

小鼠骨骼肌挫伤修复过程中肌再生因子与炎症因子变化特征*

赵淋淋¹ 刘晓光¹ 陈佩杰¹ 肖卫华^{1,2}

摘要

目的:探讨小鼠骨骼肌挫伤修复过程中肌再生因子与炎症因子的表达规律。

方法:48只雄性ICR小鼠,随机选择8只作为对照组(C组,n=8),其余小鼠以钝物击打构建骨骼肌挫伤模型(S组,n=40),分别在伤后第12h、1天、5天、10天和15天取腓肠肌待测。右侧腓肠肌制作石蜡标本,用于HE染色,观察骨骼肌损伤修复过程中形态变化;左侧腓肠肌用于基因表达分析,荧光定量PCR检测肌再生调节因子与炎症因子mRNA表达变化。

结果:①骨骼肌挫伤后第5天可见少量再生肌纤维,第10天显著增多,第15天基本恢复正常;②骨骼肌损伤后,肌再生因子MyoD、Myogenin、IGF-1、MGF、HGF、TGF- β 1 mRNA表达量显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),GDF-8 mRNA在伤后表达量未出现显著变化;③骨骼肌损伤后,巨噬细胞标志物CD68、CD163、CD206,多种炎症因子IL-1 β 、IL-6、IL-10和趋化因子CCL2、CCL3、CCL5、CCL8、CXCL10、CXCL12 mRNA表达量显著上调,且多在伤后第5天达到峰值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

结论:趋化因子和炎症因子可能参与了挫伤骨骼肌早期炎症反应,而多种肌再生正向调控因子如MyoD、Myogenin、IGF-1、MGF、HGF可能参与了挫伤骨骼肌修复再生。

关键词 骨骼肌;钝挫伤;肌再生因子;炎症因子;趋化因子

中图分类号:R685, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1001-1242(2019)-11-1297-07

A study on the expression of muscle regeneration factor, inflammatory factor in the repair of skeletal muscle contusion in mice/ZHAO Linlin, LIU Xiaoguang, CHEN Peijie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(11): 1297—1303

Abstract

Objective:To investigate the regulation of muscle regeneration factors and inflammatory factors during the repair of skeletal muscle contusion in mice.

Method: Forty eight ICR male mice were divided into control group (C, n=8) and muscle contusion group (S, n=40). Subsequently, their gastrocnemius muscles were harvested at 12 hour, 1day, 5day, 10 day, 15 day after injury. Hematoxylin and eosin (HE) stain were used to assess the changes of muscle morphology. In addition, the gene expression of regeneration regulatory factors and inflammatory factors was analyzed by real-time polymerase chain reaction.

Result: ① Morphology of skeletal muscles showed signs of regeneration at 5d post injury. The maximum amount of regeneration muscle fibers appeared during 10d post contusion. 15d post-injury morphology of myofibers nearly recovered to normal. ② After skeletal muscle injury, the mRNA expression of myogenic regulatory

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.11.006

*基金项目:国家自然科学基金项目(31300975);上海市自然科学基金项目(18ZR1437100);上海市人类运动能力开发与保障重点实验室项目(11DZ2261100)

1 上海体育学院运动科学学院,上海市,200438; 2 通讯作者

作者简介:赵淋淋,女,硕士研究生; 收稿日期:2018-10-16

factors MyoD, Myogenin, IGF-1, MGF,HGF, and TGF-beta 1 was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), There was no significant change in the expression of GDF-8 mRNA after injury. ③After skeletal muscle injury, the mRNA expression of macrophage markers CD68, CD163, CD206, inflammatory factors IL-1 β , IL-6, IL-10 and chemokines CCL2, CCL3, CCL5, CCL8, CXCL10, CXCL12 were up-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion: Chemokines and inflammatory factors may be involved in the early inflammatory response of contusion skeletal muscle confusion, and many positive regulatory factors of muscle regeneration such as MyoD, Myogenin, IGF-1, MGF, HGF, may be involved in the repair and regeneration of contused skeletal muscle.

