

动态牵张促进人骨髓间充质干细胞三维培养的成骨分化

白晓强^{1,2}, 袁芷若², 周永胜^{1,2,Δ}, 吕珑薇^{2,3,Δ}

[1. 北京大学医学部医学技术研究院, 北京 100191; 2. 北京大学口腔医学院·口腔医院修复科, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 口腔生物材料和数字诊疗装备国家工程研究中心, 颅颌面组织生物智造与修复再生北京市重点实验室, 国家卫生健康委口腔数字医学重点实验室, 北京 100081; 3. 北京大学口腔医院三亚医院(三亚口腔医学中心), 海南三亚 572013]

[摘 要] **目的:**探究动态牵张对人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMMSCs)三维培养中成骨分化的促进作用。**方法:**对载有 hBMMSCs 的三维培养体系进行动态牵张, 设置动态牵张的比例(5%、10%、20%)、频率(0.5 Hz)和时间(2 h/d), 以静态培养为对照组; 通过胞质荧光染色观察动态牵张引起的 hBMMSCs 形变; 动态牵张培养 7 d 后, 通过细胞活死染色观察动态牵张对 hBMMSCs 活性的影响, 通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色及定量实验, 成骨相关基因和蛋白的表达观察动态牵张对 hBMMSCs 成骨分化的影响。**结果:**成功构建动态牵张三维培养 hBMMSCs, 可实现不同持续时间、频率和动态牵张的比例; 动态牵张使得 hBMMSCs 发生形变, 牵张比例越大, 细胞形变越明显, 从圆形向扁椭圆形变化; 动态牵张培养 7 d 后, 静态对照组和动态牵张各实验组中 hBMMSCs 基本为绿染的活细胞, 仅有个别红染的死细胞, 活细胞比例各组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$); 动态牵张各组较静态对照组 ALP 大体染色深, 显微镜下 ALP 染色阳性细胞数量多, 成骨相关基因和蛋白的表达增加, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 其中动态牵张 10% 组 ALP 大体染色最深, 阳性细胞数量最多, 成骨相关基因和蛋白的表达较静态对照组增加最为显著。**结论:**动态牵张使得 hBMMSCs 发生形变, 对细胞活性无明显影响, 能够有效促进 hBMMSCs 成骨向分化。

[关键词] 动态牵张; 三维培养; 人骨髓间充质干细胞; 成骨分化

[中图分类号] R78; R318 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2026)03-0641-09

doi: 10. 19723/j. issn. 1671-167X. 2026. 03. 026

Dynamic stretching promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in three-dimensional culture

BAI Xiaoqiang^{1,2}, YUAN Zhiruo², ZHOU Yongsheng^{1,2,Δ}, LV Longwei^{2,3,Δ}

[1. Institute of Medical Technology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; 2. Department of Prosthodontics, Peking University School and Hospital of Stomatology & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & National Engineering Research Center of Oral Biomaterials and Digital Medical Devices & Beijing Key Laboratory for Intelligent Biomanufacturing and Regeneration of Craniofacial Tissues & NHC Key Laboratory of Digital Stomatology, Beijing 100081, China; 3. Peking University Hospital of Stomatology Sanya Division (Sanya Stomatology Center), Sanya 572013, Hainan, China]

ABSTRACT Objective: To explore the promotion of dynamic distraction on osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMMSCs) in three-dimensional culture. **Methods:** Dynamic stretching in a three-dimensional culture for hBMMSCs was achieved with proportions set at 5%, 10%, and 20%, a frequency of 0.5 Hz, and a dynamic stretching duration of 2 hours per day. Static culture was used as the control group. Deformation of hBMMSCs induced by dynamic stretching was observed through cytoplasmic fluorescence staining. After 7 days of dynamic stretching culture, the impact of dynamic stretching on the viability of hBMMSCs was observed through cell live/dead staining. The effect of dynamic stretching on the osteogenic differentiation of hBMMSCs was observed through alkaline phosphatase (ALP) staining and the expression of osteogenic related genes and proteins after 7 days of dynamic stretching culture. **Results:** Dynamic stretching in a three-dimensional culture for hBMMSCs was successfully constructed, which could achieve different durations, frequencies, and ratios of dynamic stretching. Dynamic stretching led to deformation of hBMMSCs, and the greater the stretching ratio, the

基金项目:国家自然科学基金(82271032, 82470943)、海南省自然科学基金优秀青年基金(825YXQN602)、北京大学临床科学家培养计划(BMU2025PYJH011) Supported by the National Natural Science Foundation of China (82271032, 82470943), the Hainan Provincial Natural Science Foundation of China (825YXQN602), and the Peking University Clinical Scientist Training Program (BMU2025PYJH011)

Δ Corresponding author's e-mail, kqzhouysh@hsc.pku.edu.cn, lwlw@bjmu.edu.cn

网络出版时间: 2026-04-09 17:12:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20260408.1518.004.html>

more pronounced the cell deformation, transitioning from a circular to a flat oval shape. After 7 days of dynamic stretching culture, hBMMSCs in the static control group and dynamic stretching groups were mostly green stained live cells, with only a few red stained dead cells. The difference in the proportion of live cells between the groups was not statistically significant ($P > 0.05$). The ALP staining in the dynamic stretching group was deeper than that in the static control group, and the number of ALP staining positive cells observed under the microscope was higher. The expression of osteogenic related genes and proteins increased after 7 days of dynamic stretching culture, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Among them, the dynamic stretching group with 10% had the deepest ALP staining, the highest number of positive cells, and the most significant increase in the expression of osteogenic related genes and proteins compared with the static control group. **Conclusion:** Dynamic stretching caused deformation of hBMMSCs without a significant impact on cell viability, and it could effectively promote the osteogenic differentiation of hBMMSCs.

