

# 不同频率振动应力对破骨细胞特异性基因及骨保护素/核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体表达的影响\*

陈国仙<sup>1,3</sup> 陈建庭<sup>1,4</sup> 黄文华<sup>2</sup> 郑 帅<sup>1</sup> 王国荣<sup>3</sup> 林宗锦<sup>3</sup> 李国山<sup>3</sup>

## 摘要

**目的:**观察不同频率振动应力对RAW264.7细胞体外诱导分化过程中,其特异性基因及骨保护素(OPG)/核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL)表达的影响。

**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,分别为B、C、D、E、F组,未进行振动干预组为A组,振动应变加载3天和6天时,应用RT-PCR方法检测破骨细胞特异性基因(TRAP、MMP-9和CATK)与OPG/RANKL的表达水平。

**结果:**不同振动频率组破骨细胞特异性基因表达水平逐渐减低,同时B、C、D组逐渐上调OPG基因表达,而RANKL基因的表达逐渐下调。

**结论:**不同频率振动应力均抑制RAW264.7细胞向成熟破骨细胞增殖分化。

**关键词** 振动应力;RAW264.7细胞;分化;破骨细胞;骨保护素;骨质疏松

中图分类号:R58, R454 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-02-0099-05

**Effects of different frequency of vibration strain on the expressions of osteoclast-specific genes and osteoprotegerin/receptor of activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand in osteoclast/CHEN Guoxian, CHEN Jianting, HUANG Wenhua, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(2):99—103**

## Abstract

**Objective:** To investigate effects of different frequency of vibration strain on the expression of osteoclast-specific genes and osteoprotegerin(OPG)/receptor of activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand(RANKL) in RAW264.7 cells in vitro induced differentiation process.

**Method:** RAW264.7 cells were subjected to vibration strain with different frequency [3—10Hz (B-group), 15-35Hz(C-group), 35—45Hz(D-group), 50—70Hz(E-group),70—90Hz(F-group)] and similar induced fluid. A-group cells were not subjected to vibration strain.The expressions of osteoclast-specific genes(TRAP, MMP-9 and CATK) and OPG/RANKL in osteoclasts were analyzed by semi-quantative RT-PCR.

**Result:** In different frequency vibration groups, the expression levels of osteoclast-specific genes reduced gradually, at the same time in B、C、D group vibration strain promote the expression of OPG mRNA and inhibit the expression of RANKL mRNA gradually.

**Conclusion:** Different frequency of vibration strain can inhibit proliferation and differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts.

**Author's address** Department of Orthopedics,Nanfeng Hospital,Southern Medical University,Guangzhou,510515

**Key word** vibration strain; RAW264.7 cell; differentiation; osteoclast; osteoprotegerin; osteoporosis

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.02.001

\*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,广州,510515; 2 南方医科大学临床解剖学研究所; 3 福建省莆田市第一医院骨科; 4 通讯作者  
作者简介:陈国仙,男,博士研究生,主治医师; 收稿日期:2013-05-08

目前骨质疏松症(osteoporosis, OP)已成为世界范围内常见的疾病,尤其在绝经期妇女和老年人中发病率极高,严重影响患者的生存质量。关于防治骨质疏松的研究有很多报道,近年来物理疗法(力学、电磁学)成为研究的热点<sup>[1-6]</sup>。机械振动是力学刺激形式之一,目前较多相关研究表明振动疗法是一种不良反应小、无创的非药物治疗OP的新型模式,具有良好的临床应用前景<sup>[7-8]</sup>。振动的成骨效应已经形成共识,但其具体的成骨机制尚不清楚。成骨效应是否就是成骨细胞效应的结果,还是有破骨细胞效应的成分存在,尚未见相关研究报道,所以研究振动对破骨细胞分化的影响能更好地阐述振动防治OP的具体机制。

本实验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,从基因水平来观察不同频段的复合振动对破骨细胞特异性基因和骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(receptor of activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)表达的影响情况,从而进一步阐述振动防治OP机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

