

·综述·

骨骼肌损伤和修复中炎症细胞因子作用的研究进展*

左 群¹ 于新凯¹ 李 男^{1,2}

骨骼肌损伤在高强度的运动训练,超过习惯性的活动或体力劳动中经常发生,骨骼肌损伤后的修复一直是运动医学界长期关注和研究的基础性问题,众多研究者从不同角度展开了多方面的研究,但许多机制性问题并未完全解决。最新的研究发现,骨骼肌损伤后早期出现的炎症反应除了传统意义上的吞噬作用,对肌肉的修复起着重要作用^[1]。原因在于,炎症反应除了传统意义上吞噬坏死的细胞和组织碎片作用外,它还分泌许多细胞因子,如 γ -干扰素(interferon, IFN- γ)、白细胞介素IL-1 β (interleukin, IL-1 β)、IL-8、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等,作用于卫星细胞的生肌过程^[2-4],其中,以IFN- γ 、IL-6和TNF- α 的研究较多,但存在的争议也较多。研究同时发现,除了炎症细胞,骨骼肌细胞也能分泌上述细胞因子,它们在骨骼肌损伤和修复中可能相互协调,共同发挥生肌调节作用。

1 IFN- γ

干扰素是由激活的T淋巴细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞产生,与细胞膜受体结合,通过JAK-STAT信号通路和经典途径激活巨噬细胞杀死病原体,调节机体的免疫反应和众多生理功能^[5-7]。研究发现,作为抗病毒因子的IFN- γ 对骨骼肌的再生修复起着重要作用^[8]。在心脏毒素所致的骨骼肌损伤部位中性粒细胞在损伤后第1天和第3天增加,5天后恢复正常;巨噬细胞的聚集表现要稍后,第5天达到峰值,第10天恢复;CD4⁺T细胞和NK细胞第5天达到峰值,第10天仍然存在。IFN- γ 在不同的炎症细胞和成肌细胞中都有表达,且IFN- γ mRNA和蛋白的表达大体上和巨噬细胞、T细胞、NK细胞和MyoD⁺成肌细胞的变化相似。IFN- γ 缺失的大鼠在损伤后第5天巨噬细胞的聚集和野生型大鼠相比下降;在体阻断IFN- γ 的产生导致肌肉再生显著下降,具体表现为增殖的细胞和MyoD⁺成肌细胞数目减少,但TNF- α 和IL-1 β 的表达不变;在体阻断IFN- γ 受体的表达减少了成肌细胞向多核肌管的融合^[9]。研究结果表明,内源性的IFN- γ 是骨骼肌再生所必需的,而且IFN- γ 可以通过调节炎症细胞、肌肉细胞、成纤维细胞的活性影响肌肉

再生。离体研究发现,外源性补充IFN- γ 能够促进肌肉修复,减少纤维变性^[9],通过使培养的骨骼肌细胞中大量基因,包括主要组织相容性复合物(MHC)分子、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达增加来促进肌肉修复^[10-12]。但体外研究的结果也有矛盾,表现为IFN- γ 阻止人成肌细胞的增殖,但促进大鼠成肌细胞的增殖,可能和外源性IFN- γ 的剂量有关^[13-14],因为高浓度的IFN- γ 促进分解代谢,低浓度促进肌肉修复。同时,IFN- γ 的促增殖或分解作用还取决于其受体亚基磷酸化后是否与STAT-1对接,引起STAT-1磷酸化后转位入核,进一步结合到 γ 激活的序列元件上,调节众多基因的表达,包括IRF-1, iNOS, SOCS-3等,而SOCS-3具有促进成肌细胞融合的作用^[15]。

