

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002851

持续静压力环境下 MC3T3-E1 细胞的基因测序分析

宋志靖¹, 张浩令², 蒋宇航², 王 凯¹, 宁浩驰¹, 裴雪冬¹, 陈海亮¹, 宋 敏¹, 王 薇³

(1. 甘肃中医药大学中医临床学院, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学公共卫生学院, 兰州 730000;

3. 甘肃中医药大学针灸推拿学院, 兰州 730000)

【摘要】目的:通过对持续静压力环境下 MC3T3-E1 细胞的基因测序, 筛选出 Hub 基因并分析其与骨质疏松症相关性。**方法:**采用 MTT 检测细胞增殖和免疫荧光检测细胞骨架蛋白, 筛选出最佳实验条件。用 TRIzol 法提取 RNA 与基因测序, 通过 Mfuzz 聚类、富集分析、GSVA 分析, 利用 NCBI GEO 数据库、Genecards 数据库、molecular signatures database 数据库, 分析对比持续静压力环境下 MC3T3-E1 细胞差异表达基因, 筛选 Hub 基因, 对比分析其与骨质疏松症信号通路关联的分子学机制。**结果:**在持续静压力环境下, MC3T3-E1 细胞增殖显著降低, 在 1.0 MPa 处理 8 h 和 0.5 MPa 处理 24 h 细胞模型组的细胞骨架中, 微管蛋白和肌动蛋白的抑制作用显著。通过空白组与模型组基因测序对比后发现 29 164 个差异基因, 其中 14 489 个上调、14 675 个下调。这些差异基因涉及 1 658 个 GO 功能, 包括 1 096 GO_BP(生物过程), 255 GO_CC(细胞组分), 307 GO_MF(分子功能), MC3T3-E1 细胞在持续静压力作用下受到差异基因调控的信号转导通路有 305 个。最后筛选出的 Hub 基因为 *BTK*、*CSF1R*、*MATK*、*NOS1*、*PDGFRB*, 骨质疏松症中 *MATK* 表达显著 ($P < 0.05$), 与 5 个核心基因相对应的 AUC 曲线下面积为 *BTK* (0.900)、*CSF1R* (0.850)、*MATK* (0.950)、*NOS1* (0.650)、*PDGFRB* (0.800)。通过对 5 个核心基因进行 GSVA 分析, 得出 *MATK* 涉及 3 个关键信号传导途径: INFLAMMATORY-RESPONSE、HEDGEHOG-SIGNALING 和 KRAS-SIGNALING-DN。**结论:**持续静压力可降低 MC3T3-E1 细胞增殖活性, 并降低细胞骨架中微管蛋白和肌动蛋白表达; *MATK* 可能作为持续静压力环境下调控 MC3T3-E1 细胞成骨基因, 并与骨质疏松症 3 个关键信号传导途径相关。

【关键词】MC3T3-E1 细胞; 持续静压力; 基因测序; 骨质疏松症**【中图分类号】**R681**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-04-22

Gene sequencing analysis of MC3T3-E1 cells under continuously compressive pressures

Song Zhijing¹, Zhang Haoling², Jiang Yuhang², Wang Kai¹, Ning Haochi¹, Pei Xuedong¹, Chen Hailiang¹,Song Min¹, Wang Wei³

(1. Clinical College of Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine; 2. School of Public Health, Gansu University of Chinese Medicine; 3. College of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Gansu University of Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To screen out the Hub gene and analyze its correlation with osteoporosis by sequencing the genes of MC3T3-E1 cells under continuously compressive pressures (CCP). **Methods:** MTT assay was used to detect cell proliferation and immunofluorescence assay was used to screen out the best experimental conditions. RNA was extracted by TRIzol method and sequenced. And by Mfuzz clustering, enrichment analysis, GSVA analysis, NCBI GEO database, Genecards database and molecular signatures database, the differentially expressed genes in MC3T3-E1 cells under CCP were analyzed and compared, the Hub gene was screened, and the molecular mechanism associated with osteoporosis signal pathway was compared and analyzed. **Results:** The proliferation of MC3T3-E1 cells decreased significantly under CCP, and tubulin and actin inhibited significantly in the cytoskeleton of cell model groups treated with 1.0 MPa for 8 hours and 0.5 MPa for 24 hours. After comparing the blank group and the model group, 29 164 different genes were found, of which 14 489 were up-regulated and 14 675 were down-regulated. These differential genes involved 1 658 GO functions, including 1 096 GO_BP (biological process), 255 GO_CC (cell component) and 307 GO_MF (molec-

作者介绍: 宋志靖, Email: szj@gszy.edu.cn,

研究方向: 中医药防治高原脊柱骨关节疾病与高血压疾病。

通信作者: 王 薇, Email: wangwei@gszy.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81960877)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210608.1633.004.html>

(2021-06-09)

ular function), and there were 305 signal transduction pathways regulated by differential genes in MC3T3-E1 cells under CCP. The final screened Hub genes were *BTK*, *CSF1R*, *MATK*, *NOS1* and *PDGFRB*. The expression of *MATK* in osteoporosis was significant ($P < 0.05$). The areas under AUC curve corresponding to the five core genes were *BTK* (0.900), *CSF1R* (0.850), *MATK* (0.950), *NOS1* (0.650) and *PDGFRB* (0.800). According to GSVA analysis of five core genes, *MATK* was involved in three key signaling pathways: INFLAMMATORY-RESPONSE, HEDGEHOG-SIGNALING and KRAS-SIGNALING-DN. **Conclusion:** CCP can decrease the proliferation activity of MC3T3-E1 cells, and reduce the influence of tubulin and actin in cytoskeleton. *MATK* may be a gene that regulates the osteogenesis of MC3T3-E1 cells under CCP, and is related to three key signal transmission pathways of osteoporosis.

