

## 牵张力对 C2C12 细胞株 MEF2A 基因表达的影响

刘春利<sup>1</sup>, 刘晓伟<sup>2</sup>, 肖丹娜<sup>1</sup>, 高辉<sup>1</sup>

(1. 天津市口腔医院正畸科, 天津 300041; 2. 武警后勤学院附属医院口腔科, 天津 300162)

**摘要** 目的: 评价牵张力作用后 C2C12 细胞 MEF2A 基因表达变化。方法: 应用四点弯曲加力系统对 C2C12 细胞施加周期性机械牵张力, 加力频率 0.5 Hz, 形变量 2 000  $\mu$  strain, 加力时间分别为 1、2、4、8、12 h。采用实时荧光定量 PCR 检测受力后 C2C12 细胞 MEF2A 基因表达变化。结果: 对于 C2C12 细胞在 12 h 内设定的时间段加 0.5 Hz, 加力板形变量 2 000  $\mu$  strain 的周期性牵张力后, 其 MEF2A 基因表达未因加力明显变化, 其表达量的变化未见统计学意义, 不同加力时间 MEF2A 基因表达无明显差异 ( $P>0.05$ )。结论: 短时间加力刺激对骨骼肌的改建影响较小, 12 h 以内牵张力刺激对颌面部骨骼肌无明显影响。

**关键词** C2C12 细胞株; 牵张力; MEF2A 基因

中图分类号 R783.5

文献标志码 A

### Effects of C2C12 on cell lines MEF2A gene expression

LIU Chun-li<sup>1</sup>, LIU Xiao-wei<sup>2</sup>, XIAO Dan-na<sup>1</sup>, GAO Hui<sup>1</sup>

(1. Department of Orthodontics, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin 300041, China; 2. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of the Armed Police Logistics College, Tianjin 300162, China)

**Abstract Objective:** To evaluate the effect of the cyclic stretch on the expression of MEF2A mRNA. **Methods:** C2C12 cells were stretched cyclically using a four-point bend device, in different periods of 2 000  $\mu$  strain periodic mechanical tension. Real-time quantitative PCR were applied to detect the level of MEF2A mRNA. **Results:** In 12 h within the set periods 0.5 Hz, 2 000  $\mu$  strain strength added to C2C12 cells, MEF2A gene expression was not obviously affected, and the quantity of expression was not statistically significant ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** The length of the loading time is one of the most important factors that affect the reconstruction of skeletal muscle, and Pulling tension within 12 h has no significant influence on maxillofacial skeletal muscle reconstruction.

**Key words** C2C12; cyclic stretch; MEF2A

有些正畸治疗尤其功能矫形治疗或者正畸正颌联合治疗的病例, 在治疗后不仅硬组织发生改建, 相应的软组织也需要发生适应性改变, 从而适应新的功能环境。颌面部肌肉结构和功能的适应性改建是这些治疗成功的一个关键因素<sup>[1-2]</sup>。机械牵张刺激对颌面部肌肉改建的影响与治疗效果的维持关系密切, 因此摸索合适的机械牵张刺激对于治疗效果以及辅助矫治装置的研发有重要意义。肌细胞增强因子 MEF2 是一种调节肌肉特异性转录的基因, 可以激活多种肌肉相关基因的表达, 从而对肌肉组织的分化、维持和再生起重要作用<sup>[3]</sup>。MEF2A 是其在骨骼肌中主要表达的亚型之一<sup>[4]</sup>, 对 MEF2A 的研究是对骨骼肌细胞应答机制研究的重要组成部分。为了模拟机械牵张力对颌面部肌肉作用, 本实验应用四点弯曲细胞加力装置对 C2C12 细胞施加不同时间段相同力度的机械牵张刺激, 并通过实时荧光定量 PCR 检测加力刺激后 C2C12 细胞 MEF2A

的基因表达规律, 初步探索 0.5 Hz, 加力板变形量 2 000  $\mu$  strain 的牵张力对骨骼肌细胞的影响, 为探索功能矫治的细胞及分子生物学机制提供实验依据。

