DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.009

胰岛素样生长因子 1 受体在肌损伤组织肌卫星细胞的表达

李小雷[1]，黄厚今[2]，周光前[3]

（1. 连云港中医药高等职业技术学校妇儿康复教研室，连云港 222006；2. 遵义医学院公共卫生学院，遵义 563000；
3. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室干细胞与组织工程研究室，成都 610041）

【摘 要】目的：探讨胰岛素样生长因子 1 受体（Insulin like growth factor 1 receptor，IGF1R）在正常和注射心脏毒素后，致肌损伤的肌肉组织中具有再生能力的肌卫星细胞表达情况；为进一步研究某些肌肉变性疾病的分子学发病机制和治疗方法提供参考依据。方法：取 C57 雄性小鼠 12 只，随机分为 6 组，1~6 组左侧股四头肌局部注射心脏毒素（Cardiotoxin，CTX），5 μg/只，右侧股四头肌作为自身对照，于注射后 1、4 d 及 1、2、4、6 周处死小鼠，分离两侧股四头肌，取材行 HE 染色、免疫组织化学染色及逆转录聚合酶链式反应（RT-PCR）检测分析，了解 IGF1R 的原位表达情况。结果：HE 染色示肌肉组织从损伤修复到再生的全过程，免疫组织化学及 RT-PCR 显示：正常小鼠股四头肌中 IGF1R 在肌卫星细胞上仅有少量的表达；与对照比较，注射心脏毒素 1 d 后，表达即明显增加并持续到观察终点的第 6 周，其表达量在第 2 周达到高峰且直到观察期间末（第 6 周），仍高于正常肌肉组织，且其差异有统计学意义（$P<0.01$）。结论：IGF1R 可能在肌肉损伤修复过程中起重要作用。

【关键词】肌卫星细胞；胰岛素样生长因子-1 受体；心脏毒素；肌损伤
【中国图书分类法分类号】R685.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-21

Expression of IGF1R in muscle satellite cells of injured muscle tissues

LI Xiao-lei[1], HUANG Hou-jin[2], ZHOU Guang-qian[3]

(Weman And Children Rehabilitation Staff Room, Lianyungang Higher Vocational Technical College of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】*Objective*: To observe the expression of IGF1R in muscle satellite cells of normal and cardiotoxin-intoxicated muscle tissues in situ, so as to contribute useful data for further investigation of the molecular mechanism involved in muscle regeneration. *Methods*: Twelve C57 mice were divided into six groups. In 1st to 6th group, the mice were injected with cardiotoxin (5 μg per mouse) in left quadriceps femoris, while their right quadriceps femoris were left for control without any injection. After the mice were sacrificed at different time-points (1, 4 d, 1, 2, 4, 6 week), the quadriceps femoris were isolated. The histological, immunohistochemical analysis and reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) were used to investigate the expression of IGF1R in muscle tissues in situ. *Result*: HE staining results demonstrated that the muscle tissues experienced the process from muscle injury, repair, to regeneration. The result of immunohistochemistry and RT-PCR showed that there were few expression of IGF1R in muscle satellite cells of normal muscle tissues. Compared with normal tissues, obviously increased expression of IGF1R in 24 hour-group to sixth week-group was found. And, the expression of IGF1R peaked at 2nd week. *Conclusion*: IGF1R may play an important role in the process of muscle impairment and reparation.

