

文章编号:1004-7220(2011)06-0574-06

间歇牵拉应变对大鼠骨髓间充质 干细胞增殖与成骨分化的影响

吴玉琼, 房兵, 江凌勇

(上海交通大学医学院附属第九人民医院, 正颌-正畸治疗中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011)

摘要: **目的** 探讨体外间歇牵拉应变对大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone mesenchymal stem cell, rBMSC)的增殖与成骨分化效应。**方法** 应用 Flexcell-4 000 应力系统,将间歇牵拉应变(振幅 10%,频率 0.5 Hz,每天作用 2 次,4 h/次)作用于体外分离培养的正常 rBMSC,加力 1、3、5、7 d 后检测应力对细胞形态改变、细胞增殖及骨形成核心结合因子 Cbfa1、碱性磷酸酶(ALP)和 I 型胶原等成骨基因和 Cbfa1 蛋白的影响。**结果** rBMSC 在间歇牵拉应力作用 1 d 后即出现增殖速度减缓,一直延续到加力第 7 d,ALP 和 I 型胶原等成骨基因的表达自加力 3 d 后升高了 3~6 倍($P < 0.05$),并且 Cbfa1 的基因和蛋白表达在力学刺激下都出现上调。**结论** 力学刺激在 rBMSC 的增殖与分化中起重要作用,适宜的间歇牵拉应变可以减缓 BMSC 的增殖,促进其成骨分化。

关键词: 骨髓间充质干细胞;力学刺激;细胞培养;细胞增殖;成骨分化

中图分类号: R 783.5 文献标志码: A

Effect of intermittent tensile strain on proliferation and osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells

WU Yu-qiong, FANG Bing, JIANG Ling-yong (Center of Craniofacial Orthodontics, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of intermittent tensile strain on the proliferation and osteogenic differentiation of rBMSCs (rat bone mesenchymal stem cells). **Methods** Intermittent tensile strain was applied on rBMSCs *in vitro* by Flexcell-4 000 Tension System (10% elongation amplitude, 0.5 Hz, twice every day, 4 h every time), then effects of the strain after 1, 3, 5, 7 d on cell morphology, cell proliferation, and the relative expression of Cbfa1 (core binding factor $\alpha 1$), ALP and collagen I mRNA as well as Cbfa1 protein were measured. **Results** Intermittent tensile strain slowed the proliferation of rBMSCs from the first day to the seventh day. The relative expression of ALP and collagen I mRNA increased by 3~6 times from the third day ($P < 0.05$), meanwhile the expression of Cbfa1 mRNA and protein was up-regulated under the mechanical stimulation. **Conclusions**

Mechanical stretch plays an important role in the proliferation and differentiation of rBMSC, and appropriate intermittent tensile strain can slow the proliferation of rBMSC and promote its osteogenic differentiation.

Key words: Bone mesenchymal stem cell (BMSC); Mechanical stimulation; Cell culture; Cell proliferation; Osteogenic differentiation

收稿日期:2011-04-25;修回日期:2011-08-05

基金项目:国家自然科学基金项目资助项目(30901698,10972142),上海市科学技术委员会资助(08411961600)。

通讯作者:江凌勇,Tel:(021)23271699-5339;E-mail:jly117@sina.com。

力学刺激对骨骼的生长发育、正常骨量的生长以及骨折的修复和塑形都有极其重要的作用。在正畸的临床治疗中,牙移动伴随着张力侧骨的形成和压力侧骨的吸收。大量的研究表明^[1-2],骨骼在适宜的机械力刺激下,牵张区组织细胞可表达一系列成骨相关信号分子,并调控该部位原始的间充质干细胞向成骨细胞分化,并最终形成新生骨组织。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)是一类来源于骨髓非造血性的干细胞,具有多向分化潜能,包括分化成骨、软骨、脂肪、肌腱及肌肉等。因此,作为取材较为容易的骨髓间充质干细胞,研究其对机械力刺激的反应以及相关成骨性信号分子的表达,具有十分重要的意义。基于正畸临床中常采用间歇力移动牙齿,本文就间歇牵拉应力促进骨髓间充质干细胞成骨分化的程度展开进一步研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

