

不同频率振动应力对RAW264.7细胞体外分化的影响*

陈国仙^{1,2} 陈建庭^{1,3} 郑 帅¹ 王国荣² 林宗锦² 李国山² 林群贤² 黄益平² 郭春仙²

摘要

目的:观察不同频率振动应力对RAW264.7细胞诱导分化及活性的影响。

方法:应用复合振动仪将不同频段3—10Hz、15—35Hz、35—45Hz、50—70Hz和70—90Hz振动应变分别作用于体外诱导分化的RAW264.7细胞,振动应变加载6d时,通过抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色及鬼笔环肽染色检查破骨细胞形成情况,通过骨吸收陷窝分析比较各组破骨细胞活性的差异。

结果:不同振动频率组形成TRAP染色阳性多核细胞数量均低于对照组,骨吸收陷窝计数亦较对照组少,差异均有显著性意义($P<0.01$)。

结论:不同频率振动应力均抑制RAW264.7细胞向成熟破骨细胞分化,且随着振动频率的增加抑制能力逐渐增强。

关键词 振动应力;破骨细胞;骨质疏松症

中图分类号:R681,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-01-0009-05

Effects of different frequencies of vibration strains on differentiation potencies of RAW264.7 cells in vitro/
CHEN Guoxian, CHEN Jianting, ZHENG Shuai, et al. // Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29
(1): 9—13

Abstract

Objective: To investigate the effects of different frequencies of vibration strains on differentiation potencies of RAW264.7 cells in vitro.

Method: RAW264.7 cells were induced and differentiated in vitro and subjected to vibration strains at different frequencies (3—10Hz, 15—35Hz, 35—45Hz, 50—70Hz, 70—90Hz) respectively. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining and fluorescent microscope with FITC-Phalloidin were used to assess the differentiation. Bone resorption pits were detected by scanning electron microscope to assess the function.

Result: The amounts of TRAP-positive multinucleated cells and bone absorptive lacunae in vibration group were lower than control group at day 6 ($P<0.01$).

Conclusion: Different frequencies of vibration strains could inhibit differentiation potencies of RAW264.7 cells into osteoclasts (OCs). With the frequency of vibration increasing, suppression ability of vibration strengthened gradually.

Author's address Dept. of Orthopedics, Southern Medical University Hospital South, 510515

Key word vibration strain; osteoclast; osteoporosis

近年来,应用物理疗法(力学、电磁学方法)防治骨质疏松症(osteoporosis, OP)的研究成为热门^[1-6]。机械振动是力学刺激形式之一,目前相关研究表明振动疗法是一种具有无创、副作用小的非药物治疗

OP的新型模式,具有良好的应用前景^[7-8]。振动的成骨效应已经形成共识,但其具体的机制尚不清楚。成骨效应是否就是成骨细胞效应的结果,还是破骨细胞效应的成分尚未见有报道,研究振动对破

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.01.003

*基金项目:福建省卫生厅青年基金资助项目(2011-2-49);福建莆田市科技局资助项目(2011D02)

1 南方医科大学南方医院脊柱骨科,广东省广州市,510515;2 莆田市第一医院骨科;3 通讯作者

作者简介:陈国仙,男,在读博士,主治医师;收稿日期:2013-02-06

骨细胞分化的影响就能更好地阐述振动防治OP的机制。因此,本实验拟使用不同频率的复合振动直接作用于破骨细胞前体RAW264.7细胞,观察振动对破骨细胞分化成熟的影响,从而为振动防治OP机制提供进一步的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM培养基和胎牛血清(购自Gibco公司),抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(购自Sigma公司),小鼠RANKL(购自Peprotech公司),RAW264.7细胞株(ATCC, Manassas, USA),鬼笔环肽(FITC-Phalloidin)(购于Enzo公司);RANKL(R&D);PI染液(Keygen)。CO₂细胞培养箱Nu3500E(奥地利),YG-875B超净工作台(苏州医疗设备厂),细胞培养瓶和板(美国Corning公司),FV1000激光共聚焦显微镜及倒置相差显微镜(日本Canon公司)。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7细胞培养:从液氮中取出装有RAW264.7细胞的冷冻管,快速37℃水浴直到解冻后,离心弃上清,培养液重悬,隔天换液,细胞约长满后,用0.25%胰酶+0.02% EDTA将RAW264.7细胞消化下传代培养,取状态良好同步化生长的第6代OC,随机分为A、B、C、D、E、F组。每组加入含有RANKL的DMEM诱导培养基,并将RANKL调节成终浓度为50ng/ml,定期换液,并保持RANKL终浓度不变;A组为非加力组,B、C、D、E、F组为加力组,分别施加3—10Hz、15—35Hz、35—45Hz、50—70Hz及70—90Hz频段的振动应力,各加力组其他振动参数一致(振动强度:0.3g,振动时间:每次振动15min,每天振动2次,共持续6d)。

