

原子力显微镜技术检测几种骨组织细胞力学性能

王 哲 郝峰涛 杨周岐 陈晓虎 商 澎*

(西北工业大学生命学院, 西北工业大学特殊环境生物物理学研究所,
空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072)

摘要 为了探究几种骨组织细胞系的力学性能及其与细胞功能的关系, 该文采用原子力显微镜压陷法分别检测了前成骨细胞系(2T3和MC3T3-E1)、前骨细胞系(MLO-A5)和骨样细胞系(MLO-Y4)的杨氏模量, 利用激光共聚焦显微镜观察了这几种细胞微丝和微管的排布。结果显示, 2T3、MC3T3-E1、MLO-A5和MLO-Y4细胞的杨氏模量分别为(7 000±2 015) Pa、(6 600±2 024) Pa、(4 700±1 644) Pa和(4 500±1 622) Pa, 与原代骨组织细胞的杨氏模量及变化趋势保持一致, 但两种前成骨细胞的杨氏模量要显著高于前骨细胞和骨细胞。细胞荧光染色结果表明, 前成骨细胞细胞核周围的微丝和微管分布密度要高于前骨细胞和骨细胞, 而前骨细胞MLO-A5, 尤其是骨细胞MLO-Y4的骨架主要集中于细胞突触和边缘, 这可能是导致几种细胞力学性能差异的原因。该研究从生物力学的角度为进一步深入理解骨组织细胞结构与功能的关系提供了实验依据。

关键词 原子力显微镜; 力学性能; 杨氏模量; 成骨细胞; 骨细胞

Investigation of Mechanical Property of Various Bone Cell Lines by Atomic Force Microscopy

Wang Zhe, Hao Fengtao, Yang Zhouqi, Chen Xiaohu, Shang Peng*

(Key Laboratory for Space Biosciences and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics,
School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract In order to investigate the mechanical property of various bone cell lines and its relation with cell function, atomic force microscopy (AFM) was used to probe the Young's modulus of pre-osteoblast (2T3 and MC3T3-E1), pre-osteocyte (MLO-A5) and osteocyte (MLO-Y4). The fluorescent images of cell cytoskeleton such as F-actin and microtubule were detected by laser confocal microscopy. The results demonstrated that the Young's modulus of 2T3, MC3T3-E1, MLO-A5 and MLO-Y4 cell lines were (7 000±2 015) Pa, (6 600±2 024) Pa, (4 700±1 644) Pa and (4 500±1 622) Pa, respectively. Interestingly, the Young's modulus of pro-osteoblast was significantly higher than those of MLO-A5 and MLO-Y4, and this tendency of change in the Young's modulus was consistent with that of primary bone cells in different differentiation states. Meanwhile, the images of cytoskeleton showed that thick bundles of the F-actin and microtubule in 2T3 and MC3T3-E1 were concentrated in peri-nuclear region. But for MLO-A5, especially for the MLO-Y4, the cytoskeletons were mainly distributed in the cell process or cell periphery, which might be one reason to explain the low Young's modulus in the MLO-A5 and MLO-Y4 cells. This

收稿日期: 2013-12-11 接受日期: 2014-02-14

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB710903)和西北工业大学博士生论文创新基金(批准号: CX201021)资助的课题

*通讯作者。Tel: 029-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

Received: December 11, 2013 Accepted: February 14, 2014

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2011CB710903) and the Doctorate Foundation of Northwestern Polytechnical University (Grant No.CX201021)

*Corresponding author. Tel: +86-29-88460391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

网络出版时间: 2014-05-04 10:52

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0413.html>

study, for a biomechanical view, provided a basis interpretation for deeply understanding the relationship between the cell function and their structure.

