

伴有下斜肌功能亢进外斜 V 征眼外肌 myogenin 的研究

任 晔¹, 严 宏²

作者单位:¹(710054) 中国陕西省西安市卫生学校;²(710038) 中国陕西省西安市, 第四军医大学唐都医院眼科
作者简介:任晔, 毕业于第四军医大学, 硕士, 研究方向:小儿斜视及弱视。

通讯作者:任晔. renyekx@163.com

收稿日期:2014-07-07 修回日期:2014-12-22

Muscular expression of myogenin in V-pattern exotropia with inferior oblique overaction patients

Ye Ren¹, Hong Yan²

¹Xi'an Health School, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China;²Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Ye Ren. Xi'an Health School, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. renyekx@163.com

Received:2014-07-07 Accepted:2014-12-22

Abstract

• AIM: To study the number of myogenin-positive activated satellite cells in the inferior oblique muscles and the medial muscles of V-pattern exotropia with inferior oblique overaction, to further explore the possible etiological factors of V-pattern exotropia with inferior oblique overaction.

• METHODS: The inferior oblique muscles and the medial muscles were cut from V-pattern exotropia patients with inferior oblique overaction during strabismus operation treated as the strabismus group. Cross sections were stained immunohistochemically for the presence of activated satellite cells, as identified by myogenin immunoreactivity. The inferior oblique muscles and the medial muscles were obtained from the corneal transplant donors (six eyes of six cases), which treated as the control group.

• RESULTS: The frequency of myogenin-positive satellite cells of the inferior oblique muscles was (22.7±7.03)% and (4.2±0.75)% in the strabismus group and the control group. Significant differences existed in the expression of myogenin in two groups ($P<0.05$). Again, the frequency of myogenin-positive satellite cells of the medial muscles was (2.2±0.75)% and (4.5±1.05)% in the strabismus group and the control group. Significant differences also existed in the expression of myogenin in two groups ($P<0.05$).

• CONCLUSION: It is first report that myogenin-positive

satellite cells presents in extraocular muscles of V-pattern exotropia with inferior oblique overaction. The current results suggest that myogenin is one of possible etiological factors of V-pattern exotropia with inferior oblique overaction.

• KEYWORDS: V-pattern exotropia; inferior oblique muscle; medial muscle; myogenin

Citation: Ren Y, Yan H. Muscular expression of myogenin in V-pattern exotropia with inferior oblique overaction patients. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(1):162-164

摘要

目的: 观察伴有下斜肌功能亢进的外斜 V 征患者下斜肌和内直肌中 myogenin 活性卫星细胞数量的变化, 探讨伴有下斜肌功能亢进的外斜 V 征的可能发病原因。

方法: 将伴有下斜肌功能亢进外斜 V 征患者 6 例中切除的下斜肌及内直肌作为斜视组, 行 myogenin 免疫组织化学染色, 统计 myogenin 阳性染色的卫星细胞核数; 角膜移植供体的下斜肌及内直肌 (6 例) 作为对照组。

结果: 斜视组和对照组下斜肌中 myogenin 免疫染色阳性肌卫星细胞数占总细胞数比例分别为 (22.7±7.03)% 和 (4.2±0.75)%, 具有统计学差异 ($P<0.05$)。斜视组和对对照组内直肌中 myogenin 免疫染色阳性的肌卫星细胞数分别为 (2.2±0.75)% 和 (4.5±1.05)%, 具有统计学差异 ($P<0.05$)。

结论: 首次报道伴有下斜肌功能亢进外斜 V 征患者眼外肌中表达 myogenin 免疫染色阳性肌卫星细胞的变化。myogenin 可能是伴有下斜肌功能亢进外斜 V 征的致病因素。

