



机械牵拉对大鼠骨骼肌卫星细胞的增殖作用及其途径的研究

杨璐, 陆耀飞*

(上海体育学院 运动科学学院, 上海 200438)

摘要:目的:探讨不同的牵拉模式对大鼠骨骼肌卫星细胞增殖的作用及其可能的作用途径。方法:用两步酶消化法和差速贴壁离心技术分离和提纯卫星细胞。取第3代卫星细胞,利用Flexcell细胞牵拉系统以频率为1 Hz,分别施加5%和15%的拉伸度,各牵拉4 h和6 h。CCK-8检测牵拉结束24 h后卫星细胞的增殖情况,WB检测牵拉结束即刻和牵拉结束24 h后Akt、P38、ERK和JNK的活性以及牵拉结束24 h后的Myf5、MyoD的表达。结果:1)与对照组(不牵拉,下同)相比,15%拉伸度,牵拉4 h和6 h骨骼肌卫星细胞增殖升高($P < 0.01$),5%拉伸度,牵拉4 h和6 h未出现显著增殖($P > 0.05$);2)15%拉伸度,牵拉6 h的Myf5蛋白表达高于对照组($P < 0.01$),牵拉4 h和6 h的MyoD的表达高于对照组($P < 0.01$),5%拉伸度,牵拉4 h和6 h的MyoD和Myf5的表达与对照组相比未有显著变化($P > 0.05$);3)牵拉结束即刻:15%拉伸度,牵拉4 h和6 h的Akt、P38、ERK和JNK的活性高于对照组($P < 0.01$),5%拉伸度,牵拉4 h和6 h的Akt、P38、ERK和JNK的活性与对照组相比未有显著变化($P > 0.05$)。牵拉结束24 h后:15%拉伸度,牵拉4 h和6 h的Akt、P38、ERK、JNK活性增加($P < 0.05$),牵拉结束24 h后:5%拉伸度,牵拉4 h和6 h的Akt、P38、ERK、JNK活性未有显著变化。结论:15%拉伸度的机械牵拉能促进骨骼肌卫星细胞的增殖,这可能是通过激活Akt、P38、ERK、JNK这些通路实现的。

关键词:机械牵拉;肌卫星细胞;增殖;信号通路

中图分类号:G804.2

文献标识码:A

骨骼肌损伤是运动中常见的运动性损伤疾病,以疼痛、局部肿胀、肌张力降低、功能障碍为主要表现。在运动引起的损伤中,骨骼肌损伤的发生率为10%~55%不等,由于骨骼肌再生能力有限,导致自然修复效果不佳,严重影响患者的生活质量(Herridge et al., 2003)。因此,提高肌肉恢复能力和改善肌肉损伤后的治疗方法具有重要的临床价值。

骨骼肌卫星细胞作为肌源干细胞已被广泛研究。骨骼肌的损伤修复依赖于骨骼肌卫星细胞的激活、增殖、分化。有研究者发现,运动能够激活骨骼肌卫星细胞并且促进其增殖(Pallafacchina et al., 2013)。机械牵拉作为模拟运动的一种方式,近年来已被应用于骨骼肌卫星细胞的研究。有研究表明,机械牵拉能够促进骨骼肌卫星细胞的激活和增殖(Kook et al., 2008),抑制分化(史仍飞等, 2012),并且与牵拉程度存在相关性。然而,机械牵拉对骨骼肌卫星细胞的调节机制尚未阐述清楚。因此,本实验通过离体培养骨骼肌卫星细胞,研究机械牵拉对骨骼肌卫星细胞增殖的作用,初步探究可能的作用途径,为骨骼肌损伤修复及细胞肥大过程提供理论依据。

1 研究对象与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠2只,2~3周龄,体重90 g,由上海实验动物研究中心提供,SCXK(2013-0016)。

1.2 主要实验试剂

DMEM培养液(Gibco)、胎牛血清(Gibco)、马血清(Gibco)、青霉素、链霉素(Amresco)、II型胶原酶(Sigma)、胰酶(Gibco)、CCK-8试剂盒(日本同仁堂)、 α 横纹肌肌动蛋白(武汉博士德)、SABC试剂盒(武汉博士德)、DAB试剂盒(武汉博士德)。

1.3 骨骼肌卫星细胞原代培养

10%的水合氯醛以0.4 ml/100 g的剂量腹腔注射麻醉大鼠,约5 min后,待其疼痛反射和角膜反射均消失后,浸泡至75%的酒精中,2 min后,仰卧位固定大鼠。在无菌条件下分离双侧腿部比目鱼肌、腓肠肌和背部肌肉。去除

收稿日期:2018-02-09; 修订日期:2019-10-08

第一作者简介:杨璐(1993-),女,在读博士研究生,主要研究方向为运动生理学,E-mail:1026990956@qq.com。

*通信作者简介:陆耀飞(1961-),男,副教授,博士,硕士研究生导师,主要研究方向为运动生理学,E-mail:yflu@sus.edu.cn。

筋膜、血管、脂肪等组织,充分剪碎至 1 mm^3 。在剪碎的肌肉中加入 0.1% II型胶原酶 30 ml ,在 37°C 条件下搅拌器搅拌 1 h , $1\ 000$ 转/分离心 15 min 后,弃上清。再加入 0.25% 胰酶 30 ml , 37°C 消化 15 min ,胎牛血清终止消化, $1\ 000$ 转/分离心 15 min ,弃上清。加入种植培养液吹打混匀,依次通过 100 目、 200 目、 400 目细胞筛过滤。接种于未经多聚赖氨酸包被的培养瓶中,置于 37°C , $5\%\text{CO}_2$, 100% 空气湿度的培养箱中培养。 2 h 后将培养瓶中的细胞悬液置于未经多聚赖氨酸包被的培养瓶中。 2 h 后,将第一次差速贴壁完的细胞接种于经多聚赖氨酸的包被的培养瓶中, 24 h 后首次换液,之后每 2 d 换 1 次液。