Author's address Department of Sports Science, Shanghai University of Sport, Shanghai, 200438

Key word skeletal muscle; contusion; muscle regeneration factor; inflammatory factor; chemokine

骨骼肌损伤再生的机制已通过多种动物模型(如骨骼肌萎缩、冻伤、烧伤、毒素注射骨骼肌损伤、mdx小鼠等)^[1-5]进行了深入研究。研究表明,骨骼肌损伤后再生一般包括三个阶段:第一个阶段为损伤期,出现在骨骼肌损伤开始的1—3天,表现为损伤骨骼肌局部肿胀,血肿明显,部分肌组织坏死并伴有炎症反应。第二个阶段是修复期,一般出现在骨骼肌损伤后的5—10天,坏死肌组织被吞噬并伴随着损伤骨骼肌的再生。第三个阶段为肌组织的塑形期,一般从骨骼肌损伤后的2—3周开始,此时再生肌纤维成熟,并伴随着瘢痕组织的形成^[6-7]。在上述过程中,需要多种免疫细胞^[8]、再生因子^[6]、炎性因子及趋化因子的相互协调配合,才能使修复得以顺利完成。

而骨骼肌挫伤作为运动中常见的一种损伤,其再生机制是否与其他类型损伤相同,仍有待阐明。因此,本研究通过构建小鼠骨骼肌挫伤模型,深入研究了骨骼肌挫伤后免疫细胞、肌再生因子、炎性因子等的变化规律,从肌再生因子、炎性因子等多个层面对骨骼肌挫伤修复的整体变化规律进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

48只8周龄雄性ICR小鼠,体重36—40g,(动物等级:SPF级)购自第二军医大学实验动物中心,SYXK(沪)2013-0016。随机取8只作为骨骼肌钝挫伤模型的对照组(C组),其余40只小鼠进行骨骼肌钝挫伤,分别在伤后第12h、第1天、第5天、第10天以及第15天取材。

1.2 骨骼肌钝挫伤动物模型

本研究用钝物击打构建挫伤模型,该方法操作

简单且具有很好的重复性^[9-10],主要方法如下:将2.5%戊巴比妥钠行小鼠腹腔注射使其麻醉后,将小鼠后肢固定,膝关节伸直且踝关节背伸90°位,将一实心不锈钢钢球(直径15.9mm,重量16.8g)置于一透明管道顶端(高125cm,内径16.0mm),实心钢球释放后垂直击中透明管道下方的打击装置,打击装置底端在实心钢球的冲击作用下,撞击小鼠双侧腓肠肌肌腹中点(打击面积28.26mm²),小鼠腓肠肌被打击部位可立即产生血肿。

1.3 实验动物取材

小鼠在受伤后的第12h、第1天、第5天、第10天、第15天取材。采用颈椎脱臼处死小鼠,迅速分离小鼠腓肠肌。右侧腓肠肌经4%多聚甲醛固定用于形态学分析,左侧腓肠肌于-80℃速冻用于基因水平检测。

1.4 HE染色

腓肠肌固定后,石蜡包埋,横切3—4 μ m厚的连续薄片,脱蜡后进行HE染色,中性树胶封片。通过观察HE染色结果,评估肌肉损伤后的形态变化。

1.5 RNA提取和cDNA合成

在腓肠肌肌腹中点处剪取约60mg组织,剪碎后加入1ml Trizol(Invitrogen公司),用机械匀浆器(IKA,德国)粉碎匀浆。静置10min后,加入200 μ l氯仿并上下颠倒充分混匀后静置5min使明显分层,12000r/min,4℃离心15min后小心吸取500 μ l上清放入一新离心管中,加入等量异丙醇,颠倒混匀并静置20min。冷冻离心机(centrifuge5417R,德国Eppendorf公司)中12000r/min,4℃离心10min,白色沉淀即为RNA,75%酒精洗涤2次后,加入30 μ l DEPC水溶解。测OD值,OD260/280为1.8—2.0的样品可用。取2 μ g总RNA,按Fermentas公司第一链cDNA

合成试剂盒说明加 0.2μg 随机引物、20mM dNTP-mix、5×Reaction buffer、20U RiboLock™ RNase Inhibitor 和 200U of Revertaid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 总体积是 20μl。在梯度 PCR 仪 (Mastercycler EP, 德国 Eppendorf 公司), 进行反转录。反应过程中的温度控制是 25℃ 进行 5min, 42℃ 进行 60min, 70℃ 进行 5min, 然后温度降低到 4℃, cDNA 就可以完成合成。合成的 cDNA 储存在 -20℃ 备用^[11-12]。

