

[文章编号 1000-1182(2005)02-0110-03]

大鼠骨髓间充质干细胞和颅骨成骨细胞 在张应力下细胞骨架的改变

戚孟春, 胡 静, 邹淑娟, 韩力赤, 罗 恩

(口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)和颅骨成骨细胞(OB)在机械张应力刺激下的反应和细胞骨架蛋白 F-actin 的变化。方法 体外分离培养大鼠骨髓 MSCs 和颅骨 OB, 应用四点弯曲加力系统对细胞施加 2 000 μ 的机械张应力, 加力时间分别为 0 h、2 h、6 h、12 h。采用激光共聚焦显微镜观察特异性荧光染料标记的微丝蛋白 F-actin 和细胞核, 并用图像分析软件对细胞形态学参数进行测量。结果 MSCs 和 OB 荧光强度减弱, F-actin 纤维束稀疏, 排列紊乱; 细胞核轮廓模糊, 部分细胞可观察到凋亡小体; MSCs 体积明显变小, OB 体积变化不明显。定量分析表明, MSCs 的细胞总面积、总荧光密度、绿色荧光(F-actin)密度均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); OB 的总荧光密度、绿色荧光密度和细胞核红色荧光密度也显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 机械张应力刺激可引起 MSCs 和 OB 细胞骨架 F-actin 解聚和重排, 部分细胞发生凋亡; MSCs 对机械力刺激的反应比 OB 更敏感。

[关键词] 间充质干细胞; 成骨细胞; 机械张应力; 激光共聚焦显微镜

[中图分类号] R 782 **[文献标识码]** A

The Changes of Cytoskeleton F-actin in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Calvarial Osteoblasts under Mechanical Strain QI Meng-chun, HU Jing, ZOU Shu-juan, HAN Li-chi, LUO En. (Key Lab. of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective To explore the response of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) and calvarial osteoblasts to mechanical strain and the consequent changes of cytoskeleton F-actin. **Methods** Bone marrow MSCs and calvarial osteoblasts were isolated from SD rats and cultured *in vitro*. Mechanical stretch was performed on passage 3 cells at 2 000 μ for 0, 2, 6 and 12 hours using four-point bending system. The response of cells and the distribution of F-actin were observed using fluorescent staining under laser scanning confocal microscope and the morphological parameters were quantified using image analysis software Laspix. **Results** Under mechanical stretch, the fluorescent staining decreased obviously at both MSCs and osteoblasts, and F-actin filaments were rearranged and became tenuous, thinner, and abnormally distributed. The outline of nucleus became unclear and apoptotic changes were observed at some of both cells. Cellular size decreased more significantly in MSCs than in osteoblasts. Quantity analysis showed that total area of cells, total fluorescent density and green fluorescent density (F-actin) were all significantly decreased in MSCs ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and total fluorescent density, green fluorescent density and red fluorescent density (nuclei) did also in osteoblasts ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Mechanical stretch caused extensive response on both MSCs and osteoblasts which led to the rearrangement of F-actin filament and apoptosis in some of these cells. MSCs were more sensitive to mechanical strain than osteoblasts.

Key words mesenchymal stem cells; osteoblasts; mechanical stretch; laser scanning confocal microscope

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有多向分化潜能的原始细胞,是成骨细胞(osteoblast, OB)的来源细胞。目前有关细胞对机械力学刺激反应的研究主要集中在 OB,而对 MSCs

在力学刺激下发生的变化知之甚少。在细胞水平上,骨组织对机械力学刺激的反应涉及复杂的信号传导网络,其中细胞骨架蛋白扮演着重要角色。聚合态肌动蛋白(F-actin)是微丝蛋白的主要形式,对细胞的多种功能起着重要的调控作用。本研究利用荧光标记技术,通过激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)观察,探讨 MSCs 和 OB 在周期性张应力刺激下细胞的反应及骨架蛋白 F-actin 的变化,为力学刺激下骨组织细胞信号应答网络的进一步研究提供实验依据。

[收稿日期 2004-09-15; 修回日期 2004-10-26]

