

骨细胞微环境仿生模拟技术*

任丽 续惠云 蹇爱荣 商澎**

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

摘要 骨细胞是生长于骨组织中的重要功能性细胞, 承载着力学感知、骨重建平衡、机体矿物质代谢和内稳态调节等多种重要功能。骨陷窝-骨小管网络系统为骨细胞生长和功能发挥提供了稳定的结构微环境, 骨基质的主要成分 I 型胶原蛋白和羟基磷灰石是骨细胞黏附、细胞与细胞以及细胞与细胞外基质相互作用的生化微环境基础。而骨细胞多种生理功能的发挥离不开其对周围力学微环境变化的感知与响应。此外, 骨细胞对周围环境非常敏感, 微环境结构、生化组成和力学刺激的变化会对骨细胞结构和功能产生较大影响。因此, 在微环境基础上研究骨细胞的结构和功能, 是阐明骨细胞力学感知机制、发现骨细胞新的生物学功能的前提。然而, 骨陷窝-骨小管网络系统复杂的结构和坚硬的质地, 给在体研究带来了很大的困难。体外构建骨细胞仿生微环境成为骨细胞结构功能研究的必经之路。本文系统介绍了骨细胞的结构、生化和力学微环境, 回顾了体外骨细胞微环境仿生模拟技术的最新进展, 旨在为骨基础生物学、组织工程和再生医学的发展提供参考。

关键词 骨细胞, 结构微环境, 生化微环境, 力学微环境, 仿生模拟

学科分类号 Q81, Q6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00515

骨骼具有坚硬的结构和恒定的外形, 能够为机体提供稳定的机械支撑, 保护内部器官, 并具有自我更新能力和机体代谢调节功能^[1], 而骨组织中的三种主要功能性细胞——骨细胞、成骨细胞和破骨细胞, 通过间隙连接途径或旁分泌途径的相互作用, 在维持骨组织的结构稳定和功能动态平衡中发挥作用。骨细胞是骨组织中含最丰富、寿命最长的细胞, 约占骨组织细胞总数的 90%~95%, 生长在骨陷窝-骨小管网络系统中, 寿命长达数十年, 承载着诸多重要功能: a. 力学感知功能, 感知骨组织内部的力学微环境变化, 并将力学信号转化为生化信号; b. 骨重建调节功能, 通过直接调节成骨细胞的骨形成活性和破骨细胞的骨吸收活性, 调节骨重建的平衡; c. 骨骼矿化调节功能; d. 机体矿物质代谢调节功能; e. 内分泌功能, 能够分泌可溶性因子作用于远距离的靶器官, 如肾脏和肌肉; f. 自噬功能, 能够重建骨陷窝周围的骨基质^[2-4]。

坚硬的骨基质和复杂的骨陷窝-骨小管网络系统, 是骨细胞发挥力学感知、骨平衡和内稳态调节等功能的微环境基础, 但也正是此环境的特殊性,

限制了对骨细胞结构和功能的深入研究^[5]。骨细胞发挥力学感知的机制是什么? 骨细胞是否具有新的生物学功能? 能否在骨细胞中发现骨科疾病治疗的药物靶点? 对骨细胞结构功能的深入研究以及新功能的发现还需要更多研究者的努力和新技术方法的引进。

体外骨细胞培养与研究方法的发展, 以及 MLO-Y4、MLO-A5、IDG-SW3 等骨样细胞系的建立^[6-8], 为骨细胞结构功能研究提供了便利, 获得了大量有价值的研究数据。但是越来越多的研究发现, 细胞对周围的生长环境, 尤其是直径在 10~100 μm 范围内的微环境非常敏感, 微环境结构(二维/三维结构)、生化组成和力学刺激等因素的变化对细胞形态、活性、功能, 以及与邻近细胞的相

* 中国博士后基金面上资助(2013M532083)和西北工业大学基础研究基金资助项目(3102014JKY15003)。

** 通讯联系人。

Tel: 029-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-27, 接受日期: 2014-05-05

互作用影响较大^[9-11], 此外, 二维和三维环境中细胞的力生物学参数也存在显著的差异, 包括细胞刚度^[12]、黏着斑复合物的形态^[13], 以及标志物的表达等^[14]. 与生长于二维平面上的细胞相比, 生长在三维环境中的细胞表现出的生物学特征更接近体内环境中的细胞特征. 因此, 若想进一步揭示骨细胞更真实的神秘功能, 探明其发挥功能的分子机制, 有效的研究途径是: 发展骨细胞微环境仿生模拟技术, 模拟体内骨细胞的结构、生化和力学微环境, 在可控条件下研究骨细胞的功能及其机理. 本文参阅大量研究性论文, 对骨细胞的结构、生化和力学微环境做了系统的介绍, 并回顾了体外骨细胞微环境仿生模拟技术的研究进展, 旨在为骨基础生物学、组织工程和再生医学的发展提供参考.

1 骨细胞微环境

1.1 骨细胞的结构微环境

解剖学上, 骨组织的结构单元尺寸相差较大, 从构成骨组织的分子、细胞到组织、器官水平, 存在 9~10 个数量级的差别^[15]. 在宏观尺度上, 骨组织由松质骨和包裹在其外层的皮质骨构成. 松质

