

[文章编号 1000-1182(2004)04-0281-03]

周期性牵张体外培养面颌成肌细胞肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶活性及其 mRNA 变化的研究

车晓霞¹, 曾 宏², 罗颂椒³

(1. 首都医科大学北京口腔医院 正畸科, 北京 100050; 2. 成都地奥集团, 四川 成都 610000;
3. 四川大学华西口腔医院 正畸科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 观察牵张引起的成肌细胞内 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶活性及 mRNA 变化, 探求口腔正畸功能矫形治疗中肌肉改建机理, 为正畸临床治疗及防止复发提供理论性指导。方法 采用四点弯曲加力装置, 使体外培养的 SD 大鼠面颌部成肌细胞发生牵张变形后, 无机磷-钼酸铵直接比色法测定加力后不同时段 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶活性, RT-PCR 测定肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶 mRNA 变化。结果 SD 大鼠体外培养成肌细胞在加力变形后的 4 h 内 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶活性显著降低, 8 h 到 24 h 期间明显升高, 48 h 基本接近对照组水平; 此外, RT-PCR 结果显示成肌细胞受牵张力后 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶 mRNA 水平在各时间段组均较对照组升高, 其中以 2 h 和 48 h 段组升高最明显。结论 随着受力时间的延长, 成肌细胞发生了适应性变化, Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶活性变化的控制发生在基因翻译前水平, Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶活性及其 mRNA 变化会直接影响对细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的调节, 继而引起细胞内发生的一系列生物学反应的变化。

[关键词] 牵张; 成肌细胞; Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶

[中图分类号] R 783.5 **[文献标识码]** A

Changes of Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase Activity of Cultured Myoblast Induced by Cyclic Stretch

CHE Xiao-xia¹, ZENG Hong², LUO Song-jiao³. (1. Dept. of Orthodontics, Beijing Stomatology Hospital, Beijing 100050, China; 2. Institute of Materia Medica, Diaoyu Group, Chengdu 610000, China; 3. Dept. of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of stretch on sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases activity and mRNA level and study the remodeling reaction of muscle in a variety of mechanical environments. **Methods** Myoblast from maxillofacial skeletal muscle of one-week-old male Sprague-Dawley rat was cultured and stretched cyclicly using a four-point bend device. Inorganic Phosphorus test was used to compare the activity of Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases of myoblast before and after stretch. RT-PCR was also used to observe the Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases mRNA level. **Results** The activity of Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases of myoblast down regulated significantly in 4 hours. During the period of 8 hours to 24 hours, up-regulation followed then returned to control level at the 48 hour point. RT-PCR showed that Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases mRNA level were elevated by stretch, particularly at 2 hour and 48 hour point. **Conclusion** The results suggested a transcriptional control of Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases activity was involved in the muscle remodeling process induced by stretch.

[Key words] stretch; myoblast; Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases

骨骼肌长期在非习惯作用模式下收缩发生的改建是多个复杂的生物学反应的集合, 这与正畸临床密切相关, 面颌部肌肉最终的改建结果直接影响矫治的疗效及疗效的保持。因此, 对骨骼肌改建过程中细胞内各种组成物质和信号分子的研究将为正畸的临床治疗提供理论性依据。

骨骼肌细胞内的游离 Ca^{2+} 参与细胞的多种生理和生化反应, 细胞质中的游离 Ca^{2+} 处于极为严格的调控之中。为了有效控制细胞质内静息状态下游离 Ca^{2+} 浓度和在各种反应发生时 Ca^{2+} 分布的时间和空间变化, 细胞内存在着游离 Ca^{2+} 的转移系统, 包括细胞膜和肌浆网膜上的 Ca^{2+} 泵 (Ca^{2+} -ATP酶)、 Na^{+} - Ca^{2+} 交换器和各种钙离子通道。肌浆网含有丰富的 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶, 对于 Ca^{2+} 的转移作用具有灵敏、快速的特点, 对维持细胞内 Ca^{2+} 平衡起着重要作用。目前国内外学者对肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶活性的研

[收稿日期 2004-02-04; 修回日期 2004-06-12]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30171024)

[作者简介] 车晓霞 (1969-), 女, 河北人, 住院医师, 博士

[通讯作者] 罗颂椒, Tel: 028-85501492

究多采用活体实验方法,如增加肌肉运动训练、牵张肌肉并制动等,本研究通过体外成肌细胞培养,采用加力装置使其变形从细胞学水平探讨牵张对成肌细胞内 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性及其 mRNA 的影响,为研究牵张引起的骨骼肌改建提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 体外面颌成肌细胞的培养

