

文章编号:1004-7220(2017)02-0122-08

成骨细胞 MC3T3-E1 对高重力的力学生物学响应

李 军^{1,4}, 孙明林^{1*}, 宋光明², 张春秋^{3*}, 李瑞欣⁴, 张西正⁴, 黄 揆¹, 刘迎节⁴

(1. 武警后勤学院附属医院 骨科, 天津 300162; 2. 武警后勤学院 药理教研室, 天津 300309;

3. 天津市先进机电系统设计及智能控制重点实验室, 天津 300384; 4. 军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津 300161)

摘要: **目的** 探讨高重力对前成骨细胞 MC3T3-E1 形态和成骨功能的影响。**方法** 将 MC3T3-E1 细胞按不同高重力分为对照组、5 g 组、10 g 组、15 g 组、20 g 组, 实验组每次加载 30 min 连续加载 3 d, 对照组同步置于除 g 值外相同的环境中。鬼笔环肽染色考察细胞骨架蛋白形态; 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测试剂盒检测 ALP 含量; 实时定量 PCR 检测 ALP、I 型胶原 (collagen I, Col I)、骨钙素 (osteocalcin, OC)、runt 相关转录因子 (runt-related transcription factors, Runx2) 的基因表达; Western blotting 检测 Col I、OC 蛋白表达。**结果** 高重力条件下成骨细胞胞体变薄, 细胞表面积明显增大; 细胞骨架排列结构变得疏松、松散, 微丝肌动蛋白束状结构减少, 微丝呈弥散状, 有序性降低。成骨分化相关指标 ALP、Col I、OC、Runx2 的基因均显著上调; Col I 和 OC 蛋白亦呈现高表达。对照组茜素红染色只有极少量面积很小的桔红色结节, 高重力加载后各组细胞明显形成面积大小不一的桔红色结节。**结论** 高重力下成骨细胞可通过骨架结构发生重排引起细胞形态的改变, 并进一步通过上调分化相关基因和蛋白表达, 有效刺激成骨细胞成熟分化。

关键词: 成骨细胞; 高重力; 生物力学; 骨向分化

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.02.004

The mechanical and biological responses of MC3T3-E1 cells under hypergravity

LI Jun^{1,4}, SUN Ming-lin^{1*}, SONG Guang-ming², ZHANG Chun-qiu^{3*}, LI Rui-xin⁴, ZHANG Xi-zheng⁴, HUANG Kui¹, LIU Ying-jie⁴ (1. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Logistics University of PAPF, Tianjin 300162, China; 2. Department of Pharmacology, Logistics University of PAPF, Tianjin 300309, China; 3. Tianjin Key Laboratory for Advanced Mechatronic System Design and Intelligent Control, Tianjin 300384, China; 4. Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China)

Abstract: Objective To explore the effect of hypergravity on morphology and osteogenesis function of preosteoblast MC3T3-E1 cells. **Methods** The cultured MC3T3-E1 cells under hypergravity by different loading forces were divided into five groups, including control group, 5 g group, 10 g group, 15 g group and 20 g group. The experimental groups were loaded for 30 min each time in 3 successive days, and the control group with no g-value was synchronously exposed to the same surrounding. The morphology of cytoskeletal protein was observed by phalloidin staining, The alkaline phosphatase (ALP) content was examined by ALP activity assay kit, the gene ex-

收稿日期:2016-05-03; 修回日期:2016-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(11432016, 31370942, 11372221)。

通信作者: 张春秋, 研究员, Tel: (022) 60214133, E-mail: zhang_chunqiu@126.com;

孙明林, 副教授, Tel: (022) 60578952, E-mail: sunmlren@sohu.com。

* 为共同通信作者

pression of ALP, collagen I (Col I), osteocalcin (OC), runt-related transcription factors (Runx2) was measured by real-time quantitative PCR, and the protein expression of Col I and OC was tested by Western blotting. **Results** Under the condition of hypergravity, cell body of osteoblast became thinner, but its surface area increased significantly; with the structure of skeletal arrangement becoming loose, actin microfilament structure reduced so that the orderly arrangement of actin-like dispersion lowered. The gene expressions of related indicators of osteogenic differentiation including ALP, Col I, OC, Runx2 were significantly up-regulated, which was the same as Col I protein and OC protein after hypergravity loading. A very minute quantity of small red-orange nodules was found in the control group, while the cells in experimental groups after hypergravity loading obviously formed various sizes of red-orange nodules. **Conclusions** Under hypergravity, changes in osteoblast morphology can be triggered by rearrangements of skeletal structure. Furthermore, osteoblast maturation and differentiation can be stimulated effectively by up-regulating differentiation-related gene and protein expressions.

