

肌卫星细胞在失重肌萎缩中的可塑性变化及机制*

李景龙¹⁾ 刘红菊²⁾ 王 飞³⁾ 贺 健²⁾ 李文炯²⁾ 任 维¹⁾ 陈晓萍^{2,3)**}

(¹⁾ 陕西师范大学生命科学院, 西安 710119; ²⁾ 中国航天员科研训练中心, 航天医学基础与应用国家重点实验室, 北京 100094;

³⁾ 中国航天员科研训练中心, 人因工程重点实验室, 北京 100094)

摘要 肌卫星细胞在骨骼肌生长发育和出生后骨骼肌损伤修复中起着重要的作用, 但是有关肌萎缩中肌卫星细胞的可塑性变化、作用及其机制尚不清楚. 本研究采用小鼠尾悬吊模拟失重效应诱导失重肌萎缩, 动态分析了失重肌萎缩发生过程中不同类型肌纤维的肌卫星细胞数量和增殖、分化潜能可塑性的改变, 发现在失重肌萎缩过程中, 处于安静状态的肌卫星细胞显著增多、激活增殖的肌卫星细胞显著减少, 而具有成肌分化潜能的肌卫星细胞有持续减少趋势. 此外, 在失重肌萎缩比目鱼肌单根肌纤维移出的体外培养中, 证明了失重肌萎缩肌纤维肌卫星细胞可塑性降低的特征性变化. 进一步, 通过对比分析 Smad3 基因敲除及其同窝野生型小鼠, 在失重肌萎缩中肌卫星细胞可塑性的差异性变化, 揭示了 Smad3 在调控失重肌萎缩肌卫星细胞可塑性变化中的关键作用.

关键词 肌卫星细胞, 可塑性, 失重, 肌萎缩

学科分类号 Q25

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0045

骨骼肌占人体重量的 40%, 在骨和关节的配合下, 通过骨骼肌的收缩和舒张, 维持人和高等动物的体态和完成躯体的各种动作或运动等. 最近研究报道特别关注骨骼肌作为代谢重要器官, 在维持血糖平衡等机体代谢中起着关键作用^[1-2]. 更为重要的是, 在航天飞行尤其是中长期航天飞行中, 失重环境将导致航天员骨骼肌尤其是下肢背侧抗重力肌的萎缩, 从而严重影响航天员健康和工作绩效. 可见, 维持骨骼肌结构与功能的正常, 对保障人体健康乃至载人航天事业的发展都具有非常重要的意义.

肌卫星细胞被公认是出生后骨骼肌损伤、再生的唯一“储备库”, 其数量和功能是决定成年骨骼肌质量和机能是否能够维持正常的关键^[3]. 肌卫星细胞的数量与增殖分化功能均受到包括去负荷废用等在内的骨骼肌所处环境的影响^[4]. 有关肌卫星细胞在肌萎缩中的研究比在骨骼肌生长和损伤修复中的研究少很多^[5]. 近年来, 尽管有研究肌卫星细胞在后肢去负荷废用性肌萎缩中的改变, 但结论不一. 以往的研究显示, 肌卫星细胞数量和功能的调节依赖于力学负荷和它们在肌纤维中的定位, 研究

还发现去负荷导致了肌卫星细胞数量和分裂增殖等的显著下降, 尤其在肌纤维的中心区域变化最为明显^[6]. 可是, Darr 和 Schultz(1989 年)^[7]证明了肌卫星细胞的特性变化与后肢悬吊去负荷萎缩的时间相关, 即去负荷 3 天(早期)肌卫星细胞的数目与激活增殖功能均显著降低, 而在 3~10 天期间持续激活增殖, 且肌卫星细胞在趾长伸肌纤维中代偿性增加了 4 倍. 对人体的研究发现, 14 天制动^[8]和 28 天卧床^[9]的废用性或去负荷肌萎缩中, 肌卫星细胞数量没有明显改变, 但 Suetta 等^[10]报道了 14 天制动的肌萎缩中, 肌卫星细胞数量显著增加. 与以上报道相反, Verdijk 等^[11]发现在严重的废用性肌萎缩中, I 和 II 型肌纤维的肌卫星细胞数目显著降低. 可见, 有关去负荷肌萎缩中肌卫星细胞的数量与功能的改变仍然不清楚.

* 国家自然科学基金(31171144, 81272177), 航天医学基础与应用国家重点实验室基金(SMFA13A01)和人因工程重点实验室基金(SYFD140051801)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66360241, E-mail: xpchen2009@163.com

收稿日期: 2016-02-19, 接受日期: 2016-05-17

本研究采用小鼠尾悬吊模拟失重效应诱导失重肌萎缩, 动态分析了失重肌萎缩发生过程中不同类型肌纤维的肌卫星细胞数量和增殖、分化功能的改变; 在体内单根纤维移出的肌卫星细胞体外培养体系中, 进一步证明了失重肌萎缩中肌纤维肌卫星细胞的可塑性变化特征; 通过分析 Smad3 基因敲除及其同窝野生型小鼠在失重肌萎缩肌纤维肌卫星细胞可塑性的差异性变化, 揭示了重要信号转录因子 Smad3 在调控失重肌萎缩肌卫星细胞可塑性中的重要作用. 这可为基于骨骼肌卫星细胞干预的航天失重肌萎缩乃至临床疾病肌萎缩等治疗药物研发提供新的思路.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