[Key words] MC3T3-E1 cell; continuously compressive pressure; gene sequencing; osteoporosis

流体单位面积所受到的垂直于该表面上的力称为流体静压强,也称静压力,持续作用一定时长称为持续静压力(continuously compressive pressure, CCP)^[1]。持续静压力作为机械应力刺激生物体的一种应力形式,是刺激骨组织生长的有效条件,也是生物体内的一种生理刺激需要。缺乏机械应力刺激的生物体,其维持骨重建与动态平衡机制会出现偏离,造成骨量丢失^[2],最终形成骨质疏松。骨质疏松症主要是以骨微结构的骨损伤及低骨量为特征的渐进性骨骼疾病^[3]。通过机械应力加载和卸载可以影响成骨细胞的成骨机制进程和功能,从而影响骨质疏松症的转归。成骨样细胞系 MC3T3-E1 细胞作为力学刺激敏感细胞,是研究骨生长、发育、成形机制的基本单位,也是研究应力学环境下骨质疏松症成骨机制的经典细胞^[4]。MC3T3-E1 细胞对机械应力的感知首先经过其细胞骨架转化为化学刺激信号,调控成骨机制。细胞骨架调控蛋白主要是肌动蛋白和微管蛋白。肌动蛋白是细胞骨架蛋白,在细胞分泌、吞噬、移动、胞质流动和胞质分离等过程中起重要作用。微管蛋白是一种聚合的细胞骨架蛋白,可形成微管,微管调节重要的细胞过程,例如细胞运动、形态、分裂、胞内运输等。本研究通过分析 MC3T3-E1 细胞在持续静压力环境下的增殖、细胞骨架微管蛋白、肌动蛋白表达及 MC3T3-E1 细胞在压力环境下的成骨基因测序,探讨持续静压力环境中 MC3T3-E1 细胞的基因调控成骨机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

MC3T3-E1 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号:CL-0378)。

1.2 主要试剂与仪器

MTT(美国 Sigma 公司)、0.25% Trypsin(美国 Gibco 公司,

货号:15050065)、多聚甲醛(国药集团,货号 80096618)、浓缩型正常山羊血清(武汉博士德生物工程有限公司,货号 AR1009)、荧光(FITC)标记羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司,货号 BA1105)、荧光(FITC)标记羊抗大鼠 IgG (BIOSsbs-0293G-FITC)、tubulin(Abcam,货号 ab6161)、actin(Abcam,货号 ab179467)、TRIZOL 试剂(美国 Invitrogen 公司)、RNA 建库(TruSeq® RNA LT Sample Prep Kit v2,美国 Illumina 公司)、测序试剂 1(TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS,美国 Illumina 公司)、测序试剂 2(TruSeq SBS Kit v3-HS (200-cycles),美国 Illumina 公司)、捕获磁珠(AmpureBeads,美国 Beckman 公司)、Qubit 定量(Quant-iT™ PicoGreen® ds-DNA Assay Kit,美国 Life 公司)。CO₂ 恒温培养箱(SANYO,型号:MCO-15AC)、压力环境细胞培养箱(自研气体加压可调型细胞培养箱)、显微镜(OLYMPUS,型号 BX53)、低速离心机(Eppendorf,型号 5702R)、酶标仪(Thermo,型号 MULTI-SKAN MK3)、Hisq2500 高通量测序仪(美国 Illumina 公司)、CBOT 簇生成仪(美国 Illumina 公司)、电泳仪(中国天能公司)、凝胶成像系统(中国天能公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将 MC3T3-E1 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号 CL-0378)在 10%胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号 10099-141),37℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养。

1.3.2 MTT 法测定细胞增殖能力 取生长状态良好的 MC3T3-E1 细胞,用 MEM-α 培养基调整细胞密度至 5×10^4 个/mL,接入 96 孔板,每孔 100 μL 细胞悬液,37℃培养过夜(在细胞孔周围孔内加入 100 μL 无菌 PBS);根据实验分组利用压力可调型细胞培养箱建立细胞模型(加压气体 N₂ 75%,O₂ 20%,CO₂ 5%,并保持细胞培养环境稳定)。设置未加压力常规培养为空白组,压力组分别施加 0.5 MPa、1 MPa、1.5 MPa 压力;以不同分组和细胞处理设置分别处理细胞,每组 3 个复孔,37℃分别培养 2 h、4 h、8 h、24 h;细胞处理结束后,每孔加入 10 μL MTT,37℃培养 3 h,吸出培养基,加入 150 μL DMSO 震荡 10 min;酶标仪测定 568 nm 各孔光密度(optical density, OD)值。

1.3.3 免疫荧光检测细胞骨架蛋白 第 1 天:在培养板中已将爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗 3 次,每次 3 min,用 4%的多聚甲醛固定爬片 15 min,PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3 min;0.5%

Triton X-100(PBS 配制)室温通透 20 min;PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3 min,吸水纸吸干 PBS,在玻片上滴加正常山羊血清,室温封闭 30 min;吸水纸吸掉封闭液,不洗,每张玻片滴加足够量稀释好的一抗并放入湿盒,4℃孵育过夜;第 2 天:PBST 浸洗爬片 3 次,每次 3 min,吸水纸吸干爬片上多余液体后滴加稀释好的荧光二抗,湿盒中 37℃孵育 1 h,PBST 浸洗切片 3 次,每次 3 min,从加荧光二抗起,后面所有操作步骤都尽量在较暗处进行。滴加 DAPI 避光孵育 5 min,对标本进行染核,PBST 5 min × 4 次洗去多余 DAPI,用吸水纸吸干爬片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

1.3.4 TRIzol 法 RNA 提取与基因测序 对未加压力常规培养组(空白组)和筛选出的细胞模型组进行 RNA 提取与基因测序。TRIzol 法提取 RNA,取 1 L 利用 Nanodrop 仪器进行定量,根据定量结果,取 500 ng 1%琼脂糖进行电泳检测,合成 cDNA 后末端补平,加 12.5 L A-tailing buffer 到 17.5 L DNA 中,充分混匀,37℃放置 30 min,加接头后进行 PCR 富集,使用 Qubit 定量 RNA 文库。使用 Start cBot 仪器簇生成后进行 Illumina Hiseq 3000 测序。

1.3.5 Mfuzz 聚类分析差异基因 利用 DESeq2 软件对上述 2 组基因测序结果进行筛选,满足 $|\log_2FC| \geq 1$ 和 $P \leq 0.05$ 差异表达范围筛选 2 组之间的差异基因。针对样本组间筛选的差异表达基因,采用对基因和样本进行双向层级聚类并用热图显示聚类参数(distance metric:pearson correlation;linkage rule:average linkage)。筛选样本量大于等于 6 个的差异基因,采用 Mfuzz 聚类分析法,将不同载荷持续静压力对 MC3T3-E1 细胞差异基因的表达模式聚类分析为 10 类。

1.3.6 富集分析 利用 R 语言和 Bioconductor 包对靶点基因进行目的基因的生物学和功能注释,通过基因集富集分析进行 GO 分析和 KEGG 富集分析(3.0 版, <http://software.broadinstitute.org/gsea/>)可确定定义的基因集是否有统计学差异。以 $P < 0.05$ 作为筛选条件, P 值越小越丰富,被认为是重要的生物学过程和途径。

1.3.7 Hub 基因的筛选及在骨质疏松症中差异表达 从 STRING 上导出 PPI 网络图,根据节点的中心度筛选基因测序结果的 Hub 基因,同时从 NCBI GEO 数据库导出骨质疏松症相关基因,二者进行对比分析。

1.3.8 Hub 基因与骨质疏松症标志物的相关性 通过 Genecards 数据库筛选出骨质疏松症疾病标志物,选取评分前 20 的基因作为后续研究对象,对核心基因表达量及疾病标志物进行 Spearman 相关性分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

