论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0710-05

慢性电刺激对成肌分化的C2C12细胞肌型转换的影响

欧 娜[1],刘 刚[1],姜 帆[2],邹仲敏[2],刘 熙[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院呼吸内科[1];军事预防医学院毒理学研究所[2])

[摘要] **目的** 研究钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)在低频复合生理频率慢性电刺激(chronic electrical stimulation with lower physiological frequency, CESLPF)对骨骼肌细胞肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)亚型表达的影响。**方法** 以体外2%马血清诱导小鼠成肌母细胞C2C12成肌分化为模型。实验分3组:对照组、CsA组和KN93组。对照组为正常分化的细胞;CsA组和KN93组在细胞诱导分化3 d后,分别用CaN抑制剂环孢菌素A(CsA,8 μmol)、Ca^{2+}/钙调蛋白依赖的蛋白激酶(CaMK)抑制剂KN93(6 μmol)单一或联合CESLPF(10+40 Hz,1.5 h/d,共2 d)处理。通过RT-PCR、Western blot检测观察成肌分化过程中肌球蛋白重链亚型的表达水平及其转换情况,采用比色法检测CaN的活性。**结果** 在成功构建的体外成肌分化模型上发现,CsA和KN93能够抑制C2C12细胞MHC Ⅰ的mRNA及蛋白的表达。与分化对照组MHC Ⅰ mRNA相对表达量(0.79±0.04)相比,CsA组(0.62±0.03)和KN93组(0.69±0.05)能够抑制C2C12细胞MHC I型纤维的表达(与对照组比$P<0.05$);对照组、CsA和KN93处理组MHC I蛋白相对水平分别是(0.91±0.05)、(0.36±0.01)和(0.66±0.02)。对照组MHC Ⅱb相对表达量为(0.53±0.01),CsA(0.63±0.02)和KN93(0.75±0.03)促进MHC Ⅱb型纤维的表达(与对照组比较,$P<0.05$);CESLPF能够逆转上述改变(与对照组比较,$P>0.05$)。CsA能够抑制CaN的活性表达;CESLPF能够显著提高CaN活性($P<0.05$),但仍显著低于正常水平($P<0.05$)。**结论** CaN和CaMK是骨骼肌细胞MHC Ⅱ型向MHC Ⅰ型转变的重要调控酶,CESLPF可能是经CaN通路和非CaN通路联合作用促进肌型转换,该结果为临床应用CESLPF治疗OSAS提供了实验依据。

[关键词] 钙调神经磷酸酶;肌球蛋白重链;MHC亚型;电刺激

[中图法分类号] R322.74;R329.25;R337.5 [文献标志码] A

Effect of chronic electrical stimulation on transformation of myosin heavy chain isoforms in differentiated C2C12 cells

Ou Na[1], Liu Gang[1], Jiang Fan[2], Zou Zhongmin[2], Liu Xi[1] ([1]Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, [2]Institute of Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of chronic electrical stimulation with lower physiological frequency (CESLPF) on expression of myosin heavy chain (MHC) isoforms in differentiated C2C12 cells. **Methods** Three days after a C2C12 cell differentiation model was induced by 2% horse serum (HS), expression level of MHC isoforms in differentiated C2C12 cells treated with calcineurin (CaN) inhibitor cytosporin-A (CsA, 8 μmol) or calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) inhibitor KN93 (6 μmol) alone or in combination with CESLPF (10+40 Hz, 1.5 h/d for 2 d) was measured by RT-PCR and Western blotting, respectively. Activity of CaN was detected by colorimetry. **Results** CsA and KN93 could inhibit the expression of MHC I mRNA and protein in C2C12 cell differentiation model *in vitro*. The expression level of MHC Ⅰ mRNA and protein was higher in control group than in CsA and KN93 treatment group (0.79±0.04 *vs* 0.62±0.03 and 0.69±0.05, 0.91±0.05 *vs* 0.36±0.01 and 0.66±0.02, $P<0.05$). The expression level of MHC Ⅱb mRNA was lower in control group than in CsA and KN93 treatment group (0.53±0.01 *vs* 0.63±0.02 and 0.75±0.03, $P<0.05$). CESLPF was able to reverse the expression of MHC isoforms ($P>0.05$). CsA could suppress while CESLPF could increase the CaN activity which was still significantly lower than its normal level ($P<0.05$). **Conclusion** CaN and CaMK are the important regulatory enzymes for the transformation of MHC Ⅱ to MHC Ⅰ. CESLPF can promote the transformation of MHC Ⅱ to MHC Ⅰ through CaN-

