

# 热休克预处理提高猪成肌细胞自体正常肌肉移植后的生存率

杨 圣<sup>①②\*</sup> Laumonier Thomas<sup>②</sup> Menetrey Jacques<sup>②\*</sup>

(① 大连大学附属中山医院骨外科, 大连 116001; ② Department of Orthopedic Surgery, Geneva Faculty of Medicine and University Hospital, CH-1211 Geneva, Switzerland)

**摘要** 研究表明成肌细胞移植有可能用于治疗 Duchenne 型肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)、心衰和严重肌肉损伤。移植后成肌细胞快速大量的死亡是影响该方法疗效的一个主要难题。细胞在受到各种刺激后会过度表达热休克蛋白(heat shock protein, HSP)。体外和体内实验均已证实 HSP 能帮助细胞对抗多种有害刺激。本实验针对 HSP 的过度表达能否提高猪成肌细胞自体正常肌肉移植后的存活率进行研究。猪成肌细胞经过 42℃, 1 h 的热休克后会过度表达 HSP。通过 Western blot 和流式细胞仪来定量检测猪成肌细胞中 HSP 的表达; 同时分析细胞中的 CD56 和结合蛋白含量, 从而了解休克后细胞的肌源性有无变化。利用放射性 H<sup>3</sup> 定量分析移植后细胞的生存率。借助慢病毒载体(Lentivector Lac Z)监测移植后成肌细胞与宿主细胞的融合情况。结果表明热休克预处理后成肌细胞的 HSP70 显著增高( $P<0.01$ ), 并且细胞的肌源性无变化。成肌细胞体内移植后( $n=7$ ), 24 h 时热休克组和非热休克组的细胞存活率无显著性差异( $(67.69 \pm 8.35)\%$  vs  $(58.79 \pm 8.35)\%$ ,  $P>0.05$ )。48 h 时热休克组细胞存活率比非热休克组的高 2 倍( $(53.32 \pm 8.22)\%$  vs  $(28.27 \pm 6.32)\%$ ,  $P<0.01$ )。120 h 时热休克组细胞存活率比非热休克组的高 3 倍( $(26.33 \pm 5.54)\%$  vs  $(8.79 \pm 2.51)\%$ ,  $P<0.01$ )。组织学检查显示; 热休克细胞和非热休克细胞均能与宿主细胞融合。这些结果提示热休克预处理能增强成肌细胞 HSP70 的表达, 并可提高成肌细胞自体移植后的生存率。体外热休克预处理是一个简单有效的能改善猪成肌细胞自体移植生存率的方法。这也许是一个解决成肌细胞移植后存活率低的方法。

**关键词** 成肌细胞 热休克预处理 HSP70 移植 骨骼肌

成肌细胞移植是一种已广泛研究并用于治疗 Duchenne 型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)<sup>[1,2]</sup>、心衰<sup>[3,4]</sup>和严重肌肉损伤的细胞移植技术<sup>[5]</sup>。

DMD 是由位于 X 染色体上抗肌萎缩蛋白(dystrophin)基因突变所致的以该种蛋白缺乏为特征

的 X-性连锁隐性遗传型肌病<sup>[1,2]</sup>。抗肌萎缩蛋白是一种棒状细胞骨架蛋白, 它位于肌纤维的内表面, 并在保持肌细胞膜的完整和稳定方面起着关键的作用。抗肌萎缩蛋白的缺乏会导致骨骼肌进行性和不可逆性萎缩。DMD 在临床上的特征是: 儿童时期进行性肌萎缩无力, 青少年期瘫痪, 常在 30 多岁死于心肺系

统疾患。该病不分种族和国籍,其发生率约为每年 3500 个新生男婴中就有 1 例<sup>[6]</sup>。由于该种肌肉疾病较高的发生率和严重后果,DMD 成为近年来骨骼肌疾病方面最热门的研究项目之一。成肌细胞移植是目前最重要的细胞移植治疗 DMD 的方法之一。

成肌细胞移植也是一种能改善心衰病人生存状况的新疗法。针对这些疾病的成肌细胞移植已在动物实验和临床上取得一定的成功,但移植后细胞快速大量的死亡仍然制约成肌细胞移植的发展。为了减少移植后细胞的死亡,已有几种方法(如利用放射线和细胞因子等)被应用,近来研究表明热休克预处理诱导出现的热休克蛋白家族(HSP,尤其是 HSP70)能保护移植细胞和改善它们的生存率。因此我们假设热休克预处理成肌细胞能改善该细胞自体骨骼肌移植后的生存率<sup>[7~10]</sup>。我们已建立了相关的猪动物模型,由于猪的各种组织和器官在尺寸和功能上与成年人相似,故猪是一种合适的能给人的生化研究提供实验基础的大动物模型。

本实验的研究目的是:(i)明确 42℃ 中度热休克预处理正常猪成肌细胞能否促使细胞内热休克蛋白 70(HSP70)的表达;(ii)明确热休克处理是否改变猪成肌细胞的肌源性特征;(iii)明确 HSP70 的过度表达能否提高猪成肌细胞自体移植后的生存率。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

本研究中所有动物实验和动物护理均按照相关的瑞士和国际法规定进行。实验使用的 7 只母猪(体重 $(20.3 \pm 2.5)$  kg,年龄 8 周 $\pm$ 1 周)均由瑞士日内瓦大学动物中心提供。