Key words atomic force microscopy (AFM); mechanical property; Young's modulus; osteoblast; osteocyte

骨骼系统是人体最大的组织系统之一,具有支撑和保护身体、维持运动、造血、存储钙质等多种功能^[1]。骨组织细胞主要由骨髓间充质细胞、成骨细胞、骨细胞和破骨细胞等几种细胞构成。在人的生长和终老过程中,骨持续进行规律的骨重建过程。骨重建过程的新陈代谢是成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收共同作用的一个动态平衡过程^[1]。成骨细胞是骨形成细胞,它的分化成熟是骨组织生长的必要条件。一般而言,间充质干细胞首先经过一步或者几步的分化成为前成骨细胞,接着分化形成的成骨细胞分泌大量细胞外基质,将细胞包埋在矿化基质中,最后成骨细胞本身发育形成终端分化的骨细胞^[2-3]。在上述的分化过程中,骨组织细胞的结构和功能伴随着细胞分化的进行而发生改变。

细胞的生物力学特性是细胞重要的本征特征之一,它与细胞的结构形态以及功能有着密切的关系。因此,从生物力学的角度来研究和解释生命活动的现象和进程,已成为当前生物科学领域的一个热点问题^[4-6]。有研究发现,骨髓间充质干细胞在药物诱导的作用下向成骨细胞分化的过程中,细胞的力学性能发生改变^[7]。同时,也有文献报道原代分离的不同分化阶段的成骨细胞的力学性能也各有不同^[8]。

由于pN级的分辨率及微损的检测方式,原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)被视为一种理想的用于研究细胞力学性能的实验工具,已被应用于多种细胞的力学性能检测^[9]。尽管如此,目前对于骨组织细胞研究中使用最为广泛的建系细胞力学性能的研究却鲜有报道。因此,本研究使用原子显微镜和共聚焦显微镜分别检测了几种常用的骨组织细胞的力学性能及细胞骨架的排布,分析了前成骨细胞、前骨细胞和骨细胞几种细胞系的弹性模量与骨架分布的关系,从生物力学的角度为进一步深入理解骨组织细胞结构与功能的关系提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

前成骨细胞2T3和前骨细胞MLO-A5(美国德克萨斯大学健康科学中心姜欣教授惠赠);前成骨细

胞MC3T3-E1(澳大利亚悉尼大学ANZAC研究所周虹教授惠赠);骨样细胞MLO-Y4(美国密苏里州立大学堪萨斯分校Bonewald教授惠赠)。以上四种骨组织细胞系均为小鼠来源,处于成骨细胞分化过程的不同阶段。按照分化过程可依次排序如下:2T3、MC3T3-E1、MLO-A5、MLO-Y4。

1.2 试剂及仪器

α -MEM培养基、小牛血清(BCS)和牛血清白蛋白(BSA)购自Gibco公司;胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司;罗丹明标记的鬼笔环肽购自Invitrogen公司;Tublin鼠单抗和FITC标记的兔抗鼠IgG购自Calbiochem公司;DAPI染料、HEPES和多聚甲醛购自Sigma公司;抗荧光淬灭甘油购自江苏碧云天生物技术研究所;其他化学试剂均为国产分析纯。

AFM(美国Agilent公司,型号:PicoPlus); Si_3N_4 探针(日本Olympus公司,型号:PSA 400,弹性系数0.02 N/m);激光共聚焦显微镜(德国Leica公司,型号:TCS SP5);细胞培养控温平台(美国Lakeshore公司,型号:Lakeshore 321)。

1.3 细胞培养

将MC3T3-E1、2T3、MLO-A5和MLO-Y4细胞培养于 α -MEM培养基中,内含100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素,并置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养。其中,MC3T3-E1和2T3细胞培养基中含有10% FBS, MLO-A5细胞培养基含有2.5% FBS和2.5% BCS, MLO-Y4细胞培养基含有5% FBS和5% BCS。细胞生长至对数期时用于实验研究。

1.4 原子力压陷实验样品制备

取对数生长期的细胞接种于35 mm培养皿,细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{皿}$,细胞贴壁24 h后用于实验。AFM压陷实验时,培养基中加入10 mmol/L的HEPES用于保持培养基的pH不变。

1.5 AFM力-距离曲线的获取及分析

实验开始前,使用AFM自带的热调谐适配器(Themo K)获取探针的弹性系数。接着将制备好的细胞样品置于安装有细胞培养控温装置的载物台上,在显微镜的帮助下将探针移动到细胞核区域上方后对细胞进行压陷并获得力-距离曲线。每个样

品选取30~40个细胞, 每个细胞上重复获取10~15条力-距离曲线。所有力-距离曲线的获取条件完全一致, 采样点为20 000个, 加载速率为4 $\mu\text{m/s}$ 。