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2005AC5060,CSTC2010GGB428);第三军医大学临床创新基金(2010XLC22)

[通信作者] 刘 刚,电话:(023)68754115, E-mail:liugang6399@sohu.com

dependent and CaN-independent pathway. Our results provide evidence for the application of CESLPF in treatment of obstructive sleep apnea syndrome.

[**Key words**] calcineurin; myosin heavy chain; isoforms of myosin heavy chain; electrical stimulation

Supported by the Tackling Project of Sci&Tech Research of Chongqing (CSTC2005AC5060, CSTC2010GGB428) and the Innovative Foundation for Clinical Research of Third Military Medical University(2010XLC22). Corresponding author: Liu Gang, Tel:86-23-68754115, E-mail:liugang6399@sohu.com

阻塞型睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)是呼吸科的常见病、多发病,其特点为睡眠期间反复发生上气道阻塞并引起呼吸暂停。OSAS 的发病机制复杂,至今尚未完全阐明。有人提出假说,认为 OSAS 主要由于上呼吸道横纹肌适应性下降,在非清醒状态下(如睡眠)不能保持呼吸道的开放[1]。目前认为舌根松弛、舌体或者舌根肥厚导致睡眠期间舌后坠是 OSAS 的常见病因之一。颏舌肌是最重要的上气道扩张肌,其正常收缩使舌体前移,阻止咽腔缩小并对抗气流阻力,维持气道通畅。颏舌肌功能异常是 OSAS 患者上气道陷闭,通气功能异常的主要因素[2]。我们前期的研究发现在慢性电刺激后,低压缺氧兔颏舌肌的肌球蛋白重链"由快向慢"转变(MHC 由Ⅱ型向Ⅰ型转变),这种转变在低频复合生理频率的电刺激时变化趋势非常显著[3]。进一步研究表明,CESLPF 诱导慢性低压缺氧兔颏舌肌肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)由 MHC Ⅱb 型向 MHC Ⅱa 和 MHC Ⅰ型转变,SR Ca^{2+} 的摄取-释放功能显著增强,这种变化在超低频复合生理频率刺激组的变化更加显著[4]。目前变频电刺激引起的骨骼肌的肌纤维类型转变机制尚不明确。钙调神经磷酸酶(CaN)和 Ca^{2+}/钙调蛋白依赖的蛋白激酶(CaMK)在骨骼肌肌纤维类型转变通路中起重要作用[5],但慢性变频电刺激是否与此有关尚不清楚。本研究以小鼠骨骼肌成肌细胞系 C2C12 细胞成肌分化为模型,研究 CaN 在 MHC 类型重构中的作用,探讨慢性变频电刺激临床治疗 OSAS 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞及培养方法 小鼠成肌细胞 C2C12 细胞系由第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所保存,在含 10 % 胎牛血清的 DMEM 增殖培养液(growth medium, GM)中扩增培养,待细胞生长至 70% ~80% 融合时,换为含 2% 马血清的 DMEM 分化培养液(differentiation medium, DM)诱导分化。细胞培养于 37 ℃,5 % CO_2 饱和湿度细胞培养箱中。

