

低强度次声对体外培养的骨样细胞骨架蛋白 F-actin 表达的动态影响

王 斌¹ 陈景藻¹ 牟 翔¹ 刘 静¹

摘要 目的:探讨 4Hz/100dB、12Hz/100dB、20Hz/100dB 的次声作用后,小鼠成骨样细胞 MC3T3 的细胞骨架 F-actin 表达的改变。方法:将 MC3T3 接种于细胞玻片上,并分为对照组和 4Hz/100dB、12Hz/100dB、20Hz/100dB 的次声暴露组。对照组无次声输出,其他各组接受次声作用 30min/d。第 3d 于暴露后 2h、4h、8h 不同时间,对细胞进行 F-actin 的免疫荧光染色,应用激光扫描共聚焦显微镜,观察细胞 F-actin 的表达改变,测定单个细胞 F-actin 的平均荧光强度。结果:对照组细胞大部分荧光物质呈弥漫状态,胞膜荧光较强,胞浆内少量肌动蛋白纤维丝,方向不规则,长短不一;不同频率次声作用后 2h,各次声作用组均可看到胞浆中微丝 F-actin 明显粗大纤长,荧光物质大多为较长的粗大应力丝,沿细胞纵轴排列较多,其中 20Hz/100dB 组的荧光强度增强较对照组具有显著意义($P<0.05$);在次声作用后 4h 和 8h,次声作用组的细胞 F-actin 仍处于较高表达状态,其中 12Hz/100dB 组和 20Hz/100dB 组的荧光强度增高较对照组具有显著意义($P<0.05$)。不同频率次声作用组细胞的 F-actin 变化趋势较一致,各组在各时间点未见明显差异($P>0.05$)。结论:4Hz、12Hz 和 20Hz 的 100dB 的次声作用 30min/d 后,可诱导 F-actin 表达的增强,这种改变在 8h 后仍未见减弱。

关键词 次声;小鼠成骨样细胞;聚合态肌动蛋白;激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号:R49,R681 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-03-0197-03

The effect of low intensity infrasound on filament F-actin of osteoblast MC3T3 cells in vitro/WANG Bin, CHEN Jingzao, MU Xiang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(3): 197—199

Abstract **Objective:** To study the alterations in expression of F-actin of osteoblast MC3T3 exposed by low intensity infrasound. **Method:** After the primary MC3T3 were cultured on coverglass, the cells were divided into four groups. Cells in experimental groups were exposed by infrasound with output intensity of 100dB and frequency of 4Hz, 12Hz and 20Hz individually for 30min/d. The cells in control group were managed in the environment as experimental groups but without infrasound output. Laser scanning confocal microscope was used to examine the changes of F-actin after immunofluorescent staining and the photos were taken for further analysis of the cells' average fluorescence by spectrofluorometric quantification. **Result:** In control group, most fluorescein-labelled substance was in diffusion states. Less actin filaments were tenuous and short without direction. Correspondingly F-actin in the cells of experimental groups was thick and long and showed in longitudinal arrangement at the 2nd hour after exposure. The intensity of fluorescence was significantly increased in 20Hz/100dB group ($P<0.05$). More F-actin expression in experimental groups were being kept obviously increasing in 12Hz/100dB group and 20Hz/100dB group than the control at the 4th hour and 8th hours after infrasound exposure ($P<0.05$). However, there was no significant difference in F-actin expression between the experimental groups ($P>0.05$). Anyway cells in experimental groups showed synchronous changes. **Conclusion:** F-actin expression can be increased in osteoblast MC3T3 exposed 30min/d by low intensity infrasound with output intensity of 100dB and frequency of 4Hz, 12Hz, 20Hz. The expression increasing of F-actin still can be founded at the 8th hour after exposed under the low intensity infrasound.

