

·论著·

前列腺素 E2 对成骨细胞力学敏感性的调控作用^{*}龚啸元^{1,2},杨柳²,潘君^{1△}

(1. 重庆大学生物工程学院,重庆 400044;2. 第三军医大学西南医院关节外科,重庆 400038)

摘要:目的 探讨前列腺素 E2(PGE2)与成骨细胞力学敏感性的关系,并对其细胞水平的作用机制进行分析。方法 使用 16,16-二甲基 PGE2(dmPGE2)对成骨细胞株(MC3T3-E1)进行预处理,随后观察其对细胞内钙离子信号的调控作用;并采用蛋白激酶 A(PKA)信号通路的激活剂与阻滞剂检验 PKA 信号通路在此调控过程中的参与作用。**结果** 相对于空白处理组,dmPGE2 预处理显著提升了细胞中由水肿刺激引起的钙离子信号强度。该作用被 PKA 信号通路的激活剂 8-溴腺苷-3,5-环单磷酸钠(8br-cAMP)所模拟;且被 PKA 多肽阻滞剂(PKI)阻断。**结论** dmPGE2 通过激活 PKA 信号通路上调 MC3T3-E1 细胞中由水肿刺激引起的钙离子响应,为解释 PGE2 在骨组织中的促合成作用提供了重要的细胞学基础。

关键词:地诺前列酮;力学刺激;成骨细胞;力学敏感性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.12.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)12-1416-03

Regulating effect of PGE2 on mechanosensitivity of osteoblasts^{*}Gong Xiaoyuan^{1,2}, Yang Liu², Pan Jun^{1△}

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. Department of Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relation between prostaglandin E2(PGE2) and the mechanosensitivity of osteoblasts and to analyze its action mechanism in cellular level. **Methods** Osteoblasts cell line MC3T3-E1 cells were performed the pre-treatment by using 16,16-dimethyl prostaglandin E2(dmPGE2). Then the regulating effect of PGE2 on intracellular calcium ion signal was observed; the activator agent and inhibitor of the protein kinase A(PKA) signal path were adopted to detect the participating effect of the PKA signal path in the regulating process. **Results** Compared with the blank treatment group, dmPGE2 pre-treatment significantly increased the calcium ion signal intensity induced by hypotonic swelling stimulation in MC3T3-E1 cells. This effect of dmPGE2 was mimicked by 8-bromo-cAMP(8br-cAMP), an activator of PKA pathway; but blocked by PKI, an inhibitor of PKA pathway. **Conclusion** dmPGE2 is able to up-regulate the calcium response induced by hypotonic swelling stimulation by activating PKA pathway, which provides an important cellular mechanism for explaining PGE2's anabolic effect in bone tissue.

Key words: dinoprostone; mechanical stimulation; osteoblasts; mechanosensitivity

骨组织的大小、形状以及内部结构与其所受到的力学刺激有着极为密切的关系。力学刺激能够促使骨形成及抑制骨吸收,从而达到增加骨密度的作用^[1]。前列腺素 E2(PGE2)作为一种多功能的调控分子,被普遍认为在炎症产生、疼痛传导以及癌症发展中起重要调控作用^[2]。在骨组织中,PGE2 能够通过调控骨生成作用与骨吸收作用之间的平衡而促进骨密度的增加^[2],但其细胞学机制尚不明了。既往研究表明,不同水平的 PGE2 通过分别激活蛋白激酶 A(PKA)信号通路以及蛋白激酶 C(PKC)信号通路调控静态培养成骨细胞的分化与增殖^[3-6]。然而,PGE2 与力学加载的交互作用对成骨细胞力学敏感性的调控尚不明确。阐明该机制能够为解答 PGE2 在骨组织中促合成作用提供重要的细胞学基础。

