生物医学工程学杂志
J Biomed Eng 2002; 19(2): 324- 328

离体培养细胞的力学实验方法*

白 灵[1] 樊瑜波[1,△] 张 明[2] 综述 陈君楷[1] 审校
1(四川大学 建筑与环境学院 生物力学四川省重点实验室,成都 610065)
2(香港理工大学 复康科技中心,香港九龙)

摘要 细胞力学是组织工程和细胞工程的基础之一,在细胞离体培养过程中对细胞施加不同的机械力以研究应力对细胞的影响是细胞力学的一个重要研究领域,也是细胞力学的重要研究手段。本文综述了离体培养细胞的力学实验方法,根据不同的载荷施加方式可分为:微吸管吸吮技术、压力载荷法、基底拉伸法和流体剪切法等,并指出了各种方法存在的利与弊。

关键词 细胞离体培养 机械力 细胞力学

Experimental Methods for Mechanically Stimulating the Cells in Vitro

Bai Ling[1] Fan Yubo[1,△] Zhang Ming[2] Chen Junkai[1]
1(*Biomechanics Laboratory, Sichuan University, Chengdu* 610065)
2(*Rehabilitation Engineering Centre, The Hong Kong Polytechnic University, Kowloon Hong Kong*)

Abstract Cellular mechanics is a branch of tissue engineering and cellular engineering. As one of the important method, loading different mechanical stimuli to culturing cells in vitro so as to study the influence that the stress has on the cells is one of the important fields of cellular mechanics. This paper reviews the experimental methods for mechanically stimulating the cells in vitro, according to the different loading modalities, the methods can be categorized into micropipette aspiration, compression loading, substrate distention, fluid shear, etc. And it also points out their advantages and disadvantages.

Key words Cells in vitro Mechanical force Cellular mechanics

1 前 言

细胞力学是组织工程和细胞工程的基础之一,常常要研究机械力对细胞形态变化及生长的影响。由于体内环境异常复杂,细胞的体外分离和培养技术是研究细胞生理、病理现象的一种重要手段,也是生物力学中迅速发展起来的前沿领域和目前细胞力学研究的重要方法。近年来有关生物组织应力-生长关系的研究表明,从器官、组织到细胞、亚细胞等各个层次上的生命运动都是在一定力学环境中进行的,应力与生长的关系在细胞水平上主要体现在两个方面:单个细胞的生物学行为,如增殖、形态变化和分泌功能等的响应;群体细胞组织化的整体行为响应,如血管内皮细胞收缩功能的增强、机械信号传导以及基因的表达等。机械力深刻影响着细胞/组织的生长、维持和重建,是细胞工程及组织工程的一个重要因素。

在离体培养细胞的力学实验方法研究领域,Glucksmann[1]进行了开拓性的研究,将鸡胚胎胫骨内膜细胞培养在成对的肋间肌基质上,当肌肉组织萎缩肋骨彼此靠近后,离体培养的细胞受到压力作用。Rodan等[2]用电磁阀产生的脉冲控制气动活塞装置对鸡胚胎长骨细胞凝胶体施加低值连续压力。多年来,经过不断的改进和发展,人们提出了多种离体培养细胞的力学实验方法,研制出不同类型和功能的实验装置,不仅可以定性地分析而且能定量地研究细胞的力学特性。本文综述了目前主要的细胞力学实验方法。

2 离体培养细胞的力学实验方法

根据不同的载荷施加方式,可将离体培养细胞

* 国家自然科学基金资助项目(39870231 19972043 19732003),教育部跨世纪优秀人才计划资助项目

△ 联系人 ybfan@mail.sc.cninfo.net

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的力学实验方法分为以下几类: 微吸管吸吮技术、压力载荷法、基底拉伸法和流体剪切法等。

