

[文章编号] 1000-1182(2015)05-0456-06

钙调神经磷酸酶-T细胞核因子信号通路在 应力诱导成肌细胞凋亡中的作用

丁弦¹ 夏晨蕾¹ 贺苗¹ 孙文娜¹ 王芳¹ 姜文心¹张彩霞¹ 王爽玉¹ 张强¹ 姚如永² 袁晓¹

1. 青岛大学医学院附属青岛市立医院口腔医学中心, 青岛 266075;

2. 青岛大学医学院附属医院中心实验室, 青岛 266003

[摘要] **目的** 探讨钙调神经磷酸酶 (CaN) - T细胞核因子 (NFAT) 信号通路在应力介导的成肌细胞凋亡中的作用。**方法** 构建成肌细胞体外培养—力学刺激模型, 利用多通道应力加载系统对细胞加载不同时间的周期性张应力, 加入CaN的特异性抑制剂环孢素 (CsA) 作为对比。采用Hoechst 33258染色法和流式细胞术检测成肌细胞凋亡情况, 实时聚合酶链式反应检测CaN和NFAT mRNA的表达情况, 蛋白质印迹法检测NFAT3的蛋白含量。**结果** 随加力时间的延长, 细胞凋亡逐渐增加, CaN亚基CnA、CnB及NFAT3的mRNA表达及NFAT3蛋白含量逐渐升高; 加入CsA后, 细胞凋亡减少, CnA、NFAT3的mRNA表达及NFAT3的蛋白含量明显减少。**结论** 周期性张应力可以诱导成肌细胞发生凋亡; CaN-NFAT信号通路可能参与了周期性张应力诱导的成肌细胞凋亡。

[关键词] 成肌细胞; 细胞凋亡; 钙调神经磷酸酶; T细胞核因子; 周期性张应力

[中图分类号] Q 813 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2015.05.003

Role of calcineurin-nuclear factor of activated T cells signaling pathway in myoblast apoptosis induced by cyclic tensile strain Ding Xian¹, Xia Chenlei¹, He Miao¹, Sun Wenna¹, Wang Fang¹, Jiang Wenxin¹, Zhang Caixia¹, Wang Shuangyu¹, Zhang Qiang¹, Yao Ruyong², Yuan Xiao¹. (1. Dept. of Stomatology, The Affiliated Qingdao Municipal Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266075, China; 2. The Central Laboratory, The Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[Abstract] **Objective** This study investigated the role and mechanism of calcineurin (CaN)-nuclear factor of activated T cells (NFAT) pathway in the myoblast apoptosis induced by cyclic tensile strain. **Methods** Myoblasts were cultured using an *in vitro*-mechanical stimulation model and imposed with tension for different hours with a multi-channel cell stress loading system. Cyclosporine (CsA) was used as CaN inhibitor to clarify the role of CaN in the apoptosis induced by cyclic stress. Hoechst 33258 staining and flow cytometry detection were performed to detect the apoptotic cells. Real-time polymerase chain reaction was conducted to detect the mRNA expression of CaN and NFAT. Protein levels of NFAT3 were evaluated by Western blot. **Results** The apoptosis rate increased with the extension of loading time. The mRNA expression of the CaN subunits, CnA and CnB, and the protein levels of NFAT3 also increased. When the myoblasts were incubated with CsA, the apoptosis rate decreased, the mRNA expression of CnA and NFAT3 significantly decreased, and the NFAT3 protein expression levels became significantly lower than those of the groups without CsA. **Conclusion** Continuous cyclic tensile stress can induce myoblast apoptosis. The CaN-NFAT signaling pathway may be involved in the cyclic stretch-induced apoptosis of myoblasts.

[Key words] myoblasts; apoptosis; calcineurin; nuclear factor of activated T cells; cyclic tensile strain

[收稿日期] 2015-04-15; **[修回日期]** 2015-07-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31170891); 山东省卫生计生重点基金资助项目 (2011HD001)

[作者简介] 丁弦, 硕士, E-mail: xiaowunvdx@163.com

[通信作者] 袁晓, 教授, 博士, E-mail: yuanxiaod@163.com

颌面部肌肉组织在错颌畸形的发生、发展、矫治和疗效维持中发挥重要作用。临床上, 正畸医生通过调控矫形力来牵张咀嚼肌, 影响牙齿、颌骨及颞下颌关节的改建, 进而使软硬组织发生适应性变

