

文章编号: 1004-7220(2016)02-0112-05

周期性机械牵张刺激对C₂C₁₂小鼠成肌细胞增殖和有氧代谢能力的影响

胡晓馨, 达 忱, 黄东洋, 田向阳, 史仍飞

(上海体育学院 运动科学学院, 上海 200438)

摘要: 目的 探讨不同频率牵张刺激对 C₂C₁₂小鼠成肌细胞增殖及细胞有氧代谢能力的影响。方法 采用 Flexercell 细胞应力加载装置对体外培养的 C₂C₁₂成肌细胞分别加载 1、2 Hz 不同频率的牵张刺激,牵张幅度为 15%,牵张时长为 2 h/d,连续进行 4 d。以静置培养的 C₂C₁₂成肌细胞作为对照组。实验期间通过倒置相差显微镜观察细胞生长状态,利用 CCK-8 试剂盒测定细胞增殖情况。实验结束后,分别收取各组细胞,经胰酶消化处理,然后利用荧光探针,通过能量代谢设备检测细胞耗氧量比率。结果 细胞经机械牵张刺激后,显微镜下细胞形态为典型的长梭形,排列呈现一定方向性,与牵张刺激方向平行,生长状况良好;与对照组细胞相比,1、2 Hz 频率牵张刺激均可显著促进细胞增殖($P < 0.05$),且在第 3、4 d,1 Hz 实验组的增殖情况优于 2 Hz 实验组;实验组与对照组细胞耗氧量比率均有增加,但各组之间并无显著差异($P > 0.05$)。结论 周期性机械牵张刺激能有效促进 C₂C₁₂小鼠成肌细胞增殖,且与牵张刺激的频率有关,其中 1 Hz 的牵张频率最佳,但牵张刺激对 C₂C₁₂小鼠成肌细胞的有氧代谢能力无明显影响。

关键词: 机械牵张; 刺激; 细胞增殖; 有氧代谢

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.02.112

Effects of cyclic mechanical stretch stimulation on proliferation and aerobic capacity of C₂C₁₂ myoblasts

HU Xiao-pan, DA Chen, HUANG Dong-yang, TIAN Xiang-yang, SHI Reng-fei (School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of mechanical stretch at different frequencies on proliferation and aerobic capacity of mice myoblast cells C₂C₁₂. **Methods** C₂C₁₂ cells cultured *in vivo* were exposed to mechanical strain with the magnitude of 15% at the frequency of 1 Hz and 2 Hz, respectively, for 2 hours per day over a period of 4 days by using Flexercell Cell Tension System, while in control group C₂C₁₂ cells were cultured statically. The C₂C₁₂ cells were observed by inverted phase contrast microscope. CCK-8 Cell Counting Kit was used to estimate the proliferation of cells. After the experiment, the cells from both groups were obtained by trypsin digestion. MitoXpress-Xtra system with oxygen sensitive probe was introduced to detect the extracellular oxygen consumption level. **Results** The morphology of C₂C₁₂ cells presented a typical long spindle under the microscope following the mechanical stretch stimulation. The cells were arranged in a certain direction, parallel to the direction of tension stimulation and growing in good condition. Compared with the control group, the cell numbers in both 1 Hz group and 2 Hz group were significantly increased ($P < 0.05$). At the 3rd and 4th day, the number of cells in 1 Hz group significantly increased more than that in 2 Hz group. However, the oxygen consumption capacity increased in both experimental groups and the control group, but no significant difference was found in be-

收稿日期:2015-10-26; 修回日期:2015-12-09

基金项目:上海市科委能力建设(1290503000),国家自然科学基金项目(31371197)。

通信作者:史仍飞,副教授,Tel:(021)51253247;E-mail:rfshi@sus.edu.cn。

tween ($P > 0.05$). **Conclusions** Cyclic mechanical stretch stimulation can effectively induce proliferation of C₂C₁₂ cells, which is related to the frequency of mechanical stretch, with the frequency of 1 Hz being optimum. But stretch stimulation has no significant impact on the aerobic ability of C₂C₁₂ cells.