Author's address Dept. of Physiotherapy and Rehabilitation Medicine, Xijing Hospital, Xi'an, 710032

Key words infrasound; osteoblast MC3T3; F-actin; laser scanning confocal microscope

近年对次声生物学效应的研究逐渐增多,较高声压级的次声较长时间的作用可对中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统、听觉系统、生殖系统及多种器官产生不良影响^[1]。

本文作者报道低强度次声对体外培养的成骨样细胞的增殖分化的影响,发现 100dB 的次声波 30min/d 的作用可以促进体外培养的成骨样细胞 MC3T3 的增殖和分泌功能^[2]。一般认为细胞外基质-

整合素-细胞骨架轴是细胞感受机械信号并将其转化为生化信号的主要途径^[3-5]。推测次声作为力学的信号能够导致这种效应,其细胞内的转导途径还可能与细胞骨架有关。微丝骨架是细胞骨架的一种,与维持细胞形态、参与细胞分裂、细胞运动、细胞内物

1 第四军医大学西京医院康复医学与理疗科,西安,710032

作者简介:王斌,男,博士,讲师

收稿日期:2006-06-26

质转运及信号转导等多种细胞功能密切相关。本实验观察了不同频率参数的次声暴露后 MC3T3 小鼠成骨样细胞中 F-actin 表达的改变, 探讨低强度次声促进成骨细胞功能的细胞内的转导途径。

1 材料与方法

1.1 次声设备

次声压力仓系统及次声检测系统由第四军医大学与航天工业总公司及中科院声学所协作研制。次声压力仓系统包括低频信号发生器、功率放大器、电动扬声器及仓体。检测系统主要包括次声传感器和次声信号数据采集分析系统。

1.2 仪器及试剂

α -DMEM 细胞培养基(美国 Gibco 公司)、培养板(Costar 公司)、异硫氰酸荧光素-鬼笔环肽(FITC-phalloidin, Sigma 公司)、碘化丙啶(PI, Sigma 公司)、激光扫描共聚焦显微镜(LSCM, Bio-Rad 公司)、倒置荧光显微镜(Carl Zeiss 公司)。

1.3 细胞培养及分组

利用已建株的小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 (第四军医大学生化教研室提供), 作常规培养, 在对数生长期按 2×10^4 个细胞/孔接种于预先放置细胞玻片的 24 孔培养板中, 分为对照组和 4Hz/100dB, 12Hz/100dB, 20Hz/100dB 的次声作用组, 共 4 组。次日细胞贴壁状态稳定后进入次声仓内作用 30min/d, 对照组无声波输出。实验前将次声仓严格消毒。每次次声作用结束后把细胞放回细胞孵箱, 第 3d 次声作用后在不同时间点检测细胞样本。各组细胞共分 3 个时间点, 即次声作用后第 2、4、8h 等。每个时间点 6 孔细胞标本。

1.4 FITC-phalloidin 和 PI 的双标染色及定量分析

在不同的时间点取细胞玻片; 4%多聚甲醛室温下固定 30min; 0.01M PBS 清洗 3min $\times$ 2 次; 0.2%tritonX-100 室温下渗透 10min; 0.01M PBS 清洗 3min $\times$ 2 次; 加入 FITC-phalloidin 5 μ g/ml 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min; 0.01M PBS 清洗 3min $\times$ 2 次; 加入 PI 20 μ g/ml 30min; 0.01M PBS 清洗 3min $\times$ 2 次; 50%甘油封片, 避光待检。LSCM 激发 FITC 产生绿色荧光、PI 产生红色荧光(细胞核衬染)。观察记录细胞图像, 用 LSCM 自带软件测定图像中单个细胞的 FITC 荧光强度值(每一组细胞玻片标本任选 6 个边界形态清楚的细胞测定取平均值)。

1.5 统计学分析

所得各组细胞荧光强度测定值用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行多组间 P 检验

(Paired Samples T test P), $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 对照组细胞各时间点 F-actin 显色

对照组未经次声作用的 MC3T3-E1 细胞固定染色后, 在激光共聚焦显微镜下观察, 可见 F-actin 呈绿色荧光, 大部分荧光物质呈弥漫状态, 细胞形态呈圆形、梭形或多边形, 界限清楚, 胞膜荧光较强, 胞浆内可见少量肌动蛋白纤维丝, 方向不规则, 长短不一, 部分细而短小, 部分呈网状, 较长的可横贯细胞, PI 衬染的细胞核呈红色, 外观呈圆形(图 1, 见前置彩色插页 8)。对照组不同时间点的细胞之间 F-actin 阳性荧光染色强度无明显差异 (P 值分别为 0.831, 0.944 和 0.854)。

