

生理性力学刺激对抗骨组织细胞凋亡的研究进展

王海芳 梅其炳*

(西北工业大学生命科学院, 空间生物实验模拟技术重点实验室, 西安 710072)

摘要 骨系细胞的适度凋亡对于骨组织形态和力学性能的维持和调节至关重要。在某些疾病或用药情况下, 成骨细胞发生过度凋亡可直接引起骨量减少; 骨细胞凋亡过多可通过促进骨吸收作用而导致骨力学性能的削弱; 相反, 许多骨活性激素或药物则可通过抑制骨系细胞凋亡而改善病理性骨量减少。近年来的体内外研究表明, 模拟生理状态的力学刺激可直接对抗成骨细胞和骨细胞凋亡, 从而有利于骨的发育和病理性骨量减少的改善。本文将对此进行综述, 重点论述可能参与力学刺激对抗骨组织细胞凋亡的信号通路。

关键词 成骨细胞; 骨细胞; 抗凋亡; 流体剪切力; 牵拉应力

1 骨组织细胞凋亡的生物学意义

骨组织中存在多种细胞类型, 包括成骨细胞、骨细胞、破骨细胞和骨衬细胞。为满足骨骼发育、更新和骨折修复的需要, 骨组织终其一生持续进行着塑形(modeling)和重塑(remodeling)活动, 此过程依赖成骨前体细胞的激活、成骨细胞增殖、分化和骨组织细胞死亡的协调发生。对于骨这种不断更新的组织, 细胞凋亡与新细胞产生具有同等重要的意义。骨系细胞保持适度凋亡对于骨组织形态和力学性能的维持和调节至关重要。

1.1 成骨细胞及其凋亡

骨祖细胞(osteoprogenitor cell)来源于骨髓间充质多能干细胞和贴附于血管内皮层的间充质细胞。早期骨祖细胞表达骨特异性转录因子 Runx2, 是成骨细胞分化的重要调节因子。骨祖细胞进一步分化为前成骨细胞, 并继续增殖分化, 最后成为成熟成骨细胞, 停止增殖, 其主要功能为分泌骨基质。完成分泌相后, 成骨细胞或埋藏于矿化骨基质中成为骨细胞, 或成为无活性的骨衬细胞保护骨基质不被破骨细胞吸收, 其余约 80% 通过发生凋亡而清除。在正常的骨组织发育、更新过程^[1]和骨折修复过程^[2], 以及某些疾病过程中^[3]均可观察到成骨细胞凋亡现象; 这是一个复杂的、受到严格调控的生理过程, 多种激素、生长因子、细胞因子和药物对其发挥调节作用。成骨细胞和破骨细胞的相对活性控制着骨量的多少。当成骨细胞发生过度凋亡(如长期应用糖皮质激素或雌激素缺乏时)而寿命缩短、数量减少时, 将影响骨形成率, 最终导致骨量减少; 绝经后或卵巢切除术后伴发的骨转换加快、骨量减少与 TNF- α 引起的成骨

细胞凋亡有关。而二膦酸盐类药物的抗骨折效应则与其抑制成骨细胞凋亡、延长成骨细胞工作时间直接相关。

1.2 骨细胞及其凋亡

骨细胞是骨组织含量最为丰富的细胞(约占细胞总数的 95%); 其寿命也最长, 几乎与骨组织相当, 但并非永生细胞, 其中相当一部分将死于凋亡。成熟的骨细胞呈星形, 细胞体埋藏在矿化骨基质的腔隙中, 具有数目众多的、垂直于骨表面的细长细胞突起, 延伸至纵横交错的骨小管中。骨细胞的细胞突起之间、及其与静止骨表面的骨衬细胞、新骨形成部位的成骨细胞以及毛细血管和血窦的周边细胞之间通过缝隙联接相连, 还可间接与骨髓基质中的成骨细胞前体细胞相连, 在矿化的骨基质内构成一个三维细胞网络, 使骨组织成为一个巨大的功能合体^[4]。

骨细胞数目和活性对于骨量的维持和完整性的保持极其重要。目前认为, 骨细胞的主要功能为感受力学刺激、将其转化为生物学信号并转导至其他骨细胞及成骨细胞和破骨细胞, 从而对骨吸收和骨形成发挥调节作用^[5], 影响骨的重建。体外研究表明, 骨细胞样细胞 MLO-Y4 的条件培养基可刺激成骨细胞分化。骨细胞和成骨细胞共培养研究表明, 受到力学刺激后, 骨细胞可以向成骨细胞发送信号, 增强成骨细胞活性。骨细胞受到流体剪切力作用后, 还通过分泌可溶性因子抑制破骨细胞的形成和骨吸收。Cardoso 等^[6]报告, 对大鼠尺骨施加 14 天疲劳负荷的同时若连续应用凋亡酶抑制剂, 可完全阻断疲劳

