

## 机械力对骨细胞诱导破骨细胞分化作用的影响

崔 亮, 李小彤, 张 丁

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院口腔科, 北京 100730

通信作者: 张 丁 电话: 010-69156334, 电子邮件: dingz77@sina.com

**摘要:** 目的 评估机械力对骨细胞诱导破骨细胞分化作用的影响。方法 对 MLO-Y4 骨细胞施以 12 dyn/cm<sup>2</sup> 流体剪切力, 在加力第 1、2、4、6、12、24 小时, 收集加力后的细胞与同源性小鼠骨髓干细胞共存培养, 于第 9 天进行抗酒石酸磷酸酶染色, 计数并比较染色阳性的破骨细胞数目。采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测不同加力时间点上骨细胞骨保护因子 (OPG) 和破骨细胞分化因子 (RANKL) mRNA 表达的时序性变化。结果 与未受流体剪切力刺激的骨细胞相比, 受力后所有时间点 MLO-Y4 骨细胞诱导形成的破骨细胞数量均明显降低 ( $P$  均  $< 0.01$ )。MLO-Y4 骨细胞的 OPG mRNA 表达在流体剪切力作用 12 h 内明显升高 ( $P < 0.001$ ), RANKL mRNA 在流体剪切力作用 4 h 内明显降低 ( $P < 0.05$ ), RANKL/OPG 比值在流体剪切力作用 12 h 内均明显降低 ( $P < 0.01$ ); 上述变化在加力 24 h 时与加力前的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 在 12 dyn/cm<sup>2</sup> 流体剪切力负载作用下, MLO-Y4 骨细胞表现出抑制骨吸收的骨保护作用。随着机械负载时间延长, 这种作用逐渐消失。

关键词: MLO-Y4 骨细胞; 机械力; 破骨细胞

中图分类号: R783.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2012)03-0207-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2012.03.003

## Effect of Fluid Flow-induced Shear Stress on Osteoclast Formation Induced by Osteocyte

CUI Liang, LI Xiao-tong, ZHANG Ding

Department of Stomatology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: ZHANG Ding Tel: 010-69156334, E-mail: dingz77@sina.com

**ABSTRACT: Objective** To study the role of osteocyte in bone remodeling due to mechanical loading *in vitro*. **Methods** MLO-Y4 osteocyte-like cells were exposed to fluid flow-induced shear stress (12 dyn/cm<sup>2</sup>) for 0, 1, 2, 4, 6, 12, and 24 hours. Osteocyte exposed to shear stress at different time points were used in co-culture system for 9 days, and then the cells were stained with tartrate-resiseant acid phosphatase on the 9<sup>th</sup> day and the amount of positively stained osteoclasts were counted and compared. The expressions of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappa (RANKL) were detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (semi-quantitative RT-PCR). **Results** Compared with bone cells without stimulation with fluid flow-induced shear stress, the amount of osteocytes significantly decreased at all time points after the application of fluid flow-induced shear stress (all  $P < 0.05$ ). The OPG expression at mRNA levels was significantly up-regulated in the first 12 hours ( $P < 0.001$ ), the RANKL mRNA expression was significantly down-regulated in the first 4 hours ( $P < 0.05$ ), and the RANKL/OPG ratio significantly

decreased within 12 hours ( $P < 0.01$ ). However, all these indicators showed no significant difference at 24 hours when compared with the pre-stimulation level. **Conclusion** Osteocytes may act as mechanosensors that are able to inhibit bone resorption after mechanical loading; however, such effect shows certain adaptation ability to shear stress as time goes.

**Key words:** MLO-Y4 cells; fluid shear stress; osteoclast

*Acta Acad Med Sin*, 2012, 34(3):207-211

以往人们对于骨细胞的认识多局限于功能退化,包埋在骨基质当中,对于其在活跃骨代谢活动中的作用研究较少。近年来,关于骨细胞及其形成的三维骨架结构在骨改建中作用的研究逐渐深入,有学者提出骨细胞是骨组织对力信号的第一感受器<sup>[1]</sup>。要肯定这一观点,至少需证明两方面内容:(1)骨细胞对力信号有相应反应;(2)受力后的骨细胞在微环境中能与成骨细胞或破骨细胞产生互动。本研究评估了机械力对骨细胞诱导破骨细胞分化作用的影响,探讨了骨细胞在机械力作用下对骨改建的作用和意义。