2.2 实验组细胞各时间点 F-actin 显色

次声作用结束后 2h, 细胞形态未见明显变化, 也呈圆形、梭形或多边形, 界限清楚, 胞浆 F-actin 微丝明显粗长, 荧光物质大多为较长的粗大应力丝, 沿细胞纵轴排列较多, 小部分呈网状交叉排列, 少量呈弥漫状态(图 2, 见前置彩色插页 8)。各次声作用组细胞的 F-actin 表达量及荧光强度增加, 但 4Hz/100dB 组和 12Hz/100dB 组与对照组比较没有显著性意义(P 值分别为 0.074 和 0.124), 仅 20Hz/100dB 组荧光强度显著增高($P=0.018$)。

在次声作用结束后第 4h 和第 8h 时间点上, 不同频率的三组细胞的 F-actin 均处于高表达状态(图 3, 见前置彩色插页 8), 但 4Hz/100dB 组与对照组比较未有显著差别(P 值分别为 0.062 和 0.059); 12Hz/100dB 组和 20Hz/100dB 组较对照组比较显著增高(P 值分别为 0.046, 0.033, 0.009 和 0.031)。

而各不同频率次声作用组之间在各时间点上变化趋势较为一致, 差别均不明显。次声作用后第 2h 时间点, 各实验组之间相比, P 值分别为 0.901, 0.649 和 0.809; 次声作用后第 4h 点, 各实验组之间相比 P 值分别为 0.854, 0.911 和 0.985; 次声作用后第 8h 点, 各实验组之间相比 P 值分别为 0.808, 0.753 和 0.977。各组细胞在不同时间点的荧光强度值见表 1。

表 1 各组细胞在不同时间点的荧光强度值 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	2h	4h	8h
对照组	80.2 $\pm$ 19.8	82.6 $\pm$ 24.7	79.7 $\pm$ 23.5
4Hz/100dB 组	125.4 $\pm$ 32.7	127.0 $\pm$ 30.5	121.7 $\pm$ 36.2
12Hz/100dB 组	127.7 $\pm$ 44.4	130.2 $\pm$ 31.8 ^①	127.9 $\pm$ 30.1 ^①
20Hz/100dB 组	132.4 $\pm$ 26.2 ^①	129.8 $\pm$ 31.4 ^①	127.6 $\pm$ 28.8 ^①

①与对照组比较 $P < 0.05$

3 讨论

细胞骨架体系是细胞中的重要组成部分, 细胞

骨架有三种基本的结构包括微丝、微管和中间丝。细胞骨架结构与细胞膜及核膜上的蛋白脂质分子相连接, 维持细胞形态并参与细胞运动、分裂等多种功能, 是跨膜力学信号传递的结构基础, 也是细胞赖以生存、分化和生长的重要内部环境基础。Actin 在胞内以聚合态 F-actin 和游离态 G-actin 两种状态存在。G-actin 为单体分子球形蛋白, 溶于胞浆, F-actin 呈纤维状, 是构成细胞骨架的主要部分, F-actin 具有更为明显的生物学功能。微丝由双股的 F-actin 螺旋式组装而成。正常情况下细胞内的两种 actin 处于平衡状态, 当受一定的力刺激后, 细胞内游离的 G-actin 彼此结合形成 F-actin, 进而通过自身螺旋形成微丝, 此过程即细胞骨架重排。应用激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 为 F-actin 的图像分析和定量分析提供了可能^[6]。细胞受机械应力刺激后, 可以引起结构和功能等多方面的改变^[7-9]。次声是一种以震荡的方式传播的机械波, 次声作用于细胞可产生一种近似于机械拉伸的应力, 这种力学信号可能会通过细胞外基质-整合素-细胞骨架的途径转导产生相应的生化效应。

