

· 综述 ·

生肌调节因子在肌肉发育、发生和再生中的作用

徐齐宇 王锋 张全兵 周云

安徽医科大学第二附属医院康复医学科, 合肥 230000

通信作者: 周云, Email: zhoukeg@163.com

【摘要】 生肌调节因子是肌细胞发生过程中的重要因子, 不仅在肌肉的发育、发生中发挥着作用, 在指导肌卫星细胞特化、骨骼肌再生中也起着重要的作用。尽管研究者们对这些因子进行了大量的研究, 但是它们的功能存在重叠, 确切作用机制仍不清楚。本文以生肌调节因子的分子结构为基础, 对其在肌肉发育发生、控制卫星细胞功能和再生中的作用进行综述, 以期对肌肉骨骼疾病的治疗提供新的思路。

【关键词】 成肌分化因子; 肌源性因子 5; 肌细胞生成素; 生肌调节因子 4; 肌再生

基金项目: 安徽省重点研究和开发计划项目 (201904a07020067); 安徽医科大学校科研基金项目 (2018xkj050)

Funding: Anhui Key Research and Development Program (201904a07020067); Anhui Medical University Research Foundation (2018xkj050)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.06.024

成肌分化因子 (myogenic differentiation, MyoD) 是肌源性分化过程一个里程碑式的发现。Davis 等^[1]分离出成肌细胞的 cDNA, 不仅能促使肌卫星细胞 (satellite cells, SCs) 转化为肌细胞, 还能把非干细胞 (成纤维细胞、脂肪细胞) 转化为肌细胞, 这种 cDNA 被称为 MyoD。此后 MyoD 的序列同源相继被发现, 分别被鉴定并命名为肌源性因子 5 (myogenic factor 5, Myf5)、肌细胞生成素 (myogenin, MyoG) 和生肌调节因子 4 (myogenic regulatory factors 4, MRF4), 这 4 种转录因子共同构成生肌调节因子 (myogenic regulatory factors, MRFs) 家族^[2]。MRFs 对肌肉谱系的多个点起作用, 协调成肌细胞增殖、退出细胞周期, 到成肌细胞融合和肌管成熟等骨骼肌发育的各个阶段^[3]。

MRFs 直接与 DNA 结合调控骨骼肌的发育, 是肌肉转录网络的核心。MRFs 在肌肉发生过程中具有特殊性——只在肌源性细胞中表达, 但其在蛋白结构域水平以及表达的时间和阶段上存在差异^[4]。然而到目前为止, 对于这些差异及 MRFs 确切机制的研究仍然很少。本文以生肌调节因子的结构为基础, 对其在肌肉发育、发生和再生中的作用, 以及在肌肉骨骼疾病中的应用等进行综述。

MRFs 的分子结构

MRFs 蛋白质序列高度保守, 含有 3 个结构域: 基本螺旋-环-螺旋 (b-HLH) 结构域, 氨基末端 (N-末端) 和羧基末端 (C-末端) 反式激活结构域。b-HLH 结构域与顺式调节元件中特定序列 E-box (CANNTG) 结合, 这种序列普遍存在于不同下游肌肉和非肌肉特异性基因的启动子和增强子区域, 但只有特定的序列与激活转录相关 (如, 与 MyoD 结合的 CAGGTG)^[5]。

MRFs 的蛋白质序列分析表明, b-HLH 结构域蛋白高度保守, N-末端和 C-末端的区域在氨基酸序列上存在着很大的差异。b-HLH 结构域相似性是 MRFs 功能高度重叠的基础, 其他结构域的差异使各 MRF 获得不同的作用^[4]。Ishibashi 等^[6]将 MyoD 和 Myf5 分别导入 MyoD/Myf5 双载体缺失 (MyoD-/Myf5-)

的成纤维细胞系, 发现 MyoD 在诱导成肌细胞分化表达方面优于 Myf5, 而 Myf5 在促进成肌细胞增殖方面效率更高。这种差异可以用交换策略来解释, 通过互换 MyoD 与 Myf5 N-末端和 C-末端区域构建嵌合的 MRF, 仅交换 C-末端或 N-末端时不足以诱导分化, 而当 MyoD 的 N-末端和 C-末端同时交换时, 就产生了类似全长 MyoD 的活性, 说明 MyoD 的 N-末端和 C-末端通过协同的方式诱导分化。进一步研究发现, MyoD 和 Myf5 结合相同的位点诱导组蛋白乙酰化, 但是功能不同。这是因为与 Myf5 相比, MyoD 拥有更强的激活结构域, 诱导组蛋白的乙酰化需要招募 RNA 聚合酶 II (Pol II), 从而有力地激活基因转录^[7]。不仅 MyoD/Myf5 结构交换后功能发生改变, MyoD 与 myogenin 结构交换后功能也发生变化。MyoD 的 C/H 结构域和 Helix III 结构域与 myogenin 交换, 增强了 myogenin 启动内源基因转录的能力^[8]。与此相似, MRF4 激活域和相关的氨基末端与 MyoD 能够相互替代, 但交换后靶特异性降低, 因为 MyoD-MRF4 嵌合体与野生型 MRF4 诱导的肌肉基因类型不同^[9]。MRF4 既可以作为转录激活因子, 也可以作为抑制因子。Moretti 等^[10]发现, MRF4 通过抑制肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor, MEF2) 的活性, 负性调节成人骨骼肌生长。为了确定 MRF4 的结构域是否参与 MEF2 的抑制, 研究者们交换了 myogenin 与 MRF4 的 C-末端结构域, 发现只有含有 MRF4 C-末端的嵌合转基因拥有抑制活性。综上所述, b-HLH 结构域高度保守是 MRFs 功能的基础, C-末端与 N-末端的不同导致 MRFs 的功能差异, 不同的反式激活结构域在调节特定位置基因的靶向方面发挥了作用。