Key words: Osteoblast; Hypergravity; Biomechanics; Osteogenic differentiation

载人航天器发射与返回过程中,宇航员承受正加速度可达到 5 ~ 8 g,负加速度为 4 ~ 5 g,而异常情况时应急返回超重值会远远高于正常值^[1];在飞船应急逃逸过程中,航天员将承受 8 ~ 15 g 甚至更高加速度^[2-3]。现代高性能战斗机作战或训练时,飞行员经常承受高加速度冲击,第 3 及第 4 代战斗机可产生高达 9 ~ 12 g 加速度^[4]。娱乐设施过山车在运行时都可产生超重加速度 4 ~ 6 g。随着科技的发展,将有越来越多的宇航员、飞行员及娱乐人员等人暴露于高重力(高 g)力学环境中。研究发现,飞行员在飞行训练过程中受高重力的影响,颈椎的骨密度和全身的骨矿物含量增加^[5]。小鼠在 2 g 超重环境下生活,其股骨、骨盆长度和骨盆腔、第 4 颈椎宽度均有所增加,在第 2、3 代小鼠中也出现了增加^[6]。Vico 等^[7]认为,高重力能抵抗微重力对骨引起的不良影响,减少软骨形成,增加松质骨的骨量。成骨细胞是对应力敏感的主要细胞之一。研究表明,微重力下成骨细胞形态和成骨功能方面发生了一系列的变化^[8-10]。高重力对成骨细胞的形态和成骨功能也可能有着重要的调节作用。然而关于成骨细胞在高重力下形态和成骨功能变化的研究甚少,本文采用体外培养成骨细胞的方法,观察高重力下成骨细胞的力学生物学响应。

1 材料与方法

1.1 细胞株

小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞系由协和医科大学基础医学研究所提供。

1.2 主要试剂

α -MEM 培养基(HyClone 公司,美国)、胎牛血清(兰州百灵生物技术有限公司)、双抗(即青霉素、链霉素, Gibico 公司,美国)、0.25% 胰蛋白酶(Gibico 公司,美国)、罗丹明标记的鬼笔环肽(上海翊圣生物科技有限公司)、DAPI(上海翊圣生物科技有限公司)、碱性磷酸酶(ALP)定量试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)、OC 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国)、Col I 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国)、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(Santa Cruz 公司,美国)、Trizol 试剂(Invitogen 公司,美国)、实时定量 PCR(qPCR)试剂盒(Invitogen 公司,美国)。

1.3 实验仪器

离心式高加速度加载机(天津理工大学)、倒置显微镜及照相系统(Olympus 公司,日本)、CO₂ 细胞培养箱(Forma Scientifis 公司,美国)、超净工作台(苏州净化设备公司)、超分辨率共聚焦扫描显微镜 TCS-SP8(Leica 公司,德国)、Bio-Rad IQ5 实时定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国)、高速低温离心机(Eppendorf 公司,德国)、普通离心机(北京医用离心机厂)、WD-94037 紫外分析仪、水平电泳仪、Protein 垂直电泳仪(北京市六一仪器厂)、蛋白转移系统、稳压稳流电泳仪(Bio-Rad 公司,美国)、超声细胞破碎仪(Sonics 公司,美国)、压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞高重力加载装置 采用本课题组特殊设计的离心式高加速度加载机,使之能匹配培养瓶

(培养皿)和六孔板一起固定于转子体对应的凹槽内。测量离心半径,根据

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} r \cdot v^2$$

计算相对高重力(relative centrifugal force, RCF)。其中: v 为转速(单位 r/min); r 为离心半径(单位 cm)。

1.4.2 实验分组及高重力加载 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中进行传代培养,取对数生长期的细胞常规消化,并完全随机分为对照组、5 g 组、10 g 组、15 g 组、20 g 组。5 组同时接种至培养瓶(25 cm², 密度 1 × 10⁶/瓶)或培养皿(35 mm, 密度 2 × 10⁵/皿),培养 24 h 后开始在相应高重力下加载。高重力加载前培养瓶(培养皿)内灌满培养基,使瓶内不留任何气泡,并在无菌条件下以无菌密封胶密封,然后实验组于离心式高加速度加载机内在相应高重力下加载 30 min,连续加载 3 d,对照组同步置于除 g 值外相同的环境中。