### 1.2 试剂

不含镁和钙的 Hanks 液(Invitrogen 公司);生长培养基(由 80%  $\alpha$ -MEM 培养基(Invitrogen 公司)和 20% MCDB110 液(Sigma 公司)组成并含有 0.5  $\mu$ L/mL 的转移素,0.18 mg/mL 的胰岛素,15  $\mu$ g/mL 的肌酐,3.9 mg/mL 的地塞米松(均为 Sigma 公司),5  $\mu$ g/mL 的庆大霉素(Invitrogen 公司),10  $\mu$ g/mL 的 $\beta$ -成纤维细胞生长因子(Invitrogen 公司),100  $\mu$ g/mL 的表皮细胞生长因子(瑞士 Becton Dickinson 公司));分化培养基(由 50% 的 4:1 的 $\alpha$ -MEM 培养基和 50% 的牛血清白蛋白

及 5  $\mu$ g/mL 庆大霉素组成);洗涤培养基[由 80% 的 F-10 培养基(Invitrogen 公司)和 20% 的牛血清(以色列 Readysystem 公司)和 5  $\mu$ g/mL 的庆大霉素组成];TNE 液(50 mmol/L Tris-HCL (pH7.4), 150 mmol/L NaCL, 1 mmol/L EDTA);Tween20 的 Tris 缓冲液(TTBS, 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 137 mmol/L Na 和 0.1% Tween20)。

### 1.3 成肌细胞的分离和培养

猪成肌细胞的分离采用一种既往已报道的人成肌细胞分离法<sup>[11]</sup>的改良法。自猪股内侧肌取一块肌肉并将其剪为碎糜状。于 37℃ 水浴中,搅拌状态下蛋白酶(Sigma 公司,按 0.14 mg/g 肌肉比例应用)消化 90 min。消化结束后加 10% 小牛血清中止蛋白酶的消化作用,消化液经直径 40  $\mu$ m 的尼龙过滤器(瑞士 Becton Dickinson 公司)过滤,并以 350 $\times$ g 离心力离心 5 min。洗涤培养基清除细胞外的基质和破坏的血小板。Tryptan 蓝染色确认细胞存活率后接种细胞。在每个面积 75 cm<sup>2</sup> 的培养瓶(日本东京 Iwaki glass 公司)中接种  $5 \times 10^5$  个细胞(用于体内和体外实验);在每个直径 35 mm 的培养皿(日本东京 Iwaki glass 公司)中接种  $2.5 \times 10^4$  个细胞(用于成肌细胞融合指数测定)。

培养瓶和培养皿均已预先用明胶包被。在 37℃, 7% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中,用含 15% 小牛血清的生长培养基静置培养猪成肌细胞,并将第一代细胞用于所有移植实验中。用于体外检测成肌细胞肌源特性(融合指数)的细胞在培养 8 天后改用分化培养基培养 3 天并进行检测。

### 1.4 热休克处理

把直径 35 mm 培养皿和面积 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中亚饱和的猪成肌细胞置于 42℃, 0.5% CO<sub>2</sub> 的烘箱中作 1 h 的热休克处理。除需作成肌细胞融合指数检测的细胞在热休克后改用分化培养基外,其余成肌细胞在热休克前后均使用新鲜的生长培养基。作为对照,非热休克细胞在 37℃, 0.5% CO<sub>2</sub> 环境中放置 1 h,热休克后的细胞在 37℃, 7% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 24 h。

### 1.5 体外实验

热休克 (heat shock treatment, HS) 和非热休克 (non heat shock treatment, non-HS) 猪成肌细胞的 HSP70 和融合指数的检测均在体外进行。

(1) Western blot 分析: 冰 PBS 液洗涤饱和的单层细胞后, 将细胞刮于 TNE 液并匀浆。用含 5%  $\beta$ -巯基乙醇(美国 Bio-Rad 实验室)的 Lammeli's 样本液按 1:1 稀释匀浆液, 于 100℃煮沸匀浆 5 min, 冰上快速冷却后-20℃冻存备用。按照考马斯亮蓝(Bradford)法, 利用牛血清白蛋白作标准曲线, 并测定各样本蛋白浓度。在 8%十二烷基磺酸(SDS)聚丙烯酰胺凝胶上按每孔 15  $\mu$ g 蛋白加样并进行单向电泳, 用电转膜仪将凝胶上的蛋白质转移至 PVDF 膜(德国 Bio-Rad 实验室), 用含 5%去酯奶粉的 TTBS 液封闭 1 h, 再加入封闭液稀释的一抗孵育 1 h。检测 HSP70; 按 1:1000 加入小鼠抗人 HSP70 单克隆抗体(Merck 公司); 检测结合蛋白和 $\alpha$ -微管蛋白, 均按 1:5000 加入小鼠抗人结合蛋白单克隆抗体(丹麦 DAKO Als 公司, Clone D33)和小鼠抗人 $\alpha$ -微管蛋白单克隆抗体(Sigma 公司, Clone DM1A)。TTBS 漂洗后, 按 1:3000 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗孵育 1 h。

用增强化学发光剂(ECL, Amersham Biosciences 公司)使蛋白印迹显影。用 OptiQuant 软件(Packard 公司, 2000 年 3 月版本)半定量测定各蛋白条带的密度值。

