

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

陈国平 周征 郑翼 罗颂椒

摘要 目的:探讨成骨样细胞株 UMR-106 受机械力作用后细胞骨架微丝蛋白 F-actin 的变化。方法:成骨样细胞株 UMR-106 体外扩增,实验组以 225 ×g 相对离心力离心 10 min 后,分 7 组分别继续培养 15、30 min、1、4、6、12、24 h,并设立相应对照组。所有样本经 BODIPY FL Phalloidin 处理后,在激光扫描共聚焦显微镜下观察、记录图片并测定单个细胞的平均荧光强度。结果:对照组 F-actin 较粗,呈束状,排列较整齐;实验组除 24 h 外,其余各组的纤维明显较对照组纤细、短,散乱分布于胞浆内、无方向性;但两组间差异随时间延长逐渐减小。除 24 h 外,实验组的平均荧光强度较对照组明显降低,差异有显著性;随时间延长,实验组荧光强度逐渐回升,到 24 h 组时较对照组增强。结论:成骨样细胞受力后细胞骨架微丝的结构明显变化,荧光染色变弱,表明在机械力作用下微丝结构趋于解聚。去除刺激后随时间延长,实验组逐渐恢复并比对照组增高,说明细胞骨架受力后的改变是可恢复和改建的。

关键词 成骨细胞 细胞骨架 肌动蛋白 激光扫描共聚焦显微镜 机械压力

The Effects of the Mechanical Stress on the Cytoskeleton Filament F-actin of Osteoblast-like Cells in vitro

Chen Guoping, Zhou Zheng, Zheng Yi, et al

West China College of Stomatology, Sichuan University

Abstract

Objective Mechanical stimulation alters cell's metabolism, but little is known about the effects of mechanical strain on the cytoskeleton of osteoblasts. This study was to investigate the changes of F-actin, a cytoskeleton protein of rat-derived osteoblast-like cell line UMR-106, and to provide theoretical basis for further investigation of mechanism of bone-remodeling. **Methods**: Centrifugation was used to inflict UMR-106 the top-bottom axial stress (225 ×g) expected and, confocal laser scanning microscope (LSCM) was used to examine the morphological changes 15, 30min, and 1, 4, 6, 12, and 24hr after undergoing physical strain. Unstrained cells were used as the controls respectively. The distribution of F-actin was observed after immunofluorescent staining and electronic photo was scanned for further analysis of osteoblasts average fluorescence by spectrofluorimetric quantification. **Results**: Except the 24hr group, the actin filaments of the strained osteoblasts were much shorter, more flimsy and tenuous than that of untreated osteoblasts and unlike the normal distribution of bundles or membrane-like of the control group, and they were arranged without direction. Its quantified fluorescence was significantly less than that of the controls. But the 24hr group showed a normal distribution and a stronger fluorescence. **Conclusion**: It is concluded that the cytoskeleton of the strained osteoblasts has a reduced number of F-actin fibers and a unique abnormal morphology and could recover in 24hr.

Key words: osteoblast-like cell cell skeleton F-actin confocal laser scanning microscope mechanical stress

细胞骨架是细胞的支架结构,是细胞力学信号转导的一个重要环节¹⁻³。肌动蛋白(actin)是细胞骨架中微丝的主要蛋白,包括聚合态肌动蛋白(F-actin)或游离态肌动蛋白(G-actin),它们可直接

影响细胞骨架的结构,体外培养时 actin 与细胞的粘附和伸展密切相关。正畸治疗时,正畸牙移动涉及成骨与破骨活动,成骨细胞在受机械力后,其反应必将对正畸临床有重要意义。本研究是在激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)下初步观察成骨样细胞 UMR-106 在受机械力刺激后细胞骨架发生的变化。

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39800145)

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

成骨样细胞株 UMR-106 (北京大学口腔医学院口外实验室提供), 含 10% 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养基 (Hyclone 公司), 经 BODIPY FL Phalloidin (Bio-Rad 公司, 美国), LSCM (MRC1024ES, Bio-Rad 公司, 美国), 图像处理软件 Image-Pro plus (Version 4.0, Media Cybernetics, LP)。