1.5 检测指标

1.5.1 细胞骨架染色 取高重力加载结束后的各组细胞,37 ℃预热的 PBS(pH 7.4)清洗细胞 2 次。用溶于 PBS 的 4% 甲醛溶液进行细胞固定,室温下固定 10 min。室温条件下,PBS 清洗细胞 3 次,每次 10 min。0.5% Triton X-100 溶液透化处理 5 min。PBS 清洗细胞 3 次,每次 10 min。取 400 μL TRITC 标记鬼笔环肽工作液(浓度 100 nmol/L),覆盖住激光共聚焦用培养皿上的细胞,37 ℃避光孵育 30 min,用 PBS 清洗盖玻片 3 次,每次 5 min。400 μL DAPI 溶液(浓度 100 nmol/L)对细胞核进行复染 30 s,PBS 清洗培养皿。在超分辨率共聚焦扫描显微镜下进行荧光观察,选择 TRITC 激发/发射滤片($E_x/E_m = 545/570$ nm)和 DAPI 激发/发射滤片($E_x/E_m = 364/454$ nm)。

1.5.2 ALP 活性测定 取加载结束后培养 24 h 的各組细胞,PBS 洗涤 2 遍,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,各组沉淀中加入 500 μL 2% Triton-100,充分振荡,4 ℃过夜裂解细胞。再次以上述方式离心,提取上清。取各组上清液 50 μL,按碱性磷酸酶试剂盒说明进行操作,酶标仪读取 490 nm 波长下的吸光度,计算各组 ALP 值,每组 ALP 值独立测量 3 次。

1.5.3 Real-time RT-PCR 检测基因表达 根据 GeneBank 小鼠中 Col I、Runx2、ALP、OC、GAPDH 的

mRNA 序列(见表 1)用 Primer 5.0 软件设计引物,并由沙船(天津)生物技术有限公司合成。按 Trizol 说明书提取各组细胞 RNA。取 1 μg RNA 用逆转录试剂盒进行逆转录获得 cDNA,取 2 μL cDNA 进行 PCR 反应,热循环条件如下:先 95 ℃、3 min;95 ℃、15 s,60 ℃、30 s,共 40 个循环;72 ℃冷却 2 min。并绘制各引物的溶解曲线以验证扩增产物单一性。通过 PCR 得到每个扩增产物阈值(CT 值),并得到各组产物的相对值,再用 GAPDH 标化,每种基因做 3 个复孔。

表 1 相关基因引物序列

Tab. 1 Related gene primer sequences

基因	引物序列
ALP	正 GAAGGAGGCAGGATTGAC
	反 ATCAGCAGTAACCACAGTC
Col I	正 CAGTGCGGTTATGACTT
	反 CTGCGGATGTTCTCAATCT
Runx2	正 GCAGCACTCCATATCTCTAC
	反 GCGTCAACACCATCATTCT
OCN	正 CCATCTTTCTGCTCACTCT
	反 ACTACCTTATTGCCCTCCT
GAPDH	正 CAGCAACTCCCCTCTTC
	反 TGTAGCCGTATTCATTGTC

1.5.4 Western blotting 检测相关蛋白表达情况 裂解各组细胞,提取蛋白并用 BCA 法测定所提取蛋白浓度。将蛋白提取物和蛋白上样缓冲液按比例充分混匀,沸水浴加热失活。每上样孔加入 30 μg 蛋白至 SDS-PAGE 蛋白电泳系统,电泳充分后,将分离胶上的蛋白转到 PVDF 膜上。PVDF 膜在室温下用脱脂奶粉封闭 1 h,加入相应 I 抗(1:500 稀释),4 ℃孵育过夜。取出 PVDF 膜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记的 II 抗(1:5 000 稀释),室温孵育 1 h,如前所述再次清洗 PVDF 膜,加入化学发光剂,暗室内医用 X 射线胶片曝光成像。每组蛋白试验 3 次,Image J 图像分析软件检测得出各蛋白条带灰度值,计算其表达相对值(各蛋白灰度值/GAPDH 灰度值)。

1.5.5 茜素红染色 取高重力加载结束后培养 16 d 的各組细胞,PBS(pH 7.2,不含钙镁)洗涤 2 遍,用 4% 多聚甲醛固定细胞,室温下固定 30 min,

PBS(不含钙镁)洗涤 2 次,茜素红染色工作液室温避光孵育 30 min, PBS(pH 7.2, 不含钙镁)洗涤 5 次,每次 2 min。显微镜下观察染色结果,茜素红工作液和细胞基质钙结合形成桔红色沉淀。

1.6 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,计量资料用均数 ± 标准差表示,多组间均数比较采用方差分析,两两比较使用 LSD 法。显著性检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 高重力对成骨细胞细胞骨架的影响

正常条件下培养的 MC3T3-E1 细胞不规则,多呈梭形、不规则三角形以及多角形,有较多的突起,核大且核仁明显;高重力加载处理后,细胞变圆,开始出现向外伸展、分叉的现象,细胞伸展的面积加大,细胞胞体增大、变薄,折光性降低。正常条件下培养的 MC3T3-E1 细胞微丝肌动蛋白是束状结构,蛋白纤维较粗,排列有序,且外围的束状纤维界限也

