论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0898-03

不同张应力对体外培养的人牙周膜成纤维细胞形态和纤维型肌动蛋白改变的影响

彭庭莉,杨 军,周继祥,杨彦春 (第三军医大学西南医院口腔科,重庆 400038)

提 要: 目的 研究动态张应力对体外培养的人牙周膜成纤维细胞(HPDLF)形态和微丝改变的影响,进一步了解HPDLF的应力-生物学效应。**方法** 利用自行设计的膜式动态张应力-体外细胞培养研究体系对体外分离培养的第6代的HPDLF进行不同应力水平、频动范围及时相点的张应力加载,所有样本经FITC-Phalloidin免疫荧光染色后,以激光扫描共聚焦显微镜观察加力后不同时间细胞及其肌动蛋白形态的变化特征。**结果** 动态张应力作用16、24 h后,部分人牙周膜成纤维细胞出现收缩,F-actin排列等方面的变化;32 h后,变化更明显。5 kPa的静态张应力作用后,可引起细胞间隙增大等变化,F-actin改变较少。**结论** 不同张应力可引起体外培养的人牙周膜成纤维细胞的形态和F-actin发生了有规律的变化,特别是动态张应力组2,在细胞投影面积以及细胞平均荧光强度方面均与加力时间呈正比,微丝随加力时间的延长而逐渐变粗。

关键词: 人牙周膜成纤维细胞;纤维型肌动蛋白;张应力;激光扫描共聚焦显微镜

中图法分类号: R322.41; R329.24 **文献标识码**: A

Effects of different tension stress on the shape and F-actin of human peridontal ligament fibroblast *in vitro*

PENG Ting-li, YANG Jun, ZHOU Ji-xiang, YANG Yan-chun (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the shape and F-actin of human periodontal ligament fibroblasts(HPDLF) under different tension stress *in vitro* so as to learn the stress-biological effects of HPDLF. **Methods** HPDLF were cultivated for 6 passages and observed morphologically and identified by immunocytochemistry to be positive anti-vimentin and negative anti-keratin. HPDLF were divided into four groups: control (without tension stress), static tension stress (5 kPa), dynamic tension stress group 1 (5 to 0 to 5 kPa at the frequency of 3/min) and dynamic tension stress group 2 (5 to 2.5 to 5 kPa at the frequency of 3/min). The cells of each group were observed at the different time points of 16, 24, 32 h. The projection areas and shapes of cells as well as the structure of F-actin were examined by laser scanning confocal microscope and immunity fluorescence technique. The relationship among tension stress, time, shape and the structure of F-actin of HPDLF was analysed. **Results** In the dynamic tension stress group 1 and 2, the shape and the arrangement of F-actin of some HPDLF underwent regular changes at 16, 24 h, but the changes appeared to be obvious at 32 h. In the static tension stress group, it was found the increase of interspace of HPDLF, but no obvious changes in the structure of F-actin. **Conclusion** Different tension stress patterns had different effects on the shape and F-actin of HPDLF. Especially in the dynamic tension stress group 2, it showed direct ratio between the cell projection areas, the average fluorescence density and different loading time.

Key words: human periodontal ligament fibroblast; F-actin; tension stress; laser scanning confocal microscope

人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblast, HPDLF)是人牙周组织的主要组成部分之一,起着连接、缓冲外力、传递信息的作用,是牙周膜中最重要的功能细胞。HPDLF也是牙周组织再生的主要细胞群,在牙周创伤愈合早期,就需要HPDLF在牙根面基质上附着和向牙冠方定向移动[1]。纤维型肌动蛋白(F-actin)是细胞骨架中一类复杂的蛋白纤维网状结构,参与细胞的多种功能,也是调节细胞力学信号转导的重要因素。近几年来关于F-actin等细胞骨架结

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200054)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200054)

作者简介:彭庭莉(1977-),女,四川省广安市人,硕士研究生,医师,主要从事口腔临床医学方面的研究。电话:(023)68754439, E-mail: pengtingli@hotmail.com

通讯作者:周继祥,电话:(023)68754439

收稿日期:2004-11-22;**修回日期**:2005-02-10

构在受到外力后的反应研究较多，但是在动态张应力方面的研究还很少。本研究通过给体外培养的人牙周膜成纤维细胞施加静态张应力和不同的动态张应力，观察不同时间内细胞形态和 F-actin 的变化特征，研究外力通过 F-actin 系统对细胞的影响。