DMEM培养基和胎牛血清(购自Gibco公司),小鼠RANKL(购自Peprotech公司),RAW264.7细胞株(ATCC, Manassas, USA),M-MLV反转录试剂盒(Invitrogen公司,美国),TrizolRAN提取试剂盒、无RNA酶水、SYBR Premix EX Taq™试剂盒(Takara公司,中国),抗小鼠GAPDH抗体(KangChen Bio-tech公司,中国),CO<sub>2</sub>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),EP管、八联管、枪头(无RNA酶)(Axygen公司,美国),倒置相差显微镜(日本Canon公司),ABI7500PCR扩增仪(ABI公司,美国)。

### 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VS,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,每日振动2次)。

**1.2.2 不同基因总RNA提取和RT-PCR:**按照TrizolRAN提取试剂盒说明提取细胞总RNA,分别在不同频率振动处理3d和6d后,弃去培养板内的培养基,并用PBS溶液清洗2次。将1ml Trizol试剂加入培养板内,并用移液器反复吹打细胞以促进细胞裂解,移入1.5ml EP管中,冰上静置5min,加入0.2ml 氯仿,盖好管盖,用手剧烈振5s,冰上静置5min,见样本分层。样本在预冷的高速离心机上40℃,12000g,离心15min。轻轻地取出样本,小心吸取上层无色溶液,转入新的1.5ml EP管中,加入等体积的异丙醇,混匀,以沉淀RNA。静置10min。样本在4℃,12000g,离心10min。弃去上清,加入1ml 75%乙醇,振匀样本,4℃,离心5min。小心吸去上清,见白色沉淀,在超净台内干燥5—10min,使RNA沉淀干燥,加入无RNA酶水20 $\mu$ l,制成RNA溶液。取上述RNA样品1 $\mu$ l,用核酸分析仪进行定量,A260/280判断其纯度及浓度,根据测定结果用无RNA酶水将各组样品RNA浓度调为一致,按照试剂盒说明书合成第一链cDNA,再以第一链cDNA为模板进行RT-PCR反应测量TRAP、MMP-9、CATK和OPG/RANK mRNA表达。该反应的条件:Stage 1:预变性95℃,30s,1循环;Stage 2:PCR反应95℃,5s;60℃,34s,40循环;Stage 3:退火95℃,15s;60℃,60s;95℃,15s,1循环。用SYBR Green Mater Mix试剂检测待测基因的mRNA水平,共重复检测3次,mRNA水平用GAPDH作内参,基因的表达用 $\Delta\Delta$ Ct法定量分析<sup>[9]</sup>。所用引物序列见表1。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 11.5统计学软件对实验数据进行分析,实验结果用均数 $\pm$ 标准差表示。各组总体均数比较采用单向方差分析。

表1 PCR引物序列

| 目的基因  | 引物系列   |
|-------|--|
| MMP-9 | 5'-GCCCTGGAACCTCACACGACA-3'<br>5'-TTGAAAACCTCACACGCCAGAAG-3'   |
| CATK  | 5'-CAGCAGAACGGAGGCATTGA-3'<br>5'-CCTTTGCCGTGGCGTTATAC-3'       |
| TRAP  | 5'-CTACCTGTGTGACATGACCA-3'<br>5'-GCACATAGCCCCACCCGTTTC-3'      |
| OPG   | 5'-CACAGTGAGGAGGAAGACATT-3'<br>5'-GAGAAGAACCCATCTGGACAT-3'     |
| RANKL | 5'-ATCAGAAGACAGCACTCACT-3'<br>5'-ATCTAGGACATCCATGCTAATGTTTC-3' |
| GAPDH | 5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'<br>5'-TGAAGGGTCGTTGATGG-3'          |

## 2 结果

### 2.1 对破骨细胞特异性基因表达的影响

按实验设计分组,RAW264.7细胞诱导培养3d和6d后进行实时RT-PCR检测,分析破骨细胞特异性基因:组织蛋白酶-K(cathepsin K, CATK),基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)的表达。研究不同频率的复合振动对破骨细胞分化成熟的影响。实验发现,与对