1.6 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 反应体系包括 12.5μl 2×Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix

(Thermo Scientific), 1μl cDNA, 无核酸酶水和 300nM 的上下游引物。引物由上海生工生物工程有限公司合成 (见表 1)。使用荧光定量 PCR 仪 (ABI SteponePlus Real Time PCR System7500, USA) 进行扩增。反应条件为: 预变性 95℃ 时间为 10min, 95℃ 变性时间为 15s 40 个循环, 60℃ 时间为 1min 退火/延伸。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算所测样本 mRNA 的相对含量^[13-14]。

1.7 统计学分析

本实验的所有实验数据都用 SPSS 20.0 软件来进行处理, 组间采用单因素方差分析, 非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

表 1 荧光定量 PCR 引物一览表

基因	上游引物序列	下游引物序列
MyoD	5'-GAGCGCATCTCCACAGACAG-3'	5'-AAATCGCATTGGGGTTTGAG-3'
Myogenin	5'-CCAGTACATTGAGCGCCTAC-3'	5'-ACCGAACTCCAGTGCATTGC-3'
CD68	5'-CAAAGCTTCTGCTGTGGAAT-3'	5'-GACTGGTCACGGTTGCAAG-3'
CD163	5'-GCAAAAATGGCAGTGGG-3'	5'-GTCAAAATCACAGACGGAGC-3'
CD206	5'-GGATTGTGGAGCAGATGGAAG-3'	5'-CTTGAATGGAATGCACAGAC-3'
TGF-β	5'-TGCGCTTGACAGAGATTA-3'	5'-CGTCAAAAGACAGCCACTCA-3'
HGF	5'-AGGAACAGGGGCTTACGTT-3'	5'-GCTGCCTCCTTTACCAATGA-3'
IGF-I	5'-GCTTGCTCACCTTTACCAGC-3'	5'-AAATGTACTTCCTTCTGGGTCT-3'
MGF	5'-GCTTGCTCACCTTTACCAGC-3'	5'-AAATGTACTTCCTTCTCTCTC-3'
GDF-8	5'-TGCAAAATTGGCTCAAACAG-3'	5'-GCAGTCAAGCCCAAGTCTC-3'
IL-1β	5'-TGACGTTCCCATAGACAAGT-3'	5'-CCGTCTTTCATTACACAGGACA-3'
IL-6	5'-GAACAACGATGATGCACTTGC-3'	5'-CTTCATGTACTCCAGGTAGCTATGGT-3'
IL10	5'-CAAGGAGCATTGAATTCCC-3'	5'-GGCCTGTAGACACCTTGGTC-3'
CCL2	5'-GCTCAGCCAGATGCAGTTAAC-3'	5'-CTCTCTCTTGAGCTTGGTGAC-3'
CCL3	5'-ACCATGACACTCTGCAACCA-3'	5'-CCCAGGTCTCTTTGGAGTCA-3'
CCL5	5'-CATATGGCTCGGACACCA-3'	5'-ACACACTTGGCGGTTCTC-3'
CCL8	5'-CTTCTTGCCTGCTGCTCATAG-3'	5'-CACTTCTGTGTGGGTCTACA-3'
CXCL9	5'-CTCCTTGCTTGCTTACCCTTT-3'	5'-CCAGCCTGTCTACTTTGAGAG-3'
CXCL10	5'-CCTCATCTGCTGGGTCTG-3'	5'-GTGGCAATGATCTCAACACG-3'
CXCL12	5'-ACGGAAGAACCAAGAGAAAGA-3'	5'-CTCAGACAGCGAGGCACAT-3'
GAPDH	5'-ACTCCACTCACGGCAAATTC-3'	5'-TCTCCATGGTGGTGAAGACA-3'

2 结果

2.1 小鼠挫伤骨骼肌形态学表现

骨骼肌组织 HE 染色后在 20 倍物镜下观察, 评估肌肉损伤后的形态变化。对照组小鼠骨骼肌细胞胞质被染成粉红色, 肌细胞核被染成蓝紫色, 呈卵圆形, 多个细胞核位于肌细胞边缘。腓肠肌挫伤后的第 12h 以及第 1 天, 可见大量坏死肌纤维, 肌纤维境界模糊, 大量多核炎性细胞浸润。在损伤后第 5 天, 出现少量肌细胞核位于细胞中央的新生肌细胞。在损伤后第 10 天, 细胞核位于中央的新生肌细胞增多, 炎性细胞大量减少。在损伤后第 15 天, 肌细胞

