

肌卫星细胞激活和补给的分子调控与肌肉疾病*

潘玲梅 王 恬 石放雄**

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要 肌卫星细胞 (muscle satellite cell, SC) 作为生肌干细胞, 参与司控生后骨骼肌的生长、修复和维持等重要过程. 综述了 NO-HGF, Myostatin, Notch 等重要信号分子及卫星细胞自身的特殊微环境对 SC 激活和补给的分子调控机制, 希冀将来可以从这两方面入手克服目前临床中肌卫星细胞移植治疗各种骨骼肌疾病的瓶颈.

关键词 肌卫星细胞, 激活, 补给, 肌病

学科分类号 Q291

由肌纤维细胞骨架蛋白变异引起的肌肉广泛降解性疾病, 如肌肉萎缩症 (DMD 和 BMD), 是困扰目前人类的主要骨骼肌疾病. 其中 DMD 是 X 连锁的隐形致死性遗传性疾病, 发病概率男性为 1/3 500. 目前认为 DMD 无法进行肌肉修复的主要原因在于 SC 细胞库的耗竭. 运用肌干细胞治疗包括肌肉萎缩在内的肌病是一项非常具有潜力的方案, 包括细胞介导基因治疗. 虽然在实验动物模型中运用 SC 进行细胞治疗获得了一定效果, 但在临床运用中, 效果却不是十分理想. 目前的主要障碍来源于移植细胞的大量死亡和受体的免疫排斥作用. 然而在 2006 年, Hill 等^[1]通过移植含激活因子的 SC, 发现供体细胞可在受体中大量增殖, 明显增加受损区域的肌纤维数量. 从而提供了从 SC 激活和补给角度考虑细胞移植治疗肌病的崭新方案. 所以, 对 SC 激活和补给分子机制的了解成为促进骨骼肌的健康生长、疾病治疗和衰老修复的关键所在.

1 肌卫星细胞的静息与激活

1961 年 Mauro 利用电子显微镜在青蛙胫前肌的肌膜和基膜之间首次发现了肌卫星细胞 (SC). 正常情况下, 成体肌肉的 SC 绝大多数处于一个活跃转录的抑制状态——静息态 (quiescent state). 静息态 SC 具有核小, 核质比高, 异染色质高 (相对于肌纤维细胞), 细胞器容物少等特点. 联合使用 SC

表面蛋白分子标记, 如 Pax7 与 C-met 或 Pax7 与 Myf5 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 可进行静息态 SC 的鉴定. 近来报道 SM/C-2.6 单抗和肌核转录因子 FoxK1 的 β 亚型可用于静息态 SC 的特异性鉴定, 其中 FoxK1 对于 SC 有着重要的意义^[2]. 受负重锻炼、创伤等刺激后, 静息态 SC 的胞质发生扩张, 体积增大, 高尔基体、内质网、核糖体和线粒体等细胞器变得清晰明显时, 表明 SC 开始进入激活态, 称为 SC 的激活. 可通过 C-met 及配体 HGF, C-jun, C-fos 等分子标记的表达进行 SC 激活的鉴定. SC 激活后进入分裂、增殖期产生肌前体细胞 (myogenic precursor cells, MPCs), 并进一步分化、融合形成肌管参与骨骼肌的修复. SC 的激活处于骨骼肌修复的核心环节.

2 肌卫星细胞激活的分子调控与肌病

虽然静息态 SC 的表面分子 Syndecan-3, Syndecan-4 及 CXCR4 均参与 SC 早期激活, 一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS), 肌肉生长

*国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2004CB117500) 和教育部留学归国人员科研启动基金资助.

** 通讯联系人. Tel/Fax: 025-84399112, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

收稿日期: 2006-05-09, 接受日期: 2006-06-14

抑素(myostatin), Notch 等信号分子, 以及 SC 的特殊微环境对于 SC 的激活起着更为重要的作用. 在体 SC 的激活是一个受多种信号调控的多步骤事件, 启动极为迅速, 最终以静息态 SC 接收激活信号, 进入细胞周期.

