

静态单轴拉伸应变刺激对细胞 有丝分裂方向的影响*

王 婧¹⁾ 胡青华¹⁾ 米 强¹⁾ 赵 磊¹⁾ 周军年²⁾
秦立蓬²⁾ 杨 春^{1)**} 王韞芳^{2)**} 庄逢源¹⁾

(¹⁾北京航空航天大学生物工程系, 北京 100083; ²⁾军事医学科学院输血研究所, 北京 100850)

摘要 力学刺激对细胞发育具有重要意义, 它如何对细胞分化及组织形态的发生产生影响是一个尚未完全阐明的问题. 细胞的有丝分裂过程与细胞增殖、分化以及胚胎发育、组织器官形态形成和损伤组织的修复再生等特性密切相关, 例如, 细胞的有丝分裂方向就是影响细胞极性分化, 乃至组织形态发生的因素之一. 那么, 力学刺激是否通过改变细胞有丝分裂方向从而影响细胞的分裂分化呢? 以小鼠成骨细胞系 MC3T3 为模型, 探讨了静态单轴拉伸应变刺激对细胞形态、应力纤维排布方向和有丝分裂方向的影响. 结果显示, 在 4% 及 8% 静态单轴拉伸应变条件下, 48 h 之内细胞形态发生明显变化, 细胞呈梭状, 长轴沿应变方向排列, 细胞骨架微丝呈束状平行排列, 方向与应变方向相关. 统计学分析表明, 4% 应变刺激 48 h 后、8% 应变 6 h 后、8% 应变 12 h 后、8% 应变 24 h 后, 及 8% 应变 48 h 后, 分别有 49%, 43%, 54%, 54%, 和 62% 的细胞应力纤维排列方向与单轴拉伸应变方向的夹角在 30° 以内, 以及 50%, 48%, 56%, 53% 和 62% 的细胞有丝分裂方向与单轴应变方向夹角在 30° 以内. 统计学分析表明, 细胞形态、应力纤维排布及有丝分裂方向与拉伸方向相关, 且应力纤维排列方向和有丝分裂方向之间呈现高的相关性, 这种相关性在拉伸刺激 48 h 后表现很明显, 由此推测, 存在力学刺激影响细胞形态及细胞应力纤维排布方向, 控制有丝分裂方向的机制.

关键词 有丝分裂, 应力纤维, 单轴静态拉伸, MC3T3

学科分类号 Q2, Q66

力学刺激普遍存在于生物体内, 许多实验表明, 力学刺激对多种细胞的形态、增殖、发育和组织的功能都有影响, 如, 周期性应变可影响细胞形态, 导致细胞骨架重排^[1], 不同的应力刺激可导致骨髓间充质干细胞分化方向改变^[2], 周期性加载可影响组织工程软骨中细胞增殖等^[3]. 但力学刺激对生命过程的影响及其机制仍远未阐明.

细胞的增殖、分化以及胚胎发育、组织器官形态形成和损伤组织的修复都与细胞的有丝分裂过程密切相关. 有丝分裂不仅使细胞数量得到增殖, 其方向性 also 具有重要意义. 近年来, 有关有丝分裂方向的研究越来越受到关注. 例如: 具有极性的细胞通过控制有丝分裂方向使子代细胞分裂成两个相同的细胞(对称分裂)实现细胞的增殖, 或者分裂成两个具有不同功能的子代细胞(不对称分裂)控制细胞的分化^[4]. 多种组织(如皮肤、小肠等)的干细胞在分裂过程中通过保持子代细胞干性或启动分化, 来

保持其增殖与分化的平衡^[5]. Wallenfang 等^[6~8]认为, 对于干细胞而言, 不对称分裂(asymmetric division)决定子代细胞的命运, 在某种程度上可以理解为, 有丝分裂方向规定了干细胞的极性分化. 另一方面, 细胞的对称分裂过程中有丝分裂方向关系到细胞增殖及其排列的方向, 从而对组织的形态形成具有重要意义^[9]. 因此, 细胞有丝分裂的方向在发育生物学中是非常值得深入研究的问题. 目前已知的影响有丝分裂方向的因素有: 酵母细胞的有丝分裂方向受到细胞内微丝排列方向的调控^[10]; 小鼠受精卵的形状可调控其后的有丝分裂方向^[11]; 细

* 国家自然科学基金(10402002, 30671098)和高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金(200356)资助项目.

** 通讯联系人.

杨春. Tel: 010-82339422-1004, E-mail: yangchun@buaa.edu.cn

王韞芳. Tel: 010-66931974, E-mail: wangyf1972@gmail.com

收稿日期: 2007-07-10, 接受日期: 2007-09-12

胞外基质的分布可诱导细胞有丝分裂方向^[12]等. 决定细胞有丝分裂方向的是某种因素诱导及一系列分子事件^[13], 但究竟哪些因素能够影响或者诱导有丝分裂方向的确定尚不完全清楚.