大都位于肌纤维的边缘, 肌细胞境界分明, 排列规则, 中央成核肌细胞几乎消失。见图 1。

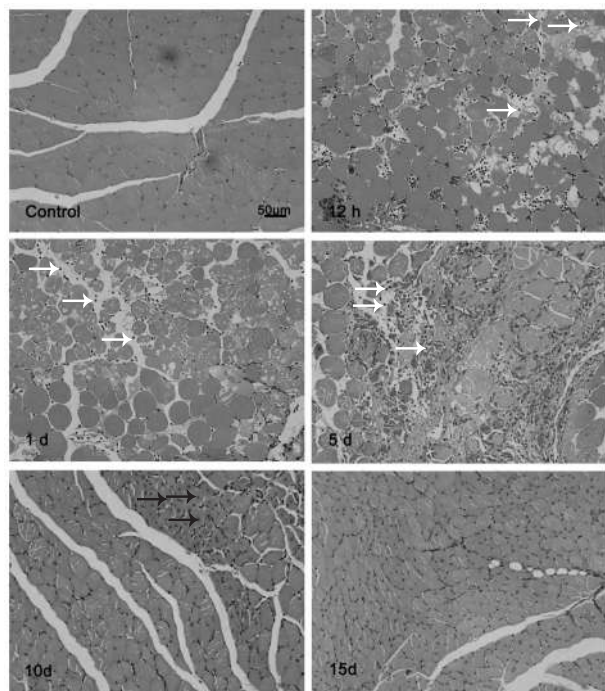
2.2 骨骼肌卫星细胞、巨噬细胞特异性标志物表达

MyoD 和 Myogenin mRNA 在骨骼肌损伤后的第 5 天显著增加 ($P < 0.01$)。M1 型巨噬细胞标志物 CD68 mRNA 在骨骼肌损伤的第 1 天显著增加 ($P < 0.01$)。M2 型巨噬细胞标志物 CD163 和 CD206 mRNA 在骨骼肌损伤后第 5 天显著增加 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 骨骼肌挫伤修复过程中肌再生调节因子表达

胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth fac-

图1 小鼠腓肠肌挫伤后形态学表现 (HE染色, ×200)



Control: 未损伤对照组; 12h、1d、5d、10d、15d 分别代表损伤后第 12h、第 1 天、第 5 天、第 10 天、第 15 天; 白色箭头代表炎性细胞, 黑色箭头代表再生肌纤维(中央成核肌纤维)

tors-1, IGF-1)mRNA 在骨骼肌损伤后第 5 天($P < 0.05$), 第 10 天显著增加($P < 0.01$)。而 IGF-1 异构体机械生长因子(mechano growth factor, MGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)以及促纤维化因子转化生长因子- $\beta 1$ (transforming

growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)mRNA 在骨骼肌损伤后第 5 天显著增加($P < 0.05$)。肌肉生长负调节因子肌肉生长抑制素(myostatin, 又称 GDF-8)mRNA 在骨骼肌损伤后未见显著改变。见表 3。

2.4 骨骼肌挫伤修复过程中炎性因子的表达

促炎因子白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)mRNA 在骨骼肌损伤后第 12h 表达显著增加($P < 0.05$)白细胞介素 6 在骨骼肌损伤后第 1 天仍显著增加($P < 0.05$)。抑炎因子白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)mRNA 表达量在伤后第 1 天、第 5 天、第 10 天均显著增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 4。

2.5 骨骼肌损伤修复过程中趋化因子的表达

我们检测了多种 CC 家族趋化因子, 其中 CCL2 (chemokine c-c motif ligand-2)mRNA 在骨骼肌损伤后第 12h 和第 1 天显著升高($P < 0.05$)。而趋化因子 CCL3、CCL5 与 CCL8 表达的变化却稍有不同, 它们在骨骼肌损伤后第 5 天均显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 5。

此外, 我们还检测了 CXC 家族趋化因子, 结果显示, CXCL9(chemokine c-x-c motif ligand-9)在骨骼肌损伤后未见显著变化, 而 CXCL10(chemokine c-x-c motif ligand-10)mRNA 在损伤后第 5 天显著上调($P < 0.05$), CXCL12(chemokine c-x-c motif ligand-12)mRNA 在伤后第 12h 显著增加($P < 0.01$)。见表 5。