关键词: 外斜 V 征; 下斜肌; 内直肌; myogenin

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.1.49

引用: 任晔, 严宏. 伴有下斜肌功能亢进外斜 V 征眼外肌 myogenin 的研究. 国际眼科杂志 2015;15(1):162-164

0 引言

肌卫星细胞作为肌细胞的前体细胞, 在动物出生后肌肉的生长、发育和再生过程中起十分重要的作用^[1-3]。当处于静息状态的卫星细胞受到外界刺激被激活后, 传代产生肌源性细胞, 经过多次传代后最终分化融合, 形成多核肌管^[4]。生肌调节因子 (myogenic differentiation antigen, MRFs) 是肌肉形成的主要调节因子, 有 4 个成员, 分别是 MyoD, Myf5, myogenin 和 MRF4。其中, Myf5 和 MyoD 属于初级生肌调节因子, 决定着肌卫星细胞是否能激活并具有成肌特性; myogenin (肌细胞生成素) 和 MRF4 属于次级生肌调节因子, 发挥着调节卫星细胞终末分化为肌纤维的功能。在这两个阶段中, MyoD 和 myogenin

表1 斜视组病例资料

编号	年龄	性别	病程	研究对象	斜视度	V征
①	5岁	女	5a	LIO, LMR	-40 [△] L/R25 [△]	Up-40 [△] Down-25 [△]
②	6岁	女	4a	LIO, RMR	-35 [△] L/R12 [△]	Up-35 [△] Down-14 [△]
③	6岁	男	2a	LIO, LMR	-35 [△]	Up-50 [△] Down-10 [△]
④	6岁	女	5a	LIO, LMR	-35 [△] L/R10 [△]	Up-35 [△] Down-15 [△]
⑤	7岁	男	1a	RIO, LMR	-50 [△]	Up-45 [△] Down-16 [△]
⑥	8岁	女	6a	LIO, LMR	-40 [△] L/R7 [△]	Up-25 [△] Down-10 [△]

注: IOM: 下斜肌; MR: 内直肌。

分别起着主要作用。处于静止状态的肌卫星细胞不能检测到生肌调节因子的表达,当卫星细胞被激活后开始分裂、增殖、分化, MRFs 家族开始陆续表达,增殖的卫星细胞相互融合,并形成肌管^[4]。其中, myogenin 是唯一的无可取代的生肌调节因子。因此, myogenin 是骨骼肌再生的重要标志。

人类眼外肌属于骨骼肌,为横纹肌,具有骨骼肌的特点。与其他骨骼肌不同的是,眼外肌具有终生不断自我更新和塑形的能力。近年来,随着越来越多对斜视患者眼外肌病理形态学的观察和自身组织学的研究,眼外肌自身肌源性组织学特性可能是导致斜视的原因。本研究主要观察伴有下斜肌功能亢进的外斜 V 征患者下斜肌和内直肌中 myogenin 活性卫星细胞数量的变化,探讨伴有下斜肌功能亢进的外斜 V 征的可能发病原因。

1 对象和方法

1.1 对象 收集 2011-01/09 第四军医大学唐都医院眼科收住院的伴有下斜肌功能亢进的外斜 V 征患者 6 例做为斜视组(表 1),年龄分布于 5~8(平均 6)岁,并且手术方式为下斜肌部分切除+内直肌缩短术及联合外直肌后徙术。所有病例除斜视、弱视、屈光不正外,患者均无神经系统疾病,无颅面部畸形,无其他眼病史,无家族遗传病史。V 现象正上方与正下方斜视度相差 $\geq 15^{\Delta}$,以向正上方与正下方转眼 25° 角之内的外斜视度作为标准。角膜移植供体的下斜肌及内直肌(6 例)做为对照组,均为男性,年龄 35~50 岁,且供体无斜视和神经肌肉疾病病史。收集斜视矫正术中截取的下斜肌及内直肌,将截取的肌肉立即置于 4% 甲醛溶液中固定。

1.2 方法 免疫组织化学染色检测 myogenin 阳性表达:标本固定 12~24h,常规脱水,石蜡包埋。各标本眼外肌行切片,层厚 $3\mu\text{m}$,行 myogenin 免疫组织化学染色。血清封闭切片,滴加一抗,一抗为鼠抗人单克隆抗体 myogenin (Abcam 公司),浓度为 1:50。4℃ 过夜后 37℃ 复温 45min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,滴加二抗(壮志技术生物有限公司),PBS 冲洗, DAB 显色。PBS 替代一抗作为空白对照。图像处理采用 Olympus IX50 倒置显微镜和 PM304 曝光控制系统对染色结果进行显微照相。Myogenin 阳性表达为细胞核内出现棕黄色的颗粒。应用高倍显微镜($\times 400$)每张切片随机取 5 个视野计数,共计数 100 根肌纤维中的阳性肌卫星细胞核数目。

