

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.50.002 [http://www.crter.org]

刘名燕, 李燕, 钱红, 冯云霞, 段银钟, 李永明. 牵张应力介导细胞成骨分化及相关基因的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(50):8629-8634.

牵张应力介导细胞成骨分化及相关基因的表达***☆

刘名燕¹, 李燕¹, 钱红², 冯云霞¹, 段银钟², 李永明² (¹山西医科大学口腔系, 山西省太原市 030001; ²解放军第四军医大学口腔医学院正颌科, 陕西省西安市 710032)

文章亮点:

文章的创新性为证实 MC3T3-E1 细胞受到 12% 细胞形变率的周期性牵张应力作用时, ERK1/2 信号通路及核因子 κ B 信号通路同时被激活。说明牵张应力可通过 ERK1/2 信号通路及核因子 κ B 信号通路调节成骨细胞分化及相关基因的表达。

关键词:

组织构建; 骨组织构建; 牵张应力; 成骨细胞; ERK1/2; 核因子 κ B; 信号转导; 碱性磷酸酶; I 型胶原; 白细胞介素 6; 国家自然科学基金

主题词:

应力, 物理; 成骨细胞; NF- κ B; 碱性磷酸酶; 胶原 I 型; 白细胞介素 6

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(30970697, 31370943)*; 山西医科大学博士启动基金项目(B03201219)*

摘要

背景: ERK1/2 信号通路和核因子 κ B 信号通路是否参与了牵张应力作用下 MC3T3-E1 细胞成骨分化及相关基因表达的调控, 尚不清楚。

目的: 观察机械牵张应力对作用下 ERK1/2 和核因子 κ B 通路对成骨细胞碱性磷酸酶、I 型胶原、骨钙蛋白、白细胞介素 6 表达的影响, 探讨 ERK1/2 与核因子 κ B 信号通路对成骨细胞分化的调控作用。

方法: 体外培养的 MC3T3-E1 细胞, 以 ERK1/2 通路特异性抑制剂 PD098059 及核因子 κ B 通路抑制剂 PDTC 分别处理 30 min 后加载 12% 的拉伸应变率 24 h, 以正常细胞及单纯加载 12% 牵张应力 24 h 为对照。采用 ELISA 及 Real-time PCR 方法检测细胞加载前后碱性磷酸酶活性、I 型胶原、骨钙蛋白及白细胞介素 6 mRNA 的表达。

结果与结论: 在 12% 牵张应力作用下, MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶、I 型胶原、白细胞介素 6 的表达受 ERK1/2 信号通路的调控, 而骨钙蛋白基因表达的变化不受 ERK1/2 通路的影响。核因子 κ B 信号通路抑制剂 PDTC 可显著抑制机械牵张应力作用下 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶活性的降低, 同时抑制白细胞介素 6 基因的表达, 而 I 型胶原、骨钙蛋白基因表达的变化不受核因子 κ B 信号通路的影响。结果表明牵张应力可以通过 ERK1/2 和核因子 κ B 通路影响 MC3T3-E1 细胞的成骨分化及相关基因表达。

Osteogenic differentiation and related gene expression mediated by mechanical strain

Liu Ming-yan¹, Li Yan¹, Qian Hong², Feng Yun-xia¹, Duan Yin-zhong², Li Yong-ming² (¹Dental Department, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; ²Department of Orthodontics, College of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The regulatory role of extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) signal pathways in the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells subjected to mechanical strain remains unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effects of ERK1/2 and NF- κ B signal pathway on alkaline phosphatase, type I collagen, osteocalcin and interleukin-6 expression in osteoblasts in response to mechanical strain, and to explore the regulatory effects of ERK1/2 and NF- κ B signal pathway on osteoblast differentiation.

METHODS: MC3T3-E1 cells cultured *in vitro* were separately treated with ERK1/2 pathway specific inhibitor PD098059 and NF- κ B pathway inhibitor PDTC for 30 minutes, and subjected to 12% elongation for 24 hours. Normal cells and cells along loading 12% mechanical strain for 24 hours were considered as controls. Enzyme linked immunosorbent assay and real-time PCR were utilized to detect alkaline phosphatase activities, type I collagen, osteocalcin and interleukin-6 mRNA expression before and after cell loading.