收稿日期: 2009-04-08 接受日期: 2009-11-17

* 通讯作者。Tel: 029-88460391, E-mail: qbmei@nwpu.edu.cn

负荷引起的骨细胞凋亡和破骨细胞激活,提示疲劳负荷会在骨内产生微损伤并导致骨细胞凋亡,从而激活破骨细胞引发骨的吸收而开始骨重建过程,清除微损伤,最终使骨的稳态得以恢复。这表明适当的骨细胞凋亡对于骨骼的力学适应性重建具有极其重要的意义,应用凋亡抑制剂抑制骨细胞凋亡可能导致疲劳损伤的积聚。然而,在长期卧床或骨骼制动时,骨组织活动减少导致骨间隙液流动减少,供氧和营养缺乏、代谢废物则在局部积累,骨细胞所受力学刺激减弱,骨细胞凋亡将显著增多。失重情况下,全身血液重新分配,运动系统循环血液量下降,同时系统血液循环和骨间隙液中激素水平发生变化,也将导致骨细胞的营养状况发生变化,力学刺激减少,引起骨细胞凋亡增加。在病理性超负荷情况下,骨细胞胞体和细胞突起则因为骨组织微损伤而受损断裂。骨细胞凋亡使骨细胞网络的完整性遭到破坏,死亡或凋亡的骨细胞可发放诱导破骨细胞在局部募集和激活的信号,促进骨吸收活动,最终导致骨矿物质丢失、骨的力学性能削弱^[7]。采用药物或其他物理手段抑制骨细胞凋亡,有可能通过抑制破骨细胞活性而改善病理性骨量丢失。

2 生理性力学刺激对骨组织细胞凋亡的保护作用

2.1 骨组织细胞所受的力学刺激

正常生理条件下,当骨骼受到牵拉、压缩或弯曲时,力学负荷施加到骨组织可直接引起基质应变,对细胞产生牵拉作用;另一方面,矿化骨基质发生形变时在骨陷窝及骨小管网络系统内造成压力梯度,引起间隙液体的流动;当负荷因素去除时,压力梯度恢复,液体逆向流动。因此,骨间隙液实际上一直处于动态的振荡流动状态。实验研究表明,对骨细胞而言,流体剪切力(flow shear stress, FSS)是比基质变形更强的刺激信号^[8]。因此,目前认为由于液体流动而产生的流体剪切力是骨骼系统最主要的力学刺激信号。在体外实验中,对成骨细胞和骨细胞的力学反应性进行研究时常采用的力学刺激方法为流体剪切力(模式包括稳定单向、脉冲单向和振荡性)和对生长于弹性基质上的细胞进行直接牵拉(stretching 或 bending)。

在体内,成骨细胞和骨细胞对何种力学刺激更为敏感,目前仍无定论。由于骨细胞的位置较深,突起伸入矿化基质的骨小管内,因此推测骨细胞能直接感

受骨应变产生的液体流动。而位于骨表面的成骨细胞的受力情况目前仍不清楚。不过,体外研究显示,成骨细胞和骨细胞均可对各种力学刺激(包括流体剪切力、牵张应力或压应力)发生反应,尽管反应性存在差异^[9]。由于从动物分离得到的原代细胞分化程度参差不齐,增加了研究的复杂性。因此,目前对骨组织细胞力学感受及转导机制的研究大多仍然采用细胞系进行。

2.2 力学刺激对骨系细胞凋亡的抑制作用

诸多体内体外研究表明,力学刺激不但可调节骨组织细胞的增殖、分化和功能^[10],而且可通过诱导或抑制细胞凋亡而影响其寿命^[11]。研究发现,模拟生理状态的力学刺激可直接对抗成骨细胞和骨细胞凋亡,似乎也在一定程度上可为骨细胞的长寿命做出解释。

模拟失重模型可从反面验证力学刺激对骨组织的重要性。骨组织的力负荷主要源于肌肉的主动收缩,其目的为抵抗重力和外力。在失重模型中,重力负荷几乎为零,骨组织的力学负荷水平明显降低,骨细胞凋亡增加,骨吸收加快,最终导致骨量减少。Aguirre等^[12]的研究显示,小鼠吊尾3天后,松质骨和皮质骨均可见骨细胞凋亡增加;2周后破骨细胞数目增多、皮质孔隙度升高,骨小梁和骨皮质的宽度下降,脊柱骨矿物质密度和椎骨强度降低;因此,认为减少力学刺激信号可能使骨细胞活力下降,最终导致凋亡。处于凋亡状态的骨细胞可发放募集破骨细胞的信号,促进骨吸收。Dufour等^[13]报告,吊尾2~7天可使大鼠胫骨骨量减少,并可见成骨细胞及骨细胞的凋亡。进一步的研究发现,去负荷骨的 $\alpha_5\beta_1$ 整合素表达水平和磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)磷酸化水平降低,同时Bcl-2表达降低、Bax保持不变,提示骨骼去负荷可能通过削弱 $\alpha_5\beta_1$ -PI3K-Bcl-2生存通路而促进成骨细胞凋亡。Mann等^[14]向培养于3-D生物反应系统中的人松质骨施加周期性力学刺激3 000微应力、每日5 min,连续3天后静置组标本中骨细胞活力下降、凋亡细胞比例增加,而受力组则骨细胞凋亡比例明显较低,骨细胞活力强于对照组。这些整体和组织水平的研究表明,力学刺激不足可导致成骨细胞/骨细胞凋亡,提示力学刺激可能具有直接抑制骨组织细胞凋亡的作用。