1.4 骨骼肌卫星细胞传代培养

吸出培养瓶中的培养液,PBS清洗 2 次,弃去PBS。加入 0.25% 胰蛋白酶 2 ml , 37°C 消化 2 min ,并用巴氏吸管充分吹打瓶壁,待大部分细胞从瓶壁上脱落时,加入 1 ml 胎牛血清终止消化, $1\ 000$ 转/分离心 10 min 。弃上清,加生长培养液充分吹打制成细胞悬液后,接种到新的培养瓶中。

1.5 骨骼肌卫星细胞纯度鉴定

取第三代的细胞,将细胞密度调至 3×10^5 个/孔,接种于放有盖玻片 12 孔板内,将培养板置于 37°C , $5\%\text{CO}_2$, 100% 空气湿度细胞培养箱中培养 24 h 。取出 12 孔板,用PBS漂洗 3 次。 4% 多聚甲醛固定为 20 min ,用PBS漂洗 3 次, $3\text{ min}/\text{次}$ 。以 75% 、 85% 、 95% 浓度酒精依次脱水, $3\text{ min}/\text{次}$,用PBS漂洗 3 次, $3\text{ min}/\text{次}$ 。 $3\%\text{H}_2\text{O}_2$ 灭活内源性的过氧化物酶,室温浸泡 30 min ,用PBS漂洗 3 次, $3\text{ min}/\text{次}$ 。滴加 5% BSA封闭液,室温孵育 20 min ,除去多余液体。滴加一抗($1:100$ 稀释的横纹肌肌动蛋白抗体), 4°C 过夜,用PBS漂洗 3 次, $3\text{ min}/\text{次}$ 。滴加二抗(生物素化山羊抗小鼠IgG), 37°C 孵育 20 min ,用PBS漂洗 3 次, $3\text{ min}/\text{次}$ 。滴加复合SABC, 37°C 孵育 20 min ,PBS洗涤 3 次, $5\text{ min}/\text{次}$ 。DAB显色后,苏木素复染 2 min 。取出玻片,脱水,透明,封片。显微镜下观察,随机选取 6 个视野拍照,计算细胞纯度。细胞纯度(100%)=(细胞总数-阴性细胞数) $\div$ 细胞总核 $\times 100\%$ 。

1.6 骨骼肌卫星细胞的机械牵拉

取第三代细胞,将卫星细胞的密度调制 2×10^5 个/ml后种植在牵拉板,在牵拉板上继续培养 24 h 使细胞完全贴壁,然后对细胞以 1 Hz 的频率进行周期性机械牵拉。将细胞分组如下:

对照组(C):不施加任何牵拉;

5% 拉伸度 4 h 组($5\%\text{S }4\text{ h}$):以 5% 的机械牵拉强度牵拉 4 h ;

5% 拉伸度 6 h 组($5\%\text{S }6\text{ h}$):以 5% 的机械牵拉强度牵拉 6 h ;

15% 拉伸度 4 h 组($15\%\text{S }4\text{ h}$):以 15% 的机械牵拉强

度牵拉 4 h ;

15% 拉伸度 6 h 组($15\%\text{S }6\text{ h}$):以 15% 的机械牵拉强度牵拉 6 h 。

1.7 CCK-8检测骨骼肌卫星细胞的增殖

牵拉结束后放置培养箱中, 24 h 后换液,每孔加入 1 ml 生长培养液和 $100\text{ }\mu\text{l}$ CCK8溶液使其完全覆盖细胞,并轻轻摇晃均匀,孵育 2 h 后,将待测液加入 96 孔板中,以吸光度为 450 nm 测定OD值。

1.8 Western blotting

除去牵拉板中的生长培养液,用预冷的PBS清洗 3 次。在每孔中加入 $80\text{ }\mu\text{l}$ 细胞裂解液,静置于冰袋上,孵育 30 min ,用细胞刮板刮净,收取细胞。 4°C 离心机上 $12\ 000$ 转/分离心 20 min 。 -80°C 保存,待测。采用BCA法测定细胞的总蛋白含量后蛋白变性。然后进行 8% 的SDS-PAGE电泳,将目的条带转至PVDF膜,使用 5% 脱脂牛奶封闭,然后 4°C 孵育一抗过夜,TBST清洗后,室温孵育二抗 2 h ,ECL超敏试剂盒显影,扫描图片,分析蛋白相对表达量。

1.9 统计学分析

采用SPSS17.0软件,分析实验数据均以 $M\pm SD$ 表示。针对不同牵拉强度和牵拉时间的数据,先采用双因素方差分析,确定牵拉强度、牵拉时间是否产生独立作用或交互作用,针对不同因素产生的作用,进行Post Hoc组间两两比较,事后检验采用LSD法。采用独立样本 t 检验检测不同组别与C组的差异。 $P<0.05$ 为显著性差异, $P<0.01$ 为非常显著性差异。

2 实验结果

2.1 骨骼肌卫星细胞的形态学观察

A:骨骼肌卫星细胞贴壁 1 d ,细胞体积小,呈圆形,折光性强($40\times$);

B:骨骼肌卫星细胞贴壁 2 d ,部分细胞呈长梭形($40\times$);

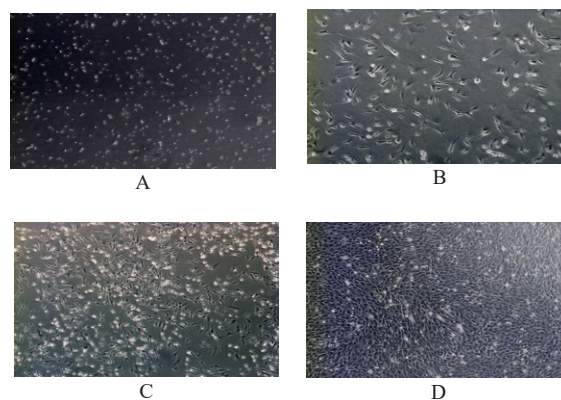


图1 骨骼肌卫星细胞的形态学观察

Figure 1. Morphological Observation of Skeletal Muscle Satellite Cells

C:骨骼肌卫星细胞贴壁4d,细胞增多,细胞体积变大,部分细胞呈梭形或多角形(40×);