【Key words】muscle satellite cell; insulin like growth factor 1 receptor (IGF1R); cardiotoxin; muscle injury

骨骼肌是动态的肌组织，占成人体重的 40%~50%。研究表明，骨骼肌损伤诱发肌卫星细胞的增殖，其再生能力主要来源于单核细胞群的肌卫星细胞。肌卫星细胞是一种源于胚胎中胚层的干细胞，于 1961 年被 Mauro 等[1]首次在蛙骨骼肌中发现，在发育成熟的个体，位于肌纤维浆膜和基底膜之间的一群小单核梭形细胞，处于静息状态。当肌肉受到损伤等刺激条件下，进入有丝分裂循环，提供肌肉修复的细胞[2-4]。新生的细胞可以相互融合形成新的肌束，或融入已有的肌束，修复肌组织损伤。

细胞因子与肌卫星细胞表面的细胞因子受体结合后发挥重要作用。胰岛素样生长因子（Insulin like growth factor，IGF）存在两型即 IGF-1、IGF-2，其中 IGF1 是一种重要的促有丝分裂原，通过激活胰岛素样生长因子 1 受体（Insulin like growth factor 1 receptor，IGF1R）介导的信号通路，影响创面修复和修复后的组织改建[5,6]。IGF1R 在肌肉损伤中，在急性呼

作者介绍：李小雷（1981-），男，讲师，硕士，
研究方向：生物化学与分子生物学。
通信作者：黄厚今，男，教授，Email：huanghj6688@163.com。

吸系统综合征[7]，间质性肺疾病[8]中过表达。而在骨骼肌损伤中未见 IGF1R 蛋白表达相关报道。本实验旨在观察 IGF1R 在肌卫星细胞的表达情况；为进一步研究肌肉退行性疾病，如进行性肌营养不良的分子机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

4~6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 12 只，体重 14.5~16 g，由中国科学院上海实验动物中心提供。兔抗鼠多克隆抗体 IGF1R(Boster 公司)，兔抗鼠单克隆抗体 Pax-3(sigma 公司)，免疫组化试剂盒与 DAB 显色试剂盒(中杉金桥试剂公司)，心脏毒素(sigma 公司)，RT-PCR 试剂盒(Takara 公司)，千屏病理图像分析系统(武汉显微图像分析系统专业软件开发公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 肌损伤模型的建立 根据文献[9-11]：心脏毒素按 5 μg/只局部注射入 C57 左侧股四头肌建立肌损伤模型，右侧作为自身对照。分别于注射后 1、4 d、1、2、4、6 周颈椎脱臼处死小鼠，完整分离两侧股四头肌，取材进行以下检测。

1.2.2 HE 染色 标本为 4%多聚甲醛固定、石蜡包埋，连续切片，切片厚度为 4 μm，HE 染色，光镜观察。

1.2.3 免疫组织化学染色 采用 SP 法，切片脱蜡，3%双氧水孵育 20 min，0.01 mol/L PBS 洗(5 min×3 次)，微波热修复，5%山羊血清封闭 20 min，加一抗 IGF1R(1:100)，对照用 PBS 代替一抗，4℃孵育过夜，加生物素化标记的二抗，加 ABC 复合物进行 DAB 显色，苏木素复染，常规透明封片。光镜下观察，细胞浆或细胞膜中有棕色颗粒为 IGF1R 阳性表达。

1.2.4 RT-PCR 检测 采用常规 TRIzol 试剂，提取 RNA，行 RT-PCR 检测，引物序列由 Gen Bank 查找，上海捷瑞生物公司合成。引物 GAPDH：正义链 5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3'，反义链：5'-TGTCATTGAGAGCAATGCCAGC-3'；IGF1R：正义链：5'-CAATCTATTCACAAGCCTCC-3'，反义链：3'-AGGCAGAGGAGAGAAAAAGG-5'。PCR 反应体系扩增 35 个循环，按照 94℃ 30 s(GAPDH 55℃ 45 s，IGF1R 45℃ 50 s)，72℃ 1 min，4℃保存，凝胶成像仪分析图像。

1.2.5 图像分析及数据处理 免疫组化采用武汉千屏病理图像分析系统，统一放大倍数(×200)及光源强度，取 2 张切片，每张切片随机选取 5 个视野，通过高分辨摄取图像信号，设定灰度值，表达强弱用平均积分吸光度(Integral absorbance，IA)表示。采用 SPSS13.0 进行数据的处理和分析，组间差别用方差分析。