成骨细胞,作为骨组织内调控骨基质生成的重要成员^[7],与骨细胞共同构成了骨组织内的三维力学传导系统。力学刺激通过激发成骨细胞内的一系列生物学效应,如细胞内钙离子浓度的迅速变化(细胞内钙离子信号)、一氧化氮的释放、细胞骨架的重组与细胞硬度的增加、Ⅱ型环氧化合酶表达的增加、前列腺素的释放及 I 型胶原蛋白合成来达到促进成骨样分化的作用。其中,最早产生的细胞内钙离子信号作为第二信使调

控了后续生物学效应,起到将力学信号转换为生物学信号的重要翻译作用。有研究表明,成骨细胞内由力学刺激引发的细胞内钙离子释放上调骨桥蛋白的表达^[8];有研究通过对不同钙离子信号强度的细胞进行分析后,发现较高的钙离子响应往往对应着较高的骨桥蛋白表达量。可见成骨细胞受到力学刺激后产生的钙离子信号是细胞力学敏感性的重要指标。因此,本研究试图通过使用细胞内钙离子作为力学敏感性的指标,检测 PGE2 对成骨细胞力学敏感性的调控作用,并对其调控机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 MC3T3-E1 细胞购自美国模式培养物集存库。主要实验试剂包括胎牛血清(FBS, Gibco)、 α -MEM(Sigma)、青链霉素混合液(Sigma)、胰蛋白酶(Hyclone)、I 型胶原(Hyclone)、16,16-二甲基 PGE2(dmPGE2, Cayman)、8-溴腺苷-3,5-环单磷酸钠(8br-cAMP, Sigma)、PKA 多肽阻滞剂(PKI, Promega)、Fura-2 AM(Invitrogen)。主要实验仪器包括注射器泵(Harvard, Apparatus)、钙离子信号检测系统(Intracellular Imaging)。

1.2 方法

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(11272366、11172207、10972243);重庆大学“生物流变科学与技术”教育部重点实验室访问学者基金资助项目(CQKLBST-2012-002)。作者简介:龚啸元(1984—),讲师,博士研究生,主要从事细胞力学研究。△ 通讯作者, Tel: 18983399552; E-mail: panj@cqu.edu.cn。

1.2.1 细胞培养 MC3T3-E1 细胞使用含有 10% FBS 以及 1% 青链霉素混合液的最小必须培养基 α-MEM,于 37 ℃ 含有 5% CO₂ 或 95% 空气的培养箱进行培养。当细胞增殖至 90% 融合时对细胞进行传代,3~10 代的 MC3T3-E1 细胞被用于实验。

1.2.2 荧光染色、药物处理以及细胞加载 由于细胞水肿模型能够较好的模拟力学刺激对细胞的作用,并且具有操作简单以及可重复性高等优点^[9]。因此,本研究采用水肿加载对成骨细胞进行刺激并观测细胞内钙离子信号。将 MC3T3-E1 细胞按照初始密度(4×10^4 个/mL)接种于经过 I 型胶原包被的培养皿中,当细胞增殖至 80% 融合时对细胞进行细胞水肿加载。操作方法:(1)使用 Fura-2 AM(0.67 mmol)对细胞进行 30 min 的避光孵育(37 ℃);(2)使用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗多余染料后,保留 1 mL PBS 并将培养皿移置到荧光显微镜载物台上,静置 30 min 以消除染色过程对细胞的扰动;(3)在静态条件下分别对空白处理组(10 μL 双蒸水)、dmPGE2 处理组(dmPGE2 10 nmol)、8br-cAMP 处理组(8br-cAMP 100 μmol)、dmPGE2/PKI 联合组(dmPGE2 10 nmol + PKI 10 μmol)、8br-cAMP/PKI 联合组(8br-cAMP 100 μmol + PKI 10 μmol)细胞进行 15 min 的处理;(4)药物处理结束后,使用注射器泵缓慢加入 1 mL 的双蒸水至培养皿中产生细胞膜内外的离子浓度差,同时记录相应的钙离子浓度变化。