1.3.9 GSVA 分析 基因集差异分析(gene set variation analysis,GSVA)是评估转录组基因富集情况的一种非参数无监督方法。GSVA 通过对感兴趣的基因集合进行综合打分,将基因水平变化转变为通路水平变化,进而判断样本的生物学功能。本研究将从 molecular signatures database 数据库(7.0 版)下载基因集合,采用 GSVA 算法对每个基因集合进行综合打分,评估不同样本潜在的生物学功能变化。

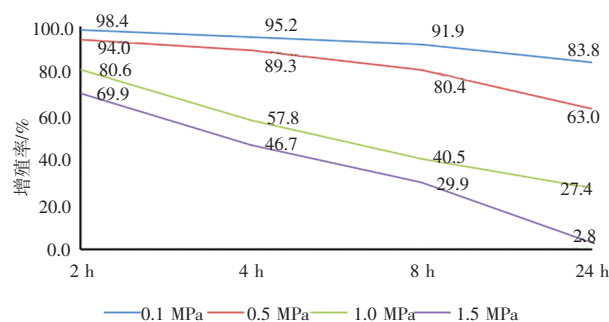
1.4 统计学处理

采用 SPSS 24.0 软件进行分析。4 组(正常细胞、细胞模型)在不同持续静压力 and 不同时间细胞增殖能力的比较采用重复测量方差分析,当数据不满足球形假定时,采用 Pillai's Trace 多元方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。采用 R 语言(version 3.6)进行。所有统计检验均为双侧,显著性水平为 0.05,即概率曲线左右两侧各占一半,即 $\alpha=0.025$ 时具有意义,并绘图。

2 结果

2.1 不同载荷持续静压力作用下 MC3T3-E1 的增殖能力

根据 MTT 实验结果,并依据 IC_{50} 条件筛选后续实验细胞模型。从 MTT 结果来看, IC_{50} 附近的条件分别为 0.5 MPa 处理 24 h,1.0 MPa 处理 4 h 及 8 h,1.5 MPa 处理 4 h。考虑到仪器稳定性及细胞内相关蛋白的表达稳定性, IC_{50} 首选条件为 0.5 MPa 处理 24 h(图 1)。

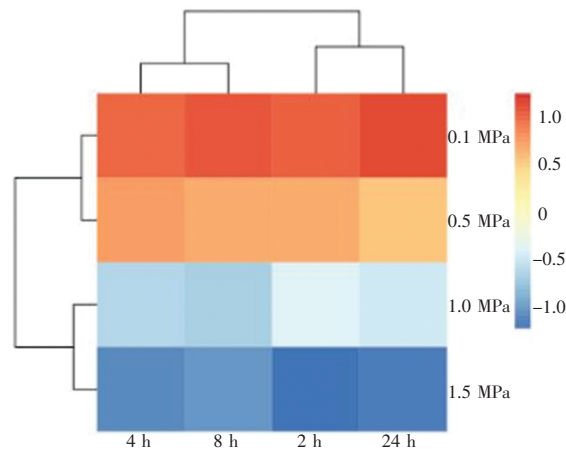


注:增殖率 = 压力下细胞数平均值/不加力细胞数平均值

图 1 不同载荷持续静压力下 MC3T3-E1 的增殖率

2.2 持续静压力与时间的层次聚类分析

通过聚类分析,可分为低增殖率和高增殖率 2 类。第一类为 1.0 MPa、1.5 MPa,细胞增殖率较低;第二类是 0.1 MPa、0.5 MPa,细胞增殖率较高(图 2)。

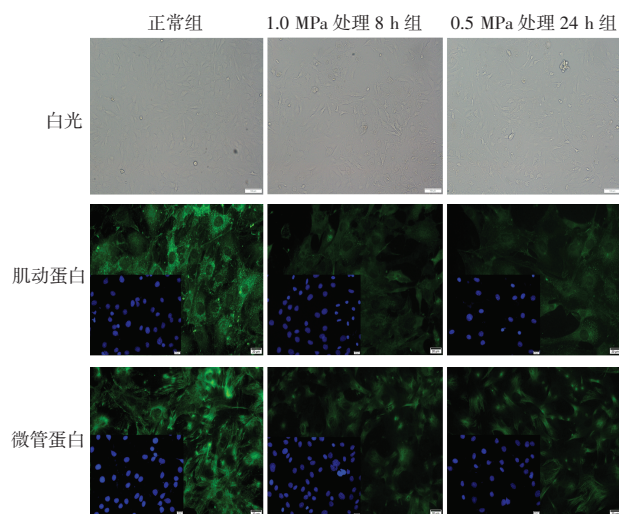


注:增殖率以压力组间相互比较,红色越深,增殖率的正向影响越大;反之蓝色越深,增殖率的负向影响越大

图 2 不同时间和压力对增殖率影响层次聚类分析

2.3 对细胞骨架微管蛋白、肌动蛋白的影响

免疫荧光细胞爬片结果显示,与未加压力常规培养正常细胞(空白组)比较,其荧光强度显著降低。因此 1.0 MPa 处理 8 h 及 0.5 MPa 处理 24 h 组中细胞骨架微管蛋白、肌动蛋白抑制作用显著,表明持续静压力对细胞形态、分裂等产生影响(图 3)。



注:绿色为目的蛋白,蓝色为细胞核

图 3 细胞骨架微管蛋白、肌动蛋白免疫荧光检测照片

2.4 差异基因分析

利用 DESeq2 软件对空白组和 0.5 MPa 处理 24 h 细胞模型组进行差异表达基因筛选,根据 $|\log_2FC| \geq 1$ 和 $P \leq 0.05$ 作为差异表达范围的筛选条件,结果显示,2 组共有差异基因 29 164 个,其中表达上调 14 489 个,表达下调 14 675 个(图 4)。