1.1.2 实验试剂及器材 钙调神经磷酸酶抑制剂环孢菌素 A(CsA)购于美国 Santa Cruz 公司,Ca^{2+}/钙调蛋白依赖的蛋白激酶抑制剂 KN93 购于英国 Tocris 公司。胎牛血清、马血清购于 Hyclone 公司,DMEM 培养基购于 Gibico 公司,Fura-2 购于日本同仁化学研究所,兔抗小鼠骨骼肌快肌球蛋白重链单克隆抗体、兔抗小鼠骨骼肌慢肌球蛋白重链单克隆抗体均购于英国 Abcam 公司,细胞钙调神经磷酸酶活性比色法定量检测试剂盒购于美国杰美公司(Genmed Scientifics Inc., USA)。自制变频电刺激仪,多功能酶标仪(型号:SYNERGY HT BIO-TEK,美国),高速冷冻式离心机(型号:eppendorf 5810R,德国),电泳仪(型号:DYY-8C,DYCP31CN,北京六一仪器厂),基因扩增仪(型号:GeneAmp PCR System9700, 美国),分光光度仪(型号:DR2800,美国哈希公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 体外低频复合生理频率模型的建立 将体外诱导的 C2C12 成肌细胞分为 3 组,分别为对照组(HS):为正常分化的细胞;KN93 组:在细胞诱导分化 3 d 后加入抑制剂 KN93 6 μmol;CsA 组:在细胞诱导分化 3 d 后加入抑制剂 CsA 8 μmol。在培养箱中安装好自制变频电刺激仪,上述各组细胞分别用低频复合生理频率(10 + 40 Hz)刺激(1.5 h/d,共 2 d)。刺激条件的确定参考文献[6-7]和预实验对细胞耐受性的研究。

1.2.2 RT-PCR 测定 C2C12 细胞 MHC 亚型 mRNA 的表达

①总 RNA 的提取:收集每组培养的 4×10^6 个 C2C12 成肌细胞,将细胞用 Trizol(购于 Invitrogen 公司)裂解提取总 RNA,经紫外分光光度计测定 $D(260)/D(280)$ 值,鉴定 RNA 纯度及定量后,置 -70 ℃ 冰箱冻存备用;②反转录:反转录所需 Rever TreAce-a-逆转录试剂盒购于 TOYOBO 公司,cDNA 第 1 链的合成按照试剂盒说明书进行,然后进入 PCR 反应;③聚合酶链反应:采用我们前期研究中所用引物,以 GAPDH 为内参,引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,具体序列如下:MHC-IS 5′-CCTTGGCACCAATGTCCCGGCTC; MHC-IAS 5′-GAAGCGCAATGCAGAGTCGGTG; MHC-IIaS5′-ATGAGCTCCGACGCCGAG; MHC-Ⅱ aAS 5′-TCTGTTAGCATGAACTGGTAGGCG); MHC-Ⅱ bS 5′-GTGATTTCTCCTGTCACCTCTC; MHC-Ⅱ bAS 5′-GGAGGACCGCAAGAACGTGCTGA; GAPDH S 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′; GAPDH AS 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′。建立 20 μl 反应体系,反应条件为 94 ℃ 5 min→(94 ℃ 30 s → 61 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s) ×40→72 ℃ 10 min; ④电泳:将反应完成后的 PCR 反应液 5 μl 置 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,设定电压为 60 V,电泳时间为 30 min,电泳结束后采用生物电泳图像分析系统照相保存,用 Quantity One 软件分析电泳条带,以目的基因条带光密度值/内参基因条带光密度值作为基因的相对表达水平。

1.2.3 Western blot 测定 C2C12 细胞 MHC 亚型蛋白的变化

肌纤维蛋白的提取参照文献[6]完成。冰上恒压 80 V 持续电泳 20 h,电泳后运用 Bio-Rad 装置,在冰上 100 V 转膜 2 h,将蛋白质转移至 PVDF 膜上。然后用 5% 脱脂牛奶封闭,在 4 ℃ 加入一抗孵育过夜,用 0.1% 的 TBS-T 洗膜 3 次,在室温下加入二抗孵育 2 h,然后用 0.1% TBS-T 洗膜。最后用化学发光试剂