## 材料和方法

**材料** 5~7周龄雄性昆明小鼠24只,清洁级,购自北京大学医学部动物室, MLO-Y4骨细胞(美国Bonewald实验室赠送);平行平板流体剪切力加力装置(自制)<sup>[2]</sup>, CO<sub>2</sub>细胞培养箱(NAPCO, 美国), MLS-3780高压消毒锅(SANYO, 日本), I型鼠尾胶原(Fisher, 美国), 改良基格培养基( $\alpha$ -minimal essential medium,  $\alpha$ -MEM)(GIBCO, 美国), 胎牛血清(Hyclone, 美国), 小牛血清(Hyclone, 美国), 胶原酶(GIBCO, 美国), Trypsin-EDTA(GIBCO, 美国), TE2000-U倒置相差显微镜(Nikon, 日本); TRIZOL(GIBCO, 美国), 逆转录试剂盒、Taq Plus DNA聚合酶、dNTP(上海生工), 100 bp DNA标准物(MBI), 琼脂糖凝胶(GENE TECH), 无水乙醇、异丙醇、氯仿(北京北化精细化学品有限公司)。

**MLO-Y4骨细胞的培养与加力** 参照美国Bonewald实验室提供的MLO-Y4骨细胞培养流程进行培养<sup>[3]</sup>。细胞加力装置如图1所示:加力装置工作时,储液瓶上方的通气开口利于CO<sub>2</sub>气体进入循环的培养基,保证细胞生理状态所需要的微酸性环境。细胞受力时,除了恒流泵主机部分在细胞孵箱之外,其余部分均位于孵箱内部,保证了循环培养液的均衡温度和细胞生长环境的相对无菌。当恒流泵运转

时,培养基匀速通过平行平板流室,在玻璃板上贴壁生长的细胞表面受到持续剪切力。

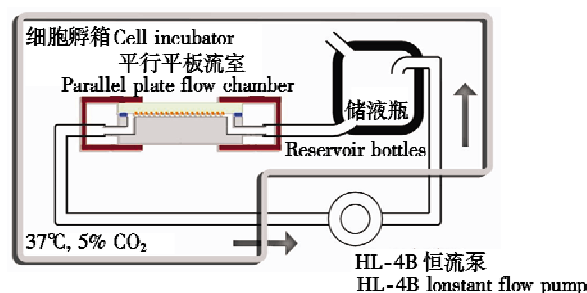


图1 流体剪切力加力装置工作示意图

Fig 1 Schematic diagram of fluid flow induced shear stress

**细胞共存培养** 于加力1、2、4、6、12、24 h终止加力,收集细胞,加入含5%胎牛血清和5%小牛血清的 $\alpha$ -MEM培养液制成细胞悬液,以 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔接种到0.15 mg/ml I型鼠尾胶原包被过的24孔板中,同源骨髓于细胞(从昆明小鼠长骨中获得)悬液以 $1 \times 10^6$ 个细胞/孔分至24孔板中,培养基终体积为2 ml/孔。培养第9天行抗酒石酸磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色,于倒置显微镜10 $\times$ 20倍光镜下计数TRAP染色阳性且含3个以上细胞核的细胞。具体方法为孔板底自制网格(1 mm $\times$ 1 mm/格),利用随机函数随机选取10个视野分别计数,总和计为每孔破骨细胞数,24孔破骨细胞数相加计为此样本破骨细胞数<sup>[4]</sup>。

**骨保护因子和破骨细胞分化因子mRNA表达的检测** 采用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR),引物序列如下:(1)骨保护因子(osteoprotegerin, OPG)(536 bp):上游引物5'-ATCATTGAATGGACAACCCAGG-3',下游引物5'-TGCCTGGCTTCTCTGTTTCC-3';(2)破骨细胞分化因子(receptor activator of nuclear factor-kappa, RANKL)(479 bp):上游引物5'-TTTGCAGGACTCG-ACTCTGGAG-3',下游引物5'-TCCCTCCTTTCATCAG-GTTATGAG-3';(3) $\beta$ -actin(550 bp):上游引物5'-CTGAGAGGGAAATCGTG-3',下游引物:5'-GGTGTA-

