DOI:10.16016/j.2097-0927.202302064

过度机械拉伸应力通过 Piezo1 介导肌腱细胞凋亡的作用及机制研究

陈墨龙,陈 万,唐康来 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院运动医学中心

[摘要] **目的** 探索机械敏感离子通道蛋白 Piezo1 在过度机械拉伸应力诱导肌腱细胞凋亡中的作用机制。**方法** 分离并培养 8 周龄雄性 C57 小鼠($n=20$, 体质量 22~26 g)的肌腱细胞,采用 Flexcell 系统建立机械拉伸诱导肌腱细胞凋亡的细胞模型。将肌腱细胞分为对照组、20%拉伸组、20%拉伸+Yoda1 组、20%拉伸+GsMTx4 组、20%拉伸+Piezo1 敲低慢病毒(Lv-Piezo1)组及 20%拉伸+对照慢病毒(Lv-Ctrl)组,采用线粒体膜电位、流式细胞仪、Western blot 和钙离子荧光探针检测 Piezo1 在肌腱细胞凋亡中的作用。将肌腱细胞分为 20%拉伸组、20%拉伸+siRNA 介导 Calpain2 敲低(si-Calpain2)组、20%拉伸+对照 siRNA(si-Ctrl)组,Western blot 检测 Piezo1 下游信号 Calpain2/BAX/Caspase3 轴的激活情况。**结果** 过度机械拉伸应力作用下,20%拉伸组细胞凋亡水平显著高于对照组($P<0.05$),Yoda1 进一步促进了机械拉伸应力诱导的肌腱细胞凋亡($P<0.05$),而 GsMTx4 和 Lv-Piezo1 表现出相反的作用($P<0.05$)。过度机械拉伸应力作用下,肌腱细胞 Calpain2、BAX 和 cleaved-Caspase3 的表达增强($P<0.05$)。20%拉伸+si-Calpain2 组 BAX 和 cleaved-Caspase3 的表达水平低于 20%拉伸组、20%拉伸+对照 siRNA 组($P<0.05$),敲低 Calpain2 可抑制 BAX 和 cleaved-Caspase3 的表达($P<0.05$),减轻肌腱细胞凋亡($P<0.05$)。**结论** 过度机械牵拉应力通过激活 Piezo1 和下游 Calpain2/BAX/Caspase3 通路诱导肌腱细胞凋亡,Piezo1 有望成为肌腱病的潜在治疗靶点。

[关键词] Piezo1;肌腱细胞;细胞凋亡;机械拉伸应力

[中图法分类号] R322.74; R363.11; R363.21 [文献标志码] A

Excessive mechanical stretch stress induces tendon cell apoptosis *via* mechanosensitive ion channel protein Piezo1

CHEN Molong, CHEN Wan, TANG Kanglai Sports Medicine Center, First Affiliated Hospital, Army Medical University(Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and mechanism of Piezo1, a mechanically-sensitive ion channel protein, in excessive mechanical stretch induced apoptosis of tendon cells. **Methods** Tendon cells of 8-week-old male C57 mice($n=20$, body mass: 22~26 g) were isolated and cultured, and a cell model of mechanical stretch induced apoptosis of tendon cells was established using the Flexcell system. Tendon cells were divided into the control group, the 20% elongation group, the 20% elongation+Yoda1 group, the 20% elongation+GsMTx4 group, the 20% elongation+Piezo1 knockdown lentivirus group (Lv-Piezo1) and 20% elongation+control lentivirus group (Lv-Ctrl). Mitochondrial membrane potential assay, flow cytometry assay, Western blot assay and calcium fluorescence probe were used to detect the role of Piezo1 in tendon cell apoptosis. Tendon cells were divided into the 20% elongation group, the 20% elongation+siRNA-mediated Calpain2 knockdown group (si-Calpain2), and the 20% elongation+control siRNA group (si-Ctrl). Western blot assay was used to detect the activation of Piezo1 downstream signal Calpain2/BAX/Caspase3 axis.

[通信作者] 唐康来,E-mail:tangkanglai@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Results The level of apoptosis with excessive mechanical tensile stress was higher in the 20% elongation group than those in the control group ($P<0.05$), and Yoda1 promoted mechanical tensile stress induced apoptosis in tendon cells ($P<0.05$), while GsMTx4 and Lv-Piezo1 showed the opposite effect ($P<0.05$). The expression of Calpain2, BAX and cleaved-Caspase3 in tendon cells was enhanced by excessive mechanical stretch stress ($P<0.05$). The 20% elongation+si-Calpain2 group had lower expression levels of BAX and cleaved-Caspase3 than those in the 20% elongation and the 20% elongation+control siRNA group ($P<0.05$). Knockdown of Calpain2 inhibited the expression of BAX and cleaved-Caspase3 ($P<0.05$) and attenuated apoptosis in tendon cells ($P<0.05$). **Conclusion** Excessive mechanical stretch stress can induce apoptosis of tendon cells *via* the activation of Piezo1 and the downstream Calpain2/BAX/Caspase3 pathways. Piezo1 holds promise as a potential therapeutic target for tendinopathy.

[**Key words**] Piezo1; tendon cells; apoptosis; mechanical stretch

Corresponding author: TANG Kanglai, E-mail: tangkanglai@hotmail.com

随着社会人口老龄化程度进一步加深、群众健身运动意识增强,以跟腱断裂、前交叉韧带损伤、肩袖损伤为代表的肌腱病发病率逐渐增高[1-2]。肌腱病主要表现为疼痛、功能受限、运动能力下降,常需要手术治疗,严重影响患者的生活质量[3-4]。机械拉伸应力被认为是导致肌腱病的重要外界因素之一。解剖上,肌腱组织主要承受循环拉伸应力[5]。病理学研究证实,肌腱过度、重复的轴向拉伸使用导致了肌腱细胞的过度凋亡[6-7]。然而,机械拉伸应力如何介导肌腱细胞凋亡,目前尚不清楚。Piezo1 是新近发现的机械敏感离子通道蛋白[8-9]。Piezo1 参与细胞对外部机械刺激包括压缩、拉伸、重力、流体剪切的反应,可通过增强钙离子(Ca^{2+})内流和改变细胞内钙信号,帮助细胞将机械信号转化为生物信号,进而参与调节发育、肿瘤发生、骨重塑等多种细胞生命进程[10-11]。Piezo1 广泛分布于全身多个组织,且已被证实在肌腱组织中表达[12-13]。多项研究表明,Piezo1 可以介导过度机械应力导致的细胞凋亡[14-17],因此本研究推测机械拉伸应力诱导肌腱细胞凋亡可能由 Piezo1 介导。