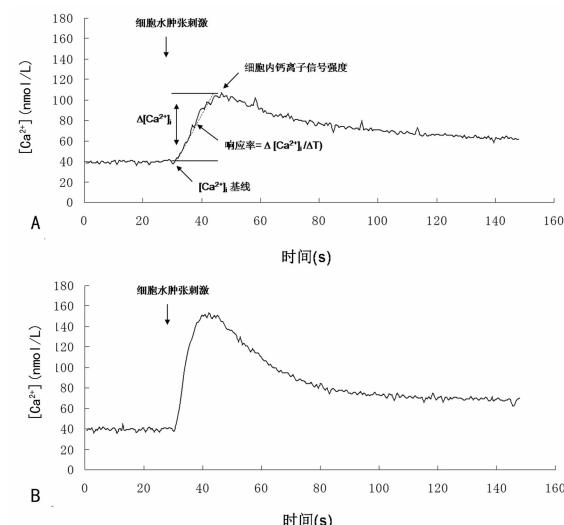
1.2.3 评价标准 钙离子响应曲线中峰值除以基线平均值得到的倍数被定义为平均细胞内钙离子信号强度(mean peak $[Ca^{2+}]_i$ response);mean peak $[Ca^{2+}]_i$ response ≥ 2 时认为细胞响应;响应细胞的数量除以细胞总数的百分比被定义为响应率;同一实验组平均钙离子响应曲线中加载初始点至峰值的线性拟合斜率被定义为响应速率。实验经过 9 次独立重复。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.01 软件对数据进行统计学分析,细胞内钙离子信号强度及响应速率数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 以及 bonferroni 校正检验;细胞响应率数据以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 dmPGE2 增加成骨细胞的力学敏感性 水肿刺激促使空白处理组中 MC3T3-E1 细胞迅速产生细胞内钙离子响应(图 1A)。与空白处理组比较,dmPGE2 处理组中细胞经过 15 min 的 dmPGE2 处理后,可明显提升细胞中由同等强度水肿

刺激诱导的钙离子信号(图 1B)。



A:空白处理组;B:dmPGE₂ 处理组。

图 1 dmPGE2 对成骨细胞内钙离子信号的提升作用

2.2 PKA 信号通路在 PGE2 提升细胞内钙离子信号过程中的参与作用 为验证 PKA 信号通路在 PGE2 处理过程中的参与作用,分别使用 PKA 信号通路的激活剂 8br-cAMP 以及多肽阻滞剂 PKI 对细胞进行处理。结果表明,8br-cAMP 处理组中 8br-cAMP 模拟了 dmPGE2 对细胞力学敏感性的提升作用(图 2A)。而 dmPGE2/PKI 联合组中,PKI 的加入在一定程度上抑制了 dmPGE2 对细胞力学敏感性的提升作用(图 2B);且 8br-cAMP 对细胞力学敏感性的提升作用也同样被 PKI 阻断(8br-cAMP/PKI 联合组,图 2C)。与空白处理组比较,dmPGE2 处理组中细胞的响应率、细胞内钙离子信号强度及响应速率均明显提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。8br-cAMP 处理组中细胞的响应率及胞内钙离子信号强度比空白处理组明显提高($P < 0.05$);但响应速率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 dmPGE2 处理组比较,dmPGE2/PKI 联合组中细胞的响应率以及胞内钙离子信号强度明显降低($P < 0.05$);响应速率则降低至 1.45 nmol/s($P < 0.05$)。与 8br-cAMP 处理组比较,8br-cAMP/PKI 联合组细胞的响应率以及胞内钙离子信号强度也明显降低($P < 0.05$),响应速率则降低至 1.42 nmol/s($P < 0.05$),见表 1。