C57BL6 小鼠购自北京维通利华实验动物中心; Smad3 小鼠由军事医学科学院杨晓研究员提供; Laminin、Myf5、MyoD、成肌蛋白(myogenin) 抗体购自 Abcam 公司; 辣根酶标记羊抗小鼠 IgG 和辣根酶标记兔抗羊 IgG 购自中杉金桥公司; DMEM 及青链霉素购自 Gibco 公司; 反转录试剂盒购自 Takara 公司; 冰冻切片机(Microm HM525, 德国), 激光共聚焦显微镜(Leica, 德国); 电泳仪(Bio-Rad, 美国).

1.2 动物与模型

健康清洁级雄性 C57BL6 小鼠 80 只, 体重 (20±1) g(北京维通利华实验动物中心提供), 按照体重配对原则, 分为尾悬吊 3 天组、尾悬吊 7 天组、尾悬吊 14 天组、尾悬吊 21 天组和尾悬吊 28 天组及对照组. 采用标准的小鼠尾悬吊模拟失重效应模型, 尾悬吊小鼠可以在鼠笼内头低位自由活动、摄食和饮水, 各组动物维持 12 h-12 h 昼夜交替, 室温(23±2)℃. 尾悬吊结束后, 动态称取肌萎缩形成过程中小鼠体重和肌肉重量, 计算肌萎缩指数(肌肉质量/体质量; mg/g), 进行统计学分析.

1.3 免疫荧光染色

取出比目鱼肌, OCT 包埋剂包埋组织, 置于液氮内预冷的异戊烷中, 然后在冰冻切片机上切片, 厚度为 8 μm. 将切片放入 0.3% PBST, 室温下洗 30 min; 用 5%羊血清 4℃封闭 1 h; 用 5%羊血清配制兔抗 laminin 一抗(1:300 稀释), 4℃过夜; 用 5%羊血清配制 FITC 标记 IgG 二抗(1:300 稀释), 4℃放置 2 h, 此过程均需避光, DAPI 封片, 用激光共聚焦显微镜拍照并保存, 采用软件

Image-Pro Plus 统计骨骼肌横截面积.

1.4 免疫印迹

取出比目鱼肌组织, 按比例加入 RIPA 裂解液, 提取蛋白进行蛋白质印迹(Western blot)检测. 取等量蛋白质样品经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 以湿转法电转移至硝酸纤维素膜, 以含 5%脱脂奶粉的 PBST 4℃封闭 2 h, 加入特异性针对目的蛋白 Myf5、MyoD 和 myogenin 的抗体, 4℃摇床孵育过夜, 次日加入辣根过氧化物酶标记的对应二抗孵育 2 h, 最后用 ECL 化学发光法显色.

1.5 mRNA 提取和 RT-PCR

将比目鱼肌放入匀浆器中, 加入 1 ml TRIzol 充分研磨, 室温下放置 30 min; 将液体转移到 EP 管中, 4℃ 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液; 将上清液加入 200 μl 氯仿后剧烈震荡, 4℃ 12 000 r/min, 离心 20 min; 将上清液加入等体积的异丙醇, 上下翻转混匀, 静置 10 min, 4℃ 12 000 r/min, 离心 25 min; 小心倒掉上清液, 加入 1 ml 75%乙醇(1:1 000 DEPC 水配置), 4℃ 12 000 r/min, 离心 5 min, 倒掉上清液, 重复此操作; 配置 DNA 酶(DNase)溶液, 50 μl 配方(5 μl 10×DNase I 缓冲液, 2 μl Recombinant DNase I, 0.5 μl RNA 酶抑制剂, 42.5 μl 1/1 000 DEPC 水); 将 EP 管中的液体晾干, 加入 40 μl DNase 溶液, 充分混匀, 放入水浴锅中, 37℃ 30 min、55℃ 10 min, 之后测定 RNA 浓度. 根据试剂盒中反转录体系在 PCR 仪器中进行反转录反应, 条件为 37℃ 15 min, 然后 85℃ 5 s 以灭活反转录酶的活性, 反应结束后将进行后续的 RT-PCR 反应. 实验所用引用物见表 1.

