**分 类 号** **学校代码：10114**

**密** 级 学 **号：Dr2008045**

**Myod1 和 Myog 真核共表达载体构建及转染真皮成纤维细胞的实验研究**

**研 究 生 ： 高 宏 飞**

**指 导 教 师 ： 梁 炳 生** 教 **授专 业 名 称 ： 外 科 学**

**研 究 方 向 ： 骨 骼 肌 修 复 与 功 能 重 建学 位 类 型 ： 科 学 学 位**

**所 在 学 院 ： 第 二 临 床 医 学 院**

**中国 ft西**

**二〇一三年五月三十日**

目 录

[摘 要](#_Toc686937035) 3

[Abstract](#_Toc686937036) 4

[前 言](#_Toc686937037) 4

[参考文献：](#_Toc686937038) 4

[第一部分 大鼠](#_Toc686937039)**[Myod1](#_Toc686937039)**[和](#_Toc686937039)**[Myog](#_Toc686937039)**[基因真核共表达载体的构建](#_Toc686937039) 5

[前言](#_Toc686937040) 5

[结论](#_Toc686937041) 22

[参考文献：](#_Toc686937042) 22

[第二部分 大鼠真皮成纤维细胞的体外培养及鉴定](#_Toc686937043) 23

[前 言](#_Toc686937044) 23

[结论](#_Toc686937045) 26

[参考文献：](#_Toc686937046) 26

[第三部分](#_Toc686937047) **[Myod1](#_Toc686937047)**[和](#_Toc686937047)**[Myog](#_Toc686937047)**[真核共表达载体转染大鼠真皮成](#_Toc686937047) 27

[前 言](#_Toc686937048) 27

[结 论](#_Toc686937049) 32

[参考文献：](#_Toc686937050) 32

[参考文献：](#_Toc686937051) 36

[参考文献：](#_Toc686937052) 39

**Myod1和Myog真核共表达载体构建**

**及转染真皮成纤维细胞的实验研究**

摘 要

目的：多年来，失神经支配骨骼肌萎缩始终是骨科学研究领域中的一个重要并亟需突破的理论难题，逆转骨骼肌纤维化的研究更加具有挑战性。目前，运用转录因子进行基因治疗是极具潜力和应用前景的治疗方法，也是各个学科前沿研究的热点。在调控骨骼肌发生、分化和成熟的过程中，生肌调节因子家族发挥着决定性作用。因此，应用生肌调节因子进行基因治疗以逆转骨骼肌纤维化，可能具有较高的研究价值。以前的研究结果显示，针对失神经骨骼肌萎缩，利用单一基因进行基因治疗可以发挥一定的治疗作用，但是，总地来说疗效不佳，需要进一步提高。由于生肌调节因子家族中的各个成员在发挥调控骨骼肌分化的作用时，具有相互协同和相互促进的作用，因此探索双基因联合应用进行基因治疗以逆转骨骼肌纤维化是一项很有价值研究课题，能够为防治失神经支配骨骼肌萎缩寻找新的思路，并且提供基础研究的实验依据。由于Myod1和Myog是生肌调节因子家族中最为重要的两个成员，因此，本研究选取Myod1和Myog作为研究对象，探讨二者联合基因转染对于诱导真皮成纤维细胞转分化成为成肌细胞的作用，以期为逆转失神经支配骨骼肌萎缩寻找新的治疗靶点。

（1）通过克隆Myod1具基因和Myog基因的cDNA，构建Myod1和Myog各自的克隆载体，进一步构建Myod1和Myog二者的真核共表达载体，为下一步进行Myod1和Myog联合基因转染防治骨骼肌失神经萎缩的细胞学研究提供实验基础。（2）通过原代培养大鼠真皮成纤维细胞，为下一步进行Myod1和Myog真核共表达载体体外转染的细胞学实验提供理想的细胞基础。（3）应用Myod1和Myog真核共表达载体对原代培养的大鼠真皮成纤维细胞进行体外转染实验，检测转染后的真核共表达载体能否正确表达Myod1蛋白和Myog蛋白，观察并

鉴定Myod1和Myog基因联合体外转染能否使来源于大鼠皮肤真皮层的成纤维细胞转分化成为成肌细胞，为逆转骨骼肌纤维化的治疗提供新的靶点。

方法：（1）通过RT-PCR的方法克隆大鼠Myod1基因和Myog基因的全长

cDNA，将Myod1和Myog的cDNA分别连接到克隆载体pMD18，构建重组的pMD18-Myod1和pMD18-Myog克隆载体，利用大肠杆菌扩增克隆载体，提取、纯化克隆载体，酶切克隆载体获得Myod1基因和Myog基因的cDNA，将二者依次插入到pVAX1载体中，构建出重组的Myod1和Myog真核共表达载体pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP，采用测序的方法对其进行鉴定，验证所构建的真核共表达载体的正确性。（2）从大鼠皮肤真皮层提取成纤维细胞，在分离、纯化后进行原代培养，然后对所培养细胞进行鉴定，采用免疫荧光及免疫细胞化学的方法检测细胞特异性成分Vimentin和Desmin，以确定所培养细胞种类为成纤维细胞。（3）应用转染试剂Lipofectamine2000作为媒介，将Myod1和Myog的真核共表达载体pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP对原代培养的大鼠真皮成纤维细胞进行转染，利用Western Blot检测Myod1蛋白和Myog蛋白的表达，验证真核共表达载体能否正确表达目的蛋白；利用免疫荧光及免疫细胞化学方法对成纤维细胞是否能够发生转分化进行鉴定，明确Myod1和Myog的真核共表达载体体外转染能否使原代培养的大鼠真皮成纤维细胞转分化为成肌细胞。

结果：（1）测序鉴定结果表明：重组的pMD18-Myod1和pMD18-Myog克隆载体中所克隆的Myod1和Myog cDNA的长度及碱基序列均正确，证实本实验所克隆的Myod1和Myog cDNA序列与Gene bank所报道的序列一致。（2）测序鉴定结果表明：重组的Myod1和Myog真核共表达载体pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP内的Myod1和Myog cDNA的序列长度及碱基顺序均正确，证实本实验所克隆的Myod1基因和Myog基因的cDNA序列与Gene bank所报道的序列一致。（3）Vimentin染色和Desmin染色检测结果表明原代培养的细胞是成纤维细胞，本实验所培养的细胞中没有出现Desmin

染色阳性的成肌细胞。（4）在转染实验中，Western Blot能够检测到有Myod1蛋白和Myog蛋白的表达，证实Myod1和Myog的真核共表达载体体外转染成纤维细胞后能够正确表达Myod1蛋白和Myog蛋白。（5）在转染后的细胞内能够能够检测到Desmin染色阳性表达，证实Myod1和Myog真核共表达载体体外转染后能够使原代培养的大鼠真皮成纤维细胞转分化为成肌细胞。

结论：（1）本研究正确克隆了Myod1和Myog的cDNA。（2）本研究正确构建了重组pMD18-Myod1克隆载体和重组pMD18-Myog克隆载体。（3）本研究正确构建了重组Myod1和Myog真核共表达载体pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP。（4）本研究能够从大鼠皮肤真皮层原代培养出纯度较高的成纤维细胞。（5）本研究所构建的重组Myod1和Myog的真核共表达载体在脂质体的介导下能够有效地转染到原代培养的大鼠真皮成纤维细胞内，并且能够表达结构正确的Myod1蛋白和Myog蛋白。（6）本研究所构建的重组Myod1和Myog真核共表达载体pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP在体外转染时，能够诱导大鼠真皮成纤维细胞转分化为成肌细胞。

关键词：基因治疗； Myod1； Myog；成纤维细胞；皮肤；骨骼肌；萎缩； 大鼠

**Construction of Myod1 Gene and Myog Gene Co-expression Vector and Effect of Transfected on Fibroblasts Derived from Skin**

Abstract

**Objective:** It is a tough problem to treat denervated skeletal muscle atrophy. It is the best way for researching an approach of preventing of promoting muscle proliferation and differentiation to treat denervated skeletal muscle atrophy. People always treat denervated skeletal muscle atrophy by single gene. Now it has cooperation and facilitative effete between transcription factors through a long time study. Double genes can promote cell proliferation and differentiation, and can provide a new way of preventing denervated skeletal muscle atrophy. (1) To clone full-length rat Myod1 and Myog cDNA, to construct recombinant cloning vector and to construct eukaryotic co-expression vector for further ex vivo gene transfection. (2) To establish an ideal cellular model of rat skin Fibroblasts for further ex vivo gene transfection. (3) To detect whether the eukaryotic co-expression vector of rat Myod1 and Myog gene can properly express Myod1 and Myog protein in the transfection experiment, and to investigate whether Myod1 and Myog gene transfection can transform the primary cultured fibroblasts derived from rat skin into myoblasts.

**Methods:** Full-length Myod1 and Myog cDNA were amplified by RT-PCR. The PCR products were ligated into pMD18-T simple vector to generate the recombinant plasmid, designated pMD18-Myod1 and pMD18-Myog, which was then by sequencing verified. The Myod1 and Myog co-expression plasmid was generated by subcloning the Myod1 and Myog cDNA into pVAX1. The recombinant Myod1 and Myog were then transient transferred to primary culture fibroblasts derived from rat

Skin by transfection reagent. Expression of Myod1 and Myog was detected by Western blot. Immunofluorescence was used to detect whether transfected cells were transformed into myoblast.

**Results:** The sequencing results of pMD18-Myod1 and pMD18-Myog and pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP were identical with reported rat Myod1 and Myog cDNA sequence by Gene bank. The immunohistochemistry staining of vimentin and desmin confirmed that the primary cultured cells were fibroblasts and there was no myoblast contamination. Myod1 and Myog expression was detected by Western blot after transient transfection. Immunofluorescence of desmin confirmed these cells were myoblasts. The pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP transfection could transform the primary cultured fibroblasts derived from rat skin into myoblasts.

**Conclusions:** (1) The cDNA of Myod1 and Myog, are cloned successfully. (2) The pMD18-Myod1 and pMD18-Myog, cloning vectors for Myod1 and Myog, are cloned successfully. (3) The pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP, a eukaryotic co-expression vector of Myod1 gene and Myog gene, is successfully constructed. (4) The primary cultured cells from rat skin were fibroblasts only. (5) The pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP can be transfected into the primary cultured fibroblasts efficiently. The eukaryotic co-expression vector of rat Myod1 and Myog gene can properly express Myod1 and Myog protein in the transfection experiment. (6) Myod1 and Myog gene transfection can transform the primary cultured fibroblasts derived from rat skin into myoblasts.

**Key Words:**: Gene Therapy; Myod1; Myog; Fibroblasts; Skin; Skeletal muscle; Atrophy; Rat

前 言

失神经支配骨骼肌萎缩是多种神经肌肉系统病变在终末期的共同转归，是一种危害非常严重的病理状态。失神经支配骨骼肌萎缩的病理学特征，本质上就是骨骼肌在失去神经支配后发生了形态学上的重构，其中包括骨骼肌细胞萎缩、凋亡所导致的肌细胞重塑，以及细胞外间质增多、纤维化所导致的细胞外间质重塑。这种病理改变进展迅速，最终导致骨骼肌的体积缩小，具有收缩功能的肌细胞的绝对数量减少甚至消失，骨骼肌整体上的收缩功能减弱甚至丧失。在骨骼肌萎缩重构时，肌细胞表现为萎缩、凋亡，但与此相反，没有收缩功能的间质细胞却表现为大量增殖，而且间质细胞会分泌产生大量的胶原纤维，重塑的细胞外间质会在一定程度上取代骨骼肌细胞原本所占据的空间，结果导致细胞外间质增多、纤维化[1, 2, 3]。

骨骼肌在丧失神经支配后，在骨骼肌发生重构的过程当中，细胞外间质重塑发挥了重要的作用。在细胞外间质重塑的过程中，以成纤维细胞大量增殖为主。在正常的生理状态下，骨骼肌组织中的细胞成分主要包括骨骼肌细胞和间质细胞，骨骼肌细胞的数量较多，间质细胞的数量较少。但是，在失神经支配骨骼肌萎缩的病理状态下，骨骼肌组织内肌细胞的绝对数量会因萎缩凋亡而显著减少，同时，肌细胞的体积也会显著缩小、收缩力显著减退；然而，没有收缩功能的间质细胞的数量却会显著增多，其中以成纤维细胞的数量增多最为明显，同时，成纤维细胞的体积会明显增大，分泌胶原纤维的功能也明显增强。发生这种形态学改变的原因，主要是由于骨骼肌细胞的再生能力较差，在受到损伤后通常无法通过增殖而进行自我修复；然而成纤维细胞适应缺血、缺氧等恶劣环境的能力较强，而且增殖能力旺盛，在损伤的状态下反而会被激活，并通过大量增殖对损伤进行修复，最终的结果就是肌细胞逐步萎缩消失并被纤维组织所取代。

骨骼肌在丧失神经支配后，发生肌细胞萎缩和间质纤维化等骨骼肌重构的

病理改变的进展速度非常迅速。通常在神经支配丧失后的3个月左右，骨骼肌就会在形态学上出现显著的纤维化病理改变[4, 5, 6]。骨骼肌在丧失神经支配后，肌细胞萎缩和细胞外间质纤维化重塑的改变在不断进展，与此同时，为骨骼肌组织供血供氧的毛细血管网也会随之发生重塑。毛细血管网重塑表现为毛细血管的数量进行性减少，这种改变会进一步促进骨骼肌细胞萎缩和间质纤维化的病理改变进展，最终形成恶性循环进一步加重骨骼肌萎缩重构[7,8,9,10]。在病程发展的后期，成纤维细胞所分泌的大量的胶原纤维不仅会使骨骼肌的弹性减退，而且还会在细胞周围形成一道屏障，破坏细胞之间的连接和信息传递。细胞外间质重塑所产生的屏障作用会机械性地将肌细胞与末梢神经纤维分离开，导致再生的神经纤维很难与肌细胞形成有效的突触联系，这就使骨骼肌重新获得神经支配的机会减小，促进丧失神经支配后的骨骼肌进一步发生重构[11, 12]。

对于丧失神经支配所引起的骨骼肌萎缩，目前仍然没有有效的预防和治疗的办法。临床常用的治疗方法包括：被动运动疗法、电刺激疗法、脉冲式磁疗法、股神经寄养法、药物治疗等多种手段，虽然都有一定程度的治疗作用，但是总体而言疗效并不确切[13,14,15,16, 17]。这些治疗方法只能在一定程度上延缓骨骼肌萎缩纤维化重构的速度，但是最终都无法阻断骨骼肌重构的进程，也无法阻止骨骼肌功能丧失、挛缩变形的终末状态出现。骨骼肌萎缩会使得骨骼肌的收缩功能逐步减退，最终导致肢体的运动功能完全丧失，这就会给患者和社会带来沉重的医疗负担和经济负担。因此，失神经支配骨骼肌萎缩已经成为进一步提高神经系统病变治疗效果的重大障碍，目前迫切需要探寻一条能够逆转并重建萎缩骨骼肌的途径。加强基础研究，揭示骨骼肌萎缩纤维化的本质，寻找有效的防治及逆转失神经支配后骨骼肌重构方法，具有重大的理论意义和现实意义。

多年来，失神经支配骨骼肌萎缩一直是骨科学领域中的一个重要并亟需破解的理论难题，学者们在这方面已经进行了很多研究。利用细胞移植对失神经支配骨骼肌萎缩进行治疗是目前研究的热点之一，许多相关的实验研究都显示

细胞移植在一定程度上具有治疗骨骼肌萎缩重构的作用[18, 19]。胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、骨骼肌成肌细胞是现在研究较多的种子细胞，然而，对于胚胎干细胞，由于存在伦理学争议，来源稀少、获得困难，分离纯化的技术难度较大、异体移植时存在免疫排斥反应，以及具有潜在的致瘤作用等诸多问题，因此距离临床实际应用还很遥远。对于骨髓间充质干细胞，因其具有多方向分化能力，故定向分化为骨骼肌的效率较低，此外，骨髓间充质干细胞同样存在潜在的致瘤作用等安全问题，因此目前尚需进一步研究其临床实际应用的方法。对于骨骼肌卫星细胞，也存在来源有限，数量稀少等问题，在临床实际应用同样也受到限制。因此，在利用细胞移植方法来逆转骨骼肌萎缩并进行骨骼肌重建的过程当中，最关键性问题是要寻找一种临床实用性较强的、自体来源的、可移植的细胞作为种子细胞。

随着分子生物学技术的飞速发展，特别是细胞移植和基因工程等生物工程技术的联合应用，能够用于骨骼肌移植的自体细胞的来源途径获得了极大的扩充。运用转录因子进行基因治疗是极具应用前景的治疗方法，也是目前研究的热点。近年来的研究结果提示，生肌调节因子家族（Myogenic regulatory factors，

MRFs），即MRFs转录因子家族，是在胚胎发育时期调控骨骼肌发育过程的主导基因，对于骨骼肌细胞的发生、分化和成熟起着决定性作用[20, 21]。此外，研究发现，如果将外源性MRFs转录因子家族的成员通过分子生物学方法导入非肌细胞如成纤维细胞内，那么就会激活非肌细胞自身的与骨骼肌生成相关内源性基因，启动其向肌细胞分化的定向分化过程，其结果就是诱导非肌细胞转分化为具有收缩功能的骨骼肌细胞[22, 23]。

生肌调节因子家族内部主要包括4个成员，即Myod1, Myf5, Myog和MRF4。其中，Myod1基因首先被发现，之后其它三个成员Myf5，Myog和MRF4 (muscle- specific regulatory factor 4)也相继被发现。目前，生肌调节因子家族4个成员在骨骼肌发生及发育过程中所发挥的作用已经基本阐明[24]。在胚胎发育时期，如果Myf5基因在骨骼肌发育过程中失活，那么就会导致肌节形成延迟，以及骨骼肌

前体细胞迁移部位异常。但是，当Myod1基因在细胞内正确表达后，所有因Myf5基因失活所导致的异常发育状态就会被修正。这种现象表明Myf5基因所具有作用基本能够被Myod1基因替代。同样，对于骨骼肌发育过程中仅仅是Myod1基因失活所导致的异常发育问题，也会因为Myf5基因的正确表达而得到代偿。然而，如果两者同时失活的话，那么就会导致成肌细胞完全缺失，骨骼肌的发生和发育彻底停止。由此可见，Myod1基因和Myf5基因二者的功能具有很多的相同的特征[25, 26, 27]。Myog基因在骨骼肌发生过程中所发挥的作用非常重要，并且与其它生肌调节因子家族成员之间没有太多的相似之处。如果Myog基因失活，那么就会导致成肌细胞分化不良，结果使得骨骼肌组织大量减少，但是却不会出现骨骼肌完全缺失的状态。MRF4基因的功能没有特殊之处，在骨骼肌发生过程中所发挥的作用似乎并不重要，它的失活只会引起轻微的骨骼肌发育异常，不会从根本上阻碍骨骼肌的发育过程[28, 29, 30]。通常，MRF4能够在发育成熟的骨骼肌中保持较高的表达水平，这表明MRF4的功能可能与维持骨骼肌的分化状态有关

[31]. 基于以上实验依据可以推论，生肌调节因子家族成员各自的表达时间和功

能特点对于决定骨骼肌的发生、分化和成熟具有重要的作用，Myod1与Myf5基因主要在骨骼肌发育早期的肌前体细胞向成肌细胞分化的过程中发挥作用，而

Myog与MRF4基因主要在骨骼肌发育晚期的成肌细胞向终末骨骼肌纤维细胞分化的过程中发挥作用。

目前，国内外学者对失神经支配骨骼肌萎缩的基因治疗虽然已经开展了一些研究，但是大多数局限于应用单基因进行治疗，而且疗效不佳，尝试联合应用两个基因进行治疗的研究尚未见报道。由于转录因子之间存在相互协同与促进的作用，因此探索双基因联合应用促进细胞增殖和成肌分化是一项很有价值研究，能够为失神经支配骨骼肌萎缩的防治寻找新的思路，并提供实验依据。对于将非肌细胞诱导为肌细胞的研究，联合应用两个最重要的生肌细胞调节因子Myod1和Myog进行基因治疗，才有可能获得更好的治疗效果。诱导成纤维细胞向具有收缩功能的肌细胞转化进而产生种子细胞，可以用于骨骼肌重建的细

胞移植治疗，并有望成为骨骼肌重建的一条新的途径。成纤维细胞是来源于中胚层的一种间充质细胞，在哺乳动物体内分布广泛，来源丰富、数量充足。尤其是真皮成纤维细胞(dermal fibroblast)，自体来源非常丰富，而且具有体外增殖能力旺盛优点，在进行体外培养时取材方法简单易行，因此是用于自体细胞移植的最佳的种子细胞来源之一[32,33]。

基因转染仍然是目前基因治疗中最具有挑战性的难题之一。总体而言，由于转染效率相对较高，大部分基因治疗的临床试验选用了病毒载体。虽然病毒载体的转染效率较高，但是，也存在许多不足之处，其缺点在于可控性差，DNA装载容量有限，载体组装难度较大，具有潜在的致癌性和自身免疫原性，还可能造成宿主细胞发生病理改变，因此病毒载体的应用具有一定局限性[34]。与病毒载体相比，尽管非病毒载体的转染效率较低，但其优势在于操作简单，DNA装载容量较大，毒性较低，没有免疫原性，便于重复给药，因此非病毒载体的应用范围较为广泛[35]。真核表达质粒pVAX l是被美国FDA批准的可用于人体实验的基因转移载体，属于非病毒载体，具有较高的生物安全性，本研究选择该载体作为基因转染的工具。

综上所述，本研究将以上述理论为依据，把组织工程技术与基因治疗技术相结合，采用生物安全性较高的真核表达质粒pVAX l作为基因转移的载体，联合应用两类最重要的生肌细胞调节因子Myod1和Myog的真核共表达载体转染大鼠真皮成纤维细胞，诱导其分化为具有收缩功能的骨骼肌细胞，为将来的临床研究提供基础实验依据。本研究不但能为防治失神经支配骨骼肌萎缩的基础研究提供细胞学实验依据，而且能为临床治疗失神经支配骨骼肌萎缩提供新的思路，未来必将产生巨大的经济效益和社会效益，具有广阔的应用前景。

参考文献：

[1] Diers A, Kaczinski M, Grohmann K, et al. The ultrastructure of peripheral nerve, motor end-plate and skeletal muscle in patients suffering from spinal muscular

Atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). Acta Neuropathol. 2005 Sep;110(3):289-97.

[2] Simon CM, Jablonka S, Ruiz R, et al. Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet. 2010 Mar 15; 19(6): 973-86.

[3] Aird RB, Naffziger HC. The pathology of human striated muscle following denervation. J Neurosurg. 1953 May; 10(3): 216-27.

[4] Degens H, Koşar SN, Hopman MT, et al. The time course of denervation-induced changes is similar in soleus muscles of adult and old rats. Appl Physiol Nutr Metab. 2008 Apr; 33(2): 299-308.

[5] Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, et al. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. PLoS One. 2012; 7(1): e29082. Epub 2012 Jan 3.

[6] Riley DA, Bain JL, Romatowski JG, et al. Skeletal muscle fiber atrophy: altered thin filament density changes slow fiber force and shortening velocity. Am J Physiol Cell Physiol. 2005 Feb; 288(2): C360-5.

[7] Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of the vascular bed andprogressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. Anat Rec. 2000 Mar 1; 258(3): 292-304.

[8] Cebasek V, KubínováL, Janácek J, et al. Adaptation of muscle fibre types and capillary network to acute denervation and shortlasting reinnervation. Cell Tissue Res. 2007 Nov; 330(2): 279-89. Epub 2007 Sep 6.

[9] Fujino H, Kohzuki H, Takeda I, et al. Regression of capillary network in atrophied soleus muscle induced by hindlimb unweighting. J Appl Physiol. 2005 Apr; 98(4): 1407-13.

[10] Kano Y, Shimegi S, Furukawa H, et al. Effects of aging on capillary number and

Luminal size in rat soleus and plantaris muscles. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002 Dec;57(12):B422-7.

[11] Cebasek V, KubínováL, Janácek J, et al. Adaptation of muscle fibre types and capillary network to acute denervation and shortlasting reinnervation. Cell Tissue Res. 2007 Nov; 330(2): 279-89.

[12] Okiura T, Nagatomo F, Gu N, et al. Bone density of the femur and fibercross-sectional area and oxidative enzyme activity of the tibialis anterior muscle in type II collagen-induced arthritic mice. J Physiol Sci. 2008 Aug; 58(4): 221-7.

[13] Salanova M, Schiffl G, Püttmann B, et al. Molecular biomarkers monitoring human skeletal muscle fibres and microvasculature following long-term bed rest with and without countermeasures. J Anat. 2008 Mar; 212(3): 306-18.

[14] Coutinho EL, DeLuca C, Salvini TF, et al. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. Connect Tissue Res. 2006; 47(5): 278-86.

[15] Walsh SF. Treatment of a brachial plexus injury using kinesiotape and exercise. Physiother Theory Pract. 2010 Oct; 26(7): 490-6.

[16] Belzberg AJ, Dorsi MJ, Storm PB, et al. Surgical repair of brachial plexus injury: a multinational survey of experienced peripheral nerve surgeons. J Neurosurg. 2004 Sep; 101(3): 365-76.

[17] Songcharoen P. Management of brachial plexus injury in adults. Scand J Surg. 2008; 97(4): 317-23.

[18] Musgrave DS, Bosch P, Lee JY, et al. Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. Clin Orthop Relat Res. 2000 Sep; (378): 290-305.

[19] Jane JA Jr, Dunford BA, Kron A, et al. Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenetic protein (BMP) -4 and BMP-6 gene transfer. Mol Ther. 2002 Oct; 6(4): 464-70.

[20] Huang J, Weintraub H, Kedes L. Intramolecular regulation of MyoD activation domain conformation and function. Mol Cell Biol. 1998; 18(9): 5478-84.

[21] Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, et al. The molecular regulation of muscle stem cell function. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008; 73: 323-31.

[22] Lassar AB, Davis RL, Wright WE, et al. Functional activity of Myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. Cell. 1991; 66(2): 305-15.

[23] Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, et al. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. Cell. 1990; 60(5): 733-46.

[24] Te Pas MF, Soumillion A, Harders FL, et al. Influences of Myog genotypes on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness, and lean weight of pigs. J Anim Sci. 1999; 77(9): 2352-6.

[25] Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. Biochem Cell Biol. 1995; 73(9-10): 723-32.

[26] Strachan T, Read AP. PAX genes. Curr Opin Genet Dev. 1994; 4(3): 427-38.

[27] Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, et al. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. J Cell Sci. 1999; 112 ( Pt 17): 2895-901.

[28] Tapscott SJ. The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription. Development. 2005 Jun; 132(12): 2685-95.

[29] Yablonka-Reuveni Z, Day K, Vine A, et al. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. J Anim Sci. 2008; 86(14 Suppl): E207-16.

[30] De la Serna IL, Ohkawa Y, Berkes CA, et al. MyoD targets chromatin remodeling complexes to the Myog locus prior to forming a stable DNA-bound complex. Mol Cell Biol. 2005; 25(10): 3997-4009.

[31] Jennings CG. Expression of the Myogenic gene MRF4 during Xenopus development. Dev Biol. 1992; 151(1): 319-32.

[32] Kern JS, Loeckermann S, Fritsch A, et al. Mechanisms of Fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysis bullosa: high stability of collagen VII favors long-term skin integrity. Mol Ther. 2009 Sep; 17(9): 1605-15.

[33] Yogalingam G, Crawley A, Hopwood JJ, et al. Evaluation of Fibroblast-mediated gene therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. Biochim Biophys Acta. 1999 Feb 24; 1453(2): 284-96.

[34] Barouch DH. Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. Curr Opin HIV AIDS. 2010 Sep; 5(5): 386-90.

[35] Dalby B, Cates S, Harris A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Methods. 2004 Jun; 33(2): 95-103.