1　材料与方法

1.1　主要设备及材料

二氧化碳恒温孵箱，倒置相差显微镜，激光扫描共聚焦显微镜(LSCM，Bio-Rad 公司，美国)，图像处理软件 Image-Pro plus 4.0，自行开发建立的膜式动态张应力-体外细胞培养研究体系。

DMEM 培养基(Hyclone，USA)，胎牛血清(Hyclone，USA)，FITC(异硫氰酸荧光素)标记的 Phalloidin (鬼笔环肽)(Sigma，USA)。

1.2　方法

1.2.1　HPDLF 的培养及鉴定　　参照文献[2]方法，人牙周组织取自因正畸矫治需要而被拔除的健康牙齿的牙根表面和牙槽窝内，将 HPDLF 用组织块法进行原代培养，常规传代培养。然后进行人牙周膜成纤维细胞的形态学观察和免疫组织化学鉴定(采用 S-P 法，进行波形蛋白和角蛋白染色)，所培养的细胞经免疫细胞化学检测呈抗波形蛋白强阳性，抗角蛋白阴性，表明细胞来源于中胚层，属于牙周膜成纤维细胞。取第 6 代的细胞作为研究对象。

1.2.2　HPDLF 的应力加载　　实验分为对照组、静张应力组、动态张应力组 1 和动态张应力组 2 共 4 组，每组设置 4 个培养皿。对照组：0 静张应力作用；静张应力组：5 kPa 静张应力作用；动态张应力组 1：5 kPa 动态张应力作用，动态频率为 3 次/min，频动范围 5～0～5 kPa；动态张应力组 2：5 kPa 动态张应力作用，动态频率为 3 次/min，频动范围 5～2.5～5 kPa。每组再分 16、24 h 和 32 h 3 个观察时相点。将同步化后基本处于 G_0 期的 HPDLF 制成细胞悬液按 2×10^6/小室的量接种到膜式动态张应力-体外细胞培养研究体系的细胞培养小室内，加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 3 ml，静置 24 h，待细胞自然贴壁于硅胶膜上后开始加力。加力装置为自行开发研究建立的膜式动态张应力-体外细胞培养研究体系，加力过程中细胞培养小室和分压传导装置均置于二氧化碳恒温孵箱中，液体传导管线为医用硅胶管及一次性输液器管线。加力过程中，调速电机匀速运转，液体压力传导至细胞培养小室，硅胶膜受力后逐渐隆起，然后又逐渐恢复，细胞受到动态的张应力。

1.2.3　HPDLF 细胞形态变化观察　　在到达预定时间后先在倒置相差显微镜下观察，然后弃去培养小室内的培养基，取出硅胶膜，剪下一小块，约 1 cm × 1 cm 大小，PBS 冲洗 4 次，吸水纸吸干硅胶膜上的水分，用预冷丙酮固定 20 min，再用 0.5% PBS Triton X-100 打孔 10 min，0.1% PBS Triton X-100 漂洗彻底，再经 FITC 标记的 Phalloidin (终浓度 50 μg/ml)37 ℃水浴闭光孵育 40 min，0.1% PBS Triton X-100 漂洗后，缓冲甘油封片。将标记后的标本置于 LSCM 下观察，激光激发波长 488 nm，所得图像通过镜载摄像系统输入电脑保存(所有样本参数均为 gain：666，pinhole：107.7，488 nm：23.8)，并用图像处理软件 Image-Pro Plus 4.0 分析、测定，计算出细胞的投影面积(每 1 块膜上任选 4 个视野，每 1 视野任选 5 个平均染色强度、形态边界清楚的细胞，由单一 LSCM 操作员完成)，观察细胞形态的改变情况。

1.2.4　HPDLF 微丝变化的观察　　用同上的方法进行免疫荧光染色，LSCM 观察，采图，测定细胞的平均荧光强度。本实验所用抗体 FITC-Phalloidin 仅能与 F-actin 结合，故染色后仅见微丝结构。细胞平均荧光强度的改变即为微丝的改变，荧光强度下降，提示微丝解聚，荧光强度增强，提示微丝重排、聚合。

