

不同加载时间流体剪切力对成骨细胞中基质金属蛋白酶-1和基质金属蛋白酶抑制剂-1表达的影响

杨全增^{1,2}, 张成俊^{1,2}, 丁宁^{1,2}, 李忠浩^{1,2}, 夏亚一^{1,2}

1. 兰州大学第二医院骨科, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省骨关节疾病研究重点实验室, 甘肃 兰州 730000

【摘要】目的:研究加载不同时间流体剪切力对成骨细胞基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和基质金属蛋白酶抑制因子(TIM-1)表达的影响。**方法:**利用自行设计的平行平板流体剪切力加载装置,对MC3T3-E1成骨细胞施加12 dyn/cm²流体剪切力0、15、30、45、60 min,采用蛋白免疫印记实验检测MMP-1和其抑制剂TIM-1的表达水平。**结果:**对体外培养的MC3T3-E1细胞加载12 dyn/cm²流体剪切力,随着加载时间的延长,MMP-1表达上调,TIM-1表达水平下调,在45 min左右达到高峰。**结论:**加载不同时间的12 dyn/cm²流体剪切力能够上调MC3T3-E1成骨细胞MMP-1的表达,下调TIM-1的表达,加载45 min最合适。

【关键词】流体剪切力;MC3T3-E1细胞;基质金属蛋白酶;基质金属蛋白酶抑制剂

【中图分类号】R35

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2018)01-0102-04

Effects of loading time of fluid shear stress on expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in osteoblasts

YANG Quanzeng^{1,2}, ZHANG Chengjun^{1,2}, DING Ning^{1,2}, LI Zhonghao^{1,2}, XIA Yayi^{1,2}

1. Department of Orthopedics, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Key Laboratory of Orthopaedics, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To discuss the variations of the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in osteoblasts with the increasing loading time of fluid shear stress (FSS). **Methods** MC3T3-E1 cells were subjected to FSS (12 dyn/cm²) using a parallel plate flow system for 0, 15, 30, 45, 60 min. The expression level of MMP-1 and its inhibitor TIMP-1 were detected by Western blotting. **Results** FSS of 12 dyn/cm² was applied to the MC3T3-E1 cells cultured *in vitro*. With the increase of loading time, the expression of MMP-1 was up-regulated, while the expression of TIMP-1 was down-regulated. Forty-five minutes after loading, the expression of MMP-1 was the maximum and that of TIMP-1 reached the minimum. **Conclusion** Loading 12 dyn/cm² FSS can promote the expression of MMP-1, and down-regulates the expression of TIMP-1 in MC3T3-E1 cells. The optimal loading time of FSS is 45 minutes.

Keywords: fluid shear stress; MC3T3-E1 cell; matrix metalloproteinase; tissue inhibitors of matrix metalloproteinase

前言

成骨细胞参与骨组织的形成与吸收等多种生理功能,适宜的机械应力可以刺激成骨细胞,介导骨组

织的重建。骨重建通过骨吸收和骨形成两种机制的偶联进行,在骨吸收的过程中,由成骨细胞分泌的基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)可以降解骨基质,其特异性抑制剂基质金属蛋白酶抑制因子(Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases, TIMPs)可以抑制MMPs的功能,MMPs和TIMPs之间保持平衡是保证骨重建正常进行的前提条件^[1]。机械应力刺激可引起骨组织微管内液体的流动,形成流体剪切应力(Fluid Shear Stress, FSS),FSS是一种存在广泛、研究较为充分的机械应力,只有处于生理范围内适宜的机械应力刺激才能有效地促进成

【收稿日期】2017-09-17

【基金项目】国家自然科学基金(81672207);甘肃省青年科技研究基金(2015GS05051)

【作者简介】杨全增,硕士研究生,研究方向:细胞生物力学、关节外科, E-mail: yangqz2015@126.com

【通信作者】夏亚一,博士,主任医师,教授,研究方向:关节外科、生物材料、细胞生物力学, E-mail: xiayayi@126.com

骨,有利于骨组织的生长和改建^[2]。因此,研究加载不同时间FSS对成骨细胞MMPs和TIMPs表达的影响,对于了解骨组织重建的机制是非常重要的,本实验通过对MC3T3-E1细胞加载不同时间12 dyn/cm²的FSS,观察MMP-1和TIMP-1的表达水平,有助于了解FSS作用下骨组织重建的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

