

· 基础研究 ·

低强度脉冲超声促进 C2C12 成肌细胞分化的作用机制研究

张亚莲¹ 舒彬¹ 杨忠² 李倩¹ 蔡星¹¹重庆医科大学附属大学城医院康复中心,重庆 401331; ²陆军军医大学药学与检验医学系临床血液学教研室,重庆 400038

通信作者:舒彬,Email:shubin1017@163.com

【摘要】 目的 观察不同功率密度低强度脉冲超声(LIPUS)对骨骼肌 C2C12 成肌细胞脂联素(Adiponectin)及其受体的影响,探讨 LIPUS 促进 C2C12 成肌细胞分化的潜在机制。**方法** 将体外培养的 C2C12 成肌细胞根据有无超声干预或超声干预的功率密度随机分为对照组、U_{0.1}组、U_{0.3}组和 U_{0.5}组,对照组接受假 LIPUS 干预,U_{0.1}组、U_{0.3}组、U_{0.5}组分别接受功率密度为 0.1 W/cm²、0.3 W/cm²、0.5 W/cm² 的 LIPUS 干预。干预 5 d 后,分别采用 CCK-8 法检测细胞活力,采用荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测脂联素、脂联素受体 1(AdipoR1)和 T-钙黏蛋白(T-Cadherin) mRNA 水平,采用 Western blot 法检测脂联素、AdipoR1、T-Cadherin、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、活化型-磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(P-AMPK)、肌细胞生成蛋白(MYOG)和胚胎肌球蛋白重链(eMHC)的蛋白水平,并对 4 组细胞肌管的分化能力进行免疫荧光化学检测。**结果** LIPUS 干预 5 d 后,U_{0.1}、U_{0.3}和 U_{0.5}组细胞相对活力明显高于对照组($P<0.01$)。U_{0.3}组和 U_{0.5}组脂联素、受体 AdipoR1 和 T-Cadherin mRNA 水平均显著上调,与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。U_{0.3}组和 U_{0.5}组脂联素、AdipoR1、T-Cadherin 蛋白和 AMPK 磷酸化水平与对照组比较,均显著增加($P<0.05$),且 U_{0.1}组和 U_{0.5}组均显著低于 U_{0.3}组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。U_{0.3}组和 U_{0.5}组 C2C12 成肌细胞分化指标 eMHC、MYOG 蛋白水平和 C2C12 成肌细胞融合指数与对照组比较,均明显增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** LIPUS 可促进 C2C12 成肌细胞的分化,并以 0.3 W/cm²、5 min/d、1 MHz,占空比为 20%的 LIPUS 干预作用最明显,其调控机制可能与 C2C12 成肌细胞脂联素、受体 AdipoR1 和 T-Cadherin 的表达上调和下游 AMPK 磷酸化水平活化有关。

【关键词】 低强度脉冲超声波; 脂联素; 脂联素受体; 分化**基金项目:**国家自然科学基金项目(31171148)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.03.001

The mechanism through which low-intensity pulsed ultrasound promotes the differentiation of C2C12 myoblasts

Zhang Yalian¹, Shu Bin¹, Yang Zhong², Li Qian¹, Cai Xing¹¹Rehabilitation Center of University City Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China; ²Department of Clinical Hematology, Army Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: Shu Bin, Email: shubin1017@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) at different intensities on the expression of adiponectin and its receptors in C2C12 myoblasts, and to explore the potential mechanism by which LIPUS promotes the differentiation of C2C12 myoblasts. **Methods** C2C12 myoblasts cultured in vitro were randomly divided into a control group and U_{0.1}, U_{0.3} and U_{0.5} groups. The control group received sham LIPUS exposure, while the U_{0.1}, U_{0.3} and U_{0.5} groups were exposed to LIPUS at intensities of 0.1W/cm², 0.3W/cm² or 0.5W/cm² respectively, and 1MHz for 5 min daily for 5 days. Cell viability was measured using CCK-8 assays. Fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reactions were used to detect the mRNA expression of adiponectin, adiponectin receptor 1 (adipoR1) and T-cadherin in the cells. Western blotting was employed to assess the protein expression of adiponectin, adipoR1, T-cadherin, adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), activated phosphorylated adenylyate-activated protein kinase (P-AMPK), embryonic myosin heavy chain (eMHC) and myogenin (MYOG). The differentiation ability of the 4 groups was measured using cell immunofluorescence chemistry. **Results** After the intervention the cell viability in the U_{0.1}, U_{0.3} and U_{0.5} groups was significantly higher than in the control group. Compared with the control group, the average mRNA expression of adiponectin and

the receptors of adipoR1 and T-cadherin were up-regulated significantly in the $U_{0.3}$ and $U_{0.5}$ groups. The average adiponectin, adipoR1 and T-cadherin protein expressions, and the AMPK phosphorylation level in the $U_{0.3}$ and $U_{0.5}$ groups had increased significantly compared with the control group, but all were significantly lower than in the $U_{0.3}$ group. The average protein expression of eMHC and MYOG, and the C2C12 myoblast fusion indices of the $U_{0.3}$ and $U_{0.5}$ groups were significantly higher the control group's averages. **Conclusions** LIPUS can promote the differentiation of C2C12 myoblasts. It is most effective at $0.3\text{W}/\text{cm}^2$, administered for $5\text{min}/\text{d}$ at 1MHz with a 20% duty cycle. Its regulatory mechanism may be related to up-regulation of the expression of adiponectin, the adipoR1 and T-cadherin receptors, and the activation of AMPK phosphorylation in C2C12 myoblasts.