随后使用赫兹模型分析探针逼近曲线确定接触点并利用斜率法计算细胞杨氏模量。本研究采用逐点搜寻法, 使用MATLAB程序自动寻找接触点。

对于锥形探针, 赫兹模型满足以下方程:

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan\alpha \delta^2 \quad (1)$$

其中, F 是探针对细胞所施加的压力, E 是杨氏模量, ν 是泊松比, α 是探针半开角, δ 是压痕深度。将公式两端同时开方并且线性化:

$$\left(\frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan\alpha\right)^{1/2} = \frac{\Delta(F^{1/2})}{\Delta\delta} = slope \quad (2)$$

使用斜率法推算出细胞的弹性模量:

$$E = \frac{\pi}{2} \left[\frac{\Delta(F^{1/2})}{\Delta\delta}\right]^2 \frac{1-\nu^2}{\tan\alpha} = \frac{2}{\pi} slope^2 \frac{1-\nu^2}{\tan\alpha} \quad (3)$$

1.6 细胞骨架荧光染色

细胞骨架染色方法参考张维等的实验方法^[10]。将 1×10^5 细胞接种于放有预处理盖玻片的35 mm培养皿, 培养24 h后取出细胞爬片进行细胞骨架和细胞核的荧光染色。染色具体过程如下: 吸出培养基后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞1次, 加入4%多聚甲醛固定细胞; 0.5% Triton X-100的TBS室温下通透细胞膜10 min; 用含有2% BSA的PBS室温封闭10 min;

加入罗丹明标记的鬼笔环肽和tublin鼠单抗室温避光孵育1 h; 0.1% Triton X-100洗涤3次; 使用FITC标记的兔抗鼠IgG和DAPI室温避光孵育1 h; 0.1% Triton X-100洗涤3次; 加入抗荧光淬灭甘油封片后, 使用激光共聚焦显微镜进行扫描成像。

1.7 数据处理及统计学分析

使用Prism 5.0软件进行实验数据统计分析, 数据表达式形式为 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 。采用单因素方差分析检验进行各组均值间差异性比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

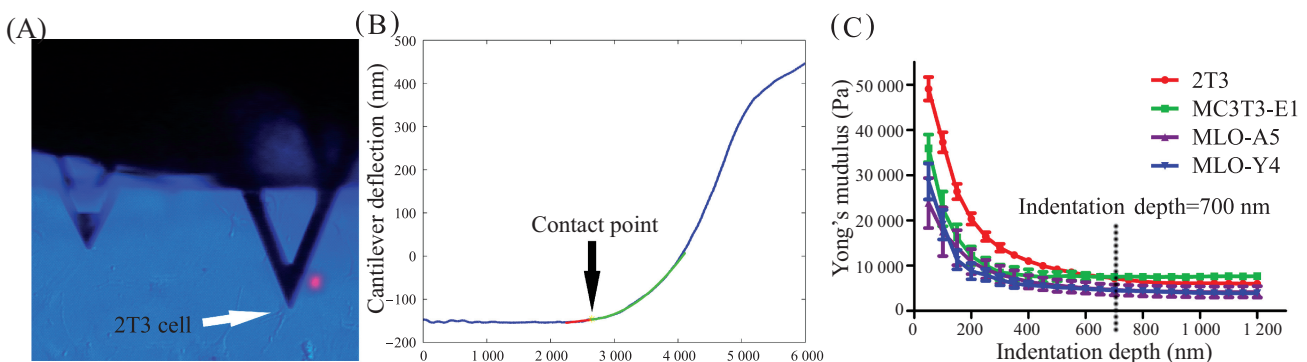
2 结果

2.1 细胞压陷力-距离曲线的获取和分析

使用原子力显微镜弹性压陷细胞, 获取了2T3、MC3T3-E1、MLO-A5和MLO-Y4几种骨组织细胞系的力-距离曲线, 分析计算细胞弹性模量与压痕深度的关系, 确定了实验中采用的压痕深度, 最终我们选取的压痕深度为700 nm(图1)。本实验中, 选取细胞核附近区域作为探针压陷位置(图1A)。在Crick等^[11]的算法基础上, 通过编写的MATLAB程序分析了力-距离曲线的进针曲线, 由拟合曲线确定了探针与细胞的接触点(图1B), 即一次拟合区域(红色)与二次拟合区域(绿色)结合处。最后我们分析了四种细胞在不同压痕深度下的杨氏模量(图1C)。结果显示, 所有细胞的弹性模量都随着压痕深度的增加而降低, 最后趋于稳定。

