

前交叉韧带干细胞分化后其牵引力的变化

马德顺* 高淑云 路春霞 易正鑫

(沈阳大学生物与环境工程学院, 沈阳 110044)

摘要 细胞牵引力是细胞的一个重要物理参数,它反映了细胞的生长状态。本实验测定了前交叉韧带(ACL)干细胞分化前后牵引力的变化,发现 ACL 干细胞在分化后,当形态发生明显变化时,其细胞牵引力明显减小,平均减小了 30%,同时平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的含量也相应减少了,这说明,干细胞在分化后细胞内的结构和组成发生了明显变化,编码 α -SMA 的基因表达受到了一定程度的抑制。

关键词 前交叉韧带;干细胞;细胞牵引力

细胞牵引力是细胞的一个重要物理参数,它与细胞的许多生物过程有着密切的关系,比如炎症反应、创伤修复、血管生成、形态保持、信号转导以及新陈代谢等过程^[1]。牵引力由肌动球蛋白的相互作用和肌动蛋白的聚合作用而产生^[2-4],受平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的调节^[5,6]。 α -SMA 的变化能改变细胞牵引力^[1,7,8],细胞牵引力与肌动球蛋白和肌动蛋白的功能密切相关^[9,10]。据 Wottawah 等^[11]学者研究发现细胞牵引力在肿瘤诊断方面具有重要意义。

不同的细胞其牵引力也不同,相同的细胞在不同的发育阶段,其牵引力也不一样^[12-14]。目前,关于细胞牵引力的研究还非常有限,由于其测算技术的复杂性,目前只局限于美国少数几所大学从事该领域研究。显微镜追踪法测定细胞牵引力技术(cell traction force microscopy, CTFM)^[2]是近几年在美国发展起来的测量单个细胞牵引力的技术,本研究用 CTFM 法测定了前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)干细胞在分化前后不同形态时的细胞牵引力,试图发现干细胞的分化及形态变化与细胞牵引力之间的关系。

1 材料与方法

1.1 组织来源

人体组织 ACL 由芝加哥大学附属医院提供,系 36 岁健康男性白人,死于车祸。

1.2 细胞培养

将人体组织 ACL 置于培养皿中,充分剪碎、消化和吹打后,将组织悬液以 1 000 r/min 离心 5 min 去上清液,加入培养液吹打,然后接种于 100 ml 培养瓶中,加入 DMEM 培养液,内含 20% 犊牛血清、50 U/ml 青链霉素(Gibco-BRL 公司),置 CO₂ 培养箱内,5%

CO₂, 37 °C 培养。培养 3~4 天换液,去除未贴壁的细胞。用倒置显微镜(尼康 TE-2000)观察细胞生长状态,挑取克隆生长的细胞扩大培养,每 3 天传代一次,待大多数细胞具有较好的集落形态时(图 1A),取出测定细胞牵引力,同时取一部分细胞制备电泳样本,以检测 α -SMA 的表达。剩余细胞继续培养,使其自然分化一周左右,待其形态有了明显变化后(图 1B),再测定细胞牵引力,并以同样方法留取细胞制备电泳样本以检测 α -SMA 的表达。

1.3 细胞牵引力测算

1.3.1 CTFM 技术 其基本原理是根据细胞基质弹性表面形变来测算细胞牵引力的一种技术。在制备弹性基质时掺入荧光微珠,当细胞贴附后会使基质产生形变,当细胞脱离时再回复原位,这种基质的形态变化可以通过荧光微珠的位移表现出来,可以用荧光显微镜追踪观察。将细胞脱离前后的基质形态变化拍成图片,用 MATLAB7.0 运行专用自编程序进行比较分析即可测算出细胞牵引力。其过程主要分为 3 个步骤: (1)拍摄细胞图片,以确定细胞牵引力的区域; (2)分别拍摄细胞贴附时和脱离后的基质形态图片,以确定荧光微珠的位移; (3)将拍摄的 3 张图片上机分析。

1.3.2 基质的制备 在 35 mm 的玻底培养皿中制备直径为 14 mm 厚度为 120 μ m 的凝胶,其含 5% 聚丙烯酰胺、0.1% Bis 及 0.8% 的 0.5 μ m 的荧光微珠;在种细胞之前在凝胶上铺上一层浓度为 1% 的 I 型胶

收稿日期: 2009-11-09 接受日期: 2010-01-25

沈阳大学与美国匹兹堡大学合作项目

* 通讯作者。Tel: 024-82165750, E-mail: madeshun6410@yahoo.

com.cn

原蛋白液。

1.3.3 细胞移植 当细胞培养成熟时,用胰蛋白酶处理使其处于悬浮状态后移植至基质上,每个培养皿种植细胞 1 500 个左右,1 h 后当细胞贴附在基质上时再加 2 ml 培养液,在培养箱内培养 5 h,当细胞完全伸展开后拍摄图像。

1.3.4 图像拍摄 用尼康 TE2000 荧光倒置显微镜拍摄所需图像,首先用普通光源拍摄细胞图像,然后用绿色荧光拍摄基质图像。当获得细胞贴壁状态的图片后,滴入 1~2 滴 1 mol/L 的氢氧化钠溶液,使细

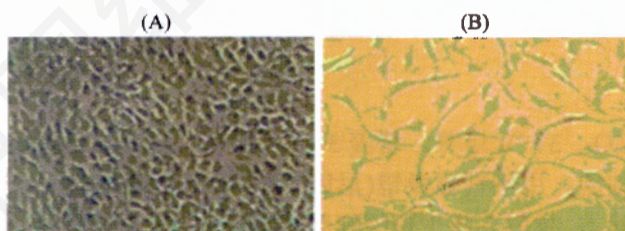


Fig.1 Cell morphology

A: ACL stem cells before differentiation; B: ACL stem cells after differentiation.