表2 骨骼肌损伤后肌卫星细胞及巨噬细胞标志物 mRNA 相对表达变化

($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	MyoD	myogenin	CD68	CD163	CD206
对照组	1.00±0.47	1.00±0.57	1.00±0.78	1.00±0.23	1.00±0.22
损伤 12h 组	2.64±1.17	1.72±0.84	7.68±4.21	1.96±1.45	2.09±0.98
损伤 1d 组	2.71±0.81	3.3±3.01	21.36±10.96 ^②	1.77±0.86	3.04±1.35
损伤 5d 组	3.53±2.58 ^②	7.63±6.21 ^②	2.8±2.18	3.9±0.53 ^①	3.57±2.27 ^①
损伤 10d 组	2.51±2.06	2.56±2.09	3.15±1.73	2.73±1.14	2.68±0.6
损伤 15d 组	1.12±0.44	0.68±0.53	1.99±1.44	1.14±0.31	1.93±1.02

与对照组相比: ① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$

表3 骨骼肌损伤后肌再生调控因子 mRNA 相对表达变化

($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	IGF-1	MGF	HGF	GDF-8	TGF $\beta 1$
对照组	1.00±0.6	1.00±0.66	1.00±0.37	1.00±1.27	1.00±0.37
损伤 12h 组	1.28±0.45	1.53±0.79	1.78±0.92	0.51±0.19	1.25±0.68
损伤 1d 组	1.4±0.48	1.72±0.72	2.25±1.44	2.2±1.23	3.16±1.8
损伤 5d 组	4.02±3.04 ^①	3.34±1.53 ^①	25.39±14.49 ^①	2.18±1.92	3.66±2.65 ^①
损伤 10d 组	4.48±2.02 ^②	3.54±1.04	10.24±3.87	2.53±2.4	2.88±1.59
损伤 15d 组	1.3±0.55	1.02±0.54	3.14±2.77	1.5±0.94	1.77±1.34

与对照组相比: ① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$

表4 骨骼肌损伤后炎症因子mRNA相对表达变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	IL-1 β	IL-6	IL-10
对照组	1.00 $\pm$ 0.84	1.00 $\pm$ 0.41	1.00 $\pm$ 0.47
损伤12h组	11 $\pm$ 9.2 ^①	6.03 $\pm$ 5.08 ^①	4.39 $\pm$ 1.26
损伤1d组	7.07 $\pm$ 3.03	5.86 $\pm$ 1.67 ^①	5.74 $\pm$ 1.83 ^①
损伤5d组	3.03 $\pm$ 1.18	2.79 $\pm$ 2.46	7.09 $\pm$ 3.8 ^①
损伤10d组	3.49 $\pm$ 1.17	4.23 $\pm$ 1.51	12.08 $\pm$ 4.93 ^②
损伤15d组	0.77 $\pm$ 0.48	2.49 $\pm$ 1.2	3.67 $\pm$ 2.96

与对照组相比:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$

表5 骨骼肌损伤后趋化因子mRNA相对表达变化

($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	CCL2	CCL3	CCL5	CCL8	CXCL9	CXCL10	CXCL12
对照组	1 $\pm$ 0.62	1 $\pm$ 0.67	1 $\pm$ 0.52	1 $\pm$ 1.16	1 $\pm$ 0.6	1 $\pm$ 1.51	1 $\pm$ 0.26
损伤12h组	28.73 $\pm$ 9.81 ^①	2.05 $\pm$ 1.65	1.71 $\pm$ 1.15	4.84 $\pm$ 4.2	1.62 $\pm$ 1.57	2.42 $\pm$ 2	6.89 $\pm$ 4.77 ^②
损伤1d组	29.24 $\pm$ 17.24 ^①	5.23 $\pm$ 2.07	2.77 $\pm$ 2.44	8.34 $\pm$ 4.5	1.1 $\pm$ 0.79	3.02 $\pm$ 2.67	2.83 $\pm$ 3.43
损伤5d组	6.27 $\pm$ 4.05	16.44 $\pm$ 12.59 ^①	6.26 $\pm$ 4.65 ^①	43.27 $\pm$ 29.15 ^②	4.32 $\pm$ 3.48	3.86 $\pm$ 3.57 ^①	2.66 $\pm$ 2.12
损伤10d组	3.15 $\pm$ 2.65	4.67 $\pm$ 1.32	5.96 $\pm$ 4.03	19.03 $\pm$ 6.98	2.92 $\pm$ 2.07	1.66 $\pm$ 0.60	1.46 $\pm$ 0.64
损伤15d组	0.92 $\pm$ 0.48	4.19 $\pm$ 1.61	2.05 $\pm$ 1.63	9.35 $\pm$ 6.01	1.98 $\pm$ 1.8	0.81 $\pm$ 0.7	0.33 $\pm$ 0.23