D:骨骼肌卫星细胞贴壁6d,细胞明显增多,密集呈网状,相互融合(40×)。

2.2 骨骼肌卫星细胞的鉴定

本实验计数1 000个细胞,阴性细胞数为24个。

细胞纯度(100%)=(1 000-24)/1 000×100%=97.6%

细胞纯度≥95%,达到的纯化的要求。

2.3 不同机械牵拉强度对骨骼肌卫星细胞增殖的影响

如图2所示,双因素方差分析显示,不同的牵拉强度对骨骼肌卫星细胞增殖作用显著($P<0.05$)。15%牵拉强度比5%牵拉强度促增殖效果更好($P<0.01$)。

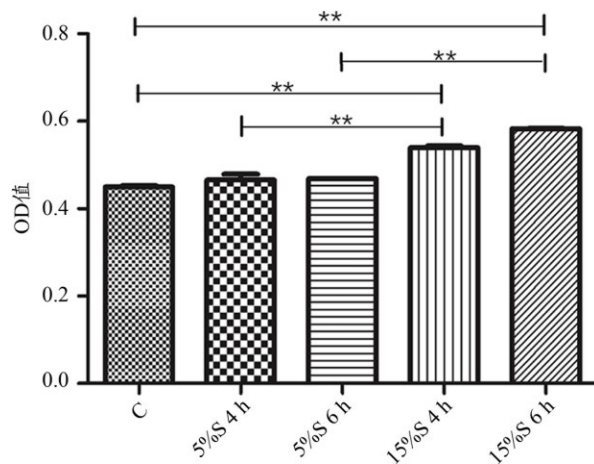


图2 机械牵拉对骨骼肌卫星细胞增殖的影响

Figure 2. Effects of Mechanical Stretch on the Proliferation of Skeletal Muscle Satellite Cells

与C组相比,15%S 4 h组和15%S 6 h组均能促进骨骼肌卫星细胞的增殖($P<0.01$),5%S 4 h组和5%S 6 h组的骨骼肌卫星细胞增殖没有显著性变化。

2.4 机械牵拉对骨骼肌卫星细胞增殖相关蛋白的影响

2.4.1 牵拉结束即刻Akt、P38、ERK、JNK的变化

如图3所示,不同牵拉强度对Akt、P38、JNK的磷酸化作用显著($P<0.05$)。与5%牵拉强度相比,15%牵拉强度活化Akt、P38、JNK效果更好($P<0.01$)。不同牵拉强度和牵拉时间均对ERK的磷酸化作用显著($P<0.01$),且两者之间出现交互作用($P<0.05$),ERK的磷酸化结果显示5%S 6 h vs 15%S 6 h($P<0.01$)、5%S 4 h vs 15%S 4 h($P<0.05$)、15%S 4 h vs 15%S 6 h($P<0.01$)、5%S 6 h vs 15%S 4 h($P<0.01$)。

15%S 4 h组和15%S 6 h组的Akt、P38、ERK、JNK的磷酸化在牵拉结束即刻显著高于C组($P<0.01$),5%S 4 h组和5% 6 h组的Akt、P38、ERK、JNK的磷酸化水平在牵拉结束即刻与C组相比未有显著变化。

2.4.2 牵拉结束24 h后Myf5和MyoD的蛋白表达

如图4,不同的牵拉强度和牵拉时间对Myf5和MyoD作

用不显著,且牵拉时间与牵拉强度之间没有出现交互作用。

如图4A,与C组相比,15%S 6 h组Myf5蛋白表达显著增加($P<0.01$),5%S 4 h组、5%S 6 h组、15%S 4 h组的Myf5蛋白表达均无显著性差异。如图4B,与C组相比,15%S 4 h组和15%S 6 h组的MyoD的蛋白表达显著增加($P<0.01$),5%S 4 h组、5%S 6 h组的MyoD的蛋白表达无显著变化。

2.4.3 牵拉结束24 h后Akt、P38、ERK、JNK的变化

不同牵拉强度和牵拉时间对Akt的磷酸化没有显著影响,但牵拉强度和牵拉时间的交互作用显著($P<0.05$),Akt的磷酸化结果显示5%S 6 h vs 15%S 6 h($P<0.01$)、15%S 4 h vs 15%S 6 h($P<0.05$)、15%S 6 h vs 5%S 4 h($P<0.01$)、5%S 6 h vs 15%S 4 h($P<0.05$)。不同牵拉强度和牵拉时间对P38、ERK和JNK的磷酸化没有显著影响,同时牵拉时间与牵拉强度之间均没有出现交互作用。

如图5,牵拉结束24 h后,15%S 4 h组和15%S 6 h组的Akt、P38、ERK、JNK的磷酸化显著高于C组($P<0.01$),5%S 4 h组和5%S 6 h组的Akt、P38、ERK和JNK的磷酸化未有显著性。

3 分析讨论

骨骼肌卫星细胞是肌源性干细胞,简称卫星细胞,具有极强的增殖能力。Mauro等(1961)首次从蛙的胫骨前肌中发现了位于肌膜与基膜之间的卫星细胞。此后,对卫星细胞进行了很多研究。在成年骨骼肌中,卫星细胞是静止的,疾病或者损伤等一些刺激,会激活静止的卫星细胞,卫星细胞通过不对称分裂方式,一部分分裂为活化的卫星细胞,来修复肌肉损伤,另一部分则补充卫星细胞池,以保持细胞池的相对稳定。