NO-HGF-C-met 通路是 SC 激活过程中最重要的信号通路. 因为一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是目前所知的唯一可激活静息 SC 的细胞因子. 近年研究发现 NO 不仅可能来源于肌纤维的 NOS- I μ (muscle specific nitric oxide synthase- I, NOS- I μ), 也可能源于 SC 自身. HGF 也称弥散因子 (scatter factor, SF), 是 SC 有力的促分裂剂和趋化剂. 目前认为骨骼肌受刺激后, 通过相应机制增加 NOS 的活性或数量, 合成和释放 NO, 成为 SC 激活的起始信号. 释放的 NO 一方面既可介导挫伤后 SC 激活过程中的细胞快速肥大和与周边纤维分离等形态变化过程. 同时也介导 HGF 及 C-met 在 SC 的共同定位作用^[3]. HGF 一方面与受体 C-met 结合, 引发有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 等有关基因转录和细胞分裂的多个信号途径, 使静息 SC 退出 G0 期进入 S 期, 开始增殖分裂, 这是以 Pax3 的高水平表达为标志. 另一方面 HGF 可能通过下调 Mstn 的表达, 正向调控 SC 的激活. 因为 HGF 和 Mstn 在正常肌肉修复进程中呈现相斥表达模式, 进一步实验也验证了 HGF 抑制 Mstn 表达的作用^[4]. Mstn 也称生长分化因子 8 (growth differentiation factor 8, GDF-8), 属于转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 超家族成员^[5]. 目前推测 Mstn 以自分泌的形式正向调控 p21, 抑制细胞周期素依赖性蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, Cdk) 的活性和水平, 以保持 SC 的静息态^[6]. 此外, Notch 信号通路不仅在 SC 的激活过程中有促进作用, 而且在此后引发的增殖过程中同样发挥着至关重要的作用 (图 1). 值得指出的是, 肌肉损伤后 24 h, Notch 配体(Delta) 的表达增加不局限于激活的 SC 中, 还包括损伤位点附近的未受损肌纤维^[7]. 这在一定意义上解释了 SC 的远端激活特性. 另外成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、胰岛素样生长因子 (insulin/insulin-like growth factor, IGF) 和 Wnt1 信号通路对于 SC 具有激活和征集作用, 尤其是 FGF2 可能也是 SC 激活的一个有力促进剂,

但确切的分子调控通路还有待探索.

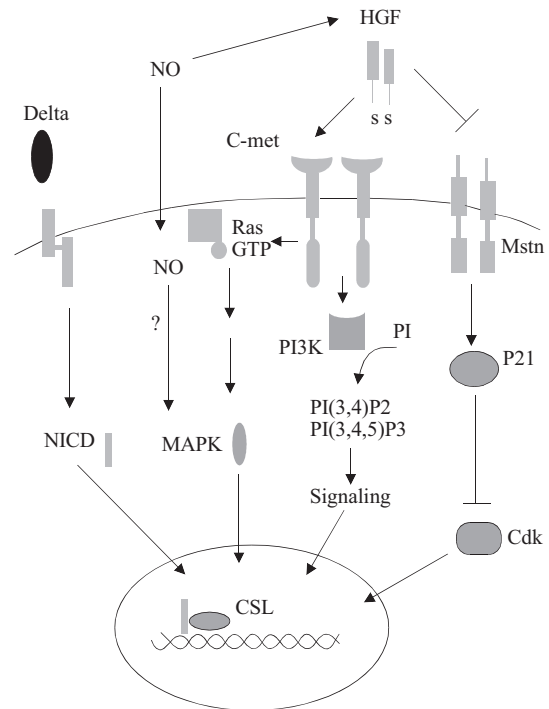


Fig. 1 Signaling pathways involved in SC activation] processes

图 1 SC 激活事件中的主要信号通路

HGF: 肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor); NO: 一氧化氮 (nitric oxide); MAPK: 有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase); Mstn: 肌肉生长抑制素 (myostatin); Cdk: 周期蛋白依赖性蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase); NICD: Notch 的细胞外构域 (intracellular domain of Notch); PI: 磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol).