MRFs 在胚胎发育肌生成中的作用

一、MRFs 控制发育中肌肉发生的各个阶段

MRFs 在肌肉发生的过程中参与组成了精确复杂的调控网络, 具有不同的时空表达。脊椎动物头部的骨骼肌起源于未分段的颅骨中胚层, 躯干和四肢的肌肉组织来自体节^[11]。中胚层

旁的体节前后成对排列,位于神经管和脊索两侧。这些暂时性上皮球体最初是均匀的,几乎没有明显的极性或分化,但在外部信号的影响下,腹内侧区从上皮转变为间质,形成了为椎骨和肋骨提供细胞的生骨节。小鼠胚胎发育期第 8.0 天首次检测到 MRFs,表达 Myf5/MRF4 的细胞分层并迁移到生皮层下形成肌节,最终形成身体和四肢的骨骼肌^[12-13]。在胚胎发育期第 10.5 天,背侧内胚层的 Wnt 信号和外侧中胚层的 BMP4 信号诱导 MyoD 的表达,这些细胞通过 MRFs 的激活,与表达配对盒基因(Pax)3/Pax7 干细胞的后代一起促进肌节的形成^[14]。myogenin 和 MRF4 的转录本(通过转录形成的一种或多种可供编码蛋白质的成熟的 mRNA)分别在胚胎发育期第 8.5 天和 9.0 天处被检测到。MRF4 转录本在肌肉谱系的确定和分化中具有双重作用,表现为双相表达,在胚胎发育期第 9.0 天处上调,在 11.5 天处下调^[10,15]。

初级肌肉发生在胚胎发育期第 14.5 天前完成,最初的胚胎成肌细胞经过几次分化,形成初级肌肉纤维。次级肌肉发生在胚胎发育期第 16.5 天左右,表达 Myf5/MyoD 的成肌细胞开始增殖,在 myogenin 的指引下进入分化程序,并重新表达 MRF4,在初级肌肉纤维的基础上形成次级肌纤维,这一过程在小鼠出生时基本完成^[16]。出生后早期小鼠的 SCs 在 MRFs 的控制下,通过肌纤维增生和肥大对肌肉的生长提供新的肌核。3 周后,肌肉的生长只能通过肌纤维肥大来维持。卫星细胞在此期间进入静止状态,下调除 Myf5 以外的 MRFs 的表达,但卫星细胞仍可以被激活^[17]。因此,MRFs 通过不同时空表达控制着肌肉发生的各个阶段。

二、MyoD、Myf5、MRF4 的功能存在重叠

MRFs 被分为早期转录因子(MyoD、Myf5)和晚期转录因子(MRF4 和 myogenin),前者参与肌源性细胞的定型和增殖,后者调节定型细胞的终末分化^[7]。然而,更多的证据表明^[18-20],MRFs 在功能上存在重叠,基因失活技术有助于确定它们在肌肉发生中的作用,并探究它们是如何调节彼此表达的。

在单基因敲除模型中,MyoD 缺失(MyoD⁻)小鼠可生育存活,小鼠 Myf5 mRNA 数量增加,提示 Myf5 在骨骼肌发育中可以替代 MyoD 的缺失^[18]。与 MyoD⁻小鼠相似,myf5⁻小鼠 MyoD 和 myogenin 可以正常表达,表明 MyoD 的激活不依赖于 Myf5,MyoD 可以在一定程度上替代 Myf5^[19]。但不是每种 MRF 基因敲除都能得到相似的结果,MRF4、myogenin 基因缺失的小鼠在出生时死亡^[20-21]。

在双基因敲除模型中,Myf5/MyoD 都缺失时,大多数肌源性程序会受到严重影响,MRF4 能够补偿和启动有限的肌肉生成^[22]。Myf5/MRF4 缺失的情况下,初级肌节的形成延迟了 1~2 d,MyoD 仍可以进行肌肉发生。MRF4⁻/MyoD⁻小鼠在出生时死亡,表现出与 myogenin-小鼠高度相似的表型^[23]。在这些基因缺陷小鼠中,myogenin 仍可以表达,但不足以支持体内正常的肌肉生成。

综上所述,MyoD、Myf5、MRF4 的功能存在重叠,在转录网络中协作,调节胚胎发育期间成肌细胞的变化。相比之下,myogenin 在胚胎肌肉发生中具有独特的作用,缺失 myogenin 小鼠无法进行胚胎肌肉发生,几乎没有分化的肌纤维存在。