### 1 材料及方法

**1.1 细胞系和主要试剂及仪器** C2C12 细胞, DMEM/F12 培养基, 新生小牛血清 (成都哈里生物工程有限公司), CO<sub>2</sub> 孵箱 (Forma Scientific .Inc 美国), 倒置相差显微镜及照相系统 (OLY MPUS IX70), Forcel 四点弯曲加力装置 (四川大学华西口腔医学院正畸与成都电子科技大学联合研制), FTC2000 实时荧光定量基因扩增仪 (加拿大枫岭公司), Trizol (美国 MRC 公司), RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (立陶宛 MBI 公司), Gel Doc 1000 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司), 引物合成及探针修饰 (上海生物工程有限公司)。

#### 1.2 小鼠成肌细胞株 C2C12 培养及加力

**1.2.1 成肌样细胞株 C2C12 的传代培养** 将成肌样细胞株 C2C12 按  $1 \times 10^7/L$  的密度, 接种于经多聚赖氨酸处理的中号玻璃培养瓶中, 加入约 10 mL 含 10% 新生小牛血清的 DMEM/F12 培养基, 置于 CO<sub>2</sub>

基金项目 天津市自然科学基金资助项目 (06YFJMJC08900)

作者简介 刘春利 (1979-), 女, 主治医师, 硕士, 研究方向: 口腔正畸学; 通信作者: 高辉, E-mail: keyanjiaoxue@gmail.com。

孵箱(37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>)。当 C2C12 细胞生长形成单层, 铺满培养瓶底 80% 以上时, 在无菌条件下传代。用 PBS 液清洗培养瓶 3 次, 加入 25 g/L 胰酶和 22 g/L EDTA, 室温消化 3~5 min, 加入含有 10% 新生小牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化, 吹打细胞制成细胞悬液, 按 1×10<sup>5</sup>/L 密度分别置于各培养瓶中继续培养隔天换液。

**1.2.2 实验分组** 将实验细胞分两大组: 第 1 组为空白对照组, 第 2 组为加力组, 每组按不同时段加力 1、2、4、8、12 h, 每实验时段收集 3 个样本。

**1.2.3 四点弯曲加力装置对 C2C12 细胞加力** 将 BD Falcon 公司的 75 cm<sup>2</sup> 蓝盖斜颈细胞培养瓶从中间剖开, 取细胞常规培养时用的底面(厚度 1.15 mm), 分成 3 cm×8 cm 大小两块, 周缘平滑四角圆钝, 以避免加力过程中的应力集中。洗净加力用细胞培养板, 灭菌后接种细胞。采用传代后的 C2C12 细胞, 按 2×10<sup>5</sup> 密度接种于加力板上(实验组和对照组同时种板), 然后将其放入培养皿中, 贴壁 6 h 后加入含 100 mL/L 小牛血清的 DMEM/F12 培养基, 于 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 48 h 后, 再将培养基换为无血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h, 以同步化 C2C12 的细胞周期。采用 Forcel 四点弯曲体外细胞力学加载装置对接种在加力板上的成肌样细胞进行加力, 频率 0.5 Hz, 加力板变形量为 2 000 μ strain, 对细胞按不同时间段施加周期性牵张力。各加力组重复 3 次(n=3), 加力结束后分别收获细胞。

**1.3 样本采集** 以 PBS 冲洗加力后细胞, 无菌滤纸吸净多余 PBS 液, 然后原位裂解细胞, 严格按照 Invitrogen 公司的 TRIZOL 试剂说明书提取 RNA, 并收取 RNA 样本置于经 DEPC 水处理过的 1.5 mL 离心管中, 存放于 -20 摄氏度。

**1.4 RT-PCR 检测 MEF2A-mRNA 的表达**

**1.4.1 引物设计与合成** MEF2A 上游引物: 5'-CACGCTACATAGAAATGTGT-3', 下游引物: 5'-CTTGAGTTTACAAATCCATT-3', 探针: CTGTAGT-GCTCAACATCCCAC, 该产物产生 144bp cDNA 片段; ATCB: 上游引物: 5'-GAAGATCAAGATCATTGCTC-CT-3', 下游引物: 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3', 探针: 5'-CTGTCCACCTTCCAGCAGA-3', 该产物产生 111BP cDNA 片段。

**1.4.2 总 RNA 的提取和逆转录** 在紫外分光光度计上测定 RNA 的浓度和纯度。使用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (立陶宛 MBI 公司) 试剂盒反转录成 cDNA。