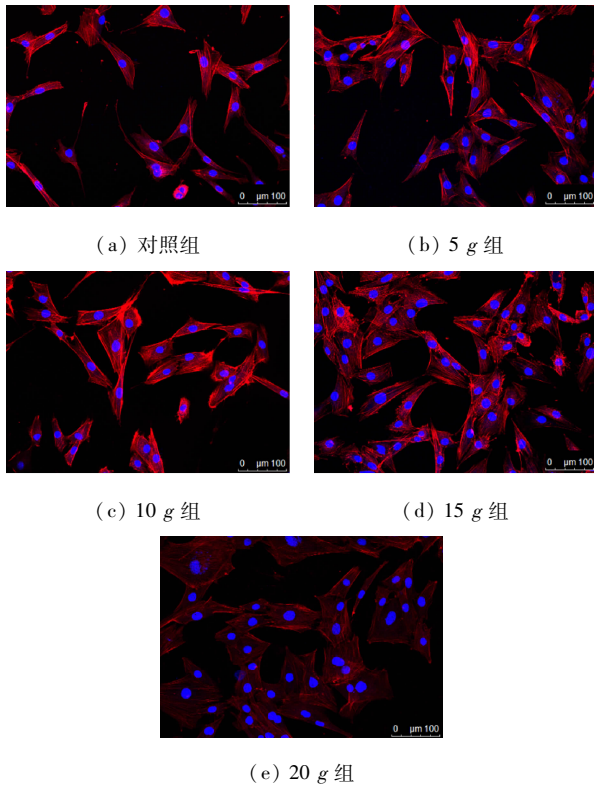


图 1 细胞骨架染色

Fig.1 Cytoskeleton staining (a) Control group, (b) 5 g group, (c) 10 g group, (d) 15 g group, (e) 20 g group

很明显;细胞经高重力加载处理后,微丝肌动蛋白束状结构减少,微丝呈弥散状,有序性降低。高重力 10 g 加载后,球状微丝出现,其他微丝以弥散状分布在细胞质中;高重力 15 g 加载后,球状微丝大多数都聚集在核周,边缘并没有完全解聚,细胞界限明显(见图 1)。

2.2 ALP 活性测定结果

高重力加载后,各组细胞 ALP 活性明显增高,呈高重力大小依赖性。与对照组相比,5 g 组 ALP 值略增高,但无显著差异;10 g 组、15 g 组和 20 g 组 ALP 值显著增高($P < 0.01$),分别为对照组 1.4、2.0 和 2.6 倍(见图 2)。

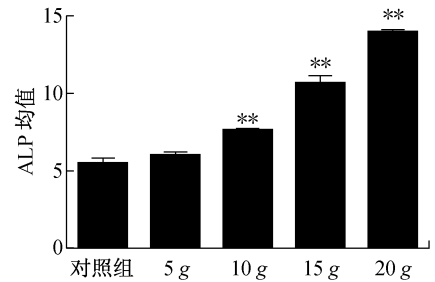


图 2 高重力加载后各组细胞 ALP 活性 (** $P < 0.01$)

Fig.2 ALP activity of cells in each group after hypergravity loading

2.3 Real-time RT-PCR 结果

与对照组比较,15 g 组和 20 g 组 ALP mRNA 表达显著上调($P < 0.01$),为对照组的 3.4 和 9.7 倍;5 g 组和 10 g 组无显著差异。15 g 组和 20 g 组 OC mRNA 表达均显著上调($P < 0.05$),分别为对照组的 2.1 和 5.8 倍,且 20 g 组表达高于 15 g 组($P < 0.01$)。高重力加载后,5 g 组、10 g 组、15 g 组和 20 g

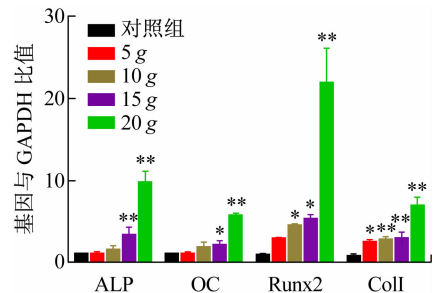


图 3 高重力加载后各组细胞基因相对表达量

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.3 Relative expression of genes in each group after hypergravity loading