KEY WORDS Dynamic stretching; Three-dimensional culture; Human bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation

口腔颌面部骨缺损病因多样,发病率高,形态复杂,骨再生难度大,严重影响患者的容貌以及咀嚼和发音等功能,导致患者生活质量与身心健康受到损害^[1]。目前,对于小范围骨缺损,机体可自愈,或者通过填充人工骨粉等材料实现修复;而对于较大范围骨缺损,目前治疗方法包括自体移植、同种异体移植和合成骨替代物,但这些方法都有局限性,自体骨移植供区有损伤且可能创伤大,同种异体和合成骨替代物存在免疫原性、感染、整合不良和血管化不足等问题^[2-3]。因此,迫切需要开发新的技术来制备骨修复材料,恢复受损骨的结构和功能。

近年来,类器官逐渐出现,为治疗大范围的骨缺损提供了新的方法。类器官是一种源自干细胞的体外三维组织样结构,能够使干细胞在三维空间中增殖、分化和自我组织,并表现出与目标组织器官相似的结构和功能,已逐步应用于人体器官发育的研究、疾病建模、药物筛选、再生医学、个性化治疗等方面^[4-5]。骨类器官的研究已取得一定进展,但培养过程中耗时长,多是静态下的培养,缺乏对天然骨组织动态生理环境的模拟^[6]。

在目前的医学实践中,发现患者长期卧床会造成骨质疏松;口腔正畸会有压力侧牙槽骨吸收和牵张侧牙槽骨沉积;在牵张成骨中,骨间隙内新骨持续形成,这些都是动态力学环境对骨组织的影响。人体的运动通常是周期性的重复动作,从而不可避免地在细胞周围产生动态变化的力学刺激,最直接的响应是骨内基质的形变,这种变形会通过细胞外基质传递到细胞,进而引起细胞的形变及生物学响应^[7]。动态牵张是在力学作用下发生的一种循环往复的牵张形变,通过调整动态牵张的频率、比例和时间,能够在体外模拟体内细胞所受的应力环境。对外二维细胞水平的研究发现,间充质干细胞在经过动态牵张后会更好地成骨向分化^[8];成骨细胞受到机械负载会激活 Piezo1,使得胶原表达增加,抑

制破骨^[9];骨细胞受到不同机械力,所产生的成骨和破骨效应也不同^[10-11]。可见骨组织是可以响应力学环境的变化,内部的成骨向细胞也是力学响应性细胞。

人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMMSCs)是源于骨组织中的成体干细胞,具有优异的自我更新能力和多向分化潜能,是构建骨类器官的重要干细胞来源之一^[12]。同时, hBMMSCs 也是力学响应性细胞,目前尚未见关于 hBMMSCs 在三维动态牵张应力中的报道。因此,本研究旨在通过构建动态牵张系统模拟天然骨组织的动态生理环境,探究动态牵张应力对 hBMMSCs 三维培养的影响,为进一步构建骨类器官提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 细胞

原代 hBMMSCs 购自美国 ScienCell 公司,货号 7500,本研究采用三株来源于不同供体的 hBMMSCs,批号为 6881、6899、6890,传代培养至第 5 代用于实验。

1.2 试剂与材料

研究所用材料、试剂除特殊说明外全部购自美国 Sigma 公司。 α -MEM (alpha-minimum essential medium) 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶-EDTA (质量分数 0.25%)、青霉素-链霉素 (5 000 U/mL) 均购自美国 Gibco 公司;甲基丙烯酰化明胶 (gelatin methacryloyl, GelMA), 型号 EFL-GM-90, 及 GelMA 裂解液均购自苏州永沁泉智能设备有限公司;多聚赖氨酸 (货号 ZLI-9005) 购自中国中杉金桥生物科技公司;Sybe Green 荧光染料、活细胞示踪剂 5-氯甲基荧光素二醋酸酯 (5-chloromethylfluorescein diacetate, CMFDA)-绿色 (货号 40721ES60) 购自中国翌圣生物科技公司;TRIzol 试

剂购自美国 Invitrogen 公司; Western 及 IP 细胞裂解液(货号 P0013J)、免疫染色洗涤液(货号 P0106)、免疫染色一抗稀释液(货号 P0262)、免疫荧光染色二抗稀释液(货号 P0265)、免疫染色通透液(Triton X-100, 货号 P0096)、免疫染色封闭液(货号 P0260)、BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase, ALP)显色试剂盒(货号 C3206)、碱性磷酸酶检测试剂盒(货号 P0321S)均购自中国碧云天生物科技公司;细胞活力(活死细胞染色)检测试剂盒(Calcein AM, PI 法, 货号 KGA9501)购自中国凯基生物公司;RNA 逆转录试剂盒购自中国艾科瑞生物公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司;兔源 RUNX2 抗体(货号 A11753)购自中国 Abclonal 公司;兔源 OCN 抗体(货号 23418-1-AP)、兔源 COL-1 抗体(货号 14695-1-AP)、山羊抗兔 IgG (H + L) CoraLite488-conjugated(货号 SA00013-2)购自中国 Proteintech 公司;DAPI 溶液(C0060)购自中国索莱宝科技有限公司;动态牵张腔室(20 mm × 20 mm)购自中国杭州表面力科技有限公司。

1.3 hBMMSCs 体外培养、传代和成骨诱导

hBMMSCs 培养于含 5% (体积分数) CO₂ + 95% (体积分数) 空气的 37 °C 恒温培养箱。增殖培养基(proliferation medium, PM)成分: α-MEM 培养基 + 10% (质量分数) FBS + 1% (质量分数) 青-链霉素, 每 2 天更换一次培养基, 待细胞生长至 80% ~ 90% 汇合度, 随后进行传代。每个培养皿中的细胞经胰酶消化、培养基中和、离心、重悬, 按 1 : 3 的比例接种到新培养皿中。成骨诱导培养基(osteogenic medium, OM)成分: α-MEM + 10% FBS + 1% 青-链霉素 + 10 mmol/L β-甘油磷酸钠 + 50 mg/L 维生素 C + 100 nmol/L 地塞米松。

1.4 hBMMSCs 三维培养和动态牵张

动态牵张腔室内表面首先通过氮气等离子体喷涂处理, 去除表面杂质; 接下来涂覆一层多聚赖氨酸溶液, 避光过夜孵育, 次日弃掉多聚赖氨酸溶液, 60 °C 烘干 1 h 备用, 以提高腔室表面的亲水性和黏附性。