显影,X胶片成像。胶片扫描图像采用Quanity One软件对目的条带进行光密度值分析,以目的蛋白与内参GAPDH蛋白的比值作为蛋白的相对表达水平。

1.2.4 比色法测定CaN活性 按照试剂盒说明书方法进行,简述如下:将各组细胞每组设3复孔,每孔细胞量为3×10^6个细胞,分化、抑制剂、刺激等处理3 d后,冻融法提取细胞裂解产物。将细胞萃取液置于冰槽中,设定分光光度仪的波长为660 nm并置零。取不同浓度的磷标准溶液按照酶促反应产物磷的测定方法进行测定并绘制标准曲线。依次进行样品测定,并跟进标准曲线计算样品磷浓度。酶活性以37 ℃条件下保温1 h,每10^6细胞释放的磷微摩尔量表示[μmol/(10^6·h)]。

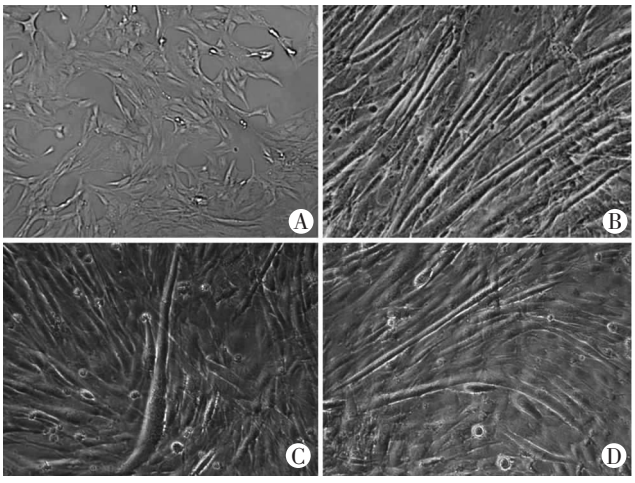
1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 18.0统计软件包进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 体外成肌分化模型的建立

我们通过采用2%马血清体外诱导C2C12细胞成肌分化形成肌管。C2C12成肌细胞在正常培养时形态为多角形或梭状(图1A),在经马血清诱导分化之后于显微镜下可以见到细胞融合,出现典型的含有多个细胞核的肌管形态(图1B)。证实我们在体外诱导分化的C2C12成肌细胞模型可以用于进一步的研究。CaN和CaMK是已知调控成肌和肌型形成的重要信号通路元件。在细胞成肌分化过程中加入CaN抑制剂CsA和CaMK抑制剂KN93,培养5 d,细胞形态学出现显著变化(图1C、D)。KN93处理后,细胞胞体增大,分化形成的肌管增粗明显。

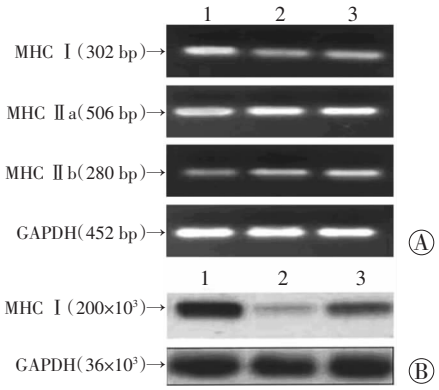


A:正常培养的C2C12成肌细胞;B:经诱导分化后,C2C12成肌细胞分化为骨骼肌细胞,可见典型的肌管;C:经KN93处理后C2C12成肌细胞;D:经CsA处理后C2C12成肌细胞

图1 体外诱导C2C12成肌细胞分化为骨骼肌细胞 (相差显微镜×200)