化,重建新的功能平衡,达到预防错殆畸形及调控生长的目的^[1-2]。在此过程中,成肌细胞作为适应性改建的主要体现者,明确其力学信号转导机制对于阐明功能矫形时面颌部肌肉组织的适应性改建机制有重要意义^[3]。本课题前期研究已证实,周期性张应力可诱导成肌细胞凋亡,在凋亡过程中Ca²⁺作为细胞内信号转导分子之一,具有重要的作用^[4]。研究发现,钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)作为现阶段发现的唯一受Ca²⁺/钙调素(calmodulin, CaM)调节的磷蛋白磷酸酶,其介导的信号通路与细胞凋亡关系密切,在细胞信号传递过程中直接受Ca²⁺的调节,通过其重要底物活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)去磷酸化和核内转位发挥功能调节作用。CaN-NFAT信号通路是内质网应激的一条重要通路,本研究拟在周期性张应力作用下明确CaN-NFAT信号通路在成肌细胞凋亡中的作用,进一步探明应力作用下成肌细胞适应性改建的分子机制,为功能矫形提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

大鼠L6成肌细胞株,购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。胎牛血清、胰蛋白酶(Hyclone公司,美国),Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒(北京嘉美诺斯生物科技有限公司),RT-PCR试剂盒、Trizol提取试剂盒(Takara公司,日本),半胱天冬氨酸蛋白酶9兔抗大鼠抗体(Abcam公司,英国),BioFlex弹性细胞培养板(Flexcell公司,美国)。

1.2 细胞培养

将成肌细胞按 $1 \times 10^7 \cdot L^{-1}$ 的浓度接种于培养瓶中,加入含体积分数10%的胎牛血清、双抗,配成最终浓度为 $100 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的高糖DMEM培养液,在CO₂孵箱中37℃、5%CO₂、95%空气、饱和湿度下培养。48 h换液一次,并通过倒置相差显微镜观察成肌细胞生长状况及变化。待细胞生长至培养瓶底80%以上时进行传代。

1.3 成肌细胞体外培养—力学刺激模型的构建

选择对数生长期传至第3代左右的成肌细胞胰酶消化后,进行细胞计数,将接种密度调整到 $3 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 后接种至BioFlex培养板,放置于37℃、5%CO₂培养箱内培养1~2 d,当细胞融合达80%以上时,用低血清浓度(含体积分数为3%胎牛血清的DMEM)的培养液继续培养24 h。

将成肌细胞分为加力组和对照组,利用多通道应力加载系统对加力组细胞分别施加1、2、6、12、

24 h频率为 $10 \text{ cycles} \cdot \text{min}^{-1}$ 、15%细胞形变的张应力,每一循环包括3 s拉伸和3 s松弛;对照组放在同一培养箱内不加力(即加力0 h)。应力结束后,于倒置相差显微镜下观察成肌细胞生长状况以及形态变化。

1.4 Hoechst 33258染色法检测成肌细胞凋亡

2组细胞加入固定液固定10 min,冲洗完后向培养板中加入Hoechst 33258染色液,染色5 min,于荧光显微镜(激发波长350 nm,发射波长460 nm)下观察细胞凋亡情况。将CaN的特异性抑制剂环孢素(cyclosporin A, CsA)加入24 h(加抑制剂组)后,观察细胞凋亡情况。每组重复3次。

1.5 流式细胞术检测成肌细胞凋亡

2组细胞弃旧培养液,PBS洗两遍,用不含EDTA的胰酶消化后收集细胞至离心管中,再按照Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书进行标记,在室温下避光染色15 min后用流式细胞仪检测细胞凋亡。在加力24 h的成肌细胞中加入CsA(加抑制剂组)后,再次检测细胞凋亡。每组重复3次。

1.6 实时聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)检测CaN和NFAT mRNA的表达情况

收集2组细胞,按照Gibco BRL公司的说明书提取细胞总RNA,分光光度计测量RNA的浓度和纯度,利用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,将得到的反应液加入到real-time PCR的反应体系中,再对上海生工生物技术有限公司合成的引物进行PCR扩增反应,检测CaN和NFAT mRNA的表达情况。2组细胞中加入CsA后,再次检测CaN和NFAT mRNA的表达情况。各因子的引物见表1。