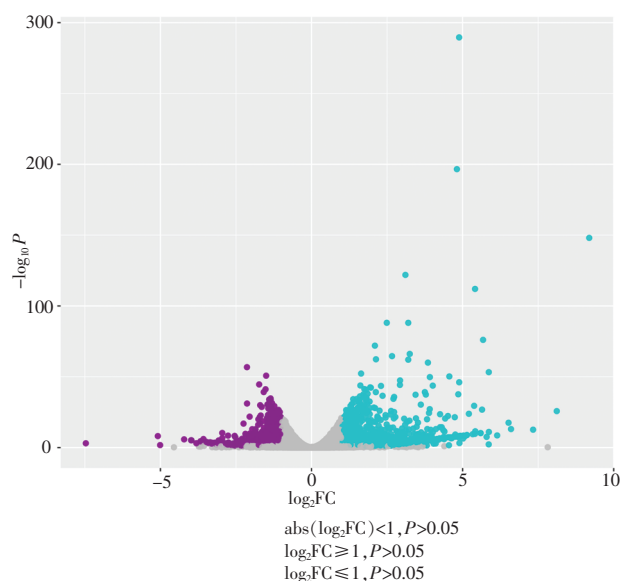


图 4 2 组样本间的火山图和散点图

2.5 GO 功能分析

采用 TopGO 软件进行 GO 功能分析,根据 $P \leq 0.05$ 筛选显著富集 GO,结果显示在持续静压力作用下差异显著基因涉及的 GO 功能有 1 658 个,可影响 MC3T3-E1 细胞生物合成与代谢主要包括细胞分解、细胞代谢、有机物分解、杂环酸代谢、细胞芳香化合物代谢、细胞氮化合物代谢、有机环化合物代谢、含核酸酶的复合代谢、有机氮复合分解、有机物代谢、含磷复合代谢,以及细胞浆部分蛋白质结合、阴离子结合、核糖核酸结合、嘌呤核糖核苷酸结合、磷酸核苷结合、离子结合、腺苷核糖核苷酸结合等生物学过程,通过对细胞生物合成与代谢影响,从而抑制 MC3T3-E1 细胞增殖分化,具体见表 1、图 5。

表 1 Top GO 功能富集分析结果

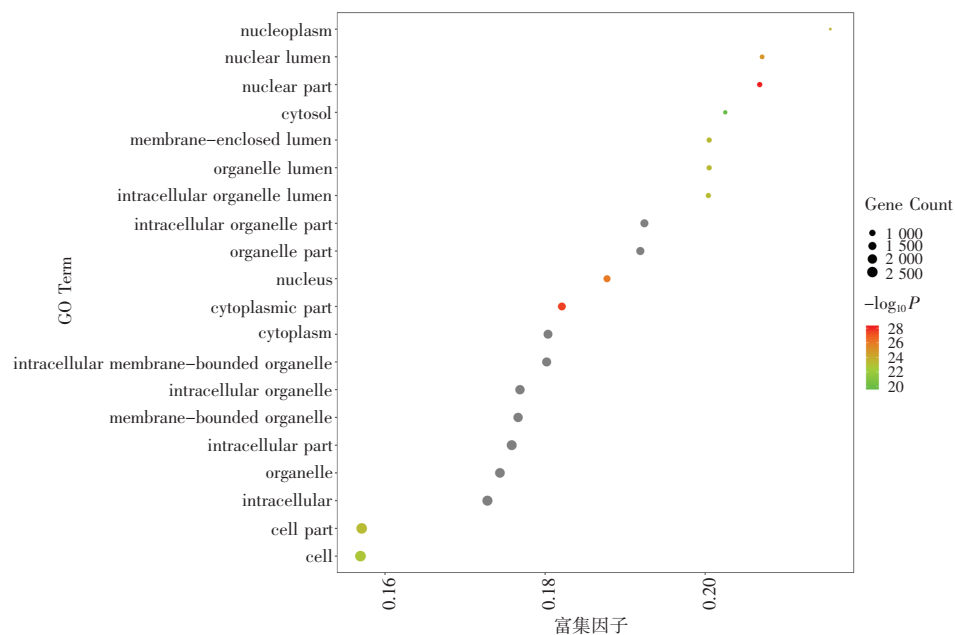
GO标示		标记的	显著的
GO:0044248	cellular catabolic process	2 801	582
GO:0044237	cellular metabolic process	10 302	1 749
GO:0071840	cellular component organization or biogenesis	5 723	1 045
GO:0009056	catabolic process	3 040	608
GO:0016043	cellular component organization	5 547	1 010
GO:0044424	intracellular part	12 859	2 261
GO:0005622	intracellular	13 386	2 313
GO:0044422	organelle part	7 952	1 526
GO:0044446	intracellular organelle part	7 827	1 506
GO:0043226	organelle	12 205	2 128
GO:0005515	protein binding	8 342	1 459
GO:0005488	binding	13 078	2 125
GO:0043168	anion binding	2 858	577
GO:0032559	adenylnucleotide binding	1 520	340
GO:0032553	ribonucleotide binding	2 089	441

注:其中包括 GO_BP(biological process)1 096 个,GO_CC(cellular componen)255 个,GO_MF(molecular function)307 个

2.6 KEGG 分析结果

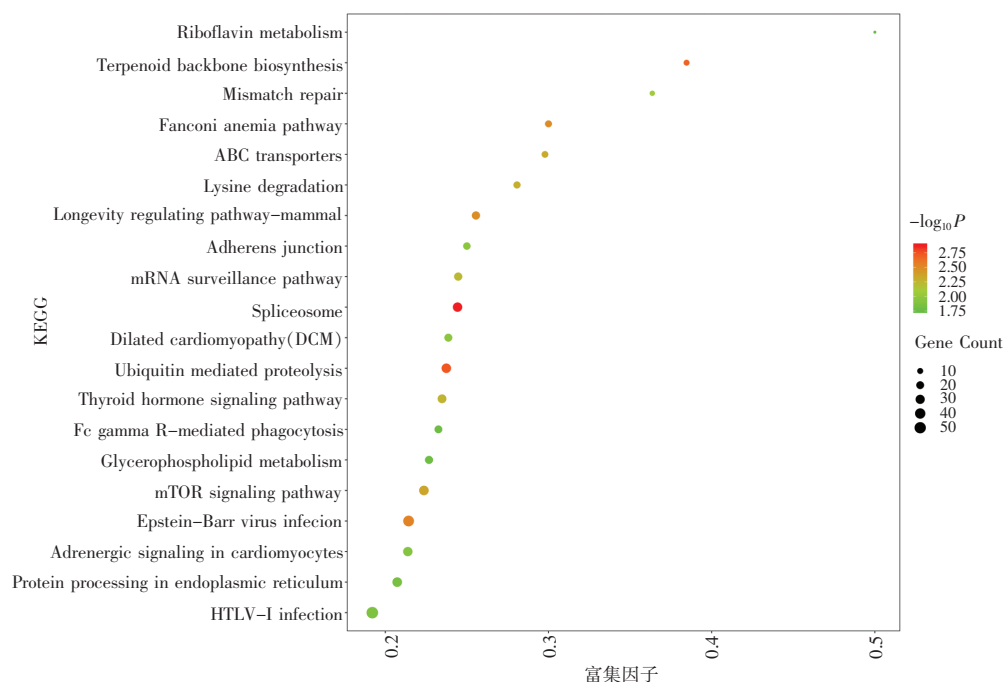
将得到的差异基因进行信号通路分析,结果显示差异基因可调控的信号转导通路共 305 条, 主要涉及蛋白质水解、mTOR 信号通路、AMPK 信号通路、B 细胞受体信号通路、FcεRI 信号通路、AGE-RAGE 等信号通路、Notch 信号通路、GnRH 信号通路、T 细胞受体信号通路、雌激素信号通路、Toll 样受体信号通路、HIF-1 信号通路、VEGF 信号通路、L-17 信

