



成肌调节因子MyoD与myogenin在肌肉损伤修复过程的动态变化

成肌调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs)是一组转录因子,主要包括4个成员: MyoD、Myf5、myogenin与MRF4。在胚胎发育过程中的肌肉发生中它们起着重要的调节作用。其中MyoD与Myf5主要在干细胞分化为成肌细胞过程中起作用,而myogenin与MRF4主要在成肌细胞分化为成熟肌纤维过程中起作用,在这两个阶段中MyoD与myogenin又分别起着主导作用。本研究主要探讨在肌肉损伤后的再生修复过程中,二者的表达规律及能否作为反映肌肉再生的指标。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物分组 将36只体质量为200~250 g Wistar大鼠,(中山大学实验动物中心)分为2组,每组18只。I组动物的一侧下肢为实验肢(局部注射盐酸布比卡因),另一侧下肢局部注射生理盐水作为对照;II组动物的一侧下肢为空白对照肢(不做任何处理),另一侧下肢为假注射肢(只切开皮肤,不注射任何液体)。每个时间点每组用2只Wistar大鼠。以Wistar胚胎鼠的骨骼肌组织作为阳性对照。

1.1.2 主要试剂 盐酸布比卡因(bupivacain, Sigma公司),兔抗鼠多克隆抗体MyoD(M-318 Santa Cruz Biotechnology公司),兔抗鼠多克隆抗体myogenin(M-225,购自Santa Cruz Biotechnology公司),SABC试剂盒与DAB显色试剂盒(Boster公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 肌肉损伤模型的制作[1][2]用乙醚麻醉Wistar大鼠,暴露一侧下肢腓肠肌,局部注射0.5% bupivacain 0.5 ml,对侧下肢腓肠肌局部注射生理盐水0.5 ml作为对照。

1.2.2 肌组织冰冻切片的制备 在肌肉损伤后12、18、24、48、72 h和4、5、7、14 d分别取双侧腓肠肌,放入液氮预冷后的异戊烷中冷冻数分钟,-20℃恒冷冰冻切片中切成7~9mm厚的横切片,室温下放置数分钟,冷丙酮固定10 min,干燥后即做HE染色、免疫组化或-70℃冰箱密封保存备用。

1.2.3 肌组织HE染色 将冰冻切片在苏木素中染色20 s,自来水冲洗;1%稀盐酸酒精分化数秒,自来水冲洗;淡氨水返蓝数秒,蒸馏水冲洗;伊红染色20 s,蒸馏水冲洗;常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并照相。

1.2.4 肌组织免疫组化染色 将冰冻切片用新鲜配制的3%过氧化氢-甲醇阻断内源性过氧化物酶30 min,0.01 mol/L PBS冲洗2 min×3次;滴加非免疫性血清置湿盒内室温孵育20 min;甩去多余液体,滴加适当稀释度的一抗(MyoD与Myogenin均为1:400稀释),置湿盒内37℃孵育1 h或4℃过夜,0.01 mol/L PBS冲洗2 min×3次;滴加亲生物素标记的二抗,置湿盒内37℃孵育20 min,0.01 mol/L PBS冲洗2 min×3次;再滴加链霉亲和素-过氧化物酶复合物置湿盒内37℃孵育20 min,0.01 mol/L PBS冲洗5 min×4次;然后滴加新鲜配制的DAB显色剂显色,显微镜下观察,当细胞核出现阳性颗粒时,及时水洗终止染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并照相。

1.2.5 实验结果的记录方法 每张冰冻切片随机选择3个视野，计算每个视野中阳性核数目与对照侧所有肌核数目之比(由于肌肉损伤早期大量炎性细胞浸润，所以选用对照侧所有肌核数目作为分母便于比较)。用均数表示。

2 结果

2.1 注射盐酸布比卡因后Wistar大鼠的行为改变

当把盐酸布比卡因局部注射于Wistar大鼠的腓肠肌后，该侧腓肠肌立即变得松软，足背屈，爬行时明显呈拖步状态，这种拖步表现在12 h后仍可见到，18 h后仅见爬行缓慢，24 h后趋于正常。

2.2 注射盐酸布比卡因后MyoD与myogenin的动态变化

HE染色显示，注射盐酸布比卡因12 h后已有嗜酸性的巨噬细胞迁移到坏死的肌纤维处，但此时未见成肌调节因子MyoD与myogenin的表达。在注射后18 h MyoD开始在坏死肌纤维周边表达，这时仍未见myogenin表达。第24 h坏死肌纤维及细胞外间隙被大量的单核细胞浸润，myogenin开始表达，MyoD的表达也增多。注射后48 h开始出现成簇排列的细胞，MyoD的表达达到高峰(图1)，myogenin的表达也增多。72 h后开始出现肌管样具中央核的再生肌纤维，myogenin的表达达到高峰(图2)，而MyoD的表达下降。注射后4 d Myogenin的表达减少，MyoD的表达继续下降。注射后5~7 d大部分坏死肌纤维都被再生肌纤维所取代，MyoD与myogenin的表达继续减少。14 d后肌纤维大小与对照侧基本相同，但仍有核中移，此时仍可检测到MyoD与myogenin的表达。盐水注射对照侧以及空白对照肢、假注射肢无肌纤维变性坏死和炎性细胞浸润，也未检测到MyoD与myogenin的表达。MyoD与myogenin在各时间点的表达情况见图3。