1.2.2 标本处理及指标检测:①诱导破骨细胞形成及抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色实验。12孔板内每孔放置消毒准备好玻片,将状态良好的RAW264.7细胞以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度传代于12孔培养板,每孔加入RANKL进行诱导培养,并调节成终浓度为50ng/ml,定期换液,并保持RANKL终浓度不变。每实验组重复12孔。A组置于振动仪加载台上(时间与加力组相同),不予振动;B、C、D、E、F组置于振动仪加载台

上并施加不同频段的VS(其他振动参数相同)。在培养第6天时取出6片盖玻片按TRAP试剂盒说明书进行TRAP染色实验。以TRAP染色阳性,细胞核 ≥ 3 个为破骨细胞。

②细胞骨架纤维性肌动蛋白(F-actin)荧光染色和细胞核PI染色。在培养第6天时去除培养液,取出上述另外6片盖玻片用PBS清洗细胞2次,4%多聚甲醛室温固定10min,PBS再次清洗细胞3次后,再用FITC-Phalloidin工作液($5 \mu\text{g}/\text{ml}$)并置于密闭的湿盒中室温染色50min, PBS清洗3次,加入PI染液染色10min后PBS清洗细胞3次,封片,荧光显微镜下观察。

③骨吸收陷窝检测。取新鲜成年牛后腿股骨皮质,去除软组织、骨膜,-80℃贮存。用全自动磨片机磨成厚 $50 \mu\text{m}$,面积为 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 的骨片,全自动抛光机抛光两面,超声清洗仪清洗,75%乙醇浸泡24h,紫外线照射消毒备用。将RAW264.7细胞以 $3 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度传代于6孔板中,6孔板内每孔放置消毒准备好牛骨皮质片(大小约为 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$),诱导培养方法及不同频率振动干预同前;在培养6d后弃培养液, PBS清洗细胞2次,骨片采用2.5%戊二醛固定液固定5min,在0.25mol/L氢氧化铵中超声清洗3次,然后系列乙醇脱水,最后1%甲苯胺蓝室温染色4min,三蒸水漂洗后,倒置显微镜下观察,光镜100倍下每张骨片随机选择6个视野,观察并记录骨吸收陷窝数目,取其平均值作为结果分析;再次予以0.25mol/L氢氧化铵中超声清洗3次,然后系列乙醇脱水,70℃烘箱内烘干48h后,装台(粘胶)、表面真空离子喷金,扫描电子显微镜下观察并摄像。

1.3 统计学分析

统计软件SPSS 11.5,单因素方差分析法比较各组间TRAP染色阳性多核细胞数及骨吸收陷窝数。 $P < 0.01$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同频率振动对RAW264.7细胞体外诱导分化的影响,诱导细胞行TRAP染色情况

按实验设计分组,RAW264.7细胞诱导培养6d后进行TRAP染色,观察不同频率振动对RAW264.7细胞体外诱导分化的影响,未诱导培养对照组仅见

少数TRAP染色阳性多核细胞(图1A),实验A组明显出现许多TRAP染色阳性多核细胞(≥ 3 核)即破骨细胞(osteoclast, OC),细胞大,胞浆成空泡状,染成淡红,胞膜边界不整,周边可见伪足伸展(图1B),但是B、C、D组TRAP染色阳性多核细胞(≥ 3 核)较A组减少(图1C),差异存在显著性意义($P<0.01$),E、F组TRAP染色阳性多核细胞(≥ 3 核)很少形成(图1D),这暗示着不同频率复合振动均抑制RANKL诱导的RAW264.7细胞向破骨细胞分化(见表1),且随着振动频率的增加对RAW264.7细胞分化的抑制能力逐渐增强。