1.6 单根肌纤维分离

配制纤维消化液(DMEM+葡萄糖 35 mg/L+青链霉素 100U/ml + I 型胶原酶 400U/ml)和纤维培养液(DMEM+葡萄糖 35 mg/L+青链霉素 100U/ml + 10%FBS). 颈椎脱臼处死小鼠, 75%酒精消毒皮毛, 置超净台内分离出所需骨骼肌, 将骨骼肌置于盛有 DMEM 液的玻璃平皿中清洗 2~3 次, 将肌肉取出置于含 10 ml 纤维消化液的 15 ml 离心管中(纤维消化液提前 10 min 拿出预热); 将此带肌肉的离心管迅速放入 37℃、5%二氧化碳培养箱中固定在旋转架上, 30 r/min 进行翻转消化 1.5 h, 期间每 0.5 h 吹打肌肉混液 1 次, 共 3 次; 看到肌纤维分解时, 轻轻移出 1 ml 纤维消化液放入另一个 15 ml

Table 1 Primer sequences	
Gene	Primer sequence
Smad3	Forward 5' GGGCCTACTGTCCAATGTCAA 3'
	Reverse 5' CCCAATGTGTGCGCTTGTA 3'
Myf5	Forward 5' CCAGCCCCACCTCCAAC 3'
	Reverse 5' GACCAGACAGGGCTGTTACATTC 3'
MyoD	Forward 5' GATGGCATGATGGATTACAGC 3'
	Reverse 5' GACTATGTCCTTTCTTTGGGG 3'
GAPDH	Forward 5' TTGTGATGGGTGTGAACACAGAGA 3'
	Reverse 5' CATGAGCCCTTCCACAATGCCAAA 3'

离心管中,加入预热好的 10 ml 培养液中和酶,重复 2~3 次;在显微镜下挑选出直、厚、透明且不卷曲的单根活纤维,用拉制的微量巴氏吸管(口很细小)轻轻吸出,放于 24 孔培养板中,每孔放置 2~3 根,迅速放回培养箱中;种植培养 15 min 后,37℃ 1 100 g 离心 30~40 min,增加其黏附性,进行贴壁生长,每隔 1 天换半液 1 次.

1.7 统计学分析

各实验组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS17.0 对各组数据进行分析,单因素方差分析统计数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 实验结果

在小鼠尾悬吊模拟失重效应诱导失重肌萎缩形成过程中不同时间点,检测骨骼肌组织、肌纤维和 RNA、蛋白质表达的变化,分析肌卫星细胞数目及可塑性的动态变化,揭示失重肌萎缩发生过程中

肌卫星细胞可塑性变化特征;采用 Smad3 Knockdown(+/-)及其同窝野生型对照(+/+)尾悬吊 14 天诱导失重肌萎缩,对比分析其对肌卫星细胞可塑性变化的调控作用,进一步揭示了 Smad3 在失重肌萎缩发生过程中肌卫星细胞可塑性变化中的关键作用.

2.1 尾悬吊模拟失重诱导失重肌萎缩的动态变化

采用标准尾悬吊方法^[12],制备小鼠失重肌萎缩模型,进行肌萎缩形成过程中的动态取材,肌萎缩指数如图 1 所示,在尾悬吊诱导失重肌萎缩过程中,后肢背侧快肌腓肠肌(以糖酵解代谢纤维含量为主,也叫白肌),在第 14 天和 21 天显著萎缩,到 28 天恢复(图 1a).而后肢背侧慢肌比目鱼肌(以有氧代谢纤维含量为主,也叫红肌),在第 7 天则发生显著肌萎缩且以第 14 天萎缩最为显著,到 28 天仍未恢复(图 1b).

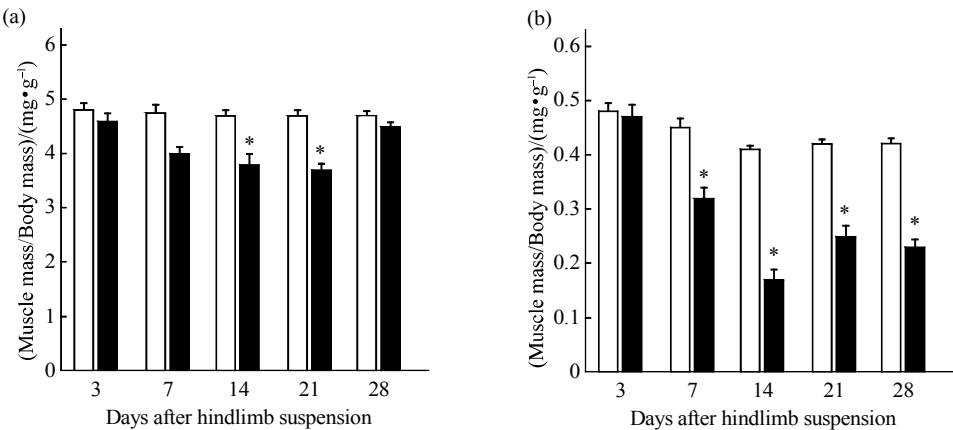


Fig. 1 The dynamic changes of atrophy index (muscle mass/body mass)of gastrocnemius(a) and soleus (b)after hindlimb suspension(HS) in mice during 28days
Date are means±SEM, *P < 0.05 as compared with control group(CON). n=6. □: CON; ■: HS.

因此,本研究成功建立了尾悬吊诱导失重肌萎缩模型,并证明了失重肌萎缩具有后肢背侧慢肌比目鱼肌的萎缩发生较早且程度更为严重的选择性肌萎缩特征,慢肌比目鱼肌肌肉质量丢失在 14 天尤为显著.

