

空间微重力环境对人牙髓间充质细胞的影响初探

张 锋^{1,2}, 邓旭亮², 梅 芳³, 王新知²

1. 武警北京总队第二医院口腔科, 北京 100037

2. 北京大学口腔医院, 北京 100081

3. 北京大学医学部解剖与组织胚胎学系, 北京 100083

[摘要] 通过实际空间搭载实验, 研究空间环境对人牙髓间充质细胞的影响。将人牙髓间充质细胞无源(细胞保存于密闭环境条件中, 没有细胞培养所需的 5% CO₂、37 °C、饱和湿度标准条件的适宜环境) 搭载长征 2 号飞船进入空间环境, 空间飞行时间为 17d, 返回地面后, 继续培养成活并传代, 观察其细胞骨架的改变。激光共聚焦显微镜观察显示: 空间实验组细胞骨架出现弥散性的变化, 局部微丝解聚。实验结果表明: 人牙髓间充质细胞经历空间飞行后可以继续成活, 并且细胞骨架发生了明显改变。

[关键词] 人牙髓间充质细胞; 空间环境; 细胞骨架

[中图分类号] R85

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)02-0034-04

Periminary Study on the Effect of Space Environments on the Human Dental Pulp Stroma Cells

ZHANG Feng^{1,2}, DENG Xuliang², MEI Fang³, WANG Xinzhi²

1. Department of Stomatology, The 2nd Hospital of Beijing Armed Police Force, Beijing 100037, China

2. School and Hospital of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China

3. Department of Anatomy and Histio-embryology, Peking University, Beijing 100083, China

Abstract: The effects of space environments on the human pulp stroma cells are studied by putting them into a real outer space environment. The human pulp stroma cells are put on board of a spacecraft for 17 days, and then are cultivated continually after they have returned to the earth. The changes of the cells cytoskeleton are observed under laser scanning confocal microscopy. The result shows that human pulp stroma cells can survive the spaceflight and the space environment can significantly alter the human pulp stroma cells cytoskeleton.

Key Words: human pulp stroma cells; space environments; cells cytoskeleton

CLC Number: R85

Documen Coder: A

Article ID: 1000-7857(2007)02-0034-04

近年来, 随着空间技术的发展, 国内外有关研究表明。空间环境可以改变动物细胞的生物性状和发育, 空间微重力环境可为细胞提供特殊的三维培养空间, 这为组织工程学研究提供了新的实验条件^[1], 因此, 空间组织工程应运而生。空间生物学近年来也取得了一些进展, 国内外学者对各种组织细胞进行了空间微重力研究, 但

在这一领域对牙齿细胞的报道较少, 尤其是对人类牙齿细胞的研究尚未见报道。本实验将人牙髓间充质细胞搭载宇宙飞船进入空间环境, 回收细胞后继续培养, 以探索其在经历空间环境后是否能够成活及细胞形态、功能、细胞骨架发生的改变。

收稿日期: 2006-12-14

基金资助: 国家自然科学基金科学部主任基金(3044008203)

作者简介: 张 锋, 女, 北京市西城区月坛北街丁 3 号武警北京总队第二医院口腔科, 主治医师, 主要研究方向为口腔修复学;

E-mail: zf3164@vip.sina.com

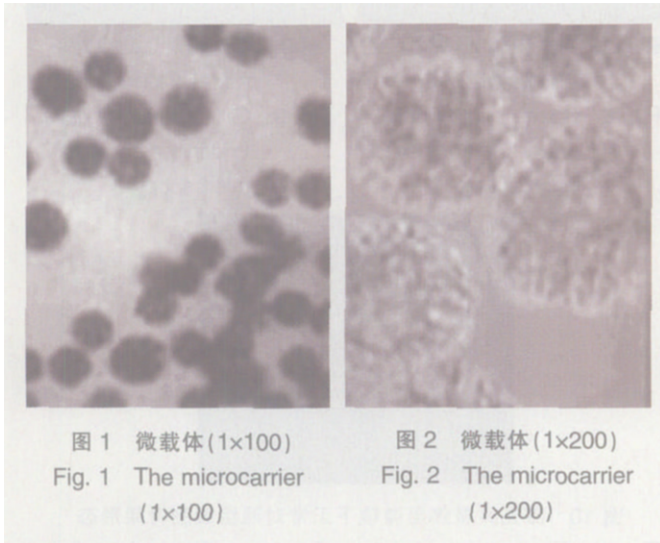
王新知(通讯作者), 女, 北京市海淀区中关村南大街北京大学口腔医院修复科, 教授, 主要研究方向为口腔修复学;