Key words: Mechanical stretch; Stimulation; Cell proliferation; Aerobic metabolism

运动和力学负荷刺激在改善骨骼肌质量及代谢中发挥重要作用^[1]。基于这一现象,国内外进行了大量关于牵张刺激或力学负荷对细胞生长影响的研究,其中 C₂C₁₂小鼠成肌细胞是研究肌卫星细胞功能的主要细胞体系。研究发现,力学刺激能够调节细胞的新陈代谢和基因表达过程^[2];肌卫星细胞在本身遗传特性的基础上,通过各种条件的诱导,可以选择性地激活、增殖及分化,从而使肌纤维发生改变^[3]。

近年来,有关牵张应力对骨骼肌细胞影响的理论相继提出^[4-5],主要围绕组织器官水平,如力学刺激能直接影响骨骼肌的生长与代谢状况,并且与机械刺激的环境参数有关^[6];运动训练中,肌肉活动程度的差异可以影响骨骼肌酶的活性^[7]。这些实验成果为研究牵张刺激对骨骼肌细胞代谢能力的影响以及探讨不同频率牵张刺激对骨骼肌卫星细胞产生作用的机制及两者之间的关系奠定了坚实基础。

鉴于实验技术和检测方法的滞后,目前关于周期性机械刺激与细胞代谢的研究相对较少。本文采用细胞应力加载装置对 C₂C₁₂小鼠成肌细胞施加不同频率的牵张应力,并通过特殊的细胞能量代谢设备对细胞外氧消耗水平进行检测,评价细胞的有氧代谢能力。本研究工作的开展为探讨运动改善肌细胞代谢以及周期性机械牵张刺激与细胞代谢之间的关系提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM 胎牛血清、DMEM 培养基(Gibco 公司,美国);青霉素 G 钠和链霉素(上海生工);胰蛋白酶(Sigma 公司,美国);青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 μg/mL;CCK-8 试剂盒(碧云天生物公司)。

1.2 主要仪器和实验器材

CO₂ 细胞培养箱(Thermo 公司,美国),倒置显微镜(Leica 公司,德国),96 孔板,6 孔柔性细胞培养板,BIO-RAD 酶标仪(Bio-Rad 公司,美国),超净工作台(苏州净化设备厂),高速离心机(上海医用

仪器厂),15、50 mL 塑料离心管,细胞应力加载装置(Flexercell 5000 cell stretching unit, Flexercell 公司,美国),MitoXpress-Xtra 耗氧检测仪(BMG Labtech 公司,德国)。

1.3 细胞培养及力学刺激

C₂C₁₂小鼠成肌细胞株培养于含有 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱(MCO-15AC, SANYO 公司,日本)中,隔天换液 1 次,待细胞增殖达 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,以 1:2 比例进行传代培养。将细胞接种于 Bioflex 6 孔培养板,每孔接种 1 mL(接种密度为 1×10^4 /mL)。

1.4 细胞力学加载

细胞力学加载使用 Flexcell-5000 细胞应力加载装置,其加载原理是使用一个真空泵和储变气压系统,抽吸由弹性硅胶膜制成的培养皿底部,形成负压,使培养皿底部产生拉伸变形,从而使贴壁生长的细胞受到力学刺激。该系统通过自身研制的 FlexSoftFX-5000TM 软件和 FX5KTMTension FlexLink 应力加载控制器对应压力的加载大小、作用频率和持续时间进行智能定量调控。实验组 C₂C₁₂成肌细胞施加 1、2 Hz 两种不同频率的牵张刺激,牵张时长为 2 h/d,连续进行 4 d;对照组培养条件和实验组相同,但不进行力学牵张刺激。每组实验重复 3 次。

1.5 CCK-8 测定各组细胞增殖能力

按照试剂盒操作说明,吸出培养板中的培养液,向 96 孔板中接种细胞悬液,以 1:1 的比例加入细胞液与培养液共 110 μL,随后加入 20 μL/孔 CCK-8 试剂,混匀,将 96 孔板在培养箱中孵育 1 h,用 BIO-RAD 酶标仪测定 OD 值,吸光度为 450 nm。鉴于 CCK-8 对细胞的无损伤性,在原培养板加入培养液继续培养。