号通路、TGF-β 信号通路、cAMP 信号通路、MAPK 信号通路、ak-STAT 信号通路、cGMP-PKG 信号通路、NF-κB 信号通路、TNF 信号通路等 20 条信号通路(图 6)。其中 AMPK 信号通路、雌激素信号通路、TGF-β 信号通路、cAMP 信号通路、MAPK 信号通路、NF-κB 信号通路、TNF 信号通路都与骨质疏松症直接相关,参与骨代谢的平衡调节,说明持续静压力可以通过差异基因影响多个疾病主要相关通路,抑制 MC3T3-E1 细胞增殖分化。



注:显著富集的 GO 散点图,横坐标表示富集因子(候选基因集中属于该 GO 的基因总数与属于该 GO 的基因总数之比)。富集因子越大,富集度越大,纵坐标表示 $-\log_{10}P$

图 5 GO 功能分析气泡图

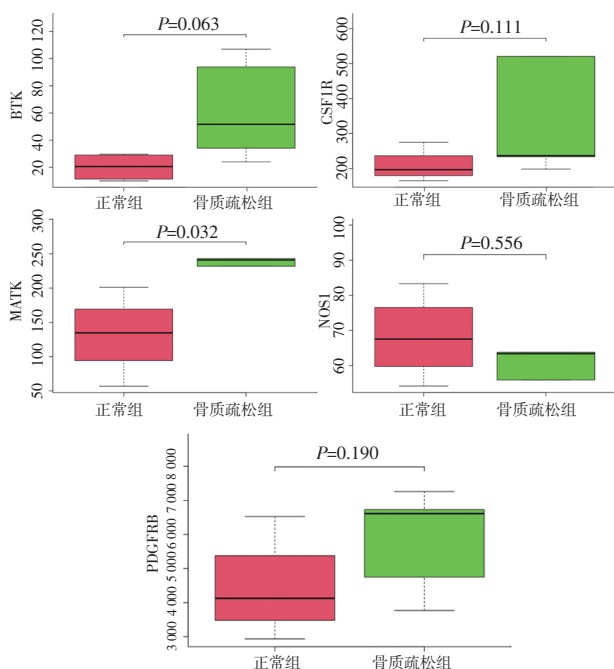


注:显著富集的 KEGG 途径散点图,横坐标代表富集因子(候选基因中属于该 KEGG 途径的基因总数与所有基因中属于该 KEGG 途径的基因总数之比)。富集系数越大,越丰富。纵轴代表 $-\log_{10}P$ 。根据富集因子的排名信息,显示前 20 条 KEGG 途径

图 6 功能富集分析结果

2.7 Hub 基因与骨质疏松症差异分析

根据基因测序结果,绘制 PPI 网络图,依据中心度值筛选前 5 个基因为 Hub 基因,分别为 *BTK*、*CSF1R*、*MATK*、*NOS1*、*PDGFRB*,并与骨质疏松症相关性进行分析。结果表明,骨质疏松症中 *MATK* 的表达显著($P=0.032$),5 个核心基因对骨质疏松症的预测效率表明,与 5 个核心基因相对应的 AUC 曲线下的面积为 *BTK*(0.900)、*CSF1R*(0.850)、*MATK*(0.950)、*NOS1*(0.650)、*PDGFRB*(0.800)(图 7、图 8)。结合前面差异分析筛选出的 *MATK* 基因,预测在该骨质疏松症中表达具有显著性,可能作为新的治疗基因靶点。



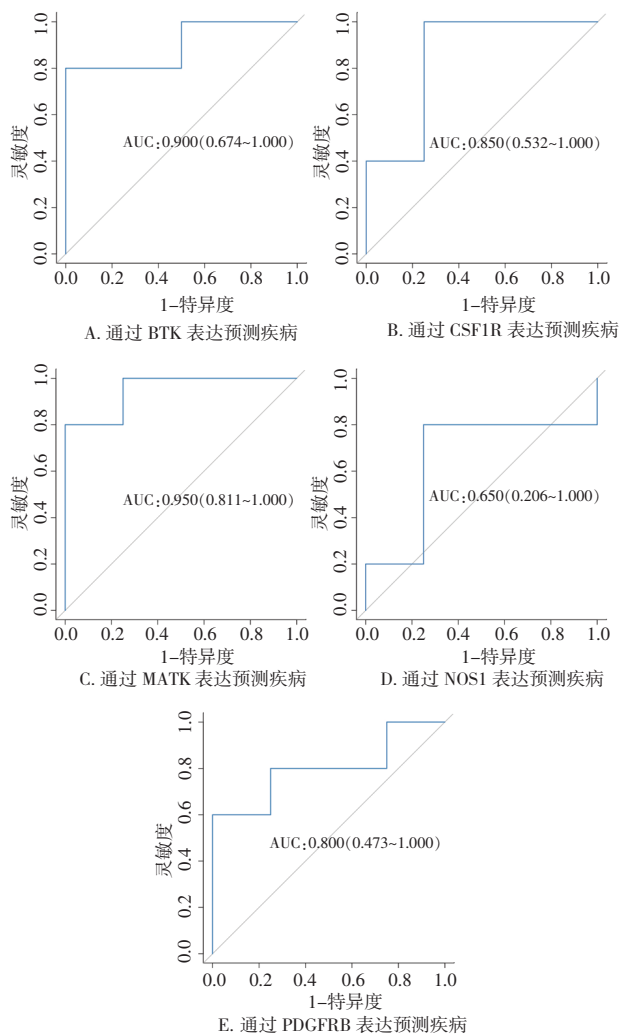
注:骨质疏松症和对照之间核心基因的差异分析

图 7 Hub 基因骨质疏松症差异分析

2.8 核心基因与骨质疏松症标志物的相关性

通过 Spearman 分析核心基因表达和疾病标志物的相关性,结果表明 *MATK* 与大多数骨质疏松症相关标志物有关,而 *PDGFRB*、*CSF1R* 和 *BTK* 仅与某些骨质疏松症基因有关,

表明 4 个基因都直接与间接调控骨质疏松症。而 *NOS1* 与相关标志物无关,可能通过调节其他基因或蛋白质表达影响骨质疏松症。从结果来看 *MATK* 与多个骨质疏松相关基因有关($P<0.05$),可进一步认为 *MATK* 参与骨质疏松症的调控过程(图 9)。



