周期性压应力对成骨细胞增殖及活性的影响*

王碧超[1**]，付雪飞[2]，朱铭慧[2]，王薮馨[2]，谢 慧[1]，张军梅[2***]
（1. 贵州医科大学，贵州 贵阳 550004；2. 贵州医科大学附属口腔医院，口腔正畸科，贵州 贵阳 550004）

[摘 要] **目的**：研究周期性压应力对成骨细胞增殖及活性的影响。**方法**：提取24 h新生SD大鼠成骨细胞并培养至第三代，鉴定后接种于六孔板，采用E1级饼形实验砝码加压（分别为0、1.42、2.83、4.25和5.66 g/cm^2），压应力以加压30 min再停止加压30 min的方式循环进行，作用时间分别为3、6、9、12和24 h，设0 g/cm^{2}压应力为对照组，1.42、2.83、4.25和5.66 g/cm^{2}压应力为实验组；采用活细胞计数试剂盒（CCK-8试剂盒）及碱性磷酸酶（ALP）活性检测不同周期性压应力对成骨细胞生长增殖数目和细胞活性的影响。**结果**：经鉴定，原代培养细胞符合成骨细胞特性；周期性压应力作用6 h，1.42和2.83 g/cm^{2}实验组成骨细胞*OD*值大于较对照组（$P<0.05$），但作用12和24 h时，前两者细胞*OD*值小于对照组（$P<0.05$）；周期性压应力作用3 h，2.83 g/cm^{2}实验组成骨细胞ALP活性较对照组及其他实验组高（$P<0.05$）；作用9、12和24 h，各实验组成骨细胞的ALP活性均低于对照组（$P<0.05$）；各时间点，4.25和5.66 g/cm^{2}实验组的成骨细胞*OD*值及ALP活性均低于对照组及其他实验组（$P<0.05$）。**结论**：短时间内0～2.83 g/cm^{2}的周期性压应力促进成骨细胞生长，但随着时间的延长，细胞增殖及活性受到抑制；2.83～4.25 g/cm^{2}的周期性压应力对成骨细胞增殖有抑制作用；>4.25 g/cm^{2}周期性压应力能抑制成骨细胞的增殖及活性。

[关键词] 成骨细胞；周期性压应力；细胞增殖；碱性磷酸酶
[中图分类号] R322.41；R336 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)01-0030-04
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.01.007

The Effect of Periodic Compression Force on Osteoblasts Proliferation and Activity

WANG Bichao[1], FU Xuefei[2], ZHU Minghui[2], WANG Souxin[2], XIE Hui[1], ZHANG Junmei[2]
(*1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Orthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect of periodic compression force on osteoblasts proliferation and Alkaline phosphatase activity. **Methods**: To extract primary osteoblasts from SD rats, cultivate them to the third generation and plant them into the 6-well plates, and then to conduct different periodic compression force with various experimental weight of level E1 for different periods of time, then preliminarily evaluate the effect of early osteoblasts proliferation on Alkaline phosphatase (ALP) activity by using cell counting kit-8 (CCK-8) and ALP activity detection. **Results**: By conducting periodic compression force for 6 h, the osteoblasts proliferation of the 1.42 g/cm^2, 2.83 g/cm^2 experimental groups was more than that of the control group ($P<0.05$). But when it was conducted for 12 h and 24 h, the osteoblasts proliferation in the two experimental groups was lower than that in the control group ($P<0.05$). By periodic compression force for 3 h, ALP activity of the 2.83 g/cm^2 experimental group was higher than the up-regulation as time went on, the osteoblasts proliferation rate and activity of the former were significantly higher than those of the control group and other experimental groups ($P<0.05$); The ALP activity of each experimental group with the compression force for 9 h,

*[基金项目]贵阳市科技攻关项目基金[筑科合同GG字(2015)12号]
**贵州医科大学2015级硕士研究生
***通信作者：E-mail：zjm46688@126.com
网络出版时间：2018/1/20 1:21 网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180120.0121.007.html

