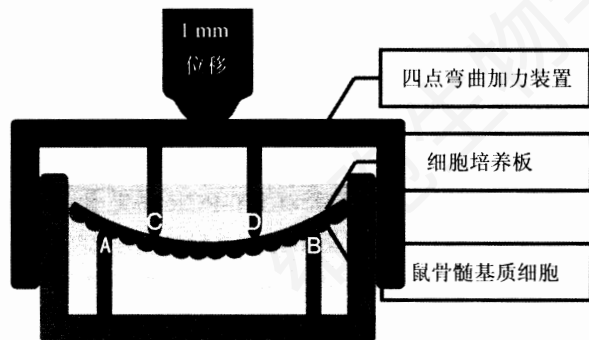


图 1 四点弯曲细胞加力装置示意图

成像摄影系统(Pharmacia Biotech ImageMaster VDS), 倒置相差显微镜(Olympus)

## 1.2 引物设计

从NCBI GenBank中查得鼠RANKL/OPG及内参β 肌动蛋白基因全序列, 用生物设计软件 Primer5.0 设计引物, 见表 1。

## 1.3 原代大鼠骨髓基质细胞培养

骨髓取自清洁级重 120 g 左右雄性 SD 大鼠。颈椎脱臼法处死 2 只大鼠, 将其完全浸没于 75% 酒精中, 5 min 后取出置于无菌冰浴手术台上。分离并取出大鼠后肢双侧股骨和胫骨, 去净附着的肌纤维, 在超净台内剪去两端骨髓, 用 10 ml 针筒吸取完全培养基(含 80%α-MEM, 20% 胎牛血清, 100 U/ml 肝素), 以不同方向冲洗骨髓腔共 4 次。细胞吹打均匀后接种于直径 60 mm 的塑料培养皿, 在 37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境下培养。整个过程要求严格无菌、操作迅速。

0.5 h 后吸取细胞混悬液, 按 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml 接种至细胞培养瓶中。每隔两天换液, 逐步换去其他参杂的悬浮细胞。一般 7~9 天后细胞铺满底壁, 以 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 反复传代法纯化鼠骨髓基质细胞, 细胞传至第三代时备用。

## 1.4 细胞加力

将接近汇合的第三代骨髓基质细胞按 1 × 10<sup>8</sup> 个/ml 的密度接种在 2 cm × 5 cm 的塑料培养板上,

分成 6 组。24 h 后细胞接近汇合时将细胞培养板置入四点弯曲细胞加力装置中(图 1)。设置位移为 1 mm, 频率为 0.5 Hz 的机械张应力。6 组的加力时间分别为 0 h、1 h、3 h、6 h、9 h、12 h。整个加力过程在无菌的加力皿中进行, 加力装置放置在细胞培养箱中。

## 1.5 RT-PCR

**1.5.1 用 TRIzol 试剂提取总 RNA** 取出细胞培养板, 细胞培养用 PBS 清洗 2~3 遍后加入 1 ml TRIzol 试剂反复吹打来裂解细胞至均一通亮的液态。随后分别用 0.2 ml 氯仿降解蛋白质, 0.5 ml 异丙醇沉淀 RNA, 1 ml 75% 乙醇再洗涤沉淀一次。最后将总 RNA 溶于 DEPC 水中至 20 μl。取 2 μl 稀释于 98 μl DEPC 水中, 紫外分光光度计(A<sub>260/280</sub>)对 RNA 样品检测总 RNA 纯度以及浓度。实验过程各个环节防止 RNA 酶污染。

### 1.5.2 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA

取 5 μl 总 RNA、1 μl Oligo (dT) 18、6 μl DEPC 水、4 μl 5 × 反应缓冲液、1 μ 20 U/μl RNA 酶抑制剂、2 μl 10 mmol/L dNTP Mix、20 U/μl MMLV-RT, 合成终体积 20 μl cDNA

**1.5.3 PCR 扩增试剂盒扩增目的基因** 为比较实验两目的基因的表达比例变化同时又避免干扰, 本实验采用目的基因与 β 肌动蛋白基因拟同管扩增。即采用相同的模板量、相同的反应环境、相同的试剂盒和反应条件、但采用分开的 PCR 扩增管对目的基因与 β 肌动蛋白基因进行的转录和扩增, 组成理论上与同管扩增结果无影响的实验条件。