2.2 失重肌萎缩中肌卫星细胞数量和增殖、分化潜能的动态变化

为了探讨失重肌萎缩发生过程中肌卫星细胞数量与功能的变化,选择萎缩最为显著的比目鱼肌进行研究,对比目鱼肌样本进行冰冻切片,采用肌纤维基底膜特异抗体 laminin 进行免疫荧光染色,分析失重肌萎缩比目鱼肌肌纤维横截面积(cross sectional area, CSA)的动态变化.结果表明(表 2,

图 2),尾悬吊 14 天(HS14)比目鱼肌肌纤维 CSA 较对照组(CON)显著降低($***P < 0.001$),28 天后有所恢复,但与对照组相比仍有显著下降($*P < 0.05$).

Table 2 Changes of cross sectional area (CSA) of soleus fiber hindlimb suspension in mice during 28 days

Group	Cross sectional area/ μm^2
CON	1968.07 $\pm$ 878.04
HS7	1915.23 $\pm$ 861.11
HS14	1637.36 $\pm$ 850.27 ***
HS28	1807.02 $\pm$ 926.28 *

Data are means $\pm$ SEM, $n=3$. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ as compared with control group(CON).

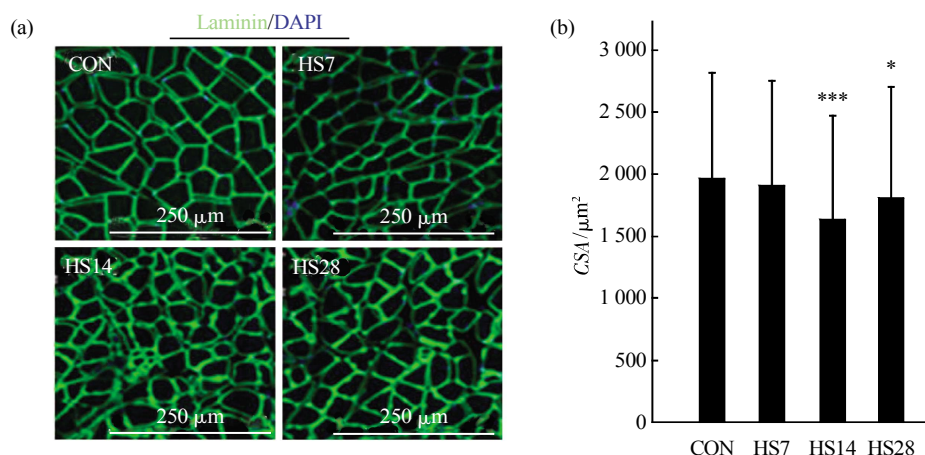


Fig. 2 The dynamic changes of cross sectional area (CSA) of soleus fibers after hindlimb suspension in mice during 28 days

(a) Representative images of immunofluorescence staining of the soleus muscle after 28 days of hindlimb suspension using anti-laminin antibody to highlight fiber borders. (b) The mean cross sectional areas(CSA) of the soleus muscles. Analysis of the results in (a). Data are means $\pm$ SEM, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ as compared with control group(CON)($n=3$).

采用安静肌卫星细胞特异因子 Myf5 抗体对失重肌萎缩发生过程中比目鱼肌冰冻切片进行免疫组织化学检测(图 3a),统计分析获得了 28 天尾悬吊诱导失重肌萎缩中肌卫星细胞数量的动态变化(图 3b).并用 RT-PCR 方法,检测了失重肌萎缩发生过程中肌卫星细胞数量和激活、增殖和分化的特异调节因子 Myf5 和 MyoD 基因表达水平的动态变化.结果表明,失重肌萎缩形成过程中处于安静、制动状态的肌卫星细胞特异 Myf5 基因表达水平在第 14 天开始持续显著增加(图 3c),与其安静状态的肌卫星细胞统计数目(图 3b)变化相似,而肌卫星细胞激活、增殖潜能的特异标志基因 MyoD 在尾

悬吊第 3 天有所增加,但第 7 天后持续显著降低,且第 14 天开始下降幅度增大(图 3d).

由此可见,在失重肌萎缩形成、尤其是慢肌比目鱼肌显著萎缩过程中,安静肌卫星细胞数目及其激活、增殖与分化潜能发生了特征性改变,即处于安静制动状态的肌卫星细胞显著增多.与此同时,尽管激活增殖状态的肌卫星细胞在第 3 天有所增加,但之后持续性显著减少,而具有成肌分化潜能肌卫星细胞有持续减少趋势.以上变化特征,提示肌卫星细胞可塑性改变在失重肌萎缩形成中起着重要的作用.