RESULTS AND CONCLUSION: Under 12% mechanical strain, alkaline phosphatase, type I collagen, and interleukin-6 expression was regulated by ERK1/2 signal pathway in MC3T3-E1 cells, but osteocalcin gene expression was not affected by ERK1/2 pathway. NF- κ B signal pathway inhibitor PDTC significantly suppressed

刘名燕☆, 女, 1975 年生, 山西省长治市人, 汉族, 2012 年解放军第四军医大学毕业, 博士, 主要从事口腔正畸生物力学研究。
mlinda123@163.com

通讯作者: 李永明, 博士, 副教授, 研究生导师, 解放军第四军医大学口腔医学院正颌科, 陕西省西安市 710032
liyongming@fmmu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)50-08629-06

修回日期: 2013-10-23
(201309068/W · Q)

Liu Ming-yan☆, M.D., Dental Department, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
mlinda123@163.com

Corresponding author: Li Yong-ming, M.D., Associate professor, Master's supervisor, Department of Orthodontics, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
liyongming@fmmu.edu.cn

Accepted: 2013-10-23

alkaline phosphatase activities in MC3T3-E1 cells under mechanical strain, and inhibited interleukin-6 gene expression. However, type I collagen and osteocalcin gene expression was not affected by NF- κ B signal pathway. Results suggested that mechanical strain affected osteogenic differentiation and relevant gene expression in MC3T3-E1 cells by ERK1/2 and NF- κ B signal pathway.

Subject headings: stress, mechanical; osteoblasts; NF- κ B; alkaline phosphatase; type I collagen; interleukin-6

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 30970697*, 31370943*; the Doctoral Priming Foundation of Shanxi Medical University in China, No. B03201219*

Liu MY, Li Y, Qian H, Feng YX, Duan YZ, Li YM. Osteogenic differentiation and related gene expression mediated by mechanical strain. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(50):8629-8634.

0 引言 Introduction

成骨细胞作为应力敏感细胞,在骨组织应力改建过程中发挥着重要作用,研究机械应力状态下成骨细胞生物学行为的变化是了解正畸牙槽骨改建机制的关键问题之一。ERK1/2信号通路和核因子 κ B信号通路是成骨细胞内应力信号转导过程中两条重要的信号转导通路,其激活后诱导表达的一些细胞因子对于成骨细胞和破骨细胞的分化成熟以及功能活性非常重要^[1-3]。但是由于应力大小及作用方式不同,牵张应力作用下,ERK1/2信号通路和核因子 κ B信号通路是否参与了MC3T3-E1细胞成骨分化及相关基因表达的调控,尚不清楚。因此,实验观察机械牵张力对ERK1/2信号通路和核因子 κ B信号通路的影响,并通过分别给予ERK1/2信号通路和核因子 κ B信号通路的特异性抑制剂,在基因水平上了解牵张应力作用下ERK1/2信号通路和核因子 κ B信号通路对MC3T3-E1细胞成骨分化及相关基因表达的调控作用。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机分组,细胞学实验对比观察。

时间及地点: 2010年9月至2012年6月在解放军第四军医大学口腔医学院中心实验室完成实验。

材料:

牵张应力介导细胞成骨分化及相关基因的表达实验试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
MC3T3-E1 细胞株	ATCC 公司
DMEM 培养基、胰蛋白酶、96 孔培养板	Gibco 公司
胎牛血清	德国 BIOCHROM AG 公司
6 孔弹性培养板	Flexcell 公司 美国
倒置显微镜及照相系统	Olympus, Japan
细胞应力加载仪	解放军第四军医大学
Synergy HT 多功能酶标仪	美国 BioTek 公司
ALP 检测试剂盒	南京建成生物制品公司
RNA 抽提试剂盒	MBI 公司
Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和引物合成	上海生物工程公司
Real-time PCR 仪	Corbett Research, 美国
PD098059、PDTC	Sigma 公司

实验方法:

细胞培养: 用含有体积分数10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素和1%谷氨酰胺的DMEM培养液,在37 °C、体积分数5%CO₂孵箱中常规培养MC3T3-E1细胞,每3 d更换培养液1次,传代时先用2.5 g/L胰蛋白酶消化,再以1:3的比例进行传代。生长良好的MC3T3-E1细胞,胰酶消化后吹散,细胞计数后调整浓度至 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$,加入6孔弹性基底膜培养(Flexcell, USA),标准环境下以含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液孵育24 h后,然后按实验分组,利用自行研制的多通道细胞牵张应力加载系统,对培养在6孔弹性基底膜培养板上的MC3T3-E1细胞进行加载,细胞的加载作用时间为24 h。所有加力组细胞的力学刺激频率为6周/min,即5 s拉伸,5 s松弛。

实验分组: 将同步化生长的细胞随机分为4组,每组6孔细胞。4组为:①非加载正常对照组。②应力加载组:12%牵张应力24 h。③应力加载+PD098059干预组:先以终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的ERK1/2通路特异性抑制剂PD098059预孵育30 min,再加载12%牵张应力24 h。④应力加载+PDTC干预组:先以终浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 的核因子 κ B通路抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)预孵育30 min,再加载12%牵张应力24 h。

细胞牵张应力加载: 采用解放军第四军医大学口腔医学院自行研制的多通道细胞牵张应力加载系统^[4],以美国Flexcell公司生产的BioFlex[®]弹性膜6孔培养板作为细胞培养单元,通过单片机控制可以3个通道同时进行不同形变大小的应力加载。细胞所受应力值大小由培养皿底部弹性膜拉伸应变率(%)表示,加载范围0%-20%细胞表面拉伸率。

Western Blotting检测牵张应力对ERK1/2及核因子 κ B信号通路的影响: MC3T3-E1细胞力学刺激分别30, 60及120 min后,冷PBS冲洗贴壁生长的细胞2 mL/次 \times 3次;将裂解液直接加在弹性膜上,冰上原位裂解细胞30 min;用细胞刮将细胞刮离弹性膜,收集此混悬液入EP管;4 °C低温离心14 000 r/min \times 15 min,收集上清液。取40 μg 细胞总蛋白点样于8%SDS-PAGE胶电泳分离,电转至硝酸纤维素膜,再分别用P-ERK、ERK、p-IKK、IKK、I κ B- α 、核因子 κ B(p65)抗体杂交,检测

P-ERK、ERK、p-IKK、IKK、I κ B- α 、核因子 κ B(p65)蛋白质表达, ECL法显示免疫复合物。采用Image-Pro Plus软件分析各组染色条带的灰度值, 染色条带的灰度值减去背景灰度值后得到的相对灰度值, 以排除背景及非特异性条带的干扰。各蛋白条带灰度值与 β -actin灰度的比值作为相对蛋白含量水平。

碱性磷酸酶活性的检测: 细胞应力加载后, 取出孔内培养液, 用0.01 mol/L PBS洗涤2次, 每孔加入0.2% TritonX-100 1 mL, 4 $^{\circ}$ C过夜。按碱性磷酸酶检测试剂盒要求: 每孔取5 μ L细胞裂解液放入96孔细胞培养板, 加入基质液及缓冲液各50 μ L, 充分混匀37 $^{\circ}$ C孵育15 min, 加入150 μ L显色剂, 混匀后在490 nm波长下测定各孔的吸光度值(A值), 同时设标准及空白对照, 每孔细胞测3次, 取平均值。按公式计算碱性磷酸酶活性。

$$\text{碱性磷酸酶活性(金氏单位/100 mL)} = \text{样品管吸光度} \times \text{标准管酚的含量(0.005 mg)} \times 100 \text{ mL} / \text{标准管吸光度} \times 0.05 \text{ mL}$$

Real-time PCR方法检测 I 型胶原、骨钙蛋白及白细胞介素6 mRNA的表达: 实验细胞用2.5 g/L胰蛋白酶消化后, 800 r/min离心6 min, PBS清洗再次离心后, 收集细胞, 根据TRIzol Reagent产品说明提取总RNA。收集的细胞加入1 mL TRIzol试剂, 室温作用5 min后加入氯仿0.2 mL, 充分混匀后室温孵育2.0-3.0 min, 4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心15 min, 收集水相, 将水相转移到新离心管中。水相与异丙醇混合以沉淀其中的RNA, 每1 mL的TRIZOL试剂匀浆的样品中加0.5 mL的异丙醇。混匀后室温孵育10 min, 然后4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心10 min, 再用体积分数75%乙醇洗涤后4 $^{\circ}$ C下以7 500 r/min离心5 min, 空气中自然干燥RNA后加入无菌水, -70 $^{\circ}$ C保存备用。