2.2 四种骨组织细胞的杨氏模量大小及分布范围

本实验中, 采用赫兹模型和斜率法分析计算了四种细胞在700 nm压痕深度下细胞的杨氏模量。对



A: 选择细胞压陷区域; B: 分析压痕曲线获取接触点; C: 获取杨氏模量与压痕深度关系, 确定压痕深度。

A: choose of the indentation region of probe under optical microscopy; B: identification of the contact point by curve fitting method with the MATLAB software; C: determination of indentation depth from the curve of Young's modulus vs indentation depth.

图1 力-距离曲线的获取和分析

Fig.1 Acquisition and data processing of force-distance curve

各细胞的杨氏模量数值进行统计, 以每个区间长度为1 000 Pa绘制了细胞杨氏模量直方图, 同时对各自的直方图进行了高斯拟合。图2A~图2D分别展示了2T3、MC3T3-E1、MLO-A5和MLO-Y4细胞的杨氏模量的分布情况。

对细胞的杨氏模量进行了统计学分析, 获得各自杨氏模量的分布区间和均值, 误差为高斯峰的一半峰宽, 并对几种细胞进行统计学差异比较。表1展

示了四种骨组织细胞杨氏模量的分布范围和统计分析。结果显示, 前骨和骨细胞的杨氏模量远远小于两种前成骨细胞, 并且它们与两种成骨细胞之间的统计学差异具有显著性($P<0.01$)。但是, 两种前骨细胞以及前成骨和骨细胞之间进行统计学分析, 则没有发现明显的统计学差异。