**1.4.3 实时荧光定量 PCR** 以 cDNA 为模板进行

PCR 扩增, 30 μL 反应体系中包含以下溶液或试剂: 10×buffer 3 μL, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol) 3 μL, dNTP(25 mmol) 0.36 μL, PCR Forward Primer (10 μmol) 1 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 1 μL, 探针 (10 μmol/L) 0.6 μL, Template 0.3 μL, ddH<sub>2</sub>O 18.74 μL。两步法 PCR 扩增标准程序: 预变性: 94℃、2min 1 个循环; PCR 反应: 94℃、20 s, 46℃、20 s, 60℃、30 s 45 个循环。

**1.5 统计学处理** 利用 SPSS 13.0 统计分析软件包, 采用 *t* 检验以及单因素方差分析对数据进行统计学分析, 以 *P*<0.05 为有显著性差别。

## 2 结果

**2.1 实际 ACTB 内参和 MEF2A 相对分子质量条带** MEF2A 与内参照 ACTB 的实际电泳条带和理论扩增条带基本一致, 说明二者的实际扩增相对分子质量与理论值基本相符。凝胶电泳检查结果见图 1。同时, 总 RNA 提取完整无降解, 满足后续实验的要求。见图 2。

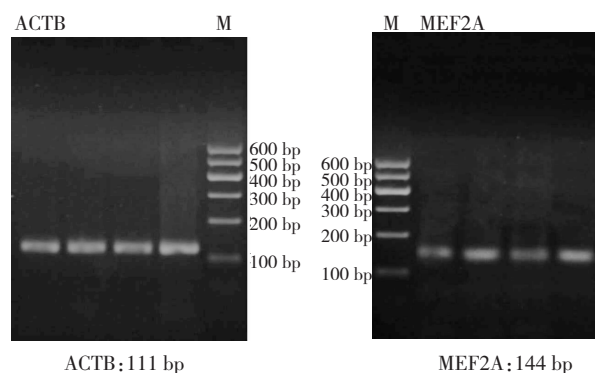


图 1 ACTB 和 MEF2A 扩增产物电泳条带

Fig 1 Electrophoresis banding amplification products of ACTB and MEF2A

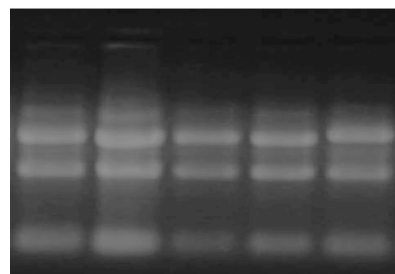


图 2 总 RNA 凝胶电泳结果

Fig 2 Results for total RNA gel electrophoresis

**2.2 对照组与加力组 MEF2A 基因表达比较** 采用 *t* 检验, 相同时间段加力组与空白对照组相比, MEF2A 基因表达量未见明显变化(*P*>0.05), 采用单因素方差分析对加力组不同时间段 MEF2A 基因的表达进行比较, 发现加力后各时间段 MEF2A 基因表达强度未见统计学差异(*P*>0.05), 见表 1。

表 1 两组各时间点牵张力诱导 MEF2AmRNA 表达 (Ct 值) 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Compare MEF2A gene expression affected by strain force between different time groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h
空白组	15	6.90±0.605	6.45±0.491	6.91±0.314	6.99±0.340	6.01±0.439
加力组	15	6.31±0.464	6.29±0.536	6.06±0.578	6.59±0.528	6.33±0.489

### 3 讨论

在口周肌肉受到的各种刺激当中,张力刺激尤为重要。因为口周肌肉附着在颌骨上,当咀嚼时或是戴用矫形装置时,颌面部骨骼肌会因被拉伸而处于张力作用下,矫形治疗中和治疗后颌面部骨骼肌改建及其稳定性与张力刺激有关。MEF2A 广泛存在于骨骼肌中,其 DNA 结合活性在骨骼肌中高度表达<sup>[5]</sup>,参与调控肌细胞的分化和肌肉特异性蛋白表达<sup>[6-7]</sup>,张力刺激对于 MEF2A 影响的研究是研究张力对于骨骼肌改建影响的重要组成部分。

