

骨骼肌再生和骨骼肌卫星细胞相关研究的进展

刘丰彬¹ 段立公²

在我们的日常生活和体育锻炼中,发生肌肉损伤不可避免,肌肉发生损伤以后,需要经历修复和再生的过程。而对骨骼肌的修复和再生的发生、发展、转归的研究在骨骼肌损伤后的治疗和康复领域有很重要的临床和现实意义。但以往组织病理学的观点认为,人体成熟的骨骼肌细胞属于终末分化细胞,已经不再具有分裂和再生的能力,一旦因为某种原因遭受破坏,就会成为永久性的功能和组织的缺失,被纤维化的瘢痕组织所代替,不再具有收缩能力,使其运动能力减弱或丧失。这种观点一直影响着后来的医学和体育工作者。Carlson 在 1973 年发表了一篇综述,其中对当时有关骨骼肌再生的文献进行了综述报道^[1]。从那以后,人们对骨骼肌再生的关注程度逐渐提高,有关的研究逐渐增多,很多文章对骨骼肌损伤后再生的病理学以及形态学的变化有所报道,但有关再生过程的机制还没有明确指出。

1 骨骼肌的再生

传统意义上的理解,骨骼肌的再生应该是发生在损伤之后,是骨骼肌自我修复的一种反映。骨骼肌损伤后再生修复是其损伤病理过程中的一部分。它是通过肌组织的同种特异性细胞的再生而重建其原有的正常结构与功能,是对损伤过程中丧失的肌组织的补偿,属于完全性病理性再生^[2]。与纤维结缔组织或瘢痕组织来替代缺损的肌组织不同,后者属于不完全性病理性再生。现代创伤修复学认为再生是创伤愈合的始动和基础,修复是创愈的过程,愈合是创愈的结局。事实上骨骼肌的损伤和再生是一个连续病理过程中的不同阶段^[3-5]。它包括:骨骼肌的变性坏死,肌纤维结构破坏;炎症细胞浸润,主要是巨噬细胞,吞噬坏死细胞成分;卫星细胞激活,分裂增殖形成新的肌管细胞进而发育成肌纤维;再生肌纤维的分化成熟,肌肉功能恢复。而有研究认为,大多数骨骼肌损伤后的再生过程是基本一致的。当肌肉受到损伤后,由于外部机械刺激损伤和体内代谢的因素的影响,在损伤的肌纤维组织的局部,磷脂酶 A2、Ca²⁺活性蛋白酶和溶酶体的蛋白酶等被激活,同时细胞内 Ca²⁺水平的提高,扰乱了线粒体的正常的功能,破坏了肌浆网的正常的结构。进而引起局部的组织结构的损伤加重和肌肉内部的损伤,出现肌原纤维断裂、线粒体和肌浆网破裂、肌膜的连续性受到破坏等现象。与此同时,肌肉内的蛋白质降解系统被启动,这里最为主要的是由 Ca²⁺的依赖性的 Calpain 蛋白质降解系统的激活,引起胞内的蛋白质降解,加速了肌纤维内部损伤组织的消化吸收,这些坏死组织和细胞的消化吸收可以促进损伤部位的再生反应。

应该值得注意的是,就在骨骼肌发生损伤的部位,也会出现炎症反应,哺乳动物的炎症反应时间通常是在损伤 2—6h 出现,这时肌组织内伴有大量炎症细胞浸润,并在以后几天中持续发展。巨噬细胞在这里成为主要的浸润细胞,它在

组织坏死部位最主要的功能就是吞噬并消除坏死的组织碎片,而吞噬功能执行的好坏,是影响组织能否完全修复的重要决定因素^[6]。还有少量的中性粒细胞和其他的血源性的细胞也具有浸润功能,它们向损伤的部位扩散,吞噬损伤的肌肉和坏死组织。需要指出的是,这些吞噬细胞为血源性的,因此,它们对损伤部位的浸润要在该部位的血管再生以后才可实现,而损伤部位的本身会引起血液循环障碍,使此处的血供受阻,这样就推迟和阻碍了细胞向损伤部位的浸润,使损伤的修复延缓。