E-mail: xinzhang@sna.com.cn

1 材料和方法

1.1 实验材料

细胞来源于北大口腔医院因正畸目的而拔除的健康青少年的双尖牙(经患者同意),患牙无龋,无牙髓病变,无牙周病变。 α MEM 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清(Hyclone 公司)、HEPES(Sigma 公司)、胰蛋白酶(Sigma 公司)、青霉素钠、链霉素(华北制药股份有限公司)、细胞保护剂、微载体(见图 1, 图 2)及特制试管由中日友好医院惠赠。



1.2 实验仪器

实验仪器包括超净工作台(苏州安泰空气技术公司)、CO₂ 恒温培养箱(Forma 公司)、Labofuge 400R 型低温离心机(Heraeus 公司)、LD4-2A 型离心机(上海医用分析仪器厂)、电子天平(OHAUS)、光学显微镜(OLYMPAS 公司)、倒置相差显微镜(NIKON 公司)、数码照相机(OLYMPAS 公司)。

1.3 人牙髓间充质细胞的获得和培养

征得患者同意,将因正畸需要而拔除的健康年轻恒牙用含双抗的生理盐水冲洗后置于 α MEM 培养液中,离体后 4 h 之内送达实验室处理。在无菌操作间内,在无菌状态下劈开离体牙,将冠根髓组织取出,在培养液浸润下剪成 1 mm³ 大小的碎块均匀平铺于的 6 孔培养板中,加入 α MEM 培养液,放入恒温培养箱中(37°C, 5% CO₂),3 d 后小心换液,防止冲起组织块。约 14~21 d 后可看到组织块周围有细胞爬出。细胞贴壁后 5~7 d 铺满瓶底的 80% 时,即可进行传代培养。弃去原培养液,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 1 次,加入 0.25% 胰蛋白酶,倒置相差显微镜下观察,3~5 min 后可见大多数细胞已收缩近圆形时加入等量含血清的 α MEM 培养液终止消化。用尖吸管反复轻轻吹打培养瓶底壁,制成细胞悬液,离心 1 000 rpm×3 min。弃上清,加入含血清的 α MEM 培养液重新悬浮,以 1:3 比例传代,接种于新的培养瓶

中培养。选取第 4~5 代生长状态良好的细胞用于以下实验。

1.4 实验分组设置

实验分组设置见表 1。

表 1 实验分组设置 Table 1 Experiment groups			
空间飞行组		地面对照组	正常对照组
培养基	特殊培养液	特殊培养液	α -MEM 培养液加 DMSO
保存容器	特制试管(放入高品质保温杯中)	特制试管(放入高品质保温杯中)	冻存管
保存条件	空间环境	冰箱 4°C 及常温(昼伏夜出)	-196°C 液氮罐冰冻保存

1.5 人牙髓间充质细胞搭载飞船进入空间环境

人牙髓间充质细胞搭载长征 2 号返回式卫星于 2004 年 9 月 30 日发射升空,在空间飞行 17 d,返回地面 48 h 内将细胞取回实验室。

1.6 人牙髓间充质细胞返回地面后发生的形态改变

1.6.1 肉眼及倒置相差显微镜下观察空间及地面组细胞状态

观察试管中培养液颜色,然后将空间细胞及地面对照组细胞从特制试管转移至六孔板中,倒置显微镜下观察。

1.6.2 将空间组和地面组细胞复温,同时复苏冰冻保存的正常组细胞

将空间组细胞及地面对照组细胞更换条件培养液(原细胞升空前细胞培养液的上清液过滤后加入特殊培养液,比例为 1:5),置于 37°C,5% CO₂ 饱和湿度恒温箱中复温 24 h。与此同时,复苏冰冻保存的正常牙髓间充质细胞。