为验证假设,本研究分离小鼠肌腱细胞并进行培养,使用细胞牵张拉伸应力加载系统刺激肌腱细胞检测细胞凋亡水平,并检测机械拉伸应力作用下的肌腱细胞中 Piezo1 的表达和激活状态。而后利用 Piezo1 激动剂、抑制剂和 Piezo1 敲低病毒阐明机械拉伸应力诱导肌腱细胞凋亡的机制,验证 Piezo1 对机械拉伸应力诱导肌腱细胞凋亡的影响,有助于更好地理解肌腱病中 Piezo1、机械拉伸应力和肌腱细胞凋亡之间的关系,为肌腱病治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 C57 小鼠共 20 只,体质量 22~26 g,由陆军军医大学实验动物中心提供。动物实验伦理批准由陆军军医大学实验动物福利伦理委员会提供(AMUWE20210782)。

1.2 小鼠肌腱细胞提取的分离培养

小鼠肌腱细胞的分离培养根据参考文献[18]进行。小鼠腹腔注射过量戊巴比妥钠(150 mg/kg)处死。肌腱组织在无菌条件下分离,用眼科剪剪成约 1 mm^3 的碎片。组织用 0.4% Ⅰ型胶原酶和 0.01%透明质酸酶 V 型在 37 ℃下消化 90 min。用 70 μm 细胞过滤器去除组织碎片,400×*g* 离心 5 min,弃上清。用含有 DMEM/F-12 培养基(中国普诺赛公司)和 10%胎牛血清(中国四季青公司)、1%青霉素/链霉素双抗(中国碧云天公司)的完全培养基重新悬浮沉淀物。细胞在含 5% CO_2 的 37 ℃细胞培养箱中培养。每 3 天更换 1 次培养基,当融合度达到 80%~90%时传代,第 3 代肌腱细胞被用于后续实验。

1.3 机械拉伸应力干预

肌腱细胞接种于 Bioflex 拉伸 6 孔板(美国 Flexcell 公司),细胞融合率达到 80%~90%时,使用 Flex-Cell 5000 张力系统(美国 Flexcell 公司)诱导机械拉伸。机械拉伸的参数选择为 0.5 Hz,拉伸形变量 5%~20%[19]。拉伸 36 h 后,收集肌腱细胞用于后续测试。

1.4 Piezo1 的激动剂、抑制剂干预

肌腱细胞分为 20%拉伸组、20%拉伸+Yoda1 组、20%拉伸+GsMTx4 组,使用 DMSO 配置 0.5 μmol/L 的 Piezo1 激动剂 Yoda1(美国 MCE 公司)而后添加于肌

腱细胞中以激活 Piezo1,使用 DMSO 配置 0.1 μmol/L 的 Piezo1 抑制剂 GsMTx4(美国 MCE 公司)添加于肌腱细胞中以抑制 Piezo1。20%拉伸组添加 DMSO 处理。

1.5 慢病毒及 siRNA 干扰 Piezo1 及 Calpain2 表达

肌腱细胞分为 20%拉伸组、20%拉伸+ Lv-Piezo1 组及 20%拉伸+Lv-Ctrl 组,Piezo1 shRNA 慢病毒表达载体 Lv-Piezo1 及对照慢病毒载体 Lv-ctrl 购于上海和元生物公司。肌腱细胞采用无血清培养基培养 24 h,分别加入 Lv-Piezo1 或 Lv-ctrl,感染复数(multipe of infection,MOI)为 20,然后在肌腱细胞中加入新鲜培养基。肌腱细胞分为 20%拉伸组、20%拉伸+si-Calpain2 组、20%拉伸+si-Ctrl 组。siRNA-Calpain2 及 siRNA-Ctrl 购自美国 Santa Cruz 公司。siRNA 敲除实验根据说明书进行标准操作,Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)用于 siRNA 的转染。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

用 0.05%EDTA 胰蛋白酶(美国 HyClone 公司)消化肌腱细胞。随后,使用 Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒(中国碧云天公司)进行标准染色。用流式细胞仪进行检测。Annexin V-PE +/7-AAD-和 Annexin V-PE +/7-AAD +细胞被认为是凋亡细胞。计数凋亡细胞发生比例。

1.7 线粒体膜电位(mitochondria membrane potential,MMP)测定

采用 MitoTracker Red Chloromethyl-X-rosamine(CMXRos)试剂盒(中国碧云天公司)检测肌腱细胞的线粒体膜电位。根据试剂制造商的说明书配置 MitoTracker 工作溶液,在 37 ℃黑暗环境中孵育 30 min。细胞核用 Hoechst 33342(中国碧云天公司)进行染色。用荧光显微镜(德国 ZEISS 公司)观察荧光强度。

1.8 钙离子内流检测

细胞内钙离子浓度用 Cal-520 钙离子荧光探针(中国百萤生物公司)测定。肌腱细胞置于含有 0.02% Pluronic F-127(中国索莱宝公司)和 1 mmol/L Probenecid(中国索莱宝公司)的 Hanks 平衡盐溶液中,在 37 ℃的黑暗环境中,使用 5 μmol/L 的 Cal-520 孵育 1 h,然后用 PBS 清洗 3 次。细胞核用 Hoechst 33342(中国碧云天公司)进行染色。用荧光显微镜(德国 ZEISS 公司)观察荧光强度。

1.9 Western blot 实验

使用 RIPA 裂解缓冲液(中国碧云天公司)裂解肌腱细胞,用 BCA 测定试剂盒(中国碧云天公司)测定蛋白浓度。在裂解液中加入 1/5 体积的加载缓冲液,然后将样品置于沸水中 10 min。蛋白质通过 SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶阻断 PVDF 膜 1 h,添加一抗置于 4 ℃孵育过夜。一抗包括兔抗小鼠 Calpain2(中国 Proteintech 公司)、BAX(中国 Proteintech 公司)、cleaved-Caspase3(美国 Abcam 公司)、Piezo1(中国 Proteintech 公司)和 β-actin(中国 Proteintech 公司)。用 TBST 清洗 PVDF 膜,然后用二抗孵育 1 h。二抗为山羊抗兔 IgG(H+L)HRP(中国 Absin 公司)。目的蛋白表达采用 ChemiDoc 成像系统(美国 Bio-Rad 公司)检测,所有结果使用 β-actin 进行归一化处理。

1.10 统计学分析

每个实验至少重复 3 次。使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组比较采用 t 检验。采用单因素方差分析和 Bonferroni 事后检验(post-hoc test)对多个组间的比较进行评估。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 机械拉伸应力可以诱导肌腱细胞凋亡

使用 Flexcell-5000 张力系统对小鼠肌腱细胞施加逐渐递增的拉伸应力。流式结果显示,肌腱细胞凋亡百分比随着拉伸程度的增加而显著增加,在拉伸 20%凋亡水平高于其余拉力参数下的凋亡水平($P<0.05$,图 1A、C)。MMP 测定结果显示,随着拉伸程度的增加,MMP 强度逐渐下降($P<0.05$,图 1B、D)。这些结果表明机械拉伸应力可以诱导肌腱细胞的凋亡。20%的拉伸诱导细胞凋亡最为明显,被用于后续实验。