胞脱离基质,并保持培养皿处于原位不动,用显微镜观察确认,当细胞确实脱离后再拍摄细胞脱离后的基质图像,并使前后两张基质图像能够完全重合,将 3 张图片编号后上微机分析。

1.3.5 图像信息的分析处理 在美国匹兹堡大学生物力学实验室,用 MATLAB7.0 软件及由该实验室编制的程序对图片进行比较分析,测算出各个细胞的牵引力(图 2)。

1.3.6 α -SMA 的检测 首先取 2 ml (约含 30 万个细胞)干细胞,用含 1.5% 蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 (Sigma-Aldrich 公司)处理细胞,1 2000 r/min 离心 10 min,取上清液蛋白用 BCA 试剂盒检测其浓度,将干细胞蛋白样本制备好后,放入冰箱冷冻保存。待剩余细胞分化后,在测定牵引力的同时,按上述方法制备蛋白质样本。将细胞分化前后的样本同时进行电泳测定。取含等量蛋白质的样品注入 10% 的聚丙烯酰胺凝胶,以 90 V 恒定电压电泳,然后,用电转膜仪 (Bio-Rad)以 70 V 电压转膜 90 min。用 5% 的奶粉 PBS-Tween20 缓冲溶液处理 1 h,进行抗体反应,用抗 α -SMA 特异蛋白为一级抗体(购于 Sigma-Aldrich),用以

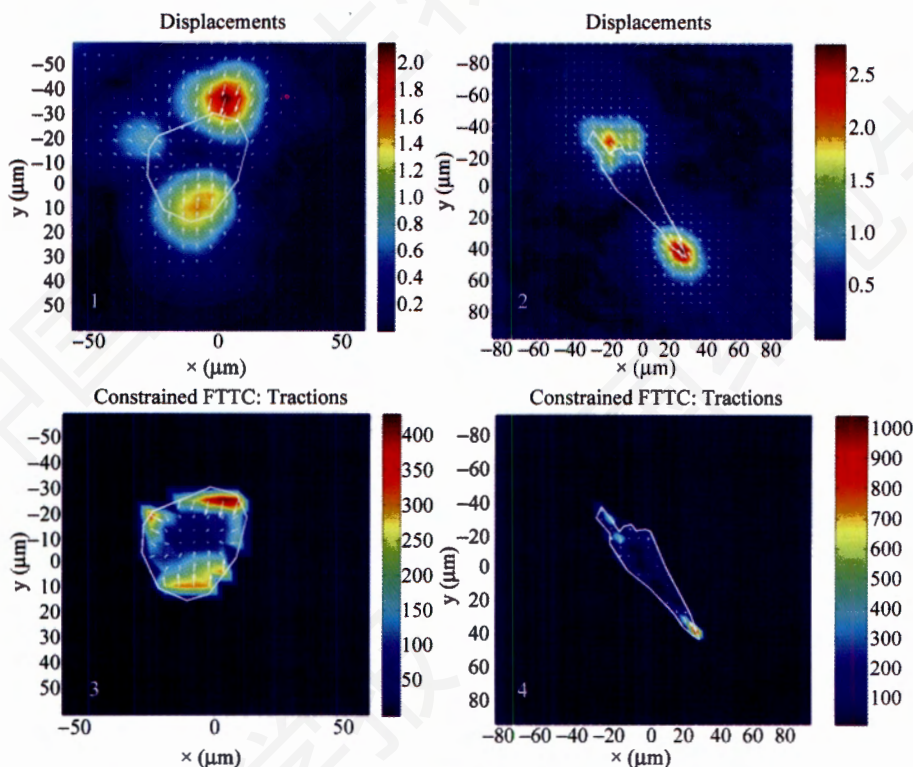


Fig.2 The image of displacement and traction force caused by ACL stem cells before and after differentiation

1: the displacement of microbeads caused by ACL stem cells before differentiation in the substrate; 2: the displacement of microbeads caused by ACL stem cells after differentiation in the substrate; 3: the distribution of CTF of ACL stem cell before differentiation in the substrate; 4: the distribution of CTF of ACL stem cells after differentiation in the substrate.

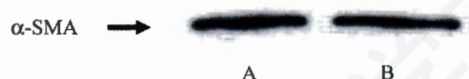


Fig.3 The comparison of expression of α -SMA in ACL stem cells before and after differentiation

A: the expression of α -SMA of ACL stem cells before differentiation;
B: the expression of α -SMA of ACL stem cells after differentiation.