1.2 实验方法

将成骨样细胞株 UMR-106 于盖玻片表面培养 24 h 后 (10% FBS 的 DMEM 培养基), 以 225 xg 相对离心力在离心机对实验组加力 10 min。实验组共分 7 组, 分别于加力后培养 15、30 min, 1、4、6、12、24 h, 设立相应的不加力对照组。各组标本在各设定培养时间用 4% 多聚甲醛固定 5 min, 0.1% Triton X-100 处理 10 min, 在经 BODIPY FL Phalloidin 中 37 孵育 1 h, PBS 清洗后, 缓冲甘油封片。在 LSCM 下观察、记录图片 (所有样本的参数均为 $\text{iris}: 3.9$, $\text{Gain}: 1384$, $\text{Blew}: -33$), 并用图像处理软件 Image-Pro plus 测定单个细胞的荧光强度 (每一标本任选 6 个平均染色强度、形态边界清晰的细胞, 由单一 LSCM 操作员完成)。

1.3 统计学分析

测定结果采用 SPSS 9.0 软件包, 以两因素有重复的方差分析进行统计学分析。

2 结果

2.1 形态学观察

形态学观察表明, 对照组纤维较粗, 呈束状平行排列或呈染色均匀一致的膜状结构, 排列整齐; 实验组的肌动蛋白纤维明显较对照组短、细, 散乱分布于胞浆内, 无方向性。见图 1。随时间延长, 实验组的 F-actin 的染色逐渐增强、纤维增粗; 其中 24 h 的实验组与对照组间未见明显不同。见图 2。



图 1 成骨样细胞受力后 15 min, 实验组形态学观察 荧光强度明显改变 (左: 对照组, 右: 实验组)

Fig 1 The morphologic changes of UMR-106 cytoskeleton 15 min after mechanical loading (right: 15 min after loading, left: without loading)

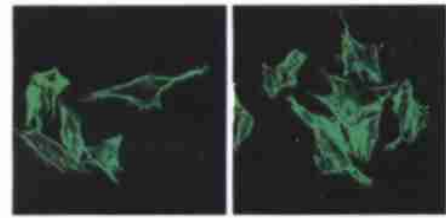


图 2 成骨样细胞受力后 24 h, 实验组细胞骨架形态与对照组相似 (左: 对照组, 右: 实验组)

Fig 2 The morphologic changes of UMR-106 cytoskeleton 24 h after mechanical loading (right: 24 h after loading, left: without loading)

2.2 荧光强度

荧光强度的测量结果显示: 除 24 h 组外, 实验组其余各组细胞平均染色强度均较相应的对照组减弱, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 实验组的染色强度在 1 h 组最低, 以后随时间延长有增强的趋势; 24 h 的实验组染色强度较对照组升高, 且差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 1, 图 3。

表 1 各时间点实验组与对照组的细胞平均荧光强度比较
Tab 1 The average fluorescence density of UMR-106 skeleton with and without mechanical stimulation

组别	15 min	30 min	1 h	4 h	6 h	12 h	24 h
实验组	73.1	13.9	27.4	25.7	29.9	43.3	127.5
对照组	127.5	150.2	137.4	155.0	171.5	138.4	103.5
P 值	0.007	0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.003

注: 平均荧光强度为各组中随机选取 6 个被检细胞样本荧光强度测量值的均值

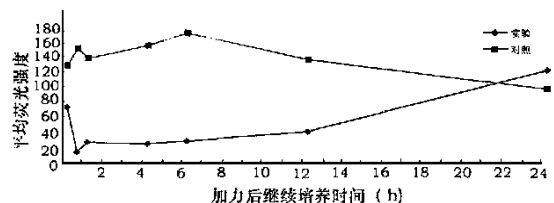


图 3 实验组与对照组平均荧光强度比较

Fig 3 The average fluorescence density of UMR-106 skeleton changes after mechanical loading (compared with the control group without mechanical loading)

3 讨论

许多学者¹⁻⁴的研究结果表明细胞受机械力刺激后, 细胞及细胞核的形态、增殖活性、蛋白及基因表达均可发生改变。对细胞施加机械刺激的装

置有多种,如机械拉伸、膜压力变形、流体剪切力、四点弯曲变形等方式。以离心机对贴壁生长的细胞施以顶轴向力是可靠的加力方式之一,力值稳定,重复性好¹。本实验中发现施加离心力后细胞形态无明显变化,能较好地满足实验要求,证实了其可行性。