在损伤部位出现组织的变性和炎症反应地同时,卫星细胞也会出现。在肌肉发生损伤后 24h 内,卫星细胞已经出现,并且由于受到损伤刺激的影响,卫星细胞已经出现了细胞核增大、DNA 合成增加、细胞质含量增多和细胞质密度升高的现象,这说明卫星细胞已经被激活,并开始表现出分裂和增殖,这与 Timo 等^[9]通过实验得出的卫星细胞在肌肉损伤后 1 天已开始增殖的结论,以及 Bischoff 的卫星细胞增殖时间在损伤后 18h 出现基本一致。

在整个骨骼肌再生的过程中,巨噬细胞吞噬坏死组织,卫星细胞的激活,是决定整个肌肉再生最重要的两个阶段。对参与吞噬反应的巨噬细胞和生成新肌纤维的卫星细胞的研究将会成为整个肌肉再生机制研究中的重点内容。

2 骨骼肌卫星细胞

2.1 骨骼肌卫星细胞的发现和其在肌肉中的位置

有研究表明,哺乳动物的骨骼肌对生长、训练和损伤等刺激具有很强的适应能力,该过程的发生主要得益于卫星细胞的存在。1961 年,Mauro 描述了一个与青蛙肌纤维细胞边缘紧密相连的细胞,并根据其位置命名为卫星细胞,其位于肌膜和基膜之间。正常情况下,其保持不分裂和静止状态,当肌肉受到损伤刺激时,卫星细胞被激活、增殖并且表达,向肌细胞分化。最终这些细胞同原有的骨骼肌细胞相融合,或是彼此融合成肌管后加到肌纤维的尾部,形成新的肌纤维^[5,7]。

2.2 骨骼肌卫星细胞的一般特征

从形态学角度讲,卫星细胞位于肌细胞基膜和肌膜之间,一般为小梭形扁平的单核细胞。超微结构反映出它是一种分化不成熟的细胞,核在胞浆内位置不对称,一端细长,体积与相邻的肌管细胞的核相比较小,核膜下异染色体成群聚集,未见核仁,核浆比例小,与肌细胞相比其异染色质的量较高,胞浆一端含少量的细胞器,如游离核糖体、小泡及微丝、中间丝和微管等,核周有少量的小体积的线粒体,偶见粗面

1 首都体育学院,北京,100088

2 国家体育总局运动医学研究所

作者简介:刘丰彬,男,硕士在读

收稿日期:2005-10-19

内质网和高尔基膜系统、糖原颗粒和髓鞘结构等,有时核旁可见成对的中心粒。肌卫星细胞和肌纤维共有的肌浆膜上常富含胞饮小泡。冰冻蚀刻研究显示这些细胞向胞浆伸展,意味有运动能力^[8-10]。但是在普通病理学肌肉的切片中能够观察到具有上述结构的真正的卫星细胞是极为少见的。

有研究认为^[11-12],肌组织在胚胎发育过程中,肌母细胞在正常发育成为肌管细胞的同时,有肌母细胞的一个亚群停止发育过程,并移动到成熟肌纤维的表面,最后形成了肌卫星细胞群。肌卫星细胞数量随年龄的增加而逐渐减少,青少年的卫星细胞数目约占肌细胞核总数的 10%,成年人约为 2%—3%,也有人认为是 5%^[13]。不同的类型肌纤维肌卫星细胞数目也有不同,一般讲,慢肌纤维的肌卫星细胞数目要比快肌纤维的多^[14],这其中的原因目前还不是十分清楚。也说明调控肌卫星细胞表达的机制非常复杂,和许多因素有关。有证据表明体育运动对肌卫星细胞的活动有很大的影响^[9,15]。另外还有一种理论认为在肌卫星形成时,肌卫星细胞就已经分为不同的亚群,可能有快肌亚群和慢肌亚群,还有一种是可以在不同亚群间转换的亚群^[10]。

2.3 骨骼肌肌卫星细胞的起源

有一种说法认为,骨骼肌前体细胞,包括肌卫星细胞群起源于体节的多潜能的中胚层细胞^[16]。支持该假设的证据最初起源于在鸟类模型上完成的种间移植实验^[17-18]。这些研究牵涉到胚胎体节的移植(或置换),将鹌鹑的胚胎移植进鸡的胚胎。移植后的鹌鹑细胞具有独特的形态学的特征,并被发现来源于体节,形成肢体肌肉和出生后的骨骼肌的卫星细胞群。卫星细胞已经从新生的骨骼肌中分离出来,该肌肉来源于 E15 期或更老的胚胎,这就说明卫星细胞在胚胎发育的后期阶段发育成肢体。卫星细胞在肢体发育过程中,是否来源于独立体节的细胞系,还是来源于已经存在的细胞系(例如胚胎或胎儿的肌母细胞),现在还不清楚。但明确的概念是:每个肌母细胞的前体细胞(像胚胎、新生儿的肌母细胞以及卫星细胞)都是体节的衍生物。