2.2 CsA和KN93对分化细胞MHC亚型表达的影响

应用RT-PCR检测了分化细胞MHC各型mRNA的表达,结果显示对照组(HS)MHC Ⅰ mRNA相对表达量为(0.79±0.04),CsA(0.62±0.03)和KN93(0.69±0.05)都可以抑制C2C12成肌细胞分化过程中MHC Ⅰ的表达,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。对照组MHC Ⅱb相对表达量为(0.53±0.01),CsA(0.63±0.02)和KN93(0.75±0.03)促进MHC Ⅱb型纤维的表达,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。以CsA对MHC Ⅰ的抑制更强,以KN93对MHC Ⅱb的刺激更强(图2A)。蛋白印迹反应亦证实,两种抑制剂可以抑制MHC Ⅰ型蛋白的产生(图2B),对照组、CsA组和KN组MHC Ⅰ蛋白相对水平分别是(0.91±0.05)、(0.36±0.01)和(0.66±0.02)。说明CsA和KN93这两种抑制剂都能够抑制慢肌形成。



1:HS组;2:CsA组;3:KN93组

A:RT-PCR结果;B:Western blot结果

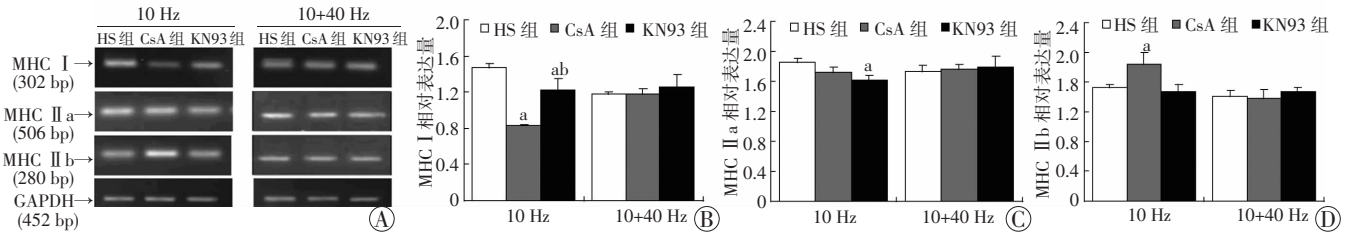
图2 抑制剂对体外诱导C2C12成肌细胞分化过程中MHC亚型表达的影响

2.3 低频复合生理频率电刺激对成肌分化C2C12细胞MHC亚型mRNA的影响

C2C12细胞经2%马血清诱导培养之后,我们采用单一频率(10 Hz)或复合生理频率(10+40 Hz)进行刺激,然后采用RT-PCR检测细胞各MHC亚型mRNA的表达情况(图3A)。研究结果显示,与正常分化细胞相比,在10 Hz电刺激时,CsA组和KN93组细胞MHC Ⅰ的mRNA表达均有显著降低($P<0.05$),以CsA组MHC Ⅰ的表达降低最为明显;当采用复合生理频率刺激时,CsA和KN93对MHC Ⅰ表达的抑制作用被完全逆转,与正常对照组相比无显著差异($P>0.05$)(图3B)。10 Hz和复合生理频率(图3C)电刺激,KN93组细胞MHC Ⅱa的mRNA表达的显著变化($P<0.05$),CsA组虽有降低,但与对照相比无显著差异($P>0.05$)。与正常分化细胞相比,10 Hz电刺激时,KN93组MHC Ⅱb的mRNA表达接近正常水平($P>0.05$),但对CsA组显著升高的MHC Ⅱb表达无明显作用,MHC Ⅱb mRNA仍维持在显著增高水平($P<0.05$)。当采用复合生理频率刺激时,CsA和KN93对MHC Ⅱb表达的抑制作用被完全逆转,与正常对照组相比无显著差异($P>0.05$)(图3D)。