注:AUC 曲线值越接近 1,其方法的真实性越好

图 8 核心基因对应的 AUC 曲线

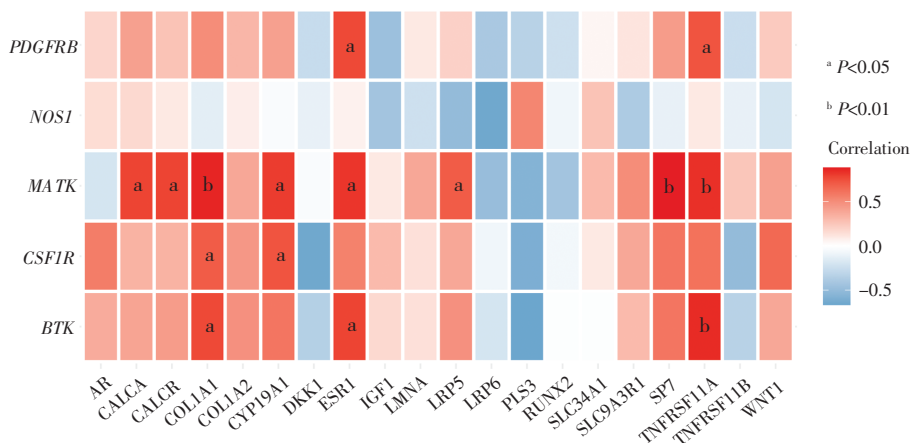


图 9 通过 Spearman 相关性分析核心基因表达和疾病标志物

2.9 GSVA 分析

BTK、CSF1R 和 MATK 的高表达都涉及 INFLAMMATORY-RESPONSE、HEDGEHOG-SIGNALING 和 KRAS-SIGNALING-DN 信号通路,这 3 条信号通路可调控细胞的增殖分化。而 NOS1 的高表达与 BILE-ACID-METABOLISM、IL2-

STAT5-SIGNALING 信号通路有关,说明 NOS1 通过调控胆汁酸代谢与 IL-2 细胞因子分泌而间接影响骨质疏松症。而 PDGFRB-VIA-SISAXIA 的高表达与 ANGIOFA 相关(图10~图14)。