2.2 诱导细胞行免疫荧光检查情况

细胞骨架纤维性F-actin荧光染色和细胞核PI染色,按实验设计分组,RAW264.7细胞诱导培养6d后进行鬼笔环肽染色,观察不同频率振动对RAW264.7细胞体外诱导分化的影响,未诱导培养对照组可见大部分单核细胞聚集,但不融合(图2A),实验A组出现许多较大绿色的F-actin环,内含多核

细胞,细胞核蓝染,边聚,细胞膜边界不清,可见有伪足和褶皱(图2B),但是B、C、D组的绿色F-actin环较A组减少,且细胞核减少(图2C),E、F组多核细胞明显减少(图2D)。

2.3 诱导细胞行骨吸收陷窝的测定情况

按实验设计分组,RAW264.7细胞诱导培养6d后进行甲苯胺蓝染色,观察不同频率振动对RAW264.7细胞体外诱导分化的影响。倒置显微镜下观察可见未诱导培养对照组未见有蓝染的骨吸收陷窝(图3A),实验A组出现许多形状为圆形、椭圆形及不规则形,染色多不均匀,边界清晰的蓝紫色异染(图3B),但是B、C、D组形成的骨吸收陷窝计数及面积较A组减少(图3C),E、F组未见有骨吸收陷窝(图3A及表2)。电镜显微镜检查可见:破骨细胞在骨片上的吸收陷窝呈圆形或椭圆形,边界轮廓清晰,陷窝底部纤维腐蚀吸收的纹路清晰可见(图3D)。

图1 细胞行TRAP染色后倒置显微镜下观察形态($\times 100$)

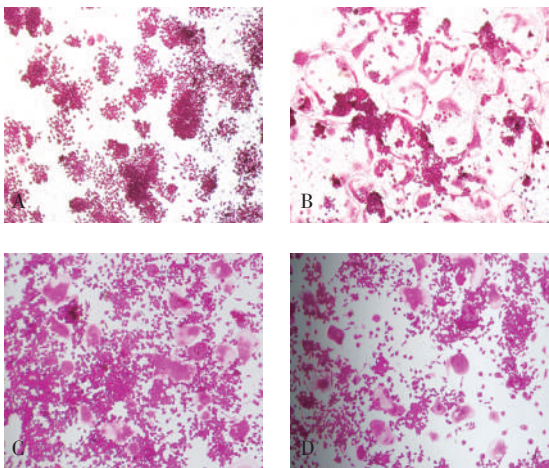


表1 破骨细胞形成情况 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	TRAP染色阳性多核细胞(≥ 3 核)(个)
空白对照	2.17 ± 2.07^{①}
A组(非加力组)	163 ± 21.67
B组(3—10Hz)	102 ± 25.45^{①}
C组(15—35Hz)	82 ± 28.66^{①}
D组(35—45Hz)	72 ± 19.43^{①}
E组(50—70Hz)	32 ± 19.66^{①}
F组(70—90Hz)	22 ± 29.35^{①}

①与A组比较 $P<0.01$

图2 细胞行鬼笔环肽及PI染色后
荧光显微镜下观察形态 ($\times 200$)

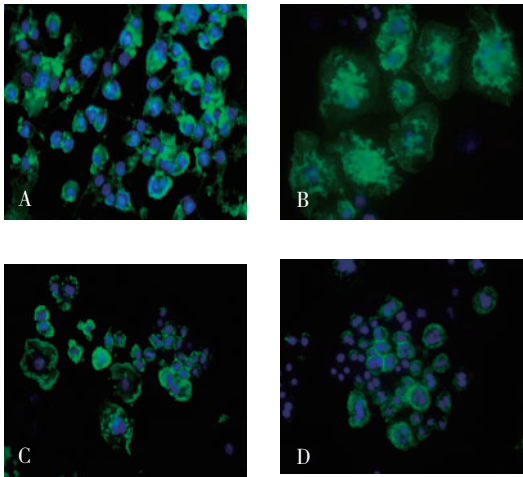
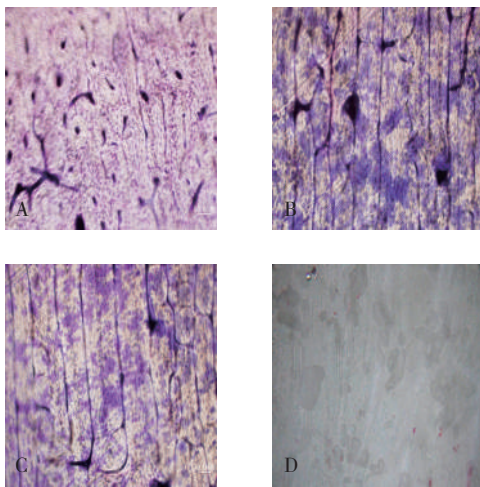