【Key words】 Ultrasound intensity; Pulsed ultrasound; Adiponectin; Adiponectin receptor; Differentiation; Myoblasts

Funding: National Natural Science Foundation of China (31171148)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.03.001

骨骼肌损伤是最常见的运动损伤之一,其肌肉挫伤在运动训练过程中发生的概率高达 $50\% \sim 70\%$ ^[1]。相关研究表明,骨骼肌卫星细胞会激活为成肌细胞,而成肌细胞的增殖和分化是骨骼肌损伤与修复的核心环节,通过促进成肌细胞增殖、分化、融合形成新的肌纤维,可加速骨骼肌的损伤修复^[2]。脂联素(adiponectin)是一种细胞分泌激素,包括骨骼肌在内的多种组织均可表达^[3],骨骼肌损伤可导致脂联素表达水平的下降^[4]。目前有研究发现,脂联素有三种受体,包括脂联素受体 1(AdipoR1)、脂联素受体 2(AdipoR2)和 T-钙黏蛋白(T-Cadherin),在骨骼肌组织中主要表达 AdipoR1 和 T-Cadherin 两种受体,而 AdipoR2 主要在肝脏中表达^[5]。相关研究表明,脂联素及其受体 AdipoR1 和 T-Cadherin 在骨骼肌的生长发育、损伤再生等多种病理生理过程中具有重要作用^[6],在骨骼肌损伤模型中,可通过促进脂联素及其受体的表达来促进成肌细胞分化,加速骨骼肌的损伤修复,其作用机制可能与下游腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路的活化有关^[7]。

低强度脉冲超声(low intensity pulsed ultrasound, LIPUS)是指功率密度 $<3\text{ W}/\text{cm}^2$ 的一种超声波,在骨骼肌的损伤修复中具有重要的临床应用价值^[8]。本课题组早期的研究发现,LIPUS 可通过促进成肌细胞的分化进而促进骨骼肌的损伤修复^[9],但有关 LIPUS 促进成肌细胞分化的机制尚不清楚,LIPUS 是否通过影响脂联素及其受体的表达来调节成肌细胞的分化尚鲜见报道。鉴于 C2C12 成肌细胞是由 C3H 小鼠骨骼肌卫星细胞永生化而来的细胞株,是小鼠的骨骼肌干细胞,是体外研究肌细胞分化的良好模板,因此本研究通过建立 C2C12 成肌细胞模型来观察不同功率密度的 LIPUS 对成肌细胞分化的影响,并探讨脂联素及其受体 AdipoR1、T-Cadherin 和下游 AMPK 信号通路在其中的作用,旨在为 LIPUS 治疗相关肌病提供实验依据。

材料与方法

一、实验试剂与仪器

本研究主要试剂和仪器包括骨骼肌 C2C12 成肌细胞株(美国 ATCC 公司),马血清(Hyclone),胎牛血清(美国康宁),兔单克隆 AMPK α_1 抗体、兔单克隆 AdipoR1 抗体、兔多克隆脂联素抗体(武汉博士德),兔单克隆 T-Cadherin 抗体、兔单克隆磷酸化 AMPK(phosphorylated AMPK, P-AMPK) α 抗体(美国 CST 公司),胚胎肌球蛋白重链(embryonic myosin heavy chain, eMHC)(上海 DSHB 公司),myogenin(美国 Santa Cruz 公司),Trizol Regent(美国 Invitrogen 公司),细胞计数试剂-8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒(日本同仁化学研究所),cDNA 合成试剂盒(瑞士罗氏公司),脉冲超声治疗仪(美国 Chattanooga 公司)等。

二、实验分组和干预方法

取生长状态良好的细胞接种传代于培养瓶,采用改进的 Eagle 基础细胞培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)(含 10% 胎牛血清+1% 青链霉素)置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中进行培养。当细胞聚合至 95% 时,采用随机数字表法将细胞分为对照组、 $U_{0.1}$ 组、 $U_{0.3}$ 组、 $U_{0.5}$ 组共 4 组,每组 3 个平行,同时将培养液换为 DMEM 高糖分化培养基(含 2% 马血清+1% 青链霉素)进行诱导分化。对照组接受 LIPUS 假干预, $U_{0.1}$ 组、 $U_{0.3}$ 组、 $U_{0.5}$ 组分别接受功率密度为 $0.1\text{ W}/\text{cm}^2$ 、 $0.3\text{ W}/\text{cm}^2$ 、 $0.5\text{ W}/\text{cm}^2$ 的 LIPUS 干预,每日换液,仪器探头通过耦合剂紧贴培养瓶底进行 LIPUS 干预,每日干预 5 min,频率为 1 MHz,20% 的占空比,干预 5 d 后收集各组细胞。

三、细胞活力检测

采用 CCK-8 法检测细胞活力。干预 5 d 后,将 4 组 C2C12 成肌细胞制备成细胞悬液,以 10 000 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板,培养 24 h 后,分别向每孔中加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 CCK-8 工作液,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中孵育

1 h 后,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值,采用细胞相对活力法计算经 LIPUS 干预后各组细胞相对活力值,细胞相对活力(%)=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)×100%。