组 Col I mRNA 表达均显著上调 ($P < 0.05$), 分别是对照组的 3.2、3.6、3.8 和 9.0 倍。高重力条件下 5 g 组 Runx2 mRNA 表达无显著差异, 10 g 组、15 g 组和 20 g 组 Runx2 mRNA 表达均显著上调 ($P < 0.05$), 且分别为对照组的 5.0、5.7 和 23.9 倍 (见图 3)。

2.4 Western blotting 检测结果

与对照组比较, 10 g 组、15 g 组和 20 g 组 OC 表达均显著上调 ($P < 0.01$), 分别为对照组的 1.4、2.0 和 3.3 倍, 且 15 g 组比 10 g 组、20 g 组比 15 g 组显著上调 ($P < 0.01$); 5 g 组无显著差异。高重力 15 g 组和 20 g 组 Col I 表达显著均上调 ($P < 0.05$), 约是对照组的 1.8、2.6 倍, 且 20 g 组比 15 g 组显著上调 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 5 g 组和 10 g 组无显著差异 ($P > 0.05$, 见图 4)。

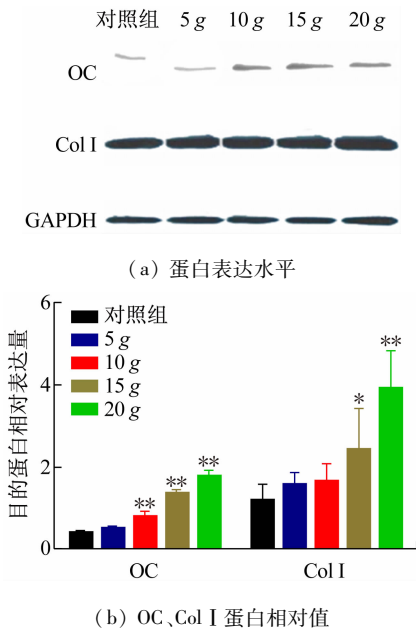


图 4 高重力加载后各组细胞目的蛋白相对表达值
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 4 Relative expression values of the target proteins in each group after hypergravity loading (a) Protein expression level, (b) Relative expression value of OC, Col I protein

2.5 茜素红染色结果

对照组只有极少量的桔红色结节而且面积很小; 5 g 组有少量面积较小的桔红色结节; 10 g 组桔红色结节增多、面积较小; 15 g 组可见数量明显增多、结节面积较 10 g 组略增大的桔红色结节; 20 g

组能见数量较多、面积明显增大、着色深的桔红色结节 (见图 5)。

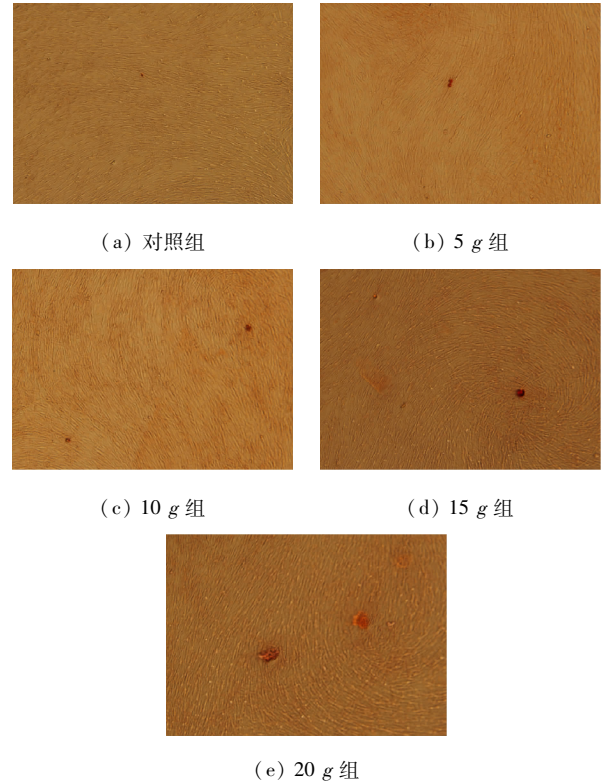


图 5 各组细胞茜素红染色 ($\times 100$)

Fig. 5 Alizarin red staining cells in each group (a) Control group, (b) 5 g group, (c) 10 g group, (d) 15 g group, (e) 20 g group

3 讨论

细胞骨架由微丝、微管和中间纤维构成, 其中微丝普遍存在于多种细胞内并与多种膜蛋白构成交联, 在维持细胞形态、承受外力、保持细胞内部结构的有序性方面起重要作用, 而且还参与许多重要的生命活动。研究表明, 成骨细胞受力学刺激作用后, 细胞骨架结构改变发生重排, 可引起细胞形态的改变, 并可传递生物学信号, 调控相关基因表达^[11-12]。实验观察到高重力加载后成骨细胞伸展的面积加大, 细胞胞体增大、变薄, 且该变化趋势与高重力 g 值正相关; 这与文献[13-16]中报道的在高重力下成骨细胞形状以扁圆为主, 微管网络高度降低、表面积显著增加且呈高重力大小依赖性的结果相一致。同时, 细胞在高重力加载处理后, 微丝肌动蛋白束状结构减少, 微丝呈弥散状, 有序性降低, 球状微丝出现