按说明书配置 8% (质量分数) GelMA 溶液, 重悬细胞沉淀, 使细胞分散均匀, 细胞终密度为 2×10^6 /mL; 将 800 μL 重悬细胞后的 GelMA 溶液注入底表面积为 20 mm × 20 mm 的动态牵张腔室中, 405 nm 光固化 30 s 后 GelMA 水凝胶与动态牵张腔室紧密黏附, 厚度约为 2 mm; PM 培养 3 d 后更换为 OM, 同时将腔室置入动态牵张系统设备中, 设置动态牵张的比例为 5%、10%、20%, 频率为 0.5 Hz, 时间 2

h/d, 使动态牵张腔室发生形变的同时带动三维培养体系发生动态牵张。

1.5 细胞形变的观察

吸去培养基, 加入按说明书配置的 CMFDA 工作液, 37 °C 孵育 30 min。吸去 CMFDA 工作液, 换用新鲜培养基。通过激光共聚焦显微镜观察动态牵张下的细胞形变。

1.6 细胞活性的检测

三维培养样本 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 100 r/min; 加入按说明书配制好的活死染液, 使染液没过样本, 避光室温染色 40 min; 弃掉染液, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 100 r/min; 将样本通过 ZEISS 共聚焦显微镜采集荧光图像; 将荧光图像中的活细胞和死细胞分别计数后, 进行活细胞百分比的统计分析。实验重复 3 次。

1.7 ALP 染色及定量

三维培养样本 PBS 洗 3 次; 4% (质量分数) 多聚甲醛, 室温固定 30 min; PBS 洗 3 次; 加入按说明书配制好的染液, 避光室温染色 1 h; PBS 洗 3 次; 通过扫描仪扫描获得样本的大体图像; 通过 Nikon 倒置显微镜采集样本显微镜下的图像。按照说明书进行 ALP 定量检测。同时采用 BCA 法测定总蛋白含量, 用 ALP 定量结果除以总蛋白含量来代表 ALP 活性。实验重复 3 次。

1.8 定量反转录 PCR (quantitative reverse transcriptase-mediated, PCR, qRT-PCR)

GelMA 裂解液按说明书裂解水凝胶释放细胞, TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 以 Sybr Green 进行 qRT-PCR, 检测成骨相关基因 mRNA 的表达, 引物序列见表 1。采用 ΔΔCT 法分析数据, 以 GAPDH 作为内参照。

1.9 免疫荧光染色 (immunofluorescence, IF)

三维培养样本 PBS 洗 3 次; 4% 多聚甲醛, 室温固定 30 min; PBS 洗 3 次; 免疫染色通透液 4 °C 处理 10 min; 免疫染色封闭液 4 °C 封闭 1 h; 4 °C 过夜孵育一抗; 免疫染色洗涤液洗 3 次; 室温孵育二抗 2 h; 免疫染色洗涤液洗 3 次; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 常温染色 15 min; F-actin 常温染色 40 min; PBS 洗 3 次; 通过 ZEISS 激光共聚焦显微镜 Z-stack 采集荧光信息, 重建三维图像。

1.10 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件, 计量资料以均数 ± 标准差表示, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较数据结果, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义, 所有实验均重复 3 次。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Prime sequences used for quantitative real-time PCR

Gene	Forward primer(5'to 3')	Reverse prime(5'to 3')
<i>GAPDH</i>	GAAGCTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGCTGATGGGATTTC
<i>RUNX2</i>	GAACCACAAGTCCGGTGCAA	ACTGCTTGCAGCCTTAAATGACT
<i>ALP</i>	ATGGGATGGGTGTCTCCACA	CCACGAAGGGGAACCTTCTC
<i>OCN</i>	CATGAGAGCCCTCACACTCCTC	CCTGCTTGGACACAAAGGCTGC
<i>COL-1</i>	ACAGGGCTCTAATGATGTTGA	AGGCGTGATGGCTTATTTGT

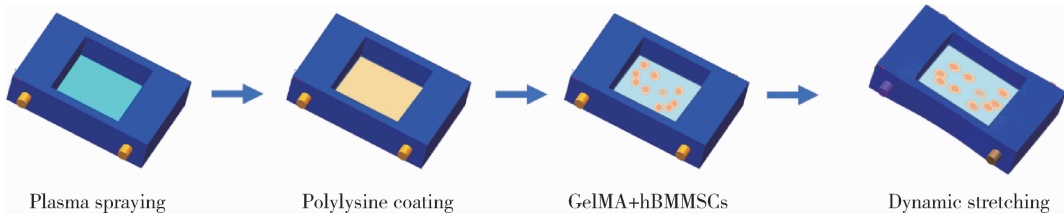
qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase-mediated PCR; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *RUNX2*, runt-related transcription factor 2; *ALP*, alkaline phosphatase; *OCN*, osteocalcin; *COL-1*, collagen-1.

2 结果

2.1 hBMMSCs 动态牵张三维培养的构建

首先通过氮气等离子体喷涂清洗和涂覆一层多聚赖氨酸溶液优化动态牵张腔室内表面,以提高腔室表面的亲水性和黏附性。随后,将重悬细胞后的

GelMA 溶液注入动态牵张腔室中,光固化后 GelMA 水凝胶与动态牵张腔室紧密黏附。将腔室置入动态牵张系统设备中,一端固定,另一端移动。参考以往在二维水平细胞牵张研究中相关的最优牵张参数^[8, 13],设置本研究动态牵张的比例、频率和时间,使动态牵张腔室发生形变,同时带动三维培养体系发生动态牵张(图 1)。



hBMMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; GelMA, gelatin methacryloyl.
图 1 动态牵张三维培养的构建
Figure 1 Construction of dynamic stretching three-dimensional culture

2.2 动态牵张下 hBMMSCs 形变

为了探究水凝胶牵张的同时引起的细胞形变,通过 CMFDA 进行细胞荧光染色,共聚焦显微镜下观察。静态对照组的细胞多呈圆形,少量椭圆形,且细胞长轴的方向随机。动态牵张 5% 组,细胞基本

呈圆形或略偏椭圆形,但相较静态对照组,该组细胞长轴的方向更有规律,开始沿着水凝胶牵张的方向。动态牵张 10%、20% 组几乎无圆形细胞,细胞均为椭圆形,细胞长轴沿水凝胶拉伸方向,动态牵张 20% 组较 10% 组细胞更加偏椭圆形(图 2)。