2.2 机械拉伸应力可以激活肌腱细胞的 Piezo1 表达

Western blot 结果显示,机械拉伸应力作用下,肌腱细胞中 Piezo1 蛋白的表达水平上调($P<0.05$,图 2A、B)。钙离子荧光探针检测结果显示,机械拉伸应力促进了肌腱细胞中钙离子内流($P<0.05$,图 2C、D)。结果表明,机械拉伸应力可以激活体外培养的肌腱细胞中的 Piezo1 的表达。

2.3 机械拉伸应力通过 Piezo1 激活调控肌腱细胞的凋亡

为进一步探讨 Piezo1 在肌腱细胞凋亡中的作用机制,分别在机械拉伸应力下的肌腱细胞中添加 0.5 μmol/L Yoda1 和 0.1 μmol/L GsMTx4。流式细胞仪分析显示,Yoda1 可以增强肌腱细胞凋亡,GsMTx4 则减轻肌腱细胞凋亡($P<0.05$,图 3A、B)。MMP 免疫荧光染色结果显示,Yoda1 加剧了机械拉伸应力刺激下 MMP 强度的降低,而 GsMTx4 导致 MMP 强度增强

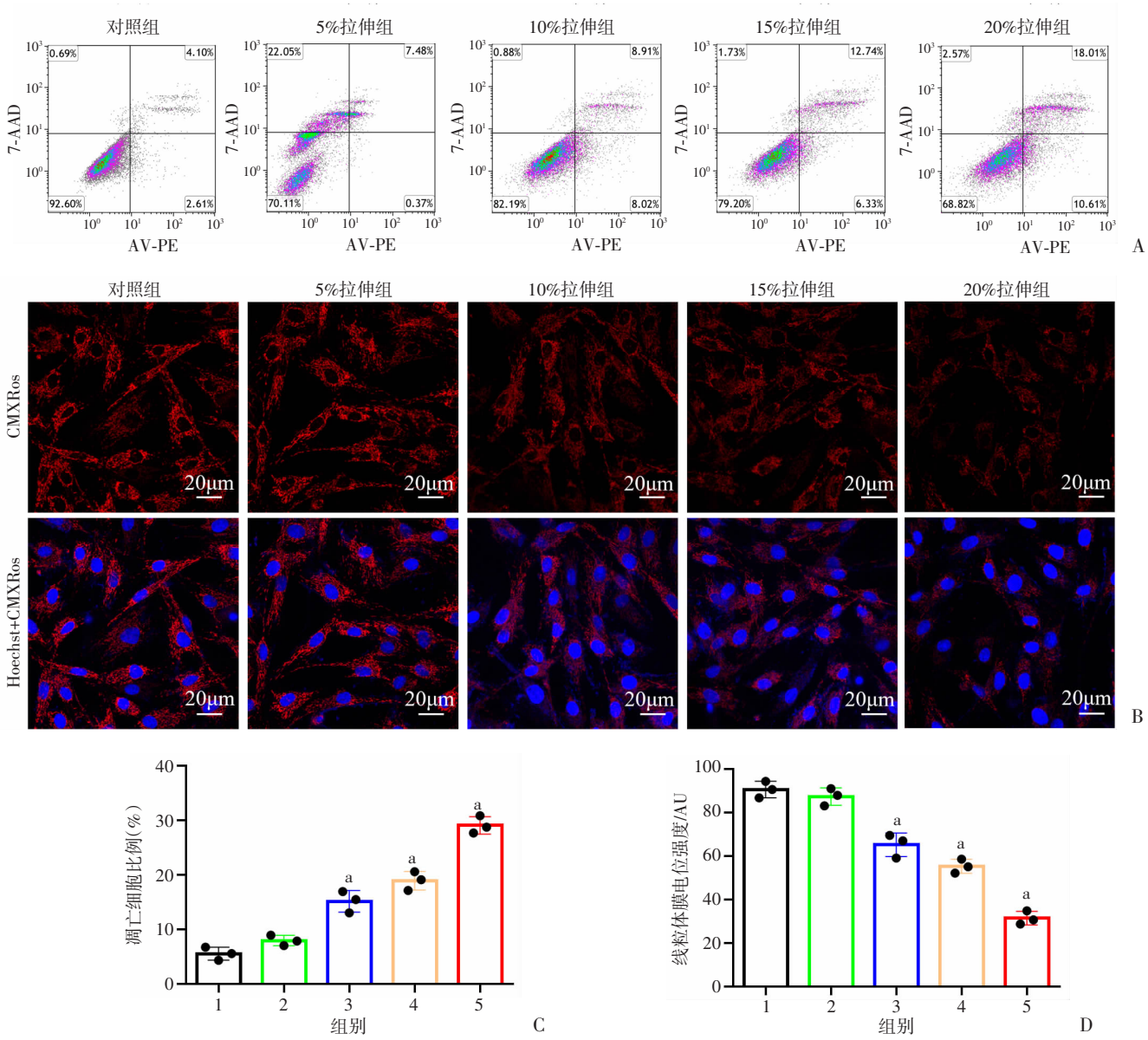
($P<0.05$,图 3C、D)。结果表明,机械拉伸应力下 Piezo1 的激活状态与肌腱细胞凋亡有关。

2.4　敲除 Piezo1 可以减少机械拉伸应力下肌腱细胞的凋亡

为进一步证实 Piezo1 在机械拉伸应力诱导的肌腱细胞凋亡中的作用,使用 Lv-Piezo1 敲低 Piezo1 的表达。结果显示 20%拉伸+Lv-Piezo1 组的肌腱细胞凋亡率低于 20%拉伸+Lv-Ctrl 组和 20%拉伸应力组($P<0.05$,图 4A、B),敲除 Piezo1 可以缓解机械拉伸应力导致的肌腱细胞中 MMP 强度的降低($P<0.05$,图 4C、D)。结果进一步表明,Piezo1 介导了机械拉伸应力刺激下肌腱细胞的凋亡。

