

机械力对间充质干细胞向成骨细胞分化的力学响应机制研究*

赵红斌¹⁾ 吕同德¹⁾ 马敬¹⁾ 马慧¹⁾ 张西正^{2)**}

¹⁾兰州军区兰州总医院, 兰州 730050;

²⁾军事医学科学院卫生装备研究所, 天津 300161)

摘要 间充质干细胞的分化受多种因素的影响, 其中力学是重要因素之一. 为了探讨力学信号在间充质干细胞分化中的传导机制, 利用力学加载装置在成骨细胞诱导体系条件下, 对小鼠骨髓间充质干细胞系(D1细胞)加载不同拉伸应变, 运用RT-PCR方法、Flou-3-AM Ca²⁺染色技术、激光共聚焦显微镜技术及5种信号阻断剂, SB203580(p38MAPK特异抑制剂)、PD98059(MEK-1/2MAPK特异抑制剂)、LY294002(PI₃Ks特异抑制剂)、细胞松弛素B(微丝结构阻断剂)、EGTA(Ca²⁺螯合剂), 探讨力学信号的基本传导途径. 结果显示: 3%的拉伸应变能明显提高细胞内Ca²⁺水平; 细胞微丝结构破坏后, 延迟了3%拉伸应变对细胞内Ca²⁺水平增加的影响; 细胞外Ca²⁺螯合后, 拉伸应变不能促进细胞内Ca²⁺水平的升高, 该结果提示, 拉伸应变对细胞内Ca²⁺水平的影响主要通过细胞外Ca²⁺的内流实现. 5种信号阻断剂能完全阻断干细胞向成骨细胞分化过程中关键基因骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)和OSX mRNA的表达. p38MAPK途径、MEK-1/2MAPK途径被阻断后, 拉伸应变激活了OCN和Osterix(OSX, 与成骨细胞分化相关的关键基因)mRNA的表达; PI₃Ks途径阻断后, 拉伸应变部分激活了OCN和OSX mRNA的表达; 细胞微丝破坏及胞外Ca²⁺螯合后, 拉伸应变不能促进OCN和OSX mRNA的表达. 上述结果表明: 力学信号通过Ca²⁺信号、细胞微丝结构以及PI₃Ks信号途径引起细胞的应答反应和生物学效应.

关键词 应变, 间充质干细胞, 成骨细胞, Ca²⁺, 力学信号

学科分类号 R318.01

钙离子在细胞的生长、分化及信号传导等生物学功能方面起重要作用. 机械力能促进成骨细胞内Ca²⁺水平的提高, Ca²⁺做为第二信使将力学信号传导至细胞内, 引起一系列信号级联反应^[1]. 钙火花(Ca²⁺ spark)是Ca²⁺信号传递的一种表现形式. 目前, 在心肌细胞、骨骼肌细胞和神经细胞中关于细胞内钙火花事件有大量的研究报道^[2,3], 干细胞的定向分化研究中尚未见相关报道. 干细胞对力学信号的感知并将该信号转化为生物学信号, 引起一系列生物学反应的过程是极其复杂的事件, 认识力学信号的转导机制是阐明力学偶联(mechanocoupling)机理的重要环节. 目前, 虽然有关力学信号传导机制研究的报道较多, 但是由于使用的细胞不同, 加载力的方式不同, 其结果有明显的差异^[4,5].

本研究通过不同拉伸应变作用细胞后, 分析不同拉伸应变对细胞内钙离子水平的影响, 观察干细胞向成骨细胞分化过程中, 拉伸应变能否激发干细

胞产生钙火花事件. 同时, 利用不同信号阻断剂, 探讨与成骨细胞分化有关的关键基因(Osterix, OSX)和成骨细胞的标志物基因(OCN)的表达, 旨在进一步探讨力学信号在干细胞分化中的作用.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

小鼠骨髓间充质干细胞系(D1细胞)购自美国细胞系库(American Type Culture Collection, ATCC公司). 自行研制的基底膜拉伸试验仪. 低糖DMEM(GiBCO公司); 细胞松弛素B(cytochalasin B, CB, Sigma产品); 乙二醇-双-(2-氨基乙基)四乙

*国家自然科学基金资助项目(30470438)和军事医学科学院创新基金项目(CX-04028).