根据Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明将2 μ g总RNA反转录为cDNA。使用引物设计软件Primer Premier 5.0进行引物序列设计, 实时定量PCR使用引物序列见表1。

将DNA模板以及所有cDNA样品分别配置Realtime PCR反应体系。将配置的PCR反应溶液置于Realtime PCR仪上进行PCR反应, 40个PCR循环(94 $^{\circ}$ C, 20 s; 退火温度, 20 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s)。基因表达的相对定量基于比较CT值法, 每个样本的RNA含量均根据各自的 β -actin含量进行标准化。mRNA表达量结果以相对荧光值表示。

主要观察指标: ①牵张应力对ERK1/2及核因子 κ B信号通路的影响。②ERK1/2及核因子 κ B通路抑制剂对牵张力作用下MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶活性的影响。③ERK1/2及核因子 κ B通路抑制剂对牵张力作用下MC3T3-E1细胞 I 型胶原、骨钙蛋白、白细胞介素6基因表达的影响。

表 1 牵张应力介导细胞成骨分化及相关基因的表达实时定量PCR使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used for real-time quantitative PCR in osteogenic differentiation and related gene expression mediated by mechanical strain in cells

基因名称	双向引物序列(5'-3')	退火温度($^{\circ}$ C)
β -actin	Forward:CCT CTA TGC CAA CAC AGT GC Reverse: ATA CTC CTG CTT GCT GAT CC	55-60
I 型胶原	Forward:ACG TCC TGG TGA AGT TG Reverse: CAG GGA AGC CTC TTT CTC CT	58-60
骨钙蛋白	Forward:AAG CAG GAG GGC AAT AAG GT Reverse:AGC TGC TGT GAC CAT CCC ATA C	55-60
白细胞介素6	Forward: ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC TT Reverse: ATC ACG GTT TGC CGA GTA GAC TCT	55-60

统计学分析: 采用SPSS 12.0统计软件对数据进行分析处理, 所有数据均来自3次实验结果, 取其平均值, 表示为 $\bar{x} \pm s$, 组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果 Results