四、细胞脂联素、AdipoR1 和 T-Cadherin mRNA 表达的检测

采用荧光定量逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法,使用 Trizol 法提取各组细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,反应条件为 65 ℃ 10 min,55 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min,合成的 cDNA 储存于-20 ℃。再以合成的 cDNA 为模板,GAPDH 作为内参基因,各组按照 20 μL 体系进行 PCR 反应,反应条件为:95 ℃ 预变性 3 min,95 ℃ 变性 3 s,60 ℃ 退火延伸 30 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组脂联素、受体 AdipoR1 和 T-Cadherin 的 mRNA 相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列
脂联素	正义:5'-GGAGAAGGTGCTATGTATACC-3' 反义:5'-TGTGCTAGGCAAAGTAGTACAG-3'
AdipoR1	正义:5'-GAAAGACAACGACTACCTGCTA-3' 反义:5'-ATAGCACAAAACCAAGCAGATG-3'
T-Cadherin	正义:5'-GAGGACATTAATGACAACGCTC-3' 反义:5'-AATCTCAAACCTGAAGGGGTCT-3'
GAPDH	正义:5'-GGTGTCTCTCTGCGACTTCA-3' 反义:5'-TGCTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'

五、细胞脂联素、AdipoR1 和 T-Cadherin 蛋白水平检测

采用蛋白免疫印迹法(Western blot)。4 组细胞经磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)洗涤 3 次后,加入适量预冷放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay,RIPA)裂解液和蛋白酶抑制剂(100:1)提取各组细胞蛋白,采用蛋白质定量(bicinchoninic acid,BCA)法测定蛋白浓度。各样品中加入十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS)上样缓冲液混合后于 100 ℃ 水浴加热 5 min 变性,上样,行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)凝胶电泳 120 V,1.5 h,半干转印 1 h。以封闭液于摇床上室温封闭 2 h,再加入经抗体稀释液稀释的一抗脂联素(1:100)、AdipoR1(1:100)、T-Cadherin(1:2000)、AMPK(1:100)、P-AMPK(1:1000)、eMHC(1:100)、肌细胞生成蛋白(myogenin,MYOG)(1:200)4 ℃ 孵育过夜。三羟甲基氨基甲烷缓冲液(tris buffered saline tween,TBST)洗膜 5 次,每次 9 min,洗膜后与辣根过氧化物酶标记的二抗

(1:3500)室温孵育 1 h,再次洗膜 5 次,每次 7 min。洗膜结束后行增强化学发光法(enhanced chemiluminescence,ECL)显色,凝胶成像仪进行化学发光检测,实验结果光密度用 Image Lab 软件进行分析。

六、eMHC 免疫荧光化学检测

将 LIPUS 干预 5 d 后的各组细胞爬片浸于 4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。TritonX-100 通透 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。5%山羊血清 37 ℃ 封闭 2 h 后加入含 eMHC(1:50)的抗体稀释液,免疫荧光染色 4 ℃ 避光过夜。第二天 PBS 漂洗后加入四甲基异硫氰酸罗丹明(Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanate,TRITC)标记二抗(1:100)室温避光孵育 1 h,PBS 漂洗后加入 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride,DAPI)对核进行衬染。将 4 组的 eMHC 和 DAPI 拍照图片重叠,用 Image Pro-plus 6.0 版软件计算分析各组成肌细胞的融合指数(eMHC 染色阳性的多核肌管的细胞核数占总细胞核数的百分比)。

七、统计学分析

各实验独立重复 3 次,采用 SPSS 24.0 版统计学软件对数据进行分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,若方差齐性各项检测数据两两比较选用最小显著性差异法(least significant difference, LSD)检验;若方差不具齐性,采用 Tamhane's T2 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、LIPUS 对 4 组分化不同时间点 C2C12 成肌细胞的影响