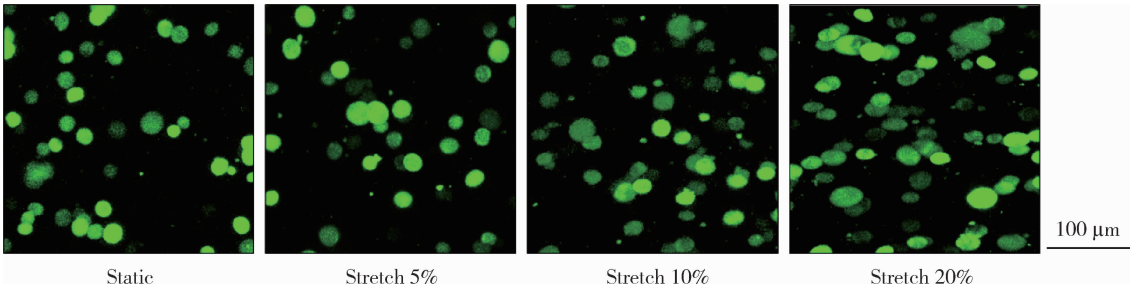
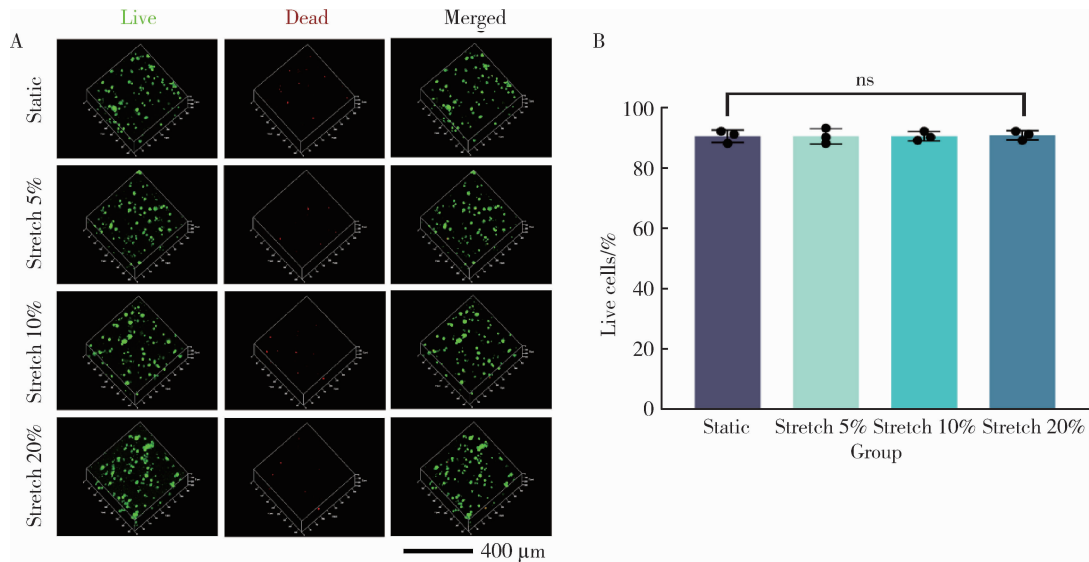


图 2 不同比例动态牵张下 hBMMSCs 的形变
Figure 2 Deformation of hBMMSCs under dynamic stretching at different proportions

2.3 动态牵张对 hBMMSCs 活性无明显影响

为了研究动态牵张是否会影响人骨髓间充质干细胞的活性,选取了 5%、10%、20% 的梯度牵张比例,静态组作为对照。在动态牵张培养 7 d 后,用 Calcein-AM/PI 进行活死细胞染色,发现活细胞被染成绿色,死细胞被染成红色,可见各组绝大部分细胞均为活细胞,仅有少量部分细胞为死细胞(图 3A)。通过活细胞计数,动态牵张各组与静态对照组活细胞比例的差异无统计学意义($P > 0.05$),说明动态牵张 5%、10%、20% 不会影响人骨髓间充质干细胞的活性(图 3B)。



hBMMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; ns, not significant.

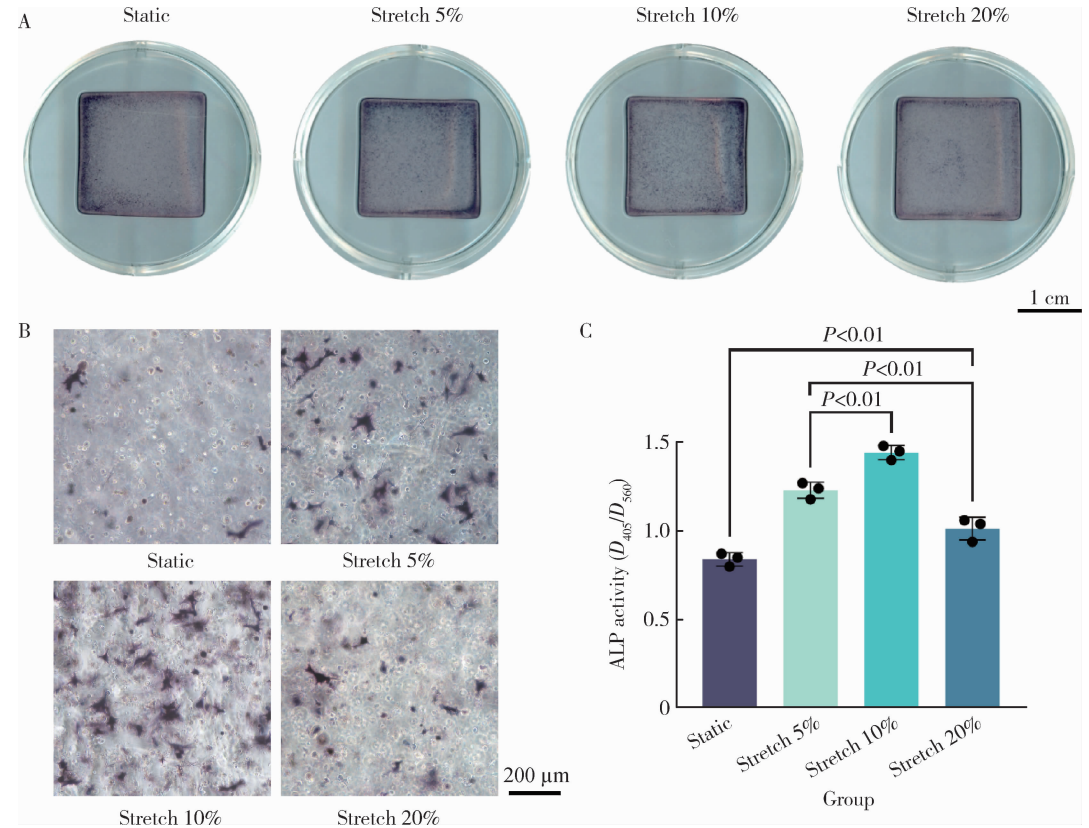
图3 不同比例动态牵张下 hBMMSCs 活死染色 (A) 和活细胞百分比 (B)