这个假设最近受到了挑战,因为有研究指出无体节来源的多潜能细胞可能是卫星细胞的前体细胞。De Angelis 等^[19-22]的报告指出,从胚胎背部大动脉分离处的细胞与卫星细胞具有相似的形态学表现和基因表达的特点。而且,将大动脉起源的肌细胞移植到刚出生的小鼠的实验显示,该细胞群参与出生后肌肉的生长、再生和与卫星细胞的融合。作者指出卫星细胞可能来源于内皮细胞或者来源于一种是卫星细胞和内皮细胞共同的前体细胞。

卫星细胞起源于体节和无体节来源并不相互排斥。两种细胞系可能是在生理的或是病理的状态下的卫星细胞群。我们还需要采用细胞原子矩阵图的方法继续证实和分析存在于成熟骨骼肌中的所有卫星细胞的细胞系来源。这些研究在确定是否所有的卫星细胞群是否存在一个共同的细胞系来源,以及在肌肉和非肌肉组织中的具有再生能力的卫星细胞是否也同样有一个共同的细胞系来源是很重要的。

3 骨骼肌再生和骨骼肌肌卫星细胞

肌肉组织是一种终末分化结构,失去了去分化的能力,

即自身不能形成新的骨骼肌纤维,产生再生。人们很早就注意到肌肉再生,如蝾螈等爬行动物在断肢后会再生出新的肢体。由于当时实验技术的落后,人们对生肌细胞的起源没有得到一致的看法。一直到 Mauro 利用电子显微镜在青蛙的肌肉中发现了卫星细胞,并在许多脊柱动物中也见到它,卫星细胞作为肌细胞的来源才逐步被确认。美国运动医学大学年会曾经重点指出^[23],卫星细胞和生长因子在骨骼肌的生长、发育、训练适应和损伤、移植中具有重要作用。而就肌肉再生这一过程,主要是由卫星细胞来完成的。肌肉损伤后引起肌纤维坏死,使趋向死亡的组织部位的卫星细胞出现增殖、愈合、形成新的肌纤维,取代以前的坏死纤维。Bischoff 在研究卫星细胞的化学趋向性时指出^[24],自骨骼肌再生过程中,生肌细胞(即卫星细胞)的移行非常广泛。值得注意的是,从未损伤部位中迁移来的卫星细胞很少,损伤只引起其临近部位的卫星细胞出现增殖,但在临近部位的肌肉也出现损伤,并使肌外膜结构的连接组织受到破坏的时候,临近的其他肌纤维中的卫星细胞就会向损伤部位迁移。

正常情况下,卫星细胞处于休眠状态,又称为休眠肌母细胞。而处于再生状态的卫星细胞又叫活化卫星细胞^[20-22]。卫星细胞的活化一般出现在巨噬细胞开始吞噬坏死的纤维后,说明卫星细胞的激活依赖于巨噬细胞分泌的某些物质,但在巨噬细胞消失以后,仍然有卫星细胞的增殖分裂现象,说明还有其他因素在调节卫星细胞的激活^[20]。从分子生物学的角度来看,卫星细胞的激活以及增殖分裂,最后形成成熟的肌纤维是一个十分复杂的过程。它包括:各种生物因子如 IGF、HGF、FGF、LIF 等在骨骼肌再生中的作用^[24-30];特异性肌分化控制基因 MYOD 家族在促进骨骼肌再生中的作用^[25-28];肌球蛋白重链 MHC 蛋白异构体在肌再生过程中的变化,对肌纤维分型的影响;中等径微丝和肌细胞外基质在骨骼肌再生过程中的作用^[27];骨骼肌再生和骨骼肌凋亡的关系。研究还发现^[29],在肌纤维修复过程中,不仅坏死部位的卫星细胞参与修复反应,整根肌纤维的卫星细胞都可以移行到坏死部位参与修复反应,而且坏死纤维周围正常肌纤维的肌卫星细胞也会移行到坏死部位参与修复反应^[26-27]。