2.1 牵张应力对ERK1/2信号通路的影响 见图1。

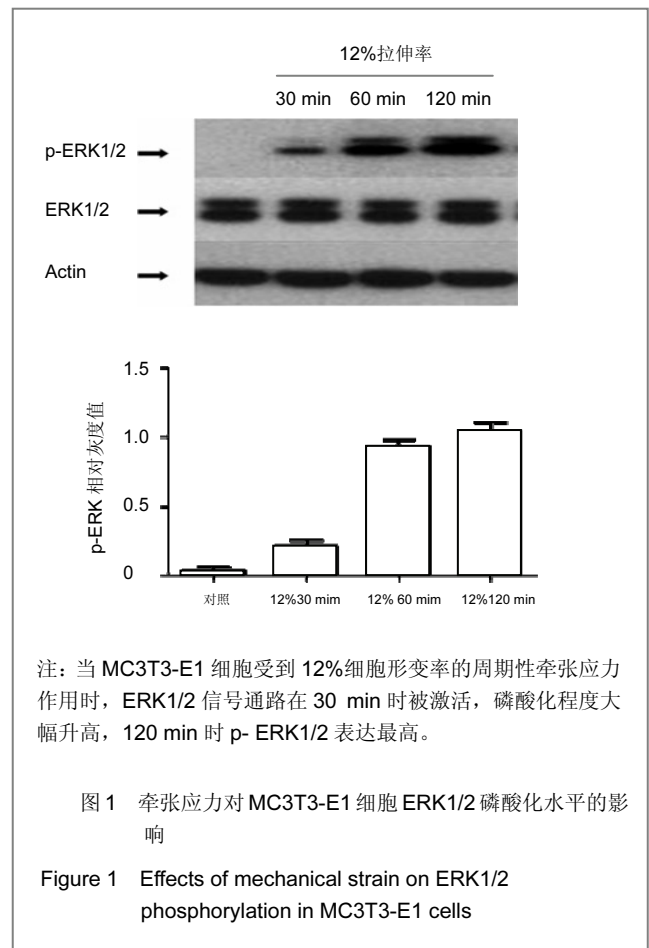


图1结果可见, 当MC3T3-E1细胞受到12%细胞形变率的周期性牵张应力作用时, ERK1/2信号通路在30 min时被激活, 磷酸化程度大幅升高, 与对照组相比差异有显著性意义($P < 0.01$), 并且随作用时间磷酸化水平增加更为明显, 120 min时p-ERK1/2表达最高, 与60 min时相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.2 牵张应力对核因子 κ B信号通路的影响 结果见图2。

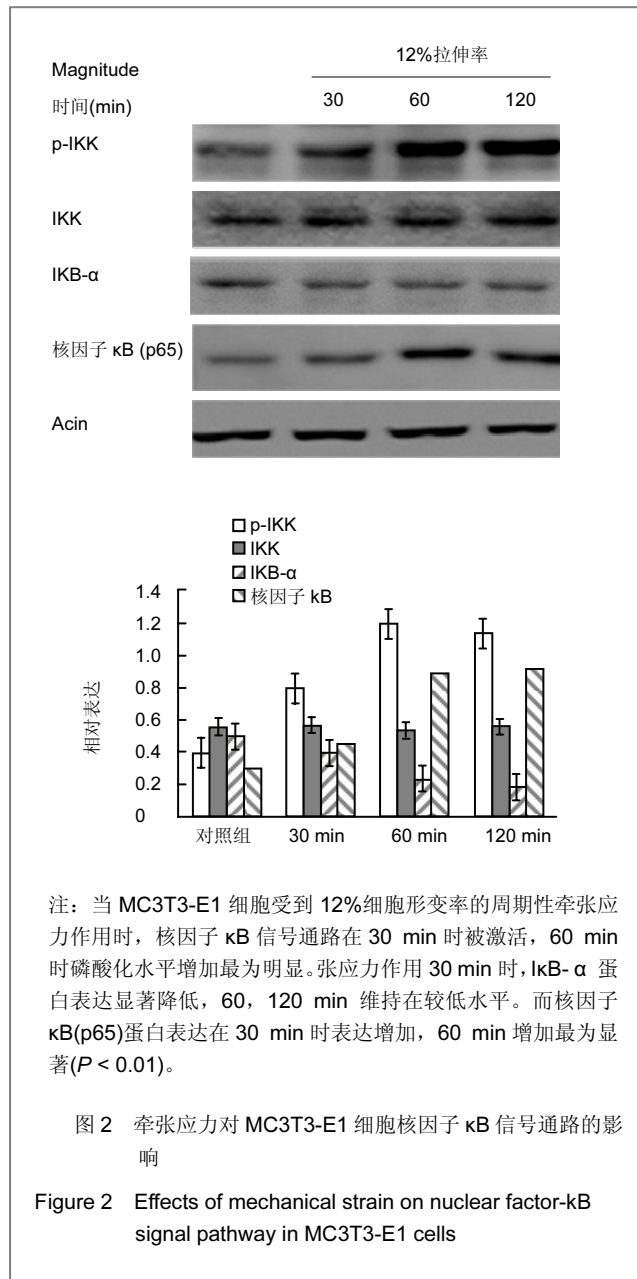


图2可见, 当MC3T3-E1细胞受到12%细胞形变率的周期性牵张应力作用时, 核因子 κ B信号通路在30 min时被激活, p-IKK磷酸化程度大幅升高, 并且60 min时磷酸化水平增加最为明显, 120 min时p-IKK磷酸化仍然维持在高水平, 但与60 min时相比差异无显著性意义($P > 0.05$)。张应力作用30 min时, I κ B- α 蛋白表达显著

