

研究论文

巨噬细胞剔除可通过调控损伤骨骼肌炎症和氧化应激水平损害骨骼肌再生

刘晓光¹, 陈佩杰¹, 赵淋淋¹, 曾志刚^{1,2}, 肖卫华^{1,*}

¹上海体育学院运动科学学院, 上海 200438; ²井冈山大学体育学院, 吉安 343000

摘要: 本研究旨在探索巨噬细胞在骨骼肌损伤修复中的作用及其机制。将小鼠随机分为损伤组、未损伤对照组、剔除组和剔除对照组。损伤组和剔除组小鼠用钝物击打构建骨骼肌挫伤模型, 剔除组和剔除对照组小鼠用氯膦酸盐脂质体腹腔注射构建巨噬细胞剔除模型。骨骼肌钝挫伤后1、3、7和14 d取双侧腓肠肌, HE和Masson染色观察损伤骨骼肌再生和纤维化瘢痕愈合过程, real-time PCR及Western blotting检测骨骼肌中炎症因子、趋化因子和氧化应激因子表达变化。结果显示, 骨骼肌损伤后14 d, 损伤组只存在少量再生肌纤维, 而剔除组存在大量再生肌纤维, 两组肌纤维直径差异具有显著性($P < 0.05$)。伤后14 d, 剔除组胶原纤维面积所占百分比显著高于损伤组($P < 0.01$)。与未损伤对照组相比, 损伤组多种促炎细胞因子、趋化因子和氧化应激因子表达均显著上调。与损伤组相比, 剔除组中多种促炎细胞因子、趋化因子和氧化应激因子的表达在损伤后期(损伤后7~14 d)均显著增加。以上结果提示, 骨骼肌损伤修复过程中多种炎症因子、趋化因子和氧化应激因子表达上调, 剔除巨噬细胞后, 上述因子的表达在损伤后期进一步上调, 且骨骼肌再生能力受损, 纤维化修复加剧。这些结果表明巨噬细胞在骨骼肌损伤修复过程中发挥了重要作用, 炎症和氧化应激可能参与了剔除巨噬细胞损害骨骼肌再生这一过程。

关键词: 骨骼肌; 损伤修复; 巨噬细胞; 炎症因子; 趋化因子; 氧化应激因子

中图分类号: R339.4

Macrophages depletion impairs skeletal muscle regeneration by regulating inflammation and oxidative stress levels

LIU Xiao-Guang¹, CHEN Pei-Jie¹, ZHAO Lin-Lin¹, ZENG Zhi-Gang^{1,2}, XIAO Wei-Hua^{1,*}

¹School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China; ²College of Physical Education, Jinggangshan University, Ji'an 343000, China

Abstract: The objective of this study was to explore the roles of macrophages in the regeneration of injured skeletal muscle and the mechanisms involved. Mice were randomly divided into the following groups: muscle contusion (S), muscle contusion control (S_{con}), macrophages depleted (T) and macrophages depleted control (T_{con}) groups. Muscle contusion model was created by high-energy blunt injury. Macrophages depletion model was constructed by injection of clodronate-liposomes. Their gastrocnemius muscles were harvested at the time points of 1, 3, 7 and 14 d post-injury. The changes in skeletal muscle morphology were assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson's trichrome staining. The mRNA and protein levels of inflammatory cytokines, chemokines and oxidative stress factors were analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting, respectively. HE staining results showed that a small amount of regenerating myofibers were observed in the S group (14 d post-injury), whereas a large number of regenerating muscle fibers were observed in the T group. Quantitative analyses showed that the sizes of regenerating myofibers were significantly smaller in the T group as compared with the S group at 14 d post-injury ($P < 0.05$). At the same time, Masson staining

Received 2017-07-13 Accepted 2017-09-19

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 31271273, 31300975), the Doctoral Fund of Ministry of Education of China (No. 20133156120004) and Shanghai Key Laboratory of Human Sport Competence Development and Maintenance (Shanghai University of Sport) (No. 11DZ2261100).

*Corresponding author. Tel: +86-21-51253247; E-mail: xiaoweihua@sus.edu.cn

results showed that macrophage depletion significantly increased the area of fibrosis as compared with the S group at 14 d post-injury ($P < 0.01$). The expression levels of inflammatory cytokines, chemokines, and oxidative stress factors were increased significantly after muscle injury. Moreover, macrophage depletion increased the expressions of inflammatory cytokines, chemokines and oxidative stress factors as compared with the S group during the later stage of injury (7–14 d post-injury). These results suggest that macrophages depletion can aggravate fibrosis and impair muscle regeneration, and inflammatory cytokines, chemokines and oxidative stress factors may be involved in this process.

Key words: skeletal muscle; regeneration; macrophage; inflammatory cytokines; chemokines; oxidative stress factors

骨骼肌损伤是运动医学中常见损伤, 而肌肉钝挫伤则是运动性骨骼肌损伤的常见形式^[1]。一般将骨骼肌损伤修复过程分为3个阶段^[2]。第一阶段出现在损伤早期, 此时肌纤维结构破坏、肿胀坏死并有大量炎性细胞浸润, 称之为损伤炎症期。第二阶段出现在损伤后5~10 d, 此时肌卫星细胞激活、增殖、分化, 与受损伤肌纤维或残存肌管融合, 修复受损骨骼肌, 此阶段称为损伤修复期。第三阶段为组织塑形期, 一般出现在损伤后14~21 d, 此时再生肌纤维成熟, 骨骼肌损伤严重时可出现纤维化^[3]。

骨骼肌损伤后浸润到损伤部位的巨噬细胞有两种基本类型, M1和M2巨噬细胞^[4]。在骨骼肌损伤早期, 主要是M1巨噬细胞浸润到损伤骨骼肌^[5]。M1巨噬细胞可吞噬坏死肌纤维及细胞碎片, 同时可分泌多种促炎细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α , 干扰素- γ , 白介素-6等, 加剧损伤部位的炎症反应^[6]。随后M2巨噬细胞数量增加, 它可抑制M1巨噬细胞活性、抑制炎症反应, 促进损伤骨骼肌再生^[7]。