表 1 real-time PCR各因子引物

Tab 1 Primers of genes used in real-time PCR

基因	引物序列(5→3)	PCR产物/bp
GAPDH	正向: GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	143
	反向: ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	143
CnA	正向: TATTGATGCCCCAGTCACAGT	112
	反向: CCCTAAGAAGAGGTAGCGAGTG	112
CnB	正向: GAGGAGGAGATGGAGAGAATGA	83
	反向: CTGAGGTGGATGGGTGTGTA	83
NFAT3	正向: CCTTCCTGTATCCCCCTTCTCT	87
	反向: CTGTCCTCACACCCTCAGT	87
NFAT4	正向: TTTACGACCTCACGCATTTTAC	95
	反向: GAACCTTTGTGCTGGCGATTAT	95

1.7 蛋白质印迹法(western blot)检测NFAT3的蛋白含量

收集2组细胞,使用裂解液提取总蛋白,采用

BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，各组取等量蛋白上样，电泳分离后转移至PVDF膜上，封闭后将一抗与一抗稀释液按比例混匀后与PVDF膜4℃过夜，PBST冲洗3遍；再将配好的二抗稀释液和膜在摇床上摇动孵育1h，用PBST冲洗3遍。加显影液后放入计算机显影系统内，将蛋白的表达量拍照，并保存记录。2组细胞中加入CsA后，再重复上述步骤。对图像进行分析并计算灰度值。

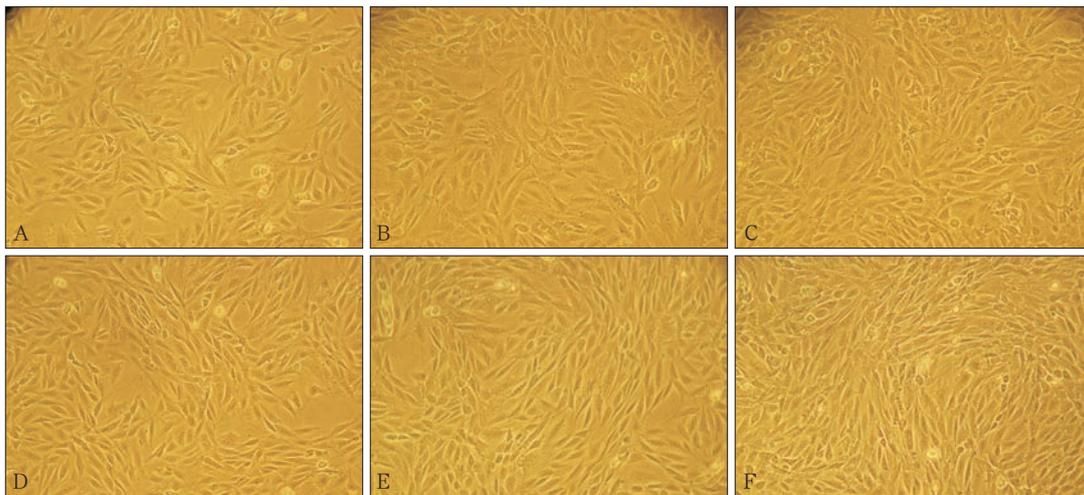
1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行分析，对数据进行方差分析和配对t检验， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成肌细胞体外培养力学刺激模型的构建

倒置相差显微镜下观察可见，对照组成肌细胞贴壁良好，但排列方向杂乱无章；加力组细胞贴壁良好且生长状态佳，无明显变性、脱落；随着加力时间的延长，成肌细胞逐渐顺应力场方向排列，且呈时间依赖性（图1）。成肌细胞体外培养—力学刺激模型构建成功。