且大多数都聚集在核周,与康金超^[17]在高重力条件下以人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和小鼠胚胎成纤维(NIH3T3)作为研究对象的研究结果相仿。此外,高重力加载后成骨细胞间的相互联系也明显加强,推测细胞相互之间为了更好地传递信号而在力学环境改变时做出适应性的变化。

Runx2 又称 Cbfa1,是成骨过程最早表达并最具有特异性的转录因子,是机械力刺激作用于成骨细胞的靶点^[18]。多种骨形成标志分子如 Col I、ALP、OC 等的启动子都存在 Runx2 的结合位点,前成骨细胞的成熟分化均需要 Runx2 的转录激活。与文献^[19]的研究结果相似,本实验结果表明,高重力条件下成骨细胞 Runx2 基因表达上调,且自 10 g 开始表达量显著上调且呈高重力大小依赖性,表明高重力可促进 Runx2 的转录激活,故认为高重力可使 Runx2 转录激活并通过其相关信号通路作用于成骨细胞分化。

ALP 由成熟的成骨细胞分泌,是成骨细胞和骨细胞主要的功能活性酶,能够促进细胞的成熟、钙化,是成骨细胞分化的早期指标^[20-21]。既往研究证实,高重力可有效刺激成骨细胞 ALP 活性^[22]。本实验得到类似结果,即高重力条件下成骨细胞的活性增高,自 10 g 开始 ALP 活性显著增高且呈高重力大小依赖性;与 ALP 活性相似的 ALP 基因在高重力条件下表达上调,自 15 g 开始表达量显著上调且呈高重力大小依赖性。由此可见,高重力可促进成骨细胞 ALP 的表达,有效刺激成骨细胞分化。

OC 是由成骨细胞合成、分泌的一种丰富的骨细胞外基质蛋白,是骨质钙化和维持骨组织的正常矿化的必要因子,故 OC 是检测成骨细胞早、中期分化的重要的分子标志^[23]。与对照组相比,高重力条件下成骨相关基因 OC 表达量上调,且自 15 g 开始表达量显著上调,呈高重力大小依赖性;高重力条件下 OC 蛋白表达量增高,自 10 g 开始显著增高,并呈高重力大小依赖性。由此可见,高重力刺激对成骨细胞 OC 基因转录、表达有着重要的促进作用,且两者变化趋势正相关,表明高重力刺激对成骨细胞成熟骨化有着重要的促进作用。与本实验发现高重力可促进 OC 表达不同,Tjandrawinata 等^[24]研究发现,当 MC3T3-E1 细胞在无血清条件下振动高重力(7.83 g)加载后 3 h 内 OC mRNA 表达水平明显下

降。其原因可能是由于无血清环境缺乏 OC mRNA 合成所需的底物或成骨细胞对离心高重力和振动高重力的响应机制不同导致。

Col I 是成熟成骨细胞分泌最多的胞外蛋白,构成细胞外基质的骨架,是成骨细胞分化扩增晚期、基质形成早期的产物,在骨形成与矿化过程中发挥着重要作用,与早期成骨分化有关^[25]。高重力条件下成骨相关基因 Col I 表达显著上调且呈高重力大小依赖性;Col I 蛋白表达也呈上调趋势,与基因相比较,Col I 蛋白自 15 g 开始显著上调。由此可见,高重力刺激对成骨细胞的 Col I 基因和蛋白的表达有着重要的刺激作用,且呈高重力大小依赖性。Col I 蛋白表达明显滞后于基因表达,推测两者不同步的原因是成骨细胞对高重力刺激的反应首先体现在细胞基质方面,通过分泌大量支撑性胶原以加固细胞骨架;其次成骨细胞 Col I 对高重力刺激响应可能存在于一个“临界值”。当临界值以下高重力刺激成骨细胞时,只分泌支撑性胶原;当高重力超过临界值时,才开始动员钙离子运输的相关蛋白表达。因此,推测这个高重力临界值为 15 g,但需要进一步实验进行验证。

茜素红与细胞的钙盐成分以螯合方式形成复合物,肉眼观察为桔红色沉积(即钙结节)。胞外矿化基质沉积,标志着成骨细胞的成熟^[26]。茜素红染色结果提示,高重力刺激可有效促进成骨细胞成熟分化,且高重力 g 值越高促进作用越明显。