骨孔隙率高达 50%~90%, 孔径约为 1 mm, 骨密度较低; 而皮质骨结构致密, 孔隙率仅为 6.1%~13.1%^[16]. 在微观尺度上, 皮质骨由基本结构单元——骨单元 (osteon) 构成, 骨单元平均横截面积仅为 $45\,405\ \mu\text{m}^2$ ^[17], 中央为哈佛氏管, 周围为骨陷窝-骨小管网络系统, 其中骨陷窝平均体积约为 $298.5\ \mu\text{m}^3$ ^[18], 骨小管的直径约为 $150\sim 550\ \text{nm}$ ^[19], 骨小管与骨陷窝相互连通, 形成网络状结构. 骨细胞是具有极性的多树状突起细胞 (每个细胞约含有 50~60 个突起), 体积约为 $110\sim 279\ \mu\text{m}^3$ ^[20], 其中胞体存在于骨陷窝中, 细胞突起平均直径约为 $(104\pm 69)\ \text{nm}$ ^[21], 呈放射状穿过骨小管, 细胞突起通过纤维状的横向元件 (transverse elements) 与骨小管基质之间形成连接, 使细胞突起处于骨小管腔中央. 骨小管中充满组织液, 通过间隙流为骨细胞供给养分、运送细胞因子及代谢废物^[21]. 此外, 骨细胞突起还可穿过骨小管延伸至周围的骨陷窝和骨表面, 与骨细胞以及骨表面的其他骨组织细胞形成连接^[22]. 因此, 骨陷窝-骨小管网络系统构成了骨细胞生存和发挥功能的结构微环境 (图 1).

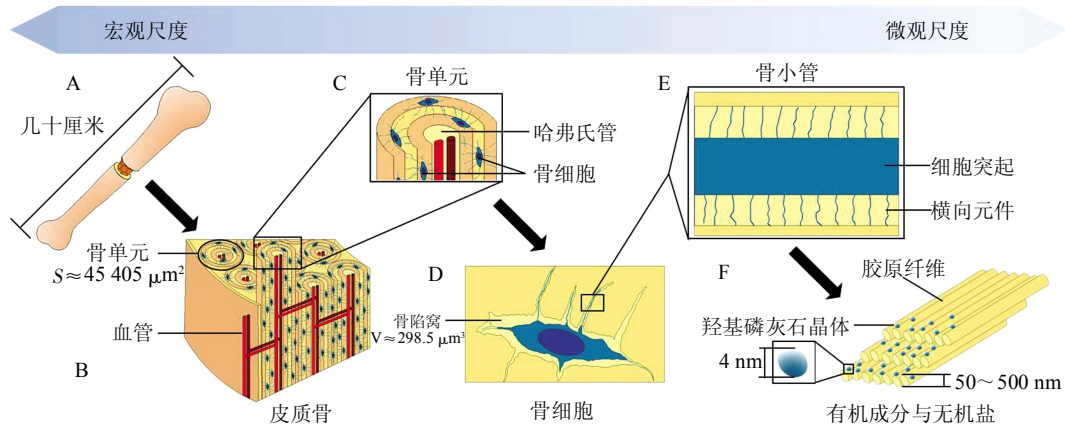


Fig. 1 The structural and chemical microenvironment of osteocyte

图 1 骨细胞的结构微环境与生化微环境

A: 长骨; B: 皮质骨; C: 骨单元; D, E: 骨小管构成了骨细胞的结构微环境; F: 有机成分 (主要是 I 型胶原蛋白) 和无机盐 (羟基磷灰石) 构成了骨细胞的生化微环境.

1.2 骨细胞的生化微环境

骨组织是由有机成分和无机盐构成的复合物. 有机成分包括胶原蛋白和非胶原蛋白两大类, I 型胶原蛋白是主要的有机成分, 占总有机物的 90%~95%, 胶原纤维 (50~500 nm) 以同心圆方式

分布于哈佛氏管周围, 形成致密的网络结构, 为无机盐的沉积提供了模板^[23-24]. V 型胶原蛋白在骨基质所占比例很少^[25]. 除胶原蛋白外, 骨基质中还包含有数种非胶原蛋白, 如骨钙素 (osteocalcin), 分子质量为 6 ku, 占成熟骨组织非胶原蛋白总量的

15%左右, 是骨基质中含量最多的非胶原蛋白^[25]. 此外还有骨桥蛋白 (osteopontin)、骨唾液酸蛋白 2 (bone sialoprotein-2)、骨黏连蛋白 (osteonectin)、纤连蛋白 (fibronectin)、血小板反应蛋白 (thrombospondin) 等^[25]. 除了作为无机盐沉积的支架, 骨基质蛋白还为骨细胞黏附和发挥功能创造了生化微环境 (表 1).

Table 1 The extracellular matrix proteins found in bone^[24-25]

表 1 骨组织细胞外基质蛋白^[24-25]

细胞外基质蛋白		功能
胶原蛋白	I 型胶原蛋白	保持骨组织的抗拉强度
	V 型胶原蛋白	保持骨组织的抗拉强度
非胶原蛋白	骨钙素	促进骨基质矿化
	骨桥蛋白	促进细胞黏附和骨基质矿化
	骨唾液酸蛋白 2	促进骨基质矿化
	骨黏连蛋白	促进细胞黏附
	纤连蛋白	促进细胞黏附
	血小板反应蛋白	促进细胞黏附

羟基磷灰石是骨组织的主要无机盐成分, 以平均直径约为 4 nm 的纳米晶体形式沉积于有机物网络中. 这些力学特性相差极大的各组分相互作用, 在纳米尺度上组织成型, 构成了致密的骨组织, 并决定了骨骼的强度、刚度和韧性等基本力学特性. 骨细胞通过细胞表面的整联蛋白、黏着斑蛋白等与细胞外基质之间发生相互作用, 促使细胞突起延伸入骨小管中, 发挥骨细胞力学感知和骨组织内稳态调节功能 (细胞 - 基质相互作用)^[24-25]. 因此, 骨组织的有机成分和无机盐为骨细胞发挥功能提供了良

好的生化微环境 (图 1)^[24-25].

