

机械压力对青春期大鼠咀嚼肌细胞增殖活性影响的体外研究

陈开云 罗颂椒

【摘要】目的 建立咀嚼肌细胞的力学刺激—细胞培养模型,在细胞水平探讨机械力作用下青春期大鼠咀嚼肌细胞功能代谢的变化。方法 采用流式细胞术检测不同时段、不同力值的机械压力对体外培养的青春大鼠咀嚼肌细胞增殖活性的影响。结果 各实验组肌细胞的DNA含量(S期百分数)均大于对照组。细胞持续受力2h后,实验组细胞的增殖指数(PI)较对照组高;细胞持续受力4h后,在2000 μ strain组的细胞增殖指数达到最高(48.9%),而4000 μ strain组的PI在所有实验组中最低(39.0%)。结论 适当的压力对咀嚼肌细胞起着促进增殖的作用;而较大的压力作用较长时间时,对体外培养咀嚼肌细胞的增殖活性却有抑制作用。

【关键词】 咀嚼肌细胞; 机械压力; 增殖活性

Study on Mechanical Compression Regulating the Proliferation of Young Growing Rat Masticatory Myocyte in vitro

CHEN Kaiyun*, LUO Songjiao. (* Department of Orthodontics, Oral Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510280, China)

【Abstract】 Objective To establish an experimental model which was the masticatory myocyte culture and force stimulation *in vitro* and study the proliferation changes of cultured masticatory myocytes caused by mechanical compression in young rat.

Methods Flow cytometry (FCM) was used to examine the changes of cellular DNA content and cell cycles of cultured masticatory myocytes.

Results The DNA content in experimental groups was higher than that in control. After the compressive force was applied for 2 hours, the proliferation index (PI) in experimental group became higher than that in control. Under a continuous pressure for 4 hours, the PI in 2000 μ strain group reached the maximum (48.9%) but the PI in 4000 μ strain group reached the minimum (39.0%).

Conclusion The proliferation of masticatory myocytes from young rat increased under certain force and certain period of time, but decreased if the force applied was overloaded.

【Key words】 masticatory myocyte; mechanical compression; proliferation

由咀嚼肌和口周肌功能异常导致的牙颌面畸形必须通过矫治器将矫治力以及面颌部肌肉收缩产生的力学信号传递到牙、牙弓及颌骨等需要矫治的部位,使牙颌形态发生改建,同时使功能过度或功能不足的肌肉恢复正常,引导儿童口颌系统正常生长发育。只有建立新的神经肌肉协调平衡关系,并与硬组织形态改建相适应,达到功能、形态平衡协调,才能保持疗效,防止复发。由此可见,面颌部肌肉组织在牙颌面畸形的发生、发展、矫治及疗效维持中起着重要的作用。以往对咀嚼肌的体内研究多为组织学、组织化学、超微结构变化,肌电和影像学研究;但由于肌细胞体内研究受诸多因素(神经、激素等)调控,因此体

外培养肌细胞的研究可以避免多种因素的相互干扰。目前,肌细胞在体外培养状态下对力学信号反应特性的变化,国内外尚少见报道。本研究将建立咀嚼肌细胞的力学刺激—细胞培养模型,利用四点弯曲细胞力学加载仪(专利号:CN2534576Y),采用流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测不同时段、不同力值的机械压力对体外培养的青春大鼠咀嚼肌细胞DNA含量及细胞周期的影响,并进一步分析研究机械力对咀嚼肌细胞增殖活性的影响,为深入阐明功能矫形治疗时神经肌肉调控的细胞学机制提供可靠的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

原代培养的5周龄SD大鼠双侧咀嚼肌细胞, F12培养基、鸡胚浸出液及胎牛血清(Gibco公司,美国);四点弯曲细胞力学加载仪;碘化丙啶染液:含碘化丙啶10 mg/L, RNA酶10 mg/L, Triton X-100 1.0%;FACScan型流式细胞仪(Beckman-