2.1 微吸管吸吮技术

微管吸吮技术是目前研究细胞力学特性的主要方法之一,也是检测单个细胞或细胞对变形和黏附的重要手段,它通过测量在一定负压作用下细胞的变形及变形过程来研究细胞的力学特性;或者用双微管吸吮黏附在一起的细胞对,利用细胞的变形分析细胞间相互作用的力学问题。微吸管吸吮技术最早由 Mitchison和 Swann[3]提出,经过不断的改进,细胞显微操作技术在方法和实验精度上都有了较大提高。装置通常包括两套液压控制系统,一套用来精细控制微吸管的运动,另一套则控制吸管产生用以吸附细胞的微小负压。Miyazaki和 Hayashi[4]使用直线电机驱动显微操作器并用力传感器测量荷载,使细胞产生更接近生理状态的变形。

微吸管吸吮技术的优点是精度高,易于标定,重复性好;能够观察和控制细胞的黏附行为。其缺点是只能检测单个细胞或细胞对的相互作用,无法检测大量细胞的黏附特性;微吸管技术曾被认为是很精确的,但仍存在不少缺陷,如微吸管的内径和聚焦误差需要光学矫正且其锥度需要测定和补偿,被吸入膜的舌部折叠伪迹需要一个短时的压力才能取消等。

2.2 压力载荷法

压力载荷法是指在细胞离体培养过程中,模拟在体环境下组织间隙压力,研究在压应力作用下细胞力学特性的实验方法。产生压应力的方式包括间接加载法和直接加载法。

2.2.1 *气体、液体传导静压力的静压加压法*　该法如图 1a和图 1b所示,是常用的间接加载方法。可通过以下方式加载: (**1**)注射器抽真空产生的负压使培养室内的细胞受压。(**2**)在密闭的细胞培养室内注入 CO_2和空气或由 N_2、CO_2和空气组成的混合气体,或注入 N_2、氦气及压缩气体等,使培养室内的细胞受压。Imamura等[5]将 O_2、CO_2和 N_2组成的混合气体注入培养室内,用带压力传感器的电磁阀控制压力大小并用压力计进行监测。(**3**)由水柱产生的静水压力作用于培养室内的细胞。Parkkinen等[6]把牛关节软骨细胞密封在双层膜内并固定于培养皿中,将培养皿放入注满水的圆柱形培养室内,使细胞受到不同频率、不同大小的连续或周期性静水压作用。

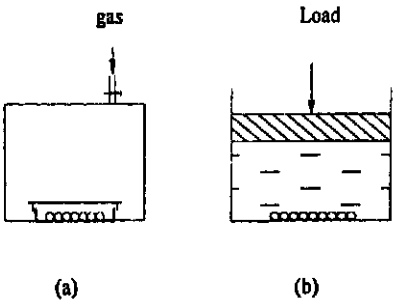

图 **1**　气体、液体静压加压法

(a)　气体静压加压;(b)　液体静压加压

Fig 1　**Gas liquid hydrostatic pressurization**

(a)　Gas; (b)　Liquid

气体、液体静压加压法的优点是设备简单;易传递载荷并且载荷的传递不依赖于培养物与基底的结合状态,使细胞受力均匀;易进行不同载荷条件下的重复实验。其缺点是将细胞置于一个密闭的环境中,随着细胞增殖和代谢,该环境中的 O_2、CO_2分压及 pH值等都会发生改变,不利于长时间的细胞力学实验。

2.2.2 *常用的直接加载法是压板接触法*　Sah等[7]采用如图 2所示的方法,使软骨细胞切片受单轴径向无约束静压和动态周期性压力作用。动压板的设计使切片在整个实验中都处于压板之间,即使在较高振幅的非线性荷载条件下,随着压力值的改变所有切片的直径变化也不大,动压由伺服控制的马达提供。此外,人们还采用其它方式进行加载,Burton-Wurster等[8]通过手动调节方式对软骨外植体施加静载或周期性无约束压力。Torzilli等[9]改用气动装置对软骨外植体施加无约束的单轴压力。Tanaka[10]用动力放大器驱动的压电传动装置产生低应变范围的单轴压力,并由激光位移表调节位移。