A: 对照组; B: 加力1 h组; C: 加力2 h组; D: 加力6 h组; E: 加力12 h组; F: 加力24 h组。

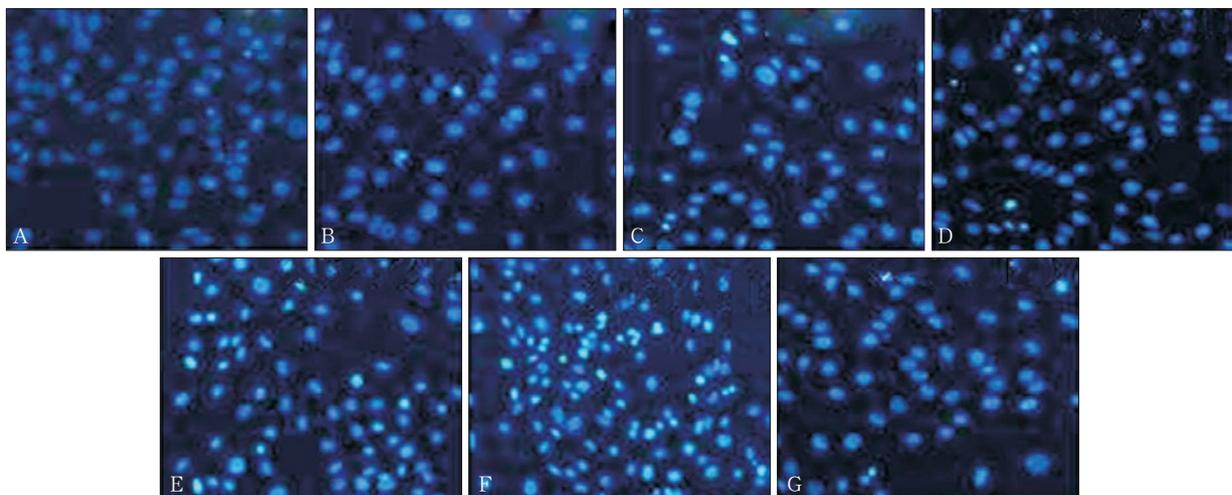
图 1 各组成肌细胞的形态 倒置相差显微镜 ×400

Fig 1 Myoblasts morphology of every group inverted phase contrast microscope ×400

2.2 Hoechst 33258染色检测成肌细胞凋亡

对照组成肌细胞的胞核清晰且呈卵圆形，染色质分布均匀，发出淡蓝色荧光；加力组出现凋亡细胞，胞核发生固缩，发出致密浓染的亮蓝色荧光，

个别颜色发白，随加力时间的延长，凋亡现象越发明显；加抑制剂组凋亡细胞明显比加力24 h组减少，说明CsA能有效抑制细胞凋亡（图2）。



A: 对照组; B: 加力1 h组; C: 加力2 h组; D: 加力6 h组; E: 加力12 h组; F: 加力24 h组; G: 加抑制剂组。

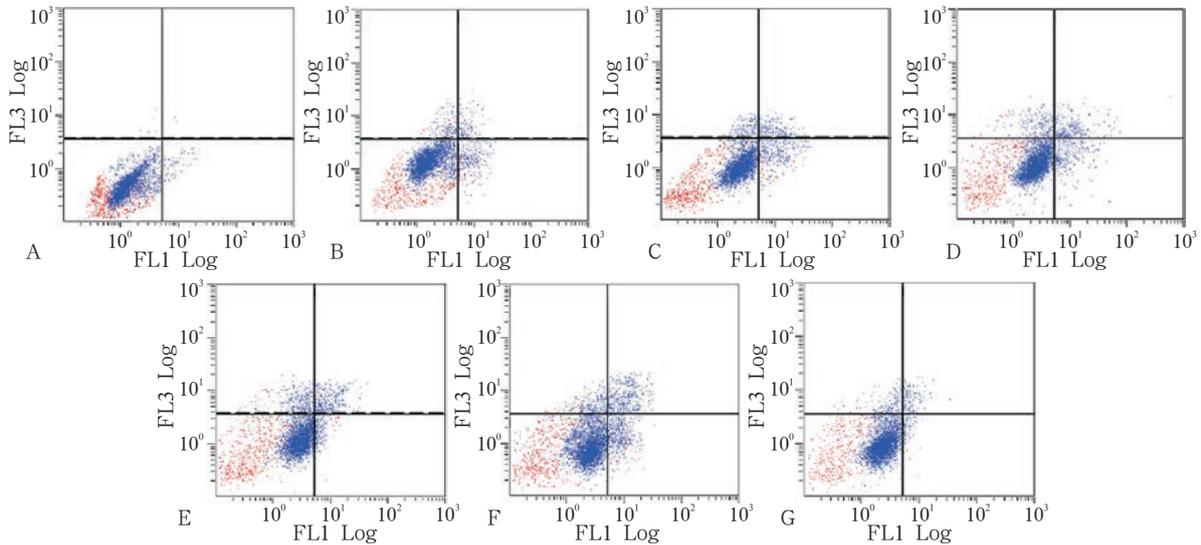
图 2 各组成肌细胞的形态 Hoechst 33258染色 ×400

Fig 2 Myoblasts morphology of every group Hoechst 33258 staining ×400

2.3 流式细胞术检测成肌细胞凋亡

流式细胞术检测发现, 对照组细胞的凋亡率为(4.47±0.93)%, 加力1、2、6、12、24 h组的细胞凋亡率分别为(5.83±0.26)%、(6.56±0.34)%、(6.93±0.52)%、(7.75±0.15)%、(8.17±0.28)%, 加抑制剂组的细胞凋亡率为(2.17±0.13)%。统计