近年来研究显示, 巨噬细胞是骨骼肌损伤修复所必需的, 巨噬细胞选择性剔除可损害骨骼肌再生^[8]。不仅如此, 选择性剔除巨噬细胞或者抑制巨噬细胞活性还加重损伤骨骼肌纤维化^[9, 10], 而外源性补充巨噬细胞可减轻损伤骨骼肌纤维化^[5]。虽然巨噬细胞在骨骼肌损伤修复过程中发挥重要作用, 但其发挥作用的机制并不明了。炎症因子、趋化因子、氧化应激因子与巨噬细胞关系密切, 在骨骼肌损伤修复过程中表达上调^[6, 7, 11]。因此, 我们推测巨噬细胞剔除可能通过调节炎症因子、趋化因子和氧化应激因子表达而损害骨骼肌再生, 加重损伤骨骼肌纤维化。为了验证这一猜想, 我们建立骨骼肌钝挫伤模型和巨噬细胞剔除模型, 检测损伤骨骼肌中炎症因子、趋化因子和氧化应激因子的表达水平, 探究巨噬细胞在骨骼肌损伤修复中的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组 8周龄清洁级C57BL/6雄性小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。小鼠适应性喂养1周后, 随机分为未损伤对照组($n = 11$)、损伤组($n = 44$)、剔除对照组($n = 11$)和剔除组($n = 44$)。未损伤对照组小鼠不做任何处理, 损伤组小鼠在麻醉后对腓肠肌进行钝挫伤, 剔除对照组小鼠进行巨噬细胞剔除而不损伤腓肠肌, 剔除组小鼠进行巨噬细胞剔除和腓肠肌钝挫伤。小鼠腓肠肌损伤后1、3、7和14 d取材, 每组每个时间点各取11只。未损伤对照组和剔除对照组仅在损伤和建模当天取材。所有动物实验方案均获得上海体育学院动物伦理委员会批准。

1.2 骨骼肌钝挫伤模型 小鼠用10%水合氯醛(400 mg/kg体重)腹腔注射麻醉后, 将其固定于一坚固平台上, 使膝关节伸直 0° , 踝关节背伸 90° 位。将一重16.8 g, 直径1.6 cm的不锈钢钢珠, 置于一管状装置顶端, 自125 cm高处释放, 击中一自制打击装置, 打击装置底端撞击小鼠腓肠肌中部(打击面积 28.26 mm^2)。通过此种打击方法, 可以使骨骼肌出现较大面积血肿, 随后出现大面积骨骼肌再生, 这是制作骨骼肌钝挫伤模型的常用方法^[11, 12]。

1.3 巨噬细胞剔除模型 小鼠腓肠肌钝挫伤前2 d, 腹腔注射2 mg脂质体包被氯膦酸盐(购自Liposoma公司, 荷兰), 随后在损伤前2 h小鼠腹腔注射0.5 mg脂质体包被氯膦酸盐, 之后在损伤后3、6、9和12 d腹腔注射0.5 mg脂质体包被氯膦酸盐。此法可特异性剔除体内巨噬细胞, 而不影响其他细胞, 是巨噬细胞剔除的最常用方法^[9, 13, 14]。

1.4 动物取材 小鼠腓肠肌钝挫伤后1、3、7和14 d, 用10%水合氯醛(400 mg/kg体重)腹腔注射麻醉后颈椎脱位致死, 迅速取双侧腓肠肌。随后, 将腓肠肌置于液氮中速冻后, 转 -80°C 冰箱保存备用。

1.5 HE染色 骨骼肌经4%多聚甲醛固定24 h

后，石蜡包埋，于腓肠肌肌腹中段处横切 3~4 μm 厚的连续薄片，切片脱蜡复水，苏木精染色，1% 盐酸-酒精分化，伊红染色，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。光学显微镜 (Olympus DX70) 下观察并拍摄。采用 Northern Eclipse 软件统计再生肌纤维直径 (中央成核肌纤维的最小直径)，6 个样本 / 每组，每个样本随机选 200 个肌纤维^[15]。

1.6 Masson 染色 Masson 染色 (D206, 购自南京建成生物工程研究所) 后肌纤维呈红色，胶原纤维呈蓝色 (苯胺蓝)，主要用来区分肌纤维和胶原纤维，可反映骨骼肌纤维化程度^[16]。首先，切片脱蜡至水，铁苏木素染 5~10 min，1% 盐酸酒精分化。然后，丽春红酸性品红染液染 5~10 min，磷钼酸溶液处理 5 min，苯胺蓝染液复染 5 min。随后，1% 冰醋酸处理 1 min，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封固。在高倍镜下 (200 倍) 每张切片随机挑选 5 个视野 (6 张切片)，使用 ImageJ 软件圈出染成蓝色的胶原纤维，测量胶原纤维的面积及整个肌纤维的面积，并计算胶原纤维面积占总面积的百分比。

1.7 Real-time PCR 实验 采用 Trizol 法提取腓肠肌中总 RNA。测样品 OD 值 (NanoDrop 2000 分光光度计, Thermo Fisher Scientific, 美国), OD_{260/280} 为 1.8~2.0 的样品可用。取 2 μg RNA, 按 Fermentas 公司第一链 cDNA 合成试剂盒说明在梯度 PCR 仪 (Mastercycler EP, 德国 Eppendorf 公司) 进行反转录合成 cDNA。合成的 cDNA 储存于 -20 °C 冰箱

备用^[17, 18]。Real-time PCR 反应体系包括 12.5 μL 2 × Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix (Thermo Scientific, 美国)、1 μL cDNA、无核酸酶水和 300 nmol/L 的上下游引物。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计并合成，引物序列见表 1。使用荧光定量 PCR 仪 (ABI StepOnePlus Real Time PCR System 7500, 美国) 进行扩增。反应条件为：95 °C 预变性 10 min；95 °C 变性 15 s，60 °C 1 min 退火 / 延伸，共 40 个循环。通过 2^{-ΔΔCt} 方法计算所测样本 mRNA 的相对含量^[19, 20]。

1.8 Western blot 实验 取 60~80 mg 腓肠肌移入 2 mL EP 管中，加入含磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液后，冰浴下剪碎并充分匀浆；4 °C 离心机 12 000 r/min 离心 5 min，取上清液；二喹啉甲酸 (BCA) 法测蛋白样本浓度；SDS-PAGE 电泳，5% 浓缩胶，70 V 恒压电泳 30 min，10% 分离胶，110 V 恒压电泳 90 min 后，用湿转法转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上；PVDF 膜于 5% 脱脂牛奶 (TBST 配置) 中室温封闭 1.5 h，后用 TBSTX 洗膜 3 次；分别加入抗 gp91phox 抗体和抗 GAPDH 抗体 (兔抗小鼠, CST 公司, 稀释比例均为 1:1 000)，4 °C 过夜，TBST 洗膜 3 次，加入 HRP 标记二抗 (1:5 000, Santa Cruz 公司) 室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次。条带滴满 ECL 发光液后，用 Tanon 5200 Multi 全自动化学发光 / 荧光图像分析系统曝光，采用 ImageJ 分析软件测定条带灰度值。