1.1.1 实验动物 6周龄SD大鼠,雄性,体重140~160 g,由上海斯莱克动物实验中心提供。

1.1.2 试剂 α -MEM(Gibco),胎牛血清(杭州四季青生物技术有限公司),1 000 U/mL青霉素,1 000 U/mL链霉素(Invitrogen, Carlsbad, 美国),胰蛋白酶(Hyclone, 美国),Alamarblue(Invitrogen, Carlsbad, 美国),TRIzol reagent(Invitrogen, Carlsbad, 美国),M-MLV reverse transcriptase(Promega, 中国),SYBR Premix Ex Taq酶(Takara, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 rBMSC的分离和培养^[3] SD大鼠处死后,无菌条件下取双侧股骨和胫骨,用 α -MEM培养液冲洗骨髓腔,接种于10 cm培养皿,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.2.2 间歇牵拉应变作用于体外培养的rBMSC 传第3代的rBMSC以 2×10^5 个/孔的密度分别接种于Bioflexcell可变形的膜状聚合底物6孔培养板,静置72 h,待大部分细胞贴壁并铺满膜后正常换液,安装于Flexcell应力系统,施加频率为0.5 Hz、振幅为10%变形、正弦波状力学信号,每天作用2次,每次4 h。实验分为动态力学信号刺激组(mechanical stimulation, MS)及对照组(control, CO),于牵拉应变第1、3、5、7 d终止培养,每组每时间段样本量为3孔。

1.2.3 细胞增殖检测 分别于力学刺激前,力学刺激1、3、5、7 d后用Alamarblue试剂检测细胞的增殖活性。加力结束后,实验组和对照组细胞更换含10% Alamarblue荧光染料的培养液在37℃、5%CO₂培养箱中孵育2 h。将培养液转移至96孔板,于酶标仪采用590 nm吸收光进行读数,对比加力组和对照组的细胞增殖差异。

1.2.4 Realtime PCR测定成骨基因的表达 力学刺激结束后,细胞用TRIzol试剂抽提取总RNA。逆转录结束后,按照操作说明采用SYBR Premix Ex Taq酶,运用ABI7900HT系统进行real-time PCR,PCR运行条件如下:95℃预变性5 min,95℃变性10 s,60℃退火30 s,50个循环扩增,4℃冷却。数据采用比较函数 $Ct(2^{-\Delta\Delta Ct})$ (Pfaffl, 2001)方法分析。每个样本重复3次分析。基因引物序列见表1。

表1 实验中采用的实时RT-PCR引物

Tab.1 Real-time RT-PCR primers used in the experiment

基因	引物	引物长度/bp
β -actin	上游: GTAAAGACCTCTATGCCAACA	21
	下游: GGACTCATCGTACTCTCTGCT	20
ALP	上游: TATGTCTGGA ACCGCACTGAAC	22
	下游: CACTAGCAAGAAGAAGCCCTTGG	23
Col I	上游: CTGCCGAGAAGAATATGTATCACC	24
	下游: GAAGCAAAGTTTCTCCAAGACC	23
Cbf α 1	上游: ATCCAGCCACCTTCACTTACACC	23
	下游: GGGACCATTGGGAAGTATAGG	22

1.2.5 Western blot检测Cbf α 1蛋白的表达 分别于力学刺激前以及力学刺激1、3、5、7 d后提取细胞蛋白。细胞用PBS洗3次后,每孔加入50 μ L蛋白裂解液(上海博彩生物科技有限公司)冰浴30 min后,10 360 r/min,离心5 min,收取10 μ L上清液进行BCA蛋白浓度测定。余40 μ L蛋白上清与10 μ L 5 \times loading buffer混合后于95℃煮蛋白5 min。配制聚丙烯酰胺凝胶,取20 μ g蛋白样品进行SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶)电泳。在冰浴中将细胞蛋白转移至硝酸纤维素膜上,300 mA,1.5 h。丽春红染色后,裁膜。用50 g/L脱脂奶粉,室温封闭1 h。加Cbf α 1一抗(1:500稀释)4℃过夜,TBST洗膜,10 min/次,洗3次。加荧光标记二抗(1:1 000)室温孵育2 h,TBST洗膜。条带经Od-

yssey 扫描后采用 Alpha 图像分析软件分析。

1.2.6 统计分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两样本均数 t 检验, $P < 0.05$ 为有差异性, $P < 0.01$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 不同时间段间歇拉伸应变下 rBMSC 的形态变化