实验中小鼠成骨样细胞 MC3T3 细胞接种于盖玻片上, 细胞充分黏附伸展, 状态良好, 干扰因素少, 能比较准确地反映低强度次声作用后细胞骨架的改变。不同频率的实验组细胞在次声作用后 2h, 可观察到细胞微丝明显变粗变长, 数量增多, 荧光增强, 表明 100dB/30min 的低强度次声作用后, 细胞骨架发生了重排, F-actin 表达增加, 细胞骨架感受了次声信号的传导并发生了显著改变, 与 Franke 报道剪切力引起细胞中央出现方向排列整齐的束状应力纤维的细胞骨架改变的结果相类似^[10]。Olkawa 等发现微丝的重组出现在形态变化之前, 认为剪切力引起内皮细胞形态变化是微丝重组的结果, 应力纤维的长度粗细随剪切力水平的提高和作用时间延长而增加^[11]。在次声作用后 4h 和 8h 的时间点上, 细胞的 F-actin 仍处于较高表达状态, 推测随着作用后时间的延长 F-actin 表达会逐渐减少。

细胞骨架和细胞的功能状态密切相关, 低强度次声作用后成骨细胞的细胞骨架的这种改变与细胞的多种功能改变相关, 并可使机体组织产生进一步的生物学效应。结果提示低强度的次声作用可引起细胞骨架的改变, 可能是低强度次声波的生物学效应的可能机制。

本观察发现的 4Hz 和 12Hz 组的增高没有显著性意义的原因可能由于样本量偏小, 以及个别样本的数值变异较大。

在本结果中, 虽然 4Hz/100dB 的次声作用在结束后各时间点未见显著性意义的增高, 但各不同频率之间未发现造成体外培养的成骨样细胞 MC3T3 的 F-actin 表达增强的差异性, 即未发现低强度次声的效应具有频率的特异性, 与本文作者报道同样 100dB 声压级 30min/d 作用时间时, 4Hz 和 12Hz 能较明显促进细胞增殖, 而 20Hz 更明显促进细胞成熟分泌的结论有差异^[2]。其原因尚需进一步研究分析。另外, 值得强调的是体外培养细胞的研究结果和在体实验结果也可能存在一定差异。

在机体内, 成骨细胞是通过胞体上的许多细长突起部分, 经过缝隙连接相互连接成网状胞体联合, 通过这样的网状胞体联合感受骨质中的应力变化和骨质中组织液流体力学变化, 从而启动骨组织的重建, 调控骨的生成^[12]。胞体联合的感受频率和体外培养时的单个细胞的感觉频率是有所差别的。

其次, 骨质疏松的发生主要是成骨细胞和破骨细胞之间平衡失调的结果, 但不仅是骨的重建和吸收的问题, 在成骨细胞和破骨细胞之间的调节除了骨保护蛋白 (osteoprotegerin, OPG)/核因子 κ B 受体性活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 的途径外, 可能还涉及到自身免疫因素的参与。因此, 单纯从体外培养成骨样细胞的角度研究骨质重建, 可能与机体实际情况有所偏差。

参考文献

- [1] 陈景藻. 医药卫生科学技术进展[M]. 第 1 版. 北京: 军事医学科学出版社, 1997. 194—197.
- [2] 王斌, 陈景藻, 刘静, 等. 次声波对成骨样细胞生物学特性的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(25): 83.
- [3] Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton [J]. Science, 1993, 260(5111): 1124.
- [4] Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes [J]. J Bone Miner Metab, 1999, 17(1): 57.
- [5] Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain [J]. Calcif Tissue Int, 1995, 57(5): 344.
- [6] 赵启韬, 苗俊英. 激光共聚焦显微镜在生物医学研究中的应用[J]. 北京生物医学杂志, 2003, 22(1): 52.
- [7] Sims JR, Karp S, Ingber DE. Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape [J]. J Cell Sci, 1992, 103(pt4): 1215.
- [8] Meazzini MC, Toma CD, Schaffer JL, et al. Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro [J]. J Orthop Res, 1998, 16(2): 170.
- [9] Hughes-Fulford M, Lewis ML. Effects of microgravity on osteoblast growth activation [J]. Exp Cell Res, 1996, 224(1): 103.
- [10] Franke RO, Grafe M, Schnittler H, et al. Induction of human vascular endothelial stress fibers by fluid shear stress [J]. Nature, 1984, 307: 648.
- [11] Olkawa K, Sato M, Ohshima N. Time course changes in cytoskeletal structures of cultured endothelial cells exposed to shear stress [J]. Front Med Biol Eng, 1993, 5(2): 121.
- [12] Frost HM. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone cartilage and collagenous tissue organs [J]. J Bone Miner Metab, 2000, 18: 305.