1.9 统计学分析 实验数据以 mean ± SD 表示，

表 1. Real-time PCR 引物序列
Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Target gene	Forward primer sequences	Reverse primer sequences	Product length
TNF-α	5'-CTTCTGTCTACTGAACCTTCGGG-3'	5'-CACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'	163 bp
IFN-γ	5'-GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT-3'	5'-GTC ACC ATCCTTTTGCCAGT-3'	162 bp
IL-6	5'-GAACAACGATGATGCACTTGC-3'	5'-CTTCATGTACTCCAGGTAGCTATGGT-3'	154 bp
IL-10	5'-CAAGGAGCATTGGAATTCCC-3'	5'-GGCCTGTAGACACCTTGGTC-3'	157 bp
gp91phox	5'-CCAGTGAAGATGTGTTCAGCT-3'	5'-GCACAGCCAGTAGAAGTAGAT-3'	155 bp
TGF-β1	5'-TGCGCTTGCAGAGATTAATA-3'	5'-CGTCAAAAAGACAGCCACTCA-3'	135 bp
TWEAK	5'-GCTCCCAAAGCCCCTACTTAT-3'	5'-AGTCCAGCCCATCTCAGT-3'	97 bp
CCL2	5'-GCTCAGCCAGATGCAGTTAAC-3'	5'-CTCTCTCTTGGAGCTTGGTGAC-3'	153 bp
CCL3	5'-ACCATGACACTCTGCAACCA-3'	5'-CCCAGGTCTCTTTGGAGTCA-3'	202 bp
CCL4	5'-CCACTTCTGCTGTTTCTCTTA-3'	5'-CTGTCTGCCTCTTTTGGTCAG-3'	125 bp
CCL8	5'-CTTCTTTGCCTGCTGCTCATAG-3'	5'-CACTTCTGTGTGGGTCTACA-3'	221 bp
CXCL12	5'-ACGGAAGAACCAAAGAGAAAGA-3'	5'-CTCAGACAGCGAGGCACAT-3'	80 bp
CXCR4	5'-CAAGGCCCTCAAGACGACAG-3'	5'-CCCCAAAAGGATGAAGGAG-3'	101 bp
GAPDH	5'-ACTCCACTCACGGCAAATTC-3'	5'-TCTCCATGGTGGTGAAGACA-3'	171 bp

采用 SPSS20.0 软件进行统计检验, 各组胶原纤维面积占总面积百分比之间差异比较采用卡方检验, 基因和蛋白表达情况的差异采用重复测量方差分析, 采用 Bonferroni 法进行事后检验。 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学显著性。

2 结果

2.1 巨噬细胞剔除损害骨骼肌再生

HE 染色结果显示, 未损伤对照组及剔除对照组肌纤维形态规则, 肌细胞核位于肌膜下, 肌纤维结构完整性较好, 无坏死及炎性细胞浸润 (图 1)。骨骼肌损伤后 1 d, 损伤组和剔除组均出现大量肌纤维肿胀坏死, 炎性细胞浸润, 但两组之间并无显著差异。骨骼肌损伤后 3 d, 损伤组骨骼肌中出现少量中央核肌纤维 (再生肌纤维), 但剔除组骨骼肌中未见再生肌纤维, 且存在大量肿胀肌细胞。骨骼肌损伤后 7 d, 损伤组可见大量中央成核肌纤维, 且这些肌纤维体积较大, 并出现较多多核肌纤维融合成的肌管; 而剔除组仅见少量中央成核肌纤维零星分布, 且肌纤维较小。骨骼肌损伤后 14 d, 损伤组中大部分再生肌纤维成熟, 仅有少量再生肌纤维, 而在剔除组中出现大量中央成核肌纤维, 且剔除组

再生肌纤维直径显著低于损伤组 ($P < 0.05$, 图 1), 表明巨噬细胞剔除使骨骼肌再生延迟, 损害骨骼肌再生。

2.2 巨噬细胞剔除加重损伤骨骼肌纤维化

Masson 染色结果显示, 骨骼肌损伤后 14 d, 损伤组骨骼肌中出现蓝色胶原纤维, 剔除组与损伤组相比, 蓝色胶原纤维面积 / 总面积显著增加 ($P < 0.01$, 图 2), 提示巨噬细胞剔除加重损伤骨骼肌纤维化。

2.3 巨噬细胞剔除对损伤骨骼肌炎症因子表达的影响

损伤组促炎细胞因子 TNF- α mRNA 表达水平在损伤后 1 d 即升高到峰值, 且在损伤后 3 和 14 d 持续保持在较高水平 ($P < 0.01$)。而剔除组 TNF- α mRNA 表达的变化与损伤组相似, 在损伤后 1、3、7 和 14 d 表达均显著增加, 且在损伤后 7 d 表达显著高于损伤组 ($P < 0.01$, 图 3A)。剔除组 IFN- γ mRNA 表达的变化与损伤组相似, 在损伤后 1、3、7 和 14 d 表达均显著高于剔除对照组, 在损伤后 14 d 表达显著高于损伤组 ($P < 0.05$, 图 3B)。损伤组 IL-6 mRNA 在损伤早期表达显著增加, 在损伤后 7~14 d 表达恢复正常水平, 但剔除组 IL-6 mRNA 在伤后 7~14 d 表达量仍显著高于剔除对照组 ($P <$

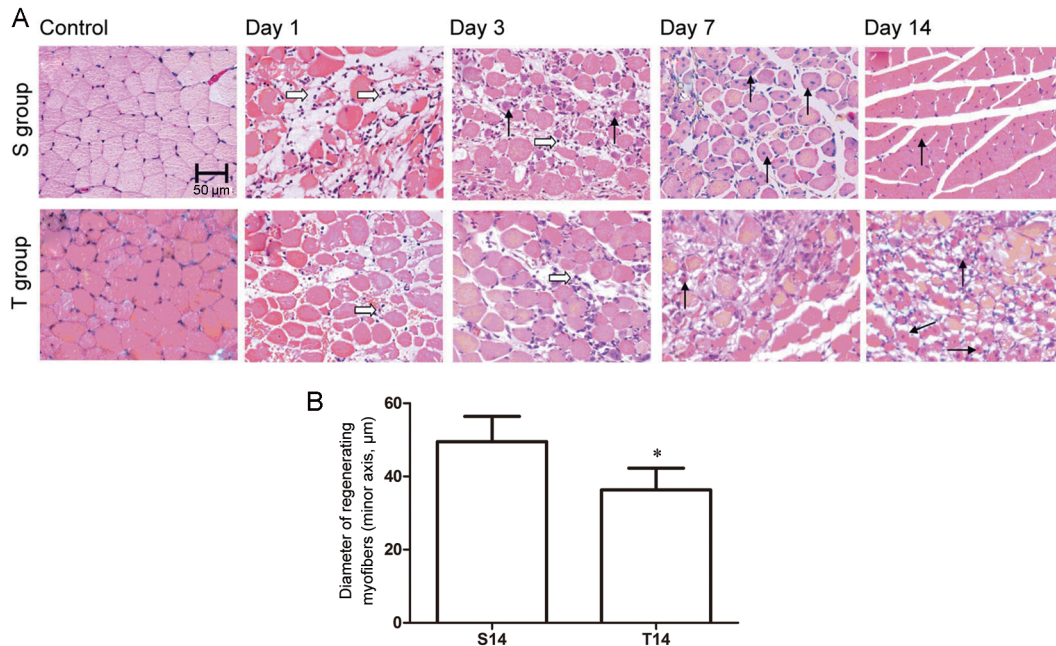


图 1. 骨骼肌 HE 染色

Fig. 1. Skeletal muscle histologic characterization using HE staining. A: Representative micrographic images of skeletal muscle at different time points. B: Diameters of regenerating myofibers 14 d post-injury. S: muscle contusion group; T: muscle contusion and macrophage depleted group. Data are means \pm SD, $n = 6$. * $P < 0.05$ vs S14 (muscle contusion group on day 14 post-injury). Scale bar, 50 μ m. Black arrows stand for centralized nuclei, and black hollow arrows stand for inflammatory cells.