1.6.3 将 3 组细胞按常规培养并传代

1.6.4 细胞激光共聚焦显微镜观察罗丹明标记的细胞骨架。

激光共聚焦显微镜观察细胞骨架之前需先将细胞用罗丹明标记的鬼笔环肽染色,染色步骤:PBS 洗 3~5 min; PBS 稀释的 3.7% 的甲醛浸泡 10 min; PBS 洗 3~5 min; 0.1% Triton(PBS 配制)洗 5 min; PBS 洗 3~5 min; 1% BSA(PBS 配制)洗 30 min; PBS 洗 3~5 min; 10 μ l 罗丹明标记的鬼笔环肽混匀,室温避光处理细胞样品 20 min; PBS 洗 1 次 5 min; 甘油封片剂封片。

2 实验结果

2.1 肉眼观察结果

肉眼可见空间组培养液颜色呈浅紫粉红色, pH 值 8.0 左右。倒置显微镜下观察可见空间组细胞从微载体上脱落的死细胞较多,细胞多呈皱缩状(见图 3, 图 4),

而地面对照组细胞则与微载体结合良好较少脱落。

2.2 倒置显微镜下观察结果

1 周后镜下观察, 空间及地面组均有细胞贴壁生长, 地面组细胞贴壁较早且显著多于空间组细胞。与此同时, 复苏培养冰冻保存的正常组细胞。20 d 后 3 组细胞均消化传代培养, 3 组细胞的镜下形态无显著区别, 空间组细胞形态略显细小, 生长传代稍慢, 颗粒较多(见图 5~图 7)。



图 3 游离于微载体之外的太空组细胞(1×100)
Fig. 3 Space control cells dissociated from the microcarrier (1×100)

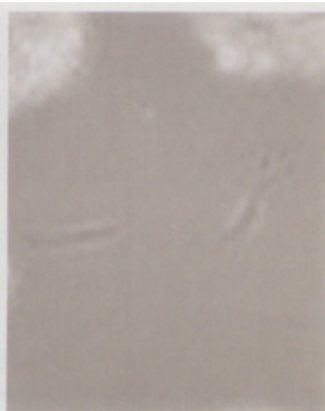


图 4 游离于微载体之外的太空组细胞(1×200)
Fig. 4 Space control cells dissociated from the microcarrier (1×200)

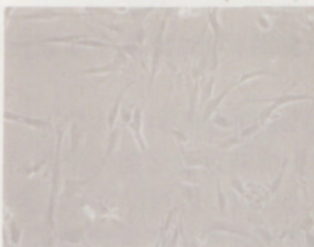


图 5 太空组细胞倒置显微镜下形态(1×200)
Fig. 5 Space control cells under inverted microscope (1×200)

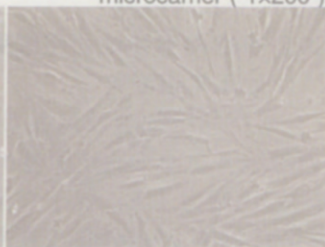


图 6 地面对照组细胞倒置显微镜下形态 (1×200)
Fig. 6 Ground control cells under inverted microscope (1×200)



图 7 正常对照组细胞倒置显微镜下形态 (1×200)
Fig. 7 Normal control cells under inverted microscope (1×200)