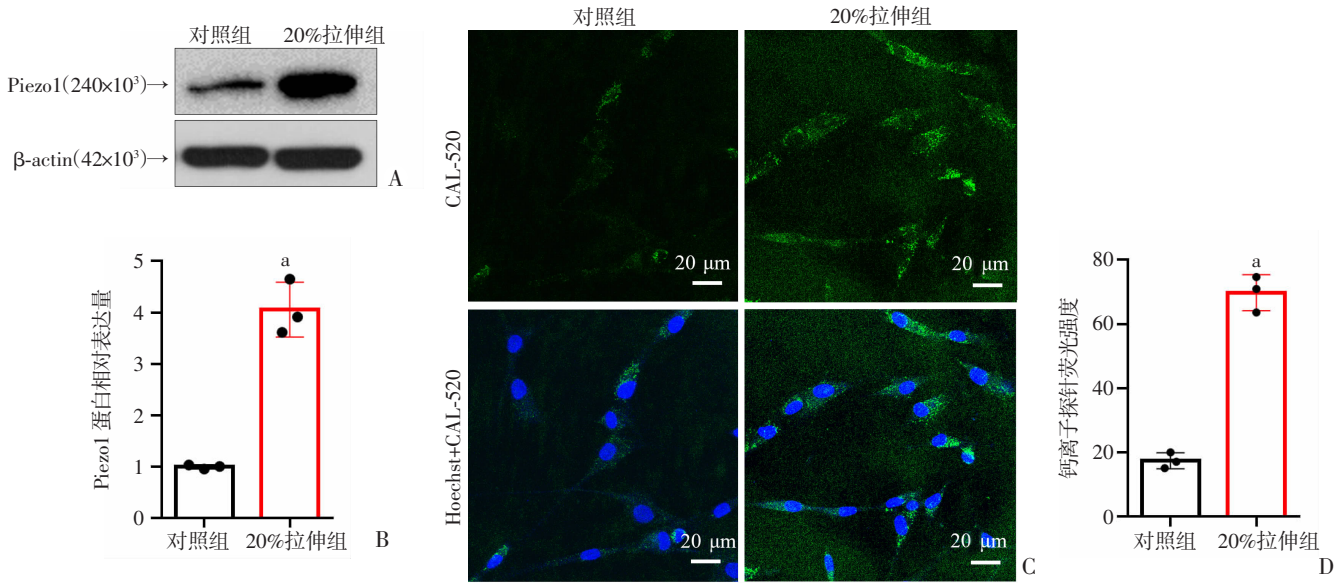
2.5　Piezo1 促进肌腱细胞凋亡涉及 Calpain2/BAX/Caspase3 的激活

探讨 Piezo1 介导肌腱细胞凋亡的下游机制。Piezo1 激活的钙离子信号通路可诱导下游钙离子的活化,其与细胞凋亡密切相关。Western blot 结果显示,机械拉伸应力处理后 Calpain2 及下游 BAX、cleaved-Caspase3 的表达均升高,Lv-Piezo1 处理后则下降($P<0.05$,图 5)。



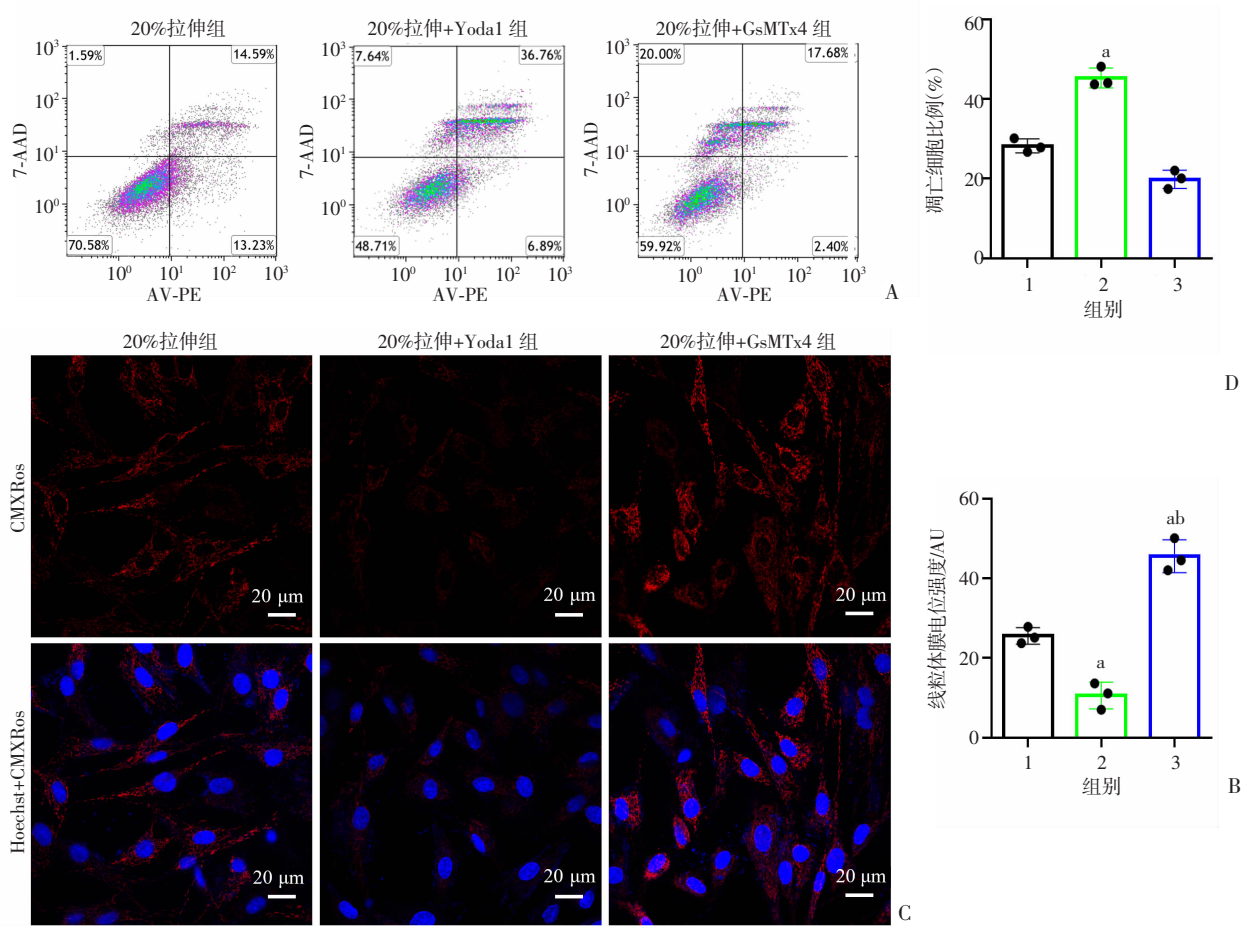
A:肌腱细胞凋亡的流式细胞图;B:肌腱细胞 MMP 的 CMXRos 荧光染色观察　CMXRos 呈红色,核呈蓝色;C:凋亡肌腱细胞比例统计分析;D:MMP 平均荧光强度的统计分析　1:对照组;2:5%拉伸组;3:10%拉伸组;4:15%拉伸组;5:20%拉伸组;a:$P<0.05$,与对照组比较

图 1　机械拉伸应力对体外培养的肌腱细胞凋亡的影响　($n=3$)