LSCM是近年来发展的新一代光学显微镜,使用激光点光源逐点扫描,避免邻近点的衍射光、散射光的干扰;利用照明针孔和探测针孔相对物镜焦平面共轭的原理,滤去不同焦平面的散射光,从而得到高信/噪比、高清晰度、高分辨率的光学图像;并能在不同厚度扫描被测物,俗称“细胞CT”,是观察细胞骨架的良好工具⁵。本文采用LSCM并与图像分析软件结合,定量分析细胞的染色强度,从而反映细胞中F-actin的量。

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,在细胞形态的维持、运动、分裂中起重要作用。微丝由actin与肌动蛋白相关蛋白(actin-binding proteins, ABPs)构成,actin是其中的基础蛋白,能较好地反映微丝的结构形态变化。Actin在胞内呈聚合态即F-actin和游离态G-actin两种状态存在,F-actin呈纤维状,构成细胞骨架的主要部分;G-actin为单体分子球形蛋白,溶于胞浆。正常细胞中两者处于动态平衡中,其比例随生理、运动状态和细胞周期的不同而有所变动,两者有各自的生化特点,亦有许多共同的结合位点^{2,6~8}。两者间的转化受多种因子如肌动蛋白解聚因子的影响⁶,并具有自身调节功能⁷。本文所用抗体BODIPY FL Phalloidin仅能与聚合态的肌动蛋白结合,故染色后仅见细胞中纤维状的微丝结构。

本实验加力前在盖玻片上培养细胞24h,可消除胰酶消化和接种对细胞的影响,使细胞充分粘附伸展,状态良好,对外界刺激反应敏捷显著。本实验结果显示对照组成骨细胞微丝结构正常,加力后15min即出现排列紊乱、丝状结构变细变短,说明在机械力作用下微丝结构有明显变化,荧光强度下降,提示机械刺激可促使F-actin解聚。随加力后时间的延长,两组间虽然染色强度仍有显著性差异,但均值逐渐变得接近,说明微丝的这种改变是可逆的,外力刺激去除后微丝得到了重建或改建。很多

学者^{2,6,7}曾报道细胞骨架可发生改建,如在微重力环境下细胞骨架形态发生显著改变⁴,间接说明机械力能对细胞骨架产生影响,本实验结果与其类似。

Reuner等⁷对低渗条件下鼠肝细胞含量的研究表明,初期肝细胞中G-actin含量下降,F-actin含量不变,mRNA含量增加,但继续培养G-actin并不再下降,认为这是由于actin本身存在的自身调节作用。本实验结果表明,24h实验组荧光强度比对照组高,差异有显著性。其原因可能是:(1)细胞骨架受到机械力刺激后,早期发生一定的解聚并在24h内恢复,由于其自身的调节作用,到24h时还有一定的增强。(2)细胞中actin蛋白总量增加导致F-actin荧光增强。关于actin蛋白总量和mRNA变化的关系,以往文献存在争议⁴,可进一步研究。

参考文献

- 1 Hughes-Fulford M, Fitzgerald J. Mechanically induced c-fos expression is mediated by cAMP in M3T3-E1 osteoblasts. *FASEB J*, 1999, 13(3):553~557
- 2 Akisaka T, Yoshida H, Inoue S, et al. Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured osteoclast. In *Process Citation*. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(7):1248~1255
- 3 Hughes-Fulford M, Lewis ML. Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp Cell Res*, 1996, 224(1):103~109
- 4 Meazzini MC, Toma CD, Schaffer JL, et al. Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro. *J Orthop Res*, 1998, 16(2):170~180
- 5 Warn RM, Robert-Nicoud M. F-actin organization during the cellularization of the *Drosophila* embryo as revealed with a confocal laser scanning microscope. *J Cell Sci*, 1990, 96(Pt 1):35~42
- 6 Jiang CJ, Weeds AG, Khan S, et al. F-actin and G-actin binding are uncoupled by mutation of conserved tyrosine residues in maize actin depolymerizing factor (ZmADF). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(18):9973~9978
- 7 Reuner KH, Wiederhold M, Schlegel K, et al. Autoregulation of actin synthesis by physiological alterations of the G-actin level in hepatocytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995, 33(9):569~574
- 8 James MF, Manchanda N, Gonzalez-Agosti C, et al. The neurofibromatosis 2 protein product merlin selectively binds F-actin but not G-actin, and stabilizes the filaments through a lateral association. *Biochem J*, 2001, 356(Pt 2):377~386

(2002-01-20 收稿)

(本文编辑 刘 怡)