① PCR 反应体系。见上海生工生物工程技术服务有限公司试剂盒(SK2491)操作手册, 总反应体系量为 50 μl。

② PCR 反应条件。(1) RANKL 基因: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 54.5℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后一个循环 72℃ 延伸 7 min。(2) OPG 基因: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 57.5℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1

min, 30 个循环, 最后一个循环 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

③ 琼脂糖凝胶电泳和图象分析。(1)上样条件: 每孔上样包括 10  $\mu$ l OPG 和 10  $\mu$ l RANKL, 10  $\mu$ l  $\beta$  肌动蛋白, 5  $\mu$ l 上样缓冲液, 混匀; 电泳条件: 1% 琼脂糖凝胶, 0.5  $\times$  TBE, pH 约为 8.5, 120 V 电压电泳 40 min。(2)成像摄影系统上观察、拍照。

### 1.6 电泳条带图片光密度分析

采用 Ultra Violet Products Ltd 公司 (Cambridge UK) 的 BANDSCAN (Version 4.0) 软件对琼脂糖凝胶电泳条带图片进行光密度分析: 各样品的目的基因的表达强度 = 目的条带的光密度积分值 V 值 / 内参条带光密度积分值 V 值。

### 1.7 RT-PCR 产物测序

为验证目的基因的 RT-PCR 产物的正确性, 随机选取 OPG 和 RANKL 的 RT-PCR 产物一份送上海生工生物工程技术有限公司测序部测序。

### 1.8 统计学方法

细胞加力实验各组皆重复 3 次。各组样品的目的基因的表达强度计算结果用均数  $\pm$  标准差形式给出。采用 SPSS13.0 统计分析软件进行数据分析。应用单因素方差分析统计方法 (One-Way ANOVA) 分析数据。方差齐性时用 LSD 法, 方差不具齐性时用 Tamhane's  $T_2$  法做组内两两比较, 设  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 原代鼠骨髓基质细胞

原代鼠骨髓基质细胞生长缓慢, 大约培养 7~9 天后, 细胞逐渐汇合 (图 2)。细胞形态为纺锤形或成纤维样细胞样, 单核, 核圆形或卵圆形, 有集落样生长趋势。原代骨髓基质细胞经多次传代, 混杂的血细胞减少, 细胞类型趋向一致, 排列更有序, 呈现更活跃的增殖活动 (图 3)。

### 2.2 加力前后的原代鼠骨髓基质细胞

加力前骨髓基质细胞排列无规则 (图 4), 加力 6 h 后骨髓基质细胞呈沿应变力方向排列 (图 5)。

### 2.3 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

图 6 的 6 条泳道从左到右分别为鼠骨髓基质细胞加力 0、1、3、6、9、12 h 后 RT-PCR 产物电泳, 该图显示 RANKL DNA 产物随加力时间延长有表达下降的趋势, 而 OPG DNA 产物随加力时间延长有表达增加的趋势。

随意选取目标产物送上海生工生物工程技术有限公司测序部测序结果显示 RANKL 和 OPG 目

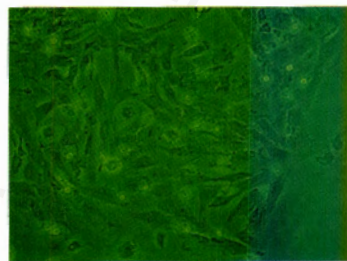


图 2 原代鼠骨髓基质细胞加力前 (100  $\times$ )

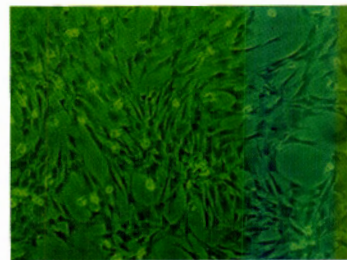


图 3 第三代鼠骨髓基质细胞传代培养后 (50  $\times$ )

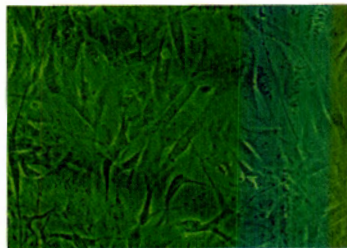


图 4 第三代鼠骨髓基质细胞加力前 (50  $\times$ )

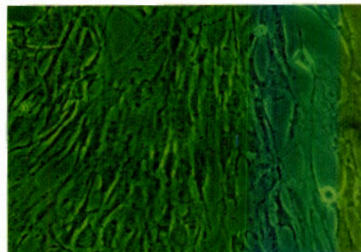


图 5 第三代鼠骨髓基质细胞加力 6 h 后 (50  $\times$ )

