

赵为民,涂枫,任守文,等. 激活素 A 对大鼠肌细胞增殖分化的作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):287-289.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.088

激活素 A 对大鼠肌细胞增殖分化的作用

赵为民,涂枫,任守文,方晓敏,李碧侠,赵芳,付言峰,王学敏

(江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业科学院动物品种改良和繁育重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:激活素 A (Activin A) 是转化生长因子 β (transforming growth factor - β , TGF - β) 超家族中的一员,具有重要的生物学功能。为研究 Activin A 在肌肉发育中的作用,以大鼠肌细胞 L6 为研究模型,通过时空表达谱、CCK - 8 以及流式细胞周期分析等方法来进行研究。结果表明 Activin A 随着肌细胞由增殖转向分化状态,其表达量呈下降趋势。添加不同浓度的 Activin A (5 ~ 25 ng/mL) 均能显著促进 L6 细胞的增殖速度,且这种促进细胞增殖的效应随着 Activin A 浓度的增大而逐渐增强。Activin A 能显著增加 S 期在细胞周期中的比例,同时缩短 G1 和 G2 期在细胞周期中所占的比例。此外,通过添加 Activin A 显著抑制了肌肉分化标记基因 *Myog* 的表达。以上结果为进一步研究 Activin A 在肌肉发育中的作用机制奠定了基础。

关键词:大鼠;激活素 A (Activin A);肌细胞;增殖;细胞周期

中图分类号: S828.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0287-03

Activin A 最初是从猪的卵泡液中分离的一种糖蛋白,通过二硫键连接 2 个 β A 亚基构成二聚体形式^[1]。Activin A 作为 TGF - β 超家族的一员,通过与其受体 ActR II / II B 结合,激活下游的 Smad2 / Smad3 通路,从而发挥重要的生物学功能。Activin A 最初的功能是刺激卵泡刺激素 (follicle - stimulating / mL hormone, FSH) 的分泌,促进卵泡发育^[1],后来发现 Activin A 在其他的生理过程中也发挥着重要作用。研究表明 Activin A 在炎症反应中发挥着关键作用^[2],例如它在由脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 介导的炎症反应中能调节关键炎症因子的表达^[3],此外在呼吸道过表达 Activin A 可诱导严重的肺部炎症反应^[4]。Activin A 还能促进包括睾丸支持细胞、卵巢颗粒细胞以及肝星状细胞等多种细胞的增殖^[5-7]。近年来报道显示 Activin A 在肌肉的生长发育中也起到重要作用。Activin A 在 IL - 1 α 和 TNF - α 炎症因子处理后的肌细胞分化中起到抑制作用^[8]。过量的 Activin A 可导致肌肉的萎缩和恶病质,且这种效应比 MSTN 还要强^[9]。MSTN 是肌肉发育的一个负调控因子,通过基因编辑技术敲除 MSTN 可使生物个体如猪表现出典型的双肌性状^[10-11],这说明 Activin A 可作为一个新的肌肉靶标基因,通过对其敲除可为适度提高我国地方猪品种的瘦肉率提供一种新途径。然而 Activin A 在肌肉发育中的作用机制仍不清楚,这阻碍了对其进行有效挖掘和利用。本研究利用大鼠肌细胞 L6 为模型,探讨 Activin A 在肌细胞增殖分化中的作用,这将有助于更好地

揭示 *Activin A* 基因在肌肉发育中的调控机制,同时也为进一步在猪上进行基因编辑 *Activin A* 的研究提供了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Trans1 - T1 菌株购于北京金全生物技术有限公司;大鼠 L6 肌细胞购于中国医学科学院基础医学细胞中心;Activin A 重组蛋白购于 R&D Systems;RNA 提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司;CCK - 8 购于日本同仁;SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus)、*Taq* 酶、PrimeScript[™] RT Master Mix 反转录试剂盒购于 TaKaRa 公司;Activin A ELISA 试剂盒购于武汉博士德生物;DEME、胎牛血清、双抗购于 Thermo Fisher 公司;引物合成、基因测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成