# 第一部分 大鼠**Myod1**和**Myog**基因真核共表达载体的构建

前**言**

随着分子生物学和胚胎生物学相关研究的不断深入，目前已经发现，胚胎发育时期脊椎动物骨骼肌的发生和分化是由两个转录因子家族共同来调控的，二者分别是生肌调节因子家族(Myogenic regulatory factors, MRFs)和肌细胞增强因子2 ( myocyte enhancer factor 2, MEF2 )[1, 2]。生肌调节因子家族的结构特征是拥有基本的碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构域，肌细胞增强因子2是MADS(MCMI agamous deficiens serum response factor)转录因子家族的一个成员，它们均是进行细胞信号传导并决定染色质结构改变及激活的关键因素。骨骼肌特异性基因的转录水平，如骨骼肌特异性肌球蛋白（muscle specific

myosin）、乙酰胆碱受体亚基(acetylcholine receptor subunits)、肌酸激酶(muscle creatine kinase, CPK)等基因的转录水平就是由这个调控系统来决定的。在这个调控系统中，各个成员之间相互协调、相互促进，共同发挥调节基因转录的作用。在肌细胞增强因子2的基因序列内，具有能够与生肌调节因子家族成员的DNA进行结合的保守序列——E盒序列[3]。当生肌调节因子家族成员与E盒序列进行结合之后，就可以激活并启动MEF2基因进行转录表达。与此同时，生肌调节因子家族成员的基因启动区内同样存在能够与肌细胞增强因子2进行结合的碱基序列

——肌细胞增强因子2结合序列，当二者相互结合后，就会启动并促进生肌调节因子家族成员的基因进行转录表达。这两种转录因子相互作用互相促进，结果构成一个正反馈系统[4]。从时间角度上来分析，在骨骼肌的发育过程中，肌细胞增强因子2的基因表达时间晚于生肌调节因子家族成员的表达时间，由此可见，生肌调节因子家族具有启动肌细胞增强因子2基因表达的能力，而肌细胞增强因子2所起的作用则是正反馈地促进生肌调节因子家族进一步转录表达，以迅速提高其转录的水平。

在胚胎发育时期，骨骼肌的发生过程受到多种诱导信号和抑制信号的共同影响，在这些影响因素的综合作用下，当促进骨骼肌分化的正性调节因子的活化水平或表达水平上调，而抑制骨骼肌分化的负性调节因子失活或表达下调时，中胚层的骨骼肌前体细胞才能够开始向成熟骨骼肌方向进行分化。骨骼肌前体细胞首先分化为成肌细胞，成肌细胞能够表达生肌调节因子，但不能表达成熟骨骼肌的终末分化的基因产物[5]。成肌细胞可以自我复制以保存自身的种子细胞，也可以进一步向下游不可逆地分化为肌细胞。多个肌细胞之间可以发生相互融合，进而形成具有多个细胞核的肌管，肌管才能进一步分化为成熟的骨骼肌肌纤维[6]。生肌调节因子家族和肌细胞增强因子2都是促进骨骼肌分化的正性调节因子，其中，生肌调节因子家族所发挥的作用最为重要。生肌调节因子家族中主要包括4个成员：Myod1, Myf5, Myog和MRF4。在这4个成员中，

Myod1基因首先被发现，之后其它三个成员Myf5, Myog和MRF4也陆续被发现。目前，生肌调节因子家族的4个成员在骨骼肌发生和发育中所起的作用已经基本研究清楚。在胚胎发育时期骨骼肌发育过程中，如果Myf5基因失活，那么就会导致肌节形成延迟以及骨骼肌前体细胞迁移部位异常，但是这些问题会随着Myod1基因的正确表达而得以纠正，这就说明Myod1基因基本能够替代

Myf5基因发挥作用[7]。同样，对于仅仅是Myod1基因失活所产生的问题，也会由于Myf5基因的正确表达而得以纠正。然而，假如两者同时失活则会导致成肌细胞完全缺失，骨骼肌的发生和分化彻底停止[8]。由此可见，Myod1基因和Myf5基因二者的功能具有很多的相似之处。Myog基因在骨骼肌发生过程中所发挥的作用非常重要，并且与其它生肌调节因子家族成员之间没有太多的相似之处。如果Myog基因失活则会导致成肌细胞分化不良，结果使得骨骼肌组织大量减少，但是不会出现骨骼肌完全缺失的状态。MRF4基因的功能没有特殊之处，在骨骼肌发生过程中所发挥的作用似乎并不重要，它的失活仅能引起轻微的骨骼肌发育异常，但是不会从根本上阻碍骨骼肌的发育过程[9]。基于以上研究结论可以推论，生肌调节因子家族成员各自的表达时间和功能特点对于决定骨骼肌的

发生、分化和成熟具有重要的作用，Myod1和Myf5基因主要是在骨骼肌发育早期的肌前体细胞向成肌细胞分化的过程中发挥作用，而Myog和MRF4基因主要在骨骼肌发育晚期的成肌细胞向终末骨骼肌纤维分化的过程中发挥作用。其中Myod1、Myog的作用尤为突出，Myod1在其他类型细胞转分化为成肌细胞以及成肌细胞分化为肌管的过程中发挥着重要的作用，在骨骼肌特异性基因的激活与转录过程中起着总开关的作用；Myog是决定骨骼肌细胞终末分化的关键因子。目前，虽然国内外学者对失神经支配骨骼肌萎缩的基因治疗展开了广泛的探索，但是大多数仅局限于应用单一基因进行治疗，而且疗效不佳。本课题组推测，联合应用两类最重要的生肌细胞调节因子Myod1和Myog的真核共表达载体进行基因治疗，可能会有更好的疗效。

材料和方法

## 1、 主要试剂

Trizol Invitrogen公司

SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR Invitrogen公司

Platinum Taq DNA polymerase High Fidility Invitrogen公司

pVAX1 Invitrogen公司

pIRES2-EGFP天恩泽基因公司

pMD18-T simple vector Takara公司

T4 DNA ligase NEB 公司

platinum pfx DNA polymerase Invitrogen公司

Marker Promega公司

小量质粒纯化试剂盒QIAGEN公司

EcoRI NEB 公司

NotI NEB 公司

NheI NEB 公司

DNA凝胶回收试剂盒Axygen公司

DH5α感受态细胞天根生化公司

其它常规试剂均为市售分析纯级试剂

## 2、 主要仪器

SXP-1B台式手术显微镜上海医用光学仪器厂

XHF－1高速组织匀浆机上海金达生化仪器厂

PTC-225 PCR仪MJ Research, Inc.公司

高速离心机Eppendorf公司

冷冻高速离心机Eppendorf公司

紫外-可见光分光光度计岛津公司

## 3、 实验方法

本实验方法均参考《分子克隆实验指南》进行操作。

### 35.1 失神经支配骨骼肌萎缩动物模型制备：

选择成年健康雄性Sprague-Dawley（SD）大鼠，重约150g～180g（鼠龄约

6～8周），实验用鼠购自ft西医科大学实验动物中心。实验期间，饲养于ft西医科大学实验动物中心。

手术操作：1％硫喷妥钠（0.5ml/100g）腹腔麻醉妥后，俯卧位固定。无菌条件下取左臀部作1.5cm切口，分离臀部骨骼肌后，暴露坐骨神经，在距梨状肌下缘0.5cm处切除坐骨神经长约1cm，远近端均予以旷置。关闭切口。7天后，取小腿坐骨神经支配的小腿三头肌为标本进行总RNA的抽提。

### 35.2 大鼠Myod1和Myog基因的CDNA克隆：

35.2.1标本取材：

1％硫喷妥钠（0.5ml/100g）腹腔麻醉妥后，俯卧位固定。无菌条件下暴露失神经模型大鼠小腿三头肌，剥离骨骼肌外膜，眼科剪取0.5×1.0×1.0cm大小的骨骼肌组织，约100mg，立即投入装有1ml Trizol的离心管中用于抽提总RNA，另取同样大小的组织立即放入液氮中速冻后置于－80℃冰箱冻存备用。

35.2.2总RNA抽提

所有器皿、试剂和材料均160℃干烤2h或以DEPC处理。

用眼科剪将Trizol液中的骨骼肌组织剪碎，高速匀浆机匀浆直到无明显的块状组织为止。

立即将匀浆液转移置1.5ml的Eppendorf管中，加入200ul氯仿充分混匀，剧烈震荡15sec，冰上静置5分钟，以沉淀蛋白。

4℃，12，000×g高速冷冻离心15min，取上清液400～500ul，转至新Ep

管。

加入等体积异丙醇，颠倒混匀，室温静置10min，沉淀核酸。4℃，12, 000×g高速冷冻离心10min，弃上清液。

以75%冷乙醇500～1000ul漂洗沉淀，于4℃，7,500×g高速冷冻离心5min，弃上清液。

4℃，7,500×g高速冷冻离心5min，弃上清液，室温空气中干燥RNA沉淀

20～30分钟。

加入50ul DEPC处理过的水融解沉淀。

总RNA定量及鉴定：取2ul RNA+398ul DEPC处理水，用岛津UV-240紫外-可见光分光光度计测定OD260nm值、OD280nm值。

35.2.3逆转录

使用SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR试剂盒进行反转录（试剂均由试剂盒中提供）

取上述实验中的RNA 5.0ul，按以下体系配制反应混合液。Component Amount

Total RNA 5 ul

50 uM oligo(dT) 20 1 ul

10 mM dNTP mix 1 ul

DEPC-treated water 3 ul

混合液65℃孵育5min，然后放入冰中1min。按以下体系配制cDNA合成混合液。

Component Amount

10X RT buffer 2 ul

25 mM MgCl2 4 ul

0.1 M DTT 2 ul

RNaseOUT. (40 U/ul) 1 ul

SuperScript. III RT (200 U/ul) 1 ul

将以上2个混合液混合在一起，50℃孵育50min。

85℃孵育5min，终止合成反应，并将反应液置冰浴5分钟。在反应液中加入1ul RNase H，37℃孵育20min。

反应产物置于-20℃保存。

35.2.4 CDNA扩增：

PCR引物设计与合成

根据GenBank上Myod1和Myog序列，应用Primer软件Prim5.0设计PCR

引物，引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成。根据参考序列设计的引物为：

Myod1 PCR引物：

Myod1-CDNA-F: 5'-GGACCCAGAACTGGGACATG-3' Myod1-CDNA-R: 5'-CTGCAGCCAACCTCTCAGAG-3'

Myog PCR引物：

Myog-CDNA-F: 5'-TCCGACCTGATGGAGCTGTA-3' Myog-CDNA-R: 5'-CAGCCTGGCAGACAATCTCA-3'

以上述RT产物cDNA为模板进行多聚酶链式反应（PCR）扩增，扩增体系为：

Component Amount

10X buffer 5ul

50 mM MgSO4 1.5ul

10 mM dNTP 1ul

Primer F(10 mM) 2ul

Primer R(10 mM) 2ul

cDNA 2ul

Platinum Taq DNA polymerase High Fidility 0.2ul ddH2O 36.3ul

扩增循环条件为：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 95℃ | 3 分钟 | 1cycle |
| 94℃ | 30 秒 |  |
| 56℃ | 30 秒 | 35cycles |
| 68℃ | 60 秒 |  |
| 68℃ | 10 分钟 | 1cycle |

取反应产物10ul在1.5%Agarose电泳，凝胶成像仪扫描摄影。反应产物置于－20℃保存。

35.2.5 PCR产物的纯化

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述PCR产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于－20℃冻存。

35.2.6连接反应

将PCR产物与pMD18-T simple vector连接。

短暂离心连接反应的Vector和Buffer溶液，逐一加入反应体系，连接体系为：

Component Amount

Solution I 5ul

PMD18-T simple vector 1ul

纯化的PCR产物4ul

用移液器将上述反应液混合均匀。

16℃连接1hour。

35.2.7感受态大肠杆菌E. coli. DH5α的制备

从冻存菌株中划单克隆（分别划在不加抗生素和加抗生素的两种培养基上，以检查有无污染）。

挑单克隆于5ml不加抗生素LB中，37℃、250rpm摇菌培养过夜。

分别取1ml菌液接种于两瓶50mlLB中，37℃、250rpm开始扩大培养。约2小时开始，用一个培养物测OD600值，OD600值在0.4～0.5时（此时

培养物处于对数生长期，细菌数应在20分钟内加倍），立即把另一培养物放置

在冰浴里10分钟，让细胞停止分裂。

把培养物分装到两个聚丙烯管（灭菌并预冷），4℃、4000rpm，离心10分钟。

弃上清，加10ml 0.1MCaCl2（灭菌并预冷）悬浮沉淀，4℃、4000rpm，离心10分钟。

弃上清，加2ml 0.1M CaCl2悬浮沉淀。

进行质粒转化实验。如果不马上转化，应该加灭菌甘油至终浓度10～20％，置于－70℃冻存。（以上操作均在超净台中进行）

35.2.8转化细菌（热激转化法）

把感受态细菌从－70℃冰箱中取出置冰上融化

取5ul连接产物加入至100ul感受态细菌即大肠杆菌DH5α中，冰上放置

20～30分钟。

把加入了连接产物的感受态细菌置于42℃水浴箱热激90秒。热激后的感受态细菌置于冰上5～10分钟。

加入900ul不含抗生素的LB，37℃、250rpm摇菌培养45分钟。

取100ul转化菌液涂布于100ug/ml氨苄青霉素平板，用于筛选阳性克隆。平板倒置于37℃培养箱中孵育16hour。

35.2.9从平板中挑取阳性克隆

挑选8～10个大小均匀的白色克隆，进一步进行扩增培养。蓝色菌落和大小不一的菌落为阴性菌落。

35.2.10质粒DNA的少量制备

用无菌牙签将3.2.9中的单个阳性克隆挑至含氨苄青霉素的LB培养液中，

37℃、250rpm摇菌培养过夜。

将上述扩增培养液分装至1.5ml的Eppendorf管，13000rpm离心30秒，去上清，吸取残液。

重复收集菌液，离心，去上清。

加入100ul预冷的溶液一（含5.0ug/ul RNAase），用涡轮振荡器充分悬浮。加入150ul溶液二，快速颠倒，温和混匀，室温放置5分钟。

加入150ul预冷的溶液三，温和混匀，放入－20℃冰箱5分钟。

13000rpm，离心3分钟，取上清至1.5ml Ep 管

加入2倍于上清液体积的无水酒精，混匀，13000rpm，离心5分钟，尽可能除去上清

0.5ml 70％乙醇漂洗DNA沉淀一次，13000rpm，离心2分钟，倒掉70％乙醇，低温干燥10分钟以上。

加40ml TE（含5.0ug/ul RNAase）溶解DNA，37℃放置数分钟。置于4℃备用或－20℃冻存。

3.2.11重组克隆载体测序鉴定

分别由Takara公司和上海生工（Sangon）生物工程公司完成。

### 3.3 构建pVAX1-IRES2-EGFP载体

3.3.1设计合成引物扩增IRES2-EGFP片段，上游引物5’端添加EcoRI，下游引物5’端添加NotI，引物序列为：

IRES2-EGF

P-EcoR1-F IRES2-EGF P-Not1-R

5'-ATTATTGAATTCGCCCCTCTCCCTCCCCCC-3'

5'-ATTATTGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'

3.3.2从pIRES2-EGFP上扩增IRES2-EGFP片段，PCR体系为：

Component Amount

10×buffer 5ul

MgSO4(50mM) 1.5ul

dNTP(10mM) 1ul

IRES2-EGFP-EcoR1-F(10uM) 2ul

IRES2-EGFP-Not1-R(10uM) 2ul

pIRES2-EGFP 0.5ul

Platimum pfx DNA polymerase (5U/ul) 0.2ul ddH2O 37.8ul

循环条件：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 95℃ | 3min | 1 | cycle |
| 94℃ | 30sec |  |  |
| 55℃ | 30sec | 30 | cycles |
| 68℃ | 90sec |  |  |
| 68℃ | 10min | 1 | cycle |

3.3.3 PCR产物电泳，并回收IRES2-EGFP片段。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：

取上述PCR产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.3.4用EcoRI和NotI酶切IRES2-EGFP片段和pVAX1，37℃反应2小时，酶切体系为：

Component Amount

10×buffer 5ul

DNA（约100ng/ul）5ul

EcoRI 1ul

NotI 1ul

ddH2O 38ul

3.3.5回收酶切的IRES2-EGFP片段和pVAX1载体片段。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.3.6将酶切的IRES2-EGFP片段连接到pVAX1载体中，室温连接2小时，连接体系为：

Component Amount

Ligation buffer 1ul

酶切的pVAX1(20ng/ul) 1ul

酶切的IRES2-EGFP片段2ul

T4 DNA ligase 0.5ul

ddH2O 5.5ul

3.3.7取5ul连接产物转化100ul的DH5a感受态细胞。把感受态细菌从－70℃冰箱中取出置冰上融化

取5ul连接产物加入至100ul感受态细菌即大肠杆菌DH5α中，冰上放置

20～30分钟。

把加入了连接产物的感受态细菌置于42℃水浴箱热激90秒。热激后的感受态细菌置于冰上5～10分钟。

加入900ul不含抗生素的LB，37℃、250rpm摇菌培养45分钟。

取100ul转化菌液涂布于抗生素的平板，用于筛选阳性克隆。平板倒置于

37℃培养箱中孵育16hour。

3.3.8从平板上挑取阳性克隆并测序。

挑选8～10个大小均匀的白色克隆，进一步进行扩增培养。蓝色菌落和大小不一的菌落为阴性菌落。用无菌牙签将5.9中的单个阳性克隆挑至含抗生素的

LB培养液中，37℃、250rpm摇菌培养过夜。

将上述扩增培养液分装至1.5ml的Eppendorf管，13000rpm离心30秒，去上清，吸取残液。

重复收集菌液，离心，去上清。

加入100ul预冷的溶液一（含5.0ug/ul RNAase），用涡轮振荡器充分悬浮。加入150ul溶液二，快速颠倒，温和混匀，室温放置5分钟。

加入150ul预冷的溶液三，温和混匀，放入－20℃冰箱5分钟。

13000rpm，离心3分钟，取上清至1.5ml Ep管。

加入2倍于上清液体积的无水酒精，混匀，13000rpm，离心5分钟，尽可能除去上清。

0.5ml 70％乙醇漂洗DNA沉淀一次，13000rpm，离心2分钟，倒掉70％乙醇，低温干燥10分钟以上。

加40ml TE（含5.0ug/ul RNAase）溶解DNA，37℃放置数分钟。置于4℃备用或－20℃冻存。

重组克隆载体分别由Takara公司和上海生工（Sangon）生物工程公司完成测序鉴定。

### 3.4 构建pVAX1-Myod1-IRES2-EGFP载体

3.4.1设计Myod1与IRES2-EGFP进行PCR拼接的PCR引物。Primer1的5’端加EcoRI，引物序列如下：

Primer 1/2扩增Myod1; primer 3/ IRES2-EGFP-Not1-R扩增IRES2-EGFP. Primer 1 5'-ATCATGGAATTCGCCACCATGGAGCTACTATCGCCGCCA-3'

5'-TAACGTTAGGGGGGGGGGAGGGAGAGGGGCTCAGAGCA

Primer 2

Primer 3

IRES2-EGF P-Not1-R

CCTGGTAAATCGGATT-3'

5'-AAGCCCAATCCGATTTACCAGGTGCTCTGAGCCCCTCTCC CTCCCCCCCCCCTAA-3'

5'-ATTATTGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'

3.4.2以CDNA克隆质粒为模板，扩增Myod1拼接片段；同时以

pIRES2-EGFP质粒为模板扩增IRES2-EGFP拼接片段。PCR体系如下：

Component Amount

10×buffer 5ul

MgSO4(50mM) 1ul

dNTP(10mM) 1ul

Primer F(10uM) 2ul

Primer R(10uM) 2ul

Platinum pfx DNA polymerase(5U/ul) 0.2ul

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 质粒  ddH2O  循环体系如下：  95℃ 3min | 1 | cycle | 0.5Ul 38.3ul |
| 94℃ 30sec  56℃ 30sec | 30 | cycles |  |
| 68℃ 2min  68℃ 10min | 1 | cycle |  |

3.4.3回收PCR产物。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述PCR产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.4.4将Myod1片段与IRES2-EGFP片段进行PCR拼接，拼接 成

Myod1-IRES2-EGFP片段，PCR体系如下：

Component Amount

10×buffer 5ul

MgSO4(50mM) 1ul

dNTP(10mM) 1ul

Primer 1(10uM) 2ul

Primer 4(10uM) 2ul

Platinum pfx DNA polymerase(5U/ul) 0.2ul

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Myod1 片段  IRES2-EGFP 片段  ddH2O |  |  | 2Ul 2ul  34.8ul |
| 循环体系如下： |  |  |  |
| 95℃ 3min  94℃ 30sec | 1 | cycle |  |
| 60℃ 30sec 68℃ 3min  68℃ 10min | 30  1 | cycles  cycle | |
| 3.4.5 回收拼接的 PCR 产物。 |  |  | |

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.4.6用EcoRI和NotI酶切Myod1-IRES2-EGFP片段和pVAX1载体，37

℃反应2小时，酶切体系为：

Component Amount

10×buffer 5ul

DNA（约200ng/ul）5ul

EcoRI 1ul

NotI 1ul

ddH2O 38ul

3.4.7回收酶切的Myod1-IRES2-EGFP片段和pVAX1载体。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.4.8用T4 DNA ligase连接片段和载体，室温连接2小时，连接体系为：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Component  Ligation buffer | Amount  1 |
| 酶切的 pVAX1(20ng/ul) | 1 |
| 酶切的 Myod1-IRES2-EGFP 片段 | 2 |
| T4 DNA ligase | 0.5 |
| ddH2O | 5.5 |
| 3.4.9 | 连接产物转化 DH5a 感受态细胞。 |  |

把感受态细菌从－70℃冰箱中取出置冰上融化

取5ul连接产物加入至100ul感受态细菌即大肠杆菌DH5α中，冰上放置

20～30分钟。

把加入了连接产物的感受态细菌置于42℃水浴箱热激90秒。热激后的感受态细菌置于冰上5～10分钟。

加入900ul不含抗生素的LB，37℃、250rpm摇菌培养45分钟。

取100ul转化菌液涂布于抗生素的平板，用于筛选阳性克隆。平板倒置于

37℃培养箱中孵育16hour。

3.4.10挑取阳性克隆并测序。

挑选8～10个大小均匀的白色克隆，进一步进行扩增培养。蓝色菌落和大小不一的菌落为阴性菌落。用无菌牙签将5.9中的单个阳性克隆挑至含抗生素的

LB培养液中，37℃、250rpm摇菌培养过夜。

将上述扩增培养液分装至1.5ml的Eppendorf管，13000rpm离心30秒，去上清，吸取残液。

重复收集菌液，离心，去上清。

加入100ul预冷的溶液一（含5.0ug/ul RNAase），用涡轮振荡器充分悬浮。加入150ul溶液二，快速颠倒，温和混匀，室温放置5分钟。

加入150ul预冷的溶液三，温和混匀，放入－20℃冰箱5分钟。

13000rpm，离心3分钟，取上清至1.5ml Ep管。

加入2倍于上清液体积的无水酒精，混匀，13000rpm，离心5分钟，尽可能除去上清。

0.5ml 70％乙醇漂洗DNA沉淀一次，13000rpm，离心2分钟，倒掉70％乙醇，低温干燥10分钟以上。

加40ml TE（含5.0ug/ul RNAase）溶解DNA，37℃放置数分钟。置于4℃备用或－20℃冻存。

重组克隆载体分别由Takara公司和上海生工（Sangon）生物工程公司完成测序鉴定。

### 3.5 构建pVAX1-Myog-IRES2-EGFP载体

3.5.1设计Myog与IRES2-EGFP进行PCR拼接的PCR引物。Primer4的5’端加EcoRI，引物序列如下，primer 4/5扩增Myog ; primer 6/ IRES2-EGFP-Not1-R扩增IRES2-EGFP

5'-ATCATGGAATTCGCCACCATGGAGCTGTATGAAACATCCC

Primer 4

Primer 5

Primer 6

CCTA-3'

5'-TAACGTTAGGGGGGGGGGAGGGAGAGGGGCTCAGTTGG GCATGGTTTCATCTG-3'

5'-ACCTTCCCAGATGAAACCATGCCCAACTGAGCCCCTCTC CCTCCCCCCCCCCTAA-3'

IRES2-EG FP-Not1-R

5'-ATTATTGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'

3.5.2以CDNA克隆质粒为模板，扩增Myog拼接片段；同时 以

pIRES2-EGFP质粒为模板扩增IRES2-EGFP拼接片段。PCR体系如下：

Component Amount

10×buffer 5ul

MgSO4(50mM) 1ul

dNTP(10mM) 1ul

Primer F(10uM) 2ul

Primer R(10uM) 2ul

Platinum pfx DNA polymerase(5U/ul) 0.2ul

质粒0.5ul

ddH2O 38.3ul

循环体系如下：

95℃ 3min 1 cycle

94℃ 30sec

56℃ 30sec 68℃ 2min

30 cycles

68℃10min 1 cycle

3.5.3回收PCR产物。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述PCR产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，

置于4℃备用或－20℃冻存。

3.5.4将Myog片段与IRES2-EGFP片段进行PCR拼接，拼接 成

Myog-IRES2-EGFP片段，PCR体系如下：

Component Amount

10×buffer 5ul

MgSO4(50mM) 1ul

dNTP(10mM) 1ul

Primer 1(10uM) 2ul

Primer 4(10uM) 2ul

Platinum pfx DNA polymerase(5U/ul) 0.2ul

Myog片段2ul

IRES2-EGFP片段2ul

ddH2O 34.8ul

循环体系如下：

95℃ 3min 1 cycle

94℃ 30sec

60℃30sec 68℃3min

30 cycles

68℃10min 1 cycle

3.5.5回收拼接的PCR产物。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述PCR产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，

置于4℃备用或－20℃冻存。

3.5.6用EcoRI和NotI酶切Myog-IRES2-EGFP片段和pVAX1载体，37℃反应2小时，酶切体系为：

Component Amount

10×buffer 5ul

DNA（约200ng/ul）5ul

EcoRI 1ul

NotI 1ul

ddH2O 38ul

3.5.7回收酶切的Myog-IRES2-EGFP片段和pVAX1载体。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.5.8用T4 DNA ligase连接片段和载体，室温连接2小时，连接体系为：

Component Amount

Ligation buffer 1ul

酶切的pVAX1(20ng/ul) 1ul

酶切的Myog-IRES2-EGFP 片

段

2ul

T4 DNA ligase 0.5ul

ddH2O 5.5ul

3.5.9连接产物转化DH5a感受态细胞。

把感受态细菌从－70℃冰箱中取出置冰上融化

取5ul连接产物加入至100ul感受态细菌即大肠杆菌DH5α中，冰上放置

20～30分钟。

把加入了连接产物的感受态细菌置于42℃水浴箱热激90秒。热激后的感受态细菌置于冰上5～10分钟。

加入900ul不含抗生素的LB，37℃、250rpm摇菌培养45分钟。

取100ul转化菌液涂布于抗生素的平板，用于筛选阳性克隆。平板倒置于

37℃培养箱中孵育16hour。

3.5.10挑取阳性克隆并测序。

挑选8～10个大小均匀的白色克隆，进一步进行扩增培养。蓝色菌落和大小不一的菌落为阴性菌落。用无菌牙签将5.9中的单个阳性克隆挑至含抗生素的

LB培养液中，37℃、250rpm摇菌培养过夜。

将上述扩增培养液分装至1.5ml的Eppendorf管，13000rpm离心30秒，去上清，吸取残液。

重复收集菌液，离心，去上清。

加入100ul预冷的溶液一（含5.0ug/ul RNAase），用涡轮振荡器充分悬浮。加入150ul溶液二，快速颠倒，温和混匀，室温放置5分钟。

加入150ul预冷的溶液三，温和混匀，放入－20℃冰箱5分钟。

13000rpm，离心3分钟，取上清至1.5ml Ep 管

加入2倍于上清液体积的无水酒精，混匀，13000rpm，离心5分钟，尽可能除去上清

0.5ml 70％乙醇漂洗DNA沉淀一次，13000rpm，离心2分钟，倒掉70％乙醇，低温干燥10分钟以上。

加40ml TE（含5.0ug/ul RNAase）溶解DNA，37℃放置数分钟。置于4℃备用或－20℃冻存。

重组克隆载体分别由Takara公司和上海生工（Sangon）生物工程公司完成

测序鉴定。

### 3.6 构建pVAX1-Myod1-IRES2-Myog载体

3.6.1设计Myog与Myod1-IRES2进行PCR拼接的PCR引物。Primer7的5’端加NheI, primer10的5’端加EcoRI，引物序列如下，primer 7/8扩增Myod1-IRES2；primer 9/10扩增Myog。

Primer 7 5'-ATCATGGCTAGCGCCACCATGGAGCTACTATCGCCGCCA-3'

5'-GGGGGATGTTTCATACAGCTCCATGGTGGCTGTGGCCATAT

Primer 8

Primer 9

TATCATCGTGTTTTTC-3'

5'-AAACACGATGATAATATGGCCACAGCCACCATGGAGCTGT ATGAAACATCCCCCTA-3'

Primer 10 5'-ATCATCGAATTCTCAGTTGGGCATGGTTTCATCTG-3'

3.6.2以pVAX1-Myod1-IRES2-EGFP为模板，扩增Myod1-IRES2拼接片段；同时以CDNA克隆为模板扩增Myog拼接片段。PCR体系如下：

Component Amount

10×buffer 5ul

MgSO4(50mM) 1ul

dNTP(10mM) 1ul

Primer F(10uM) 2ul

Primer R(10uM) 2ul

Platinum pfx DNA polymerase(5U/ul) 0.2ul

质粒0.5ul

ddH2O 38.3ul

循环体系如下：

95℃ 3min 1 cycle

94℃ 30sec

56℃ 30sec 30 cycles

68℃2min

68℃10min 1 cycle

3.6.3回收PCR产物。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述PCR产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.6.4将Myod1-IRES2片段与Myog片段进行PCR拼接，拼接 成

Myod1-IRES2-Myog片段，PCR体系如下：

Component Amount

10×buffer 5ul

MgSO4(50mM) 1ul

dNTP(10mM) 1ul

Primer 1(10uM) 2ul

Primer 4(10uM) 2ul

Platinum pfx DNA polymerase(5U/ul) 0.2ul

Myod1-IRES2片段2ul

Myog片段2ul

ddH2O 34.8ul

循环体系如下：

95℃ 3min 1 cycle

94℃ 30sec

60℃ 30sec 30 cycles

68℃3min

68℃10min 1 cycle

3.6.5回收拼接的PCR产物。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述PCR产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.6.6用EcoRI和NheI酶切Myod1-IRES2-Myog片段和pVAX1载体，37

℃反应2小时，酶切体系为：

Component Amount

10×buffer 5ul

DNA（约200ng/ul）5ul

EcoRI 1ul

NheI 1ul

ddH2O 38ul

3.6.7回收酶切的Myod1-IRES2-Myog片段和pVAX1载体。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.6.8用T4 DNA ligase连接片段和载体，室温连接2小时，连接体系为：

Component Amount

Ligation buffer 1ul

酶切的pVAX1(20ng/ul) 1ul

酶切的Myod1-IRES2-Myog 片

段

2ul

T4 DNA ligase 0.5ul

ddH2O 5.5ul

3.6.9连接产物转化DH5a感受态细胞。

把感受态细菌从－70℃冰箱中取出置冰上融化

取5ul连接产物加入至100ul感受态细菌即大肠杆菌DH5α中，冰上放置

20～30分钟。

把加入了连接产物的感受态细菌置于42℃水浴箱热激90秒。热激后的感受态细菌置于冰上5～10分钟。

加入900ul不含抗生素的LB，37℃、250rpm摇菌培养45分钟。

取100ul转化菌液涂布于抗生素的平板，用于筛选阳性克隆。平板倒置于

37℃培养箱中孵育16hour。

3.6.10挑取阳性克隆并测序。

挑选8～10个大小均匀的白色克隆，进一步进行扩增培养。蓝色菌落和大小不一的菌落为阴性菌落。用无菌牙签将5.9中的单个阳性克隆挑至含抗生素的

LB培养液中，37℃、250rpm摇菌培养过夜。

将上述扩增培养液分装至1.5ml的Eppendorf管，13000rpm离心30秒，去上清，吸取残液。

重复收集菌液，离心，去上清。

加入100ul预冷的溶液一（含5.0ug/ul RNAase），用涡轮振荡器充分悬浮。加入150ul溶液二，快速颠倒，温和混匀，室温放置5分钟。

加入150ul预冷的溶液三，温和混匀，放入－20℃冰箱5分钟。

13000rpm，离心3分钟，取上清至1.5ml Ep管。

加入2倍于上清液体积的无水酒精，混匀，13000rpm，离心5分钟，尽可能除去上清。

0.5ml 70％乙醇漂洗DNA沉淀一次，13000rpm，离心2分钟，倒掉70％乙醇，低温干燥10分钟以上。

加40ml TE（含5.0ug/ul RNAase）溶解DNA，37℃放置数分钟。置于4℃备用或－20℃冻存。

重组克隆载体分别由Takara公司和上海生工（Sangon）生物工程公司完成测序鉴定。

### 3.7 构建pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP载体

3.7.1用EcoRI和NotI酶切pVAX1-IRES2-EGFP和

pVAX1-Myod1-IRES2-Myog载体，37℃反应2小时，酶切体系为：

Component Amount

10×buffer 5ul

DNA（约200ng/ul）5ul

EcoRI 1ul

NheI 1ul

ddH2O 38ul

3.7.2回收酶切下的IRES2-EGFP片段和pVAX1-Myod1-IRES2-Myog载体。

使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的基因片段（试剂均由试剂盒中提供）：取上述产物于1%琼脂糖凝胶进行电泳。