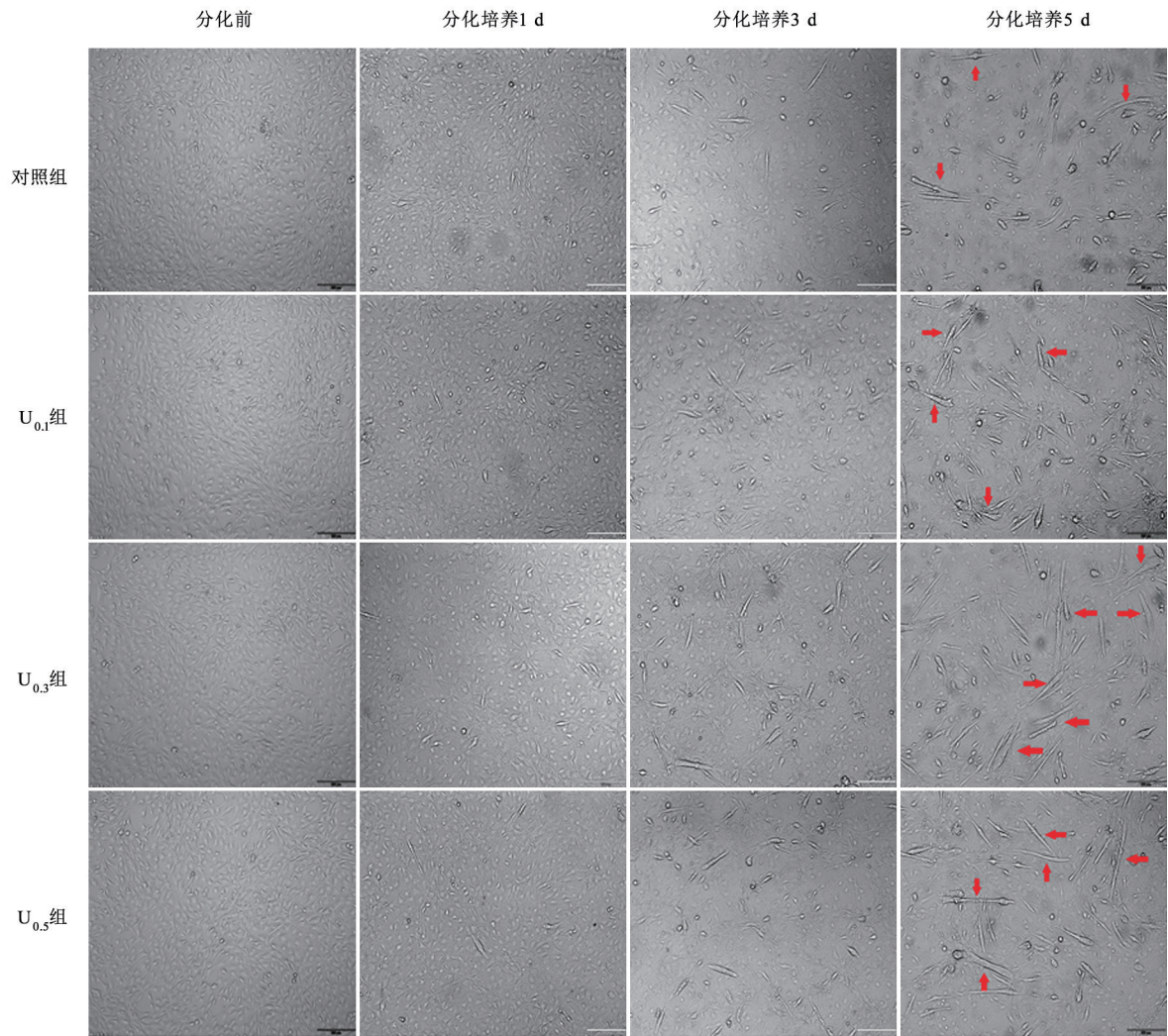
图 1 所示,通过倒置显微镜观察发现,4 组细胞生长状态良好,分化培养 1 d 后,4 组少量细胞开始出现长梭形分化状态,分化培养 3 d 和 5 d 后,4 组细胞开始融合,形成大量多核肌管,其中以 $U_{0.3}$ 组肌管数量最明显。

二、LIPUS 对 4 组 C2C12 成肌细胞活力的影响

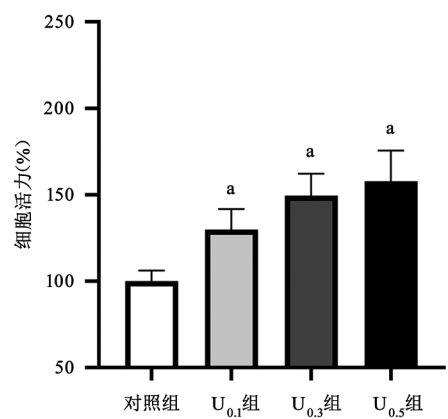
LIPUS 干预 5 d 后, $U_{0.1}$ 、 $U_{0.3}$ 和 $U_{0.5}$ 组诱导分化的 C2C12 成肌细胞活力较对照组明显增加,差异均有统计学意义($P < 0.01$),其中以 $U_{0.5}$ 组最明显,详见图 2。

三、LIPUS 对 4 组 C2C12 成肌细胞的脂联素及其受体 mRNA 表达的影响

LIPUS 干预 5 d 后, $U_{0.3}$ 组和 $U_{0.5}$ 组 C2C12 成肌细胞的脂联素、受体 AdipoR1 和 T-Cadherin mRNA 水平与对照组比较,均显著上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$); $U_{0.1}$ 组的脂联素、受体 AdipoR1 和 T-Cadherin mRNA 水平与 $U_{0.3}$ 组比较均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),详见表 2。



注:红色箭头所指为典型多核肌管
图1 不同时间点4组C2C12成肌细胞分化状态(×200)



注:与对照组相比,^a $P<0.01$
图2 4组C2C12成肌细胞的相对活力值

表2 4组C2C12成肌细胞脂联素及其受体mRNA相对表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	脂联素	AdipoR1	T-Cadherin
对照组	1.000±0.051	1.000±0.023	1.000±0.042
$U_{0.1}$ 组	1.087±0.077 ^a	0.951±0.044 ^a	1.019±0.039 ^a
$U_{0.3}$ 组	1.616±0.121 ^b	1.362±0.061 ^b	1.310±0.078 ^b
$U_{0.5}$ 组	1.609±0.154 ^b	1.219±0.040 ^b	1.221±0.065 ^c

注:与 $U_{0.3}$ 组相比,^a $P<0.01$;与对照组相比,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$