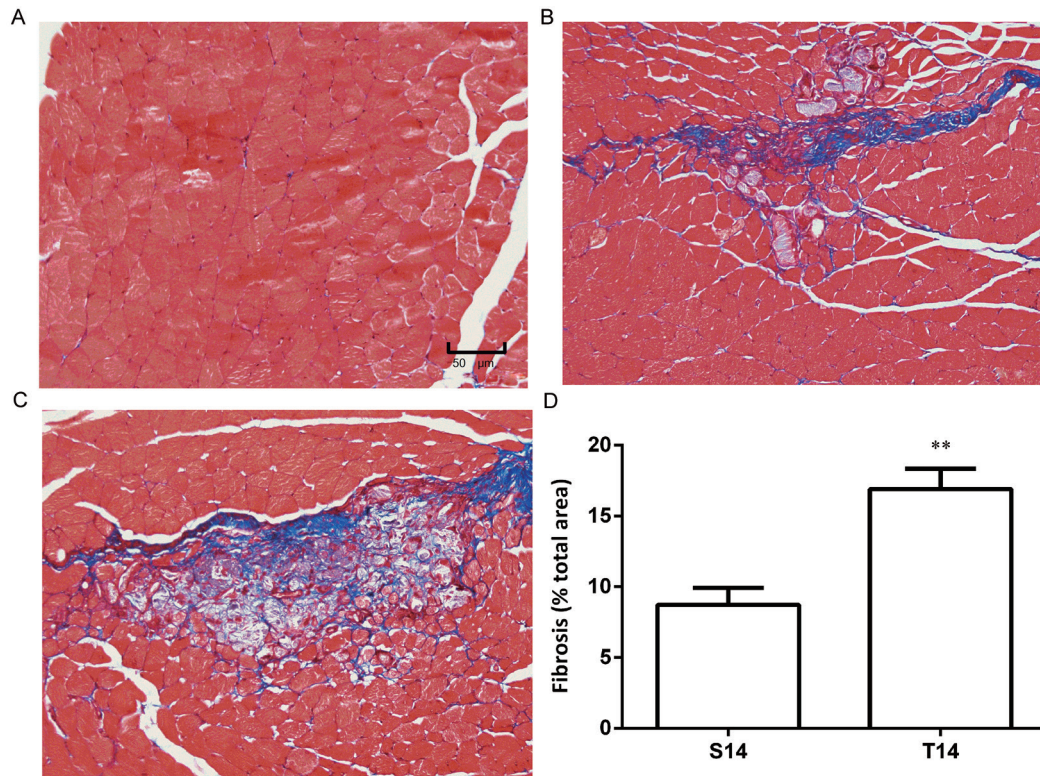


图 2. Masson染色评定伤后14 d损伤骨骼肌瘢痕组织的形成

Fig. 2. Histologic evaluation of the formation of scar tissue 14 days after injury by Masson's trichrome staining. A: Uninjured control group; B: Muscle contusion (S) group (14 days post-injury); C: Muscle contusion and macrophage depleted (T) group (14 days post-injury); Scale bar, 50 μ m. D: Quantification of the scar tissue area in injured skeletal muscle. Data are means \pm SD, $n = 8$. ** $P < 0.01$ vs S14 (muscle contusion group on day 14 post-injury).

0.05), 且在损伤后 14 d 显著高于损伤组 ($P < 0.05$, 图 3C)。抑炎细胞因子 IL-10 mRNA 水平在损伤后 1~7 d 表达量显著增加 ($P < 0.01$), 损伤后 14 d 基本恢复正常水平; 巨噬细胞剔除后, IL-10 mRNA 水平在损伤后 1 d 其表达显著低于损伤组 ($P < 0.05$), 而在损伤后 7~14 d 表达显著高于剔除对照组 ($P < 0.01$, 图 3D)。损伤组 TGF- β 1 mRNA 水平在损伤后 1、3 和 7 d 表达均显著增加 ($P < 0.01$), 剔除组仅在损伤后 3 d 表达显著增加 ($P < 0.01$), 且剔除组 TGF- β 1 mRNA 在损伤后 1 d 表达显著低于损伤组 ($P < 0.05$), 而在损伤后 14 d 表达显著高于损伤组 ($P < 0.01$, 图 3E)。损伤组肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂 (TNF-like weak inducer of apoptosis, TWEAK) mRNA 水平在损伤后 3 和 7 d 表达均显著增加, 剔除组 TWEAK mRNA 水平在损伤后 1 和 7 d 表达显著下降, 且剔除组 TWEAK mRNA 水平在损伤后 1 和 7 d 表达显著低于损伤组, 而在损伤前及损伤后 14 d 表达显著高于损伤组 (图 3F)。

2.4 巨噬细胞剔除对损伤骨骼肌趋化因子表达的影响

荧光定量 PCR 结果显示, 损伤组骨骼肌趋化因子 (CCL2、CCL3、CCL8 和 CXCR4) mRNA 水平在损伤后 1~7 d 表达均显著增加, 在损伤后 14 d 基本回到正常水平 (图 4A、B、D、F); 而趋化因子 CCL4 mRNA 在损伤后 14 d 表达显著低于未损伤对照组 ($P < 0.01$, 图 4C); 损伤组趋化因子 CXCL12 仅在伤后 7 d 表达显著增加 ($P < 0.01$, 图 4E)。

巨噬细胞剔除组中 CCL2 在伤后 1、3 和 7 d 表达均显著增加, 且在伤后 14 d 表达显著高于损伤组 ($P < 0.05$, 图 4A)。剔除组 CCL3 表达与 CCL2 表达相似, 损伤后 3 和 7 d 表达显著增加 ($P < 0.01$), 在损伤后 3 和 14 d 表达显著高于损伤组 (均 $P < 0.05$) (图 4B)。剔除组 CCL4 mRNA 表达与 CCL2、CCL3 略有不同, 在损伤后 1 d 表达显著下降 ($P < 0.01$), 损伤后 14 d 表达显著增加 ($P < 0.01$), 且在损伤后 14 d 的表达显著高于损伤组 ($P < 0.01$, 图 4C)。CCL8 mRNA 表达变化亦是伤后表达显著增加, 但是巨噬