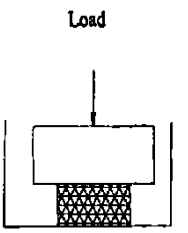

图 **2**　直接加载法 (压板)

Fig 2　**Direct loading(platen abutment)**

压板接触的优点是可以得到较大范围的试件变形,易形成与在体环境相类似的载荷条件;缺点是应

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

变的不均匀性,尤其是应变范围内泊松效应的不均匀性。

2.3 基底拉伸法

Leung等[11]使用如图 3a所示的方法,用马达驱动的活塞 联动装置使附着于矩形弹性硬蛋白基底上的细胞受到不同频率、不同大小的周期性拉伸。Ives等[12]使用弹性负载滑轮、缆绳代替活塞、联动装置,并使基底的几何形状更规则、更均匀。Carosi等[13]进一步改进,用铰链、/DC马达控制偏心杆使细胞附着的矩形弹性膜产生位移。Bottlang等[14]使用如图 3b所示方法,由电磁驱动矩形硅胶膜产生四点弯曲,并通过全息干涉进行测量,用光学实验论证了应变的各向同性。

Winston等[15]使用如图 4a所示方法,将空气或流量受控的流体注入膜下的封闭腔内,通过弹性膜底面的变形,使附着于膜上的细胞受牵张。Hasegawa等[16]使用如图 4b所示的方法,对凸形压板上的、细胞附着的弹性膜施加连续或间歇性拉伸,膜拉伸的程度随所用压板的曲率不同而变化。Hung和 Williams[17]使用如图 4c所示方法,利用摩擦较小的环形压板,由直流电机控制马达驱动压板产生位移,使弹性硅胶膜产生拉伸变形。这种方法的优点是可通过压板的无摩擦运动同时输入径向和周向应变。Vandenburgh[18]使用如图 4d所示方法,使具有球形尖端的压杆产生向上的脉冲运动,带动弹性橡胶膜产生位移,从而使膜上黏附的细胞产生牵张。这种方法的特点是径向和周向应变分布依赖于介质及膜的拉伸和压杆与膜的接触,且应变量与压杆的垂直位移有关。Banes等[19]使用如图 4e所示方法,利用真空产生的负压使塑性基底膜产生变形。