2.3 四种骨组织细胞细胞骨架排布

为了研究四种骨组织细胞力学性能与细胞骨

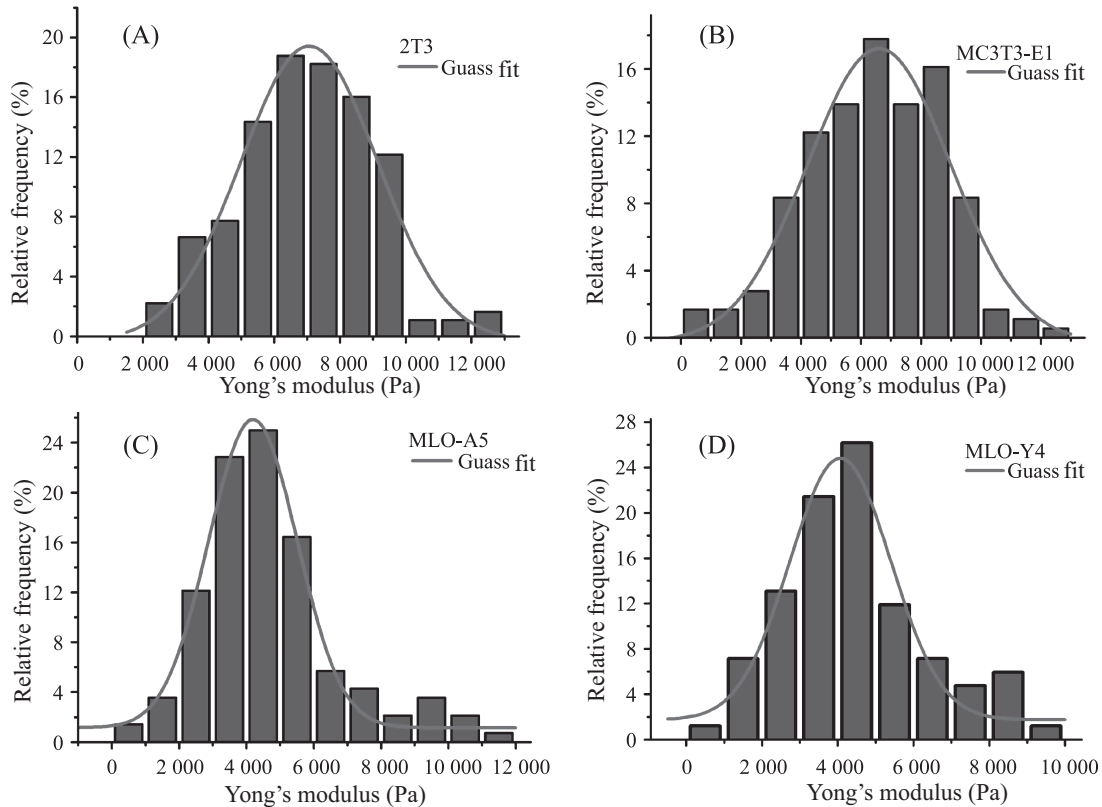


图2 四种骨组织细胞杨氏模量分布图

Fig.2 Histograms of the Young's modulus determined for four kinds of bone cell lines

表1 四种骨系细胞的杨氏模量($\bar{x}\pm S.D.$)

Table 1 Young's modulus of four kinds of bone cell line ($\bar{x}\pm S.D.$)

细胞系 Cell line	样本数 n	杨氏模量范围(Pa) Range of Young's modules (Pa)	杨氏模量(Pa) Young's modulus (Pa)
2T3	36	2 500~12 300	7 000 \pm 2 015 ^{**#}
MC3T3-E1	37	1 900~12 400	6 600 \pm 2 024 ^{**#}
MLO-A5	34	1 670~11 200	4 700 \pm 1 644
MLO-Y4	38	1 600~9 300	4 500 \pm 1 622

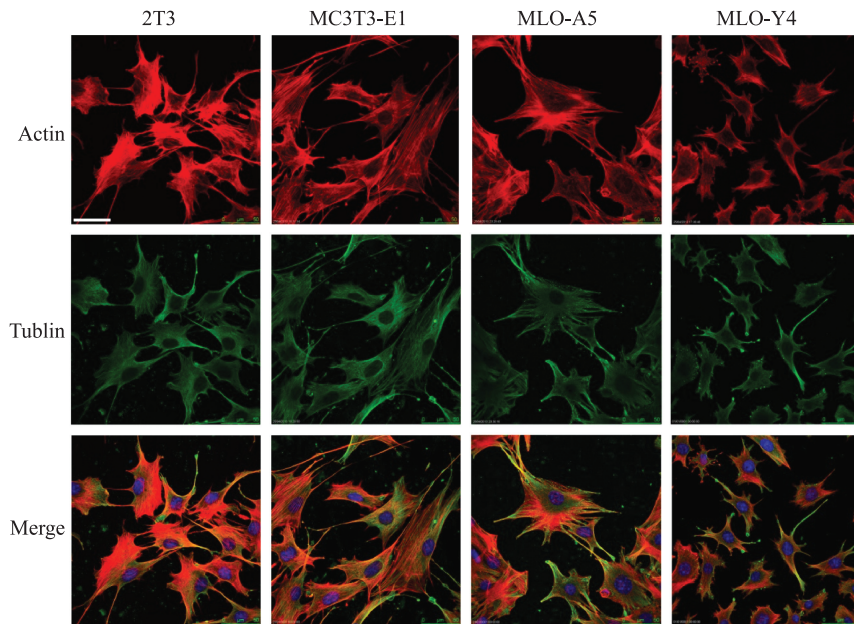
** $P<0.01$, 与MLO-A5比较; # $P<0.01$, 与MLO-Y4比较。

** $P<0.01$ vs MLO-A5; # $P<0.01$ vs MLO-Y4.

架的关系, 采用了荧光染色的方法观察了细胞微丝和微管骨架的排布(图3)。由图3观察发现, 两种前成骨细胞2T3和MC3T3-E1细胞核附近微丝微管分成束状排布, 分布密集。但对于前骨细胞MLO-A5尤其是骨样细胞MLO-Y4, 细胞形态趋向于星型并伸出多个细胞突触, 微丝和微管主要集中在细胞边缘和细胞突触中。

3 讨论

近年来, 细胞的力学性能及其与细胞功能之间的关系受到了研究人员广泛的关注。大量研究表明,



红色: 微丝; 绿色: 微管; 蓝色: 细胞核。标尺=50 μm 。

Red: F-actin; Green: microtubule; Blue: nuclear. Bar=50 μm .

