

國立臺灣體育學院競技運動學系
碩士學位論文

探討活化的吞噬細胞對 C₂C₁₂ 肌肉細胞
移動速度的影響

**EFFECTS OF THE ACTIVATED MACROPHAGES
ON THE MIGRATION OF C₂C₁₂ MYOGENIC CELLS**



研究生：黃淑宜 撰

指導教授：方世華 教授

中華民國 99 年 12 月

中文摘要

骨骼肌具有自我再生的能力，透過位於肌纖維膜及基底層的肌肉前趨細胞進行增生及分化，最後形成具有功能性的肌纖維。當肌肉損傷時會產生一連串的免疫反應，嗜中性白血球、單核球及巨噬細胞會移至損傷部位，然後釋放相關的發炎物質，促進發炎反應進行，這些物質可以吸引肌肉前趨細胞移至損傷部位，使肌纖維得到修復。

研究指出，高濃度的腫瘤壞死因子- α (TNF- α)及介白素-6 (IL-6)會造成骨骼肌蛋白質流失及肌肉萎縮，因此，本研究擬觀察活化的吞噬細胞所分泌的 TNF- α 及 IL-6 對 C₂C₁₂ 肌肉細胞移動能力的影響。結果發現，巨噬細胞釋放的 TNF- α 及 IL-6 會造成肌原母細胞及肌小管細胞的移動速度變慢。此外，單純外加細胞激素 TNF- α 或 IL-6 同樣也會抑制肌原母細胞及肌小管細胞的移動速度，因此我們認為，TNF- α 及 IL-6 可能與肌肉細胞的移動速度相關。

此外，運動時肌肉組織往往是處於較低氧氣濃度的狀態下，因此我們也觀察在低氧條件下活化的吞噬細胞培養液對肌肉細胞移動能力的影響。結果發現，低氧會減慢肌原母細胞及肌小管細胞的移動速度，而加入活化後的吞噬細胞培養液對肌原母細胞及肌小管細胞的移動抑制更為明顯。我們認為在低氧環境中，肌肉細胞的正常功能及代謝可能會跟著改變，進而影響其移動速度。另外，實驗結果也發現，無論在正常氧分壓或低氧環境下，肌小管細胞的移動速度都比肌原母細胞慢，其原因可能是因為在正常的生理過程中，肌纖維的再生能力主要是透過肌原母細胞的增生及分化來完成。

關鍵字：細胞激素、肌肉細胞、缺氧

ABSTRACT

Skeletal muscle has the ability to regenerate fully functional myofibers by the proliferation and differentiation of myogenic precursor cells that are located in the sarcolemma and basal layers. Muscle injury triggers a series of immune responses. Neutrophils, monocytes and macrophages migrate to the injury site and release proinflammatory factors that promote acute inflammation and attract myogenic precursors migrate to the injury site and repair injured myofibers.

Studies indicate that high concentrations of TNF- α and IL-6 lead to a significant loss of skeletal muscle protein and muscular dystrophy. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of TNF- α and IL-6 secreted by activated macrophages on the migration of C₂C₁₂-derived myogenic cells. Results show that TNF- α and IL-6 secreted by activated macrophages suppressed the myoblasts and myotubes migration. Therefore, we regard that TNF- α and IL-6 may be related to the migration speed of myogenic cells.

Besides, muscle tissue is frequently exposed to hypoxia during exercise. Therefore, we also observed the effects of activated macrophage conditioned medium to the migration of myogenic cells under hypoxia. Results show that the myoblasts and myotubes migration was inhibited by hypoxia. In addition, activated macrophage conditioned medium further

suppressed the myoblasts and myotubes migration. On the other hand, experimental results reveal that myotubes migrate slower than myoblasts under normoxia and hypoxia. This may be due to the fact that myofibers regeneration depends on myoblasts proliferation and differentiation in normal physiological processes.

Key words: cytokine, myogenic cell, hypoxia

謝誌

終於完成碩士論文了，在就讀研究所的三年半期間，真的非常感謝我的指導教授方世華老師及研究助理史佩玉學姊，因為她們不厭其煩的指導及磨練，讓一個對免疫學及免疫相關實驗完全不懂的我，變成為雖然稱不上是佼佼者，但卻讓我對運動免疫有更進一步的了解，並且也享受在實驗的樂趣當中。