(2) 流式细胞分析(FACS): 用常规胰酶-EDTA 液收集单层饱和 HS 细胞或 non-HS 细胞, 按每个标本 1 百万细胞的比例制成细胞悬液(检测 CD56 时用含 1% 小牛血清的 PBS 液; 检测结合蛋白和 HSP70 时用 PBS 液)。尽管没有猪的抗体, 但已证实可购买的抗人蛋白抗体能与猪相应抗原发生交叉反应。CD56 染色; 加入小鼠抗人 CD56 抗体(Becton Dickinson 公司, clone NCAM)并于冰上孵育 60 min。该抗体存在于小鼠总免疫球蛋白中并已被异硫氰酸荧光素(FITC)标记。阴性对照按相同方法处理, 但使用的抗体是 FITC 标记的小鼠同型 IgG2a 抗体(Becton Dickinson 公司)。结合蛋白和 HSP70 染色; 加入固定/渗透液(Becton Dickinson)并在冰上孵育 20 min 以使抗体能渗透入细胞。渗透/漂洗液(Becton Dickinson, 1 $\times$ )漂洗 2 次。含 50%男性 AB 型血清(Sigma 公司)的渗透/漂洗液(2 $\times$ )孵育 15 min, 以封闭细胞内非特异性位点。加入一抗; 小鼠抗人结合蛋白抗体(丹麦 DAKO, Glostrup 公司, Clone DE-R11, 检测结合蛋白)或小鼠抗人 HSP70 单克隆抗体(Merck 公司, 检测 HSP70)。漂洗 2 次后加入二抗; FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体

(Sigma 公司)。阴性对照的一抗为纯化的小鼠同型 IgG1(Beckton Dickinson 公司, Clone MOPC-21)。样本(细胞悬液)用 FACSCalibur (Becton Dickinson 公司)仪器检测细胞的荧光, 并经 CellQuest 软件(Becton Dickinson 公司)分析数据。

(3) 成肌细胞融合指数: 单层饱和的 HS 细胞和 non-HS 细胞在分化培养基中于 37℃, 7% CO<sub>2</sub> 环境中培养 3 天后开始检测。

含 4%福尔马林的 PBS 液固定细胞 10 min。PBS 漂洗后, 用含 0.25%Triton 的 PBS 液孵育细胞 20 min 以使其可渗透化。再次漂洗后用含 0.1% Tween 20 和 2%山羊血清(Sigma)的 PBS 液孵育 5 min 以封闭非特异性位点。加入小鼠抗人肌钙蛋白(Troponin)T 抗体(Sigma 公司, clone JLT11)孵育 90 min 并漂洗 2 次。加入山羊抗小鼠 FITC 抗体(Sigma 公司)孵育 60 min 后, 用含特异性蓝色荧光的 DAPI 封片胶封片。每个样本随机选择 27 个视野(放大倍数 $\times$ 20)检测; 观察者分别确定各视野中绿色(肌管中肌钙蛋白被染成绿色)和蓝色(细胞核被染为蓝色)区域, 并利用 Metamorph 软件(瑞士 Felbach, zeiss)自动计算成肌细胞融合指数(视野内肌管中被 DAPI 染蓝的细胞核数目除以视野内被 DAPI 染蓝的细胞核总数)。

(4) 猪成肌细胞自体移植前的标记: 用含 *nls-lacZ* 报告基因的慢病毒载体转染 HS 细胞和 non-HS 细胞。报告基因的表达受到来源于人的延长因子 I  $\alpha$  中的构建活化启动子的调控。为了分析移植后组织学变化, *nls-lacZ* 标记后的细胞被分别移植于猪的胫骨前肌。在 4 个相邻部位各注射含  $1.8 \times 10^7$  细胞的 40  $\mu$ L 细胞悬液(具体过程见后)。8 天之后在相应部位切取标本。用含 2%福尔马林 PBS 液于振荡中固定 24 h, 尔后作 $\beta$ -半乳糖苷酶染色。

(5) 组织学分析和  $\beta$ -半乳糖苷酶染色: 标本经含有 5 mmol/L 氰铁酸钾, 5 mmol/L 亚铁氰酸钾, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.02 g/mL NaDC, 0.02% NP-40(Fluka 公司), 1 mg/mL X-gal (5-溴-4-氯-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷)的 1 倍 PBS(-)液染色 48 h。24 h 更换染色液 1 次。最后标本经含 5%福尔马林的 1 倍 PBS(-)液固定 24 h, 石蜡包埋, 在明胶覆盖的玻片上作常规苏木素-依红染色。

## 1.6 体内实验

为了定量分析移植后细胞的死亡情况, 成肌细胞被含  $1.85 \times 10^5$  Bq/mL 放射性 <sup>3</sup>[H]标记的胸腺嘧啶

脱氧核苷(瑞士 Braunschweig, HartmannAnalytic 公司)的生长培养基培养 16 h 并进行放射性标记。

(1) 成肌细胞移植: 麻醉时一直使用异氟烷(瑞士 Baar, Abbott 公司), 并通过一个半密闭吸入系统供氧。猪被麻醉后, 切开实验区骨骼肌上的皮肤, 用带 27 号针头的 50  $\mu\text{L}$  注射器(瑞士 Bonaduz, Hamilton 公司)将含  $1.6 \times 10^6$  细胞的 40  $\mu\text{L}$  细胞悬液注入肌肉。肌肉表层的四周用不可吸收线标记, 注射点位于中心。分别在注射后的第 0, 24, 48 和 120 h 时活检。手术后连续 3 天给猪注射头孢呋辛(750 mg/天, 瑞士 Munchenuchsee, GlaxoSmithkline, Zinacef 公司)和连续 2 天的芬太尼( $1 \mu\text{g}/(10 \text{ kg} \cdot \text{天}^{-1})$ , 瑞士 Mendrisio, Sintetica S,A 公司)

