

· 综述 ·

肌纤维凋亡与骨骼肌萎缩

范晓华 纪树荣 周红俊

骨骼肌纤维是多核纤维,肌核的转录活动和/或肌核的数量发生变化时,基因物质的含量可能发生改变,从而参与肌纤维蛋白含量与肌纤维体积的调节。神经肌肉电活动减低和/或负荷的减少(如脊髓损伤、后肢悬吊与太空飞行、制动、失神经支配等)可导致骨骼肌纤维发生显著、快速的萎缩,并伴有细胞核的数量减少。肌核丢失的机制不明,可能与细胞凋亡有关。本文主要归纳肌纤维凋亡与骨骼肌萎缩的研究进展。

细胞凋亡在光镜下不易区分。细胞凋亡分 3 个阶段,即起始阶段、效应阶段及降解阶段。在起始阶段,细胞内或细胞外损伤与凋亡启动刺激(如氧自由基产物或胞浆内钙离子内流等)活化不同的途径,启动凋亡过程。促凋亡因子 bax 与抗凋亡因子 bcl-2 之间的失衡启动线粒体途径。效应阶段又分为线粒体途径、内质网途径与死亡因子及其受体途径。在效应阶段,线粒体膜的通透性增加引起促凋亡因子的释放,如 caspase 活化因子(细胞色素 C、hsp10)以及 AIF。这些因子活化 caspase 水解级联反应,导致降解阶段典型的形态学特征,如细胞骨架的重排、DNA 碎片、膜的发泡、凋亡小体的形成。细胞是否发生凋亡是由氧化应激水平决定的。

肌纤维凋亡概述

正常骨骼肌纤维呈细长圆柱形,有多个甚至几百个椭圆形细胞核,细胞核位于细胞周缘。胞浆内含有许多与细胞长轴平行排列的肌原纤维,肌原纤维之间有大量的线粒体、糖原及少量脂滴,肌浆内还含有肌红蛋白。快肌纤维细胞核的数量少于慢肌纤维。

骨骼肌在正常发育过程中,凋亡对肌细胞核的数量起重要的调节作用。包括人类在内的哺乳动物,在胎儿肌纤维发育早期,有 40% 以上的肌细胞是通过凋亡清除的,说明正常骨骼肌发育中也存在凋亡现象^[1]。出生后骨骼肌与成年骨骼肌纤维内,TUNEL 阳性细胞核很少见,且没有凋亡相关蛋白(如 bcl-2 家族或 caspase 家族)的表达,表明正常骨骼肌纤维的胞浆能够抵抗细胞色素 C-依赖的 II 型 caspase 活化,且缺乏凋亡蛋白激活酶活化蛋白-1 (apoptosis protease activator protein-1, APAF-1)^[2]。

同一机体不同细胞谱系有不同的凋亡类型,因此多核肌纤维的凋亡,不同于单核细胞的凋亡。肌纤维内的一个细胞核控制相连的数个肌节,一条肌纤维中,同一时间内并非所有的核均表现为凋亡的 DNA 碎片,可能为单个肌细胞核的凋亡与相关肌节的降解,长此以往可导致肌纤维萎缩,如失神经支配后骨骼肌失去神经的营养作用^[3]、脊髓损伤后骨骼肌神经肌肉电活动与负荷均减少^[4]。

病理状态下,肌纤维促凋亡蛋白 bax、caspases 与抗凋亡蛋白 bcl-2 的表达均明显上调,说明肌纤维既能启动线粒体途径

的凋亡,又能启动抗凋亡作用^[5]。Bax 与 bcl-2 表达明显上调,提示线粒体膜内转变小孔的通透性增加是启动肌纤维凋亡的主要原因,bax 与 bcl-2 的失衡可能起着决定性作用。而促凋亡因子 FAS 的表达、caspases 以及其后降解阶段发生的过程与肌纤维凋亡的关系,目前尚不明^[5]。神经肌肉疾病时(如失神经支配、肌营养不良、先天性肌病等) caspase 表达上调,慢性心衰或烧伤时骨骼肌 caspase 表达也上调,尤其是 caspase-3 可能是参与凋亡肌纤维降解的重要因子^[6]。凋亡特定蛋白(apoptosis-specific protein, ASP)也称为 c-Jun/AP-1,是凋亡降解阶段的一个标记物,在肌纤维凋亡的降解阶段表达明显上调,见于有边缘空泡的远端肌病。目前不知 ASP 的表达仅与凋亡有关,还是与自噬作用形成的边缘空泡有关^[6]。