割胶。

参照DNA凝胶回收试剂盒操作手册中小量胶回收的操作步骤逐步进 行

DNA回收。

将洗脱后的DNA融于30ul 10mM TE溶液中，移入1.5ml Eppendorf管中，置于4℃备用或－20℃冻存。

3.7.3用T4 DNA ligase连接片段和载体，室温连接2小时，连接体系为：

Component Amount

Ligation buffer 1ul

酶切的pVAX1-Myod1-IRES2-Myog载体（20ng/ul）1ul IRES2-EGFP片段2ul

T4 DNA ligase 0.5ul

ddH2O 5.5ul

3.7.4连接产物转化DH5a感受态细胞。

把感受态细菌从－70℃冰箱中取出置冰上融化

取5ul连接产物加入至100ul感受态细菌即大肠杆菌DH5α中，冰上放置

20～30分钟。

把加入了连接产物的感受态细菌置于42℃水浴箱热激90秒。热激后的感受态细菌置于冰上5～10分钟。

加入900ul不含抗生素的LB，37℃、250rpm摇菌培养45分钟。

取100ul转化菌液涂布于抗生素的平板，用于筛选阳性克隆。平板倒置于

37℃培养箱中孵育16hour。

3.7.5挑取阳性克隆并测序。

挑选8～10个大小均匀的白色克隆，进一步进行扩增培养。蓝色菌落和大小不一的菌落为阴性菌落。用无菌牙签将5.9中的单个阳性克隆挑至含抗生素的

LB培养液中，37℃、250rpm摇菌培养过夜。

将上述扩增培养液分装至1.5ml的Eppendorf管，13000rpm离心30秒，去上清，吸取残液。

重复收集菌液，离心，去上清。

加入100ul预冷的溶液一（含5.0ug/ul RNAase），用涡轮振荡器充分悬浮。加入150ul溶液二，快速颠倒，温和混匀，室温放置5分钟。

加入150ul预冷的溶液三，温和混匀，放入－20℃冰箱5分钟。

13000rpm，离心3分钟，取上清至1.5ml Ep 管

加入2倍于上清液体积的无水酒精，混匀，13000rpm，离心5分钟，尽可能除去上清

0.5ml 70％乙醇漂洗DNA沉淀一次，13000rpm，离心2分钟，倒掉70％乙醇，低温干燥10分钟以上。

加40ml TE（含5.0ug/ul RNAase）溶解DNA，37℃放置数分钟。置于4℃备用或－20℃冻存。

重组克隆载体分别由Takara公司和上海生工（Sangon）生物工程公司完成测序鉴定。

结果

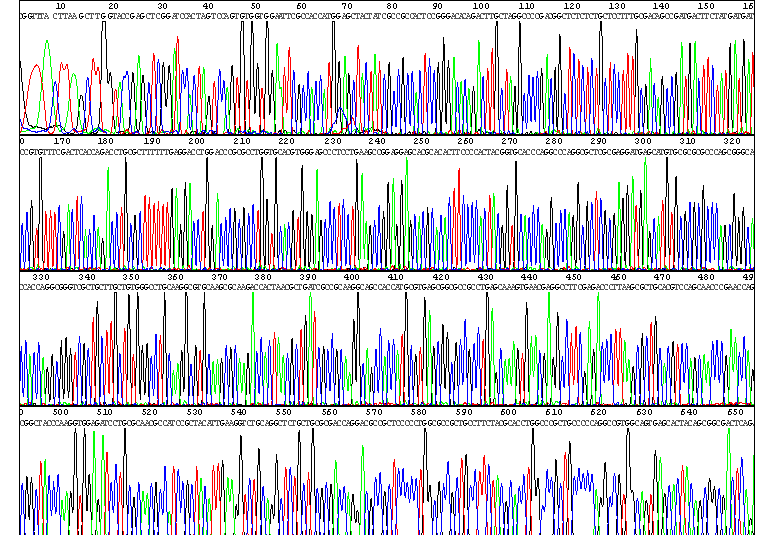
## 1、 测序结果

Takara公司和上海生工（Sangon）生物工程公司测序的结果均证实，插入

pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体中的Myod1、Myog、

IRES2及EGFP的碱基序列，分别与GenBank所公布的Myod1、Myog、IRES2

及EGFP的碱基序列完全相同。测序结果见图1-1~1-4。



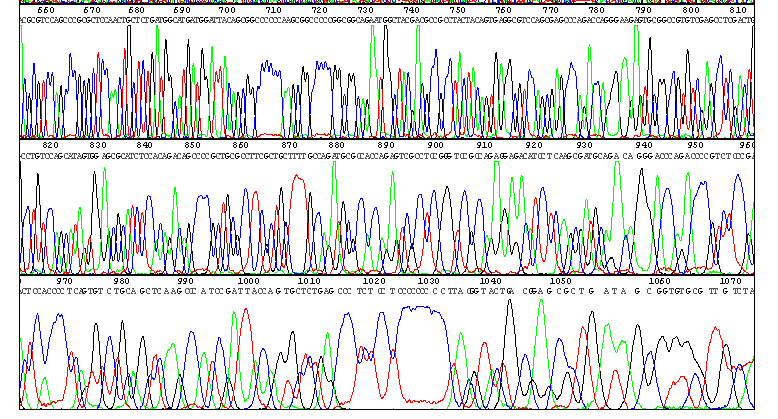


图1-1 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体中Myod1的测序结果



图1-2 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体中Myog的测序结果



图1-3 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体中IRES2的测序结果



图1-4 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体中EGFP的测序结果

**讨论**

多年来，失神经支配骨骼肌萎缩一直是骨科学领域中的一个重要并亟需破解的理论难题。运用转录因子进行基因治疗是极具应用前景的治疗方法，是目前研究的热点。生肌调节因子家族对骨骼肌的发生、分化和成熟起决定性作用。 过去人们多用单基因来治疗骨骼肌失神经萎缩，但是疗效不佳。由于发现转录因子之间存在相互协同与促进的作用，因此探索双基因联合应用以促进细胞增殖和成肌分化是一项很有价值研究，能够为失神经支配骨骼肌萎缩的防治寻找新的思路，并提供实验依据。

在胚胎发育阶段，骨骼肌的发生和发育主要取决于MRFs转录因子家族成员所发挥的调控作用。不同的MRFs家族成员的所发挥的作用具有不同的时间特异性和空间特异性，这种特定的时间和空间模式表明MRFs家族各个成员在骨骼肌的发生和发育过程中所发挥的作用是不相同的。在人类胚胎时期，骨骼肌发生的初期首先出现Myf5和MyoD1表达，随后Myog开始进行表达，最终促使成肌细胞完成向骨骼肌肌纤维分化的过程[10]。通常，MRFs转录因子在发育成熟的骨骼肌中表达水平较低，但是MRF4却是个例外的转录因子，它能够在

发育成熟的骨骼肌中保持较高的表达水平，这表明MRF4的功能可能与维持骨骼肌的分化状态有关[11]。在MRFs家族的四个成员中，有些功能却又是相似的，但是每个成员又都具有各自独特的功能[12]。根据蛋白结构及所具有功能的相似性，MRFs家族的四个成员可以分为两类，第一类包括有MyoD1和Myf5两个因子，两者在空间结构和表达的时间上具有很高的相似性，与胚胎发育时期成肌细胞的发生过程具有密切的关系。第二类包括Myog和MRF4两个因子，它们与成肌细胞的分化过程以及骨骼肌的成熟过程具有密切的关系[13]。

在MRFs转录因子家族的成员中，MyoD1和Myf5两个因子之间结构和功能具有极高的相似性，二者基本上可以相互替代。在大鼠发育的胚胎时期，只需单一的MyoD1或Myf5转录因子出现表达就基本上能够满足骨骼肌发育成熟的要求[14]。近年来的研究结果表明，单独缺乏MyoD1或者Myf5转录因子的大鼠胚胎在发育过程中不会出现严重的骨骼肌异常，但是当同时缺乏MyoD1和Myf5两个因子时，大鼠胚胎则不会出现分化成熟的骨骼肌，这表明MyoD1 和

Myf5不仅能够在骨骼肌肌细胞发生的早期阶段发挥作用，而且二者还具有相似的功能，基本上可以相互替代[15]。Myf5是在胚胎时期骨骼肌发育早期，在骨骼肌祖细胞内最早出现表达的MRFs家族成员[16]。如果Myf5基因表达缺失，那么就会导致早期的肌节不能形成。但是，这种发育障碍会被随后出现表达的MyoD1所修复，结果使得骨骼肌仍然能够正常发育。近年来的研究结果表明，在胚胎发育过程中，缺乏Myf5 基因表达的大鼠会在出生时出现严重的脊柱和胸廓畸形，但并不影响正常的骨骼肌的形成，这可能是由于缺乏Myf5基因而导致肌节与生骨节之间失去联系而产生的结果；反之，如果MyoD1基因表达存在缺陷，那么就会导致Myf5的表达水平出现代偿性增高，结果使得骨骼肌仍然能够正常发育

[17]. 但是，对于MyoD1基因和Myf5基因两者同时缺乏的大鼠胚胎来讲，结果就是其体内既不会出现成熟的骨骼肌，也不会出现成肌细胞的前体细胞群[18]。由此可见，Myf5和MyoD1两个因子的功能是相似，并且从时间上来讲，二者应该都是在Myog和MRF4两个因子之前进行表达的，由此才能启动骨骼肌的

发育过程。此外，在成年大鼠体内，当骨骼肌发生损伤，肌卫星细胞进行再生修复时，Myf5和MyoD1基因的转录水平首先升高，随后，MyoD1的表达水平会进一步升高[19]。由此可见，MyoD1是在干细胞向成肌细胞分化的过程中发挥着主导作用，是肌卫星细胞处于激活状态的一个很好的标记蛋白。

Myog和MRF4是MRFs家族成员中另外两个具有相似功能的转录因子。

Myog促进成肌细胞分化的能力与MRF4相似。对于Myog基因缺失的小鼠，如果给予其外源性MRF4基因的进行补充治疗，那么就可使其成肌细胞的分化能力得到部分代偿，这就证明MRF4基因具有的功能可以部分替代Myog基因。此外，如果MRF4基因转录表达缺失，那么Myog基因的表达水平就会升高以发挥代偿作用。近年来的研究结果表明，Myog转录因子在骨骼肌的分化过程中能够发挥重要的作用，Myog基因表达缺失会阻碍骨骼肌肌纤维的成熟，但是对于肌母细胞的发生则不会产生不利影响[20]。在小鼠胚胎体内，如果敲除掉

Myog基因，则会导致严重的骨骼肌发育缺陷，在正常应该出现骨骼肌的部位只有少量的发育不良的肌纤维出现，但是，如果单独敲除的是MRFs家族成员中其它三个成员，那么就不会出现如此严重的后果[21,22,23]。由此可见，Myog转录因子的缺失可以导致骨骼肌发育的较为严重缺陷，这就提示其在骨骼肌分化过程中所担当的作用较为重要。在Myog基因转录表达缺失的小鼠胚胎体内，MRF4基因的表达水平大约会减少3/4，而MyoD1基因的转录表达水平仍然处于正常水平，这就提示Myog转录因子可以调节MRF4基因的表达水平，但是不能对

MyoD1的表达水平产生影响[24,25]。由此可见，Myog和MRF4两者具有相似功能，并且共同在Myf5和MyoD1两个因子的下游发挥促进骨骼肌分化的作用。基于以上研究结论可以推论，生肌调节因子家族成员各自的表达时间和功

能特点对于决定骨骼肌的发生、分化和成熟具有重要的作用，Myod1和Myf5基因主要是在骨骼肌发育早期的肌前体细胞向成肌细胞分化的过程中发挥作用，而Myog和MRF4基因主要在骨骼肌发育晚期的成肌细胞向终末骨骼肌纤维分化的过程中发挥作用。其中Myod1、Myog的作用尤为突出，Myod1在其他类型

细胞转分化为成肌细胞以及成肌细胞分化为肌管的过程中发挥着重要的作用，在骨骼肌特异性基因的激活与转录过程中起着总开关的作用；Myog是决定骨骼肌细胞终末分化的关键因子[26]。目前，虽然国内外学者对失神经支配骨骼肌萎缩的基因治疗展开了广泛的探索，但是大多数仅局限于应用单一基因进行治疗，而且疗效不佳。因此，本研究选择联合应用两类最重要的生肌细胞调节因子

Myod1和Myog的真核共表达载体进行基因治疗，以期得到更好的疗效。

目前，能够用于在真核细胞中表达外源性基因的载体主要有两类，它们分别是病毒载体和非病毒载体。以病毒载体为媒介的转基因技术称为转导，以非病毒载体为媒介的转基因技术称为转染。病毒性载体通常包括RNA病毒载体和

DNA病毒载体[27]。非病毒性载体包括质粒、脂质体、DNA配体复合物、裸DNA等[28]。目前应用较多的表达载体是病毒载体。病毒载体的优点是转染效率较高，而且表达效率也较高；但缺点是存在潜在的生物安全性隐患。已有研究表明，病毒载体的应用可以引起宿主细胞发生肿瘤等疾病，这是因为病毒载体易于插入到宿主细胞的染色体内进行整合，这就容易引起宿主细胞的染色体发生重排或者基因突变，结果会导致宿主细胞发生异常增殖并发展为肿瘤等疾病[29, 30, 31]。 随着基因治疗技术的不断发展，虽然病毒载体的安全性已有很大提高，但是导致宿主细胞发生恶变的风险依然在存在。虽然通过各种努力，这方面的隐患已经有了极大程度的降低，但其仍然是一个无法彻底解决的问题，因此病毒载体在应用上受到一定的限制。腺病毒是一种常用的病毒性载体，它的优点包括：制备方法简单；能够携带较大片段的目的基因，最大可达35kb；能够转导多种细胞。缺点包括：插入的DNA片段在宿主细胞内仍以游离体形式存在，易被降解；免疫原性高，容易引起宿主反应；存在潜在的致瘤性，临床应用的安全性有待进一步提高。

与病毒载体相比之，非病毒载体的安全性相对更高，构建的载体方法也不是特别复杂，表达外源性基因的时间通常也能够持续几周至几个月。因此，非病毒载体也被很多研究采用，但是其不足之处在于转染效率有时比较低[32]。质

粒载体是一种常用的非病毒载体，虽然其转染效率和表达效率均较无法高于病毒载体，但是仍然具有自身的一些优点，主要包括：第一，质粒载体的制备过程简单且重复性好，不需要有包装细胞进行包装，能够大规模生产，来源充足；第二，质粒载体的容量较大，可以插入较大的目的基因片段；第三，质粒载体还具有转染非分裂期细胞的能力，而且能够在非分裂期细胞内有效表达目的基因；第四，质粒载体自身的免疫原性低，毒性作用较小；第五，质粒载体基因表达持续时间相对病毒载体较短，引起基因突变或发生恶性肿瘤的可能性较小。目前应用较多的转染的试剂是阳离子脂质体，其优点主要是：对目的基因片段的长度无限制，不容易引起宿主细胞的免疫反应，不会整合入宿主细胞的染色体DNA中引起基因突变；缺点主要是转染的效率相对较低。各种载体各有优缺点，实际应用时需要根据具体情况进行选择。非病毒载体质粒的安全性较高，对于周围神经损伤后骨骼肌失神经萎缩这一非致命性疾患而言，在进行基因治疗时应该尽量选择安全性高的方法进行治疗，以避免肿瘤形成等严重的不良后果。基于以上特点，本研究采用了质粒作为携带目的基因片段的真核表达载体，以获得更高的生物安全性。

本研究所用的真核表达载体pVAX1是被美国食品和药品管理委员会批准的唯一可以应用于人体实验的非病毒载体质粒，是由Invitrogen公司研发的用于在真核细胞内进行表达的工程载体，是在载体pcDNA3.1的基础上改建而成的一种新型真核表达载体。pVAX1的碱基数目约为3.0 kb，含有多个克隆酶切位点允许同时克隆多个大片段的目的基因，其所包含的强启动子pCMV和BGH poly A信号可以在哺乳动物细胞中高水平表达目的基因蛋白。该载体用卡那霉素抗性筛选基因替代pcDNA3.1中的氨卞霉素抗性筛选基因，最大程度地减少抗性筛选基因和人类基因组发生重组的可能性。

结论

## 1、 本实验成功构建了Myod1基因和Myog基因的真核共表达载体pVAX1-Myod1-

IRES2- Myog-IRES2-EGFP。

参考文献：

[1] Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, et al. The molecular regulation of muscle stem cell function. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008; 73: 323-31.

[2] Seale P, Ishibashi J, Holterman C, et al. Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient Myogenic cell. Dev Biol. 2004; 275(2): 287-300.

[3] Blain M, Zeng Y, Bendjelloul M, et al. Strong muscle-specific regulatory cassettes based on multiple copies of the human slow troponin I gene upstream enhancer. Hum Gene Ther. 2010; 21(1): 127-34.

[4] Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, et al. The molecular regulation of muscle stem cell function. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008; 73: 323-31.

[5] Huang J, Weintraub H, Kedes L. Intramolecular regulation of MyoD activation domain conformation and function. Mol Cell Biol. 1998; 18(9): 5478-84.

[6] Megeney LA, Kablar B, Garrett K, et al. MyoD is required for Myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. Genes Dev. 1996; 10(10): 1173-83.

[7] Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. Biochem Cell Biol. 1995; 73(9-10): 723-32.

[8] Chen JC, Goldhamer DJ. Transcriptional mechanisms regulating MyoD expression in the mouse. Cell Tissue Res. 1999; 296(1): 213-9.

[9] Olson EN. Regulation of muscle transcription by the MyoD family. The heart of the matter. Circ Res. 1993; 72(1): 1-6.

[10] Di Carlo A, De Mori R, Martelli F, et al. Hypoxia inhibits Myogenic differentiation through accelerated MyoD degradation. J Biol Chem. 2004; 279(16): 16332-8.

[11] Jennings CG. Expression of the Myogenic gene MRF4 during Xenopus development. Dev Biol. 1992; 151(1): 319-32.

[12] Huang J, Weintraub H, Kedes L. Intramolecular regulation of MyoD activation domain conformation and function. Mol Cell Biol. 1998; 18(9): 5478-84.

[13] Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. Biochem Cell Biol. 1995; 73(9-10): 723-32.

[14] Strachan T, Read AP. PAX genes. Curr Opin Genet Dev. 1994; 4(3): 427-38.

[15] Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, et al. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. J Cell Sci. 1999; 112 ( Pt 17): 2895-901.

[16] Hasty P, Bradley A, Morris JH, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the Myogenin gene. Nature. 1993; 364(6437): 501-6.

[17] Rampalli S, Li L, Mak E, et al. p38 MAPK signaling regulates recruitment of Ash2L-containing methyltransferase complexes to specific genes during differentiation. Nat Struct Mol Biol. 2007; 14(12): 1150-6.

[18] Dezan C, Meierhans D, Künne AG, et al. Acquisition of Myogenic specificity through replacement of one amino acid of MASH-1 and introduction of an additional alpha-helical turn. Biol Chem. 1999; 380(6): 705-10.

[19] Cossu G, Kelly R, Tajbakhsh S, et al. Activation of different Myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. Development. 1996; 122(2): 429-37.

[20] Tapscott SJ, Weintraub H. MyoD and the regulation of Myogenesis by helix-loop-helix proteins. J Clin Invest. 1991; 87(4): 1133-8.

[21] Tapscott SJ. The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription. Development. 2005 Jun; 132(12): 2685-95.

[22] Yablonka-Reuveni Z, Day K, Vine A, et al. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. J Anim Sci. 2008; 86(14 Suppl): E207-16.

[23] De la Serna IL, Ohkawa Y, Berkes CA, et al. MyoD targets chromatin remodeling complexes to the Myogenin locus prior to forming a stable DNA-bound complex. Mol Cell Biol. 2005; 25(10): 3997-4009.

[24] Olson EN. Regulation of muscle transcription by the MyoD family. The heart of the matter. Circ Res. 1993; 72(1): 1-6.

[25] Pownall ME, Emerson CP Jr. Sequential activation of three Myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. Dev Biol. 1992; 151(1): 67-79.

[26] Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7(7): 540-6.

[27] Larocca C, Schlom J. Viral vector-based therapeutic cancer vaccines. Cancer J. 2011 Sep-Oct; 17(5): 359-71.

[28] Perrie Y, Gregoriadis G. Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. Biochim Biophys Acta. 2000 Jul 3; 1475(2): 125-32.

[29] Barouch DH. Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. Curr Opin HIV AIDS. 2010 Sep; 5(5): 386-90.

[30] Musgrave DS, Bosch P, Lee JY, et al. Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. Clin Orthop Relat Res. 2000 Sep; (378): 290-305.

[31] Jane JA Jr, Dunford BA, Kron A, et al. Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenetic protein (BMP) -4 and BMP-6 gene transfer. Mol Ther. 2002 Oct; 6(4): 464-70.

[32] Dalby B, Cates S, Harris A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Methods. 2004 Jun; 33(2): 95-103.

# 第二部分 大鼠真皮成纤维细胞的体外培养及鉴定

前 言

利用细胞移植的方法治疗失神经支配骨骼肌萎缩是一种全新的治疗途径，这就为萎缩骨骼肌的组织重建以及功能恢复提供了新的希望。但是细胞移植的方法目前仍然存在着一些亟待解决的问题，其中主要包括：可移植的细胞来源、 获取途径和获取数量，可移植细胞的生物学特性，及其与宿主特定组织部位细胞之间的相似性，移植细胞和宿主机体之间的免疫排斥反应等问题。随着分子生物学技术的飞速发展，尤其是基因工程的研究进展，目前已经可以利用分子生物学手段来对某些细胞自身的基因进行分子生物学改造，从而人为操控该细胞的生物学特性。这种方法有可能为解决细胞移植所面临的难题提供新的途径。 将基因治疗和细胞移植技术的优点结合起来形成优势互补，可能是解决移植细胞的来源不足的问题的重要途径，开展深入研究具有光明的前景，也是该领域的一个新的研究热点。

真皮成纤维细胞是基因治疗过程中一种常用的工具细胞，已经被广泛应用于分子生物学研究的诸多领域。真皮成纤维细胞是存在于皮肤真皮层结缔组织内的成纤维细胞，是由胚胎时期的间充质干细胞分化而来。由于皮肤位于机体表面，因此真皮成纤维细胞所处的位置非常表浅，直接从体表取材即可获得，十分方便。此外，由于体表皮肤的表面积很大，而且皮肤的再生能力很强，因此机体真皮成纤维细胞的细胞储备非常丰富，可供取材的细胞数量非常多。在进行体外培养时，真皮成纤维细胞的适应能力与增殖能力都很强，在多次传代培养后仍能保持旺盛的增殖能力和活跃的生物学特性。一般而言，与其他细胞相比，成纤维细胞对于基因转染具有良好的耐受性，并且能够稳定表达外源性目的基因，这对于基因转染、体外细胞培养及细胞移植等研究工作十分有利。因此，真皮成纤维细胞可以作为基因治疗的理想靶细胞。基于以上理论基础，本实验通过体外分离大鼠真皮成纤维细胞进行原代培养，并应用免疫荧光及免

疫细胞化学方法进行细胞鉴定，为后续的基因转染实验提供细胞基础。

材料和方法

## 1. 材料

### 1.1 实验动物：

选择健康的雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠，体重均为180~220 g，由ft西医科大学动物实验中心提供。

### 1.2 主要试剂及药品：

胰蛋白酶(Trypsin)美国Sigma公司

胶原蛋白酶Ⅱ型美国Sigma公司

特级胎牛血清(fetal calf serum, FCS)美国Hyclone公司

ft羊血清美国Sigma公司

Dulbecco's Modification of Eagle's Medium(DMEM)培养基

美国Gibco BRL公司5-溴脱氧尿嘧啶核苷(Bromodeoxyuridine, BrdU)美国Sigma公司

台盼蓝(Trypan blue)美国Sigma公司乙二胺四乙酸(Ethylene diamineteraacetic acid disodium, EDTA)

华美生物工程公司兔抗大鼠结蛋白（anti-desmin）多克隆抗体Santa Cruz公司

羊抗大鼠波形纤维蛋白(anti-vimentin)多克隆抗体 武汉博士德生物有限公司标记辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)的羊抗大鼠抗体免疫球蛋白链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(StreptAvidin-Biotin-Complex, SABC)

武汉博士德生物有限公司

G(Immunoglobulin G, IgG)武汉博士德生物有限公司

3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒

武汉博士德生物有限公司

青霉素钠（80万单位）和硫酸链霉素（100万单位）华北制药股份有限公司

### 1.3 主要试剂配制方法

D-Hanks液(g/L)的配制方法：KCl 0.40g, KH2PO4 0.06g, NaCl 8.00g, NaHCO3 0.35g，Na2HPO4·12H2O 0.08g, Phenol Red 0.02g，用三蒸水将各成份充分溶解，然后定容至1000 ml，用0.22um滤膜负压抽滤除菌后分瓶分装，4℃冰箱保存。

DMEM细胞培养液的配制方法：将一袋DMEM粉(13.6 g)加入三蒸水900 ml

中，加入2.5 g的NaHCO3搅拌均匀；将pH调至7.2-7.4，然后定容至1000 ml，用

0.22um滤膜负压抽滤除菌后分瓶，4℃冷藏；使用时加入10%~20%经55℃，30 min

灭活的胎牛血清。

0.25%胰蛋白酶消化液的配制方法：胰蛋白酶0.25g，EDTA0.02 g, D-Hanks

液100 ml，将pH调至7.2-7.4；用0.22um滤膜过滤除菌后分装于小瓶，置于－20

℃冰箱冻存备用。

0.02 M无钙镁磷酸缓冲盐溶液(PBS)配制方法：Na2HPO4 2.8 g, NaH2PO4 0.4 g, NaCl 8.5 g，加入三蒸水充分搅拌溶解，然后定容至1000 ml，用0.22um滤膜负压抽滤除菌，于4℃冷藏备用。

### 1.4 主要仪器与设备：

免疫荧光图像分析系统美国Media Cybernetics公司

2500E CO2细胞培养箱美国NuAire公司

Centrifuge5402高速低温离心机德国Eppendorf公司

DMBRI倒置相差荧光显微镜德国LEICA公司

DMX1200型显微镜数码摄像机系统日本NIKON公司

IX70型倒置相差显微镜日本Olympas公司

Olympas BX60光学显微镜日本Olympas公司

可调式微量移液器(200ul)美国GILSON公司

LD4-Ⅱ低速离心机北京医用离心机厂

SZK-202型超净工作台苏净集团安泰公司

WS2-261-79电热恒温水浴箱上海跃进医疗器械一厂

TGL-16B台式离心机上海跃进医疗器械厂

AND HR-120精密电子天平日本AND公司

85-1恒温磁力搅拌器江苏医用仪器厂

细胞培养孔板丹麦Nunclon公司

细胞培养瓶丹麦Nunclon公司

一次性滤器(22um)美国GILSON公司

## 2. 方法

### 2.1 大鼠真皮成纤维细胞的获取及原代培养：

将SD大鼠称重后用3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，取仰位固定手术台上，腹部剃毛后，用75%乙醇将手术部位局部消毒。

在无菌条件下于大鼠腹侧正中切取2.0 cm×2.0cm的全层皮肤，放入4℃含100 IU/L青霉素、100ug/L链霉素双抗的D-Hanks液中，漂洗3次至液体清亮为止。

将皮肤标本移入超净工作台，用无菌齿镊和眼科手术剪修除皮肤上附着的脂肪组织，用PBS液漂洗3次，表皮面向上置于Ⅱ型胶原酶(200 IU/ml)中，于4℃冰箱冷消化过夜。

用齿镊将消化后的皮肤标本组织表皮剥离，再将剩下的组织块剪成约1mm

×1 mm大小碎片，将碎组织块接种于25 cm2培养瓶，加5 ml含20%灭活FCS和100

IU/L青霉素、100ug/L链霉素的DMEM培养液，置于37℃、含有5%CO2饱和湿度的细胞培养箱中培养。每2~3 d更换培养液一次，弃去培养瓶内尚未贴壁的细胞，将贴壁的成纤维细胞继续培养。

当培养的成纤维细胞在瓶底达到80%～90%面积融合时，将单层长满细胞培养瓶底的细胞用0.25%胰蛋白酶消化分离5min，及时加入含10%FCS的等量

DMEM培养液终止消化，利用吸管反复轻柔吹打成单细胞悬液，把单细胞悬液转移至离心管中，设定1000r/min离心5min。弃上清后，加入成纤维细胞完全培养液至5 mL，用吸管反复轻柔吹打将细胞重悬，收集细胞计数调整至2.0×

106cells/ml后，分别接种到培养瓶中继续传代培养。

将培养至第2-3代的细胞用抗波形蛋白抗体免疫细胞化学染色及倒置显微镜观察，对培养的成纤维细胞进行鉴定。

### 2.2 成纤维细胞的鉴定

2.2.1细胞爬片的制作

用稀硫酸将盖玻片浸泡4～6小时，取出后洗净，并用无水乙醇进行脱水。用镊子自无水乙醇中将盖玻片取出，置于超净台内的滤纸上，用吹风机吹

干。

将盖玻片放入6孔培养板，每孔一片，用紫外灯照射2-3小时。

滴加一滴0.01mg/ml多聚赖氨酸溶液，使其刚好覆盖盖玻片，静置5分钟。用吸管吸掉多聚赖氨酸溶液，用灭菌蒸馏水漂洗×3次。

打开超净台的通风机，待其风干。

将经过计数的单细胞悬浮液移入培养板中，使盖玻片完全浸在培养液中。置于37℃，5%CO2培养箱中孵育3－5天，当细胞贴壁生长至覆盖培养板

底部2/3面积时取出。

用镊子将盖玻片取出，用PBS漂洗2次后，进行固定以及细胞免疫化学检测。

2.2.2成纤维细胞波形蛋白（Vimentin）和结蛋白（Desmin）的免疫荧光显微镜鉴定

用镊子将细胞爬片取出，用PBS漂洗2次。用冷丙酮固定10 min，然后用PBS洗3次。用吸管滴加封闭血清，置于37℃温育1小时。

用吸管滴加1: 50稀释的抗大鼠波形蛋白（Vimentin）和结蛋白（Desmin）一抗，置于37℃湿盒温育2小时，后置于4℃冰箱孵育过夜。

用PBS漂洗5min×3次，用吸管滴加1: 200 FITC标记的荧光二抗，置于

37℃温育2小时。

用PBS漂洗5min×3次，然后用缓冲甘油、火棉胶封片，然后迅速置于免疫荧光显微镜下检测。

以封闭血清代替一抗添加，作为阴性对照。

### 2.3 大鼠真皮成纤维细胞的免疫细胞化学染色鉴定波形蛋白Vimentin

经防脱片剂Poly-L-Lysine处理后的盖玻片，消毒后置于无菌培养皿中。用0.25%胰蛋白酶消化贴壁培养的真皮成纤维细胞，并制成单细胞悬液，以

2.0×106cells/ml的细胞密度接种于培养皿内的盖玻片上，置于37℃，5%CO2细胞培养箱内培养2 h。

倒置显微镜下观察见细胞充分附着贴壁后，在盖玻片其周围缓慢注入足量含20%FCS的DMEM培养液继续培养16~24 h。

用镊子将盖玻片取出，用PBS漂洗2次后，用4%甲醛在室温下固定30 min，蒸馏水漂洗3次，将盖玻片固定于载玻片上完成免疫细胞化学染色的标本制备。

用含有30%H2O2 1份＋纯甲醇50份的混合液将盖玻片室温下封闭内源性过

氧化物酶活性10 min，蒸馏水漂洗2 min×3次。

加入10%正常ft羊血清200ul予以封闭，室温下放置10 min，然后弃去多余的液体。

用吸管滴加波形蛋白单克隆抗体一抗200ul，然后置于湿盒中于4℃冰箱孵育过夜。取出后用PBS漂洗2 min×3次。用PBS取代一抗作为阴性对照。

用吸管滴加辣根过氧化物酶标记的二抗，羊抗大鼠抗体IgG，置于37℃，温育20min，然后用PBS液漂洗2 min×3次。

用吸管滴加试剂链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(Strept Avidin-Biotin-Complex, SABC)孵育20 min，然后用PBS漂洗5 min×3次。