研究发现,IFN- γ 对肌肉修复既有直接作用途径,也有间接作用途径。直接作用途径表现为通过干扰转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的信号转导和直接作用于基质元件来减少细胞外基质的合成,减少肌肉的成纤维化^[16-17]。因为TGF- β 可通过沉默生肌调节因子MyoD家族成员的转录活性抑制生肌分化和融合,促进肌肉成纤维化^[18-20]。间接作用机制是通过影响巨噬细胞的活性,激活巨噬细胞使之产生炎症细胞因子以及iNOS和活性氧簇等实现。因为,在IFN- γ 缺失的小鼠实验中表现为iNOS的产生减少,但TNF- α 、IL-1 β 的产生不受影响^[8]。由于巨噬细胞可以刺激骨骼肌卫星细胞的增殖,因此,IFN- γ 可以通过影响巨噬细胞的活性间接发挥作用^[21]。在上述研究中,IFN- γ 及其受体的缺失并没有导致TNF- α 和IL-1 β 受到影响,但肌肉的修复能力却是表现为受损,提示在此损伤模型中IFN- γ 的作用较TNF- α 和IL-1 β 更居于主导。

2 IL-6

IL-6属于IL-6细胞因子家族,是一种多效的细胞因子,同控制和协调免疫反应有关,特别是急性炎症反应过程中,介导B细胞的增殖与成熟。IL-6可由T、B淋巴细胞、造血干细胞、巨噬细胞、肾小球系膜细胞等多种细胞产生,通过与IL-6受体(IL-6R)结合,在细胞因子网络中发挥多种效应。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.09.026

*基金项目:上海市自然科学基金资助项目(10ZR1429000);上海市重点学科建设项目资助(S30802)

1 上海体育学院运动科学学院,上海,200438; 2 上海体育科学研究所

作者简介:左群,女,副教授; 收稿日期:2011-10-06

IL-6在运动性骨骼肌损伤中的作用,最初是发现离心收缩运动后(运动性骨骼肌损伤常用模型)^[22],IL-6的释放与运动强度和持续时间无关,而和肌肉损伤标志物(CK)有关^[23],因此有学者推测IL-6的生成与离心运动诱导延迟型肌肉损伤有关。但也有实验证明,IL-6和CK水平不存在相关,认为离心运动产生的IL-6与肌肉损伤的关联不大^[24-25]。包括对大鼠腓肠肌予以电刺激(100Hz)产生向心收缩或离心收缩,刺激结束后30min发现,肌肉IL-6 mRNA水平不因收缩形式不同产生差异,但与未受刺激的对侧肌肉IL-6 mRNA水平相比有显著性提高^[26]。说明运动后IL-6的增加非源于损伤肌肉本身,因为向心收缩通常不产生肌肉损伤,即使有损伤也较离心收缩导致的损伤程度要轻^[27]。由于该实验是在运动后30min进行的测试,而离心收缩导致的损伤具有延迟性出现的特征,故可能尚不能完全反映IL-6的真正变化。因为Tomiya等^[27]通过电刺激使肌肉产生离心收缩,运动后12h在肌细胞质发现有IL-6的表达;之后,在炎症细胞和增殖的卫星细胞上也检测到IL-6的表达。对IL-6 mRNA进行干扰导致C2C12成肌细胞myogenin和 α -actin基因的表达减少^[28],提示IL-6具有潜在的生肌作用。

随着研究的深入,发现骨骼肌作为机体最大的内分泌器官,在第一时间可以释放内源性骨骼肌因子,包括IL-6、TNF- α 等^[29]。骨骼肌自身分泌的IL-6在骨骼肌损伤与修复过程中的作用不容忽视^[30-31]。正常骨骼肌细胞IL-6的表达很低,但在损伤部位的骨骼肌细胞和炎症单核细胞中显著上调^[32]。Cantini等^[33]通过骨骼肌细胞培养,发现激活的单核细胞分泌生长因子刺激肌原细胞生成IL-6,同时肌原细胞的增殖同肌原细胞自分泌的IL-6相关;后续的研究^[34]进一步发现,IL-6可增加肌肉损伤后巨噬细胞的吞噬作用,同时促使卫星细胞周期同步,其含量同肌原细胞增殖、融合有关联。研究结果提示,骨骼肌产生的IL-6在调节卫星细胞增殖和核融和方面具有重要作用。同时Kami等^[35]采用原位杂交技术,研究损伤肌肉中IL-6mRNA的表达,结果发现单核细胞和损伤的肌纤维IL-6mRNA均有表达;不仅如此,IL-6mRNA在肌肉神经施万细胞中也有表达。这个结果提示,肌源性IL-6在损伤肌肉和神经的修复中具有一定作用。