实验细胞为MC3T3-E1细胞(中国医学科学院)。试剂有胎牛血清(PAN-Biotech,德国); α -MEM培养基(Hyclone公司,美国);磷酸盐缓冲液PBS(中杉金桥,中国);胰蛋白酶(Sigma公司,美国);青霉素-链霉素双抗(武汉博士德生物工程公司,中国);RIPA强力细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司,中国);PMSF(Genview,美国);鼠 β -actin一抗(Sigma,美国);兔MMP-1一抗(Abcam,英国);鼠TIMP-1一抗(Abcam,英国);山羊抗兔二抗(中杉金桥,中国);兔抗小鼠二抗(中杉金桥,中国)。实验仪器有细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司,中国);垂直电泳仪(Bio-Rad,美国);电转仪(Bio-Rad,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将小鼠MC3T3-E1细胞接种到无菌培养瓶中, α -MEM培养基中添加10%胎牛血清和100 U/mL青链霉素制成完全培养基,在温度37℃、CO₂饱和度5%的培养箱中孵育细胞,每隔2~3 d换液1次,待细胞融合至80%~90%时,用0.25%胰酶消化,接种至25 cm²培养瓶中继续传代培养。

1.2.2 加载FSS 在显微镜下观察培养瓶中的成骨细胞,选择生长达80%~90%以上融合的成骨细胞,将细胞培养瓶中的成骨细胞用胰酶作用后,轻轻吹打成细胞悬液。将吹打好的细胞悬液(浓度约为4 000个/mL)接种于20 mm×50 mm无菌盖玻片上,静置约1 h待细胞完全贴壁后加入培养基继续培养。待细胞融合至80%~90%后,放置盖玻片到密闭加力小室中,组装层流流体小室,并将其连接到储液柱和蠕动泵上。向储液柱中加入200 mL预热(37℃)的 α -MEM基础培养基,以蠕动泵为动力,加载大小为12 dyn/cm²的FSS,分别加FSS作用0、5、15、30、45、60 min。

1.2.3 蛋白质免疫印迹实验(Western blotting) 迅速吸除成骨细胞的培养液,用预冷(4℃)的PBS轻柔冲洗细胞3次,然后吸净培养瓶或者是玻片中的PBS液体。接着加入RIPA和PMSF的混合液(100:1)裂解细胞,置于冰上缓慢摇晃30 min后,用细胞刮刀刮下,将细胞收集于1.5 mL的离心(Eppendorf, EP)管

中。然后,在4℃、12 000 r/min条件下离心15 min,用移液器缓慢吸取上清液于EP管中,加入上清液1/3体积量的蛋白上样缓冲液后,立即在沸水中煮沸3~5 min,然后放到-80℃冰箱冷藏。以 β -actin作为内参,配制聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE凝胶),然后经过上样、电泳、电转、封闭、孵育一抗、洗膜、孵育二抗、洗膜、曝光等步骤得到条带。

1.2.4 统计学分析 所有的实验数据均重复3次。实验数据以均数±标准差表示,采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,用Image pro-Plus 6.0软件测量条带灰度值,两组均数比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

为检测FSS对成骨细胞MMP-1和TIMP-1表达的影响,对MC3T3-E1细胞加载12 dyn/cm²的FSS分别作用0、15、30、45、60 min,采用Western blotting检测MMP-1和TIMP-1表达的情况,以 β -actin作为内参。如图1~3所示,MMP-1和TIMP-1的变化呈现时间依赖性。MMP-1从15 min开始逐渐增加,差异有统计学意义($P<0.01$),在45 min达到高峰,60 min开始下降,但仍然高于空白对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);TIMP-1在15 min时表达量开始下降,在45 min时降到最低,差异有统计学意义($P<0.01$),在60 min时表达量又上调。这说明在MC3T3-E1成骨细胞中,随着FSS加载时间的延长,FSS可以上调MMP-1的表达,下调TIMP-1的表达,加载45 min作用最明显。

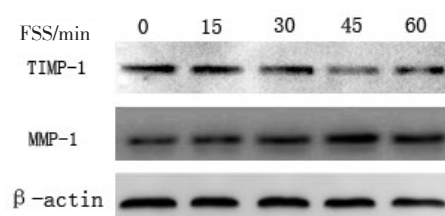


图1 FSS对成骨细胞内的MMP-1和TIMP-1蛋白表达的影响
Fig.1 Effect of fluid shear stress (FSS) on the expression of MMP-1 and TIMP-1 in osteoblasts

3 讨论

机械应力在骨组织的代谢中起着重要的作用^[3],当骨组织受到较小的机械力学作用时,不能有效刺激骨基质的合成,长期以往则会产生废用性改变,导致骨量减少,形成骨质疏松;而在过载的机械应力作用下会产生病理性编织骨,骨质发生增生硬化,骨细

