

·基础研究·

腰痛患者肌卫星细胞生物学特性及其鉴定

徐义明¹ 白跃宏^{1,2} 俞红¹

摘要 目的:观察腰痛患者肌卫星细胞体外培养的生物学特性,探讨其在慢性腰痛中肌纤维损伤的修复作用。方法:取腰骶部慢性骨筋膜间隔综合征所致腰痛患者活体竖脊肌组织块,采用I型胶原酶和胰蛋白酶两步消化法及差速贴壁法纯化肌卫星细胞,进行原代培养及传代培养,观察细胞形态及其传代能力,绘制生长曲线,结蛋白免疫组化染色鉴定肌卫星细胞。结果:纯化后肌卫星细胞生长良好,传代培养后增殖速度较原代培养快,6代以前形态较规则,8代以后逐渐老化,结蛋白鉴定呈阳性。结论:慢性腰痛患者肌卫星细胞体外培养形态与正常人基本相同,但传代能力减弱,可能与修复受损肌纤维有关。

关键词 卫星细胞;腰痛;细胞培养

中图分类号:R681,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-08-0734-03

Biological characteristics and identification of skeletal muscle satellite cells in patients with low back pain/
XU Yiming, BAI Yuehong, YU Hong//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(8): 734-736

Abstract Objective: To observe biological characteristics of skeletal muscle satellite cells in patients with low back pain in vitro and to discuss its contribution to repairing damaged muscle fibers. **Method:** The human erector spinae tissues of patients with low back pain induced by chronic compartment syndrome were obtained through surgery. Muscle satellite cells were purified by two-step digest method of collagenase-I and trypsin and the method of different-speed adherence were subject to primary as well as passage culture in vitro. Morphological characteristics, growth curve were observed to evaluate the proliferation, differentiation and passage ability of muscle satellite cells. The cells were identified with cellular immunochemical stain. **Result:** The purified cells showed strong proliferative ability which was stronger in passage culture than primary culture. The morphous of cells were regular before the sixth generation, but commenced to be aged since the eighth generation. Endochylemas were positive by cellular immunochemical stain with desmin. **Conclusion:** Morphological characteristics of muscle satellite cells in patients with low back pain induced by chronic compartment syndrome were similar with health people, while their passage abilities were weak, which may result in skeletal muscle satellite cells lose repairing of the damaged muscle fibers.

Author's address Department of Rehabilitation, Shanghai Sixth People Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200233

Key words satellite cell; low back pain; cell culture

1961年 Mauro^[1]从青蛙胫前肌中首次发现肌卫星细胞(satellite cell, SC),它起源于胚胎中胚层,正常人体中位于肌纤维肌膜和基底膜之间,是一种多能骨骼肌干细胞,一般处于静止状态,但在正常骨骼肌受损如负重训练、创伤时可被激活,发生分裂、增生修补受损肌纤维,有时也能向成软骨细胞和成骨细胞等多个方向分化^[2]。目前在骨骼肌的胚胎发育研究、肌组织工程技术、基因治疗技术与失神经性肌营养不良的研究等方面肌卫星细胞越来越受到关注。在已发表的各项研究中,多数切取 Wistar 大鼠下肢肌肉进行体外纯化培养,黄汉伟等^[3]也曾采集急诊创伤病例人体骨骼肌进行培养,但并未针对人体骨骼肌相关疾病进行研究。

腰骶部慢性骨筋膜间隔综合征所致腰痛患者腰

部肌肉代谢多有障碍^[4],导致部分肌纤维变性坏死,肌卫星细胞被激活后参与修复。我们通过体外培养研究腰痛患者肌卫星细胞生物学特性,有利于阐明人体肌纤维慢性受损后的修复过程,并为组织工程移植肌卫星细胞治疗腰痛提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