1.3 骨细胞的力学微环境

骨组织作为机体的承重和机械支撑结构, 在机体不同状态下会因承受不同的力学载荷而发生不同程度的应变. 在宏观水平上, 日常活动中骨组织应变为 1 000~2 000 $\mu\epsilon$ (0.1%~0.2%), 废用性骨组织的应变小于 1 000 $\mu\epsilon$ (<0.1%), 高强度训练可使骨组织发生高达 3 000 $\mu\epsilon$ (~0.3%) 的应变; 骨组织应变小于 1 000 $\mu\epsilon$, 骨吸收功能增强, 应变大于 3 000 $\mu\epsilon$ 骨形成功能增强, 而当应变大于 4 000 $\mu\epsilon$ (0.4%) 时会发生骨折^[26]. 如前所述, 骨组织的基本结构单元——骨单元, 由骨陷窝 - 骨小管网络系统构成, 其结构的复杂性使微观水平的应变与宏观水平的应变存在极大差异. Nicolella 等^[27]利用数字图像相关应变测量技术, 测得骨组织应变为 2 000 $\mu\epsilon$ 时, 骨陷窝周围基质应变达到 30 000 $\mu\epsilon$, 比组织水平的应变大 15 倍. 在此基础上, Nicolella 和 Schneider 等^[28-29]利用显微成像技术测得组织水平应变为 2 000 $\mu\epsilon$ 时, 骨陷窝周围基质平均应变在 7 500~20 000 $\mu\epsilon$ 之间, 最大应变高达 35 000 $\mu\epsilon$. 此外, Verbruggen 等^[26]基于共聚焦成像的高分辨率图, 构建了骨细胞微环境模型, 推测组织水平具有生理活性的力学载荷 (3 000 $\mu\epsilon$) 能够引起骨细胞自身发生 10 500~12 000 $\mu\epsilon$ 的应变. 以上实验研究和理论分析结果虽然在微观水平的应变数据上存在差异, 但有一点可以确定的是, 骨陷窝 - 骨小管网络系统对组织水平的应变具有显著放大作用. 构成骨陷窝 - 骨小管网络系统的骨基质应变会对骨细胞产生拉伸或压缩应力刺激, 引发骨细胞的力生物学反应, 因此骨基质应变构成了骨细胞的重要力学微环境 (图 2).

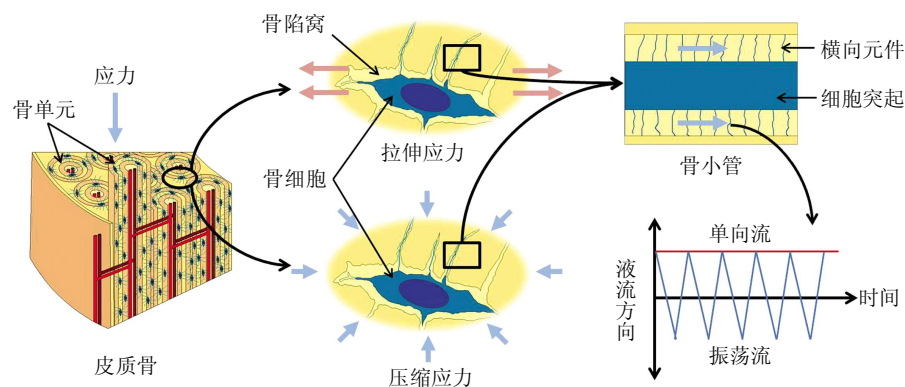


Fig. 2 The main mechanical microenvironment of osteocyte

图 2 骨细胞的主要力学微环境

骨组织应变会对骨陷窝 - 骨小管网络的不同部位产生不同应力, 进而引起骨小管中组织液顺压力梯度流动^[30]. 通常认为, 骨小管中液体流动产生的流体剪切力, 能够将应力信号传递给骨细胞, 引发骨重建^[31]. 由于机体活动类型不同, 骨组织承受的力学载荷也不同, 因此, 骨陷窝 - 骨小管网络系统中的液流呈现复合流动状态, 主要包括振荡流和单向流 (图 2). 振荡流通常由骨骼系统的周期循环运动引发, 如行走或跑步; 单向流通常由姿势改变引发, 如从坐姿到站姿的转变^[32]. 骨组织中液流产生的流体剪切力变化范围较大, 且不同物种或不同骨组织均存在差异, 目前尚无有效的流体剪切力测定技术. Mi 等^[33]利用数学模型推测火鸡和公鸡骨组织流体剪切力范围是 $0.2 \sim 20 \text{ dyne/cm}^2$, Price 等^[34]利用实验和数学模型, 推测骨细胞突起承受的最大剪切力约为 50 dyne/cm^2 . 骨细胞突起富含肌动蛋白骨架, 是整个细胞中对力学刺激最敏感的部分, 细胞突起通过纤维状的横向元件与骨小管基质之间形成连接^[35], 对流体剪切力刺激具有一定的放大作用. 因此流体剪切力微环境是骨细胞的另一个重要的力学微环境^[36].

骨组织的固液界面处, 固相界面的负电荷吸引液相中的正电荷, 使正电荷聚集于骨表面, 形成“双电荷层”^[37]. 骨组织应变导致液体顺压力梯度的流动, 会在流动方向上产生流动电位和电磁场^[37-38]. 体内和体外实验证实外源性电磁场能够增加骨组织细胞的活性, 但是持续力学加载产生的内源性电磁场并不会对骨细胞产生显著的影响^[37-40].

由此可见, 骨基质应变和由此引发的流体剪切力构成了骨细胞的主要力学微环境, 对骨细胞活性和功能发挥具有重要意义.