(2) 成肌细胞生存率的检测: 在注射细胞前, 于同一块猪骨骼肌上取 3 块标本作盲测。为了确定细胞 100% 存活时的参考值, 在活检后立即将 40  $\mu\text{L}$  的细胞悬液直接注入肌肉标本中(并记为体外  $T_0$ , *ex vivo*  $T_0$ )。标本均被冻存于  $-20^\circ\text{C}$  备用。所有的标本(约  $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$  大小)均被 Beckman 组织溶解液-450(BTS-450, 德国 Krefeld, Beckman Coulter 公司)于  $37^\circ\text{C}$  振荡状态下匀浆化。在 10 mL 的有机准备液(Coulter, Beckman 公司)中加入 500  $\mu\text{L}$  已消化的肌肉匀浆, 混合而成含有放射微粒的鸡尾酒式混合液。利用 Beckman LS600TA 计数系统(Coulter, Beckman 公司)检测该混合液而获得各个标本的放射性标记量, 从而间接判断细胞存活情况。

## 1.7 统计学处理

统计学处理由  $t$  检验完成。  $P < 0.05$  表明有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 热休克预处理提高了猪成肌细胞中 HSP70 的表达

HS 和 non-HS 细胞中 HSP70 的表达情况通过 Western blot 方法来检测。图 1 表明 HS 细胞中的 HSP70 显著增多。各条带中结合蛋白和  $\alpha$ -微管蛋白的表达是一致的, 这说明各条带的总蛋白量是相等的。

通过计算机处理各条带密度而得到半定量分析的结果。HS 细胞中 HSP70 的表达是 non-HS 细胞的 2 倍多(分别为  $(0.659 \pm 0.016)\%$  和  $(0.292 \pm 0.015)\%$ ,  $P < 0.01$ )(图 2)。与此不同的是, HS 和 non-HS 细胞中的结合蛋白则无显著性差异(分别为  $(0.398 \pm 0.009)\%$  和  $(0.404 \pm 0.005)\%$ ,  $P > 0.05$ )。

为了证实此数据, 休克 24 h 后 HS 和 non-HS 细胞中 HSP70 的表达也用流氏细胞仪进行了测定。结果表明: HS 细胞内 HSP70 的表达是 non-HS 细胞的 4 倍多(分别为  $30.61 \pm 1.31$  和  $7.35 \pm 0.76$ , HSP70 的荧光中位数,  $P = 0.004$ )(图 3)。

### 2.2 热休克处理没有改变猪成肌细胞的肌源性特征

猪成肌细胞的表现型由流氏细胞仪通过针对 CD56 和结合蛋白的标记物来确定。与 Western blot 的结果一致, HS 和 non-HS 细胞内 CD56 和结合蛋白均无明显变化。为了证实 HS 和 non-HS 细胞的肌源性, 我们也检测了它们的融合指数。有或无热休克预处理的细胞都能在生长培养基中良好地增殖; 在分化培养基中融合并形成肌管。由于肌钙蛋白-T 是成熟肌管特有的一种蛋白, 故肌管可通过它来标记(图 4)。

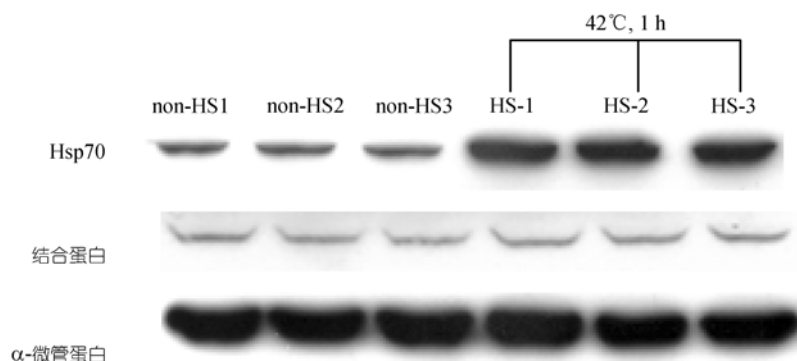


图 1

$42^\circ\text{C}$  1 h 热休克(HS)细胞或非热休克(non-HS)细胞内的蛋白均在热休克处理 24 h 后收集。与 non-HS 细胞相比: HS 细胞中的热休克蛋白(HSP70)增加 2 倍; 然而休克后细胞内结合蛋白的表达无改变。 $\alpha$ -微管蛋白一致说明各条带内加载的总蛋白量是相同的

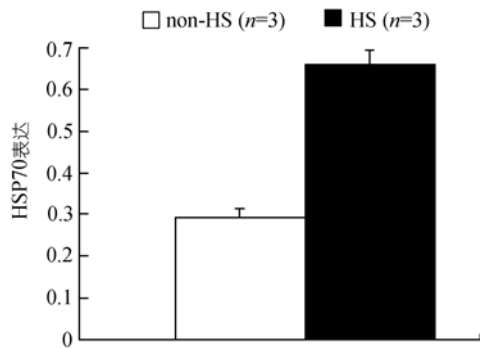


图2 分析各条带密度半定量 HSP70 的表达  
热休克处理使 HSP70 的表达增加 2 倍,  $P < 0.01$

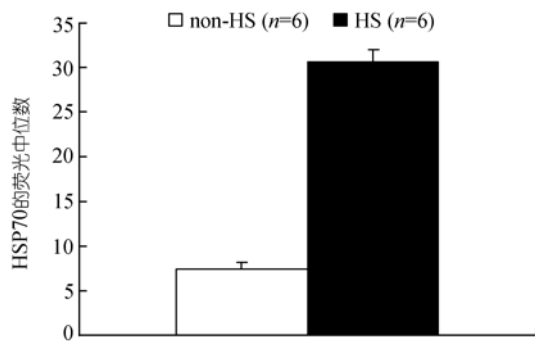


图3 热休克后 HSP70 的过多表达

热休克 24 h 后 HS 和 non-HS 细胞内 HSP70 经流式细胞分析. 与 non-HS 细胞相比, HS 细胞中的 HSP70 增加 4 倍(分别为  $30.61 \pm 1.31$  和  $7.35 \pm 0.76$ , HSP70 的荧光中位数,  $P = 0.004$ ). 图中所示为 6 次实验的均值及其标准差

HS 和 non-HS 细胞( $n=3$  (小培养皿/组))的融合指数可通过半自动生化图像技术来测定, 它们分别是  $(63.69 \pm 1.22)\%$  和  $(64.78 \pm 1.26)\%$ . 这 2 种融合指数没有显著性差异. 因此热休克处理细胞的肌源性与未处理细胞的一致.