图3 四种骨组织细胞骨架排布

Fig.3 Distribution of cytoskeleton in the 4 kinds of bone cell lines

细胞的力学性能与诸多的生物学过程密切相关, 通过分析细胞力学性能如杨氏模量的改变可以推知或者反映细胞在生理病理过程中的变化^[4,12]。从某些程度而言, 细胞的力学性能可以被看做为细胞结构和功能的一个表征, 获取细胞的力学性能信息, 可以更深入和详细地了解细胞的结构和功能。

本文使用原子力显微镜系统地研究了前成骨细胞、前骨细胞和骨细胞三种骨组织细胞系的力学性能, 并探讨了细胞杨氏模量与细胞骨架排布之间的关系。结果显示, 2T3和MC3T3-E1细胞的杨氏模量均值为(7 000 \pm 2 015) Pa和(6 600 \pm 2 024) Pa, 远远高于MLO-A5和骨样细胞MLO-Y4的(4 700 \pm 1 644) Pa和(4 500 \pm 1 622) Pa(表1), 但两种前成骨细胞之间以及前骨细胞和骨细胞之间未见统计学差异, 这与Sugawara等^[9]在几种原代的骨组织细胞上检测的数值相近。同时, 从细胞弹性模量的变化趋势上来看, 伴随成骨细胞向骨细胞的分化, 骨组织细胞系的弹性模量逐渐减小, 这与原代成骨细胞在分化过程中细胞弹性模量的变化保持一致^[8], 表明建系的骨组织细胞在细胞力学性能方面保持了原代细胞相同的特征。

原子力显微镜是目前研究细胞生物力学特性使用最广泛的手段之一, 可在生理条件下对正常培

养的细胞进行压陷, 最后通过使用赫兹模型分析压陷曲线从而获得细胞的弹性模量。在此过程中, 接触点位置判定和压陷深度对杨氏模量的测定起到非常关键的作用^[13]。本研究改进了力曲线数据分析算法, 利用MATLAB程序自动确认接触点位置以减少人为分析误差。同时, 分析判断了杨氏模量与压陷深度的关系, 从而选取合适的压陷深度。结果发现, 四种骨组织细胞杨氏模量随着压陷深度的增加而降低, 在压陷深度达到700 nm后, 四种细胞的杨氏模量均趋于平缓, 这与Guo等^[4]在MC3T3-E1细胞上的结果趋势一致。因此, 本次实验最后选取了700 nm的压陷深度, 从而保证实验条件的统一性并可降低实验误差(图1C)。

细胞自身的结构, 尤其是细胞骨架的排布是影响细胞性能的一个重要因素。已有研究发现, 富含微丝微管的区域或者微丝微管排列比较有序的细胞, 细胞的弹性模量相对较大^[15]。而本研究也发现, 两种前成骨细胞内部, 尤其是细胞核周围的微丝微管分布要多于前骨细胞, 而实验压陷的位置也在细胞核附近, 这可能是成骨细胞的杨氏模量要远远高于前骨细胞的原因。

另一方面, 细胞的力学性能与细胞的功能有密切的关系。成骨细胞的主要功能是分泌细胞外基质

基质, 丰富的细胞骨架系统保障细胞内外的物质运输。而骨细胞是末端分化细胞, 包埋在骨基质中, 是骨组织中最重要力学感受器。骨细胞通过细胞突触感知骨髓腔中的流体刺激或者通过细胞体直接感知组织应变^[16]。集中分布在细胞突触中的细胞骨架, 能快速感知细胞外的力学刺激, 将力学信号及时转化为生物信号。通过对成骨细胞和骨细胞网络施加不同大小的流体刺激, Guo等^[17]发现, 相对于称骨细胞, 骨细胞对外界的力学刺激更为敏感。另一方面, Bacabac等^[18]发现, 相对于完全贴壁的骨细胞, 弹性模量明显减低的半贴壁球形体现出更高的力学敏感性。以上结果提示, 越小的细胞弹性模量则代表细胞的形变能力和力学敏感性越高, 在同样强度的外力作用下细胞能产生更大细胞形变和更多的信号转导分子。因此, 骨细胞呈现较小的弹性模量与其功能有着密切的关系, 它可以直接感应更小组织的应变和流体刺激, 从而促进细胞的力学刺激向生化信号的转变并维持骨代谢平衡。