与对照组相比:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$

再生相关^[8]。本研究中,M1型巨噬细胞(CD68)在骨骼肌损伤后第1天迅速增加并达到最高峰,然后开始下降;M2型巨噬细胞(CD163、CD206)在伤后第5天达到峰值。这与Novak ML等^[15]的研究相似,他们用小鼠腓肠肌制作了跌打损伤模型,发现M1型巨噬细胞与M2型巨噬细胞都是在损伤后1—3天高度表达。

此外,本研究发现促炎因子IL-1 β 在损伤后12h达到峰值,IL-6在损伤后第1天显著增加,随后下降;而抑炎因子IL-10在伤后持续上调,直到第10天达到峰值。表明骨骼肌挫伤后第1天处于高炎症反应状态,伤后第1天是炎症反应的最高峰,其后炎症得以缓解。IL-10持续性高表达可能与挫伤骨骼肌中M1型巨噬细胞向M2型转变有关。研究表明,IL-10可激活M2型巨噬细胞,并在M1型巨噬细胞向M2型巨噬细胞转变中发挥了关键性作用^[16]。

3.2 CC和CXC家族趋化因子可能参与了挫伤骨骼肌中免疫细胞的趋化

CC家族趋化因子及其受体参与单核细胞、巨噬细胞以及淋巴细胞的激活与迁移,而CXC家族趋化因子则有趋化中性粒细胞特异性^[17-18]。CC趋化因子具有促进免疫细胞向损伤部位浸润的效应,若阻断损伤骨骼肌中CCL2/CCR2信号通路可严重影响损伤骨骼肌再生^[8,19]。除促进趋化效应外,CC趋化

3 讨论

3.1 挫伤骨骼肌炎症反应特征

本实验采用重物击打小鼠腓肠肌来构建骨骼肌钝挫伤模型。HE染色结果表明骨骼肌挫伤模型成功建立。大量研究表明,骨骼肌损伤修复过程中炎症因子发挥重要作用。M1型巨噬细胞可分泌多种促炎因子,加剧炎症反应;而M2型巨噬细胞可减弱炎症反应并分泌多种肌再生调节因子,与肌纤维的

因子还参与了成肌细胞的增殖^[20]。骨骼肌损伤后,参与修复再生的免疫细胞主要有嗜中性粒细胞和巨噬细胞^[20],因此本研究中我们着重对可能参与该类免疫细胞趋化的CC和CXC家族趋化因子进行了研究。结果表明,骨骼肌损伤后的第12h,CCL2 mRNA表达显著增强,并持续到损伤后第1天,其他CC趋化因子(CCL3、CCL5、CCL8)也呈相似变化,伤后第12h一直持续到损伤后的第5天都显著上调表达,该变化趋势与其他人的研究相似^[21-22]。这些研究提示CC趋化因子可能参与了损伤骨骼肌中炎症细胞的趋化。

此外,我们对多种参与损伤骨骼肌中免疫细胞趋化的CXC趋化因子(CXCL9、CXCL10、CXCL12)进行了检测^[17,23]。结果表明,CXCL9在骨骼肌损伤后无显著性变化。而CXCL10 mRNA在伤后第5天达到峰值。CXCL12 mRNA在损伤后第12h即刻达到峰值。因CXC趋化因子具有趋化中性粒细胞的特性^[17-18],推测伤后CXCL10、CXCL12显著上调可能参与了对中性粒细胞的趋化,从而参与伤后的炎症反应。