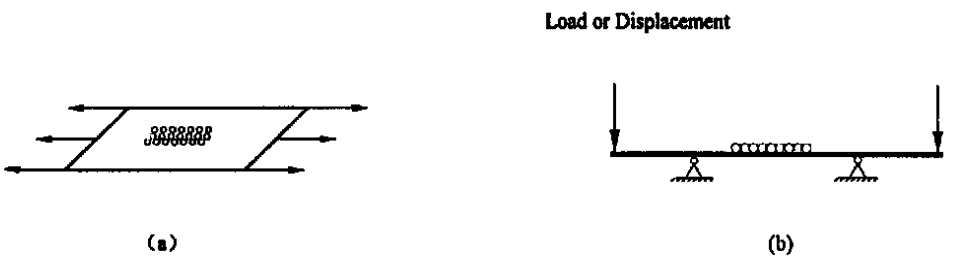

图 3 矩形基底的拉伸法

(a)单轴拉伸;(b)弯曲

Fig 3 Methods of rectangular substrate stretch

(a) Uniaxial tension, (b) Flexure

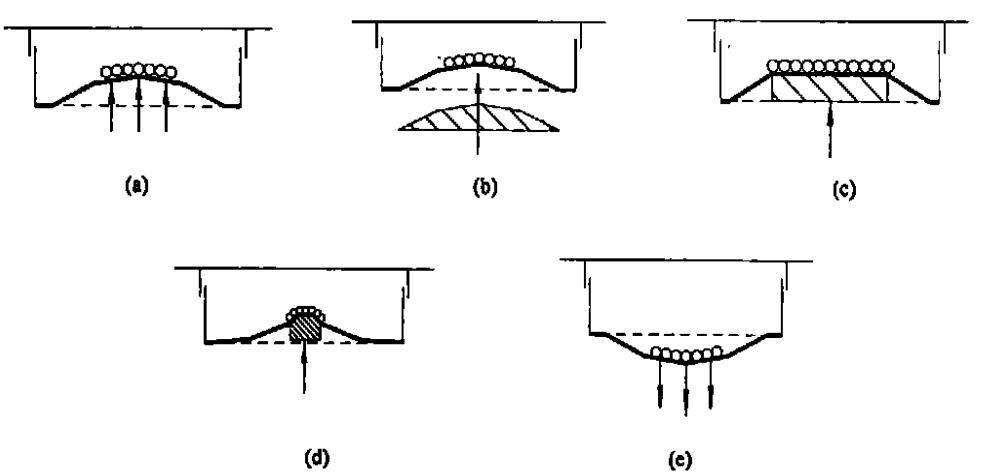

图 4 园形基底的拉伸法

(a) 流体位移;(b) 凸形压板位移;(c) 环形压板位移;(d) 压杆尖端位移; (e) 真空

Fig 4 Methods of circle substrate distention

(a) Fluid displacement, (b) Convex platen displacement, (c) Circle platen displacement, (d) Pin shape displacement, (e) Vacuum

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　流体剪切法

研究表明,剪切应力影响机体细胞对机械刺激信号的接收(例如,原生质膜感受器,离子通道,交互/焦点黏连,蛋白激酶信号)和生化反应(例如,细胞内的钙,一氧化氮,前列腺环素,细胞骨架重建),因此细胞所受的切应力对维持细胞、组织乃至整个机体正常的生理状态有重要意义。

由于平行平板流室(如图 5a所示)能保证细胞在受到不同水平的恒流或生理剪切力作用的同时仍然保持黏附,目前已成为人们研究离体培养细胞生物力学特性的重要手段之一。平行平板流室由具有不同高差的静水压提供不变的剪应力或由激活泵提供瞬态剪应力使流入管和流出管之间产生压差,为流体剪切速率提供动力,使细胞受均匀或脉动的剪切力作用。Levesque和 Nerem[20], Jacobs等[21]使用平行平板流室系统研究剪切应力对细胞形态功能的影响。为减小入口流效应, Heimeke等[22]设计的流室具有 T形部分,用来发展入口流,使流槽内产生充分发展的泊肃叶流,并用大视野的荧光光学系统进行图像捕获和重建。平行平板流室的优点是流室体积小,便于在显微镜载物台上实时观察、显示和记录;操作简便快速,能实现自动化控制。其缺点是在流室系统中很难分清切应力和静水压作用的影响并且必须要求有能够贴壁生长的细胞;流场的相似性不能保障,特别是在血管生理(脉动压力波形、振荡状态等)、几何结构(直径、长度直径比、锥度角等)、动力学参数(粘度、边界条件)等方面不能很好地模拟真实情况的流体动力学环境。在研究细胞黏附时,切应力对细胞产生整体作用,因此不能测量单个细胞与材料的黏附和脱附,只能用于测量大量细胞与基底材料的黏附特性。

Dewey[23]采用如图 5b所示的锥板流室系统研究流体剪切对细胞黏附特性的影响,能使培养的内皮细胞受较大范围剪应力,通过保持锥体转速不变获得定常层流。Schnittler等[24]设计的锥板系统,锥板均透明,可用相差倒置荧光显微镜进行观察,锥板的间距由测微计和复位齿轮调节,转速由微电机提供。Langille等[25]使用如图 5c所示的,在旋转板和静止板间产生剪应力的板-板流室。锥板流室的优点是锥表面角补偿由锥旋转产生的从中间至周边递增的径向影响,使细胞受均匀的剪切作用;通过改变锥角和转速,能取得较大范围的剪应力;加工或装配误差、尺寸等对实验精度影响较小。其缺点是培养室内的液体是通过锥体的转动而被动流动的,不能与外部循环,所以只能用来研究短时间内切应力对细胞黏附、变形和生长的影响。

