

流体剪应力对成骨细胞 OPG 和 ODF 表达的影响*

张兵兵 潘君** 王远亮 鲜成玉 向燕 辛娟 李永刚 王喜云

(重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程研究中心, 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘要 通过平板流动腔装置对大鼠成骨细胞施以流体剪应力, 研究剪应力作用对成骨细胞中骨保护因子(osteoprotegerin, OPG), 破骨细胞分化因子 (osteoclast differentiation factor, ODF) 基因表达的影响. 分别考察了剪应力大小和作用时间, 以及单一水平和梯度变化的剪切力加载方式的影响. 运用 RT-PCR 和蛋白质印迹技术检测 OPG、ODF mRNA 和蛋白质表达的变化, 结果显示, 剪切力作用下 OPG 的表达得到促进, ODF 的表达受到抑制, mRNA 与蛋白质表达的变化一致, 这种影响与剪切力的大小和作用时间有关. 1.0 和 1.5 N/m² 的剪应力作用效果比 0.5 N/m² 明显, 梯度变化的作用方式在作用效果上与最后一个梯度水平相当的恒定剪应力单独作用没有显著差异, 在加载的 24 h 内剪应力对 OPG、ODF 表达的影响始终存在. 这种影响使得 OPG/ODF 的平衡向着 OPG 占优的方向发展, 这种变化意味着骨吸收会受到抑制, 提示力学刺激可能通过 OPG/ODF 调控系统对骨代谢平衡进行调控.

关键词 流体剪应力, 成骨细胞, 骨保护因子, 破骨细胞分化因子

学科分类号 Q66

骨组织的主要功能是作为结构支撑, 为了实现这一点, 在整个生命过程中骨的结构都在不断变化, 以适应相应的力学环境. 力学适应性是一个细胞过程, 由效应细胞感受载荷信息完成骨吸收和骨形成. 在骨组织中实现骨生成和骨吸收的效应细胞分别是成骨细胞和破骨细胞, 这两种细胞间存在耦联机制, 从而保证骨吸收和骨形成的动态平衡. 成骨细胞能够通过表达各种细胞因子影响破骨细胞的形成和活性, 1997 年发现的破骨细胞分化因子 (osteoclast differentiation factor, ODF) 和骨保护因子 (osteoprotegerin, OPG) 被认为是介导各种刺激因子诱导破骨细胞生成及功能活化的核心因子, OPG/ODF/RANK 系统可能处于骨代谢调控的中心地位^[1~4], 为阐明骨代谢调控的分子机制提供了新的方向. 以往的研究证实, 应力刺激能够影响到成骨细胞中雌激素、PGE2、TGF- β 、TNF、IL、BMP、PTH 等因子的表达^[5~8], 这些因子也都能对 OPG/ODF 的表达产生调节(图 1)^[3, 9], 因此假设 OPG/ODF 的表达和二者的比例变化也是应力调节骨代谢的途径之一, 本研究将通过流体剪应力作用于成骨细胞, 研究 OPG/ODF 基因表达的变化.

1 材料和方法

1.1 流动腔装置

应力加载流动系统由蠕动泵、硅胶导管、储液瓶、平板流动腔组成. 如图 2 所示, 流动腔结构参照 Nauman 等^[10]的设计进行改造, 由 2 块透明性良好的有机玻璃 A1, A2 组成, 在 A1 两端是与硅胶导管相连的进液口 E 和出液口 H, 结构 F 和 G 是高度 0.5 mm 的缝隙对灌流液起到缓冲和分散作用, 能有效地降低入口的扰流现象, 然后液体沿矩形窄缝流入加载小室. 加载小室由有机玻璃板 A1、A2, 硅胶垫片 B 组成. 流室的尺寸设计基于 Poiseuille 流动模型^[11], 置入培养细胞载玻片 C 后的流室尺寸为, $l=7.5$ cm, $b=2.5$ cm, $h=0.2$ mm. 该尺寸满足 $l \gg h$, $b \gg h$, $l/h \gg 10$, 能保证流体流过时满足: 层流、二维流动、充分发展的流动.

$$\text{流室底面切应力计算公式为: } \tau_w = \frac{6\mu Q}{h^2 b}$$

*国家自然科学基金资助项目(30300084, 19872080, 30600130).