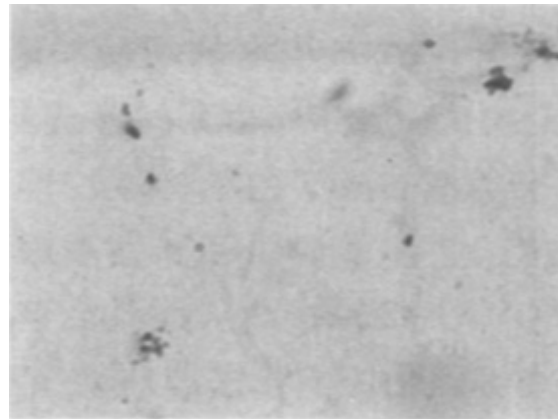


图1 盐酸布比卡因注射后48 h MyoD 的表达
(原放大倍数: ×400)

Fig.1 MyoD expression 48 h after bupivacain hydrochloride injection
(Original magnification: ×400)

MyoD-positive nuclei were present in activated satellite cells. The positive nuclei were brown with DAB staining, and the cytoplasm was not stained.

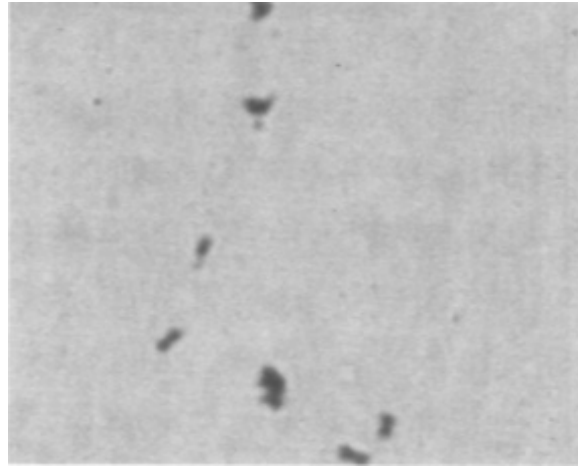


图2 盐酸布比卡因注射后72 h myogenin的表达 (原放大倍数: ×400)

Fig.2 Myogenin expression 72 h after bupivacain hydrochloride injection (Original magnification: ×400)

Myogenin-positive nuclei were present in newly formed myotube. The positive nuclei were brown with DAB staining, and the cytoplasm was not stained.

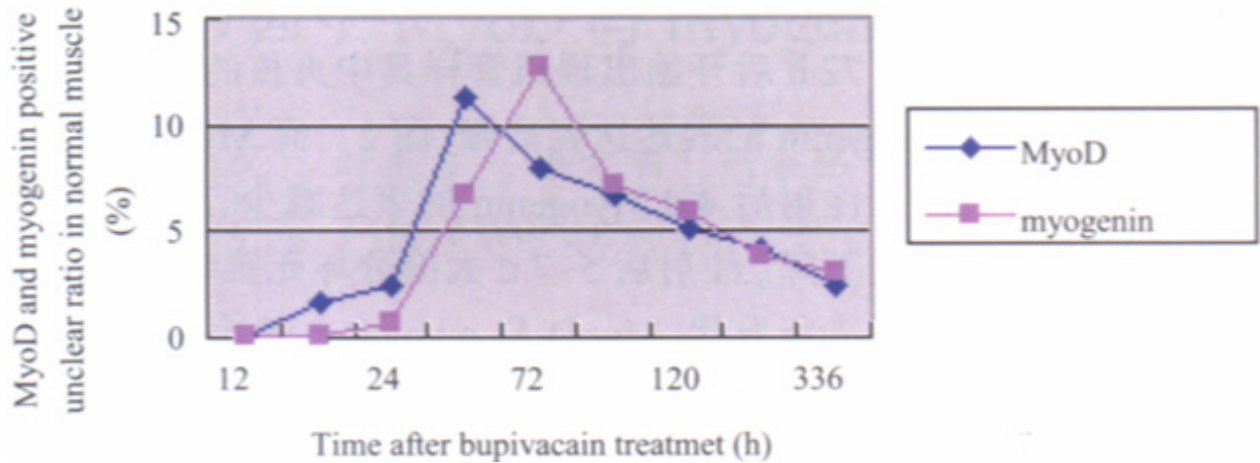


图3 盐酸布比卡因注射后各时间点MyoD与myogenin阳性核的比例

Fig.3 Ratio of MyoD- and myogenin-positive nuclei at different time points after bupivacain hydrochloride injection