1.3　统计学分析

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 软件包，进行单因素方差分析，各组间均值的多重比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　HPDLF 细胞形态变化观察

细胞形态变化，用细胞投影面积的改变情况来分析，测定结果见表 1。LSCM 镜下观察表明：对照组，细胞排列比较乱呈长梭形，细胞投影面积大；静态张应力组，各个时间段细胞排列整齐，呈梭形生长，细胞的投影面积随加力时间的增加而减小；动态张应力组 1，细胞部分收缩，边界清晰，细胞间隙增大，细胞的长轴方向无明显差异，与受力方向有关系，细胞的投影面积随加力时间的增加仍明显小于对照组，但是在加力 24 h 后略呈增加趋势；动态张应力组 2，细胞的长轴方向无明显差异，与受力方向有明显关系，细胞的投影面积随加力时间的增加仍明显小于对照组，但是在加力 24、32 h 后也一直呈上升趋势。

表 1　不同加力时间和频率作用下 HPDLF 细胞投影面积(μm²，$n=20$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The cell projection areas of HPDLF at different loading time in four groups (μm², $n=20$, $\bar{x}\pm s$)

Group	16 h	24 h	32 h
Control	23 150.00 ± 8 076.92#	13 575.00 ± 3 138.34	11 589.62 ± 2 616.22#
Static tention stress group	3 937.01 ± 800.21*	3 065.25 ± 468.29*	2 176.57 ± 86.95*
Dynamic tention stress group 1	2 763.11 ± 438.51*#	3 294.90 ± 549.79*	2 514.39 ± 1 002.79*#
Dynamic tention stress group 2	4 096.91 ± 220.68*#	4 395.98 ± 670.16*	5 221.47 ± 955.45*#

*：$P<0.05$，*vs* control；#：$P<0.05$，*vs* static tention stress group

2.2　HPDLF F-actin 变化的观察

HPDLF 微丝发生解聚或重排，F-actin 的荧光强度会发生改变。HPDLF 在不同张应力作用下，细胞平均荧光强度测定结果见表 2。结果显示：对照组，细胞的平均荧光强度随加力时间的延长呈增加的趋势；静张应力组，细胞平均荧光强度与对照组相比减弱，但总体趋势无明显的变化；动态张应力组 1，细胞平均荧光强度与对照组相比在加力 16 h 后略高于对照组，但 24 h 后低于对照组，在 32 h 后总体趋势出现明显的变化，有增加的趋势；动态张应力组 2，细胞平均荧光强度与对照组相比在加力 16 h 后明显低于对照组，但 24 h 后高于对照组，在 32 h 后总体趋势出现更明显的变化，明显高于对照组，呈直线上升的趋势。

表 2 不同加力时间和频率作用下细胞平均荧光强度($n=20, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Average fluorescence density of HPDLF at different loading time in four groups ($n=20, \bar{x} \pm s$)

Group	16 h	24 h	32 h
Control	1 315.50±67.00#	1 446.75±204.26	1 824.75±592.31#
Static tention stress group	1 048.75±185.03	1 088.00±168.24*	1 132.00±280.92
Dynamic tention stress group 1	1 678.50±102.53#	1 130.50±33.23*	1 488.25±167.91#
Dynamic tention stress group 2	966.25±67.28*#	1 893.00±781.93	2 848.75±284.08*#

*: $P<0.05$, *vs* control; #: $P<0.05$, *vs* static tention stress group

3 讨论

细胞骨架包括微丝、微管及中间丝,微丝是细胞骨架的主要组成部分。近年来发展起来的激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)。可对样本进行无损伤光切片,即"细胞 CT",获得其三维立体结构及细胞形态的变化,成为形态学、分子细胞生物学等领域中新一代强有力的研究工具[3]。本次实验采用 FITC 标记的 Phalloidin 仅对微丝的 F-actin 进行免疫荧光染色,运用 LSCM 特异性观察 F-actin,比较 HPDLF 在不同张应力和不同时相点细胞形态的差别,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 的量的变化。