普遍存在于生物体内的力学环境能否对细胞有丝分裂方向产生影响, 继而影响组织形态的发生和损伤修复过程? 这是个值得探究的问题. 该问题的阐明将有助于深入理解力学刺激在胚胎发育、组织修复、干细胞分化等过程中的影响. 本文采用改进的单轴应变拉伸装置对小鼠成骨细胞系 MC3T3 细胞施加特定方向的不同强度的力学刺激, 观察了 MC3T3 细胞对力学信号诱导的响应, 探讨了在单轴拉伸应变作用下细胞有丝分裂方向与单轴拉伸应变的关系问题, 为研究力学信号对细胞有丝分裂的影响提供了理想的细胞模型.

1 材料与方法

1.1 单轴拉伸装置

本实验所采用的单轴拉伸装置是在 Paul Sung

等^[14]提供的等双轴拉伸装置^[15]基础上改造而来. 拉伸装置原理如图 1 所示, 该装置由旋转装置(screw top), 拉伸室外壁(culture wall), 推进压头装置(indenter), 弹性硅胶膜, 橡胶圈构成. 弹性硅胶膜通过橡胶圈固定于拉伸室外壁上. 旋转装置带动推进装置作用于硅胶膜上, 使硅胶膜产生等双轴拉伸应变. 旋转装置每旋转一圈在硅胶膜上造成的应变为 4%. 本实验选用细条状硅胶膜(0.6 cm)衬于拉伸装置原有的整块膜之上, 两端固定于拉伸室外壁, 则在推进装置推进时该细条状硅胶膜内产生单轴拉伸应变. 实验时施加应变之后应保证细条状硅胶膜与整块硅胶膜之间有相对滑移, 以避免由于两块膜粘连造成的细条状硅胶膜的侧向应变. 条状硅胶膜的应变状态通过实验测量得出: 在条状硅胶膜上均匀撒若干橡胶小珠, 由于亲和力很强, 橡胶小珠和硅胶膜粘在了一起, 通过显微成像测量施加应变前后三个小珠的位移得到硅胶膜的实际应变. 旋转装置旋转一圈, 沿着条状膜长轴方向的应变约为 4%, 而垂直于长轴方向的应变约为 0.2%. 如图 1 所示.

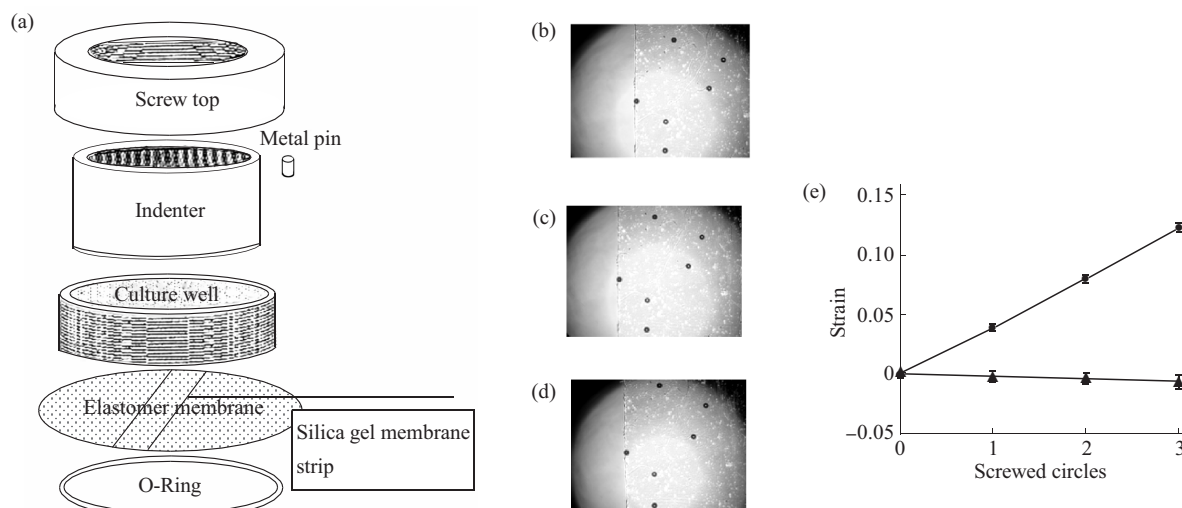


Fig. 1 The uniaxial stretch device

(a) Illustration of the uniaxial stretch device. The elastomer membrane was sealed to the culture well by the O-Ring. Screw top stretches the silicon membrane via driving the indenter. A rectangular strip of silicon membrane with the width of 0.6 cm was lined on the full size silicon sheeting. The two ends of the rectangular membrane were fixed on the indenter. When the indenter was screwed out, the strip then experienced a uniaxial strain. It is important to avoid the adhesion between the two membranes since the adhesion can induce lateral strain of the strip. Microcarrier beads were scattered on the strip, and then the displacement of the beads before and after applying stretch was measured from the microscope image. (b), (c), (d) corresponding to the image of the microcarrier beads before stretch, screw top screwed for one circle and two circle, respectively. (e) The measured strain on the rectangular silica gel strip. ●—●: In the stretch direction; ▲—▲: In the direction vertical to stretch.