统计学分析:应用 SPSS 12.0 软件包进行统计分析,对斜视组和对照组眼外肌 myogenin 免疫染色阳性肌卫星细胞数目进行两组间 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 下斜肌中卫星细胞 myogenin 的表达 斜视组及对照组下斜肌肌卫星细胞中的 myogenin 表达见图 1~2。结果显示, myogenin 在斜视组及对照组下斜肌肌卫星细胞中的阳性表达率分别为 $(22.7 \pm 7.03)\%$ 和 $(4.2 \pm 0.75)\%$ 。采用两组间 *t* 检验,两组间具有统计学差异($P < 0.05$)。

2.2 内直肌中卫星细胞 myogenin 的表达 斜视组及对照组内直肌肌卫星细胞中的 myogenin 表达见图 3~4。结果显示 myogenin 在斜视组及对照组内直肌肌卫星细胞中的阳性表达率分别为 $(2.2 \pm 0.75)\%$ 和 $(4.5 \pm 1.05)\%$ 。采用两组间 *t* 检验,两组间具有统计学差异($P < 0.05$)。

3 讨论

V 型斜视是 A-V 综合征中较为常见的一种斜视,通常合并水平斜视,其中外斜位较为常见。关于 A-V 综合征的病因目前尚无统一定论。近年来,大量研究认为,眼外肌自身肌源性组织学特性可能是导致斜视的原因。在成熟的未受损伤的骨骼肌中,卫星细胞处于静息状态,但 McLoon 等研究发现,正常成熟的小鼠^[5]、兔^[6]、猴子和人类^[7]的眼外肌中仍然存在着少量活性卫星细胞。对斜视患者眼外肌卫星细胞活性的研究越来越受到专家的关注。目前对眼外肌卫星细胞的研究认为:眼外肌组织病理形态学的改变是由活性肌卫星细胞数目的改变所导致,眼外肌功能的异常与其自身组织特性有关,并且这可能是斜视的病因。

MRFs 是肌肉形成的主要调节因子,在肌肉的再生和发育过程中发挥着关键作用。在生肌调节因子的 4 个成员中, MyoD 和 myogenin 是活性卫星细胞的两个很好的标记蛋白。Myogenin 是唯一的无可取代的生肌调节因子, myogenin 是骨骼肌再生的重要标志。Antunes-Foschini 等^[8]研究发现:功能亢进的下斜肌中 MyoD 和 myogenin 免疫染色阳性的肌卫星细胞表达率均高于正常组,并得出结论:活性肌卫星细胞数量的增加可能是下斜肌功能亢进、肌肉收缩力量增强的原因。

