

成梯度增加的拉伸刺激对成骨细胞胶原合成的影响^{*}

唐丽灵 王远亮^{**} 潘君 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 使用四点弯曲加载装置研究机械拉伸对成骨细胞胶原合成的影响, 在生理应变范围 (500~1 500 $\mu\epsilon$) 研究了不同加载时间、不同应变水平对成骨细胞胶原合成的影响. 发现在 500 $\mu\epsilon$ 下的拉伸刺激提高了成骨细胞合成胶原的能力, 而在 1 000 $\mu\epsilon$ 和 1 500 $\mu\epsilon$ 下的拉伸刺激使成骨细胞的胶原合成受到了明显抑制 ($P < 0.01$). 设计了应变成梯度增加的加载方式: 使细胞在 500 $\mu\epsilon$ 加载一段时间后, 将应变增加到 1 000 $\mu\epsilon$ 加载同样长的时间, 最后将应变增加到 1 500 $\mu\epsilon$ 加载同样长的时间. 在梯度加载实验中发现, 成骨细胞接收到有利于其胶原蛋白合成的信号时, 大量地吸收用于合成胶原的脯氨酸, 当力学刺激变为抑制信号时, 储存在胞内的³H-脯氨酸又重新释放回溶液中. 说明在应变逐渐增加的加载过程中, 细胞会进行自我调节以适应新的机械刺激.

关键词 应变, 梯度增加, 成骨细胞, 胶原合成

学科分类号 Q24

成骨细胞在骨对应力的响应中起主要作用, 其最主要的功能之一是合成和分泌骨的有机基质, 其中 I 型胶原占 90%, 因此 I 型胶原合成是否活跃可以反映成骨细胞的成骨能力^[1]. 离体细胞实验研究表明剪切、拉伸等机械刺激会对成骨细胞的活性和功能产生影响^[2,3]. 但是, 这些研究都是对成骨细胞施加稳定的机械刺激. 而对于在体骨组织来说, 骨细胞所受的应变水平并不总是恒定的. 那么, 当成骨细胞受到逐渐增加的拉伸刺激时, 如何相应地调节其生理功能以响应变化的外来力信号呢? 因此我们在实验中设计了梯度加载的方式, 使成骨细胞所受的力学刺激间隔一段时间后逐渐增加. 研究不同应变大小和受载时间, 以及梯度加载方式对成骨细胞胶原合成能力的影响, 探索骨组织对功能性环境改变的响应.

1 实验方法

1.1 成骨细胞的培养

采用消化法^[4]. 取出生 1~2 d 的 Wistar 大鼠颅盖骨, 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 DMF12 4 ml、胎牛血清 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 2~6 代稳定的传代细胞做实验.

1.2 实验装置

采用四点弯曲单向等应变加载装置^[5]. 其原理图见图 1. 图 1 中 CD 区为等弯区, 该区域的应

变为单向应变, 从而保证在该区域贴壁生长的细胞受到同一拉伸应变的作用, 工作频率 0.4 Hz, 动态应变加载范围 500 $\mu\epsilon$, 1 000 $\mu\epsilon$, 1 500 $\mu\epsilon$.

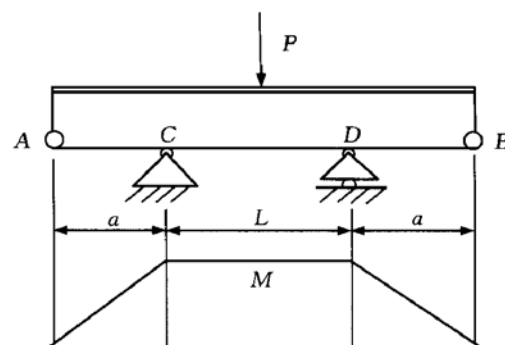


Fig 1 The principle of four point bending device

P : press; A , B : the loading point; C , D : the supporting point; a : the distance between loading point and supporting point; L : the distance between the two supporting point; M : bending moment. $M =$

$$\frac{1}{2} P \cdot a.$$

1.3 实验方案

将成骨细胞以 2×10^4 个/cm² 的密度接种在两个用培养皿制成的小腔中, 加入 5 ml 完全培养液 (含 10% 小牛血清的 DMF12), 培养 24 h, 使细胞贴壁并融合生长. 然后将一个小腔放入四点弯曲加载装置中, 按两种方案进行加载. a. 应变分别为

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (19872080).

^{**} 通讯联系人.