RNA 提取主要步骤:细胞加入 Trizol 裂解液室温裂解 5 min,然后加入 200 μ L 氯仿混匀 15 s,静置 3 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清约 400 μ L,转移到新的 1.5 mL EP 管中,加入等体积的 70% 乙醇,颠倒混匀,10 000 r/min 过柱离心 45 s,弃掉废液。加 500 μ L 去蛋白液 RE,12 000 r/min 离心 45 s,弃掉废液。加入 700 μ L 漂洗液 RW 12 000 r/min 离心 60 s,弃掉废液。加入 500 μ L 漂洗液 RW,12 000 r/min 离心 60 s,弃掉废液。将吸附柱 RA 放回空收集管中,12 000 r/min 离心 2 min,在吸附膜的中间部位加适量 RNase free 水,室温放置 2 min,12 000 r/min 离心 1 min, - 80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

cDNA 的合成主要步骤为:500 ng/mL RNA,2 μ L 5 \times primerscript RT Master Mix,补水至 10 μ L。37 $^{\circ}$ C 反应 15 min,85 $^{\circ}$ C 处理 1 min, - 20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.3 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 按照 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] II 说明书操作,体系如下:cDNA 2 μ L,2 \times SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] II

收稿日期:2016-09-12

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(编号:2014ZX08006-003);国家生猪现代产业技术体系建设专项(编号:CARS-36)。

作者简介:赵为民(1983—),男,湖北钟祥人,博士,助理研究员,主要从事转基因与育种研究。Tel:(025)84391941;E-mail:zhao_wemin1983@aliyun.com。

通信作者:王学敏,硕士,助理研究员,主要从事转基因与猪生产研究。Tel:(025)84391941;E-mail:wxml16@sina.com。

10 μL , Rox reference Dye II (50 \times) 0.4 μL , 正向引物 0.5 μL , 反向引物 0.5 μL , 补水到 20 μL 。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。

1.4 L6 肌细胞培养及分化

L6 细胞培养于含 10% 胎牛血清的培养基(90% DEME + 10% 胎牛血清 + 1% 双抗)中,然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养,待其密度达到 80% 时,按照 1:3 传代。待分化时,换成含 2% 马血清的 DMEM 进行分化,每 2 d 换 1 次培养液。

1.5 Activin A ELISA 测定

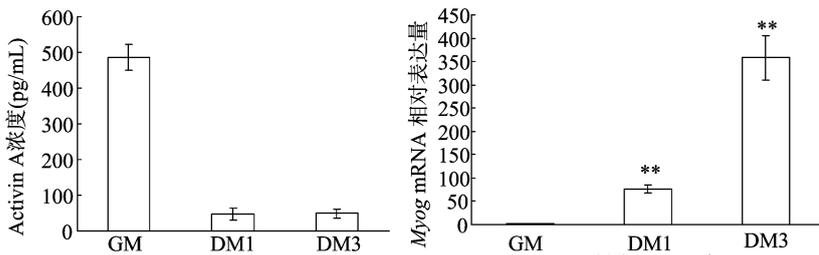
参照试剂盒说明,主要步骤:加样品和标准品,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 90 min。不洗。加生物素标记抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min,1 \times 洗涤缓冲液洗涤 3 次。加 ABC,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,1 \times 洗涤缓冲液洗涤 5 次。TMB 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20~25 min,加入 TMB 终止液,读数。

1.6 细胞增殖分析

在 96 孔板中接种 L6 细胞,然后将 96 孔板放在培养箱培养(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) 12 h 后,每组加入终浓度为 5、10、25 ng/mL 的 Activin A,每个处理组重复 4 次,分别培养 24、48、72 h。然后向每孔加入 10 μL CCK-8,在培养箱内孵育 1~4 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

1.7 细胞周期分析

细胞用胰酶酶消化后,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃培养基,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗细胞 2 次,离心去 PBS,加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70% 乙醇 -20 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,次日离心弃去固定液,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 5 mL 洗细胞 2 次,加入 0.5 mL PBS [含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化乙锭(PI),100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A] 重悬细胞,



A. Activin A 在 L6 细胞分化前后的表达量

GM—增殖期 (growth medium); DM1、DM3 分别为分化期 (differentiation medium, DM) 的第 1 天和第 3 天

图1 Activin A 和 Myog 基因在 L6 细胞分化前后的表达量

2.3 Activin A 对肌细胞周期的作用

为了探讨 Activin A 是否通过影响细胞周期来影响细胞增殖,添加 Activin A 培养 48 h 后,通过流式细胞周期分析发现 Activin A 能影响 L6 细胞各个周期的比例大小(图 3-A)。与对照组相比,Activin A 能极显著提高 S 期在细胞周期中的比例($P < 0.01$),同时极显著降低 G1 和 G2 期在细胞周期中的比例($P < 0.01$)(图 3-B)。

2.4 Activin A 对肌细胞分化的影响

由图 4 可见,在 L6 细胞分化液中添加 Activin A 培养 48 h 后,通过定量 PCR 结果发现与对照组相比,Activin A 极显著抑制了肌肉分化标记基因 Myog 的表达($P < 0.01$)。