有研究表明,一次性力竭运动能够激活静息期的卫星细胞,但不足以诱导其分化(Snijders et al., 2012);短期的抗阻运动能够使卫星细胞数目的增加,以及肌纤维肥大(Kadi et al., 2004);长期的力量训练能使肌细胞核和卫星细胞的数目增加,并且使肌纤维横截面积增大(Snijders et al., 2009)。这些研究均证实,运动可以通过激活骨骼肌中的卫星细胞,进而促进肌肉的肥大。机械牵拉通过模拟运动的方式,已在多种细胞研究中被应用,例如骨髓间充质干细胞、C2C12细胞、心肌细胞、骨细胞等。其中,骨骼肌卫星细胞对机械牵拉反应相当敏感,有学者发现,机械牵拉能够导致卫星细胞活化和增殖。许多可以调节机械转导的细胞因子也参与了卫星细胞活化(Thornell et al., 2003; Wang et al., 2006)。有关机械牵拉促进卫星细胞增殖的作用机制尚未研究透彻,现在的大多数研究使用成肌细胞系而不是原代培养的卫星细胞来探究机械牵拉在调节肌生成中的作用(Chen et al., 2007; Kumar et al., 2004)。本实验通过体外提取具有干细胞功能的骨骼肌

卫星细胞,而不是使用被转化的细胞系,能更好的分析关

于机械牵拉介导的肌生成的调节机制。

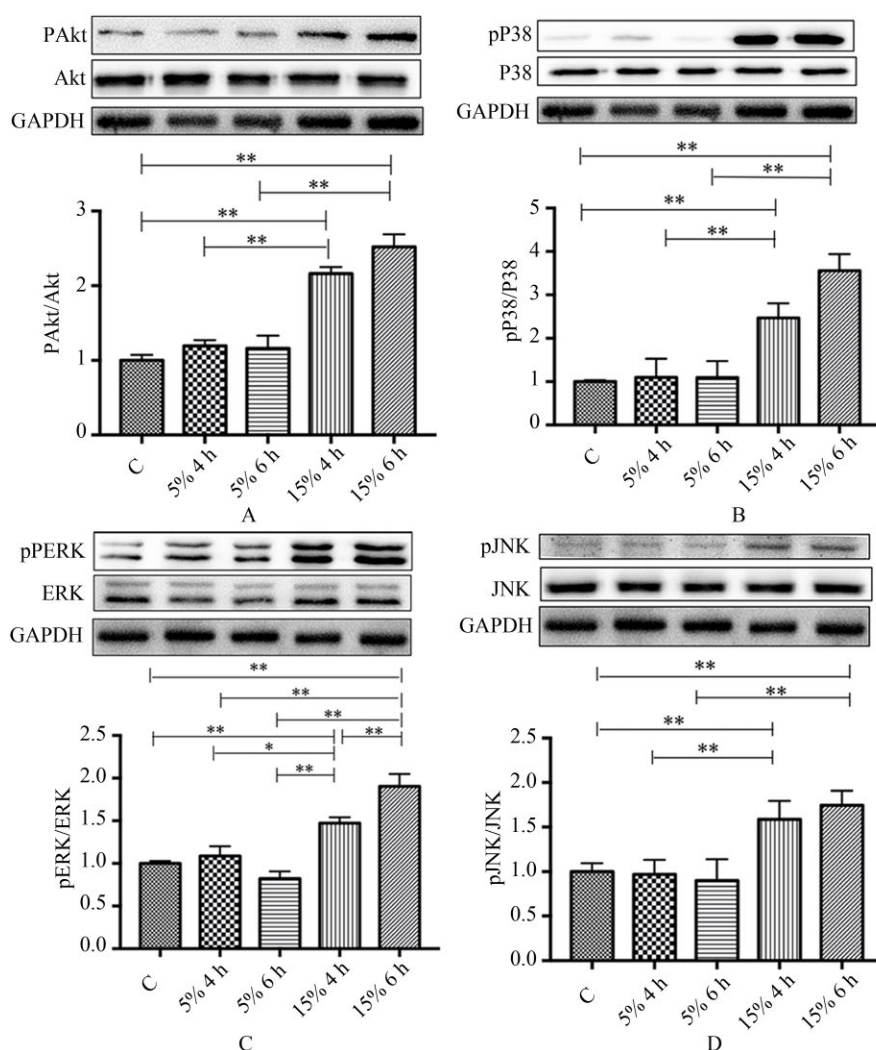


图3 机械牵拉结束即刻骨骼肌卫星细胞增殖相关通路的变化

Figure 3. Changes of Signaling Pathways Associated with the Proliferation of Stretch of Skeletal Muscle Satellite Cells Immediately after Mechanical Stretch

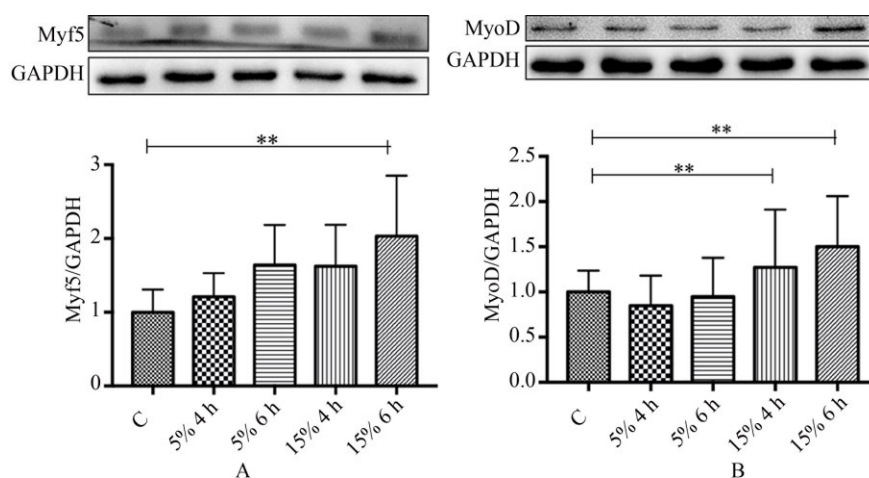


图4 机械牵拉结束24 h后骨骼肌卫星细胞增殖相关蛋白的变化

Figure 4. Changes of Protein Expressions Associated with the Proliferation of Stretch of Skeletal Muscle Satellite Cells at 24 Hours after Mechanical Stretch