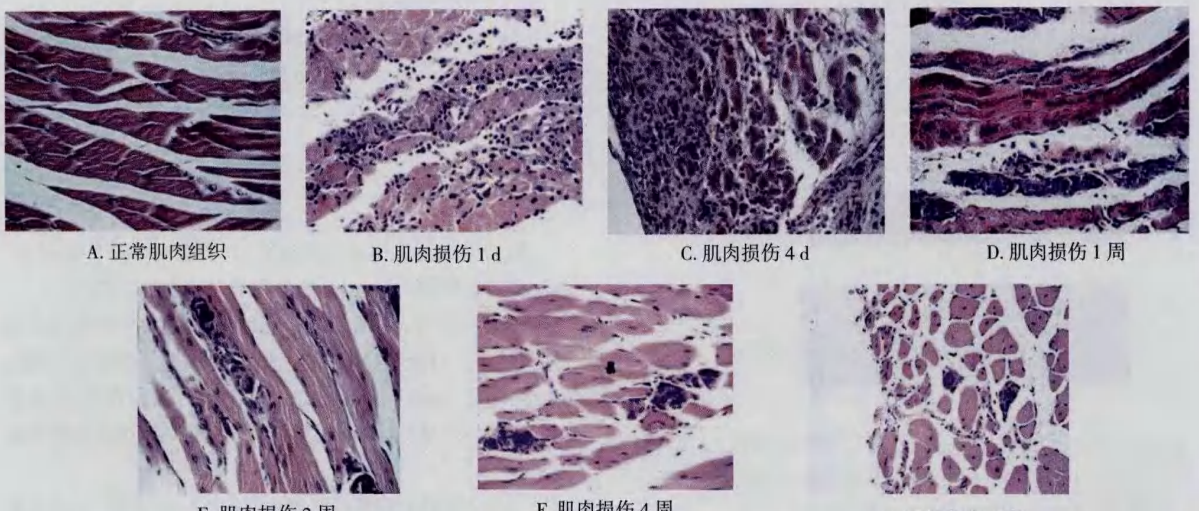
2 结 果

2.1 建立肌损伤模型

HE 染色观察：正常肌纤维，光镜下可见其形态细长，肌细胞核为扁椭圆形，每个肌纤维有许多细胞核，位于肌纤维的周边，紧靠肌膜的内表面(图 1A)。注射心脏毒素 1 d 后可见肌细胞变性坏死、溶解，胞核聚集(图 1B)；4 d 肌纤维发生明显断裂，肌细胞变细、变小，变性、坏死加重(图 1C)；1 周坏死加重，出现空泡、网状，吞噬细胞包裹并出现钙化，肌细胞胞体部分形成网状结构(图 1D)；2 周可见肌细胞坏死继续加重，出现嗜碱性组织，巨噬细胞包裹吞噬坏死的肌细胞(图 1E)；4 周变性坏死钙化依然存在，但已可见部分肌纤维再生(图 1F)；6 周变性坏死已不明显，钙化仍存在，肌细胞部分再生(图 1G)。

