

综述

培养骨组织及成骨细胞的生物力学研究概况

中国中医研究院骨伤科研究所(北京 100700) 李可心 尚天裕审校

骨组织培养技术在本世纪二、三十年代被发明并使生理应力对骨组织的影响研究得到发展。Glucksmann^[1]指出:许多复杂的生理因素在组织培养中可被去除,骨和软骨可在没有血管、神经和肌肉的情况下在体外生长,因而观察骨组织结构与已知应力的直接作用关系较体内实验更为精确。

1. 培养技术:

(1) 骨组织培养法悬滴培养法 (Hanging Drop Cultural Method): 培养基由 1 滴血清和 2 滴鸡胚浸液组成,将培养液置于经过消毒的盖玻片上,再将培养组织放置培养基中,翻转盖玻片,以容器密闭之并置入温箱中培养。

表玻璃培养法 (Watch-glass Cultural Method): 在一表玻璃内移入由血清和鸡胚浸液组成的培养基,骨组织置于培养基凝块中,表玻璃再放入一湿润培养皿内,在 38°C 下培养。

合成培养基培养法 (Artificial Medium Cultural System): 采用化学合成培养基,如 BGJ, CMRL-1066, TC-199, Eager 等加一定量的动物血清进行骨组织培养。骨组织多置于滤膜,尼龙或金属网表面,再放入培养皿中。这是目前进行骨组织生物力学研究最常用的培养方法。

绒毛尿囊膜培养法 (The Chorioallantoic Membrane Cultural System): 供体骨为孵育 4 至 16 天的鸡胚股骨或胫骨,受体则为孵育 8 至 9 天的鸡胚,无菌条件下取出供体骨后移置于受体鸡胚绒毛尿囊膜上,利用绒毛尿囊膜上的营养培养供体骨。

(2) 成骨细胞培养法: 移行细胞培养法 (Emigrated Cell Cultural Method): 将骨组织在培养基悬滴中培养数天后,组织周围可见呈放射状移行生长的成骨细胞,去除骨组织继续培养,细胞仍保持活力。还有一种方法是将新生小鼠颅骨取出,剥去纤维骨膜,将碎玻片置入颅骨凹面,经培养后成骨细胞移行生长在玻片上。

机械分离成骨细胞培养法 (Method of Mechanical Separating Osteoblasts): 将骨组织切碎,在缓冲液中反复搔刮,成骨细胞游离于上清液中,通过离心获得细

胞。

酶消化分离成骨细胞培养法 (Method of Enzymetic Digestion): 用胶原酶或胶原酶-胰蛋白酶混合液对成骨组织碎片进行消化,同时进行机械震荡。终止酶活性后离心上清液,将获得的成骨细胞种植于含有 Eager 培养基及小牛血清的培养瓶中,在 37°C 饱和湿度及 5% CO₂ + 95% 空气环境下培养。

2. 加力方式

(1) 机械压力 (Mechanical Compressive Force): 作者^[2]运用机械加压装置给予在绒毛尿囊膜上培养的鸡胚胫骨直接施加压力,观察骨折愈合。

(2) 机械牵张力 (Mechanical Tension or Stretching) 在骨组织培养中多用于研究牵张力对颅骨骨缝融合的影响。张力的施加一般采用弹簧样装置。在细胞培养中,不少作者设计了牵拉成骨细胞贴附生长的基板,使细胞产生应变^[3]。

(3) 离心力所产生压力 (Hypergravity): 培养的成骨细胞在离心状态下对所形成的超重力发生应变,促进细胞分化与增生^[4]。

(4) 流体静压 (Hydrostatic Pressure), 将培养瓶置于密闭的器皿中,通入恒定浓度的气体,在培养基表面形成一定的压力并传导至培养的骨组织细胞^[5]。

3. 应力对培养骨组织及细胞的作用研究

(1) 胶原合成: 结缔组织的稳定性赖于胶原的生理特性。Meikle^[6]和 Yen^[7]给颅骨纤维关节施予牵张力时,发现新合成的胶原增加,随着张力的增大,关节间细胞增殖和骨形成也相应增加。Coprav^[8]发现间断压应力 (0.5g) 促进骨基质硫酸氨基多糖和胶原的合成。

(2) 基质及软骨的矿化: Bagi 和 Burger^[9]运用流体静压给胚胎小鼠长骨施加间断力 (0.3HZ, 132g/cm²) 观察到硫酸盐与基质的结合率,在骨下部分实验组较对照组高一倍,在干骺端高 20%。Klein-Nulend^[10]也发现间断和持续压力的增加,均能促进钙磷与基质结合,且间断压力的效果高于持续压力。

(3) 细胞的增殖与分化: Buckley^[11]等提供培养成骨

细胞一个循环机械张力 (0.05HZ, 0-24% elongation, Square Wave) 发现成骨细胞数在培养后第 2 至第 3 天增加 1.8 倍, DNA 合成增加 2-4.1 倍。Ozawa 等连续给予成骨细胞 3 个大气压, 发现连续加压抑制碱性磷酸酶活性, 并抑制胶原的合成和矿化, 而对 DNA 的合成没有影响。