四、LIPUS对4组C2C12成肌细胞的脂联素及其受体蛋白表达的影响

LIPUS干预5 d后, $U_{0.3}$ 组和 $U_{0.5}$ 组C2C12成肌细胞的脂联素、受体AdipoR1和T-Cadherin蛋白水平与对照组比较均显著增高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。 $U_{0.1}$ 组和 $U_{0.5}$ 组的脂联素、受体AdipoR1和T-Cadherin蛋白水平较 $U_{0.3}$ 组均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$),详见图3。

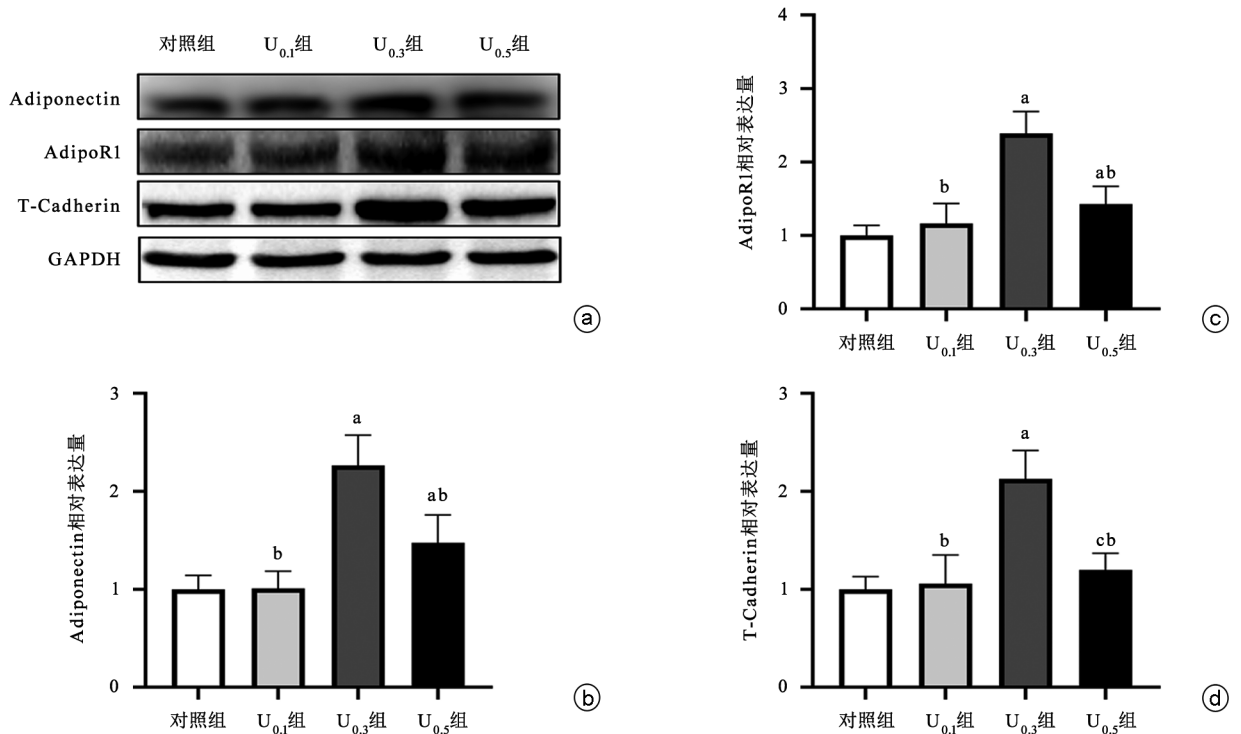
五、LIPUS 对 4 组 C2C12 成肌细胞的 AMPK 磷酸化水平的影响

LIPUS 干预 5 d 后, $U_{0.1}$ 、 $U_{0.3}$ 、 $U_{0.5}$ 组的 AMPK 磷酸化水平与对照组比较均显著上升, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 且 $U_{0.1}$ 和 $U_{0.5}$ 组的 AMPK 磷酸化水平显著低于 $U_{0.3}$ 组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 详见图 4。

六、LIPUS 对 4 组 C2C12 成肌细胞分化的影响

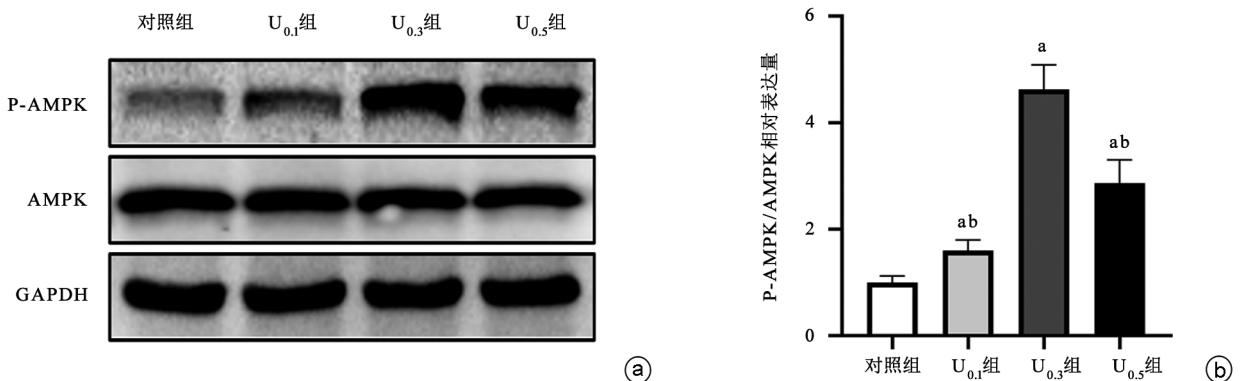
LIPUS 干预 5 d 后, 通过荧光显微镜观察发现, 4 组 C2C12 成肌细胞呈多核、条索样排列的肌管,

