

体外培养细胞的加力实验装置

刘丽* 李乐乐 何福明

(浙江大学医学院附属口腔医院 杭州 310006)

摘要 机械力对细胞生物学行为的影响是目前细胞生物学和细胞力学研究的一个重要课题。体外分离细胞和加载培养技术是细胞力学的基础之一和目前细胞力学研究的重要方法。大致可分为离心力加载、流体加载、单细胞加载、压力传导加载和基底形变加载技术。

细胞力学是现代生物力学发展的前沿领域。涉及到载荷下细胞、细胞膜、细胞骨架的变形,弹性常数、黏弹性、黏附力等力学性能的研究;以及力学因素对细胞黏附、铺展及生长、分化等生物学行为的影响。细胞力学研究的基础和关键是细胞加载技术。由于体内环境异常复杂;人体细胞的大小在十几到几十个微米之间,细胞膜的厚度仅有几个纳米到几十个纳米,常规的宏观力学加载方法和实验技术无法直接使用。因此,体外分离细胞和建立合适的加载培养模型是细胞力学面临的首要问题。早在1939年,Glucksmann在体外培养细胞的力学加载研究方面,进行了开拓性的研究。他将鸡胚胎的胫骨内膜细胞培养在成对的肋间肌基质上,当肌肉萎缩牵引肋骨相互靠近时,离体培养的细胞即受到了压力的作用。经过多年改进和发展,已研制出多种体外培养细胞的加力装置。大致可分为离心力加载、流体加载、单细胞加载、压力传导加载和基底形变加载装置。

1. 离心力加载

将体外分离得到的细胞定量计数后,悬浮于一定浓度的培养液中,再将细胞悬液转移至离心机上低速离心,培养液中的悬浮细胞即受到离心力、重力以及与培养液相对移动所产生的摩擦力等三种力的综合作用。在离心过程中细胞悬浮于基质中,细胞与细胞之间、细胞与基质之间未发生附着。而目前已知细胞之间、细胞与基底之间的附着存在信息传导,与细胞膜上蛋白质和细胞骨架的分布密切相关,影响细胞的功能状态。无附着的悬浮细胞虽然受到力的作用,但不能真正反映细胞的生理状态^[1]。

2. 流变学加载技术

研究表明,机体细胞接受剪切应力刺激、产生系列生化反应,对维持细胞、组织乃至整个机体的正常生理状态有重要意义。流动小室加载技术是根据流变学原理研制的加载装置。其基本原理是利用流动的培养液对附着于培养基质上的细胞产生剪切力。

这种加载方式对细胞产生整体作用,适合于观察、测量大量细胞与基底的黏附特性^[2]。

平行平板流动室是常用的一种流动小室技术。核心部分如图1所示是一个高度 h 远小于横向宽度 b 和纵向长度 L 的扁平流动腔室,由不同高差的静水压提供恒定的剪切力,或由激活泵提供瞬态剪切力使流入管和流出管之间产生压差,使流动室内的细胞受到均匀或脉动的剪切力作用。切应力的 τ 大小通常使用计算公式: $\tau = 6\mu Q/bh^2$ 。式中 τ 表示腔底切应力, μ 为流体黏度, b 和 h 分别为流动腔底宽度和高度。为减少计算误差,一般要求流动腔高度取0.025cm,最大流量30-40ml/min;并仅适用于腔内均匀流动区域,入口和出口附近使用此公式误差较大。柳兆荣等详细讨论了端点条件对平行平板流动室腔底部切应力的影响情况,指出端点条件的影响只局限在离开腔室约腔室宽度的区域内,这对于分析流动腔内细胞的力学行为和讨论切应力对细胞的影响有实际意义^[3]。由于该技术能保证细胞在受到不同水平恒流或生理剪切力的作用时仍保持与基底的黏附,是体外研究细胞受剪切应力作用下的力学特性和生物学反应的重要手段。主要应用于血管内皮细胞的体外加载实验,在体外模拟血管环境,研究剪应力对血管内皮细胞损伤、白细胞粘附与血管壁疾病等的关系。Nguyen等使用平行平板流动室对人脐静脉内皮细胞和微血管内皮细胞进行加载,证明了流体剪切力可抑制内皮细胞凝血酶受体基因的表达^[4]。McAllister等在对骨髓来源的破骨细胞样细胞进行加载研究时,也使用了平行平板流动室技术^[5]。

