

[文章编号] 1000-1182(2007)03-0289-03

交变应力对大鼠翼外肌成肌细胞增殖活性的影响

宋锦璘¹, 樊瑜波², 赵志河³, 邓 锋¹, 郑雷蕾³

(1.重庆医科大学附属口腔医院 正畸科, 重庆 400015; 2.北京航空大学 生物医学工程学院, 北京 100083;

3.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 探讨不同交变应力作用下, 大鼠翼外肌成肌细胞增殖活性的变化, 为交变应力下翼外肌组织的改建提供必要的基础实验数据。方法 在自行研制的脉动式细胞力学系统基础上, 将大鼠翼外肌成肌细胞在膜交变应力培养小室内进行培养, 分别施加2.5、5.0、10.0 kPa交变力学刺激于不同频率组, ³H-TDR检测成肌细胞增殖活性, 并将结果进行统计学处理分析。结果 高频组不同大小的交变应力都有促成肌细胞增殖的趋势, 与空白组比较具有明显的促增殖作用($P<0.05$); 在交变应力作用12 h后, 不同频率组间比较的规律与6 h后基本一致, 但是较6 h具有更大的增殖活性变化。低频组组间的增殖活性变化规律基本与高频组一致, 但低频组有更大的促增殖效应。结论 低频率比高频率具有较高的促成肌细胞增殖活性; 随着交变应力作用时间的延长, 成肌细胞增殖活性在较低应变范围内(5.0 kPa)随应变的加大而增加, 较大应变具有较小的成肌细胞增殖活性增加趋势。

[关键词] 交变应力; 成肌细胞; 增殖活性

[中图分类号] R783.5 [文献标识码] A

Time Varied Stress Effects on the Proliferation of Myoblast in Rats SONG Jin-lin¹, FAN Yu-bo², ZHAO Zhi-he³, DENG Feng¹, ZHENG Lei-lei³. (1. Dept. of Orthodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China; 2. Bioengineering College, Beijing Aviation University, Beijing 100083, China; 3. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To investigate the effects of time varied stress on the proliferation of myoblast in rats and provide the basic experimental data for the remodeling of tissue in functional orthopaedics. Methods Based on the pulsatile mechanical system founded, this study loaded different strain(2.5, 5.0, 10.0 kPa) to the myoblast of lateral pterygoid muscle. The proliferation of myoblast was detected by ³H-TDR. Results After 6 hours under time varied strain, the significant proliferation of myoblast($P<0.05$) was observed, and the 5.0 kPa group expressed the best proliferation. After 12 hours under time varied strain, all groups expressed a better proliferation. Meanwhile, the lower frequency(0.40 Hz) had the bigger effect on the proliferation more than in the higher frequency(1.25 Hz) under the same time varied strain. Conclusion The frequency of time varied strain had also the important influence on the proliferation, the lower frequency(0.40 Hz) had the bigger effect on the proliferation more than in the higher frequency(1.25 Hz) under the same time varied strain. In the certain period of time and certain magnitude of time varied strain, the proliferation of myoblasts rised.

[Key words] time varied stress; myoblast; proliferation

研究表明, 从器官、组织到细胞、亚细胞等各个层次上的生命运动, 都是在一定力学环境中进行的。“应力—生长”的关系在细胞水平上主要体现在2个方面: 单个细胞的生物学行为, 如增殖、形态变化和分泌功能等的响应; 群体细胞组织化的整体行为响应, 如肌肉组织在力学环境下的改建等。因此,

本实验结合肌细胞的力学作用的生物学活性, 从细胞力学层次模拟研究翼外肌组织的“应力—生长—形态”构建过程, 探讨功能矫形中翼外肌细胞在力学环境下改建的形态和增殖的关系, 为探讨矫治治疗中成肌细胞改建机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要实验仪器及设备

OLYMPUS IX 50倒置相差显微镜(Olympus公司,

[收稿日期] 2006-12-26; [修回日期] 2007-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(10472138和10202016)