12 h and 24 h was lower than that of the control group ($P < 0.05$). The osteoblasts proliferation and ALP activity of the 4.25 g/cm^2, 5.66 g/cm^2 experimental groups were lower than those of the control group and other experimental groups ($P < 0.05$). **Conclusion**: Present experimental conditions, the periodic compression force between 0 g/cm^2 and 2.83 g/cm^2 promotes osteoblasts growth within a short time, but the osteoblasts proliferation and activity are inhibited as the time goes on. The periodic compression force between 2.83 g/cm^2 and 4.25 g/cm^2 may inhibite osteoblasts proliferation; The periodic compression force of over 4.25 g/cm^2 may severely inhibit cell proliferation and activity, and even lead to apoptosis.

[**Key words**] osteoblasts; periodic compression force; cell proliferation ; alkaline phosphatase

口腔正畸治疗促使牙的移动依赖于牙槽骨的改建，而牙槽骨改建至关重要的一步为牙槽骨的吸收，作为行使骨吸收功能的破骨细胞，它的成熟和分化受成骨细胞相关因子的调控，多种信号通路参与和调节破骨细胞的分化和成熟，最终达到动态的破骨吸收和成骨生成的平衡。正畸牙移动时受到的主要机械力为压应力，是刺激压力侧牙槽骨改建的重要因素[1]。其中，体外施加周期性压应力与人体牙槽骨受力的方式更为接近[2]。本研究目的探究周期性压应力对成骨细胞增殖及活性的影响，摸索促进或抑制成骨细胞生长的周期性压应力范围。

1　材料与方法

1.1　材料

24 h 内新生 SD 大鼠（贵州医科大学动物实验中心），E1 级实验砝码（成都金沙计量公司）、DMEM 高糖培养基美国（Gibco 公司）、青－链霉素（以色列 Biological Industries 公司）、胎牛血清（以色列 Biological Industries 公司）、胰蛋白酶美国（Gibco 公司）、Ⅰ型胶原酶（美国索莱宝公司）、CCK-8 细胞计数试剂盒（日本同仁化学公司）、碱性磷酸酶（ALP）检测试剂盒（南京建成公司），ELX800UV 酶标仪（美国 Bio-Teck 公司）。

1.2　方法

1.2.1　原代成骨细胞提取、纯化、培养和鉴定　将 24 h 新生 SD 大鼠颅盖骨取出剪碎为 1 mm × 1 mm 碎骨，依次在 37 ℃水浴箱中加入 0.25% 胰蛋白酶消化 20 min、1g/L Ⅰ型胶原酶消化 60 min 后收集细胞。采用倒置差速贴壁法纯化细胞后培养至第 3 代备用。按照茜素红、Ⅰ型胶原染色试剂盒说明书步骤进行染色鉴定。

1.2.2　压应力的施加及分组　将已纯化并经鉴定的第 3 代成骨细胞以 2×10^4 密度接种于 6 孔板中（每孔直径 3.5 mm），常规培养 8 h，待细胞融合 80% 后换液 1 次，并覆盖直径为 3 cm 的圆形盖玻片，换用含 1% 胎牛血清完全培养基培养 16 h 后，在盖玻片上分别放置重量为 0（无砝码）、10、20、30 和 40 g 的饼形 E1 级实验砝码，因盖玻片重量为 0.28 g，单位面积产生的压应力为 0.04 g/cm^2，可忽略不计。E1 级实验砝码产生的压应力分别为 0、1.42、2.83、4.25 和 5.66 g/cm^2。计时：压应力以加压 30 min 再停止加压 30 min 的方式循环进行，总时间分别为 3、6、9、12 和 24 h；以 0 g/cm^2 压应力作为对照组，1.42、2.83、4.25 和 5.66 g/cm^2 压应力作为实验组，每组设平行样本 6 个。