### 2.3 组织学分析

慢病毒已为人熟知能在体外有效地转染纯化的人成肌细胞和猪肌肉细胞, 并且不伴有细胞病毒所致的成肌细胞增值和分化能力的降低 [11]. HS 和 non-HS 细胞被含有 *nls-lacZ* 基因的慢病毒载体转染并培养 8 天后又在分化培养基中培养 72 h, 它们仍能分化、融合并形成肌管. 该肌管中有报告基因的表达.

我们将经 *nls-lacZ* 转染的 HS 和 non-HS 细胞分别自体移植, 并在 8 天后活检. 组织学检查表明: X-gal 阳性细胞核的出现证实了含有 2 种细胞核——移植(热休克或非热休克)细胞的细胞核和接受移植部位原有细胞的细胞核, 再生杂交肌管的存在(图 5). 我们原

来的研究 [12] 已证实了既有移植(非热休克)细胞又有原细胞的细胞核的杂交肌管的存在.

### 2.4 成肌细胞移植后的生存率变化

移植前, HS 或 non-HS 成肌细胞被放射性  $^3\text{H}$  标记的胸腺嘧啶脱氧核苷孵育 16 h. 尔后成肌细胞被注射进同一块猪骨骼肌的不同位置, 在移植后的不同时间点(从第 0~120 h)作活组织检查. 通过测定活检标本( $n=7$ )中的放射值来判断移植后细胞的生存率, 在既往的研究中 [12], 我们已经确定了合适的猪移植细胞 100% 生存率的参考值. 移植 24 h 后(与相应的  $T_0$  相比), HS 和 non-HS 的细胞生存率分别为  $(67.7 \pm 8.35)\%$  和  $(52.9 \pm 10.82)\%$ . 这二者之间没有显著差异( $P > 0.2$ ). 然而在移植 48 h 后, HS 和 non-HS 的细胞生存率分别是  $(52.3 \pm 8.22)\%$  和  $(22.0 \pm 5.90)\%$ . 与此类似, 在移植 120 h 后, HS 和 non-HS 的细胞生存率分别是  $(26.3 \pm 5.54)\%$  和  $(8.7 \pm 3.34)\%$ , 移植后第 48 h ( $P < 0.05$ ) 和第 120 h ( $P < 0.01$ ), HS 细胞的生存率均显著改善(图 6).

## 3 讨论

热休克蛋白家族(HSP), 又称为压力蛋白, 是存在于所有细胞中的一组蛋白. 它们能保护细胞对抗随后的损伤, 无论该损伤是原发刺激还是其他的刺激. 换句话说, 当细胞受到热刺激后会获得对抗其他随后而来的有害刺激的能力 [7~10], 既往研究表明热休克预处理能增强细胞心脏移植后的生存能力 [7,9]. Bouchentouf 等人 [13] 报道热休克预处理能改善成肌细胞移植于 MDX 小鼠后的生存率. 本研究中, 我们证实了热休克预处理能诱发猪成肌细胞内 HSP70 的过度表达, 并改善细胞自体正常骨骼肌移植后的生存.

HSP 家族成员中, HSP70 是热休克刺激后数量最多的热休克蛋白 [14,15]. HSP 在炎症、感染和缺血等方面的细胞保护作用已有广泛的报道 [15,16]. 因此, 我们在本研究中选择 HSP70 作为评价猪成肌细胞热休克效应的主要标准之一.

在我们的体外实验中, Western blot 结果显示 HS 细胞中的 HSP70 比 non-HS 细胞的高 2 倍. 然而 FACS 分析表明, HS 细胞中的 HSP70 是 non-HS 细胞的 4 倍多. 我们分析这个差别是由于使用的检测方法所致. FACS 是一种定量检测, 而 Western blot 却是一种半定