体外模拟生理性力学刺激直接对抗细胞凋亡的早期研究多见于血管内皮细胞。向体外培养的内皮细胞施加流体剪切力,不但可完全阻断肿瘤坏死因子

- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)或生长因子撤退引起的DNA断裂,还可抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和 H_2O_2 诱导的细胞凋亡。目前,关于力学刺激对成骨细胞/骨细胞凋亡保护作用的体外研究尚不充分,主要集中在几个实验室。

Tan 等^[15]报告,脉冲性流体(0.70±0.30 Pa, 5 Hz)预处理 1 h 可显著抑制 TNF- α 诱导的鸡骨细胞凋亡,但不能对抗成骨细胞凋亡。流体的抗凋亡作用可为 NO 合成抑制剂 L-NAME [N (G)-nitro-L-arginine methylester]所阻断,提示 NO 信号途径在流体剪切力抗骨细胞凋亡中发挥重要作用。Pavalko 等^[16]报告, TNF- α /环己酰胺(cyclohexamide, CHX)处理 4~6 h 可诱导原代大鼠颅骨成骨细胞、MC3T3 成骨细胞和 UMR106 骨肉瘤细胞发生凋亡。如向细胞施加单向稳定流体剪切力(12 dyne/cm²)同时应用 TNF- α /CHX,凋亡现象几乎完全抑制, TNF- α 诱导的 caspase-3 激活被完全阻断。进一步研究表明,流体剪切力可激活 PI3K 信号通路,并引起蛋白激酶 B (Akt)磷酸化,如采用 LY294002 抑制 PI3K 活性,则流体的抗凋亡作用被阻断。然而,LY294002 不能抑制流体引起的 Akt 磷酸化作用,提示流体剪切力可能通过抑制依赖 PI3K 活性的其他途径而发挥抗凋亡作用。Bakker 等^[15]研究表明,在静置培养条件(模拟去力学负荷)下,血清饥饿可使骨细胞膜表面暴露磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS),其比例高于骨膜成纤维细胞 6 倍,高于成骨细胞 3 倍。施加单向脉冲性流体剪切力(0.3 Pa, 5 Hz)可使暴露 PS 的骨细胞数目下降 90%,但对成骨细胞和成纤维细胞则无影响。流体剪切力对骨细胞凋亡的保护作用可能与 Bcl-2/Bax 比例的改变有关。我们的研究显示,向 MC3T3 成骨细胞施加模拟生理振荡性流体剪切力,5~15 min 即可部分对抗 TNF- α /CHX 诱导的凋亡,施加流体剪切力 2 h 后, TNF- α /CHX 诱导的凋亡和 caspase-3 激活完全被抑制,而且此种抗凋亡作用可持续数小时(数据待发表)。以上结果表明,生理范围内的流体剪切力(6~30 dynes/cm²),无论是单向稳定流体、振荡性或脉冲性流体,均具有一定程度的抗凋亡作用,但在骨细胞和成骨细胞得到的实验结果存在某些差异。

Plotkin 等^[17]对体外培养的 MLO-Y4 骨细胞施加牵张应力(牵张基质使细胞长度增加 5%),1~5 min 内即可观察到胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)发生磷酸化激活并向细胞核内转位,从而拮抗地塞米松诱导的细胞凋亡,整合素、

细胞骨架成分包括微管和微丝以及 Src 激酶参与介导牵拉刺激的抗凋亡作用。抑制 ERK 磷酸化、抑制新基因转录和抑制新蛋白质合成可完全阻断牵拉刺激的抗凋亡作用。

上述可见,施加模拟生理活动状态下骨组织细胞所受的力学刺激可直接对抗成骨细胞和骨细胞凋亡。但是值得注意的是,现有实验结果之间可能存在一定偏差,这可能与所采用力学刺激的模式(流体剪切力或牵拉应力)、细胞的不同分化阶段(成骨细胞或骨细胞)以及凋亡诱导机制(TNF- α 、血清饥饿或糖皮质激素)不同有关。

3 力学刺激对抗骨组织细胞凋亡的机制

目前,对离体骨组织细胞凋亡的研究通常采用的模型是 TNF- α /CHX 诱导、血清饥饿以及应用 etoposide 或糖皮质激素进行诱导。由于不同模型的凋亡诱导信号途径不同,而处于不同分化阶段的骨组织细胞对凋亡诱导方法的敏感性存在差异,因此所采用的凋亡检测方法也不相同,有些采用形态学方法检测染色体浓缩和核断裂,有些则采用 caspase 活性作为凋亡的标准。另外,成骨细胞和骨细胞对不同力学刺激(牵拉、流体剪切力或四点弯曲)的反应性不同。这些因素增加了体外研究的复杂性。鉴于本领域的研究还远未成熟,下文仅对目前认为可能参与力学刺激对抗骨组织细胞凋亡的几条重要信号途径进行综述。

