

# 流动剪切力作用下原代大鼠成骨样细胞 PGE<sub>2</sub> 的表达

乔 鞠 陈伟辉 李声伟 罗颂椒 田卫东 张 敏 李 强

**摘要** 目的:探讨流动剪切力调节成骨细胞增殖和分化的信号转导过程中 PGE<sub>2</sub> 的作用机制。方法:对体外培养的大鼠成骨样细胞施加 0.12 mN/cm<sup>2</sup> 的流动剪切力,采用放射免疫法检测细胞受力 5、10、15、30、60、120 min 后不同时间段的 PGE<sub>2</sub> 的表达。结果:大鼠成骨样细胞受到 0.12 mN/cm<sup>2</sup> 流动剪切力作用后 PGE<sub>2</sub> 的生成与空白对照组相比明显提高 ( $P < 0.01$ ), PGE<sub>2</sub> 的生成在受力后 10 min 开始显著增加 ( $P < 0.01$ ), 60 min 后达到高峰 ( $P < 0.01$ )。结论: PGE<sub>2</sub> 途径是将流动剪切力刺激信号转导进入成骨细胞,促进骨改建的信号转导途径之一。

**关键词** 流动剪切力 成骨样细胞 PGE<sub>2</sub> 信号转导

## Effects of Fluid Shear Stress on PGE<sub>2</sub> Synthesis of Primary Osteoblast-like Cells in Rats

Qiao Ju, Chen Weihui, Luo Songjiao, et al

The College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective:** The purpose of this study is to study the function of PGE<sub>2</sub> during the signal transduction in which fluid shear stress regulates the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. **Methods:** The isolated rat primary osteoblast-like cells were exposed to fluid shear stress 0.12 mN/cm<sup>2</sup> for 5, 10, 15, 30, 60 and 120 minutes respectively in a flow chamber. The release of PGE<sub>2</sub> was examined. **Results:** After exposure to fluid shear stress, the PGE<sub>2</sub> synthesis of rat primary osteoblast-like cells increased significantly ( $P < 0.01$ ) when compared with the control. After 10 minutes, the release of PGE<sub>2</sub> began to increase significantly ( $P < 0.01$ ) and the effect was maximal after 60 minutes ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** PGE<sub>2</sub> pathway may be one of the signal-transduction pathways which can transduce the fluid shear stress into osteoblast-like cells and then stimulate the bone remodeling.

**Key words:** fluid shear stress PGE<sub>2</sub> osteoblast-like cell signal transduction

大量的研究表明适当大小的机械应力刺激能促进成骨细胞的增殖、总蛋白产物和 DNA 合成增加<sup>1</sup>。然而,成骨细胞受到机械应力后如何应答所施加的刺激信号,并将信号转导进入细胞内,从而调节骨改建的分子机制仍未有清楚的认识。本研究采用参照 Hochmuth 等<sup>2</sup>设计的流室系统,对体外培养的单层原代大鼠成骨样细胞施加精确可控的流动剪切力。通过检测成骨样细胞受到流动剪切力后不同时间段的 PGE<sub>2</sub> 的表达变化,探索

PGE<sub>2</sub> 在应力刺激下骨改建中的作用机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

细胞培养主要试剂:199 细胞培养液(GIBICO BRL, USA), I 型胶原酶(Sigma Co, USA), 胎牛血清(GIBICO BRL, USA)等。

流室系统主要包括:流室:由两块有机玻璃平板和一块胶垫构成。灌流系统:由蠕动泵、储液瓶及若干导管构成。

流动剪切力 ( $\text{mN}/\text{cm}^2$ ) =  $6 Q / H^2 W$  ( :灌流液的粘度; Q:单位时间内流经流室的灌流流量;H:流室高度;W:流室宽度)。

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39600167)

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院

<sup>3</sup>H-PGE<sub>2</sub> 放免试剂盒(解放军总医院北京东亚免疫技术研究所)。

### 1.2 方法

1.2.1 原代大鼠成骨样细胞培养 选用5只刚出生数小时的SD大鼠,无菌条件下取其颞、顶骨,采用改良酶消化法,从鼠颅盖骨中分离出成骨细胞进行体外传代培养,并根据成骨细胞的生物学特性,采用酶细胞化学法及形态观察证实其具有成骨细胞的功能和特性。当原代细胞生长融合成单层后,消化分离并以1×10<sup>5</sup>个/ml的细胞密度接种于载玻片上,培养24~36h后进行实验。

1.2.2 细胞加力 将培养有单层成骨样细胞的载玻片嵌入流室底部的凹槽中,流室密封后,由精密输液泵提供=0.12 mN/cm<sup>2</sup>的流动剪切力,整个流室系统及加力过程保持37℃恒温,灌流液中pH值维持7.2~7.4。对贴壁的成骨样细胞持续施加5、10、15、30、60和120 min的流动剪切力,分别测定不同时段灌流液中PGE<sub>2</sub>的表达量。空白对照组除不受流动剪切力外,余处理同细胞加力组。