图1 不同频率复合振动对破骨细胞CATK基因表达的影响

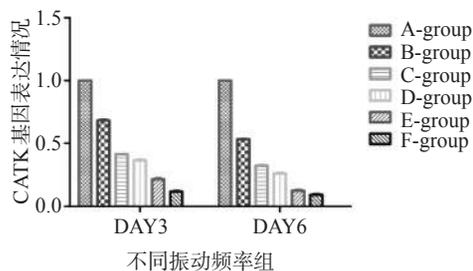
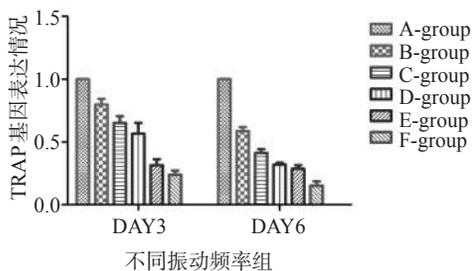


图3 不同频率复合振动对破骨细胞TRAP基因表达的影响



对照组A组相比,B、C、D、E、F组频段的复合振动均能抑制RANKL促进破骨细胞特异性基因CATK, MMP-9和TRAP表达,其差异具有显著性意义( $P < 0.01$ )。见图1—3,表2。

### 2.2 对OPG/RANKL基因表达的影响

按实验设计分组,RAW264.7细胞诱导培养3天后进行实时RT-PCR检测,分析OPG、RANKL基因的表达。实验发现与A组对比,B、C、D、E、F组OPG基因和RANKL的表达水平差异均有显著性意义( $P < 0.01$ )。随着振动频率的增加,其抑制RANKL基因表达越明显,但对于OPG基因表达情况,B、C、D组逐渐上调,而E、F组逐渐下调OPG基因的表达。见图4,表3。

## 3 讨论

OP是一种以骨量减少、骨组织微结构退化为特征,以致骨的脆性增高、骨折危险性增加的一种全身性、系统性、代谢性骨病。OP是危害中老年人健康的常见病,尤以绝经后妇女为甚。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

图2 不同频率复合振动对破骨细胞MMP-9基因表达的影响

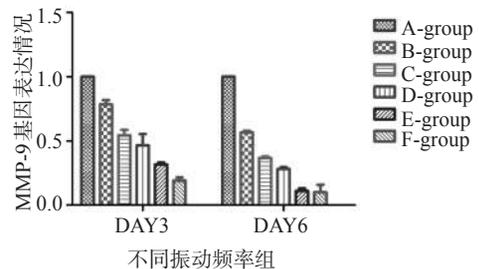


图4 3d后不同频率复合振动对OPG/RANKL基因表达的影响



**表2 不同频率 VS 对破骨细胞 CATK, MMP-9, TRAP 基因表达的影响** (n=4, x±s)

| 组别               | 实验 3d         | 实验 6d         |
|------------------|---------------|---------------|
| <b>CATK 基因表达</b> |               |               |
| A 组              | 1±0           | 1±0           |
| B 组              | 0.6829±0.0061 | 0.5335±0.0025 |
| C 组              | 0.4143±0.0013 | 0.3232±0.0023 |
| D 组              | 0.3655±0.0745 | 0.2612±0.0041 |
| E 组              | 0.2158±0.0059 | 0.1255±0.0038 |
| F 组              | 0.1167±0.0056 | 0.0919±0.0051 |
| G 组              | 0.0465±0.0078 | 0.0455±0.0075 |
| P                | 0.000         | 0.000         |
| <b>MMP-9 基因</b>  |               |               |
| A 组              | 1±0           | 1±0           |
| B 组              | 0.7845±0.0332 | 0.5675±0.0115 |
| C 组              | 0.5443±0.0416 | 0.3675±0.0113 |
| D 组              | 0.4653±0.0875 | 0.2813±0.0151 |
| E 组              | 0.3183±0.0149 | 0.1125±0.0178 |
| F 组              | 0.2177±0.0236 | 0.1009±0.0581 |
| G 组              | 0.0046±0.0018 | 0.0045±0.0015 |
| P                | 0.000         | 0.000         |
| <b>TRAP 基因</b>   |               |               |
| A 组              | 1±0           | 1±0           |
| B 组              | 0.7981±0.0462 | 0.5863±0.0317 |
| C 组              | 0.6521±0.0531 | 0.4134±0.0298 |
| D 组              | 0.5653±0.0875 | 0.3193±0.0154 |
| E 组              | 0.3143±0.0489 | 0.2865±0.0287 |
| F 组              | 0.2387±0.0341 | 0.1521±0.0343 |
| G 组              | 0.0216±0.0015 | 0.0125±0.0017 |
| P                | 0.000         | 0.000         |