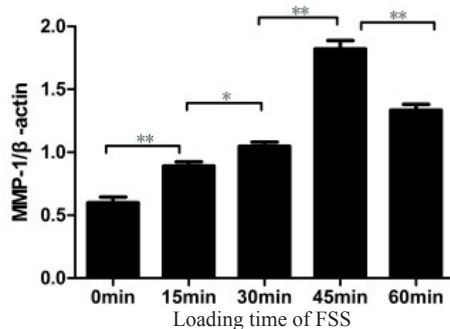


图2 FSS对成骨细胞内MMP-1表达的影响

Fig.2 Effect of FSS on the expression of MMP-1 in osteoblasts

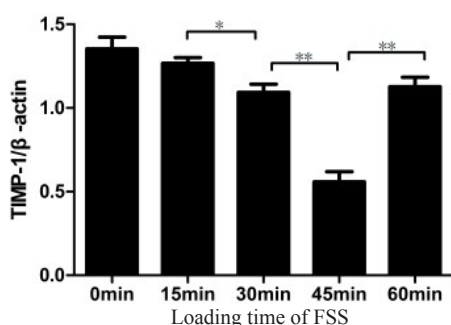
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 

图3 FSS对成骨细胞内TIMP-1表达的影响

Fig.3 Effect of FSS on the expression of TIMP-1 in osteoblasts

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

胞的生长也受到抑制,只有处于生理范围内适宜的机械应力刺激才能有效地产生成骨作用,介导骨组织的重建^[4]。通常机体能感受到的机械应力有压应力、张应力、FSS、离心力及电磁力等^[5],而FSS是一种存在广泛、研究较为充分的机械应力^[6-7]。人体正常骨组织中骨陷窝、骨小管及骨小梁充填构成纵横交错的三维网状通路,这些腔隙结构中充满了组织液,形成骨组织内流动液体;正常活动对骨组织施加的机械应力,将引起骨腔隙间液流动产生FSS,促进成骨细胞增殖^[8-9]。我们实验室前期研究发现,12 dyn/cm² FSS加载30~60 min可有效刺激成骨细胞增殖,施加较高的FSS(18 dyn/cm²)则抑制了成骨细胞增殖^[10]。

MMPs是参与降解包括骨组织以及其他组织细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)的蛋白酶家族,在重建ECM和维持正常的骨形态方面起着重要的作用,在成骨细胞系和其他细胞中,MMPs的表达受激素、细胞因子和生长因子的调节^[11-12]。在骨吸收的过程中,蛋白酶最主要的作用是溶解骨基质^[13]。有研究发现,多种MMPs参与了骨基质的降解过程,MMP-1主要由成骨细胞产生,可以降解I型胶原,MMPs和TIMPs之间保持平衡有利于骨重建的正常

进行,也可以预防骨质疏松等其他骨代谢性疾病的发生^[14]。

在本研究中,根据我们前期的研究,对MC3T3-E1成骨细胞施加12 dyn/cm²的FSS是对成骨细胞最适宜的刺激^[15]。加载12 dyn/cm²的FSS分别作用0、15、30、45、60 min,MMP-1和TIMP-1蛋白的变化随着加载时间而变化。MMP-1从15 min开始逐渐增加,在45 min达到高峰,60 min开始下降;TIMP-1在15 min时表达量开始下降,在45 min时降到最低,在60 min时表达量又上调。这说明FSS可以促进MMP-1的表达,降解骨基质和I型胶原,进而促进骨吸收;但同时其特异性抑制因子TIMP-1随着FSS加载时间的延长,表达量上调,可以抑制MMP-1的功能以减弱其对骨基质和I型胶原的降解,调节MMPS和TIMP-1的动态平衡,维持机体正常的骨形成和吸收^[16]。有研究表明FSS作用于成骨细胞,可以上调MMPs的表达,MMPs是存在于骨基质中的蛋白酶,可以降解ECM,引起信号分子的释放,诱导信号转导的启动,从而促进Runx-2、c-fos/c-jun、Nmp4/CIZ等基因的表达^[17-18]。有研究发现在人牙周韧带干细胞中,FSS增加了MMP-1、MMP-2的表达,抑制TIMP-2的表达,用细胞外信号调节激酶阻滞剂干预后阻断了FSS诱导的MMP-1的表达,这表明FSS诱导MMP-1的表达是通过细胞外信号调节激酶信号通路来调节的^[19]。

MC3T3-E1成骨细胞是通过哪条信号通路将机械信号转化为生物化学信号,进而调节MMPs降解ECM?目前还不清楚,有待进一步的研究,MMPs是存在于骨基质中的蛋白酶,可降解多种胶原和骨基质。因此,研究MMPs在骨质疏松发病机制中的作用非常重要,尤其是随着人们对各种MMPs抑制剂的了解,它有可能成为研发抗骨质疏松药物的新靶点。