$U_{0.1}$ 、 $U_{0.3}$ 、 $U_{0.5}$ 组 C2C12 成肌细胞融合指数高于对照组, 其中 $U_{0.3}$ 组和 $U_{0.5}$ 组与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$), 且 $U_{0.1}$ 组 C2C12 成肌细胞的融合指数显著低于 $U_{0.3}$ 组 ($P<0.01$), 详见图 5。LIPUS 干预 5 d 后, $U_{0.3}$ 组和 $U_{0.5}$ 组的 eMHC 和 MYOG 蛋白水平与对照组比较均显著增加, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); $U_{0.1}$ 和 $U_{0.5}$ 组 eMHC 和 MYOG 蛋白水平与 $U_{0.3}$ 组比较均显著降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 详见图 6。



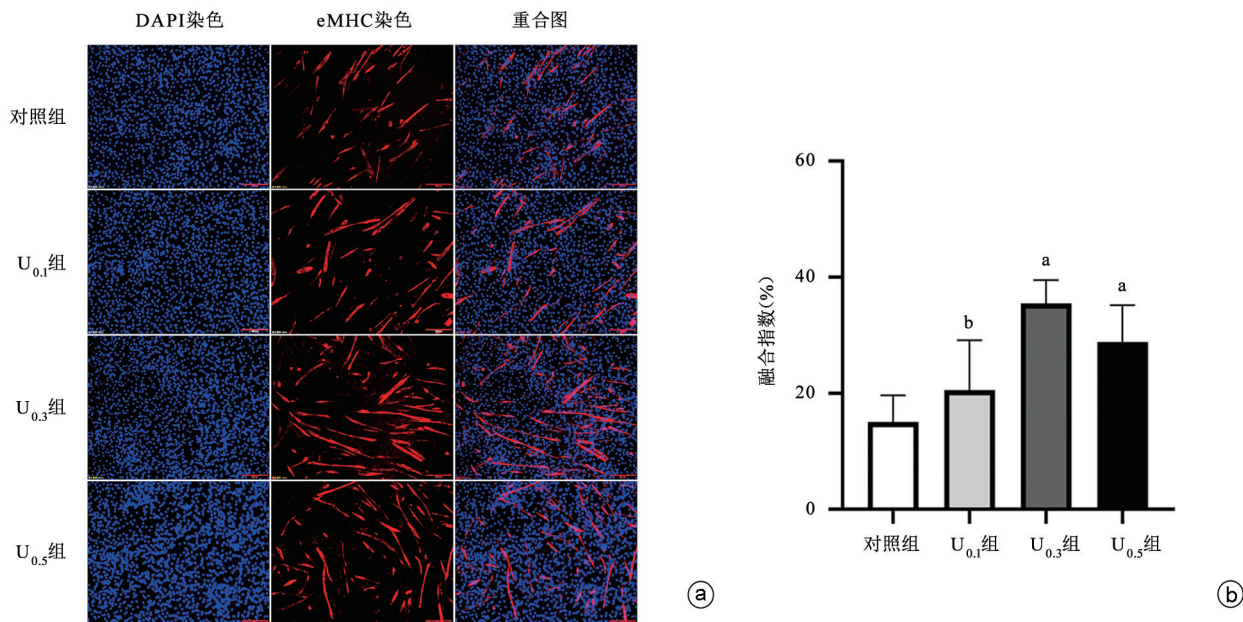
注: a 为 Western blot 检测 LIPUS 干预后脂联素、AdipoR1、T-Cadherin 的蛋白变化; b、c、d 为半定量分析显示的脂联素、AdipoR1、T-Cadherin 蛋白的相对表达水平, 与对照组比较, $^a P<0.01$, $^c P<0.05$; 与 $U_{0.3}$ 组比较, $^b P<0.01$

图 3 4 组 C2C12 成肌细胞的脂联素及其受体蛋白水平的比较



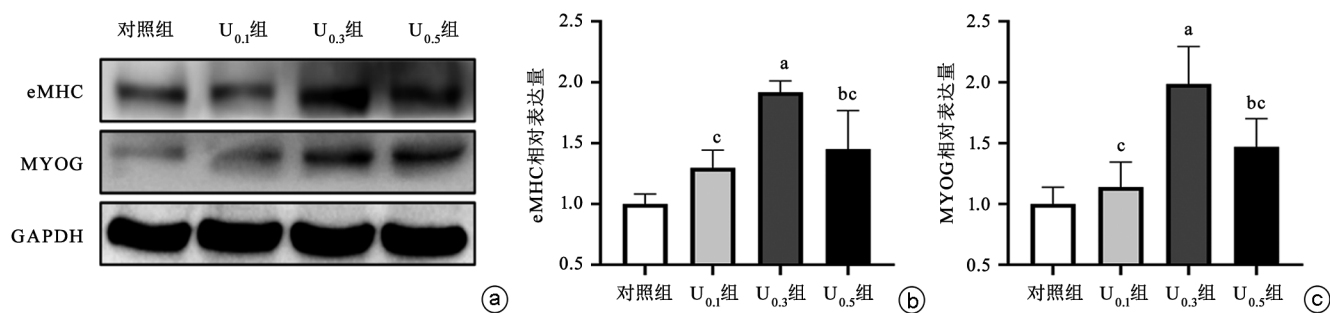
注: 图 a 为 Western blot 检测 LIPUS 干预后 AMPK、P-AMPK 的变化; 图 b 为半定量分析显示 AMPK 磷酸化相对表达的水平, 与对照组相比, $^a P<0.01$; 与 $U_{0.3}$ 组相比, $^b P<0.01$