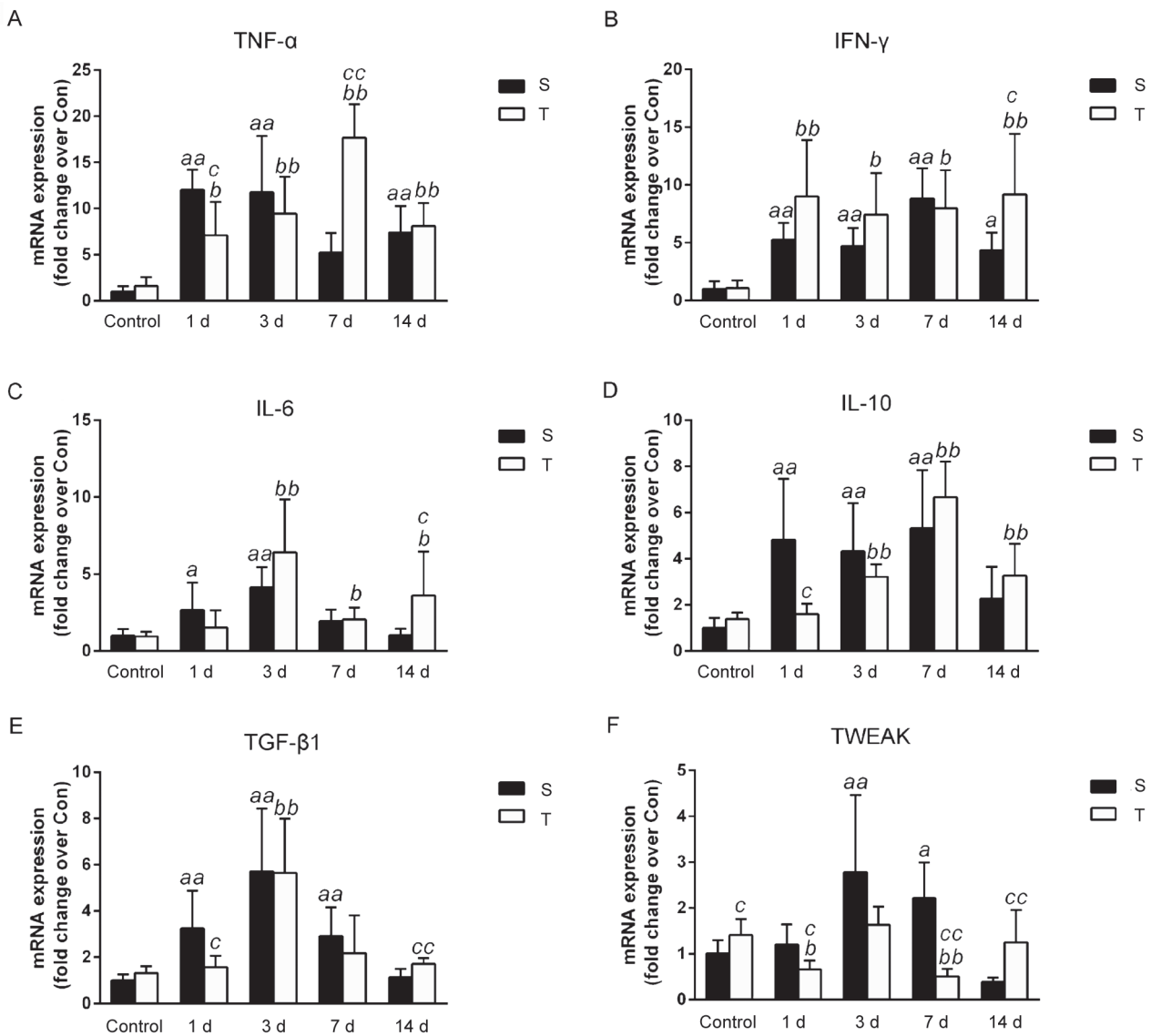


图 3. 巨噬细胞剔除对损伤骨骼肌炎症因子表达的影响

Fig. 3. Effects of macrophage depletion on the mRNA expressions of inflammatory cytokines detected by RT-PCR. A: TNF- α ; B: IFN- γ ; C: IL-6; D: IL-10; E: TGF- β 1; F: TWEAK. S: muscle contusion group; T: muscle contusion and macrophage depleted group. Data are means \pm SD, $n = 8$. ^a*P* < 0.05, ^{aa}*P* < 0.01 vs uninjured control group; ^b*P* < 0.05, ^{bb}*P* < 0.01 vs depleted control group; ^c*P* < 0.05, ^{cc}*P* < 0.01 vs S group at the same time point.

细胞剔除后 1 和 3 d 表达显著低于损伤组, 而 14 d 表达显著高于损伤组 ($P < 0.01$, 图 4D)。剔除组 CXCL12 mRNA 在损伤后 7 和 14 d 表达显著增加 ($P < 0.01$), 且在伤后 14 d 表达显著高于损伤组 ($P < 0.01$, 图 4E)。剔除组 CXCR4 mRNA 在损伤后 3、7 和 14 d 表达均显著增加 ($P < 0.01$), 且在损伤后 14 d 表达显著高于损伤组 ($P < 0.05$, 图 4F)。

2.5 巨噬细胞剔除对损伤骨骼肌氧化应激因子表达的影响

荧光定量 PCR 结果显示, 损伤组氧化应激因子

gp91phox mRNA (NADPH 氧化酶关键亚基) 在损伤后 1、3 和 7 d 表达量均显著增加, 且在损伤后 3 d 达到峰值 ($P < 0.01$)。剔除组 gp91phox mRNA 在损伤后 3 和 14 d 表达均显著增加 ($P < 0.01$), 且与损伤组相比, 在损伤 1、3 和 7 d 表达虽显著下降, 但伤后 14 d 表达却显著高于损伤组 ($P < 0.05$, 图 5A)。为了进一步探究巨噬细胞剔除对损伤骨骼肌氧化应激因子表达的影响, 本研究通过 Western blotting 检测骨骼肌损伤修复过程中 gp91phox 蛋白表达变化。结果显示, 损伤组 gp91phox 蛋白表达