AAACGCAGCTC-3'。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖 (w/v) TBE 缓冲液凝胶电泳观察, VILBER LOURMAT 凝胶呈像系统 (法国 Vilber) 照相, 采用 ImageJ 1.38 × 图像分析软件分析条带相对积分光密度, 半定量检测 OPG 和 RANKL mRNA 的表达。

**统计学处理** 采用 SPSS 11.5 统计软件, 不同加力时间点的差异比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

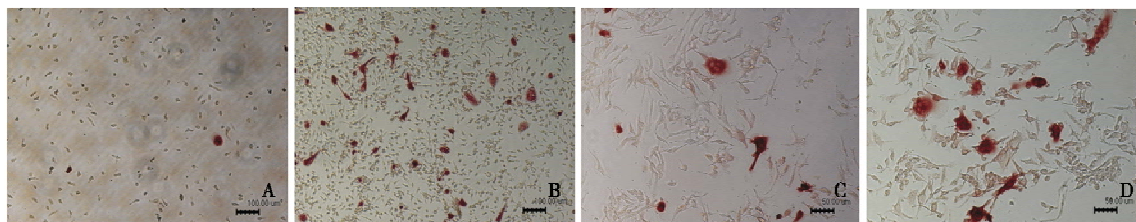
### 流体剪切力对骨细胞诱导破骨细胞分化的影响

骨髓基质细胞单独培养时, 几乎观察不到 TRAP 阳性多核细胞 (破骨细胞) 的形成; MLO-Y4 骨细胞与骨髓基质细胞共存培养时, 镜下可见大量破骨细胞。与未受流体剪切力刺激的 MLO-Y4 骨细胞相比 ( $2013.00 \pm 104.09$ ), 受力后 1、2、4、6、12、24 h MLO-Y4 骨细胞诱导形成的破骨细胞数分别为  $1102.33 \pm 96.95$ 、 $1041.00 \pm 76.31$ 、 $750.66 \pm 126.91$ 、 $932.33 \pm 78.50$ 、 $1141.00 \pm 93.14$ 、 $1357.33 \pm 141.31$ , 均明显降低 ( $P$  均  $< 0.01$ ); 其中, 受力 4 h 时形成的破骨细胞数与其他时间点相比差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 此后随着加力时间延长, 其诱导破骨细胞数目有回升趋势 (图 2)。

**流体剪切力对 MLO-Y4 骨细胞 OPG 和 RANKL-mRNA 表达的影响** 与未受流体剪切力刺激的 MLO-Y4 骨细胞 ( $0.045 \pm 0.021$ ) 相比, 受力后 1、2、4、6、12、24 h MLO-Y4 骨细胞 OPG/ $\beta$ -actin 的比值分别为  $0.516 \pm 0.123$ 、 $0.729 \pm 0.212$ 、 $0.775 \pm 0.180$ 、 $0.298 \pm 0.115$ 、 $0.146 \pm 0.045$ 、 $0.046 \pm 0.012$ , 除受力 24 h 外, 其余各时间点均显著升高 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 其中, 受力 1、2、4 h 间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 受力 6 和 12 h 间差异也无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。

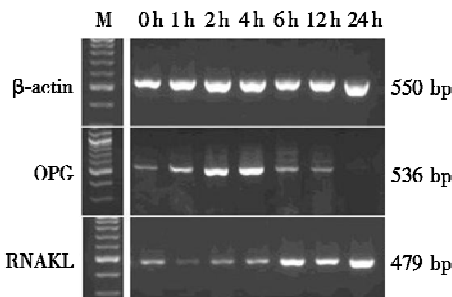
与未受流体剪切力刺激的 MLO-Y4 骨细胞 ( $0.384 \pm 0.013$ ) 相比, 受力后 1、2、4、6、12、24 h MLO-Y4 骨细胞 RANKL/ $\beta$ -actin 的比值分别为  $0.033 \pm 0.015$ 、 $0.121 \pm 0.042$ 、 $0.177 \pm 0.037$ 、 $0.426 \pm 0.101$ 、 $0.323 \pm 0.125$ 、 $0.447 \pm 0.168$ , 其中 1、2、4 h 明显降低 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 6、12、24 h 差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ ); 1 h 与其他个时间点差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ) (图 3)。