2 骨细胞微环境模拟技术

骨陷窝 - 骨小管网络系统为骨细胞提供独特的结构、生化和力学微环境的同时, 其坚硬的质地和复杂的结构也给在体深入研究骨细胞功能带来了很大的困难. 结合骨陷窝 - 骨小管网络系统的特点, 构建骨细胞仿生微环境, 不但能够克服在体研究的困难, 还能弥补传统体外二维培养与体内微环境相差甚远的不足^[41], 为骨细胞结构功能研究开辟了新途径.

2.1 结构/生化微环境模拟技术

模拟骨细胞周围的结构、生化微环境, 是体外骨细胞仿生培养和形态、功能研究的基础. 研究者

通常采用与骨基质组分类似的天然材料或人工合成的仿生材料, 构建多孔三维支架, 实现结构、生化微环境模拟和骨细胞的仿生培养. 取材自人或动物骨组织的松质骨, 保持了体内骨细胞微环境的结构特点和生化组成, 成为体外骨细胞仿生培养和功能研究的可选材料^[41-42]. 但是由于松质骨来源有限, 取材成本高, 批次间质量无法控制, 限制了其在骨细胞培养和功能研究中的广泛应用.

天然 I 型胶原蛋白是常用的骨细胞三维培养支架材料^[8, 43-44], 其富含羧基活性基团, 为羟基磷灰石沉积提供了活性位点^[45-46], 便于构建胶原 - 羟基磷灰石复合支架, 是仿生模拟骨细胞结构、生化微环境的常用材料. 利用 I 型胶原蛋白在 37°C 中性溶液中快速固化形成弹性凝胶的特点, 将胶原蛋白中性溶液与骨细胞悬液混合, 放置在 37°C 培养箱中固化, 即可实现骨细胞的三维培养^[44]. 胶原纤维形成微米 / 纳米多孔三维网络, 其孔隙为骨细胞胞体的生长和突起的延伸提供了足够的三维空间, 并能够满足 O_2/CO_2 和营养物质的供给. 基于 Ca^{2+} 和 HPO_4^- 与羧基基团相互作用, 在胶原纤维表面形成羟基磷灰石的原理, 采用 Na_2HPO_4 和 CaCl_2 溶液沉积法, 即可在已固化的胶原纤维上沉积羟基磷灰石, 形成复合支架^[44]. 采用与血液中离子浓度相似的模拟体液 (5.0 mmol/L K^+ , $142.0 \text{ mmol/L Na}^+$, $2.5 \text{ mmol/L Ca}^{2+}$, $1.5 \text{ mmol/L Mg}^{2+}$, $103.0 \text{ mmol/L Cl}^-$, $10.0 \text{ mmol/L HCO}_3^-$, $1.0 \text{ mmol/L HPO}_4^{2-}$) 浸润胶原凝胶, 能够在胶原纤维表面均匀地沉积无定型羟基磷灰石, 显著增强胶原凝胶的硬度, 并且通过调整模拟体液的沉积时间等, 可有效调节羟基磷灰石的沉积量, 有利于获得胶原 - 羟基磷灰石复合三维支架^[45-46], 为体外仿生模拟骨细胞的三维网络状结构微环境和胶原 - 羟基磷灰石复合生化微环境提供了便利.

人工合成的无机或有机生物材料因具有良好的生物相容性, 也成为构建骨细胞微环境的备选材料. 目前研究比较多的无机生物材料主要是生物玻璃和磷酸钙生物陶瓷. 生物玻璃的基本组成成分是 SiO_2 、 Na_2O 、 CaO 和 P_2O_5 ^[47], 磷酸钙生物陶瓷主要有羟基磷灰石 (HA)、 β 磷酸三钙 (β -TCP), 以及 HA 与 β -TCP 构成的双相磷酸钙 (BCP) 等^[48-50]. 用于构建骨细胞三维培养支架, 模拟骨细胞结构微环境的有机聚合物材料种类较多, 如聚己内酯 (PCL)^[51]、聚乳酸^[52]、聚氨酯^[53]、聚乳酸 - 乙醇酸共聚物 (PLGA)^[54]、聚丙交酯、聚乙交酯及其共聚物

聚乙交酯-丙交酯 (PLGA)^[55]等。有机聚合物材料具有良好的生物相容性, 制得的多孔三维支架孔隙率适宜。利用静电纺丝技术制备的聚合物纤维丝, 具有与天然骨基质中胶原纤维相似的形态^[24, 56], 通过调整制备条件, 可以获得不同孔隙率和微观形貌的三维支架^[56]。研究者在控制和优化有机聚合物材料三维形貌的基础上, 采用溶剂铸造/颗粒浸出等技术手段^[57], 可获得聚合物-羟基磷灰石复合支架; 而表面带有羧基活性基团的聚合物在模拟体液中, 能够在表面形成羟基磷灰石沉积层^[56, 58]。人工合成的无机和有机材料均不含胶原及非胶原等蛋白, 在生化组成上与骨组织存在显著差异。然而生物玻璃、生物陶瓷, 以及有机聚合物材料具有良好的生物相容性, 能够促进细胞黏附和增殖^[48, 52-53], 且能够采用特殊的工艺制成不同孔径和孔隙率的三维多孔结构, 在骨细胞结构微环境模拟方面具有显著优势^[48, 59]。

2.2 力学微环境模拟技术

骨细胞作为骨组织含量最丰富的细胞, 承载着骨重建平衡调节、机体矿物质代谢调节、内稳态调节等诸多重要功能^[2-3], 而其生理功能的发挥离不开对周围力学微环境变化的感知与响应。在模拟骨细胞结构微环境和生化微环境的基础上, 构建力学微环境, 是体外骨细胞仿生培养和结构功能研究的必经之路。研究者采用力学加载装置和生物反应器, 分别构建了骨细胞的主要力学微环境——应力和流体剪切力微环境, 为在接近体内条件下深入研究骨细胞的结构和功能提供了有效的技术方法。