(4) 对骨折愈合的影响: 虽然有作者报导培养骨器官 (Bone organ) 人工骨折的愈合情况, 但由于对培养骨组织骨折端直接加力有一定困难, 故尚未见报导。作者等^[7]报导运用绒毛尿囊膜培养法, 以机械加压装置直接施力 (0.20-1.10g, 1HZ, 30Min, 4tim/d) 于离体培养的经过人工骨折的骨组织, 可促进骨折愈合。

4. 应力与骨修复和生长适应性的机理研究

(1) 骨组织压电效应: Ferrier 等在细胞培养过程中, 给培养基通入恒定电场, 所培养的成骨细胞向阴极移动, 破骨细胞向阳极移动, Rodan 等发现振荡电场促进培养鸡胚骨骨髓软骨细胞 DNA 的合成。表明电势能的变化可以影响骨细胞的生物物理特性。

(2) 显微损伤对骨形成的影响: Murray 和 Rushton 研究了离体培养成骨细胞在生理及病理应变状态下^[8], 其细胞内 DNA 合成加快, 并有 PGE₂ 和 cAMP 水平增高。因而认为细胞的显微损伤可促进细胞的增殖。

(3) 应力作用下前列腺素的产生及前列腺素对骨形成的影响: Yeh^[9]对在应力应变状态下成骨细胞 PGE₂ 水平的检测, 认为 PGE₂ 可引起骨的吸收, 但足够高的浓度则促进骨的形成。认为 PGE₂ 影响成骨细胞增殖与分化的中间环节为①离子通道的开放; ②腺苷酸环化酶和磷酸分解代谢的起动。这些环节通过钙的流量和蛋白激酶的活性来调控。

(4) 环核苷酸对骨形成的调节机制: Rodan^[10]首先提 cAMP 和 cGMP 为力影响骨重建的重要调节因子。在 60g/cm² 的压力下, 离体培养骨的 cAMP 和 cGMP 含量较对照组为低。Somen^[11]使离体培养成骨细胞产生应变, 其 cAMP 水平增高, 同时 DNA 合成增高。现在认为 cAMP 含量变化受 PGE₂ 调控。PGE₂ 增高将增加环核苷酸活性或抑制磷酸二酯酶的活性。

总之, 骨组织和成骨细胞离体培养技术使骨的生物力学研究进入一个新的水平。它不仅可以排除动物实验中难以排除的复杂生理因素, 也使我们能进一步在细胞或亚细胞水平, 以及分子水平研究骨组织细胞的生物力学特性。

参考文献

1. Glucksmann A: The role of mechanical stresses in bone formation in vitro. *J. of Anat.* 1942; 76: 232
2. Li Kexin et al: A new model of bone fracture healing induced by imitated physiological stress. in Proceedings of Xi'an satellite conference of 1991 world congress on medical physics and biomedical engineering. Xi'an Jiaotong University Press. 1991; A2-3.
3. Murray D. W. and Rushton H.: The Effect of Strain on Bone Cell Prostaglandin E₂ Release: A New Experimental Method. *Calcif. Tissue Int.* 1990; 47: 35-39
4. Miwa M: Effects of hypergravity on proliferation and differentiation of osteoblasts like cells. *Bone and Mineral.* 1991; 14: 15
5. Ozawa H. et al: Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-EL) in vitro. *J. cell physio.* 1990; 142: 177
6. Meikle M. C. et al: Rabbit suture fibroblasts under tension express a different collagen phenotype. *Archs Oral Biol.* 1982; 27: 609
7. Yen C. K. et al: Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen rebbons. *Calcif. Tissue Int.* 1984; 36: 367
8. Copray J. C. et al: Growth and growth pressure of mandibular condylar and some primary cartilages of the rat in vitro. *Arch Oral Biol.* 1985; 30: 305
9. Bagi C. and Burger E. A.: Mechannical stimulation by intermittent compression and matrix mineralization in fatal mouse long-bone rudiments under serum-free condition. *Calcif. Tissue Int.* 1989; 45: 342
10. Klein-Nulend J. et al: Increased calcification of growth platic cartilage as a result of compressive force in vitro. *Arthritis and Rheumatism.* 1986; 29(8): 1002
11. Buckley M. J. et al: Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. *Bone and Mineral.* 1988; 4: 225
12. Ferried J. et al: Osteoclasts and osteoblasts migrate in opposite directions in response to a constant electrical field. *J. Cell Physiol.* 1986; 129: 283
13. Rodan G. A. et al: DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscilating electric fields. *Science.* 1978, 199(10): 690
14. Somjen D. et al: Bone remodelling induced by physical stress is prostaglandin E₂ mediated. *Biochemical et Biomedica Acta.* 1980; 627: 91 (收稿: 1994-03-04)