目前尚不清楚降解的肌细胞核与相关收缩成分是如何清除的。Fidzianska 等^[7]发现,在婴儿型脊髓肌萎缩内,邻近肌纤维吞噬凋亡小体包括降解的染色质与凋亡肌纤维的收缩成分。也有研究发现,凋亡的肌纤维是由巨噬细胞或通过自噬作用清除的,自噬作用与边缘空泡的形成有关。此外,有研究发现,肌节的降解可能早于肌细胞核的降解,蛋白水解作用可能参与肌节的降解^[8]。

肌纤维凋亡的机制至今尚不明,可能与氧化应激产生的氧自由基、一氧化氮、过亚硝酸盐等有关^[9],也可能与胞浆内 Ca^{2+} 浓度、TNF- α 等因素有关。Leeuwenburgh^[10] 和 Adhihetty^[11] 等认为,氧自由基的产生可促使线粒体释放细胞色素 C,活化 caspase-9,进而激活 caspase-3,启动肌细胞核的凋亡。胞浆内 Ca^{2+} 浓度增高,可激活内质网途径介导的凋亡通路。

肌纤维凋亡与骨骼肌萎缩

一、后肢悬吊引起的肌纤维凋亡

Allen 等^[12]研究发现,大鼠后肢悬吊后,比目鱼肌(慢肌)肌纤维 TUNEL 标记的阳性细胞核的数量明显增多,且 TUNEL 阳性细胞核的出现时间较肌萎缩早,悬吊第 7 天即可出现。TUNEL 阳性细胞核包括形态正常的细胞核,在同一条纤维中也有 TUNEL 阴性的细胞核。应用激素、IGF-1 与训练治疗后,凋亡细胞核数量减少,说明凋亡与肌细胞核丢失有关。Siu 等^[13]将成年大鼠后肢悬吊 14 d 后,发现内侧腓肠肌内凋亡 DNA 碎片较正常对照组明显增加,bax 与 bcl-2 mRNA 的表达上调,胞浆内细胞色素 C 的浓度增加,凋亡诱导因子 AIF 的表达也显著上调。说明失负荷引起的骨骼肌萎缩,不仅可导致慢肌肌纤维的凋亡,也可引起快肌肌纤维的凋亡。Alway 等^[14]研究发现,大鼠后肢悬吊 7, 14, 21 d 后,骨骼肌中多聚腺苷酸核糖聚合酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP] 阳性的细胞核(表示细胞凋亡)分别占 22%, 12% 和 10%, caspase 水平增高,并伴分化抑制因子-2 (Inhibitor of differentiation-2, Id2) 表达上调,尤其在悬吊 7 d 与 14 d 组。说明 Id2 可能参与骨骼肌纤维的凋亡,细胞凋亡具有时间依从性关系,肌纤维的凋亡可能是通过启动线

作者单位:250021 济南,山东省立医院康复医学中心(范晓华);北京博爱医院(纪树荣、周红俊)

粒体途径进行的。此外 caspases 的表达也上调,使 PARP-I 裂解增多,引起悬吊骨骼肌 PARP-I 阳性细胞核数量增加,PARP-1 可能通过凋亡起始因子激活凋亡程序,失负荷肌内 caspase-8 表达也上调,因此也可能活化死亡区域受体经由 TNF- α 途径激活细胞凋亡。