体内骨组织因拉伸或压缩产生不同程度的应变, 对生长于其中的骨细胞产生应力刺激。体外构建骨细胞应力微环境, 即在仿生三维培养基础上, 采用集成于培养系统的力学加载仪, 对三维培养支架施加可控的拉伸或压缩应力 (图 3a)^[60-61]。Bose Electroforce systems 公司生产的“整形外科生物动力腔” (Orthopaedic BioDynamic™ Chamber) 是一种较常采用的动力学加载装置^[53], 该装置既能够同普通生物反应器一样, 使细胞仿生三维培养支架保持在培养液环境中, 又可以同标准力学测试仪一样, 对细胞培养支架施加动态拉伸或压缩应力, 为骨细胞应力微环境模拟提供了有效的方法。

骨组织应变引发骨陷窝-骨小管网络系统中液体流动产生的流体剪切力, 是骨细胞发挥力学感知和响应功能的另一个重要的力学微环境^[30]。利用特殊的流体加载系统, 能够在三维培养支架不发生应

变的情况下, 构建流体剪切力微环境, 单独研究流体剪切力效应, 有助于分别获得流体剪切力效应和应力效应数据。目前采用较多的流体剪切力微环境模拟系统主要是搅拌式生物反应器、旋壁式生物反应器和液体灌注式生物反应器 (图 3), 这三类生物反应器均能够为仿生三维培养的骨细胞提供良好的养分供给和代谢废物排除功能, 保证三维环境中骨细胞活性和功能的正常发挥, 并提供特定的流体剪切力微环境, 表 2 比较了这三类生物反应器的主要参数。搅拌式生物反应器结构简单 (图 3b), 仿生三维培养支架通过悬臂悬挂固定于容器中, 添加足够量的培养基覆盖三维支架, 利用容器底部的磁力搅拌器带动培养基涡旋流动, 液体对流能够为三维培养的细胞有效供给养分、移除代谢产物, 同时对支架内的细胞提供流体剪切力刺激^[62]。然而由于搅拌式生物反应器固有的液体涡流特点, 使作用于支架的流体剪切力不均匀, 影响支架内部细胞分布的均匀性与受力的均一性^[63]。旋壁式生物反应器 (图 3c) 通常由两个同轴圆筒组成, 三维支架位于两个圆筒之间的环形空间中, 通过设定外部圆筒的旋转速率, 可使置于生物反应器中的三维支架处于相对平衡的位置^[63-64]。与搅拌式生物反应器相比, 旋壁式生物反应器中液体呈动态层流, 且作用的三维支架的剪切力显著减小, 然而支架内部的养分供给和氧气扩散仍然受到限制^[63]。液体灌注式生物反

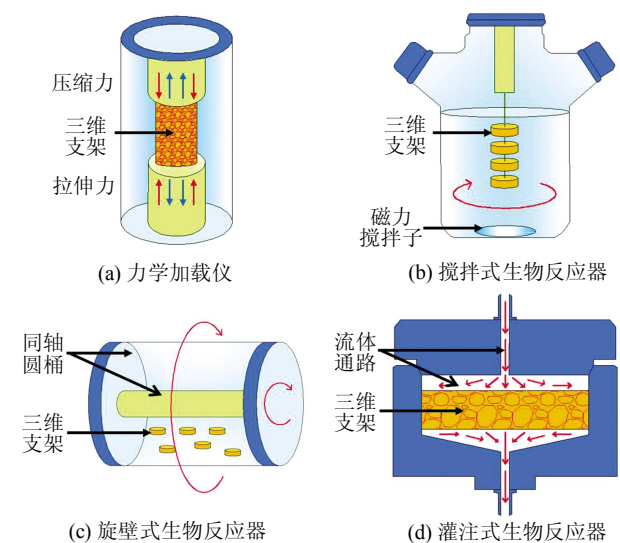


Fig. 3 Schematics of mechanical microenvironment simulation devices for strain (a) and shear stress (b~d) loading

图 3 骨细胞应力微环境 (a) 和流体剪切力微环境 (b~d) 模拟装置示意图

反应器(图 3d)利用微量注射泵为仿生三维支架提供液流,液体能够流经支架内部,通过对流与扩散为支架内部的细胞提供养分,并能保证充足的氧气供给^[63].严格控制流体通路和灌注流速,能够保证液体流经三维支架内部,而不是从支架边缘流过,有利于实现剪切力的稳定控制.此外,调整流体的流

速、黏度等,可以调整作用于细胞的剪切力大小,而改变流体的供给方式,为仿生三维培养的细胞提供恒定流或振荡流,能更有效地模拟骨细胞的流体剪切力微环境^[65-67].液体灌注式生物反应器是目前应用较多的仿生三维培养骨细胞剪切力微环境模拟技术.

Table 2 Comparison of parameters in different bioreactors

表 2 不同生物反应器的参数比较

生物反应器类型	流体提供方式	溶质传输方式	液流方向	剪切力
搅拌式	通过磁力搅拌提供液流	对流	涡流	大 不均一
旋壁式	通过按一定转速旋转提供液流	对流	层流	小 均一性较好
灌注式	通过微量注射泵提供液流	对流与扩散	层流 (恒定流或振荡流)	大小可控 均一性较好

3 结语与展望

骨细胞结构与功能的发现和阐释经历了漫长而曲折的研究历程.骨细胞体外培养和研究方法的发展以及骨样细胞系的建立,使得这一深埋于骨基质中的特殊细胞的功能逐渐被揭示,尤其是近 20 年的发展更加丰富了我们对骨细胞功能的了解.然而至今为止,对骨细胞的认知仍然不全面.未来 10 年或 20 年,能否发现骨细胞新的生物学功能?能否阐明骨细胞发挥功能的分子机制,为骨质疏松等骨科疾病的防护和治疗提供有效的建议,为骨组织工程和再生医学的发展提供新思路和新方法?诸多问题摆在研究者的面前.我们认为,进一步发展骨细胞的体外仿生培养和研究技术,将会为骨基础生物学、骨组织工程和再生医学的发展开拓新的研究思路,提供新的研究平台.