之后按照3, 3'-二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒说明书进行DAB显色操作，取1 ml蒸馏水，分别加入试剂盒中A，B，C试剂各

1 滴，混匀后加至盖玻片上，于室温下暗室中进行显色反应，镜下观察显色程度，反应时间一般在5~30 min之间，显色满意后用蒸馏水漂洗。

用吸管滴加200ul新鲜配制的DAB液终止反应，蒸馏水漂洗，用苏木素复染、脱水及透明中性树胶封片，免疫荧光显微镜观察、拍照，胞浆内呈棕褐色者为阳性细胞。

结果

## 1、 原代培养大鼠真皮成纤维细胞的形态和Th长情况

培养第3天首次换液后，倒置相差显微镜下观察可见部分原代大鼠真皮成纤维细胞贴壁并散布于培养瓶底，细胞呈单层生长，细胞形态呈梭形、扇形、多角形及不规则形态，细胞体积大小不一，胞核呈圆形或椭圆形，位于细胞中央或偏一侧，相邻细胞间连接紧密，相互衔接成片，见图2-1。

培养至第5天时，成纤维细胞出现集落样迅速生长，呈放射状、螺旋状、瀑布状、编织状排列，见图2-2。

培养第7天时细胞基本铺满瓶底，汇合处细胞之间空隙变小，排列密集，细胞排列无方向性，细胞呈集落生长，且集落中心区细胞界限不清，部分胞体交叉重叠，见图2-3。



图 2-1 培养3天的大鼠真皮成纤维细胞×200



图 2-2 培养5天的大鼠真皮成纤维细胞×200



图2-3 培养7天的大鼠真皮成纤维细胞×200

## 2、 成纤维细胞的鉴定

采用羊抗大鼠波形蛋白（anti-vimentin）多克隆抗体对体外培养的大鼠真皮成纤维细胞进行免疫荧光染色，结果显示，荧光显微镜下体外培养的细胞波形蛋白表达阳性，呈位于胞浆中的绿色荧光物质，蓝色为细胞核，见图2-4。

采用兔抗大鼠结蛋白（anti-desmin）多克隆抗体对培养细胞进行免疫荧光染色，胞浆及胞膜均未见荧光阳性物质。波形蛋白和结蛋白是中间丝蛋白的一种，波形蛋白在成纤维细胞和成肌细胞中均有表达，而结蛋白只表达于成肌细胞，所以当波形蛋白和结蛋白免疫荧光均为阳性时，就可以证明该细胞为成肌细胞；当波形蛋白免疫荧光阳性，而结蛋白免疫荧光阴性时，则可证明该细胞为成纤维细胞。皮肤真皮层内的主要细胞成分为成纤维细胞，而且不含有成肌细胞。因此，经过免疫荧光检测能够证明本实验所培养的细胞是单一纯净的成纤维细胞，不含成肌细胞。



图2-4 原代培养的成纤维细胞波形蛋白免疫荧光阳性×400

## 3、 免疫细胞化学染色鉴定结果

传代后的大鼠真皮成纤维细胞用抗波形蛋白(anti-vimentin)多克隆抗体进行免疫细胞化学染色鉴定，光镜下见细胞呈梭形或多角形，细胞质中含有较多棕褐色阳性颗粒，均为成纤维细胞的染色特征，蓝色为细胞核，见图2-5。实验采用已传2~4代的真皮成纤维细胞，纯度可达到95%以上。



图2-5 原代培养的成纤维细胞波形蛋白免疫细胞化学染色阳性×400

讨论

失神经支配骨骼肌萎缩是多种神经系统病变终末期都会出现的严重不良后果。究其原因，实质上就是骨骼肌自身在失去神经支配后发生了萎缩和纤维化等骨骼肌重构的病理性改变，这种病理性重构进展非常迅速，最终导致具有收缩功能的骨骼肌细胞萎缩、凋亡，绝对数量减少。然而，在骨骼肌细胞萎缩的同时，细胞外间质重塑也在迅速发展，没有收缩功能的间质细胞会大量增生，并且产生大量的胶原纤维，增生的间质细胞会在一定程度上取代原有正常骨骼肌细胞所占有的位置空间[1, 2, 3]。在这些增生的间质细胞中，以成纤维细胞大量增生为主。发生这种形态学改变的原因，主要是由于骨骼肌细胞的自我增殖修复能力较差，在受到损伤后通常无法自行修复，而成纤维细胞的适应能力以及增殖能力都很强，在损伤状态下常会大量增生以促进修复，结果就会导致骨骼肌细胞不断萎缩、消失，并逐步被纤维组织所取代。正常的骨骼肌在失去神经支配后，发生骨骼肌萎缩和纤维化改变等骨骼肌重构的病理过程进展非常迅速。

通常在失去神经支配后的3个月左右，骨骼肌就已经发生了显著的纤维化改变

[4, 5,6]. 与此同时，随着肌细胞萎缩和纤维化病程的不断进展，为骨骼肌组织供血

的毛细血管床也会发生重塑，主要表现为毛细血管的数量出现进行性减少，这种改变将进一步加快骨骼肌细胞萎缩和纤维化病变的病程进展，最终形成恶性循环导致骨骼肌功能完全丧失，并出现瘢痕挛缩畸形[7,8,9,10]。在病程发展的后期，成纤维细胞所大量分泌的胶原纤维会形成一道屏障，这就会将神经轴突与骨骼肌纤维分割开来，导致再生的神经纤维无法形成有效的神经-骨骼肌接头，其结果就使得失去神经支配的骨骼肌细胞重新获得再生神经支配的能力丧失[11, 12]。对于失神经支配骨骼肌萎缩这种疾病，目前尚无有效的预防和治疗的办法，无法彻底阻断骨骼肌萎缩的病程进展，无法阻止骨骼肌萎缩的疾病终末状态出现。因此，迫切需要探寻能够修复与重建萎缩骨骼肌的方法。

多年来，失神经支配骨骼肌萎缩一直是骨科学领域中的一个亟需破解的理论难题，学者们在这方面已经进行了很多研究。目前，细胞移植是一种很有潜力的治疗方法，利用细胞移植的方法来对失神经支配骨骼肌萎缩进行治疗是目前研究的热点之一。现有的一些实验研究结果显示，细胞移植在一定程度上具有治疗失神经支配骨骼肌萎缩的作用[13, 14]。进行细胞移植治疗首先要求准备大量的可移植细胞作为“种子细胞”。胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、骨骼肌成肌细胞是现在研究较多的种子细胞，然而，对于胚胎干细胞，由于存在伦理学争议，来源稀少、获得困难，分离纯化的技术难度较大、异体移植时存在免疫排斥反应，以及具有潜在的致瘤性等诸多问题，因此距离临床实际应用还很遥远。对于骨髓间充质干细胞，因其具有多方向分化能力，故定向分化为骨骼肌的效率较低，此外，骨髓间充质干细胞同样存在潜在的致瘤性的安全问题，因此目前尚需进一步研究其临床实际应用的方法。对于骨骼肌卫星细胞，由于来源有限，数量稀少等问题同样限制了进一步的临床实际应用。由于选用患者自身的体细胞通常不会受到伦理道德的限制，而且自体细胞还能够避免机体发生免疫排斥反应，因此选用患者自身的体细胞作为种子细胞是一种较好的途径。

如果能够利用取材方便且易于进行体外培养的各种组织器官的成体细胞，尤其是来源于结缔组织内部所包涵的间充质干细胞作为种子细胞，则会具有重要的临床应用价值。因此，寻找临床应用价值较大的自体来源的可移植细胞作为种子细胞，是利用细胞移植方法进行骨骼肌重建的一个关键性问题。

基因治疗时如何选取靶细胞是一个决定治疗成败的关键问题。靶细胞的选择取决于的特定的解剖部位中靶细胞的质量，以及取材操作的难易程度[15]。对于局部失神经支配骨骼肌萎缩的基因治疗来说，体外基因转移途径为靶细胞的选择提供很大的选择空间。选择何种细胞作为外源性目的基因的靶细胞取决于这种细胞是否容易获得，并且易于进行体外培养扩增，是否具有表达外源性目的基因的能力等因素。结缔组织中所包含的间充质干细胞是完成组织器官损伤修复病理过程必不可少的细胞，其中，成纤维细胞(fibroblast, FB)是结缔组织中最为增生最为活跃的细胞种类，也是参与机体创伤修复过程的最重要的细胞，在机体的组织损伤修复中发挥着重要作用。结缔组织中最常见的细胞类型就是成纤维细胞，在不同类型的结缔组织中，成纤维细胞的含量也不相同。一般情况下，在相同体积的组织中，致密结缔组织所包含的成纤维细胞的密度会比疏松结缔组织多。哺乳动物机体内最大的器官是覆盖于机体表面的皮肤，它由表皮、真皮和皮下组织三层组织构成，其中真皮层所包含的主要细胞成分就是成纤维细胞，又称为真皮成纤维细胞(dermal fibroblast)。真皮成纤维细胞是基础研究中常用的一种细胞，被广泛应用于分子生物学研究的许多领域，也是一种在基因治疗研究中常用的工具细胞[16, 17]。真皮成纤维细胞属于中胚层来源的间充质细胞，在哺乳动物体内分布范围最为广泛，其所在位置表浅、处于机体的外表面便于取材，且在体外培养时增殖能力很强，易于成活[18, 19]。随着细胞培养技术的不断提高，目前对于真皮成纤维细胞的分离及培养技术已经比较成熟，对于其在体外生长增殖的规律也已经有了较为全面的掌握，因此，真皮成纤维细胞在基础医学研究和临床医学研究中已经有了较为广泛的应用[20]。真皮成纤维细胞在体外培养时的适应能力与增殖能力都非常强，生命力旺盛，在经历多次传

代后仍能保持旺盛的增殖能力。真皮成纤维细胞不仅对于基因转移具有良好的适应性，而且也能很好地适应外源性目的基因的转录表达，并能够在不同的诱导因素下转变成为组织工程所需的的多种种子细胞，因此，可以作为基因治疗时理想的靶细胞[21,22,23,24]。

成纤维细胞是由胚胎时期的干细胞分化而来间充质细胞，是结缔组织中最常见的一种细胞类型。成纤维细胞的形态并不固定不变，可以随着细胞的功能状态改变以及所处的环境不同而发生相应的变化，常见的形态包括梭形、大多角形和扁平星形等形态。在显微镜下观察可见，成纤维细胞的胞体通常比较大，细胞质染色特征为弱嗜碱性，细胞核多呈椭圆形，体积较大，核内的染色质分布疏松，着色较浅，核仁较为明显。在电镜下观察可见，成纤维细胞的胞浆中含有大量的粗面内质网、核糖体以及发达的高尔基复合体，这些细胞器表明成纤维细胞具有强大的合成和分泌细胞外基质等蛋白质产物的功能。波形蛋白是中间丝的一种，是构成细胞的骨架主要成分之一，其分子量约为57KD，成纤维细胞内包含大量的波形蛋白。与成纤维细胞内含有的波形蛋白相同，在成肌细胞的胞浆内包含大量的结蛋白，在上皮细胞的胞浆内包含大量的角蛋白，这种差别就是不同种类细胞分类鉴定的相对特异性的标志，并且可以用于体外培养细胞的鉴定。在做病理学检测时，通常利用抗波形蛋白抗体对成纤维细胞进行鉴定。一般情况下，在相同体积的组织中，致密结缔组织所包含的成纤维细胞的密度会比疏松结缔组织高，也就是说，致密结缔组织中的成纤维细胞数量多，因此体外原代培养成纤维细胞多以皮肤等致密结缔组织作为取材部位。在本次体外细胞培养过程中，可以见到，真皮成纤维细胞细胞呈梭形和多边形等形态；体积较大，胞浆染色呈弱嗜碱性，细胞核体积较大，呈椭圆形，染色质分布疏松，着色较浅，核仁较为明显。通过免疫荧光及免疫细胞化学染色的鉴定方法，可以进一步证实本实验获得的细胞是高纯度的真皮成纤维细胞。

综上所述，本部分实验探讨了大鼠真皮成纤维细胞的体外分离及原代培养方法，结果显示本实验所培养的真皮成纤维细胞较为纯净，而且可以在体外培

养的情况下旺盛生长并进行传代培养。这就为下一步实验所进行的Myod1和

Myog真核共表达载体转染大鼠成纤维细胞的实验研究提供了靶细胞。

结论

1、本实验成功进行了大鼠真皮成纤维细胞的体外分离及原代培养。

参考文献：

[1] Diers A, Kaczinski M, Grohmann K, et al. The ultrastructure of peripheral nerve, motor end-plate and skeletal muscle in patients suffering from spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). Acta Neuropathol. 2005 Sep; 110(3): 289-97.

[2] Simon CM, Jablonka S, Ruiz R, et al. Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet. 2010 Mar 15; 19(6): 973-86.

[3] Aird RB, Naffziger HC. The pathology of human striated muscle following denervation. J Neurosurg. 1953 May; 10(3): 216-27.

[4] Degens H, Koşar SN, Hopman MT, et al. The time course of denervation-induced changes is similar in soleus muscles of adult and old rats. Appl Physiol Nutr Metab. 2008 Apr; 33(2): 299-308.

[5] Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, et al. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. PLoS One. 2012; 7(1): e29082. Epub 2012 Jan 3.

[6] Riley DA, Bain JL, Romatowski JG, et al. Skeletal muscle fiber atrophy: altered thin filament density changes slow fiber force and shortening velocity. Am J Physiol Cell Physiol. 2005 Feb; 288(2): C360-5.

[7] Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of the vascular bed and

Progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. Anat Rec.2000 Mar 1; 258(3): 292-304.

[8] Cebasek V, KubínováL, Janácek J, et al. Adaptation of muscle fibre types and capillary network to acute denervation and shortlasting reinnervation. Cell Tissue Res. 2007 Nov; 330(2): 279-89. Epub 2007 Sep 6.

[9] Fujino H, Kohzuki H, Takeda I, et al. Regression of capillary network in atrophied soleus muscle induced by hindlimb unweighting. J Appl Physiol. 2005 Apr; 98(4): 1407-13.

[10] Kano Y, Shimegi S, Furukawa H, et al. Effects of aging on capillary number and luminal size in rat soleus and plantaris muscles. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002 Dec; 57(12): B422-7.

[11] Cebasek V, KubínováL, Janácek J, et al. Adaptation of muscle fibre types and capillary network to acute denervation and shortlasting reinnervation. Cell Tissue Res. 2007 Nov; 330(2): 279-89.

[12] Okiura T, Nagatomo F, Gu N, et al. Bone density of the femur and fibercross-sectional area and oxidative enzyme activity of the tibialis anterior muscle in type II collagen-induced arthritic mice. J Physiol Sci. 2008 Aug; 58(4): 221-7.

[13] Musgrave DS, Bosch P, Lee JY, et al. Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. Clin Orthop Relat Res. 2000 Sep; (378): 290-305.

[14] Jane JA Jr, Dunford BA, Kron A, et al. Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenetic protein (BMP) -4 and BMP-6 gene transfer. Mol Ther. 2002 Oct; 6(4): 464-70.

[15] Zhang Y, Chee A, Thonar EJ, et al. Intervertebral disk repair by protein, gene, or cell injection: a framework for rehabilitation-focused biologics in the spine. PM R. 2011 Jun; 3(6 Suppl 1): S88-94.

[16] Ishihara A, Zekas LJ, Weisbrode SE, et al. Comparative efficacy of Dermal

Fibroblast-mediated and direct adenoviral bone morphogenetic protein-2 gene therapy for bone regeneration in an equine rib model. Gene Ther. 2010 Jun;17(6):733-44.

[17] Tanaka M, Kogawa K, Nakamura K, et al. Anti-metastatic gene therapy utilizing subcutaneous inoculation of EC-SOD gene transduced autologous Fibroblast suppressed lung metastasis of Meth-A cells and 3LL cells in mice. Gene Ther. 2001 Jan; 8(2): 149-56.

[18] Yogalingam G, Crawley A, Hopwood JJ, et al. Evaluation of Fibroblast-mediated gene therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. Biochim Biophys Acta. 1999 Feb 24; 1453(2): 284-96.

[19] Luo Y, Fan Y, Zhou B, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from skin Fibroblasts of a patient with olivopontocerebellar atrophy. Tohoku J Exp Med. 2012; 226(2): 151-9.

[20] Tian C, Ambroz RJ, Sun L, et al. Direct conversion of Dermal Fibroblasts into neural progenitor cells by a novel cocktail of defined factors. Curr Mol Med. 2012 Feb; 12(2): 126-37.

[21] Yan WF, Murrell DF. Fibroblast-based cell therapy strategy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Dermatol Clin. 2010 Apr; 28(2): 367-70

[22] Kern JS, Loeckermann S, Fritsch A, et al. Mechanisms of Fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysis bullosa: high stability of collagen VII favors long-term skin integrity. Mol Ther. 2009 Sep; 17(9): 1605-15.

[23] Cao X, Li Q, Ju DW, et al. Enhanced antitumor effects of bone marrow transplantation in combination with Fibroblast-mediated IL-2 and IL-3 gene therapy. Transplantation. 1999 May 15; 67(9): 1242-50.

[24] Yogalingam G, Crawley A, Hopwood JJ, et al. Evaluation of Fibroblast-mediated gene therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. Biochim Biophys Acta. 1999 Feb 24; 1453(2): 284-96.

# **第三部分** **Myod1**和**Myog**真核共表达载体转染大鼠真皮成

**纤维细胞的实验研究**

前 言

多年来，失神经支配骨骼肌萎缩一直是骨科学领域中的一个亟需破解的理论难题，学者们在这方面已经进行了很多研究，但是仍无突破性进展。对于失神经支配骨骼肌萎缩这种疾病，目前尚无有效的预防和治疗的办法，临床常用的治疗方法包括：被动运动法、电刺激法、脉冲式磁疗法、股神经寄养法、药物治疗等几种手段，虽然都有一定的疗效，但总体而言疗效不佳[1,2,3,4,5]。上述治疗方法仅能在一定程度上延缓失神经支配骨骼肌萎缩的进程，但最终都无法彻底阻断骨骼肌萎缩的病程进展，无法阻止骨骼肌萎缩的疾病终末状态出现。利用细胞移植对失神经支配骨骼肌萎缩进行治疗是目前研究的热点之一[6,7]。寻找切实可行的自体来源的可移植细胞作为种子细胞，是利用细胞移植方法进行骨骼肌重建的一个关键性问题。随着分子生物学技术的飞速发展，特别是细胞移植和基因工程等生物工程技术的联合应用，能够用于骨骼肌移植的自体细胞的来源途径获得了极大的扩充。运用转录因子进行基因治疗是极具应用前景的治疗方法，也是目前研究的热点。生肌调节因子家族是在胚胎发育时期调控骨骼肌发育过程的主导基因，对于骨骼肌细胞的发生、分化和成熟起着决定性作用[8, 9]。Myod1与Myf5基因主要在骨骼肌发育早期的肌前体细胞向成肌细胞分化的过程中发挥作用，而Myog与

MRF4基因主要在骨骼肌发育晚期的成肌细胞向终末骨骼肌纤维细胞分化的过程中发挥作用。目前，国内外学者对失神经支配骨骼肌萎缩的基因治疗虽然已经开展了一些研究，但是大多数局限于应用单基因进行治疗，而且疗效不佳，尝试联合应用两个基因进行治疗的研究尚未见报道。由于转录因子之间存在相互协同与促进的作用，因此探索双基因联合应用促进细胞增殖和成肌分化是一项很有价值研究，能够为失神经支配骨骼肌萎缩的防治寻找新的思路，并提供实验依据。对

于将非肌细胞诱导为肌细胞的研究，联合应用两个最重要的生肌细胞调节因子

Myod1和Myog进行基因治疗，有可能获得更好的治疗效果。诱导成纤维细胞向具有收缩功能的肌细胞转化进而产生种子细胞，可以用于骨骼肌重建的细胞移植治疗，并有望成为骨骼肌重建的一条新的途径。真皮成纤维细胞具有取材简便、自体来源丰富以及体外增殖能力旺盛等优点[10, 11]，因此是用于细胞移植的较好的种子细胞来源之一。本研究将以上述理论为依据，把组织工程技术与基因治疗技术相结合，以第一部分实验中所构建的Myod1和Myog真核共表达载体为工具，通过

Lipofectamine2000转染试剂的介导，转染原代培养的大鼠真皮成纤维细胞。这样，一方面可以进一步检验所构建的真核共表达载体是否能够正确表达；另一方面可以验证Myod1和Myog基因的转染能否使原代培养的真皮成纤维细胞转化成为成肌细胞，这些实验将为探索细胞移植治疗失神经支配骨骼肌萎缩的新方法提供实验依据和思路。

材料和方法

## 1、 原代培养的真皮成纤维细胞

来源于实验二中所分离培养的原代成纤维细胞，细胞密度大致为2～5×

105/ml。

## 2、 试剂

胎牛血清、小牛血清美国Gibco-BRL公司

DMEM（高糖）细胞培养液美国Gibco-BRL公司

胶原酶ⅠA、胰蛋白酶美国Sigma公司

QIAGEN－Tip 500 Endofree质粒纯化试剂盒德国QIAGEN公司

Lipofectamine2000脂质体转染试剂盒Invitrogen corporation公司

Geneticin（G418）阳性细胞克隆筛选试剂美国Gibco-BRL公司小鼠抗大鼠Myod1单克隆抗体美国Santa Cruz公司

小鼠抗大鼠Myog单克隆抗体美国Santa Cruz公司

兔抗大鼠结蛋白（anti-desmin）多克隆抗体美国Santa Cruz公司羊抗鼠IgG二抗、羊抗兔IgG荧光二抗上海华美生物工程公司

## 3、 主要仪器

Hera Cell二氧化碳细胞培养箱德国Heraeus公司

Heraeus高温干燥消毒箱德国Heraeus公司

IMT-2型倒置显微镜日本Olympus公司

超净工作台上海净化设备厂

冷冻高速离心机美国Bio-Rad公司

凝胶成像扫描仪Pharmacia公司

荧光显微镜日本Olympus公司

核酸电泳系统、蛋白电泳系统美国Bio-Rad公司

## 4、 实验方法

24.1转染用低内毒素质粒的纯化（参照试剂盒说明书进行操作）取－80℃冻存的菌种进行划平板，用Amp进行筛选。

挑取单克隆菌种至初始培养基2～5ml LB液中，内含50ug/ul氨苄青霉素，置于37℃、250rpm培养箱中摇菌培养8～12小时。

稀释初始培养基至1/100，从初始培养基中吸取1ml加入100mlLB培养液中，置于37℃、250rpm培养箱摇菌培养8～12小时。

利用Beckman JA-10转子，于4℃，6000rpm进行离心分离，离心15分钟，弃去上清，收集细菌。

将细菌重悬于10ml Buffer P1溶液中，用涡轮振荡器进行震荡，充分混合均匀。

用吸管加入10ml Buffer P2溶液，轻柔混合均匀，上下颠倒混合4～6次，室温放置5分钟。在此期间，将QIAfilter的出口盖子旋紧，放置于试管中。

用吸管加入预冷的10ml Buffer P3，上下颠倒混合4～6次。

用吸管将裂解液立即加入至QIAfilter Cartridge中混合均匀，室温反应10 分

钟。

将出口盖子移除，插入塞柱，将过滤裂解液收集至50ml Endofree管中。用吸管滴加2.5ml ER至滤过的裂解液中，上下颠倒混合均匀10次，置于冰

上反应30分钟。

用10ml平衡QIAGEN-tip500柱，用吸管将裂解液加入至QIAGEN-tip500

柱中，待其自然流出。

用吸管滴加2×30ml Buffer QC漂洗QIAGEN-tip500柱。用吸管加入15 ml Buffer QN洗出DNA。

用吸管吸取10.5ml室温的异丙醇加入至洗出的DNA，混合均匀，立即置于

4℃，15000rpm的离心机中离心30分钟，弃去上清液。用吸管加入5ml 70%的乙醇漂洗DNA。

置于4℃，15000rpm的离心机中离心10分钟。

在空气自然干燥5～10分钟，重新溶解DNA至TE中保存备用。

24.2 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核表达载体的瞬时转染实验在转染实验的前一天，培养皿中的细胞汇合率约为80%，密度接近2～8×

105/ml。

置于37℃，含5%CO2培养箱中正常孵育细胞过夜。

在转染操作当天，吸取150ul不含血清及抗生素细胞培养液对溶于TE的5ug

质粒DNA进行稀释。

用吸管加入15ul Lipofectamine 2000脂质体转染试剂到DNA溶液中，吹打混合均匀。

将DNA复合物置于常温下孵育5～10分钟。

弃去细胞培养皿中的培养液，并用PBS 4ml将待转染细胞漂洗3次。

加1ml培养液至DNA复合物，吹打2次混合均匀后立即全部转入培养皿中。置于37℃，含5%CO2的培养箱中孵育细胞2～3小时。

用吸管吸去包含转染复合物的培养液，并用4 ml PBS漂洗细胞4次。

用吸管加入新鲜的完全培养基继续进行培养。

24.3 Western Blot检测瞬时转染的Myod1、Myog及结蛋白的蛋白表达

24.3.1裂解细胞

用吸管弃去细胞培养液，并加入1ml PBS漂洗细胞2次。

用细胞刮棒将细胞收集于微量离心管，2500 rpm离心5min，用滤纸吸尽上清。

新鲜配制裂解液，成分为2%SDS, 50 mmol/L Tris·HCl，pH 6.8, 10%

glycerine。用吸管吸取200ul裂解液加入细胞中，混合混匀，置于4℃冰箱反应30～60 min。

用超声将染色体DNA打断，约5～6秒。置于100℃沸水中加热变性10分钟。

置于4℃，12000 rpm离心机中离心10分钟。收集上清液，于－20℃冰箱中冻存。

用改良Lowry法测定上清液中蛋白浓度。

24.3.2实验材料准备将玻璃板安装好。

计算分离胶的凝胶浓度和体积，并配制10％分离胶。

小心地将分离胶注入准备好的玻璃板间隙中，防止产生气泡。用吸管轻轻加入三蒸水进行覆盖并压实。

置于37℃环境，静置10～15 min，待分离胶凝固后，倒掉覆盖在上面的水，并用滤纸吸干净。

计算分离胶的凝胶浓度和体积，配制5％的浓缩胶。

用吸管将浓缩胶注入到分离胶的上层，插入梳子，去除气泡，等待凝胶凝固。

将样品与加样缓冲液混合均匀，使终浓度达到1×SDS。

待浓缩胶凝固后，拔掉梳子，将凝胶放入电泳槽中，上下槽均加入1×Tris-

甘氨酸电泳缓冲液。

用吸管将细胞裂解液进行上样。

接通电流开始电泳，浓缩胶用8 V/cm电压电泳，分离胶用12 V/cm电压电泳。

24.3.3考马斯亮蓝染色

轻轻取下凝胶，剪下一部分浸泡在考马斯亮蓝染色液中，摇动3～4 h。用不含染料的乙醇冰乙酸液浸泡进行脱色，摇动4～8 h，其间换液3～4次。

24.3.4蛋白质电转移

将PVDF膜与6块3 MM滤纸一起浸泡在转移缓冲液进行湿化。将凝胶置于转移缓冲液中漂洗5～10 min。

依次将3块3 MM滤纸，PVDF膜，凝胶，另3块3 MM滤纸摆放整齐后置于电极板之间，并夹紧，注意不能夹杂气泡。

将电极板放入电转移槽内，凝胶靠阴极，加入转移缓冲液，置于4℃，100 V

电压电转移1 h。

24.3.5丽春红染色

将转移膜浸泡在丽春红染色液中快速染色，约1 min，蒸馏水漂洗，脱色，观察电转移效果。

24.3.6封闭

将电转移后的PVDF膜用TBS摇动漂洗3次。

用吸管加封闭液(TBS，0.05℅Tween-20，5℅脱脂奶粉)进行封闭，置于37

℃环境封闭20 min。

24.3.7一抗

用TBS将PVDF膜摇动清洗3次。

用吸管加入用稀释的Myod1或Myog或结蛋白的一抗，置于37℃转炉中反应2 h。

24.3.8二抗

用TBS将PVDF膜摇动清洗3次。

用吸管加入用稀释的二抗，置于37℃转炉中反应2 h。

24.3.9发光

用TBS将PVDF膜摇动清洗3次。

按照试剂盒说明书，用吸管将等量的混合（A液和B夜）后的ECL液加在

PVDF膜上，室温反应2～3 min，弃去多余的ECL液，把PVDF膜放置于暗室中显影。

### 4.4 细胞爬片的制作

将盖玻片经稀硫酸浸泡4～6小时，用三蒸水洗净，用无水乙醇进行脱水。用盖片镊将盖玻片取出后，置于超净台内的滤纸上，用吹风机吹干。

将盖玻片轻轻放入6孔培养板，在距离紫外灯直射范围内20-30厘米处照射

2-3小时。

用吸管滴加一滴0.01mg/ml多聚赖氨酸溶液，使其刚好覆盖盖玻片，静置 5

分钟。

用吸管弃去多聚赖氨酸溶液，三蒸水漂洗3次，待其风干。

用吸管将经过计数的细胞悬浮液移入培养板中，使盖玻片完全浸在培养液中。置于37℃，5%CO2培养箱中孵育24—72小时，当贴壁细胞生长至覆盖培养板底部2/3面积时进行实验。