**通讯联系人. Tel: 022-84656717, E-mail: Z56787@sohoo.com

收稿日期: 2006-11-14, 接受日期: 2006-12-15

酸 (ethylene glycol-bis- (β -aminoethylrther)-N, N, N, N, -tetraacetic acid, EGTA), 信号阻断剂 SB203580、PD98059、LY294002、Fluo-3-AM (Sigma 公司); 激光共聚焦显微镜(型号 BIO-IAD Radiance 2100TM), RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司). Trizol RNA 提取试剂(Invitrogen 公司).

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养. D1 细胞培养于含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 置 37°C 5% CO₂ 孵箱中培养. 每周更换 2 次培养液, 用 0.25%的胰酶消化传代培养. 用面积为 4.56 cm² 的金属环放在硅橡胶膜上(用来限制细胞的生长范围), 其中间硅橡胶膜表面预先用鼠尾胶原包被, 将 1×10⁵ 个细胞接种到厚度为 0.5 mm 的硅橡胶膜上, 放入特制的拉伸培养盒中继续培养.

1.2.2 应变加载实验.

实验分为 4 组. I 组: 3%应变分别拉伸 1 min, 2 min, 3 min, 5 min 和 10 min, 静态培养为对照; II 组: 加细胞松弛素 B (10 mg/L)作用 20 min 后用 3%应变分别拉伸 2 min, 5 min; III 组: 分别用 1%, 3%和 10%的不同应变拉伸 2 min; IV 组: 加入 EGTA(5 mmol/L) 作用 20 min 后用 3%应变拉伸 2 min + CaCl₂ (12.5 mmol/L). 运用激光共聚焦显微镜技术检测细胞内 Ca²⁺ 的水平.

80%细胞达到融合时, 更换为诱导培养液. 实验分为 4 组, I 组为诱导组、II 组为拉伸组、III 组为阻断组、IV 组为阻断 + 拉伸组, 其中 III 组和 IV 组各加入 15 μ mol/L SB203580、10 μ mol/L PD98059、1 μ mol/L LY294002、0.25 g/L CB、5 mmol/L EGTA, 继续培养 1 h 后, 进行应变加载实验, 拉伸频率为 0.5 Hz, 拉伸时间 1 h. 实验完毕后提取总 RNA, 分装后 -80°C 保存备用.

1.2.3 细胞内钙离子的检测. 不同条件作用细胞后, 用 PBS 缓冲液洗 2 遍, 将 15 μ l 的 Fluo-3-Am 储存

液用 HEPES 缓冲液稀释至 1 ml, 37°C 负载细胞 30~40 min, HEPES 缓冲液冲洗 2 遍, 加少许 HEPES 缓冲液后上激光共聚焦显微镜观察、扫描、记录. 随机挑选 10 个细胞进行细胞荧光强度统计分析, 计算出细胞内 Ca²⁺ 的相对含量.

1.2.4 RT-PCR 分析 OCN 和 OSX mRNA 的表达.

利用 Trizol 试剂使用说明提取 D1 细胞内总 RNA, 按照逆转录试剂盒操作说明进行逆转录, 反应条件为室温 10 min, 55°C 30 min, 95°C 5 min, 5°C 5 min. 继之以获得的 cDNA 为模板进行 PCR. OCN PCR 引物: 上游引物 5' TCTCTCTAGCCT-CACAGATCCC 3'; 下游引物 5' TACCTTATT-GCCCTCCTGCTTG 3'; (OSX)PCR 引物: 上游引物 5' TATGCTCCGACCTCCTCAAC 3'; 下游引物 5' AATAGGATTGGGAAGCAGAAAG 3'. PCR 反应条件为 94°C 2 min, 94°C 45 s, 56°C (OSX) 或 60°C (OCN) 退火, 72°C 45 s, OSX 30 个循环, OCN 35 个循环, 72°C 5 min. PCR 产物经 3%的琼脂糖凝胶电泳后, 利用凝胶图像分析仪进行分析并拍照.

1.2.5 统计学分析. 利用 SPSS 10.0 统计分析软件进行数据统计分析.