2.3 激光共聚焦显微镜下显示的细胞骨架结构

空间组细胞与地面及正常对照组相比, 微管及微丝发生解聚, 有序度降低, 微管变短, 荧光染色减弱, 细胞周边胞膜不完整。地面及正常对照组细胞骨架清晰, 荧

光染色强, 微管微丝粗大, 排列整齐有序(见图 8~图 10)。

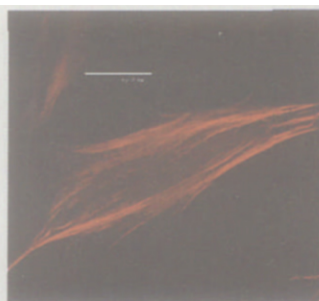


图 8 激光共聚焦显微镜下空间组细胞骨架形态
Fig. 8 Space control cells under the confocal microscopy

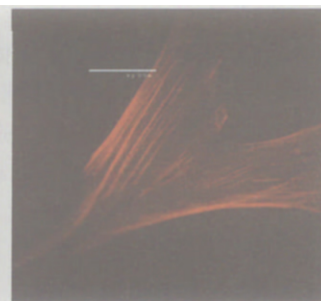


图 9 激光共聚焦显微镜下地面组细胞骨架形态
Fig. 9 Ground control cells under the confocal microscopy

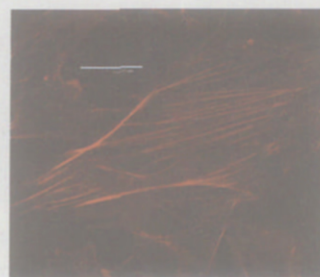


图 10 激光共聚焦显微镜下正常对照组细胞骨架形态
Fig. 10 Normal control cells under the confocal microscopy

3 讨论

以往空间搭载实验证明, 微重力和空间辐射可以改变细胞骨架结构^[2], 细胞骨架系统对微重力环境非常敏感^[3]; 可能参与微重力导致的细胞形态功能变化过程^[4], 细胞可通过细胞外基质以及细胞骨架系统, 协同化学信号传导通路将重力变化的刺激级联传递到细胞核, 激发相关基因表达变化, 进而影响细胞功能^[5-6]。

Infanger M.^[7]通过模拟微重力促进人类上皮细胞凋亡的研究表明模拟微重力可以导致细胞外基质蛋白(extracellular matrix proteins, 简称 ECMP)增加, 改变细胞骨架组分(如 α 微管蛋白和中间丝), 诱导凋亡。Grimm D.^[8]发现回转器模拟失重可诱导滤泡性甲状腺癌细胞的凋亡。Dai Z.Q.^[9]的研究也表明, 在微重力下细胞骨架微丝解聚。细胞骨架系统是重力的感受器, 在重力条件下, 细胞骨架同细胞的形态、功能、信号传导等相关, 但细胞骨架与基因传导之间的关系尚不清楚^[10]。

在本实验中, 空间组细胞返回地面后, 在与对照组细胞同时培养的过程中, 倒置显微镜下发现空间组细胞死细胞较多, 细胞生长传代较慢, 细胞形态较为细小, 细胞内颗粒较多。采用激光共聚焦显微镜同时检测了地面、正常对照组和空间组细胞微丝骨架结构的变化, 发现人牙髓间充质细胞在经历空间环境之后, 细胞骨架胞

膜不完整,细胞骨架出现弥散性变化,局部微丝解聚,张力纤维减少、骨架蛋白弥散分布、细胞骨架的网络结构消失;而对照组细胞的微丝骨架排列有序、粗细均匀、走向清晰,微管束粗长整齐,荧光染色强,说明人牙髓间充质细胞骨架对空间微重力环境敏感,空间微重力环境可以破坏人牙髓间充质细胞的细胞骨架,促进其凋亡。

本实验属于无源搭载,即将细胞保存于密闭环境条件下,没有细胞培养所需的适宜环境——5% CO₂、37°C、饱和湿度标准条件。细胞要经历空间微重力和空间射线辐射,以及宇宙飞船升空过程中的温度变化,这些因素对细胞的生长状态及基因都可能会有所影响,所以,笔者设置了地面对照组(除没有经历空间环境之外其他条件均相同)与空间组相对照。为了尽量排除细胞受温度变化的影响,将细胞保存于高品质的保温杯中以隔绝温度变化。正常对照组采用与空间及地面对照组同源同代的细胞,并利用液氮深低温冰冻保存,这就保证了细胞处于同一代次,国外已有学者证实深低温保存是可以保持细胞生长分化特性的^[11-12]。

空间的特殊微重力环境,可以为细胞提供一个不受重力约束的三维生长空间,这是在地面上无法实现的。现有的各种组织工程材料都或多或少地有一些不利于细胞生长的因素,移植入体内会使机体产生排斥反应,而空间环境本身提供的三维生长空间,可以使细胞不借助支架材料生长,这为牙组织工程提供了新的思路和线索。