**表3 不同频率 VS 3d 后对 OPG/RANKL 基因表达的影响** (n=4, x±s)

| 组别  | OPG           | RANKL         |
|-----|---------------|---------------|
| A 组 | 1±0           | 1±0           |
| B 组 | 0.2356±0.0162 | 0.8643±0.0876 |
| C 组 | 0.3121±0.0132 | 0.7668±0.0618 |
| D 组 | 0.4623±0.0175 | 0.5367±0.0344 |
| E 组 | 0.5123±0.0263 | 0.3895±0.0267 |
| F 组 | 0.5765±0.0256 | 0.2376±0.0344 |
| P   | 0.000         | 0.000         |

吸收。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，但其确切的信号传导通路尚不清楚<sup>[9-11]</sup>。目前关于不同频率的复合振动对破骨细胞活性影响尚未见报道，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特异性基因表达及 OPG/RANKL mRNA 表达的影响，从而为振动防治 OP 机制提供进一步的理论基础。

核因子-κB 受体活化因子配体(activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)是一种肿瘤

坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)家族的二型跨膜蛋白<sup>[12]</sup>。人类 RANKL 基因主要表达于骨髓、骨及淋巴组织。RANK 在细胞内缺乏内在酶活性，只能通过肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor associated factor, TRAF)介导，其中 TRAF6 是 RANK-RANKL 诱导破骨细胞分化最重要的衔接蛋白。人类 RANK 编码的蛋白在体内有两种，第一种称为可溶性 RANK，存在循环的血液中，其虽然能与 RANKL 结合，但不能介导破骨细胞分化和成熟，反而起抑制破骨细胞的分化和成熟作用<sup>[14]</sup>。第二种称为跨膜蛋白，表达于破骨细胞前体细胞膜表面，其与 RANKL 结合后能够促进破骨细胞分化和成熟。众所周知，OPG 和 RANK 能够相互竞争与 RANKL 结合，若 RANK 与 RANKL 结合，激活 RANK 信号通路从而促进破骨细胞分化及成熟<sup>[13]</sup>；若 OPG 与 RANKL 结合则抑制破骨细胞分化和成熟。因此 RANK/RANKL/OPG 调节轴在破骨细胞分化及骨重建耦联中发挥重要的作用。本实验中，B、C、D 组频段的复合振动逐渐上调 OPG mRNA 的表达，相应的 RANKL mRNA 表达逐渐减少，这导致 OPG/RANKL 的比值增加；本实验表明复合振动频率在小于 45Hz 时，随着振动频率增加，该 OPG/RANKL 比值逐渐增大，说明该频段的复合振动能够抑制破骨细胞的分化和成熟，同时能促使骨组织代谢向着骨形成的方向发展，从而提高骨密度，增加骨量，改善骨的微结构，从而可以达到防治 OP。随着振动频率的增加，比如振动频率大于 50Hz 时(E 和 F 组)，其下调 OPG 和 RANKL 基因的表达，说明过强的复合振动频率，不仅抑制破骨细胞的分化和成熟，也抑制骨组织向骨形成方向发展，这与临床上相似，过强频率的复合振动会使 RANK/RANKL/OPG 调节轴紊乱，从而危害人的机体。