2 结 果

2.1 拉伸应变作用不同时间后细胞 Ca²⁺水平的变化

3%拉伸应变作用细胞 1 min 时 Ca²⁺ 平均荧光强度为 81.10, 2 min 时为 143.68, 3 min 时为 53.59, 5 min 时为 61.97, 10 min 时为 45.79. 1 min 时 Ca²⁺ 荧光强度增加, 2 min 时最强, 拉伸 3 min、5 min、10 min 时 Ca²⁺ 荧光强度较弱(图 1), 它们同 1 min 和 2 min 组相比具有显著性差异($P < 0.01$). 该结果提示细胞受到拉伸应变 2 min 时能促进细胞内 Ca²⁺ 短暂释放.

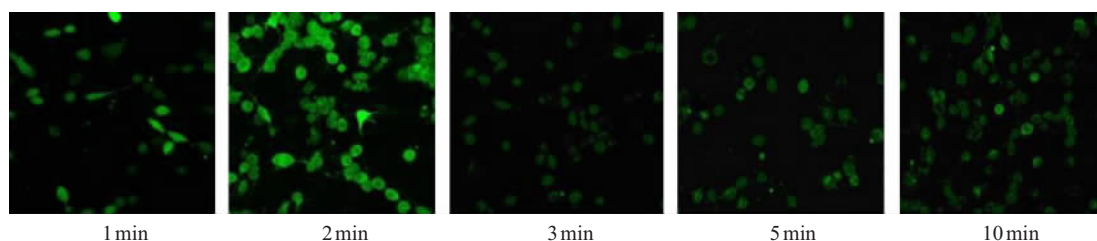


Fig. 1 The $[Ca^{2+}]_i$ -dependent fluorescence of D1 cells induced by 3% strain in different times ($\times 40$)

2.2 不同拉伸应变对细胞 Ca^{2+} 水平的影响

1%应变作用细胞 2 min 后, Ca^{2+} 平均荧光强度为 81.10, 3%为 141.68, 10%为 43.48(图 2), 1%组同其他 2 组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$). 以上结果提示: 3%的拉伸应变可能是激发细胞内 Ca^{2+} 内流的有效力学条件.

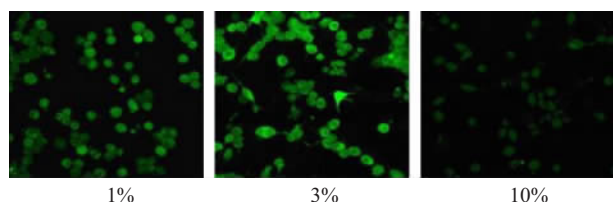


Fig. 2 The $[Ca^{2+}]_i$ - dependent fluorescence of D1 cells induced by different strain for 2 min ($\times 40$)

2.3 微丝结构破坏后拉伸应变对细胞 Ca^{2+} 水平的影响

细胞拉伸前加入 10 mg/L CB 作用 20 min 后, 3%应变作用细胞 2 min 和 5 min, 静态组 Ca^{2+} 平均荧光强度值为 47.41, 2 min 组为 38.17, 5 min 组为 91.11(图 3). 该结果显示细胞微丝结构破坏后延

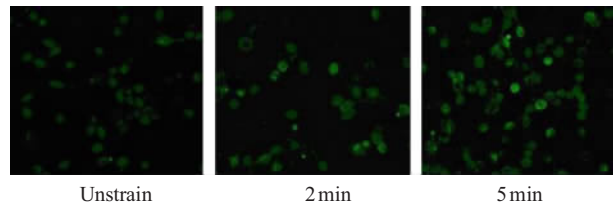


Fig. 3 The $[Ca^{2+}]_i$ - dependent fluorescence of D1 cells induced by 3% strain treatment with CB ($\times 40$)

迟了拉伸应变对细胞内 Ca^{2+} 的水平的影响.

2.4 EGTA 作用细胞后应变对细胞内 Ca^{2+} 水平的影响

细胞拉伸前加入 5 mmol/L EGTA 作用 20 min 后, 3%应变作用细胞 2 min 时 Ca^{2+} 平均荧光强度值为 38.14, 对照组为 47.41, 当加入 12.5 mmol/L $CaCl_2$ 后 Ca^{2+} 平均荧光强度为 250(图 4), 同其他两组相比具有极显著性差异 ($P < 0.01$). 该结果表明: 应变拉伸对细胞 Ca^{2+} 水平变化的影响主要是通过细胞外 Ca^{2+} 的内流.