标扩增片段和各自基因序列 100% 吻合。

### 2.4 统计数据与结果

统计结果见表 2。鼠骨髓基质细胞在机械应力作用下随着加力时间的延长 (6 h 后) RANKL mRNA 表达显著减少, 达 34.4%; 而 OPG mRNA (9 h 后) 表达显著增加, 达 73%。

## 3 讨论

正常状况下骨代谢是由骨吸收和骨形成维持着

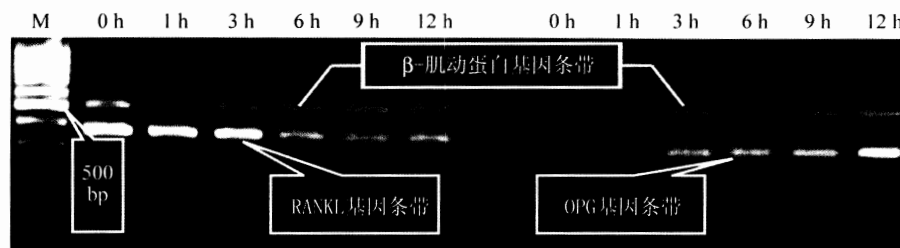


图6 RANKL和OPG基因PCR电泳图

M采用100 bp DNA Ladder。0 h、1 h、3 h、6 h、9 h和12 h分别表示鼠骨髓基质细胞加力的时间。

表2 OPG/RANKL基因表达强度统计表

| 加力时间      | 样本数 | RANKL/β 肌动蛋白 | OPG/β 肌动蛋白    |
|-----------|-----|--------------|---------------|
| 0 h (对照组) | 3   | 5.84 ± 0.21  | 1.86 ± 0.08   |
| 1 h       | 3   | 6.04 ± 0.17  | 2.01 ± 0.07   |
| 3 h       | 3   | 5.66 ± 0.39  | 1.87 ± 0.13   |
| 6 h       | 3   | 4.38 ± 0.33* | 2.02 ± 0.06   |
| 9 h       | 3   | 4.34 ± 0.17* | 3.26 ± 0.16** |
| 12 h      | 3   | 4.57 ± 0.11* | 3.33 ± 0.18** |

表中各统计量为均值±标准差。在机械应力的作用下6 h后,骨髓基质细胞RANKL mRNA表达与未加力组别比较, \* $P<0.05$ ; 9 h后OPG mRNA表达与未加力组别比较, \*\* $P<0.01$ 。RANKL mRNA表达在6、9、12 h组之间并无差异; OPG mRNA表达在9、12 h组之间并无差异。

动态平衡。生理性力不但可以促进骨改建,还可以抑制骨吸收。但是作用在骨细胞上的力是通过何种分子生物学的机制生效用仍不很清楚。本实验通过四点弯曲加力装置<sup>[6]</sup>给予原代细胞加载生理范围的机械应力,并运用RT-PCR方法检测与骨代谢最为关系密切的一对细胞因子OPG/RANKL mRNA量的表达。

### 3.1 生理性的机械应力

四点加力装置以及原理:根据力学原理可知整个加力板是一个等弯区,而且该区域是一个单向应力状态,所以该区域的应变也是一个单向的应变状态,从而保证该区域的细胞受到同一应变的作用<sup>[6]</sup>。作用在细胞上力的大小可由下式得出: $\epsilon = tY/s(L-1.3s)$ 。(t为细胞培养板的厚度、L为细胞培养板的长度、Y为细胞培养板的弯矩、s为载荷作用点距细胞培养板支座处的距离)<sup>[7]</sup>。Owan等<sup>[7]</sup>还认为细胞受力大小应当以细胞应变量张力单位( $\mu\text{strain}$ )来表示,1 000单位张力即相当于1%的形变。本实验加载的力量为位移1 mm,频率0.5 Hz,相当于1 500单位张力以下的生理性应张力。而加力前后板载细胞无论从细胞计数或是核酸总量都与对照非加力组没有差异<sup>[8]</sup>,提示实验中所观察到的RANKL/OPG mRNA表达的变化是由作用在鼠骨髓基质细胞上的应力所引起。