分析表明, 加力组与对照组之间的细胞凋亡率有统计学差异($P<0.05$)。随加力时间的延长, 细胞凋亡率及死细胞比率逐渐升高, 24 h达到高峰。与单纯加力24 h组相比, 加抑制剂组的细胞凋亡率和死细胞比率均下降, 而活细胞比率有所上升(图3)。



A: 对照组; B: 加力1 h组; C: 加力2 h组; D: 加力6 h组; E: 加力12 h组; F: 加力24 h组; G: 加抑制剂组。

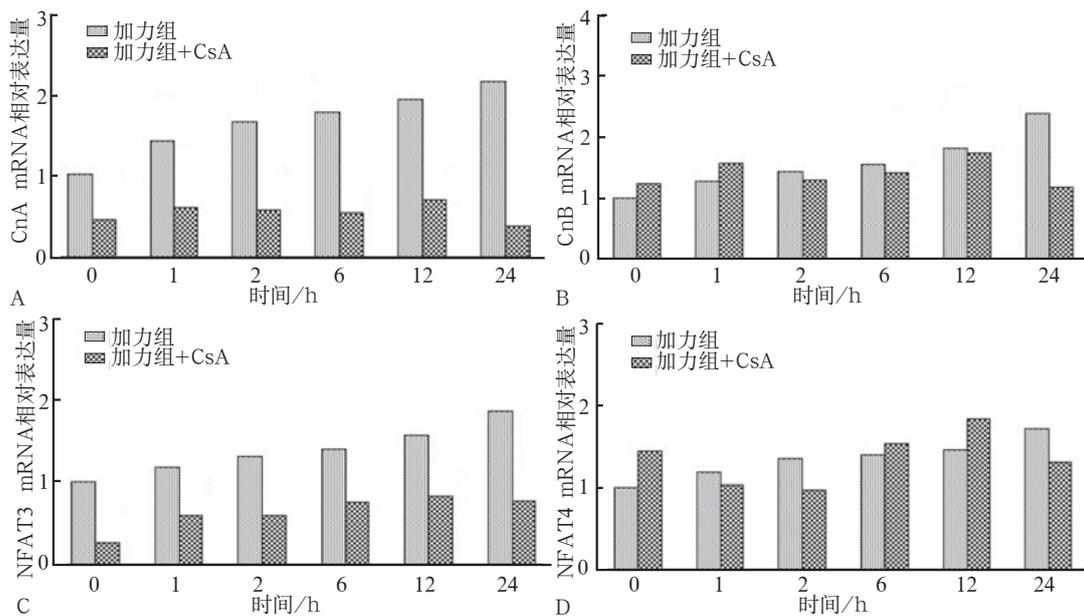
图3 各组成肌细胞流式细胞仪检测结果

Fig 3 Flow cytometry analysis in myoblasts of every group

2.4 real-time PCR检测CaN和NFAT的mRNA表达

real-time PCR检测结果表明, 随着加力时间的延长, CaN亚基CnA、CnB及NFAT3的mRNA表达量逐渐升高, 24 h达到峰值, 与对照组相比有统计学差异($P<0.05$); 而NFAT4的mRNA表达无统计

学差异。在相同加力时间情况下, 加入抑制剂后, CnA、NFAT3的mRNA表达比不加抑制剂减少, 有统计学差异($P<0.05$), CnB的mRNA仅在加力24 h时比不加抑制剂减少, 具有统计学差异($P<0.05$), NFAT4的mRNA表达2组间无统计学差异(图4)。



A: CnA; B: CnB; C: NFAT3; D: NFAT4。

图4 各组成肌细胞CaN和NFAT的mRNA表达变化的比较

Fig 4 Comparison of expression of CaN and NFAT mRNA in myoblasts of every group

2.5 蛋白质印迹法检测NFAT3的蛋白含量

蛋白质印迹法检测结果表明,随着加力时间的延长,NFAT3蛋白含量逐渐升高,24 h达到峰值,在12、24 h时与对照组相比具有统计学差异 ($P < 0.05$);加入抑制剂后,NFAT3的蛋白含量明显受到抑制,与相同加力时间的对应组之间均有统计学差异 ($P < 0.05$) (图5)。