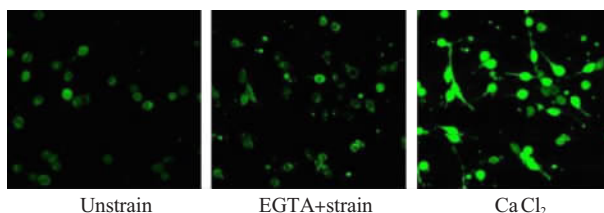


Fig. 4 The $[Ca^{2+}]_i$ - dependent fluorescence of D1 cells induced by 3% strain treatment with EGTA and $CaCl_2$ ($\times 40$)

2.5 拉伸应变对 MSCs 向成骨细胞分化过程中 Ca^{2+} 火花的激发

3%拉伸应变加载细胞 1~2 min 时细胞内有钙火花的产生(图 5), 当加入 CB 后拉伸 2 min 时没有钙火花现象的发生, 5 min 时有钙火花现象(图 6). 以上结果显示, 拉伸应变作用一定时间能激发干细胞产生钙火花, 微丝结构破坏后延迟了细胞钙火花的激发.

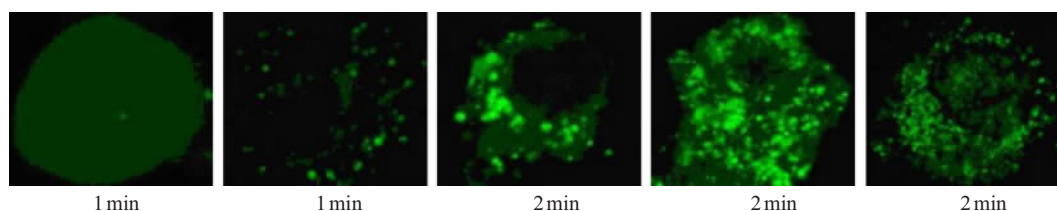


Fig. 5 Ca^{2+} spark induced by 3% strain in D1 cells for 1~2 min ($\times 500$)

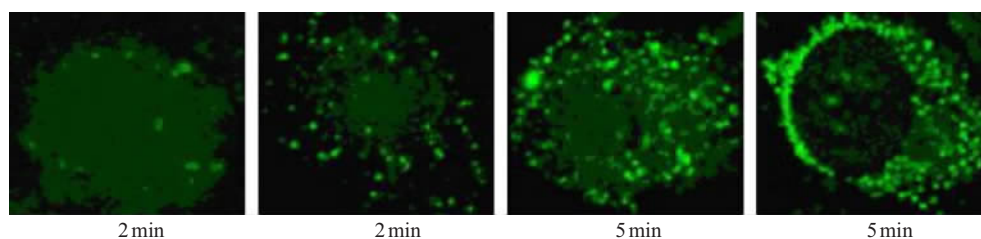


Fig. 6 Ca^{2+} spark induced by 3% strain in D1 cells for 2~5 min treatment with CB ($\times 500$)

2.6 力学信号转导途径

加入相应的信号阻断剂后, OCN mRNA 的表达被完全抑制. 加入相应的信号阻断剂后, 给细胞施加应变 1 h, OCN mRNA 的表达发生了变化, 其中阻断 MAPK 途径 (PD98059)、MAPKp38 (BS203580) 途径后 OCN mRNA 的表达丰度显著增加, 阻断 PI₃K 途径 (LY294002) 后 OCN mRNA 的表达有部分增加, 破坏细胞微丝结构 (加入 CB) 和螯合细胞外 Ca²⁺ (加入 EGTA) 后 OCN mRNA 未见表达 (图 7). 当加入相应的信号阻断剂后, OSX mRNA 的表达与 OCN mRNA 的表达基本一致 (图 8). 以上结果提示: 应变能促进干细胞向成骨细胞定向分化, 力学信号的传导与细胞骨架结构——微丝、Ca²⁺ 信号以及 PI₃K 信号有关.