骨细胞结构和生化微环境模拟是骨细胞仿生培养和研究的前提与基础, I 型胶原蛋白与羟基磷灰石构成的复合三维支架,在模拟骨细胞的三维网络状结构微环境和蛋白质-羟基磷灰石复合生化微环境方面具有显著的优势.人工合成的无机和有机生物材料,具有可控的三维形貌和孔隙率,也成为骨细胞三维培养的可选材料,但是由于其生化组成与骨基质存在显著差异,在骨细胞生化微环境模拟方面存在不足.改善制备工艺和选择合适的材料,制备有机-无机复合支架,有望克服生化组成的不足,促进骨细胞的黏附生长和微环境的仿生模拟.

在结构和生化微环境仿生模拟基础上实现骨细胞三维培养,并采用具有特殊功能的力学加载系统或生物反应器,为细胞提供应力或流体剪切力等力学微环境,将会克服在体骨细胞结构功能研究的困难,弥补传统体外二维培养的不足,获得与体内贴近的研究数据和成果.

综上所述,骨细胞结构功能的深入研究离不开新方法的引进和发展,而体外骨细胞结构、生化和力学微环境仿生模拟技术将会成为骨基础生物学和组织工程等研究领域的重要技术方法.

致谢 感谢西北工业大学空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室人员的支持.

参 考 文 献

- [1] Sheng M H, Zhou X D, Bonewald L F, *et al.* Disruption of the insulin-like growth factor-1 gene in osteocytes impairs developmental bone growth in mice. *Bone*, 2013, **52**(1): 133-144
- [2] Dallas S L, Prideaux M, Bonewald L F. The osteocyte: an endocrine cell... and more. *Endocr Rev*, 2013, **34**(5): 658-690
- [3] Bonewald L F. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, 2011, **26**(2): 229-238
- [4] Yao W, Dai W, Jiang J X, *et al.* Glucocorticoids and osteocyte autophagy. *Bone*, 2013, **54**(2): 279-284
- [5] Stern A R, Stern M M, Van Dyke M E, *et al.* Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice. *Biotechniques*, 2012, **52**(6): 361-373
- [6] Kato Y, Windle J J, Koop B A, *et al.* Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res*, 1997, **12**(12): 2014-2023

- [7] Kato Y, Boskey A, Spevak L, *et al.* Establishment of an osteoid preosteocyte-like cell MLO-A5 that spontaneously mineralizes in culture. *J Bone Miner Res*, 2001, **16**(9): 1622–1633
- [8] Woo S M, Rosser J, Dusevich V, *et al.* Cell line IDG-SW3 replicates osteoblast-to-late-osteocyte differentiation *in vitro* and accelerates bone formation *in vivo*. *J Bone Miner Res*, 2011, **26**(11): 2634–2646
- [9] Cipriano A F, De Howitt N, Gott S C, *et al.* Bone marrow stromal cell adhesion and morphology on micro- and sub-micropatterned titanium. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, **10**(4): 660–668
- [10] McMurray R J, Wann A K T, Thompson C L, *et al.* Surface topography regulates wnt signaling through control of primary cilia structure in mesenchymal stem cells. *Sci Rep*, 2013, **3**: 3545
- [11] Fu R R, Liu Q L, Song G B, *et al.* Spreading area and shape regulate apoptosis and differentiation of osteoblasts. *Biomed Mater*, 2013, **8**(5): 055005
- [12] Bacabac R G, Mizuno D, Schmidt C F, *et al.* Round versus flat: bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing. *J Biomech*, 2008, **41**(7): 1590–1598
- [13] Cukierman E, Pankov R, Stevens D R, *et al.* Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 2001, **294** (5547): 1708–1712
- [14] Hamamura K, Zhao L, Jiang C, *et al.* Hydroxyapatite modulates mRNA expression profiles in cultured osteocytes. *Cell Mol Bioeng*, 2012, **5**(2): 217–226
- [15] Wallace J M. Applications of atomic force microscopy for the assessment of nanoscale morphological and mechanical properties of bone. *Bone*, 2012, **50**(1): 420–427
- [16] Malo M K, Rohrbach D, Isaksson H, *et al.* Longitudinal elastic properties and porosity of cortical bone tissue vary with age in human proximal femur. *Bone*, 2013, **53**(2): 451–458
- [17] Bernhard A, Milovanovic P, Zimmermann E A, *et al.* Micro-morphological properties of osteons reveal changes in cortical bone stability during aging, osteoporosis, and bisphosphonate treatment in women. *Osteoporos Int*, 2013, **24**(10): 2671–2680
- [18] Carter Y, Thomas C D, Clement J G, *et al.* Femoral osteocyte lacunar density, volume and morphology in women across the lifespan. *J Struct Biol*, 2013, **183**(3): 519–526
- [19] Benalla M, Palacio-Mancheno P E, Fritton S P, *et al.* Dynamic permeability of the lacunar-canalicular system in human cortical bone. *Biomech Model Mechanobiol*, 2013, DOI 10.1007/s10237-013-0535-7
- [20] D'Emic M D, Benson R B. Measurement, variation, and scaling of osteocyte lacunae: a case study in birds. *Bone*, 2013, **57**(1): 300–310
- [21] Jacobs C R, Temiyasathit S, Castillo A B. Osteocyte mechanobiology and pericellular mechanics. *Annu Rev Biomed Eng*, 2010, **12**: 369–400
- [22] Cheung W Y, Simmons C A, You L. Osteocyte apoptosis regulates osteoclast precursor adhesion *via* osteocytic IL-6 secretion and endothelial ICAM-1 expression. *Bone*, 2012, **50**(1): 104–110
- [23] Wallace J M, Orr B G, Marini J C, *et al.* Nanoscale morphology of type I collagen is altered in the Brlt mouse model of osteogenesis imperfecta. *J Struct Biol*, 2011, **173**(1): 146–152
- [24] Barkaoui A, Chamekh A, Merzouki T, *et al.* Multiscale approach including microfibril scale to assess elastic constants of cortical bone based on neural network computation and homogenization method. *Int J Numer Method Biomed Eng*, 2013, doi: 10.1002/cnm.2604
- [25] Jang J H, Castano O, Kim H W. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**(12): 1065–1083
- [26] Verbruggen S W, Vaughan T J, McNamara L M. Strain amplification in bone mechanobiology: a computational investigation of the *in vivo* mechanics of osteocytes. *J R Soc Interface*, 2012, **9**(75): 2735–2744
- [27] Nicoletta D P, Bonewald L F, Moravits D E, *et al.* Measurement of microstructural strain in cortical bone. *Eur J Morphol*, 2005, **42**(1–2): 23–29
- [28] Nicoletta D P, Moravits D E, Gale A M, *et al.* Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone. *J Biomech*, 2006, **39**(9): 1735–1743
- [29] Schneider P, Meier M, Wepf R, *et al.* Towards quantitative 3D imaging of the osteocyte lacuno-canalicular network. *Bone*, 2010, **47**(5): 848–858
- [30] Vaughan T J, Haugh M G, McNamara L M. A fluid-structure interaction model to characterize bone cell stimulation in parallel-plate flow chamber systems. *J R Soc Interface*, 2013, **10**(81): 20120900
- [31] Batra N, Burra S, Siller-Jackson A J, *et al.* Mechanical stress-activated integrin alpha 5 beta 1 induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(9): 3359–3364
- [32] Lu X L, Huo B, Park M, *et al.* Calcium response in osteocytic networks under steady and oscillatory fluid flow. *Bone*, 2012, **51**(3): 466–473
- [33] Mi L Y, Fritton S P, Basu M, *et al.* Analysis of avian bone response to mechanical loading-Part one: distribution of bone fluid shear stress induced by bending and axial loading. *Biomech Model Mechanobiol*, 2005, **4**(2–3): 118–131
- [34] Price C, Zhou X, Li W, *et al.* Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow. *J Bone Miner Res*, 2011, **26**(2): 277–285
- [35] Thi M M, Suadicani S O, Schaffler M B, *et al.* Mechanosensory responses of osteocytes to physiological forces occur along processes and not cell body and require $\alpha V\beta 3$ integrin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(52): 21012–21017
- [36] Li J, Rose E, Frances D, *et al.* Effect of oscillating fluid flow stimulation on osteocyte mRNA expression. *J Biomech*, 2012, **45**(2): 247–251
- [37] Xu L Y, Hou Z D, Wang H. Investigation of pressure loading rates on streaming potentials in bone. *Sci China Technol Sc*, 2011, **54**(6): 1376–1381