** 通讯联系人.

Tel: 023-60996074, E-mail: cqingzbb@163.com, panj@cqu.edu.cn

收稿日期: 2006-08-31, 接受日期: 2006-09-30

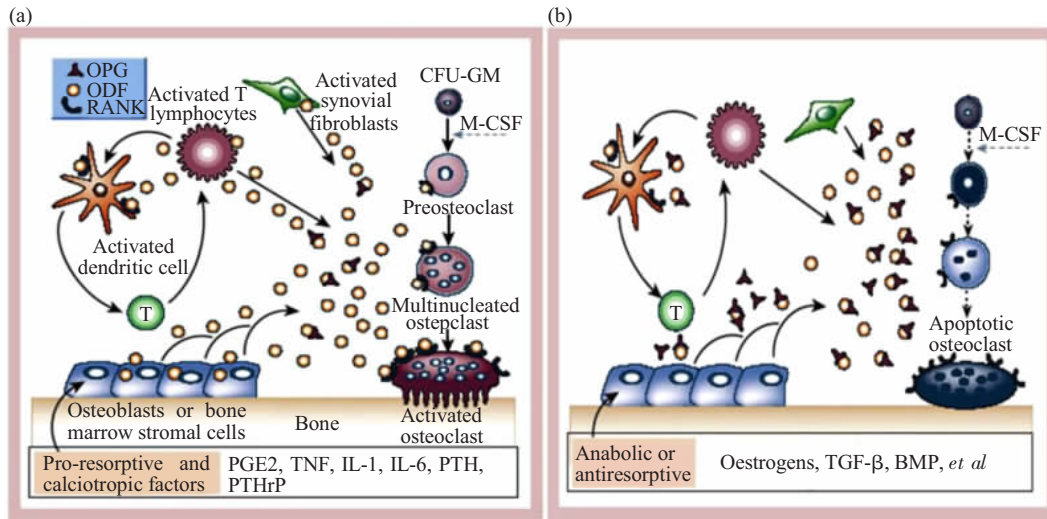


Fig. 1 Schematic of formation and activation regulated by OPG and ODF in osteoclasts^[3]

ODF expression is induced in osteoblasts, activated T cells, synovial fibroblasts and bone marrow stromal cells, and subsequently binds to its specific membrane-bound receptor RANK, thereby triggering a network of TRAF mediated kinase cascades that promote osteoclast differentiation, activation and survival. Conversely, OPG expression is induced by factors that block bone catabolism and promote anabolic effects. OPG binds and neutralizes ODF, leading to a block in osteoclastogenesis and decreased survival of pre-existing osteoclasts (Revised from reference [3]). (a) Certain hormones, cytokines and humoral factors regulated by mechanical stimuli induce the ODF expression in osteoblasts, consequently increase bone resorption, such as PGE2, TNF, IL-1, IL-6, PTH, PTHrP. (b) Certain hormones, cytokines and humoral factors regulated by mechanical stimuli induce the OPG expression in osteoblasts, consequently inhibit bone resorption, such as oestrogens, TGF-β, BMP.

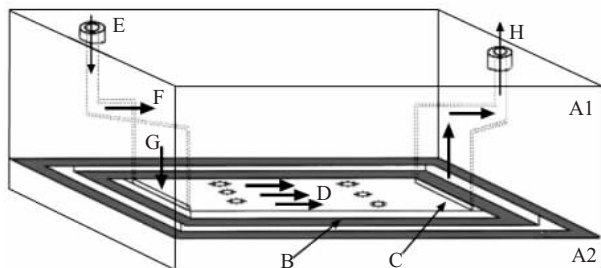


Fig. 2 Schematic of a parallel-plate flow chamber

τ_w 为流室底面剪切力(N/m²), μ 为灌流液粘度(N·s/m²), Q 为流量(cm³/s), h 为流室腔高度(cm), b 为腔宽度(cm).

1.2 细胞培养及其剪应力加载方案

采用消化法^[12]. 取出生 1~2 天的 Wistar 大鼠(第三军医大学动物实验中心) 颅盖骨, 洗净、剪碎, 加入含 0.25%胰酶和 0.1%胶原酶的消化液,

37℃ 恒温振荡消化 120 min, 收集细胞悬液. 加入 DMEM/F12(Sigma 公司, USA) 4 ml、胎牛血清(Hyclone 公司, USA) 1 ml, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 U/ml. 在孵箱中培养, 温度 37℃, CO₂ 含量 5%, 取 2~3 代稳定的传代细胞用于应力加载实验, 应力装置置于孵箱中.