3.1 钙/NF- κ B 信号途径

NF- κ B 是一类在动物细胞中广泛表达的转录因子。在大多数细胞类型中, NF- κ B 在胞浆中与抑制亚单位 I κ B 结合形成无活性的复合物。当 I κ B 发生磷酸化和降解时, NF- κ B 从复合物中释放并活化,转位进入胞核,诱导一系列凋亡抑制基因(如 TRAF1、TRAF2、cIAP-1、c-cIAP-2 和 FLIP_L 等)的转录而拮抗细胞凋亡,促进成骨细胞增殖^[18]。You 等^[19]的研究表明,流体剪切力(2 牛顿/m², 1 Hz)作用于 MC3T3 成骨细胞,1~2 min 后可见胞浆钙浓度迅速升高,应用磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)抑制剂 U73122 抑制 IP₃ 的产生或应用 L-型电压依赖性钙通道阻断剂 nifedipine 可抑制流体剪切力引起钙信号变化。Chen 等^[20]报告,流体剪切力(12 dyn/cm², 1 h)可引起 MC3T3 成骨细胞内 I κ B 降解和 NF- κ B 向细胞核内转位。应用胞内钙螯合剂 BAPTA 或 U73122 抑制胞内钙释放可完全阻断流体引起的 NF- κ B 转位,而应用 L-型电

压依赖性钙通道阻断剂并对 NF- κ B 转位无影响。这些结果提示, 流体剪切力可能通过释放胞内钙而诱发 NF- κ B 转位, 提高抗凋亡蛋白的表达, 从而发挥抗成骨细胞凋亡作用。

3.2 PI3K/Akt 信号途径

PI3K/Akt 通路通过多种途径促进细胞存活, 是抗细胞凋亡作用的重要调节因子。PI3K 被激活后, 在细胞膜上生成第二信使 PIP₃, 后者与细胞内含有 PH 结构域的信号蛋白 Akt 和磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 (phosphoinositide dependent kinase-1, PDK1) 结合, 促使 PDK1 磷酸化 Akt 的 Ser308 导致其活化。Akt 能直接磷酸化多种转录因子, 通过调控这些转录因子, 抑制凋亡基因的表达和增强抗凋亡基因的表达, 从而促进细胞的存活。此外, Akt 也能通过直接磷酸化促凋亡蛋白 Bad 来促进细胞的生存, 还可磷酸化激活 IKK, 促进 NF- κ B 转位到细胞核内并诱导抗凋亡基因的表达^[21]。

对内皮细胞的研究显示, PI3K 抑制剂 wortmannin 或 Ly294002 可抑制流体剪切力诱导的 Akt 磷酸化, 阻断流体剪切力对抗生长因子撤退诱导内皮细胞凋亡的作用, 表明 PI3K/Akt 途径参与介导流体剪切力的抗内皮细胞凋亡作用^[22]。然而有趣的是, Pavalko 等^[16]发现, 尽管流体剪切力可激活成骨细胞内 PI3K 信号通路, 引起 Akt 磷酸化; 而且利用 PI3K 抑制剂 LY294002 也可阻断流体的抗凋亡作用, 但是 LY294002 并不能抑制流体引起的 Akt 磷酸化, 提示流体剪切力也可能通过抑制其他依赖 PI3K 活性的信号途径而发挥抗凋亡作用, 同时还提示在不同类型细胞凋亡中, 流体剪切力的抗凋亡作用机制存在差异。Plotkin 等^[17]研究表明, 对骨细胞施加牵拉应力可在数分钟内激活 PI3K/Akt 信号通路, 但是应用 PI3K 抑制剂不能抑制牵拉应力对糖皮质激素诱导骨细胞凋亡的保护作用, 这也提示不同类型的力学刺激可能通过不同信号通路发挥抗凋亡作用。

3.3 促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号途径

MAPK 成员包括 ERK、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino-terminal kinase, JNK) 和 p38。目前认为, p38 和 JNK 属于“应激诱导”的 MAPK, 而 ERK 被认为是与细胞增殖、转化和分化相关的 MAPK。MAPK 家族成员在细胞凋亡中的作用根据细胞类型和凋亡类型不同而存在很大差异, 在活化 T 细胞中 ERK 信号通路激活可抑制 CD95/Fas 诱导的凋亡^[23], 但在钾

缺乏所诱导的神经元凋亡过程中, ERK 则通过介导细胞膜破坏和 DNA 损伤而加速细胞死亡^[24]。在不同细胞类型和不同凋亡诱导刺激情况下, JNK/p38 信号途径的作用可能是诱导凋亡^[25]或促进细胞生存^[26]。

Plotkin 等^[17]研究表明, 对骨细胞施加牵拉应力可在数分钟内激活 ERK 和 p38, 应用 ERK 活化抑制剂可阻断牵拉应力对糖皮质激素诱导骨细胞凋亡的保护作用, 但抑制 p38 磷酸化则无影响。如预先应用药物破坏骨细胞的细胞骨架蛋白, 则应力引起的 ERK 磷酸化作用被取消, 对糖皮质激素诱导骨细胞凋亡的保护作用也被完全阻断, 提示牵拉应力可通过细胞骨架蛋白成分引起 ERK 磷酸化激活, 从而发挥抗凋亡作用。振荡性流体剪切力作用于 MC3T3 成骨细胞后, 也可很快激活 ERK 和 p38, 并可持续 2 h 左右, 但对 JNK 活性无影响^[19]。不过, 我们在实验中发现, 利用 MAPK 抑制剂 U0126 阻断振荡性流体剪切力引起的 ERK 磷酸化, 并不削弱流体对 TNF- α /CHX 诱导成骨细胞凋亡的保护作用 (数据待发表), 提示不同类型力学刺激的抗凋亡作用机制可能与凋亡的诱导机制有关。