2.4 Western blot检测CsA和KN93对C2C12细胞经低频复合生理频率电刺激的MHC亚型蛋白的变化

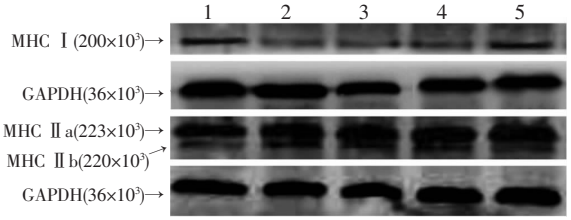
C2C12细胞经马血清诱导成为骨骼肌细胞之后其MHC主要由Ⅱa和Ⅰ两种异构体构成。研究结果显示,马血清诱导的正常过程中,MHC Ⅱa是组成骨骼肌MHC的主要亚型,MHC Ⅰ有一定水平的表达;低频复合生理频率电刺激进一步提高MHC Ⅱa蛋白的水平,MHC Ⅱb也有一定程度上升(图4)。抑制剂KN93和CsA处理后,MHC Ⅰ的表达显著降低,MHC Ⅱb显著增加;CsA组经低频复合生理频率电刺激可以抑制MHC Ⅱb



A:RT-PCR 检测电刺激后电泳结果;B、C、D:MHC Ⅰ、MHC Ⅱa 和 MHC Ⅱb mRNA 表达的量化分析结果　a:$P<0.05$, 与 HS 组比较;b:$P<0.05$, 与 CsA 组比较

图 3　RT-PCR 检测各组 C2C12 细胞经低频复合生理频率电刺激的 MHC 亚型 mRNA 变化

的表达,但对 MHC Ⅰ的提升不明显(图 4)。该结果说明 CsA 与 KN93 能抑制 C2C12 骨骼肌细胞的 MHC Ⅱ向 MHC Ⅰ转换,低频复合生理频率电刺激对 MHC Ⅱb 蛋白的表达有抑制作用。

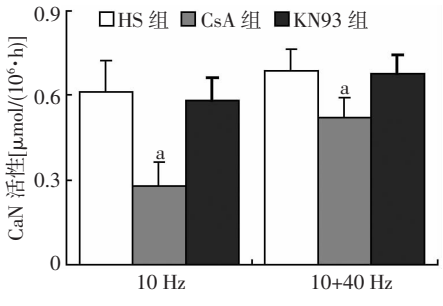


1:1.2% 马血清诱导的 HS 组;2:KN93 组;3:CsA 组;4:CsA + 低频复合生理频率电刺激组;5:1.2% 马血清 + 低频复合生理频率电刺激组

图 4　Western blot 检测各组 C2C12 细胞经低频复合生理频率电刺激的 MHC 亚型蛋白表达

2.5　比色法测定钙调神经磷酸酶活性

CsA 和 KN93 处理后细胞 CaN 活性的变化见图 5。CsA 可以显著抑制 CaN 的酶活性,但 KN93 对其无显著作用。在 C2C12 细胞经复合生理频率刺激后,CaN 的活性有所提高,但仍显著低于对照组($P<0.05$)。需要说明的是,电刺激使对照组和 KN 组的 CaN 活性升高。