光学显微镜下显示随着应力作用时间的增加, rBMSC 在形态上日趋沿着与应力牵拉垂直的方向排列(见图1, 图中箭头指向为应力加载的方向)。

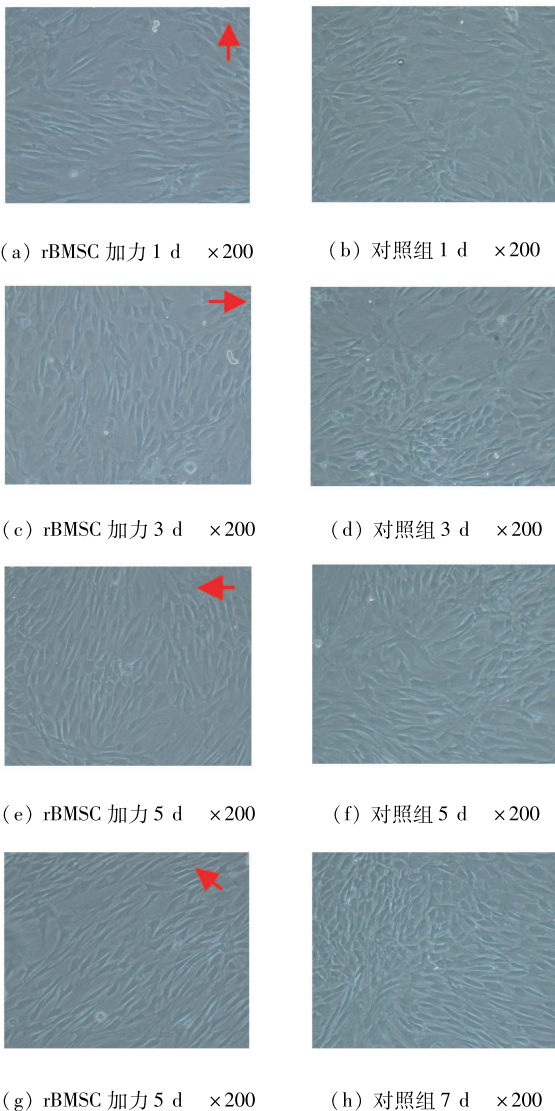


图1 不同时间段间歇拉伸应变下 rBMSC 的形态变化
Fig.1 Cell morphology of rBMSC after intermittent tensile strain at different time

2.2 细胞增殖

在酶标仪上用波长 590 nm 的荧光吸收光值对培养液进行检测, 整理数据, 绘图(见图2)。由图2可知: 自加力第 1 d 起, 加力组细胞的增殖速度较对照组皆有所降低, 以第 7 d 最为明显, 第 3 d 两组细胞的数量无明显差异。

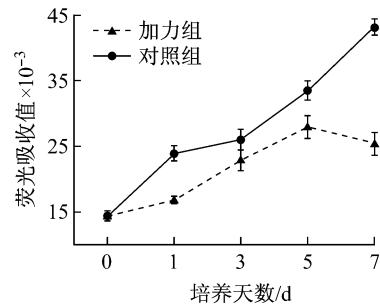


图2 加力组与对照组 rBMSC 的增殖速率比较
Fig.2 Proliferation rate of rBMSC in MS (mechanical stimulation) and CO (control) group

2.3 间歇拉伸应变对 rBMSC 成骨基因表达的影响

2.3.1 间歇拉伸应变对 rBMSC 的 ALP mRNA 表达的影响 力学刺激第 1 d, ALP mRNA 的表达无明显变化; 在力学刺激第 3、5、7 d, 加力组 ALP mRNA 的表达较对照组增加 ($P < 0.05$), 并且随着力学刺激时间的延长, ALP mRNA 的表达日趋上调, 至第 7 d, 加力组 ALP 表达量约是对照组的 3 倍(见图3)。

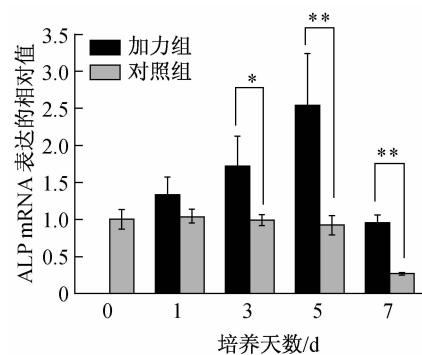


图3 加力组与对照组 ALP mRNA 表达的相对值
Fig.3 Relative expression of ALP mRNA in MS (mechanical stimulation) and CO (control) group

