

## 拉伸作用对成骨细胞粘附、铺展、粘弹性的影响

王红兵, 卢晓, 王远亮, 黄岂平, 秦建, 唐丽灵, 蔡绍哲

(重庆大学生物工程学院, 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044)

**摘要:**采用四点弯曲梁实验装置(自行研制)对离体培养的大鼠成骨细胞,施以拉伸应变影响,通过微管吸吮系统、显微摄像、计算机图像系统了解细胞的粘附、铺展行为和细胞的粘弹性变化,认识细胞形态、粘附力及变形性对机械刺激的反应。发现(1)机械拉伸2h成骨细胞与基底粘附力以及细胞单位面积粘附力较对照组明显升高,但加载后期与对照无明显差异;(2)成骨细胞粘弹性较对照组略低;(3)加载24h(500 $\mu$ e)实验组细胞增殖比对照组快。机械拉伸有利于成骨细胞生长,并可通过粘附、铺展调整、削减应变影响。

**关键词:**成骨细胞;应变;细胞粘附;粘弹性;生长

**中图分类号:**Q66 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-6737(2001)03-0568-06

在体成骨细胞受到剪切、拉伸、静压等应力应变的复杂作用,在体外动力模型上单独考察拉伸应变对成骨细胞生物行为的影响,对认识力学因素与骨重建的关系十分重要。有研究者提出一个包括四个步骤的系统来描述整个从物理刺激转化为生物反应的过程<sup>[1]</sup>:(1)力的耦合;(2)力的转导;(3)信号转导;(4)细胞生理反应和功能变化。关于第一步力耦合的常见后果是细胞变形,细胞变形涉及到细胞骨架变化和细胞与基底的粘附等过程,而此活动过程又直接与应变作用后细胞的最终生物学行为相关。有机体具有保持优化的骨应变水平的能力,有假设认为<sup>[2]</sup>,细胞可通过释放粘着斑蛋白及铺展和变形,从而使应变降低至最低限度。本实验研究采用四点弯曲梁实验装置,观察了不同应变作用时间下,成骨细胞铺展、粘附、变形性等生物学行为的应答,这方面的研究工作报道尚少。

## 1 材料和方法

### 1.1 OB 原代培养

1-3天的乳鼠(Wistar大鼠)断颈处死,分离颅骨,剥离骨膜,骨块剪成1mm<sup>2</sup>大小碎片,静置于25ml培养瓶内,加入DMEM/F<sub>12</sub>,20%的胎牛血清的完全培养基,5-10天细胞从组织块边缘迁移而出,待细胞生长至融合单层,以0.125%胰蛋白酶+0.02%EDTA混合消化液传代培养,2-10代细胞用于实验。

成骨细胞鉴定:Von-Kossa染色呈阳性反应。

### 1.2 实验装置与方法

加载系统<sup>[3]</sup>由控制电路、线性伺服电机传动装置、培养器皿固定支座(自制),可弯曲的弹性长方形板(梁)以及在该板中央制成的细胞培养小室(处于伸张变形区域)等部份构成

收稿日期:2001-01-02

基金项目:国家自然科学基金重点项目(编号:19732003);国家自然科学基金项目(编号:19872080)

作者简介:王红兵,1960年生,讲师,医学学士,电话:(023)65102508,E-mail:bio@cqu.edu.cn.

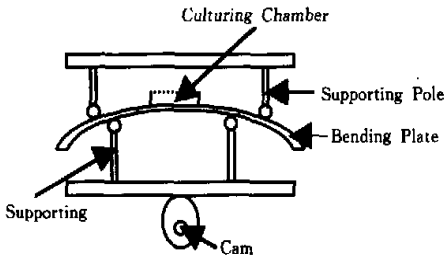


Fig.1 Schematic diagram for four-point supporting bending system

加载实验(本实验研究选用  $500\mu\text{e}0.8\text{Hz}$ )。

### 1.3 细胞与表面粘附力的测定

1.3.1 微管吮吸系统:微管吮吸实验系统<sup>[4,5]</sup>。主要由显微镜(Axiovert 35;Zeiss Co.,德国)、显微操作器(MR5170;Eppendorf. Co.,德国)、时标发生器(VTG-For A. Co.,日本)、录像机及监视器、图像处理仪(Image Tool Vidas 21;Kontron Co.,德国)、负压吮吸系统(包括水位瓶、微管零点调节器、步进电机、计算机等;自制组成),如图 2 所示。实验用微管由内径 1.1mm、长 100mm 的玻璃毛细管在微管控制器(P-87;Sutter Instrument Co.,美国)上拉制成尖端管径  $4\sim 7\mu\text{m}$  大小的微管备用。