2.2 肌肉组织免疫组织化学

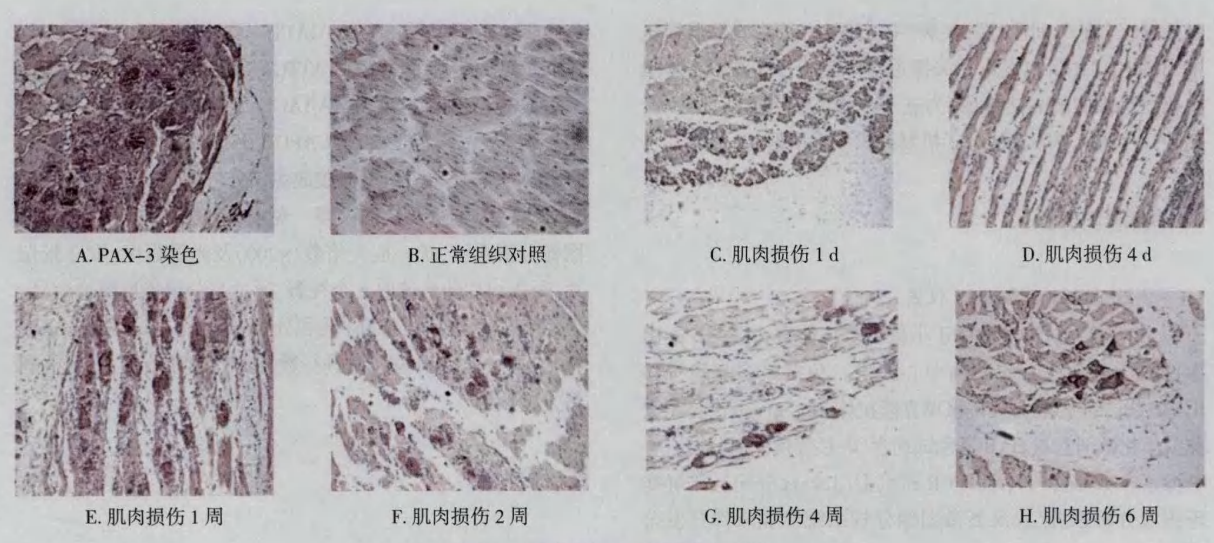
用 Pax-3 对注射心脏毒素 7 d 的肌肉组织进行肌卫星细胞的鉴定，可见 Pax-3 表达明显(图 2A)，证明再生细胞为肌卫星细胞。因此对正常和注射心脏毒素的股四头肌进行免疫组织化学染色，结果显示：正常肌肉组几乎不表达IGF1R，注



A. 正常肌肉组织　B. 肌肉损伤 1 d　C. 肌肉损伤 4 d　D. 肌肉损伤 1 周

E. 肌肉损伤 2 周　F. 肌肉损伤 4 周　G. 肌肉损伤 6 周

图 1 正常与注射心脏毒素肌肉组织(HE 染色，×400)

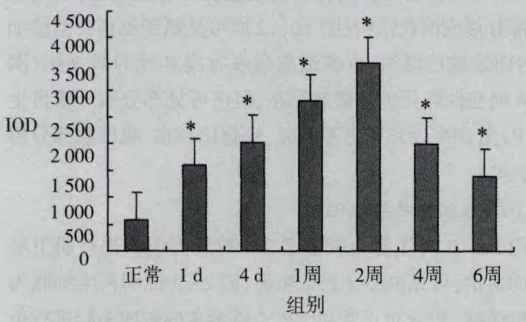


A. PAX-3 染色　B. 正常组织对照　C. 肌肉损伤 1 d　D. 肌肉损伤 4 d

E. 肌肉损伤 1 周　F. 肌肉损伤 2 周　G. 肌肉损伤 4 周　H. 肌肉损伤 6 周

图 2　肌肉组织免疫化学染色(×200)

射心脏毒素 1 d 后，IGF1R 表达明显(与对照比较)。在 2周左右达到高峰后逐渐下降，且持续到观察时间末，其表达量均比正常组织高。各组染色见图 2，统计结果见图 3。结果显示，在注射心脏毒素后 1 d~6 周，IGF1R 的表达均高于正常组织($P<0.01$)，而在实验各组中，以注射 2 周时表达最高。

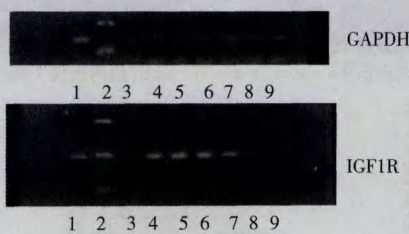


*：正常组织比较 $P<0.01$

图 3　示正常与受心脏毒素损伤的肌肉不同时间段 IGF1R 的表达 IOD($\bar{x}\pm s$)