1.2 药品、试剂和设备

高糖 DMEM 培养基和胎牛血清(Gibco 公司); 牛血清白蛋白、胰蛋白酶和 DAPI(Sigma 公司); 罗丹明 - 鬼笔环肽(Rhodamin-phalloidin, Molecular Probes 公司); 100 μ m 硅胶微珠(Solohill 公司); 倒置荧光显微镜(日本 Olympus71X).

1.3 细胞培养

小鼠成骨样细胞系 MC3T3 细胞按 5×10^4 /ml 接种于经高压灭菌的拉伸装置上. 细胞生长 24 h 后对硅胶膜施加单轴静态拉伸应变. 分别观察拉伸应变量为 4% 时 48 h 后, 拉伸应变量为 8% 时 6 h、12 h、24 h 及 48 h 后细胞应力纤维排布及有丝分裂

方向. 由于应力纤维与有丝分裂方向会受到细胞与细胞外基质之间及细胞之间的相互作用影响, 因此在培养细胞过程中, 细胞接种密度尽量低, 以便选取独立生长的细胞进行观察和统计.

1.4 细胞微丝及细胞核荧光标记

细胞经 3.7% 多聚甲醛室温固定 10 min 后, 以 0.1% Triton-X-100 作用 5 min 破膜, 1% BSA 封闭 30 min 后, 加入罗丹明 - 鬼笔环肽荧光标记物, 室温作用 30 min. PBS 冲洗 3 次. 加入 1:100 稀释 DAPI 溶液避光作用 10 min, 上机待测. 在荧光显微镜下以 554 nm 和 490 nm 激发并观察.

1.5 统计学分析

选取独立生长的细胞进行细胞骨架微丝和细胞核的观测, 以有丝分裂中期至末期的细胞核连心线或者赤道板的中垂线确定细胞有丝分裂方向, 采用手工方法在拍摄到的细胞图片上标出应力纤维的主方向及有丝分裂方向, 采用“书童量角器”软件测量出有丝分裂方向、应力纤维方向与拉伸应变方向之间的夹角. 夹角的统计方法采用 Thery 等^[12]统计细胞有丝分裂方向的方法. 按夹角的大小将所有拍摄到的分裂期细胞分成 3 组: 组 I, $0^{\circ} \sim 30^{\circ}$; 组 II, $30^{\circ} \sim 60^{\circ}$; 组 III, $60^{\circ} \sim 90^{\circ}$, 统计各组的细胞数量并在极坐标系中绘制柱状图, 当统计的细胞数量足够多, 即样本量足够大时, 柱状图就反应了夹角在上述 3 个范围内的概率分布.

2 实验结果

2.1 单轴静态拉伸应变条件下细胞形态的变化

图 2 为接种在硅胶膜上无拉伸时和处于 8% 单

轴拉伸状态下 12 h 后的典型的细胞相衬照片. 从图 2 中可以看出无拉伸时接种于硅胶膜上的细胞呈短梭形和不规则形状, 排列比较杂乱, 无一定规律. 而 8% 应变拉伸状态下, 细胞主要呈长梭状, 且其主轴与拉伸方向比较一致.

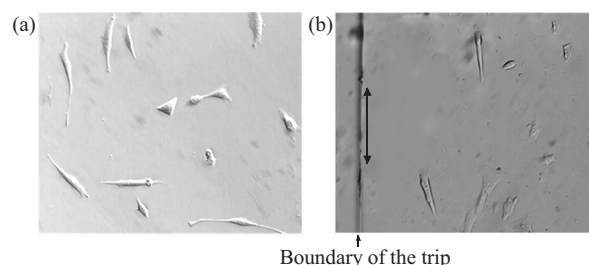


Fig. 2 Representative images (x10) of the morphology change induced by uniaxial stretch

(a) Cultured cells without stretch. The long axial of the cells distributed randomly. (b) The long axial of most cells under 8% static uniaxial stretch were parallel to the stretch direction. The line with the arrowhead shows the stretch direction.