Figure 3 Live/dead staining (A) and the proportion of live cells (B) of hBMMSCs under dynamic stretching at different proportions

2.4 动态牵张下 hBMMSCs ALP 染色及定量

将静态对照组和不同比例的动态牵张组培养 7 d 后进行 ALP 染色及活性定量。大体样本可见动态牵张 5% 和 10% 两组染色较深,静态对照组和动态牵张 20% 组染色较浅(图 4A),镜下可见动态牵张

5% 组 ALP 染色阳性细胞数量最多,其次是动态牵张 5% 组和动态牵张 20% 组,静态对照组 ALP 染色阳性细胞数量最少(图 4B)。ALP 活性定量结果显示,动态牵张 10% 组活性最高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),与大体染色结果趋势一致(图 4C)。



hBMMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; ALP, alkaline phosphatase.

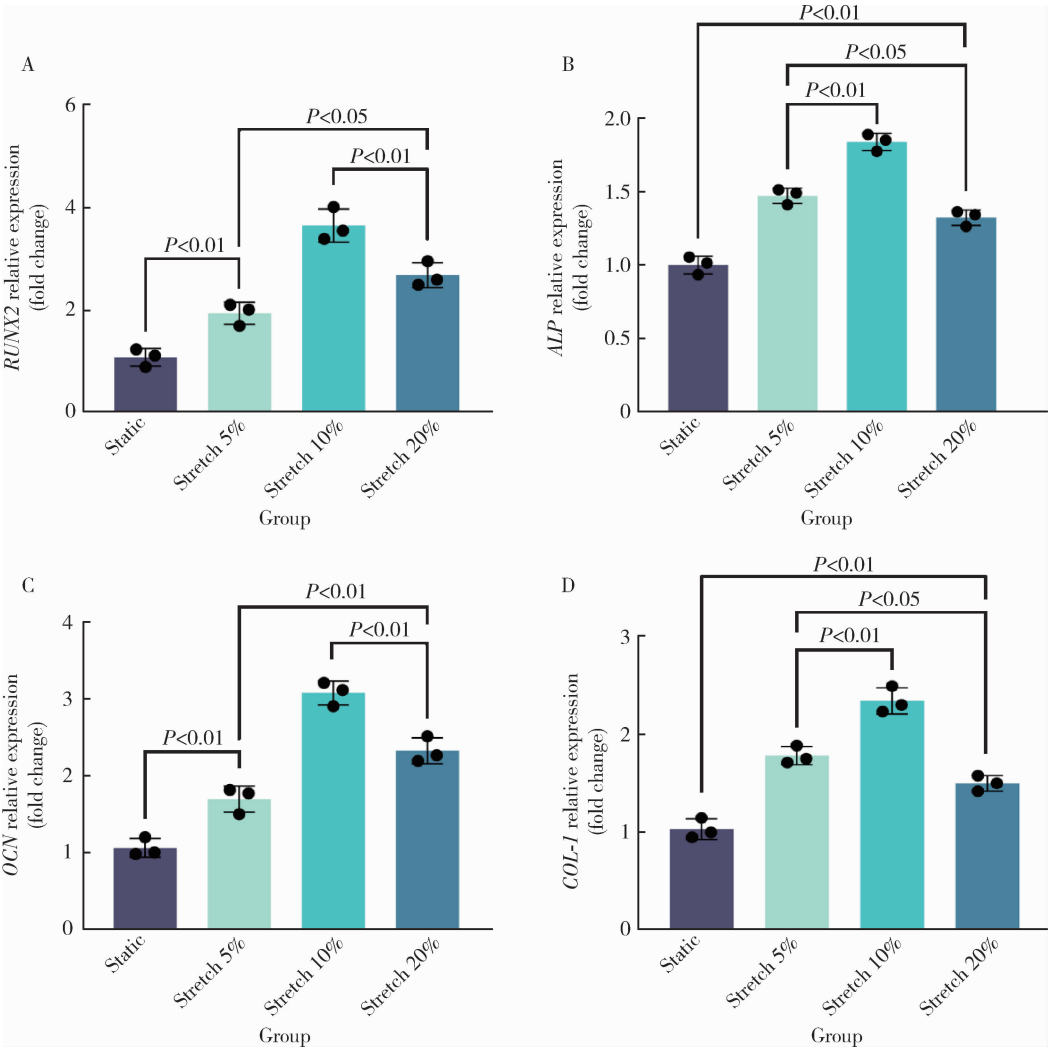
图4 不同比例动态牵张下 hBMMSCs ALP 染色大体 (A)、显微镜下 (B) 和活性相对定量 (C)

Figure 4 ALP staining's general view (A), microscope view (B) and relative quantification of activity (C) of hBMMSCs under dynamic stretching at different proportions

2.5 动态牵张下 hBMMSCs 成骨相关基因的表达

动态牵张培养第 7 天时,检测成骨相关标志基因的表达情况,发现 *ALP* 基因的表达与 *ALP* 染色及定量的结果趋势相似,动态牵张组较静态对照组能更好地促进人骨髓间充质干细胞成骨分化,其中以

动态牵张 10% 组效果最佳。*RUNX2*、*OCN*、*COL-1* 基因的表达情况与 *ALP* 基因表达情况相似,动态牵张组较静态对照组表达明显升高,以动态牵张 10% 组升高最明显,表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 5)。



hBMMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; *RUNX2*, runt-related transcription factor 2 (A); *ALP*, alkaline phosphatase (B); *OCN*, osteocalcin (C); *COL-1*, collagen-1 (D).