[作者简介] 宋锦璘(1973-), 男, 江西人, 副教授, 博士

[通讯作者] 宋锦璘 T I 023 66758691

日本)。

1.2 主要实验材料及试剂

型胶原酶、胰蛋白酶(Sigma公司, 美国)、DMEM培养基、新生小牛血清(四川大学华西医学中心分子生物学实验室), 2周龄纯种SD大鼠(四川大学华西实验动物中心), 医用硅胶膜(成都化工部有机硅中心)。

1.3 细胞力学脉动流实验装置

将体外培养的成肌细胞培养于硅胶膜上, 通过硅胶膜密闭隔开细胞培养小室与液压小室。当直流电机在驱动控制系统作用下运动时, 带动循环液作周期性的生理脉动, 膜产生弹性变形, 从而使贴附于其上的成肌细胞受到相应的脉动流体剪切应力。这就构建了细胞力学脉动流实验装置。

1.4 实验方法

1.4.1 SD大鼠翼外肌成肌细胞的培养、鉴定 采用肌卫星细胞培养法获得高纯度的成肌细胞。分离培养SD大鼠翼外肌肌卫星细胞, 型胶原酶、胰蛋白酶2次消化后接种于含胶原的培养瓶中培养, 待90%左右细胞近似汇集后传代。常规显微镜对培养成肌细胞进行形态学观察。

1.4.2 膜交变应力培养小室和硅胶膜的处理 所用硅胶膜在使用前置于75%乙醇中浸泡24 h, 去除可能的其他化学成分, 然后三蒸水反复漂洗后浸泡12 h。在接种成肌细胞之前, 硅胶膜进行纤维蛋白基底预处理。组装不锈钢整体培养小室, 用高温、高压(121 ℃、0.1 MPa、25 min)灭菌后备用。

1.4.3 SD大鼠翼外肌成肌细胞生长曲线的测定 将培养瓶中传代第4代的翼外肌成肌细胞, 以每毫升 1×10^4 个的浓度接种于不锈钢培养小室的硅胶膜上, 每室4 mL, 每3室为1组, 共7组。将细胞继续培养8 d, 每天取1组, 胰酶消化后进行细胞计数, 取3室平均值, 绘制翼外肌成肌细胞生长曲线。

1.4.4 不同交变应力环境下³H-TDR检测成肌细胞增殖活性 将含15%小牛血清的DMEM培养基, 与第4代具有旺盛增殖能力的SD大鼠翼外肌成肌细胞混悬液5 mL(每毫升 1×10^4 个), 加入不锈钢培养小室中培养, 并分别在2.5、5.0、10.0 kPa交变应力状态下(0.40、1.25 Hz)持续培养6、12 h。将不锈钢培养小室整体取出, 立即送同位素检测室加入³H-TDR(上海原子能研究所), 放入37 ℃培养箱再培养6 h后, 用表面活性剂Xtraton 100%终止反应, 令测试细胞样本完全破裂, 取上清液, 在FJ-2107p液体闪烁计数器上测定cpm(次/分)值。