就在肌源性IL-6对骨骼肌再生作用得到大量研究和肯定的同时,研究发现,IL-6作为机体能量感应调节因子,骨骼肌即使不损伤,只要有收缩就能产生IL-6^[36-37]。尤其是在肌糖原大量消耗的情况下,肌源性IL-6大量释放进入血液,并且以荷尔蒙样的方式工作,作用于肝脏和脂肪组织,维持运动中的糖代谢,并且调节运动过程中的脂肪分解。同时,即使在骨骼肌检测到IL-6的表达,也不能排除是由骨骼肌中的其他细胞产生和释放。因此,IL-6在骨骼肌损伤与修复过程中的组织来源以及作用还有待进一步证实。

3 TNF- α

TNF- α 又被称为促炎症细胞因子,是启动抗菌炎症反应的关键细胞因子,通过刺激血管内皮细胞表达,刺激单核吞噬细胞和其他细胞分泌趋化性细胞因子,引起白细胞在炎症部位聚集。

TNF- α 是一个早期和有利的致炎细胞因子,即使是很小的创伤也能使肥大细胞释放TNF- α ,同时中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞都能释放TNF- α 迅速聚积到损伤部位,使TNF- α 含量迅速增加。作为一种具有多种生物效应的细胞因子,TNF- α 的作用具有剂量依赖性,过量表达诱导细胞凋亡或坏死,产生病理性损伤,与很多疾病密切相关;中等剂量时导致炎症反应或恶病质;低水平时具有组织适应性效应,在宿主抵抗微生物入侵和抑制肿瘤产生的防御系统中起关键作用^[38]。TNF- α 在骨骼肌损伤和修复的作用是通过研究发现,在恶病质中,TNF- α 通过MyoD或caspase途径抑制骨骼肌的分化而阻止骨骼肌的再生^[39-40]。但在正常生理水平,对C₂C₁₂成肌细胞予以血清限制后,TNF- α 的基础表达水平显著上升,同时血清限制使NF- κ B的活性也提高^[41]。TNF- α 迅速刺激血清效应因子SRF(成肌细胞分化所必需的转录因子),同时激活SRF所依赖的骨骼肌 α -actin基因表达,通过NF- κ B和SRF的活性增加促进肌细胞的早期分化。同时,有研究表明,TNF在调节肌形成中的作用表现为和在分化的肌管中的分解代谢的作用相反,是成肌细胞分化早期所必需的调节因子,且通过p38 MAPK途径起作用^[41-43]。但也有研究发现,将C₂C₁₂成肌样细胞用TNF- α 处理导致MyoD1,MyoG,CDKNA,MyHC,TPM1蛋白的丢失,肌管形成受抑制;且TNF- α 抑制成肌细胞的分化是通过诱导NO合酶和NO的产生,该过程依赖NF- κ B途径,结合到MyoD1启动子部位,下调生肌转录程序,使MyoD1的合成和活性下降^[44-45]。研究认为,造成这种结果的差异和TNF- α 的浓度有关,0.05ng/ml的浓度可以提高p38、myogenin和MHC的活性和表达,但在0.5—5ng/ml的浓度范围却抑制了上述分化。因此,TNF- α 刺激或抑制肌再生的作用呈现剂量依赖性,低浓度具有生理作用,刺激肌再生;高浓度具有病理作用,抑制肌再生。因此研究发现,当外源性添加TNF- α (10—20ng/ml)超过正常生理浓度时,引起对肌再生的抑制^[43]。同时研究发现,这种抑制表现为阻止成肌细胞分化为肌管,以及成肌细胞特异性骨骼肌基因的表达;但当成肌细胞已经融合和分化为肌管时,TNF对骨骼肌的基因表达不起作用,表明TNF的信号通路在成肌细胞分化之前,提示TNF的作用对象可能是卫星细胞^[46]。

在体研究中发现,TNF- α 对成肌细胞具有趋化性,能够促进卫星细胞的有丝分裂,提示TNF- α 在肌肉再生中的直接作用^[47]。有作者认为TNF- α 既是增进因子,能促使启动的卫星细胞增殖;也是感受因子,能激活卫星细胞进入细胞周