图 5 不同比例动态牵张下 hBMMSCs 成骨相关基因的表达

Figure 5 Expression of osteogenic related genes of hBMMSCs under dynamic stretching at different proportions

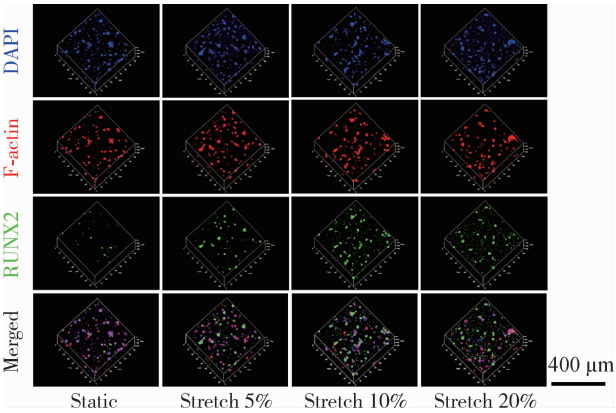
2.6 动态牵张下 hBMMSCs 成骨相关蛋白免疫荧光染色

本实验通过免疫荧光染色观察成骨相关蛋白的表达情况。在培养第 7 天时观察 *RUNX2*、*OCN*、*COL-1* 成骨相关蛋白,发现动态牵张组 *RUNX2* 的表达明显优于静态对照组,说明动态牵张能够明显促进人骨髓间充质干细胞早期成骨分化(图 6)。 *OCN*、*COL-1* 的表达情况与 *RUNX2* 相似,动态牵张组明显优于静态对照组,且动态牵张 10% 组最佳(图 7~9)。

3 讨论

口腔颌面部较大范围骨缺损发病率高,并发症多,严重影响患者的身心健康,也是困扰临床医生的难题。骨类器官富含成骨向细胞、丰富的细胞外基质和细胞因子,是有望治疗较大范围骨组织缺损的有效方法之一^[14]。与大多数软组织不同,骨组织作为人体的负重结构,长期处在动态的力学环境下。当骨组织所承受的力学载荷发生变化时,其结构会发生调整 and 变化^[15]。日常生活中,存在许多“废用

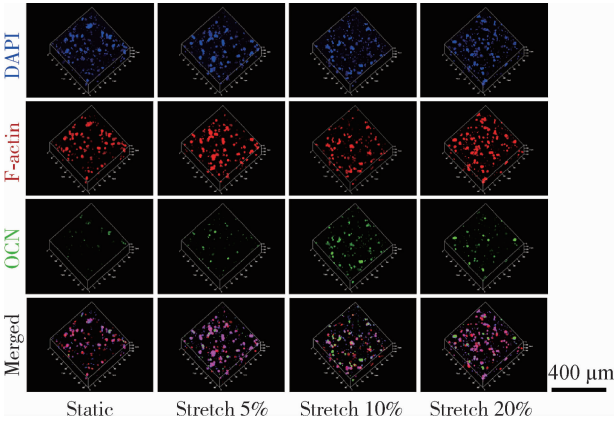
导致骨吸收”的现象,例如,长期卧床患者会发生骨质流失,导致骨质疏松;航天员因为长期处于微重力环境其体内的骨质以每月 1% ~ 2% 的速度流失^[16]。尾吊模型常用在小鼠的无重力模拟实验中,会发现后肢较前肢更容易出现骨丢失^[17]。当雄性小鼠饲养在一起而可以相互争斗时,其密质骨和松质骨的骨量都会增加,说明雄性小鼠之间争斗所产生的骨组织应力刺激利于成骨过程的发生^[18]。可见,骨组织是一种积极的力学响应性器官。因此,模拟天然骨组织的动态应力环境可能是正向促进构建骨类器官的潜在方法。



hBMMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; RUNX2, runt-related transcription factor 2. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

图 6 不同比例动态牵张下 hBMMSCs 成骨相关蛋白 RUNX2 的表达

Figure 6 Expression of osteogenic related proteins RUNX2 under dynamic stretching at different proportions



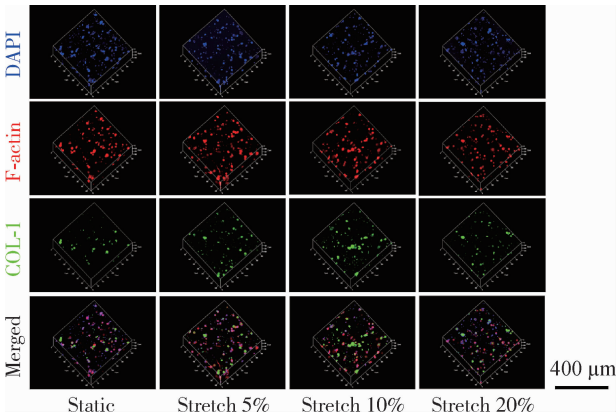
hBMMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; OCN, osteocalcin. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

图 7 不同比例动态牵张下 hBMMSCs 成骨相关蛋白 OCN 的表达

Figure 7 Expression of osteogenic related proteins OCN under dynamic stretching at different proportions

模拟骨组织的力学环境进行体外培养,需要明确体内骨组织中细胞所受的力学刺激。人体的运动通常是周期性的重复动作,从而不可避免地会在细胞周围产生动态变化的力学刺激,这种动态力学刺激也会影响骨组织中细胞的生物学响应^[19-20]。松质

骨内存在大量的骨小梁,疏松多孔,孔隙内有液体存在,在外力作用下不同位置处的液体压强会出现差异,进而引起液体的流动,会在细胞表面形成流体剪切力。同时,骨的形变和液体流动还会对细胞有施加压力的作用。更为重要的是,当骨受到力学刺激时,最直接的响应是骨内基质的形变,这种变形会通过细胞外基质传递到细胞,进而引起细胞的形变及生物学响应。由于人体所受的力学载荷是周期性变化的,因而传递到细胞周围的基质形变也是动态的,故引起的细胞形变也是动态变化的。因此,本研究基于生理状况下骨组织中细胞水平的变化,模拟骨组织的动态生理环境,构建了基于动态牵张的 hBMMSCs 三维培养体系,设置了不同牵张比例。



hBMMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; COL-1, collagen-1. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