a:$P<0.05$, 与 HS 组和 KN93 组比较

图 5　比色法检测各组 CaN 活性变化

3　讨论

成肌细胞 C2C12 是骨骼肌细胞的前体细胞,又称肌卫星细胞。正常情况下成肌细胞位于成熟肌纤维的表面,具有较强的增殖、分化能力,参与肌损伤的修复[8]。小鼠 C2C12 成肌细胞系由 Yaffe 等[9]在 1977 年建立,体外培养的 C2C12 细胞在低浓度马血清的诱导下可以分化为多核的肌细胞,并表达 myosin 和 myogenin 等成熟骨骼肌细胞标志蛋白。C2C12 细胞是体外研究骨骼肌成肌细胞增殖、分化和功能的首选模型。在本研究中我们采用 C2C12 细胞分化模型,研究 CaN 抑制剂 CsA 和 CaMK 抑制剂 KN93 在骨骼肌细胞经复合生理频率(10 + 40 Hz)电刺激后 MHC 亚型转变中的作用。我们首先在体外构建成肌细胞分化模型,结果提示在使用含 10% 胎牛血清的培养基培养时,C2C12 仅表现为数量增加,细胞形态为星形、多边形,但在使用含 2% 马血清培养基诱导培养之后, C2C12 细胞的数量不再增加,C2C12 细胞离开细胞的增殖周期,并且形态发生显著改变,镜下可见典型的肌管形成。我们进一步对低频复合生理频率慢性电刺激后的 C2C12 细胞加入 CsA 和 KN93 处理后,C2C12 细胞形态变化更加明显,肌管较未经 CsA 和 KN93 处理组更加粗大。成肌分化模型是本研究的基础,从研究结果来看,诱导分化的骨骼肌细胞具有典型的骨骼肌肌管,并且肌管在经 CsA 和 KN93 处理之后形态学变化显著,说明诱导分化的骨骼肌细胞可以用于进一步的实验。

骨骼肌纤维内含有大量的肌球蛋白,在整个骨骼肌蛋白中肌球蛋白占 25%,肌球蛋白由两条重链和两对轻链组成,而肌球蛋白中的重链能够决定整个肌球蛋白的 ATP 酶活性,与骨骼肌纤维的收缩力关系密切[10]。因此,研究 MHC 的表型变化在骨骼肌功能研究中具有重要的意义。

在成熟骨骼肌中肌球蛋白有 MHC Ⅰ、MHC Ⅱa、MHC Ⅱb 和 MHC Ⅱx 四种异构体类型。其中 MHC Ⅰ型纤维具有耐疲劳但肌力较弱的特点[11-12];MHC Ⅱa 型纤维具有收缩速度快但耐疲劳能力不及 MHC Ⅰ的特点;而 MHC Ⅱb 型纤维则是肌肉收缩力的主要影响因素,收缩速度快但易疲劳[13]。通常将其分为快肌纤维(MHC Ⅱb 和 MHC Ⅱa)和慢肌纤维(MHC Ⅰ)。我们前期的研究表明在慢性低压缺氧兔动物模型中,兔

颏舌肌 MHC Ⅰ亚型肌纤维比例较正常对照组显著减少[3-4]。并且在 10 Hz 电刺激组及 10 + 40 Hz 电刺激组兔颏舌肌 MHC Ⅰ型肌纤维的比例增加,而 MHC Ⅱa 亚型减少,该结果提示在低频复合生理频率慢性电刺激后慢性低压缺氧兔颏舌肌出现 MHC Ⅱa 型纤维向 MHC Ⅰ型纤维转变,而 MHC Ⅰ型纤维增加可以改善颏舌肌的抗疲劳能力,从而减少颏舌肌疲劳所引起的舌后坠和上气道塌陷。