1.6 耗氧能力检测

应用含氧敏感性的荧光探针 Luxcel MitoXpress-Xtra Oxygen Consumption Assay(HS)检测细胞耗氧量。MitoXpress-Xtra 探针的荧光信号在氧含量的调节下,随着耗氧量的增加,荧光信号会随之增强;最佳检测波长为:激发波长 340 nm,发射波长 642 nm,

延迟时间分别为 30、70 μs , 检测时间窗均为 30 μs 。用公式

$$\text{life time} = (D_2 - D_1) / \ln(W_1 / W_2)$$

计算荧光寿命。其中: D_1 、 D_2 分别为延迟时间; W_1 、 W_2 分别为测量出的荧光强度。细胞耗氧量比率 (oxygen consumption rate, OCR) 通过评价探针信号增强率来测量, 即荧光寿命曲线斜率为计算的 OCR (见图 1)。

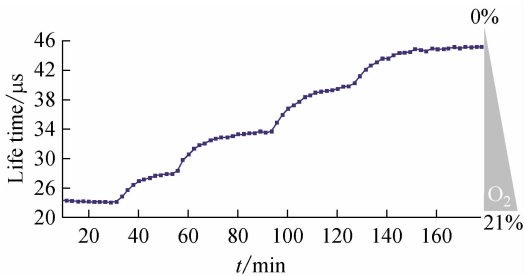
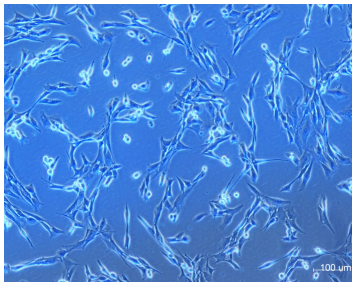
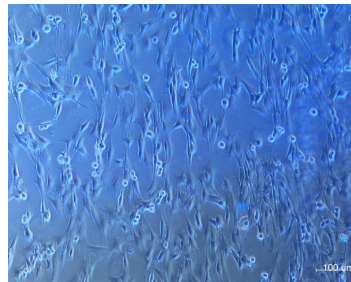


图1 荧光寿命检测曲线图

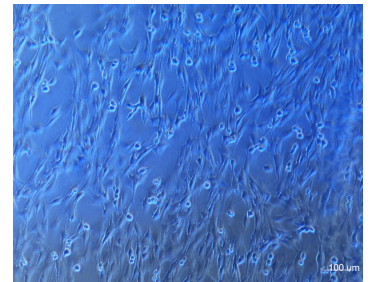
Fig.1 Fluorescence life time curve



(a) 对照组



(b) 1 Hz 组



(c) 2 Hz 组

图2 各组 C_2C_{12} 成肌细胞形态图片 (20X)

Fig.2 Morphology of C_2C_{12} cells in each group (20X) (a) Control group, (b) 1 Hz group, (c) 2 Hz group

2.2 周期性力学牵张刺激促进 C_2C_{12} 细胞增殖

CCK-8 试剂盒是一种基于 WST-8 的产品, 后者类似于噻唑蓝 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT], 可反映细胞能量代谢情况, 其生成量与细胞数成正比, 故可以用酶标仪测定其含量 (OD 值) 来检测细胞增殖能力。随着细胞培养时间的延长, C_2C_{12} 细胞数目逐渐增加, 尤其是从第 3 d 开始, 实验组 OD 值均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 表明牵张刺激促进细胞增殖 (见图 3)。

2.3 牵张刺激不影响 C_2C_{12} 细胞氧消耗能力

采用 FX5000T 应力加载系统对体外培养的小鼠成肌细胞施加 1、2 Hz 两种频率的牵张刺激, 对照组不施加牵张应力, 连续培养 4 d, 共 8 h 后采集检测