3 讨论

骨骼肌发育是一个极其复杂的生物学过程,在一系列转

37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,采用流式细胞仪检测细胞周期变化。

1.8 数据处理

运用 Excel 软件进行数据处理与分析,统计方法采用 t 检验($\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 Activin A 在肌细胞增殖分化中的表达

如图 1-A 所示,随着 L6 细胞由增殖期 (growth medium, GM) 转向分化期 (differentiation medium, DM) 的第 1 天 (DM1) 和第 3 天 (DM3),Activin A 蛋白在 L6 细胞增殖期的表达量要极显著高于其在 L6 细胞分化期的表达量($P < 0.01$)。Myog 作为一个肌肉分化标记基因用来指示肌细胞的分化状态,从图 1-B 可以看出,随着 L6 细胞的分化,Myog 表达量从 GM 到 DM1 及 DM3 也极显著上升($P < 0.01$),说明 L6 细胞分化成功。

2.2 Activin A 对肌细胞增殖的作用

由图 2 可见,当添加不同浓度的 Activin A 培养 24 h 后,L6 细胞的增殖速度在各浓度之间并无显著差异。当继续培养至 48 h 和 72 h 后,Activin A 的效应逐渐显现出来。在 48 h 中,添加 5 ng/mL 的细胞增殖速度要显著高于对照组($P < 0.05$),而添加 10 ng/mL 和 25 ng/mL 的细胞增殖速度要极显著高于对照组($P < 0.01$),Activin A 对细胞增殖的效应随着浓度的增大而逐渐增强。Activin A 对 L6 细胞在 72 h 的增殖情况与 48 h 的增殖情况类似,但都达到差异极显著($P < 0.01$)。进一步分析发现在 72 h 时,不同浓度的 Activin A 对细胞增殖的幅度都要高于其在 48 h 时对细胞增殖的幅度。

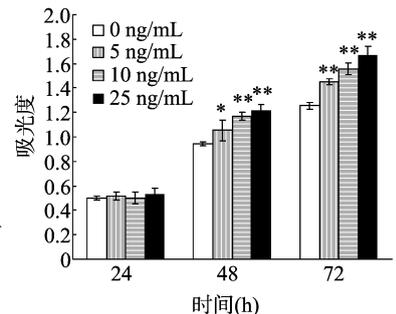


图2 不同浓度 Activin A 对 L6 细胞增殖的影响

录因子例如 PAX3/PAX7、生肌调节因子 (myogenic regulatory factors, MRFs) 以及其他基因的相互作用下,由生肌前体细胞分化为成肌细胞,后者再经过增殖、分化、融合形成多核肌管,最终发育形成肌纤维和肌肉组织^[12-13],因而肌细胞如何增殖和分化成为研究肌肉发育机制的重点。

研究表明基因的表达水平往往与其细胞所处的状态紧密相关^[14-15]。当肌细胞 L6 由增殖状态转向分化状态时,可以看到 Activin A 的表达量显著下降,说明其可能与 L6 细胞的增殖密切相关。进一步的试验表明当外源添加 Activin A 后,细胞增殖的速度明显高于对照组,说明其确实促进了细胞增殖,且这种促进效应显现出浓度依赖性,这与 Activin A 对其他细胞的增殖效应^[7]相似。细胞周期分为 G1、S、G2/M 等 3 个时期,G1 是细胞的合成前期,而 S 期是细胞 DNA 的复制期,当细胞不可逆地退出细胞周期后开始分化^[16],因而调节