2.2 单轴拉伸状态下细胞应力纤维的排布

实验通过观察单轴应变刺激下的细胞并进行 F-actin 的荧光染色, 用 554 nm 波长激发鬼笔环肽. 如图 3 所示, 细胞在未受到拉伸时, 细胞微丝沿着细胞边缘成束排列, 微丝束之间并不平行. 相反, 在单轴拉伸状态下, 接种在硅胶膜上的细胞微丝骨架呈束状排列, 排列方向与应变方向相关. 为了避免细胞之间的相互接触和作用影响应力纤维排列方向, 实验选取应变量为 4% 和 8% 的硅胶膜上单独生长的细胞作为统计对象, 在 6 h、12 h、24 h 及 48 h 4 个时间点分别统计了: 142 个细胞(第 1

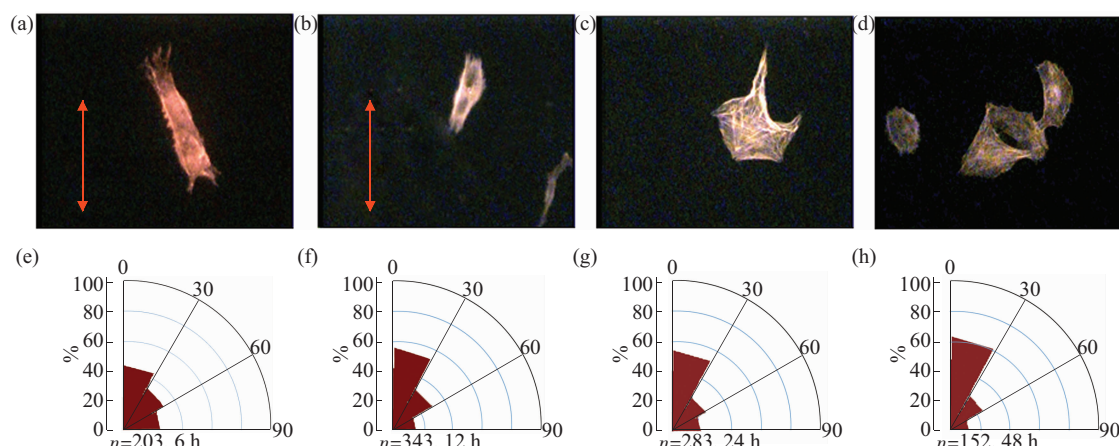


Fig. 3 Representative fluorescence image (x20) of stress fibers with or without 8% strain

(a), (b) Representative fluorescence images of stress fiber of the cells under 8% strain. The arrowheads indicate the stretch direction. (c), (d) The stress fibers images of the cells under no stretch stimuli. (e)~(h) The distribution of the angle of stress fiber alignment to the stretch direction under 8% static uniaxial strain. (e), (f), (g), (h) Corresponding to 6 h, 12 h, 24 h and 48 h.

组 4%应变 48 h), 203 个细胞(第 2 组 8%应变 6 h), 343 个细胞(第 3 组 8%应变 12 h), 283 个细胞(第 4 组 8%应变 24 h), 152 个细胞(第 5 组 8%应变 48 h). 经过统计得到细胞应力纤维排列方向与单轴拉伸应变方向夹角的概率分布规律. 统计结果表明, 第 1 至 5 组分别有 49%, 43%, 54%, 54%, 62%的细胞应力纤维排列方向与单轴拉伸应变方向(即图 3 中标注出来的方向)的夹角在 30° 以内, 即出现在组 I 中的频度(概率密度)明显高于出现在组 II 以及组 III 范围内的频度. 其中第 2 至 4 组(8%应

变量)的统计结果绘于图 3.

2.3 单轴拉伸条件下的细胞有丝分裂方向

经过染色观察及相衬照片观察, 5 个实验组中分别获得 142 个, 212 个, 231 个, 206 个, 和 123 个处于分裂中期至末期的细胞. 图 4 给出了有丝分裂后期的细胞典型的相衬图和荧光染色图. 此外本实验通过连续拍摄得到了一个处于胞质分裂期的细胞分裂过程照片, 如图 5 所示. 由于缩聚环的方向与有丝分裂方向垂直, 因此在类似的照片中可以通过细胞缩聚环方向确定细胞有丝分裂方向.