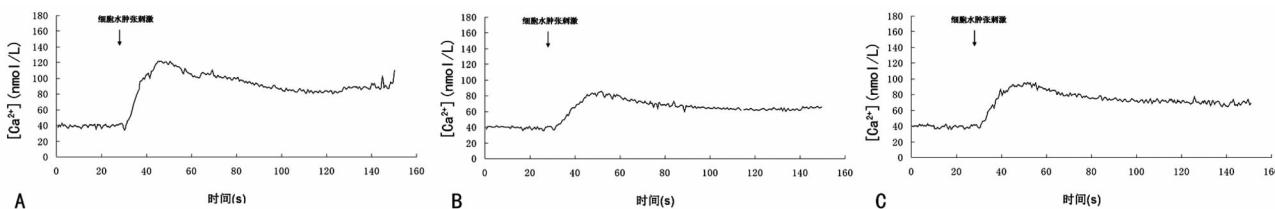


图 2 PKA 信号通路在 dmPGE2 提升细胞内钙离子信号过程中的参与作用

表 1 各组成骨细胞内钙离子响应率、信号强度及响应速率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	空白处理组	dmPGE2 处理组	8br-cAMP 处理组	dmPGE2/PKI 联合组	8br-cAMP/PKI 联合组
响应率(%)	61.23 ± 12.89	86.45 ± 5.82^a	87.11 ± 3.62^a	69.73 ± 10.13^b	77.49 ± 6.91^c
信号强度	4.07 ± 0.34	5.40 ± 0.39^a	5.31 ± 0.42^a	3.32 ± 0.20^b	3.75 ± 0.36^c
响应速率(nmol/s)	2.66 ± 0.47	6.19 ± 0.25^a	3.30 ± 0.38	1.45 ± 0.32^b	1.42 ± 0.29^c

^a: $P < 0.05$,与空白处理组比较;^b: $P < 0.05$,与 dmPGE2 处理组比较;^c: $P < 0.05$,与 8br-cAMP 处理组比较。

3 讨 论

骨组织通过调控骨生成作用与骨吸收作用之间的平衡来适应其所处的力学环境。成骨细胞作为骨组织内重要的力学感应单元,在受到生理水平的力学刺激时,通过提高碱性磷酸酶活性^[10],增加 I 型胶原分泌以及胞外钙沉积调控骨生成作用。力学刺激作用于成骨细胞表面,使得细胞产生微小形变,促使位于细胞膜表面的力学敏感型钙离子通道(MSCC)开放^[11],引发细胞外钙离子的内流以及细胞膜内外电势差,继而激活同样位于细胞膜表面的电压敏感型钙离子通道(VSCC)^[12]。VSCC 的开放促使细胞向胞外释放三磷酸腺苷(ATP),并由此引发细胞内钙池中的钙离子向细胞质中的释放^[13],共同构成了胞内钙离子信号。胞内钙离子信号,作为细胞受到力学刺激后首先产生的生物学效应,在力学信号向生物信号的翻译过程中起到重要的传导作用。由此可见,成骨细胞在受到力学刺激时的形变能力在一定程度上决定了细胞的力学敏感性。研究表明,甲状旁腺素(PTH)一种促进成骨细胞骨样分化的信号分子,能够通过降低细胞骨架中微丝的强度来增加 MSCC 的开放程度,继而增强成骨细胞的力学敏感性^[11]。本研究结果发现,PGE2 能够产生类似于 PTH 对成骨细胞力学敏感性的提升作用。

PKA 信号通路广泛参与了细胞力学敏感性的调控过程。既往研究表明,PKA 信号通路的激活能够提升成骨细胞在受到流体剪应力加载时产生的细胞内钙离子信号^[14],并且在流体剪应力引发的细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路的激活过程中起传导作用^[15]。本研究通过使用 PKA 信号通路的激活剂以及其阻滞剂,发现 PKA 信号通路参与了 dmPGE2 对成骨细胞力学敏感性的提升过程。有研究表明,PKA 信号通路能够通过调控微丝结构继而调控成骨细胞形态^[16]。此外,PKA 信号通路能够通过抑制小 G 蛋白超家族成员 A(RhoA)活性降低微丝强度^[17]。由此猜想 PGE2 或许通过类似于 PTH 的作用机制,即降低微丝强度,软化成骨细胞,增加 MSCC 开放途径来达到提升细胞力学敏感性的效果。