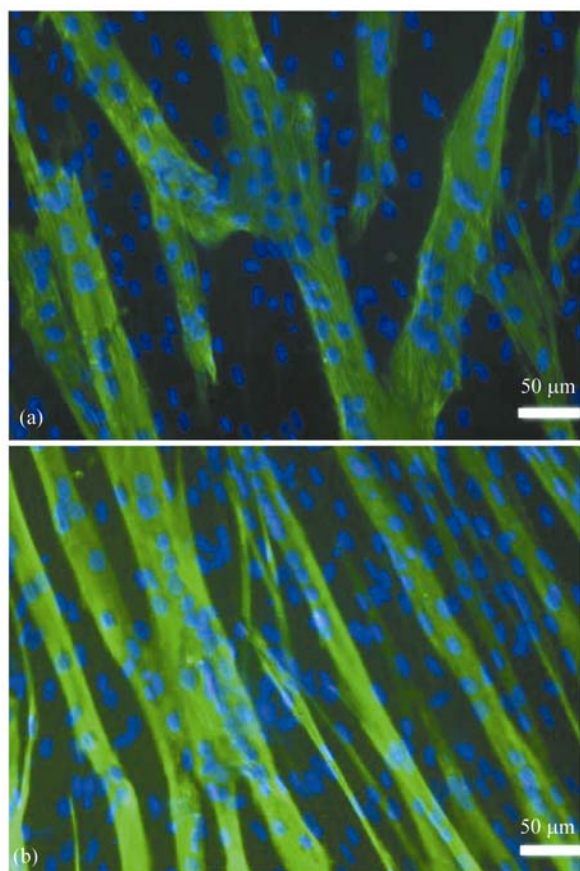


图4 HS 和 non-HS 细胞均保持了融合为肌管的肌源性特征  
HS 或 non-HS 细胞在生长培养基中培养 6~8 天后即可达到饱和状态, 尔后再在分化培养基中培养 3 天. 图中条状排列的细胞核就是典型的肌管. 利用抗肌钙蛋白-T 的抗体将肌管染为绿色, 细胞核则被 DAPI 染为蓝色. 肌管之间清晰可见未融合细胞的细胞核. (a) non-HS 细胞融合而成的肌管(b) HS 细胞融合而成的肌管, 物镜倍数 $\times 40$ , 比例尺: 50  $\mu\text{m}$

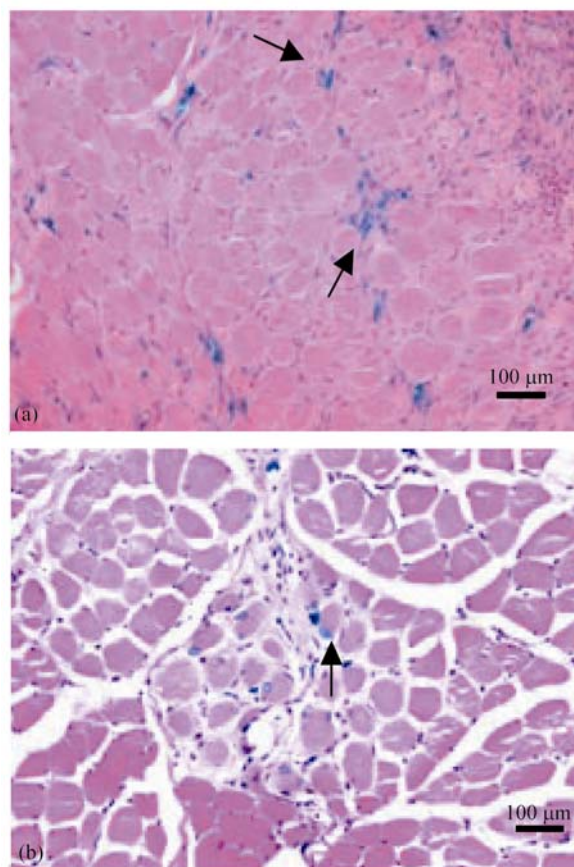


图 5

*nls-lacZ* 转染的猪成肌细胞在自体肌肉移植 8 天后的组织学染色. 肌肉标本中有 X-gal 的细胞核被染为蓝色, 细胞浆被依红染为红色. (a) 中黑色箭头所示为受体肌管中热休克处理的供体细胞核, 物镜倍数 $\times 10$ , 比例尺: 200  $\mu\text{m}$ ; (b) 中黑色箭头所示为受体肌管中非热休克供体细胞核. 这些仅是 5 个组织学分析标本中的代表, 物镜倍数 $\times 20$ , 比例尺: 100  $\mu\text{m}$

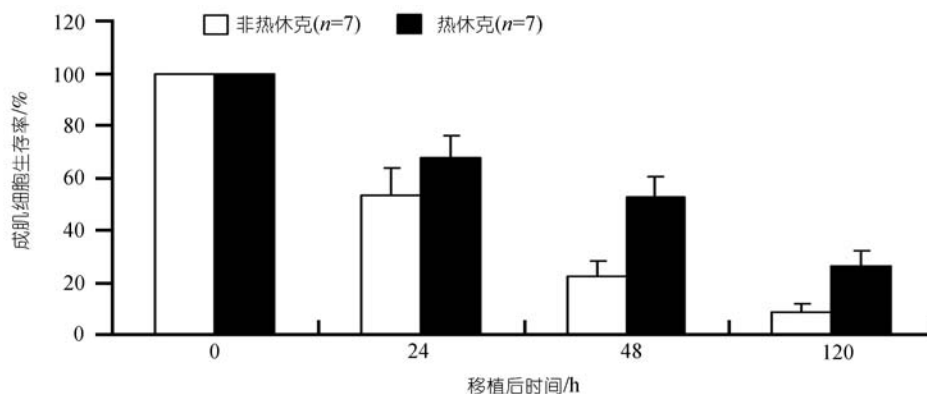


图 6 猪成肌细胞移植于正常骨骼肌后的生存率

在移植于正常骨骼肌之前, HS 和 non-HS 细胞首先被放射性  $^3\text{H}$  标记的胸腺嘧啶脱氧核苷孵育 16 h. 在实验开始( $T_0$ )时, 立即作一块肌肉活检, 此时测得的放射值(单位为 cpm)记为 100%. 在移植后第 24, 48 和 120 h,  $^3\text{H}$  标记细胞的放射值为: 某个时间点每毫克活检组织中的 cpm 值/ $T_0$  时每毫克组织中的 cpm 值. 图中白色长方形代表非热休克组(non-HS), 黑色长方形代表热休克组(HS). 移植 24 h 后, HS 和 non-HS 之间的生存率无显著性差异( $67.7 \pm 8.35\%$  和  $52.9 \pm 10.82\%$ ,  $P > 0.2$ ). 移植 48 h 后, HS 细胞的生存率得到显著改善( $52.3 \pm 8.22\%$  和  $22.0 \pm 5.90\%$ ,  $P = 0.014$ ), 与非热休克组相比, HS 细胞的生存率在移植 120 h 后有 3 倍多的增加( $26.3 \pm 5.54\%$  vs  $8.7 \pm 3.34\%$ ,  $P < 0.01$ ).