用盖片镊将盖玻片取出，用PBS漂洗后进行后续实验。

### 4.5 免疫荧光显微镜检测转化细胞Myod1的表达

用盖片镊将将待染色细胞爬片取出，用PBS漂洗2次。用冷丙酮固定细胞爬片10 min，用PBS漂洗3次。

用吸管滴加封闭血清，置于37℃封闭1小时。

用吸管滴加1: 50稀释的抗大鼠Myod1一抗试剂，置于37℃湿盒温育2小时后，置于4℃冰箱过夜。

用PBS漂洗3次。用吸管滴加1: 200 Cy3标记的荧光二抗试剂，置于37

℃湿盒温育2小时。

用PBS漂洗3次后，用缓冲甘油、火棉胶封片，迅速置于免疫荧光显微镜下检测。

用封闭血清代替一抗试剂作为阴性对照。

### 4.6 免疫荧光显微镜检测转化细胞Myog的表达

用盖片镊将将待染色细胞爬片取出，用PBS漂洗2次。用冷丙酮固定细胞爬片10 min，用PBS漂洗3次。

用吸管滴加封闭血清，置于37℃封闭1小时。

用吸管滴加1: 50稀释的抗大鼠Myog一抗试剂，置于37℃湿盒温育2小时后，置于4℃冰箱过夜。

用PBS漂洗3次。用吸管滴加1: 200 Cy3标记的荧光二抗试剂，置于37

℃湿盒温育2小时。

用PBS漂洗3次后，用缓冲甘油、火棉胶封片，迅速置于免疫荧光显微镜下检测。

用封闭血清代替一抗试剂作为阴性对照。

### 4.7 免疫荧光显微镜检测转化细胞结蛋白的表达

用盖片镊将将待染色细胞爬片取出，用PBS漂洗2次。用冷丙酮固定细胞爬片10 min，用PBS漂洗3次。

用吸管滴加封闭血清，置于37℃封闭1小时。

用吸管滴加1: 50稀释的抗大鼠结蛋白（anti-desmin）一抗试剂，置于37

℃湿盒温育2小时后，置于4℃冰箱过夜。

用PBS漂洗3次。用吸管滴加1: 200 Cy3标记的荧光二抗试剂，置于37

℃湿盒温育2小时。

用PBS漂洗3次后，用缓冲甘油、火棉胶封片，迅速置于免疫荧光显微镜下检测。

用封闭血清代替一抗试剂作为阴性对照。

结果

## 1、 Western Blot检测pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体转染后Myod1、Myog及结蛋白的蛋白表达情况

在Lipofectamine2000脂质体转染试剂的介导下，我们将pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体和pVAX1空质粒载体分别转染到了原代培养的大鼠真皮成纤维细胞内，在转染后48小时，分别取培养的细胞进行Western Blot检测Myod1、Myog及结蛋白的蛋白表达情况，结果显示，在对照组pVAX1空质粒载体转染组的细胞内未检测到Myod1蛋白、Myog蛋白及结蛋白的表达。而在实验组pVAX1-Myod1- IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体转染组的细胞内，分别检测到了Myod1蛋白、Myog蛋白及结蛋白这三种蛋白的表达，见图3-1~图3-3。这说明pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体能够顺利转染到大鼠真皮成纤维细胞内，并且能够有效地表达目的Myod1蛋白和Myog蛋白，进而成功诱导成纤维细胞转分化成为能够表达结蛋白的成肌细胞。

Myod1蛋白

图3-1 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体转染后Myod1蛋白的表达

Myog蛋白



图3-2 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体转染后Myog蛋白的表达

Desmin蛋白



图3-3 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体转染后结蛋白的表达

## 2、 免疫荧光显微镜检测pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体转染后Myod1、Myog及结蛋白的蛋白表达情况

在Lipofectamine2000转染试剂的介导下，我们将pVAX1-Myod1-IRES2- Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体和pVAX1空质粒载体转染到了原代培养的大鼠真皮成纤维细胞内，转染效率可达90%以上。在转染后48小时，分别取培养细胞进行免疫荧光检测Myod1、Myog及结蛋白的蛋白表达情况。结果显示，在对照组pVAX1空质粒载体转染组的细胞内未检测出Myod1蛋白、Myog蛋白及结蛋白的表达。而在实验组pVAX1-Myod1-IRES2-Myog- IRES2-EGFP真核共表达载体转染组的细胞内检测到了Myod1蛋白、Myog蛋白及结蛋白的表达，见图3-4~3-6，图中红色部分即为胞浆中的阳性成分，蓝色为细胞核。这说明pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体能够顺利转染到大鼠真皮成纤维细胞内，并且能够有效表达目的蛋白Myod1蛋白、Myog蛋白，进而成功诱导成纤维细胞转分化成为能够表达结蛋白的成肌细胞。



图3-4 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体转染后Myod1蛋白的表达

×400



图3-5 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核表达载体转染后Myog蛋白的表达×

400



图3-6 pVAX1-Myod1-IRES2-Myog-IRES2-EGFP真核共表达载体转染后结蛋白的表达×400

讨论

目前，骨科学领域中有许多重要的理论难题，其中失神经支配骨骼肌萎缩

就是亟待解决的问题之一。多种神经系统病变在终末期都会进展成为失神经支配骨骼肌萎缩，表现为受损骨骼肌的收缩舒张运动彻底消失，所支配肢体的运动功能完全丧失，并出现骨骼肌挛缩畸形。失神经支配骨骼肌萎缩虽然严重，但是对于该病的防治，临床上却至今仍然没有行之有效的办法。因此，通过加强基础理论方面的研究，以揭示失神经支配骨骼肌萎缩纤维化的本质，并进一步探寻有效的逆转骨骼肌萎缩、促进骨骼肌功能恢复的方法，具有重大理论和实践意义。

理论上讲，利用细胞移植的方法来治疗并逆转失神经支配骨骼肌萎缩具有一定的可行性，而且应用前景广阔，是目前研究的热点之一。进行细胞移植治疗的前提条件是要求有大量的可移植细胞作为种子细胞的原料。近年来的研究结果显示，成体干细胞在特定条件下能够表现出一定的可塑性，并且具有受诱导后出现定向分化的能力。这个结果就提示，成体干细胞在一定的条件下可以作为生产种子细胞的原材料，这就能够为解决细胞移植治疗时可移植细胞的来源提供了一条有利的途径。对于成体干细胞的可塑性和分化能力进行深入研究具有极大的实用价值和广阔的应用前景。

基因治疗是目前医学领域中的研究热点之一，运用转录因子进行基因治疗是目前常用的研究方法。运用转录因子对于调控成体干细胞的可塑性和定向分化具有一定的作用。生肌调节因子家族对骨骼肌的发生、分化和成熟起决定性作用，而且对于诱导成体干细胞向成肌细胞定向分化具有一定的作用。真皮成纤维细胞是一种应用广泛的种子细胞，在许多领域的分子生物学研究中都发挥了重要的作用。真皮成纤维细胞不仅生命力旺盛，而且对于外源性基因转入具有良好的适应能力。当外源性基因转入后，真皮成纤维细胞会表现出成体干细胞所具有的良好的可塑性和定向分化能力，在诱导因素的作用下转变为特定的种子细胞，成为组织工程所需的重要的细胞工具。因此，真皮成纤维细胞作为成体干细胞可以作为基因治疗所需的理想的种子细胞。利用生肌调节因子的真核表达载体转染真皮成纤维细胞，以诱导其分化产生出的成肌细胞作为种子细

胞进行细胞移植治疗，或作为组织工程的种子细胞构建人工骨骼肌，是治疗失神经支配骨骼肌萎缩的一个新的思路，具有重要的研究价值和开发潜力。

当中枢神经系统或周围神经出现严重病变时，最终会使得其所支配的骨骼肌靶器官完全丧失神经支配，结果导致骨骼肌不仅丧失了主动收缩与舒张的功能，而且也失去了神经对骨骼肌的营养支持作用，最终则会引起靶器官骨骼肌发生萎缩纤维化等重构现象，甚至还会出现瘢痕挛缩、肢体畸形等严重的肢体残疾。当周围神经受到损伤发生离断后，需要神经纤维依靠自身的再生能力从近端爬行替代至远端来完成修复，但是神经纤维的这种再生爬行速度非常缓慢。如果周围神经损伤之处距离所支配靶器官骨骼肌终点的距离很长，那么就会使得靶器官骨骼肌长时间处于没有神经支配的状态，结果导致在再生神经纤维达到之前，骨骼肌萎缩和纤维化的程度已经非常显著，并且丧失了能够接受神经纤维再支配的能力，最终造成靶器官骨骼肌所在肢体的功能部分或全部丧失以及肢体挛缩畸形[12, 13]。对于周围神经损伤在进行手术修复后，受损神经所支配的靶器官骨骼肌萎缩就是治疗后患肢运动功能恢复不良的一个非常重要的原因。在臂丛损伤时这种情况非常多见[3, 4, 5]。作为神经系统所支配的靶器官，骨骼肌的组织形态结构功能以及萎缩程度直接决定着肢体的运动功能，是神经系统病变治疗后决定肢体功能恢复的最关键的因素，如果骨骼肌萎缩后无法恢复，那么将会直接导致肢体运动功能永久性丧失，最终造成终生残疾[14, 15, 16]。因此，加强基础研究，揭示骨骼肌萎缩本质，寻找有效防治和逆转骨骼肌萎缩的方法，具有重大的临床应用价值和广阔的应用前景。

目前，对于失神经支配骨骼肌萎缩的发病机制的研究已经取得了一定程度的进展。失神经支配骨骼肌萎缩的病理学特征，本质上就是骨骼肌在失去神经支配后发生了形态学上的重构，其中包括骨骼肌细胞萎缩、凋亡所导致的肌细胞重塑，以及细胞外间质增多、纤维化所导致的细胞外间质重塑。这种病理改变进展迅速，最终导致骨骼肌的体积缩小，具有收缩功能的肌细胞的绝对数量减少甚至消失，骨骼肌整体上的收缩功能减弱甚至丧失。在骨骼肌萎缩重构时，

肌细胞表现为萎缩、凋亡，但与此相反，没有收缩功能的间质细胞却表现为大量增殖，而且间质细胞会分泌产生大量的胶原纤维，结果导致细胞外间质增多、纤 维化。骨骼肌在丧失神经支配后，发生肌细胞萎缩和间质纤维化等骨骼肌重构的病理改变的进展速度非常迅速[17, 18, 19]。通常在神经支配丧失后的3个月左右，骨骼肌就会在形态学上出现显著的纤维化病理改变。骨骼肌在丧失神经支配后，肌细 胞萎缩和细胞外间质纤维化重塑的改变在不断进展，与此同时，为骨骼肌组织供血供氧的毛细血管网也会随之发生重塑。毛细血管网重塑表现为毛细血管的数量进行性减少，这种改变会进一步促进骨骼肌细胞萎缩和间质纤维化的病理改变进展，最终形成恶性循环进一步加重骨骼肌萎缩重构[20, 21]。在病程发展的后期，成纤维细胞所分泌的大量的胶原纤维不仅会使骨骼肌的弹性减退，而且还会在细胞周围形成一道屏障，破坏细胞之间的连接和信息传递。细胞外间质重塑所产生的屏障作用会机械性地将肌细胞与末梢神经纤维分离开，导致再生的神经纤维很难与肌细胞形成有效的突触联系，这就使骨骼肌重新获得神经支配的机会减小，促进丧失神经支配后的骨骼肌进一步发生重构。骨骼肌在丧失神经支配后，在骨骼肌发生重构的过程当中，细胞外间质重塑发挥了重要的作用。在细胞外间质重塑的过程中，以成纤维细胞大量增殖为主。在正常的生理状态下，骨骼肌组织中的细胞成分主要包括骨骼肌细胞和间质细胞，骨骼肌细胞的数量较多，间质细胞的数量较少。但是，在失神经支配骨骼肌萎缩的病理状态下，骨骼肌组织内肌细胞的绝对数量会因萎缩凋亡而显著减少，同时，肌细胞的体积也会显著缩小、收缩力显著减退[21, 22, 23]。然而，没有收缩功能的间质细胞的数量却会显著增多，其中以成纤维细胞的数量增多最为明显，同时，成纤维细胞的体积会明显增大，分泌胶原纤维的功能也明显增强。发生这种形态学改变的原因，主要是由于骨骼肌细胞的再生能力较差，在受到损伤后通常无法通过增殖而进行自我修复；然而成纤维细胞适应缺血、缺氧等恶劣环境的能力较强，而且增殖能力旺盛，在损伤的状态下反而会被激活，并通过大量增殖对损伤进行修复，最终的结果就是肌细胞逐步萎缩消失并被纤维组织所取代。

随着胚胎生物学和分子生物学的研究进展，人们对于骨骼肌的发生、发育过程以及损伤后损伤修复过程的研究，已经从早期的组织形态学研究深入到了细胞基因调控领域的分子生物学研究，其中内在的分子生物学机制的研究是目前国内外学者所关注的焦点。近年来的研究表明，生肌调节因子家族[8,9]就是调控骨骼肌发生和发育的一组最为重要的转录调节因子家族，在骨骼肌的胚胎发育以及损伤修复过程中发挥着重要的作用。在胚胎发育时期，MRFs家族可以使中胚层内原始的多能胚胎干细胞定向分化为成肌细胞，并能促进成肌细胞进一步分化并融合成为肌管，之后肌管之间会发生相互融合，最终形成成熟的肌纤维细胞[24,25,26,27]。此外，在体外的细胞转染实验研究中也发现，成肌调节因子能够诱导非肌细胞如：成纤维细胞、成脂肪细胞及成软骨细胞等转分化成为成肌细胞，这些转化而来的成肌细胞可以稳定传代，并且能够进一步分化成为肌管，最终相互融合形成具有收缩功能的肌纤维细胞[28]。

生肌调节因子家族是一组结构上具有极大的相似性的基因的转录调节因子，它们通过与染色体DNA的特定部位发生结合进而发挥调节骨骼肌特异性基因转录表达的作用[29]。生肌调节因子家族成员的共同特点是在结构上都具有碱性-螺旋-环-螺旋（bHLH）这种特殊的结构域。目前发现，生肌调节因子家族内部主要包括4个成员，即Myod1, Myf5, Myog和MRF4。其中，Myod1基因首先被发现，之后其它三个成员Myf5, Myog和MRF4也相继被发现。生肌调节因子家族4个成员在骨骼肌发生及发育过程中所发挥的作用已经基本阐明[30]。在胚胎发育时期，Myod1基因和Myf5基因二者的功能具有很多的相同的特征。如果Myf5基因在骨骼肌发育过程中失活，那么就会导致肌节形成延迟，以及骨骼肌前体细胞迁移部位异常。但是，当Myod1基因在细胞内正确表达后，所有因Myf5基因失活所导致的异常发育状态就会被修正。这种现象表明Myod1基因基本能够替代Myf5基因所具有的作用[31]。Myog基因在骨骼肌发生过程中所发挥的作用非常重要，并且与其它生肌调节因子家族成员之间没有太多的相似之处[32]。如果Myog基因失活，那么就会导致成肌细胞分化不良，结果使得骨骼

肌组织大量减少，但是却不会出现骨骼肌完全缺失的状态。MRF4基因的功能没有特殊之处，在骨骼肌发生过程中所发挥的作用似乎并不重要。生肌调节因子家族成员各自的表达时间和功能特点对于决定骨骼肌的发生、分化和成熟具有重要的作用，Myod1与Myf5基因主要在骨骼肌发育早期的肌前体细胞向成肌细胞分化的过程中发挥作用，而Myog与MRF4基因主要在骨骼肌发育晚期的成肌细胞向终末骨骼肌纤维细胞分化的过程中发挥作用。

利用细胞移植的方法对失神经支配骨骼肌萎缩进行治疗具有重要的研究价值和巨大的应用潜力，细胞移植治疗首先要求制备大量的可移植细胞作为移植原料。近年来的研究结果显示，成体干细胞在特定条件下能够表现出一定的可塑性，并且具有受诱导后出现定向分化的能力。这个结果就提示，成体干细胞在一定的条件下可以作为生产种子细胞的原材料，这就能够为解决细胞移植治疗时可移植细胞的来源提供了一条有利的途径。对于成体干细胞的可塑性和分化能力进行深入研究具有极大的实用价值和广阔的应用前景。利用患者自身的成体干细胞作为种子细胞进行自体细胞移植治疗具有很好的组织相容性，能够避免机体对移植物发生免疫排斥反应，此外，利用自体组织进行治疗也完全符合伦理道德规范的要求，因此选用患者自身的成体干细胞作为种子细胞的来源是一种很好的选择[33]。对于机体而言，如果能够从位置表浅、易于取材的体表部位寻找到适应能力强、体外培养生命力旺盛的成体干细胞，则会具有重要的临床应用价值。来源于皮肤的结缔组织内部所包涵的间充质干细胞就是具有上述特征的成体干细胞，可以作为种子细胞的良好来源。结缔组织中增生最为活跃的间充质干细胞种类就是成纤维细胞，成纤维细胞还是对机体创伤进行修复的最重要的细胞成分之一，在机体的组织损伤修复过程中发挥着重要的作用。在哺乳动物机体中，体表所覆盖的皮肤是最大的器官之一，不仅具有保护机体的作用，而且增生代谢非常旺盛。皮肤是由表皮、真皮和皮下组织三层组织构成，其中真皮层所包含的主要结缔组织细胞成分就是成纤维细胞，又称为真皮成纤维细胞。真皮成纤维细胞已经被广泛应用于分子生物学研究的诸多领域，

它不仅是基因治疗过程中一种常用的工具细胞，而且也是一种十分常用的靶细胞[34, 35]。随着体外细胞分离培养技术的不断提高，目前对于真皮成纤维细胞的分离及培养技术已经比较成熟，对于其在体外生长增殖的规律也已经有了全面客观的认识。真皮成纤维细胞在体外培养时生命力旺盛，适应能力与增殖能力都非常强，在经历多次传代后仍能保持很强的增殖和分化能力[36]。在进行基因干预时，真皮成纤维细胞不仅对于外源性目的基因转入具有良好的耐受性和适应性，而且也能很好地适应外源性基因的转录表达，并且能够在外源性基因的诱导作用下转分化为组织工程所需的多种目的细胞，因此，真皮成纤维细胞可以作为基因治疗时理想的工具细胞[37,10,38,11]。

目前，基因治疗是医学领域中新出现的一种治疗方法，由于具有极大的应用潜力，因此也是当前的研究热点之一。基因治疗是针对目的基因所进行的一种治疗，可以对多种疾病发挥治疗作用[39, 40]。首先，许多先天性疾病都存在基因缺陷或基因表达异常，对于这些疾病，通过基因治疗可以达到弥补缺陷纠正异常的作用。其次，通过基因治疗还能将特定的目的基因在体内进行表达并得到某种特殊的基因产物，利用这种产物可以实现对某些疾病的治疗，这样就不需要外源性药物来直接干预，而是调动机体自身的潜能来直接达到治疗疾病的目的。利用转基因技术能够使MRFs基因在成纤维细胞内进行转录表达，通过基因治疗工程将成纤维细胞诱导成为肌细胞，这就使得成纤维细胞那个成为治疗失神经支配骨骼肌萎缩的种子细胞。

基因治疗的主要治疗步骤就是将目的基因导入靶细胞内，这一过程可以通过体内和体外这两条基因转移途径来实现。直接将目的基因导入机体自身体内的基因治疗方法就是直接基因治疗方式[41, 42]。与此相对应的是间接基因治疗，它是利用体外基因转移的方法，并通过多个步骤来达到基因治疗的目的[43]。间接基因治疗需要多个步骤来完成任务，第一步是在局部组织内收集一定量的靶细胞，并将这些靶细胞在体外培养进行扩增，以使其达到治疗所需的数量。第二步是通过体外基因转移的方法，将外源性目的基因转入靶细胞内，并进行目的

基因表达，生产出特定的具有治疗作用的基因产物。最后，将带有目的基因的有活性的靶细胞移植到机体特定的器官或组织中，让这些靶细胞真正在体内发挥基因治疗的作用，这样整个治疗过程才算结束[44]。与直接基因治疗相比，间接基因治疗的优势在于不仅能够选择特异的靶细胞种类，而且能够在体外客观评估外源性目的基因的表达情况并预测治疗效果，此外，在靶向性方面，要比将病毒载体或DNA复合体直接注入到体内所得到的靶向性更高[45]。目前人们广泛采用的基因治疗方法仍然是体外基因转移技术，应用该方法可以为细胞移植及组织工程制备出大量的种子细胞。

在基因治疗过程中，怎样将外源性目的基因高效、准确、特异、安全地导入靶细胞是首先要解决的一个技术问题。理论上讲，外源性目的基因最好能够特异性地针对靶细胞进行靶向性导入，这样才能避免对非靶细胞的干扰以及目的基因的浪费。一般而言，外源性目的基因较易导入处于分裂期的靶细胞，但是较难导入非分裂期的靶细胞，如果能够解决了后一问题则会取得较好的疗效。导入靶细胞内的目的基因在进行表达时如果具有调控机制进行调节则会获得更好的疗效和更大的安全性。在治疗过程中可以促使其充分表达，当治疗结束后，则可以使其失活从而避免过度表达。外源性目的基因在除治疗作用之外，组织相容性还应较高，不应含有激发宿主机体发生免疫排斥反应的成分；而且生物安全性应该较高，不应含有容易导致细胞恶性突变的致癌和致畸成分[46, 47, 48]。基因转移通常需要借助载体来协助外源性目的基因进入靶细胞，目前所使用的大部分载体只能基本符合上述要求，更好的基因转移方法仍然有待进一步研究。

在基因治疗过程中，能够将外源性目的基因导入真核细胞内并进行表达的载体主要有两大类，包括病毒载体和非病毒载体。以病毒载体为媒介的外源性基因转移技术称为转导，以非病毒载体为媒介的外源性基因转移技术称为转染。病毒性载体又可以分为RNA病毒载体和DNA病毒载体两类[49]。非病毒性载体可以分为裸DNA、DNA配体复合物、质粒、脂质体等不同类型[50]。病毒载体的优点是转染效率和表达效率都比较高；但是主要的缺点是存在一定的生物安全性

隐患[51]。相比之下，非病毒载体虽然转染效率和表达效率都不及病毒载体高，但是其的生物安全性相对更高，因此，也被很多研究采用[52]。质粒载体是一种常用的非病毒载体，具有很多独特的优点。质粒载体可携带的目的基因容量较大，能够装载较大的目的基因片段。不论靶细胞是否处于分裂期，质粒载体都能够进行转染，转染后能够促使目的基因进行有效表达。质粒载体自身不仅的免疫原性较低，而且引起靶细胞基因突变或发生恶性肿瘤的可能性相对较小。应用质粒载体进行转染需要转染试剂进行协助，目前应用较多的转染的试剂是阳离子脂质体。对于周围神经损伤后骨骼肌失神经萎缩这一非致命性疾患而言，在进行基因治疗时应该尽量选择生物安全性高的方法进行治疗，以避免基因恶性突变发生导致致瘤或致畸等严重的不良后果。基于以上原因，本研究采用了质粒作为转移目的基因片段的真核表达载体，以期获得更高的生物安全性。

肌卫星细胞不仅能够表达波形蛋白，而且能够特异性地表达结蛋白，不同的是，成纤维细胞只能表达波形蛋白，而不能表达结蛋白，因此结蛋白通常被作为鉴定肌卫星细胞的特异性标记物。Myod1和Myog真核共表达载体转染成纤维细胞后的蛋白表达情况可以通过免疫荧光染色的办法来评价。本实验结果发现，Myod1和Myog真核共表达载体转染成纤维细胞后，可以观察到结蛋白表达阳性的细胞，这表明这些转染后的成纤维细胞能表达出肌卫星细胞所特有的结构蛋白，由此可见，将Myod1和Myog真核共表达载体转染成纤维细胞后，能够诱导大鼠真皮成纤维细胞转分化为肌卫星细胞。本部分实验的体外研究可以为体内研究提供了一个间接的证据；也为后期的深入研究提供了实验基础，下一阶段，我们将继续进行体内实验研究以验证由真皮成纤维细胞转分化而来的成肌细胞在进行细胞移植时的疗效。

结 论

## 1、 本实验所构建的重组Myod1和Myog真核共表达载体的在体外转染时，能够诱导原代培养的大鼠真皮成纤维细胞转分化为成肌细胞。

参考文献：

[1] Salanova M, Schiffl G, Püttmann B, et al. Molecular biomarkers monitoring human skeletal muscle fibres and microvasculature following long-term bed rest with and without countermeasures. J Anat. 2008 Mar; 212(3): 306-18.

[2] Coutinho EL, DeLuca C, Salvini TF, et al. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. Connect Tissue Res. 2006; 47(5): 278-86.

[3] Walsh SF. Treatment of a brachial plexus injury using kinesiotape and exercise. Physiother Theory Pract. 2010 Oct; 26(7): 490-6.

[4] Belzberg AJ, Dorsi MJ, Storm PB, et al. Surgical repair of brachial plexus injury: a multinational survey of experienced peripheral nerve surgeons. J Neurosurg. 2004 Sep; 101(3): 365-76.

[5] Songcharoen P. Management of brachial plexus injury in adults. Scand J Surg. 2008; 97(4): 317-23.

[6] Musgrave DS, Bosch P, Lee JY, et al. Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. Clin Orthop Relat Res. 2000 Sep; (378): 290-305.

[7] Jane JA Jr, Dunford BA, Kron A, et al. Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenetic protein (BMP) -4 and BMP-6 gene transfer. Mol Ther. 2002 Oct; 6(4): 464-70.

[8] Huang J, Weintraub H, Kedes L. Intramolecular regulation of MyoD activation domain conformation and function. Mol Cell Biol. 1998; 18(9): 5478-84.

[9] Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, et al. The molecular regulation of muscle stem cell function. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008; 73: 323-31.

[10] Kern JS, Loeckermann S, Fritsch A, et al. Mechanisms of Fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysis bullosa: high stability of collagen VII favors long-term

Skin integrity. Mol Ther. 2009 Sep;17(9):1605-15.

[11] Yogalingam G, Crawley A, Hopwood JJ, et al. Evaluation of Fibroblast-mediated gene therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. Biochim Biophys Acta. 1999 Feb 24; 1453(2): 284-96.

[12] Skouras E, Ozsoy U, Sarikcioglu L, et al. Intrinsic and therapeutic factors determining the recovery of motor function after peripheral nerve transection. Ann Anat. 2011 Jul; 193(4): 286-303.

[13] Hadzic A, Williams BA, Karaca PE, et al. For outpatient rotator cuff surgery, nerve block anesthesia provides superior same-day recovery over general anesthesia. Anesthesiology. 2005 May; 102(5): 1001-7.

[14] Ihm PA, Samii M. Quantitative study of muscle fibre atrophy and restitution after nerve grafts. Acta Neurochir (Wien). 1976; 34(1-4): 185-93.

[15] Vinciguerra M, Musaro A, Rosenthal N. Regulation of muscle atrophy in aging and disease. Adv Exp Med Biol. 2010; 694: 211-33.

[16] Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. Int J Biochem Cell Biol. 2005 Oct; 37(10): 1974-84.

[17] Carvalho RF, Castan EP, Coelho CA, et al. Heart failure increases atrogin-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy. J Mol Histol. 2010 Feb; 41(1): 81-7.

[18] Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, et al. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. PLoS One. 2012; 7(1): e29082. Epub 2012 Jan 3.

[19] Riley DA, Bain JL, Romatowski JG, et al. Skeletal muscle fiber atrophy: altered thin filament density changes slow fiber force and shortening velocity. Am J Physiol Cell Physiol. 2005 Feb; 288(2): C360-5.

[20] Okiura T, Nagatomo F, Gu N, et al. Bone density of the femur and fiber

Cross-sectional area and oxidative enzyme activity of the tibialis anterior muscle in type II collagen-induced arthritic mice. J Physiol Sci. 2008 Aug;58(4):221-7.

[21] Dasarathy S, Dodig M, Muc SM, et al. Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastamosis rat. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Dec; 287(6): G1124-30.

[22] Hall JK, Banks GB, Chamberlain JS, et al. Prevention of muscle aging by myofiber-associated satellite cell transplantation. Sci Transl Med. 2010 Nov 10; 2(57): 57ra83.

[23] Van der Meer SF, Jaspers RT, Jones DA, et al. Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle. Muscle Nerve. 2011 Feb; 43(2): 212-22.

[24] Weintraub H, Genetta T, Kadesch T. Tissue-specific gene activation by MyoD: determination of specificity by cis-acting repression elements. Genes Dev. 1994; 8(18): 2203-11.

[25] Seale P, Ishibashi J, Holterman C, et al. Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient Myogenic cell. Dev Biol. 2004; 275(2): 287-300.

[26] Cusella-De, Angelis MG, Lyons G, et al. MyoD, Myog independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. J Cell Biol. 1992; 116(5): 1243-55.

[27] Megeney LA, Kablar B, Garrett K, et al. MyoD is required for Myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. Genes Dev. 1996; 10(10): 1173-83.

[28] Gerhart J, Baytion M, DeLuca S, et al. DNA dendrimers localize MyoD mRNA in presomitic tissues of the chick embryo. J Cell Biol. 2000; 149(4): 825-34.

[29] Te Pas MF, Soumillion A, Harders FL, et al. Influences of Myog genotypes on

Birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness, and lean weight of pigs. J Anim Sci. 1999; 77(9): 2352-6.

[30] Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. Biochem Cell Biol. 1995; 73(9-10): 723-32.

[31] Wyzykowski JC, Winata TI, Mitin N, et al. Identification of novel MyoD gene targets in proliferating Myogenic stem cells. Mol Cell Biol. 2002; 22(17): 6199-208.

[32] Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7(7): 540-6.

[33] Zhang Y, Chee A, Thonar EJ, et al. Intervertebral disk repair by protein, gene, or cell injection: a framework for rehabilitation-focused biologics in the spine. PM R. 2011 Jun; 3(6 Suppl 1): S88-94.

[34] Ishihara A, Zekas LJ, Weisbrode SE, et al. Comparative efficacy of Dermal Fibroblast-mediated and direct adenoviral bone morphogenetic protein-2 gene therapy for bone regeneration in an equine rib model. Gene Ther. 2010 Jun; 17(6): 733-44.

[35] Tanaka M, Kogawa K, Nakamura K, et al. Anti-metastatic gene therapy utilizing subcutaneous inoculation of EC-SOD gene transduced autologous Fibroblast suppressed lung metastasis of Meth-A cells and 3LL cells in mice. Gene Ther. 2001 Jan; 8(2): 149-56.

[36] Tian C, Ambroz RJ, Sun L, et al. Direct conversion of Dermal Fibroblasts into neural progenitor cells by a novel cocktail of defined factors. Curr Mol Med. 2012 Feb; 12(2): 126-37.

[37] Yan WF, Murrell DF. Fibroblast-based cell therapy strategy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Dermatol Clin. 2010 Apr; 28(2): 367-70

[38] Cao X, Li Q, Ju DW, et al. Enhanced antitumor effects of bone marrow transplantation in combination with Fibroblast-mediated IL-2 and IL-3 gene therapy. Transplantation. 1999 May 15; 67(9): 1242-50.

[39] Madry H, Kohn D, Cucchiarini M. Gene therapy in orthopaedic surgery Orthopade. 2006 Nov; 35(11): 1193-202

[40] Wu X, Wang S, Chen B, et al. Muscle-derived stem cells: isolation, characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. Cell Tissue Res. 2010 Jun; 340(3): 549-67.

[41] Gregory-Evans K, Bashar AM, Tan M. Ex vivo gene therapy and vision. Curr Gene Ther. 2012 Apr 1; 12(2): 103-15.

[42] Jullig M, Zhang WV, Stott NS. Gene therapy in orthopaedic surgery: the current status. ANZ J Surg. 2004 Jan-Feb; 74(1-2): 46-54.