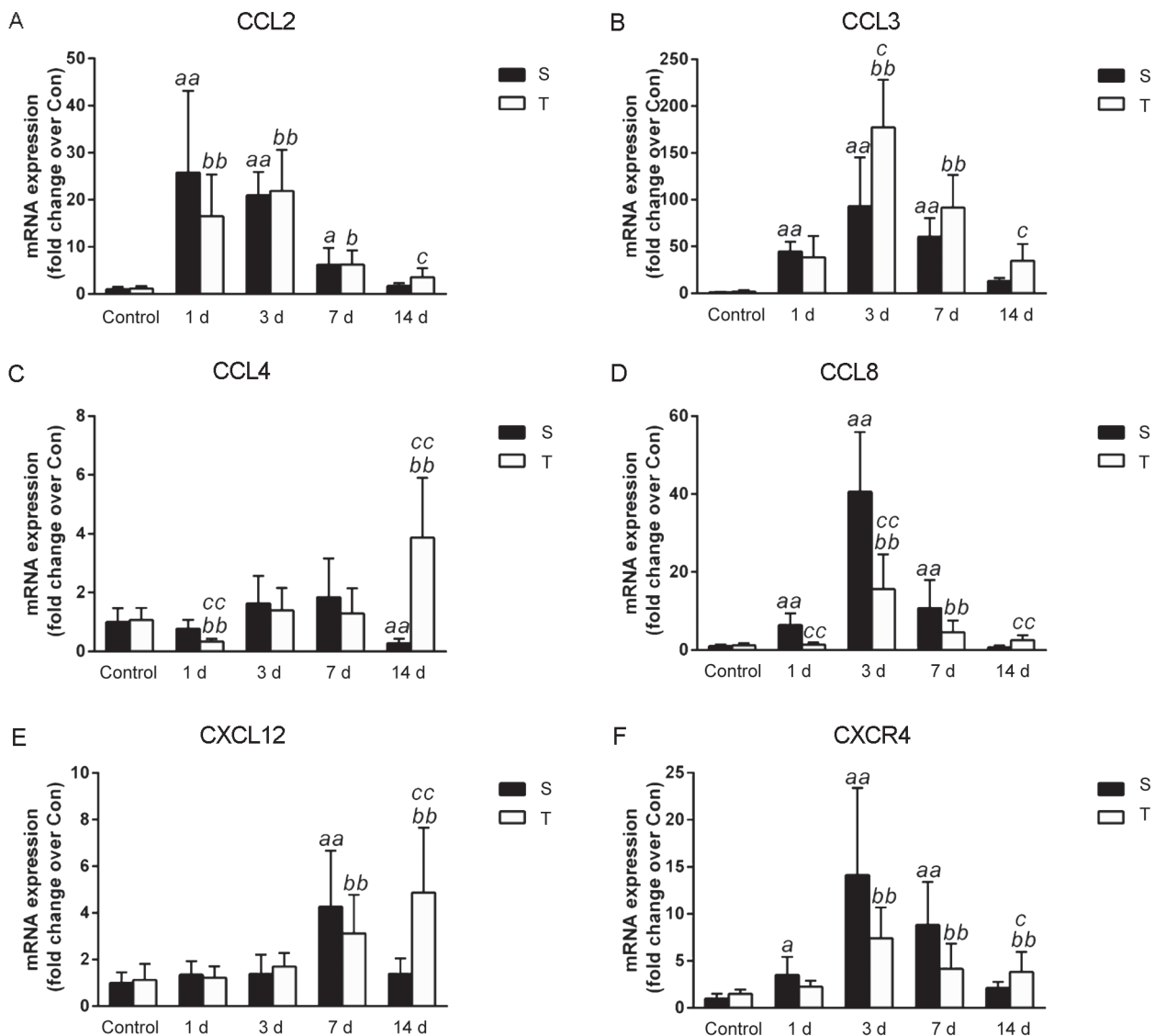


图 4. 巨噬细胞剔除对损伤骨骼肌趋化因子表达的影响

Fig. 4. Effects of macrophage depletion on the mRNA expressions of chemokines in injured skeletal muscle detected by RT-PCR. A: CCL2; B: CCL3; C: CCL4; D: CCL8; E: CXCL12; F: CXCR4. S: muscle contusion group; T: muscle contusion and macrophage depleted group. Data are means \pm SD, $n = 8$. ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$ vs uninjured control group; ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ vs depleted control group; ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$ vs S group at the same time point.

变化与基因表达变化相似，在伤后 3 d 蛋白表达量显著增加并达到峰值 ($P < 0.01$)。巨噬细胞剔除组 gp91phox 蛋白表达虽有升高，但与剔除对照组相比并无显著差异。但在伤后 14 d，剔除组 gp91phox 蛋白表达显著高于损伤组 ($P < 0.05$ ，图 5B)。

3 讨论

本研究结果显示，骨骼肌损伤后 1 和 3 d 肌纤维结构破坏、大量炎性细胞浸润。在损伤后 3 d 出现少量中央成核肌纤维 (再生肌纤维)，损伤后 7 d

出现大量再生肌纤维，损伤后 14 d 大部分再生肌纤维已成熟，但仍有少量再生肌纤维。此结果同其他钝挫伤模型^[21]及本研究组前期实验结果相似^[12]，提示骨骼肌钝挫伤模型成功建立。同时，本研究组前期采用流式细胞术检测脂质体包被氯膦酸盐处理后损伤骨骼肌中巨噬细胞相对含量，结果同其他研究结果相似，显示脂质体包被氯膦酸盐处理组中损伤骨骼肌巨噬细胞含量显著降低^[9, 14]。同时，本研究组曾通过 RT-PCR 检测损伤骨骼肌中 M1 巨噬细胞标志物 CD68 和 M2 巨噬细胞标志物 CD206 的表

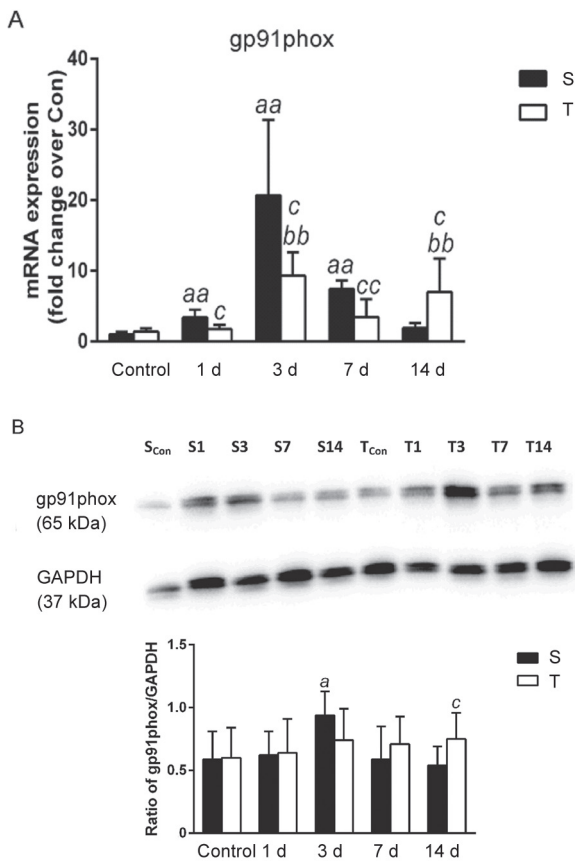


图 5. 细胞剔除对损伤骨骼肌氧化应激因子表达的影响
Fig. 5. Effects of macrophage depletion on the expression of oxidative stress factors in injured skeletal muscle. A: mRNA levels of gp91phox in skeletal muscle post-injury; B: Protein levels of gp91phox in skeletal muscle post-injury. S: muscle contusion group; T: muscle contusion and macrophage depleted group. Data are means \pm SD, $n = 8$. ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$ vs uninjured control group; ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ vs depleted control group; ^c $P < 0.05$, ^{cc} $P < 0.01$ vs S group at the same time point.