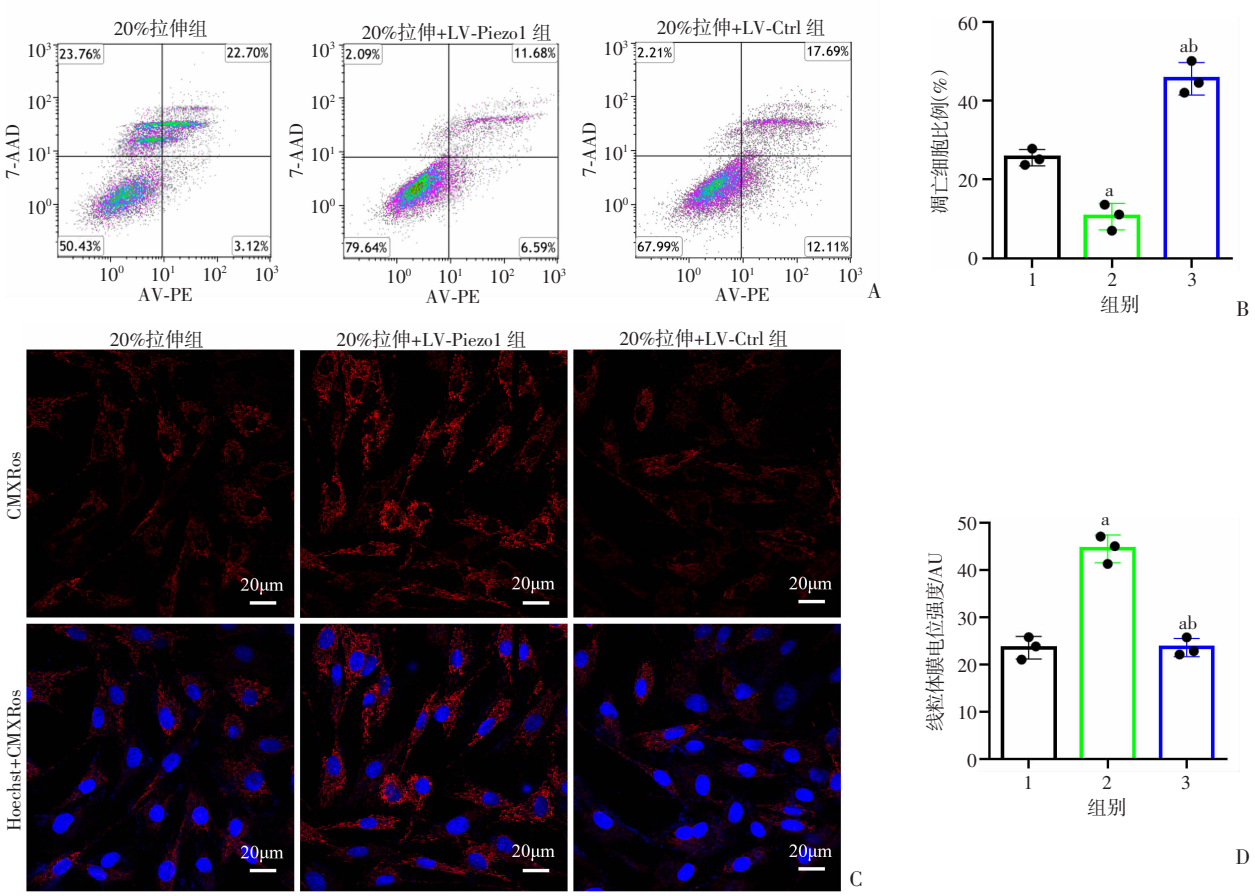
A、B:Western blot 检测机械拉伸应力下肌腱细胞中 Piezo1 表达及统计结果;C、D:CAL-520 染色检测 Ca^{2+} 内流及统计分析 绿色:Cal-520;蓝色:核;a:$P<0.05$,与对照组比较

图 2 机械拉伸应力对肌腱细胞中 Piezo1 表达的影响 ($n=3$)



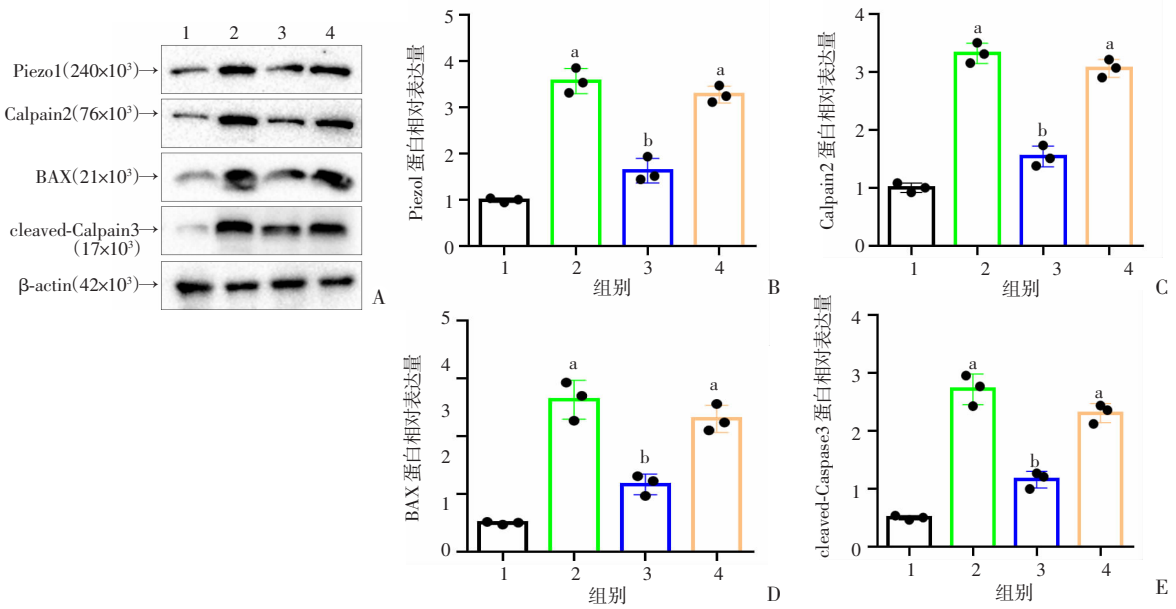
A、B:Yoda1 及 GsMTx4 作用下肌腱细胞凋亡的流式细胞图及统计分析;C、D:Yoda1 及 GsMTx4 作用下肌腱细胞 MMP 的 CMXRos 荧光染色观察及统计分析 红色:CMXRos,蓝色:核;a:$P<0.05$,与 20%拉伸组比较;b:$P<0.05$,与 20%拉伸+Yoda1 组比较;1:20%拉伸组;2:20%拉伸+LV-Piezo1 组;3:20%拉伸+Lv-Ctrl 组

图 3 Yoda1 及 GsMTx4 对机械拉伸应力诱导的肌腱细胞凋亡的影响 ($n=3$)