表2 骨吸收陷窝计数形成情况 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	骨吸收陷窝计数(个)
空白对照	$0^{①}$
A组(非加力组)	83 ± 8.76
B组(3—10Hz)	52 ± 9.45^{①}
C组(15—35Hz)	25 ± 5.96^{①}
D组(35—45Hz)	16 ± 8.45^{①}
E组(50—70Hz)	$0^{①}$
F组(70—90Hz)	$0^{①}$

①与A组比较 $P<0.01$

图3 骨片行甲苯胺蓝染色后情况 (×100)



3 讨论

骨重建是一个骨组织自我更新的过程:成骨细胞(osteoblast, OB)不断形成新骨,破骨细胞不断吸收旧骨。成骨细胞的骨形成与破骨细胞的骨吸收两者间保持动态平衡是骨活动保持正常状态的基础。若该平衡紊乱后可引起许多临床上常见疾病,包括OP。

根据 Wolff 定律,骨重建是骨对机械应力的适应过程。骨重建过程中,骨在应力集中的地方生长,而应力减少的地方骨吸收^[9-10]。机械振动是力学刺激形式之一。大量的研究^[11-13]表明,低强度、短时间、一定频率的振动能通过降低骨吸收,促进成骨细胞的增殖和分化,提高成骨速度,增加松质骨量而提高骨的数量和质量是一种治疗OP的新型模式,在防治OP中有广阔的应用前景。振动的成骨效应已经形成共识,但其确切的信号传导通路也不清楚,目前研究普遍认为与细胞膜离子通道激活、整合素-细胞骨架复合体、力学调控系统^[14-16]、生化信号有关。复合振动在改善骨质量的同时还可在一定程度上预防或改善肌萎缩,维持或增强肌力,有助于改善或增强平衡能力^[17]。目前国内外因实验方法及实验模型不同,对振动频率研究虽然报道中应用的频率相差较大,但均在低频范围(<100Hz)。复合振动虽然在成骨细胞和动物层次得到很好的成骨效应,但其对唯一引起骨吸收的破骨细胞尚未进行研究报道,因此,本实验拟使用不同频率的复合振动直接作用于破骨细胞

前体 RAW264.7 细胞,观察振动对破骨细胞分化成熟的影响,从而为振动防治OP机制提供进一步的理论基础。

TRAP是一种结构高度保守的含铁糖蛋白,作用的底物专一性较低,可以水解各种磷酸酯酶和无机磷酸盐类。其主要存在于胞转小泡内,胞转时破坏内吞噬的基质退化物。TRAP在成熟破骨细胞和融合前单核细胞内表达,在破骨细胞前体细胞内不表达。本研究发现不同频率的复合振动均抑制 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞阳性多核细胞分化。这与其他机械刺激抑制破骨细胞形成的结果吻合^[18-19]。破骨细胞的骨吸收过程是一个复杂的过程。破骨前体细胞融合形成成熟破骨细胞,并吸附于骨表面在骨与细胞之间形成一个密闭的酸性环境,此时破骨细胞内的骨吸收酶通过细胞表面的皱褶缘分泌进此空隙,对骨质起吸收作用,骨表面形成骨吸收陷窝^[20]。本研究发现不同频率的复合振动均抑制 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞向成熟破骨细胞分化,本研究发现随着振动频率增加,RAW264.7 细胞向成熟破骨细胞分化越少;本实验 E、F 组内未发现有骨吸收陷窝,表明没有成熟破骨细胞分化成。骨吸收功能还与破骨细胞核的数量密切相关,核数越多的破骨细胞吸收活性越强大^[21-23]。这可能跟融合的细胞多,增大了细胞胞浆和细胞膜面积,使破骨细胞接触骨表面的面积增大,吸收陷窝增大;也可能跟细胞核仍然保存转录活性有关。本实验通过诱导细胞的荧光染色观察可见不同频率的复合振动均抑制细胞增大和细胞核的增多,从而抑制 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞向成熟破骨细胞分化。