达, 结果显示脂质体包被氯膦酸盐处理组中巨噬细胞标志物表达显著降低^[13], 表明本研究所用的巨噬细胞剔除模型是可靠的。

本研究的形态学结果显示, 与损伤组相比, 巨噬细胞剔除组再生肌纤维直径较小、纤维化面积更大, 表明剔除巨噬细胞加剧了纤维化修复, 损害了骨骼肌再生。对相关因子的研究表明, 骨骼肌损伤早期(损伤后 1~3 d), 多种炎症因子(TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10、TGF- β 1 和 TWEAK)均显著上调表达, 且损伤后期(伤后 7~14 d) TNF- α 、IFN- γ 和 TGF- β 1 仍处于高表达状态, 提示骨骼肌损伤程度较重, 损伤修复未完成^[12]。这些炎症因子在骨骼肌损伤修复中起重要作用, 如 IFN- γ 可提高中性粒细胞对趋化

因子的敏感度, 促进其侵入受损组织, 放大机体免疫反应, 加剧骨骼肌损伤^[3]。TNF- α 可由 M1 巨噬细胞产生, 可促进骨骼肌损伤后 IL-6 的分泌, 加重机体炎症反应、抑制损伤骨骼肌再生^[23]。此外, TNF- α 和 TGF- β 1 亦是重要的促纤维化因子, 其表达上调可加重损伤骨骼肌纤维化, 而减少或抑制其表达均可抑制损伤骨骼肌纤维化^[24, 25]。本研究结果显示, 相比于损伤组, 剔除组巨噬细胞上述炎症因子表达在损伤后期可进一步上调, 提示巨噬细胞剔除损害骨骼肌再生过程中炎症因子可能发挥了重要作用。

我们还对趋化因子的表达规律进行了探究。结果显示, 骨骼肌挫伤后, CCL2、CCL3、CCL4 和 CCL8 mRNA 均迅速上调表达, 但在损伤后 14 d 基本恢复正常水平。这些趋化因子在骨骼肌损伤修复过程中具有重要作用, 可在骨骼肌损伤后募集单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞等向损伤处游移, 参与组织修复过程^[27–29]。当其表达被抑制时, 骨骼肌再生过程受损。如敲除小鼠 CCL2 基因, 可使骨骼肌缺血损伤后巨噬细胞浸润显著减少, 损害骨骼肌再生^[30]。我们的结果同 Warren 等^[28]相似, 他们发现 CCL2、CCL3 和 CCL4 mRNA 在小鼠胫骨前肌冻伤后 24 h 显著增加, 在伤后 3~7 d 进行性下降, 但仍显著高于对照组, 伤后 14 d 恢复正常水平。此外, 本研究结果还显示, 剔除巨噬细胞可显著上调损伤骨骼肌中 CCL2、CCL3、CCL4、CCL8、CXCL12 以及 CXCR4 mRNA 在损伤后期的表达, 而单纯损伤组多数趋化因子此时均已恢复至正常水平。再生后期阶段趋化因子高表达可能有损骨骼肌再生, 因为这些因子可以促进单核细胞、T 细胞等的募集, 而 T 细胞可释放多种细胞因子, 导致肌纤维坏死和炎症反应^[31]。因此, 再生后期趋化因子过表达也可能参与了剔除巨噬细胞损害骨骼肌再生这一过程。

此外, 我们还对骨骼肌损伤后氧化应激水平进行了研究。结果显示, 骨骼肌钝挫伤后 3 d NADPH 氧化酶关键亚基 gp91phox mRNA 及蛋白水平均显著提高, 提示损伤骨骼肌氧化应激加强^[34]。NADPH 氧化酶可介导 ROS 生成, 在组织氧化应激中发挥重要作用^[35], 而 gp91phox 是 NADPH 氧化酶重要的膜结合亚基, 常作为 NADPH 氧化酶和氧化应激水平的检测标志物^[36–39]。本研究中上调表达的 gp91phox 可能来自于浸润的中性粒细胞和巨噬细胞, 因为骨骼肌损伤后, 中性粒细胞和巨噬细胞一般会浸润增多, 二者可由 NADPH 氧化酶介导产生

大量 ROS, 促进炎症反应以及清除坏死组织, 参与损伤骨骼肌再生^[41]。但氧化应激水平过高则不利于损伤骨骼肌修复, 如 Ghaly 等^[36]发现, 损伤骨骼肌中 gp91phox 过度增高, 可使骨骼肌氧化应激加强, 损伤后修复受损, 同时伴随较严重的骨骼肌纤维化。离体状态下, 骨骼肌细胞 NADPH 氧化酶活性提高, ROS 产生增加, 可促进成肌细胞产生较多的胶原蛋白、纤连蛋白, 促进骨骼肌纤维化^[42]。本研究结果显示, 与损伤组相比, 剔除组 gp91phox mRNA 及蛋白水平在伤后 14 d 仍处于高表达状态。gp91phox 表达增加, 提示 NADPH 氧化酶活性提高, ROS 生成增加, 而 ROS 生成增加可进一步提高损伤处炎症反应, 加剧损伤骨骼肌纤维化, 不利于损伤骨骼肌再生^[41]。这些结果提示, 剔除巨噬细胞可能通过调节损伤后期 NADPH 氧化酶活性, 提高损伤骨骼肌氧化应激水平, 从而损害骨骼肌再生、加重纤维化^[36]。

综上所述, 本研究结果显示骨骼肌损伤修复过程中多种炎症因子、趋化因子和氧化应激因子表达上调, 剔除巨噬细胞后, 上述因子在损伤后期进一步上调表达, 且骨骼肌再生能力受损, 纤维化修复加剧。这些结果表明巨噬细胞在骨骼肌损伤修复过程中发挥了重要作用, 炎症和氧化应激可能参与了剔除巨噬细胞损害骨骼肌再生这一过程。