3 讨论

Bupivacain是一种局部麻醉药,临床上主要用于局部浸润麻醉、神经阻滞、硬膜外阻滞和蛛网膜下腔阻滞。动物实验表明它是一种肌肉毒性药物,局部应用可造成肌肉变性坏死。而且盐酸布比卡因选择性地损伤肌膜,而不损伤基底膜、卫星细胞、血管和周围神经,是一种公认的用于制作肌肉损伤模型的肌毒性药物[1][2]。我们用它制作肌肉损伤模型来详细研究成肌调节因子在肌肉再生过程各个时段的动态表达。

转录因子对组织特异性基因的表达起着重要的调控作用[3],肌细胞的分化受多种因子调控,其中MRFS起着核心作用。MRFS只分布于骨骼肌以及骨骼肌源性的肿瘤,其中myogenin与MyoD目前被认为是诊断小儿横纹肌肉瘤的最佳免疫组化标记物[4]。MRFS编码的蛋白具有基本的螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, bHLH)结构,相互间形成异源二聚体。它们都有一个类似c-myc的结构域,即E盒(CANNTG),能与位于很多骨骼肌特异性基因启动子上的某一特定的DNA序列结合,从而激活这些骨骼肌特异性基因使之编码相应的骨骼肌收缩蛋白[5][6][7]。而作为MADS(MCM1, agamous, deficiens, serum response factor)转录因子家族成员的

MEF2又处于承接二者的重要地位。MEF2基因的5'非翻译区存在bHLH家族MRFS的DNA结合序列E盒，而MEF2又可结合于MRFS基因启动子区内的MEF2序列，二者相互作用构成循环。由于在肌肉发生中，MEF2的表达在时间上滞后于MRFS，因此认为MRFS启动MEF2表达，而MEF2的作用是放大和维持MRFS的表达水平[8]。而MRFS的4个成员在肌肉发生过程的表达也具有一定的时间和空间规律。成体骨骼肌的卫星细胞是一类多潜能干细胞[9]，位于骨骼肌的基底膜下，与肌纤维并列。在一般情况下卫星细胞处于静息状态，不表达MRFS。当疾病或损伤累及肌肉时，卫星细胞被激活并表达MRFS，重新进入细胞循环，卫星细胞的子细胞就是肌源性前体细胞。我们的实验表明，在Bupivacain诱导的肌肉损伤修复过程中，MyoD的表达先于Myogenin，约早6 h左右。在肌肉损伤后18 h就可检测到MyoD的表达，48 h后达高峰，这段时间正是卫星细胞被激活增殖的时期。Myogenin的表达在肌肉损伤后24 h可以检测到，72 h达高峰，此时可观察到新生肌管的形成。随着受损肌肉的逐步修复，MyoD与Myogenin的表达随之减少，到肌肉损伤后14 d，只能检测到少量MyoD与myogenin的表达。我们研究的结果与文献报道[10]相似，所不同的是后者是以比目鱼肌作为研究对象，而我们是以前腓肠肌外侧头作为研究对象。这是为了使肌肉损伤的方式仅限于盐酸布比卡因局部注射，而不夹杂着肌肉受牵扯或钝性分离肌肉所造成的损伤，我们认为这样的实验结果更具有可比性。有研究表明MyoD与myogenin的表达随肌肉损伤的方式以及受损伤的肌肉不同而有所不同[11][12][13]。我们的研究结果同时也表明MyoD与myogenin在肌肉再生过程的表达与它们在肌肉发生过程的表达相似：MyoD先表达，它决定着干细胞向肌细胞方向定向分化；myogenin则在肌管形成和肌纤维成熟方面起作用。

总之，我们的研究结果证实局麻药的是一种肌毒性药物，临床上做肌肉活检时要注意局麻药只能注射于皮肤及皮下组织，千万不能注射到肌肉，否则会影响病理结果的可信度。成肌调节因子可以作为鉴定肌肉前体细胞和反映肌肉再生的指标。

(责任编辑：吴锦雅)