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件和 Excel 软件对数据进行处理分析。数据以均数 \pm 标准差表示, 各实验组与对照组比较采用独立样本 t 检验; 各实验组间以及对照组各时间点间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验; 显著性水平为 $P < 0.05$, 非常显著性水平为 $P < 0.01$ 。

2 实验结果

2.1 周期性力学牵张刺激对 C_2C_{12} 细胞形态影响

在倒置显微镜下观察实验组每次接受牵张刺激后细胞形态与对照组之间的区别。实验组 C_2C_{12} 成肌细胞贴壁后呈梭形及多角形, 对照组和实验组体外培养 C_2C_{12} 成肌细胞均发生增殖, 生长状况良好 [见图 2(a)]。机械牵张后, 细胞排列呈现规律性, 且有一定方向性, 与牵张方向一致, 排列更为紧密 [见图 2(b)、(c)]。

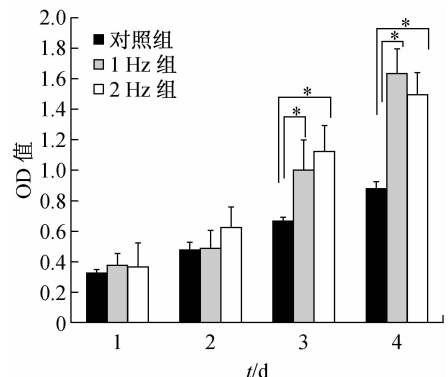


图3 各组细胞不同时间增殖情况对比 (* $P < 0.05$, 与对照组相比)
Fig.3 Comparison of cell proliferation in each group at different time

得出: 实验组与对照荧光寿命值均随时间延长增加,

但实验组与对照组总体上的差异不具有显著性 ($P > 0.05$),表明细胞受到 1、2 Hz 牵张刺激后,氧消耗功能并未发生明显改变,即受被动运动的实验组细胞外氧代谢水平没有显著升高(见图 4),没有提高细胞的有氧代谢能力(见图 5)。

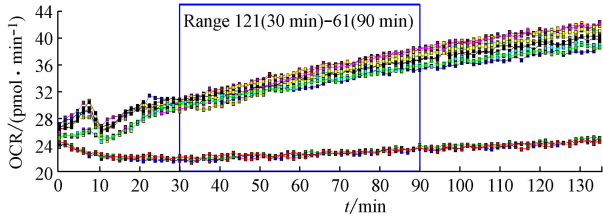


图 4 牵张刺激后 C₂C₁₂细胞耗氧率随时间变化曲线

Fig. 4 Variation of oxygen consumption rate of C₂C₁₂ cells with time under stretch stimulation

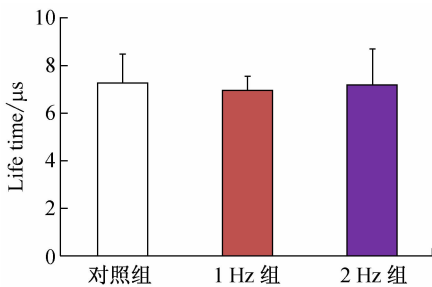


图 5 各组氧代谢数比较

Fig. 5 Comparison of the numbers of oxygen metabolism in each group

3 讨论

本文设计了 C₂C₁₂成肌细胞体外培养-牵张刺激模型,通过细胞力学实验方法和分子生物学检测技术,研究不同频率牵张刺激对骨骼肌细胞代谢产生的影响。结果发现,1、2 Hz 两种频率的牵张刺激在一定程度上能够诱导成肌细胞增殖,而对细胞外氧消耗水平并没有促进作用。

力的周期性刺激比持续性刺激更能促进细胞增殖和分化^[8],故采用周期性牵张刺激作为细胞干预的方式。宋锦等^[9]运用四点力装置施与细胞各种时间段的生理性牵张应力,结果发现,细胞的长度、形态变化明显,而停止加力时细胞的纵向形态会有回复趋势。本实验的细胞形态学观察也证实了这一现象,机械牵张刺激使细胞排列更为紧密,显微镜下细胞生长呈现方向性和规律性,并与牵张方向一致。