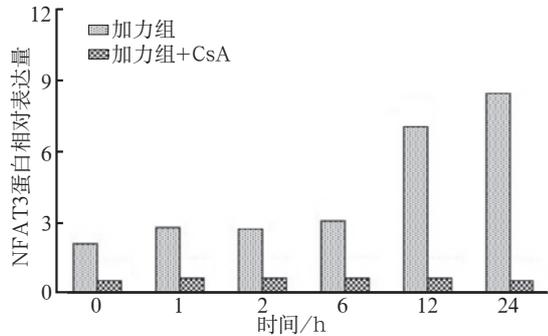


图5 各组成肌细胞NFAT3蛋白量的相对灰度值

Fig 5 Relative gray value of NFAT3 protein in myoblasts of every group

3 讨论

临床上正畸医生通过功能矫形治疗对生长发育期儿童施加生物力来引起肌肉形态和功能的变化,但其具体的作用机制尚不明确。本课题前期研究发现,内质网应激介导的细胞凋亡参与了面颌部肌肉组织的适应性改建,在此过程中 Ca^{2+} 起到了十分重要的作用^[5]。内质网是细胞内重要的 Ca^{2+} 处理器,可以调控细胞内 Ca^{2+} 的摄取、存储和释放。研究发现,当细胞受到某些刺激时,胞内游离的 Ca^{2+} 浓度会迅速升高,从而因 Ca^{2+} 超载引发内质网应激,进而发生核酸内切酶的活化、DNA断裂等,导致细胞凋亡;反之,当细胞外的 Ca^{2+} 缺乏或者细胞内的 Ca^{2+} 螯合时,可以抑制内质网应激的发生,进而减少细胞凋亡。

CaN是一种保守蛋白,由一个相对分子质量为 61×10^3 的催化亚基CnA和一个相对分子质量为 19×10^3 的调节亚基CnB紧密结合而成,是目前所发现的唯一的一种受 Ca^{2+} /钙调素调节的磷酸酶^[6]。CaN介导的信号通路与细胞凋亡关系密切。通过对心肌细胞、神经元、癌细胞及淋巴细胞系的研究^[7-10]发现,CaN被激活后具有促凋亡和抗凋亡的双重作用。因此,在细胞类型、刺激种类或强度不同的情况下,CaN所产生的细胞生物学效应也可能不同。

NFAT是介导细胞内信号转导的一种能够快速诱导的核因子,可以调节大量基因的表达^[11-14]。目前已

知的NFAT家族有5个成员,其中NFAT1、NFAT2、NFAT4主要存在于免疫组织中,NFAT3主要存在于其他组织细胞(如心脏)中^[15]。NFAT的活化可以调节许多细胞因子的信号转导,从而干预某些疾病的发生、发展。

本研究应用Hoechst 33258染色及流式细胞术检测周期性张应力下成肌细胞凋亡情况,发现成肌细胞凋亡率随应力加载时间的延长而升高,说明周期性张应力可诱导细胞凋亡。real-time PCR及蛋白质印迹法研究结果发现,随着加力时间的延长,CnA、CnB及NFAT3的mRNA表达量及NFAT3的蛋白含量逐渐升高,24 h达峰值 ($P < 0.05$),而NFAT4的mRNA表达量无明显变化,这一结果可能与NFAT4主要存在于免疫组织而在其他组织中较少表达有关。加入CaN特异性抑制剂CsA后,CnA、NFAT3的mRNA表达量及NFAT3的蛋白含量明显受到抑制,与各自对应对照组相比有统计学差异,CnB的mRNA仅在加力24 h组差异具有统计学意义,而NFAT4的mRNA表达量无明显变化,说明CsA可以抑制CaN催化亚基CnA的表达,但对CaN调节亚基CnB的表达仅在其浓度较高时有部分抑制作用。由此可以看出,CaN与NFAT3在应力介导的成肌细胞凋亡过程中发挥了一定作用,CaN-NFAT3信号通路可能参与了应力介导的成肌细胞凋亡,但其确切机制尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Lee DH, Yu HS. Masseter muscle changes following orthognathic surgery: a long-term three-dimensional computed tomography follow-up[J]. Angle Orthod, 2012, 82(5):792-798.
- [2] Yagci A, Uysal T, Kara S, et al. The effects of myofunctional appliance treatment on the perioral and masticatory muscles in Class II, Division 1 patients[J]. World J Orthod, 2010, 11(2):117-122.
- [3] Sanchez-Esteban J, Wang Y, Cicchiello LA, et al. Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(3):L448-L456.
- [4] 温葭, 陈士林, 徐宏喜, 等. 葛根素对细胞凋亡影响的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(1):61-64.
- [5] 张强, 王洪玲, 丁弦, 等. 成肌细胞体外培养-力学刺激模型与周期性张应力的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(5):669-674.
- [6] 张荣成, 王萌萌, 王建春. 钙调神经磷酸酶信号通路在心