常用的平行平板流动室是矩形边界的流动室,无法模拟血管分叉及弯曲处的流体流动。Chiu和Truskey等在平行平板流动室技术的基础上,改进

本课题受国家自然科学基金(No. 30271427)资助。

* 负责人。E-mail: yjing@mail.hz.zj.cn

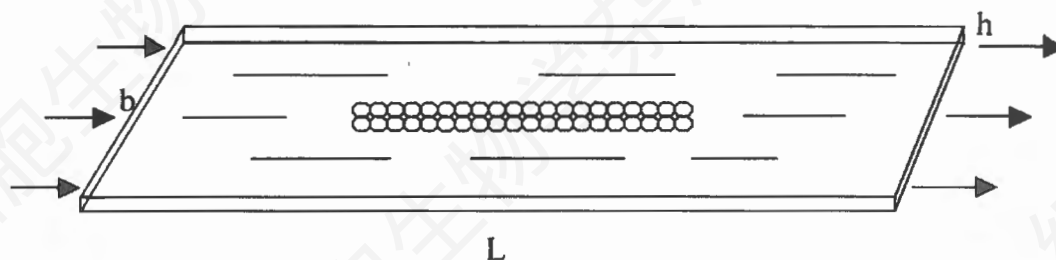


图1 平行平板流动室

制成了垂直梯流动室,成功地模拟了流体分离、波动切应力及较大范围的切应力梯度^[6,7]。

另一种流体加载技术是锥板流室技术。Dewey等进行血管内皮细胞、红细胞力学性能实验时,使用的锥板流室装置如图2,是由一个 $0.5^{\circ}-3^{\circ}$ 的透明锥板、平板以及倒置显微镜等部件组成。透明锥板和平板以相同速度作相反方向的运动,使培养在透明锥板和平板之间的细胞相对地面处于准静止状态。保持锥板和平板的速率不变,可获得稳定的层流,使培养细胞受到稳定、均匀、较大范围的剪切应力^[8]。因为锥板的角速度很小,可认为锥板工作区内剪应力处处相等。工作区内细胞所受的剪应力为: $\tau=3M/2\pi R^3$,式中 R 为锥板半径,扭矩 M 可测量获得。Langile等则如图3使用了两块平板,制作了旋转平板和静止平板间产生剪切应力的板-板流室^[9]。李绵洋等研究剪切力活化血小板的作用机制,使用的是一种改制的锥板黏度计^[10]。与平行平板流动室相比,锥板流室内的液体是通过锥体的转动而产生被动流动,培养基难以进行外部循环。

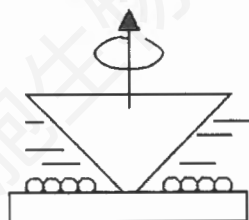


图2 锥板流室

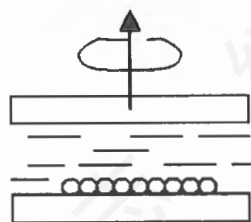


图3 板-板流室

3. 单细胞加载技术

单细胞加载实验技术主要有微管吸吮技术、探

压技术和磁-受体偶联加载技术等。其中技术上比较成熟,使用比较多的是微管吸吮技术。微管吸吮技术系统包括微吸管、显微操作器、倒置显微镜、负压加载系统、磁带实时记录系统、图像处理仪和计算机组成。微吸管是外径为几个毫米的特制空心玻璃管,加载时利用显微操作器与细胞表面轻轻接触,开启负压加载系统使细胞在阶跃负压作用下,在微吸管内产生一个帽状变形,通过磁带实时记录系统进行记录,由图像处理仪和计算机作图像处理和数值计算。微管吸吮借助显微技术,在直视下对单个细胞进行加载,虽较为精确但只能观察单细胞或细胞对的相互作用,无法同时进行大量细胞的观察和检测。张西正等利用微管吸吮技术观察人、Wistar大鼠、昆明小鼠成骨细胞在负压作用下的变形,把成骨细胞简化为标准黏弹性固体,通过相应的力学计算和计算机图像处理,获得成骨细胞的黏弹性^[11]。

对单个细胞的加载还可采用探压技术。探压装置中探针的一端与单个细胞接触,另一端通过悬臂梁与步进电机相连。当步进电机上下垂直运动时,探针就会挤压细胞,细胞由于变形而产生的阻力通过悬臂梁的变形被精确地测量出来,从而得到细胞的形变与所受应力的关系^[12]。

最新的一种单细胞加载方法是磁-受体偶联加载技术。Wang等通过磁场作用于特异性结合在细胞表面受体的微磁球,对细胞进行加载。它是用一种微米级的磁性微球,在其表面包裹上某种抗体或蛋白质分子,然后使磁球与细胞膜上的受体结合,在原磁场的垂直方向,再加上一个均匀弱磁场使磁球旋转。当磁球旋转时,如果受体与细胞骨架连接在一起,则细胞骨架就会对磁球旋转产生阻力。只要测量磁球所产生的磁场力的变化,就可定量获得细胞内部的力学参数^[13]。