- [38] Fernández J R, Garcia-Aznar J M, Martínez R, *et al.* Piezoelectricity could predict sites of formation/resorption in bone remodelling and modelling. *J Theor Biol*, 2012, **292**: 86–92
- [39] Cheng G Z, Ge B F, Chen K M, *et al.* Sinusoidal electromagnetic fields enhance rat osteoblast differentiation and mineralization by activating nitric oxide signaling pathway. *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(4): 331–337
- [40] Jiang X L, Qiu X Z. Application of magnetic nanoparticles in tissue engineering. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(10): 1049–1055
- [41] Chan M E, Lu X L, Huo B, *et al.* A trabecular bone rplant model of osteocyte-osteoblast Co-culture for bone mechanobiology. *Cell Mol Bioeng*, 2009, **2**(3): 405–415
- [42] Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, *et al.* *In situ* imaging of the autonomous intracellular Ca^{2+} oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone. *Bone*, 2012, **50**(4): 842–852
- [43] Scully N, Evans S L, Mason D J, *et al.* Mimicking osteocytes *in vivo* using 3D collagen gels: development of a novel tool to study osteocyte biology. *Endocrine Abstracts*, 2013, **31**: 5
- [44] Vazquez M, Evans B, Evans S, *et al.* *In vitro* 3D osteoblast-osteocyte co-culture mechanical loading model. *Bone Abstracts*, 2013, **1**: 207
- [45] Nudelman F, Lausch A J, Sommerdijk N A, *et al.* *In vitro* models of collagen biomineralization. *J Struct Biol*, 2013, **183**(2): 258–269
- [46] Lausch A J, Quan B D, Miklas J W, *et al.* Extracellular matrix control of collagen mineralization *in vitro*. *Adv Funct Mater*, 2013, **23**(39): 4906–4912
- [47] Moorthi A, Vimalraj S, Avani C, *et al.* Expression of microRNA-30c and its target genes in human osteoblastic cells by nano-bioglass ceramic-treatment. *Int J Biol Macromol*, 2013, **56**: 181–185
- [48] Lin K, Xia L, Gan J, *et al.* Tailoring the nanostructured surfaces of hydroxyapatite bioceramics to promote protein adsorption, osteoblast growth, and osteogenic differentiation. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, **5**(16): 8008–8017
- [49] Wang C, Lin K, Chang J, *et al.* Osteogenesis and angiogenesis induced by porous β -CaSiO₃/PDLGA composite scaffold *via* activation of AMPK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Biomaterials*, 2013, **34**(1): 64–77
- [50] Chan Y H, Chang Y S, Shen Y D, *et al.* Comparative *in vitro* osteoinductivity study of HA and α -TCP/HA bicalcium phosphate. *Int J Appl Ceram Tec*, 2013(DOI: 10.1111/ijac.12141)
- [51] Ahn S H, Lee H J, Kim G H. Polycaprolactone scaffolds fabricated with an advanced electrohydrodynamic direct-printing method for bone tissue regeneration. *Biomacromolecules*, 2011, **12**(12): 4256–4263
- [52] Scisłowska-Czarnecka A, Pamula E, Kolaczowska E. Impact of poly(L-lactide) versus poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) on biological characteristics of fibroblasts and osteoblasts. *Folia Biol (Krakow)*, 2013, **61**(1–2): 11–24
- [53] Sittichokechaiwut A, Scutt A M, Ryan A J, *et al.* Use of rapidly mineralising osteoblasts and short periods of mechanical loading to accelerate matrix maturation in 3D scaffolds. *Bone*, 2009, **44**(5): 822–829
- [54] Lupu-Haber Y, Pinkas O, Boehm S, *et al.* Functionalized PLGA-doped zirconium oxide ceramics for bone tissue regeneration. *Biomed Microdevices*, 2013, **15**(6): 1055–1066
- [55] Deng M, Kumbar S G, Nair L S, *et al.* Biomimetic structures: biological implications of dipeptide-substituted polyphosphazene-polyester blend nanofiber matrices for load-bearing bone regeneration. *Adv Funct Mater*, 2011, **21**(14): 2641–2651
- [56] Yunos D M, Ahmad Z, Salih V, *et al.* Stratified scaffolds for osteochondral tissue engineering applications: electrospun PDLLA nanofibre coated Bioglass[®]-derived foams. *J Biomater Appl*, 2013, **27**(5): 537–551
- [57] Chuenjittkuntaworn B, Inrung W, Damrongsri D, *et al.* Polycaprolactone/Hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and *in vitro* and *in vivo* biological responses of human primary bone cells. *J Biomed Mater Res A*, 2010, **94**(1): 241–251
- [58] Charles L F, Kramer E R, Shaw M T, *et al.* Self-reinforced composites of hydroxyapatite-coated PLLA fibers: fabrication and mechanical characterization. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2013, **17**: 269–277
- [59] Fu Q, Saiz E, Rahaman M N, *et al.* Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2011, **31**(7): 1245–1256
- [60] David V, Guignandon A, Martin A, *et al.* *ex vivo* bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Eng Part A*, 2008, **14**(1): 117–126
- [61] Di Federico E, Bader D L, Shelton J C. Design and validation of an *in vitro* loading system for the combined application of cyclic compression and shear to 3D chondrocytes-seeded agarose constructs. *Med Eng Phys*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.medengphy.2013.11.007>
- [62] Yeatts A B, Fisher J P. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone*, 2011, **48**(2): 171–181
- [63] Salehi-Nik N, Amoabediny G, Pouran B, *et al.* Engineering parameters in bioreactor's design: a critical aspect in tissue engineering. *Biomed Res Int*, 2013, **2013**: 762132
- [64] Nishi M, Matsumoto R, Dong J, *et al.* Engineered bone tissue associated with vascularization utilizing a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res A*, 2013, **101**(2): 421–427
- [65] Shakeel M, Matthews P C, Graham R S, *et al.* A continuum model of cell proliferation and nutrient transport in a perfusion bioreactor. *Math Med Biol*, 2013, **30**(1): 21–44
- [66] Gharravi A M, Orazizadeh M, Hashemitabar M, *et al.* Design and Validation of perfusion bioreactor with low shear stress for tissue engineering. *J Med Biol Eng*, 2013, **33**(2): 185–192
- [67] Partap S, Plunkett N A, Kelly D J, *et al.* Stimulation of osteoblasts using rest periods during bioreactor culture on collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*, 2010, **21**(8): 2325–2330