分别采用单一水平和梯度变化的剪应力加载方式研究剪应力大小和作用时间对成骨细胞的作用, 考察剪应力作用下 OPG、ODF mRNA 及其蛋白质表达的变化, 每组实验进行 6 次.

1.3 RT-PCR 分析 mRNA 水平

加载结束, 按照 Trizol Reagent Kit (Gibco USA)的说明方法, 提取受载成骨细胞总 RNA, 并经 DNAase I 去除 DNA 污染. 单链 cDNA 按 RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 (TaKaRa 公司, 大连)所提供

Table 1 Sequence of primer pairs used in RT-PCR mRNA analyses

Target mRNA	PCR primer sequence 5'~3'	Product size/bp
OPG	5'sense: GCACGAGCCTTATCCCATTTGTAG	379
	3'antisense: ATAAGAGGGCGCATAGTCAGTAGA	
ODF	5'sense: CCATCGGGTTCCCATAAAGTCAGT	407
	3'antisense: AAAGCCCCAAAGTACGTCGCATCT	
GAPDH	5'sense: CCACCAACTGCTTAGCACA	415
	3'antisense: GCCAAATTCGTTGTCATACC	

的方法, 以 Oligo dT-Adaptor Primer 作为下游引物合成. 根据 OPG 和 ODF 基因序列 (GenBank RNU94330、AF187319), 设计并合成引物 (上海生物工程生物技术公司) 进行 PCR 扩增, 同时以 GAPDH 作为内参, 作半定量 PCR 分析, 初步判断剪应力大小和作用时间以及梯度加载方式对 OPG 和 ODF 基因表达的影响. 实验所用引物序列见表 1. PCR 循环数控制在平台期以内, 确保分析的准确性, PCR 产物琼脂糖凝胶电泳, SxImage 成像分析系统对电泳条带进行灰度扫描, 并进行丰度分析.

1.4 蛋白质印迹分析蛋白质表达

蛋白质与 mRNA 提取同步, 参照 Trizol Reagent Kit 的方法步骤进行. BCA 蛋白质定量试剂盒 (Pierce 公司, USA) 测定总蛋白含量. 样品经 10% SDS-PAGE, 然后电转移至 NC 膜, 丽春红 S 染色, 根据标准分子质量确定目的蛋白的位置. 三蒸水漂洗 NC 膜数次, 加入封闭液 (TTBS + 5% 脱脂奶粉), 4°C 过夜保存. 加入山羊抗鼠 OPG 或 ODF

抗体稀释液 (1 : 500) (Santa Cruz 公司, USA), 4°C 过夜保存, TBS 漂洗 NC 膜数次, 加入辣根过氧化物酶标记驴抗山羊二抗 (博士德生物公司), 37°C 孵育 2 h, PBS 漂洗, DAB (博士德生物公司) 显色.

2 结 果

2.1 静态组 OPG、ODF mRNA 表达的变化

细胞静态培养 24 h, 融合生长达 80%, 开始分时段提取总 RNA 并作 RT-PCR, 电泳结果如图 3a 所示, 不同时段 OPG、ODF mRNA 表达相对含量及 OPG/ODF mRNA 表达相对含量比值见图 3b. 从图 3 中可以看出, 在静态培养下, OPG mRNA 的表达量随时间延长逐步降低, 24 h 内降低了 30.5%. 但是, ODF mRNA 的表达量却随时间的延长逐步升高, 24 h 内升高了 1.44 倍. 在这种变化下, OPG/ODF mRNA 比值迅速下降, 24 h 内降低了 71.3%.