Tel: 023-65102508, E-mail: wyl@equ.edu.cn

收稿日期: 2002-02-28, 接受日期: 2002-04-01

500 $\mu\epsilon$ 、1 000 $\mu\epsilon$ 、1 500 $\mu\epsilon$ 的加载。b. 梯度加载: 细胞在 500 $\mu\epsilon$ 下加载一段时间后, 将应变调至 1 000 $\mu\epsilon$ 加载同样长的时间, 再将应变调至 1 500 $\mu\epsilon$ 加载相同时间。另一个未加载的小腔作对照。

1.4 胶原蛋白合成测定

实验前在培养液中加入 1.85×10^5 Bq 的 ^3H -脯氨酸 (北京原子能研究所), 然后按实验流程加载。按时间点取加载组和对照组的上清液, 加入闪烁液后于液闪仪 (LKB-1217) 中计数测定。

2 实验结果

2.1 机械拉伸对成骨细胞胶原合成的影响

图 2 表明了不同的应变大小和不同的加载时间对成骨细胞胶原合成能力的影响。成骨细胞在

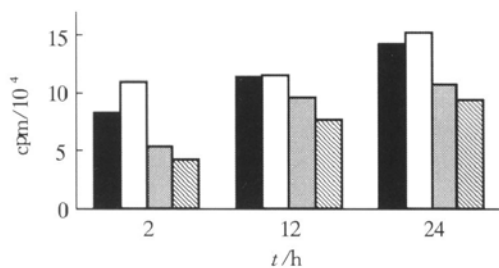


Fig.2 The ^3H -proline uptake value of osteoblasts stretched with different strain level and loading time

^3H -proline concentration: 0.1%; cell number: 2×10^5 . ■: control; □: 500 $\mu\epsilon$; ▒: 1 000 $\mu\epsilon$; ▨: 1 500 $\mu\epsilon$.

500 $\mu\epsilon$ 下加载 2 h、12 h 和 24 h 后, ^3H -脯氨酸的掺入量均高于相应时间点的对照组值 ($P < 0.01$). 而 1 000 $\mu\epsilon$ 和 1 500 $\mu\epsilon$ 下细胞的 ^3H -脯氨酸掺入量均低于相应时间点的对照组值 ($P < 0.01$). 1 500 $\mu\epsilon$ 下成骨细胞的 ^3H -脯氨酸掺入量的值最低. 说明 500 $\mu\epsilon$ 的拉伸刺激提高了成骨细胞合成胶原蛋白的能力, 而 1 000 $\mu\epsilon$ 和 1 500 $\mu\epsilon$ 的拉伸刺激抑制了成骨细胞合成胶原蛋白的能力. 在相同的应变水平下, 细胞经拉伸刺激 12 h 后其 ^3H -脯氨酸掺入量与对照组的差异最小。

图 3 为 1 000 $\mu\epsilon$ 下加载的时间过程对成骨细胞胶原合成的影响. 从图 3 中可以看出, 在各时间点的 ^3H -脯氨酸掺入量都低于相应的对照组值 ($P < 0.01$). 说明 1 000 $\mu\epsilon$ 下的拉伸对成骨细胞的胶原合成是不利的. 而且, 这种拉伸刺激改变了成骨细胞胶原合成的过程. 对照组和加载组的 ^3H -脯氨酸掺入量的变化趋势发生了变化。

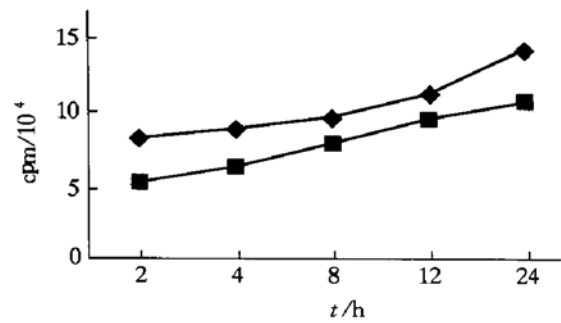


Fig.3 The time course of osteoblast ^3H proline absorption when osteoblasts were stretched at 1 000 $\mu\epsilon$ for 2~ 24 h

^3H -proline concentration: 0.1%; cell number: 2×10^5 . ◆—◆: control; ■—■: 1 000 $\mu\epsilon$.

2.2 梯度加载方式对成骨细胞胶原合成的影响

图 4 表明了间隔 2 h 的梯度加载对成骨细胞胶原合成能力的影响. 在第一个 2 h, 细胞受到 500 $\mu\epsilon$ 的拉伸刺激, ^3H -脯氨酸的掺入量明显高于对照组 ($P < 0.01$), 经第二个 2 h 1 000 $\mu\epsilon$ 加载后 ^3H -脯氨酸的掺入量急剧降低, 明显低于对照组 ($P < 0.01$). 到第三个 2 h 1 500 $\mu\epsilon$ 加载, ^3H -脯氨酸的掺入量逐渐增加, 但掺入量值仍低于相应时间点的对照组值, 表明成骨细胞的胶原合成此时仍处于受到抑制的状态。

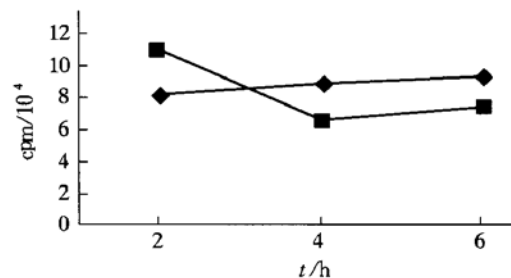


Fig.4 The ^3H proline absorption amount of osteoblasts that were stretched with the strain magnitude raised every 2 h

^3H -proline concentration: 0.1%; cell number: 2×10^5 . ◆—◆: control; ■—■: loaded cells.