1.2.3　成骨细胞增殖　采用活细胞计数试剂盒（CCK-8 试剂盒）检测成骨细胞的增殖数。各组分别施加周期性压应力培养 3、6、9、12 和 24 h 后，采用 96 孔培养板每孔依次加入相应时间点取出的中间部分培养液 100 μL 和 CCK-8 溶液 10 μL，各组 6 个平行样本，37 ℃，5% CO_2 培养箱孵育 120 min，用酶标仪以 450 nm 测定各孔吸光度（*OD*）值。以含有成骨细胞、CCK-8 溶液和 E1 级饼形试验砝码的孔作为测定孔；含有 E1 级饼形试验砝码的培养基和 CCK-8 溶液，不含成骨细胞的孔作为标准孔；不含成骨细胞的培养基和 E1 级饼形试验砝码，但含有 CCK-8 溶液的孔作为空白孔。*OD* 值 = 测定孔 *OD* 值 − 标准孔 *OD* 值 − 空白 *OD* 值。*OD* 值大小反映细胞增殖数的多少。

1.2.4　成骨细胞中碱性磷酸酶（ALP）　按照试剂盒操作步骤依次备好各测定孔、标准孔及空白孔，在用酶标仪以波长 490 nm 测定各孔 *OD* 值。ALP 活力（金氏单位/mL）=（测定 *OD* 值 − 空白 *OD* 值）/（标准 *OD* 值 − 空白 *OD* 值）× 酚标准品浓度 ×100 mL × 样本测定前稀释倍数，金氏单位/mL 与国际单位（U/L）进率为 7.14。

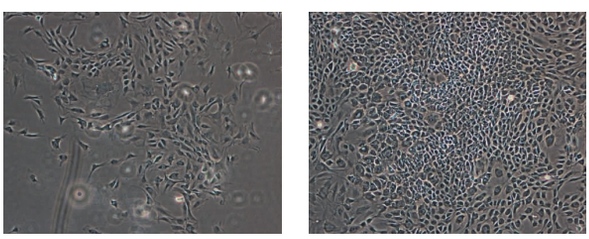
1.3　统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计学分析，实验数据用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，比较时采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　成骨细胞观察及鉴定

原代细胞培养的第 5 天(图 1A),镜下见细胞形态多样,细胞之间连接较少;细胞培养到第三代,细胞形态相对稳定,呈“铺路石”状生长,细胞间通过基质均匀连接、生长密集(图 1);茜素红染色阳性,镜下见红色灶状钙节结生长;I型胶原染色阳性,细胞基质呈浅棕黄色,细胞核呈深棕黄色(图 2)。



原代第5天　　第三代第5天

图 1　成骨细胞培养(200 ×)

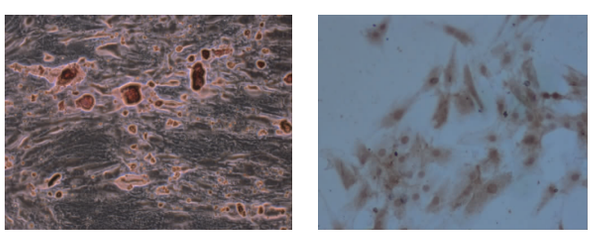
Fig. 1　Primary osteoblast cell observation

2.2　周期性压应力下成骨细胞 CCK-8 检测

周期性压应力作用 3 和 6 h 时,1.42 和 2.83 g/cm^2 实验组的 *OD* 值高于对照组(3 h,$P>0.05$;6 h,$P<0.05$);作用 9、12 和 24 h 时, 1.42 和 2.83 g/cm^2 实验组的 *OD* 值少于对照组(9 h,$P>0.05$;12 和 24 h,$P<0.05$)。见表 1。

2.3　周期性压应力下成骨细胞 ALP 活性

周期性应压力作用 3 h 时,2.83 g/cm^2 实验组成骨细胞 ALP 的活性较对照组及其他实验组高($P<0.05$)。见表 2。



茜素红染色　　I 型胶原染色

图 2　成骨细胞鉴定(400 ×)

Fig. 2　Identification of osteoblast cells

表 1　周期性压应力对成骨细胞 *OD* 值影响($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1　The effect of periodic compression force on osteoblasts proliferation