目前的空间实验研究大多是空间环境对植物或对肿瘤细胞的影响,而空间环境也可能使人类正常基因发生改变,牙髓是较易得到的正常细胞的样本,牙髓基因的改变可以作为研究空间环境对人类正常基因影响的研究载体。空间特殊的空间环境可以改变生物体基因表达而诱发变异,这种变异可能是有益的也有可能是有害的,通过实验研究,可以探索充分利用空间环境得天独厚的优势,诱导牙髓细胞向我们所期望的方向去增殖分化,牙髓干细胞有望成为一个较易得到的干细胞库的种子来源。

此外,随着人类对空间的探索,世界各国都加快了空间研究的脚步,越来越多的宇航员进入空间环境,空间环境对宇航员机体的影响也越来越受到关注。牙齿是人类生活的重要器官之一,对生活质量有着很大的影响,为保证宇航员在空间探索工作的顺利进行,空间环境对牙齿的影响应该受到关注和深入的研究。

4 结论

将人牙髓间充质细胞搭载宇宙飞船进入太空,回收细胞后,继续培养成活,对经历空间微重力环境之后的人牙髓间充质细胞培养特性有了初步的了解,发现空间环境能使人牙髓间充质细胞的形态、功能、细胞骨架发

生改变,为进一步利用空间平台研究牙组织工程提供了线索。

参考文献(References)

- [1] 蔡哲,张岚,舒峻,等.空间生物技术在干细胞和组织工程学研究中的应用[J].中国康复理论与实践,2004,10(1):9-10.
CAI Zhe,ZHANG Lan,SHU Jun, et al. The application of space biotechnology in the study of stem cells and tissue engineering [J].Chin J Rehabil Theory Practice, 2004, 10 (1):9-10.
- [2] KORDYUM EL. Calcium signaling in plant cells in altered gravity[J]. Adv Space Res, 2003, 32(8): 1621- 1630.
- [3] PAPASEIT C, POCHON N, TABONY J. Microtubule self-organization is gravity- dependent[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(15): 8364- 8368.
- [4] SATO A, KUMEI Y, SATO K, et al. Studies on the effects of microgravity on the ultrastructure and function of cultured mammalian cells [J]. Biol Sci Space, 2001, 15 Suppl: S61- S63.
- [5] WANG N, BUTLER JP, INGBER DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton[J]. Science, 1993, 260(5111): 1124- 1127.
- [6] STEIN GS, VAN WIJNEN AJ, et al. Implications for interrelationships between nuclear architecture and control of gene expression under microgravity conditions [J]. FASEB J, 1999, 13 Suppl: S157- S166.
- [7] INFANGER M, KOSSMEHL P, SHAKIBAEI M, et al. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells[J]. Cell Tissue Res, 2006, 324(2): 267- 277.
- [8] GRIMM D, BAUER J, KOSSMEHL P. Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma Ecells[J]. FASEB J, 2002, 16(6): 604- 606.
- [9] DAI Z, LI Y, DING B, et al. Effects of clinorotation on COL1A1- EGFP gene expression[J]. Sci China C Life Sci, 2004, 47(3): 203- 210
- [10] 张勇,吴兴裕,陈苏民.重力变化对表皮生长因子诱导的信号转导的影响 [J]. 航天医学与医学工程, 2001, 14(5): 373- 377.
ZHANG Yong, WU Xingyu, CHEN Sumin. Influence of gravity change on EGF- induced signal transduction[J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2001, 14 (5): 373- 377.
- [11] PAPACCIO G, GRAZIANO A, et al. Long - term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP- DPSCs) and their differentiated osteoblasts: A cell source for tissue repair[J]. J Cell Physiol, 2006, 208(2): 319- 325.
- [12] FUJIWARA S, KUMABE S, IWAI Y. Isolated rat dental pulp cell culture and transplantation with an alginatescaffold[J]. Okajimas Folia Anat Jpn, 2006, 83(1): 15- 24.

(责任编辑 王芷)