TRAP, MMP-9 和 CATK 作为成熟破骨细胞的特异性基因<sup>[15-16]</sup>。TRAP 在融合前单核细胞内和成熟破骨细胞内表达，在破骨细胞前体细胞内不表达，其主要存在于胞转小泡内；TRAP 是一种结构高度保守的含铁糖蛋白，其作用的底物专一性较低，可以水解各种无机磷酸盐类和磷酸酯酶，其主要在胞转时破坏内吞噬的基质退化物。MMP-9 可以降解细胞外基质多种蛋白成分，在骨吸收及胶原降解中发

挥重要作用<sup>[16]</sup>,其在破骨细胞向骨表面迁移的过程中发挥重要作用。倘若MMP-9缺失,会阻碍破骨细胞向骨表面的迁移,促使破骨细胞聚集在类骨质和软骨界面处,减低破骨细胞的骨吸收功能。TRAP和CATK是破骨细胞分泌的两种水解酶,均能促使破骨细胞对骨质的溶解、吸收<sup>[15]</sup>,其中发挥主要作用的是CATK。CATK属于溶酶体半甘氨酸蛋白酶中的番木瓜蛋白酶超家族成员,它是破骨细胞中表达量最高、溶骨活性最强的一种半甘氨酸蛋白酶,是骨吸收过程中的一个关键酶。本实验发现不同频率复合振动均抑制破骨细胞特异性基因CATK、MMP-9和TRAP的表达,随着振动频率的增加,其抑制能力增强。该研究从基因水平上说明复合振动可以抑制破骨细胞的分化和成熟,抑制破骨细胞骨吸收功能。

总之,本研究首次从基因水平方面报道不同频段的复合振动对破骨细胞特异性基因表达的影响,不同频率的复合振动对RANKL/RANK/OPG骨代谢调节轴的影响。本研究表明,不同频率的复合振动抑制破骨细胞的分化和成熟,抑制破骨细胞的骨吸收功能且随着振动频率的增加,其抑制能力增强。小于45Hz的复合振动可以抑制破骨细胞的分化和成熟,促进骨组织向骨形成的方向发展,但过强的复合振动频率,不仅抑制破骨细胞的分化和成熟,也抑制骨组织向骨形成方向发展,这与临床上相似,过强频率的复合振动会使RANK/RANKL/OPG调节轴紊乱,从而危害人的机体,本研究的内容与结果进一步完善复合振动防治OP的理论基础。

## 参考文献

- [1] Chang WH, Chen LT, Sun JS, et al. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities [J]. *Bioelectromagnetics*, 2004, 25(6):457—465.
- [2] Diniz P, Shomura K, Soejima K, et al. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts[J]. *Bioelectromagnetics*, 2002, 23(5):398—405.
- [3] Fliieger J, Karachalios T, Khaldi L, et al. Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats[J]. *Calcif Tissue Int*, 1998, 63(6):510—514.
- [4] Rubin C, Turner AS, Bain S, et al. Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones[J]. *Nature*, 2001, 412(6847):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 (ERK 1/2) signaling pathway[J]. *J Biomech*, 2003, 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] Torstveit MK. Bone adaptation to mechanical loading[J]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2002, 122(21):2109—2111.
- [10] Burger EH, Klein-Nulen J. Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro[J]. *Adv Dent Res*, 1999, (13): 93—98.
- [11] 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学杂志*,2005,(12):765—767.
- [12] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation[J]. *Cell*, 1998, 93(2):165—176.
- [13] Leibbrandt A, Penninger JM. RANKL/RANK as key factors for osteoclast development and bone loss in arthropathies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009, (649):100—113.
- [14] Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(7):3540—3545.
- [15] Ishibashi O, Niwa S, Kadoyama K, et al. MMP-9 antisense oligodeoxynucleotide exerts an inhibitory effect on osteoclastic bone resorption by suppressing cell migration[J]. *Life Sci*, 2006, 79(17):1657—1660.
- [16] Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, et al. Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(3):291—296.