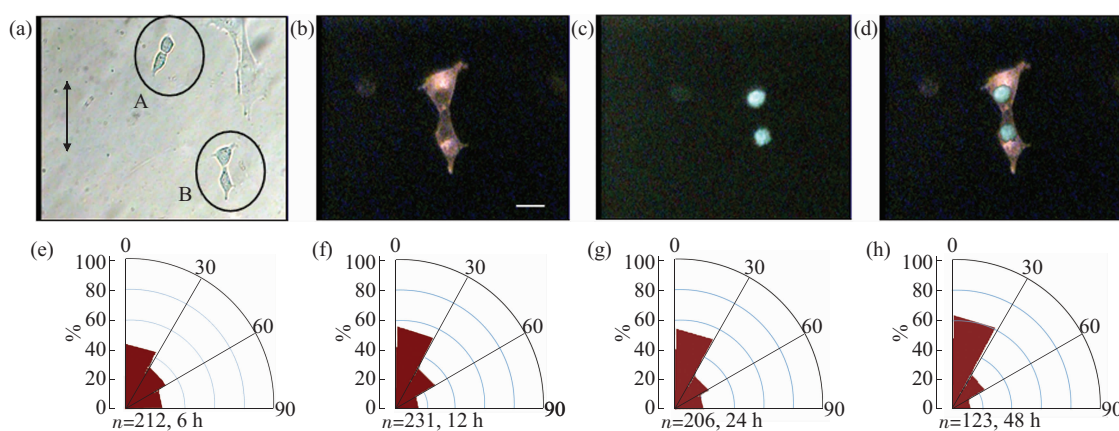


Fig. 4 Representative image ($\times 20$) of a cell in mitosis under 8% strain and the distribution of the angle of cell division direction to the stretch direction

(a), (b) were pictures of a same cell. (a) A light image ($\times 10$) of two dividing cells, A and B, in their telophase. The arrowhead shows the stretch direction. Cell A was washed out in the subsequent fixing and dyeing process. (b) Fluorescence image of stress fibers of the cell B. (c) Nuclei of the dividing cell B. (d) Merged image of stress fiber and nuclei. (e)~(h) The distribution of the angle of cell division direction to the stretch direction under 8% static uniaxial strain. (e), (f), (g), (h) Corresponding to 6 h, 12 h, 24 h and 48 h.

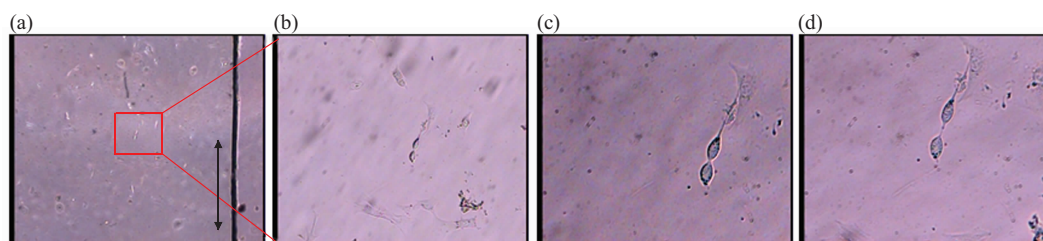


Fig. 5 Image of a cell in its telophase

This series of photos show a cell dividing in the telophase within 30 min. The edge of the rectangular silica gel strip is shown in (a). The stretch is along the edge of the strip. (a), (b), (c) corresponding to $\times 4$, $\times 10$, and $\times 20$ images in the same area. (d) 30 min later, the cell divided into daughter cells.

对实验中获得有丝分裂相的细胞进行有丝分裂方向统计, 得到 5 种实验状态下有丝分裂方向与拉伸应变方向夹角的概率分布规律. 4%应变静态拉伸 48 h 实验组(第 1 组)中有 50%, 8%应变静态拉伸 6 h 实验组(第 2 组)中有 48%, 8%应变静态拉伸 12 h 实验组(第 3 组)中有 56%, 8%应变静态拉伸 24 h 实验组(第 4 组)中有 53%, 8%应变静态拉伸 48 h 实验组(第 5 组)中有 62%的细胞有丝分裂方向与应变方向夹角在 30° 以内. 其中第 2 组至第 4

组的统计结果绘于图 4 中. 同样的, 细胞有丝分裂方向与应变方向夹角处在组 I 范围内的频度明显高于处在组 II, 以及组 III 范围内的频度. 对比细胞应力纤维方向的分布规律与有丝分裂方向的分布规律, 直观上即可见二者的概率分布具有较高的一致性, 这种现象在 8%应变刺激 48 h 后最为明显. 因此, 本文选取 8%单轴静态拉伸应变刺激 48 h 之后的细胞应力纤维方向——单轴应变方向的夹角和有丝分裂方向——单轴应变方向交角的条件概率分布

规律进行了相关性分析。考虑到需要在同一个细胞中统计细胞的有丝分裂方向和应力纤维的排列方向，因此选取有丝分裂后期缩缢环出现之前的细胞进行分析，共统计了 50 个细胞。结果表明，应力

纤维排列方向落在组 I 范围内的细胞的有丝分裂方向也大多落在组 I 范围内，落在组 II 和组 III 中的细胞也是如此。因此可得出结论：应力纤维方向与有丝分裂方向呈现很高的相关性，如表 1 所示。

Table 1 The relativity between the stress fiber alignment and the mitosis orientation

The angle of stress fiber alignment to the stretch direction	Number of the cells			Total
	Group I (0°~30°) ¹⁾	Group II (30°~60°) ¹⁾	Group III (60°~90°) ¹⁾	
Group I (0°~30°)	34	2	0	36
Group II (30°~60°)	1	9	0	10
Group III (60°~90°)	0	1	3	4
Total	35	12	3	50

¹⁾ The angle of mitosis orientation to the stretch direction.