1.4.5 统计分析 用PEMS 3.0统计学软件进行统计分析。

2 结果

2.1 成肌细胞生长曲线

成肌细胞数目在第1天缓慢增加, 到第5天达到峰值, 以后生长开始减弱(图1)。

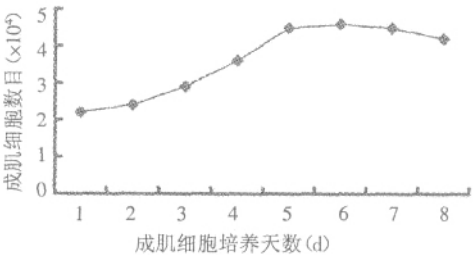


图1 大鼠翼外肌成肌细胞生长曲线

Fig 1 The growth curves of every passage in myoblasts

2.2 不同交变应力环境成肌细胞增殖活性

在交变应力作用6 h后, 高频组(1.25 Hz)不同大小的交变应力都有促成肌细胞增殖的趋势, 与空白组比较具有明显的促增殖作用(P<0.05), 以5.0 kPa组效果最好; 在交变应力作用12 h后, 不同频率组间比较的规律与6 h后基本一致, 但是较6 h具有更大的增殖活性变化。低频组(0.40 Hz)组间的增殖活性变化规律基本与高频组一致, 但低频组有更大的促增殖效应。5.0 kPa低频交变应力相对于空白对照组和其他实验组有显著的促增殖作用(P<0.05)(表1、2)。实验中观察到在高交变应力(10.0 kPa)作用2 h后, 大鼠成肌细胞在硅胶膜局部, 尤其在膜中心到1/2半径处出现细胞脱落现象。

表1 1.25 Hz高频率时不同交变张应力作用下成肌细胞cpm值 n=5, $\bar{x} \pm s$

Tab 1 The comparison of proliferative ability of myoblasts under time varied strain with 1.25 Hz in silicon membrane n=5, $\bar{x} \pm s$

时间(h)	对照组	交变应力(kPa)		
		2.5	5.0	10.0
6	1 485 ±132	1 528 ±177*	1 669 ±193*	1 509 ±168*
12	1 548 ±215	1 726 ±102*	1 843 ±83*	1 620 ±62*

注: *示与对照组比较, P<0.05

表2 0.40 Hz低频率时不同交变张应力作用下成肌细胞cpm值 n=5, $\bar{x} \pm s$

Tab 2 The comparison of proliferative ability of myoblasts under time varied strain in silicon membrane with 0.40 Hz n=5, $\bar{x} \pm s$

时间(h)	对照组	交变应力(kPa)		
		2.5	5.0	10.0
6	1 485 ±132	1 643 ±52*	1 774 ±120*	1 684 ±66*
12	1 548 ±215	1 922 ±66*	2 091 ±94*	1 883 ±96*

注 *示与对照组比较 P 0.05

3 讨论

3.1 翼外肌在功能矫形治疗中的改建

功能矫形治疗是应用肌收缩能力刺激颌骨发生适应性改建,改善颌骨的矢状关系,达到矫治下颌后缩、发育不足的 类错殆畸形^[1]。目前肌肉力学改建的具体机制尚存在争论,一般关注肌肉在力学作用下的生物学效应,而忽视了力学作用对肌肉的形态学改建研究^[2]。同时,单纯形态学改建并不足以导致临床形态学改建,必然伴随一定程度的成肌细胞增殖^[3-4]。以往的研究^[5]发现,功能矫治前伸下颌后幼年大鼠翼外肌线粒体数量增多,体积增大,这种变化导致线粒体内酶的合成增多,活性增强,翼外肌的氧化代谢功能增强,表示应力刺激增加了翼外肌增殖活性。有学者^[6-9]对实验组和对照组大鼠翼外肌内胰岛素的含量进行检测后发现,实验组的胰岛素含量明显高于对照组,提示胰岛素通过促进肌肉葡萄糖跨膜转运,促进糖元合成,增加蛋白质合成,使肌纤维肥大、增殖,为功能前伸下颌后翼外肌功能和结构的适应性改建奠定基础。

3.2 交变应力环境下成肌细胞的增殖活性

以往的研究表明:第4代成肌细胞具有较高的增殖活性。本研究通过绘制第4代成肌细胞生长曲线发现传代后第5天的成肌细胞具有高增殖活性。所以,本研究选取第4代成肌细胞培养5 d后的细胞作为实验用细胞。细胞增殖周期中DNA、RNA合成的增加是³H-TDR作用的原理所在。³H-TDR在培养基中作为合成原料被摄入成肌细胞,测定成肌细胞内³H-TDR的放射量即掺入率,间接反映了成肌细胞的增殖情况^[10]。