对骨骼肌的再生过程的研究表明,生长因子不但参与,而且在不同的细胞周期起的调节作用也不同。利用细胞培养技术,已经检测出生长因子在其生物学上的影响,它们或者单独作用,或者多种细胞因子联合作用,对卫星细胞的生长调节产生作用。现在研究较多的有以下几种生长因子:胰岛素样生长因子(IGF),体外培养时,IGF-I 和 IGF-II 可以增加卫星细胞的增殖和分化,给细胞注射 IGF-I,可引起卫星细胞增殖的提高和肌肉数量的增加^[29];肝细胞生长因子(HGF),它是一种多功能的细胞因子,对卫星细胞的调节也表现在多个方面,包括作为一个潜在的趋化因子、卫星细胞的激活子和成纤维细胞分化的抑制子,HGF 能激活和有选择性地促使卫星细胞的增殖;成纤维细胞生长因子(FGF),Sheehan 和 Allell^[20]在对卫星细胞的培养中发现 FGF 家族对卫星细胞增殖的详细作用,在 FGF 家族的 9 种亚型中,FGF-1、FGF-2、FGF-4、FGF-6 和 FGF-9 被证实可以刺激细胞的增殖,同时 HGF 和 FGF-2、FGF-4、FGF-6 或 FGF-9 的协同作用,能提高卫星细

胞的增殖。可能还有其他因子参与了成熟骨骼肌卫星细胞的调节; 氮的氧化物、血小板衍生生长因子、内皮衍生生长因子和睾酮已经显示可以介导卫星细胞的行为^[25-26]。显然, 卫星细胞的调节受很多因子的共同调节, 在再生中以浓度依赖性的方式进行作用。

有国内的学者对骨骼肌再生过程进行进一步的研究, 得到最新发现, 基质溶素-3 对肌卫星细胞激活有一定的调节作用, 出现了高表达^[20]。基质溶素-3(mmp-11), 是基质金属蛋白酶家族中三种基质溶素的一种。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是由多种锌离子依赖性酶组成的能降解细胞外基质蛋白的重要酶类^[24,31]。几乎能降解细胞基质的所有成分(胶原、明胶、粘性蛋白、纤维粘连蛋白、蛋白多糖等)。MMPs 是自然进化中高度保守的一类酶, 广泛分布于植物、脊椎动物、无脊椎动物中。以往对基质溶素-3 研究多数都是集中于其在肿瘤细胞分化和增殖过程中的表达, 对其他领域, 特别是对在骨骼肌再生过程中的作用机制的研究, 国内外文献报道较少, 对基质溶素-3 在骨骼肌卫星细胞的激活过程中的确切作用值得我们进一步研究和探讨。随着对骨骼肌卫星细胞功能的深入了解和研究, 会使我们对肌卫星细胞在骨骼肌再生过程中的作用有更具体、准确的理解和认识, 为与运动相关的骨骼肌的损伤进行有效的预防、积极的治疗并合理的康复提供帮助和借鉴。