Leeuwenburgh 等^[15]认为,骨骼肌萎缩与肌核的数量减少有关,而肌核的数量主要是通过凋亡途径丢失的,并认为年龄与骨骼肌萎缩和肌纤维凋亡有关。随年龄增加,比目鱼肌纤维凋亡水平(TUNEL 标记的阳性细胞核的数量与 DNA 碎片)明显增高,caspase-3 的活性趋于增加,核酸内切酶 G(endonuclease G,EndoG,一种线粒体特异核酸酶)存在核异位现象,但 EndoG 蛋白含量无改变。这导致肌核领域(即每个核的横截面积)明显减少,其中以老年动物为著。青壮年大鼠失负荷引起的比目鱼肌萎缩与肌核数量丢失有关,而老年大鼠虽然其凋亡水平明显增高,但肌萎缩与肌核数量丢失无关,这种现象有待于进一步研究。后肢悬吊 14 d 后,青壮年组与老年组比目鱼肌的凋亡水平均明显增加,随年龄增长而增加尤为显著;青壮年组 caspase-3 的活性明显增加,而老年组无明显增加;老年组 EndoG 存在核异位现象,且 EndoG 蛋白含量明显增加。表明老年骨骼肌肌核领域存在失调现象,在失负荷后这种现象尤其明显。青壮年与老年骨骼肌纤维凋亡途径不同,失负荷引起的青壮年骨骼肌萎缩是激活 caspase 相关机制导致肌纤维凋亡,而老年骨骼肌纤维的凋亡可能经由与 caspase 无关的途径,如 EndoG 异位。

二、脊髓损伤引起的肌纤维凋亡与骨骼肌萎缩

Dupont-Versteegden 等^[4]将大鼠 T₁₀ 水平脊髓横断,并在横断 5 d 后开始踏车训练 5 d,取大鼠比目鱼肌,发现脊髓横断组与训练组活化的肌卫星细胞的数量增加,但训练组增殖的肌卫星细胞并没有融入肌纤维。脊髓横断 5 d 后肌细胞核的数量下降 25%,TUNEL 阳性细胞核的数量增加,训练后凋亡细胞核的数量较横断组减少,但凋亡细胞核数量的减少并没有导致肌细胞核的数量增加。表明细胞凋亡可能导致脊髓横断后骨骼肌萎缩肌细胞核的丢失;训练能够使肌肉体积增大,但不能增加肌细胞核的数量。此外,他们在大鼠 T₁₀ 水平脊髓横断后进行胚胎脊髓移植加训练,发现胚胎脊髓移植联合训练能够使比目鱼肌的体积明显增大,肌细胞核的数量较横断组有明显恢复,肌细胞核数量增加可能与肌卫星细胞增殖、分化、融入肌纤维有关^[16]。

三、制动引起的肌纤维凋亡与骨骼肌萎缩

Smith 等^[17]将兔踝关节缩短位管型制动 2 d 与 6 d,发现比目鱼肌显著萎缩,肌肉湿重与横截面积下降,电镜观察发现肌纤维核染色质浓缩,肌细胞核形态不规则,肌丝破坏,肌膜下线粒体异常。制动 2 d,TUNEL 阳性细胞核的数量明显增多,制动 6 d 减少,表明凋亡参与制动引起的慢肌萎缩。Jin 等^[18]对兔后肢管型制动 3,7,14,28 d,发现制动后萎缩骨骼肌内有 TUNEL 阳性凋亡细胞,说明凋亡参与了制动引起的骨骼肌萎缩的过程。凋亡细胞的数量与制动时间相关,在制动 14 d 凋亡达高峰,且骨骼肌萎缩的程度与肌细胞凋亡的程度呈正相关。