MRFs 在肌再生中的作用

一、肌卫星细胞

肌卫星细胞负责出生后骨骼肌的生长和再生,具有增殖和分化潜力。SCs 具有明显的结构特征,包括胞质稀少、胞核较肌核小等特点^[24]。Kassar-Duchossoy 等^[25]在发育过程中发现一种表达配对盒基因 3/配对盒基因 7(Pax3/Pax7)干细胞,通过谱系追踪技术表明,体节表达 Pax3/Pax7 的干细胞不仅分化产生了构成四肢和躯干肌肉的成肌细胞,还产生了卫星细胞群,因此 SCs 来自与它们所在肌肉相同的胚胎原始细胞。配对盒基因在所有肌卫星细胞中表达,是肌卫星细胞的特异标志物。配对盒基因位于 MRFs 基因的上游,Pax7 缺失小鼠的生长减少并出现明显的肌肉萎缩,多个肌群中卫星细胞谱系渐进性消融。Pax7 缺陷细胞可以在卫星细胞位置存活,但这些细胞在进入有丝分裂时停止并死亡,无法重新填补其生态位,因此 Pax7 对于形成和维持功能性肌卫星细胞是必不可少的^[26]。肌卫星细胞的所处状态不同时,MRFs 的表达水平以及所起作用均存在差别。

二、静止肌卫星细胞中的 MRFs

肌卫星细胞通常处于静止状态,肌肉损伤时才会被激活。静止的卫星细胞通常不包含 MyoD,也不存在活跃的 MRF4 位点,Myf5 在大鼠多数静止卫星细胞中都是活跃的,大约 90% 静止的肌卫星细胞中可以检测到 Myf5 表达,但表达水平不同^[27]。研究发现尽管肌卫星细胞转录了 Myf5,但 microRNA-31(miR-31)将 myf5 mRNA 隔离在 mRNP 颗粒中,限制 myf5 的翻译,使骨骼肌卫星细胞保持静止的状态^[28]。Myf5 在谱系确定上起重要作用,防止表达其细胞的非肌源性命运,在发育过程中缺少 MyoD、myogenin、MRF4 的 Myf5 不能驱动成肌分化^[7,29]。

三、肌卫星细胞激活中的 MRFs

肌卫星细胞激活受多种信号分子控制,除了静止肌卫星细胞的 Myf5 蛋白外,Myf5 mRNA 从 mRNP 颗粒中释放出来,以促进激活时的快速翻译^[30]。不同的刺激,如运动^[31]、电刺激^[32]、电针^[33]等都可以诱导肌卫星细胞的激活。静止的卫星细胞被同步激活,共同表达转录因子 Pax、MyoD,激活后 Pax7 逐渐下调^[34]。

肌卫星细胞的激活大多伴随着 Myf5 蛋白水平的逐渐增加,Pax7+/Myf5+的肌卫星细胞,只能进行对称分裂,所有子代细胞增殖分化进入肌源性途径。Pax7+/Myf5-的肌卫星细胞,除了对称分裂产生 Pax7+/Myf5-卫星细胞外(回到静止状态维持肌卫星细胞池),还可以通过基底-顶端的不对称分裂形成 Pax7+/Myf5+卫星细胞。因此,骨骼肌中的卫星细胞是由卫星干细胞(Pax7+/Myf5-)和卫星肌源性细胞(Pax7+/Myf5+)组成的异质性群体^[28]。

四、肌卫星细胞增殖、分化过程中的 MRFs

增殖肌卫星细胞中表达最突出的生肌因子是 Myf5 和 MyoD,而增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达是肌卫星细胞增殖的最佳鉴别标志。Montarras 等^[35]对 Myf5-小鼠进行的相关研究表明,新生小鼠原代胎儿肌卫星细胞的增殖和分化减少,MyoD 的蛋白和转录水平正常。Ustamina 等^[36]研究发现,成体 Myf5 缺失的静止卫星细胞最初在体外增殖率降低,但分化正常。Macharia 等^[37]对 MyoD-小鼠的实验表明,卫星细胞进入细胞周期的时间延迟,肌原细胞的增殖减少,分化再生能力减弱。

在增殖后,大多数细胞开始下调其 Pax7,并维持 MyoD 以进

行分化。其余的细胞维持 Pax7 的表达,并抑制 MyoD 回到静止状态^[38]。SCs 从增殖到分化的转变主要是在高于 MRFs 的水平上调节的。这是通过在增殖的干细胞中逐渐将 Notch 蛋白的表达转换为分化 SCs 中表达的 Wnt 蛋白来实现的。Wnt 蛋白促进 b-catenin 的稳定,b-catenin 激活分化需要几个肌肉特异基因的转录^[39]。

在 MRFs 水平上,Pax7 表达逐渐下调,MyoD 表达增强,是从增殖向分化转变的标志。此外,MyoD 的表达上调并引导分化中的干细胞向肌核终末分化^[24,40]。如果干细胞维持 Pax7 的表达并抑制 MyoD 水平,则分化进程受阻。然而,一旦肌卫星细胞表达 myogenin,肌卫星细胞 Pax7 的表达受到抑制并随后发生分化,这表明 MRFs 和 Pax7 之间存在一种相互抑制的机制^[41]。Pax7 是导致 MRFs 级联活性的重要因素。Kumar 等^[42]发现 MRFs 的表达水平受到 Pax7 结合位点下游的 DNA(ID2 和 ID3)等反向调控蛋白的调节。Pax7 结合在 ID3 启动子的上游,通过诱导 ID2 和 ID3 的表达来阻止静止卫星细胞的过早分化,从而实现肌肉生成的充分控制^[43]。