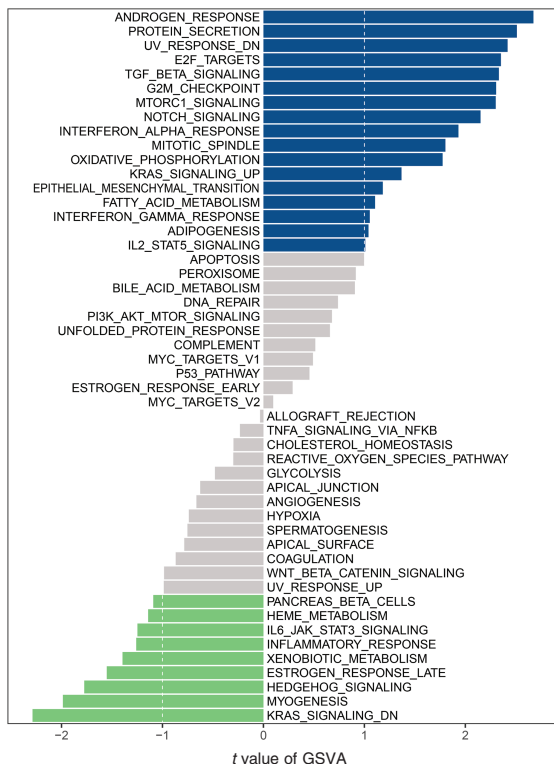


图 10 BTK GSVA 结果分析

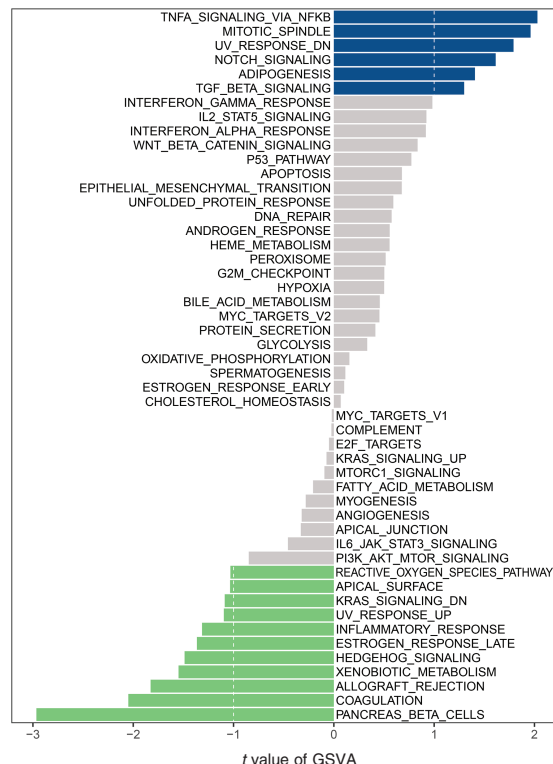


图 11 CSF1R GSVA 结果分析

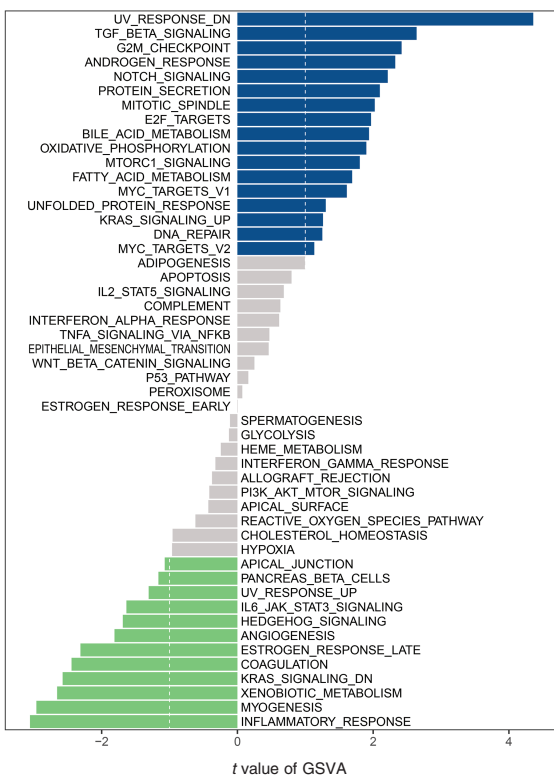


图 12 MATK GSVA 结果分析

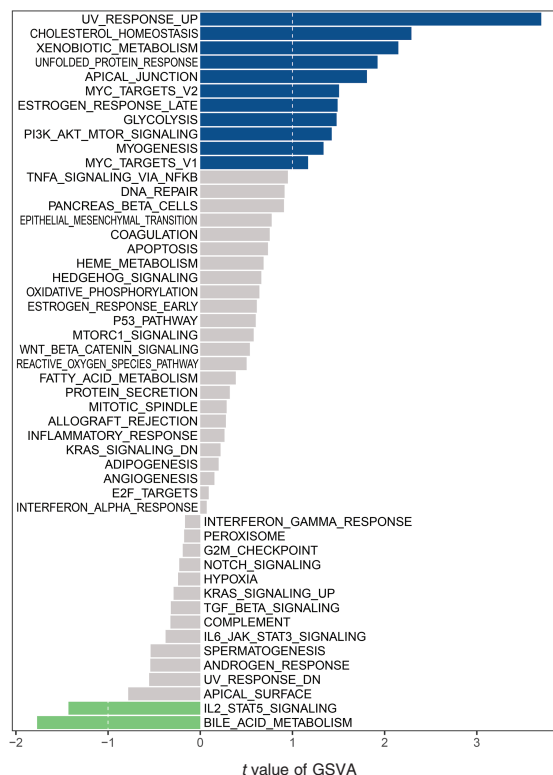


图 13 NOS1 GSVA 结果分析

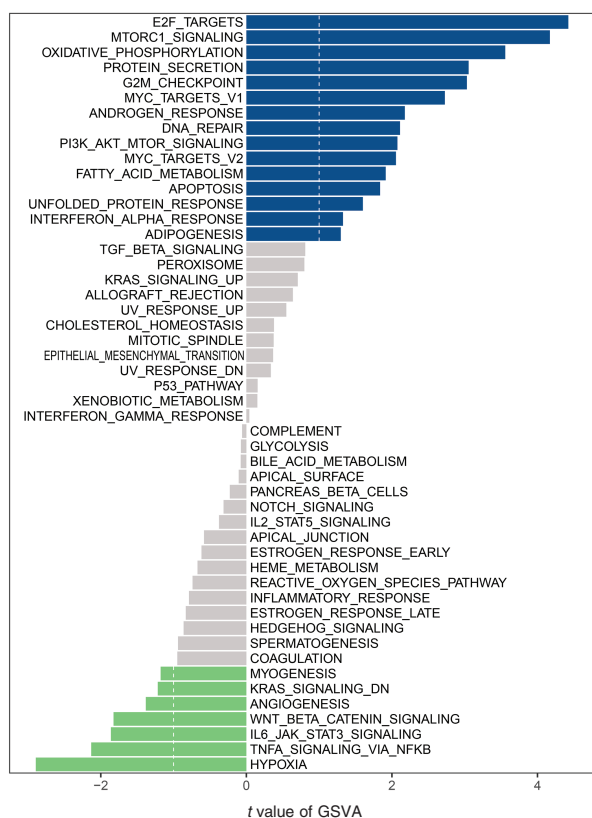


图 14 PDGFRB GSVA 结果分析

3 讨论

世界卫生组织的一项调查数据表明,骨质疏松症是在心血管疾病之后全球面临的第二大严重健康问题,其特点是骨骼密度低,并且可能伴随全身慢性疼痛、骨折、听力下降等问题^[5-6]。人口老龄化是很多国家和地区都面临的问题^[7-10],而人口老龄化随之带来的就是骨质疏松症人数的增加^[11]。女性在绝经后发病概率随着雌激素的降低而增加,男性在 66 岁后引起骨折的风险也增大^[12]。机械应力刺激对骨质疏松症的成骨作用会产生影响,对 MC3T3-E1 细胞生物活性的影响较大,基础研究常采用持续静压力、流体剪切力、机械离心力等方式对 MC3T3-E1 细胞施加机械力刺激,构建实验应力刺激模型^[13]。Ozawa H 等^[13]研究发现,持续静压力作为常见的机械应力刺激,干预成骨细胞后,抑制了成骨细胞标志物碱性磷酸酶活性,当细胞转移到细胞内时,碱性磷酸酶活性的抑制迅速恢复。冯元等^[14]对 MC3T3-E1 成骨样细胞通过自制的加载装置分别施加 50 kPa、100 kPa、150 kPa 持续静压力,培养一定时间后发现不同大小的静压力可以影响成骨细胞系 MC3T3-E1

上 ADAM28 金属蛋白酶解离素 28 表达强度,进而影响骨改建。侯晋等^[15]给 MC3T3-E1 细胞施加 2 个标准大气压的持续性静压力后发现细胞增殖速度减缓,随着干预时间延长,加力组骨钙素的分泌增加,表明一定大小的持续性静压力在抑制 MC3T3-E1 细胞生长的同时促进其分化成熟。进一步研究表明,生理范围内的持续静压力可显著影响 MC3T3-E1 细胞的增殖活性和功能状态,并在抑制骨吸收的同时促进其分化成骨作用,这一过程不发生病理性损害^[16-20]。对细胞成骨分化只是表现出早期的延迟作用,而不是最终抑制细胞分化。然而,超过生理接受范围的过量持续静压力明显抑制成骨机制的病理过程,不利于骨组织的维持和改建。但其作用的细胞学基础尚不清楚,对这一病理过程的研究将对机械应力刺激损伤成骨作用的防治具有重要意义。

本研究分别给予 0.1 MPa、0.5 MPa、1 MPa、1.5 MPa 持续静压力干预 MC3T3-E1 细胞,发现随压力增加,细胞增殖率逐渐下降,随时间推移,细胞增殖活性也明显降低。根据 MTT 结果,实验条件选择在 IC₅₀ 时,符合后续检测的要求,IC₅₀ 附近的条件为 0.5 MPa 处理 24 h;与空白组相比,微管蛋白、肌动蛋白水平明显下降,说明持续静压力过载后细胞的增殖活性受到抑制,主要在细胞核发挥作用。持续静压力可通过对细胞生物合成与代谢造成影响,从而抑制 MC3T3-E1 细胞增殖分化,与细胞形变、蛋白质裂解、细胞凋亡等有关。并且可以通过差异基因影响多个疾病主要相关通路,参与骨代谢的平衡调节,抑制 MC3T3-E1 细胞增殖分化。

本研究发现,MTK 是骨质疏松症相关研究中较新的基因,国内外对本基因的研究较少。BTK 与破骨细胞的分化有关,CSF1R 与破骨细胞的形成有关^[21-22]。PDGFRB 可促进新骨和小梁骨形成,从而增加骨强度^[23]。NOS1 在骨质疏松方面的研究比较缺乏。本研究的 GSVA 中,5 个核心基因的高表达与 6 条通路(KRAS-SIGNALING-DNE、HEDGEHOG-SIGNALING、INFLAMMATORY-RESPONS、BILE-ACID-METABOLISM、IL2-STAT5-SIGNALING 和 PDGFRB-VIA-SISAXIA)有关。相关性结果表明 MTK 基因在持续静压力环境下对 MC3T3-E1 细胞成骨调控机制相关性更强,MTK 涉及 3 个关键信号传导途径,即 INFLAMMATORY-RESPONSE、HEDGEHOG-SIGNALING 和 KRAS-SIGNALING-DN。MTK 基因是下一步研究机械应力刺激转化为化学刺激调控成骨机制的重要基因,这对持续静压