四、失神经支配引起的肌纤维凋亡与骨骼肌萎缩

失神经支配后骨骼肌萎缩,肌纤维的体积与重量进行性减少。Borisov 等^[3]研究证实,凋亡参与失神经支配引起的肌萎缩

与肌细胞核数量的丢失。从时间依从关系上研究发现,TUNEL 阳性细胞核的出现先于骨骼肌的萎缩。Siu 等^[19]认为,失神经支配后骨骼肌萎缩可通过激活线粒体途径启动肌细胞凋亡。大鼠失神经支配 14 d,内侧腓肠肌内 TUNEL 阳性细胞核的数量明显增多,bax 与 bcl-2 mRNA 表达上调,但 bax/bcl-2 比例明显增加,细胞色素 C、凋亡诱导因子(AIF)、caspase-3,9 等的表达也显著上调,表明骨骼肌失神经支配后线粒体途径的凋亡信号因子上调,凋亡在调节失神经支配的骨骼肌萎缩中起着重要作用。临床研究较多的是进行性脊肌萎缩^[6,20]。超微结构下观察发现,肌纤维丢失的机制是凋亡,急性婴儿型脊髓型肌萎缩患儿的肌纤维发生降解现象,TUNEL 阳性细胞核的数量增多,伴有凋亡小体的形成以及邻近肌纤维的吞噬作用。凋亡相关因子(如 bcl-2、bax、caspase-1 等)表达上调。凋亡发生时,同时激活了抗凋亡因子,但抗凋亡因子 bcl-2 表达上调不足以对抗 bax 的高表达,因此不能阻止凋亡细胞降解。Tews 等^[21]对实验性大鼠面肌失神经支配与重支配模型的研究发现,失神经支配骨骼肌凋亡细胞核的数量明显增多,而重新支配的骨骼肌凋亡细胞核的数量明显减少。几乎所有失神经支配的肌纤维都高水平表达 bax,其中有 25% 的肌纤维(主要是萎缩的肌纤维)既表达 bcl-2,又表达 bcl-xl。神经再支配的肌纤维,凋亡细胞核内 bax 与 bcl-2 产物下降表现为时间依赖性。失神经支配肌细胞核凋亡的机制可能也是氧化应激导致肌纤维的变性与丢失^[6,9,10]。

总之,骨骼肌纤维是多核细胞,神经肌肉电活动减低和/或负荷的减少导致骨骼肌纤维萎缩,肌纤维凋亡可能是骨骼肌萎缩、肌细胞核数量丢失的机制之一。后肢悬吊、脊髓损伤、制动、失神经支配等引起的骨骼肌萎缩均与肌纤维凋亡有关。bax 与 bcl-2 表达上调说明主要通过启动线粒体途径的凋亡引起肌萎缩与肌细胞核数量的减少。肌纤维凋亡的机制可能与氧化应激产生的氧自由基、一氧化氮、过亚硝酸盐等有关。

参 考 文 献

- [1] Fidzianska A. Human ontogenesis. 1. Ultrastructural characteristics of developing human muscle. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1980, 39: 476-486.
- [2] Sandri M, El Meslemani AH, Sandri C, et al. Caspase 3 expression correlates with skeletal muscle apoptosis in Duchenne and facioscapulo human muscular dystrophy. A potential target for pharmacological treatment? *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001, 60: 302-312.
- [3] Borisov AB, Carlson BM. Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. *Anat Rec*, 2000, 258: 305-318.
- [4] Dupont-Versteegden EE, Murphy RJ, Houle JD, et al. Activated satellite cells fail to restore myonuclear number in spinal cord transected and exercised rats. *Am J Physiol*, 1999, 277: C589-C597.
- [5] Primeau AJ, Adhihetty PJ, Hood DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol*, 2002, 27: 349-395.
- [6] Tews DS. Apoptosis and muscle fibre loss in neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord*, 2002, 12: 613-622.
- [7] Fidzianska A, Goebel HH, Warlo I. Acute infantile spinal muscular atrophy. Muscle apoptosis as a proposed pathogenetic mechanism. *Brain*, 1990, 113: 433-445.
- [8] Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G, et al. Calpain 3 par-