选择健康 1 周龄 SD 大鼠雄性乳鼠,断颈处死,解剖分离面颌部咬肌区骨骼肌,参照 Blau 方法¹,进行原代骨骼肌成肌细胞的体外培养。培养 4 d 后,成肌细胞在 35 mm 培养瓶中生长密度达到 80%~90% 后传代,本实验中所用加力的成肌细胞均为第 3 代培养细胞。将第 3 代培养细胞按照 1.8×10^5 密度接种在面积为 3 cm \times 7 cm 的培养板上,24 h 同步化无血清培养。随后,采用 Forcel 四点弯曲加力装置(发明专利号 01129166.4),对接种在培养板上的成肌细胞加力,频率为 0.1 Hz,培养板变形量为 2000 μ Strain。

1.2 无机磷法检测体外培养 SD 大鼠面颌成肌细胞 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性

按照 0.5、1、2、4、8、12、16、20、24、48 h 时间段分组,每组各包含对照和加力组。加力组和对照组细胞反复在 -70 液氮中冻融 3 次,冰浴下收集样本。以无机磷-钼酸铵直接比色法检测成肌细胞对照组与加力组 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性,即为反应体系中含 Ca^{2+} 时测定的总酶活性与反应体系中无 Ca^{2+} 时测得的酶活性之差。按照测定血清中无机磷含量的试剂盒(成都迈克)说明书中的步骤,采用美国 PE 公司 HTS7000 plus 多孔板(紫外/荧光/可见光)高效分析仪以无机磷测定程序测定样本 OD,并换算成无机磷含量,读数波长为 635 nm,并将样本 OD 换算成酶活性²。

1.3 SD 大鼠面颌成肌细胞 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 的测定

成肌细胞体外培养、传代、接种及同步化处理同实验一。按照加力 1、2、12、24、48 h 时间段分组,每组各包含对照和加力组,采用细胞反复冻融方法获取样本。

1.3.1 成肌细胞肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶引物设计

依据 SD 大鼠骨骼肌肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶基因全长序列³ 设计引物,正义链(Sense)为:5'-CTG CTG CTT CGC TCG TGT 3',反义链(AntiSense)为:5'-TGT CCA GGT CAG GTG GGT T-3',限定片段长为 428 bp。

PCR 的内标选用管家基因 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase),其引物为 Sense 链:5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3', AntiSense 链:5'-

AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3',限定片段长为 309 bp。

1.3.2 RNA 提取 经胰酶-EDTA 消化、离心收集细胞,PBS 洗涤 2 次后用 TRIzol 试剂(Life Technologies)提取总 RNA,操作按试剂说明书进行。提取的总 RNA 以琼脂糖凝胶电泳及分光光度计(Smart SpecTM 3000)检测,无降解,且 OD 260/280 值在 1.8~2.0 的 RNA 分装后于 -80 储存备用。

1.3.3 RT-PCR 采用一步法 RT-PCR(One Step RNA PCR Kit 购自 TaKaRa 公司,PCR 仪为 Eppendorf Mastercycler Gradient),详细步骤参照试剂手册进行。反应扩增条件为 55 30 min 94 2 min 94 20 s 57 20 s 72 30 s(27cycles) 72 3 min;55 30 min-RNA 反转录成 cDNA;94 2 min 反转录酶失活;降解 RNA,防止非特异性扩增;将单链 cDNA 变为双链 cDNA。按照下列程序进行 27 个循环:94 20 s 使 cDNA 变性,DNA 双链打成单链;57 20 s 复性、单链 DNA 与引物结合;72 30 s 单链 DNA 与引物结合的延伸;72 3 min 使未完全反应的反应完全延伸。扩增产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.4 数据分析 电泳结果用 BIO RAD 凝胶成像系统拍照,BIO RAD Quantity One 4.4 软件分析电泳条带光密度值。

2 结果

2.1 SD 大鼠成肌细胞加力后不同时段肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性变化

SD 大鼠体外培养成肌细胞对照组及加力后各时段组 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性变化结果见表 1。

表 1 SD 大鼠成肌细胞加力组和对照组 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性比较

Tab 1 Comparison of the Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases activity of myoblast cultured in vitro between control and stretch groups

时间(h)	加力组(1)	对照组(2)	(1)/(2)
0.5	3.23	6.44	0.50
1	2.40	5.43	0.44
2	5.02	13.88	0.36
4	27.56	54.54	0.50
8	12.87	8.01	1.61
12	3.60	1.34	2.69
16	4.23	2.61	1.62
20	4.23	1.61	2.63
24	2.62	1.29	2.03
48	3.22	3.03	1.07