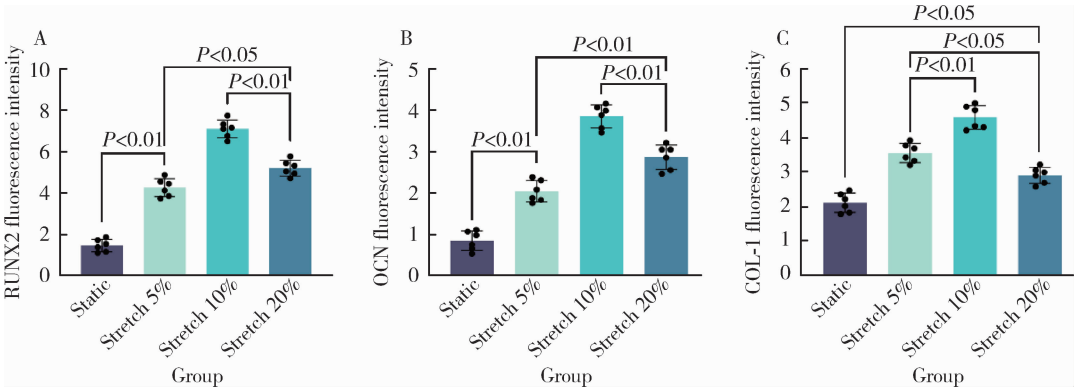
图 8 不同比例动态牵张下 hBMMSCs 成骨相关蛋白 COL-1 的表达

Figure 8 Expression of osteogenic related proteins COL-1 under dynamic stretching at different proportions

在骨组织的生理发育过程中,细胞水平的表现为骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞,一部分成骨细胞转变为静态的骨衬细胞,一部分成骨细胞分泌细胞外基质,主导骨矿化过程^[21-22]。当成骨细胞被矿化基质逐渐包围后,会分化为成熟的成骨细胞。本研究发现,动态牵张引起细胞形变的同时,并不会影响 hBMMSCs 的细胞活性。相比于静态对照组,引入动态牵张后,早期成骨标志物 RUNX2 的表达明显增加,说明 hBMMSCs 更好地向成骨向分化;成骨细胞标志物 OCN 的表达也明显增加,说明成骨细胞形成的更多;正向调节矿物沉积的 ALP 表达增加,细胞外基质的主要有机成分 COL-1 的表达也增加,说明动态牵张促使形成的细胞外基质中更多的表达成骨和骨基质形成相关蛋白;此外,本研究发现不同比例动态牵张组的生物效应是不同的,其中动态牵张 10% 组成骨分化的效果最佳,这与天然骨组

织存在最佳力学环境的情况相符^[23]。本研究结果证明,动态牵张的引入遵循骨组织生长发育的原理,

促进三维培养 hBMMSCs 成骨向分化,且存在发生最佳成骨分化的力学刺激水平。



hBMMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells; RUNX2, runt-related transcription factor 2; OCN, osteocalcin; COL-1, collagen-1.

图 9 不同比例动态牵张下 hBMMSCs 成骨相关蛋白 RUNX2 (A)、OCN (B)、COL-1 (C) 表达的半定量分析

Figure 9 Semi quantitative analysis of the expression of osteogenic related proteins RUNX2 (A), OCN (B), and COL-1 (C) of hBMMSCs under dynamic stretching at different proportions

以往基于二维水平研究力学因素对细胞的影响取得了部分进展,发现骨髓间充质干细胞暴露在二维动态牵张下,会促使其成骨标志物的表达增加^[24]。若其暴露在单轴向压力的作用下,会促使软骨分化基因的表达增加和糖胺聚糖的沉积。成骨细胞是单向分化细胞,力学刺激下成骨细胞分化特性较为稳定^[25]。骨细胞受到适宜的力学刺激,也有利于矿物质的产生和维持^[11]。本研究率先构建了基于 hBMMSCs 的动态牵张三维培养体系,证明动态牵张应力环境促进 hBMMSCs 成骨向分化的效果,更好地反映了骨组织内的实际情况,为后续的研究提供了更多三维培养水平的证明。然而,骨组织工程和骨类器官的构建是一个相对长时间的工作,本实验动态牵张培养的时间只有 7 d,后续仍需延长培养时间,探究长期动态牵张对 hBMMSCs 三维培养的影响。此外,尚缺乏动态牵张促进三维培养 hBMMSCs 成骨分化的机制研究,需探索应力、形变和生物学响应之间的分子生物学机制。YAP、Piezol 是机械应力刺激的敏感蛋白,可以考虑作为机制探究的切入点^[26-27]。

当今动态力学因素已经逐渐引入三维培养、组织工程和类器官的构建中。在制备心肌组织体外研究模型中,给予循环拉伸刺激,有利于体外模型长期的功能和结构的保留^[28]。周期性拉伸还可以促进人胚胎干细胞向心肌组织分化,所形成的心肌细胞具有更成熟的表型^[29]。在人多能干细胞来源的神经管类器官中,机械牵张有助于生长和表型的维持^[30]。SpinU 旋转生物反应器产生的剪切应力有助于经人多能诱导干细胞诱导构建前脑类器官,该类

器官表现出人类皮质发育的关键特征^[31]。可见,动态应力并非局限于骨组织,也是应用于其他组织细胞三维培养的有效方法。

综上所述,本研究发现,在动态应力三维培养环境下 hBMMSCs 发生形变,成骨标志物 ALP 染色加深,成骨相关基因和蛋白的表达增加,证明 hBMMSCs 在三维水平能够响应动态牵张力向成骨分化。本研究动态应力三维培养体系的成功构建,有望应用于骨组织工程和骨类器官的构建,进而为其他组织三维培养的突破提供新的尝试。本研究为通过动态牵张三维培养高效构建组织工程化骨或骨类器官提供了新途径,为临床骨缺损修复的治疗提供了新方向,有望成为骨再生医学领域的重要突破,进而提升骨再生修复效果,提升广大骨缺损患者的生活质量。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明 白晓强:提出研究思路,设计研究方案,收集、分析、整理数据,撰写论文;袁芷若:收集、整理数据;周永胜、吕瓊薇:提出研究思路,总体把关和审定论文,并提供资金支持。所有作者均参与论文修改,并对最终文稿进行阅读和确认。