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30371553);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20020610062)

[作者简介]戚孟春(1971-),男,河北人,主治医师,博士

[通讯作者]戚孟春, Tel: 028-85502334

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器

SD 大鼠购自四川大学华西医学中心实验动物部。DMEM、LG-DMEM、FBS 均购自美国 Hyclone 公司; Percoll 分离液 (PHARMACIA 公司, 美国); BODIPY FL Phalloidin, DAPI-Rhodamine、LSCM、图像处理软件 Laserpix 均购自美国 Bio Rad 公司。

1.2 大鼠骨髓 MSCs 和颅骨 OB 的分离和培养

采用密度梯度离心法分离骨髓 MSCs, 详细方法参见文献^[1]。采用骨组织块法分离颅骨 OB。无菌条件下取新生 2 d 的乳鼠颅骨, 用含双抗的 PBS 液洗涤 3 次, 去净内外骨膜及软组织, 将颅骨剪成 1 mm^3 的碎片, 均匀铺散在 25 cm^2 的培养瓶底壁上; 将培养瓶底面朝上, 小心加入 3 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO_2 的培养箱内培养 4 h, 小心翻转培养瓶, 继续培养; 5~7 d 后更换培养基, 去除骨组织碎片, 细胞达 80% 融合时用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞, 并按 1:2~1:3 的比例传代。

1.3 LSCM 观察机械力作用下 MSCs 和 OB 形态

采用四川大学华西口腔医院正畸科和电子科技大学联合研制的四点弯曲加力系统进行细胞加力。加力参数为位移 1 mm, 频率 0.5 Hz, 此时细胞受力为 2000μ 。取第 3 代 MSCs 和 OB, 接种于特制塑料培养板上, 继续培养 48 h。每种细胞分为加力 0 h、2 h、6 h、12 h 4 组。加力完成后塑料培养板用 PBS 冲洗 2 次, 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 20 min; PBS 洗涤 3 次, 每板加入 100 μl 孵育液, 内含与 F-actin 专一性结合的绿色荧光标记物 BODIPY FL Phalloidin (1:100) 和胞核特异性红色荧光染料 DAPI-Rhodamine (1:800), 37℃ 避光孵育 1 h; PBS 洗涤 3 次, 缓冲甘油封片, LSCM 下观察。

应用 Laserpix 图像处理软件, 随机对每一培养板上 6 个边界清晰的细胞进行图像分析, 测量各项形态学参数 (细胞总面积、总荧光密度、绿色荧光密度和红色荧光密度)。

1.4 统计学分析

每种细胞的计量资料用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析, 差异有显著性时进一步进行多重比较: 方差齐性时用 LSD 法; 方差不齐时用 Tamhance 法。

2 结果

2.1 形态学观察

大鼠骨髓 MSCs 未加力时 (0 h) 细胞形态呈典型的多角形, 荧光染色强, 分布均匀; 肌动蛋白纤维呈束状平行排列, 纤维较粗; 细胞中央可见椭圆形红染的

细胞核。细胞受力后, 荧光强度减弱, 且分布不均匀; 细胞体积变小, 形态变得不规则, 部分细胞呈皱缩的小圆形、三角形细胞; 肌动蛋白束变细, 排列稀疏而紊乱; 胞核轮廓模糊, 部分细胞染色质发生浓聚或破碎成大小不一的颗粒状凋亡小体 (图 1)。上述变化随加力时间延长而变得更加显著。

大鼠颅骨 OB 细胞形态与 MSCs 相似, 也呈典型的多角形, 但体积较小。未加力时 (0 h) 细胞荧光染色强, 分布均匀; 肌动蛋白呈束状平行排列, 纤维较粗; 细胞中央可见轮廓清晰的红染细胞核。细胞受力后, 随受力时间延长, 荧光强度减弱, 分布不均匀; 细胞体积及形态变化不显著; 肌动蛋白束变细, 排列稀疏, 方向性变差; 胞核轮廓模糊, 红色荧光强度略增强, 部分细胞染色质也随加力时间的延长发生浓聚, 或破碎成颗粒状。与 MSCs 比较, 上述改变相对较轻 (图 2)。