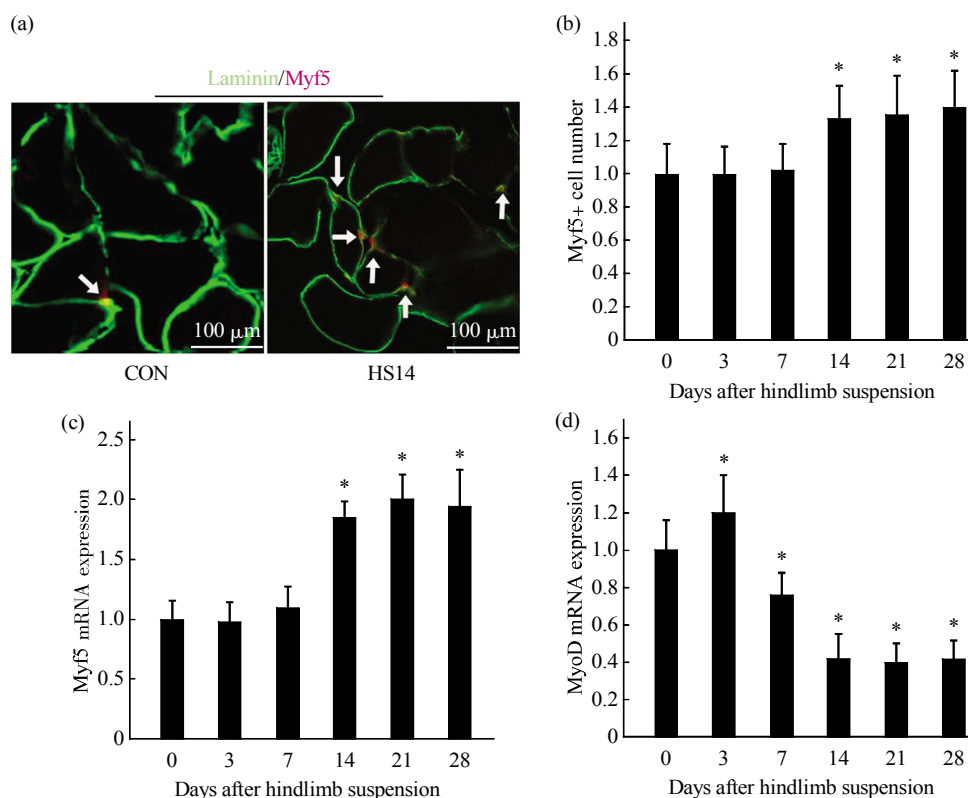


Fig. 3 The number of positive quiet muscle satellite cell specific marker Myf5(b) and the dynamic changes of Myf5(c) and MyoD(d) mRNA expression of soleus after hindlimb suspension in mice during 28 days

(a) Representative immunofluorescence staining of Myf5 positive muscle satellite cell in soleus muscle of control and 14 days of hindlimb suspension group. (b) The number of Myf5 positive muscle satellite cell in soleus during 28 days of hindlimb suspension. (c) RT-PCR analysis of Myf5 mRNA expression of soleus during 28 days of hindlimb suspension. (d) RT-PCR analysis of MyoD mRNA expression of soleus during 28 days of hindlimb suspension. Data are means $\pm$ SEM, * P < 0.05 as compared with control group ($n=5$).

2.3 失重肌萎缩单根纤维来源的肌卫星细胞数量和体外增殖、分化潜能的变化

为更加直观、动态地观察定位于肌纤维基底膜下的肌卫星细胞数目与功能的变化, 直接验证肌卫星细胞可塑性变化及其在失重肌萎缩形成中的重要作用, 我们采用本实验室建立的单根肌纤维分离(培养方法见材料与方法 1.6), 在体内移出单根纤维的体外培养体系中, 进一步分析了尾悬吊 14 天诱导失重肌萎缩的单根肌纤维中肌卫星细胞数目变化, 以及单根肌纤维来源的肌卫星细胞从肌纤维逸出、激活、增殖和融合、成肌分化等潜能的可塑性变化特征。从图 4 可见: 与地面对照组(CON)相比, 体内新鲜移出(0)的尾悬吊 14 天(HS)比目鱼肌纤维显著萎缩, 位于肌纤维基底膜下的肌卫星细胞数目显著减少; 体外培养 3 天(3)的肌纤维中, 失重萎缩的肌纤维中从肌纤维逸出、迁徙的激活、增殖肌卫星细胞显著降低; 在体外培养 7 天(7)后, 对照组(CON)中, 单根肌纤维移出、激活、增殖的肌卫星细胞融合、成肌分化形成粗大肌管; 而尾悬

吊 14 天(HS)比目鱼肌单根肌纤维仅少量溢出肌卫星细胞, 其迁徙、激活、增殖和分化潜能均显著抑制, 未见明显成肌分化肌管。以上结果显示, 肌卫星细胞储备数目和增殖、分化可塑性降低在失重肌萎缩形成中起着重要的作用。

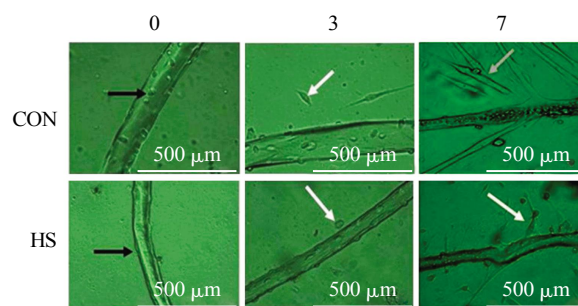


Fig. 4 In vitro dynamic changes in number and activation, proliferation and differentiation potential of satellite cells explant from soleus muscle single fibers after 14 days of hindlimb suspension

Black arrow directs quiet muscle satellite cells; white arrow directs activated, escaped single muscle fiber surface and the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. $n=4$.