降低与对照组相比差异具有显著性意义($P < 0.05$), 60, 120 min维持在较低水平, 但与30 min时相比差异无显著性意义($P > 0.05$)。而核因子 κ B(p65)蛋白表达在30 min时表达增加, 60 min增加最为显著($P < 0.01$), 120 min时虽然维持在高水平, 但与60min时相比差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 ERK1/2及核因子 κ B通路抑制剂对牵张力作用下MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶活性的影响 见表2。

表 2 抑制剂对牵张力作用下 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶活性的影响

Table 2 Effects of inhibitors on alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells under mechanical strain

($\bar{x} \pm s$, $n=18$, King unit/L)

组别	碱性磷酸酶活性
正常对照组	32.76 \pm 6.62
应力加载组	20.18 \pm 6.84 ^b
应力加载+PD098059 干预组	25.18 \pm 7.61 ^a
应力加载+PDTC 干预组	44.58 \pm 7.09 ^{bc}

与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, 与应力加载组比较, ^c $P < 0.05$ 。

注: 说明 ERK1/2 信号通路部分调节碱性磷酸酶的合成和分泌。而使用核因子 κ B 信号通路抑制剂 PDTC 后, 碱性磷酸酶活性明显增加。

从表2所示结果可以看出, 在12%牵张应力作用下, MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶活性明显降低, 使用ERK1/2信号通路抑制剂PD098059后, 碱性磷酸酶活性有所增加, 但仍低于对照组($P < 0.05$), 说明ERK1/2信号通路部分调节碱性磷酸酶的合成和分泌。而使用核因子 κ B信号通路抑制剂PDTH后, 可显著抑制机械牵张应力作用下碱性磷酸酶活性的降低, 与对照组相比碱性磷酸酶活性明显增加($P < 0.01$)。

2.4 ERK1/2及核因子 κ B通路抑制剂对牵张力作用下MC3T3-E1细胞I型胶原、骨钙蛋白、白细胞介素6基因表达的影响 见表3。

从表3所示结果可以看出, 在12%牵张应力作用下, MC3T3-E1细胞I型胶原、白细胞介素6基因表达明显增加, 骨钙蛋白基因表达明显降低。但使用PD098059后, I型胶原基因表达明显降低, 而核因子 κ B信号通路抑制剂PDTH的抑制作用不明显; 应力作用下骨钙蛋白基因表达的明显降低不受ERK1/2和核因子 κ B信号通路的影响; PD098059及PDTC均可以显著抑制应力作用下白细胞介素6基因表达的增加, 说明应力作用下白细胞介素6基因的表达受ERK1/2和核因子 κ B信号通路的共同影响。

表3 抑制剂对牵张力作用下 MC3T3-E1 细胞 I 型胶原、骨钙蛋白、白细胞介素 6 基因表达的影响

Table 3 Effects of inhibitors on expression of type I collagen, osteocalcin and interleukin-6 gene expression in MC3T3-E1 cells under mechanical strain ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

组别	I 型胶原	骨钙蛋白	白细胞介素 6
正常对照组	0.336±0.074	0.593±0.082	0.377±0.086
应力加载组	1.446±0.097 ^b	0.298±0.075 ^a	2.428±0.132 ^b
应力加载+ PD098059 干预组	0.129±0.089 ^{ac}	0.302±0.093 ^a	0.874±0.096 ^{ac}
应力加载+ PDTC 干预组	1.417±0.093 ^b	0.314±0.096 ^a	0.195±0.078 ^{ac}

与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, 与应力加载组比较, ^c $P < 0.01$ 。

注: 在 12% 牵张应力作用下, MC3T3-E1 细胞 I 型胶原、白细胞介素 6 基因表达明显增加, 骨钙蛋白基因表达明显降低。但使用 PD098059 后, I 型胶原基因表达明显降低, 应力作用下白细胞介素 6 基因的表达受 ERK1/2 和核因子 κ B 信号通路的共同影响。