MyoD 和 myogenin 的表达导致 MRF4 基因和其他肌肉分化晚期基因的表达,从而允许形成多核纤维。在成熟的肌肉纤维中,MyoD 和 Myogenin 的表达随后下调,而 MRF4 继续保持高水平的表达^[10,44]。

MRFs 在肌肉骨骼疾病中的应用

一、肌肉萎缩过程中的 MRFs

肌肉萎缩是常见的临床表现,常用的肌肉萎缩模型有废用性肌萎缩及失神经支配萎缩模型。肌肉废用的特征是神经完整肌肉机械应力下降,实验上可以通过卧床、石膏固定、夹板制动、后肢悬吊等方法诱导肌肉废用性萎缩^[45-47]。石膏固定一侧大鼠后肢,10 d 后大鼠腓肠肌 myogenin 和 MyoD mRNA 的表达上调^[45]。与此类似,制动 7 d 后小鼠腓肠肌和比目鱼肌 Pax7、MyoD 和 myogenin mRNA 的表达增加。这表明,机械应力降低(固定)时萎缩肌肉 MyoD 和 myogenin mRNA 等 SCs 激活物的表达增加^[46]。余涛等^[48]在腓肠肌失神经支配的大鼠模型中发现,腓肠肌中 MyoD 和 miR-206 的 mRNA 水平和蛋白水平上调,且两者的表达呈正相关,表明 MyoD 可能通过激活 miR-206 的转录延缓肌肉萎缩。失神经肌肉萎缩模型 MRFs 并不是一直保持着高表达水平。沈燕国等^[49]研究人体失神经支配后不同时间段的骨骼肌,myogenin 和 MRF4 在 1 年内维持较高水平,1 年后快速下降,这为临床治疗提供了指导,周围神经损伤应在 1 年内修复。Wang 等^[50]通过大鼠悬吊 2 周再负重 2 周研究废用性肌萎缩的具体通路,发现重负荷增加 MyoD RNA、TGF- β 通路成员(TGF β 1、肌生成抑制素等)及下游效应器的表达(Pax7)。表明废用性肌肉萎缩通过典型和非经典 TGF- β 信号途径,以强度依赖性的方式进行再负荷,Pax7 和 MyoD 可能是 TGF- β 途径介导再负荷恢复的效应因子。不仅废用性肌萎缩模型中 MRFs 的表达增加,失神经萎缩模型中 MRFs 的表达也会出现变化。

二、肌肉损伤过程中的 MRFs

MRFs 通过调控 SCs 的增殖、分化和再生,修复损伤肌肉。刘晓光等^[51]采用改良自由落体法制作大鼠骨骼肌急性钝挫伤模型,损伤后腓肠肌胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1,IGF-1)、MyoD 和 myogenin mRNA 的表达增加。表明骨

骼肌钝挫伤后高表达的 MRFs 促进了肌肉的再生。由于骨骼肌损伤后 MRFs 的表达出现改变,MRFs 也被用来推断损伤时间。王男等^[52]制作类似的骨骼肌钝挫伤模型,利用免疫荧光计算骨骼肌 Pax7、MyoD、myogenin 阳性细胞数量,结果表明 MyoD、Pax7 阳性细胞的数量在 3 d 达到高峰,myogenin 阳性细胞数量在损伤后 3 d 开始增加,一直持续到损伤后第 7 天,这为损伤时间的推断提供了参考依据。除骨骼肌急性钝挫伤模型外,大负荷运动也会导致肌肉损伤^[53]。

三、不同康复治疗中的 MRFs

1.运动:运动是肌肉萎缩最主要的治疗方法之一。为了研究不同类型运动对 MRFs 的影响,Yang 等^[54]研究抗阻运动(高负荷、低重复)和耐力运动(低负荷、高重复)后肌肉 MyoD mRNA 的变化。一组受试者连续跑台运动 30 min,运动后 8 h 和 12 h 人腓肠肌 MyoD 的表达分别增加 8 倍和 5 倍;另一组受试者的膝关节接受伸展抗阻训练,股外侧肌 MyoD 的表达仅在运动后 8 h 升高 6 倍。两组患者在运动后即刻、1 h、2 h、4 h、24 h 没有变化。说明不同运动方案引起 MyoD 的升高趋势不同。然而,该研究 MyoD mRNA 表达的差异可能与研究选择的肌肉不同有关,因为 MyoD 的表达已被证实与肌肉纤维类型有关^[55]。Wilborn 等^[31]研究不同强度抗阻训练对 MRFs 表达的影响,该实验研究 18~20 次、60%~65% 的单次最大强度运动,与 8~10 次、80%~85% 的单次最大强度运动对股外侧肌 MRFs 的影响,结果表明这两种不同强度的运动均可以在 6 h 内上调 MyoD、myogenin、MRF4 和 myf5 mRNA 的表达(两组之间差异无统计学意义),表明单次最大强度运动以内不同强度的抗阻运动,都能促进肌卫星细胞的肌源性激活。适度的运动可以促进肌肉再生和修复,运动负荷过大或者休息间隙不足的阻力训练会上调肌肉萎缩蛋白的表达,使 MyoD、myogenin、IGF-1 蛋白水平降低,加重肌肉萎缩^[53]。