参考文献

[1] Hartmann A, Hildebrandt H, Younan Z, et al. Long-term results in three-dimensional, complex bone augmentation procedures with customized titanium meshes[J]. Clin Oral Implants Res, 2022, 33(11): 1171 – 1181.
[2] Khachatryan L, Khachatryan G, Hakobyan G. The treatment of lower jaw defects using vascularized fibula graft and dental implants[J]. J Craniofac Surg, 2018, 29(8): 2214 – 2217.
[3] Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, et al. Bone substitutes: A review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management[J]. J Tissue Eng,

- 2018, 9; 2041731418776819.
- [4] Tang XY, Wu S, Wang D, et al. Human organoids in basic research and clinical applications [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7; 168.
- [5] Kratochvil MJ, Seymour AJ, Li TL, et al. Engineered materials for organoid systems [J]. *Nat Rev Mater*, 2019, 4 (9) : 606 – 622.
- [6] Zhang J, Griesbach J, Ganeyev M, et al. Long-term mechanical loading is required for the formation of 3D bioprinted functional osteocyte bone organoids [J]. *Biofabrication*, 2022, 14 (3) : 035018.
- [7] Boccafroschi F, Mosca C, Ramella M, et al. The effect of mechanical strain on soft (cardiovascular) and hard (bone) tissues: Common pathways for different biological outcomes [J]. *Cell Adhes Migr*, 2013, 7 (2) : 165 – 173.
- [8] Chen X, Yan J, He F, et al. Mechanical stretch induces antioxidant responses and osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells through activation of the AMPK-SIRT1 signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 126; 187 – 201.
- [9] Wang L, You X, Lotinun S, et al. Mechanical sensing protein PIEZO1 regulates bone homeostasis via osteoblast-osteoclast crosstalk [J]. *Nat Commun*, 2020, 11; 282.
- [10] Li W, Zhao J, Sun W, et al. Osteocytes promote osteoclastogenesis via autophagy-mediated RANKL secretion under mechanical compressive force [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 694; 108594.
- [11] Xu H, Xia M, Sun L, et al. Osteocytes enhance osteogenesis by autophagy-mediated FGF23 secretion under mechanical tension [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 9; 782736.
- [12] Xie C, Liang R, Ye J, et al. High-efficient engineering of osteocallus organoids for rapid bone regeneration within one month [J]. *Biomaterials*, 2022, 288; 121741.
- [13] Sun J, Chan YT, Ho KWK, et al. “Slow walk” mimetic tensile loading maintains human meniscus tissue resident progenitor cells homeostasis in photocrosslinked gelatin hydrogel [J]. *Bioact Mater*, 2023, 25; 256 – 272.
- [14] Wu S, Wu X, Wang X, et al. Hydrogels for bone organoid construction: From a materiobiological perspective [J]. *J Mater Sci Technol*, 2023, 136; 21 – 31.
- [15] Skerry TM. The response of bone to mechanical loading and disuse: Fundamental principles and influences on osteoblast/osteocyte homeostasis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473 (2) : 117 – 123.
- [16] Williams D, Kuipers A, Mukai C, et al. Acclimation during space flight: Effects on human physiology [J]. *Can Med Assoc J*, 2009, 180 (13) : 1317 – 1323.
- [17] Man J, Graham T, Squires-Donnelly G, et al. The effects of microgravity on bone structure and function [J]. *NPJ Microgravity*, 2022, 8; 9.
- [18] Cooper AN, Cunningham CB, Morris JS, et al. Musculoskeletal mass and shape are correlated with competitive ability in male house mice (*Mus musculus*) [J]. *J Exp Biol*, 2020, 223 (Pt 3) : jeb213389.
- [19] Fahy N, Alini M, Stoddart MJ. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: Implications for cartilage tissue engineering [J]. *J Orthop Res*, 2018, 36 (1) : 52 – 63.
- [20] Zhang Y, Habibovic P. Delivering mechanical stimulation to cells: State of the art in materials and devices design [J]. *Adv Mater*, 2022, 34 (32) : 2110267.
- [21] Chen S, Chen X, Geng Z, et al. The horizon of bone organoid: A perspective on construction and application [J]. *Bioact Mater*, 2022, 18; 15 – 25.
- [22] Weivoda MM, Bradley EW. Macrophages and bone remodeling [J]. *J Bone & Mineral Res*, 2023, 38 (3) : 359 – 369.
- [23] Yang C, Liu Y, Wang Z, et al. Controlled mechanical loading improves bone regeneration by regulating type H vessels in aS1Pr1-dependent manner [J]. *FASEB J*, 2022, 36 (10) : e22530.
- [24] Wu T, Yin F, Wang N, et al. Involvement of mechanosensitive ion channels in the effects of mechanical stretch induces osteogenic differentiation in mouse bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236 (1) : 284 – 293.
- [25] Wang D, Cai J, Zeng Z, et al. The interactions between mTOR and NF- κ B: A novel mechanism mediating mechanical stretch-stimulated osteoblast differentiation [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236 (6) : 4592 – 4603.
- [26] Wang H, Yu H, Huang T, et al. Hippo-YAP/TAZ signaling in osteogenesis and macrophage polarization: Therapeutic implications in bone defect repair [J]. *Genes Dis*, 2023, 10 (6) : 2528 – 2539.
- [27] Qin L, He T, Chen S, et al. Roles of mechanosensitive channel Piezo1/2 proteins in skeleton and other tissues [J]. *Bone Res*, 2021, 9; 44.
- [28] Fischer C, Milting H, Fein E, et al. Long-term functional and structural preservation of precision-cut human myocardium under continuous electromechanical stimulation *in vitro* [J]. *Nat Commun*, 2019, 10; 117.
- [29] Mihic A, Li J, Miyagi Y, et al. The effect of cyclic stretch on maturation and 3D tissue formation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Biomaterials*, 2014, 35 (9) : 2798 – 2808.
- [30] Abdel Fattah AR, Daza B, Rustandi G, et al. Actuation enhances patterning in human neural tube organoids [J]. *Nat Commun*, 2021, 12; 3192.
- [31] Qian X, Nguyen HN, Song MM, et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure [J]. *Cell*, 2016, 165 (5) : 1238 – 1254.

(2024-01-16 收稿)

(本文编辑:王 蕾)