4. 压力传导加载

压力传导加载是常用的加载方法。通常使用气体或液体作为传导介质,通过以下方法进行加载:(1)抽真空产生负压使培养室内的细胞受压;(2)如

图4向密闭的培养室内注入二氧化碳和空气,或氮气、二氧化碳和空气的混合气体,或氮气、氮气和压缩空气的混合气体使培养室内的细胞受压;(3)如图5由水柱产生的静水压力作用于培养室内的细胞。Rubin等应用气体密闭培养室注入1.37个大气压的氧气和二氧化碳混合气体,有效地抑制了鼠破骨细胞募集^[14]。邢东明等研究压应力对体外培养软骨细胞产生细胞因子的影响,是利用气相静压力装置对原代软骨细胞施压^[15]。这种加载装置设备简单,操作方便,易于传递载荷且细胞受载均匀,应用较为广泛。但由于细胞置于一个密闭环境中,随着细胞增殖、代谢,该密闭环境中的氧分压、二氧化碳分压、pH值等指标都会改变。因此只能在相对比较短的时间内提供恒定的实验条件,限制了长时间的实验观察。

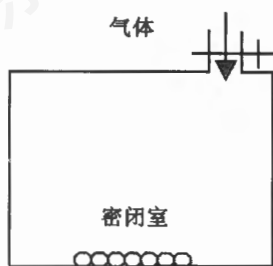


图4 气体密闭室

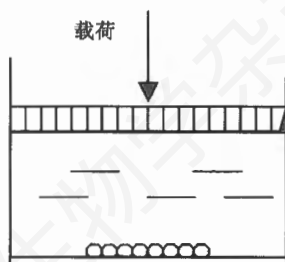


图5 液体密闭室

5. 基底形变加载

基底形变加载技术开始于弹性细胞培养膜的问题。以弹性膜作为基底材料,通过机械拉伸矩形基底,或利用气压、液压和机械接触引起弹性底面的形变,使附着于该底面的细胞受到牵张力,并可附加一些调节加力周期的机械装置。这种加载装置加力方式较为合适,且不限实验周期,目前是一种较为理想的实验装置。

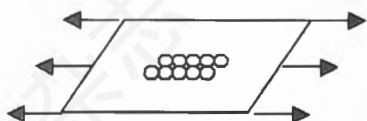


图6 矩形基底拉伸

Leung等早在1977年就如图6所示,使用马达驱动的活塞-联动装置拉伸矩形硬蛋白基底,使附着其上的细胞受到不同大小、不同周期的拉伸力作用^[16]。Ives等用弹性负载滑轮代替活塞-联动装置,使基底的受力更规则、更均匀^[17]。Carosi改进使用铰链-DC马达控制偏心杆使基底膜产生更为规则的位移^[18]。产生更为均匀拉伸力的是四点弯曲梁加载技术。Owan等采用一种可以控制梁的挠度和挠度变化率的四点梁,因为结构的对称性,梁的两个力作用点之间处于等弯区,梁在该区域的应力处处相等^[19]。李小彤等体外加力培养人牙周膜细胞,使用的是一种矩形基底膜拉伸装置,由低速马达带动凸轮,推动动杆,使附着膜受到间歇机械牵张力^[20]。

圆形基底的拉伸如图7所示,在基底膜与基座之间的封闭腔中注入液体或气体产生压力达到基底变形,通过调节压力大小来改变弹性底面的垂直形变量,最终控制细胞受力的大小。Brighton制作了一套液体加载实验装置,以Pellthanc2363-80AE作为基底培养膜,用泵注入液体产生压力,使薄膜向上凸起发生弯曲变形,产生双向应变^[21]。Gilbert使用的是Flexcell公司生产的Flexcell加载装置,其中专门生产的柔性细胞培养板的亲水性基底膜表面可达到200%的延伸率。通过计算机监控系统控制气体流入速率,从而调节气压产生的膜形变^[22]。邹淑娟等观察机械张力对人成骨细胞TGF- β 基因表达的影响,使用的也是Flexcell装置^[23]。

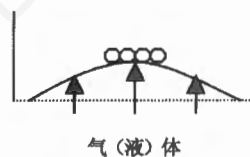


图7 气(液)压圆形基底拉伸

Vandenberg和Soma采用的圆形基底加载装置并未利用气压或液压,而是如图8通过一根与基底膜接触的压杆或顶杆。机械牵动压杆或顶杆使基底膜产生向下或向上的变形,使细胞受到拉伸作用^[24, 25]。Banes等则如图9所示,利用封闭腔抽真空产生的负压使弹性基底膜发生形变^[26]。