压应力(g/cm^2)	样本量(n)	*OD* 值				
		3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
0	6	0.436 ± 0.058	0.527 ± 0.063	0.731 ± 0.049	0.948 ± 0.033	1.383 ± 0.047
1.42	6	0.451 ± 0.061	0.562 ± 0.044$^{(1)}$	0.707 ± 0.038	0.782 ± 0.048$^{(2)}$	0.834 ± 0.052$^{(3)}$
2.83	6	0.463 ± 0.046	0.626 ± 0.051$^{(1)}$	0.692 ± 0.035	0.749 ± 0.033$^{(2)}$	0.801 ± 0.050$^{(3)}$
4.25	6	0.422 ± 0.050	0.413 ± 0.035$^{(4)}$	0.386 ± 0.043$^{(4)}$	0.372 ± 0.051$^{(4)}$	0.325 ± 0.043$^{(4)}$
5.66	6	0.348 ± 0.030$^{(5)}$	0.287 ± 0.033$^{(5)}$	0.254 ± 0.042$^{(5)}$	0.227 ± 0.040$^{(5)}$	0.201 ± 0.056$^{(5)}$

$^{(1)}$ 与对应时间点 0 g/cm^2 组相比,$P<0.05$;$^{(2)}$ 与对应时间点其他各组相比,$P<0.05$

表 2　不同周期性压应力下成骨细胞 ALP 表达($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2　The expression of the osteoblast ALP by periodic compression force

压应力(g/cm^2)	样本量(n)	ALP(U/L)				
		3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
0	6	5.006 ± 0.296$^{(1)}$	6.881 ± 0.330	7.758 ± 0.440	8.521 ± 0.394	11.585 ± 0.450
1.42	6	5.235 ± 0.399$^{(1)}$	7.085 ± 0.450	7.237 ± 0.410$^{(2)}$	7.439 ± 0.450$^{(4)}$	8.012 ± 0.400$^{(2)}$
2.83	6	6.616 ± 0.550	7.259 ± 0.422	6.350 ± 0.253$^{(2)}$	6.073 ± 0.438$^{(4)}$	5.376 ± 0.385$^{(2)}$
4.25	6	4.892 ± 0.326$^{(1)}$	4.664 ± 0.391	4.595 ± 0.527$^{(2)}$	4.172 ± 0.671$^{(4)}$	3.224 ± 0.317$^{(2)}$
5.66	6	3.413 ± 0.490$^{(1)}$	3.171 ± 0.411	3.062 ± 0.439$^{(2)}$	3.008 ± 0.388$^{(4)}$	2.781 ± 0.547$^{(2)}$