期。由浸润的巨噬细胞和受伤的肌纤维产生的TNF- α 能够刺激SRF结合到c-fos基因的启动子SRE上,通过NF- κ B途径促进肌细胞的早期分化^[26,48]。在对小鼠胫骨前肌予以冻伤后,研究发现TNF- α 基因缺陷组中成肌调节因子MyoD mRNA表达、免疫染色和组织学性质与野生型组相比均显著下降,而IL-6缺陷组的上述指标和野生型相似。由于MyoD不仅可促使静止期的肌卫星细胞向成肌细胞转化,而且能使多种类型细胞(如成纤维细胞、脂肪细胞等)转化为成肌细胞,并可促进成肌细胞进一步融合、分化为成熟的肌纤维。因此,作者总结是TNF- α ,不是IL-6调节MyoD的表达和肌肉功能的恢复^[47]。但也有研究者发现^[49]。在TNF- α (-/-)和TNF- α (-/-)/LT- α (-/-)小鼠中,尽管有TNF- α 基因的缺失,但并没有影响骨骼肌的再生修复,提示存在TNF- α 之外的修复途径。因此,TNF- α 在肌肉损伤修复中的作用还有待进一步加以证实。

4 小结

作为炎症细胞因子,IFN- γ 、IL-6和TNF- α 的细胞来源众多,离体实验和在体条件存在较大差异;同时,实验对象损伤模型的不同也会使研究结果出现不同。由于骨骼肌损伤与修复是一动态而复杂的过程,细胞因子之间存在网络型的结构作用机制,使得炎症细胞因子在骨骼肌损伤与修复中的作用相当复杂。由于损伤后的炎症反应是肌肉修复必不可少的过程,因此,探讨炎症细胞因子在骨骼肌损伤与修复过程中的作用机制对骨骼肌损伤后的治疗和康复将提供有益的思路。

参考文献

- [1] Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury[J]. Med Sci Sports Exerc, 1995, 27:1022—1032.
- [2] Lescaudron L, Peltékian E, Fontaine-Péru J, et al. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant[J]. Neuromuscul Disord, 1999, 9:72—80.
- [3] Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology[J]. J Appl Physiol, 2001, 91: 534—551.
- [4] Smith C, Kruger MJ, Smith RM, et al. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities[J]. Sports Med, 2008, 38:947—969.
- [5] Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, et al. Transcriptionally active Stat1 is required for the anti-proliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:7673—7678.
- [6] Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor[J]. Annu Rev Immunol, 1993, 11:

- 571—611.
- [7] Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, et al. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways[J]. EMBO J, 2000, 19:263—272.
- [8] Cheng M, Nguyen MH, Fantuzzi G, et al. Endogenous interferon- γ is required for efficient skeletal muscle regeneration[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294:C1183—C1191.
- [9] Foster W, Li Y, Usas A, et al. Gamma interferon as an anti-fibrosis agent in skeletal muscle[J]. J Orthop Res, 2003, 21: 798—804.
- [10] Legoedec J, Gasque P, Jeanne JF, et al. Complement classical pathway expression by human skeletal myoblasts in vitro[J]. Mol Immunol, 1997, 34:735—741.
- [11] Mantegazza R, Hughes SM, Mitchell D, et al. Modulation of MHC class II antigen expression in human myoblasts after treatment with IFN-gamma[J]. Neurology, 1991, 41:1128—1132.
- [12] Reyes-Reyna SM, Krolick KA. Chemokine production by rat myocytes exposed to interferon-gamma[J]. Clin Immunol, 2000, 94:105—113.
- [13] Kelic S, Olsson T, Kristensson K. Interferon-gamma promotes proliferation of rat skeletal muscle cells in vitro and alters their AChR distribution[J]. J Neurol Sci, 1993, 114:62—67.
- [14] Kalovidouris AE, Plotkin Z, Graesser D. Interferon-gamma inhibits proliferation, differentiation, and creatine kinase activity of cultured human muscle cells. II. A possible role in myositis[J]. J Rheumatol, 1993, 20:1718—1723.
- [15] Spangenburg EE. SOCS-3 induces myoblast differentiation[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 10749—10758.
- [16] Ulloa L, Doody J, Massagué J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway[J]. Nature, 1999, 397:710—713.
- [17] Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response[J]. FASEB J, 2004, 18: 816—827.
- [18] Smith CA, Stauber F, Waters C, et al. Transforming growth factor-beta following skeletal muscle strain injury in rats[J]. J Appl Physiol, 2007, 102:755—761.
- [19] Allen RE, Boxhorn LK. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor[J]. J Cell Physiol, 1989, 138:311—315.
- [20] Martin JF, Li L, Olson EN. Repression of myogenin function by TGF-beta 1 is targeted at the basic helix-loop-helix motif and is independent of E2A products[J]. J Biol Chem, 1992, 267:10956—10960.
- [21] Arnold L, Henry A, Poron F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflam-