3.3 肌再生因子可能参与了损伤骨骼肌修复过程的调控

骨骼肌挫伤后可进行自我修复,一旦骨骼肌损伤,静息状态下的肌卫星细胞即被激活,经过增殖、

分化,最终形成新的肌管或者修复受损肌纤维^[24-25]。MyoD与Myogenin分别是肌卫星细胞增殖和分化标志物^[13,26],MyoD在骨骼肌钝挫伤后第1天表达量显著增加,直到第5天达到峰值,Myogenin也在伤后第5天表达量显著增加,这一变化规律与其他骨骼肌损伤模型变化规律相似^[17]。提示MyoD可能参与了挫伤骨骼肌中肌卫星细胞的激活,而Myogenin则可能参与肌卫星细胞的分化。

骨骼肌再生过程中,IGF-1可介导生长激素的功能,可促进成肌细胞增殖,促进蛋白质合成并增加骨骼肌质量^[27],IGF-1的异构体MGF则可能参与损伤骨骼肌中肌卫星细胞的激活^[28],即IGF和MGF等肌再生因子在骨骼肌再生中具有重要作用。本研究中,骨骼肌钝挫伤后第10天IGF-1mRNA表达量达到峰值。这一结果与Xiaoguang Liu等人的研究相似^[29],他们发现骨骼肌损伤后第3天、第5天、第7天可见IGF-1显著上调。此外,骨骼肌损伤后,IGF-1的异构体MGF在伤后第5天显著上调。这与Weihua Xiao等人的研究相似^[30],他们发现骨骼肌损伤后第3天仍可见MGF的显著上调,并推测其与肌卫星细胞的激活有关^[43]。此外,本研究中,HGF在伤后第5天达到峰值,这一变化趋势与其他骨骼肌损伤模型变化趋势相同^[17]。我们推测HGF在骨骼肌挫伤修复过程中可能参与了肌卫星细胞的激活,从而发挥重要作用。因为前期有研究表明,非损伤肌肉外源性注射HGF可激活静息态卫星细胞,将HGF注射到损伤肌肉中可促进肌细胞增殖,HGF被认为是激活静息态卫星细胞的唯一因子^[31]。这些结果表明,上述正向肌再生因子在挫伤骨骼肌修复过程中可能发挥了重要作用。

我们还研究了骨骼肌负向调控因子GDF-8和TGF- β 1。GDF-8和TGF- β 1都是TGF- β 超家族的一员,GDF-8主要在骨骼肌中表达,对其功能的研究表明,GDF-8对骨骼肌质量起负调节作用^[32],敲除或者抑制GDF-8可促进损伤后骨骼肌再生^[33]。本实验发现,在损伤后再生阶段的第1天到第10天,GDF-8 mRNA表达呈上升趋势,但无显著性变化。损伤后第15天与对照组相比,呈下降趋势。GDF-8未显著性上调可能有助于挫伤骨骼肌蛋白合成,从而有助于修复再生。TGF- β 1与多种组织纤维化密切相

关^[34-35]。同时,损伤骨骼肌出现的瘢痕组织也与TGF- β 1高表达相关^[36]。本研究中,骨骼肌挫伤后第5天,TGF- β 1 mRNA表达显著增强,提示TGF- β 1可能参与了挫伤骨骼肌的纤维化修复。本研究只从基因水平对损伤骨骼肌中相关因子进行了检测,若能增加蛋白水平的检测,其结论会更有说服力,这有待下一步深入研究。

4 结论

趋化因子和炎性因子可能参与了挫伤骨骼肌早期炎症反应,而多种肌再生正向调控因子如MyoD、Myogenin、IGF-1、MGF、HGF,可能参与了挫伤骨骼肌修复再生。

参考文献

- [1] Lu H, Huang D, Saederup N, et al. Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury[J]. FASEB J, 2011, 25(1):358—369.
- [2] Lesault PF, Theret M, Magnan M, et al. Macrophages improve survival, proliferation and migration of engrafted myogenic precursor cells into MDX skeletal muscle[J]. PLoS One, 2012, 7(10):e46698.
- [3] Powers SK, Smuder AJ, Criswell DS. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(9):2519—2528.
- [4] McCracken JM, Chalise P, Briley SM, et al. C57BL/6 substrains exhibit different responses to acute carbon tetrachloride exposure: implications for work involving transgenic mice[J]. Gene Expr, 2017, 17(3):187—205.
- [5] Wu X, Walters TJ, Rathbone CR. Skeletal muscle satellite cell activation following cutaneous burn in rats[J]. Burns, 2013, 39(4):736—744.
- [6] Tidball JG. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration[J]. Compr Physiol, 2011, 1(4):2029—2062.
- [7] Xiao W, Liu Y, Luo B, et al. Time-dependent gene expression analysis after mouse skeletal muscle contusion [J]. J Sport Health Sci, 2016, 5(1): 101—8.
- [8] Tidball JG, Vialta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010, 298(5): R1173—1187.
- [9] Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, et al. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contu-