3 讨 论

本文对无拉伸应变及单轴静态应变拉伸条件下的细胞进行了形态学观察，其中未拉伸状态下的细胞呈短梭形或不规则形状，排列杂乱无规律，单轴静态拉伸应变情况下，细胞呈现长梭形改变，细胞的长轴与外界应变方向呈明显的相关性。

为了避免细胞之间的相互接触和作用影响应力纤维排列方向，实验选取 4% 及 8% 拉伸状态的硅胶膜上单独生长的细胞作为统计对象。细胞骨架荧光染色实验表明，细胞应力纤维聚合成束状排列，束与束的排列方向大致相同，形成一个方向主轴。分别对 5 个实验组中观测到的 142 个(第 1 组 4% 应变 48 h)，203 个(第 2 组 8% 应变 6 h)，343 个(第 3 组 8% 应变 12 h)，283 个(第 4 组 8% 应变 24 h)，152 个(第 5 组 8% 应变 48 h)单独生长的细胞的应力纤维排布方向进行统计，得到分别有 49%，43%，54%，54%，62% 的细胞的应力纤维主轴方向与单轴应变方向夹角在 30° 以内。夹角处在组 I 范围内的频度(概率密度)明显高于组 II 以及组 III 范围内的频度，提示细胞的应力纤维排列方向与外加应变方向呈现较高的一致性。自施加单轴拉伸应变刺激 6 h 起，细胞的形态以及应力纤维的排列方向对应变刺激有响应。5 组数据对比说明，在 48 h 之内，细胞应力纤维排列方向与应变方向的一致性与施加在细胞上的单轴静态拉伸应变具有量效和时效性。

虽然多种细胞，如韧带成纤维细胞、静脉平滑肌细胞，在体内沿着应力方向排列，但体外实验表明，这些细胞在周期性单轴交变应变的作用下，细胞长轴和应力纤维的排列方向出现与应变方向相垂

直的改变^[16,17]。本文利用静态单轴拉伸应变诱导 WC3T3 细胞系，发现在静态拉伸应变的刺激下单独生长的细胞长轴、应力纤维排列方向与应变方向一致。细胞对外加力学刺激会做出相应的响应和调整，提示细胞的排列方式与细胞所受的应力、应变类型相关。

Hirai 等^[18]在体外诱导乳腺细胞团产生有方向性的分支结构(如乳腺导管结构)，并推测与有丝分裂纺锤体轴的定位有关，细胞有丝分裂方向被认为是控制组织三维形态(如管腔结构)形成的重要因素之一，因此深入分析有丝分裂方向的影响因素有重要意义。实验通过观察和收集单轴应变装置中有丝分裂中期至末期的细胞，统计得出有丝分裂方向的概率分布规律：细胞有丝分裂方向与应变方向夹角处在组 I 内的频度明显高于组 II 以及组 III 范围内的频度。与未加应变刺激的对照组(数据未在本文给出)对比表明，细胞的有丝分裂方向与外加应变方向呈现较高的一致性。

统计数据显示，在受到 4% 静态单轴应变刺激条件下，细胞应力纤维主轴方向及有丝分裂方向与应变方向夹角在 30° 以内的细胞百分数低于 8% 静态单轴应变条件。在静态单轴应变为 8% 情况下，自施加应变刺激 6 h 起细胞的形态、应力纤维的排列以及有丝分裂方向对应变刺激有响应。直观地比较图 3 与图 4，可知经 8% 应变刺激不同时间的细胞有丝分裂方向与应力纤维排列方向的统计结果呈现较高的一致性，在对细胞施加静态应变刺激 48 h 之后，这种一致性最为明显。因此本文对该组细胞的应力纤维方向——单轴应变方向的夹角和有丝分裂方向——单轴应变方向夹角的条件概率分布

规律进行了相关性分析. 分析结果证实应力纤维排列方向与细胞有丝分裂方向一致性高. 一般认为应力、应变刺激可通过细胞骨架直接传导至细胞内部, 导致细胞微丝骨架重排, 细胞骨架重排之后细胞对应力刺激产生适应. 因此, 静态的单轴应变刺激下, 细胞对应力本身的响应出现在刺激早期. 本实验结果表明, 应力纤维方向——单轴应变方向的夹角和有丝分裂方向——单轴应变方向夹角在静态应变刺激 48 h 之后仍然保持很高的一致性, 提示有丝分裂方向的确定不是受到外加应力的直接影响, 应力纤维的排列方向与细胞有丝分裂方向之间可能存在内在联系.