2.4 Smad3 在调控失重肌萎缩中肌卫星细胞数量和增殖、分化潜能中的作用

为探讨骨骼肌生长发育的重要转录调控因子 Smad3 在失重肌萎缩形成中对肌卫星细胞可塑性变化的调控作用, 采用定量 RT-PCR 检测技术, 比较分析了小鼠尾悬吊 0、3、7、14、21 和 28 天诱导失重性肌萎缩形成过程中, 比目鱼肌(慢肌)Smad3 的动态变化. 结果显示, 尾悬吊第 3 天开始 Smad3 基因表达水平持续显著增高(图 5a), 结合图 3 中肌卫星细胞可塑性变化特异因子的动态变化规律, 推测 Smad3 在失重肌萎缩形成中可能参与对肌卫星细胞可塑性变化的调控作用.

为深入探讨 Smad3 在失重肌萎缩形成中对肌

卫星细胞可塑性变化调控的关键, 采用 Smad3 杂合子(+/-)及其同窝野生型(+/+)小鼠配对尾悬吊 14 天(HS)诱导失重肌萎缩, 采用 Western blot 方法, 分析肌卫星细胞可塑性变化特异因子 Myf5、MyoD 和 myogenin 蛋白表达的差异性变化. 结果表明(图 5b, c), 与同窝野生型(+/+)小鼠相比, Smad3 杂合子(+/-)可显著提高 Myf5、MyoD 和 myogenin 蛋白表达水平, 提示肌卫星细胞储备数量增加, 其激活、增殖和成肌分化潜能均显著增高, 其中对肌卫星细胞的激活、增殖调控能力尤为显著. 因此, Smad3 在失重肌萎缩中肌卫星细胞数量和增殖、分化潜能的调控中起着关键作用.

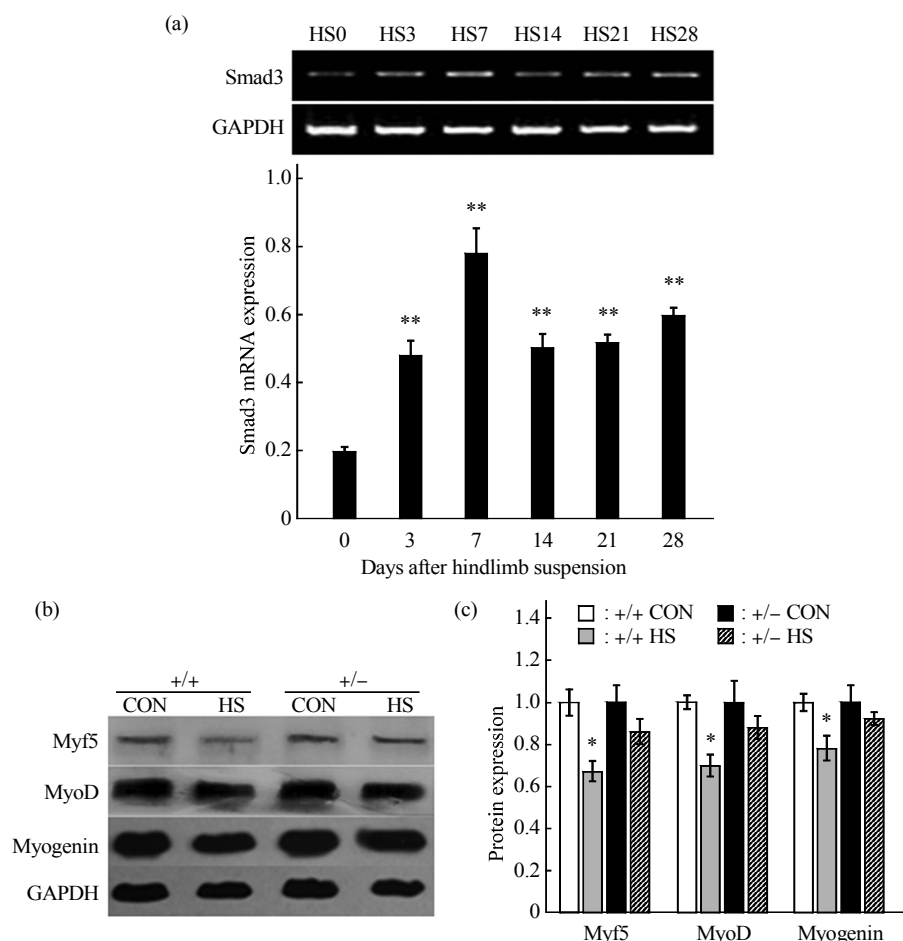


Fig. 5 The dynamic changes of Smad3 in the process of muscle atrophy in weightlessness and effects on plasticity of muscle satellites cell

The dynamic changes of Smad3 mRNA in the process of muscle atrophy in weightlessness(a), and the changes of muscle satellite cell plasticity Myf5, MyoD and myogenin protein level after hindlimb suspension in Smad3 knockdown(+/-) and wild-type(+/+) littermates mice during 14 days in the soleus (b, c). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with control group. $n=6$.