3.4 NO 信号途径

NO 的生理作用主要是作为信号分子广泛参与细胞间与胞内信号传递, 以其特有的生物化学反应性和富含 NO 潜在作用位点的蛋白质与酶反应, 通过改变蛋白与酶的构象调节其活性, 从而广泛参与细胞信号网络系统。NO 对细胞的增殖与存活具有双重效应。Hermann 等^[27]报告, 流体剪切力 (15 dynes/cm²) 对氧化应激或 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡具有保护作用, 利用还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 合成抑制剂或 NO 合成抑制剂可部分抑制流体剪切力的抗凋亡作用。

体外实验表明, 流体剪切力作用于成骨细胞可引起 NO 的释放增加^[28]。应用 NO 合成酶抑制剂 L-NAME 可抑制负荷引起的大鼠新骨形成, 但不影响无负荷骨的新骨形成, 表明 NO 可能在力学信号转化为生物学信号的过程中具有重要意义^[29]。Vezeridis 等^[30]的实验表明, 脉冲性流体剪切力 (0.70 \pm 0.30 Pa, 5 Hz, 1 h) 可抑制 TNF- α 诱导的骨细胞凋亡, 抑制 caspase-3/caspase-7 活性, 但对成骨细胞凋亡无影响。我们的实验结果也表明, 阻断 NO 合成不影响振荡性流体剪切力对 TNF- α 诱导 MC3T3 细胞凋亡的保护作用。

3.5 Wnt 信号途径

Wnt 是一组分泌型糖蛋白家族, 通过调节细胞增

殖、分化、死亡和功能而在胚胎发生、器官发生和肿瘤发生等许多重要的生物学过程中发挥调控作用, 并参与许多组织细胞凋亡的调节。Wnt 蛋白可与细胞表面卷曲(frizzled, FZD) G 蛋白偶联受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和 6 (LRP5/LRP6) 构成的受体复合物相结合, 激活经典信号途径(Wnt/ β -连环蛋白信号途径)和非经典胞内信号途径(Wnt/ Ca^{2+} 和 Wnt/JNK 信号途径)。经典 Wnt 信号途径为 Wnt 蛋白与 LRP-5/LRP-6 结合, 激活蓬乱蛋白(dishevelled, Dsh), Dsh 抑制糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase, GSK-3 β)的活性, 切断 β -连环蛋白的降解途径, 从而使 β -连环蛋白在细胞质中积累, 并进入细胞核, 与 T 细胞因子(T cell factor / lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)相互作用, 调节靶基因的表达^[31]。

近年来, 大量证据显示成骨细胞 Wnt 可通过自身分泌和旁分泌对骨发育和骨量维持起重要作用。临床研究发现, LRP-5 突变患者伴发骨矿物质密度降低和骨折, 而 LRP-5 功能增强和 Wnt 抑制物表达缺失的小鼠则表现为骨矿物质密度升高、成骨细胞凋亡减少。临床前实验中应用 GSK-3 β 抑制剂的结果也表明经典 Wnt 信号途径对骨形成和成骨细胞凋亡发挥重要的调节作用^[32,33]。Wang 等^[34]采用反义核酸技术抑制 Wnt 抑制物 Dickkopf-1 (DKK1)的表达后, 地塞米松对 MC3T3 成骨细胞碱性磷酸酶活性和骨钙素 osteocalcin 表达的抑制作用被取消, 地塞米松引起的细胞凋亡也被抑制。Almeida 等^[35]研究发现, 应用经典 Wnt 蛋白(包括 Wnt3a 和 Wnt1)和非经典 Wnt5a 蛋白均可减轻血清饥饿引起的 MC3T3-E1 细胞凋亡。Wnt1 和 Wnt3a 的抗凋亡作用依赖于 β -连环蛋白介导的转录作用, 而 Src、ERK、PI3K 和 Akt 活性则为 Wnt5a 抗凋亡作用所必需。

Armstrong 等^[36]报告, 对 ROS 17/2.8 成骨细胞和原代培养成骨细胞施加短期应力(四点弯曲, 峰值 3 400 微应力, 1 Hz, 连续 600 次)后, 活性 β -连环蛋白向细胞核内聚集并刺激 TCF/LEF 报告子的活性, 此作用可被雌激素受体抑制剂所阻断, 提示 Wnt/ β -连环蛋白通路参与成骨细胞对力学环境的反应性, 雌激素受体可能介导此作用。Norvell 等^[37]报告单向稳定流体(10 dynes/cm²)作用 45 min 后可引起成骨细胞中 β -连环蛋白向核内转位, 激活 T 细胞因子-报告基因(TCF-reporter gene)。这些结果提示, 力学刺激可能通过调节 Wnt/ β -连环蛋白信号通路而对成骨细胞凋亡发挥保护作用。

综上所述, 力学刺激对抗成骨细胞和骨细胞凋亡的作用可能涉及多种信号通路, 这些信号通路之间存在相互影响。力学刺激抑制骨组织细胞凋亡的机制与凋亡的诱导方法密切相关。在不同骨疾病中, 细胞凋亡的发生机制之间存在差异, 例如在失重时的细胞凋亡可能主要由于营养缺乏和力学刺激减少引起, 而老年骨量丢失的原因则与雌激素缺乏、TNF- α 分泌增多有关。因此, 在体外对模拟生理力学刺激对抗骨组织细胞凋亡的机制进行研究时, 应同时考察几种不同的凋亡模型, 这将不但有助于进一步阐明生理活动和运动锻炼对于骨塑形、骨重建、骨疾病和骨折修复的意义, 而且可为运动医学和器械治疗失重及其他病理性骨量减少打下理论基础、提供指导。