图 5 表明了间隔 12 h 的梯度加载对成骨细胞胶原合成能力的影响. 其变化趋势与间隔 2 h 梯度加载的趋势一致. 细胞在 500 $\mu\epsilon$ 下拉伸 12 h 后, ^3H -脯氨酸的掺入量明显高于对照组 ($P < 0.01$), 当应变升高到 1 000 $\mu\epsilon$ 加载 12 h 后, ^3H -脯氨酸的掺入量急剧降低, 明显低于对照组 ($P < 0.01$). 到第三个 12 h 1 500 $\mu\epsilon$ 加载, ^3H -脯氨酸的掺入量逐渐增加, 但和对照组的掺入量相比, 其值仍较低, 这说明成骨细胞的胶原合成此时仍处于受到抑制的状态。

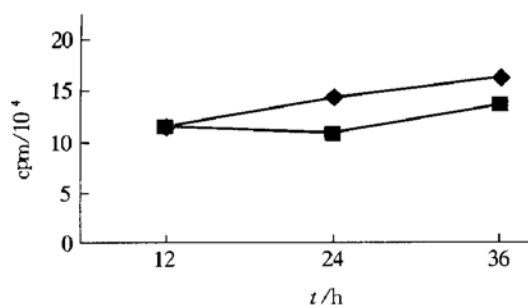


Fig 5 The ³H proline absorption value of osteoblasts that were stretched with the strain magnitude raised every 12 h
³H-proline concentration: 0.1%; cell number: 2×10^5 . ◆—◆: control; ■—■: loaded cells.

3 讨 论

Owan 等^[6]认为, 周期性的拉伸加载对成骨细胞的刺激是两方面的. 一方面是基底膜的拉伸, 另一方面是拉伸产生的液体流动, 类似于在体骨内的液体流动. 这种拉伸刺激直接影响骨内细胞的新陈代谢, 成骨细胞通过改变它们的生化行为如增殖、合成基质蛋白等来响应刺激. 成骨细胞能够感受不同大小的应变而相应地改变细胞的功能. Rubin 等^[7]也指出成骨细胞位于松质骨和皮质骨未矿化的细胞基质上, 所以细胞基底的形变是刺激这些细胞的适当的信号. 机械刺激因素如应变大小、频率和加载的次数都会影响细胞的响应^[8,9].

本实验中在 500 $\mu\epsilon$ 下的加载促进了成骨细胞的胶原合成, 而 1 000 $\mu\epsilon$ 和 1 500 $\mu\epsilon$ 下的拉伸刺激抑制了胶原蛋白的合成过程. 说明成骨细胞可以区分不同水平的应变并相应地调节它的响应. 500 $\mu\epsilon$ 水平对大鼠颅盖骨分化出的成骨细胞胶原合成更有利. 而且, 拉伸对成骨细胞胶原合成方面的影响是一个早期的响应, 细胞经拉伸 2 h 后就出现了明显的促进合成或抑制合成的效应. 此时对照组和加载组之间的差异最大.

本研究首次设计了应变成梯度增加的加载方式, 在梯度加载的实验中我们观察到了有趣的现象. 当细胞在 500 $\mu\epsilon$ 下加载, 由于这是一个有利于细胞胶原合成的力学信号, 细胞大量地吸收了溶液中的³H-脯氨酸, 明显高于未受载的细胞. 然后将应变调至 1 000 $\mu\epsilon$ 时, 由于这一应变水平不利于胶原的合成, 细胞的³H-脯氨酸掺入量明显低于对照组. 更重要的是, 细胞的³H-脯氨酸总掺入量也低于 500 $\mu\epsilon$ 加载的值. 这说明当成骨细胞接收到

有利于其胶原蛋白合成的信号时, 大量地吸收用于合成胶原的脯氨酸, 这是一个早期的响应, 但是这些脯氨酸并未立即全部合成胶原蛋白, 而是储存在胞内. 当力学刺激变为抑制信号时, 成骨细胞作出相应的响应, 信号传递到胞内, 引起细胞的生化响应, 储存在胞内的³H-脯氨酸又重新释放回溶液中. 此外, 在梯度加载实验中, 细胞拉伸至 1 000 $\mu\epsilon$ 点的³H-脯氨酸掺入量明显高于直接在 1 000 $\mu\epsilon$ 水平下的加载组 ($P < 0.01$). 说明在应变逐渐增加的加载过程中, 细胞会进行自我调节以适应新的机械刺激. 这一结果有助于了解骨对不同应变响应的不同特点, 从而找到适宜的保持骨质量的锻炼方法, 并为骨组织工程的设计提供理论依据.

