文章编号:1000-5404(2010)06-0507-04

论著

新型肌腱细胞循环牵伸载荷系统的研制及运行效果观察

曹洪辉[1],唐康来[1],陈 磊[1],常廷杰[1],董世武[2],郑 红[1],陈前博[1],陶 旭[1],James H-C Wang[3] (400038 重庆,第三军大学:西南医院骨科,全军矫形外科中心[1],基础医学部人体解剖学教研室[2],重庆市生物力学重点实验室;Mechanobiology Laboratory, Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA[3])

[摘要] **目的** 研制一种能对体外培养肌腱细胞进行循环载荷牵伸的实验装置并观察其运行效果。**方法** 用聚二甲基硅氧烷预聚物与固化剂制备微沟槽硅树脂培养皿;用可编程控制器配控制循环载荷牵伸装置的运转速度及时间,调节对培养皿的牵拉频率和时间;更换不同大小凸轮对培养皿实行不同牵拉强度。观察循环牵伸载荷系统的运行情况及稳定性;初步观察不同牵拉强度、频率和时间对体外肌腱细胞的生物学表现。**结果** 循环牵伸载荷系统能按不同的强度、频率和时间对硅树脂微沟槽培养皿进行牵拉,运行良好且稳定。微沟槽硅树脂培养皿能对其表面生长的肌腱细胞进行改向,细胞呈平行排列,与体内肌腱细胞排列方向具有相似性。**结论** 本研究研制的新型肌腱细胞循环牵伸载荷系统是一个较好的体外细胞牵伸载荷模型,具有运行稳定、可控性强的优点。

[关键词] 肌腱细胞;微沟槽硅树脂培养皿;循环载荷细胞牵伸系统
[中图法分类号] R-331;R329.24;R686.1 **[文献标志码]** A

Design and evaluation of a new cyclic stretching system of tenocytes *in vitro*

Cao Honghui[1], Tang Kanglai[1], Chen Lei[1], Chang Tingjie[1], Dong Shiwu[2], Zheng Hong[1], Chen Qianbo[1], Tao Xu[1], James H-C Wang[3] ([1]Department of Orthopedics, Southwest Hospital, [2]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China; [3]Mechanobiology Laboratory, Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA)

[Abstract] Objective To design a new cyclic stretching system of tenocytes and evaluate its effects *in vitro*. Methods The microgrooved silicone dishes were made of 2 silicone components, polydimethylsiloxane prepolymers, and RTV ME 601A and 601B mixed in a ratio of 10∶1, and then degassed to produce microgrooved silicone dishes. The cyclic stretching system was controlled under different frequency, duration time and magnitude of stretching through a Programmable Logic Controller (PLC) and step motor. Stretch strength was adjusted through changing cams at different sizes. The stability of this system when it was working was observed. The biology of tenocytes under different frequency, duration time and magnitude of stretching was studied. Results The cyclic stretching system worked well and stable under the different of stretching frequency, duration time and magnitude. The direction of tenocytes on the microgrooved dishes was well controlled and parallel with the grooves, in a similar order as *in vivo*. Conclusion The new system is a good cyclic stretching model of tenocytes with stable, well controlled characteristics.

[Key words] tenocytes; microgrooved silicone dishes; cyclic stretching system

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30872620) and the Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06MB245). Corresponding author: Tang Kanglai, Tel: 86-23-68765289, E-mail: tangkanglai@sina.com

肌腱病是目前骨科学和运动医学面临的主要伤病之一。大量研究表明:过度的牵伸载荷是其发生的直接原因;病理证实肌腱过度的、重复性的使用导致了肌腱的炎症、退变,甚至最终断裂[1,2]。运动负荷包括运动强度、频率及时间。重复的过度载荷条件下可以通过改变细胞的形态、周期、DNA变化和蛋白合成而改变细胞功能[3]。研究表明,肌腱细胞在体内排列方式为平行排列,其受力的方式为单轴牵拉,即牵拉的方向与肌腱细胞长轴方向一致[4]。

根据肌腱细胞在体内的排列方向、受力方式及频率、时间,对体外培养肌腱细胞的行周期性机械拉伸,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30872620);全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MB245)
[通信作者] 唐康来,电话:(023)68765289,E-mail:tangkanglai@sina.com