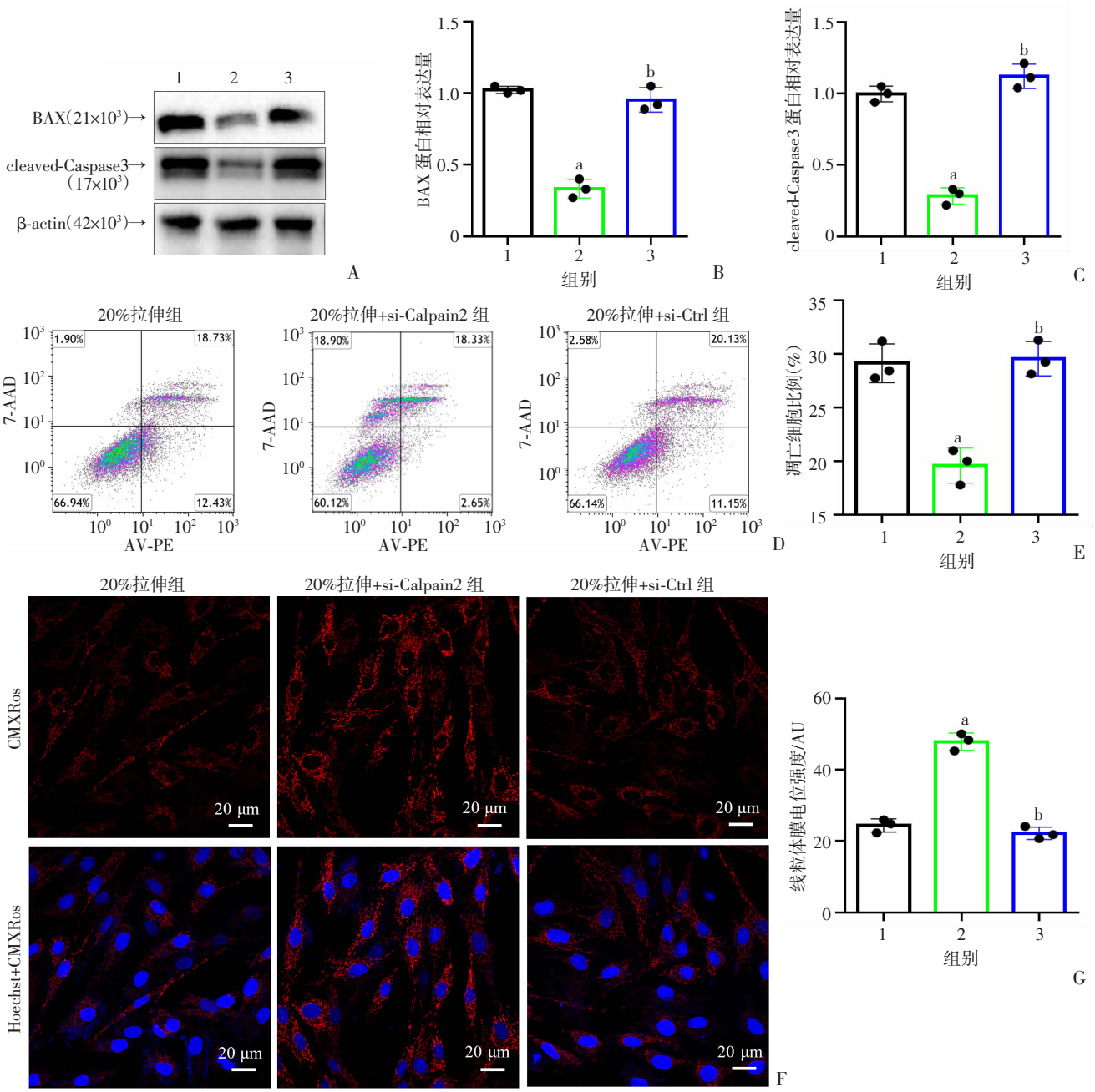
A、B:肌腱细胞凋亡的流式细胞图及统计分析;C、D:肌腱细胞 MMP 的 CMXRos 荧光染色观察及统计分析　红色:CMRos;蓝色:核;a:$P<0.05$,与 20%拉伸组比较;b:$P<0.05$,与 20%拉伸+Lv-Piezo1 组比较;1:20%拉伸组;2:20%拉伸+LV-Piezo1 组;3:20%拉伸+Lv-Ctrl 组

图 4　敲除 Piezo1 对机械拉伸应力诱导的肌腱细胞凋亡的影响　($n=3$)



A:Western blot 检测肌腱细胞 Piezo1、Calpain2、BAX、cleave-Caspase3 表达;B~E:各蛋白表达的统计分析　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 20%拉伸组比较;1:对照组;2:20%拉伸组;3:20%拉伸+LV-Piezo1 组;4:20%拉伸+Lv-Ctrl 组

图 5　Piezo1 对肌腱细胞凋亡相关蛋白表达的影响　($n=3$)



A~C:Western blot 检测肌腱细胞 BAX、cleaved-Caspase3 表达及统计分析;D、E:肌腱细胞凋亡的流式细胞图及统计分析;F、G:肌腱细胞 MMP 的 CMXRos 荧光染色观察及统计分析 红色:CMXRos 蓝色:核;a:$P<0.05$,与 20%拉伸组比较;b:$P<0.05$,与 20%拉伸+si-Calpain2 组比较;1:20%拉伸组;2:20%拉伸+si-Calpain2 组;3:20%拉伸+si-Ctrl 组

图 6 敲低 Calpain2 对 BAX/Caspase3 表达和机械应力导致的肌腱细胞凋亡的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.6 敲低 Calpain2 下调 BAX/Caspase3 表达,抑制机械应力导致的肌腱细胞凋亡

使用 si-Calpain2 干扰机械拉伸应力下肌腱细胞中的 Calpain2 表达。Western blot 结果显示,si-Calpain2 处理后,BAX 和 cleaved-Caspase3 的表达下调($P<0.05$,图 6A~C)。si-Calpain2 处理后肌腱细胞凋亡受到抑制($P<0.05$,图 6D~G)。上述结果表明,机械拉伸应力通过激活 Piezo1 和 Calpain2/BAX/Caspase3 通路促进肌腱细胞凋亡。

3 讨论

过度机械拉伸诱导肌腱细胞凋亡是肌腱病的诱发因素之一[19]。然而,机械拉伸促进肌腱细胞凋亡的机制尚不清楚。本研究探讨机械敏感离子通道蛋白

Piezo1 在机械拉伸诱导肌腱细胞凋亡中的作用,并探讨其可能的机制。本研究发现在体外培养的肌腱细胞中,机械拉伸应力引起了明显的肌腱细胞凋亡,伴 Piezo1 表达上调和 Piezo1 通道的激活。Yoda1 进一步促进肌腱细胞凋亡,GsMTx4 和慢病毒敲除 Piezo1 则抑制肌腱细胞凋亡。Piezo1 可以激活下游 Calpain2/BAX/Caspase3 通路促进肌腱细胞凋亡。本研究揭示 Piezo1 在机械拉伸应力介导的肌腱细胞凋亡的作用,可能有助于未来肌腱病的临床诊疗。