Kizer 等^[10]指出成骨细胞响应周期性应变而引起的基质蛋白合成的变化, 与成骨细胞中的非选择性阳离子通道 (SA-CAT) 的激活有关, SA-CAT 参与细胞的力传导过程, 不同水平的应变对 SA-CAT 通道的电势产生不同的影响, 因而影响成骨细胞胶原蛋白的合成. 尽管对 SA-CAT 的特性还有待进一步的研究, 但我们从实验中发现, 成骨细胞胶原蛋白的合成表现出对外界力信号变化的迅速响应, 可以推测在成骨细胞内必然存在着一种能快速响应应力/应变变化的信号通道, 将力学信号传递到细胞内并引发细胞生理活性的变化. 这种对变化的机械刺激响应是骨组织维持其功能适应性的基础.

致谢 张西正博士对本实验装置的设计与校正给予很大的帮助, 谨此致谢.

参 考 文 献

- 1 Buckwalter J A, Glimcher M J, Cooper R R, *et al.* Bone biology part I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *J Bone Joint Surg*, 1995, **77-A** (8): 1256 ~ 1273
- 2 Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, *et al.* Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *J Biomechanics*, 2000, **33** (1): 45 ~ 51
- 3 Duncan R L, Turner C H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, 1995, **57** (5): 344 ~ 358
- 4 Robey P G, Temine J D. Human bone cells *in vitro*. *Calcified Tissue Int*, 1985, **37** (5): 453 ~ 460
- 5 张西正, 匡震邦, 蔡绍哲, 等. 一种四点弯曲单向交变应变细胞加载装置的研制. *医疗卫生装备*, 1999, **83** (4): 6 ~ 8
Zhang X Z, Kuang Z B, Cai S X, *et al.* *Medical Equipment Journal*, **83** (4): 6 ~ 8
- 6 Owan I, David B B, Turner C H. Mechanotransduction in bone:

- osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol*, 1997, **273** (3pt1): c810~ c815
- 7 Rubin C T, McLeod K J. Promotion of bony ingrowth by frequency-specific low amplitude mechanic strains. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1994, (298): 165~ 174
 - 8 Brighton C T, Stanford B, Gross S B, *et al.* The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone cells of rats to cyclic biaxial mechanical strain. *J Bone Joint Surg*, 1997, **73-A** (3): 320~ 331
 - 9 Femor B, Gundle R, Evans M, *et al.* Primary human osteoblast proliferation and prostaglandin E2 release in response to mechanical strain *in vitro*. *Bone*, 1998, **22** (6): 637~ 643
 - 10 Kizer N, Guo X L, Hruska K. Reconstitution of stretch-activated cation channels by expression of the α -subunit of the epithelial sodium channel cloned from osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (3): 1013~ 1018

Effect of Step Increased Stretching on Osteoblasts Collagen Synthesis*

TANG Li-Ling, WANG Yuan-Liang**, PAN Jun, CAI Shao-Xi

(Bio-engineering College and Key Laboratory for Biomechanics & Tissue Engineering Under The State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract A four-point bending device was used to investigate the effect of stretching on osteoblasts collagen production. Cells were stretched with different strain level and loading time. Cyclic stretching of the cells with a strain magnitude of 500 $\mu\epsilon$ resulted in an increased collagen production while collagen synthesis was significantly reduced with a strain magnitude of 1 000 $\mu\epsilon$ and 1 500 $\mu\epsilon$ ($P < 0.01$). A new loading method, step increased stretching was also used. Cells were stretched at 500 $\mu\epsilon$ firstly, followed by stretching at 1 000 $\mu\epsilon$ for the same hours. Then the strain level was raised to 1 500 $\mu\epsilon$ and cells were stretched for the same hours. The step increased stretching experiment showed that osteoblasts absorbed proline to synthesize collagen when received an appropriate signal (500 $\mu\epsilon$). When the strain magnitude was raised, that is to say, the mechanical stimulation was turned into an inhibiting signal, intracellular ^3H -proline was released into solution again. These results demonstrate that osteoblasts can adjust themselves to adapt the new mechanical stimulation during the step increased stretching course.

Key words strain, step increase, osteoblast, collagen production

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (19872080).

** Corresponding author. Tel: 86-23-65102508, E-mail: wyl@cqu.edu.cn

Received: February 28, 2002 Accepted: April 1, 2002