由表 1 看出:SD 大鼠体外培养的成肌细胞在加力变形后的 4 h 内 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性显著降低, 8 h 到 24 h 期间升高明显, 48 h 基本恢复正常。

2.2 SD 大鼠面颌成肌细胞加力后不同时段肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 的变化

2.2.1 成肌细胞肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶在 SD 大鼠成肌细胞中的表达

如图 1 所示, 1 代表 1 h 对照组、2 代表 1 h 加力组、3 代表 2 h 对照组、4 代表 2 h 加力组、5 代表 12 h 对照组、6 代表 12 h 加力组、7 代表 24 h 对照组、8 代表 24 h 加力组、9 代表 48 h 对照组、10 代表 48 h 加力组、GAPDH 为内标带, 长度 309 bp, Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase 为实验带, 长度为 428 bp。图中可见肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 在体外培养的 SD 大鼠成肌细胞中可见清晰表达, 且加力组与对照组光密度不同。



图 1 SD 大鼠面颌成肌细胞肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 表达
Fig 1 The expression of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases mRNA level of myoblast

2.2.2 加力不同时段 SD 大鼠面颌成肌细胞中肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 变化

RT-PCR 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, BIO RAD 凝胶成像系统拍照结果, BIO RAD Quantity One 4.4 软件分析电泳条带的光密度值, 结果见表 2。由表 2 可以看出, 不同时段加力组 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 表达均较对照组升高, 其中以 2 h 段和 48 h 段升高最为明显。

表 2 SD 大鼠成肌细胞肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 电泳条带的光密度值

Tab 2 The optics density of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPases mRNA of myoblast

时间 (h)	对照组 (C)			加力组 (F)			(F)/(C)
	E	G	E/G	E	G	E/G	
1	496.80	999.20	0.50	789.20	1381.90	0.57	1.15
2	363.20	786.00	0.46	805.50	1407.90	0.57	1.24
12	520.00	1073.30	0.43	567.70	1336.40	0.49	1.14
24	512.50	1316.50	0.39	693.60	1521.50	0.46	1.17
48	584.60	1191.00	0.49	936.90	1513.30	0.62	1.26

注: 实验带为 E、内标 GAPDH 为 G、对照组为 C、加力组为 F

3 讨论

国内外学者对肌肉内 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性的测定通常是取材于活体或单肌纤维牵张的体外实验, 对于体外培养的成肌细胞经各种因素刺激后测定 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性的研究未见报道。本实验通过细胞反复冻融, 获得成肌细胞 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶样本, 按照无机磷测定法原理, 使用测定血清中无机磷含量的试剂盒, 得以顺利检测出成肌细胞内的 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性。

静息 Ca^{2+} 浓度升高与肌浆网钙泵泵出率下降有关⁴。有学者⁵⁻⁷的研究证实短时间运动训练使快肌纤维 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性显著降低, 运动训练恢复时通过增加功能性 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶蛋白比例使 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性增加⁸。在长期的运动训练后, 肌肉肥大, 在发生肌肉收缩时 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性下降幅度减小⁹。本实验采用无机磷-钼酸铵直接比色法测定 SD 大鼠成肌细胞加力后 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性变化, 结果显示成肌细胞在加力变形后的 4 h 时间内 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性显著降低, 8 h 到 24 h 期间升高明显, 48 h 基本接近对照组水平, 与 Green 等学者的活体实验测定肌肉 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性的结果相似, 说明随着受力时间的延长, 成肌细胞发生了适应性变化, Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性变化会直接影响对细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的调节, 继而引起细胞内发生一系列生物学反应的变化。

Zador 等¹⁰ 研究显示肌肉被动牵张制动后快肌纤维肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 水平下降到正常值的一半, 经 3 d 的被动牵张后 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 水平恢复, 但亚型的构成比例不同。而 Peters 等¹¹ 研究者使肌肉失去牵张负载, 发现快肌纤维肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶在失去负载后 2, 4 和 10 d 在 pre-mRNA 和 mRNA 转录水平分别增加 20%, 30% 和 70%, 提示是一种翻译前基因表达控制。本研究结果显示成肌细胞受牵张力后各时间段加力组 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 均较对照组升高, 其中以 2 h 段和 48 h 段表达最明显, 提示牵张引起 SD 大鼠成肌细胞的 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性变化的控制发生在基因翻译前水平, 此结果不同于体内实验, 可能与体内肌肉受到神经支配有关。结合本实验中 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶活性检测的结果, 在 8~24 h 阶段明显升高, 推测肌浆网 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP 酶 mRNA 表达在时间上可能有循环趋势。