图 1 MSCs 在加力 0 h (左) 和 12 h (右) 后细胞骨架形态 荧光标记 $\times 600$

Fig 1 Cytoskeleton changes in MSCs after 0 hour (left) and 12 hours (right) of mechanical stretch fluorescent labeling $\times 600$



图 2 OB 在加力 0 h (左) 和 12 h (右) 后细胞骨架形态 荧光标记 $\times 600$

Fig 2 Cytoskeleton changes in OB after 0 hour (left) and 12 hours (right) of mechanical stretch fluorescent labeling $\times 600$

2.2 图像分析

大鼠骨髓 MSCs 在受力各时间点 (2 h, 6 h, 12 h), 细胞总面积、总荧光密度、绿色荧光 (F-actin) 密度与未受力时 (0 h) 相比均显著降低, 方差分析表明 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 胞核红色荧光密度则先增强, 后有所减弱, 与未受力时 (0 h) 的相比差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 1。大鼠颅骨 OB 在受力各时间点

(2 h, 6 h, 12 h), 总荧光密度、绿色荧光密度、胞核红色荧光密度与未受力时(0 h)相比均显著降低, 方差分析表明 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 细胞总面积与未受力时(0 h)相比变化不明显($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 MSCs 在机械张力下各项参数定量分析($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Quantity analysis of morphometric parameters in MSCs under mechanical stretch($\bar{x} \pm s$)

分组	细胞总面积	总荧光密度	绿色荧光密度	红色荧光密度
0 h	22 347.3 \pm 12 615.6	37.3 \pm 15.7	88.9 \pm 32.2	18.5 \pm 13.2
2 h	15 642.1 \pm 7 300.5	28.0 \pm 8.7	61.5 \pm 22.3	19.4 \pm 6.2
6 h	9 548.7 \pm 2 350.0	26.3 \pm 6.4	42.0 \pm 11.9	33.5 \pm 12.9
12 h	9 505.2 \pm 2 383.9	13.6 \pm 8.8	13.7 \pm 8.4	24.4 \pm 17.6

表 2 OB 在机械张力下各项参数定量分析($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Quantity analysis of morphometric parameters in OB under mechanical stretch($\bar{x} \pm s$)

分组	细胞总面积	总荧光密度	绿色荧光密度	红色荧光密度
0 h	16 719.6 \pm 9 503.8	44.4 \pm 9.7	88.6 \pm 25.1	40.8 \pm 6.9
2 h	15 501.2 \pm 3 054.7	33.0 \pm 4.8	66.3 \pm 20.3	28.6 \pm 13.0
6 h	11 169.7 \pm 3 848.2	34.7 \pm 8.6	71.6 \pm 15.5	28.2 \pm 13.0
12 h	10 408.6 \pm 4 200.9	16.9 \pm 2.5	42.8 \pm 6.4	6.2 \pm 0.9

3 讨论

正常骨组织改建、正畸牙移动、牵张成骨等都离不开机械力学刺激, 而生理状态的周期性机械力刺激是骨组织新生的基础。在骨组织复杂的细胞信号传导网络中, 机械力引起的细胞骨架系统的改变, 是信号传导网络中重要的一环。微丝是细胞骨架的主要结构之一, 普遍存在于真核细胞中, 并与其相关蛋白、整合素和细胞外基质形成有机的复合体², 参与细胞内外的多种信号传导和物质运输。研究机械力学刺激下细胞骨架系统的改变, 以及细胞发生的进一步变化, 对揭示骨组织在机械力下发生改建和新生的机制具有重要意义。