2.物理因子治疗:除了运动外,物理因子治疗也用来治疗肌肉疾病。具体如下:①电刺激,侯志儒等^[32]将经皮电刺激作用于腓肠肌失神经大鼠,发现电刺激可以通过上调 MyoD 的表达抑制肌肉萎缩。进一步研究表明肌肉萎缩的治疗效果与电刺激的时间间隔有关,与隔日电刺激组相比,每日电刺激组 MyoD 蛋白表达水平更高,肌内结缔组织密度更低,肌纤维横截面积更高,表明每日电刺激比隔日电刺激有更好的效果^[56];②针灸,具有应用广、副作用小的特点。现代医学把传统针灸与低频电刺激联合在一起,广泛地应用于脑卒中、脊髓损伤、肌肉损伤后的康复。陈玉佩等^[33]用利多卡因损伤大鼠多裂肌,电针治疗“委中穴”,HE 染色结果表明损伤的多裂肌形态改变明显(可见新生肌纤维),Western blot 结果提示电针组 MyoD、Pax7 和基质金属蛋白酶 2(MMP2)蛋白表达增加。表明电针“委中穴”可能是通过提高 MyoD 和 MMP2 的表达和活性,减轻骨骼肌纤维化程度,促进损伤肌肉的再生修复。袁亚等^[57]研究电针“昆仑穴”、“阿是穴”对腓肠肌 MyoD 的影响,结果表明,电针“阿是穴”MyoD 的表达水平更高,更有利于损伤肌肉的康复。进一步研究表明,电针可能是通过抑制 TGF β 信号通路,促进下游 MyoD、miR-206 的表达,延缓肌肉萎缩^[58]。这些研究表明电针对于肌肉萎缩、肌肉损伤的疗效明确;③电磁场、超声及冲击波治疗,韩福军等^[59]自制低频电磁场刺激体外培养的 SCs 5 d,体外电磁场通过上调 MyoD RNA 促进原代 SCs 的增殖。王晶

等^[60]在大鼠的体内实验中得出了相似的结论。梁丹丹等^[61]研究发现,低强度聚焦超声治疗可以通过上调 MyoD 的表达,促进损伤骨骼肌修复、再生。曹宇等^[62]用不同强度冲击波刺激原代成肌细胞,发现冲击波治疗强度为 0.08 mJ/mm² 时细胞活力最高,刺激强度过高时(0.16 mJ/mm²、0.18 mJ/mm²)会诱导细胞凋亡,在一定程度上抑制细胞增殖。目前有关电磁场、超短波、冲击波治疗肌肉疾病研究还较少,MRFs 可以用作评定不同类型、强度、频率、时间间隔物理因子治疗效果的指标,为临床治疗提供参考。

3.其他治疗:高压氧治疗多年来,一直被用作多种医疗条件下的主要治疗方法,并作为药物和其他治疗方法的补充,用于治疗不同的疾病,特别是由局部缺氧或缺血引起的疾病。Bajek 等^[63]研究表明,失神经肌肉中 MyoD 和 Myogenin 蛋白的表达明显上调,高压氧处理的大鼠失神经肌肉也显著上调了这两种转录因子,但未减轻肌肉的萎缩程度,这可能与早期失神经萎缩肌肉并不是缺血缺氧状态有关。目前,尚不清楚高压氧对其他类型肌萎缩的影响。石海飞等^[64]转染了高表达 MyoD 的 SCs 细胞,将其移植到大鼠失神经萎缩模型中。术后 2、4 周取腓肠肌,SCs 细胞的肌肉横截面积、肌肉湿重及 MyoD 的表达明显高于其他组。研究证实了 MyoD 高表达的 SCs 移植可以改善失神经的肌肉萎缩,为开发新的治疗方法提供了依据。

四、MRFs 在关节挛缩研究中的前景和展望

临床上常用固定来治疗骨折和韧带疾病,固定不仅会引起废用性肌萎缩,还会导致关节挛缩。有研究将兔子膝关节在伸直位下用石膏固定 2、4、6、8 周,2 周时出现关节活动受限,6 周时关节挛缩基本稳定,8 周时关节活动度与 6 周时无明显差异^[65-66]。Kaneguchi 等^[67]研究发现,大鼠膝关节固定产生的关节挛缩早期以肌源性为主。在此基础上,Wang 等^[68]进一步研究了肌源性挛缩与关节源性挛缩,发现 2 周以内的挛缩以肌源性挛缩为主,2 周时肌源性挛缩趋于稳定,2 周后的挛缩以关节源性为主,用超短波治疗固定 8 周的兔膝关节,发现超短波可以通过上调 MyoD 的表达改善肌源性挛缩。目前对于稳定的关节挛缩缺少有效的治疗方法,是否可以通过调节 MRFs 的表达来抑制肌萎缩,从而缓解关节挛缩的进程,尚需进一步实验来验证。