本研究中采用四点弯曲细胞力学加载仪,此装置采用梁变形原理,通过数控步进电机使细胞培养板发生形变,以此对培养板表面的细胞产生恒定的周期性张力。曾有学者对细胞的多种施力方式进行研究<sup>[8-9]</sup>,细胞可以耐受的应变量为  $1\ 000\ \mu\text{ strain} \sim 4\ 000\ \mu\text{ strain}$ <sup>[10]</sup>。本实验中采用低频率 (0.5 Hz)  $2\ 000\ \mu\text{ strain}$  大小的周期性张力,对 C2C12 细胞进行加力,加力后用显微镜观察加力板上的细胞,此力值在细胞所能承受力值范围内,而且该力下细胞的贴壁及生长情况良好,脱落率极低,符合本实验的要求。

以往研究表明周期性牵张力作为一种有效刺激对牙周膜细胞、骨髓破骨细胞等均有影响<sup>[11-12]</sup>,而其对骨骼肌细胞的影响也是近年来的研究热点。为了探究周期性牵张力对骨骼肌改建的细胞学机制,本研究选择 MEF2A 作为研究对象,MEF2A 是成肌因子中的一个重要分型,此次研究也为后续研究周期性牵张力对其它成肌因子的影响提供实验依据。对 C2C12 细胞在周期性张力作用下,MEF2A 基因表达检测发现,加力 12 h 以内 MEF2A 基因表达量与对照组比较和加力组各时间段横向比较均未见统计学差异,其表达量没有随时间延长而增加,各相邻加力时间之间 MEF2A 基因表达量未发现统计

学差异,提示周期性牵张力在 12 h 以内不能以改变 MEF2A 基因表达的形式影响骨骼肌细胞。在矫形治疗中,短时间的加力过程可能不足以引起颌面部骨骼肌的明显改建,需要延长治疗中骨骼肌的受力时间,同时佐证了戴用功能矫治器建议每天戴用 14 h 以上甚至全天戴用<sup>[13]</sup>,才能保证治疗效果,并需要延长治疗满意后的效果保持时间。本次实验研究采用 0.5 Hz 加力频率,型变量为  $2\ 000\ \mu\text{ strain}$ ,在生理范围内其他频率和加力形变量对于 C2C12 的 MEF2A 基因表达的影响需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Uysal T, Yagci A, Kara S, et al. Influence of pre-orthodontic trainer treatment on the perioral and masticatory muscles in patients with Class II division 1 malocclusion[J]. Eur J Orthod, 2012,34(1):96
- [2] 阎潇,孙仙蕊,刘丽娟,等. 功能矫形状态下的翼外肌适应性改建[J]. 国际口腔医学杂志, 2014,41(3):329
- [3] 程波,李利,王林杰,等. MEF2 基因家族的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2012,48(15):70
- [4] 高智晟,杨龙,张冬杰,等. MEF2a 基因在肌肉组织中的表达研究[J]. 中国农学通报, 2009,25(4):21
- [5] Naya F J, Snyder C M, Held A, et al. MEF2A regulation of a miRNA mega-cluster is required for proper skeletal muscle regeneration[J]. FASEB J, 2011,25:851
- [6] Zhao W, Zhao S P, Peng D Q. The effects of myocyte enhancer factor 2A gene on the proliferation, migration and phenotype of vascular smooth muscle cells[J]. Cell Biochem Funct, 2012,30(2):108
- [7] Liu N, Nelson B R, Bezprozvannaya S, et al. Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014,111(11):4109
- [8] Horikawa A, Okada K, Sato K, et al. Morphological changes in osteoblastic cells (MC3T3-E1) due to fluid shear stress: cellular damage by prolonged application of fluid shear stress[J]. Tohoku J Exp Med, 2000,191(3):127
- [9] 匡威,谭家莉,张红梅,等. 不同应力条件对体外培养成肌细胞命运的影响[J]. 中国美容医学, 2011,20(7):1087
- [10] Fermor B, Gundle R, Evans M, et al. Primary human osteoblast proliferation and prostaglandin E2 release in response to mechanical strain in vitro[J]. Bone, 1998,22(6):637
- [11] 李永明,王峰,罗颂椒. 周期性牵张力对骨髓破骨细胞 MMP-3mRNA 表达的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2004,20(4):428
- [12] 李永明,杨磊,丁寅,等. 周期性牵张力调节人牙周膜细胞成骨相关基因表达的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2007,42(6):368
- [13] 倪密,陈文静,林汤毅,等. 2 种功能矫治器治疗安氏 II 类 1 分类错殆作用机理的比较研究[J]. 口腔医学, 2007,27(5):258

(2014-12-10 收稿)