本实验对伴有下斜肌功能亢进的外斜 V 征眼外肌的研究结果与以上结果相似。在肌肉组织受到外界刺激损

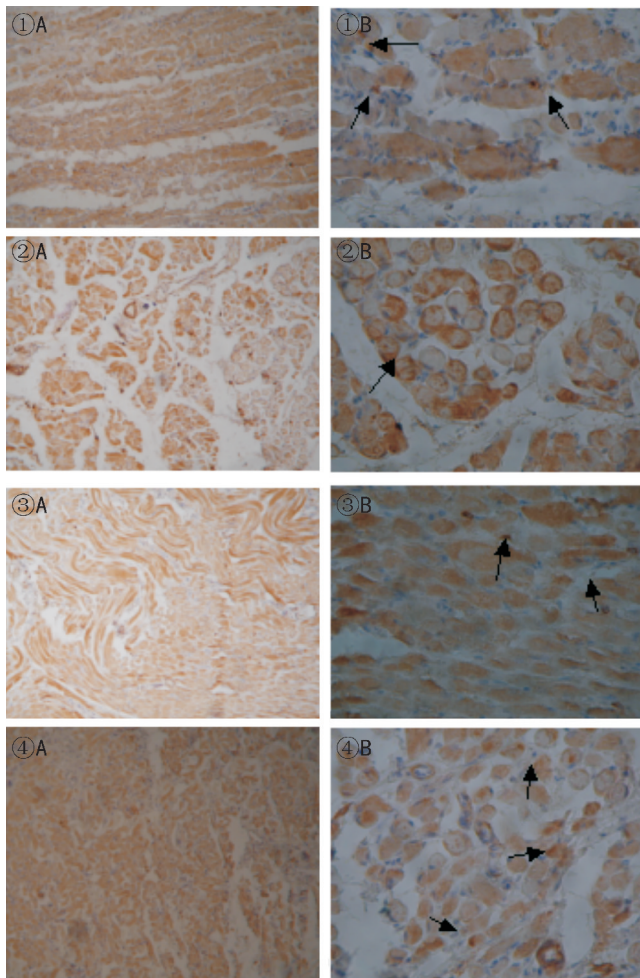


图1 斜视组下斜肌 myogenin 的表达(箭头所示为棕黄色细胞核) A:×100;B:×400。
图2 对照组下斜肌 myogenin 的表达(箭头所示为棕黄色细胞核) A:×100;B:×400。
图3 斜视组内直肌 myogenin 的表达(箭头所示为棕黄色细胞核) A:×100;B:×400。
图4 对照组内直肌 myogenin 的表达(箭头所示为棕黄色细胞核) A:×100;B:×400。

伤后,卫星细胞在肌纤维的再生修复过程中起着非常重要的作用,也是肌纤维生长发育时细胞核的主要来源。处于正在生长发育和再生状态的肌组织中活性卫星细胞的数量明显增加,卫星细胞处于增殖分化阶段,或者正在融入已有的肌纤维中,或者准备生成新的肌纤维。在本实验研究中,斜视组中下斜肌的 myogenin 免疫染色阳性的卫星

细胞表达率明显高于正常对照组,这与正处于生长发育和再生状态的肌组织表现相似。功能亢进的下斜肌中出现大量的活性卫星细胞可能通过参与肌纤维的再生和重塑过程,导致肌纤维肥大增粗,肌肉力量增加,发育不平衡,从而引起斜视。因此,功能亢进下斜肌中出现大量活性卫星细胞与下斜肌功能的改变有着密切关系。

在本研究中,斜视组的内直肌中 myogenin 免疫染色阳性的卫星细胞表达率明显低于正常对照组。但由于本实验样本量较少($n < 6$),该统计结果仅能提供参考,还需扩大样本量有待进一步研究。我们推测可能是由于卫星细胞的减少导致眼外肌的自我修复功能受到抑制,破坏了肌再生-凋亡平衡,进而引起肌纤维的萎缩等变性,导致肌力不平衡,产生斜视。

本研究观察了6例伴有下斜肌功能亢进的外斜V征患者的下斜肌和弱侧内直肌的 myogenin 活性的变化,发现 myogenin 免疫染色阳性的卫星细胞表达的变化是伴有下斜肌功能亢进外斜V征的可能致病因素。但导致斜视眼外肌卫星细胞活性变化的根本原因目前尚不清楚,还需进一步深入研究。

参考文献

- 1 Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, *et al* . Isolation of adult mouse myogenic progenitors; functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell* 2004;119(4):543-554
- 2 Collins CA, Olsen I, Zammit PS, *et al* . Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 2005;122(2):289-301
- 3 Montarras D, Morgan J, Collins C, *et al* . Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 2005; 309 (5743): 2064-2067
- 4 Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84(1):209-238
- 5 McLoon LK, Wirtschafter J. Activated satellite cells are present in uninjured extraocular muscles of mature mice. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2002;100:119-123
- 6 McLoon LK, Wirtschafter J. Continuous myonuclear addition to single extraocular myofibers in uninjured adult rabbits. *Muscle Nerve* 2002;25(3):348-358
- 7 McLoon LK, Wirtschafter J. Activated satellite cells in extraocular muscle of normal adult monkeys and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):1927-1932
- 8 Antunes-Foschini RM, Ramalho FS. Increased frequency of activated satellite cells in overacting inferior oblique muscles from humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(8):3360-3365