1.2.3 PGE<sub>2</sub>的检测 本实验采用PGE<sub>2</sub>放射免疫法测定。分别对标准PGE<sub>2</sub>作系列稀释,每种浓度作2管,制成标准曲线。

样本提取:取样本1 ml至提取管中,加入0.1 mol/ml HCl调节pH为3.5。加入重蒸馏乙酸乙酯5 ml,置混匀器混匀2 min,3500 r/min离心15 min。将上清液吸至20 ml液闪瓶中。重复操作一次,将两次的提取液合并,用氮气吹干。向吹干样本中加入1 ml PBS,充分振荡溶解后待测。

PGE<sub>2</sub>放免测定程序:按表1所示加液程序进行反应,待反应结束后,将反应液在4℃ 3500 r/min离心20 min。取上清液倒入加有11 ml 0.4% PPO,0.02% POPOP二甲苯闪烁液的液闪瓶中,放置3~5h后进行闪烁计数。按预先编制的程序,测量后直接打印出样本中PGE<sub>2</sub>的浓度。

表1 PGE<sub>2</sub>放免测定加液程序(μl)

加入物	T	N	S <sub>0</sub>	S <sub>1-7</sub>	U
PBS	300	200	100	—	—
标准品	—	—	—	100	—
待测样本	—	—	—	—	100
抗血清	—	—	100	100	100
	混匀,放4	反应8~10h			
<sup>3</sup> H标记物	100	100	100	100	100
分离剂	—	100	100	100	100
	混匀,放4	反应15~20min			

1.2.4 统计学分析 应用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较空白对照组与受力组的PGE<sub>2</sub>有无差别,q检验分别比较两组不同时间段的PGE<sub>2</sub>的生成有无差别。

## 2 结果

大鼠成骨样细胞受到0.12 mN/cm<sup>2</sup>的流动剪切力后生成的PGE<sub>2</sub>明显高于空白对照组(P<0.01)(图1)。受力组细胞在10min时,PGE<sub>2</sub>的生成明显提高(P<0.01),在60min时达到高峰(P<0.01)。而空白对照组各时段PGE<sub>2</sub>的生成无显著性差异(图2,3)。

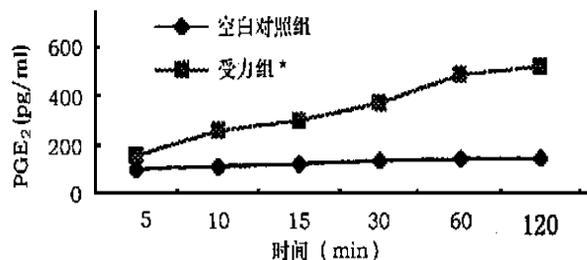


图1 受力组和空白对照组不同时段PGE<sub>2</sub>的表达变化

\*与空白对照组相比,经单因素方差分析,P<0.01

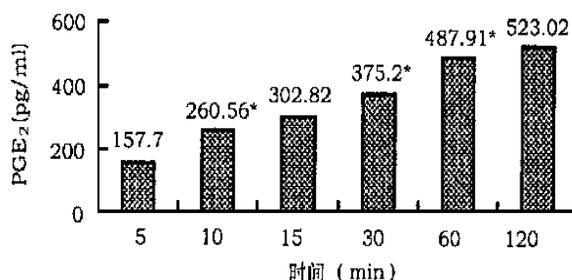


图2 受力组大鼠成骨样细胞不同时段PGE<sub>2</sub>表达的动态分布

显示数据为均数(n=3) \*与前一时间点比较,经q检验,P<0.01

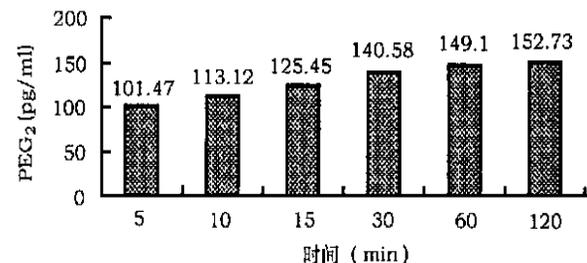


图3 空白对照组大鼠成骨样细胞不同时段PGE<sub>2</sub>表达的动态分布

显示数据为均数(n=3) 两两比较,经q检验,P>0.05

## 3 讨论

目前的观点认为骨组织细胞(如成骨细胞、骨细胞)在受到机械应力刺激后,通过信号转导途径,如应力激活性离子通道、PGE<sub>2</sub>依赖性通道、受体酪氨酸蛋白激酶磷酸化途径和整合素-细胞骨架-细胞核通道将这些信号转导进入细胞内,促使细胞内第二信使、NO及一些早期迅速反应基因(c-fos、c-jun和Egr-1)的合成,从而调节细胞的增殖和分