量分析, 所以 FACS 比 Western blot 敏感. 考虑热休克处理增加的 HSP70 阳性细胞均能被 FACS 检测, 却不能全被 Western blot 检测, 从而得到了不同的 HSP70 水平.

为了评价成肌细胞的肌源性质是否被热休克改变, 我们检测了成肌细胞内结合蛋白和 CD56 的表达, 以及成肌细胞的融合指数. 结果表明在 HS 和 non-HS 细胞之间无显著性差异, 由此可推断热休克处理没有改变成肌细胞的肌源性质.

体内实验的结果与Bouchentouf等人 [13]的研究是一致的. 在MDX小鼠中, HS细胞移植 5 天后的生存率增加了 2 倍. 本研究中HS细胞移植 5 天后的生存率增加了 3 倍, 而且在移植 48 h后的生存率也有近 2 倍的增加( $P<0.01$ ). 我们认为移植 48 h后HS细胞生存率的差异(与Bouchentouf等人研究相比)可能源于物种不同, 故HSP70 的表达也小有差别所致.

坏死和凋亡是移植后早期细胞死亡的 2 个主要原因. 细胞发生坏死后, 细胞膜的完整性表达, 细胞内容物释放并引起炎症反应, 凋亡时则不同, 凋亡细

胞内容物仍在凋亡小体中并且不发生炎症. 凋亡和坏死有以下特点: (i) 都能被相同的病理生理刺激诱发(如细胞因子、缺血、热、放射和病原体等); (ii) 都能通过抗凋亡机制来预防; (iii) 这 2 种形式能互相转换.

据报道坏死似乎是移植后最初 24 h内供体细胞死亡的主要途径 [17]. 与此对应的是, 在此期间活化的caspase-3 是可以忽略不计的. Beauchamp等人 [18]研究表明在移植后的最初 6 h内未发现供体细胞发生凋亡的依据. 尽管我们没有作相关的凋亡检测, 但可类推, 我们考虑坏死是移植后第 1 个 24 h内细胞死亡最重要的途径. 在此期间移植后细胞的死亡主要是由于注射时的机械压力、注射后的炎症及坏死所致.

HSP70 可通过多种途径(如预防凋亡 [13,14]、坏死 [14]和炎症 [13])来保护细胞. 注射成肌细胞引起的炎症主要以局部出现肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )为特征 [13], HSP70 能保护哺乳动物细胞免受TNF- $\alpha$ 和 $\beta$ 介导的细胞毒作用 [19].

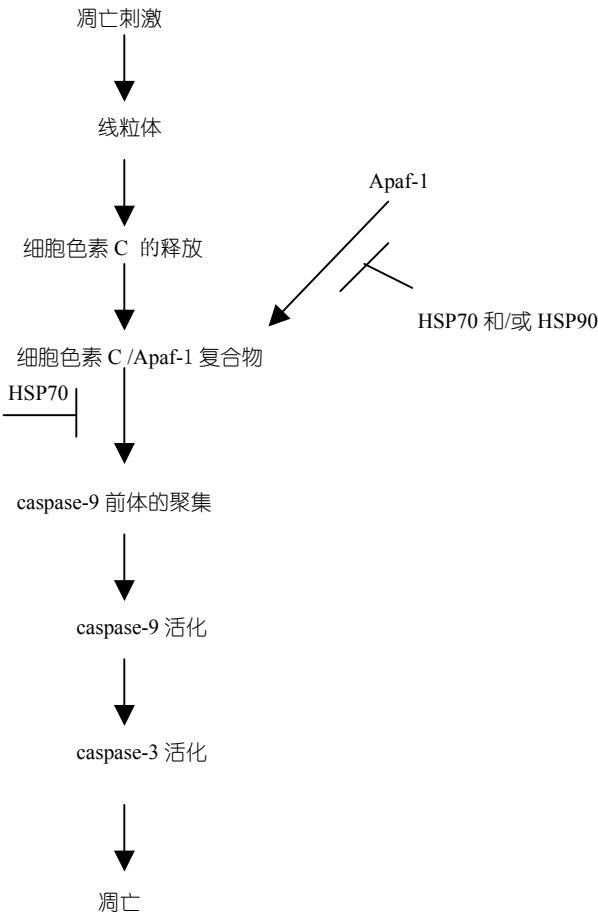


图 7 HSP70 和 HSP90 对凋亡主要环节的调节

HSP70 通过几种机制上下调节caspase蛋白酶的失活来抑制caspase依赖的凋亡. 此种凋亡是最经典和最主要的凋亡方式, 主要过程是: 线粒体内细胞色素C的释放; 尔后细胞色素C绑定凋亡体成分之一的凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1), 从而触发ATP依赖的Apaf-1 低聚化并形成复合体<sup>[20]</sup>. 此复合体随之聚集蛋白水解caspase-9 前体并使其活化, 从而触发caspase-3 前体活化而发挥完整的蛋白水解酶功能并启动凋亡<sup>[21,22]</sup>(图 7).

有2个研究<sup>[23,24]</sup>报道HSP70通过直接绑定Apaf-1, 并阻止Apaf-1 聚合物聚集caspase前体来抑制凋亡. 另外, HSP70 也可能通过抑制氮端蛋白激酶来限制凋亡, 后者在特定刺激诱发的细胞凋亡中发挥关键作用<sup>[25]</sup>. 除了HSP70 之外, HSP90 也能抑制凋亡. HSP90 能单独或与HSP70 一起绑定Apaf-1, 并限制后者与细胞色素C的结合, 从而防止caspase-9 的活化<sup>[26]</sup>.