- icipates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet*, 2005, 14: 2125-2134.
- [9] Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 2005, 288: R337-R344.
- [10] Leeuwenburgh C. Role of apoptosis in sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2003, 58: 999-1001.
- [11] Adhihetty PJ, Ljubicic V, Menzies KJ, et al. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289: C994-C1001.
- [12] Allen DL, Linderman JK, Roy RR, et al. Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol*, 1997, 273: C579-C587.
- [13] Siu PM, Pistilli EE, Alway SE. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 289: R1015-R1026.
- [14] Alway SE, Martyn JK, Ouyang J, et al. Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 284: R540-R549.
- [15] Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA, et al. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288: R1288-R1296.
- [16] Dupont-Versteegden EE, Murphy RJ, Houle JD, et al. Mechanisms leading to restoration of muscle size with exercise and transplantation after spinal cord injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279: C1677-C1684.
- [17] Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, et al. Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res*, 2000, 302: 235-241.
- [18] Jin X, Qu N, He Y, et al. Cell apoptosis in atrophic skeletal muscle induced by immobilization in rabbits—an experimental study using TUNEL. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 2004, 21: 628-630, 635.
- [19] Siu PM, Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. *J Physiol*, 2005, 565: 309-323.
- [20] Primeau AJ, Adhihetty PJ, Hood DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol*, 2002, 27: 349-395.
- [21] Tews DS, Goebel HH, Schneider I, et al. DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1997, 23: 141-149.

(修回日期:2007-02-25)

(本文编辑: 松 明)

· 研究简报 ·

饮用经 He-Ne 激光照射矿物质水对大鼠微循环功能的影响

石继飞 郑来煜

【摘要】 目的 探讨饮用 He-Ne 激光照射矿物质水对大鼠血管内皮细胞膜表面电光学特性及机体微循环功能的影响。**方法** 共选取 3 周龄 Wistar 大白鼠 20 只, 将其随机分为实验组及对照组。实验组大鼠饮用 He-Ne 激光照射矿物质水(经 He-Ne 激光持续照射 12 h), 对照组大鼠则饮用未给予 He-Ne 激光照射的矿物质水。30 d 后采用 20% 乌拉坦对 2 组大鼠进行肌肉注射麻醉, 由尾静脉注入内毒素以制作白细胞黏附及血管内皮损伤模型。观察并记录 2 组大鼠小肠系膜微血管内白细胞贴壁、渗出以及血小板、红细胞黏附、聚集、血流速度、血管内皮细胞损伤情况; 同时按常规方法测量 2 组大鼠的红细胞电泳率。**结果** 当实验进行到第 30 天时, 发现饮用 He-Ne 激光照射矿物质水能减轻内毒素所致的炎症刺激, 抑制白细胞、红细胞、血小板黏附聚集及白细胞渗出, 提高红细胞电泳率及血流速度, 减轻血管内皮细胞损伤。**结论** 饮用 He-Ne 激光照射矿物质水能提高实验大鼠血细胞及血管内皮细胞的表面负电荷密度, 减轻内毒素对血管内皮细胞的损伤, 对维系机体正常微循环功能及防止血栓形成具有积极作用。

【关键词】 He-Ne 激光; 矿物质水; 细胞表面负电荷密度; 微循环

相关研究发现, 血小板、白细胞等血液成分的黏附、聚集功能对机体微循环血流速度具有影响作用, 是血管内皮细胞损伤乃至血栓形成的主要原因之一, 其在动脉粥样硬化各阶段中均具有重要意义^[1]。由于血管内皮细胞具有明显的电磁特征^[1], 而矿物质水经 He-Ne 激光照射后其电导率将发生改变, 故本研究通过观察实验大鼠饮用 He-Ne 激光照射矿物质水, 从

而探讨 He-Ne 激光照射矿物质水对其血小板、白细胞等黏附、聚集功能的影响以及对细胞膜表面电光学特性的作用。现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

本实验选用的矿泉水是包头产雪鹿牌矿泉水, 产于包头市莫尼路东段, 产品标准编号为 GB8537-95, 其主要水质成分包括: 锶 (Sr^{2+}) 0.3 ~ 0.8 mg/L、钙 (Ca^{2+}) 45 ~ 65 mg/L、镁

作者单位: 014010 包头, 内蒙古包头医学院医学物理教研室(石继飞), 包头医学院第二附属医院(郑来煜)