3.1 机械牵拉对骨骼肌卫星细胞增殖的影响

有研究显示,细胞对牵拉的反应与牵拉程度有关,如

5%强度周期性牵拉能促进角膜成纤维细胞的增殖,但是抑制迁移(Suetta et al., 2010);15%的强度持续牵拉膀胱

平滑肌细胞, 细胞的收缩功能先下降后上升 (Honsho et al., 2009); 结缔组织细胞培养后, 给予其 10% 强度、4 h 的牵拉后, 可引起细胞增殖 (Hatton et al., 2003)。机械刺激

可以促进大鼠肌腱干细胞的分化, 4%、2 Hz 牵拉 24 h 促进成腱分化, 8%、1 Hz 牵拉 24 h 促进成骨分化, 8%、2 Hz 牵拉 48 h 促进成脂肪分化 (李跑等, 2017)。

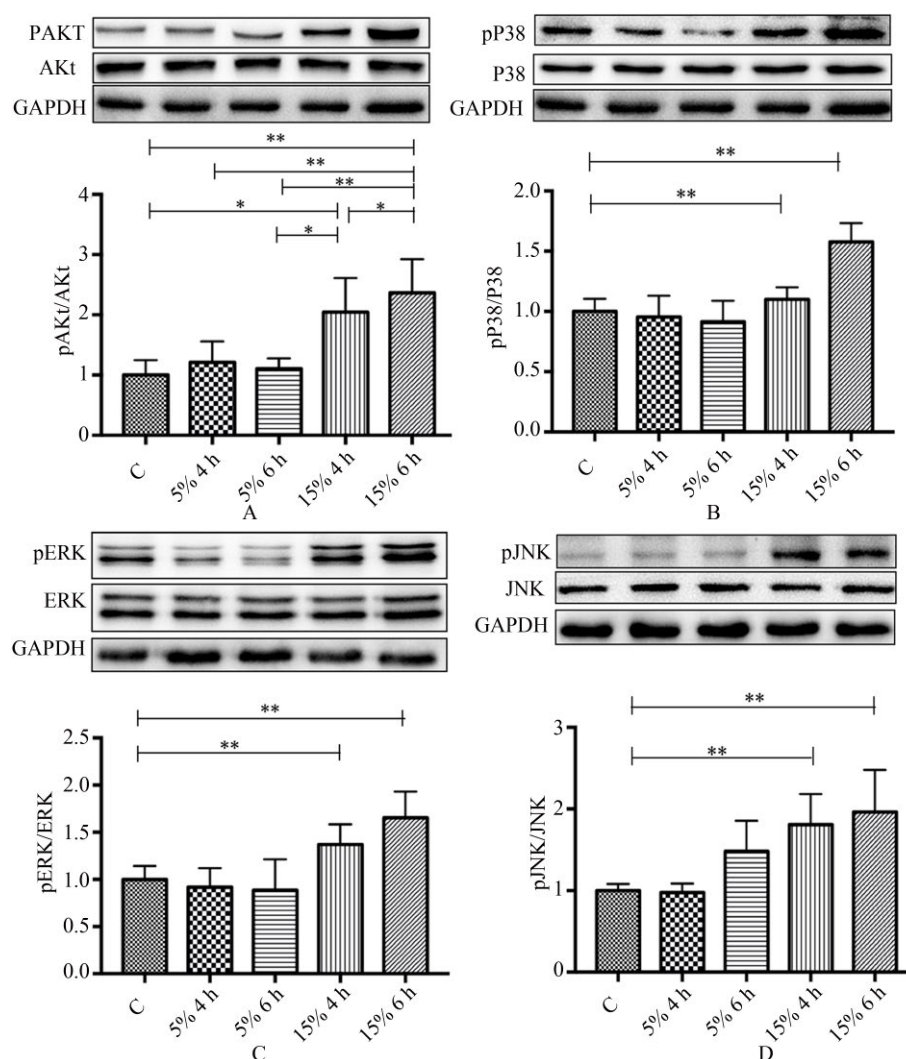


图5 机械牵拉结束 24 h 后骨骼肌卫星细胞增殖相关通路的变化

Figure 5. Changes of Signaling Pathways Associated with the Proliferation of Stretch of Skeletal Muscle Satellite Cells at 24 Hours after Mechanical Stretch

有关机械牵拉对骨骼肌卫星细胞影响的研究发现, 10% 的周期性牵拉能够促进牛肌卫星细胞的增殖并抑制其分化 (Kook et al., 2008); 同样, 史仍飞等 (2012) 发现 5%、15%、25% 的拉伸度, 频率为 1 Hz 的周期性牵拉都能促进大鼠骨骼肌卫星细胞的增殖, 其中以 15% 牵拉强度的增殖效果最为显著, 我们所得到的结果与上述的结果相一致。我们通过对肌卫星细胞施加 1 Hz、拉伸度为 5% 和 15%、牵拉时间为 4 h 和 6 h 的的周期性牵拉, 在牵拉结束 24 h 后, 采用 CCK8 比色法检测增殖情况, 发现不同牵拉强度对骨骼肌卫星细胞增殖作用显著, 15% 牵拉强度比 5% 牵拉强度促增殖效果更好, 说明在同牵拉时间 (4 h, 6 h) 和频率 (1 HZ) 的条件下, 一定范围内增加牵拉强度, 能起到促进骨骼肌卫星细胞增殖的作用。综上所述, 机械牵拉对骨骼肌卫星细胞的增殖作用与牵拉强度存在相