2.3　RT-PCR

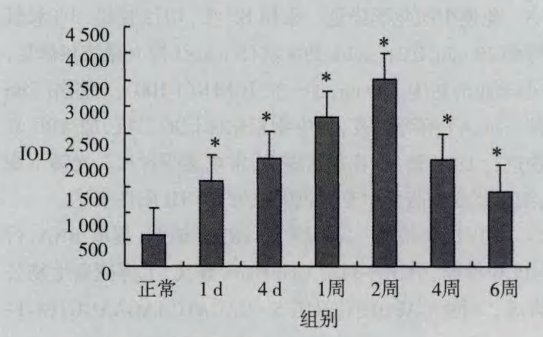
分别从正常和不同时间(1、4 d、1、2、4、6 周)损伤的 C57 小鼠股四头肌中提取 RNA，做 RT-PCR。GAPDH 参照与IGF1R 的结果见图 4。



1. 阳性参照物；2. DL2000 Marker；3. 正常对照；4. 损伤 1 d 肌肉组织；5. 损伤 4 d 肌肉组织；6. 损伤 1 周肌肉组织；7. 损伤 2 周肌肉组织；8. 损伤 4 周肌肉组织；9. 损伤 6 周肌肉组织

图 4　GAPDH 与 IGF1R mRNA 凝胶图像

以肌细胞总 RNA 为模板 RT-PCR 合成的 GAPDH、IGF1R 的 cDNA 片段经琼脂糖凝胶电泳，利用琼脂糖凝胶图像软件半定量分析(图 5)。损伤后 IGF1R 的 mRNA 水平注射组高于正常肌肉组织($P<0.01$)，且随损伤时间的延长有逐渐增高的趋势，在 2 周时达到高峰后又逐渐下降，但至 6 周时仍高于正常组织。



*：与正常组织比较 $P<0.01$

图 5　正常与受心脏毒素损伤不同时间 IGF1R 的 mRNA 的相对表达量 IOD($\bar{x}\pm s$)

3　讨　论

肌肉组织是人体最大的组织，其功能主要是负责运动、体温调节和机体代谢，也是能量和蛋白的主要贮存部位。

近来的研究认为骨骼肌损伤后可以再生，肌损伤的物质基础是建立一种稳定简便的肌损伤模型。造成肌肉组织损伤有多种方法，包括机械性、物理性和化学性肌损伤等，但由于这些方法不容易控制、相对复杂和重复性差而难以达到试验要求。

心脏毒素是从眼镜蛇毒腺中提取的一种毒素。心脏毒素能使骨骼肌发生坏死，诱导毛细血管通透性增加和组胺的释

放。病理改变主要是其导致肌膜和肌纤维的快速溶解。由于心脏毒素致肌肉损伤模型具有稳定、简便、易控制且重复性好的特点，被广泛应用于骨骼肌损伤及再生过程中许多生长因子表达的研究。

国外有研究发现，Pax-3 在肌肉损伤修复过程中起着关键的调节作用[12-14]，利用 Pax-3 检测注射心脏毒素后的肌肉组织证实，再生细胞来源于肌卫星细胞。

股四头肌损伤模型观察：股四头肌在局部注入心脏毒素 1 d 即可见细胞明显坏死，4 d 后渐重，1 周后出现钙化，2 周后坏死、营养不良性钙化更加广泛明显，4 周后开始自行再生并可见肌细胞部分再生，6 周后肌细胞已部分再生，与文献[15-17]报道基本一致。