2.3.2 间歇拉伸应变对 rBMSC 的 I 型胶原 mRNA 表达的影响 与 ALP mRNA 相似, I 型胶原 mRNA

在加力第 1 d 并未出现明显变化;随后,在加力第 3、5、7 d,其表达出现明显的增加($P < 0.01$,见图 4)。

2.4 间歇拉伸应变对 rBMSC 的 Cbfa1 基因和蛋白表达的影响

2.4.1 间歇拉伸应变对 rBMSC 的 Cbfa1 mRNA 表达的影响

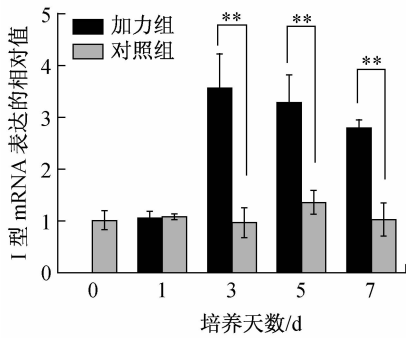


图 4 加力组与对照组 I 型胶原 mRNA 表达的相对值

Fig.4 Relative expression of Col I mRNA in MS (mechanical stimulation) and CO (control) group

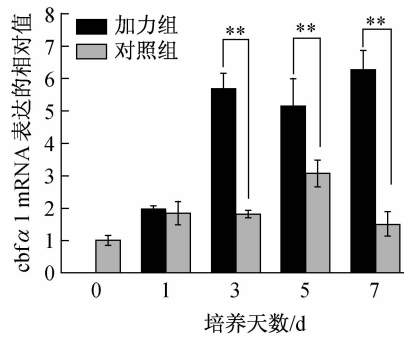


图 5 加力组与对照组 Cbfa1 mRNA 表达的相对值

Fig.5 Relative expression of Cbfa1 mRNA in MS (mechanical stimulation) and CO (control) group

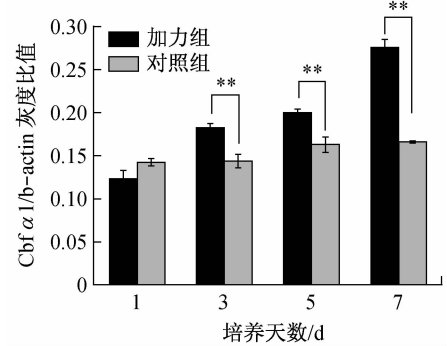


图 6 加力组与对照组在间歇牵拉应变不同时间段 Cbfa1 蛋白表达的相对值

Fig.6 Protein expression of Cbfa1 after intermittent tensile strain at different time in MS (mechanical stimulation) and CO (control) group

2.4.2 Western blot 检测

自力学刺激第 3 d 起, Cbfa1 蛋白的表达较对照组开始上调;在牵拉应变第 7 d,加力组 Cbfa1 蛋白表达量达到最高,达到对照组的 1.5 倍(见图 7)。

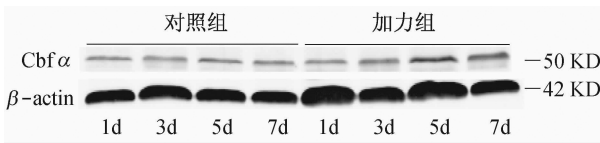


图 7 间歇牵拉应变对 rBMSC 在不同时间段 Cbfa1 蛋白的表达
 Fig.7 Protein expression of Cbfa1 in rBMSC after intermittent tensile strain at different time

3 讨论

机械力学刺激是骨骼生长和改建的重要调节因子,其在骨系细胞的增殖与分化中发挥着关键作用。在没有力刺激的情况下,如长期卧床,可导致骨质疏松的发生。而力学刺激的大小、频率和刺激方式的不同,可导致骨组织产生不同的生理反应。如在正畸临床治疗中,若所施加的正畸力适当,可以促进成

明显变化;在牵拉应变第 3 d, Cbfa1 mRNA 的表达增加了 6 倍;在第 5 d, Cbfa1 mRNA 的表达有所降低,但仍明显高于对照组,约为对照组的 5.5 倍($P < 0.05$);随后,在第 7 d 时, Cbfa1 mRNA 的表达又再次升高,达到对照组的 6 倍($P < 0.01$,见图 5、6)。

骨发生;若正畸应力过大,可促进骨的吸收。研究发现,周期性的力学刺激比持续刺激更能促进细胞的增殖和成骨基因的表达^[1]。本研究根据正畸临床治疗中所施加的应变,采用为期 7 d 的拉伸应变,每天作用 2 次。