小结

MRFs 是 II 类 bHLH 调节因子超家族成员,仅在骨骼肌组织中表达,在肌肉发育发生和再生中扮演着关键角色。MRFs 在肌肉发生的过程中,参与组成了精确复杂的网络,控制着发育中肌肉发生的各个阶段。在出生后,MRFs 通过调节 SCs 的激活、增殖和分化,介导骨骼肌的生长和再生。因此,加深对 MRFs 信号通路和作用机制的理解,对于建立新的治疗策略来治疗肌肉骨骼疾病具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA Converts fibroblasts to myoblasts[J]. Cell, 1987, 51(6):987-1000. DOI:10.1016/0092-8674(87)90585-x.
- [2] Nederveen JP, Fortino SA, Baker JM, et al. Consistent expression pattern of myogenic regulatory factors in whole muscle and isolated hu-

- man muscle satellite cells after eccentric contractions in humans[J]. J Appl Physiol, 2019, 127(5):1419-1426. DOI:10.1152/jappphysiol.01123.2018.
- [3] Codato R, Perichon M, Divol A, et al. The SMYD3 methyltransferase promotes myogenesis by activating the myogenin regulatory network[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):17298. DOI:10.1038/s41598-019-53577-5.
- [4] Singh K, Dilworth FJ. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors[J]. FEBS J, 2013, 280(17):3991-4003. DOI:10.1111/febs.12188.
- [5] Soleimani VD, Nguyen D, Ramachandran P, et al. Cis-regulatory determinants of MyoD function[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(14):7221-7235. DOI:10.1093/nar/gky3388.
- [6] Ishibashi J, Perry RL, Asakura A, et al. MyoD induces myogenic differentiation through cooperation of its NH₂- and COOH-terminal regions[J]. J Cell Biol, 2005, 171(3):471-482. DOI:10.1083/jcb.200502101.
- [7] Conerly ML, Yao Z, Zhong JW, et al. Distinct activities of Myf5 and MyoD indicate separate roles in skeletal muscle lineage specification and differentiation[J]. Dev Cell, 2016, 36(4):375-385. DOI:10.1016/j.devcel.2016.01.021.
- [8] Bergstrom DA, Tapscott SJ. Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(7):2404-2412. DOI:10.1128/MCB.21.7.2404-2412.2001.
- [9] Moss JB, Olson EN, Schwartz RJ. The myogenic regulatory factor MRF4 represses the cardiac alpha-actin promoter through a negative-acting N-terminal protein domain[J]. J Biol Chem, 1996, 271(49):31688-31694. DOI:10.1074/jbc.271.49.31688.
- [10] Moretti I, Cicilioti S, Dyar KA, et al. MRF4 negatively regulates adult skeletal muscle growth by repressing MEF2 activity[J]. Nat Commun, 2016, 7(1):12397. DOI:10.1038/ncomms12397.
- [11] Mok GF, Mohammed RH, Sweetman D. Expression of myogenic regulatory factors in chicken embryos during somite and limb development[J]. J Anat, 2015, 227(3):352-360. DOI:10.1111/joa.12340.
- [12] Baguma-Nibasheka M, Fracassi A, Costain WJ, et al. Role of skeletal muscle in motor neuron development[J]. Histo Histopathol, 2016, 31(7):699-719. DOI:10.14670/HH-11-742.
- [13] Rafipay A, Berg AL, Erskine L, et al. Expression analysis of limb element markers during mouse embryonic development[J]. Dev Dyn, 2018, 247(11):1217-1226. DOI:10.1002/dvdy.24671.
- [14] Adhikari A, Davie J. JARID2 and the PRC2 complex regulate skeletal muscle differentiation through regulation of canonical wnt signaling[J]. Epigenetics Chromatin, 2018, 11(1):46. DOI:10.1186/s13072-018-0217-x.
- [15] Hosoyama T. Possible application of muscle specific conditional mouse-derived induced pluripotent stem cells for muscle research[J]. Biochem Biophys Rep, 2020, 21(1):100744. DOI:10.1016/j.bbrep.2020.100744.
- [16] Hollway GE, Currie PD. Myotome meanderings. Cellular morphogenesis and the making of muscle[J]. Embo Rep, 2003, 4(9):855-860. DOI:10.1038/sj.embor.embor920.
- [17] Dumont NA, Rudnicki MA. Characterizing satellite cells and myogenic progenitors during skeletal muscle regeneration[J]. Methods Mol Biol,