- 肌肥厚中的作用[J]. 心血管病学进展, 2007, 28(2):321-324.
- [7] Bueno OF, Lips DJ, Kaiser RA, et al. Calcineurin Abeta gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction[J]. Circ Res, 2004, 94(1):91-99.
- [8] Jayaraman T, Marks AR. Calcineurin is downstream of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the apoptotic and cell growth pathways[J]. J Biol Chem, 2000, 275(9):6417-6420.
- [9] Tombal B, Weeraratna AT, Denmeade SR, et al. Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells [J]. Prostate, 2000, 43(4):303-317.
- [10] De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, et al. Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis *in vitro* and *in vivo*: an apoptosis-independent model of dilated heart failure[J]. Circ Res, 2000, 86(3):255-263.
- [11] Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells[J]. Cell, 2002, 109(Suppl):S67-S79.
- [12] Horsley V, Pavlath GK. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation[J]. J Cell Biol, 2002, 156(5):771-774.
- [13] Graef IA, Wang F, Charron F, et al. Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons[J]. Cell, 2003, 113(5):657-670.
- [14] Hill-Eubanks DC, Gomez MF, Stevenson AS, et al. NFAT regulation in smooth muscle[J]. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13(2):56-62.
- [15] Luik RM, Lewis RS. New insights into the molecular mechanisms of store-operated Ca²⁺ signaling in T cells[J]. Trends Mol Med, 2007, 13(3):103-107.

(本文编辑 李彩)

《国际口腔医学杂志》2016年征订启事

《国际口腔医学杂志》由教育部主管, 四川大学主办。本刊及时、准确地报道国内外口腔医学最新研究成果及临床试验(包括新理论、新技术、新方法及发展动态等), 供中国口腔医学及相关学科工作者在防病治病、科学研究、教学等工作中参考。主要报道形式为专家论坛、争鸣、病例展示、口腔护理专栏、口腔教育改革、论著、综述等。每期28万余字, A4开本, 双月刊。

《国际口腔医学杂志》2014年首次被收录为《中文核心期刊要目总览》(第7版)核心期刊, 同时本杂志被中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、RCCSE中国核心学术期刊、美国《化学文摘》(CA)、美国《乌利希国际期刊指南》、美国《剑桥科学文摘(CSA)》等国内外重要数据库收录。2006—2014年蝉联中国高校特色科技期刊奖, 2008年荣获高校科技期刊先进集体, 2009年荣获全国高校科技期刊优秀编辑质量奖, 2011年编辑部获教育部中国高校科技期刊优秀团队, 2013年网站荣获第2届中国高校科技期刊优秀网站, 2013年获第3届中国出版政府奖先进出版单位奖。现在为适应新媒体的发展, 满足作者、读者的新需要, 《国际口腔医学杂志》官方微信公众服务平台已正式开通, 微信用户可以通过扫描杂志封面的二维码或者搜索微信公众账号“国际口腔医学杂志”、微信号“gjkqyxzz”, 选择关注即可享用编辑部为您推出的微信公众平台服务。

《国际口腔医学杂志》由四川省报刊发行局通过全国各地邮局公开发行。邮发代号: 62-19, CN 51-1698/R, ISSN 1673-5749, 每册国内定价15.00元人民币。编辑部地址: 四川省成都市人民南路三段14号, 邮政编码: 610041, 电话: 028-85502414, 传真: 028-85503479, 网址: www.gjkqyxzz.cn, E-mail: gwyxkqyxfc@vip.163.com。

《国际口腔医学杂志》编辑部