可建立体外肌腱细胞过度牵拉培养模型。本研究拟研制出一种能对体外培养肌腱细胞进行循环载荷牵伸的实验装置并观察其运行效果。

1 材料与方法

1.1 材料

聚二甲基硅氧烷预聚物(PDMS)与固化剂(RTV ME 601A and 601B)购自德国 Wacker 硅树脂公司;纤维结合素(ProNectin-F)、DMEM F12、胰酶、FBS 购自美国 HyClone 公司,Ⅰ型胶原酶,Ⅰ、Ⅲ型胶原一抗、二抗 SABC(链酶亲合素-生物素-抗生物素复合物)和 DAB 显色试剂盒均购自美国 Sigma 公司,倒置相差显微镜为日本 Olympus 公司。

1.2 微沟槽硅树脂培养皿制备

将聚二甲基硅氧烷预聚物(PDMS)与固化剂(RTV ME 601A and 601B,Wacker 硅树脂公司,德国)以 10∶1(体积比)混合后,真空吸引器吸引,使其内无气泡吸存在,浇注到有机玻璃模型上,制成光滑面的硅树脂培养皿。同时,用配好的硅树脂液体浇注与用反应离子刻蚀技术刻好有微沟槽的硅树脂晶片上,制成约 1.5 mm 厚的微沟槽硅树脂膜。将膜切成约 3.5 cm × 6.5 cm 大小,用硅树脂胶贴在培养皿表面(图 1)。微沟槽硅树脂培养皿设计参数:微槽宽和槽间桥宽均为 10 μm,槽深3 μm,培养皿表面积为 3 cm × 6 cm。

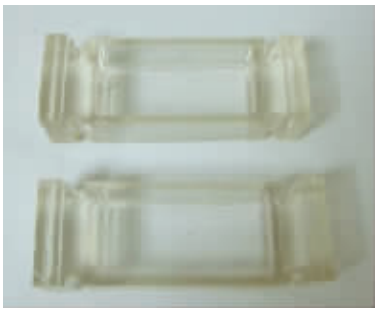


图 1 微沟槽硅树脂培养皿

1.3 循环牵伸载荷系统设计与组成

循环牵伸载荷系统设计的运动周期最小为 0.5 s,振幅为 1.2 ~ 12.0 mm。系统由电子控制和机械系统两部分组成(图 2)。



图 2 肌腱细胞循环牵伸载荷系统

1.3.1 电子控制部分 该部分硬件主要采用文本显示器、可编程控制器(PLC)、步进电机、步进电机驱动器、开关电源等单元构成定时调速控制系统。本实验装置由 PLC 配以专用程序,控制步进电机运转速度及运转时间,改变步进电机的转速以调节细胞培养皿的牵拉振荡频率。装置实验时的当前牵拉震荡频率、预约终止时间、当前已完成时间、当前拉伸位移量都通过文本显示器上的按键向 PLC 输入并由步进电机执行,同时由背光液晶显示屏(LCD)实时显示,便于实验操作者随时掌握实验情况。

1.3.2 机械部分 该部分由 6 个相同单元的底座、凸轮运动机构、联轴器、器皿支架、滚动辅助装置、器皿固定锁紧装置等部件组成。各个部件采用不锈钢材料通过加工处理防止部件生锈。执行由电动机转轴输出的扭矩,通过齿轮传递,带动主轴以电控部分设定的参数旋转,再由主轴上的凸轮机构驱动硅树脂细胞培养皿支架作往复运动,从而使固定其上的硅胶器皿随之被牵拉作相同的往复运动而达到实验目的。硅树脂细胞培养皿的拉伸率即位移量(2%、4%、8%、12%)通过更换不同规格的机械凸轮实现。

1.4 人肌腱细胞的原代培养、传代及鉴定

采用酶消化法[5]对人肌腱细胞进行分离及原代培养:无菌条件下取正常人肌腱组织,剪去腱鞘、去除肌肉组织,PBS 清洗后,剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 碎片,置于 0.01% 胰酶,37 ℃ 振荡消化 2 h。在肌腱组织成破棉絮状后,吸掉胰酶,再置于 0.1% Ⅰ型胶原酶溶液中,37 ℃ 振荡消化 12 h 后收集细胞悬液,以 1 500 r/min 速度离心 5 min,弃去上清液,PBS 冲洗 1 遍,接种于 10 cm 培养皿里,加入 10 ml 含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM F12 培养液,置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中进行原代培养,每隔 2 ~ 3 天换液 1 次。

人肌腱细胞的传代培养:原代培养的肌腱细胞光镜下达到 90% 融合后,弃去培养液,PBS 冲洗 1 次,加入 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 2 ml,观察细胞回缩变圆,迅速加入 3 ml 含 FBS 的 DMEM F12 终止消化。吹打吸取细胞悬液,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,PBS 洗 1 次,制成细胞悬液,按等密度分传至 4 个培养皿中,加入含 10% FBS 的 DMEM F12 培养液。以后视细胞生长快慢,3 ~ 4 d 传代 1 次。取第 5 ~ 7 代细胞进行细胞牵拉实验。