Piezo1 是机械敏感离子通道蛋白,可将细胞外机械刺激转化为细胞内信号。Piezo1 参与软骨细胞、Ⅱ型肺泡细胞和肿瘤细胞等多种细胞的机械拉伸诱导凋亡[20-22]。因此,本研究探索 Piezo1 在肌腱细胞中的表达以及 Piezo1 是否介导了机械拉伸诱导的肌腱细胞凋亡。发现拉伸应力作用下,Piezo1 在肌腱细胞中表达。通过使用 Piezo1 特异性激活剂 Yoda1[23],发现 Piezo1 激活增强了机械拉伸应力诱导的肌腱细胞凋亡。机械敏性阳离子通道阻断剂 GsMTx4 可抑制机械拉伸应力诱导的肌腱细胞凋亡。然而,GsMTx4 并不是一种特异的 Piezo1 抑制剂,因为它也会阻碍 TRPC1 和 TRPC3 等其他机械敏感阳离子通道的激活[24]。因此,通过 Lv-Piezo1 转染实现 Piezo1 的敲除,并发现 Piezo1 敲除抑制了机械拉伸应力诱导的肌腱细胞凋亡。这些结果证明 Piezo1 激活是机械拉伸应力诱导肌腱细胞凋亡的关键环节。

进一步研究由 Piezo1 激活刺激的下游细胞内信号。Piezo1 激活通过促进 Ca^{2+} 内流和改变后续细胞内钙信号,帮助细胞将机械信号转化为生物信号,从而引发一系列细胞生物学过程[25-26]。Ca^{2+} 在真核生物信号转导中作为第二信使发挥核心作用。细胞内游离 Ca^{2+} 浓度维持在较细胞外液低的水平。而 Ca^{2+} 超载与所有 3 种凋亡途径相关,即内在凋亡途径(线粒体途径)、外在凋亡途径(死亡受体途径)和内质网途径[27-28]。Calpain 是特殊的 Ca^{2+} 激活的非溶酶体半胱氨酸蛋白酶,与 Ca^{2+} 介导的凋亡密切相关,可通过激活 BAX 在内的凋亡因子,启动 Caspase 级联反应,加速细胞凋亡[29-32]。钙蛋白酶的活性受到细胞内 Ca^{2+} 浓度的严格调控。Calpain 与机械力刺激的细胞凋亡密切相关,且 Calpain 可在肌腱组织中表达[33]。传统的 Calpain 有两种亚型:Calpain1(μ-calpain)需要微摩尔级别 Ca^{2+} 来激活,Calpain2(m-calpain)需要毫摩尔级别 Ca^{2+} 来激活[34]。据报道,Piezo1 可以通过升高的 Ca^{2+} 内流激活 Calpain2 并介导机械信号诱发的细胞凋亡[35-36]。本研究结果发现,机械拉伸应力增强了 Calpain2 的表达,沉默 Calpain2 可以逆转 Yoda1 和机械拉伸应力刺激的肌腱细胞凋亡,这表明 Piezo1 通过 Ca^{2+} 内流介导的 Calpain2 激活促进了肌腱细胞凋亡。为了研究 Calpain2 激活的下游效应,我们探索了可被 Calpain2 切割的 BAX 的表达,其可参与诱导线粒体凋亡通路[37]。结果发现,机械拉伸应力增强了 BAX 和 cleaved-Caspase3 的表达,而敲除 Piezo1 抑制了 BAX 和 cleaved-Caspase3 的增高。沉默 Calpain2 可抑制 BAX 和 cleaved-Caspase3 的表达,并抑制肌腱细胞凋亡。以上证据证明,Piezo1 通过 Calpain2/BAX/Caspase3 途径促进肌腱细胞凋亡。

本研究亦存在局限之处:①本研究中体外施加的循环拉伸应力无法完全模拟体内的肌腱细胞受力情况,因此实验中拉伸应力刺激导致的肌腱细胞凋亡与肌腱病病理情况下肌腱细胞的凋亡并不对等;②本研究未对高水平的拉伸应力导致的肌腱细胞凋亡情况进行探究。在下一步的研究中,将结合动物实验进行 Piezo1 的敲低实验,以进一步明确 Piezo1 在肌腱病中的作用及致病机制。

综上所述,本研究探讨 Piezo1 在机械拉伸应力刺激肌腱细胞中的作用,验证机械拉伸应力可以通过 Piezo1 激活下游 Calpain2/BAX/Caspase3 轴来启动肌腱细胞凋亡。敲除 Piezo1 可以缓解肌腱细胞凋亡。Piezo1 有望成为治疗肌腱病的潜在治疗靶点。

参考文献:

[1] LIPMAN K, WANG C C, TING K, *et al*. Tendinopathy: injury, repair, and current exploration[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 591-603. DOI: 10.2147/DDDT.S154660.

[2] SCOTT A, BACKMAN L J, SPEED C. Tendinopathy: update on pathophysiology[J]. J Orthop Sports Phys Ther, 2015, 45(11): 833-841. DOI: 10.2519/jospt.2015.5884.

[3] RILEY G. Tendinopathy: from basic science to treatment[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008, 4(2): 82-89. DOI: 10.1038/ncprheum0700.

[4] DEAN B J F, DAKIN S G, MILLAR N L, *et al*. Review: emerging concepts in the pathogenesis of tendinopathy[J]. Surg, 2017, 15(6): 349-354. DOI: 10.1016/j.surge.2017.05.005.

[5] WANG J H C, IOSIFIDIS M I, FU F H. Biomechanical basis for tendinopathy[J]. Clin Orthop Relat Res, 2006, 443: 320-332. DOI: 10.1097/01.blo.0000195927.81845.46.

[6] SCOTT A, KHAN K M, HEER J, *et al*. High strain mechanical loading rapidly induces tendon apoptosis: an *ex vivo* rat tibialis anterior model[J]. Br J Sports Med, 2005, 39(5): e25. DOI: 10.1136/bjsm.2004.015164.

[7] JIANG C Y, SHAO L, WANG Q J, *et al*. Repetitive mechanical stretching modulates transforming growth factor-β induced collagen synthesis and apoptosis in human patellar tendon fibroblasts[J]. Biochem Cell Biol, 2012, 90(5): 667-674. DOI: 10.1139/o2012-024.

[8] SAVADIPOUR A, PALMER D, ELY E V, *et al*. The role of PIEZO ion channels in the musculoskeletal system[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2023, 324(3): C728-C740. DOI: 10.11 52/ajpcell.00544.2022.

[9] COSTE B, MATHUR J, SCHMIDT M, *et al*. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels[J]. Science, 2010, 330(6000): 55-60. DOI: 10.1126/science.1193270.

[10] QIN L, HE T L, CHEN S, *et al*. Roles of mechanosensitive channel Piezo1/2 proteins in skeleton and other tissues[J]. Bone Res, 2021, 9(1): 44. DOI: 10.1038/s41413-021-00168-8.