参考文献(References)

- [1] Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, et al. Osteoblast apoptosis and bone turnover, *J Bone Miner Res*, 2001, 16(6): 975-984
- [2] Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr Rev*, 2000, 21(2): 115-137
- [3] Landry P, Sadasivan K, Marino A, et al. Apoptosis is coordinately regulated with osteoblast formation during bone healing, *Tissue Cell*, 1997, 29(4): 413-419
- [4] Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling, *Bone*, 2008, 42(4): 606-615
- [5] Gu G, Kurata K, Chen Z, et al. Osteocytes: a cellular basis for mechanotransduction in bone, *J Biomech Sci Eng*, 2007, 2(4): 151-165
- [6] Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, et al. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue, *J Bone Miner Res*, 2009, 24(4): 597-605
- [7] Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(4): 1163-1168
- [8] McGarry JG, Klein-Nulend J, Mullender MG, et al. A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses — a computational and experimental study, *FASEB J*, 2005, 19(3): 482-484
- [9] Ponik SM, Triplett JW, Pavalko FM. Osteoblasts and osteocytes respond differently to oscillatory and unidirectional fluid flow profiles, *J Cell Biochem*, 2007, 100(3): 794-807
- [10] Kapur S, Baylink DJ, Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways, *Bone*, 2003, 32(3): 241-251
- [11] Weyts FA, Bosmans B, Niesing R, et al. Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation, *Calcif Tissue Int*, 2003, 72(4):505-512
- [12] Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss, *J Bone Miner Res*, 2006, 21(4): 605-615
- [13] Dufour C, Holyx X, Marie PJ. Skeletal unloading induces os-

- teoblast apoptosis and targets $\alpha_1\beta_1$ -PI3K-Bcl-2 signaling in rat bone, *Exp Cell Res*, 2007, 313(2): 394-403
- [14] Mann V, Huber C, Kogianni G, *et al.* The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone, *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006, 6(4): 408-417
- [15] Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, *et al.* Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced osteocyte apoptosis, *J Dent Res*, 2006, 85(10):905-909
- [16] Pavalko FM, Gerard RL, Ponik SM, *et al.* Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced apoptosis in osteoblasts: a role for fluid shear stress-induced activation of PI3-Kinase and inhibition of caspase-3, *J Cell Physiol*, 2002, 194: 194-205
- [17] Plotkin LI, Mathov I, Aguirre J, *et al.* Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289(3): C633-C643
- [18] Duckett CS. Apoptosis and NF- κ B: the FADD connection, *J Clin Invest*, 2002, 109(5): 579-580
- [19] 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 Biol Chem*, 2001, 276(16): 13365-13371
- [20] Chen NX, Geist DJ, Genetos DC, *et al.* Fluid shear-induced NF- κ B translocation in osteoblasts is mediated by intracellular calcium release, *Bone*, 2003, 33(3): 399-410
- [21] Franke TF, Hornik CP, Segev L, *et al.* PI3K/Akt and apoptosis: size matters, *Oncogene*, 2003 22(56): 8983-8998
- [22] Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, *et al.* Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis, *Circ Res*, 1998, 83 (3):334-341
- [23] Holmström TH, Schmitz I, Söderström TS, *et al.* MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly, *EMBO J*, 2000, 19 (20): 5418-5428
- [24] Cheung EC, Slack RS. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis, *Sci STKE*, 2004, 2004(251): PE45
- [25] Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, *et al.* Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells, *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 19245-19256
- [26] Alvarado-Kristensson M, Melander F, Leandersson K, *et al.* p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils, *J Exp Med*, 2004, 199(4): 449-458
- [27] Hermann C, Zeiher AM, Dimmeler S. Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(12): 3588-3592
- [28] Mcallister TN, Frangos JA. Steady and transient fluid shear stress stimulate NO release in osteoblasts through distinct biochemical pathways, *J Bone Miner Res*, 1999, 14(6): 1019-1057
- [29] Turner CH, Takano Y, Owan I, *et al.* Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1996, 270(4 Pt 1): E634-E639
- [30] Vezeridis PS, Semeins CM, Chen Q, *et al.* Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(3): 1082-1088
- [31] Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, *et al.* WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies, *Nat Rev Genet*, 2004, 5(9): 691-701
- [32] Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling, *J Clin Invest*, 2006, 116(5): 1202-1209
- [33] Bodine PVN. Wnt signaling control of bone cell apoptosis, *Cell Res*, 2008(18): 248-253
- [34] Wang FS, Ko JY, Yeh DW, *et al.* Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss, *Endocrinology*, 2008, 149(4): 1793-1801
- [35] Almeida M, Han L, Bellido T, *et al.* Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by β -catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT, *J Biol Chem*, 2005, 280(50): 41342-41351
- [36] Armstrong VJ, Muzylak M, Sunter A, *et al.* Lanyon. Wnt/ β -catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor- α , *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20715-20727
- [37] Norvell S, Alvarez M, Bidwell J, *et al.* Fluid shear stress induces β -catenin signaling in osteoblasts, *Calcif Tissue Int*, 2004, 75 (5): 396-404