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号30171024)

作者单位:510280 广东省口腔医院正畸科(陈开云),四川大学华西口腔医院正畸科(罗颂椒)

Dickson 公司),光源为氩离子激光发生器,发射波长为 488 nm,输出率 15 mW。

1.2 咀嚼肌细胞的原代培养

参照 Blau 的方法¹,肌肉标本在 Hanks 液中去掉筋膜、肌腱,剪成 1 mm³ 大小的碎块,按 15 ml/cm³ 组织的比例加入 1:1 混合的 0.25% 胰蛋白酶与 0.1% 胶原酶消化液,37℃ 条件下消化 3~4 次,每次 20 min。舍弃第 1 次消化所得的含较多成纤维细胞、血管内皮细胞及血细胞的细胞悬液,收集以后每次消化所得细胞悬液,离心取沉淀。加入 F12 生长培养基(含 1 × 10⁵ u/L 青霉素、100 mg/L 链霉素,0.5% 鸡胚浸出液,20% 胎牛血清,pH 7.2)终止胰蛋白酶的作用,清洗,离心取沉淀。加入生长培养基打散,置于不含 I 型胶原的培养瓶中,37℃ 静置 20~30 min。成纤维细胞能在较短时间内贴壁,肌细胞贴壁慢,仍悬浮在培养基中,取上清细胞悬液获得较纯的成肌细胞悬液²。计数后按 1 × 10⁷/L 的密度接种于含胶原的培养瓶中培养,4 d 后换液,培养条件为 37℃,饱和湿度,5% CO₂ 孵箱。

1.3 建立咀嚼肌细胞力学刺激—细胞培养模型

将原代培养的大鼠咀嚼肌细胞传代,按 1 × 10⁶ 个/板密度接种于消毒后的细胞培养板中,约 2 h 后倒置显微镜下观察细胞贴壁后,再加 F12 生长培养基淹没培养板(约 15 ml/皿),置于 CO₂ 孵箱内培养。实验组与对照组同时种板。在无菌的条件下,将培养板转移入四点弯曲细胞加力装置的专用培养皿内,加入 F12 生长培养基,并开始对实验组施加频率恒定(1 Hz)的交变应力。加力时间分为 2、4 h;力值为 2 000 μstrain 和 4 000 μstrain^{3,4}。设立相应的不加力组为对照组,各组标本均在加力后无应力状态继续培养 0.5 h。

1.4 流式细胞术

将各培养板上的肌细胞消化后制成细胞悬液,PBS 洗 2

次,每份样品中加入碘化丙啶染液 1 ml,作用 30 min 后通过流式细胞仪检测,应用 DNA 细胞周期分析软件,计算出各样品 DNA 含量(S 期百分数)及细胞周期变化。细胞的增殖活性以增殖指数(proliferative index,PI)表示,其计算公式为:

$$PI(\%) = \frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M} \times 100\%$$

2 结 果

对细胞施以 2 000 μstrain 和 4 000 μstrain 的交变应力后细胞无变性,附着良好,形态无明显变化,说明成功的建立了咀嚼肌细胞的力学刺激—细胞培养模型。

各时间段不同压力作用后细胞周期、DNA 含量及细胞增殖活性结果见表 1。从表 1 可见:(1)各实验组肌细胞的 DNA 含量(S 期百分数)均大于对照组。但随着实验时间的延长,肌细胞 DNA 含量减少。在力值为 4 000 μstrain,作用 2 h 组其 DNA 含量最高(34.8%);当持续加力 4 h 后,其 DNA 含量为各实验组中最低(24.6%)。(2)当肌细胞被施以持续性机械压力后,细胞的增殖活性出现了明显的变化。细胞持续受力 2 h 后,实验组细胞的增殖指数(PI)较对照组高,且在 4 000 μstrain 组最高(45.6%);细胞持续受力 4 h 后,在 2 000 μstrain 组的细胞增殖指数达到最高(48.9%),而 4 000 μstrain 组的 PI 是所有实验组中最低的(39.0%)。