参考文献

- Delos D, Leineweber MJ, Chaudhury S, Alzoobae S, Gao Y, Rodeo SA. The effect of platelet-rich plasma on muscle contusion healing in a rat model. *Am J Sports Med* 2014; 42(9): 2067–2074.
- Liu XG (刘晓光), Xiao WH, Zhao LL, Tian XY. Research progress of mesenchymal stem cell transplantation in skeletal muscle injury. *Chin J Reh Med (中国康复医学杂志)* 2015; 30(12): 1313–1317 (in Chinese with English abstract).
- Tidball JG. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* 2011; 1(4): 2029–2062.
- Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol* 2013; 93(6): 875–881.
- Novak ML, Weinheimer-Haus EM, Koh TJ. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury. *J Pathol* 2014; 232(3): 344–355.
- Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Munoz-Canoves P. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 491497.
- Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298(5): R1173–R1187.
- Wang H, Melton DW, Porter L, Sarwar ZU, McManus LM, Shireman PK. Altered macrophage phenotype transition impairs skeletal muscle regeneration. *Am J Pathol* 2014; 184(4): 1167–1184.
- Summan M, Warren GL, Mercer RR, Chapman R, Hulderman T, Van Rooijen N, Simeonova PP. Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290(6): R1488–R1495.
- Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, Ito T, Uezumi A, Hayashi S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res* 2008; 314(17): 3232–3244.
- Xiao W, Liu Y, Luo B, Zhao L, Liu X, Zeng Z, Chen P. Time-dependent gene expression analysis after mouse skeletal muscle contusion. *J Sport Health Sci* 2016; 5(1): 101–108.
- Liu XG (刘晓光), Zhao LL, Zeng ZG, Zheng LF, Zhou YZ, Chen PJ, Xiao WH. Expression of muscle regeneration regulatory factors and angiogenesis factors in skeletal muscle injury and repair. *Chin J Reh Med (中国康复医学杂志)* 2016; 31(12): 1294–1300 (in Chinese with English abstract).
- Liu X, Liu Y, Zhao L, Zeng Z, Xiao W, Chen P. Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: The roles of regulatory factors for muscle regeneration. *Cell Biol Int* 2017; 41(3): 228–238.
- Xiao W, Liu Y, Chen P. Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: the roles of pro-fibrotic factors, inflammation, and oxidative stress. *Inflammation* 2016; 39(6): 2016–2028.
- Shen W, Li Y, Zhu J, Schwendener R, Huard J. Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. *J Cell Physiol* 2008; 214(2): 405–412.
- Zhang J (张健), Chen SY, Li YX, Li HY. Effects of astragaloside and tanshinone IIA injection on the skeletal muscle morphology in rats with acute muscle contusion. *Chin J Sports Med (中国运动医学杂志)* 2011; 30(03): 270–274 (in Chinese with English abstract).
- Xiao W, Chen P, Liu X, Zhao L. The impaired function of macrophages induced by strenuous exercise could not be ameliorated by BCAA supplementation. *Nutrients* 2015; 7(10): 8645–8656.
- Xiao W, Chen P, Dong J, Wang R, Luo B. Dietary glutamine supplementation partly reverses impaired macrophage function resulting from overload training in rats. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2015; 25(2): 179–187.

- 19 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T) (-Delta Delta C) method. *Methods* 2001; 25(4): 402–408.
- 20 Xiao W, Chen P, Dong J. Effects of overtraining on skeletal muscle growth and gene expression. *Int J Sports Med* 2012; 33(10): 846–853.
- 21 Ota S, Uehara K, Nozaki M, Kobayashi T, Terada S, Tobita K, Fu FH, Huard J. Intramuscular transplantation of muscle-derived stem cells accelerates skeletal muscle healing after contusion injury via enhancement of angiogenesis. *Am J Sports Med* 2011; 39(9): 1912–1922.
- 22 Villalta SA, Deng B, Rinaldi C, Wehling-Henricks M, Tidball JG. IFN-gamma promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *J Immunol* 2011; 187(10): 5419–5428.
- 23 Lima AA, Spinola LG, Bacchan G, Correia K, Oliva M, Vasconcelos JF, Soares MB, Reis SR, Medrado AP. Evaluation of corticosterone and IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha expression after 670-nm laser photobiomodulation in rats. *Lasers Med Sci* 2014; 29(2): 709–715.
- 24 Urso ML. Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: benefit or detriment? *J Appl Physiol* (1985) 2013; 115(6): 920–928.
- 25 Ermolova NV, Martinez L, Vetrone SA, Jordan MC, Roos KP, Sweeney HL, Spencer MJ. Long-term administration of the TNF blocking drug Remicade (cV1q) to mdx mice reduces skeletal and cardiac muscle fibrosis, but negatively impacts cardiac function. *Neuromuscul Disord* 2014; 24(7): 583–595.
- 26 Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol* 2012; 189(7): 3669–3680.
- 27 Boyd JH, Divangahi M, Yahiaoui L, Gvozdic D, Qureshi S, Petrof BJ. Toll-like receptors differentially regulate CC and CXC chemokines in skeletal muscle via NF-kappaB and calcineurin. *Infect Immun* 2006; 74(12): 6829–6838.
- 28 Warren GL, O'Farrell L, Summan M, Hulderman T, Mishra D, Luster MI, Kuziel WA, Simeonova PP. Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(5): C1031–C1036.
- 29 Yahiaoui L, Gvozdic D, Danelou G, Mack M, Petrof BJ. CC family chemokines directly regulate myoblast responses to skeletal muscle injury. *J Physiol* 2008; 586(16): 3991–4004.
- 30 Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol* 2007; 81(3): 775–785.
- 31 Feng LQ (冯利强), Zeng HJ, Liu XH, Chen R, Huang WY, Liao H. Acute myoinjury induce the intramuscular infiltration of CD8⁺ CTL cells. *Chin J Clin Anat* (中国临床解剖学杂志) 2012; 30(3): 307–310 (in Chinese with English abstract).
- 32 Zhang J, Xiao Z, Qu C, Cui W, Wang X, Du J. CD8 T cells are involved in skeletal muscle regeneration through facilitating MCP-1 secretion and Gr1(high) macrophage infiltration. *J Immunol* 2014; 193(10): 5149–5160.
- 33 Ochoa O, Sun D, Reyes-Reyna SM, Waite LL, Michalek JE, McManus LM, Shireman PK. Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2^{-/-} mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293(2): R651–R661.
- 34 Whitehead NP, Yeung EW, Froehner SC, Allen DG. Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. *PLoS One* 2010; 5(12): e15354.
- 35 Xiao W, Chen P, Wang R, Dong J. Overload training inhibits phagocytosis and ROS generation of peritoneal macrophages: role of IGF-1 and MGF. *Eur J Appl Physiol* 2013; 113(1): 117–125.
- 36 Ghaly A, Marsh DR. Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. *Int J Exp Pathol* 2010; 91(3): 244–255.
- 37 Chan EC, Jiang F, Peshavariya HM, Dusting GJ. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol Ther* 2009; 122(2): 97–108.
- 38 Zhang Q, Wang Y, Man L, Zhu Z, Bai X, Wei S, Liu Y, Liu M, Wang X, Gu X, Wang Y. Reactive oxygen species generated from skeletal muscles are required for gecko tail regeneration. *Sci Rep* 2016; 6: 20752.
- 39 Ghaly A, Marsh DR. Aging-associated oxidative stress modulates the acute inflammatory response in skeletal muscle after contusion injury. *Exp Gerontol* 2010; 45(5): 381–388.
- 40 Nguyen HX, Tidball JG. Null mutation of gp91phox reduces muscle membrane lysis during muscle inflammation in mice. *J Physiol* 2003; 553(Pt 3): 833–841.
- 41 Kozakowska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Jozkowicz A, Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil* 2015; 36(6): 377–393.
- 42 Cabello-Verrugio C, Acuna MJ, Morales MG, Becerra A, Simon F, Brandan E. Fibrotic response induced by angiotensin-II requires NAD(P)H oxidase-induced reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 410(3): 665–670.