- teoblast apoptosis and targets $\alpha_3\beta_1$ -PI3K-Bcl-2 signaling in rat bone, *Exp Cell Res*, 2007, 313(2): 394-403
- [14] Mann V, Huber C, Kogianni G, *et al.* The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone, *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006, 6(4): 408-417
- [15] Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, *et al.* Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced osteocyte apoptosis, *J Dent Res*, 2006, 85(10):905-909
- [16] Pavalko FM, Gerard RL, Ponik SM, *et al.* Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced apoptosis in osteoblasts: a role for fluid shear stress-induced activation of PI3-Kinase and inhibition of caspase-3, *J Cell Physiol*, 2002, 194: 194-205
- [17] Plotkin LI, Mathov I, Aguirre J, *et al.* Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289(3): C633-C643
- [18] Duckett CS. Apoptosis and NF- κ B: the FADD connection, *J Clin Invest*, 2002, 109(5): 579-580
- [19] 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 Biol Chem*, 2001, 276(16): 13365-13371
- [20] Chen NX, Geist DJ, Genetos DC, *et al.* Fluid shear-induced NF- κ B translocation in osteoblasts is mediated by intracellular calcium release, *Bone*, 2003, 33(3): 399-410
- [21] Franke TF, Hornik CP, Segev L, *et al.* PI3K/Akt and apoptosis: size matters, *Oncogene*, 2003 22(56): 8983-8998
- [22] Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, *et al.* Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis, *Circ Res*, 1998, 83(3):334-341
- [23] Holmström TH, Schmitz I, Söderström TS, *et al.* MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly, *EMBO J*, 2000, 19(20): 5418-5428
- [24] Cheung EC, Slack RS. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis, *Sci STKE*, 2004, 2004(251): PE45
- [25] Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, *et al.* Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells, *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 19245-19256
- [26] Alvarado-Kristensson M, Melander F, Leandersson K, *et al.* p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils, *J Exp Med*, 2004, 199(4): 449-458
- [27] Hermann C, Zeiher AM, Dimmeler S. Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(12): 3588-3592
- [28] Mcallister TN, Frangos JA. Steady and transient fluid shear stress stimulate NO release in osteoblasts through distinct biochemical pathways, *J Bone Miner Res*, 1999, 14(6): 1019-1057
- [29] Turner CH, Takano Y, Owan I, *et al.* Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1996, 270(4 Pt 1): E634-E639
- [30] Vezeridis PS, Semeins CM, Chen Q, *et al.* Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(3): 1082-1088
- [31] Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, *et al.* WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies, *Nat Rev Genet*, 2004, 5(9): 691-701
- [32] Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling, *J Clin Invest*, 2006, 116(5): 1202-1209
- [33] Bodine PVN. Wnt signaling control of bone cell apoptosis, *Cell Res*, 2008(18): 248-253
- [34] Wang FS, Ko JY, Yeh DW, *et al.* Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss, *Endocrinology*, 2008, 149(4): 1793-1801
- [35] Almeida M, Han L, Bellido T, *et al.* Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by β -catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT, *J Biol Chem*, 2005, 280(50): 41342-41351
- [36] Armstrong VJ, Muzylak M, Sunter A, *et al.* Lanyon. Wnt/ β -catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor- α , *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20715-20727
- [37] Norvell S, Alvarez M, Bidwell J, *et al.* Fluid shear stress induces β -catenin signaling in osteoblasts, *Calcif Tissue Int*, 2004, 75(5): 396-404

殖、分化、死亡和功能而在胚胎发生、器官发生和肿瘤发生等许多重要的生物学过程中发挥调控作用,并参与许多组织细胞凋亡的调节。Wnt 蛋白可与细胞表面卷曲(frizzled, FZD) G 蛋白偶联受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和 6 (LRP5/LRP6) 构成的受体复合物相结合,激活经典信号途径(Wnt/ β -连环蛋白信号途径)和非经典胞内信号途径(Wnt/ Ca^{2+} 和 Wnt/JNK 信号途径)。经典 Wnt 信号途径为 Wnt 蛋白与 LRP-5/LRP-6 结合,激活蓬乱蛋白(dishevelled, Dsh), Dsh 抑制糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase, GSK-3 β)的活性,切断 β -连环蛋白的降解途径,从而使 β -连环蛋白在细胞质中积累,并进入细胞核,与 T 细胞因子(T cell factor / lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)相互作用,调节靶基因的表达^[31]。

近年来,大量证据显示成骨细胞 Wnt 可通过自身分泌和旁分泌对骨发育和骨量维持起重要作用。临床研究发现,LRP-5 突变患者伴发骨矿物质密度降低和骨折,而 LRP-5 功能增强和 Wnt 抑制物表达缺失的小鼠则表现为骨矿物质密度升高、成骨细胞凋亡减少。临床前实验中应用 GSK-3 β 抑制剂的结果也表明经典 Wnt 信号途径对骨形成和成骨细胞凋亡发挥重要的调节作用^[32,33]。Wang 等^[34]采用反义核酸技术抑制 Wnt 抑制物 Dickkopf-1 (DKK1)的表达后,地塞米松对 MC3T3 成骨细胞碱性磷酸酶活性和骨钙素 osteocalcin 表达的抑制作用被取消,地塞米松引起的细胞凋亡也被抑制。Almeida 等^[35]研究发现,应用经典 Wnt 蛋白(包括 Wnt3a 和 Wnt1)和非经典 Wnt5a 蛋白均可减轻血清饥饿引起的 MC3T3-E1 细胞凋亡。Wnt1 和 Wnt3a 的抗凋亡作用依赖于 β -连环蛋白介导的转录作用,而 Src、ERK、PI3K 和 Akt 活性则为 Wnt5a 抗凋亡作用所必需。