研究表明细胞内 Ca^{2+} 的浓度变化影响钙调节蛋白的活性。调钙蛋白是多功能的信号转导蛋白,能够通过构象改变活化多种下游的钙调神经磷酸酶(CaN)和激酶(如 CaMK)[5, 14]。钙调神经磷酸酶参与多种生理病理过程,在骨骼肌 MHC 的亚型表达中具有极其重要的作用[15-16]。钙调蛋白-钙调神经磷酸酶复合物(CaM-CaN)与钙结合刺激 CaN 的活性,该酶的主要作用之一就是激活 T 细胞核转录因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)。用 CsA 抑制 CaN 可以导致一些慢肌纤维向快肌纤维的转换,说明 CaN 是慢肌纤维基因表达所需要的。在本研究中,我们采用 CsA 和 KN93 分别抑制 CaN 和 CaMK 的活性,结果提示在抑制 CaN 或 CaMK 分子之后,正常分化发生改变,典型慢肌纤维的 MHC Ⅰ基因表达受到明显抑制,同时典型快肌纤维的 MHC Ⅱb 基因表达显著升高,说明 CaN 和 CaMK 参与了成肌分化中肌型的决定和/或转换。10 Hz 单一频率的电刺激对上述抑制剂的作用无明显影响。但是,使用低频复合生理频率慢性电刺激时,上述抑制剂的作用被完全或大部分逆转,MHC 快肌纤维和慢肌纤维的亚型表达得到恢复,提示低频复合生理频率慢性电刺激可能通过非 CaN 和 CaMK 依赖的途径调控肌型蛋白的表达,促进慢肌形成。由于 CsA 和 KN93 对 CaN 和 CaMK 的抑制并不是彻底的,加之低频复合生理频率慢性电刺激后 CaN 的活性有所回升,不能排除低频复合生理频率慢性电刺激直接或间接地刺激 CaN 和 CaMK 的激活,参与慢肌形成和/或肌型转换。本研究结果表明,我们前期研究中发现的低频复合生理频率慢性电刺激诱导的肌纤维“由快向慢”的适应性亚型改变,可能是通过非 CaN 通路和 CaN 通路联合作用实现的,该结果为临床应用低频复合生理频率慢性电刺激治疗 OSAS 提供了理论基础和实验依据。

参考文献:

[1] Sedy J, Horka E, Pavlikova G, *et al*. Myosin heavy chain proteins are responsible for the development of obstructive sleep apnea syndrome [J]. Med Hypotheses, 2009, 73 (6): 1014 - 1016.

[2] Berger A J. Determinants of respiratory motoneuron output[J]. Respir Physiol, 2000, 122 (2/3): 259 - 269.

[3] 张妮, 刘熙, 刘刚. 低频复合生理频率电刺激对慢性低压缺氧兔颏舌肌肌球蛋白重链表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32 (13): 1403 - 1407.

[4] 刘熙, 刘刚, 张妮, 等. LPCES 对慢性低压缺氧兔颏舌肌肌球蛋白重链和 SR Ca^{2+} 摄取-释放动力学的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33 (7): 690 - 694.

[5] Sakuma K, Yamaguchi A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 721219.

[6] Burch N, Arnold A S, Item F, *et al*. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle[J]. PLoS One, 2010, 5 (6): e10970.

[7] Meissner J D, Chang K C, Kubis H P, *et al*. The p38alpha/beta mitogen-activated protein kinases mediate recruitment of CREB-binding protein to preserve fast myosin heavy chain IId/x gene activity in myotubes [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (10): 7265 - 7275.

[8] Kang J S, Krauss R S. Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010, 13 (3): 243 - 248.

[9] Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle[J]. Nature, 1977, 270(5639): 725 - 727.

[10] Andruchov O, Andruchova O, Wang Y, *et al*. Dependence of cross-bridge kinetics on myosin light chain isoforms in rabbit and rat skeletal muscle fibres[J]. J Physiol, 2006, 571 (Pt 1): 231 - 242.

[11] 李东颖, 任文君. 肌球蛋白结构和功能变化与运动的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11 (32): 6458 - 6464.

[12] Biressi S, Rando T A. Heterogeneity in the muscle satellite cell population[J]. Semin Cell Dev Biol, 2010, 21 (8): 845 - 854.

[13] Schiaffino S, Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle[J]. J Appl Physiol, 1994, 77 (2): 493 - 501.

[14] Swindells M B, Ikura M. Pre-formation of the semi-open conformation by the apo-calmodulin C-terminal domain and implications binding IQ-motifs[J]. Nat Struct Biol, 1996, 3 (6): 501 - 504.

[15] Mallinson J, Meissner J, Chang K C. Chapter 2. Calcineurin signaling and the slow oxidative skeletal muscle fiber type[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2009, 277: 67 - 101.

[16] Schiaffino S, Sandri M, Murgia M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity[J]. Physiology (Bethesda), 2007, 22: 269 - 278.

(**收稿**:2011-12-09;**修回**:2012-01-06)

(编辑 邓强庭)