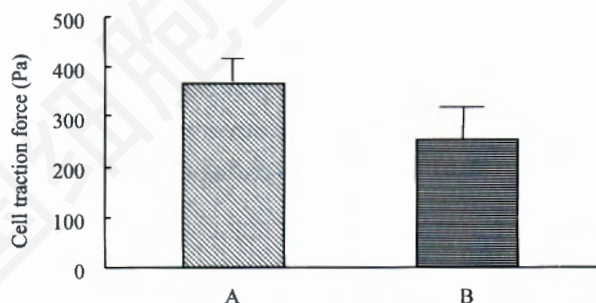


Fig.4 The comparison of CTF of ACL stem cells before and after differentiation

A: ACL stem cells before differentiation; B: ACL stem cells after differentiation. $n=10$; $P<0.05$.

过氧化物酶标记的羊抗人免疫球蛋白为二级抗体, 用 ECL 蛋白检测试剂盒检测 α -SMA (图 3)。

2 结果

ACL 干细胞分化以后, 当形态上有了明显的变化形成成纤维细胞以后, 其牵引力会明显减小, 平均减小 30% 左右 (图 4); 与此同时 α -SMA 的含量也发生了相应的变化 (图 3)。

3 讨论

ACL 干细胞分化后牵引力的减小表明干细胞分化后细胞内的分子结构和组成发生了显著变化, 尤其是 α -SMA 的含量发生了变化。这说明在分化过程当中, 随着分化过程的进行, α -SMA 的基因表达受到了一定程度的限制。这些现象与细胞分化过程中的骨架重组有关^[8]。

ACL 干细胞分化后牵引力将会减小。有趣的是这种现象并不局限于 ACL 干细胞, 在笔者研究的若干干细胞中均有此现象, 比如内侧副韧带 (medial collateral ligament, MCL) 干细胞和腓腱干细胞, 这说

明干细胞在分化过程中牵引力减小可能是一个普遍现象, 其变化机制有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Chen J, Li H, SundarRaj N, Wang JH. α -Smooth muscle actin expression enhances cell traction force. *Cell Motil Cytoskeleton* 2007; 64(4): 248-57.
- 2 Wang JH, Lin JS. Cell traction force and measurement methods. *Biomech Model Mechanobiol* 2007; 6(6): 361-71.
- 3 Moustakas A, Souchevnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 24): 4359-69.
- 4 Munevar S, Wang Y, Dembo M. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys J* 2001; 80(4):1744-57.
- 5 Kong HJ, Polte TR, Alsberg E, Mooney DJ. FRET measurements of cell-traction forces and nano-scale clustering of adhesion ligands varied by substrate stiffness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(12): 4300-5.
- 6 Kawai-Kowase K, Sato H, Oyama Y, Kanai H, Sato M, Doi H, *et al.* Basic fibroblast growth factor antagonizes transforming growth factor-beta1-induced smooth muscle gene expression through extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(8): 1384-90.
- 7 Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. α -smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell* 2003; 14(6): 2508-19.
- 8 Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. α -smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001; 12(9): 2730-41.
- 9 Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of α -smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol* 2006; 172(2): 259-68.
- 10 Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003; 200(4): 500-3.
- 11 Wottawah F, Dietrich J, Schinkinger S, Lincoln B, Remmerbach T, Guck J. Mechanical properties of cells as diagnostic marker for oral cancer. *J Biomech* 2006; 39(Supplement 1): S233.
- 12 Clement S, Hinz B, Dugina V, Gabbiani G, Chaponnier C. The N-terminal Ac-EEED sequence plays a role in α -smooth-muscle actin incorporation into stress fibers. *J Cell Sci* 2005; 118(7): 1395-404.
- 13 Bogatkevich GS, Tourkina E, Abrams CS, Harley RA, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Contractile activity and smooth muscle alpha-actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285(2): L334-43.
- 14 Beningo KA, Dembo M, Kaverina I, Small JV, Wang YL. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol* 2001; 153(4): 881-8.

Variation in Cell Traction Force of Anterior Cruciate Ligament Stem Cells before and after Differentiation

De-Shun Ma*, Shu-Yun Gao, Chun-Xia Lu, Zheng-Xin Yi

(School of Biological and Environmental Engineering, Shenyang University, Shenyang 110044, China)

Abstract Cell traction force (CTF) is an important physical parameter, which indicate a growth state of cells. In this study, Researcher have measured CTF of anterior cruciate ligament (ACL) stem cells before and after differentiation, and than found that CTF of ACL stem cells were decreased obviously after differentiation when these cells change significantly in morphology. The average of magnitude of CTF were reduced by 30%. The amount of α -smooth muscle actin (α -SMA) also be reduced correspondingly. This suggest that the structure and component of stem cells have changed significantly and to a certain extent the expression of a gene coding α -SMA have been inhibited.

Key words anterior cruciate ligament; stem cells; cell traction force

Received: November 9, 2009 Accepted: January 25, 2010

This work was in concert with Pittsburgh University

*Corresponding author. Tel: 86-24-82165750, E-mail: madesun6410@yahoo.com.cn