关性。15% 的牵拉度可以使肌卫星细胞的增殖能力显著提高, 而 5% 的拉伸度对肌卫星细胞没有促增殖作用。有其它研究发现 5% 的拉伸度能够促进细胞的增殖, 这与我们得出的结论不一样, 推测可能是由于机械牵拉对细胞的影响会根据细胞种类、种属来源的不同而有所不同 (Bullard et al., 2007; Zhao et al., 2016)。

3.2 机械牵拉可能通过调控 MyoD 和 Myf5 的表达来促进卫星细胞的增殖

骨骼肌的生成依赖生肌调节因子 (MRFs) 家族的参与。Myf5 和 MyoD 是 MRFs 中的成员, 在肌肉早期发育、形成过程中起着重要的作用 (陶志云等, 2012)。实验发现, 单独敲除 MyoD 基因, 出生的小鼠会有正常肌肉的形成, 当同时去除 MyoD 和 Myf5 时, 小鼠无肌肉形成 (Rudnicki et al., 1994)。Myf5 是参与肌细胞增殖、分化、肌纤维形成过

程中最早表达的因子,Myf5一旦被激活,MRFs家族的其他因子将相继被激活,整个肌肉发育过程才能完整而顺利的进行下去。Cooper等(1999)通过实验证实,小鼠骨骼肌再生时,肌卫星细胞激活早期MyoD基因,在所有增殖的肌卫星细胞中,MyoD也都显著表达,因此在成体骨骼肌中,MyoD被认为是卫星细胞激活的一个很好的标志。活化的骨骼肌卫星细胞中会有MyoD和Myf5的表达,在卫星细胞增殖的过程中,MyoD和Myf5的蛋白表达增加。本实验结果发现,不同的牵拉强度和牵拉时间对Myf5和MyoD作用不显著,说明MyoD和Myf5的蛋白表达对牵拉时间和牵拉强度的变化没有依赖性。拉伸度为15%,在牵拉4h和6h后24h时,MyoD蛋白表达显著增高,说明卫星细胞被大量激活,进入增殖状态,这与CCK8测得的结果相符;Myf5的蛋白表达在拉伸度为15%,牵拉6h也显著增高。而拉伸度为15%,牵拉4h未增高,这与CCK8结果并不统一,本实验选取检测Myf5蛋白表达的时间点是牵拉结束24h,并未检测牵拉结束24h以内以及牵拉结束24h以后Myf5蛋白表达的变化,推测出现此种结果的原因可能是Myf5的蛋白表达处于升高阶段,还未到达峰值,具体原因需通过进一步实验来获取。

3.3 机械牵拉可能通过调控Akt、P38、ERK、JNK通路来调节骨骼肌卫星细胞增殖

PI3K/Akt/mTOR通路是影响蛋白变化的关键通路,并且参与机械牵拉引起细胞增殖的过程。Akt是PI3K下游的关键效应分子,Akt被激活后,磷酸化水平升高,进而激活下游的mTOR,促进肌肉的合成(Rommel et al., 2001)。一定程度的机械牵拉能够通过活化Akt的途径来促进心肌的肥大;有研究表明,10%的拉伸度能显著提高血管平滑肌的Akt活性,并且这种变化对时间有依赖性(Won et al., 2013);相同的,15%的拉伸度牵拉主动脉平滑肌,持续6h,能激活PI3K/Akt通路(Liu et al., 2015)。Akt的活化被证实与肌肉的存活和凋亡密切相关,机械牵拉引起骨骼肌的质量改变也是通过PI3K/Akt/mTOR这条通路介导的(Chen et al., 2014)。对C2C12细胞进行周期性牵拉仅30min,就能引起mTOR下游蛋白p70S6K的磷酸化,进而促进肌肉的合成(Alexander et al., 2004)。由此可以推测,机械牵拉促进骨骼肌卫星细胞的增殖作用可能是通过PI3K/Akt/mTOR/p70S6K这条通路介导的。

MAPK(丝裂素活化蛋白激酶)通路是参与细胞应激和损伤反应的主要信号通路,能将多种细胞外刺激产生的信号从细胞膜外传递到细胞核内,在细胞的增殖、分化和对外环境应激中起着非常重要的作用(Amiram et al., 2013)。在哺乳动物体内主要有ERK通路、JNK通路和P38通路,这些信号的传导对细胞调节具有重要的影响。ERK通路是MAPK家族中研究最早的通路,许多细胞外刺激可以激活ERK通路,以Ras/Raf/MEK/ERK这条通路最为常见,活化后的ERK移动到细胞核,活化众多与细胞功能

相关的转录因子,进而对细胞进行调控。JNK通路可被多种因子激活,例如,LPS、TNF- α 、JNK可从胞浆进入细胞核,与转录因子结合,调控细胞相关基因的表达(Weston et al., 2002)。P38通路被认为是MAPK家族中最经典的通路,P38一般位于静止细胞的胞质和胞核,被激活后形成pP38,进而激活多种转录因子,诱导细胞表面基因表达,加速蛋白合成和细胞骨架重构(Chen et al., 2011)。

机械牵拉能够通过激活细胞内的MAPK通路,来促进蛋白的合成。15%拉伸度的机械牵拉可以激活C2C12细胞中P38、ERK、JNK的磷酸化(Nakai et al., 2010);人的成纤维细胞接受10%的机械牵拉后,P38的活化显著增高;有关大鼠平滑肌的调查发现,20%的拉伸度牵拉5~10min就可以使P38和JNK的活性显著升高(Xu et al., 2012);对牛内皮细胞进行周期性拉伸,JNK、ERK和P38的磷酸化水平都显著升高(Kito et al., 2000)。这些结果都表明,MAPK家族在机械牵拉调控的细胞增殖中具有重要的作用。