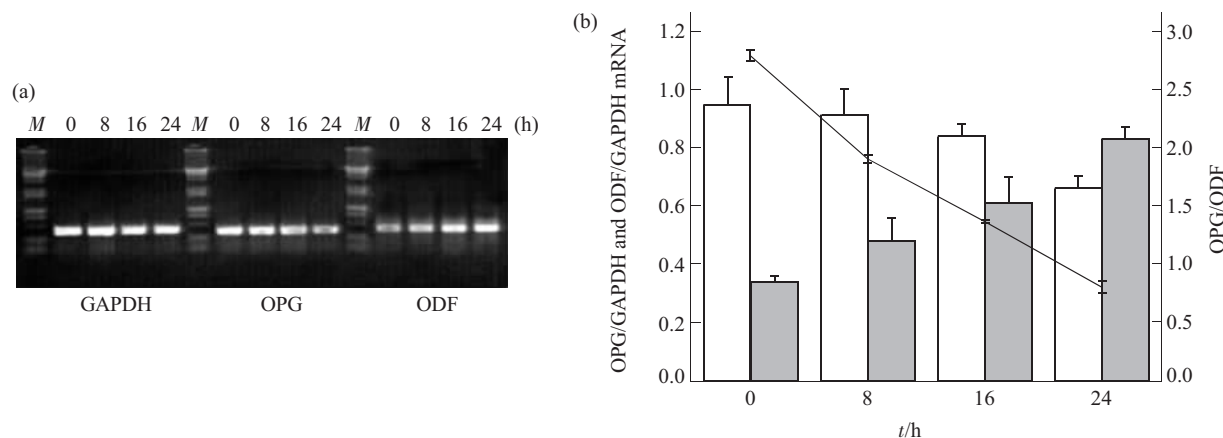


Fig. 3 RT-PCR results of OPG and ODF mRNA in static cultured osteoblasts

(a) PCR gel scan image. (b) The variation picture for OPG and ODF mRNA expression level and their ratios in 24 h in static cultured osteoblasts.

□: OPG/GAPDH mRNA; ■: ODF/GAPDH mRNA; —: OPG/ODF.

2.2 剪应力大小和梯度剪应力作用对 OPG/ODF mRNA 表达的影响

结果如图 4 所示, 0.5、1.0、1.5 N/m² 剪应力分别作用 24 h, 1.0 N/m² 与 1.5 N/m² 剪应力作用与静止培养相比, OPG mRNA 表达降低和 ODF mRNA 表达升高的趋势受到显著抑制, 但 1.0 N/m² 与 1.5 N/m² 的作用效果没有显著差异 ($P > 0.05$). 0.5 N/m² 剪应力作用, 对 OPG mRNA 降低的抑制作用不明显, 同时对 ODF 升高的抑制作用不如 1.0、1.5 N/m² 作用力效果显著. 实验同时作了剪应力梯度增加和梯度减少的影响, 结果显示, 0.5、

1.0、1.5 N/m² 每个水平的剪应力作用 8 h, 然后梯度增加至下一水平的剪应力, 对 OPG、ODF mRNA 表达的影响与 1.0、1.5 N/m² 剪应力单独作用 24 h 没有显著差异 ($P > 0.05$), 而在 1.5、1.0、0.5 N/m² 梯度减少的剪应力作用下, 与 0.5 N/m² 单独作用相比, 对 OPG mRNA 表达降低的抑制作用降低, ODF mRNA 升高的抑制没有显著差异. 各种加载方式下, OPG/ODF mRNA 的比值在 1.0 N/m² 单独作用最高, 而 1.5、1.0、0.5 N/m² 梯度降低的作用最低, 前者是后者的 8.5 倍.

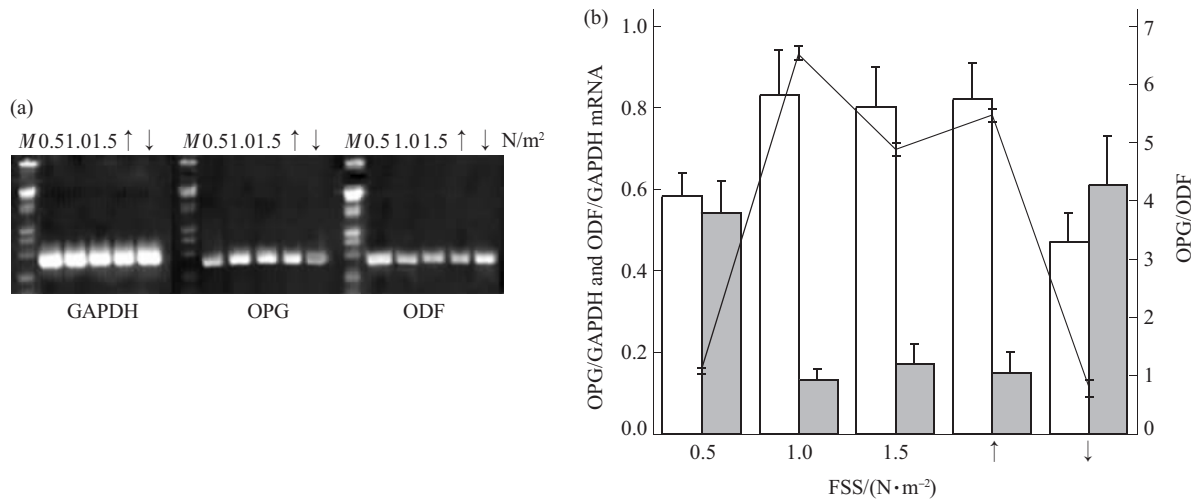


Fig. 4 RT-PCR results of OPG and ODF mRNA in osteoblasts of single level shear stress loading of 0.5, 1.0 and 1.5 N/m² and step wise shear stress loading for 24 h

