文章编号:1000-5404(2005)16-1637-03

论著

流体剪切应力对人骨髓间充质干细胞增值及细胞周期的影响

李洪鹏,许建中,周 强,罗 飞,宋晋刚,何清义,尹芝华 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察流体剪切应力对人骨髓间充质干细胞增值及细胞周期的影响。**方法** 人骨髓间充质干细胞受强度为3 dyne/cm^{2}的流体剪切力刺激30 min,应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法和流式细胞仪检测细胞的增殖能力和细胞周期。**结果** 流体剪切力作用后,细胞增殖能力提高,细胞活性增强。S期细胞百分比(13.53±1.47)%较对照组细胞的S期百分比(7.45±2.65)%约增高近181.6%。**结论** 流体剪切力对人骨髓间充质干细胞具有提高细胞增殖能力及增强细胞活性的作用。

关键词: 间充质干细胞;流体剪切力;细胞周期;组织工程
中图法分类号: R318; R322.71; R329.28 **文献标识码:** A

Enhancing effects of fluid shear stress on the proliferation and activities of human bone marrow mesenchymal stem cells

LI Hong-peng, XU Jian-zhong, ZHOU Qiang, LUO Fei, SONG Jin-gang, HE Qing-yi, YIN Zhi-hua (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of fluid shear stress (FSS) on the cellular proliferation and cell cycle of the human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSCs). **Methods** After hMSCs were stimulated by the FSS (3 dyne/cm^2, 30 min), MTT assay and flow cytometry were applied to measure the cellular proliferation and cell cycle. **Results** FSS treatment accelerated cellular proliferation obviously. After 24 h from the end of FSS stimulation for 30 min, the percentage of phase S cells [(13.53±1.47)%] was increased to 181.6% as compared to that of the control group [(7.45±2.65)%]. **Conclusion** FSS has the enhancing effect on the cellular proliferation and cell cycle of hMSCs.

Key words: mesenchymal stem cells; fluid shear stress; cell cycle; tissue engineering

骨组织工程已成为解决骨缺损修复问题的一个新途径,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是骨组织工程中具有很好发展前景的种子细胞之一。在各种细胞及细胞与支架复合物的培养过程中,生物反应器得到了广泛的应用[1]。生物反应器多为动力性培养微环境,培养液的流动对所培养的细胞可产生流体剪切应力。生理状态下,骨骼组织中的细胞需要一定强度的流体剪切应力刺激,从而使其保持正常生理功能。实验表明一定范围的流体剪切应力可以刺激成骨细胞分化及增殖[2]。然而有关FSS对hMSCs的生物学作用研究,笔者通过各种数据库检索尚少见相关报道。本实验通过观察FSS刺激hMSCs体外增殖的作用,为进一步研究FSS刺激hMSCs体外增殖机制,利用生物反应器培养骨组织工程种子细胞及细胞支架复合物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

平行平板流动腔(自制),淋巴细胞分离液(TBD公司,天津)、Dulbecco最低必须培养基(DMEM/F12)(Hyclone公司,美国),胎牛血清(Hyclone公司,美国),四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(Amersco公司,美国),恒流蠕动泵(BT00-100型,保定恒流泵有限公司),酶联免疫检测仪(DG3022A型,华东电子管厂),流式细胞仪(Becton Dickinson,美国)。

1.2 方法

1.2.1 hMSCs的分离与培养 参照文献[3],无菌条件下从健康志愿者髂后上棘抽取骨髓12 ml,将采集到的抗凝骨髓与2

基金项目:国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003-AA205020),重庆市科学技术重点攻关项目(2003-13-6),西南医院临床研究课题(SW2004007)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020), the Sci & Tech Research Project of Chongqing (2003-13-6) and the Clinical Research Project Sponsored by Southwest Hospital of Third Military Medical University (SW2004007)