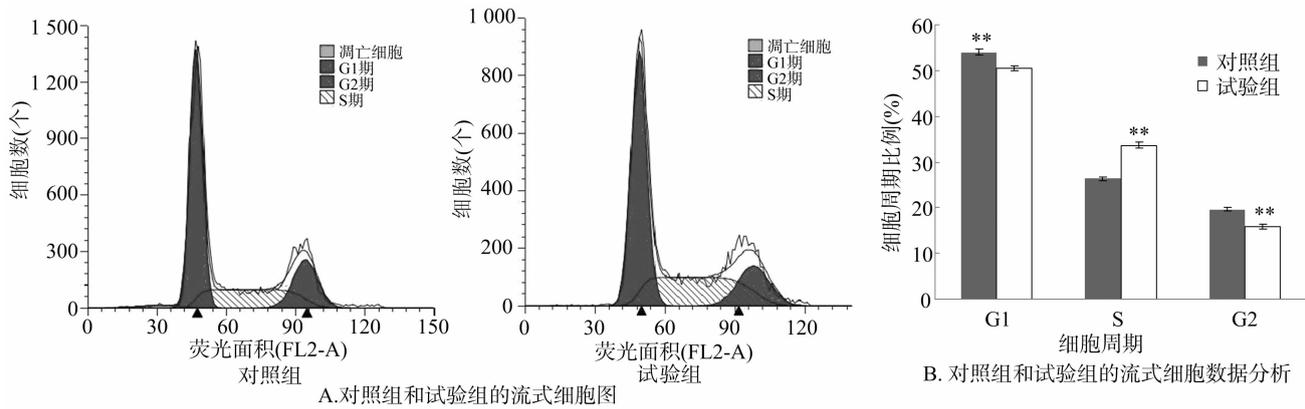


图3 Activin A 对 L6 细胞周期的影响

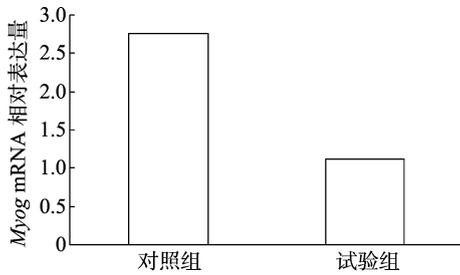


图4 Activin A 对 L6 细胞分化的影响

这两个时期的比例大小可影响细胞的增殖与分化。研究表明一些 miRNA 基因可通过促进 G1 期的停滞来促进肌细胞的分化^[17-18],相反一些 miRNA 可通过促进细胞增殖以及提高细胞周期中 S 期比例来抑制肌细胞的分化^[19]。本研究表明 Activin A 可降低 L6 细胞周期中 G1 和 G2 期的比例而增加 S 期的比例,同时结合添加 Activin A 可抑制肌肉分化标记基因 *Myog* 的表达,说明 Activin A 很可能是通过上述机制来抑制肌细胞的分化,其具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Rivier J, Spiess J, McClintock R, et al. Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid[J]. *Nature*, 1985, 133(1):120-127.
- [2] de Kretser D M, O'Hehir R E, Hardy C L, et al. The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 359(1/2):101-106.
- [3] Jones K, Mansell A, Patella S, et al. Activin a is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(41):16239-16244.
- [4] Apostolou E, Stavropoulos A, Sountoulidis A, et al. Activin - A over-expression in the murine lung causes pathology that simulates acute respiratory distress syndrome[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2012, 185(4):382-391.
- [5] Rabinovici J, Spencer S, Jaffe R. Recombinant human activin - A promotes proliferation of human luteinized preovulatory granulosa cells *in vitro*[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabo-*

- lism*, 1990, 71(5):1396-1398.
- [6] Boitani C, Stefanini M, Fragale A, et al. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development[J]. *Endocrinology*, 1995, 136(12):5438-5444.
- [7] 方胜英, 王 华, 曾令兰, 等. 激活素 A 对人肝星状细胞系 LX-2 细胞增殖的影响[J]. *临床消化病杂志*, 2012, 24(2):88-90, 93.
- [8] Trendelenburg A, Meyer A, Jacobi C, et al. TAK-1/p38/nNFκB signaling inhibits myoblast differentiation by increasing levels of Activin A[J]. *Skeletal Muscle*, 2012, 2(1):3.
- [9] Chen J, Walton K, Winbanks C, et al. Elevated expression of activins promotes muscle wasting and cachexia[J]. *FASEB Journal*, 2014, 28(4):1711-1723.
- [10] Cyranoski D. Super-muscle pigs created by small genetic tweak[J]. *Nature*, 2015, 523(7558):13-14.
- [11] Qian L, Tang M, Yang J, et al. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:14435.
- [12] Bryson-Richardson R, Currie P. The genetics of vertebrate myogenesis[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(8):632-646.
- [13] Buckingham M, Rigby P. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis[J]. *Developmental Cell*, 2014, 28(3):225-238.
- [14] Loh Y, Wu Q, Chew J, et al. The Oct4 and nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells[J]. *Nature Genetics*, 2006, 38(4):431-440.
- [15] Chen L L, Carmichael G G. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA[J]. *Molecular Cell*, 2009, 35(4):467-478.
- [16] Walsh K, Perlman H. Cell cycle exit upon myogenic differentiation[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1997, 7(5):597-602.
- [17] Dey B, Gagan J, Yan Z, et al. miR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regeneration in mice[J]. *Genes & Development*, 2012, 26(19):2180-2191.
- [18] Wei W, He H, Zhang W, et al. miR-29 targets Ak13 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development[J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4:e668.
- [19] Zhao Q, Kang Y, Wang Hong, et al. Expression profiling and functional characterization of miR-192 throughout sheep skeletal muscle development[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:30281.