化,影响骨改建。

笔者的研究已证实,0.12 mN/cm<sup>2</sup> 的流动剪切力明显促进了细胞的增殖。在此基础上,本研究进一步探讨流动剪切力刺激成骨细胞增殖,促进骨改建的信号转导过程中 PGE<sub>2</sub> 的作用。以往体内实验证实 PGE<sub>2</sub> 能提高骨内钙化组织含量、骨愈合速度以及成骨细胞的复制和分化功能<sup>3</sup>,从而介导骨的改建过程。这可能与 PGE<sub>2</sub> 提高成骨细胞内 Ca 含量和 cAMP 水平,调节 DNA 合成,促进胶原的合成有关<sup>4,5</sup>。另外, Klein-Nulend 等<sup>6</sup> 研究结果表明 PGE<sub>2</sub> 还能通过调节成骨细胞合成和分泌 TGF- $\beta$ , 促进成骨细胞的增殖,从而刺激骨的形成。

有研究发现<sup>7</sup> 低水平(0.06 mN/cm<sup>2</sup>) 和高水平(0.24 mN/cm<sup>2</sup>) 稳态流动剪切力作用下,将刺激成骨细胞 PGE<sub>2</sub> 的合成,分别增加了 9 和 20 倍。胎鼠颅骨细胞受到应变作用后, PGE<sub>2</sub> 的合成速度增加约 3.5 倍<sup>8</sup>。本实验结果发现体外培养的大鼠成骨样细胞在受到 0.12 mN/cm<sup>2</sup> 的流动剪切力作用后, PGE<sub>2</sub> 的生成明显高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ), 细胞受力后 10 min PGE<sub>2</sub> 开始明显提高,并在 60min 时达到高峰。因此作者认为 PGE<sub>2</sub> 途径是将流动剪切力刺激信号转导进入成骨细胞,促进细胞增殖的信号转导途径之一。

PGE<sub>2</sub> 如何将机械应力刺激信号转导进入细胞的作用机制仍不很清楚。有学者<sup>9</sup> 认为成骨细胞在受到流动力刺激后,激活细胞膜上的磷脂酶 A<sub>2</sub>, 促进细胞膜卵磷脂、肌醇磷脂水解,从而促进前列腺素的前身物质—长链不饱和脂肪酸,如花生四烯酸游离,通过一系列酶的复杂代谢过程后合成并分泌 PGE<sub>2</sub>。PGE<sub>2</sub> 激活刺激性 G 蛋白(guanine nucleotide binding protein, G protein),后者激活腺苷酸环化酶,随后激活磷酸二酯酶,最终导致胞内 cAMP

的快速聚集。cAMP 水平的增加将激活鸟苷酸脱羧酶,从而促进 DNA 的合成<sup>10</sup>。

## 参考文献

- 1 Reich KM, Gay CV, Frangos JA. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol*, 1990, 143(1):100~104
- 2 Hochmuth RM, Mohandas N, Blackshear PL. Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys J*, 1973, 13(8):747~762
- 3 Norrdin RW, Shih MS. Systemic effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on vertebral trabecular remodeling in beagles used in a healing study. *Calcif Tissue Int*, 1988, 42(6):363~368
- 4 Sonjen D, Binderman I, Berger E, et al. Bone remodeling induced by physical stress is prostaglandin E<sub>2</sub> mediated. *Biochem Biophys Acta*, 1980, 627(1):91~100
- 5 Nagai M. The effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on DNA and collagen synthesis in osteoblasts in vivo. *Calcif Tissue Int*, 1989, 44(6):411~420
- 6 Klein-Nulend J, Semeins CM, Burger EH. Prostaglandin mediated modulation of transforming growth factor metabolism in primary mouse osteoblastic cell in vivo. *J Cell Physiol*, 1996, 168(1):1~7
- 7 Reich KM, Frangos JA. Effect of flow on prostaglandin E<sub>2</sub> and inositol triphosphate levels in osteoblasts. *Am J Physiol*, 1991, 261(3 pt 1):C428~432
- 8 Yeh CK, Rodan GA. Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. *Calcif Tissue Int*, 1984, 36(Suppl 1):S67~71
- 9 Binderman I, Zor U, Kaye AM, et al. The transduction of mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A<sub>2</sub>. *Calcif Tissue Int*, 1988, 42(4):261
- 10 Binderman I, Shimshoni Z, Sonjen D. Biochemical pathways involved in the translation of physical stimulus into biological message. *Calcif Tissue Int*, 1984, 36(suppl 1):S82~85

(2000-08-21 收稿, 2000-12-28 修回)

(本文编辑 王 晴)