3 讨论 Discussion

机械应力刺激是调节成骨细胞生物反应, 维持骨组织应力改建平衡的重要因素之一。应力状态下的牙槽骨改建是口腔正畸临床矫治的生物学基础, 通过对成骨细胞骨或破骨细胞功能的调节, 最终实现正畸牙齿的移动, 同时维持骨组织应力改建的平衡。因此, 阐明机械应力对成骨细胞功能调节机制, 揭示正畸牙槽骨改建机制成为国内外研究的热点。然而由于体内成骨细胞所处应力微环境的复杂性, 目前尽管人们对成骨细胞的力学生物学反应进行了大量的研究, 包括其增殖、分化, 功能状态、成骨或破骨相关细胞因子的表达, 胞内信号转导通路等, 但成骨细胞对应力刺激的识别机制、信号转导机制、生物响应机制等还并不十分清楚, 甚至知之甚少。研究发现^[1-4], 力学刺激类型、大小、作用方式与成骨细胞功能调节密切相关, 周期性的牵张应力是影响成骨细胞生物学行为重要的力学方式之一。

成骨细胞在感受力学刺激后, 可将力学信号转化为细胞内一系列生物化学信号, 通过信号转导通路到达作用位点, 导致基因表达变化。但是参与细胞内应力信号转导的通路非常复杂, 并且各信号通路之间相互影响, 最终共同完成机械应力对相关基因表达的调控。ERK1/2 信号通路和核因子 κ B 信号通路是成骨细胞内应力信号转导过程中两条重要的信号转导通路, 其激活后诱导表达的一些细胞因子对于成骨细胞和破骨细胞的分化成熟以及功能活性非常重要。本研究发现, 当

MC3T3-E1 细胞受到 12% 细胞形变率的周期性牵张应力作用时, ERK1/2 信号通路及核因子 κ B 信号通路同时被激活, ERK1/2、IKK 磷酸化水平显著提高, 核因子 κ B (p65) 表达明显增加。

ERK1/2 通路作为成骨细胞力学信号转导的经典通路已得到人们的普遍关注, 是成骨细胞接受应力作用后最早出现的信号反应之一。一旦 ERK1/2 通路被应力激活, ERK1/2 迅速穿过核膜, 再激活转录因子, 可进一步调节其下游一些重要细胞因子的表达, 如白细胞介素 1、白细胞介素 6、前列腺素^[5], 碱性磷酸酶、骨钙素^[6], 胰岛素样生长因子 1、腺苷酸环化酶 2, 转化生长因子 β 、骨形成蛋白、I 型胶原等^[7]。PD98059 是 ERK1/2 信号转导途径的抑制剂, 它可以结合 ERK1/2 并使其失活, 阻止 Raf 对 ERK1/2 的磷酸化激活。实验结果显示, 在 12% 牵张应力作用下, MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶、I 型胶原、白细胞介素 6 的表达受 ERK1/2 信号通路的调控, 而骨钙蛋白基因表达的变化不受 ERK1/2 通路的影响。

核因子 κ B 是近几年发现的与成骨细胞力学信号转导密切相关的核转录因子, 一般认为, 细胞在非刺激状态下, 核因子 κ B (p50/p65) 与抑制蛋白 I κ B (主要成分为 I κ B- α) 结合以一种未被激活的形式存在于胞质, 当细胞受到应力等刺激后, 通过迅速激活 I κ B 激酶 (IKK) 复合体, 导致 I κ B 蛋白位点特异性磷酸化并降解, 从而释放出核因子 κ B (p50/p65) 并转移至胞核, 发挥转录调控作用^[8-10]。Sanchez 等^[11] 学者通过使用 I κ B 激酶 (IKK) 抑制剂 PDTH, 以观察机械应力对成骨细胞白细胞介素 6、前列腺素 E2 以及骨保护素等细胞因子表达的影响, 实验结果发现 I κ B 激酶 (IKK) 抑制剂可以明显抑制白细胞介素 6、前列腺素 E2 基因及蛋白的表达, 而前列腺素 E2、白细胞介素 6 作为成骨细胞应力敏感基因在骨组织应力改建过程中发挥着关键性的调节作用^[9]。同时有研究发现^[12], 特异性抑制核因子 κ B 信号通路可以促进成骨细胞分化, 刺激骨的形成。实验结果与上述的研究结果相似, 在 12% 牵张应力作用下, 核因子 κ B 信号通路抑制剂 PDTH 可显著抑制机械牵张应力作用下 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶活性的降低, 同时抑制白细胞介素 6 基因的表达, 而 I 型胶原、骨钙蛋白基因表达的变化不受核因子 κ B 信号通路的影响。