- sion model[J]. *Int J Sports Med*, 2004, 25(8):582—587.
- [10] Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyi G, et al. Development of approaches to improve the healing following muscle contusion[J]. *Cell Transplant*, 1998, 7(6):585—598.
- [11] Xiao W, Chen P, Liu X, et al. The impaired function of macrophages induced by strenuous exercise could not be ameliorated by BCAA supplementation[J]. *Nutrients*, 2015, 7(10):8645—8656.
- [12] Xiao W, Chen P, Dong J, et al. Dietary glutamine supplementation partly reverses impaired macrophage function resulting from overload training in rats[J]. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2015, 25(2):179—187.
- [13] Xiao W, Chen P, Dong J. Effects of overtraining on skeletal muscle growth and gene expression[J]. *Int J Sports Med*, 2012, 33(10):846—853.
- [14] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402—408.
- [15] Novak ML, Weinheimer-Haus EM, Koh TJ. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury[J]. *J Pathol*, 2014, 232(3):344—355.
- [16] Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, et al. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration[J]. *J Immunol*, 2012, 189(7):3669—3680.
- [17] 肖卫华, 陈佩杰, 刘宇. 巨噬细胞在骨骼肌急性损伤修复中的作用研究进展 [J]. *中国运动医学杂志*, 2014, 33(3):269—274.
- [18] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity[J]. *Immunity*, 2000, 12(2):121—127.
- [19] Martinez CO, McHale MJ, Wells JT, et al. Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 299(3):R832—842.
- [20] Yahiaoui L, Gvozdic D, Danialou G, et al. CC family chemokines directly regulate myoblast responses to skeletal muscle injury[J]. *J Physiol*, 2008, 586(16):3991—4004.
- [21] Warren GL, Hulderman T, Mishra D, et al. Chemokine receptor CCR2 involvement in skeletal muscle regeneration [J]. *FASEB J*, 2005, 19(3):413—415.
- [22] Warren GL, O'Farrell L, Summan M, et al. Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(5):C1031—1036.
- [23] Koh TJ, Pizzi FX. Do inflammatory cells influence skeletal muscle hypertrophy?[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2009, 1:60—71.
- [24] Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells[J]. *Dev Biol*, 1997, 191(2):270—283.
- [25] Tierney MT, Sacco A. Satellite Cell Heterogeneity in skeletal muscle homeostasis[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(6):434—444.
- [26] Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration[J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(1):209—238.
- [27] Li ZB, Kollias HD, Wagner KR. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(28):19371—19378.
- [28] Hill M, Wernig A, Goldspink G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair[J]. *J Anat*, 2003, 203(1):89—99.
- [29] Liu X, Liu Y, Zhao L, et al. Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: The roles of regulatory factors for muscle regeneration[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(3):228—238.
- [30] Xiao W, Liu Y, Luo B, et al. Time-dependent gene expression analysis after mouse skeletal muscle contusion [J]. *J Sport Health Sci*, 2016, 5(1):101—108.
- [31] Grasman JM, Do DM, Page RL, et al. Rapid release of growth factors regenerates force output in volumetric muscle loss injuries[J]. *Biomaterials*, 2015, 72:49—60.
- [32] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member[J]. *Nature*, 1997, 387(6628):83—90.
- [33] Argilés JM, Orpí M, Busquets S, et al. Myostatin: more than just a regulator of muscle mass[J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(13—14):702—709.
- [34] Kirk S, Oldham J, Kambadur R, et al. Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration [J]. *J Cell Physiol*, 2000, 184(3):356—63.
- [35] Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, et al. The role of TGF-β1 during skeletal muscle regeneration[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(7):706—715.
- [36] Xiao W, Liu Y, Chen P. Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: the roles of pro-fibrotic factors, inflammation, and oxidative stress[J]. *Inflammation*, 2016, 39(6):2016—2028.