作者简介:李洪鹏(1978-),男,山东省淄博市人,硕士研究生,医师,主要从事骨组织工程相关方面的研究。E-mail: lihongpeng7911@163.com
通讯作者:许建中,电话:(023)68754164,E-mail: xjzslw@hotmail.com

收稿日期:2005-01-30;修回日期:2005-06-24

ml DMEM/F12 培养液充分混匀，用 1.077 g/ml 淋巴细胞分离液分离，以 $3\times10^5/cm^2$ 接种培养瓶，置 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内常规培养，待细胞生长接近 70% ~ 80% 融合时，用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代，接种密度为 $1\times10^4/cm^2$。

1.2.2 FSS 刺激 hMSCs 将接种细胞的底板与垫片和有机玻璃框组成矩形槽，将第 2 代 hMSCs 经消化制成细胞悬液后，分为对照组和处理组两组，以每槽 $2\times10^4/cm^2$ 的密度接种于两个底面大小为 2 cm×8 cm 的矩形槽中。接种细胞的矩形槽置无菌大平皿中后，置 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱内常规培养 24 h。取出矩形槽，去除有机玻璃框，和平行平板流动腔的管道部分组成完整的循环系统，以恒流蠕动泵作为动力推动灌流液在系统中循环。调整蠕动泵转速，使施加于细胞的 FSS 强度为 3 dyne/cm^2，刺激 30 min。对照组不加 FSS 刺激，与实验组处于同样物理环境。

1.2.3 MTT 法检测细胞生物活性 FSS 作用后将细胞消化后以 1×10^3/孔的密度接种于 96 孔板，每孔加传代培养液 200 μl，检测前 4 h 每孔加入 0.5% 的 MTT 溶液 20 μl，4 h 后吸弃上清，每孔加入二甲亚砜 150 μl，振荡 10 min 使沉淀充分溶解后，选择 490 nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光值（A），并以时间为横轴，吸光值为纵轴，绘制细胞生长曲线。

1.2.4 流式细胞仪测定细胞周期 将处理组与对照组平板上的细胞消化制作单细胞悬液，以 1×10^6 个细胞数量悬浮细胞，经荧光染料溴化丙锭溶液避光染色 30 min，流式细胞仪 488 nm 检测，可获得 DNA 含量分布组方图。

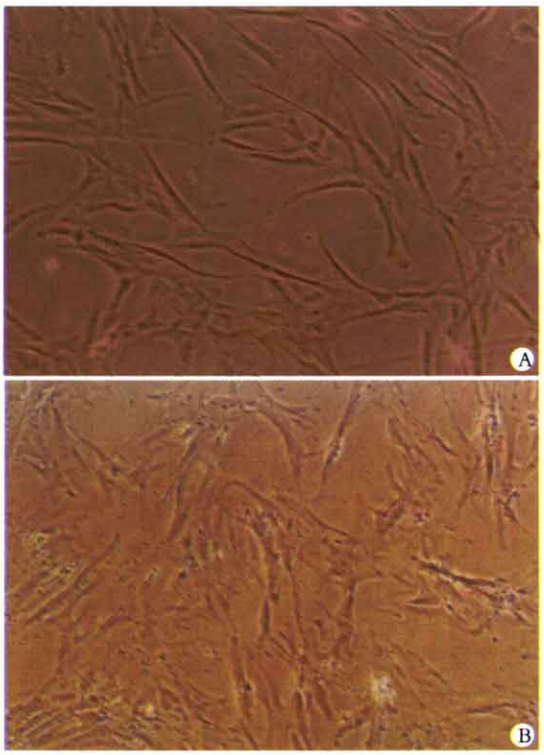
1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 12.0 统计软件，行自身配对 t 检验。

2 结果

2.1 活体细胞倒置相差显微镜观察

倒置显微镜逐日观察细胞生长情况和形态特征，细胞传第 3 代接种后 4 h 完成贴壁，24 h 后贴壁细胞开始分裂增殖，部分区域形成细胞团簇，细胞呈现成纤维细胞梭形外观。经 FSS 刺激后的 hMSCs，细胞胞体较对照组大，突起较多，多角形细胞较对照组明显增多。密度在细胞融合成单层之前明显较对照组快。两组细胞同期密度在倒置显微镜下摄影，见图 1A，B。