参考文献 (References)

- 1 Rauner M, Stein N, Hofbauer LC. Basics of Bone Biology. In: Pietschmann P, editor. Principles of Osteoimmunology. Vienna: Springer Vienna, 2012, 1-26.
- 2 Schaffler M, Cheung W, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 2013; 1-20.
- 3 孟 芮, 王海芳, 续惠云, 骞爱荣, 曹建平, 商 澎. 骨细胞功能研究进展. *中国细胞生物学学报*(Meng Rui, Wang Haifang, Xu Huiyun, Qian Airong, Cao Jianping, Shang Peng. Progress in function of osteocytes. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2008; 30(2): 161-5.
- 4 Lee GY, Lim CT. Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends Biotechnol* 2007; 25(3): 111-8.
- 5 Di Carlo D. A mechanical biomarker of cell state in medicine. *J Lab Autom* 2012; 17(1): 32-42.
- 6 唐福州, 王 翔, 熊延连, 邓雪茹, 李遥金, 王若峰. 蛋白激酶C调控脊椎生物红细胞膜骨架蛋白间亲和力的进化演变. *中国细胞生物学学报*(Tang Fuzhou, Wang Xiang, Xiong Yanlian, Deng Xueru, Li Yaojin, Wang Ruofeng. Evolution of the vertebrate erythrocytes membrane skeleton protein affinity is caused by protein kinase C. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(4): 460-8.
- 7 Titushkin I, Cho M. Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biophys J* 2007; 93(10): 3693-702.
- 8 Sugawara Y, Ando R, Kamioka H, Ishihara Y, Murshid SA, Hashimoto K, *et al.* The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes. *Bone* 2008; 43(1): 19-24.
- 9 Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron* 2007; 38(8): 824-33.
- 10 张 维, 骞爱荣, 高 翔, 胡丽芳, 瓮媛媛, 韩 晶, 等. 细胞骨架染色中不同固定方法的探讨. *中国细胞生物学学报*(Zhang Wei, Qian Airong, Gao Xiang, Hu Lifang, Wen Yuanyuan, Han Jing, *et al.* A study of different fixatives in cytoskeleton staining. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(1): 149-53.
- 11 Crick SL, Yin FC. Assessing micromechanical properties of cells with atomic force microscopy: Importance of the contact point. *Biomech Model Mechanobiol* 2007; 6(3): 199-210.
- 12 Plodinec M, Loparic M, Monnier CA, Obermann EC, Zanetti-Dallenbach R, Oertle P, *et al.* The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotechnol* 2012; 7(11): 757-65.
- 13 Carl P, Schillers H. Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: Data acquisition and processing. *Pflug Arch Eur J Physiol* 2008; 457(2): 551-9.
- 14 Takai E, Costa KD, Shaheen A, Hung CT, Guo XE. Osteoblast elastic modulus measured by atomic force microscopy is substrate dependent. *Ann Biomed Eng* 2005; 33(7): 963-71.
- 15 Docheva D, Padula D, Popov C, Mutschler W, Clausen-Schaumann H, Schieker M. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *J Cell Mo Med* 2008; 12(2): 537-52.
- 16 van Hove RP, Nolte PA, Vatsa A, Semeins CM, Salmon PL, Smit TH, *et al.* Osteocyte morphology in human tibiae of different bone pathologies with different bone mineral density—is there a role for mechanosensing? *Bone* 2009; 45(2): 321-9.
- 17 Lu XL, Huo B, Chiang V, Guo XE. Osteocytic network is more responsive in calcium signaling than osteoblastic network under fluid flow. *J Bone Miner Res* 2012; 27(3): 563-74.
- 18 Bacabac RG, Mizuno D, Schmidt CF, MacKintosh FC, van Loon JJ, Klein-Nulend J, *et al.* Round versus flat: Bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing. *J Biomech* 2008; 41(7): 1590-8.