图 4 各组 C2C12 成肌细胞 AMPK 磷酸化水平的比较



注: a 为 LIPUS 干预后 4 组肌管胚胎肌球蛋白重链 (eMHC) 免疫荧光染色, b 为肌管融合指数分析, 与对照组比较, $^a P < 0.01$; 与 $U_{0.3}$ 组比较, $^b P < 0.01$

图 5 4 组 C2C12 成肌细胞 eMHC 染色结果和肌管融合指数比较



注: a 为 Western blot 检测 LIPUS 干预后 eMHC、MYOG 的蛋白水平变化, b、c、d 为半定量分析, 与对照组比较, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$; 与 $U_{0.3}$ 组比较, $^c P < 0.05$

图 6 4 组 C2C12 成肌细胞分化指标蛋白水平的比较

讨 论

本研究结果显示, C2C12 成肌细胞经不同功率密度的 LIPUS 干预后, 其 eMHC 和 MYOG 的表达均明显增高, 肌管融合指数增加; 同时, 脂联素及其受体 AdipoR1 和 T-Cadherin 的 mRNA、蛋白的表达, 以及其下游 AMPK 磷酸化水平亦明显增强。该结果提示, 不同功率密度的 LIPUS 可促进成肌细胞分化, 增加脂联素及其受体 AdipoR1 和 T-Cadherin 的表达以及下游 AMPK 磷酸化水平, 并以 0.3 W/cm^2 、 5 min/d 、 1 MHz 、占空比为 20% 的参数作用最明显。

骨骼肌损伤是指多种原因导致的肌肉组织损伤并伴有坏死、炎症、瘢痕形成等一系列病理改变的过程^[10]。随着全民健身、竞技体育的广泛开展, 骨骼肌损伤也越来越常见。研究表明, 骨骼肌的损伤修复主

要依赖于骨骼肌卫星细胞^[11-12]。当骨骼肌受损后, 位于肌细胞膜与基底膜之间静止的卫星细胞会迅速被激活为成肌细胞, 而成肌细胞增殖、分化、与受损肌纤维融合或相互形成新的肌纤维可重塑骨骼肌的结构与功能^[13]。LIPUS 是临床上常用于治疗骨骼肌损伤的理疗方法, 但 LIPUS 与肌肉相关的具体机制还有待进一步的研究。Shu 等^[9]通过骨骼肌挫伤模型发现, 超声干预 14 d 后, 超声组几乎痊愈, 可见大量的肌管融合形成新的肌纤维, 而自然愈合组仍可见炎细胞浸润, 肌管数较少, 该结果表明, LIPUS 可以通过促进成肌细胞的分化、融合来加速损伤组织的修复。参照 Salgarella 等^[14]的研究, 本研究采用的 LIPUS 治疗时间为每日 5 min, 频率为 1 MHz, 占空比为 20% 和不同功率密度的参数方案, 旨在探讨 LIPUS 对 C2C12 成肌细胞分化的影响以及潜在的作用机制。结果发现, C2C12 成肌

细胞经 LIPUS 干预后, MYOG 和 eMHC 的蛋白表达均增加, 而 MYOG 是肌管形成的主要指标, eMHC 是新生肌纤维特有的结构蛋白^[15-16], 说明, LIPUS 可以促进成肌细胞的分化, 这与上述研究一致。

还有研究发现, 骨骼肌通过自分泌作用产生的脂联素在成肌细胞的分化、氧化应激、代谢等多种病理生理过程中具有重要的调节作用^[17]。Fiaschi 等^[18]学者发现, 在骨骼肌损伤模型中, 脂联素可以通过受体 AdipoR1 促进卫星细胞和巨噬细胞向损伤部位移动, 并诱导卫星细胞退出静止状态, 促进成肌细胞分化形成肌管, 从而加速损伤肌肉的再生与修复。Tanaka 等^[4]也探讨了脂联素及其受体 T-Cadherin 在 C2C12 成肌细胞分化中的作用, 结果表明, 敲除脂联素基因的 C2C12 成肌细胞分化程度明显降低, 经脂联素基因转染后, C2C12 分化程度明显增强, 但这一作用在 T-Cadherin 基因敲除的条件下不明显, 表明 T-Cadherin 在介导脂联素促进成肌细胞分化中具有重要作用。本研究中, 经 LIPUS 干预后, C2C12 成肌细胞脂联素及其受体 AdipoR1 和 T-Cadherin 的表达明显上调, 且 C2C12 成肌细胞分化程度增加, 推测 LIPUS 可能是通过上调脂联素及其受体的表达来促进成肌细胞的分化。但本研究中功率密度为 0.1 W/cm² 的 U_{0.1} 组对 C2C12 成肌细胞作用不显著, 其具体机制还待进一步研究。