参考文献

- [1] Carlson BM. The Regeneration of skeletal muscle: a review[J]. Am J Anat, 1973,137:119—150.
- [2] Da Silva M,Trafton PG.Bilateral femoral neck stress fractures in an amenorrheic athlete[J].Am J Orthop, 2001, 30(9): 768—774.
- [3] Zacks SI, Kurek JB, Margarita Romanella, et al. The role of Leukemia Inhibitory factor in skeletal muscle regeneration and growth [J]. Muscle & Nerve, 2002, 12:234—256.
- [4] Westermarck J, Kahari VM1. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor [J]. invasionl FASEB J, 1999, 13: 78127921.
- [5] McCully KK,Carlson BM,Hannu Kalimo, et al. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review[J]. Med and Sci in Sports and Exercise, 2002,9(3): 203—233.
- [6] Cornelison,Timo D, Wold JB.Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells [J]. Developmental Biology, 2003,191: 270—283.
- [7] Anderson JE.A role for nitric oxide in muscle repair :nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cell [J].Mol Biol Cell, 2002,11:1859—1874.
- [8] Bischoff R.The satellite cell and muscle regeneration[J].Myology, 1994,97—118.
- [9] Schultz E,McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells[J].Rev Physiol BiochemPharmacol, 1994,123:213—257.
- [10] Bower JJ, Edward Schultz.Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration [J]. Med Sci Sports Exerc, 2003, 13(S5): S112—S129.
- [11] Vater R, Cullen ML, Harris JB. The fate of desmin and titin during the degeneration and regeneration of the soleus muscle of the rat[J]. Acta. Neuropathol, 1992, 84(3): 278—288.
- [12] Timo Hurme,Hannu Kalimo. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury [J]. Medicine and Science in Sports and Exercise, 2001,24:197—205.
- [13] Trafton PG,Ishikawa H. Fine structure of skeletal muscle[J]. Cell and Muscle Motility, 2001, 4:3—23.
- [14] Sheehan SM,Allen RE.Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members[J].Cytokine & Growth Factor Reviews, 2003, 5(1): 300—312.
- [15] Chakravarthy MV, Davis BS,Booth FW.IGF—I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle[J]. Appl Physiol, 2000,89:1365—1379.
- [16] Ordahl CP, Williams RA,Denetclaw W. Determination and morphogenesis in myogenic progenitor cells: an experimental embryological approach [J].Curr Top Dev Biol, 2000,48:319—367.
- [17] Ordahl CP. Myogenic shape-shifters [J]. Cell Biol, 1999,147: 695—698.
- [18] De Angelis L,Berghella L,Coletta M, et al. Skeletal muscle myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute topostnatal muscle growth and regeneration [J]. Cell Biol, 2003,147:869—878.
- [19] De Angelis,Barbara J,Booth FW,et al.Repair of injured skeletal muscle[J].Med Sci Sports Exerc, 2002,12(2):117—123.
- [20] Fyfe I,Stranish WD. The use of eccentric mining and stretching in the treatment and prevention of tendon injuries[J]. Clin Sports Med, 2001,11 (3):601—624.
- [21] Kurek JB, Nouri Sara, Kannourakis George. Leukemia Inhibitory factor and interleukin—6 are produced by diseased and regenerating skeletal muscle[J]. Muscle & Nerve, 2002, 19: 1291—1301.
- [22] Faulkner JA, Kelly AM,Bischoff R. Proliferation of muscle satellite cells on intact myofiber in culture [J]. Dev Biol, 2003,68:109—136.
- [23] Thomas Braun, Arnold HH. A role for FGF—6 in skeletal muscle development and regeneration [J]. Genes & Development, 2001, 9: 1134—1151.
- [24] Bischoff, Ishiko T, Umemura Y, et al. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in mouse [J]. Bone Miner, 2003, 10(2): 1321—1331.
- [25] Roth D, Thomas Braun, Davis BS. Stress fractures[J]. Radiology, 2000, 20(23): 12—23.
- [26] Allell B,Harris, Kelly AM, et al. Satellite cell of skeletal muscle fibers[J].Biophys Biochem Cytol, 2003,9:457—467.
- [27] Bennett JH,Morgan MJ,Whawell SA,et al.Metalloproteinase expression in normal and malignant oral keratinocytes:stimulation of MMP—2 and MMP—9 by scatter factor [J].Eur J Oral Sci, 2004,108(4):281—291.
- [28] Camp RL,Rimm EB,Rimm DL,et al.Met expression is associate with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma [J].Cancer, 1999,86(11):2259—2265.
- [29] Bowers DC,Fan S,Walter KA,et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3—kinase—and AKT—dependent pathways[J].Cancer Res, 2004,60(15):4277—4283.
- [30] Marek K,Wojcicch B,Ewa Jankowska.Morphometric ultrastructural analysis of satellite cells in denervated rat soleus muscle [J].Experimental and Molecular Pathology, 2004,76:166—172.
- [31] 段立公.运动性小腿肌肉损伤和再生及与胫骨应力性骨折发生关系的试验研究[D].国家体育总局体育科学研究所硕士研究生学位论文, 1999,5,25.
- [32] 许家林.骨骼肌卫星细胞体外培养及肝细胞生长因子体外刺激激活的研究[D].上海体育学院硕士研究生学位论文, 2004,4.