本实验中,在牵拉结束即刻,不同牵拉强度对Akt、P38、JNK的磷酸化作用显著。与5%牵拉强度相比,15%牵拉强度活化Akt、P38、JNK效果更好,说明在同牵拉时间(4h,6h)和频率(1Hz)的条件下,一定范围内增加牵拉强度能使Akt、P38、JNK活化增加;不同牵拉强度和牵拉时间均对ERK的磷酸化作用显著,推测ERK通路的活化对牵拉强度与牵拉时间的变化均有依赖性,在同牵拉时间(4h,6h)和频率(1Hz)的条件下,一定范围内增加牵拉强度,或者同牵拉强度(5%,15%)和频率(1Hz)的条件下,一定范围内延长牵拉时间,可能使ERK的活化增加。5%S4h组和15%S6h组的Akt、P38、ERK、JNK的磷酸化显著高于C组。由此可以看出,在牵拉结束即刻这个时间点,骨骼肌卫星细胞内与增殖相关的部分蛋白磷酸化就已升高,根据牵拉结束24h后,15%S4h组和15%S6h组的Akt、P38、ERK、JNK的磷酸化依然显著高于C组的结果,可推测,与骨骼肌卫星细胞增殖相关的磷酸化蛋白在牵拉即刻就可开始升高,部分蛋白的磷酸化可能持续增高直到牵拉结束24h后。当然也有截然不同的研究结果,通过培养大鼠膀胱平滑肌细胞后进行牵拉发现,机械牵拉对与细胞生长密切相关的ERK通路无关,而与P38通路和JNK通路密切相关(Nguyen et al., 2000)。机械牵拉使牛的肌卫星细胞中ERK的磷酸化水平显著增高,而P38的磷酸化水平呈降低的趋势。这些都有可能是由于细胞的类型或者是种属的不同,而产生不同的结果。

本实验的结果表明,15%拉伸度牵拉4h和6h,均可以骨骼肌卫星细胞的增殖,在牵拉结束即刻Akt、P38、ERK、JNK的活性已经显著升高,并且在牵拉结束24h后,Akt、P38、ERK、JNK的活性依然呈现显著升高的状态。以往的研究只是对选取某个时间点进行研究,而本研究选

取了牵拉结束即刻和牵拉结束 24 h 后这 2 个时间点进行比较,能更好的探究与骨骼肌卫星细胞增殖相关的通路蛋白的变化,这也是本文的创新点。由于条件限制,本研究并未使用各个通路蛋白的特异性抑制剂进行研究,也没有检测各个通路下游蛋白的表达,因此只能得出初步结论。

4 结论

1) 15% 的拉伸度,牵拉 4 h 和 6 h 可以促进体外培养的大鼠骨骼肌卫星细胞增殖。

2) 机械牵拉可能是通过激活 Akt、P38、ERK、JNK 这些通路来促进骨骼肌卫星细胞增殖的。

参考文献:

- 李跑,高尚,周梅,等,2017.不同机械牵伸条件对大鼠肌腱干细胞分化的影响[J].中国修复重建外科杂志,(4):481-488.
- 史仍飞,刘子青,袁海平,等,2012.机械生长因子对骨骼肌卫星细胞增殖及MGFmRNA表达的影响[J].临床医学工程,19(1):18-21.
- 陶志云,邹剑敏,宋迟,等,2012.鸭胚骨骼肌卫星细胞调节因子MyoD1和Myf5发育性变化研究[J].中国家禽,34(17):16-19.
- ALEXANDER L D, ALAGARSAMY S, DOUGLAS J G, 2004. Cyclic stretch-induced cPLA 2, mediates ERK 1/2 signaling in rabbit proximal tubule cells[J]. *Kidney Int*, 65(2): 551-563.
- AMIRAM A, ORLY T, 2013. Hanging in the balance: Endogenous anti-inflammatory mechanisms in tissue repair and fibrosis [J]. *J Pathol*, 229(2): 250-63.
- BULLARD T A, HASTINGS J L, DAVIS J M, et al., 2007. Altered PKC expression and phosphorylation in response to the nature, direction, and magnitude of mechanical stretch [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 85(2): 243-250.
- CHEN J, ALBERTS I, LI X, 2014. Dysregulation of the IGF-1/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders[J]. *Int J Dev Neurosci*, 35(6): 35-41.
- CHEN S E, JIN B, LI Y P, 2007. TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(5): C1660-C1671.
- CHEN Y T, WEI J D, WANG J P, et al., 2011. Isolation of mesenchymal stem cells from human ligamentum flavum: Implicating etiology of ligamentum flavum hypertrophy [J]. *Spine*, 36(18): E1193-200.
- COOPER R N, TAJBAKHS S, MOULY V, et al., 1999. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle[J]. *J Cell Sci*, 112 (Pt 17): 2895.
- KADI F, SCHJERLING P, ANDERSEN L L, et al., 2004. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles[J]. *J Physiol*, 558(3): 1005-1012.
- HATTON J P, POORAN M, LI C F, et al., 2003. A short pulse of mechanical force induces gene expression and growth in MC3T3-E1 osteoblasts via an ERK 1/2 pathway [J]. *J Bone Mineral Res*, 18 (1): 58-66.
- HERRIDGE M S, CHEUNG A M, TANSEY C M, et al., 2003. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome [J]. *New England J Med*, 348(21): 49-50.
- HONSHO S, NISHIKAWA S, AMANO K, et al., 2009. Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways[J]. *Circ Res*, 105 (11): 1149-1158.
- KITO H, CHEN E L, WANG X, et al., 2000. Role of mitogen-activated protein kinases in pulmonary endothelial cells exposed to cyclic strain[J]. *J Appl Physiol*, 89(6): 2391-2400.
- KOOK S H, SON Y O, CHOI K C, et al., 2008. Cyclic mechanical stress suppresses myogenic differentiation of adult bovine satellite cells through activation of extracellular signal-regulated kinase [J]. *Mol Cell Biochem*, 309(1-2): 133-141.
- KUMAR A, MURPHY R, ROBINSON P, et al., 2004. Cyclic mechanical strain inhibits skeletal myogenesis through activation of focal adhesion kinase, Rac-1 GTPase, and NF- κ B transcription factor[J]. *Faseb J*, 18(13): 1524-1535.
- LIU X, HUANG X, CHEN L, et al., 2015. Mechanical stretch promotes matrix metalloproteinase-2 and prolyl-4-hydroxylase α 1 production in human aortic smooth muscle cells via Akt-p38 MAPK-JNK signaling[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 62: 15-23.
- MAURO A, 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers [J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 9(2): 493-495.
- NAKAI N, KAWANO F, OKE Y, et al., 2010. Mechanical stretch activates signaling events for protein translation initiation and elongation in C2C12 myoblasts[J]. *Mol Cells*, 30(6): 513-518.
- NGUYEN H T, ADAM R M, BRIDE S H, et al., 2000. Cyclic stretch activates p38 SAPK2-, ErbB2-, and AT1-dependent signaling in bladder smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(4): 1155-1167.
- PALLAFACCHINA G, BLAAUW B, SCHIAFFINO S, 2013. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 23: S12-S18.
- ROMMEL C, BODINE S C, CLARKE B A, et al., 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways[J]. *Nat Cell Biol*, 3(11): 1009.
- RUDNICKI M A, SCHNEGELSBERG P N J, STEAD R H, et al., 1994. Rudnicki, M. A. et al. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle[J]. *Cell*, 75(7): 1351-1359.
- SNIJDERS T, VERDIJK L B, BEELEN M, et al., 2012. A single bout of exercise activates skeletal muscle satellite cells during subsequent overnight recovery[J]. *Exp Physiol*, 97(6): 762-773.
- SNIJDERS T, VERDIJK L B, VAN LOON L J, 2009. The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells[J]. *Ageing Res Rev*, 8(4): 328-338.
- SUETTA C, CLEMMENSEN C, ANDERSEN J L, et al., 2010. Coordinated increase in skeletal muscle fiber area and expression of IGF-I with resistance exercise in elderly post-operative patients[J]. *Growth Horm Igf Res*, 20(2): 134-140.
- THORNELL L E, LINDSTRÖM M, RENAULT V, et al., 2003. Satellite cells and training in the elderly [J]. *Scand J Med Sci Sports*, 13(1): 48-55.
- WANG J H, THAMPATTY B P, 2006. An introductory review of cell mechanobiology[J]. *Biomech Model Mechan*, 5(1): 1-16.
- WESTON C R, DAVIS R J, 2002. The JNK signal transduction

- pathway[J]. Curr Opin Genet Dev, 12(1): 14-21.
- WON S K, JIN L S, HAK K Y, et al., 2013. Mechanical stretch increases MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via activation of PDGFR- β /Akt signaling pathway[J]. PloS One, 8(8): e70437.
- XU G N, YANG K, XU Z P, et al., 2012. Protective effects of anisodamine on cigarette smoke extract-induced airway smooth muscle cell proliferation and tracheal contractility[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 262(1): 70-79.
- ZHAO C, LI Y, WANG X, et al., 2016. The effect of uniaxial mechanical stretch on Wnt/ β -catenin pathway in bone mesenchymal stem cells[J]. J Craniofac Surg, 28(1): 113-117.

The Effects and Mechanisms of Mechanical Stretch on the Proliferation of Satellite Cells in Rat Skeletal Muscle

YANG Lu, LU Yaofei*

Shanghai University of Sport, Department of Kinesiology, Shanghai 200438, China

Abstract: Objective: To investigate the effects and mechanisms of different traction modes on the proliferation of rat skeletal muscle satellite cells. Methods: Satellite cells were isolated and purified by two-step enzymatic digestion and differential adherence centrifugation. The third generation satellite cells were collected and a Flex cell pulling system was used to stretch the cells at a frequency of 1 Hz, and 5% and 15% stretches for 4 h and 6 h, respectively. The CCK-8 was used to detect the proliferation of satellite cells at 24 hours after the stretch; the activity of Akt, P38, ERK and JNK was detected immediately after the stretch and at 24 hours after the stretch, and the expression of Myf5 and MyoD was also detected at 24 hours after the stretch. Result: 1) Compared with the control group (no stretch, the same below), 15% stretch for 4 h or 6 h was increased the proliferation of skeletal muscle satellite cell ($P<0.01$), but the 5% stretch for 4 h or 6 h had was no significant proliferation ($P>0.05$); 2) A higher protein expression in Myf5 was observed after 15% stretch for 6 h than that of the control group ($P<0.01$), and the protein expression of MyoD at 4 h and 6 h was both higher than that of the control group ($P<0.01$). However, no significant difference was observed in the expression of MyoD and Myf5 after 5% stretch for 4 h or 6 h compared with the control group ($P>0.05$); 3) Immediately and 24 hours after traction: The activities of Akt, P38, ERK and JNK after 15% stretch for 4 h or 6 h were higher than those in the control group ($P<0.01$; $P<0.05$). However, no significant difference was observed in the activities of Akt, P38, ERK and JNK after 5% stretch for 4 h or 6 h against the control group. There was no significant change ($P>0.05$). Conclusion: Mechanical traction with 15% stretch can promote the proliferation of skeletal muscle satellite cells, which may be achieved by activating Akt, P38, ERK, JNK pathways.

Keywords: mechanical stretch; muscle satellite cells; proliferation; signaling pathway