SC 细胞内激活信号的早期应答可概括为转录和 / 或翻译的上调以及特异基因的替换剪切, 肌肉特异性黏附分子 (M-cadherin, M-cad) mRNA SC 开始出现于 SC 进入细胞周期的 6 h 和 24 h, 发生 CD34 截短体到全长体的过渡, MNF β 亚型向 α 亚型的转换. SC 与相邻肌纤维、运动神经元、间质细胞、各种细胞外基质等组成的 SC 生存微环境 (niche) 是另一个不可忽视的影响 SC 激活的重要因素. 因为 SC 环境的任何改变均可引起不同程度的激活. 而 SC 的肌纤维基膜下的定位也提示了肌纤维和 SC 间的相互关系对于维持 SC 静息态有重要作用. 微环境对 SC 激活的作用可能体现在衰老对 SC 激活能力的削弱方面. Conboy 等^[8]发现, 当老年组增加青年小鼠血清中的正向调控因子后, 老年组的 SC 可以恢复肌肉修复能力. 表明了衰老引起的

组织再生能力下降可能是由于 SC 位置的修饰变化所引起的。

由于肌干细胞移植治疗肌病的供体细胞存在有效迁移和有效存活等问题, 目前人们开始把研究方向定位于有关 SC 激活的细胞表面分子和趋化因子方面。例如 Hill 等^[1]在移植 SC 时, 同时移植了 HGF 和 FGF2 等 SC 的激活细胞因子, 取得了令人振奋的结果。有关人的肌肉萎缩的研究显示, Mstn 的表达异常增加, 导致 SC 的激活发生抑制。Mdx 小鼠由于缺失抗肌萎缩蛋白复合体 (DGP), 引发肌肉的周期性降解, 是目前研究 DMD 的有效模型。Seumas 等发现 Mstn^{-/-}小鼠在肌肉修复过程中, 核心蛋白聚糖 (decorin) mRNA 表达的量比对照组高, 同时可以减少纤维症的发生, 比野生型有更好治疗效果^[2]。在 Mdx 小鼠中通过中和 Mstn, 可提高 Mdx 小鼠的肌肉再生修复能力。基于上述实验, 同时考虑到 HGF 对 SC 有趋化作用, 解除 Mstn 对 SC 激活负向调控, 可促进 SC/ 成肌细胞向损伤位点的迁移。因此, 拮抗 Mstn 将可能成为一种治疗肌肉降解和再生过程紊乱的重要药剂。如果可以在临床中运用免疫 Mstn 进行肌病的治疗, 这将是一件十分有益社会的事情。Mdx 小鼠出生 6~12 周后, 受损组织可以得到有效再生, 因而不像 DMD。因为肌肉组织的继续受损, 引起 SC 的耗竭, 引发心肺功能的失调, 最后导致死亡。Turk 等^[3]发现 Mdx 小鼠在 8 周时, Notch-Delta 信号通路的功能基因的表达水平相对于对照组明显上调。在 Mdx 小鼠中, Dll3 和 Numb 替换着表达, 而在对照组中, 未检测到这两个基因的表达。值得指出的是, 6~12 周是 Mdx 小鼠肌肉的修复阶段, 此后就进入了稳定期。Mdx 小鼠由于 nNOS 的脱离质膜, 使得结构不稳定而被快速降解, 引起数量的显著减少。所以在 Mdx 小鼠, SC 激活表现得较为迟缓, 但肌肉再生却极为迅速, 而且出现 SC 增生和 NOS- I μ 表达等现象, 实验结果提示了 NOS- I μ 的缺失导致 SC 向另一条更适于激活的途径发展, 虽然这条途径在激活时需要更长的时间, 但可以通过修复过程得到相应的补充。这条途径是否与肌肉修复有关尚待研究。目前研究表明, 或许只有在 NOS- I μ 完全去除的情况下, SC 才利用另一条激活途径。此外, Conboy 等^[4]证实 Notch 信号参与衰老引起的肌肉再生能力下降, 通过强制激活 Notch 可改善老年组肌肉的再生能力。提示了将来或许可通过加强 Notch 信号通路, 治疗由于衰老引起的肌肉萎缩和 SC 修复能力下降