本实验结果显示，在正常肌肉中 IGF1R 仅有少量的表达，而注射心脏毒素后，IGF1R 在肌肉组织中均有比较明显的表达且持续到观察终点的第 6 周。IGF1R 在 2 周左右表达量达到最高，且直到观察期末（第 6 周），其表达量仍高于正常肌肉组织。肌肉损伤后 1 d，卫星细胞已经出现，且由于受到损伤刺激的影响，卫星细胞出现了细胞核增大、DNA 合成增加、细胞质含量增多和细胞质密度升高的现象，可以证明卫星细胞已经被激活，并开始表现出分裂和增殖。其可能机制为：肌卫星细胞在正常状态下，含量少，且处于静止状态，在心脏毒素刺激后，肌卫星细胞被动员，进入激活态，肌卫星细胞数量增多，肌卫星细胞表面的 IGF1R 受体通道开放也随之增多，随着坏死时间的延长，肌肉组织开始再生，肌卫星细胞也随着肌肉再生而再次进入静息状态，受体通道也随之减少。

本实验对心脏毒素致肌损伤肌肉组织中，肌卫星细胞的 IGF1R 表达进行了观察。结果提示，心脏毒素可以促进IGF1R 在肌卫星细胞的原位表达，IGF1R 在肌肉损伤修复过程中可能起着重要的作用。

参 考 文 献

[1] Mauro A.Satellite cell of skeletal muscle fibers[J].Biophys.Biochem, Cytol,1961,9(1):493-498.

[2] 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)：104-106.

[3] 邬 江，孙晓娟，钟世镇，等.骨骼肌失神经和再神经化时肌卫星细胞的变化[J].中国修复重建外科杂志，2006，20(10)：1047-1051.

[4] 邬 江，孙晓娟，钟世镇.组织工程用大鼠卫星细胞的体外筛选[J].中华显微外科杂志，2002，25(2)：123-125.

[5] Ghahary A,Shen Y J,Wang R,et al.Expression and localization of insulin like growth factor-1 in normal and post burn hypertrophic scar tissue in human[J].Mol Cell Biochem,1998,183(1):1.

[6] Yoshimoto H,Ishihara H,Ohtsuru A,et al.Over expression of insulin like growth factor-1(IGF1) receptor and the invasiveness of cultured keloid fibroblasts[J].AmJ Pathol,1999,154(3):883-884.

[7] Krein P M,Sabatini P J,Tinmouth W,et al.Localization of insulin-like growth factor-1 in lung tissues of patients with fibroproliferative acute respiratory distress syndrome[J].Am J Respir Crit Care Med,2003, 167(1):83-90.

[8] Rom W N,Paakko P.Activated alveolar macrophages express the insulin-like growth factor-I receptor[J].Am J Respir Cell Mol Biol,1991, 4(5):432-439.

[9] Andres V,Walsh K.Myogenin expression,cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis[J].J Cell Biol,1996,132(4):657-666.

[10] Ownby C L,Fletcher J E,Colberg T R.Cardiotoxin-1 from cobra (Naja naja atra) venom causes necrosis of skeletal muscle in vivo[J]. Toxicon,1993,31(6):697-709.

[11] Cardoso D F.Role of crotoxin,a phospholipase isolated from Crotalus durissus terrificus snake venom,on inflammatory and immune Reactions[J].Mediators of Inflammation,2001,10(2):125-133.

[12] Relaix F,Rocancourt D,Mansouri A,et al.A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells[J].Nature,2005,435(7044): 948-950.

[13] Relaix F,Montarras D,Zaffran S,et al.Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells[J].J Cell Biol, 2006,172(1):91-94.

[14] Arnold H H,Winter B.Muscle differentiation:more complexity to the network of myogenic regulators[J].Curr Opin Genet Dev,1998,8(5): 539-544.

[15] 张 勇，邹仲敏，郭朝华，等.肌损伤的形态学观察[J].第三军医大学学报，2003，25(14)：1302-1304.

[16] Fletcher J E,Hubert M,Wieland S J,et al.Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins,melittin and other myotoxins[J]. Toxicon,1996,34(11-12):1301-1313.

[17] Letcher J E,Tripolitis L,Beech J.Species difference in modulation of calcium release by Naja naja kaouthia snake venom cardiotoxin in terminal cisternae from human and equine skeletal muscle[J].Toxicon,1993,31(1):43-51.

（责任编辑：冉明会）