### 3.2 生理性机械应力对鼠骨髓基质细胞 RANKL/

### OPG mRNA 表达变化的影响

在骨吸收的过程中,中心环节是破骨细胞的分化和成熟。目前已经证明多种激素和局部作用因子如活性维生素D3[1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]、糖皮质激素、前列腺素(PGE<sub>2</sub>)等不仅能调节破骨细胞分化、成熟,还能调节破骨细胞功能。这些因子主要作用于成骨细胞或骨髓基质细胞,调节OPG和RANKL等。破骨细胞的分化和成熟与RANKL和破骨细胞前体细胞膜表面的RANK结合直接相关。而RANKL主要由成骨细胞和骨髓基质细胞分泌的,同时成骨细胞、骨髓基质细胞分泌的OPG可以和RANKL结合从而竞争性阻滞了RANKL与RANK的结合,达到调控破骨细胞分化 and 功能作用。由此,成骨细胞、骨髓基质细胞的RANKL、OPG表达和OPG/RANKL的比例可能是调节破骨细胞的关键因素<sup>[9]</sup>。本实验数据提示生理性的机械应力可以抑制关键性的破骨因子RANKL mRNA的表达;同时促进护骨因子OPG mRNA的表达;这些发现都提示生理性的机械应力能阻止骨溶解促进骨生成。这和临床缺牙患者的牙槽嵴是否得到适当的修复体刺激而吸收程度不一是相一致的。实际上生理性的机械应力可以通过极短的时间就可以引起基因表达水平的变化:RANKL mRNA表达开始下降,  $P<0.05$ (6 h); OPG mRNA表达开始上升,  $P<0.01$ (9 h)。我们的实验还发现生理性机械应力不仅可以抑制RANKL mRNA表达同时

还可以促进 OPG mRNA 表达, 无疑明显提高了细胞 OPG/RANKL mRNA 的比例, 而 OPG/RANKL mRNA 的比例的提高则可以进一步抑制破骨细胞的生成、活化和功能, 从而抑制骨吸收。

骨代谢是国际上一个方兴未艾的研究课题, 力学与骨代谢的关系更是其中的热点。目前生理力是通过何种途径引起骨髓基质细胞基因表达的表达变化还不明了。但我们的实验从分子水平上检测了两种骨代谢关键因子的表达和生理力之间的相关性, 无疑为骨质疏松的病因和治疗提供了新的思路。

本实验在浙江大学医学院生物电磁实验室完成,

衷心感谢孙文均研究员等老师的悉心指导和各位研究生同学的热心帮助。

### 参考文献 (References)

- [1] Hofbauer LC *et al.* *J Bone Miner Res*, 2000, **15**: 2
- [2] Lacey DL *et al.* *Cell*, 1998, **93**: 165
- [3] Yasuda H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 3597
- [4] 何福明等. *中国口腔种植学杂志*, 2001, **6**: 91
- [5] Bradney M *et al.* *J Bone Miner Res*, 1998, **13**: 1814
- [6] 张西正等. *医疗卫生设备*, 1999, (4): 6
- [7] Owan L *et al.* *Am J Physical*, 1997, **273**: C810
- [8] Rubin J *et al.* *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, **278**: C126
- [9] Grimaud E *et al.* *Am J Pathol*, 2003, **163**: 2021

## The Effect of Physiological Mechanical Strain upon Osteoprotegerin/ Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand mRNA Expression by Murine Stromal Cells

Li Liu\*, Xiao-Cong Zhang, Xi-Cong Zhen, Lie-Feng Zhang

(The Affiliated Stomatology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

**Abstract** The recent identification of the receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL), its cognate receptor RANK, and its decoy receptor osteoprotegerin (OPG) has led to a new molecular perspective on osteoclasts biology and bone homeostasis. To investigate the effect of physiological mechanical strain upon OPG/RANKL mRNA expression by murine stromal cells and further elucidate the mechanism of mechanical effect on osteoclasts, the OPG/RANKL genes expression was analyzed by semi-quantitative reverse-transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) after time-controlled mechanical strain applied to murine stromal cells. The results showed that mechanical strain enhanced the expression of OPG genes to 73% after 9 h applying, while reduced the expression of RANKL genes to 34.4% after 6 h applying respectively. It is suggested that strain-induced OPG/RANKL genes expression tendency by murine stromal cells may contribute to explain the mechanism of osteolysis prevention by physiological mechanical strain.

**Key words** physiological mechanical strain; murine stromal cells; osteoprotegerin; receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand; RT-PCR

Received: December 31, 2005 Accepted: June 20, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30274127)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-87217225, E-mail: LL225@zju.edu.cn, landminestorm@zju.edu.cn