- 2017, 1560(1):179-188. DOI:10.1007/978-1-4939-6788-9_12.
- [18] Wang C, Liu W, Nie Y, et al. Loss of MyoD promotes fate transdifferentiation of myoblasts into brown adipocytes [J]. *EBioMedicine*, 2017, 16(1):212-223. DOI:10.1016/j.ebiom.2017.01.015.
- [19] Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH, et al. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death[J]. *Cell*, 1992, 71(3):369-382. DOI:10.1016/0092-8674(92)90507-9.
- [20] Zhang W, Behringer RR, Olson EN. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies[J]. *Genes Dev*, 1995, 9(11):1388-1399. DOI:10.1101/gad.9.11.1388.
- [21] Ganassi M, Badodi S, Quiroga HP, et al. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):4232. DOI:10.1038/s41467-018-06583-6.
- [22] Yamamoto M, Legendre NP, Biswas AA, et al. Loss of MyoD and Myf5 in skeletal muscle stem cells results in altered myogenic programming and failed regeneration[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(3):956-969. DOI:10.1016/j.stemcr.2018.01.027.
- [23] Rawls A, Valdez MR, Zhang W, Richardson J, et al. Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice[J]. *Development*, 1998, 125(13):2349-2358.
- [24] Musarò A, Carosio S. Isolation and culture of satellite cells from mouse skeletal muscle[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1553(1):155-167. DOI:10.1007/978-1-4939-6756-8_12.
- [25] Kassam-Duchossoy L, Giacone E, Gayraud-Morel B, et al. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(12):1426-1431. DOI:10.1101/gad.345505.
- [26] Addicks GC, Brun CE, Sincennes MC, et al. MLL1 is required for PAX7 expression and satellite cell self-renewal in mice[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1-14. DOI:10.1038/s41467-019-12086-9.
- [27] Giordani L, Parisi A, Le Grand F. Satellite cell self-renewal[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2018, 126(1):177-203. DOI:10.1016/bs.ctdb.2017.08.001.
- [28] Jaafar Marican NH, Cruz-Migoni SB, Borycki AG. Asymmetric distribution of primary cilia allocates satellite cells for self-renewal[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(6):798-805. DOI:10.1016/j.stemcr.2016.04.004.
- [29] Gayraud-Morel B, Chrétien F, Jory A, et al. Myf5 haploinsufficiency reveals distinct cell fate potentials for adult skeletal muscle stem cells[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(7):1738-1749. DOI:10.1242/jcs.097006.
- [30] Crist C, Montarras D, Buckingham M. Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(1):118-126. DOI:10.1016/j.stem.2012.03.011.
- [31] Wilborn CD, Taylor LW, Greenwood M, et al. Effects of different intensities of resistance exercise on regulators of myogenesis[J]. *J Strength Cond Res*, 2009, 23(8):2179-2187. DOI:10.1519/JSC.0b013e3181bab493.
- [32] 侯志儒, 梁炳生, 梁勇, 等. 经皮电刺激大鼠骨骼肌失神经肌萎缩时成肌调节因子基因的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(33):6496-6499. DOI:10.3969/j.issn.1673-8225.2009.33.019.
- [33] 陈玉佩, 刘通, 许玥, 等. 电针“委中”穴对大鼠腰多裂肌损伤后细胞外基质中相关蛋白表达的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(5):341-346. DOI:10.13702/j.1000-0607.180593.
- [34] Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, et al. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal[J]. *J Cell Biol*, 2004, 166(3):347-357. DOI:10.1083/jcb.200312007.
- [35] Montarras D, Lindon C, Pinset C, et al. Cultured Myf5 null and MyoD null muscle precursor cells display distinct growth defects[J]. *Biol Cell*, 2000, 92(8-9):565-572. DOI:10.1016/s0248-4900(00)01110-2.
- [36] Ustanina S, Carvajal J, Rigby P, et al. The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(8):2006-2016. DOI:10.1634/stemcells.2006-0736.
- [37] Macharia R, Otto A, Valasek P, Patel K. Neuromuscular junction morphology, fiber-type proportions, and satellite-cell proliferation rates are altered in MyoD(-/-) mice[J]. *Muscle Nerve*, 2010, 42(1):38-52. DOI:10.1002/mus.21637.
- [38] Tian ZL, Jiang SK, Zhang M, et al. Detection of satellite cells during skeletal muscle wound healing in rats: time-dependent expressions of Pax7 and MyoD in relation to wound age[J]. *Int J Legal Med*, 2016, 130(1):163-172. DOI:10.1007/s00414-015-1251-x.
- [39] Suzuki A, Minamide R, Iwata J. WNT/ β -catenin signaling plays a crucial role in myoblast fusion through regulation of nephrin expression during development[J]. *Development*, 2018, 145(23):168351. DOI:10.1242/dev.168351.
- [40] Qahar M, Takuma Y, Mizunoya W, et al. Semaphorin 3A promotes activation of Pax7, Myf5, and MyoD through inhibition of emerin expression in activated satellite cells[J]. *Febs Open Bio*, 2016, 6(6):529-539. DOI:10.1002/2211-5463.12050.
- [41] Olguin HC, Yang Z, Tapscott SJ, et al. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination[J]. *J Cell Biol*, 2007, 177(5):769-779. DOI:10.1083/jcb.200608122.
- [42] Kumar D, Shadrach JL, Wagers AJ, et al. Id3 is a direct transcriptional target of Pax7 in quiescent satellite cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(14):3170-3177. DOI:10.1091/mbc.e08-12-1185.
- [43] AlSudais H, Lala-Tabbert N, Wipar-Bergeron N. CCAAT/enhancer binding protein β inhibits myogenic differentiation via ID3[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):16613. DOI:10.1038/s41598-018-34871-0.
- [44] Tan X, Xu P, Zhang Y, Zhang PJ. Olive flounder (paralichthys olivaceus) myogenic regulatory factor 4 and its muscle-specific promoter activity[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2019, 236(1):110310. DOI:10.1016/j.cbpb.2019.110310.
- [45] Yoshihara T, Machida S, Kurosaka Y, et al. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle[J]. *J Physiol Sci*, 2016, 66(4):337-343. DOI:10.1007/s12576-015-0432-1.
- [46] Guitart M, Lloreta J, Mañas-García L, et al. Muscle regeneration potential and satellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5):4360-4372. DOI:10.1002/jcp.26282.
- [47] 李永平, 梁炳生. MyoD 在去神经骨骼肌萎缩不同时段的表达[J]. *中华手外科杂志*, 2008, 24(1):51-53. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-054X.2008.01.017.
- [48] 余涛, 王平, 周翔, 等. 失神经支配大鼠腓肠肌的演变及其 miR-206