(下转第 286 页)

致。但是本次研究时间不太长,对于牙龈组织和血液中的镍铬元素含量是否随非贵金属烤瓷冠修复时间的延长而继续增加,还是停留在一定的特异性峰值,尚有待进一步研究。

石墨炉原子吸收光谱法检测牙龈组织及血液中镍铬含量在戴用非贵金属金瓷冠一定时间后的升高趋势,提示临床:除了对美观及局部组织有影响外,口内多单位镍铬烤瓷合金的全冠,经多年的使用是否对机体器官造成损害还有待于观察。

[参考文献]

- 1] 蒙戈,吴敏,李彦兵,等. 烤瓷冠边缘刷镀防蚀的研究J. 中国美容医学,2002, 11 (1) :8-11.
- 2] Ohansson Bi, Lucas LC, Lemons JE. Corrosion of copper, nickel and gold dental casting alloysJ. Appl Biomater, 1989, 23(3) :349-352.

- 3] Watha JC, Craig RG, Hanks CT. The release of elements of dental casting alloys into cell-culture mediumJ. J Dent, 1991, 70(6) :1014-1017.
- 4] Vaidyanathan TK, Vainyanathan J, Linke HAB, et al. Tarnish of dental alloys by oral microorganismsJ. J Prosthet Dent, 1991, 66(5) :709-714.
- 5] 朱松,韩英杰. 烤瓷烧结次数对镍铬合金表面氧化膜形成的影响J. 现代口腔医学杂志,2000, 14(4) :227-278.
- 6] 徐军,郭娟丽. 烤瓷用镍-铬合金金属氧化膜研究J. 中华口腔医学杂志,1999, 34(5) :310-311.
- 7] Ito H, Okade T, Ishida T, et al. Treatment and analysis of clinical case of gingival pigmentation around the restored teethJ. Dtsch Zahnartz J, 1990, 34(1) :1-6.
- 8] Keohips PS, Memikoglu MM, Kansu G, et al. Case report: ionisation tendency of a base metal alloy in the oral environment J. Eur J Prosthodont Restor Dent, 1995, 3(5) :231-234.

(本文编辑 王 晴)

(上接第 283 页)

[参考文献]

- 1] Duan C, Delp MD, Hayes DA, et al. Rat skeletal muscle mitochondrial Ca^{2+} and injury from downhill walkingJ. J Appl Physiol, 1990, 68(3) :1241-1251.
- 2] 张俊田主编. 现代药理实验方法学M. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社,1998 :515.
- 3] Wu KD, Lytton J. Molecular cloning and quantification of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoforms in rat musclesJ. Am J Physiol, 1993, 264(2 Pt 1) :C333-341.
- 4] Balnave CD, Allen DG. Intracellular calcium and force in single mouse muscle fibres following repeated contractions with stretchJ. J Physiol, 1995, 488 (Pt 1) :25-36.
- 5] Green H, Roy B, Grant S, et al. Effects of a 21 day expedition to 6, 194 m on human skeletal muscle SR Ca^{2+} -ATPaseJ. High Alt Med Biol, 2000, 1(4) :301-310.
- 6] McKenna MJ, Harmer AR, Fraser SF, et al. Effects of training on potassium, calcium and hydrogen ion regulation in skeletal muscle and blood during exerciseJ. Acta Physiol Scand, 1996, 156(3) :335-

- 346.
- 7] Yasuda T, Inashima S, Sasaki S, et al. Effects of exhaustive exercise on biochemical characteristics of sarcoplasmic reticulum from rat soleus muscleJ. Acta Physiol Scand, 1999, 165(1) :45-50.
- 8] Ferrington DA, Reijneveld JC, Bar PR, et al. Activation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase induced by exercise J. Biochem Biophys Acta, 1996, 13 (2) :203-213.
- 9] Green HJ, Grange F, Chin C, et al. Exercise-induced decreases in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity attenuated by high-resistance trainingJ. Acta Physiol Scand, 1998, 164 (2) :141-146.
- 10] Zador E, Dux L, Wuytack F. Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibersJ. J Muscle Res Cell Motil, 1999, 20(4) :395-402.
- 11] Peters DG, Mitchell-Felton H, Kandarian SC. Unloading induces transcriptional activation of the sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1 gene in muscle J. Am J Physiol, 1999, 276 (5 Pt 1) :C1218-1225.

(本文编辑 王 晴)