其它还有如图 5d所示的圆柱管装置,如图 5e所示的径向流装置以及线性剪切应力流室和具有各种狭窄、膨胀度的流室等产生流体剪切应力的细胞力学实验方法,这里不再逐一进行详述了。

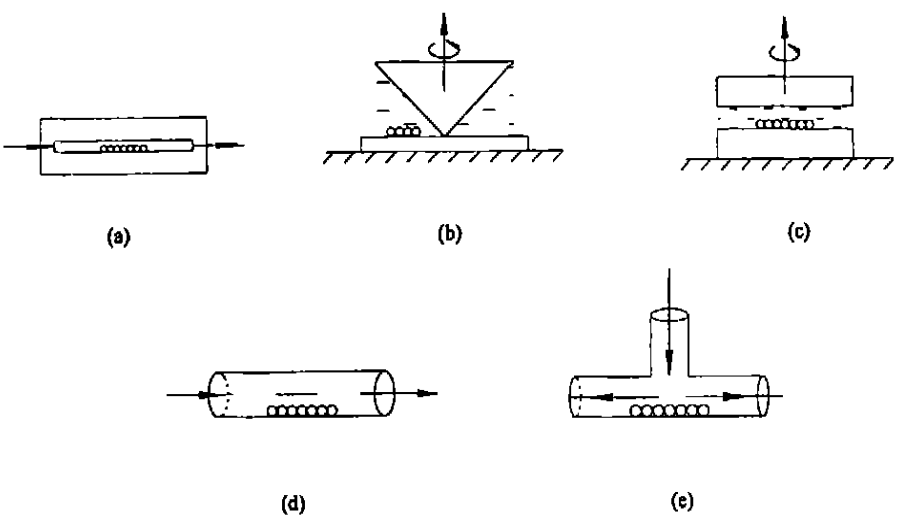

图 5　流体剪切法

(a)　平行板流室;(b)　锥板流室;(c)　板-板流室;(d)　圆柱管;(e)　径向流装置

Fig 5　fluid shear methods

(a) Parallel plate flow chamber, (b) Cone and plate flow chamber, (c) Disk-disk flow chamber, (d) Cyclindrical tube, (e) Radial flow device

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨 论

本文综述了现有离体培养细胞的主要力学实验方法。当前,细胞力学是生物力学研究中的前沿领域,而离体培养细胞的力学实验为研究机械力作用下细胞的力学特性提供了切实可行的方法。随着细胞体外分离和培养技术的发展、力学实验手段的不断更新,以及对细胞力学行为更深入细致地研究,人们更加认识到机体细胞的应力状态十分复杂,单独以某种力学实验手段很难反映细胞所处的全部力学状态及其响应,因此常常需要同时考虑几种力的复合作用,所以,在研究离体培养细胞的力学实验中,还需要对实验的技术和方法不断进行革新,尽可能地考虑各种应力、应变场对细胞的作用,研究出更合理、更完善的细胞力学实验方法,更好地模拟细胞的在体环境,以便深入地认识和了解机械力对细胞生命活动的影响。

参 考 文 献

1 Gluchsmann A. Studies on bone mechanics in vitro Ⅱ, the role of tension and pressure in chondrogenesis. Anatomical Record, 1939; 73: 39

2 Rodan GA, Mensi T, Harvey A. A quantitative method for application of compressive forces to bone in tissue culture. Calcified Tissue Research, 1975b; 18: 125