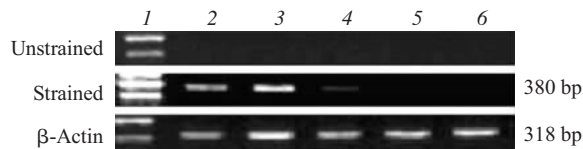


Fig. 7 Effect of the expression of OCN mRNA in different inhibitors with unstrained and strained

1: DNA marker; 2: SB203580; 3: PD98059; 4: LY294002; 5: CB; 6: EGTA.

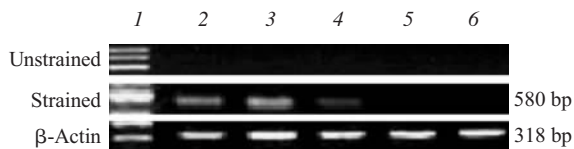


Fig. 8 Effect of the expression of OSX mRNA in different inhibitors with unstrained and strained

1: DNA marker; 2: SB203580; 3: PD98059; 4: LY294002; 5: CB; 6: EGTA.

3 讨 论

力学因素在各种组织、细胞中起重要的调控作用: a. 影响细胞和组织的行为如骨的吸收和形成, b. 骨骼肌的分化, c. 心肌细胞的肥大, d. 成纤维细胞的分化^[6]. 另外, 力学因素还能产生多种第二信使, 如激活蛋白质的磷酸化、激活蛋白激酶和多种信号转导通路.

对干细胞施加一定的拉伸应变后, 应变能促进干细胞胞内 Ca²⁺ 浓度的显著增高. 胞内 Ca²⁺ 的增加主要以细胞外 Ca²⁺ 的内流为主, 这提示拉伸应变能激活干细胞膜上的有关 Ca²⁺ 通道. 当胞外 Ca²⁺ 被螯合后, 拉伸应变不能使胞内 Ca²⁺ 浓度增加, 其原因可能是因为胞内 Ca²⁺ 浓度的增高需要胞内 Ca²⁺

库和胞外 Ca²⁺ 的同时参与, 缺乏胞外 Ca²⁺ 的内流, 胞内 Ca²⁺ 库对 Ca²⁺ 的释放非常有限, 其具体原因还有待进一步研究证实.

微丝是细胞感应机械力的主要细胞骨架结构, 细胞膜上 Ca²⁺ 通道或力敏感离子通道的启闭与细胞微丝结构的完整性有密切的关系. 当细胞微丝结构被破坏后, 拉伸应变延迟了胞内 Ca²⁺ 水平的增加. 其原因可能是细胞微丝被破坏后, 细胞不能快速感应机械力对细胞的刺激, 从而不能使细胞膜表面的受体或离子通道立刻开启, 延迟了胞外 Ca²⁺ 的内流和胞内 Ca²⁺ 库对 Ca²⁺ 的释放. 细胞受到拉伸应变后, 胞内 Ca²⁺ 的这种短暂增加是力学信号转化为生物学信号的一种表现形式, 但是 Ca²⁺ 的大量释放并不与拉伸应变的幅度和拉伸时间的延长呈正相关. 在一定的拉伸强度和时间范围内应变能促进胞内 Ca²⁺ 的释放, 其原因有待进一步研究.

钙火花是细胞肌浆网上钙释放通道 (RyR) 自发开放或 L-型钙通道开放触发引起的局部钙释放时的事件, 钙火花事件是细胞 Ca²⁺ 信号传导的另一种表现形式^[7,8]. 钙火花的发生具有时空效应, 即钙火花的触发呈随机性. 在正常情况下 RyR 对胞内的钙敏感性低, 它产生钙火花的机会较低, 当 L-型钙通道开放时能促进 RyR 钙的释放, 增加钙火花产生的频率^[9,10]. 关于细胞产生钙火花的事件在心肌细胞、骨骼细胞和神经细胞中有大量的研究报道, 但是干细胞定向诱导分化中关于钙火花分子事件尚未见相关报道. 本研究结果显示: 3% 的应变拉伸 2 min 能够激发干细胞产生钙火花事件, 微丝结构破坏后延迟了钙火花事件的发生. 其原因可能是由于细胞受到拉伸应变后, 应变激活了细胞膜上的 Ca²⁺ 通道和力敏感离子通道, 它们的瞬间开放使大量的胞外 Ca²⁺ 内流, 胞内 Ca²⁺ 浓度的突然升高又使胞内 Ca²⁺ 库中的 Ca²⁺ 释放, 两者共同作用诱发干细胞产生钙火花. 微丝是细胞感知力学信号的重要单位, 细胞微丝结构的破坏延迟了应变胞外 Ca²⁺ 的内流. 深入研究拉伸应变在干细胞定向分化过程中能激发其产生钙火花的机理, 对进一步认识力学因素在干细胞定向分化中的作用有重要的生物学意义.