【参考文献】

- [1] PAIVA K B, GRANJEIRO J M. Matrix metalloproteinases in bone resorption, remodeling, and repair[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148: 203-303.
- [2] PRICE C, ZHOU X, LI W, et al. Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow[J]. *Bone Miner Res*, 2011, 26(2): 277-285.
- [3] TADDEI R, QUEIROZ JUNIOR C M, MOURA A P, et al. The effect of CCL3 and CCR1 in bone remodeling induced by mechanical loading during orthodontic tooth movement in mice[J]. *Bone*, 2013, 52(1): 259-267.
- [4] ZHANG M, ISHIKAWA S, INAGAWA T, et al. Influence of mechanical force on bone matrix proteins in ovariectomised mice and osteoblast-like MC3T3-E1 cells[J]. *In Vivo*, 2017, 31(1): 87-95.

- [5] TAKANO-YAMAMOTO T. Osteocyte function under compressive mechanical force[J]. Jap Dental Sci Rev, 2014, 50(2): 29-39.
- [6] AISHA M D, NOR-ASHIKIN M N, SHARANIZA R, et al. Orbital fluid shear stress promotes osteoblast metabolism, proliferation and alkaline phosphates activity *in vitro*[J]. Exp Cell Res, 2015, 337(1): 87-93.
- [7] GENG B, WANG C F, ZHANG B, et al. Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced osteoblast apoptosis *via* ERK5 signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 466(1): 117-123.
- [8] 郭来威, 许田恩, 孟会强, 等. 机械应力对成骨细胞影响的研究进展[J]. 中国医学物理学杂志, 2015, 32(6): 785-789.
- GUO L W, XU T E, MENG H Q, et al. Effects of mechanical stress on osteoblasts[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2015, 32(6): 785-789.
- [9] ZHOU X, NAGURO I, ICHIJO H, et al. Mitogen-activated protein kinases as key players in osmotic stress signaling [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860(9): 2037-2052.
- [10] LI P, MA Y C, SHENG X Y, et al. Cyclic fluid shear stress promotes osteoblastic cells proliferation through ERK5 signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 364(1-2): 321-327.
- [11] PAIVA K B, GRANJEIRO J M. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions[J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 1(561): 74-87.
- [12] LIU Y, SONG F, SUN J, et al. Suture compression induced bone resorption with intensified MMP-1 and 13 expressions[J]. Bone, 2012, 51(4): 695-703.
- [13] PRIDEAUX M, STAINES K A, JONES E R, et al. MMP and TIMP temporal gene expression during osteocytogenesis [J]. Gene Exp Patterns, 2015, 18(1-2): 29-36.
- [14] FENG P, ZHANG H, ZHANG Z Q, et al. The interaction of MMP-2/B7-H3 in human osteoporosis[J]. Clin Immunol, 2016, 162: 118-124.
- [15] 张波, 杨利娟, 丁宁, 等. 震荡流体剪切力通过 ERK5 信号通路促进成骨细胞增殖[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10): 1237-1240.
- ZHANG B, YANG L J, DING N, et al. Oscillatory shear stress promotes MC3T3-E1 cells proliferation *via* ERK5 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2016, 22(10): 1237-1240.
- [16] NICHOLS R A, NIAGRO F D, BORKE J L. Mechanical stretching of mouse calvarial osteoblasts *in vitro* models changes in MMP-2 and MMP-9 expression at the bone-implant interface[J]. J Oral Implantol, 2015, 42(2): 138-144.
- [17] CHAROONPATRAPONG-PANYAYONG K, SHAH R, YANG J, et al. Nmp4/CIZ contributes to fluid shear stress induced MMP-13 gene induction in osteoblasts[J]. J Cell Biochem, 2007, 102(5): 1202-1213.
- [18] 王瀚, 李东韬, 赵学武, 等. 核基质对成骨细胞的调控作用[J]. 解放军医学院学报, 2014, 35(9): 964-966.
- WANG H, LI D T, ZHAO X W, et al. Role of nuclear matrix in regulation of osteoblasts[J]. Academic Journal of PLA Postgraduate Medical School, 2014, 35(9): 964-966.
- [19] ZHENG L, HUANG Y, SONG W, et al. Fluid shear stress regulates metalloproteinase-1 and 2 in human periodontal ligament cells: involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and P38 signaling pathways[J]. J Biomech, 2012, 45(14): 2368-2375.

(编辑:谭斯允)