与未受流体剪切力刺激的 MLO-Y4 骨细胞 ( $9.912 \pm 4.934$ ) 相比, 受力后 1、2、4、6、12、24 h MLO-Y4 骨细胞 RANKL/OPG 比值分别为  $0.068 \pm 0.018$ 、 $0.161 \pm 0.016$ 、 $0.228 \pm 0.009$ 、 $1.418 \pm 0.455$ 、 $2.210 \pm 0.007$ 、 $9.441 \pm 1.904$ , 除受力 24 h 外, 其余各时间点均显著降低 ( $P$  均  $< 0.001$ )。



A. 骨髓基质细胞单独培养; B. 加力前; C. 受力 4 h 后; D. 受力 24 h 后  
A. bone marrow cells alone; B. before stress loading; C. 4 hours after stress loading; D. 24 hours after stress loading

图 2 受力不同时间 MLO-Y4 骨细胞与骨髓基质细胞共培养的结果 (TRAP, ×100)  
Fig 2 MLO-Y4 cells induce osteoclast formation in co-culture system (TRAP, ×100)



OPG: 骨保护因子; RANKL: 破骨细胞分化因子  
OPG: osteoprotegerin; RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand

图 3 MLO-Y4 骨细胞 OPG、RANKL、OCN mRNA 时序性变化电泳图

Fig 3 Timing diagram of OPG and RANKL mRNA expression in MLO-Y4 cells by RT-PCR

## 讨 论

骨组织和力之间有着复杂的互动关系。例如：全身骨组织必须负荷生理范围内的适当应力，才能维持骨改建平衡，保持骨量；当太空失重或骨废用，即丧失了适当机械负载时，会发生骨质疏松和骨量丢失；骨组织受到适度增加的机械负荷时（如职业运动员），骨组织会有新骨形成，骨量骨密度增加<sup>[5]</sup>。但其中的细胞机制尚不清楚。骨细胞是骨组织中含最丰富的细胞，与骨基质一起构成骨组织的主体。包埋在骨基质当中的骨细胞通过其四通八达的细胞突触和骨组织内部、表面甚至骨髓内的细胞形成了广泛的缝隙连接，目前认为在体内条件下骨细胞向成骨细胞或者破骨细胞传递生物学信号是可能的<sup>[1,6]</sup>。

本研究细胞共存培养的结果表明，骨髓基质细胞在无诱导的条件下进行培养，无法形成破骨细胞，与 Udagawa 等<sup>[7]</sup> 研究结果一致。而将 MLO-Y4 骨细胞与骨髓基质细胞共存培养时，有大量破骨细胞形成。显然在此共存培养体系中，促进骨髓基质细胞向破骨细胞分化的动因来自骨细胞。将其作为考察受力后骨细胞促进破骨细胞分化能力的对照可以发现，受力后 MLO-Y4 骨细胞诱导破骨细胞前体向破骨细胞分化的能力整体表现出下降趋势，在 24 h 加力后期略有回升。也就是说，机械负载可以下调骨细胞促进破骨细胞分化的能力，体外实验条件下，这种下调与受力时间并非成正相关。已知破骨细胞是一个高度分化的多核巨细胞，直接参与骨吸收，是骨组织中行使骨吸收功能的唯一功能细胞。破骨细胞来源于骨髓造血系统，其前驱细胞是前破骨细胞。目前已知在从骨髓干细胞到破骨细胞的分化过程中，RANKL 和集落刺激因子（macrophage Colony-Stimulating Factor, M-CSF）两种因子发挥了重要作用，前者贯穿促进破骨细胞分化的整个过程，后者只在骨髓干细胞向破骨细胞前体的分化和细胞集聚过程中起作用<sup>[8]</sup>。与之相拮抗的因子是破骨细胞生成抑制因子 OPG，它是 RANKL 的可溶性非功能受体。因此推测，受力后骨细胞促进破骨细胞分化的能力发生改变，可能是微环境中上述因子比例发生了改变。