高重力下成骨细胞可通过骨架结构改变发生重排引起细胞形态的改变来响应高重力刺激,传递生物学信号,调控相关基因表达,有效刺激成骨细胞成熟分化。高重力下成骨细胞成熟分化分子标志物 ALP、OC 和 Runx2 对较高水平高重力(10 g、15 g、20 g)刺激更敏感,表达水平显著上调。成骨细胞 Col I 基因对高重力刺激比 ALP、OC 和 Runx2 基因更敏感,Col I 蛋白表达却明显滞后于 Col I 基因表达,Col I 对高重力的响应可能与 ALP、OC 和 Runx2 不同有着自己的独特机制。

常用的高重力模拟设备有竖塔模拟平台和离心加压法模拟平台。竖塔模拟平台体积庞大,且产生高重力持续时间较短;离心加压法模拟平台虽可产生实验所需时间和 g 值的高重力,但大多数是将加载物捆绑于离心手臂上面,高重力加载时存在一定

安全隐患,且均不能直接对种植于培养板和培养瓶的贴壁细胞进行加载。本实验所用课题组研制的离心式高加速度加载机具有体积小、操作简单、安全方便、 g 值和时间可调等特点,最重要的是该离心加载机可以进行变加速度加载,并且具有温度控制系统,可以对内部温度进行调控,适合用于细胞、组织和动物的力学生物学研究;此外,离心式高加速度加载机转子可直接对种植于培养板和培养瓶的贴壁细胞进行加载,解决了贴壁细胞高重力加载的限制问题。其弊端在于:虽有温控系统但仍无法达到 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 浓度,只能同步设对照组以平衡该因素。此外,只探讨了加载时间相同时不同 g 值高重力对成骨细胞的影响,下一步可研究高重力条件下加载时间不同对成骨细胞的影响。

4 结语

成骨细胞 MC3T3-E1 可响应高重力,在力学生物学方面发生了一系列的变化。在形态学方面:高重力条件下成骨细胞细胞骨架的高度降低,细胞变扁,细胞表面积明显增大,骨架排列结构变得更加疏松、松散,微丝肌动蛋白束状结构减少,微丝呈弥散状,有序性降低;在成骨细胞骨化功能方面:高重力可有效促进成骨细胞成熟分化,且较高水平 ($10\text{ }g$ 、 $15\text{ }g$ 、 $20\text{ }g$) 高重力的促进作用更显著。

参考文献:

[1] 马爱军,黄晓慧. 载人航天环境模拟技术的发展[J]. 航天医学与医学工程, 2008, 21(3): 224-232.

[2] 国耀宇,谈诚,刘炳坤,等. 着陆冲击对人体影响及医学评价问题评述[J]. 航天医学与医学工程, 2002, 15(6): 455-459.

[3] STAPP JP, TAYLOR ER. Space cabin landing impact vector effects on human physiology [J]. *Aerosp Med*, 1964, 35(12): 1117-1133.

[4] 孙喜庆,张立藩. 大过载引起的意识丧失分析[J]. 国际航空, 1996(10): 59-61

[5] NAUMANN FL, GRANT MC, DHALIWAL SS. Changes in cervical spine bone mineral density in response to flight training [J]. *Aviat Space Environ Med*, 2004, 75(3): 255-259.

[6] KITA S, IWASAKI K, ONISHI R, *et al*. Bone metabolism and formation of mice bred in a 2 G environment [J]. *Adv*

Space Res, 2003, 32(8): 1453-1457.

[7] VICO L, BAROU O, LAROCHE N, *et al*. Effects of centrifuging at 2g on rat long bone metaphyses [J]. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1999, 80(4): 360-366.

[8] 李亚龙,李东韬,张舒. 微重力对成骨细胞的周期及分化过程的影响[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(10): 1073-1075.

[9] 戴钟铨,李莹辉,万玉民,等. 微重力对成骨细胞及其分化过程的影响[J]. 中华航空航天医学杂志, 2005, 16(2): 148-151.

[10] LIANG X, DING SL, LEI RH, *et al*. Effects of simulated micro-gravity on osteoblast skeleton and function[C]//Proceedings of 2011 First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering. Qiqihar: [s. n.], 2010.

[11] 欧阳宁鹃,张鹏,傅润卿,等. FoxO1 在持续张应力促 MC3T3-E1 细胞成骨向分化中的表达变化[J]. 医用生物力学, 2015, 30(2): 154-158.

OUYANG NJ, ZHANG P, FU RQ, *et al*. Changes in FoxO1 expression of MC3T3-E1 cells during continuous tensile stress induced osteogenic differentiation [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(2): 154-158.