1.3.2 测量粘附力的原理与方法:单微管测量细胞与基底间粘附力的原理是利用吮吸负压产生的牵引力与粘附力之间的平衡关系,当牵引力等于粘附力时细胞与基底分离。实验中首先将加载实验后的培养器皿固定在显微镜恒温载物台上确定待测细胞( $32\times$ ),利用显微操作器把微管缓慢移向取定的 OB 表面与其轻轻接触,然后产生一阶跃负压,其大小约在  $10^{-10}\text{N}$  左右,使细胞在微管内产生一个小幅度变形并密封管口,以显微操作器缓慢侧向牵引细胞并逐步尝试加大吮吸负压,直至细胞与粘附表面分离。整个过程由录像机记录,然后经图像处理系统测定几何参数(图 2)。

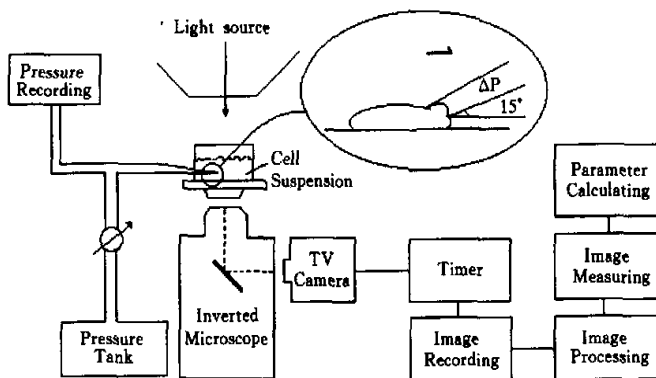


Fig.2 Schematic diagram for micropipette aspirating system

细胞在表面的粘附力由公式:  $F = \Delta P \times \pi(R_p)^2 \cos\theta$  计算,式中  $\Delta P$  为细胞与粘附表面分离时的临界负压,  $\theta$  为微管与水平面夹角,  $R_p$  为微管半径,测量  $R_p, \Delta P$ , 已知  $\theta = 15^\circ, \cos\theta \approx$

(见图 1)。

该系统可以通过控制梁的挠度变化,拉伸培养于器皿基底的细胞,四点弯曲梁结构对称,梁的两个作用点之间处于等弯区,故细胞附着基底应变处处相等。该装置可实现  $500\mu\text{e}, 1000\mu\text{e}, 1500\mu\text{e}$  三级加载(为在体骨应变生理水平)。板长 19cm,厚 0.2cm。将细胞接种于培养器皿内 2h 后见细胞粘附贴壁,即可将培养器皿夹持于固定支座上进行

0.966。

1.3.3 细胞铺展投影面积测量:采用计算机图像处理系统(Image Tool, NIH)测量细胞粘附投影面积。即以灰度值为依据勾画出粘附细胞的轮廓,并由分析软件自动计算出投影面积,从而可以计算得到单位投影面积的粘附力。

#### 1.4 细胞弹性测量

同样采用微管吸吮实验系统,可以测量细胞粘弹力学性质。

微管吸吮技术可通过测量在一定负压作用下细胞的变形时间过程阐明细胞的力学性质。本实验研究采用机械加载作用(500 $\mu\text{e}$ , 24h)后的成骨细胞,经0.25%胰蛋白酶+0.02%蛋白TA消化制成单细胞悬液(培养液)取0.5ml注入园形小室,置于倒置显微镜的恒温载物台上,在32 $\times$ 目镜下利用显微操作器使微管(管口直径4-5 $\mu\text{m}$ ),缓慢接近待测成骨细胞,开启负压控制阀,接通自动压力控制系统,使微管产生一个负压阶跃载荷(负压值以细胞在微管内的小帽状变形为准),并可在监视器上清楚地看到细胞的小部份吸入微管内。实验结束后把图像记录结果经图像处理仪分析处理,获得细胞在进入微管内部分的变形与时间关系,选用标准线性固体模型拟合成骨细胞变形实验数据。拟合模型与计算方法参见文献<sup>[6]</sup>。采用球函数法和勒让德多项式求解细胞模型的Navier方程,获得微管半径 $r_p$ 、微管壁厚 $h_p$ 和细胞半径 $R$ 、负压 $\Delta P$ 、细胞进入微管内的位移 $D(t)$ 的关系式