力环境下通过 MC3T3-E1 细胞研究骨质疏松症的分子机制提供了新的途径。

参 考 文 献

- [1] Xing Y, He ZM, Warnock JN, et al. Effects of constant static pressure on the biological properties of porcine aortic valve leaflets[J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(4): 555-562.
- [2] 赵常红, 李世昌, 孙 朋, 等. 运动对骨骼和肌肉的共调作用研究[J]. *首都体育学院学报*, 2017, 29(6): 565-570, 576.
- [3] Zhao CH, Li SC, Sun P, et al. Study of the exercise effects on interaction between bone and muscle[J]. *J Cap Univ Phys Educ Sports*, 2017, 29(6): 565-570, 576.
- [4] Rozenberg S, Bruyère O, Bergmann P, et al. How to manage osteoporosis before the age of 50[J]. *Maturitas*, 2020, 138: 14-25.
- [5] 李 军, 孙明林, 宋光明, 等. 成骨细胞 MC3T3-E1 对高重力的力学生物学响应[J]. *医用生物力学*, 2017, 32(2): 122-129.
- [6] Li J, Sun ML, Song GM, et al. The mechanical and biological responses of MC3T3-E1 cells under hypergravity[J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(2): 122-129.
- [7] Park S, Daily JW, Song MY, et al. Gene-gene and gene-lifestyle interactions of AKAP11, KCNMA1, PUM1, SPTBN1, and EPDR1 on osteoporosis risk in middle-aged adults[J]. *Nutrition*, 2020, 79/80: 110859.
- [8] de Nigris F, Ruosi C, Colella G, et al. Epigenetic therapies of osteoporosis[J]. *Bone*, 2021, 142: 115680.
- [9] Goh SK, McNowen R, Wong KN. Macroeconomic implications of population aging: evidence from Japan[J]. *J Asian Econ*, 2020, 68: 101198.
- [10] Papapetrou E, Tsalaporta P. The impact of population aging in rich countries: what's the future?[J]. *J Policy Modeling*, 2020, 42(1): 77-95.
- [11] Pascual-Saez M, Cantarero-Prieto D, Pires Manso JR. Does population ageing affect savings in Europe?[J]. *J Policy Modeling*, 2020, 42(2): 291-306.
- [12] Liu ZC, Rexachs D, Epelde F, et al. Support managing population aging stress of emergency departments in a computational way[J]. *Procedia Comput Sci*, 2017, 108: 149-158.
- [13] Nishizawa Y, Miura M, Ichimura S, et al. Executive summary of the Japan osteoporosis society guide for the use of bone turnover markers in the diagnosis and treatment of osteoporosis (2018 edition)[J]. *Clin Chimica Acta*, 2019, 498: 101-107.
- [14] Zou BH, Zheng JH, Deng WD, et al. Kirenel inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis and prevents ovariectomized-induced osteoporosis via suppressing the Ca^{2+} -NFATc1 and Cav-1 signaling pathways[J]. *Phytomedicine*, 2021, 80: 153377.
- [15] Ozawa H, Imamura K, Abe E, et al. Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells(MC3T3-E1) *in vitro*[J]. *J Cell Physiol*, 1990, 142(1): 177-185.
- [16] 冯 元, 轩 昆, 杨富生, 等. 持续静压力对成骨细胞系 MC3T3-E1 金属蛋白酶解素 28 表达的影响[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2008, 18(2): 61-64.
- [17] Feng Y, Xuan K, Yang FS, et al. Effects of continuously compressive pressure(CCP) on the expression of ADAM28 protein in mouse osteoblast-like cells(MC3T3-E1) *in vitro*[J]. *Chin J Conserv Dent*, 2008, 18(2): 61-64.
- [18] 侯 晋, 段小红, 吴军正, 等. 持续性静压力对成骨样细胞 MC3T3-E1 生物学特性的影响[J]. *临床口腔医学杂志*, 2004, 20(1): 9-11.
- [19] Hou J, Duan XH, Wu JZ, et al. Effects of continuously compressive pressure on the osteoblast-like(MC3T3-E1) cells *in vitro*[J]. *J Clin Stomatol*, 2004, 20(1): 9-11.
- [20] 宋志靖, 王 薇, 宋 敏, 等. MC3T3-E1 细胞在不同机械应力刺激下成骨表达机制的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(2): 289-292, 307.
- [21] Song ZJ, Wang W, Song M, et al. The research progress on the bone formation mechanism of MC3T3-E1 cells under different mechanical stress stimulation[J]. *Chin J Osteoporos*, 2021, 27(2): 289-292, 307.
- [22] 郑 翼. 机械力作用下成骨细胞的早期应答反应及力学信号转导机制的初步研究[D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [23] Zheng Y. The initial responses to mechanical strain and the mechanotransduction in osteoblastic cells *in vitro*[D]. Chengdu: Sichuan University, 2004.
- [24] 侯 晋. 持续性静压力对体外培养成骨细胞生物学特性和细胞内外 Ca^{2+} 分布影响的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2004.
- [25] Hou J. Effects of continuously compressive pressure on biological characteristics and intracellular and extracellular Ca^{2+} concentration of rat osteoblasts *in vitro*[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2004.
- [26] 黄生高, 张建兴, 熊培颖, 等. 持续静压力对人牙周膜细胞 RANKL mRNA 表达的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2006, 31(4): 518-522.
- [27] Huang SG, Zhang JX, Xiong PY, et al. Effect of continuously compressive pressure on the expression of RANKL mRNA in human periodontal ligament cells *in vitro*[J]. *J Central South Univ Med Sci*, 2006, 31(4): 518-522.
- [28] 张兵兵, 王远亮, 杨 力, 等. 力生长因子及其 E 肽对成骨细胞分化的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(3): 304-312.
- [29] Zhang BB, Wang YL, Yang L, et al. The effects of MGF and E peptide on the differentiation of osteoblasts[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2010, 37(3): 304-312.
- [30] Ariza Y, Murata M, Ueda Y, et al. Bruton's tyrosine kinase(btk) inhibitor tirabrutinib suppresses osteoclastic bone resorption[J]. *Bone Rep*, 2019, 10: 100201.
- [31] Wang XF, Wang YJ, Li TY, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents against lipopolysaccharide-induced osteoporosis by inhibiting osteoclast formation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108916.
- [32] Johnston JJ, Sanchez-Contreras MY, Keppler-Noreuil KM, et al. A point mutation in PDGFRB causes autosomal-dominant penttinen syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 97(3): 465-474.

(责任编辑: 周一青)