目前,应力应变与 HPDLF 形态、细胞平均荧光强度、细胞面积变化关系的研究尚不充分,并且存在较多争议,应用不同的加力方式甚至可能得出相悖的结论。麻健丰等[4]研究发现在 8%、12%、16%力值组,细胞投影面积随着加力时间和力值的增加而 24、48、72 h 每天递增,肌动蛋白纤维也随之逐渐增粗,排列更有规律;而在 20%力值组,其结果则相反。

本实验所用膜式动态张应力-体外细胞培养研究体系,是对传统的 Brighton 流动小室[5]进行改进,将循环动态加压方式改为非循环式,又设计增加了分压传递装置,应力输出的适时监测和变频式调控装置。静张应力的输出采用液压差的原理,用经典力学公式 $P=\rho gh$ 来进行计算;动态张应力的输出采用调速电机、无级调速器等作为动力源,以无级调速方式控制的变频频率为 0~13 次/min,动态变频幅度以输出张应力值的大小予以表示,为 0~39.2 N/次。因此,培养小室底部的硅胶膜受到的就是静张应力和动态张应力了,符合我们研究动态张应力作用下 HPDLF 形态及功能变化的要求。在受力过程中,硅胶膜受力后逐渐隆起呈半球状,郭欣等[6]利用三维有限元分析,发现自圆心至膜的边缘,应力值沿半径方向变化的趋势是先减小后增大。如果扩展到整个膜平面,那么在膜中心处的应力值最大,其次是受到约束的膜边缘节点。也就是说,在给定外荷载的作用下,我们可以较精确地知道培养膜上各部位细胞所处的应力环境,这对于我们进一步探讨应力对细胞生长的影响提供了必要的信息,同时也给这一类的细胞张应力实验提供了可靠的理论依据。

随着信号传导研究的深入,人们发现细胞骨架对力学信号的传递起着重要的作用,其功能受到不同信号的调节。很多学者[7~9]研究发现,微丝结构可以发生改建和重排,说明机械力可以对微丝产生影响。本实验在相同条件下,静张应力组和动态张应力组对 HPDLF 细胞投影面积和细胞平均荧光强度出现了不同的改变,结果表明不同应力方式对细胞应力实验结果有影响。另外,对于动态张应力组 1 和动态张应力组 2,虽然最大应力值和应变频率相同,但应变改变幅度不同,对 HPDLF 投影面积和细胞平均荧光强度的改变也有不同。说明不同张应力作用对 HPDLF 的细胞平均荧光强度和细胞投影面积有着显著的影响作用,并且这种影响还具有随时间变化而变化的特性。细胞平均荧光强度的增加,提示微丝的聚合,显示细胞活力增强,分泌功能旺盛,为我们进一步研究不同张应力作用下细胞的分泌功能打下基础。

参考文献:

[1] Nyman S, Gottlow J, Karring T, *et al*. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey[J]. J Clin Periodontal, 1982, 9(3): 257-265.

[2] 周继祥, 赵志河, 谭理军, 等. 体外不同张应力对人牙周膜成纤维细胞增殖活性的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2003, 34(4): 638-640.

[3] 李 楠. 激光扫描共聚焦显微术[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997. 1-11.

[4] 麻健丰, 胡 军, 张秀华, 等. 静态拉伸应变对人牙周膜成纤维细胞的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2003, 19(5): 439-442.

[5] Brighton C T, McCluskey W P. Response of cultured bone cells to a capacitively coupled electric field: inhibition of cAMP response to parathyroid hormone[J]. J Orthop Res, 1988, 6(4): 567-571.

[6] 郭 欣, 樊瑜波, 宋 锦, 等. 张应力作用下体外细胞培养膜上应力分布的三维有限元分析[J]. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(1): 60-63.

[7] Akisaka T, Yoshida H, Inoue S, *et al* . Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured osteoclast [J]. J Bone Miner Res, 2001, 16(7): 1248-1255.

[8] Jiang C J, Weeds A G, Khan S, *et al*. F-actin and G-actin binding are uncoupled by mutation of conserved tyrosine residues in maize actin depolymerazing factor(ZmADF)[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(18): 9973-9978.

[9] Reuner K H, Wiederhold M, Schlegel K, *et al*. Autoregulation of actin synthesis by physiological alterations of the G-actin level in hepatocytes[J]. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1995, 33(9): 569-574.

(编辑 陈聪连)