$$|D(t)| = \frac{1}{k_1} \left\{ 1 - \left( 1 - \frac{k_1}{k_1 + k_2} \right) \exp \left[ - \frac{k_1 k_2}{\mu (k_1 + k_2)} t \right] \right\} F(R, \Delta P, r_p, h_p)$$

式中: $\Delta P$ 为作用于细胞的负压; $r_p$ 为微管的半径; $h_p$ 为微管的壁厚; $R$ 为细胞的半径; $K_1$ 、 $K_2$ 为弹性常数; $\mu$ 为粘性系数。当给定负压、微管半径、微管壁厚和细胞半径时, $F(R, \Delta P, r_p, h_p)$ 为常数,测量出不同时间细胞进入微管内的位移就可由上述模型拟合运算得出细胞的粘弹性参数值。粘弹性参数 $K_1$ 、 $K_2$ 、 $\mu$ 与时间无关,主要反应细胞初始变形程度,粘性系数 $\mu$ 反映的是细胞变形对时间的依赖性。

#### 1.5 细胞动力学检测

使用流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson Co., USA)对细胞动力学进行检测。每50万个细胞用50 $\mu\text{g/ml}$  PI(碘化丙啶),20(g/ml RNA 酶染液0.5毫升处理。

## 2 实验结果

Table 1 Time dependence of adhesion force, adhesion projected area and adhesion force per projected area for OB stretched by cyclic tension

Time	Adhesion force of OB( $10^{-10}$ N)		Adhesion area of OB( $\mu\text{m}^2$ )		F/A( $10^9$ N/m $^2$ )	
	Test(n=50)	Control(n=50)	test(n=50)	control(n=50)	test(n=50)	Control(n=50)
2h	1057.60 $\pm$ 138.65***	378.96 $\pm$ 128.40	515.29 $\pm$ 128.08**	362.01 $\pm$ 102.01	2.17 $\pm$ 0.65***	1.11 $\pm$ 0.45
4h	516.05 $\pm$ 146.00**	376.25 $\pm$ 54.81	540.55 $\pm$ 242.86	553.19 $\pm$ 223.10	1.16 $\pm$ 0.58*	0.77 $\pm$ 0.28
12h	737.71 $\pm$ 339.46	864.21 $\pm$ 247.64	888.84 $\pm$ 319.23	1134.00 $\pm$ 408.30	1.08 $\pm$ 1.00	0.87 $\pm$ 0.38
24h	763 $\pm$ 121.09***	1089.54 $\pm$ 199.50	1343.50 $\pm$ 473.30	1192.14 $\pm$ 242.18	0.52 $\pm$ 0.17***	0.9 $\pm$ 0.20

\*P<0.05

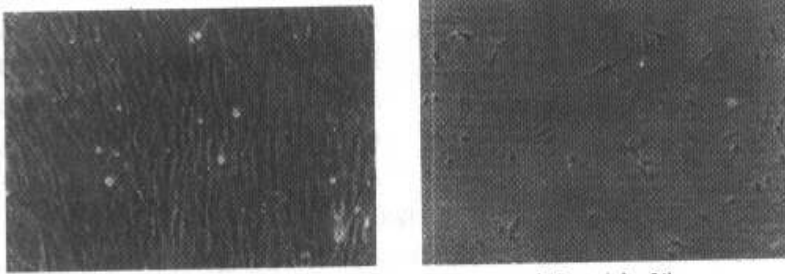
\*\*P<0.01

\*\*\*P<0.001(与对照组比较)

### 2.1 OB粘附力、铺展投影面积、单位面积粘附力随加载时间的变化

500 $\mu\text{e}$  加载 2h 成骨细胞与基底粘附力,单位面积粘附力较对照组明显升高,至加载 4h 回落,加载 24h 细胞粘附力无明显变化,但细胞铺展面积增加,使细胞单位面积粘附力下调,随培养时间延长,对照组粘附力增高,铺展增加,但细胞单位面积粘附力无明显变化。