人肌腱细胞的鉴定采用免疫组化 SABC 法,对细胞进行Ⅰ、Ⅲ型胶原染色,鉴定人肌腱细胞。取第 2 代细胞接种于多聚赖氨酸处理的盖玻片上爬片培养,待细胞长满盖玻片 90% 以上时,0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次,4% 的多聚甲醛固定 30 min,0.01 mol/L 的 PBS 洗 5 min × 3 次,3% 过氧化氢孵育 20 min,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,加入 0.3% Triton X-100(0.3 ml Triton X-100 + 0.01 mol/L PBS 100 ml)30 min,0.01 mol/L PBS 清洗 5 min × 3 次,滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min 后吸去多余的液体,滴加 1∶3 000 稀释的一抗,分别做Ⅰ、Ⅲ型胶原一抗组,阳性对照组和阴性对照组。37 ℃ 湿盒内孵育 60 min,0.01 mol/L 的 PBS 洗 2 min × 3 次,滴加生物素化的羊抗兔 IgG, 37 ℃ 20 min, 0.01 mol/L 的 PBS 洗 2 min × 3 次,滴加

SABC, 37 ℃ 20 min, 0.01 mol/L 的 PBS 洗 5 min ×3 次,DAB 室温显色,镜下控制反应时间。蒸馏水洗涤,晾干,苏木精轻度复染 2 min,脱水透明 ,中性树脂封片。

1.5 在不同牵拉条件下微沟槽硅树脂培养皿的运行情况及稳定性测试

微沟槽硅树脂培养皿在不同频率(0.5、1.0、1.5、2.0Hz)和不同牵拉幅度(2% 、4% 、8% 、12%)进行完全搭配测试,牵拉时间为 24 h,观察硅树脂培养皿形变、弹性变及抗牵拉力。

1.6 肌腱细胞在微沟槽硅树脂培养皿上生长情况、细胞贴壁率及排列情况

细胞培养前,将微沟槽硅树脂培养皿用 75% 的酒精浸泡、漂洗 30 min,再用去离子水清洗掉酒精,最后放入高压蒸锅中消毒备用。硅树脂培养皿上培养:为了提高细胞在硅树脂表面的黏附能力,微沟槽硅树脂培养皿表面涂有 10 μg/ml ProNectin-F,然后以 $2 \times 10^4/cm^2$ 种植于培养皿里,加入 10 ml 含 10% FBS 的 DMEM F12 培养液,按不同时间段计细胞贴壁率,完全贴壁后观察细胞排列情况。细胞牵拉前的准备:细胞孵箱培养 24 h 后换成含 1% FBS 的 DMEM F12 培养液。

1.7 循环牵伸载荷系统对体外肌腱细胞的牵拉测试及其生物学表现观察

肌腱细胞接种于微沟槽硅树脂培养皿内,细胞贴壁后,倒置相差显微镜观察细胞形态。按不同频率(0.5、1.0、1.5、2.0 Hz)和不同牵拉幅度(2% 、4% 、8% 、12%)进行完全搭配测试,牵拉时间为 24 h,同时较两组细胞不作牵拉作为对照。与非牵拉细胞对比,观察循环牵伸载荷系统仪器稳定性,达到的牵伸载荷强度、频率、时间,肌腱细胞牵拉下形态学变化,台盼蓝染色,计数细胞死亡百分比。

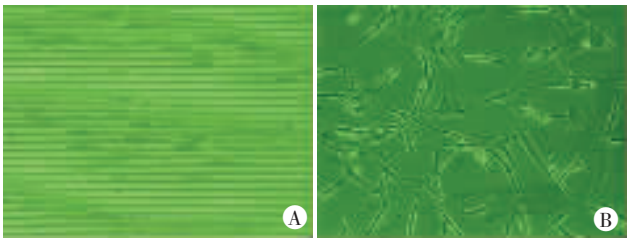
2 结果

2.1 微沟槽硅树脂培养皿在不同牵拉条件下功能测试结果

微沟槽硅树脂培养皿在不同牵拉频率,强度下能达到相应的位移量,培养皿一端沿其长轴来回运动,呈单轴运动,无断裂及撕破,牵拉前后弹性良好,无明显改变,经过高压消毒后可以反复使用。