综上所述, ERK1/2 信号通路和核因子 κ B 信号通路是成骨细胞内应力信号转导过程中两条重要的信号转导通路, MC3T3-E1 细胞受到 12% 细胞形变率的周期性牵张应力作用时, ERK1/2 信号通路及核因子 κ B 信号通路同时被激活。牵张应力可通过 ERK1/2 信号通路及核因子 κ B 信号通路调节成骨细胞分化及相关基因的表达。

作者贡献: 李永明, 刘名燕, 段银钟进行实验设计, 实验实施为刘名燕, 李燕, 钱红, 李永明。实验评估为李永明, 冯

云霞, 段银钟。数据处理为刘名燕, 李燕, 钱红, 冯云霞。文章写作为刘名燕, 李燕, 李永明。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

学术术语: 细胞外调节蛋白激酶—分为 ERK1 和 ERK2, 统称为 ERK1/2, 主要被各种生长因子、离子射线、过氧化氢等磷酸化而激活, 进入细胞核作用于 E1k-1, c-myc, c-fos, c-jun, ATF, 核因子 kB 和 AP-1 等转录因子, 促进某些基因的转录与表达和细胞的增殖与分化密切相关。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Tang L, Lin Z, Li YM. Effects of different magnitudes of mechanical strain on osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(1):122-128.
- [2] Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, et al. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends in Molecular Medicine.* 2009; 15:208-216.
- [3] Chang J, Wang Z, Tang E, et al. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB. *Nat Med.* 2009;15(6): 682-689.
- [4] 李永明, 王华, 张晓东, 等. 多通道细胞牵张应变加载系统的建立及应用[J]. *生物医学工程学杂志*, 2012, 29(1): 93-96.
- [5] Chen W, Ma Y, Ye H, et al. ERK1/2 is involved in cyclic compressive force-induced IL-6 secretion in MLO-Y4 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401(3):339-343.
- [6] Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, et al. Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2007;101:1266-1277.
- [7] Jackson RA, Kumarasuriyar A, Nurcombe V, et al. Long-term loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Cell Physiol* 2006;209:894e904.
- [8] Young SR, Gerard-O'Riley R, Harrington M, et al. Activation of NF- κ B by fluid shear stress, but not TNF- α , requires focal adhesion kinase in osteoblasts. *Bone.* 2010;47(1): 74-82.
- [9] Soysa NS, Alles N. NF-kappaB functions in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(1):1-5.
- [10] Liu J, Zou L, Zheng Y, et al. NF-kappaB response to mechanical strains in osteoblast-like cells, and lighter strains create an NF-KB response more readily. *Cell Biology International*, 2007;31(10):1220-1224.
- [11] Sanchez C, Gabay O, Salvat C, et al. Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009; 17(4):473-481.
- [12] Agarwal S, Long P, Seyedain A, et al. A central role for nuclear factor-kappa B pathway in the anti-inflammatory and proinflammatory actions of mechanical strain. *FASEB J.* 2003;17(8):899-901.



● 关于临床注册

SCI 数据库收录的《姿势与步态》杂志对临床试验注册的要求

● *Gait & Posture* 《姿势与步态》, SCI 收录杂志, ISSN: 0966-6362, 2012 年影响因子 1.969。主要发表研究原著, 简短通讯, 技术报告, 书评, 综述等类型稿件。

对临床试验注册的要求: 《姿势与步态》要求所有投稿的随机对照试验的稿件包含一份完

整的临床试验报告统一标准(CONSORT)流程图。网址: <http://www.consort-statement.org> for more information.

该杂志采用国际医学期刊编辑委员会(ICMJE)的提议, 要求临床试验在公共平台上进行临床试验注册作为临床试验文章出版的一项

必要条件。试验必须在患者招募前/时进行临床试验注册。文章摘要末尾要注明临床试验注册号。根据国际医学编辑委员会(ICMJE)对临床试验的定义为: 临床试验是指任何前瞻性分配人类受试者进行干预或研究医疗干预和健康结果之间的因果关系的研究项目, 研究设计用于其他目的, 如药代动力学, 主要毒性等可免除注册。