[11] TANG H R, ZENG R Q, HE E D, *et al*. Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (Piezo1): a promising therapeutic target and its modulators[J]. J Med Chem, 2022, 65(9): 6441-6453. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c00085.

[12] NAKAMICHI R, MA S, NONOYAMA T, *et al*. The mechanosensitive ion channel PIEZO1 is expressed in tendons and regulates physical performance[J]. Sci Transl Med, 2022, 14(647): eabj5557. DOI: 10.1126/scitranslmed.abj5557.

[13] PASSINI F S, JAEGER P K, SAAB A S, *et al*. Shear-stress sensing by PIEZO1 regulates tendon stiffness in rodents and influences jumping performance in humans[J]. Nat Biomed Eng, 2021, 5(12): 1457-1471. DOI: 10.1038/s41551-021-007 16-x.

[14] WANG B J, KE W C, WANG K, *et al*. Mechanosensitive ion channel Piezo1 activated by matrix stiffness regulates oxidative stress-induced senescence and apoptosis in human intervertebral disc degeneration[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 8884922. DOI: 10.1155/2021/8884922.

[15] SUN Y, LENG P, GUO P C, *et al*. G protein coupled estrogen receptor attenuates mechanical stress-mediated apoptosis of chondrocyte in osteoarthritis *via* suppression of Piezo1[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 96. DOI: 10.1186/s10020-021-00360-w.

[16] SHI S, KANG X J, ZHOU Z, *et al*. Excessive mechanical stress-induced intervertebral disc degeneration is related to Piezo1 overexpression triggering the imbalance of autophagy/apoptosis in human nucleus pulpous[J]. Arthritis Res Ther, 2022, 24(1): 119. DOI: 10.1186/s13075-022-02804-y.

[17] SONG Y, CHEN J F, ZHANG C, *et al*. Mechanosensitive channel Piezo1 induces cell apoptosis in pancreatic cancer by ultrasound with microbubbles[J]. Science, 2022, 25(2): 103733. DOI: 10.1016/j.isci.2022.103733.

[18] CHEN C, MAO W F, WU Y F. The effects of hypoxia-reoxygenation in mouse digital flexor tendon-derived cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 7305392. DOI: 10.1155/2020/7305392.

[19] WU S, LU Q J, WANG N L, *et al*. Cyclic stretch induced-retinal pigment epithelial cell apoptosis and cytokine changes[J]. BMC Ophthalmol, 2017, 17(1): 208. DOI: 10.1186/s12886-017-0606-0.

[20] CHEN F, SUN M T, PENG F S, *et al*. Compressive stress induces spinal vertebral growth plate chondrocytes apoptosis via Piezo1[J]. J Orthop Res, 2023. DOI: 10.1002/jor.25527.

[21] LIANG G P, XU J, CAO L L, *et al*. Piezo1 induced apoptosis of type Ⅱ pneumocytes during ARDS[J]. Respir Res, 2019, 20(1): 118. DOI: 10.1186/s12931-019-1083-1.

[22] HOPE J M, LOPEZ-CAVESTANY M, WANG W J, *et al*. Activation of Piezo1 sensitizes cells to TRAIL-mediated apoptosis through mitochondrial outer membrane permeability[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 837. DOI: 10.1038/s41419-019-2063-6.

[23] BOTELLO-SMITH W M, JIANG W J, ZHANG H, *et al*. A mechanism for the activation of the mechanosensitive Piezo1 channel by the small molecule Yoda1[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4503. DOI: 10.1038/s41467-019-12501-1.

[24] LOPEZ J R, URYASH A, FAURY G, *et al*. Contribution of TRPC channels to intracellular Ca^{2+} dyshomeostasis in smooth muscle from mdx mice[J]. Front Physiol, 2020, 11: 126. DOI: 10.3389/fphys.2020.00126.

[25] WANG S Y, LI W W, ZHANG P F, *et al*. Mechanical overloading induces GPX4-regulated chondrocyte ferroptosis in osteoarthritis *via* Piezo1 channel facilitated calcium influx[J]. J Adv Res, 2022, 41: 63-75. DOI: 10.1016/j.jare.2022.01.004.

[26] XIE Y H, CHEN D M, JIANG K J, *et al*. Hair shaft miniaturization causes stem cell depletion through mechanosensory signals mediated by a Piezo1-calcium-TNF-α axis[J]. Cell Stem Cell, 2022, 29(1): 70-85. e6.

DOI: 10.1016/j. stem.2021.09.009.

[27] MARCHI S, PATERGNANI S, MISSIROLI S, *et al*. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death[J]. Cell Calcium, 2018, 69: 62-72. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.05.003.

[28] MATTSON M P, CHAN S L. Calcium orchestrates apoptosis[J]. Nat Cell Biol, 2003, 5(12): 1041-1043. DOI: 10.1038/ncb1203-1041.

[29] QIU L L, PAN W, LUO D, *et al*. Dysregulation of BDNF/TrkB signaling mediated by NMDAR/Ca^{2+}/calpain might contribute to postoperative cognitive dysfunction in aging mice[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 23. DOI: 10.1186/s12974-019-1695-x.

[30] ALTZNAUER F, CONUS S, CAVALLI A, *et al*. Calpain-1 regulates bax and subsequent smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis[J]. J Biol Chem, 2004, 279(7): 5947-5957. DOI: 10.1074/jbc.M308576200.

[31] MADER J S, MOOKHERJEE N, HANCOCK R E W, *et al*. The human host defense peptide LL-37 induces apoptosis in a calpain- and apoptosis-inducing factor-dependent manner involving Bax activity[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(5): 689-702. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0274.

[32] WANG Y Y, ZHANG H, MA T, *et al*. Piezo1 mediates neuron oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury *via* Ca^{2+}/calp ain signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 513(1): 147-153. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.03.163.

[33] RUOSS S, KINDT P, OBERHOLZER L, *et al*. Inhibition of calpain delays early muscle atrophy after rotator cuff tendon release in sheep[J]. Physiol Rep, 2018, 6(21): e13833. DOI: 10.14814/phy2.13833.

[34] GOLL D E, THOMPSON V F, LI H Q, *et al*. The calpain system[J]. Physiol Rev, 2003, 83(3): 731-801. DOI: 10.1152/ physrev.00029.2002.

[35] TIJORE A, YAO M X, WANG Y H, *et al*. Selective killing of transformed cells by mechanical stretch[J]. Biomaterials, 2021, 275: 120866. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120866.

[36] TIJORE A, YANG B, SHEETZ M. Cancer cells can be killed mechanically or with combinations of cytoskeletal inhibitors[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 955595. DOI: 10.3389/fphar.2022. 955595.

[37] OZAKI T, YAMASHITA T, ISHIGURO S I. Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res, 2009, 1793(12): 1848-1859. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.10.002.

(收稿:2023-02-12;修回:2023-03-17)

(编辑 张 维)