(a) PCR gel scan image. (b) The variation picture for OPG and ODF expression level and their ratios in single section and step loading. ↑: Step-wise increased shear stress from 0.5 to 1.0 and then to 1.5 N/m², and each shear stress for 8 h, ↓: Step-wise decreased shear stress from 1.5 to 1.0 and then to 0.5 N/m², and each shear stress for 8 h. □: OPG/GAPDH mRNA; ■: ODF/GAPDH mRNA; —: OPG/ODF.

2.3 剪切作用时间对 OPG/ODF mRNA 表达的影响

对静止培养 24 h, 达融合生长的单层成骨细胞施加 1.0 N/m² 的剪应力作用, 上述实验结果证实, 该剪应力水平对成骨细胞刺激最明显, 分时段提取总 RNA 并作 RT-PCR, 电泳结果如图 5a, 不同时段 OPG、ODF mRNA 表达相对含量及 OPG/ODF

mRNA 表达相对含量比值见图 5b 所示. 1.0 N/m² 剪应力的作用下 OPG mRNA 的表达量仍然随时间逐步降低, 但与静止培养相比, 降低的速度明显下降, 24 h 降低了 15.8%. 同时 ODF mRNA 的表达量由静止培养状态下的升高, 变为剪应力作用下的降低, 24 h 内降低了 52.9%. OPG/ODF mRNA 的比值 24 h 内提高到 2 倍.

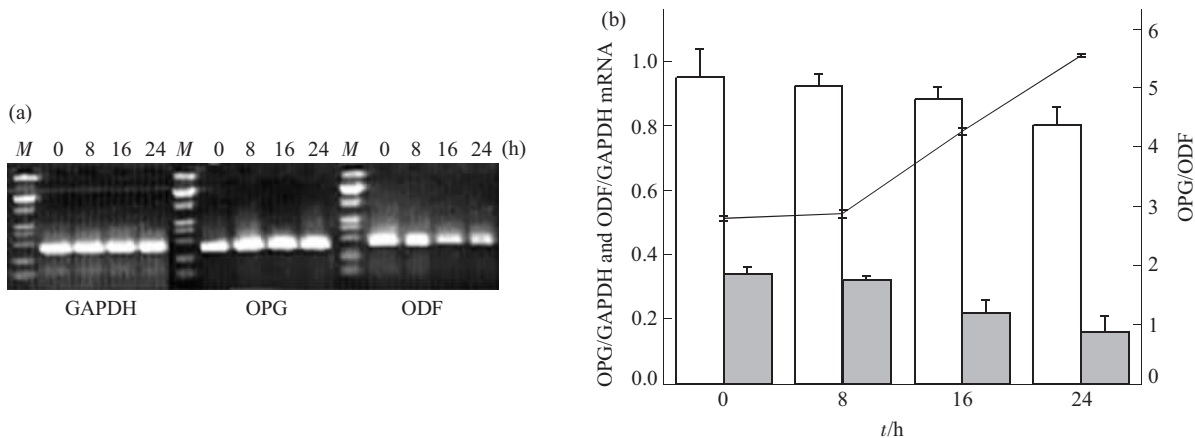


Fig. 5 RT-PCR results of OPG and ODF mRNA in osteoblasts loading with a shear stress of 1.0 N/m² for 24 h

(a) PCR gel scan image. (b) The variation picture for OPG and ODF mRNA expression level and their ration in different time in 1.0 N/m² shear stress cultured osteoblast. □: OPG/GAPDH mRNA; ■: ODF/GAPDH mRNA; —: OPG/ODF.

2.4 1.0 N/m² 的剪应力作用下 OPG/ODF 蛋白表达水平的变化

本实验检测了剪切力作用下 OPG/ODF 蛋白的

表达水平, 通过分析上述 mRNA 的表达变化, 选择了对成骨细胞刺激明显的 1.0 N/m² 作用组和静态组用于检测蛋白质的表达变化. 蛋白质印迹结果如

图 6a 所示, OPG 的蛋白质浓度与 mRNA 的变化趋势基本一致, 图像分析结果如图 6b, 可见在静态培养状态下的成骨细胞, 随着培养时间的延长, 其 OPG/ODF 蛋白比例逐渐降低, 而在 1.0 N/m² 剪应

力的作用下二者的比例在开始的 8 h 内上升了 1.5 倍, 随后有所降低, 整体趋势是 8 h 后剪应力作用下 OPG/ODF 蛋白比例变化不大, 但明显高于静态组.