总之,本实验发现不同频率的复合振动均抑制 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞向成熟破骨细胞分化,且随着振动频率的增加对 RAW264.7 细胞分化的抑制能力逐渐增强。从而阐述了成骨效应不仅仅就是成骨细胞效应的结果,还有破骨细胞效应的成分,本研究结果进一步完善了复合振动防治OP的机制。先前有研究^[24]表明促进体外成骨细胞增殖和分化的最佳振动频率范围为 15—45Hz;结合本研究可见过高的振动频率(>50Hz)不仅可以抑制体外 OB 细胞的增殖和分化,而且也抑制体外破骨细胞的增殖和分化,过低的振动频率(<10Hz)对体外破骨细胞和成

骨细胞活性影响较小。本课题通过体外实验间接指导临床上运用复合振动防治OP的较佳振动频率范围在15—45Hz。

参考文献

- [1] Chang WH, Chen LT, Sun JS, et al. Effect of pulse burst electromagnetic fields stimulation on osteoblast cell activities [J]. *Bioelectromagnetics*, 2004, 25: 457—465.
- [2] Diniz P, Shomura K, Soejima K, et al. Effects of pulsed electromagnetic field stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts [J]. *Bioelectromagnetics*, 2002, 23: 398—405.
- [3] Flieger J, Karachalios T, Khaldi L. Mechanical stimulation in the form vibration prevents postmenopausal bone in ovariectomized rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 1998, 63(6): 510—514.
- [4] Rubin C, Turner AS, Bain S, et al. Low mechanical signals strengthen long bones [J]. *Nature*, 2001, 412: 603—604.
- [5] Robling AG, Hinant FM, Burr DB, et al. Shorter, more frequent mechanical loading sessions enhance bone mass [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2002, 34(2): 196—202.
- [6] Simmons CA, Matlis S, Thornton AJ, et al. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway [J]. *J Biomech*, 2000, 36 (8) : 1087—1096.
- [7] Rubin CT, Sommerfeldt DW, Judex S, et al. Inhibition of osteopenia by low magnitude, high-frequency mechanical stimuli [J]. *Drug Discovery Today*, 2001, 6 (16) : 848—858.
- [8] Judex S, Boyd S, Qin YX, et al. Adaptations of trabecular bone to low magnitude vibrations result in more uniform stress and strain under load [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2003, 31 (1) : 12—20.
- [9] Wolff J. The classic: on the inner architecture of bones and its importance for bone growth. 1870 [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(4): 1056—1065.
- [10] Wolff J. The classic: on the theory of fracture healing. 1873 [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(4): 1052—1055.
- [11] Rubin C, Recker R, Cullen D, et al. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety [J]. *Bone Miner Res*, 2004, 19 (3) : 343—351.
- [12] Verschueren SM, Roelants M, Delecluse C, et al. Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(3): 352—359.
- [13] Slatkowska L, Alibhai SM, Beyene J, et al. Effect of whole body vibration on BMD: a Systematic review and meta-analysis [J]. *Osteoporos Int*, 2010.
- [14] Torstveit MK. Bone adaptation to mechanical loading [J]. *Tidsskr Nor Lægeforen*, 2002, 122(21): 2109—2111.
- [15] Burger EH, Klen Nulen J. Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro [J]. *Adv Dent Res*, 1999, 13 : 93—98.
- [16] 叶超群, 纪树荣. 力学刺激在骨骼中的传导 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 12: 765—767.
- [17] 陈建庭, 邓轩庚, 查丁胜, 等. 复合振动对去势大鼠腓肠肌肌纤维的影响 [J]. *中国骨科临床与基础研究杂志*, 2009(02).
- [18] Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, et al. Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(3): 291—296.
- [19] Kim CH, You L, Yellowley CE, et al. Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling [J]. *Bone (New York)*, 2006, 39(5): 1043—1047.
- [20] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 337—342.
- [21] Ishii M, Saeki Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules [J]. *Mod Rheumatol*, 2008, 18(3): 220—227.
- [22] Rubin J, Greenfield EM. Osteoclast: Origin and Differentiation [J]. *ToPics in Bone Biology*, 2005: 1—23.
- [23] Piper K, Boyde A, Jones SJ. The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro [J]. *Anat Embryol (Berl)*, 1992, 186(4): 291—299.
- [24] 查丁胜, 陈建庭, 邓轩庚, 等. 不同频率振动应变对成骨细胞增殖及分化能力的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14(5) : 303—307.