经竖脊肌内压测定确诊为腰骶部慢性骨筋膜间隔综合征所致慢性腰痛患者,采用微创方法进行竖脊

1 上海交通大学附属第六人民医院康复医学科,上海市宜山路 600 号, 200233

2 通讯作者

作者简介:徐义明,男,硕士

收稿日期:2008-11-20

肌骨筋膜切开减压术,术前患者签署“取活体标本知情同意书”,术中取竖脊肌组织块,大小约 1cm^3 。

1.2 主要试剂

I 型胶原酶、L-多聚赖氨酸为美国 Sigma 公司生产;胰蛋白酶、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、小牛血清、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)为 Gibco 公司产品;结蛋白一抗试剂盒购自武汉博士德公司,二抗和 3,3'-二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 试剂盒购自长岛生物科技有限公司。

1.3 细胞的纯化、培养

按照改良的 Dorfman^[5]的方法。取腰骶部慢性骨筋膜间隔综合征所致腰痛患者术中标本,约 1cm^3 ,置入事先预备好的 Hank's 液中,立即转送实验室超净工作台中进行冲洗,并把肌肉块剪至 1mm^3 大小,初步去除肉眼可见的筋膜、血管、肌腱等结缔组织,再移入离心管中,1000 转/min 离心 5min,去上清液,加入 Hank's 液吹打,重复该步骤 3 次,去除上层液体及悬浮的组织,随后加入 0.1% I 型胶原酶,37℃ 水浴消化 20—30min,期间吹打数次,弃上清,再用 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 水浴消化 50—60min,期间吹打数次,加入 20% 的胎牛血清培养基终止消化。反复吹打后 100、200 目钢丝网依次过滤,滤液移入离心管中,1000 转/min 离心 10min,弃上清,加入红细胞裂解液 (Tris-NH₄Cl, 1:9 混合, pH: 7.5),反复吹打后再次移入离心管,1000 转/min 离心 10min,弃上清,用胎牛血清 DMEM 培养基悬浮细胞。将细胞悬液加入未经多聚赖氨酸处理的培养瓶中,放置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中 60min,稍稍震荡摇匀后,吸出悬液,再次接种于培养瓶中,重复此步骤 2 次 (即差速贴壁法去除成纤维细胞),纯化后的细胞进行台盼蓝染色计数活细胞,接种于经 L-多聚赖氨酸处理带盖玻片的 6 孔培养皿中,加入生长培养基 (20% 的胎牛血清, DMEM),放置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中进行培养,4d 后换液,以后每 3 天换液 1 次,并在倒置显微镜下观察细胞形态和生长情况。

1.4 细胞的传代分化

原代细胞生长至 70%—80% 融合后,用 0.25% 胰蛋白酶进行充分消化,镜下观察到细胞开始回缩后,用玻璃滴管吹下细胞,按 1:2 比例传代,2—3 天换液 1 次,每天镜下观察细胞形态学变化。取培养至第 2 代的细胞,消化以后接种于有盖玻片的 6 孔培养板中,每孔 1×10^5 — 1.25×10^5 个细胞,加入生长培养基进行培养,待细胞分裂、增殖至 70%—80% 汇合后,加入分化培养基 (含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养

基) 继续培养,倒置显微镜下观察细胞生长及分化情况,绘制生长曲线。

1.5 细胞的鉴定

除观察肌管形成外,我们采用结蛋白免疫细胞染色法鉴定。取传至第 2 代的肌卫星细胞,加入生长培养基培养 48h 后,4% 多聚甲醛室温下固定 30min;0.01% PBS 洗涤后加一抗 (1:25),37℃ 2h,之后 4℃ 过夜;二抗浓度 1:200, DAB 显色,同时设立空白对照。

2 结果

2.1 肌卫星细胞的体外培养特性

倒置显微镜下观察到刚分离出的原代 SC 呈球形,散在分布,折光性较强,培养 10—12h 后细胞开始贴壁,72h 后完全贴壁,细胞逐渐延展成梭形或纺锤形,体积较小 (图 1,见彩色插页)。细胞完全贴壁后,第 5 天进入对数增殖期,细胞体积逐渐变大,排列开始出现方向性,它们的长轴互相平行 (图 2,见彩色插页),形成类似肌纤维的结构。原代细胞直接分化培养 48h 后,部分细胞之间开始出现融合,形成多核细胞并有肌管形成。传代细胞贴壁速度和增殖速度较原代细胞快,12h 即可完全贴壁,6 代以前细胞形态较为规则一致,但 8 代以后细胞逐渐出现老化,形态不规则,胞体收缩扁平,胞浆内颗粒增多等表现。