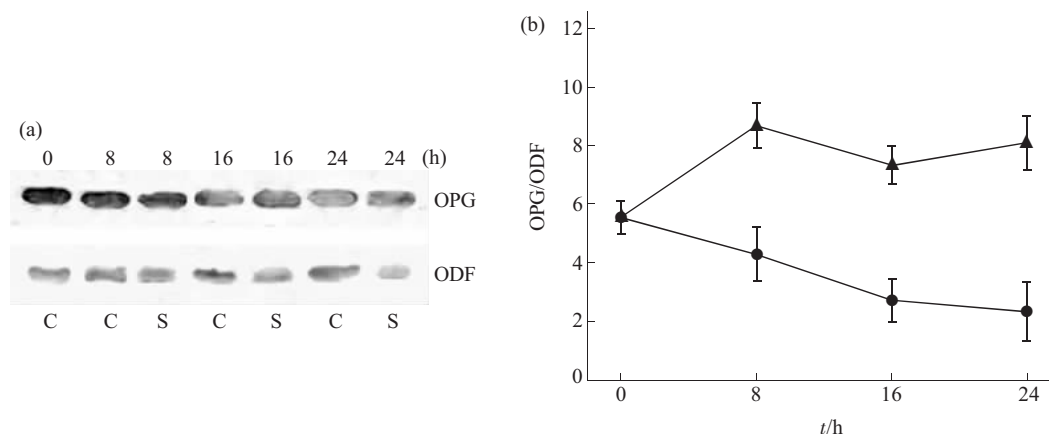


Fig. 6 Western blot results of OPG and ODF protein in static and 1.0 N/m² shear stress cultured osteoblast

(a) A typical result of Western blotting. (b) The ratios of OPG and ODF protein in static and 1.0 N/m² shear stress cultured osteoblasts in 24 h. C: Static control, S: 1.0 N/m² shear stress. ●—●: OPG/ODF (0 N/m²), ▲—▲: OPG/ODF (1.0 N/m²).

3 讨 论

OPG和 ODF 是近年骨代谢研究领域最重要的发现之一, 二者对破骨细胞的分化和活化具有重要的调控作用. 破骨细胞在骨吸收部位的成熟和功能受微环境中细胞因子的调节, 这些局部因子主要来源于成骨细胞、基质细胞和骨髓中的免疫细胞, 绝大多数调节破骨细胞分化和功能的系统激素和局部因子都是起着间接调节作用, 它们通过与成骨/基质细胞上的相应受体结合, 激活下游信号影响 ODF 和 OPG 的表达, 进而调节破骨细胞的分化和活化^[3], 因此认为 OPG、ODF 是骨代谢调控的核心因子. 在以往剪应力作用于成骨细胞的研究中已经发现, 剪应力会影响成骨细胞 PTH、PTHrP、PGE₂、IL-1、IL-6、TNF、BMP、TGF 等因子的表达^[4~8,13], 从而调节骨组织的代谢, 而 OPG/ODF/RANK 系统也会受到这些因素的调节(图 1)^[3], 可以认为是这些因素的下游信号环节, 因此假设剪应力也可能通过直接或者间接影响 OPG/ODF 的表达, 进而对骨代谢进行调节.

静态培养下的成骨细胞, OPG mRNA 的表达随着培养时间的延长逐步降低, 相反, ODF mRNA 在静态培养下逐步升高, 蛋白质表达变化与此一致, 这种变化可能使得 OPG/ODF 的平衡向

着 ODF 比例增大的方向偏移, 因此对破骨细胞的形成和活化有利, 意味着静态培养的成骨细胞, 随着体外培养时间增加, 其促进破骨细胞形成的能力也在逐步提高. 体内骨质代谢过程中, 骨吸收早于骨形成^[14], 因此认为, 在一轮骨质吸收和形成的周转中, 成骨细胞通过表达 ODF 招募新的破骨细胞. 若以静态培养的细胞与卧床的病人作类比, 也可认为在少载状态下的骨吸收增强的部分原因, 可能是 ODF 的过表达而 OPG 的表达受到抑制.