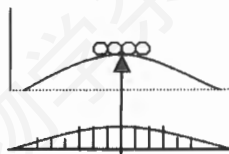


图8 机械接触圆形基底拉伸

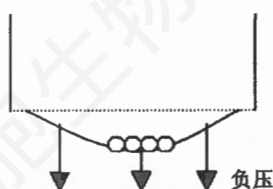


图 9 真空圆形基底拉伸

国际上,生物力学目前最热的领域是应力(主要指机械应力)作用下细胞的响应,特别是与细胞生长和重建有关的研究。这些研究正不断向纵深发展,探索包括环境应力如何传递至单个细胞,应力信号如何被细胞感受,又如何转换到 DNA 水平的基因调节,并最终导致代谢、分泌、粘附状况的变化等问题。这些是生物力学(细胞力学)尚未完全明了的基础性内容,同时也是组织工程学的重要基础。体外分离细胞和加载培养技术的发展,使我们能够对细胞力学行为进行更为深入的研究。对于实验技术而言,无论是手段、方法和原理都有待进一步改进和完善。仍需对实验技术和方法不断进行革新,研制更合理、更完善的细胞力学实验装置,更好地模拟细胞的在体环境,以便更加精确、实时地测量加载时细胞的应力和应变,更加深入地认识和了解细胞的力学转导机理。

参 考 文 献

- [1] Beckerle M C, et al., 1990, *Cell Motil Cytoskeleton*, **16** (1): 7-13.
- [2] Gooh K J, et al., 1997, Mechanical forces: their effects on cell and tissues, TX, USA: Springer-Verlag, 4-4.
- [3] 柳兆荣等, 2001, 中国生物医学工程学报, **20**(2): 187-192.
- [4] Nguyen K T, et al., 2001, *Ann Biomed Eng*, **29**(2): 145-152.
- [5] McAister T N, et al., 2000, *Biochemical and Biophysical Reseach Commun*, **270**(2): 643-648.
- [6] Chiu J J, et al., 1998, *J Biomech Eng*, **120**(1): 2-8.
- [7] Truskey G A, et al., 1995, *J Biomech Eng*, **117**(2): 203-210.
- [8] Dewey C F, et al., 1981, *J Biomech Eng*, **103**(3): 177-185.
- [9] Langille L B., 1984, *Biorheology*, **21**(3): 333-346.
- [10] 李绵洋等, 2002, 中华医学杂志, **82**(4): 267-270.
- [11] 张西正等, 2002, 北京生物医学工程, **21**(1): 40-42.
- [12] Zahalak G L, et al., 1990, *J of Biomechanical Engineering*, **112**: 283-294.
- [13] Wang N, et al., 1993, *Science*, **260**(5111): 1124-1127.
- [14] Rubin J, 1997, *J Cell Physiol*, **170**(1): 81-87.
- [15] 邢东明等, 2001, 解剖学报, **32**(4): 385-387.
- [16] Leung D Y, 1977, *Exp Cell Res*, **109**(2): 285-298.
- [17] Ives C L, 1986, *In Vitro Cell Dev Biol*, **22**(9): 500-507.
- [18] Carosi J A, et al., 1992, *J Cells Physiol*, **151**(1): 29-36.
- [19] 李小彤等, 2002, 中华口腔医学杂志, **37**(2): 135-138.
- [20] Owan I, et al., 1997, *Am J Physiol*, **273**(3 Pt 1): C810-815.
- [21] Brighton C T, et al., 1991, *J Bone Joint Surg Am*, **73**(3): 320-331.
- [22] Gilbert J A, et al. 1994, *J Biomech*, **27**(9): 1169-1177.
- [23] 邹淑娟等, 2002, 现代口腔医学杂志, **16**(3): 214-215.
- [24] Vandenburg H H, et al. 1991, *J Biomech*, **24** (Suppl 1): 91-99.
- [25] Soma S, et al., 1997, *Arch Oral Biol*, **42**(3): 205-211.
- [26] Banes AJ, et al., 1985, *J Cell Sci*, **75**: 35-42.

地球外空间环境引起植物变异的研究进展

刘 敏* 薛 淮 潘 毅 张纯花 张文利

(中国科学院遗传与发育生物学研究所 100101 北京)

摘 要 空间诱变育种是近年来迅速发展起来的空間生命科学研究领域,由于空间环境具有超真空、微重力、宇宙射线、宇宙磁场以及超洁净的特殊条件,使植物在空间环境中发生了目前地面尚不能模拟的变化。本文将近年来在返回式地面卫星、神舟飞船和俄罗斯和平号空间站搭载的种子进行的细胞学、生理学以及 RAPD 分子检测等方面的研究工作进行了初步总结,目前该领域中还有许多问题有待进一步深入探讨。

植物空间诱变育种是近年来迅速发展起来的集航天技术、生物技术与农业育种技术相结合的空间生命科学领域。空间环境是空间科学研究的一个特

殊的重要领域,其具有超真空、微重力、宇宙射线、宇

* 联系人。E-mail: mliu@genetics.ac.cn