参考文献：

- [1] Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, et al. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine)[J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 60(2): 167-74.
- [2] Akiyama C, Kobayashi S, Nonaka I. Comparison of behavior in muscle fiber regeneration after bupivacaine hydrochloride- and acid anhydride-induced myonecrosis[J]. *Acta Neuropathol*, 1992, 83(5): 584-9.
- [3] 庞建新, 程希远, 吴曙光. 转录因子Sp1和Sp3对Jurkat T细胞端粒酶活性的调节作用[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(6): 481-5.
- [4] Pang JX, Cheng XY, Wu SG, et al. Regulation of telomerase activity in Jurkat T cells by transcription factors Sp1 and Sp3[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(6): 481-5.
- [5] 奚政君, 张忠德, 祝明洁, 等. 32例小儿横纹肌肉瘤生肌因子的表达[J]. *上海第二医科大学学报*, 2002, 22(3): 263-5.
- [6] Xi ZJ, Zhang ZD, Zhu MJ, et al. Expression and significance of myogenic factors in 32 children with rhabdomyosarcoma[J]. *Acta Univ Med Sec Shanghai*, 2002, 22(3): 263-5.
- [7] Weintraub H, Davis R, Tapscott S, et al. The MyoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage[J]. *Science*, 1991, 251(4995): 761-6.
- [8] Sassoon DA. Myogenic regulatory factors: Dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis[J]. *Dev Biol*, 1993, 156(1): 1123.
- [9] Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis[J]. *Clin Genet*, 2000, 57(1): 16-25.
- [10] Molkenkin J D, Olson E N. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9366-73.

[9] 魏宽海, 金丹, 裴国献. 逆转录病毒介导人重组骨形态发生蛋白基因转染骨骼肌卫星细胞mRNA的表达[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(4): 312-5.

Wei KH, Jing D, Pei GX. mRNA expression of recombinant human bone morphogenetic protein 7 in skeletal muscle satellite cells with retroviral vector-mediated rhBMP7 gene transfection[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(4): 312-5.

[10] Jin Y, Murakami N, Saito Y, et al. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, mdx and dy, during regeneration[J]. Acta Neuropathol, 2000, 99(6): 619-27.

[11] Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, et al. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes[J]. Cell Tissue Res, 1992, 267(1): 99-104.

[12] Koishi K, Zhang M, McLennan IS, et al. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers[J]. Dev Dyn, 1995, 202(2): 244-54.

[13] Kami K, Noguchi K, Senba E. Localization of myogenin, c-fos, c-jun, and muscle-specific gene mRNAs in regenerating rat skeletal muscle[J]. Cell Tissue Res, 1995, 280(1): 11-9.

参考文献:

[1] Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, et al. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine)[J]. Acta Neuropathol (Berl), 1983, 60(2): 167-74.

[2] Akiyama C, Kobayashi S, Nonaka I. Comparison of behavior in muscle fiber regeneration after bupivacaine hydrochloride- and acid anhydride-induced myonecrosis[J]. Acta Neuropathol, 1992, 83(5): 584-9.

[3] 庞建新, 程希远, 吴曙光. 转录因子Sp1和Sp3对Jurkat T细胞端粒酶活性的调节作用[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 481-5.

Pang JX, Cheng XY, Wu SG, et al. Regulation of telomerase activity in Jurkat T cells by transcription factors Sp1 and Sp3[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 481-5.

[4] 奚政君, 张忠德, 祝明洁, 等. 32例小儿横纹肌肉瘤生肌因子的表达[J]. 上海第二医科大学学报, 2002, 22(3): 263-5.

Xi ZJ, Zhang ZD, Zhu MJ, et al. Expression and significance of myogenic factors in 32 children with rhabdomyosarcoma[J]. Acta Univ Med Sec Shanghai, 2002, 22(3): 263-5.

[5] Weintraub H, Davis R, Tapscott S, et al. The MyoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage[J]. Science, 1991, 251(4995): 761-6.

[6] Sassoon DA. Myogenic regulatory factors: Dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis[J]. Dev Biol, 1993, 156(1): 1123.

[7] Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis[J]. Clin Genet, 2000, 57(1): 16-25.

[8] Molkenkin J D, Olson E N. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18): 9366-73.

[9] 魏宽海, 金丹, 裴国献. 逆转录病毒介导人重组骨形态发生蛋白基因转染骨骼肌卫星细胞mRNA的表达[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(4): 312-5.

Wei KH, Jing D, Pei GX. mRNA expression of recombinant human bone morphogenetic protein 7 in skeletal muscle satellite cells with retroviral vector-mediated rhBMP7 gene transfection[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(4): 312-5.

[10] Jin Y, Murakami N, Saito Y, et al. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, mdx and dy, during regeneration[J]. Acta Neuropathol, 2000, 99(6): 619-27.

[11] Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, et al. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes[J]. Cell Tissue Res, 1992, 267(1): 99-104.

[12] Koishi K, Zhang M, McLennan IS, et al. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers[J]. Dev Dyn, 1995, 202(2): 244-54.

[13] Kami K, Noguchi K, Senba E. Localization of myogenin, c-fos, c-jun, and muscle-specific gene mRNAs in regenerating rat skeletal muscle[J]. Cell Tissue Res, 1995, 280(1): 11-9.

[回结果列表](#)