大量研究表明, 力学因素对细胞的生长、增殖、分化有非常重要的影响, 但对于细胞如何将力学信号转化为生物学信号, 人们还了解甚少. 探讨力学信号的传导机制是进一步认识生命活动规律的一个重要研究领域^[11,12]. 我们选用 5 种不同的细胞信

号通路阻断剂,研究拉伸应变在间充质干细胞向成骨细胞分化过程中力学信号可能的传导途径. 结果表明: 诱导组加入相应的阻断剂后, 与成骨细胞分化有关的基因 *OSX* 和其标志物 *OCN* 的表达被完全抑制. 其中的原因是因为地塞米松在成骨细胞的分化中, 主要是通过 *MAPK* 信号通路对细胞产生级联生物学反应, 当 *MAPK* 途径被抑制后, 地塞米松无法将其信号传递到细胞内, 从而不能使 *OSX* 和 *OCN* 基因表达. *PI₃Ks* 是一类磷酸化的磷脂酰肌醇和其衍生物, 磷脂酰肌醇在细胞信号传导中起重要的作用. 我们的结果显示: 用 *PI₃Ks* 信号阻断剂能抑制成骨细胞诱导体系对干细胞向成骨细胞的诱导分化. 细胞骨架结构在细胞信号传导中也发挥重要的作用, 整合素是细胞内重要的信号传递物质基础. Ca^{2+} 作为细胞内第二信使能将细胞外的各种不同的信号传递到胞内, 当胞外 Ca^{2+} 被螯合后, 胞外 Ca^{2+} 不能发生内流, 从而影响力学信号传导.

用 *p38MAPK* 的特异性抑制剂后, 结果显示拉伸应变能激活细胞 *OSX* 和 *OCN* 基因的表达, 说明在力学信号的传导中 *p38MAPK* 信号通路并不是其主要的途径. *Craig* 等研究表明抑制 *p38MAPK* 能促进成骨细胞的分化, 我们的研究结果与此相符. 但也有相反的研究报道应变能激活 *p38MAPK*, 其原因可能是所用的细胞不同或力学加载方式不同所致.

ERK1/2 通路能被各种力学信号激活. *Jessop* 等^[13]利用应变和剪切应力载荷成骨细胞均能激活 *ERK1/2*, 但单独用剪切应力, 以及用机械应变与剪切应力共同作用于细胞时, 对 *ERK1/2* 的激活有不同的结果. *Simmons* 等^[14]利用等轴循环应变 (3%, 0.25 Hz) 诱导 *MSCs* 向成骨细胞分化时发现用应变作用 *hMSCs* 不同时间后, 应变激活了 *MAPK* 和 *p38* 信号通路. 我们利用 *ERK-1/2MAPK* 的特异性抑制剂作用细胞后, 拉伸应变能激活细胞 *OSX* 和 *OCN* 基因的表达. 即使 *ERK-1/2MAPK* 信号通路被阻断后, 力学信号同样能促进干细胞向成骨细胞方向分化, 这可能是因为 *OSX* 和 *OCN* 的表达调控与 *ERK-1/2MAPK* 信号通路无密切关系.