力学作用调控骨骼肌的形成过程^[10],体内细胞的形态与功能、增殖和分化以及基因、蛋白的表达,都与其所处的力学环境有关^[11]。本研究证实,1、2 Hz 两种频率的牵张刺激可以有效促进细胞增殖。组织发育中形态构建的重要机制是细胞数量的控制,其主要取决于细胞分裂和死亡^[12],两者都受外界信号的调节。值得关注的是,牵张刺激的频率一直是影响细胞生长的重要因素。研究表明,机械刺激能直接影响骨骼肌的生长与代谢状况,且与机械刺激的环境参数有关^[6]。在体外培养的基础上,牵张刺激可改善骨骼肌卫星细胞的增殖能力和力生长因子 (mechano-growth factor, MGF) mRNA 的表达^[13]。此外,当机械力作用于细胞时,可与细胞膜上的分子感受器直接接触,通过细胞骨架将机械力传导到细胞的各个部位,使相应效应分子的激活、合成、分泌等功能发生变化,从而对细胞的增殖、分裂产生影响^[14-15]。本实验采用 1、2 Hz 两种频率的牵张刺激,观察在此条件下细胞的增殖情况。通过 CCK-8 试剂盒检测结果显示,与对照组相比,实验组的细胞数量明显增多,在第 3、4 d 细胞数目显著高于对照组。同时发现,第 4 d 牵张刺激后,2 Hz 组细胞数目略低于 1 Hz 组,提示牵张刺激对促进细胞的增殖存在着一个最适频率。已有研究表明,一旦加载频率过高,必将产生部分剪应力,对细胞代谢产生危害^[16]。在长时间高频率的牵张刺激下,细胞所承受的机械负荷增加。与 1 Hz 组相比,随着时间的延长,2 Hz 组细胞增殖比例有所下降。

牵张应力是维持细胞生长增殖的重要细胞外刺激,能够调节细胞的代谢过程^[17]。Ahlbord 等^[18]认为,牵张运动可以通过促进骨骼肌纤维肥大、影响肌细胞代谢等途径提高肌肉的运动能力。在生物有机体进行与生命活动相关的各项代谢活动中,细胞作为生命活动的基本单位,具有自我控制的复杂代谢体系。线粒体通过有氧呼吸将葡萄糖等有机物氧化分解,同时为生物体的生命活动提供能量,也为细胞内其他化合物的合成提供原料。而耗氧率正是反映线粒体功能的一个关键参数,故本实验主要探讨 1、2 Hz 两种频率的牵张刺激对细胞代谢影响,即通过含氧敏感性的荧光探针检测细胞耗氧量,反映细胞的呼吸作用,进一步验证牵张刺激是否能够影响细胞代谢能力。有研究从肌糖原含量、肌细胞肌酸激

酶的活性变化来论证振动运动可以促进骨骼肌对葡萄糖的摄取利用,改善糖代谢;并且发现中频率、长时间的振动运动(25 Hz、15 min)最有利于促进大鼠骨骼肌细胞的糖代谢,从侧面反映出振动运动可提高肌肉的无氧代谢能力^[19]。而本实验结果表明,牵张刺激并未对细胞的氧消耗水平起到明显的促进作用。实验组和对照组胞外氧代谢差异不具有显著性,分析原因如下:一方面,卫星细胞、成肌细胞对机械牵张较为敏感,表现为细胞数目的增加^[20];而本实验测试细胞线粒体呼吸与代谢能力,关乎线粒体的有氧呼吸能力,可能是线粒体呼吸代谢受牵张刺激并不敏感。另一方面,本实验是在胰酶消化传代后检测细胞呼吸作用,实验操作可能影响了牵张刺激对细胞形态的改变,进而抵消了牵张对细胞代谢的积极效应。