的相关性疾病。

3 肌卫星细胞补给的分子调控与肌病

成体肌肉组织历经多次损伤, 而 SC 数目持续恒定并保持再生修复能力等相关特性, 提示了 SC 存在自身补给的过程。根据目前对 SC 的认识, 人们提出了关于 SC 补给的不对称分裂模型、随机模型和其他驻留干细胞补充模型。

多数认为, SC 的补给源于 SC 的自我更新, 因为干细胞的特性之一就是具备自我更新能力。但到目前为止, 只有近期的一篇关于带有 SC 的单肌纤维小鼠移植实验, 第一次直接明确地提供了 SC 自我更新的证据^[5]。近来根据 Numb 在 SC 分裂中的不对称性分布提出了 SC 不对称分裂的自我更新模型。该模型认为, 获得 Numb 的子细胞, 可沿续生肌细胞的进程, 而 Numb 的非遗传子细胞则以新的 SC 形式返回到静息态。SC 的随机模型认为, SC 的自我更新是一个随机的事件, 在外部诱导因素下, 一群均一的增殖祖细胞群中的某些个体细胞随机脱离群体, 返回至静息态。SC 激活后, 虽然 MPCs 共表达 Myf5 和 MyoD, 但 MyoD^{-/-}的 MPCs 细胞增殖活性较高, 而分化活性却下降。因此 MPCs 和静息态的 SC 细胞间可能存在的一种中间态的推测在一定程度上支持了随机模型。另一种观点认为, SC 的补给是通过更原始的祖细胞进行代偿, 即 SC 其他驻留干细胞补充模型。这些祖细胞个体小而独特, 可驻留在次层阁室 (sublaminar compartment), 这些祖细胞可能源于具有生肌潜能的间质细胞, 也可能来自于 CD45 阳性驻留细胞, 也可能是来自进入骨骼肌的血源性祖细胞。需要指出的是, 上面所提及的 SC 补给的两种观点并不是相互排斥的, 存在两种补给方式共同发挥作用的可能性。但是这两种补给方式之间可能有一定的优先次序, 在正常条件下不对称 / 随机分裂处于主要地位, 而在特殊的情况下, 在前者不能满足机体对 SC 需求的时候, 就需要第二种方式的参与。有相关资料显示, 不对称分裂和随机分裂之间也可能存在一定的等级先后机制。

在 DMD 等肌肉退行性疾病中, 发生 SC 数量和增殖能力的显著下降, 被认为是 DMD 病人 SC 细胞库耗竭的主要原因, 而 SC 细胞库的耗竭又是 DMD 病人肌肉组织无法修复的主要根源。老年动物中, SC 的凋亡可能是 SC 的消耗主要原因, 进而削弱了 SC 对于损伤的再生修复能力。因此补给和

阻断 SC 的消耗是治疗肌病的另一个重要的立足点. SC 来源的成肌细胞是细胞治疗 (细胞介导的基因治疗) 的最佳供体细胞. 虽然有些研究指出一些肌肉源性的干细胞具有成肌细胞更好的性质, 如实验发现 CD-45 阳性 SP (side population) 细胞的肌肉再生效率较高^[12]. 但是到目前为止, 还未见有关灵长类模型支持上述结论的资料报道. SP 细胞是存在于肌肉组织中不同于 SC 的另一种干细胞, 先前认为 SP 细胞可能是 SC 的祖细胞, 因为在 Pax-7 存在的情况下 SP 可分化为 SC, 而 Pax7^{-/-}引起 SC 缺失, 但 SP 细胞群则无太大影响. 根据 SC 的其他驻留干细胞补充模型, 哪怕只要 SC 的某个亚群的补充, 是源于间质组织或循环迁移进入亚层的细胞, 通过使之在离体培养条件下转化为 SC, 就可以更为便利地在临床运用进行肌肉系统和相关于肌肉组织疾病的治疗. 从这个角度来讲, 可以预期, 骨髓细胞 (born marrow derived cell, BMDC) 将来或许可以替代成肌细胞移植治疗肌肉萎缩, 因为骨髓干细胞移植可能是最大和最方便的肌细胞移植供体来源^[13]. 另外有报道, 通过动脉注射中脉管成细胞 (mesoangioblasts), 使受损的肩带型肌肉萎缩得到恢复^[14].