2.2 肌腱细胞在微沟槽硅树脂培养皿上生长情况及人肌腱细胞鉴定

传代后肌腱细胞在微沟槽硅树脂培养皿上 2 ~4 h 迅速贴壁,8 h 大部分贴壁,达 90% 以上,10 h 细胞全部贴壁 ,并开始分裂增殖。细胞呈均匀分布 ,形态呈长梭形 ,并沿微沟槽方向伸展,呈平行排列,与体内肌腱细胞排列方式类似。而光滑表面培养皿生长的肌腱细胞呈杂乱无章的生长,方向各异(图 3)。

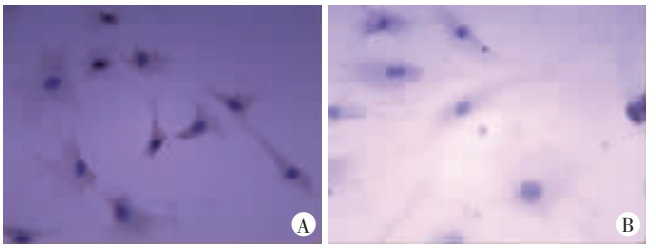


A:微沟槽硅树脂培养皿; B:普通光滑面培养皿

图 3 不同培养皿上生长的人肌腱细胞形态学观察

(倒置相差显微镜 ×100)

人肌腱细胞通过Ⅰ、Ⅲ型胶原染色免疫组化染色鉴定显示,Ⅰ型胶原染色阳性,Ⅲ型胶原染色阴性(图 4)。

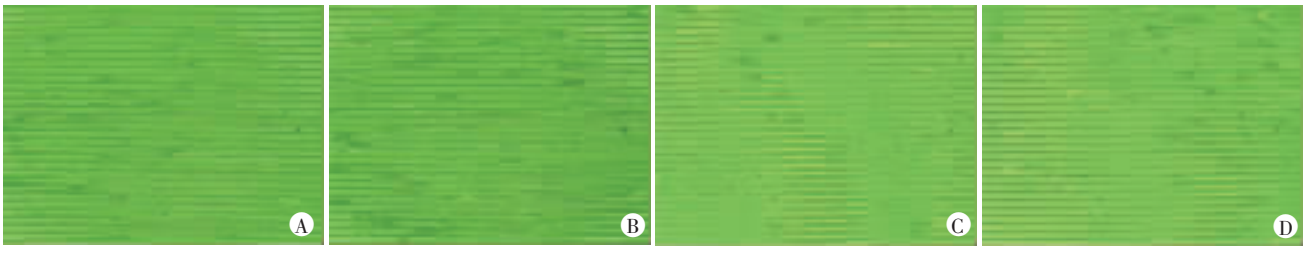


A:Ⅰ型胶原染色; B:Ⅲ型胶原染色

图 4 人肌腱细胞免疫组化染色 (SABC ×100)

2.3 循环牵伸载荷系统运行稳定性及循环牵伸载荷条件下肌腱细胞改变

循环牵伸载荷系统通过更换不同规格的机械凸轮能实现位移量 (2% 、4% 、8% 、12%)的牵拉,通过控制系统,可以实现从 0.1 ~2.0 Hz 之间任一频率的牵拉,时间可以按所需时间进行控制,并能预约开关时间。牵拉器部分在细胞孵育箱中运行良好,无共振、阻力增大及停机等现象发生,都能达到预定的牵伸强度和运行频率,肌腱细胞牵拉后贴壁生长良好,和牵拉前及未牵拉组比较无明显脱落(图 5),细胞死亡小于 2% 。



A:牵拉组牵拉前; B: 1.0 Hz,8% 幅度牵拉 24 h 后; C:非牵拉组未牵拉; D:非牵拉组 24 h 后

图 5 人肌腱细胞在微沟槽的生长情况 (倒置相差显微镜 ×100)

3 讨论

目前,针对体外培养细胞进行循环载荷牵拉以研究细胞在牵拉条件下形态学、周期、DNA 合成及蛋白合成等变化的装置较多。按力学类型及试验装置的特点有流体切应力系统[6]、流体静力作用系统[6,7]、张应力系统。流体切应力系统适用于研究血管内皮细胞。流体静力作用系统将细胞培养于一个密闭的容器中,通过气体或流体对此容器产生正性或负性压力,不利于长时间的细胞力学实验。二者均不适合对体外肌腱细胞进行循环载荷牵伸研究。