尽管在移植前, 热休克处理已上调了热休克细胞内 HSP70 的表达, 但在我们的体内实验中, 移植后第 24 h, HS 细胞和 non-HS 细胞的生存率却无显著性差异. 故我们考虑, 移植后最初 24 h 内, HSP70 调控的细胞保护功能未起效. 然而移植 48 h 和 120 h 后, HS 细胞的生存率比 non-HS 的显著增多( $P<0.01$ ). 我们推测: 从移植后 48 h~120 h 期间凋亡也许是细胞死亡的主要途径, 此时, HSP70 抗凋亡功能与 HSP70 的其他细胞保护功能一起发挥了明显的作用.

实际上, HSP70 也许不是唯一参与保护体内移植细胞的分子. 据报道, 热休克处理也可诱发热休克蛋白家族的其它成员(如HSP32, HSP90, HSP27)和其他的分子(如超氧化物歧化酶)<sup>[27]</sup>. 相对于其他分子来说, HSP70 对成肌细胞特定的保护作用是进一步研究的目标.

尽管在移植 48 h 和 120 h 后, 改善热休克细胞生存率的机制仍不清楚, 但本研究结果仍能在制定相关发展战略上给予帮助, 以期建立一种能有效治疗肌肉疾病和严重肌肉损伤的成肌细胞移植方法. 我们已证实 HS 预处理能增加猪成肌细胞(体外)HSP70 的表达, 能改善成肌细胞自体移植后的生存率(体内). 所以 HS 预处理也许是一种简单有效的可增加猪成肌细胞移植后生存率的方法, 它也许代表了一种潜在的

能改善临床成肌细胞移植疗效的方法.

## 参 考 文 献

- 1 Skuk D, Tremblay J P. Cell therapies for inherited myopathies. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, 15(6): 723—729[DOI]
- 2 Samuels L M, Bosio E, Fragall C T, et al. Innate inflammatory cells are not responsible for early death of donor myoblasts after myoblast transfer therapy. *Transplantation*, 2004, 77(12): 1790—1797[DOI]
- 3 Thompson R B, Emani S M, Davis B H, et al. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation*, 2003, 108(Suppl 1): II 264—271
- 4 Yoo K J, Li R K, Weisel R D, et al. Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardio-myopathic hamsters. *Circulation*, 2000, 102(19 Suppl 3): III204—209
- 5 Boubaker E L, Andaloussi R, Daussin P A, et al. Changes in mass and performance in rabbit muscles after muscle damage with or without transplantation of primary satellite cells. *Cell Transplant*, 2002, 11(2): 169—180
- 6 Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, et al. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, 1998, 21(4): 421—438[DOI]
- 7 Zhang M, Methot D, Poppa V, et al. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(5): 907—921[DOI]
- 8 Smythe G M, Hodgetts S I, Grounds M D. Immunobiology and the future of myoblast transfer therapy. *Mol Ther*. 2000, 1(4): 304—313[DOI]
- 9 Suzuki K, Smolenski R T, Jayakumar J, et al. Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation*, 2000, 102(19 Suppl 3): III216—221
- 10 Otterbein L E, Choi A M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000, 279(6): L1029—1037
- 11 Baroffio A, Aubry J P, Kaelin A, et al. Purification of human muscle satellite cells by flow cytometry. *Muscle Nerve*, 1993, 16(5): 498—505[DOI]
- 12 Holzer N, Hogendoorn S, Zurcher L, et al. Autologous transplantation of porcine myogenic precursor cells in skeletal muscle. *Neuromuscular Disord*, 2005, 15(3): 237—244[DOI]
- 13 Bouchentouf M, Benabdallah B F, Tremblay J P. Myoblast survival enhancement and transplantation success improvement by heat shock treatment in mdx mice. *Transplantation*, 2004, 77(9): 1349—1356[DOI]
- 14 Fink A L. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, 1999, 79(2): 425—449
- 15 Sharp F R, Massa S M, Swanson R A. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci*, 1999, 22(3): 97—99[DOI]

- 16 Proskuryakov S Y, Konoplyannikov A G, Gabai V L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*, 2003, 283(1): 1—16[DOI]
- 17 Skuk D, Caron N J, Goulet M, et al. Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: detection, dynamics and mechanisms. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003, 62(9): 951—967
- 18 Beauchamp J R, Morgan J E, Pagel C N, et al. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol*, 1999, 144(6): 1113—1122[DOI]
- 19 Jaattela M, Wissing D, Bauer P A, et al. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J*, 1992, 11(10): 3507—3512
- 20 Hu Y, Benedict M A, Ding L, et al. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J*, 1999, 18 (13): 3586—3595[DOI]
- 21 Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, 91(4): 479—489[DOI]
- 22 Xanthoudakis S, Nicholson D W. Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(9): E163—165[DOI]
- 23 Beere H M, Wolf B B, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(8): 469—475[DOI]
- 24 Saleh A, Srinivasula S., Balkir L, et al. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(8): 476—483[DOI]
- 25 Park H S, Lee J S, Huh S H, et al. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J*, 2001, 20(3): 446—456[DOI]
- 26 Bruey J M, Ducasse C, Bonniaud P, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(9): 645—652 [DOI]
- 27 Yamashita N, Hoshida S, Nishida M, et al. Heat shock-induced manganese superoxide dismutase enhances the tolerance of cardiac myocytes to hypoxia-reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(7): 1805—1813[DOI]