2.2 细胞的生长曲线

每天同一时间观察多个视野,对 SC 进行计数,取平均值,绘制生长曲线 (图 3);细胞前期增殖速度较为恒定,6d 以后增殖速度变缓,可能是细胞接触抑制导致。

2.3 细胞纯度及鉴定

肌卫星细胞的胞浆中含有结蛋白 (desmin),可以采用免疫细胞化学方法使其显色呈阳性 (图 4,见彩色插页),空白对照组不显色。从染色的情况看,肌卫星细胞通过两步消化和差速贴壁法可以纯化肌卫星细胞达 90% 以上。

3 讨论

3.1 肌卫星细胞鉴定方法

肌卫星细胞体外增殖后会发生融合,形成多核肌管,根据其形态学特征可初步鉴定,也有学者通过肌卫星细胞的大小等形态来分离肌卫星细胞^[6]。另外,可通过免疫组化染色鉴定,肌卫星细胞在人体静止期和增殖期表达的蛋白和细胞因子并不相同^[7],细胞表面的分子标志物如 c-met、NCAM (vascular cell adhesion molecule)、Syndecan-3, 转录因子

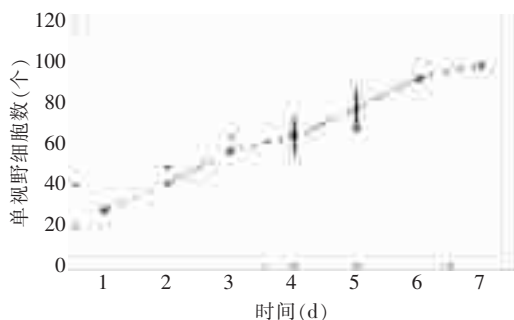


图3 肌卫星细胞生长曲线

Pax7、MNf(myocyte nuclear factor)、IRF-2(interferon regulatory factor-2)等在两种状态都能表达,而结蛋白、Myo D 只在增殖期表达并且在其早期就能检测到^[8]。文献中报道多使用结蛋白、肌球蛋白、M-钙黏蛋白及 α 横纹肌肌动蛋白染色检测^[9],几种方法均可,本试验采用普遍采用的结蛋白免疫组化染色法检测肌卫星细胞,结果阳性率高。虽然成纤维细胞也能表达结蛋白,但含量少,染色后呈弱阳性,可与肌卫星细胞染色对照,以利鉴别。也有学者采用多种免疫标记染色法,当然更为可靠。

3.2 慢性腰痛患者肌卫星细胞的生物学特性

本实验采用两步消化法及差速贴壁法提纯肌卫星细胞,所得原代肌卫星细胞 72h 完全贴壁,细胞形态为梭形和纺锤形,培养数天后开始出现方向性,平行排列,在接触抑制后增殖减慢,分化培养后,细胞贴壁速度增快,增殖速度较原代增快,数日后发生融合,形成多核肌管,上述肌卫星细胞体外培养特点与文献报道基本相似^[3],但慢性腰痛患者肌卫星细胞传代培养后,6代以前形态较为一致,8代以后逐渐出现老化,传代能力较文献报道降低^[3]。Malcolm Collins^[10]通过对运动员训练疲劳综合征的研究,发现疲劳运动员的股外侧肌中肌卫星细胞 DNA 端粒较正常对照组缩短,所以本实验中肌卫星细胞传代能力降低的原因可能是肌卫星细胞参与修复腰部损伤后,其 DNA 端粒的缩短导致,还有待进一步研究。