张应力系统是以弹性膜为基底材料,利用模板、液体或气体对基底膜施加可控的位移或压力作用,引起培养膜发生弹性变形,从而使黏附于膜上的细胞受到相应的张应变作用。张应力系统主要有:Flexercell 细胞加载系统,是由 Banes 等[8]1985 年设计的负压控制牵引力的细胞培养装置;通过真空吸引使弹性膜底部向下移位从而间接牵拉其上的贴壁生长细胞;通过计算机控制,对贴壁生长的细胞按不同时间、频率及强度进行牵拉。采用 6 孔光滑培养板,肌腱细胞表面生长方向杂乱,不能控制肌腱细胞生长方向,影响体外肌腱细胞牵拉的变化结果。舒茂国等[9]自制的机械牵拉细胞培养模型,通过将细胞直接种植在硅胶弹性膜上,待细胞贴壁生长后,采用人工控制不同幅度牵拉弹性膜而对贴壁细胞牵拉,由于此方法是一种静力性牵拉,无牵拉频率,不适合做人肌腱细胞牵拉的研究。

本研究研制的新型肌腱细胞循环牵伸载荷系统利用机械作用使硅树脂细胞培养皿进行周期性往复运动,从而间接对贴壁生长的细胞进行单轴方向牵拉。通过更换凸轮改变牵拉强度,采用可编程控制器(PLC)来控制加载的频率及时间,液晶显示屏(LCD)显示屏触摸操作并能显示实时频率及时间,具有精确、操作简单,人机交互性强等特点。能研究在不同频率、强度及时间下肌腱细胞在过度牵拉下信号转导、蛋白分泌与合成,对肌腱病的病因有全方位了解。由于牵拉强度、频率及时间可调,能按照运动员训练时运动的频率、时间进行肌腱细胞的体外牵拉,通过观察肌腱细胞发生的炎性改变而指导科学的训练方法。

培养皿采用透明、无毒、有弹性的硅树脂[10]作为原料,能在倒置显微镜下直接观察细胞生长情况、对细胞毒副作用小、有利于细胞牵拉。表面进行微沟槽处理,能对其上生长的肌腱细胞改向,使其呈平行排列,符合体内肌腱细胞排列方向,尽大可能模拟了体内肌腱细胞在负荷条件下状态,不会因为细胞的排列方向改变而影响细胞的功能。同时,该系统可以研究其他各种贴壁细胞,如 MSC、骨骼肌细胞,心肌细胞等细胞在单轴牵拉后的反应[11,12]。

总之,新型肌腱细胞循环牵伸载荷系统能模拟在人体正常生理状态时力学环境,观察肌腱细胞的牵拉条件下的生物学效应,对阐明肌腱病的病因、治疗及指导运动员科学训练提供了新的工具。

参考文献:

[1] Riley G. Tendinopathy——from basic science to treatment[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008, 4(2): 82-89.

[2] Fredberg U, Stengaard-Pedersen K. Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation[J]. Scand J Med Sci Sports, 2008, 18(1): 3-15.

[3] Ingber D. Integrins as mechanochemical transducers[J]. Curr Opin Cell Biol, 1991, 3(5): 841-848.

[4] Wang J H, Yang G, Li Z. Controlling cell responses to cyclic mechanical stretching[J]. Ann Biomed Eng, 2005, 33(3): 337-342.

[5] Cao D, Liu W, Wei X, *et al*. *In vitro* tendon engineering with avian tenocytes and polyglycolic acids: a preliminary report[J]. Tissue Eng, 2006, 12(5): 1369-1377.

[6] Brown T D. Techniques for mechanical stimulation of cells *in vitro*: a review[J]. Biomech, 2000, 33(1): 3-14.

[7] Wirtz H R, Dobbs L G. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells[J]. Science, 1990, 250(4985): 1266-1269.

[8] Banes A J, Gilbert J, Taylor D, *et al*. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells *in vitro*[J]. Cell Sci, 1985, 75: 35-42.

[9] 舒茂国, 易成刚, 韩岩, 等. 机械应力刺激对培养的人成纤维细胞分泌生长因子的影响[J]. 中国美容医学, 2008, 17(5): 689-691.

[10] Wang J H. Substrate deformation determines actin cytoskeleton reorganization: A mathematical modeling and experimental study[J]. Theor Biol, 2000, 202(1): 33-41.

[11] Park J S, Chu J S, Cheng C, *et al*. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells[J]. Biotechnol Bioeng, 2004, 88(3): 359-368.

[12] 李晓东, 黄跃生, 张东霞, 等. 机械牵张加重模拟缺血缺氧心肌细胞损伤的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(17):1557-1560.

(**收稿**:2009-10-25;**修回**:2009-11-20)

(编辑 王小寒)