人们一度认为, 微管和肌动蛋白微丝是在有丝分裂的不同时期发挥作用: 微管与纺锤体形成有关, 而微丝参与缩聚环的形成与胞质分裂有关. 但是近年来的一些实验结果提示, 微丝在纺锤体定位即有丝分裂方向的确定过程中也发挥了一定的作用: 例如, Palmer 等^[10]和 Hwang 等^[19]证明, 酵母细胞的有丝分裂方向受到细胞内微丝排列方向的调控, Rosenblatt 等^[9]证明中心粒的分离和定位依赖于应力纤维的主要成分之一肌球蛋白 II. 实际上, 理论分析说明存在应力纤维(由肌动蛋白纤维和肌球蛋白 II 构成)排列方向影响有丝分裂方向的可能性, 原因如下: 应力纤维被认为是细胞中保持细胞形态、承受外力的结构, 它承受一定的预应力^[20]. 从理论上讲, 细胞沿着应力纤维排布方向发生有丝分裂消耗的能量最低, 因此应力纤维排列方向影响细胞有丝分裂方向的推测具有合理性. 但是从国内外的文献报道来看, 体外培养的贴壁细胞的有丝分裂方向对细胞形状及应力纤维排列的依赖型报道不多, 主要是因为贴壁细胞的应力纤维、细胞形状等性质较难控制^[12]. 而本研究利用应力、应变可诱导细胞应力纤维呈现具有主轴方向的束状平行排列的性质, 为研究应力纤维对细胞有丝分裂方向的影响, 建立了一个简便有效的模型. 结果表明, 细胞在受到单轴静态应变拉伸刺激时应力纤维排布方向与应变方向趋于一致, 细胞有丝分裂方向与应变刺激方向也保持高程度的一致. 该结果再次支持了有丝分裂方向与应力纤维排列方向相关这一推论.

本文的研究结果表明, 静态单轴拉伸应变可影响细胞有丝分裂方向. 这启发我们深入探讨在体细胞所处的力学环境对有丝分裂是否具有影响. 哺乳动物体内的力学环境普遍存在, 并且多样、复杂. 不仅应力、应变的大小可能对细胞产生影响, 应

力、应变随时间和空间的变化率也可能对细胞产生影响. 在体细胞往往处于交变应力/应变作用下, 因此研究交变应力下细胞有丝分裂方向的确定, 有助于进一步深入理解力学环境对有丝分裂方向及相关的组织形态发生, 损伤修复等过程的影响. 此外, 静态单轴拉伸应变通过何种方式影响了有丝分裂方向, 应力纤维排列方向与有丝分裂方向之间的内在联系值得进一步设计实验进行研究.

致谢 本文是在军事医学科学院输血研究所裴雪涛教授的支持和鼓励下完成, 文章作者对他的帮助和与其进行的有益讨论表示感谢.

参 考 文 献

- 1 Scholey G C, Orr A W, Novak I, *et al.* Model of coupled transient changes of Rac, Rho, adhesions and stress fibers alignment in endothelial cells responding to shear stress. *Journal of Theoretical Biology*, 2005, **232**(4): 569~585
- 2 Park J S, Chu J S F, Cheng C. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotech & Bioeng*, 2004, **88**(3): 359~368
- 3 Mauck R L, Soltz M A, Wang C C B, *et al.* Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biochem Eng*, 2000, **122** (6): 252~260
- 4 Kusch J, Liakopoulos D, Barral Y. Spindle asymmetry: a compass for the cell. *Trends in Cell Biology*, 2003, **13**(11): 562~569
- 5 Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*, 2005, **437**(9): 275~280
- 6 Wallenfang M R, Matunis E. Orienting stem cells. *Science*, 2005, **301**(9): 1490~1491
- 7 Zigman M, Cayouette M, Charalambous C, *et al.* Mammalian inscuteable regulates spindle orientation and cell fate in the developing retina. *Neuron*, 2005, **48**: 539~545
- 8 Yamashita Y M, Jones D L, Fuller M T. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science*, 2003, **301**(12): 1547~1550
- 9 Rosenblatt J, Cramer L P, Baum B, *et al.* Myosin II -dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell*, 2004, **117**(4): 361~372
- 10 Palmer R E, Sullivan D S, Huffaker T, *et al.* Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 1992, **119**: 583~593
- 11 Gray D, Plusa B J, Piotrowska K, *et al.* First cleavage of the mouse embryo responds to change in egg shape at fertilization. *Curr Biol*, 2004, **14**: 397~405
- 12 Thery M, Racine V, Pepin A, *et al.* The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**(10): 947~953
- 13 Ahringer J. Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, **15**(1): 73~81
- 14 Hsieh A H, Tsai C M, Ma Q J, *et al.* Time-dependent increases in