3 讨 论

成年骨骼肌肌卫星细胞“储备库”及其激活产生的成肌细胞、肌管和新生肌纤维, 在出生后骨骼肌结构与功能维持中起着至关重要的作用^[3]。正常情况下, 肌卫星细胞保持安静状态, 但在骨骼肌损伤或生长发育期间, 肌卫星细胞进入细胞周期^[13]。成肌调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs)在出生后骨骼肌肌卫星细胞的数量和增殖、分化中起着关键的作用。当被激活时, 肌卫星细胞增殖和表达成肌调节因子 MyoD 和 Myf5^[14-15], 之后, 大部分激活细胞保持 MyoD 表达, 但下调 Myf5 并增加 myogenin 表达, 进入成肌分化阶段, 而其他的细胞保持 Myf5 表达但下调 MyoD, 退出细胞周期, 回到安静状态^[16-17]。肌卫星细胞既有产生成肌分化细胞也有自我更新维持安静肌卫星细胞“储备库”的双向功能。

国内外研究报道发现, 大鼠尾悬吊第 3~5 天肌卫星细胞有丝分裂活动几乎完全丧失, 尾悬吊 30 天肌卫星细胞数目减少了 45%^[18-20]。在失重肌萎缩形成过程中, MyoD 和 myogenin 表达水平下调使肌卫星细胞的增殖和成肌分化能力降低, 导致骨骼肌质量丢失和萎缩的发生^[21]。在本研究中, 我们的结果显示, 小鼠失重肌萎缩形成过程中处于安静、制动状态的肌卫星细胞数目和特异基因表达水平在第 14 天开始均持续显著增加, 而肌卫星细胞激活、增殖潜能的特异标志基因 MyoD 在尾悬吊第 3 天有所增加, 但第 7 天后持续显著降低, 且第 14 天开始下降幅度增大。这些变化中肌卫星细胞数目代偿性增加的改变与 Darr 和 Schultz(1989 年)^[7]报道结果相似, 肌卫星细胞激活增殖和成肌分化潜能下降与以往研究报道相同^[18-21]。但我们的研究结果与 Darr 和 Schultz(1989 年)^[7]报道的肌卫星细胞激活增殖在早期抑制、后期活跃的研究结果相反, 这种不一致可能与动物实验背景、取材时间和分析方法等选择相关, 值得注意的是, 我们在对不同阶段肌卫星细胞数目组织化学染色统计分析的同时, 增加了不同阶段肌卫星细胞特异标志基因表达水平的定量检测, 且结合本研究中失重肌萎缩动态形成过程中肌卫星细胞制动、激活能力反应性增高后随即持续降低和成肌分化能力的早期显著抑制等可塑性下降的特征, 即肌卫星细胞“储备库”动用于增加肌核、与原有肌纤维融合或产生新肌纤维以达到对抗失重肌萎缩的能力降低, 这与本研究得到的失重

骨骼肌在 7 天后持续发生肌肉质量丢失、肌纤维横截面积下降的显著萎缩, 以及失重肌萎缩肌纤维移出培养中卫星细胞可塑性抑制等结果一致, 即失重肌萎缩发生与其肌卫星细胞增殖、分化的可塑性下降密切相关。

有研究显示, 外源性 TGF- β 1 激活 Smad3 后, Smad3 可与 MyoD 的 bHLH 区域结合, 抑制 MyoD/E 二聚体的形成, 阻断了 E 盒依赖的肌细胞特异基因的表达, 从而抑制了成肌细胞分化能力^[22-23], 提示 Smad3 表达水平的上调可抑制成肌调节因子的表达。因此, 推测靶向敲除 Smad3 可能通过上调成肌特异因子的表达, 促进骨骼肌卫星细胞的增殖和成肌分化潜能, 对抗失重肌萎缩的形成。为验证该假设, 我们比较分析了靶向敲除 Smad3 (+/-) 和同窝出生的野生型小鼠(+/+)尾悬吊 14 天失重肌萎缩中肌卫星细胞可塑性的差异性变化。结果表明, 靶向敲除 Smad3 显著增加了比目鱼肌 Myf5、MyoD 和 myogenin 蛋白质表达水平, 提示肌卫星细胞储备数量增加, 其激活、增殖和成肌分化潜能均显著增高, 其中对肌卫星细胞的激活、增殖调控能力尤为显著。因此, Smad3 在失重肌萎缩中肌卫星细胞数量和增殖、分化潜能的调控中起着关键作用。

综上所述, 本研究揭示了失重肌萎缩中肌卫星细胞可塑性的动态变化特征, 并首次在肌萎缩单根肌纤维移出培养体系和 Smad3 基因敲除小鼠中, 进一步证明了肌卫星细胞数目与可塑性变化在失重肌萎缩中的作用及其 Smad3 信号机制。可为航天失重肌萎缩干预途径和有效药物对抗措施的研发提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Peng G, Li L, Liu Y, *et al.* Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology*, 2011, **152**(6): 2206-2218
- [2] Watt M J, Hoy A J. Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, **302**(11): 1315-1328
- [3] Boppart M D, De Lisio M, Zou K, *et al.* Defining a role for non-satellite stem cells in the regulation of muscle repair following exercise. *Front Physiol*, 2013, **310**(4):1-6
- [4] Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, *et al.* Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, 2007, **129**(5): 999-1010