肌卫星细胞具有异质性^[11-12],其分布随肌卫星细胞的含量和增殖的潜力与肌纤维的类型、动物的年龄、动物的种类有关^[13]。相同面积横截面的慢肌纤维为主的比目鱼肌肌卫星细胞含量是快肌纤维为主的趾长伸肌的 2—3 倍^[7],随动物年龄增大,肌卫星细胞增殖潜力下降^[11]。又有研究显示,人类肌卫星细胞干细胞池容量不随年龄的增大而减少^[14],但老龄后其增殖能力是否减退,并无文献报道。本试验标本全部取自患者,因为肌卫星细胞的异质性,腰部肌卫星细胞与身体其他部位肌卫星细胞可能因为其微环境不同而增殖能力不同,故未取急诊创伤四肢肌肉体

外培养进行有效对照。正常人体腰部肌肉因取材困难也未进行对照。

3.3 慢性肌损伤修复机制

通过对人持续抗阻力训练前后活体股外侧肌中肌卫星细胞的变化研究^[13],发现肌卫星细胞在训练过程中被组织释放的炎症因子和生长因子激活并增殖^[15-16],增殖的肌卫星细胞部分储存于干细胞池^[17],以维持其稳定的容量,与已有限变性或坏死的肌纤维融合^[16],从而修复损伤。腰骶部慢性骨筋膜间隔综合征患者,其腰骶部竖脊肌等肌肉因慢性受损而肥大,进一步回流障碍后影响脊神经后支导致腰骶部疼痛产生^[4],肌卫星细胞参与了肌纤维的肥大及后期变性坏死肌纤维的修复。

参考文献

- [1] Mauro A. The satellite cell of skeletal muscle implantation[J]. Biophys Biochem Cytol, 1961, 9: 493—496.
- [2] 魏宽海, 裴国献, 金丹, 等. rhBMP-2 对骨骼肌卫星细胞增殖与粘附的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2003, 18(7): 416—417.
- [3] 黄汉伟, 徐建光, 顾玉东, 等. 人体肌卫星细胞培养的试验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2001, 15(5): 265—268.
- [4] 徐义明, 白跃宏. 慢性骨筋膜间隔综合征致腰痛的临床研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2008, 16(1): 9—12.
- [5] Dorfman J, Duong M, Zibaitis A, et al. Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116 : 744.
- [6] Jouvion G, Rouger K, Fornasari B, et al. Functional properties of muscle-derived cells related to morphological characteristics [J]. Histochem Cell Biol, 2006, 126(5): 603—616.
- [7] Chargé BP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration[J]. Physiol Rev, 2004, 84: 209—238.
- [8] 夏家红, 谢艾妮, 徐磊, 等. 大鼠骨骼肌卫星细胞体外培养的实验研究[J]. 中华试验外科杂志, 2005, 22(2): 214—215.
- [9] 魏宽海, 裴国献, 史宇恒, 等. 骨骼肌卫星细胞的培养鉴定及生物学特性[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(2) : 104.
- [10] Collins M, Renault V, Grobler LA, et al. Athletes with exercise-associated fatigue have abnormally short muscle DNA telomeres[J]. Med Sci Sports Exerc, 2003, 35(9): 1524—1528.
- [11] Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis [J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19 (6): 628—633.
- [12] Cossu G, Tajbakhsh S. Oriented cell divisions and muscle satellite cell heterogeneity[J]. Cell, 2007, 129(5): 859—861.
- [13] Schultz E, Mc Cormick KM. Skeletal muscle satellite cells[J]. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1994, 123: 213—257.
- [14] Roth SM, Martel GF, Ivey FM, et al. Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women [J]. Anat Rec, 2000, 260: 351—358.
- [15] 曹师承, 孙黎光, 赵刚, 等. 有氧运动对大鼠骨骼肌 mTOR 活性与蛋白表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(1): 34—36.
- [16] 范晓华, 纪树荣, 周红俊. 骨骼肌内胶原对机械负荷的适应性[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(9): 860—863.
- [17] Jejurikar SS, Kuzon WM. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle[J]. Apoptosis, 2003, 8: 573—578.
- [18] Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment[J]. Trends in Cell Biology, 2005, 15(12): 666—672.