- 和 myoD 表达的变化[J]. 中华显微外科杂志, 2017, 40(2): 150-155. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2036.2017.02.012.
- [49] 沈燕国, 徐建光, 顾玉东, 等. 成肌调节因子 Myogenin 和 MRF4 在人体失神经骨骼肌中的表达及其临床意义[J]. 中华手外科杂志, 2002, 18(3): 177-180. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-054X.2002.03.021.
- [50] Wang J, Wang X, Feng W. Reloading promotes recovery of disuse muscle loss by inhibiting TGF β pathway activation in rats after hind limb suspension[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2017, 96(6): 430-437. DOI: 10.1097/PHM.0000000000000617.
- [51] 刘晓光, 赵淋淋, 曾志刚, 等. 小鼠骨骼肌损伤修复过程中肌再生调节因子和血管再生因子的表达规律研究[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(12): 1294-1300. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2016.12.001.
- [52] 王男, 李剑锋, 王莉晓, 等. Pax7、MyoD 及 MyoG 基因用于推断损伤时间的初步研究[J]. 中国法医学杂志, 2019, 34(4): 330-335. DOI: 10.13618/j.issn.1001-5728.2019.04.003.
- [53] Alves Souza RW, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ, et al. Resistance training with excessive training load and insufficient recovery alters skeletal muscle mass-related protein expression[J]. J Strength Cond Res, 2014, 28(8): 2338-2345. DOI: 10.1519/JSC.0000000000000421.
- [54] Yang Y, Creer A, Jemiolo B, et al. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle[J]. J Appl Physiol, 2005, 98(5): 1745-1752. DOI: 10.1152/jappphysiol.01185.2004.
- [55] Seward DJ, Haney JC, Rudnicki MA, et al. bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280(2): 408-413. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.2.C408.
- [56] Lima SC, Caierão QM, Peviani SM, et al. Muscle and nerve responses after different intervals of electrical stimulation sessions on denervated rat muscle[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2009, 88(2): 126-135. DOI: 10.1097/PHM.0b013e318186bf6c.
- [57] 袁亚, 朱世鹏, 金洵, 等. 电针对腓肠肌急性钝挫伤大鼠肌肉弹性及生肌调节因子表达的影响[J]. 针刺研究, 2020, 45(4): 287-292. DOI: 10.13702/j.1000-0607.190361.
- [58] 谢慧, 唐成林, 赵丹丹, 等. 电针干预经 TGF- β 1/Smad3 信号通路对失神经肌萎缩大鼠肌卫星细胞分化的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(3): 211-216. DOI: 10.16038/j.1000-6710.2019.03.008.
- [59] 韩福军, 阴爽, 杨兴辉, 等. 低频电磁场对肌卫星细胞增殖的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(7): 1868-1869. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.07.053.
- [60] 王晶, 张长杰, 顾旭东, 等. 脉冲电磁场对大鼠骨骼肌急性挫伤后成肌分化因子 D 表达的促进作用[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2009, 31(5): 292-295. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.05.002.
- [61] 梁丹丹, 蒋璟玮, 罗东, 等. 低强度聚焦超声促进 SD 大鼠慢性骨骼肌损伤修复[J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(9): 1140-1143. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002119.
- [62] 曹宇, 王伟, 张臣鸣, 等. 冲击波对成肌细胞增殖分化的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2020, 35(6): 647-655. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2020.06.002.
- [63] Bajek S, Nikolić M, Soić-Vranić T, et al. Influence of hyperbaric oxygen treatment on myogenic transcriptional factors of denervated rat muscle[J]. Coll Antropol, 2012, 36(1): 167-172.
- [64] 石海飞, 沈辉, 吴守成, 等. 成肌分化因子 D 高表达肌卫星细胞改善大鼠失神经肌肉萎缩的研究[J]. 中华手外科杂志, 2014, 30(5): 387-390. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-054X.2014.05.028.
- [65] Zhou Y, Zhang QB, Zhong HZ, et al. Rabbit model of extending knee joint contracture; progression of joint motion restriction and subsequent joint capsule changes after immobilization[J]. J Knee Surg, 2020, 33(1): 15-21. DOI: 10.1055/s-0038-1676502.
- [66] Zhang QB, Zhou Y, Zhong HZ, et al. Effect of stretching combined with ultrashort wave diathermy on joint function and its possible mechanism in a rabbit knee contracture model[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2018, 97(5): 357-363. DOI: 10.1097/PHM.0000000000000873.
- [67] Kaneguchi A, Ozawa J, Kawamata S, et al. Development of arthrogenic joint contracture as a result of pathological changes in remobilized rat knees[J]. J Orthop Res, 2016, 35(7): 1414-1423. DOI: 10.1002/jor.23419.
- [68] Wang F, Zhang QB, Zhou Y, et al. Effect of ultrashort wave treatment on joint dysfunction and muscle atrophy in a rabbit model of extending knee joint contracture; enhanced expression of myogenic differentiation[J]. Knee, 2020, 27(3): 795-802. DOI: 10.1016/j.knee.2020.02.013.

(修回日期: 2021-04-13)

(本文编辑: 凌琛)