鉴于实验的局限性,牵张刺激如何被细胞感受并传递至细胞内,最终导致细胞发生一系列生物学效应的确切机制等问题仍处于探索阶段。而本文只进行了体外的细胞学实验,仅采用 C₂C₁₂ 细胞系,该细胞系虽被公认为成肌细胞,而它是否能代表体内绝大多数已终末分化的肌肉细胞,仍需进一步探讨。另外,实验组与对照组的胞外氧消耗水平并没有显著性差异,可能是实验选取的频率刺激未能促进细胞内相应酶的代谢能力,或是外界环境温度对细胞的生长状况造成了一定影响。后续可排除这些干扰因素,进而研究牵张力学刺激下细胞行为的改变。

4 结语

本文建立了 C₂C₁₂ 成肌细胞体外培养-牵张刺激模型。结果表明,牵张刺激在一定程度上能够诱导成肌细胞增殖,而对耗氧量水平并没有影响。在后续的研究中,将继续探讨牵张应力下不同的牵张频率、刺激时长对细胞代谢的影响以及可能的调控机制,并着力优化系统模型,寻求合适的刺激频率,为运动改善肌细胞代谢提供实验基础;其次,在临床进行牵张过程中,根据不同的治疗阶段,选择相应的牵张应力,对提高临床疗效具有重要意义。

参考文献:

- [1] Tatsumi R. Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: Possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells [J]. *Anim Sci J*, 2010, 81(1): 11-20.
- [2] Grossi A, Yadav K, Lawson MA, *et al*. Mechanical stimulation increases proliferation, differentiation and protein expression in culture: Stimulation effects are substrate dependent [J]. *J Biomech*, 2007, 40(15): 3354-3362.
- [3] 宋卫红, 汤长发, 王立春. 肌卫星细胞分化与骨骼肌纤维改变[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(41): 8340-8344.
- [4] 邱小忠, 李小娜, 陈维毅, 等. 周期性机械拉伸对 C₂C₁₂ 成肌细胞增殖的影响[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2006, 24(2): 183-185.
- [5] 匡威, 谭家莉, 王桥, 等. 低强度周期性应力对骨骼肌细胞增殖分化调控的机制[J]. *临床口腔医学杂志*, 2014, 30(5): 259-261.
- [6] 史仍飞. 骨骼肌生长与适应的机械信号与途径[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(24): 4507-4511.
- [7] 胡隆成. 运动训练对骨骼肌酶活性的影响[J]. *海南大学学报(自然科学版)*, 1987, 5(2): 56-59.
- [8] 李菲菲, 丁寅, 陈福林, 等. 机械牵张应力对成骨细胞增殖和分化影响的初步研究[J]. *口腔医学研究*, 2012, 28(6): 507-512.
- [9] 宋锦, 李志华, 陈扬熙, 等. 周期性牵张应力下成肌细胞形态指数长度变化的初步研究[J]. *北京口腔医学*, 2006, 14(3): 157-160.
- [10] 谢永涛, 蓝岚. 骨骼肌卫星细胞生长因子与运动训练的关系[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 37(15): 7009-7012.
- [11] 王国辉, 陈维毅, 谢永芳. 力学刺激对巩膜成纤维细胞增殖活性及结缔组织生长因子表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(3): 186-189.
- [12] Wang GH, Chen WY, Xie YF. Effects of mechanical stimulation on proliferation activity and CTGF expression of sclera fibroblasts [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(3): 186-189.
- [13] Cheng W, Li B, Kajstura J, *et al*. Stretch-induced programmed myocyte cell death [J]. *Clin Invest*, 1995, 96(5): 2247-2259.
- [14] 危小焰, 史仍飞, 卞玉华. 不同频率牵张应力刺激对骨骼肌卫星细胞生长的影响[J]. *体育科学*, 2008, 28(6): 52-56.
- [15] Shapiro M, Tovar N, Yoo D, *et al*. Strain rate effects on the mechanical properties and fracture mode of skeletal muscle [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 39: 100-104.
- [16] You L, Cowin SC, Schaffler MB, *et al*. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix [J]. *J Biomech*, 2001, 34(11): 1375-1386.