剪应力的作用改变了静态培养下成骨细胞表达 OPG/ODF 的变化趋势, 总的效应是, 剪应力作用促进了 OPG mRNA 表达, 抑制了 ODF mRNA 的表达, 对 1.0 N/m² 作用下的蛋白质检测发现, 剪应力同样会促进 OPG 的表达而抑制 ODF 的表达, 并且变化始终与剪应力的作用时间相关, 说明在本实验所设计的时间范围内, 即 0~24 h 内成骨细胞 OPG、ODF 的表达始终受到剪应力的调节.

通过 0.5、1.0、1.5 N/m² 3 个水平的剪应力作用, 比较了不同大小的剪应力对 OPG mRNA 和 ODF mRNA 表达的影响. 结果显示, 1.0、1.5 N/m² 的刺激作用比 0.5 N/m² 作用明显, 提示成骨细胞对剪应力刺激的反应, 可能存在一个最强作用范围, 从本实验来看, 1.0、1.5 N/m² 的剪应力应处在该范围内, 而 0.5 N/m² 的剪应力处于该范围之外. Rubin

等^[9]实验证实应力刺激会抑制破骨细胞的分化成熟. 运用 Flexcell Bioflex 对骨髓基质细胞施加 1.8% 的拉伸应变, 研究发现应力作用抑制了 ODF 的表达, 并以此限制了骨髓细胞向破骨细胞的分化^[10]. 本实验中剪应力抑制了 ODF 的表达, 与 Rubin 的实验结果有相似性, 进一步证实了应力通过 ODF 途径抑制骨质吸收的可能性. 本实验同时检验了剪应力对 OPG 表达的影响, 结果显示, OPG 的力学敏感性不如 ODF, 但在对成骨细胞刺激较强的 1.0、1.5 N/m² 的剪应力, 与静态相比 OPG 的表达降低受到抑制, 也可以认为剪应力促进了 OPG 的表达, 因此认为应力促进 OPG 的表达量也是抑制骨吸收的途径之一, 事实上, OPG/ODF 的比例才是调控骨吸收的关键^[11]. 至于剪应力以何种方式和途径调控两种因子的表达, 有待进一步研究.

骨组织具有力学适应性, 而生理状态下骨组织承受的是不断变化的应力负载, 我们设计了梯度增加和梯度减少的剪应力加载方式, 将其与恒定剪应力的作用效果进行了比较分析. 结果显示, 梯度增加的剪应力作用效果与 1.0 N/m² 的作用效果相似, 数据间也没有显著差异, 表现出梯度增加的剪应力在作用效果上与其平均值的剪应力作用类似. 但是, 梯度减小的剪应力作用, 虽然与梯度增加的剪应力在平均值上相等, 但在作用效果上却截然不同, 其作用效果与 0.5 N/m² 剪应力相似, 因此认为, 无论是梯度增加还是梯度减少都由后期作用力对前期作用力的掩盖效应, 这也可能与实验设计的梯度大小和时间间隔有关.

1.0 N/m² 剪应力对成骨细胞具有明显的刺激作用, 在其作用下 OPG mRNA 表达降低的速度相对于静止培养减少了一半, 而 ODF mRNA 的表达发生逆转, 由此变化速度显示, ODF 比 OPG 对剪应力刺激更为敏感. 并且 OPG mRNA/ODF mRNA 的比值与静态细胞相比, 24 h 升高 7 倍, 蛋白质则升高了 3 倍, 从 OPG 和 ODF 对破骨细胞形成的作用来看, 这种变化势必抑制破骨细胞的形成. 当然, 对于骨形成和骨吸收平衡状态下 OPG/ODF 比值的平衡点在哪里, 目前还缺乏认识, 上述结论还需实验的进一步验证.

力学刺激能够在基因水平调控细胞的生理活性, 本实验证明了流体剪应力能够调控 OPG/ODF 的表达, 虽然更精确的实验以及力信号传导通路等工作有待进一步深入, 但有可能力学刺激正是通过调节 OPG/ODF 的平衡来调节骨代谢的平衡.