3 Mitchison JM, Swann MM. The mechanical properties of the red cell surface: I. The cell elastimeter. J Exp Biol, 1954; 31: 443

4 Miyazaki H, Hayashi K. Tensile property of fibroblasts from the rabbit patellar tendon. BIO 99: Cell and Tissue Engng I, II, III, IV, VBIO 99

5 Imamura K, Ozwawa H, Hiraide T, *et al*.. Continuously applied compressive pressure induce bone resorption by a mechanism involving prostaglandin E2 synthesis. J Cell Physiol, 1990; 144: 222

6 Parkkinen JJ, Lammi MJ, Inkinen R, *et al*. Influence of short-term hydrostatic pressure on organization of stress fibers in cultured chondrocytes. J Orthop Res, 1995; 13: 495

7 Sah RL, Kim YJ, Doong JYH, *et al*. Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. J Orthop Res, 1989; 7(5): 619

8 Burton-Wurster N, Vernier-Singer M, Farquhar T, *et al*. Effect of compressive loading and unloading on the synthesis of total protein, proteoglycan and fibronectin by canine cartilage explants. J Orthop Res, 1993; 11: 717

9 Torzilli PA, Grigiene R, Huang C, *et al*. Characterization of cartilage metabolic response to static and dynamic stress using a mechanical explant test system. J Biomech, 1997; 30: 1

10 Tanaka SM. A new mechanical stimulator for cultured bone cells using piezoelectric actuator. J Biomech, 1999; 32: 427

11 Leung DYM, Glagof S, Matthews MB. A new in vitro system for studying cell response to mechanical stimulation-different effects of cyclic stretching and agitation on smooth muscle cell biosynthesis. Exper Cell Res, 1977; 109: 285

12 Ives CL, Eskin SG, McIntire LV. Mechanical effects on endothelial cell morphology in vitro assessment. In Vitro Cellular and Dev Biol, 1986; 22: 500

13 Carosi JA, Eskin SG, McIntyre IV. Cyclic strain effects on the production of vasoactive materials in endothelial cells. J cell Physiol, 1992; 15: 29

14 Bottlang M, Simnacher M, Schmidt H, *et al*. A cell strain system for small homogeneous strain applications. Biomed Techn, 1997; 42: 305

15 Winston FK, Macarak EJ, Gorfien F, *et al*. A system to reproduce and quantify the biomechanical environment of the cell. J Appl Physiol, 1989; 67: 397

16 Hasegawa S, Sata S, Suzuki Y, *et al*. Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis. Calcif Tissue Int, 1985; 37: 431

17 Hung CT, Williams JL. A method for inducing equibiaxial and uniform strains in elastomeric membranes used as cell substrates. J Biomech, 1994; 27: 227

18 Vandenburgh HH. A computerized mechanical cell stimulator for tissue culture: effects on skeletal muscle organogenesis. In Vitro Cell Dev Biol, 1988; 24: 609

19 Banes AJ, Gilbert JL, Taylor T, *et al*. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro. J cell Sci, 1985; 75: 35

20 Levesque MJ, Nerem RM. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. J Biomech Engng, 1985; 107: 341

21 Jacobs DR, Yellowley CE, Davis BR, *et al*. Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells. J Biomech, 1998; 31: 969

22 Heimeke BP, Thakker DB, Goldman RD, *et al*. Spatiotemporal analysis of flow-induced intermediate filament displacement in living endothelia cells. Biophys J, 2001; 80: 184

23 Dewey CF. Efforts of fluid flow on living vascular cells. J Biomech Engng, 1984; 106(11): 31

24 Schnittler HJ, Franke RP, *et al*. Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells. Am J Physiol, 1993; 265(Cell Physiol, 34): C289

25 Langille BL. Integrity of arterial endothelium following acute exposure to high shear stress. Biorheol, 1984; 21: 333

(收稿: 2001-09-19 修回: 2001-10-22)

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net