$^{(1)}$ 与 3 h,2.83 g/cm^2 组比较,$P<0.05$;$^{(2)}$ 与对应时间点,0 g/cm^2 组相比,$P<0.05$

3　讨论

颌骨是人体骨骼中最活跃的部分,其良好的可塑性为正畸牙移动提供了可行的生理基础[3]。正畸牙移动的基础是牙受到外力后通过牙体、牙周膜传递到牙槽骨,使得牙槽骨受力而发生改建,最终牙移动到理想位置[4]。在参与颌骨改建的细胞中,成骨细胞扮演了重要的角色,它能较早且快速的响应机械应力刺激,通过内源性细胞骨架、离子通道及非胶原蛋白等多种途径将外界应力刺激转化为细胞内化学信号,对机械应力刺激敏感,是重要的感受与效应细胞,且它对破骨细胞的成熟分化有重要的调控作用[5-6]。采用 E1 级饼型实验砝码,具有较高精度、经济实惠和操作方便的优势,且 E1 级实验砝码无磁场力,确保实验为单一的压缩应力[7],为实验的进行提供可靠的保障。CCK-8 检测试剂盒具有高灵敏度,能快速敏锐反应细胞数增减变化[8]。而 ALP 是评价成骨细胞早期活性的重要指标,通过检测可以判断成骨细胞在周期性压应力作用下的早期活性及分化情况[9]。结果显示,对照组在不施加周期性压应力条件下成骨细胞的增殖及活性随着时间的延长而逐渐增加,12 h 后增殖数显著增多,提示细胞进入快速增长期。而实验组(1.42 和 2.83 g/cm^2)在短时间内,能促进细胞增殖,但是随着时间的延长增值数逐渐降低,活性下降,提示较小力值范围内周期性压应力短时间内对成骨细胞的增殖有明显促进,但随着时间的延长抑制成骨细胞的生长,这可能是成骨细胞自分泌的外基质所形成的内源性骨架在短时间受压后发生轻微而缓慢的结构重排,张力重新分布,进一步使得相关蛋白位点上的氨基酸发生磷酸化,从而增加了酶的活性而加快细胞增殖分化的效应[10],但是随着时间的延长,成骨细胞形变时间过长而使细胞骨架受损导致细胞增殖受到抑制。Mitsui 等[11]发现以 1.0 g/cm^2 压应力作用于成骨细胞能显著上调骨涎蛋白(BSP)、环氧合酶 2(COX-2)、前列腺素 E2(PGE2)等基因的表达,促进成骨的合成。田林强等[12]发现 20 ~ 50 mmHg 动态压应力能上调成骨相关基因的水平,促使大鼠成骨细胞成熟分化,而 100 mmHg 动态压应力虽较对照组有所增强,但差异无统计学意义,提示过大的动态压应力将抑制成骨分化。实验组(4.25 和 5.66 g/cm^2)在周期性压应力作用 3 ~ 24 h 均呈负增长趋势,前者在 12 h 后负增长趋势显著,而后者在 3 ~ 6 h 负增长趋势显著,提示过大的周期性压应力将抑制成骨细胞的生长或导致细胞凋亡。这可能是过大的压应力超过单个成骨细胞及成骨细胞骨架承受的压缩应力上限,细胞膜通透性增强,凋亡诱导因子和凋亡蛋白酶激活 caspase 系统,进而促使细胞凋亡,致整个细胞骨架破坏,膜内酶及相关蛋白失活,成骨细胞过度形变而凋亡。李军等[13]发现高重力不仅可抑制成骨细胞增殖,促进细胞凋亡,还可导致成骨细胞发生变性坏死。Zhang Fan 等[14]发现压应力 >3.0 g/cm^2 时对成骨样细胞的生长影响偏大,而 >4.0 g/cm^2 的压应力将引发成骨样细胞凋亡。

综上所述,本实验研究条件下,在 0 ~ 2.83 g/cm^2 周期性压应力下作用 24 h 内,对成骨细胞的增殖有促进作用,且在此范围内随着力的增加及时间的推移,促进作用逐渐减小;2.83 ~ 4.25 g/cm^2 的周期性压应力可能对成骨细胞的生长起抑制作用,且随时间的推移抑制作用可能逐渐显著;超过 4.25 g/cm^2 的周期性压应力不仅抑制成骨细胞生长,且可能直接导致其凋亡。具体相关作用机制有待进一步实验研究。

4　参考文献

[1] 邹励宏, 黄玉芬, 李辉. 机械力对成骨细胞增殖和分化的影响研究进展[J]. 武警后勤学院学报, 2016, 13(25):240 - 243.

[2] MANOKAWINCHOKE J, SUMREJKANCHANAKIJ P, PAVASANT P. Notch signaling participates in TGF-β induced SOST expression under intermittent compressive stress[J]. J Cellular Physiology, 2017, 8(323):2221 - 2230.

[3] JIAN P, QIZHANG W, JIYUAN L. Research progress on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws[J]. West China Journal Of Stomatology, 2017, 1(35):29 - 36.

[4] 孙芳芳, 刘琳. 牙周治疗与正畸疗效研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2017, 5(10):317 - 320.

[5] ASHKAN ARYAEIA, AMBALANGODAGE C, JAYASURIYAB. The effect of oscillatory mechanical stimulation on osteoblast attachment and proliferation[J]. Materials Science and Engineering: C, 2015(52): 129 - 134.

[6] 陈犹白, 陈聪慧, ZHANG Q, 等. 脂肪干细胞成骨分化的研究进展[J]. 中华损伤与修复杂志, 2016, 11(2): 126 - 134.

(下转第 66 页)