表 1 各时间段不同压力作用后细胞周期、DNA 含量及细胞增殖活性(%)

Tab 1 Cell cycles DNA contents and cell proliferation under different times and forces(%)

持续加力(μstrain)	时间(h)	G ₀ /G ₁		S		G ₂ /M		PI	
		实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
2 000	2	58.7	62.8	33.4	27.5	7.8	9.7	41.2	37.2
	4	51.1	56.2	28.8	28.7	20.1	15.1	48.9	43.8
4 000	2	54.4	64.4	34.8	27.0	10.8	8.6	45.6	35.6
	4	61.0	59.6	24.6	22.9	14.4	17.5	39	40.4

3 讨 论

细胞力学是现代生物力学中发展十分迅速的一个前沿领域,它涉及细胞在力学载荷作用下细胞的各种力学行为变化和细胞增殖、代谢等一系列改变,与口腔正畸学密切相关。细胞力学最理想的研究手段是直接探讨细胞在机体内的生理状态下对应力的各种反应,但体内众多的环境因素使体内研究难以区别单一效应或特定的联合效应,直接控制或检测以上诸多理化因素的影响是不现实的⁵。此外,常规的宏观

力学加载方式不可能直接作用于微米级大小的细胞。因此,体外培养细胞,并进行离体的应力刺激研究,成为细胞力学的重要研究手段。

在细胞生物力学研究中,如何更好地模拟体内的生理水平,对体外细胞模拟施加机械力刺激并进行精确地控制一直是研究的重点。有学者报道周期性机械力对细胞作用的效果较好³。经过十几年的发展,细胞施加机械刺激的装置已有多。以往的报道有许多是采用静张应力或静压应力研究力刺激的细胞效应,且一般力值偏大,有的细胞变形高达 10%~

20%,与体内细胞的受力不一致³。过大的力值将使细胞不能附着或使细胞和细胞骨架受到损害⁶。Owan等³认为细胞受力大小应以细胞应变量(μstrain)来表示,10 000 μstrain 即相当于1%的形变。人体剧烈运动时细胞应变量小于2 000 μstrain 即0.2%的形变⁴,过大的应变对细胞有去分化等作用^{7,8}。本实验使用了本科自行研制的四点弯曲细胞力学加载仪,通过梁变形原理,对粘附于培养板表面的细胞施加力值统一、恒定的形变,且应力采用了频率恒定的交变应力,但频率较低(1 Hz),以尽量减少加力过程中培养液波动对细胞产生的流体剪切力³。实验中未出现培养细胞污染,说明该装置消毒完善、可靠;对细胞施以交变应力后细胞无变性、无变形,附着良好,能较好地满足实验要求,证实了其可行性,为进一步研究功能矫形的神经肌肉调控机理奠定了基础。

功能矫形治疗是口腔正畸学中早期矫治儿童下颌发育不足、后缩畸形的最主要方法。通过功能性矫治器引导下颌姿势位前移,改善口颌系统肌群的肌能状况,应用肌收缩能力刺激颌骨发生适应性生长改建,改善颌骨的矢状关系,达到矫治下颌后缩、发育不足的一类错殆畸形。以往的实验研究已证明,下颌前伸时,肌肉变化早于骨组织。临床研究也发现,功能矫形治疗能使异常的肌功能恢复正常;面颌形态与肌肉的形态和功能密切相关,咬肌越厚,面部越短、宽;低角病例嚼肌的横截面积和长度均明显大于高角病例。动物实验研究发现,下颌前伸后,翼外肌和咬肌肌节数目和长度发生改变;翼外肌被动收缩,肌张力增加。翼外肌线粒体数量增多、体积增大、有氧代谢功能增强;肌电活动增强;胰岛素的含量和分布发生改变。但是,对于肌细胞在体外培养状态下,对力学信号反应特性的变化,国内外尚少见报道。