A: Control group; B: FSS group

图 1 hMSCs 的形态观察 （倒置相差显微镜×100）

Fig 1 The morphology of hMSCs （Invert phase contrast microscope×100）

2.2 FSS 作用后对细胞生物活性影响

实验组细胞生物活性的 MTT 法检测结果 A 值见表 1。可见实验组比对照组生长曲线前移，说明经 FSS 刺激后的 hMSCs 生物活性明显比对照组高。

表 1 MTT 检测 FSS 促 hMSCs 增殖效应（$\bar{x}\pm s$，A）

Tab 1 The proliferation of hMSCs after FSS stimulation by MTT（$\bar{x}\pm s$，A）

Group	n	Time (d)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FSS	5	0.074±0.008	0.086±0.003	0.115±0.002*	0.136±0.010*	0.179±0.002*	0.199±0.005*	0.242±0.002*	0.248±0.011*	0.257±0.005	0.261±0.002
Control	5	0.071±0.003	0.082±0.003	0.104±0.004	0.114±0.001	0.142±0.002	0.160±0.011	0.183±0.003	0.207±0.004	0.250±0.006	0.259±0.006

*：$P<0.01$，*vs* control group

2.3 FSS 作用后细胞周期的变化

流式细胞仪检测表明，FSS 作用以后，hMSCs 细胞周期发生了改变，S 期细胞百分比增高，加载 FSS 的实验组的细胞 S 期比例为（13.53±1.47）%，较对照组细胞的 S 期比例（7.45±2.65）%，约增高近 181.6%，见表 2。

表 2 FSS 刺激组与对照组的细胞周期（$\bar{x}\pm s$，%，A）

Tab 2 Cell cycle of FSS group and control group（$\bar{x}\pm s$，%，A）

Group	n	G_1	S	G_2+M	G_2+M+S
FSS	7	79.76±4.98	13.53±1.47*	6.71±4.13	20.24±4.98
Control	7	84.80±8.11	7.45±2.65	7.75±5.75	15.20±8.11

*：$P<0.01$，*vs* control group

3　讨论

间充质干细胞已作为组织工程一种新型的种子细胞，在骨组织工程应用方面已取得了很好的实验及临床效果。生物反应器在微载体技术大规模扩增种子细胞、细胞支架复合物的体外构建方面都取得了很好的实验结果。生物反应器所提供的是动力性微环境，对细胞产生主要应力影响的为流体剪切应力。一定强度的 FSS 对骨骼细胞正常功能的发挥具有正面作用。研究 FSS 对 hMSCs 的作用及机制，将为骨组织工程中生物反应器的应用提供理论基础及实验数据。