本研究对 RANKL 与 OPG 两种因子的研究结果表明，机械力作用下，MLO-Y4 骨细胞 OPG 和 RANKL mRNA 的表达表现出协调的反应：受力之

初，前者升高，后者降低；随着加力时间延长，前者逐渐降低，后者逐渐回升，体现了两者在破骨行为中互相拮抗的功能。其次，受力后 RANKL/OPG 的比值降低。已知当 RANKL/OPG 比值高时，骨组织微环境倾向于发生骨吸收；RANKL/OPG 比值低时，倾向于发生骨沉积。可见，在机械力作用下，MLO-Y4 骨细胞与骨髓基质细胞共存的微环境中，RANKL/OPG 比值降低提示促进破骨细胞分化和骨吸收的能力减弱，表现出骨保护的作用，这从 RNA 水平上呼应了细胞共存培养的结果。当然，本研究也发现，破骨细胞形成数目与 RANKL/OPG 的比值在降低时间点上并不完全对应，前者在加力后 4 h 降至最低点，后者在加力后 1 h 降至最低点。分析其中的差异，除了实验误差外，可能有以下两种原因：（1）mRNA 表达的变化常常先于功能蛋白变化，因而后者表现出一定的滞后性；（2）破骨细胞共存培养是一个较为复杂的实验条件，相比 mRNA 的变化其影响因素更多，因而表现出来的变化趋势会有所波动。国外学者研究结果也与本研究类似。2006 年，Kim 等<sup>[9]</sup> 研究发现，10 dyn/cm<sup>2</sup> 流体剪切力作用于骨细胞 2 h 后，RANKL mRNA 表达降低，OPG mRNA 表达增加；但 2007 年补充了一些新的实验数据后，该研究组认为骨细胞受力 2 h 后，RANKL 和 OPG mRNA 均表现为升高<sup>[10]</sup>。与之比较，本研究观察时间最长为受力 24 h，观察到 OPG 呈现双向性的变化，结果更为全面。

关于骨细胞其他标志物的研究结果同样表明其在机械力作用下可能表现出骨保护作用。有研究标明剪切力作用之初，骨细胞分泌的一氧化氮表现出明显增高的趋势，而一氧化氮在骨代谢中是一种短效因子，可以促进骨形成，抑制骨吸收<sup>[11]</sup>。此外，还有研究表明在机械力作用下，骨细胞环加氧酶表达增加，前列腺素 E 表达明显降低，从而抑制破骨细胞的形成<sup>[12]</sup>。均与本研究一致。

## 参 考 文 献

- [1] Matsuo K. Cross-talk among bone cells [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009, 18(4):292-297.
- [2] 崔亮, 杨雁琪, 李小彤, 等. 流体剪切力对 MLO-Y4 骨细胞骨性标志物表达的影响 [J]. *中华口腔正畸学*, 2007, 14(3):127-130.
- [3] Kato Y, Windle JJ, Koop BA, et al. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4 [J]. *J Bone Miner Res*,

- 1997, 12(12):2014-2023.
- [4] 崔亮, 李小彤, 杨雁琪, 等. 骨细胞与成骨细胞诱导破骨细胞分化的对比研究 [J]. 中华口腔医学杂志, 2010, 7(45):411-415.
- [5] Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network [J]. FASEB J, 1999, 13(Suppl):s101-s112.
- [6] Cheng B, Zhao S, Bonewald LF, et al. Expression of functional gap junctions and regulation by fluid flow in osteocyte-like MLO-Y4 cells [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(2): 249-259.
- [7] Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells [J]. Endocrinology, 1989, 125(4): 1805-1813.
- [8] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. Nature, 2003, 423(6937):337-342.
- [9] Kim CH, You L, Jacobs CR. Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling [J]. Bone, 2006, 39(5):1043-1047.
- [10] You L, Temiyasathit S, Jacobs CR, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading [J]. Bone, 2008, 42(1):172-179.
- [11] Bakker AD, Soejima K, Burger EH, et al. The production of nitric oxide and prostaglandinE (2) by primary bone cells is shear stress dependent [J]. J Biomech, 2001, 34(5):671-677.
- [12] Lau E, AL-Dujaili S, Guenther A, et al. Effect of low - magnitude, high -frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts [J]. Bone, 2010, 46(6):1508-1515.

(收稿日期: 2011-07-21)