### 2.2 成骨细胞取向,加载 24h 成骨细胞与应变垂直方向取向



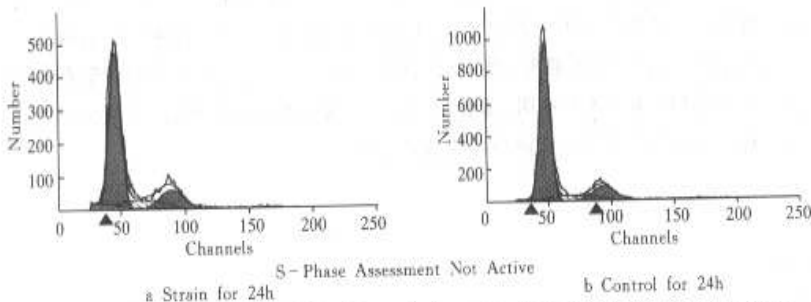
a Stretched for 24h  
b Control for 24h  
Fig.3 OB cell reorientation after stretched by cyclic tension

### 2.3 细胞动力学检测

加载 24h 实验组 G0-G1:67.69%、G2-M:16.61%、S:15.70%、G2/G1:1.97, 细胞分裂指数:0.48(G2-M:%+S%/G0-G1%)。对照组 G0-G1:76.14%、G2-M:13.70%、S:10.16%、G2/G1:1.99, 细胞分裂指数:0.31。

### 2.4 成骨细胞粘弹性检测结果

成骨细胞加载 24h, 实验组  $K_1$ 、 $K_2$  均较对照组低, $\mu$  值无明显差异。



a Strain for 24h  
b Control for 24h  
Fig.4 FACS analysis for OB without being stretched and for ones after being stretched for 24 hours

## 3 讨 论

细胞都含有能稳定细胞形状的内部丝状框架,即骨架系统(CKS),在活细胞中骨架系统可产生主动张力,即预平衡应力<sup>[7]</sup>。锚地生长的细胞,细胞膜不是均匀的粘在胞外基质(ECM)或邻近细胞上,细胞通过物理方式,将伸张的骨架丝连到局部粘附位置中聚集的特定受体上,固定于下面的 ECM 和相邻细胞上。细胞产生的内力和外部机械力都集中在这些固定的粘附位

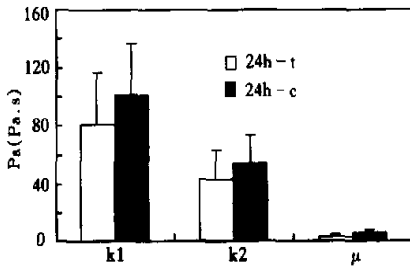


Fig.5 Visco - elasticity analysis for OB without being stretched and for ones after being stretched for 24 hours.

置,这些粘附位点的作用为:(1)为机械信号通过细胞膜表面的传递提供特定的分子通道。(2)把CKS的应力转移到周围的ECM实现CKS内部力分布的转换<sup>[8]</sup>。加载初期细胞粘附力急剧升高,4h后下调,可能与细胞受到应力刺激后骨架重排有关。因而改变了细胞的力学性质,影响到胞内的大量应力传递到细胞——基底交界面的过程。加载刺激后成骨细胞铺展出现进行性增加,单位面积粘附力持续下降,有研究指出<sup>[9]</sup>,细胞形状的动力学改变由肌动蛋白张力来控制并伴随着

CKS结构的协调变化,细胞展开是由于CKS应力转移到ECM,众多细胞通过ECM的响应,功能上也被整合为一体,有假设认为<sup>[1]</sup>,细胞可通过释放粘着斑蛋白及铺展和变形,从而使应变降低至最低限度。