PI₃Ks 信号通路主要与 *G* 蛋白信号有密切的关系, 同时与胞内 Ca^{2+} 的释放有一定的联系. 当阻断 *PI₃Ks* 时, 拉伸应变能部分激活细胞 *OSX* 和 *OCN* 基因的表达^[15]. 其原因可能是 *PI₃Ks* 信号通路也是传导力学信号的一个途径, 其依据主要有两方面: 一是当 *ERK-1/2MAPK* 和 *p38MAPK* 被阻断后, 载荷仍能促进与成骨细胞分化相关的基因 *OSX* 和

OCN 的表达, 说明 *PI₃Ks* 信号通路参与了力学信号的传导. 二是由于当细胞微丝结构被破坏或胞外 Ca^{2+} 被破坏后, 应变加载的细胞不能使 Ca^{2+} 内流, 从而抑制了 *OSX* 和 *OCN* 基因表达.

细胞骨架微丝不仅是维持细胞形态和功能的基础, 同时也是细胞感受力学刺激的重要感应器. 利用细胞松弛素 *B* 破坏细胞微丝结构并给细胞加载拉伸应变后, 结果显示拉伸应变不能激活 *OSX* 和 *OCN* 基因的表达, 其原因可能是微丝结构破坏后细胞不能感应力学信号有关.

Ca^{2+} 信号是细胞重要的信号传导途径之一, 其中胞外 Ca^{2+} 的内流是胞外信号传导的主要方式. 有研究表明用胞内 Ca^{2+} 抑制剂 *TMB* 能降低拉伸应变激活 *ERK-1/2* 的功能. *Malviya* 等^[16]研究证实, 对成骨细胞加载应变后, 应变能促进胞内 Ca^{2+} 水平的升高, 胞内 Ca^{2+} 水平的增加同细胞膜上 *L*-型钙离子通道开放和细胞核内 Ca^{2+} 的释放有密切关系. 我们利用 *EGTA* 螯合 Ca^{2+} 后加载应变, 结果表明, 应变不能使 *OSX* 和 *OCN* 基因表达, 这可能是由于应变即使细胞膜上 *L*-型钙离子通道开放, 但是由于没有 Ca^{2+} 的内流不能激活相关基因的表达. 本研究结果提示 Ca^{2+} 信号在力学信号传导方面可能发挥主要的作用.

综上分析, 本研究结果表明, 干细胞向成骨细胞定向分化过程中, 力学信号的传导主要通过细胞 Ca^{2+} 信号通路、*PI₃Ks* 信号通路及同细胞骨架微丝结构的完整性有密切关系.

参 考 文 献

- 1 Iqbal J, Zaidi M. Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **328** (3): 751~755
- 2 Cheng H, Lederer W J, Cannel M B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 1993, **262** (5134): 740~744
- 3 Isaeva E V, Shkryl V M, Shirokova N. Mitochondrial redox state and Ca^{2+} sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle. *J Physiol*, 2005, **565** (Pt 3): 855~872
- 4 Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, *et al.* Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. *J Bone Miner Metab*, 2005, **23** (3): 219~225
- 5 Laboureau J, Dubertret L, Lebreton D C, *et al.* ERK activation by mechanical strain is regulated by the small G proteins *rac-1* and *rhoA*. *Exp Derma*, 2004, **13** (2): 70~77
- 6 Schneider M F, Rodney G G. Peptide and protein modulation of local Ca^{2+} release events in permeabilized skeletal muscle fibers. *Biol Res*, 2004, **37** (4): 613~616
- 7 Chandler W K, Hollingworth S, S M Baylor. Simulation of Calcium Sparks in Cut Skeletal Muscle Fibers of the Frog. *J Gen Physiol*, 2003, **121** (4): 311~324