平行平板流动腔是一种可以提供较精确的液体层流的实验装置，在许多的研究流体剪切力的生物学效应的实验中得到了广泛的应用[2,4,5]。通过对流动电势的监测而间接推算出的作用于体内骨骼细胞的 FSS 值为 0.8 ~ 3 Pa（N/m^2）［0.1 Pa（N/m^2）= 1 dyne/cm^2］[6]，多数对成骨细胞的实验中多采用此范围的 FSS 强度大小，但笔者在实验中发现，此范围的强度对 hMSCs 可产生较明显的损伤作用，考虑 hMSCs 与成骨细胞所耐受的 FSS 强度不同。经过对 FSS 参数的摸索，初步发现强度为 3 dyne/cm^2 作用 30 min 对 hMSCs 可以产生良性作用，具体实验数据未在此详述。对 hMSCs 施加强度为 3 dyne/cm^2 的 FSS 后，hMSCs 细胞可较明显的促进 hMSCs 的增殖，细胞胞体较对照组大，突起较多，多角形细胞较对照组明显增多。这种细胞形态改变与经化学成骨诱导后的 hMSCs 改变相似，说明 FSS 对 hMSCs 向成骨方向分化具有一定的促进作用，但需要进一步的实验进行验证。MTT 法与细胞计数法、软琼脂克隆形成试验和^{3}H-TdR 掺入试验有良好的相关性，且灵敏度高、重复性好、无放射性污染等，多用于细胞活力的检测。此法原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶可使外源性的 MTT 还原成蓝紫色难溶性结晶物并沉积在细胞中，而死细胞则无此功能。利用流式细胞仪检测细胞周期主要为了观察某时间段处于不同细胞周期的细胞百分比，用 S 期或者 G_2M + S 期的百分比作为增殖指数，表明细胞的增殖情况和合成速度，S 期细胞百分比升高，表明细胞的 DNA 合成增高，细胞增殖加速。本实验检测的 MTT 结果显示，实验组测得的生长曲线较对照组曲线前移，且峰值提高。流式细胞仪检测结果显示实验组的细胞 S 期比例为（13.53 ± 1.47）%，较对照组的（7.45 ± 2.65）%约增高 181.6%。说明经 FSS 刺激后，促进更多的 hMSCs 进入 S 期，即 DNA 合成期，从而更多的细胞进行分裂使细胞总数增加，表现为细胞的增殖。

应力是参与骨骼系统的改建的重要影响因子，作用于骨骼的应力通过骨骼组织间隙液流动将 FSS 作用于骨骼细胞，从而造成骨的吸收及重建[7]。生物反应器所提供的微环境为动力性微环境，其主要应力作用为 FSS，控制生物反应器的运行参数，将其 FSS 控制在最佳的强度范围内，对骨组织工程种子细胞的生长及分化有利。本实验证实了 FSS 可促进 hMSCs 的增殖，但 FSS 最佳的作用强度、频率、时间等参数需通过实验进一步加以探索。实验显示经 FSS 刺激后，hMSCs 形态上有类似成骨细胞的改变，然而 FSS 是否对 hMSCs 向成骨方向分化有一定作用还需进一步的实验证实。

FSS 是骨骼组织中骨骼细胞所感受到的主要应力刺激，可促进骨骼细胞的增殖、分化及保持细胞正常的生理功能[8]。本实验证实一定强度的 FSS 可促进 hMSCs 的增殖，在利用生物反应器扩增种子细胞及培养组织工程骨的过程中，对其应力环境进行有效的控制，不仅可减少 FSS 对细胞的损伤，还有利于细胞生长及组织工程骨的构建。

参考文献：

[1] van den Dolder J, Bancroft G N, Sikavitsas V I, *et al*. Flow perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in titanium fiber mesh[J]. J Biomed Mater Res, 2003, 64A(2): 235 - 241.

[2] Kapur S, Baylink D J, Lau K H. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways[J]. Bone, 2003, 32(3): 241 - 251.

[3] Majumdar M K, Thiede M A, Mosca J D, *et al*. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells[J]. J Cell Physiol, 1998, 176(1): 57 - 66.

[4] Donahue T L, Haut T R, Yellowley C E, *et al*. Mechanosensitivity of bone cells to oscillating fluid flow induced shear stress may be modulated by chemotransport[J]. J Biomech, 2003, 36(9): 1363 - 1371.

[5] McAllister T N, Du T, Frangos J A. Fluid shear stress stimulates prostaglandin and nitric oxide release in bone marrow-derived preosteoclast-like cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270(2): 643 - 648.

[6] Weinbaum S, Cowin S C, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses[J]. J Biomech, 1994, 27(3): 339 - 360.

[7] Stevens H Y, Frangos J A. Bone cell responses to fluid flow[J]. Methods Mol Med, 2003, 80: 381 - 391.

[8] Basso N, Heersche J N. Characteristics of *in vitro* osteoblastic cell loading models[J]. Bone, 2002, 30(2): 347 - 351.

（编辑　王　红）