4 展 望

上述发生过程中信号转导模式, 转录因子的替换剪切和蛋白质水平的变化, 提供了了解 SC 激活和补给分子机制的基本框架. Sherwood 等^[15]提出只有 SC 能够产生新的肌肉细胞, 与多数 BMDC 的研究结论形成鲜明对比. 所以调控 SC 激活和补给的确切分子机制还有待于继续研究. Montarras 等^[16]成功设计了一种肌卫星细胞的直接分离方法, 运用这种方法可以比原始培养更有效地进行肌肉疾病的移植治疗. 总而言之, SC 的激活和补给与出生后肌肉修复和机体衰老等问题直接相关. 因此对于 SC 激活和补给分子机制的阐明, 可以对包括肌肉萎缩症 (DMD 和 BMD) 和帕金森病在内的多种临床退行性疾病的治疗产生重要作用.

参 考 文 献

- Hill E, Boontheekul T, Mooney D J. Regulating activation of transplanted cells controls tissue regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (8): 2494~2499
- Hawke T J, Jiang N, Garry D J. Absence of p21CIP rescues myogenic progenitor cell proliferative and regenerative capacity in Foxk1 null mice. *J Biol Chem*, 2003, **278** (6): 4015~4020
- Tatsumi R, Liu X, Pulido A, *et al.* Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, **290** (6): C1487~1494
- McCroskery S, Thomas M, Platt L, *et al.* Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. *J Cell Sci*, 2005, **118** (15): 3531~3541
- 杨威, 王海霞, 陈岩, 等. 鸡生长分化因子 GDF8 cDNA 的克隆表达与蛋白纯化. *生物工程学报*, 2001, **17** (4): 460~462
Yang W, Wang H X, Chen Y, *et al.* *Chinese J Biotechnology*, 2001, **17** (4): 460~462
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, *et al.* Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol*, 2003, **162**(6): 1135~1147
- Conboy I M, Rando T A. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell*, 2002, **3** (3): 397~409
- Conboy I M, Conboy M J, Wagers A J, *et al.* Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, 2005, **433** (17): 760~763
- Turk R, Sterrenburg E, de Meijer E J, *et al.* Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling. *BMC Genomics*, 2005, **6** (98): 1~15
- Conboy I M, Conboy M J, Smythe G M, *et al.* Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*, 2003, **302** (5650): 1575~1577
- Collins C A, Olsen I, Zammit P S, *et al.* Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, 2005, **122** (2): 289~301
- Chen J C, Goldhamer D J. Skeletal muscle stem cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, **1** (101): 1~7
- Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, *et al.* Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 2005, **309** (5732): 314~317
- Sampaoli M, Torrente Y, Innocenzi A, *et al.* Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*, 2003, **301** (5632): 487~492
- Sherwood R I, Christensen J L, Conboy I M, *et al.* Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell*, 2004, **119** (4): 543~554
- Montarras D, Morgan J, Collins C, *et al.* Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*, 2005, **309** (5743): 2064~2067

Molecular Basis of Activation and Replenishment on Satellite Cell Shed Light on Myopathy*

PAN Ling-Mei, WANG Tian, SHI Fang-Xiong**

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Satellite cells, as the major stem cells, are responsible for postnatal skeletal muscle growth, regeneration and maintenance. As a result, satellite cells have great potential as therapeutic agents. Activation of satellite cells *in vivo* is a key link in the muscle regeneration processes. And their replenishment is necessary to keep the capacity of skeletal muscle to regenerate after recurrence of muscle damage. Cellular and molecular regulation of activation and replenishment for satellite cells issues were reviewed. Hoping through the points of nitric oxide-hepatocyte growth factor (NO-HGF), myostatin and Notch signaling and the niche of satellite cells to overcome the recent obstruction in cell therapy in clinic myopathy, such as Duchenne muscle dystrophy.

Key words muscle satellite cell, activation, replenishment, myopathy

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2004CB117500) and Grant-in-Aid for Initial Funding for Returned Scholars from The Ministry of Education of China.

**Corresponding author . Tel/Fax: 86-25-84399112, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

Received: May 9, 2006 Accepted: June 14, 2006