参 考 文 献

- 1 Simonet W S, Lacey D L, Dunstan C R, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, **89** (2): 309~319
- 2 Lacey D L, Timms E, Tan H L, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, **93** (2): 165~176
- 3 Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003, **423** (6937): 337~342
- 4 何志勇, 李明峰, 张惟杰, 等. 破骨细胞形成抑制因子研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (5): 469~472
He Z Y, Li M F, Zhang W J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (5): 469~472
- 5 Mullender M, El Haj A J, Yang Y, *et al.* Mechanotransduction of bone cells *in vitro*: mechanobiology of bone tissue. *Med Biol Eng Comput*, 2004, **42** (1): 14~21
- 6 Genetos D C, Geist D J, Liu D, *et al.* Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 2005, **20** (1): 41~49
- 7 Nomura S, Takano-Yamamoto T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol*, 2000, **19** (2): 91~96
- 8 Sakai K, Mohtai M, Iwamoto Y. Fluid shear stress increases transforming growth factor beta 1 expression in human osteoblast-like cells: modulation by cation channel blockades. *Calcif Tissue Int*, 1998, **63** (6): 515~520
- 9 Okada F, Tsuda E. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF) /Osteoprotegerin (OPG). *Clin Calcium*, 2002, **12** (8): 1157~1164
- 10 Nauman E A, Satcher R L, Keaveny T M, *et al.* Osteoblasts respond to pulsatile fluid flow with short-term increases in PGE(2) but no change in mineralization. *J Appl Physiol*, 2001, **90** (5): 1849~1854
- 11 庄礼贤, 夷协远, 马晖扬. 流体力学. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1991. 135~137
Zhuang L X, Yin X Y, Ma H Y. *Fluid Mechanics*. Hefei: Press of University of Science and Technology of China, 1991. 135~137
- 12 唐丽灵, 王远亮, 潘君, 等. 成梯度增加的拉伸刺激对成骨细胞胶原合成的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (5): 750~753
Tang L L, Wang Y L, Pan J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (5): 750~753
- 13 Mosley J R, Lanyon L E. Strain rate as a controlling influence on adaptive modeling in response to dynamic loading of the ulna in growing male rats. *Bone*, 1998, **23** (4): 313~318
- 14 Teitelbaum S L, Tondravi M M, Ross F P. Osteoclast biology. In: Marcus R, eds. *Osteoporosis*. San Diego, CA: Academic Press, 1996. 61~71
- 15 Rubin J, Fan X, Biskobing D M, *et al.* Osteoclastogenesis is repressed by mechanical strain in an *in vitro* model. *J Orthop Res*, 1999, **17** (5): 639~645
- 16 Rubin J, Murphy T, Nanes M S, *et al.* Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, **78** (6): C1126~1132
- 17 Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, *et al.* Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/ RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 2000, **191** (2): 275~286

Effect of Fluid Shear Stress on Expressions of OPG and ODF in Osteoblasts*

ZHANG Bing-Bing, PAN Jun**, WANG Yuan-Liang, XIAN Cheng-Yu,
XIANG Yan, XIN Juan LI Yong-Gang WANG Xi-Yun

(Bioengineering College, Research Center of Bioinspired Materials Science and Engineering,

Key Laboratory for Biomechanics & Tissue Engineering Under The State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract Gene expression and protein synthesization of osteoprotegerin (OPG) and osteoclast differentiation factor (ODF) were studied in shear stress cultured osteoblasts applying parallel-plate flow chamber system. Shear stress of 0.5, 1.0, 1.5 N/m² in 24 h, and step-wise increased shear stress from 0.5 to 1.0 and then to 1.5 N/m² and each stress for 8 h, and stepwise decreased shear stress from 1.5 to 1.0 and then to 0.5 N/m² and each stress for 8 h were applied. The expression of OPG and ODF mRNA was detected by RT-PCR, and synthesization of their protein was detected by Western blot. The results showed that the shear stress of 1.0 and 1.5 N/m² induced more significant changes in OPG mRNA and ODF mRNA than 0.5 N/m² and there was no significant difference between 1.0 and 1.5 N/m². No marked differences were observed between the effects of step-wise increased shear stress and 1.5 N/m² after 24 h, and the same was between the effects of step-wise decreased shear stress and 0.5 N/m² after 24 h. The shear stress of 1.0 N/m² increased OPG expression and inhibited ODF expression in 24 h both in mRNA and protein level. In all, the ratio of OPG and ODF was increased by shear stress, which reminds that bone resorption was inhibited by the fluid flow, and shear stimuli regulated the new balance of bone resorption and bone formation throught OPG/ODF route.

Key words flow shear stress, osteoblasts, osteoprotegerin(OPG), osteoclast differentiation factor(ODF)

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30300084, 19872080, 30600130).

**Corresponding author . Tel: 86-23-60996074, E-mail: cqingzbb@163.com

Received: August 31, 2006 Accepted: September 30, 2006