- type- III collagen gene expression in medical collateral ligament fibroblasts under cyclic strains. *J Orthop Res*, 2000, **18**(2): 220 ~ 227
- 15 Lee A A, Delhaas T, Waldman L K, *et al.* An equibiaxial strain system for cultured cells. *Am J Physiol*, 1996, **271**(4 Pt 1), C1400 ~ 1408
- 16 Kurpinski K, Chu J, Hashi C, *et al.* Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(44): 16095 ~ 16100
- 17 Neidlinger-Wilke C, Grood E, Claes L, *et al.* Fibroblast orientation to stretch begins within three hours. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002, **20**(5): 953 ~ 956
- 18 Simian M, Hirai Y, Navre M, *et al.* The interplay of matrix metalloproteinases morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development*, 2001, **128**(16): 3117 ~ 3131
- 19 Hwang E, Kusch J, Barral Y, *et al.* Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J Cell Biol*, 2003, **161**(3): 483 ~ 488
- 20 Ingber E. Cellular tensegrity define new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci*, 1993, **104**(3): 613 ~ 627

Static Uniaxial Stretch Affect The Cell Mitosis Orientation*

WANG Jing¹⁾, HU Qing-Hua¹⁾, MI Qiang¹⁾, ZHAO Lei¹⁾, ZHOU Jun-Nian²⁾, QIN Li-Peng²⁾,
YANG Chun^{1)**}, WANG Yun-Fang^{2)**}, ZHUANG Feng-Yuan¹⁾

(¹⁾Department of Bioengineering, BeiHang University, Beijing 100083, China; ²⁾Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Cell division is one of the key roles in cell development, cell differentiation, embryogenesis and recovery of tissues. As a frequent stimulus, stress (or strain) plays an important role in the differentiation of the cells, morphology generation and function development of tissues. However, this stimulus was not studied enough. A uniaxial static stretch device was used to investigate the influence of a uniaxial stress on stress fibers and spindle orientation of cultured Murine osteoblast line (MC3T3). The cells were seeded for 24 h on a thin rectangular silicon membrane in the uniaxial device before the static uniaxial stretch was applied to them. Five groups of the cells experiencing 4% strain for 48 h, 8% strain for 6 h, 8% strain for 12 h, 8% strain for 24 h, and 8% strain for 48 h were observed. After the stretching, the cells were incubated in fluorescent rhodamine-conjugated phalloidin and DAPI staining solution for 30 min. The stress fiber alignment and the cell division directions of the cells were recorded by CCD camera with an inverted fluorescent microscope (Olympus 71X) equipped with a green filter (554 nm). In fact, the cells that were growing individually were counted because the interaction between cells may influence the cell alignment and the mitosis orientation. These cells were divided into three groups, 0° ~ 30°, 30° ~ 60°, 60° ~ 90°. The cells in each group were counted, then the distribution of the cell division directions were plotted in the circular graphs. It was showed that the morphology of the cells was regulated by 4% and 8% static uniaxial strain. Within 48 h, the uniaxial stress induced the stress fibers' alignment parallel to the stress direction while a random distribution of the long axial of the cells was seen in the control group. 49%, 43%, 54%, 54%, 62% of the cells under the five experimental conditions fall into the group I (0° ~ 30°) according to the angles between the stretch directions and the stress fibers alignments. And, there are 50%, 48%, 56%, 53%, and 62% of the cells under the five stretch conditions in group I (0° ~ 30°) according to the angles between the stretch and the cell division directions. Further statistic analysis indicates that the stress fibers' orientation and mitosis orientation show high relativity. The relativity was very high even 48 h after the stretch stimulus. These results suggest that the mechanical environment of the cells may play a role in the cell division orientation. The effect of cycle stress on cells mitosis orientation is worth further study.

Key words mitosis orientation, stress fibers, uniaxial static stretch, MC3T3

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (10402002, 30671098) and A Foundation for The Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200356).

**Corresponding author .

YANG Chun. Tel: 86-10-82339422-1004, E-mail: yangchun@buaa.edu.cn

WANG Yun-Fang. Tel: 86-10-66931974, E-mail: wangyf1972@gmail.com

Received: July 10, 2007 Accepted: September 12, 2007