- [5] Brooks N E, Myburgh K H. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. *Front Physiol*, 2014, **99**(5): 1–14
- [6] Wang X D, Kawano F, Matsuoka Y, *et al.* Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, **290**(4): 981–989
- [7] Darr K C, Schultz E. Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J Appl Physiol* (1985), 1989, **67**(5): 1827–1834
- [8] Snijders T, Wall B T, Dirks M L, *et al.* Muscle disuse atrophy is not accompanied by changes in skeletal muscle satellite cell content. *Clin Sci (Lond)*, 2014, **126**(8): 557–566
- [9] Brooks N E, Cadena S M, Vannier E, *et al.* Effects of resistance exercise combined with essential amino acid supplementation and energy deficit on markers of skeletal muscle atrophy and regeneration during bed rest and active recovery. *Muscle Nerve*, 2010, **42**(6): 927–935
- [10] Suetta C, Frandsen U, Mackey A L, *et al.* Ageing is associated with diminished muscle re-growth and myogenic precursor cell expansion early after immobility-induced atrophy in human skeletal muscle. *J Physiol*, 2013, **591**(15): 3789–3804
- [11] Verdijk L B, Dirks M L, Snijders T, *et al.* Reduced satellite cell numbers with spinal cord injury and aging in humans. *Med Sci Sports Exerc*, 2012, **44**(12): 2322–2330
- [12] Adams G R, Caiozzo V J, Baldwin K M, *et al.* Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* (1985), 2003, **95**(6): 2185–2201
- [13] Bischoff R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. *Development*, 1990, **109**(4): 943–952
- [14] Yablonka-Reuveni Z, Rivera A J. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol*, 1994, **164**(2): 588–603
- [15] Zammit P S, Heslop L, Hudon V, *et al.* Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res*, 2002, **281**(1): 39–49
- [16] Nagata Y, Kobayashi H, Umeda M, *et al.* Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells. *J Histochem Cytochem*, 2006, **54**(4): 375–384
- [17] Day K, Shefer G, Richardson J B, *et al.* Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*, 2007, **304**(1): 246–259
- [18] Wang X D, Kawano F, Lan Y B, *et al.* Effects of gravitational loading on rat soleus muscle fibers following hindlimb suspension. *Biol Sci Space*, 2003, **17**(3): 201–202
- [19] Schultz E, Darr K C, Macius A, *et al.* Acute effects of hindlimb unweighting on satellite cells of growing skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 1994, **76**(1): 266–270
- [20] Mozdziaik P E, Truong Q, Macius A, *et al.* Hindlimb suspension reduces muscle regeneration. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1998, **78**(2): 136–140
- [21] McMahon C D, Popovic L, Oldham J M, *et al.* Myostatin-deficient mice lose more skeletal muscle mass than wild-type controls during hindlimb suspension. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, **285**(1): 82–87
- [22] Liu D, Black B L, Derynck R, *et al.* TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev*, 2001, **15**(22): 2950–2966
- [23] Liu D, Kang J S, Derynck R, *et al.* TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *EMBO J*, 2004, **23**(7): 1557–1566

The Plastic Changes and Mechanism of Muscle Satellite Cells in Weightless Muscle Atrophy*

LI Jing-Long¹⁾, LIU Hong-Ju²⁾, WANG Fei³⁾, HE Jian²⁾, LI Wen-Jiong²⁾, REN Wei¹⁾, CHEN Xiao-Ping^{2,3)**}

¹⁾ College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China;

²⁾ State Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China;

³⁾ National Key Laboratory of Human Factors Engineering, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China)

Abstract Muscle satellite cells play an important role in the growth and development as well as postnatal injury and repair of skeletal muscles, however, it keeps unclear about muscle satellite cell plasticity, effect and mechanism in atrophied muscle. In the present study, we investigated the changes in the satellite cell number and potency of proliferation and differentiation during weightless muscle atrophy induced by mouse hindlimb suspension, and found that the number of quiet satellite cells significantly increased but that of activated cells significantly decreased, and the potential of cell myogenic differentiation also appeared a reduced tendency. Moreover, we verified the above changes of muscle satellite cell plasticity in the cultures of *ex vivo* single myofibers isolated from weightless atrophied soleus. Finally, Smad3 knockout mice and its wild-type littermates were subjected to hindlimb suspension induced muscle atrophy, and the variability analysis demonstrated that the key role of Smad3 in regulating the plasticity of muscle satellite cells weightless muscle atrophy.

Key words muscle satellite cells, plasticity, weightlessness, muscle atrophy

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0045

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31171144, 81272177), the State Key Laboratory Grant of Space Medicine Fundamentals and Application (SMFA13A01), and National Key Laboratory of Human Factors Engineering Open Fund Project (SYFD140051801).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-66360241, E-mail: xpchen2009@163.com

Received: February 19, 2016 Accepted: May 17, 2016