[43] Preechapornkul P, Imwong M, Chotivanich K, et al. Plasmodium falciparum pfmdr1 amplification, mefloquine resistance, and parasite fitness. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Apr; 53(4): 1509-15.

[44] Aggarwal R, Lu J, Pompili VJ, et al. Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application. Curr Mol Med. 2012 Jan; 12(1): 34-49.

[45] Pan D. In situ (in vivo) gene transfer into murine bone marrow stem cells. Methods Mol Biol. 2009; 506: 159-69.

[46] Hakim CH, Li D, Duan D. Monitoring murine skeletal muscle function for muscle gene therapy. Methods Mol Biol. 2011; 709: 75-89.

[47] Viggeswarapu M, Boden SD, Liu Y, et al. Adenoviral delivery of LIM mineralization protein-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo. J Bone Joint Surg Am. 2001 Mar; 83-A(3): 364-76.

[48] Hannallah D, Peterson B, Lieberman JR, et al. Gene therapy in orthopaedic surgery. Instr Course Lect. 2003; 52: 753-68.

[49] Larocca C, Schlom J. Viral vector-based therapeutic cancer vaccines. Cancer J. 2011 Sep-Oct; 17(5): 359-71.

[50] Perrie Y, Gregoriadis G. Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. Biochim Biophys Acta. 2000 Jul 3; 1475(2): 125-32.

[51] Barouch DH. Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. Curr Opin HIV AIDS. 2010 Sep; 5(5): 386-90.

[52] Dalby B, Cates S, Harris A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Methods. 2004 Jun; 33(2): 95-103.

**全文结论**

一、正确构建了大鼠Myod1基因和Myog基因的真核共表达载体pVAX1-

Myod1-IRES2- Myog-IRES2-EGFP；

二、成功建立了大鼠真皮成纤维细胞体外原代培养的细胞模型；

三、利用Myod1基因和Myog基因的真核共表达载体pVAX1-Myod1-IRES2- Myog-IRES2-EGFP进行体外转染，能够诱导原代培养的大鼠真皮成纤维细胞转分化为成肌细胞。

**创新点**

一、本研究首次联合应用Myod1和Myog作为目的基因，以原代培养的大鼠真皮成纤维细胞作为靶细胞，诱导分化出成肌细胞，为骨骼肌重建的组织工程制备出种子细胞，用以防治并逆转骨骼肌萎缩，这在研究思路上具有一定的创新性。

二、本研究采用分子生物学方法，成功构建了Myod1基因和Myog基因的真核共表达载体pVAX1-Myod1-IRES2-Myog- IRES2-EGFP，并用该载体转染原代培养的大鼠真皮成纤维细胞，成功诱导成纤维细胞转分化为成肌细胞，这在方法上具有一定的创新性。

三、本研究所建立的体外基因转染方法，为骨骼肌重建过程中生产组织工程所需的种子细胞提供了新的实验依据。

#### 综述**1**

**MRFs转录因子的研究进展**

机体的肌细胞组织大致可以分为三类，包括骨骼肌、平滑肌和心肌。其中，从重量上来讲，骨骼肌的含量最多，约占体重的40~50%，而且它是实现躯体运动功能的基础。骨骼肌体积的大小取决于所包含肌纤维细胞的数量及其体积。如果骨骼肌组织中所包含的肌纤维细胞的数量越多，而且体积越大，那么骨骼肌组织的体积就会越大。肌纤维细胞是一种多核细胞，起源于单核的成肌细胞，成肌细胞经过分化融合最终形成多核的肌纤维细胞。在胚胎发育时期，骨骼肌的形成过程如下：首先，多能胚胎干细胞定向分化为成肌细胞；然后，成肌细胞进一步分化成为肌管；最后，肌管相互融合形成肌纤维细胞。随着胚胎生物学和分子生物学的研究进展，人们对于骨骼肌的发生发育过程以及损伤后再生修复过程的研究，已经从早期的组织形态学研究深入到了基因调控领域的分子生物学研究，其中内在的分子生物学机制的研究是目前国内外学者关注的焦点。近年来的研究表明，骨骼肌的再生能力会受到成肌细胞增殖及分化能力的调控，成肌细胞增殖及分化能力又会受到多种转录因子的调控。生肌调节因子

（Myogenic regulatory factors, MRFs）家族[1,2]就是调控骨骼肌发生和发育的一组最为重要的转录调节因子家族，在骨骼肌的胚胎发育以及损伤修复过程中发挥着重要的作用。MRFs只在骨骼肌表达，在心肌细胞和平滑肌细胞内目前还没有发现其有所表达。在胚胎发育时期，MRFs家族可以使中胚层内原始的多能胚胎干细胞定向分化为成肌细胞，并能促进成肌细胞进一步分化并融合成为肌管，之后肌管之间会发生相互融合，最终形成成熟的肌纤维细胞[3,4,5,6]。此外，在体外的细胞转染实验研究中也发现，成肌调节因子能够诱导非肌细胞如：成纤维细胞、成脂肪细胞及成软骨细胞等转分化成为成肌细胞，这些转化而来的成肌

细胞可以稳定传代，并且能够进一步分化成为肌管，最终相互融合形成具有收缩功能的肌纤维细胞[5, 7]。

## 1. MRFs转录因子家族的成员

生肌调节因子(Myogenic regulatory factors, MRFs)家族是一组转录调节因子，它们通过与染色体DNA的特定部位发生结合进而发挥调节骨骼肌特异性基因转录表达的功能。生肌调节因子家族成员的共同特点是在结构上具有极大的相似性，都具有碱性-螺旋-环-螺旋（bHLH）这种特殊的结构域。目前认为，MRFs家族是一组转录因子，其中包括Myod1、Myog、Myf5以及MRF4等4个成员[8]。转录因子MRF4在不同种属的动物中又可被称为Myf6或者herculin. MRFs家族的四个转录因子都具有一种结构高度相似的同源结构域，即碱性-螺旋-环-螺旋（bHLH）结构域，其中的碱性区域是MRFs转录因子与染色体DNA进行结合的位点；HLH结构域是MRFs与其他同样具有螺旋-环-螺旋结构域的蛋白质进行结合的位点，结合后可以形成具有特定空间结构的二聚体或四聚体。除了碱性-螺旋-环-螺旋（bHLH）结构域之外，MRFs转录因子家族还具有一些其他结构相似的结构域，如富含半胱氨酸／组氨酸、丝氨酸／苏氨酸的结构区域。除了上述这些同源性很高的结构区域之外，四个转录因子的其他结构并不相同，这种差别是MRFs转录因子家族成员之间相互区分的基础。Myod1是含有318个氨基酸的蛋白质，Myog含有224个氨基酸，Myf5含有255个氨基酸，MRF4含有242个氨基酸。此外，MRFs转录因子家族四个成员的基因位置也不相同。在人类，Myod1位于第11号染色体上，Myog位于第1号染色体上，而Myf5和MRF4的基因都位于第12号染色体上[9]。同一个成员在不同种属动物细胞内的基因分布也不相同。Myod1基因在人类体内分布于第11号染色体上，而在大鼠体内却位于染色体1q22 [10]. Myog的基因在人类以及小鼠体内都存在于第1号染色体上，而在大鼠体内却存在于第13号染色体上[11]。

## 2. MRFs转录因子的分子结构

MRFs家族成员的蛋白质结构特征是具有一个在结构上高度同源的碱性-螺

旋-环-螺旋(bHLH)结构域的三维晶体结构，这是一个富含精氨酸和赖氨酸的碱性氨基酸结构区域和一个紧密相邻的螺旋-环-螺旋(HLH)结构区域。碱性-螺旋-环-螺旋(bHLH)结构域是一个由70个氨基酸残基组成的同源片段序列[12]。HLH结构域是MRFs家族成员与其他同样具有螺旋-环-螺旋结构域的蛋白质进行结合的结合位点，通过螺旋-环-螺旋结构域的结合会形成同源或异源的二聚体或四聚体。有些蛋白质，如肌细胞促进因子-2(MEF2)等，在结构上同样具有螺旋-环-螺旋结构域，并可以与MRFs家族成员的HLH结构域进行结合从而形成二聚体或四聚体结构。HLH结构域中的环状结构域所起的作用是连接两个螺旋，除此之外没有其他特殊的功能。即使环状结构域内的部分氨基酸发生突变，也不会导致bHLH的整体功能发生变化。碱性-螺旋-环-螺旋(bHLH)结构域中的碱性结构区域是与染色体DNA进行结合所必须的位点，是MRFs转录因子发挥作用的重要结构。MRFs转录因子通过该碱性区域与骨骼肌特异性基因的启动子或增强子进行结合，从而发挥其对特定基因进行转录表达的调控作用。

碱性-螺旋-环-螺旋结构域是一种在进化上高度保守的结构域，它与myc家族所含的结构域有很高的相似性，因此又可被称为basic/myc区。其他一些转录因子同样具有这种高度保守的结构域。bHLH结构域所发挥的作用主要是促进蛋白质之间发生聚合。通过bHLH的聚合作用，可以使两个或四个蛋白质形成二聚体或者四聚体，其中只有蛋白二聚体可与染色体DNA序列进行结合，四聚体则无法与染色体DNA序列进行结合。蛋白二聚体可以形成的一种а-螺旋界面，这个界面能够将两个碱性结构区域拉拢在一起并形成一个具有两个分支的DNA结合位点，之后才能与特定的染色体DNA序列进行结合[13]。当MRFs转录因子需要与染色体DNA序列结合时，至少需要两个步骤：第一步，MRFs转录因子所包含的bHLH结构域首先要和免疫球蛋白增强结合因子E蛋白进行结合以形成一个异源二聚体；第二步，异源二聚体才能与染色体上存在于骨骼肌特异性基因的上游启动子或增强子的E盒子DNA序列进行结合。当MRFs转录因子与染色体DNA序列结合后，才能进一步产生反式激活作用，发挥促进骨骼肌特异

性基因发生转录与表达的作用，以促进骨骼肌细胞的发生和发育过程的作用。E蛋白是一种促进MRFs转录因子发挥作用的免疫球蛋白增强结合因子，由E基因产生，常见的有E12和E47两种蛋白。E盒子DNA序列是MRFs转录因子与染色体DNA序列进行结合的部位，其碱基序列为CANNTG，其中N代表任意碱基。骨骼肌特异性基因的转录表达，如骨骼肌肌酸激酶（muscle creatine kinase，

MCK)、烟碱样乙酰胆碱受体(nicotinic acetylch oline receptor, AchR)等，都是通过这一途径激活的。

在MRFs转录因子的碱性-螺旋-环-螺旋(bHLH)结构域中，碱性区结构域是由两到三簇碱性氨基酸残基组成的，大约含有20~30个氨基酸残基，位于HLH结构域的氨基末端。碱性区结构域虽然不参与异源二聚体的形成过程，但是在

MRFs与骨骼肌特异性基因的DNA序列进行结合时却会发挥重要的作用，并能激活骨骼肌特异性基因的转录与表达[14]。碱性区结构域是MRFs与染色体DNA序列发生结合的位点，其中含有一个结构上高度保守的氨基酸序列，称为生肌识别结构(Myogenic recognition motif, MRM)。生肌识别结构是MRFs转录因子识别、结合骨骼肌特异性基因的启动子或增强子碱基序列的关键部位。碱性区结构域中的某些氨基酸，如ArgⅢ，Alall4, Thr115和Lysl24，是激活骨骼肌特异性基因转录的关键位点，这些氨基酸如果被替换为其它类型的氨基酸，就会导致MRFs转录因子的基因转录功能丧失[15]。研究发现，在bHLH-DNA结合复合物的整体结构中，ArgⅢ直接与DNA序列的主沟相接触，可能直接发挥激活基因转录的作用；Alall4和Thrl15虽然位于bHLH-DNA复合物的接触面，但是却不直接参与对DNA序列的主沟相接触，可能是通过影响ArgⅢ的构型而间接发挥调控基因转录的作用；Lys124则位于bHLH-DNA复合物的表面，可能只是参与氨基酸残基之间的相互作用[16]。

在MRFs转录因子的蛋白质结构特征中，除了bHLH结构域以外，还有两个同源结构域也具有一定的功能。其中，一个同源结构域是紧靠碱性区的氨基末端结构域(NH2-)，该部位具有富含组氨酸和半胱氨酸的组氨酸/半胱氨酸结构

域(H/C)和转录激活结构域(AD)，AD 结构域可能有辅助激活靶基因转录的作用。另一个同源结构域是位于MRFs羧基末端的结构域(COOH-)，该部位富含丝氨酸和苏氨酸，是兼性的a螺旋(helixⅢ)结构域，同时也是能够发生磷酸化的部位，可能与染色体的结构重塑有关[10]。在MRFs转录因子家族的蛋白质结构中，同源结构域以外的结构可能与各个成员的精细功能有关，是MRFs家族成员功能差异的分子基础。

## 3. MRFs转录因子促进骨骼肌发育的作用机制

随着胚胎生物学和分子生物学技术的迅猛进展，对于骨骼肌的发生和损伤后再生修复的研究已经从早期的组织学形态研究发展到了分子调控领域的分子生物学领域的研究，有关基因调控的分子生物学研究是目前国内外研究的热点问题。MRFs转录因子对于骨骼肌发育的调控作用主要表现在能够激活骨骼肌特异基因的转录。在应用斑点cDNA芯片技术对Myod1转录因子调控基因表达进行的实验研究中，结果显示MyoD在24小时内可以使所有受检基因中的5%的基因的转录表达水平发生改变，这就表明这些基因直接受到Myod1转录因子的调控[17]。大多数的骨骼肌特异性基因控制区都存在一个或多个能够被bHLH结构域所识别的碱基序列，该序列被称为E盒(Ebox)，是一个能够与含有bHLH结构域的蛋白二聚体发生结合的结合位点，其碱基序列为CANNTG，其中N代表任意碱基[18]。通过E盒碱基序列途径是MRFs转录因子激活骨骼肌特异性基因进行转录的重要途径。但是，有些骨骼肌特异性基因并不包含E盒碱基序列，对于这一类基因，MRFs则主要通过激活中间因子——肌细胞促进因子-2 (myocyte specific enhancer bindingfactor2, MEF2)来发挥作用，活化的肌细胞促进因子-2能够进一步与缺乏E盒碱基序列的骨骼肌特异性基因启动子结合以诱导其进行转录[19]。这就是MRFs转录因子通过非E盒碱基序列途径来激活骨骼肌特异性基因进行转录的另一条途径。

### 3.1 MRFs转录因子通过E盒碱基序列途径的调节

E盒碱基序列是MRFs转录因子激活骨骼肌特异性基因转录的一条重要途

径。E盒的碱基序列为CANNTG，其中的N代表任意碱基，该序列是能够与含有bHLH结构域的蛋白二聚体发生相互识别、结合的位点，大多数的骨骼肌特异性基因在控制区内具有一个或多个E盒碱基序列。在多数骨骼肌表型蛋白的基因调控区内，如快肌球蛋白的轻链、MHCⅠ、MHCⅡb、肌钙蛋白Ⅰ和desmin的基因调控区内，都已发现存在有E盒碱基序列[20, 21, 22]。事实上E盒碱基序列首先是在免疫球蛋白基因的增强子中被发现，随后在大多数的骨骼肌特异性基因的启动子或增强子内也发现了E盒碱基序列的存在。MRFs转录因子在发挥诱导基因转录的作用时，首先与E蛋白（如E12、E47）结合形成异源的蛋白二聚体，然后这个异源蛋白二聚体才能特异性识别骨骼肌特异性基因的启动子或增强子中所含的E盒碱基序列，并与其发生结合以形成异源寡聚物复合体[23]，从而发挥出激活基因转录的作用。E盒碱基序列可以在大多数的骨骼肌特异性基因的调控区域内被找到，如果人的阻断bHLH与E盒碱基序列的结合，那么就可以起到灭活MRFs转录因子激活基因转录的作用。

在有关MRFs转录因子与E盒碱基序列亲和力强度的研究中发现，MRFs可以与E12、E47等E蛋白相互结合所形成的异源蛋白二聚体，也可以与相同的

MRFs分子相互结合形成的同源蛋白二聚体，但是，异源蛋白二聚体要比同源蛋白二聚体对E盒碱基序列具有更强的亲和力[24]。在与E盒碱基序列结合时，同源二聚体会与异源二聚体发生竞争，这种竞争就会导致骨骼肌分化过程中的骨骼肌特异性基因的转录激活水平被降低。当异源二聚体与E盒碱基序列紧密结合后，进一步可以促进MRFs转录增加。HEB也是一种E蛋白，在成肌细胞分化早期表达水平较高，高表达的HEB与Myod1可以协同诱导Myonenin的表达增加[25]。在成肌细胞分化早期，Myod1与HEB结合所形成的异源二聚体能够识别并结合到Myog基因的启动子中的E盒碱基序列上，进而引起Myog基因的转录激活。

### 3.2 MRFs转录因子通过非E盒碱基序列途径的调节

MRFs转录因子不仅可以通过与E盒碱基序列直接结合激活骨骼肌特异性基

因的转录表达以外，对于那些缺乏E盒碱基序列的骨骼肌特异性基因，MRFs转录因子还可以通过间接的途径来激活其进行转录与表达。在这种情况下，

MRFs首先通过激活居于通路中间的间接调节因子，如MEF2，然后通过间接调节因子进一步与特定的骨骼肌特异基因的启动子相结合，进而激活这些骨骼肌特异性基因发生转录表达[26]。有些骨骼肌特异性基因，如：结蛋白、骨骼肌а-肌动蛋白基因和肌球蛋白重链-1(MHC-l)、肌球蛋白轻链等基因，虽然在这些基因的控制区内并不存在E盒碱基序列，但是它们的转录激活依然受到MRFs转录因子的调控。在这种情况下，MRFs转录因子虽然不能直接通过E盒碱基序列发挥调控基因转录的作用，但是能够通过肌细胞专一的增强子——肌细胞促进因子2 (MEF2)间接地发挥着调控基因转录的作用。MEF2是一种属于MADS家族的转录因子，目前已证实其可介导MyoD和Myog不通过E盒碱基序列途径而发挥激活骨骼肌特异性基因的转录作用[27]。MEF2与染色体DNA发生结合的位点是一段富含（A+T）碱基序列，即CC(A+T) 3GG序列，该位点又称为CarG碱基序列。CarG碱基序列是具有正效应的反式作用因子的DNA结合位点，对骨骼肌特异性基因的转录调控起着重要的作用[28]。MEF2的表达可以激活丝裂原活化蛋白激酶(P38-MAPK)通路基因的转录表达，MEF2与MRFs转录因子的稳定结合需要蛋白激酶P38的参与。研究证实，蛋白激酶P38可能是通过诱导MEF2的激活结构域发生磷酸化改变，从而使MEF2的转录活性升高，进一步提高骨骼肌特异性基因的转录水平。此外，P38通路还能够通过介导核小体重塑复合物

（SWl/SNFI）到达骨骼肌特异基因的相应位点来提高基因的转录水平[29]。

成肌细胞在细胞分化过程中会表达出MEF2转录因子[26]。此外，当外源性的MyoD或Myog转录因子在非肌细胞内出现时，也会引起MEF2转录因子的表达升高[30]。MEF2不仅是经由MRFs诱导而表达的产物，同时也能对MRFs的表达产生反馈式的调控作用。这是由于MEF2不仅可以激活缺乏E盒碱基序列的骨骼肌特异性基因进行转录表达，而且也可以作为中间因子在促进MRFs自身激活的过程中发挥出重要的作用。MRFs家族成员不仅能够激活骨骼肌特异

性基因进行转录表达，还能激活自身的基因进行转录表达，并能进一步激活家族中其他成员进行转录表达，这种作用被称为MRFs的自身激活。近年来的研究结果表明，当外源性的Myod1在10T1／2细胞或Swiss3T6细胞内进行表达时，可以激活该细胞内部自身的内源性Myod1基因的转录表达，进而激活内源性的

Myog基因发生转录表达。同样，当外源性的Myog基因转染进入这些细胞内后，也会激活该细胞自身的内源性Myog基因和MyoD基因发生转录表达[31]。在这个过程中，外源性的Myog转录因子首先激活了内源性的MEF2转录因子进行表达，内源性的Myog基因在启动子内包含有一个MEF2转录因子的结合位点，

MEF2转录因子与Myog基因的启动子结合后又可反过来激活内源性的Myog基因发生转录表达。MRFs转录因子自身激活功能的重要意义在于能够保证MRFs家族成员进行稳定的大量表达，在此基础上才能维持持并诱导细胞进行分化。

## 4. MRFs转录因子的活化、表达及其降解

在胚胎发育过程中，MRFs转录因子的表达具有特定的模式，不仅具有时间特异性以及空间特异性，而且存在多种不同的表型以及种属之间的差异性。目前，对于MRFs转录因子的基因激活机制尚不完全清楚，影响MRFs基因激活以及转录表达水平的因素也不完全明确，可能是受到胚胎发育时间、细胞分化状态以及细胞因子等多种复杂因素共同作用而产生的综合效果。这些因素有可能是对MRFs基因的转录表达起到直接调控的作用，也有可能是通过蛋白间的相互作用而间接地发挥调节表达的作用。在胚胎发育早期，MRFs基因的表达仅限于中胚层体节、生肌节、肢芽以及一些生肌前体细胞等骨骼肌发生区域。近年来的研究结果证实，Myf5是在轴结构诱导下最早出现表达的MRFs家族成员，它最早是在靠近神经管的体节背中部进行表达的。Myod1首先在新生成的头部体节短暂表达，随后在生肌节出现强烈的表达。Myod1基因的转录激活受上游控制区的控制，其对于背侧外胚层的诱导更为敏感。Myog基因的表达水平在出生后明显下降，但是当骨骼肌失去神经支配后，Myog基因的转录水平可以被再次激活而升高。MRF4与其它MRFs家族成员有所不同，可以在成年哺乳动物的

骨骼肌中持续表达，这可能与其维持细胞的分化状态的功能有关[32]。研究发现，Pax-3与MRFs关系密切，Pax-3可被激活体节肌生成的信号所诱导表达，并且在时间上先于MRFs表达而表达[33]。MRFs在Pax-3的下游表达，Pax-3的缺乏会导致使体部MRFs基因不能转录激活，使得骨骼肌无法形成。在副轴内胚层、内胚层侧部、神经管以及纤维细胞异位表达Pax-3，能够启动骨骼肌分化的程序，这表明Pax-3能够激活Myod1、Myf5和Myog的基因进行转录表达。由此可见，体节肌生成信号的激活需要依赖Pax-3所发挥的作用。

在细胞内，发挥作用之后的MRFs转录因子可以经过泛素-蛋白酶体通路而被快速降解[34]。泛素-蛋白酶体通路的降解过程为：首先，泛素被泛素激活酶El激活，随后，泛素被泛素耦联酶E2进行转运并通过泛素底物特异连接酶E3的作用与目标蛋白相连，最后导致目标蛋白发生降解。MRFs转录因子可以通过赖氨酸依赖通路，即氨基末端依赖氨酸通路而被泛素-蛋白酶体降解[35]。肌萎缩蛋白(MAFbx)是一种骨骼肌肌特异性泛素连接酶，其表达量在骨骼肌萎缩时增高，并能够促进泛素-蛋白酶体通路降解MRFs转录因子，抑制成肌细胞的增殖与分化。

## 5. MRFs转录因子功能的调节因素

成肌细胞的增殖过程和分化过程，是两个相互排斥的不同过程。也就是说，成肌细胞在增殖过程中不会发生分化，但是，一旦进入分化过程那么其增殖过程就会停止。许多因素对MRFs转录因子的表达水平及其功能大小具有调节作用，有些因素会起到正向调节作用，有些因素则起到负向调节作用。这些正向和负向调节因素与MRFs转录因子相互作用，共同形成一个复杂的调控网络，控制着骨骼肌特异性基因的转录水平，并决定着成肌细胞增殖或分化的不同方向。

### 5.1 促进MRFs转录因子发挥功能的因素

MRFs在发挥促进骨骼肌特异性基因转录作用的时候，通常需要其它含有

bHLH 结构域的蛋白共同参与。近年来的研究表明，许多调节基因表达的蛋白质，

如：daughterless、twist、schacte scute、骨骼肌LIM蛋白、免疫球蛋白增强因子结合因子E12、E47等蛋白，它们的共同特点是都具有与MRFs转录因子相似的

bHLH结构域，这些蛋白可以通过bHLH结构域与MRFs形成的异源二聚体，然后再与骨骼肌特异性基因启动子或增强子内的E盒碱基序列结合，从而激活相应基因的转录与表达[36]。两个相同的MRFs或其它具有bHLH结构域的蛋白也可以通过bHLH结构域互相结合形成同源二聚体，然后再与E盒碱基序列结合，但是同源二聚体与E盒碱基序列结合的亲和力以及作用效果均弱于异源二聚体。同源二聚体和异源二聚体均可与同一位点的E盒碱基序列结合，这表明二者对骨骼肌特异性基因的转录具有竞争性抑制作用。

有些骨骼肌特异性基因在启动转录时，必须要有其它调节因子与MRFs共同参与才能被激活。例如，人类心肌的肌动蛋白基因的在启动转录时，需要E盒碱基序列、Sp1结合位点以及血清反应单元(SRE)这三个位点同时与Myod1、

Sp1以及血清反应因子(SRF)结合时才能被激活转录[37]。此外，一些在结构上具有同源性的异型核蛋白也可能通过与MEF2或其它SRF的相互作用来调节骨骼肌特异性基因表达[38]。另外，P57可以通过灭活cyclinE-Cdk2的活性而减少MRFs磷酸化，使之稳定性增强，从而使MRFs转录因子在成肌细胞中的有效含量增加并发挥作用，进而诱导成肌细胞停止增殖并开始向肌细胞分化[39]。

### 5.2 抑制MRFs转录因子发挥功能的因素

由于成肌细胞的分化过程和增殖过程是相互排斥的两个过程，因此成肌细胞最终的发展方向取决于MRFs转录因子产生的分化信号和外源性生长因子(GF)产生的增殖信号之间的平衡。当MRFs转录因子的作用弱于GF的作用时，细胞分化就会受到抑制，骨骼肌特异性基因的表达就会受到抑制，成肌细胞就处于增殖状态；当MRFs的作用强于GF的作用时，成肌细胞的增殖就会受到抑制，而分化过程则会受到促进，成肌细胞就停止增殖，开始向肌细胞分化[40]。MRFs可以通过直接抑制与成肌细胞增殖有关的基因控制区而发挥抑制成肌细胞增殖的调控作用，也可通过抑制GF诱导的基因产物去间接发挥抑制成肌细胞增殖的

作用，或者通过干扰与成肌细胞增殖有关的细胞因子来发挥抑制成肌细胞增殖的作用。GF如何拮抗MRFs的作用机制目前仍不完全清楚，可能是通过诱导

MRFs转录因子的某些部位发生磷酸化改变而起到拮抗作用，或者通过诱导产生一些抑制性因子而发挥拮抗作用。目前，研究结果表明，许多生长因子，包括成纤维生长因子（FGF）以及β转化生长因子（TGF-β）等，都能够产生抑制

MRFs的作用，从而抑制成肌细胞的分化过程。这些生长因子结合到成肌细胞相应的受体上，通过信号转导通路就能够下调MRFs基因的转录表达水平[9]。

DNA结合抑制因子(Id)在成肌细胞的增殖过程中表达水平较高，是一种能够介导GF拮抗成肌细胞分化过程的因子。成肌细胞在增殖过程中通常会表达较高水平的DNA结合抑制因子，同时，骨骼肌特异性基因的转录水平通常较低；在成肌细胞分化的过程中，DNA结合抑制因子则表达水平下降，而MRFs和E蛋白的转录表达水平则会明显升高[41]。DNA结合抑制因子是一种含有螺旋-环-螺旋（HLH）结构域的蛋白，但却不含有碱性区结构域，因此，DNA结合抑制因子无法与染色体DNA序列相结合。HLH结构域使得DNA结合抑制因子能与其它含有碱性-螺旋-环-螺旋（bHLH）结构域的蛋白相结合形成异源二聚体，但这种异源二聚体却不具备与染色体DNA序列结合的能力，因此DNA结合抑制因子可以发挥拮抗MRFs促进成肌细胞分化作用[42]。DNA结合抑制因子可以通过与MRFs结合而直接抑制MRFs的作用，也可以通过与E蛋白聚合而形成一种竞争性抑制作用。通常，DNA结合抑制因子可与E12、E47等E蛋白形成异源二聚体，竞争抑制使得MRFs形成的异源二聚体减少，从而下调MRFs依赖E盒碱基序列所激活的基因转录。

在细胞核内，有些快速反应基因的产物具有转录因子的功能，如C-fos、C-jun、C-myc基因的产物就能够作为转录因子及调节因子去调控其他基因的转录表达[43]。C-jun蛋白的N末端结构域还具有抑制bHLH结构域活性的功能。许多生长因子和血清因子能够启动这些快速反应基因的进行转录表达，从而间接地发挥拮抗MRFs促进成肌细胞分化的作用[44]。C-fos蛋白、C-jun蛋白与Myod1、

Myog结合后就可以抑制后两者启动骨骼肌肌酸激酶(MCK)基因转录的作用，而Myod1与C-jun结合后也能够抑制那些依赖C-jun的基因启动转录。事实上，

MRFs和C-jun二者之间具有互相抑制的作用，当C-jun和MRFs相互结合后，就会使得二者的功能都无法正常表现的现象[45]。因此，当MRFs大量表达时就会导致C-jun的功能受到抑制，从而激活骨骼肌的分化过程；当C-jun大量表达时则会抑制MRFs表达功能，从而抑制骨骼肌的分化过程。

MRFs转录因子自身所发生的磷酸化改变也是一种对MRFs的功能进行调控的方式。当生长因子与成肌细胞上相应的受体结合之后，就会通过信号转导通路激活多种激酶，这些激酶能够介导MRFs转录因子发生磷酸化改变，这种磷酸化改变就能够降低MRFs转录因子的活性。多种蛋白激酶都可以将MRFs转录因子作为底物，并介导其发生磷酸化改变。例如，在Myog的碱性结构域内，即DNA结合结构域内含有一个高度保守的苏氨酸残基，活化的蛋白激酶 C

（PKC）可以介导该苏氨酸残基发生磷酸化改变，结果导致Myog不能再与染色体DNA进行结合，从而丧失原有的转录因子功能[46]。这个碱性结构域内的磷酸化位点的苏氨酸残基是高度保守的，在所有MRFs家族成员的碱性结构域内都存在。因此，活化的PKC能够发挥抑制MRFs转录因子对骨骼肌特异性基因的转录激活作用。

肌源性生长抑素(myostatin)是一种能够既能对成肌细胞的增殖过程产生抑制作用，又能对其分化过程产生抑制作用的负向调节因子，最终导致骨骼肌的肌纤维的数量减少以及体积缩少，在骨骼肌萎缩过程中发挥重要的作用。