F-actin 是微丝的主要成分, 参与细胞形态维持及多种细胞功能, 其结构重排及聚合和解聚的动态变化, 在一定程度上反映了细胞的功能状况。本研究应用荧光物质 BODIPY FL Phalloidin 和 DAPI Rhodamine 分别对 F-actin 和细胞核进行特异性标记, 研究大鼠骨髓 MSCs 和颅骨 OB 在机械力刺激下的反应。结果表明, MSCs 和 OB 在 2 000 μ 、0.5 Hz 的周期性牵张力下, 随着加力时间的延长, 细胞均发生荧光强度减弱, F-actin 纤维束变细、排列稀疏, 胞核内出现凋亡小体等变化; 而 MSCs 比 OB 变化更显著。同时, MSCs 体积明显减小, 形态变得不规则; 而 OB 的形态和体积变化不显著。上述结果表明, 在周期性牵张力下, 细胞骨架蛋白发生了改建, F-actin 解聚并重排, 从而触

发了一系列信号反应, 并诱发部分细胞发生凋亡; 而 MSCs 对机械力刺激的反应比 OB 更敏感。

本研究所观察的细胞 F-actin 在机械力刺激下的变化与其他研究相一致^{3,4}; 同时发现 MSCs 和 OB 在张应力下发生了凋亡改变。在细胞水平上, 2 000 μ 的力学刺激属生理范围, 理论上应该刺激细胞增殖和分化, 而不会引起细胞凋亡; 其他学者研究^{5~8} 也表明, 周期性机械牵张可促进成骨细胞的功能, 使转化生长因子-、胰岛素样生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、骨桥素、型胶原的 mRNA 水平增加, 骨钙素、胶原蛋白等分泌增加。这种差异可能是所采用的加力系统、加力时间以及加力频率不同所致。陈国平等³ 对 OB 的力学刺激, 采用了离心加力系统, 加力时间为 10 min; Cillo 等⁵、Harter 等⁶、Fong 等⁷、胡静等⁸ 所采用的为 Flexcell 系统, 加力频率为 0.05 Hz; 本研究采用四点弯曲加力系统, 加力频率为 0.5 Hz, 加力时间为 2~12 h。笔者认为, 正是这些不同导致了上述结果差异。本研究也提示, 应用四点弯曲加力系统研究 MSCs 和 OB 对机械力学刺激的反应时, 应施加较为温和的机械力。

细胞受到力学刺激后, 只有将力学刺激转变成相应信号传入胞内, 才能引起一系列的应答反应; 而细胞外基质-整合素-细胞骨架系统在其中起着重要作用²。相关研究^{9,10} 表明, 机械力诱发平滑肌细胞、内皮细胞等发生凋亡可能与 Caspases 家族及 p38

床治疗中前牙应防止超填,后牙应减少欠填。

评价多根牙 RCT 质量,除了根充程度和严密程度外,还应观察所有根管是否治疗完全。如治疗时有放弃或漏掉的根管,该牙 RCT 难免失败。本次分析了 540 颗磨牙的 RCT,全治率为 89.44%,有 10.56% 的患牙有根管漏治或弃治,虽然这些根管多数是因根管钙化不通或异物堵塞等原因而放弃治疗,并非完全是由于医生的原因,但此结果仍说明临床治疗中对那些容易漏治的牙位和根管应引起足够重视。笔者认为应当将根管全治率作为评价磨牙 RCT 质量的重要指标。

磨牙根管系统复杂,数目较多,形态多样,是根管治疗的难点。本研究分析了磨牙 RCT 情况,发现第一磨牙根管全治率高于第二磨牙,下磨牙高于上磨牙。上磨牙腭根管受治率最高,超填率也较高;近颊根管受治率最低,欠填率则较高,提示临床治疗中上磨牙近颊根管易漏治、易欠填。上磨牙除腭根管外,欠填率均高于超填率,说明临床治疗中如何避免磨牙根管欠填是值得重视的问题。

多数学者主张 RCT 的临床疗效观察时间以 2 年为宜^{4,7}。本次观察 RCT 术后 2 年回访的 505 例患者的 695 颗患牙中,符合成功标准的有 656 颗,其 RCT 成功率为 94.39%,这与国内外多数文献报道相当^{1~3}。失败患牙中多数为病变严重或病情复杂者,如牙周牙髓联合损害、根管钙化、异物堵塞等。另有部分原因是根管漏治或欠填。尽管本次回访率(46.37%)偏低,但回访者完成 RCT 患牙的绝对数量