加载24h细胞于应变垂直方向取向。细胞骨架和粘附系统的活动结果使细胞形态和迁移变化,但其活动有自身规律,微管一端的相对稳定导致微管蛋白单体在另一端快得多的增加,这就出现了极化的微管聚合即有方向性的微管聚合<sup>[10]</sup>,这种选择性的稳定在细胞定向的确定中发挥重要作用,细胞内微管蛋白固有的活动规律决定了细胞具有感受应变方向,并作出响应的能力。用活细胞研究证实拉动整合素受体,引起胞内骨架和核骨架迅速沿施加拉伸应力的主轴方向重新排列<sup>[11]</sup>。应力场中细胞骨架趋于定向排列,表现出的高度动态不稳定性,骨架重排与细胞增殖交互影响,即在增殖中重排取向,在取向中增殖发育,最终形成有序的组织构造。加载消除了单个细胞骨架取向的特殊性,而获得了在某方向取向的一致性。骨的细胞通过组织结构调整减少或消除非生理动态应变,从而保持骨骼的结构<sup>[12]</sup>。加载24h成骨细胞三个粘弹性参数 $K_1$ 、 $K_2$ 、 $\mu$ 较对照组略低,预示细胞刚度变小,可能与加载后细胞骨架及细胞粘附调整有关。加载后OB表现出的粘附、铺展、变形性、以及细胞取向的响应,可能是细胞通过骨架活动建立新的平衡状态来吸收消除应变影响的结果。

#### 参考文献:

- [1] Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain[J]. *calcif tissue Int.* 1995,57:344-358.
- [2] Buckley MJ, Banes AJ, Levin LG, et al. Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro[J]. *Bone Miner.* 1988,4:225-236.
- [3] 张西正,康少华,等.一种四点弯曲单向交变应变细胞加载装置[J]. *医疗卫生装备*, 1999,4:6-7.
- [4] 龙勉,吴泽志,王红兵,等.肝细胞粘弹性实验研究[J]. *生物物理学报*, 1996,12(1):169-173.
- [5] 吴泽志,邵开峰,宋关斌,等.肝细胞在IV型胶原衬表面的粘附特性[J]. *中华医学杂志*, 1999,79(5):369-372.
- [6] 张西正,匡震邦,蔡绍智,等.人成骨细胞粘弹性试验研究[J]. *固体力学学报*, 1998,19卷增刊(12):186-190.
- [7] Ingber DE. Tensegrity the architectural basis of cellular mechandrnsdution[J]. *Annual Review of*

- physiology*, 1997, 59:575-599.
- [8] Mooney D, Hansen L, Langer R. et al. Extracellular matrix controls tubulin monomer levels in hepatocytes by regulating protein turnover[J]. *Mol Biol Cell*, 1994, 5:1283-1288.
- [9] Laner KS, Valberg PA. Viscoelasticity of F-actin measured with magnetic microparticle[J]. *J Cell Biol*, 1989, 109:2233-2243.
- [10] Ingber DE, Folkman J. Tension and Compression as basic determinants of cell form and function: utilization of a cellular tensegrity mechanism[A]. In: *steined Cell Shape Determinants: Regulation and Regulatory Role*[C]. Orlando: FL Academic press, 1989. 1-32.
- [11] Ingber DE. Tensegrity the Archicetural Basis of Cellular mech anotransduetion[J]. *Annu Rev Physiol*, 1997, 59:575-599.
- [12] Jones OB, Notte H, Scholubbers JG, et al. Biochemical sig-nal transduction of mechanical strain in osteoblast like cells[J]. *Biomaterials*, 1991, 12:101.

### THE EFFECTS OF THE MECHANICAL STRAIN ON THE ADHESION AND PROJECTIVE AREA AND VISCO-ELASTICITY OF OSTEOBLAST

WANG Hong-bing, LU Xiao, WANG Yuan-liang, HUANG Qi-ping, QING Jiang,  
TANG Li-ling, CAI Shao-xi

(Bioengineering College at Chongqing University, Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering under Ministry of Education, Chongqing 400044, China)

**Abstract:** A four point bending setup was employed to study the response of culture osteoblasts' morphology, adhesion force between the cells and attached surface, and the cellular deformability to mechanical stretch. The osteoblasts from young rats were cultured on a flexible board which might be bent so that the cells were stretched. The morphological parameters were obtained using a microscope-image system. The adhesion force and deformability of the cells was measured by micropipette-aspirating system. The results were shown as follows: (1) After stretched for two hours, the adhesion force and adhesion force per unit area are higher than control group, but no distinct change was observed if stretched for more hours as compared with control. (2) Visco-elasticity of the osteoblast is lower than the control group. (3) The proliferation of the cells is faster than the control after stretched for 24 hours.

**Key Words:** Osteoblasts; Strain; Cellular Adhesion and Spread;  
Visco-elasticity; Proliferation