Myostatin的作用机制主要有两条：一个作用机制是，通过转化生长因子-β超家族信号蛋白(Smad3)的介导抑制Myod1、mfy5和Myog的表达，从而达到抑制成肌细胞增殖及分化的作用[47]；另一个作用机制是，通过促进骨骼肌中泛素-蛋白酶体蛋白降解途径的相关组分表达增多以达到灭活MRFs转录因子的作用。例如Myostatin能够促进泛素耦联酶E2(14k)基因、肌萎缩蛋白-1(atrogin-1)基因等转录表达增加，导致对于MRFs家族成员的分解代谢增强，结果导致骨骼肌发

生萎缩[48]。此外，抑制素2(PHB2)是一种转录因子的抑制因子，通过与MRFs和MEF2的相互作用来抑制MRFs和MEF2激活基因转录的作用，从而达到抑制成肌细胞分化的目的[49]。

神经支配也是负向调节MRFs转录因子表达的重要因素。近年来的研究结果表明，骨骼肌在接受神经支配后，MRFs的表达水平就会出现明显降低，但是当骨骼肌失去神经支配后，MRFs的表达水平又会再次出现升高[50]。其中的发生机制尚不明确，有可能是当骨骼肌受到神经纤维支配之后，蛋白激酶C（PKC）的表达量会随之增多，PKC的一个作用就是能够介导MRFs发生磷酸化改变使其失去与骨骼肌特异性基因DNA序列进行结合的能力，结果就抑制了MRFs促进成肌细胞分化的功能[51, 52]。神经电活动如何发挥抑制MRFs转录因子表达的确切机制目前尚不完全清楚，仍有待进一步深入研究。

## 6. MRFs转录因子的Th物功能

在胚胎发育时期，骨骼肌组织的发生起源于原始中胚层内的未分化多能胚胎干细胞，多能胚胎干细胞在一定的发育信号诱导下，能够向成肌细胞定向分化。成肌细胞是一种只能向骨骼肌定向分化的单能干细胞。成肌细胞不仅可以不断地自我复制，而且可以分化成为肌细胞，肌细胞之间可以相互融合，首先可以形成双核的肌管细胞，肌管细胞进一步与周围的肌细胞或肌管细胞相互融合形成多核的肌管细胞。在肌管细胞内，许多与细胞收缩功能相关的骨骼肌特异性基因相继表达，使肌管细胞最终发育成为具有许多细胞核的肌纤维，这些细胞核的分布部位特殊，主要在胞浆内靠近细胞膜的周边部位。

MRFs 转录因子家族成员对于骨骼肌的发生和发育发挥着重要的调节作用。成肌细胞的增殖与分化是两个完全不同的过程。MRFs转录因子不仅能够抑制成肌细胞的增殖过程，而且能够激活骨骼肌特异性基因的转录表达，从而促进成肌细胞的分化过程[53]。对于不同种属动物，在胚胎发育过程中，不同的MRFs家族成员的所发挥的作用具有不同的时间特异性和空间特异性，这种特定的时间和空间模式表明MRFs家族各个成员在骨骼肌的发生和发育过程中所发挥的

作用是不相同的。例如：在小鼠的胚胎发育时期，MRFs 家族的四个成员Myf5、

Myog、MRF4和Myod1进行表达的时间分别出现在胚胎形成时期的第8天、第

8.5天、第9天和第10.5天。此外，另一转录因子MEF2是在胚胎形成的第8.5d出现表达的，这种表达时间上的相关性提示MRFs和MEF2有可能在调节骨骼肌特异性基因表达过程具有相互协同的作用[54]。在胚胎不断发育成熟的过程中，神经系统也在不断的发育成熟。当胚胎的骨骼肌开始接受运动神经纤维支配时，周围神经就会使得Myog和Myod1的基因转录水平在胚胎发育的第15天和第

17天时开始出现下降，并持续到出生后的1~3周。

现有的研究结果表明，在胚胎时期，MRFs基因的转录表达还具有空间特异性，MRFs基因仅在中胚层骨骼肌发生区的生肌前体细胞进行表达，主要包括体节、生肌节和肢芽。例如：Myod1基因的激活转录首先是在新生成的头部体节出现，然后在生肌节内会出现大量的表达。

MRFs转录因子在人类骨骼肌的发生和发育过程中发挥着重要的作用。在人类胚胎时期，骨骼肌发生的初期首先出现Myf5和Myod1表达，随后Myog开始进行表达，最终促使成肌细胞完成向骨骼肌肌纤维分化的过程[55]。通常，MRFs转录因子在发育成熟的骨骼肌中表达水平较低，但是MRF4却是个例外的转录因子，它能够在发育成熟的骨骼肌中保持较高的表达水平，这表明MRF4的功能可能与维持骨骼肌的分化状态有关[56]。在MRFs家族的四个成员中，有些功能却又是相似的，但是每个成员又都具有各自独特的功能[1]。根据蛋白结构及所具有功能的相似性，MRFs家族的四个成员可以分为两类，第一类包括 有

Myod1和Myf5两个因子，两者在空间结构和表达的时间上具有很高的相似性，与胚胎发育时期成肌细胞的发生过程具有密切的关系。第二类包括Myog 和

MRF4两个因子，它们与成肌细胞的分化过程以及骨骼肌的成熟过程具有密切的关系[57]。

在MRFs转录因子家族的成员中，Myod1和Myf5两个因子之间结构和功能具有极高的相似性，二者基本上可以相互替代。在大鼠发育的胚胎时期，只需

单一的Myod1或Myf5转录因子出现表达就基本上能够满足骨骼肌发育成熟的要求[58]。近年来的研究结果表明，单独缺乏Myod1或者Myf5转录因子的大鼠胚胎在发育过程中不会出现严重的骨骼肌异常，但是当同时缺乏Myod1和Myf5两个因子时，大鼠胚胎则不会出现分化成熟的骨骼肌，这表明Myod1和Myf5不仅能够在骨骼肌肌细胞发生的早期阶段发挥作用，而且二者还具有相似的功能，基本上可以相互替代[59]。Myf5是在胚胎时期骨骼肌发育早期，在骨骼肌祖细胞内最早出现表达的MRFs家族成员[60]，它比肌节形成和Myod1的激活时间要早2天，激活了Myf5的肌前体细胞仍然具有多向分化的潜能[61]。如果Myf5基因表达缺失，那么就会导致早期的肌节不能形成。但是，这种发育障碍会被随后出现表达的Myod1所修复，结果使得骨骼肌仍然能够正常发育。近年来的研究结果表明，在胚胎发育过程中，缺乏Myf5基因表达的大鼠会在出生时出现严重的脊柱和胸廓畸形，但并不影响正常的骨骼肌的形成，这可能是由于缺乏

Myf5基因而导致肌节与生骨节之间失去联系而产生的结果；反之，如果Myod1基因表达存在缺陷，那么就会导致Myf5的表达水平出现代偿性增高，结果使得骨骼肌仍然能够正常发育[62]。但是，对于Myod1基因和Myf5基因两者同时缺乏的大鼠胚胎来讲，结果就是其体内既不会出现成熟的骨骼肌，也不会出现成肌细胞的前体细胞群[18]。由此可见，Myf5和Myod1两个因子的功能是相似，并且从时间上来讲，二者应该都是在Myog和MRF4两个因子之前进行表达的，由此才能启动骨骼肌的发育过程。此外，在成年大鼠体内，当骨骼肌发生损伤，肌卫星细胞进行再生修复时，Myf5和Myod1基因的转录水平首先升高，随后，

Myod1的表达水平会进一步升高[63]。综上所述，Myod1是在干细胞向成肌细胞分化的过程中发挥着主导作用，是肌卫星细胞处于激活状态的一个很好的标记蛋白。

Myog和MRF4是MRFs家族成员中另外两个具有相似功能的转录因子。

Myog促进成肌细胞分化的能力与MRF4相似。对于Myog基因缺失的小鼠，如果给予其外源性MRF4基因的进行补充治疗，那么就可使其成肌细胞的分化能

力得到部分代偿，这就证明MRF4基因具有的功能可以部分替代Myog基因。此外，如果MRF4基因转录表达缺失，那么Myog基因的表达水平就会升高以发挥代偿作用。近年来的研究结果表明，Myog转录因子在骨骼肌的分化过程中能够发挥重要的作用，Myog基因表达缺失会阻碍骨骼肌肌纤维的成熟，但是对于肌母细胞的发生则不会产生不利影响[64]。在小鼠胚胎体内，如果敲除掉

Myog基因，则会导致严重的骨骼肌发育缺陷，在正常应该出现骨骼肌的部位只有少量的发育不良的肌纤维出现，但是，如果单独敲除的是MRFs家族成员中其它三个成员，那么就不会出现如此严重的后果[65,66,67]。由此可见，Myog转录因子的缺失可以导致骨骼肌发育的较为严重缺陷，这就提示其在骨骼肌分化过程中所担当的作用较为重要。在Myog基因转录表达缺失的小鼠胚胎体内，MRF4基因的表达水平大约会减少3/4，而Myod1基因的转录表达水平仍然处于正常水平，这就提示Myog转录因子可以调节MRF4基因的表达水平，但是不能对

Myod1的表达水平产生影响[68, 69]。由此推测，Myog和MRF4两者具有相似功能，并且共同在Myf5和Myod1两个因子的下游发挥促进骨骼肌分化的作用。

综上所述，虽然每个MRFs家族成员都具有独特的功能，但是不同的成员之间可能具有向相似的功能，四个MRFs转录因子家族成员中，以Myod1 和

Myog的作用最为关键。Myod1和Myog不仅发挥着控制骨骼肌发生和分化过程的作用，而且还发挥着调控着骨骼肌肌纤维产生特殊表型的作用。其中，Myod1在促进成肌细胞的发生以及促进成肌细胞分化为肌管的早期过程中发挥着重要作用[70]；而Myog则主要在调控骨骼肌终末分化成熟的过程中发挥着关键作用

[71]。

## 7. 展望

在对于骨骼肌发育过程的研究中，MRFs转录因子的发现对阐明骨骼肌特异性基因转录的控制机制，肌卫星细胞增殖和分化过程的决定因素等研究具有重要的意义。在胚胎发育时期，骨骼肌发生的最初起源时中胚层未分化的多能胚胎干细胞。在骨骼肌的发生过程中，在多种细胞外诱导和抑制信号的综合作用

下，多能胚胎干细胞被激活并向着骨骼肌的方向分化，首先定向分化成为成肌细胞，成肌细胞是骨骼肌增殖过程中的干细胞。成肌细胞不断增殖、分化，单核的成肌细胞相互融合，形成双核的肌管细胞，细胞之间反复融合形成多核的肌管细胞。与此同时，与收缩装置相关的骨骼肌特异性基因同步表达，使肌管细胞最终发育为成熟的骨骼肌肌纤维。肌纤维是一种多核细胞，细胞核位于胞浆内贴近细胞膜的表浅部位。MRFs转录因子在骨骼肌的发育形成过程中发挥着重要的作用。Myod1和Myog是成肌调节因子家族中两个功能最为重要的成员，前者在干细胞分化为成肌细胞的过程中发挥主导作用，后者在成肌细胞分化为成熟肌纤维过程中发挥主导作用。在骨骼肌发生的早期，Myf5和Myod1在增殖的成肌细胞中表达，当细胞朝着分化的不同表型的肌细胞发育时Myog开始表达，并最终完成不可逆的分化成熟过程[55]。通过利用基因转染、组织工程以及细胞移植等分子生物学技术手段，充分发挥MRFs转录因子家族成员的治疗作用，为骨骼肌疾病的治疗提供了新的思路，具有广阔的应用前景，值得进一步深入研究。

参考文献：

[1] Huang J, Weintraub H, Kedes L. Intramolecular regulation of MyoD activation domain conformation and function. Mol Cell Biol. 1998; 18(9): 5478-84.

[2] Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, et al. The molecular regulation of muscle stem cell function. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008; 73: 323-31.

[3] Weintraub H, Genetta T, Kadesch T. Tissue-specific gene activation by MyoD: determination of specificity by cis-acting repression elements. Genes Dev. 1994; 8(18): 2203-11.

[4] Seale P, Ishibashi J, Holterman C, et al. Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient Myogenic cell. Dev Biol. 2004; 275(2): 287-300.

[5] Cusella-De Angelis MG, Lyons G, Sonnino C, et al. MyoD, Myog independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. J Cell Biol. 1992; 116(5): 1243-55.

[6] Megeney LA, Kablar B, Garrett K, et al. MyoD is required for Myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. Genes Dev. 1996; 10(10): 1173-83.

[7] Gerhart J, Baytion M, DeLuca S, et al. DNA dendrimers localize MyoD mRNA in presomitic tissues of the chick embryo. J Cell Biol. 2000; 149(4): 825-34.

[8] Te Pas MF, Soumillion A, Harders FL, et al. Influences of Myog genotypes on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness, and lean weight of pigs. J Anim Sci. 1999; 77(9): 2352-6.

[9] Pietrangelo T, Puglielli C, Mancinelli R, et al. Molecular basis of the Myogenic profile of aged human skeletal muscle satellite cells during differentiation. Exp Gerontol. 2009 Aug; 44(8): 523-31.

[10] Dias P, Dilling M, Houghton P. The molecular basis of skeletal muscle differentiation. Semin Diagn Pathol. 1994; 11(1): 3-14.

[11] Di Padova M, Caretti G, Zhao P, et al. MyoD acetylation influences temporal patterns of skeletal muscle gene expression. J Biol Chem. 2007; 282(52): 37650-9.

[12] Lassar AB, Davis RL, Wright WE, et al. Functional activity of Myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. Cell. 1991; 66(2): 305-15.

[13] Anthony-Cahill SJ, Benfield PA, Fairman R, et al. Molecular characterization of helix-loop-helix peptides. Science. 1992; 255(5047): 979-83.

[14] Willoughby DS, Nelson MJ. Myosin heavy-chain mRNA expression after a single session of heavy-resistance exercise. Med Sci Sports Exerc. 2002; 34(8): 1262-9.

[15] Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, et al. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. Cell. 1990; 60(5): 733-46.

[16] Ma PC, Rould MA, Weintraub H, et al. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. Cell. 1994; 77(3): 451-9.

[17] Chen JC, Goldhamer DJ. Transcriptional mechanisms regulating MyoD expression in the mouse. Cell Tissue Res. 1999; 296(1): 213-9.

[18] Dezan C, Meierhans D, Künne AG, et al. Acquisition of Myogenic specificity through replacement of one amino acid of MASH-1 and introduction of an additional alpha-helical turn. Biol Chem. 1999; 380(6): 705-10.

[19] Miano JM, Cserjesi P, Ligon KL, et al. Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. Circ Res. 1994; 75(5): 803-12.

[20] Unguez GA, Talmadge RJ, Roy RR, et al. Distinct myosin heavy chain isoform transitions in developing slow and fast cat hindlimb muscles. Cells Tissues Organs. 2000; 167(2-3): 138-52.

[21] Pavlath GK, Dominov JA, Kegley KM, et al. Regeneration of transgenic skeletal muscles with altered timing of expression of the basic helix-loop-helix muscle regulatory factor MRF4. Am J Patho. 2003; 162(5): 1685-91.

[22] Abe S, Rhee S, Iwanuma O, et al. Effect of mechanical stretching on expressions of muscle specific transcription factors MyoD, Myf-5, Myog and MRF4 in proliferated myoblasts. Anat Histol Embryol. 2009; 38(4): 305-10.

[23] Skinner MK, Rawls A, Wilson-Rawls J, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor gene family phylogenetics and nomenclature. Differentiation. 2010; 80(1): 1-8.

[24] Etzioni S, Yafe A, Khateb S, et al. Homodimeric MyoD preferentially binds tetraplex structures of regulatory sequences of muscle-specific genes. J Biol Chem. 2005; 280(29): 26805-12.

[25] Parker MH, Perry RL, Fauteux MC, et al. MyoD synergizes with the E-protein HEB beta to induce Myogenic differentiation. Mol Cell Biol. 2006; 26(15): 5771-83.

[26] Blain M, Zeng Y, Bendjelloul M, et al. Strong muscle-specific regulatory cassettes based on multiple copies of the human slow troponin I gene upstream enhancer. Hum Gene Ther. 2010; 21(1): 127-34.

[27] Johanson M, Meents H, Ragge K, et al. Transcriptional activation of the Myog gene by MEF2-mediated recruitment of myf5 is inhibited by adenovirus E1A protein. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 265(1): 222-32.

[28] Sparrow DB, Miska EA, Langley E, et al. MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. EMBO J. 1999; 18(18): 5085-98.

[29] Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. Annu Rev Cell Dev Biol. 2002; 18: 747-83.

[30] Bergstrom DA, Penn BH, Strand A, et al. Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. Mol Cell. 2002; 9(3): 587-600.

[31] Cao Y, Yao Z, Sarkar D, et al. Genome-wide MyoD binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming. Dev Cell. 2010; 18(4): 662-74.

[32] Dilworth FJ, Seaver KJ, Fishburn AL, et al. In vitro transcription system delineates the distinct roles of the coactivators pCAF and p300 during MyoD/E47-dependent transactivation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(32): 11593-8.

[33] Cao Y, Kumar RM, Penn BH, et al. Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. EMBO J. 2006; 25(3): 502-11.

[34] Sun LP, Li L, Goldstein JL, et al. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. J Biol Chem. 2005; 280(28): 26483-90.

[35] Batonnet S, Leibovitch MP, Tintignac L, et al. Critical role for lysine 133 in the nuclear ubiquitin-mediated degradation of MyoD. J Biol Chem. 2004; 279(7): 5413-20.

[36] Sartorelli V, Puri PL, Hamamori Y, et al. Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. Mol Cell. 1999; 4(5): 725-34.

[37] Kitzmann M, Fernandez A. Crosstalk between cell cycle regulators and the Myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. Cell Mol Life Sci. 2001; 58(4): 571-9.

[38] Deato MD, Marr MT, Sottero T, et al. MyoD targets TAF3/TRF3 to activate Myog transcription. Mol Cell. 2008; 32(1): 96-105.

[39] Reynaud EG, Pelpel K, Guillier M, et al. p57(Kip2) stabilizes the MyoD protein by inhibiting cyclin E-Cdk2 kinase activity in growing myoblasts. Mol Cell Biol. 1999; 19(11): 7621-9.

[40] De Angelis L, Zhao J, Andreucci JJ, et al. Regulation of vertebrate myotome development by the p38 MAP kinase-MEF2 signaling pathway. Dev Biol. 2005; 283(1): 171-9.

[41] Carvajal JJ, Keith A, Rigby PW. Global transcriptional regulation of the locus encoding the skeletal muscle determination genes Mrf4 and Myf5. Genes Dev. 2008; 22(2): 265-76.

[42] Pietersen AM, van Lohuizen M. Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. Curr Opin Cell Biol. 2008; 20(2): 201-7.

[43] Spitz F, Demignon J, Porteu A, et al. Expression of Myog during embryogenesis is controlled by Six/sine oculis homeoproteins through a conserved MEF3 binding site. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(24): 14220-5.

[44] Zetser A, Gredinger E, Bengal E. p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. J Biol Chem. 1999; 274(8): 5193-200.

[45] Han J, Jiang Y, Li Z, et al. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. Nature. 1997; 386(6622): 296-9.

[46] Perdiguero E, Ruiz-Bonilla V, Gresh L, et al. Genetic analysis of p38 MAP kinases in Myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. EMBO J. 2007; 26(5): 1245-56.

[47] Langley B, Thomas M, Bishop A, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. J Biol Chem. 2002; 277(51): 49831-40.

[48] McFarlane C, Plummer E, Thomas M, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. J Cell Physiol. 2006; 209(2): 501-14.

[49] Sun L, Liu L, Yang XJ, et al. Akt binds prohibitin 2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation. J Cell Sci. 2004; 117(Pt 14): 3021-9.

[50] Penn BH, Bergstrom DA, Dilworth FJ, et al. A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation. Genes Dev. 2004 Oct 1; 18(19): 2348-53.

[51] Kria L, Ohira A, Amemiya T. Growth factors in cultured pterygium Fibroblasts: immunohistochemical and ELISA analysis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1998; 236(9): 702-8.

[52] Lawson-Smith MJ, McGeachie JK. The identification of Myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. J Anat. 1998; 192 ( Pt 2): 161-71.

[53] Yablonka-Reuveni Z, Rudnicki MA, Rivera AJ, et al. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. Dev Biol. 1999; 210(2): 440-55.

[54] Roy K, de la Serna IL, Imbalzano AN. The Myogenic basic helix-loop-helix family of transcription factors shows similar requirements for SWI/SNF chromatin remodeling enzymes during muscle differentiation in culture. J Biol Chem. 2002; 277(37): 33818-24.

[55] Di Carlo A, De Mori R, Martelli F, et al. Hypoxia inhibits Myogenic differentiation through accelerated MyoD degradation. J Biol Chem. 2004; 279(16): 16332-8.

[56] Jennings CG. Expression of the Myogenic gene MRF4 during Xenopus development. Dev Biol. 1992; 151(1): 319-32.

[57] Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. Biochem Cell Biol. 1995; 73(9-10): 723-32.

[58] Strachan T, Read AP. PAX genes. Curr Opin Genet Dev. 1994; 4(3): 427-38.

[59] Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, et al. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. J Cell Sci. 1999; 112 ( Pt 17): 2895-901.

[60] Hasty P, Bradley A, Morris JH, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the Myog gene. Nature. 1993; 364(6437): 501-6.

[61] Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of Myogenesis. Semin Cell Dev Biol. 2005; 16(4-5): 585-95.

[62] Rampalli S, Li L, Mak E, et al. p38 MAPK signaling regulates recruitment of Ash2L-containing methyltransferase complexes to specific genes during differentiation. Nat Struct Mol Biol. 2007; 14(12): 1150-6.

[63] Cossu G, Kelly R, Tajbakhsh S, et al. Activation of different Myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. Development. 1996; 122(2): 429-37.

[64] Tapscott SJ, Weintraub H. MyoD and the regulation of Myogenesis by helix-loop-helix proteins. J Clin Invest. 1991; 87(4): 1133-8.

[65] Tapscott SJ. The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription. Development. 2005 Jun; 132(12): 2685-95.

[66] Yablonka-Reuveni Z, Day K, Vine A, et al. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. J Anim Sci. 2008; 86(14 Suppl): E207-16.

[67] De la Serna IL, Ohkawa Y, Berkes CA, et al. MyoD targets chromatin remodeling complexes to the Myog locus prior to forming a stable DNA-bound complex. Mol Cell Biol. 2005; 25(10): 3997-4009.

[68] Olson EN. Regulation of muscle transcription by the MyoD family. The heart of the matter. Circ Res. 1993; 72(1): 1-6.

[69] Pownall ME, Emerson CP Jr. Sequential activation of three Myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. Dev Biol. 1992; 151(1): 67-79.

[70] Wyzykowski JC, Winata TI, Mitin N, et al. Identification of novel MyoD gene targets in proliferating Myogenic stem cells. Mol Cell Biol. 2002; 22(17): 6199-208.

[71] Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7(7): 540-6.

#### 综述**2**

**失神经支配骨骼肌萎缩的发病机制及其治疗方法的研究进展**

当中枢神经系统或周围神经出现病变时，就会使得其所支配的骨骼肌靶器官发生瘫痪，结果导致骨骼肌不仅丧失了主动收缩功能，而且也失去了神经对骨骼肌的营养与调节作用，最终则会引发骨骼肌部分或全部萎缩。例如，当周围神经受到损伤发生断裂时，在修复的过程中神经纤维再生的速度非常缓慢，约为1mm/日；如果周围神经损伤之处距离所支配靶器官骨骼肌的距离比较长，那么就会使得靶器官骨骼肌等待再生神经重新支配的时间很长[1, 2]。也就是说靶器官骨骼肌失去神经支配的时间很长，结果会导致失去神经支配的骨骼肌发生萎缩和纤维化的程度十分明显，而且骨骼肌重新接受再生神经支配的能力也会下降，最终造成肢体功能的部分或全部永久性丧失。这种病变在臂丛损伤时尤为常见[3, 4, 5]。临床工作中，对于周围神经损伤的患者，在给予神经修复手术后， 靶器官骨骼肌萎缩就是患肢的运动功能恢复不良的一个重要原因。

目前，针对神经系统病变所引起的失神经支配骨骼肌萎缩的研究报道较少，对于周围神经损伤之后所引起的肢体运动功能障碍治疗的研究仍然主要集中在损伤神经修复的范畴，包括增强神经纤维再生的能力、提高神经纤维再生的速度，以及利用人工神经进行替代等方面的研究。作为神经系统所支配的靶器官，骨骼肌的功能状态以及萎缩程度直接决定着肢体的运动功能，是神经系统病变治疗后影响肢体功能恢复的最关键的因素，如果骨骼肌萎缩后无法重建，那么将会直接导致肢体运动功能永久性丧失，造成终生残疾[6, 7, 8]。因此，失神经支配骨骼肌萎缩已经成为进一步提高神经病变疗效的重大障碍，迫切需要探寻能够修复与再生萎缩骨骼肌细胞的方法，加强基础研究，揭示骨骼肌萎缩本质，寻

找有效预防和治疗方法，具有重大的理论意义和现实意义。

## 1、 失神经支配骨骼肌萎缩的发病机制

近年来，随着基础和临床研究的飞速发展，人们对于失神经支配骨骼肌萎缩的发病机制的研究取得了较大的进展，主要表现在以下三个方面。

71.1肌纤维自身发Th的病理变化

当骨骼肌在失去神经支配后出现萎缩时，肌纤维会发生较为明显的退行性病理变化，主要表现为多核的肌纤维细胞所含的细胞核数量变少，细胞体积变小，同时伴随着成纤维细胞出现大量增生。肌纤维的横截面积会表现为进行性下降，在神经纤维损伤发生四周后常常会下降到正常面积的35%～70%，在神经纤维损伤发生25个月后，则会丢失正常面积的90%～98%[9, 10, 11]。运动终板在神经纤维损伤后也会发生退行性改变，尤其是突触后膜会出现明显的病理改变，例如初级、次级皱折会逐渐变浅变宽；随着失去神经支配的时间延长，突触后膜及运动终板会逐渐萎缩消失[12, 13]。通常，在神经纤维损伤发生两周之后，肌纤维的细胞核已经开始表现出数量上的减少，线粒体体积增大，嵴变短或消失；在神经纤维损伤发生四周后，肌纤维的体积开始表现出缩小，肌纤维的直径变小，细胞之间的间隙增宽，成纤维细胞开始出现在肌细胞之间以填充肌纤维萎缩后留下的空隙，骨骼肌的湿重开始显著下降；在神经纤维损伤发生八周后，骨骼肌的湿重进一步明显减少，线粒体数量大量减少，部分呈空泡化，糖元颗粒减少，肌浆网扩大，肌原纤维排列紊乱，出现断裂和融合，细胞核增大，着色不均匀，边缘不光滑；Z线部分消失，出现断裂现象，肌纤维的数目和体积进一步缩小，单一肌纤维所含的细胞核的数量明显减少，核浆比增高，细胞核的体积相对较大，在单位面积内所观察到的细胞核数量相对增多[14, 15]。与此同时，结缔组织大量增生，不仅使得肌束膜增厚，而且遍布于相邻肌纤维之间的空隙内，并且将肌纤维包裹形成许多大小形态不等的肌束；此外，肌束间的毛细血管也会因受到增生结缔组织的压迫而发生萎缩消失[16, 17]。

71.2毛细血管网的病理变化

神经纤维损伤后，所支配的骨骼肌不仅会丧失运动神经功能和感觉神经功能，同时也会丧失交感神经功能。已有研究结果表明，交感神经功能的丧失在失神经支配骨骼肌萎缩时毛细血管网萎缩和纤维化过程中发挥着重要的作用

[18,19]。

在正常状态下，骨骼肌的血供非常丰富，这样才能满足骨骼肌收缩运动所需的能量供应以及代谢产物快速清除的生理代谢要求。一般来说，骨骼肌在运动状态下的耗氧量排在全身各器官的第二位，此时，即使短暂的缺血都会对骨骼肌细胞造成严重的损害。在神经纤维发生损伤后，肌纤维和毛细血管网都会发生明显的退行性改变，从数量上来看，二者在都在减少，但是，毛细血管网发生萎缩消失的时间更早，且速度更快，结果导致毛细血管的数量与肌纤维数量的比值明显减小[20, 21]。毛细血管网在数量上减少的同时，管壁增厚、官腔狭窄，导致其内的血流动力学也会发生相应的改变，血液的流量变小，流速变慢，血液淤滞，结果造成骨骼肌血供不足，处于缺血、缺氧状态，这将加速肌纤维萎缩，并促进成纤维细胞的大量增生，成纤维细胞会分泌大量的胶原纤维，胶原纤维反过来又压迫并加快毛细血管网发生萎缩消失的速度，这样就会形成恶性循环[22, 23]。

71.3肌卫星细胞的病理变化

肌卫星细胞在失神经骨骼肌中的变化近些年来日益受到人们重视。肌卫星细胞是一种具有潜在增殖分化能力的细胞，它被认为是成熟骨骼肌中储备的成肌细胞，是肌组织中的干细胞，它能分化为成熟的肌细胞并与原有的肌纤维发生融合，对骨骼肌的生长和再生修复具有重要的作用。有研究表明肌卫星细胞在肌纤维在受损坏死后会出现继发性增生，并可形成新的肌纤维[24, 25, 26]。因此肌卫星细胞对于肌纤维正常形态、结构的维持，以及受损肌纤维的再生修复具有重要作用。

在失去神经支配的早期，骨骼肌中肌卫星细胞的数量通常会增加，但是随着病程延长，肌卫星细胞的随着不断消耗，其绝对数量却会迅速减少，最终会

出现肌卫星细胞耗竭的现象。肌卫星细胞的正常增生有赖于骨骼肌的正常收缩运动刺激[27, 28]。在病程早期，肌卫星细胞的数量增加可能与早期的代偿活动有关。随着病程延长，肌卫星细胞的数量迅速减少的原因可能是：骨骼肌失去运动功能后对于肌卫星细胞的增生刺激减弱，使得肌卫星细胞经过长期待消耗后得不到及时的补充而出现数量减少。根据肌卫星细胞的数量变化的特征，可以推测，肌卫星细胞的绝对数量减少是造成长期失神经支配后骨骼肌萎缩的一个重要原因[29]。

## 2. 失神经支配骨骼肌萎缩防治的研究进展

一般认为，在神经纤维损伤后的2个月以内，其所支配的骨骼肌发生萎缩的速度较快，在病程进展至6—18个月以后，即使有再生的神经纤维重新长入骨骼肌内，骨骼肌的收缩功能通常也不可能完全恢复，因此在临床治疗方面强调对损伤的神经纤维应该进行早期治疗[30, 31]。为了尽早恢复骨骼肌的神经支配，以达到预防失神经肌骨骼肌萎缩的目的，临床上可应用神经移位术的方法来实现早期恢复神经支配。从预防骨骼肌萎缩的角度来看，神经移位术对于体积较大的骨骼肌疗效较好，但是，对于体积较小的骨骼肌，如手内在肌，则疗效不佳[32]。