AMPK 信号通路是脂联素及其受体调节相关生理活动的重要通路。研究表明, AMPK 可以通过抑制组蛋白去乙酰化酶 5 (Histone deacetylase 5, HDAC5) 的磷酸化水平上调肌细胞增强因子 2C (myocyte enhancer factor 2C, MEF2C) 的表达^[19-20], MEF2C 又可以通过上调 AdipoR1 介导脂联素及其下游 AMPK 信号通路的表达, 最终促进 C2C12 成肌细胞的分化^[7]。本研究中 C2C12 成肌细胞经 LIPUS 干预后, AMPK 磷酸化水平明显增加, 提示 AMPK 信号通路可能是 LIPUS 上调脂联素及其受体表达最终促进成肌细胞分化的重要途径。

综上所述, LIPUS 可能通过上调脂联素、受体 AdipoR1 和 T-Cadherin 的表达及下游 AMPK 磷酸化水平来促进 C2C12 成肌细胞分化。本课题组认为, 从脂联素及其受体的角度探讨 LIPUS 促进成肌细胞分化相关机制的研究目前尚停留在细胞学水平, 还需进行组织学水平的探讨。

参 考 文 献

- [1] 李云霞, 陈世益, 马昕, 等. 外源性胰岛素样生长因子-1 促进骨骼肌损伤修复的实验研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24 (3): 147-151. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0.2002-03-007.
- [2] 杨之雪, 朱正威, 贺舟, 等. 推拿联合跑台训练对急性骨骼肌损伤大鼠肌蛋白代谢相关因子的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,

- 2020, 42 (5): 385-391. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.05.001.
- [3] Judd RL, Fang H. Adiponectin regulation and function[J]. Compr Physiol, 2018, 8(3): 1031-1063. DOI: 10.1002/cphy.c170046.
- [4] Tanaka Y, Kita S, Nishizawa H, et al. Adiponectin promotes muscle regeneration through binding to T-cadherin[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 16. DOI: 10.1038/s41598-018-37115-3.
- [5] 胡红琳, 黄有焯, 王佑民, 等. 脂联素与肥胖相关的女性肿瘤的关系研究进展[J]. 安徽医学, 2018, 39(06): 760-763. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2018.06.039
- [6] Krause MP, Milne KJ, Hawke TJ. Adiponectin—consideration for its role in skeletal muscle health[J]. Int J Mol Sci, 2019, 27; 20(7): 1528. DOI: 10.3390/ijms20071528.
- [7] 郑宇. Mef2C 通过脂联素受体 1 信号途径调控成肌细胞分化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [8] 唐量, 孙丽君, 尹冠军, 等. 低强度脉冲超声的骨骼肌修复效应及生物学机制研究进展[J]. 应用声学, 2018, 37(01): 121-128. DOI: 10.11684/j.issn.1000-310X.2018.01.018
- [9] Shu B, Yang Z, Li X, et al. Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion[J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62(2): 329-336. DOI: 10.1007/s12013-011-9310-5.
- [10] 刘明晶. 研究骨骼肌损伤的病理进程及治疗措施[J]. 中国医药指南, 2016, 14(32): 24-25. DOI: YYXK.0.2016-32-017
- [11] Tabebordbar M, Wang ET, Wagers AJ. Skeletal muscle degenerative diseases and strategies for therapeutic muscle repair[J]. Annu Rev Pathol, 2013, 8: 441-475. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-132450.
- [12] Goel AJ, Krauss RS. Ex vivo visualization and analysis of the muscle stem cell niche[J]. Methods Mol Biol, 2019, 2002; 39-50. DOI: 10.1007/9781071-2018_177.
- [13] Stefano C, Stefano S. Corrigendum: regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications[J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(31): 4657. DOI: 10.2174/138161282131151013181841.
- [14] Salgarella AR, Cafarelli A, Ricotti L, et al. Optimal ultrasound exposure conditions for maximizing C2C12 muscle cell proliferation and differentiation[J]. Ultrasound Med Biol, 2017, 43(7): 1452-1465. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.003.
- [15] 陈绍娟, 向力, 江森, 等. 异丙肾上腺素在 C2C12 细胞分化中的作用及机制[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(09): 1178-1187.
- [16] 卜凡, 解栋梁, 舒彬, 等. 应用多重荧光标记的流式细胞分选技术检测小鼠肌卫星细胞数量及其分化能力的增龄性变化[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(18): 1630-1635.
- [17] Liu Y, Sweeney G. Adiponectin action in skeletal muscle[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2014, 28(1): 33-41. DOI: 10.1016/j.beem.2013.08.003.
- [18] Fiaschi T, Giannoni E, Taddei ML, et al. Globular adiponectin activates motility and regenerative traits of muscle satellite cells[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e34782. DOI: 10.1371/journal.pone.0034782.
- [19] Fu X, Zhao J, Liang J, et al. AMP-activated protein kinase mediates myogenin expression and myogenesis via histone deacetylase 5[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 305(8): C887-C895. DOI: 10.1152/ajpcell.00124.2013.
- [20] He K, Hu J, Yu H, et al. Serine/threonine kinase 40 (Stk40) functions as a novel regulator of skeletal muscle differentiation[J]. J Biol Chem, 2017, 292(1): 351-360. DOI: 10.1074/jbc.M116.719849.

(修回日期: 2020-12-25)

(本文编辑: 阮仕衡)