综上所述,本研究表明 PGE2 能够提升 MC3T3-E1 细胞的力学敏感性;PKA 信号通路在此过程中起参与作用。本研究的结论可为解释 PGE2 在骨组织中促合成作用提供重要的细胞学基础。

参考文献:

- [1] Muller-Decker K, Furstenberger G. The cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin signaling is causally related to epithelial carcinogenesis[J]. Mol Carcinog, 2007, 46(8): 705-710.
- [2] Tian XY, Zhang Q, Zhao R, et al. Continuous PGE2 leads to net bone loss while intermittent PGE2 leads to net bone gain in lumbar vertebral bodies of adult female rats [J]. Bone, 2008, 42(5): 914-920.
- [3] Hakeda Y, Yoshino T, Natakani Y, et al. Prostaglandin E2 stimulates DNA synthesis by a cyclic AMP-independent pathway in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells[J]. J Cell Physiol, 1986, 128(2): 155-161.
- [4] Hakeda Y, Nakatani Y, Yoshino T, et al. Effect of forskolin on collagen production in clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. J Biochem, 1987, 101(6): 1463-1469.
- [5] Hakeda Y, Hotta T, Kurihara N, et al. Prostaglandin E1 and F2 alpha stimulate differentiation and proliferation, respectively, of clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells by different second messengers in vitro[J]. Endocrinology, 1987, 121(6): 1966-1974.
- [6] Miya T, Tagawa M, Kato N, et al. Involvement of protein kinase C in proliferative response of osteoblastic cell lines stimulated with prostaglandin E2[J]. Biochem Mol Biol Int, 1993, 29(6): 1023-1028.
- [7] 刘波,潘琦,王希明,等.镁锌合金促成骨细胞增殖作用及其相关机制研究[J].重庆医学,2012,41(35):3732-3733.
- [8] You J, Reilly GC, Zhen X, et al. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts[J]. J Biol Chem, 2001, 276(16): 13365-13371.
- [9] Elperin AB, Pore SA, Evans JM, et al. Swelling-induced Ca^{2+} influx and K^+ efflux in American alligator erythrocytes [J]. J Membr Biol, 2011, 240(1): 1-12.
- [10] Mai ZH, Peng ZL, Zhang JL, et al. miRNA expression profile during fluid shear stress-induced osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells[J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(8): 1544-1550.
- [11] Zhang J, Ryder KD, Bethel JA, et al. PTH-induced actin depolymerization increases mechanosensitive channel activity to enhance mechanically stimulated Ca^{2+} signaling in osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(11): 1729-1737.
- [12] Duncan R, Misler S. Voltage-activated and stretch-activated Ba^{2+} conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR 106)[J]. FEBS Lett, 1989, 251(1/2): 17-21.
- [13] Genitos DC, Geist DJ, Liu D, et al. Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(1): 41-49.
- [14] Ryder KD, Duncan RL. Parathyroid hormone enhances fluid shear-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling in osteoblastic cells through activation of mechanosensitive and voltage-sensitive Ca^{2+} channels[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(2): 240-248.
- [15] Jessop HL, Sjoberg M, Cheng MZ, et al. Mechanical strain and estrogen activate estrogen receptor alpha in bone cells [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(6): 1045-1055.
- [16] Yang RS, Fu WM, Wang SM, et al. Morphological changes induced by prostaglandin E in cultured rat osteoblasts[J]. Bone, 1998, 22(6): 629-636.
- [17] Qiao J, Huang F, Lum H. PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(6): L972-980.

(收稿日期:2013-11-28 修回日期:2014-02-01)