本研究发现,培养的青春期大鼠咀嚼肌细胞受到持续压力作用时,在一定的时间内(作用2 h)表现出随力值增大细胞的增殖活性有逐步增高的趋势。在力值为2 000 μstrain 时,随着作用时间的延长,细胞的增殖活性有逐渐增高的趋势,作用4 h后,增殖活性达到最高。但是力值为4 000 μstrain 时,在4 h后,细胞增殖活性却出现下降。说明适当的压力对咀嚼肌细胞起着促进增殖的作用,在肌细胞的生长发育和功能矫形治疗的神经肌肉改建中起着重要的调控作用;而当较大的压力作用较长时间时,对体外培养的咀嚼肌细胞其增殖活性却有抑制作用。

参考文献

- 1 杨志明主编. 组织工程基础与临床. 成都:四川科学技术出版社, 2000:179-199
- 2 张自杰,朱家恺. 乳鼠雪旺氏细胞的培养纯净和形态学研究. 中华显微外科杂志, 1991,14(1): 42
- 3 Owan I, Burr DB, Turner CH, et al. Mechanotransduction in bone: Osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. Am Physiol Soc, 1997, 232(4): c810-815
- 4 Burr DB, Milgrom C. In vivo measurement of human tibial strains during vigorous activity. Bone, 1996, 225(18): 405-410
- 5 Schaffer JL, Rizen M, Italien GL, et al. Device for the application of dynamic biaxially uniform and isotropic strain to a flexible cell culture membrane. J Orthop Res, 1994, 26(12): 709-719
- 6 Horikawa. Regular contributions-morphological changes in osteoblastic cells (MC3T3-E1) due to fluid shear stress: Cellular damage by prolonged application of fluid shear stress. Tohoku J Exper Med, 2000, 191(3): 127-138
- 7 宋锦麟,罗颂椒,樊玉波. 静张力对大鼠髌突软骨细胞增殖效应调节研究. 华西口腔医学杂志, 2003, 21(1): 57-60
- 8 宋锦麟,罗颂椒,樊玉波. 静张力与 TGF- β 1 对大鼠髌突软骨细胞增殖效应调节初步研究. 华西口腔医学杂志, 2003, 21(1): 61-63

(2002-10-14 收稿, 2003-06-17 修回)

(本文编辑 刘怡)

《上海口腔医学》征订启事

《上海口腔医学》是由上海第二医科大学口腔医学院、上海市口腔医学会共同主办的口腔医学综合性学术期刊,是国内第一本全彩色印刷的口腔医学专业杂志,由中国口腔医学界第一位工程院院士邱蔚六教授担任主编。杂志于1992年创刊,1998年加入(CNKI)《中国学术期刊光盘版(CAJ-CD)》,1999年被选入国家科技部中国科技论文统计源期刊,并全文上网;2000年被美国《化学文摘,CA》收录,是迄今国内被CA收录的三种口腔医学专业期刊之一。2003年通过著名医学检索系统Medline的初评。本刊主要栏目有基础研究、临床研究、专栏论著、临床总结、综述、学术讲座等,适宜于从事口腔医学的各级临床医师、科研和教学人员参阅。本刊为双月刊,每2、4、6、8、10、12月末出版,标准大16开,正文80页,全部采用铜版纸彩色(插图)印刷,无线装订,由邮局公开发行。国内统一刊号CN 31-1705/R,国际标准刊号ISSN 1006-7248,邮发代号4-561,定价8.00,欢迎广大读者订阅。外地错过邮局订期的读者,可与编辑部直接联系。地址:200011上海市制造局路639号《上海口腔医学》编辑部,联系人:费斐。电话:(021)33083812,63121780,63138341-5271,传真:(021)63121780,Email:shhkqyxzzh@online.sh.cn,网址:<http://shky.chinajournal.net.cn>,
<http://shkqyx.periodicals.com.cn>。