目前，电刺激疗法是一种在临床上广泛应用的预防和治疗失神经支配骨骼肌萎缩的治疗方法，该疗法虽然不能从根本上逆转失神经支配骨骼肌萎缩的最终发展方向，但是可以有效延缓骨骼肌萎缩的发展进程，为促进骨骼肌接受再生神经支配并恢复收缩功能创造了一定的条件[33]。Nicolaidis等学者在采用可植入电极进行电刺激疗法的体内临床实验时得到的结论是，电刺激疗法对预防各种神经损伤所引起的失神经支配骨骼肌萎缩时的有效率为45%～93%[34]. Putman等学者在研究低频电刺激疗法对肌卫星细胞含量以及肌球蛋白表达量的影响时所得到的结论是，低频电刺激疗法可使肌卫星细胞的数量增加2.6-3.7倍，并且会使MHC -I和MHC- II的含量均增加[35]。由此可见，电刺激疗法可以有效改善骨骼肌萎缩病理变化。

与电刺激一样，被动运动也是一种在临床上常用的预防和治疗失神经支配

骨骼肌萎缩的治疗方法。Dupont-Versteegden等学者在研究被动运动延缓失神经骨骼肌萎的作用机制时得出的结论是，被动运动通过激活肌卫星细胞从而发挥延缓失神经骨骼肌萎的作用[36]。Umnova等学者在研究跑步训练对Wistar大鼠股四头肌内所含肌卫星细胞的数量的影响作用时得出的结论是，跑步训练可以将肌卫星细胞的数量较正常对照组提高约2倍，其中的原因可能是运动会导致一些肌纤维发生部分或完全损伤从而激活了肌卫星细胞的增殖[37]。

### 2.1 基因治疗技术

基因治疗(gene therapy)是目前医学领域中的研究热点，具有非常广阔的应用前景。传统的基因治疗概念是指在基因水平上对遗传性基因缺陷进行纠正，主要用于治疗遗传性基因缺陷疾病，也就是向需要接受治疗的靶细胞内导入外源性目的基因，以达到纠正或补偿其基因缺陷的治疗目的[38, 39, 40]。随着的基础研究及临床研究的不断进展，基因治疗的应用范围得到了不断的拓展，在针对后天获得性疾病的治疗方面同样得到了广泛的应用[41]。因此，从广义上讲，基因治疗是指为达到治疗目的而在基因水平进行的操作，其作用主要包括两个方面：一方面是能够纠正异常的基因，如有缺陷的基因或异常表达的基因；另一方面是能够利用特定的目的基因在体内表达特定的产物以实现对疾病的治疗作用

[42]. 基因治疗所面临的两个关键问题是：如何将外源基因准确地导入靶细胞，

以及如何精确调控外源基因合理表达。

### 2.2 基因治疗的策略

2.2.1载体的选择

在基因治疗过程中，如何将外源性目的基因准确地导入靶细胞是首先要面临的问题，因此基因转移是基因治疗时首先要解决的难题。目前，基因治疗通常借助于载体来协助外源性目的基因进入靶细胞内。较好的基因转移载体应该满足以下要求：①能够特异性地识别并结合靶细胞；②不论靶细胞处于分裂期还是非分裂期，都能够发挥较高的转染作用；③能够促使外源性目的基因在靶细胞内充分表达，并且这种表达具有可控性；④能够产生具有一定时限的治疗

作用；⑤能够将外源性目的基因整合至宿主细胞的染色体内特定的位点，或者能够能以附加体形式稳定存在于宿主细胞内而不被降解；⑥制备方法简便且重复性良好；⑦对外源性目的基因的表达应具有可调控的操纵元件；⑧不能含有可以激发宿主出现免疫反应的成分[43, 44, 45]。虽然现在依然没有完全符合上述所有要求的理想载体问世，但是目前大部分载体都基本符合上述要求。

目前，能够在真核细胞中表达外源性基因的载体主要有两类，它们分别是病毒载体和非病毒载体。以病毒载体为媒介的转基因技术称为转导，以非病毒载体为媒介的转基因技术称为转染。病毒性载体通常包括RNA病毒载体和DNA病毒载体[46]。非病毒性载体包括质粒、脂质体、DNA配体复合物、裸DNA等[47]。病毒载体是目前应用较多的一种表达载体，它的优点是转染效率较高，而且表达效率也较高；但缺点是有一定的安全性的问题。已有研究表明病毒载体的应用可以引起宿主细胞发生肿瘤等疾病，这是因为病毒载体易于插入到宿主细胞的染色体内进行整合，这就容易引起宿主细胞的染色体发生重排或者基因突变，结果会导致宿主细胞发生异常增殖并发展为肿瘤等疾病[48, 49, 50]。随着基因治疗技术的不断发展，虽然病毒载体的安全性已有很大提高，但是导致宿主细胞发生恶变的风险依然在存在。虽然通过各种努力，这方面的隐患已经有了极大程度的降低，但其仍然是一个无法彻底解决的问题，因此病毒载体在应用上受到一定的限制。腺病毒是一种常用的病毒性载体，它的优点包括：制备方法简单；能够携带较大片段的目的基因，最大可达35kb；能够转导多种细胞。缺点包括：插入的DNA片段在宿主细胞内仍以游离体形式存在，易被降解；免疫原性高，容易引起宿主反应；存在潜在的致瘤性，临床应用的安全性有待进一步提高。相比之下，非病毒载体的安全性相对更高，载体的构建方法也不是特别复杂，表达时间也能够持续几周至几个月，因此，也被很多研究采用，但是其不足之处在于转染效率有时比较低[51]。质粒载体是一种常用的非病毒载体，虽然其转染效率和表达效率均较无法高于病毒载体，但是仍然具有自身的一些优点，主要包括：第一，质粒载体的制备过程简单且重复性好，不需要有包装细胞进行

包装，能够大规模生产，来源充足；第二，质粒载体的容量较大，可以插入较大的目的基因片段；第三，对于非分裂期细胞，质粒载体也能进行转染，并进行目的基因的有效表达；第四，质粒载体的免疫原性低，毒性作用较小；第五，质粒载体基因表达持续时间相对病毒载体较短，引起基因突变或发生恶性肿瘤的可能性较小。目前应用较多的转染的试剂是阳离子脂质体，其优点主要是：对目的基因片段的长度无限制，不容易引起宿主细胞的免疫反应，不会整合入宿主细胞的染色体DNA中引起基因突变；缺点主要是转染的效率相对较低。各种载体各有优缺点，实际应用时需要根据具体情况进行选择。

2.2.2基因转移的途径

基因治疗过程中，进行基因转移的途径主要有两条，即体内基因转移途径和体外基因转移途径。利用体内基因转移途径(in vivo)进行的基因治疗又称为直接基因治疗，该疗法是将目的基因直接导入体内，并使外源性目的基因表达，以达到补充某些生物活性物质的方法[52, 53]。体内基因转移技术不需要将靶细胞从治疗的部位取出，也无需收集、培养细胞的过程，操作简单，费用低廉，具有显著的临床应用优势[54]。存在的缺点是转移效率较低，针对特异性靶细胞的选择性较差，在组织局部注射的载体很难完全导入治疗需要到达的靶细胞[55]。

利用体外基因转移途径(ex vivo)进行的基因治疗又称为间接基因治疗，操作过程较为复杂。首先需要在局部组织内收集大量的靶细胞，并将靶细胞进行体外培养增殖。然后通过载体将外源性目的基因片段导入靶细胞内进行转录表达，使的靶细胞内产生某些具有治疗作用的生物活性物质，最后再将基因转移的靶细胞移植到特定的器官或组织中，从而完成整个治疗过程[56]。间接基因治疗的优点是可以特异性地选择靶细胞的类型，无需将病毒粒子或DNA复合体直接注入到体内，能够在体外评估外源性目的基因的表达情况[57]。存在的缺点主要是步骤复杂，周期较长，费用较高[58]。虽然体外基因转移途径也有缺点，但是，目前人们广泛采用的基因转移的途径仍然是体外基因转移技术，间接基因治疗是目前基因治疗的主要方法。

2.2.3目的基因的选择

通常，获得所需目的基因的方法有以下四种方式：第一，通过从基因组文库或cDNA文库扩增出所需目的基因片段；第二，利用人工合成的方法合成出所需的目的基因片段序列；第三，通过利用RT－PCR的办法，扩增出所需的目的基因片段；第四，利用差异显示法从染色体中分离纯化出某些特殊基因的目的片段并进行扩增。目前大多研究采用以mRNA为模板，通过反转录的方法获得互补DNA(cDNA)，进而获得目的基因。

研究发现，生肌调节因子基因家族，是胚胎发育过程中调控骨骼肌发育成熟的主要基因之一，对肌细胞的发生和分化起决定作用，如果将一些外源性生肌调节因子家族成员转入非肌细胞内，那么就会激活内源性基因启动成肌分化过程，诱导非肌细胞如成纤维细胞转分化为具有收缩功能的骨骼肌细胞[59,60 ,61]。生肌调节因子基因家族包括4个成员：Myod1, Myf5, Myog和MRF4. Myod1以及

Myf5主要在诱导骨骼肌前体细胞向成肌细胞分化的过程中发挥作用，而Myog与

MRF4主要在诱导成肌细胞向终末骨骼肌纤维分化的过程中发挥作用

[62,63,64,65,66,67]. 不同的生肌调节因子具有不同的表达时间、表达水平以及不同的

功能特点，这些特点表明了不同的生肌调节因子在骨骼肌分化成熟的不同阶段发挥着不同的作用[68]。目前，国内外学者对失神经支配骨骼肌萎缩的基因治疗虽然开展了广泛探索，但是大多数仅局限于应用单基因进行治疗，而且疗效不佳。由此推测，联合应用两类最重要的生肌细胞调节因子Myod1和Myog进行基因治疗，可能会有更好的疗效。

2.2.4靶细胞的选择

多年来，失神经支配骨骼肌萎缩一直是骨科学领域中的一个重要并亟需破解的理论难题，学者们在这方面已经进行了很多研究。利用细胞移植对失神经支配骨骼肌萎缩进行治疗是目前研究的热点之一，许多相关的实验研究都报道了细胞移植在一定程度上具有治疗失神经支配骨骼肌萎缩的作用[40, 49, 50]。胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、骨骼肌成肌细胞是现在研究较多的种子细胞，然而，

对于胚胎干细胞，由于存在伦理学争议，来源稀少、获得困难，分离纯化的技术难度较大、异体移植时存在免疫排斥反应，以及具有潜在的致瘤性等诸多问题，因此距离临床实际应用还很遥远。对于骨髓间充质干细胞，因其具有多方向分化能力，故定向分化为骨骼肌的效率较低，此外，骨髓间充质干细胞同样存在潜在的致瘤性的安全问题，因此目前尚需进一步研究其临床实际应用的方法。对于骨骼肌卫星细胞，由于来源有限，数量稀少等问题同样限制了进一步的临床实际应用。由于选用患者自身的体细胞通常不会受到伦理道德的限制，而且自体细胞还能够避免机体发生免疫排斥反应，因此选用患者自身的体细胞作为种子细胞是一种较好的选择。如果能够利用取材方便且易于进行体外培养的各种组织器官的成体细胞，尤其是来源于结缔组织内部所包涵的间充质干细胞作为种子细胞，则会具有重要的临床应用价值。综上所述，寻找切实可行的自体来源的可移植细胞作为种子细胞，是利用细胞移植方法进行骨骼肌重建的一个关键性问题。

基因治疗时如何选取靶细胞是一个决定治疗成败的关键问题。靶细胞的选择取决于的特定的解剖部位中靶细胞的质量，以及取材操作的难易程度[69]。对于局部失神经支配骨骼肌萎缩的基因治疗来说，体外基因转移途径为靶细胞的选择提供很大的选择空间。选择何种细胞作为外源性目的基因的靶细胞取决于这种细胞是否容易获得，并且易于进行体外培养扩增，是否具有表达外源性目的基因的能力等因素。结缔组织中所包含的间充质干细胞是完成组织器官损伤修复病理过程必不可少的细胞，其中，成纤维细胞(Fibroblast, FB)是结缔组织中最为增生最为活跃的细胞种类，也是参与机体创伤修复过程的最重要的细胞，在机体的组织损伤修复中发挥着重要作用。成纤维细胞虽然是结缔组织中最常见的细胞类型，但是在不同类型的结缔组织中其含量是不同的。一般情况下，在相同体积的组织中，致密结缔组织所包含的成纤维细胞的密度会比疏松结缔组织多。哺乳动物机体内最大的器官是覆盖于机体表面的皮肤，它由表皮、真皮和皮下组织三层组织构成，其中真皮层所包含的主要细胞成分就是成纤维细

胞，又称为真皮成纤维细胞(Dermal Fibroblast, 真皮成纤维细胞)。真皮成纤维细胞是基础研究中常用的一种细胞，被广泛应用于分子生物学研究的许多领域，也是一种在基因治疗研究中常用的工具细胞[70, 71]。真皮成纤维细胞属于中胚层来源的间充质细胞，在哺乳动物体内分布范围最为广泛，其所在位置表浅、处于机体的外表面便于取材，且在体外培养时易于增殖成活[72, 73]。随着细胞培养技术的不断提高，目前对于真皮成纤维细胞的分离及培养技术已经比较成熟，对于其在体外生长增殖的规律也已经有了较为全面的掌握，因此，真皮成纤维细胞在基础医学研究和临床医学研究中已经有了较为较广泛的应用[74]。真皮成纤维细胞在体外培养时的适应能力与增殖能力都非常强，生命力旺盛，在经历多次传代后仍能保持旺盛的增殖能力。真皮成纤维细胞不仅对于基因转移具有良好的适应性，而且也能很好地适应外源性目的基因的转录表达，并能够在不同的诱导因素下转变成为组织工程所需的的多种种子细胞，因此，可以作为基因治疗时理想的靶细胞[75, 76, 77]。利用转基因技术能够使MRFs基因在成纤维细胞内进行转录表达，并能进一步诱导出骨骼肌特异性的蛋白成分出现表达，进而形成肌管，这提示通过基因工程可以将成纤维细胞诱导成为肌细胞，这使得成纤维细胞有望成为治疗失神经支配骨骼肌萎缩的种子细胞。

## 3. 展望

综上所述，虽然目前对于失神经支配骨骼肌萎缩的发病机制已经有了多方面的研究，但是确切的发病机制仍不能明确，故应进一步加强基础研究以解决这一难题。在治疗方面，虽然目前针对失神经支配骨骼肌萎缩的治疗已经有了许多措施，但是真正疗效确切的治疗方法还没有找的，故应进一步加强临床研究以解决治疗上的难题。随着研究的深入，失神经支配骨骼肌萎缩的相关问题终将得以明确。

参考文献：

[1] Skouras E, Ozsoy U, Sarikcioglu L, et al. Intrinsic and therapeutic factors

Determining the recovery of motor function after peripheral nerve transection. Ann Anat. 2011 Jul;193(4):286-303.

[2] Hadzic A, Williams BA, Karaca PE, et al. For outpatient rotator cuff surgery, nerve block anesthesia provides superior same-day recovery over general anesthesia. Anesthesiology. 2005 May; 102(5): 1001-7.

[3] Walsh SF. Treatment of a brachial plexus injury using kinesiotape and exercise. Physiother Theory Pract. 2010 Oct; 26(7): 490-6.

[4] Belzberg AJ, Dorsi MJ, Storm PB, et al. Surgical repair of brachial plexus injury: a multinational survey of experienced peripheral nerve surgeons. J Neurosurg. 2004 Sep; 101(3): 365-76.

[5] Songcharoen P. Management of brachial plexus injury in adults. Scand J Surg. 2008; 97(4): 317-23.

[6] Ihm PA, Samii M. Quantitative study of muscle fibre atrophy and restitution after nerve grafts. Acta Neurochir (Wien). 1976; 34(1-4): 185-93.

[7] Vinciguerra M, Musaro A, Rosenthal N. Regulation of muscle atrophy in aging and disease. Adv Exp Med Biol. 2010; 694: 211-33.

[8] Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. Int J Biochem Cell Biol. 2005 Oct; 37(10): 1974-84.

[9] Carvalho RF, Castan EP, Coelho CA, et al. Heart failure increases atrogin-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy. J Mol Histol. 2010 Feb; 41(1): 81-7.

[10] Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, et al. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. PLoS One. 2012; 7(1): e29082. Epub 2012 Jan 3.

[11] Riley DA, Bain JL, Romatowski JG, et al. Skeletal muscle fiber atrophy: altered thin filament density changes slow fiber force and shortening velocity. Am J Physiol

Cell Physiol. 2005 Feb;288(2):C360-5.

[12] Diers A, Kaczinski M, Grohmann K, et al. The ultrastructure of peripheral nerve, motor end-plate and skeletal muscle in patients suffering from spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). Acta Neuropathol. 2005 Sep; 110(3): 289-97.

[13] Simon CM, Jablonka S, Ruiz R, et al. Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet. 2010 Mar 15; 19(6): 973-86.

[14] Degens H, Koşar SN, Hopman MT, et al. The time course ofdenervation-induced changes is similar in soleus muscles of adult and old rats. Appl Physiol Nutr Metab. 2008 Apr; 33(2): 299-308.

[15] SorarùG, D'Ascenzo C, Polo A, et al. Spinal and bulbar muscular atrophy: skeletal muscle pathology in male patients and heterozygous females. J Neurol Sci. 2008 Jan 15; 264(1-2): 100-5.

[16] Mutsaers CA, Wishart TM, Lamont DJ, et al. Reversible molecular pathology of skeletal muscle in spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet. 2011 Nov 15; 20(22): 4334-44.

[17] Han R, Rader EP, Levy JR, et al. Dystrophin deficiency exacerbates skeletal muscle pathology in dysferlin-null mice. Skelet Muscle. 2011 Dec 1; 1(1): 35.

[18] Cebasek V, KubínováL, Janácek J, et al. Adaptation of muscle fibre types and capillary network to acute denervation and shortlasting reinnervation. Cell Tissue Res. 2007 Nov; 330(2): 279-89.

[19] Fujino H, Kohzuki H, Takeda I, et al. Regression of capillary network in atrophied soleus muscle induced by hindlimb unweighting. J Appl Physiol. 2005 Apr; 98(4): 1407-13.

[20] Kano Y, Shimegi S, Furukawa H, et al. Effects of aging on capillary number and

Luminal size in rat soleus and plantaris muscles. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002 Dec;57(12):B422-7.

[21] Salanova M, Schiffl G, Püttmann B, et al. Molecular biomarkers monitoring human skeletal muscle fibres and microvasculature following long-term bed rest with and without countermeasures. J Anat. 2008 Mar; 212(3): 306-18.

[22] Okiura T, Nagatomo F, Gu N, et al. Bone density of the femur and fibercross-sectional area and oxidative enzyme activity of the tibialis anterior muscle in type II collagen-induced arthritic mice. J Physiol Sci. 2008 Aug; 58(4): 221-7.

[23] Coutinho EL, DeLuca C, Salvini TF, et al. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. Connect Tissue Res. 2006; 47(5): 278-86.

[24] Dasarathy S, Dodig M, Muc SM, et al. Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastamosis rat. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Dec; 287(6): G1124-30.

[25] Hall JK, Banks GB, Chamberlain JS, et al. Prevention of muscle aging by myofiber-associated satellite cell transplantation. Sci Transl Med. 2010 Nov 10; 2(57): 57ra83.

[26] Van der Meer SF, Jaspers RT, Jones DA, et al. Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle. Muscle Nerve. 2011 Feb; 43(2): 212-22.

[27] Malatesta M, Meola G. Structural and functional alterations of the cell nucleus in skeletal muscle wasting: the evidence in situ. Eur J Histochem. 2010 Oct 19; 54(4): e44.

[28] Zhang BT, Yeung SS, Liu Y, et al. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension.

BMC Cell Biol. 2010 Nov 18;11:87.

[29] Pietrangelo T, Puglielli C, Mancinelli R, et al. Molecular basis of the Myogenic profile of aged human skeletal muscle satellite cells during differentiation. Exp Gerontol. 2009 Aug; 44(8): 523-31.

[30] Bodine-Fowler SC, Allsing S, Botte MJ. Time course of muscle atrophy and recovery following a phenol-induced nerve block. Muscle Nerve. 1996 Apr; 19(4): 497-504.

[31] Gardetto A, Thaler C, Kiechl S, et al. Isolated compression of the pectoral nerve resulting in atrophy of the major pectoral muscle. Muscle Nerve. 2003 Dec; 28(6): 760-3.

[32] Sharples AP, Stewart CE. Myoblast models of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011 May; 14(3): 230-6.

[33] Gigo-Benato D, Russo TL, Geuna S, et al. Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. Muscle Nerve. 2010 May; 41(5): 685-93.

[34] Nicolaidis SC, Williams HB. Muscle preservation using an implantable electrical system after nerve injury and repair. Microsurgery. 2001; 21(6): 241-7.

[35] Martins KJ, Gordon T, Pette D, et al. Effect of satellite cell ablation onlow-frequency-stimulated fast-to-slow fibre-type transitions in rat skeletal muscle. J Physiol. 2006 Apr 1; 572(Pt 1): 281-94.

[36] Dupont-Versteegden EE, HouléJD, Dennis RA, et al. Exercise-induced gene expression in soleus muscle is dependent on time after spinal cord injury in rats. Muscle Nerve. 2004 Jan; 29(1): 73-81.

[37] Seene T, Kaasik P, Umnova M. Structural rearrangements in contractile apparatus and resulting skeletal muscle remodelling: effect of exercise training. J Sports Med Phys Fitness. 2009 Dec; 49(4): 410-23.

[38] Qiao C, Koo T, Li J, et al. Gene therapy in skeletal muscle mediated by adeno-associated virus vectors. Methods Mol Biol. 2011; 807: 119-40.

[39] Liu TS, Weiss KR, Fu FH, et al. Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic surgery. Instr Course Lect. 2006; 55: 597-611.

[40] Musgrave DS, Fu FH, Huard J. Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic surgery. J Am Acad Orthop Surg. 2002 Jan-Feb; 10(1): 6-15.

[41] Madry H, Kohn D, Cucchiarini M. Gene therapy in orthopaedic surgery Orthopade. 2006 Nov; 35(11): 1193-202

[42] Wu X, Wang S, Chen B, et al. Muscle-derived stem cells: isolation, characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. Cell Tissue Res. 2010 Jun; 340(3): 549-67.

[43] Hakim CH, Li D, Duan D. Monitoring murine skeletal muscle function for muscle gene therapy. Methods Mol Biol. 2011; 709: 75-89.

[44] Viggeswarapu M, Boden SD, Liu Y, et al. Adenoviral delivery of LIM mineralization protein-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo. J Bone Joint Surg Am. 2001 Mar; 83-A(3): 364-76.

[45] Hannallah D, Peterson B, Lieberman JR, et al. Gene therapy in orthopaedic surgery. Instr Course Lect. 2003; 52: 753-68.

[46] Larocca C, Schlom J. Viral vector-based therapeutic cancer vaccines. Cancer J. 2011 Sep-Oct; 17(5): 359-71.

[47] Perrie Y, Gregoriadis G. Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. Biochim Biophys Acta. 2000 Jul 3; 1475(2): 125-32.

[48] Barouch DH. Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. Curr Opin HIV AIDS. 2010 Sep; 5(5): 386-90.

[49] Musgrave DS, Bosch P, Lee JY, et al. Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. Clin Orthop Relat Res. 2000 Sep; (378): 290-305.

[50] Jane JA Jr, Dunford BA, Kron A, et al. Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenetic protein (BMP) -4 and BMP-6 gene transfer. Mol Ther. 2002 Oct; 6(4): 464-70.

[51] Dalby B, Cates S, Harris A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Methods. 2004 Jun; 33(2): 95-103.

[52] Gregory-Evans K, Bashar AM, Tan M. Ex vivo gene therapy and vision. Curr Gene Ther. 2012 Apr 1; 12(2): 103-15.

[53] Jüllig M, Zhang WV, Stott NS. Gene therapy in orthopaedic surgery: the current status. ANZ J Surg. 2004 Jan-Feb; 74(1-2): 46-54.

[54] Neff T, Beard BC, Kiem HP. Survival of the fittest: in vivo selection and stem cell gene therapy. Blood. 2006 Mar 1; 107(5): 1751-60.

[55] Bonaros N, Bernecker O, Ott H, et al. Cell- and gene therapy for ischemic heart disease. Minerva Cardioangiol. 2005 Aug; 53(4): 265-73.

[56] Aggarwal R, Lu J, Pompili VJ, et al. Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application. Curr Mol Med. 2012 Jan; 12(1): 34-49.

[57] Pan D. In situ (in vivo) gene transfer into murine bone marrow stem cells. Methods Mol Biol. 2009; 506: 159-69.

[58] Preechapornkul P, Imwong M, Chotivanich K, et al. Plasmodium falciparum pfmdr1 amplification, mefloquine resistance, and parasite fitness. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Apr; 53(4): 1509-15.

[59] Cole NJ, Hall TE, Martin CI, et al. Temperature and the expression of Myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp Cyprinus carpio L. J Exp Biol. 2004 Nov; 207(Pt 24): 4239-48.

[60] Huang J, Weintraub H, Kedes L. Intramolecular regulation of MyoD activation

Domain conformation and function. Mol Cell Biol. 1998; 18(9): 5478-84.

[61] Rudnicki MA, Le Grand F, McKinnell I, et al. The molecular regulation of muscle stem cell function. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008; 73: 323-31.

[62] Weintraub H, Genetta T, Kadesch T. Tissue-specific gene activation by MyoD: determination of specificity by cis-acting repression elements. Genes Dev. 1994; 8(18): 2203-11.

[63] Seale P, Ishibashi J, Holterman C, et al. Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient Myogenic cell. Dev Biol. 2004; 275(2): 287-300.

[64] Cusella-De Angelis MG, Lyons G, Sonnino C, et al. MyoD, Myog independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. J Cell Biol. 1992; 116(5): 1243-55.

[65] Megeney LA, Kablar B, Garrett K, et al. MyoD is required for Myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. Genes Dev. 1996; 10(10): 1173-83.

[66] Gerhart J, Baytion M, DeLuca S, et al. DNA dendrimers localize MyoD mRNA in presomitic tissues of the chick embryo. J Cell Biol. 2000; 149(4): 825-34.

[67] Te Pas MF, Soumillion A, Harders FL, et al. Influences of Myog genotypes on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness, and lean weight of pigs. J Anim Sci. 1999; 77(9): 2352-6.

[68] Cabeço LC, Budri PE, Baroni M, et al. Maternal protein restriction induce skeletal muscle changes without altering the MRFs MyoD and Myog expression in offspring. J Mol Histol. 2012 Apr 27. [Epub ahead of print]

[69] Zhang Y, Chee A, Thonar EJ, et al. Intervertebral disk repair by protein, gene, or cell injection: a framework for rehabilitation-focused biologics in the spine. PM R. 2011 Jun; 3(6 Suppl 1): S88-94.

[70] Ishihara A, Zekas LJ, Weisbrode SE, et al. Comparative efficacy of Dermal

Fibroblast-mediated and direct adenoviral bone morphogenetic protein-2 gene therapy for bone regeneration in an equine rib model. Gene Ther. 2010 Jun;17(6):733-44.

[71] Tanaka M, Kogawa K, Nakamura K, et al. Anti-metastatic gene therapy utilizing subcutaneous inoculation of EC-SOD gene transduced autologous Fibroblast suppressed lung metastasis of Meth-A cells and 3LL cells in mice. Gene Ther. 2001 Jan; 8(2): 149-56.

[72] Yogalingam G, Crawley A, Hopwood JJ, et al. Evaluation of Fibroblast-mediated gene therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI. Biochim Biophys Acta. 1999 Feb 24; 1453(2): 284-96.

[73] Luo Y, Fan Y, Zhou B, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from skin Fibroblasts of a patient with olivopontocerebellar atrophy. Tohoku J Exp Med. 2012; 226(2): 151-9.

[74] Tian C, Ambroz RJ, Sun L, et al. Direct conversion of Dermal Fibroblasts into neural progenitor cells by a novel cocktail of defined factors. Curr Mol Med. 2012 Feb; 12(2): 126-37.

[75] Yan WF, Murrell DF. Fibroblast-based cell therapy strategy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. Dermatol Clin. 2010 Apr; 28(2): 367-70

[76] Kern JS, Loeckermann S, Fritsch A, et al. Mechanisms of Fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysis bullosa: high stability of collagen VII favors long-term skin integrity. Mol Ther. 2009 Sep; 17(9): 1605-15.

[77] Cao X, Li Q, Ju DW, et al. Enhanced antitumor effects of bone marrow transplantation in combination with Fibroblast-mediated IL-2 and IL-3 gene therapy. Transplantation. 1999 May 15; 67(9): 1242-50.

**攻读学位期间发表文章情况**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **论文题目** | **作者** | **刊物名称，年，卷**  **（期）：起止页码** | **收录**  **情况** |
|  | A highly selective OFF |  |  |  |
|  | –ON fluorescent sensor | Huili Chen, Wei | Chem. Commun., |  |
| 1 | For zinc in aqueous | Gao, Miaoli Zhu, | 2010, 46, 8389– | SCI |
|  | Solution and living | Hongfei Gao | 8391 |  |
|  | cellsw |  |  |  |
|  | Myogenic Conversion of |  |  |  |
| 2 | Bladder Fibroblasts by Construction and Expression of Eukaryotic  Expression Vector of | Hongfei Gao, Bingsheng Liang, Dongwen Wang | AJB, 2011,10(83):  19280-19285 | SCI |
|  | Myod1 Gene |  |  |  |
| 3 | Measurement of Salivary Resistin Level in Patients with Type 2 Diabetes | Jinhua Yin, Hongfei Gao, Jing Yang | International Journal of Endocrinology,201  2, 2012: 1-5 | SCI |
| 4 | Myod1 和 Myog 真核共表达载体构建及鉴定 | 高宏飞，梁炳生， 双卫兵 | 中国组织工程研  究，2013，8，已接受 |  |

致 谢

在此论文完成之际，首先向尊敬的导师梁炳生教授致以崇高的敬意和衷心的感谢！在攻读博士学位期间，导师给了我无微不至的关心和认真细致的指导。 从课题设计、具体实施到论文撰写，导师都倾注了大量的心血，我从导师身上学到的知识将令我终生受益。导师渊博的学识、开阔的思路、敏锐的洞察力、活跃的思维、严谨的治学态度和对科学的不懈追求，都是我立身处世的楷模，在不断地激励着我前进。导师精益求精的敬业精神、诚恳正直的做人准则和高风亮节的道德品质，都深深的感动着我，令我终身难忘，不仅是我永远学习的楷模，更将激励我在事业上不断地探索和进取。

同时，衷心感谢ft西医科大学第二医院骨科的全体老师，在学习、工作中给予我的大力支持和无私帮助。

最后，衷心感谢我的家人和所有关心我的人，在工作和生活中给予我的鼓励和帮助。

**作者简历**

姓 名：高宏飞 性 别：男

出生年月：1975. 6 民 族：汉

籍贯：ft西代县教育简历

1988年9月——1991年7月 大同一中 初中

1991年9月——1994年7月 大同一中 高中

1994年9月——1999年7月 ft西医科大学 本科 临床医学

2002年9月——2005年7月 ft西医科大学 硕士研究生 外科学