达 695 个,结果仍能说明一定的问题。

关于 RCT 疗程和就诊次数,本次观察病例中 89.19% 的患者需 3 次或 3 次以上才能完成,平均疗程 2.8 周。我国行 RCT 多采用多次法,治疗程序一般分为拔髓或牙髓失活、根管预备、根管充填 3 步。而国外报道⁸ 活髓牙一次性行 RCT 的比例达 55.8%,感染根管一次性行 RCT 也达 34.8%,因此缩短疗程、减少就诊次数是不容忽视的问题。

[参考文献]

- 1] Sjögren U, Hägglund B, Sundquist G, et al. Factors affecting the long-term result of endodontic treatment J. J Endon, 1990, 16(10): 498-504.
- 2] Weine FS. Basis for successful endodontics. In: Endodontic Therapy M. 5th ed. Mosby: A Times Mirror Company, 1996:1-27.
- 3] 唐荣银,史俊南. 根管治疗术一次法 10 年临床疗效 J. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1996, 6(3): 162-163.
- 4] 樊明文主编. 牙体牙髓病学 M. 北京:人民卫生出版社, 2000: 271-273.
- 5] Chueh LH, Chen SC, Lee CM, et al. Technical quality of root canal treatment in Taiwan J. Int Endod J, 2003, 36(6): 416-422.
- 6] Boucher Y, Mutossian L, Rilliard F, et al. Radiographic evaluation of the prevalence and technical quality of root canal treatment in a French subpopulation J. Int Endod J, 2002, 35(3): 229-238.
- 7] Fabio GM, Gorni D, Massimo M, et al. The outcome of endodontic retreatment: a 2-year follow-up J. J Endon, 2004, 30(1): 57-60.
- 8] Inauroto K, Kojima K, Nagnamatsu K. A survey on single-visit endodontics J. J Endon, 2001, 27(3): 35.

(本文编辑 邓本姿)

(上接第 112 页)

MAPK 等信号分子有关。本实验中, MSCs 和 OB 所发生的变化可能与机械力学刺激触发了上述相似的信号通路相关;但其对机械力学刺激应答的详细机制, 尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- 1] 韩立赤,胡静,戚孟春,等. 大鼠骨髓 MSCs 体外分离培养及多向分化的实验研究 J. 口腔医学研究, 2004, 20(2): 142-145.
- 2] Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain J. Calcif Tissue Int, 1995, 57(5): 344-358.
- 3] 陈国平,周征,郑翼,等. 成骨样细胞受力后细胞骨架中微丝形态结构变化的初步研究 J. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(3): 213-215.
- 4] 毛勇,段小红,王忠义,等. 不同应力对成骨细胞和细胞骨架影响的实验研究 J. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2001, 11(2): 98-100.

- 5] Cillo J E Jr, Cassner R, Koepsel RR, et al. Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells: implications for distraction osteogenesis J. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000, 90(2): 147-154.
- 6] Harter LV, Hruska KA, Duncan RL. Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation J. Endocrinology, 1995, 136(2): 528-535.
- 7] Fong KD, Nacamuli RP, Loba EG, et al. Equibiaxial tensile strain affects calvarial osteoblast biology J. J Craniomaxillofac Surg, 2003, 14(3): 348-355.
- 8] 胡静,邹淑娟,高占巍,等. 机械牵张对人成骨细胞 ALP 和型胶原表达的影响 J. 口腔颌面外科杂志, 2003, 13(1): 11-13.
- 9] White SR, Williams P, Wójcik KR, et al. Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal dereangement in human airway epithelial cells J. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24(3): 282-294.
- 10] Goldman J, Zhang J, Liu SQ. Degradation of alpha-actin filaments in venous smooth muscle cells in response to mechanical stretch J. Am J Physiol, 2003, 284(5): H1839-H1847.

(本文编辑 汤亚玲)