骨髓间充质干细胞是一类具有高度自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞。在不同诱导条件下, MSCs 可向多种细胞分化,在应力作用下分化为成骨细胞是新骨形成的细胞学基础。本研究以大鼠骨髓间充质干细胞作为研究对象,探讨其对力学刺激的反应及其成骨分化效应,以进一步了解该细胞向成骨转化的力学信号机制。

戚孟春等^[2]发现,机械张力刺激可以促进 MSC 细胞增殖,提高其 ALP 的活性,显著上调成骨相关基因 Ets-1、Cbfa1 和 ALP 的表达,从而促使 MSC 向成骨细胞短暂分化。李暄等^[4]证实低幅度牵拉应变可促进成骨细胞增殖,高牵张幅度则抑制细胞的增殖。本研究采用 10%、0.5 Hz 的机械牵拉应力,进行 7 d 的间歇牵拉,每天牵拉 2 次,每次作用 4 h,

于牵拉1、3、5、7 d后收集细胞样本,发现细胞在加力后增殖速率较不加力组明显变慢,并且在加力第7 d出现下降趋势(见图2),这与戚孟春等^[2]的研究有所不同,与李暄等^[4]的研究较一致,可能前者只关注于细胞受力学刺激后的增殖情况,且应力牵张幅度较小,观察时间比本组实验短,未能发现该现象。

Akisaka等^[5]发现,在力学刺激下,细胞的微丝结构可以发生改建和重排,说明机械刺激对微丝产生了一定的影响。Maniotis等^[6]证实,在胞膜整合素受体、细胞骨架和胞核骨架间存在直接连接,从而为力学信号刺激由胞外直接传递到核内提供了通路。本研究观察到,BMSC在机械刺激下的变化与Cha等^[7]研究相一致;并且随着拉伸应变时间的增加,细胞的形态及伸展方向日趋沿着与力所施加的方向垂直排列。

在骨髓间充质干细胞成骨分化过程中,Cbfa1 (core binding factor $\alpha 1$)是骨形成的关键基因^[8],决定着骨细胞的发生和分化。本实验结果显示,从力学刺激第3 d起,Cbfa1基因和蛋白较对照组明显升高,ALP、I型胶原等成骨基因也同时出现增高,这种现象同时出现于力学刺激的第5、7 d。

Ziros等^[9]将机械力作用于人牙周膜细胞后发现,Cbfa1在mRNA水平和蛋白水平的表达均升高,并且与DNA的亲合力也增强,认为Cbfa1是牙周膜细胞受力后向成骨样细胞转化时机械力的作用靶点。Dajiang等^[10]对小鼠成骨样细胞系MC3T3-E1进行静态机械刺激,发现细胞ALP活性明显增高,表明细胞正经历早期成骨分化。Raffh等^[11]采用10%的应力作用于大鼠BMSC,其骨钙素、I型胶原及ALP的表达量均较对照组明显升高,这与本实验的结果相一致。但本实验采用在不同时间点对成骨基因进行研究,以观察力学刺激的持续作用。

目前,体外实验皆已证实^[11-13]合适的机械刺激将促进BMSC的成骨分化,抑制破骨发生。本研究通过对BMSC施加间歇的牵张应变,观察成骨基因的表达变化,实验结果进一步证实了该结论;并且通过对成骨基因的上游分子Cbfa1的基因及蛋白表达都进行检测,发现Cbfa1的基因和蛋白在力学刺激第3 d起都出现了升高,这与Shi等^[14]的研究有所不同,可能为本实验所采用的间歇牵拉应力与Shi

等^[14]所采用的持续牵拉应力刺激细胞所引发的信号通路有所不同,但这两者在骨系细胞的不同作用机制尚未被充分探知,有待今后的进一步研究。通过反复尝试模拟各种生理和临床的力学参数,观察其对骨系细胞的作用,将有助于了解力在骨骼系统的作用机制,推动力学在骨科方面的临床应用。

参考文献:

- [1] Pavlin D, Zadro R, Gluhak-Heinrich J. Temporal pattern of stimulation of osteoblast-associated genes during mechanically-induced osteogenesis in vivo: Early response of osteocalcin and type I collagen [J]. *Connect Tissue Res*, 2001, 42(2): 135-148.
- [2] 戚孟春, 梁永强, 孙红, 等. 张应力下成骨性转录因子在骨髓间充质干细胞中的表达[J]. *实用口腔医学杂志*, 2008, 24(5): 654-658.
- [3] 孟国林, 胡蕴玉, 刘丹平, 等. 大鼠骨髓骨髓基质细胞的体外培养[J]. *中国矫形外科杂志*, 2001, 8(1): 53-55.
- [4] 李暄, 张晓玲, 唐国华, 等. 周期性张应变作用下成骨细胞凋亡的体外研究[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(3): 223-227.
- [5] Li H, Zhang XL, Tang GH, *et al.* Study on osteoblast apoptosis in response to mechanical stretch *in vitro* [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(3): 223-227.
- [6] Akisaka T, Yoshida H, Inoue S, *et al.* Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured osteoblast [J]. *Bone Miner Res*, 2001, 16(7): 1248-1255.
- [7] Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(3): 849-854.
- [8] Cha JM, Park SN, Noh SH, *et al.* Time-dependent modulation of alignment and differentiation of smooth muscle cells seeded on a porous substrate undergoing cyclic mechanical strain [J]. *Arti Orga*, 2006, 30(4): 250-258.
- [9] Gao YH, Shinki T, Yuasa T, *et al.* Potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: Regulation of mRNA expression of osteoblast differentiation factor (ODF) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 252(3): 697-702.
- [10] Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, *et al.* The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(26): 23934-23941.
- [11] Dajiang Du, Katsuko S. Furukawa, *et al.* 3D culture of os-

- teoblast-like cells by unidirectional or oscillatory flow for bone tissue engineering [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(6): 1670-1678.
- [11] Rath B, Nam J, Knobloch TJ, *et al.* Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts [J]. *J Biomech*, 2008, 41(5): 1095-1103.
- [12] Mauney JR, Sjostrom S, Blumberg J, *et al.* Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds *in vitro* [J]. *Calcif Tissue Int*, 2004, 74(5): 458-468.
- [13] 江凌勇, 赵志河, 王军, 等. 张应力对成骨分化骨髓间充质干细胞 ODF mRNA 表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(6): 428-432.
- Jiang LY, Zhao ZH, Wang J, *et al.* Effects of mechanical tensile stress on the expression of ODF mRNA in osteoblasts differentiated from rBMSCs *in vitro* [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(6): 428-432.
- [14] Shi Y, Li HW, Zhang XL, *et al.* Continuous cyclic mechanical tension inhibited Runx2 expression in mesenchymal stem cells through RhoA-ERK1/2 pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(8): 2159-2169.

(上接第 565 页)

- [10] Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, *et al.* Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: Implications for fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(6): G1147-1154.
- [11] Sakata R, Ueno T, Nakamura T, *et al.* Mechanical stretch induces TGF- β synthesis in hepatic stellate cells [J]. *Eur J Clin Invest*, 2004, 34(2): 129-136.
- [12] Junker JP, Kratz C, Tollbäck A, *et al.* Mechanical tension stimulates the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts in human burn scars [J]. *Burns*, 2008, 34(7): 942-946.
- [13] Campbell JH, Efendy JL, Han CL, *et al.* Haemopoietic origin of myofibroblasts formed in the peritoneal cavity in response to a foreign body [J]. *J Vasc Res*, 2000, 37: 364-371.
- [14] Sasmono RT, Oceandy D, Pollard JW, *et al.* A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse [J]. *Blood*, 2003, 101(3): 1155-1163.
- [15] Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 349-363.
- [16] Ingber DE. The architecture of life [J]. *Sci Am J*, 1998, 278(1): 48-57.
- [17] Wang JX, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of a-smooth muscle actin in mechanotransduction [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(3): 205-214.
- [18] 黄先亮, 刘肖珩, 曾焯, 等. 力-化学耦合作用在血管内皮细胞迁移中的作用及其力学生物学机制[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(5): 321-327.
- Huang XL, Liu XH, Zeng Y, *et al.* Mechanical-chemical interaction and its mechanobiological mechanism on the migration of endothelial cells [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(5): 321-327.
- [19] 周薇, 吕永钢, Gurinder K Singh, 等. 周期性机械拉伸对类风湿关节炎和骨关节炎成纤维样滑膜细胞 BMP-2 表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(2): 121-127.
- Zhou W, Lü YG, Gurinder K Singh, *et al.* Effects of cyclic mechanical stretch on BMP-2 expression in RA and OA fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(2): 121-127.
- [20] Wipff PJ, Rifkin DB, Meister JJ, *et al.* Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix [J]. *J Cell Biol*, 2007, 179(6): 1311-1323.