[12] TOMAKIDI P, SCHULZ S, PROKSCH S, *et al*. Focal adhesion kinase (FAK) perspectives in mechanobiology: Implications for cell behaviour [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(3): 515-526.

[13] FURUTSU M, KAWASHIMA K, NEGISHI Y, *et al*. Bidirectional effects of hypergravity on the cell growth and differentiated functions of osteoblast-like ROS17/2. 8 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(10): 1258-1261.

[14] VAN LOON JJ, VAN LAAR MC, KORTERIK JP, *et al*. An atomic force microscope operating at hypergravity for *in situ* measurement of cellular mechano-response [J]. *J Microsc*, 2009, 233(2): 234-243.

[15] KACENA MA, TODD P, GERSTENFELD LC, *et al*. Experiments with osteoblasts cultured under hypergravity conditions [J]. *Microgravity Sci Technol*, 2004, 15(1): 28-34.

[16] SEARBY ND, STEELE CR, GLOBUS RK. Influence of increased mechanical loading by hypergravity on the microtubule cytoskeleton and prostaglandin E2 release in primary osteoblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289(1): C148-158.

[17] 康金超. 细胞骨架系统对力学变化响应的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2015.

[18] 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.

[19] ZHOU S, ZU Y, SUN Z, *et al*. Effects of hypergravity on

- osteopontin expression in osteoblasts [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): 1-19.
- [20] DAI Z, GUO F, WU F, *et al.* Integrin alphavbeta3 mediates the synergetic regulation of core-binding factor alpha1 transcriptional activity by gravity and insulin-like growth factor-1 through phosphoinositide 3-kinase signaling [J]. *Bone*, 2014, 69(12): 126-132.
- [21] 张寅星, 崔玉红, 黄啸, 等. 生理水平流体剪应力对三维多孔支架中成骨细胞力学敏感性及其黏附、分化的影响[J]. *医用生物力学*, 2014, 29(2): 119-125.
ZHANG YX, CUI YH, HUANG X, *et al.* Effects of shear stress at physiological level on mechanical sensitivity, adhesion and differentiation of MC3T3-E1 cells in three-dimensional porous scaffold [J]. *J Med Bioemch*, 2014, 29(2): 119-125.
- [22] YANO S, KITAMURA K, SATOH Y, *et al.* Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and osteoclasts in medaka scales [J]. *Zoolog Sci*, 2013, 30(3): 217-223.
- [23] 孙玉敏, 黄冬冬, 程才, 等. 葛根素对体外培养老年女性骨质疏松症患者成骨细胞碱性磷酸酶及骨钙素的影响[J]. *武警后勤学院学报: 医学版*, 2015, 24(10): 775-778.
- [24] TJANDRAWINATA RR, VINCENT VL, HUGHES-FULFORD M. Vibrational force alters mRNA expression in osteoblasts [J]. *FASEB J*, 1997, 11(6): 493-497.
- [25] 丁波, 黄姣, 何斌. 成骨生长肽对大鼠成骨细胞 I 型胶原蛋白的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(9): 951-953.
- [26] SIKAVITSAS VI, BANCROFT GN, HOLTORF HL, *et al.* Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(25): 14683-14688.

《医用生物力学》杂志征稿、征订启事

《医用生物力学》杂志由中华人民共和国教育部主管、上海交通大学主办,是国内唯一一本公开发行,以积极反映生物力学基础研究与应用研究成果,推动国内外学术交流,促进医、生、理、工各学科相互了解和合作为目的的学术性刊物。报道内容主要包括生物力学领域中有力学生物学、器官-组织生物力学、细胞-亚细胞-分子生物力学、感觉系统生物力学、骨骼肌肉系统生物力学、航空航天生物力学、颌面口腔生物力学、呼吸系统生物力学、康复工程生物力学、心血管系统生物力学、血液流变学、医用材料生物力学、运动医学生物力学等的研究论文。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊);美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、荷兰《文摘与引文数据库》来源期刊;2015年入选北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2014年版)。

本刊为双月刊,每双月25日出版,16开本,96页,国内统一连续出版物号CN 31-1624/R,国际标准连续出版物号ISSN 1004-7220;定价每期15.00元,全年90.00元,由邮局向全国征订发行,邮发代号4-633。读者可在附近邮局订阅或通过邮政“11185”客户服务中心电话订阅。欢迎广大读者、作者订阅本刊,踊跃来稿。

地址:上海市制造局路639号200011

电话:(021)53315397;传真:(021)63137020;电子信箱:shengwulixue@163.com

网址:www.medbiomechanics.com, www.mechanobiology.cn