- matory macrophages to support myogenesis[J]. J Exp Med, 2007,204: 1057—1069.
- [22] Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle[J]. J Appl Physiol, 1983,54:80—93.
- [23] Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, et al. Exercise induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage[J]. J Physiol, 1997,499:833—841.
- [24] Toft AD, Jensen LB, Bruunsgaard H, et al. Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283:289—295.
- [25] Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, et al. Evidence that IL-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running [J]. J Physiol, 1998, 508:949—953.
- [26] Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, et al. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles[J]. J Physiol, 2000,528:157—163.
- [27] Tomiya A, Aizawa T, Nagatomi R, et al. Myofibers express IL-6 after eccentric exercise[J]. Am J Sport Med, 2004, 32: 503—508.
- [28] Baeza-Raja B, Munoz-Cánoves P. p38 MAPK-induced nuclear factor- κ B activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15: 2013—2026.
- [29] Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, et al. The expression of TNF- α by human muscle[J]. J Clin Invest, 1996,97:1111—1116.
- [30] Steensberg A, Keller C, Starkie RL, et al. IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002,283: E1272—E1278.
- [31] Steensberg A, van Hall G, Osada T, et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6[J]. J Physiol, 2000,529:237—242.
- [32] Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, et al. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration[J]. Muscle Nerve, 1997,20: 815—822.
- [33] Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E, et al. Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995,216: 49—53.
- [34] Cantini M, Carraro F. Control of cell proliferation by macrophage-myoblast interactions [J]. Basic Appl Myol, 1996,6: 485—489.
- [35] Kami K, Senba E. Localization of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 messenger ribonucleic acids in regenerating rat skeletal muscle[J]. Muscle Nerve, 1998, 21:819—822.
- [36] Chan MH, Carey AL, Watt MJ, et al. Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6 is influenced by glycogen availability[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004, 287: R322—327.
- [37] Steensberg A, Febbraio MA, Osada T, et al. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content[J]. J Physiol, 2001, 537:633—639.
- [38] Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation[J]. J Exp Med, 1988, 167:1211—1227.
- [39] Coletti D, Yang E, Marazzi G, et al. TNF- α inhibits skeletal myogenesis through a p38-dependent pathway by recruitment of caspase pathways[J]. EMBO J, 2002,21:631—642.
- [40] Langen RC, Van Der Velden JL, Schols AM, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization[J]. FASEB J, 2004,18:227—237.
- [41] Li YP, Schwartz RJ. TNF- α regulates early differentiation of C2C12 myoblasts in an autocrine fashion[J]. FASEB J, 2001,15:1413—1415.
- [42] Chen SE, Gerken E, Zhang Y, et al. Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 289:C1179—C1187.
- [43] Chen SE, Jin B, Li YP. TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292:C1660—C1671.
- [44] Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products[J]. J Clin Invest, 2004, 114: 370—378.
- [45] Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, et al. NF- κ B-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia[J]. Science, 2000,289: 2363—2366.
- [46] Miller SC, Ito H, Blau HM, et al. Tumor necrosis factor inhibits human myogenesis in vitro[J]. Mol Cell Biol, 1988,8: 2295—2301.
- [47] Warren GL, Hulderman T, Jensen N, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury [J]. FASEB J, 2002, 16:1630—1632.
- [48] Li YP. TNF- α is a mitogen in skeletal muscle[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003,285: C370—C376.
- [49] Collins RA, Grounds MD. The role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in skeletal muscle regeneration: studies in TNF- α (-/-) and TNF- α (-/-) LT- α (-/-) mice[J]. J Histochem Cytochem, 2001,49:989—1001.