本研究表明交变张应力作用于成肌细胞不同的时间段具有不同的增殖活性。12 h组较6 h组成肌细胞增殖活性具有上升的趋势,说明交变应力对成肌细胞增殖活性的时间效应是上升的。随着交变应力作用时间的延长(12 h以内),成肌细胞增殖活性在较低的应变范围内(5.0 kPa)随应变的加大而增加,较大应变(10.0 kPa)具有较小的成肌细胞增殖活性增加趋势。因此,在不同应变范围下,成肌细胞增殖活性增殖趋势在一定的范围,并非越大越高。发生这种变化可能的原因是,较大的应变所提供的促增殖信号与成肌细胞在硅胶膜上的附着有一定的关联。当应变应力由2.5 kPa上升到5.0 kPa时,张应力促增殖信号处于优势状态,这时成肌细胞的新陈代谢速度同样加强,处于过度增殖状态;当交变应力由5.0 kPa进一步上升到10.0 kPa时,成肌细

胞营养物质的代谢受过度高压的影响逐渐处于降低状态,成肌细胞的增殖逐渐受到抑制。这可以解释为什么临床接受同样治疗的某些患者未见明显改建,而有些患者改建明显的现象。

本研究结果显示,成肌细胞的增殖活性与交变张应力的动态频率有关,低频率(0.40 Hz)比高频率(1.25 Hz)具有较高的增殖活性,其可能的原因:一方面是低频率动态张应力较高频率交变应力促进翼外肌细胞增殖,另一方面是大应变动态张应力造成贴壁细胞脱落或降低翼外肌细胞增殖。

[参考文献]

- [1] Moss ML, Rankow R. The functional matrix concept and its relationship to temporomandibular joint dysfunction and treatment [J]. Dent Clin North Am, 1983, 27(3):445-455.
- [2] Sessle BJ, Woodside DG, Bourque P, et al. Effect of functional appliances on jaw muscle activity[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1990, 98(3):222-230.
- [3] Degli-Esposti MA, Dallas PB, Dawkins RL. Neuromuscular function and polymorphism of the acetylcholine receptor gamma gene [J]. Muscle Nerve, 1992, 15(5):543-549.
- [4] Petrovic AG, Stutzmann JJ, Oudet CL. Control processes in post-natal growth of mandibular condyle cartilage[J]. Rev Ibercam Ortod, 1986, 6(1):11-58.
- [5] 王 昕, 罗颂椒, 杨名仲. 矫形力对咀嚼肌结构影响的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1994, 12(4):303-305.
WANG Xin, LUO Song-jiao, YANG Ming-zhong. Study on structure of masticatory muscles to functional orthopedic force [J]. West China J Stomatol, 1994, 12(4):303-305.
- [6] 黄 宁, 罗颂椒. 功能矫形前伸下颌后大鼠翼外肌胰岛素分布的免疫组织化学研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(3):142-144.
HUANG Ning, LUO Song-jiao. An immunohistochemical study of distribution of insulin in lateral pteryoid muscle after functional mandibular protrusion in rats[J]. West China J Stomatol, 2001, 19(3):142-144.
- [7] O Keefe RJ, Teot LA, Singh D, et al. Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: An immunohistochemical and in situ hybridization study[J]. Lab Invest, 1997, 76(4):457-465.
- [8] Bak JF. Insulin receptor function and glycogen synthase activity in human skeletal muscle: Physiology and pathophysiology[J]. Dan Med Bull, 1994, 41(2):179-192.
- [9] King RA. Effects of insulin and exercise on amino acid transport in rat skeletal muscle[J]. Am J Physiol, 1994, 266(2 Pt 1):C524-C530.
- [10] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版公司, 1996:186-187.
SI-TU Zhen-qiang, WU Jun-zheng. Cell cultivation[M]. Beijing: The World Book Publication Press, 1996:186-187.

(本文编辑 汤亚玲)