- 8 张钦,程和平. 心肌细胞钙火花. 中国药理学通报, 2005, **21** (1): 23~26
Zhang Q, Cheng H P. Acta Pharmacol Sin, 2005, **21** (1):23~26
- 9 Zhou J, Brum G, Gonzalez A, *et al.* Ca²⁺ sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. J Gen Physiol, 2003, **122** (1): 95~114
- 10 Inone M, Bridge J H. Ca²⁺ sparks in rabbit ventricular myocytes evoked by action potentials: involvement of clusters of L-type Ca²⁺ channels. Circ Res, 2003, **92** (5): 532~538
- 11 Kanno T, Takahashi T, Ariyoshi W, *et al.* Tensile mechanical strain up-regulates Runx2 and osteogenic factor expression in human periosteal cells: implications for distraction osteogenesis. J Oral Maxillofac Surg, 2005, **63** (4): 499~504
- 12 Lewthwaite J C, Bastow E R, Lamb K J, *et al.* A specific mechanomodulatory role for p38 MAPK in embryonic joint articular surface cell MEK-ERK pathway Regulation. J Biol Chem, 2006, **281** (16): 11011~11018
- 13 Jessop H L, Rawlinson S C, Pitsillides A A, *et al.* Mechanical strain and fluid movement both activate extracellular regulated kinase (ERK) in osteoblast like cells but *via* different signaling pathways. Bone, 2002, **31** (1): 186~194
- 14 Simmons C A, Matlis S, Thornton A J. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cell cells *via* the extracellular signal-regulated kinase(ERK1/2) signaling pathway. J Biomech, 2003, **36** (8): 1087~1096
- 15 Li X, Zima A V, Sheikh F, *et al.* Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5- trisphosphate (IP3)-receptor type 2-deficient mice. Circ Res, 2005, **96** (12): 1274~1281
- 16 Malviya A N, Klein C. Mechanism regulating nuclear calcium signaling. Can J Physiol Pharmacol, 2006, **84** (3~4): 403~422

Mechanotransduction in Differentiation of Osteogenic From Mesenchymal Stem Cells*

ZHAO Hong-Bin¹⁾, LÜ Tong-De¹⁾, MA Jing¹⁾, MA Hui¹⁾, ZHANG Xi-Zheng^{2)**}

¹⁾Lanzhou Generation Hospital Lanzhou Command, Lanzhou 730050, China;

²⁾Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China)

Abstract In order to study the effect of mechanical strain on mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation into osteogenic, the cyclic substrate deformation instrument was applied to MSCs line (D1 cell) in osteogenic media for different strain and times. The cells were cyclically stretched for periods of 1, 2, 3, 5 and 10 min and treated with cytochalasin B(CB) and EGTA. Ca²⁺, which were loaded with (15 μl) Fluo-3 AM, were detected by confocal laser scanning microscope (CLSM). The signaling inhibitors, such as SB203580 (p38MAPK specific inhibitor), PD98059 (MEK-1/2MAPK specific inhibitor), LY294002 (PI₃Ks specific inhibitor), cytochalasin B (microfilament specific inhibitor), EGTA (Ca²⁺ specific inhibitor), were used to investigate mechanical signaling pathway by (3% 0.5Hz) Cyclic strain. The results indicated that 3% strain stimulus could induce increasement of [Ca²⁺]_i - dependent fluorescence at 2 min. Its fluorescence intensity were 143.68, which were significantly different compared with 1,3,5,10min groups and 1% and 10% strain groups (*P* < 0.01). The increasement of Ca²⁺ levels were delayed upto 10 min, when the cells were treated with CB. EGTA (5 mmol/L) could inhibited strain induction increasement of Ca²⁺ levels. Strain (3%, 0.5 Hz) could induce Ca²⁺ spark event in D1 cells at 2 min, however the cells were treated with CB Ca²⁺ spark event were delayed until 5min. The expression of OCN and OSX mRNA were completely inhibited by five specific inhibitors in unstrained condition. Inhibition of ERK1/2 and p38 pathway promoted the expression of OSX and OCN mRNA by strain. The expression of OSX and OCN mRNA to inhibit PI₃Ks pathway were partly activated by strain. Application of strain could not activate OSX and OCN mRNA expression when extracellular Ca²⁺ greatly inhibited with EGTA (5 mmol/L) and microfilament were damaged with CB. These results demonstrate that mechanical signals regulate MSCs function, suggested Ca²⁺ signaling, PI₃Ks pathway and microfilament play an important role in transduction mechanical signal in MSCs differentiation.

Key words strain, mesenchymal stem cells, osteoblast, Ca²⁺, strain signaling

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30470438) and Innovation Foundation of Academy of Military Medical Sciences(CX-04028).

**Corresponding author . Tel: 86-22-84656717, E-mail: Z56787@sohoo.com

Received: November 14, 2006 Accepted: December 15, 2006