Armstrong 等^[36]报告,对 ROS 17/2.8 成骨细胞和原代培养成骨细胞施加短期应力(四点弯曲,峰值 3 400 微应力,1 Hz,连续 600 次)后,活性 β -连环蛋白向细胞核内聚集并刺激 TCF/LEF 报告子的活性,此作用可被雌激素受体抑制剂所阻断,提示 Wnt/ β -连环蛋白通路参与成骨细胞对力学环境的反应性,雌激素受体可能介导此作用。Norvell 等^[37]报告单向稳定流体(10 dynes/cm²)作用 45 min 后可引起成骨细胞中 β -连环蛋白向核内转位,激活 T 细胞因子-报告基因(TCF-reporter gene)。这些结果提示,力学刺激可能通过调节 Wnt/ β -连环蛋白信号通路而对成骨细胞凋亡发挥保护作用。

综上所述,力学刺激对抗成骨细胞和骨细胞凋亡的作用可能涉及多种信号通路,这些信号通路之间存在相互影响。力学刺激抑制骨组织细胞凋亡的机制与凋亡的诱导方法密切相关。在不同骨疾病中,细胞凋亡的发生机制之间存在差异,例如在失重时的细胞凋亡可能主要由于营养缺乏和力学刺激减少引起,而老年骨量丢失的原因则与雌激素缺乏、TNF- α 分泌增多有关。因此,在体外对模拟生理力学刺激对抗骨组织细胞凋亡的机制进行研究时,应同时考察几种不同的凋亡模型,这将不但有助于进一步阐明生理活动和运动锻炼对于骨塑形、骨重建、骨疾病和骨折修复的意义,而且可为运动医学和器械治疗失重及其他病理性骨量减少打下理论基础、提供指导。

参考文献(References)

- [1] Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, et al. Osteoblast apoptosis and bone turnover, *J Bone Miner Res*, 2001, 16(6): 975-984
- [2] Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr Rev*, 2000, 21(2): 115-137
- [3] Landry P, Sadasivan K, Marino A, et al. Apoptosis is coordinately regulated with osteoblast formation during bone healing, *Tissue Cell*, 1997, 29(4): 413-419
- [4] Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling, *Bone*, 2008, 42(4): 606-615
- [5] Gu G, Kurata K, Chen Z, et al. Osteocytes: a cellular basis for mechanotransduction in bone, *J Biomech Sci Eng*, 2007, 2(4): 151-165
- [6] Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, et al. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue, *J Bone Miner Res*, 2009, 24(4): 597-605
- [7] Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(4): 1163-1168
- [8] McGarry JG, Klein-Nulend J, Mullender MG, et al. A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses — a computational and experimental study, *FASEB J*, 2005, 19(3): 482-484
- [9] Ponik SM, Triplett JW, Pavalko FM. Osteoblasts and osteocytes respond differently to oscillatory and unidirectional fluid flow profiles, *J Cell Biochem*, 2007, 100(3): 794-807
- [10] Kapur S, Baylink DJ, Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways, *Bone*, 2003, 32(3): 241-251
- [11] Weyts FA, Bosmans B, Niesing R, et al. Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation, *Calcif Tissue Int*, 2003, 72(4):505-512
- [12] Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss, *J Bone Miner Res*, 2006, 21(4): 605-615
- [13] Dufoura C, Holyb X, Marie PJ. Skeletal unloading induces os-

Mechanical Stimulation Prevents Bone Cell Apoptosis and Related Signaling Pathways

Hai-Fang Wang, Qi-Bing Mei*

(Key Laboratory For Space Bioscience and Biotechnology, Faculty of Life Sciences,
Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract The apoptosis of bone cells, which plays an important role in the maintenance of bone homeostasis and integrity of bone, is tightly regulated. During weightlessness or in many diseases, decreased bone cell numbers and activity due to increased apoptotic death of osteoblasts and osteocytes can cause loss of bone mass and bone strength, while bone active hormones and many drugs can prevent or delay bone loss by preventing apoptosis of bone cells. *In vivo* and *in vitro* evidence accumulated during the last decade has shown that physiological mechanical stimulation, which is essential for both the bone development and adaptive bone remodeling, also can prevent bone cells from apoptosis. The purpose of this article is to review the role of action of mechanical stimulations, mainly fluid shear stress and stretching, in osteoblast and osteocyte apoptosis and will focus on the molecular mechanism.

Key words osteoblast; osteocyte; anti-apoptosis; fluid shear stress; stretching

Received: April 8, 2009 Accepted: November 17, 2009

*Corresponding author. Tel: 86-29-88460391, E-mail: qbmei@nwpu.edu.cn