Technologies for Bionic Simulation of Osteocyte Microenvironment*

REN Li, HU Hui-Yun, QIAN Ai-Rong, SHANG Peng**

(Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, School of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract Osteocyte is the most important functional cell type in osseous tissue, which is vital in response to mechanical stimuli, bone remodeling, mineral metabolism and homeostasis. Lacuna-canalicular networks serve as the fundamental structural microenvironment for osteocyte residing in and functioning. The rigid bone matrix mainly composed of type- I collagen and hydroxyapatite provides the biochemical microenvironment for osteocyte adhesion and interaction with other cells and extracellular matrix. It is also accepted that the surrounding mechanical microenvironment is vital for osteocyte. Furthermore, due to the sensitive dependence on the surrounding environment, osteocyte will be greatly influenced by the changes of surrounding microstructures, biochemical components and mechanical stimulations. The microenvironment surrounding osteocyte is therefore of crucial importance to both elucidating the mechanism of mechanical perception and discovery of new biological functions. However, the complicated lacuna-canalicular network surrounded by rigid bone matrix makes the study of osteocyte *in vivo* technically difficult. It can be of great significance to reconstruct bionic microenvironment *in vitro* for further revealing the functions of osteocyte. The systematic introduction of structural, biochemical and mechanical microenvironment surrounding osteocyte was presented here, and the recent technologies for simulation of bionic microenvironment *in vitro* were also reviewed. This review will provide a useful reference for researchers who are interested in osteology, tissue engineering and regenerative medicine.

Key words osteocyte, structural microenvironment, biochemical microenvironment, mechanical microenvironment, bionic simulation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00515

* This work was supported by grants from The China Postdoctoral Science Foundation (2013M532083) and Northwestern Polytechnical University Foundation for Fundamental Research (3102014JKY15003).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-88460391, E-mail: shangpeng@nwpul.edu.cn

Received: January 27, 2014 Accepted: May 5, 2014