所謂嚴師出高徒，我相信只有教授的認真執著，才會使他的學生成長，雖然求學當中也有辛苦的一面，但只要把吃苦當吃補，一定會獲得加倍的收穫。

雖然在學期間我的表現不盡理想，自覺自己應該還可以再投入更多的努力去學習，所以心中難免有些許憾事，期望自己經過這段期間的磨練，以後能變得更積極，更具有求知慾望。

此外，也要感謝張振崗老師及巫錦霖老師擔任學生的論文口試審查委員，因為有了他們的指導及修正，使得本論文更具完整性。

目 錄

| | |
|--|------|
| 中文摘要 | I |
| ABSTRACT | III |
| 謝 誌 | V |
| 圖 目 錄 | VIII |
| 表 目 錄 | IX |
| 第一章 緒 論 | 1 |
| 第一節 研究背景 | 1 |
| 第二節 研究目的 | 2 |
| 第三節 名詞解釋 | 3 |
| 第二章 文 獻 探 討 | 5 |
| 第一節 肌肉細胞的形成與分化 | 5 |
| 第二節 肌肉損傷後的修復及再生 | 7 |
| 第三節 巨噬細胞與細胞激素對損傷肌肉的作用 | 10 |
| 第四節 不同的氧分壓對肌肉細胞的影響 | 13 |
| 第三章 研究 方 法 與 步 驟 | 15 |
| 第一節 實 驗 設 計 | 15 |
| 第二節 實 驗 材 料 與 方 法 | 17 |
| 壹、細胞培養 | 17 |
| (一) 細胞株 | 17 |
| (二) 細胞繼代 | 17 |
| (三) 細胞保存方式 | 18 |
| (四) 肌原母細胞分化成肌小管細胞的方法 | 18 |
| 貳、Eosin Y 染色法 | 18 |
| 參、活化吞噬細胞 RAW264.7 培養液與 C ₂ C ₁₂ 細胞 | |

| | |
|---|----|
| 共同培養的方式 | 19 |
| 肆、C ₂ C ₁₂ 細胞移動速度百分比的分析方式 | 19 |
| 伍、酵素免疫分析法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) | 20 |
| 陸、統計分析 | 21 |
| 第四章 結果 | 22 |
| 第一節 小鼠 C ₂ C ₁₂ 肌原母細胞與肌小管細胞之型態 .. | 22 |
| 第二節 正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液對肌原母細胞移動速度的影響 | 23 |
| 第三節 低氧常壓環境下活化的吞噬細胞培養液對肌原母細胞移動速度的影響 | 24 |
| 第四節 正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液對肌小管細胞移動速度的影響 | 25 |
| 第五節 低氧常壓環境下活化的吞噬細胞培養液對肌小管細胞移動速度的影響 | 26 |
| 第六節 正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液中細胞激素的濃度 | 27 |
| 第七節 正常氧分壓下 TNF- α 與 IL-6 對肌原母細胞之移動速度的影響 | 28 |
| 第八節 正常氧分壓下 TNF- α 與 IL-6 對肌小管細胞之移動速度的影響 | 29 |
| 第五章 討論 | 30 |
| 圖目錄 | 35 |
| 表目錄 | 48 |
| 參考文獻 | 49 |

圖目錄

| | |
|---|----|
| 圖一、實驗流程圖 | 16 |
| 圖二、小鼠 C ₂ C ₁₂ 肌原母細胞與肌小管細胞之型態 | 35 |
| 圖三、正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液對肌原母細胞移動速度及百分比的影響 | 36 |
| 圖四、低氧常壓環境下活化的吞噬細胞培養液對肌原母細胞移動速度及百分比的影響 | 38 |
| 圖五、正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液對肌小管細胞移動速度及百分比的影響 | 40 |
| 圖六、低氧常壓環境下活化的吞噬細胞培養液對肌小管細胞移動速度及百分比的影響 | 42 |
| 圖七、正常氧分壓下 TNF- α 、IL-6 對肌原母細胞之移動速度的影響 | 44 |
| 圖八、正常氧分壓下 TNF- α 、IL-6 對肌小管細胞之移動速度的影響 | 46 |

表目錄

| | |
|---------------------------------|----|
| 表一、正常氧分壓下活化的吞噬細胞分泌的細胞激素濃度 | 48 |
|---------------------------------|----|

第一章 緒論

第一節 研究背景

骨骼肌是由多條肌束所組成，肌束裡含有肌纖維，而肌纖維是由數個細胞核融合所構成(O'Connor et al., 2007)。當肌肉發生損傷時，肌纖維需透過衛星細胞(satellite cell)的修復，進行再生功能。衛星細胞圍繞著肌纖維並存在於基底層處(basal lamina)(Chargé & Rudnicki, 2004)，當骨骼肌造成傷害時，衛星細胞及肌原母細胞會移至損傷部位，最後肌原母細胞會停止細胞循環週期而進行分化，促使細胞與細胞間產生融合作用，形成新生的肌原纖維，使肌肉結構得到恢復(O'Connor et al., 2007)。除了透過衛星細胞及肌原母細胞使肌纖維恢復及再生，也可透過部分殘存的肌肉細胞分裂，產生肌質(sarcoplasm)，分化出肌原纖維而再生癒合。

肌肉損傷時，透過發炎反應和一系列的修復細胞活動可以進行修復功能，過程會伴隨出血、腫脹和肌纖維壞死的現象，而壞死的肌纖維及其周圍會出現大量的發炎細胞(例如：嗜中性白血球、單核球、巨噬細胞)並釋放出細胞激素，其中，活化後的吞噬細胞會移動到受損組織處，清除壞死肌纖維和細胞碎屑。肌肉組織損傷後由於血液供應受阻，導致氧供應不足，持續或長期中斷氧氣的結果可能會導致肌肉細胞生長停滯(Di et al., 2004)，因此，氧氣在受損肌肉的修復期間扮演著關鍵的角色。

第二節 研究目的

在本篇論文中，我們模擬肌肉組織損傷時肌原母細胞及肌小管細胞分別在正常氧分壓及低氧常壓環境下的移動情形，並觀察加入活化後的吞噬細胞培養液對肌原母細胞及肌小管細胞移動速度的影響。

第三節 名詞解釋

巨噬細胞 (macrophages)

巨噬細胞可吞噬多種病原微生物，是參與非特異性免疫防禦的重要免疫細胞之一，巨噬細胞本身的抗腫瘤作用很微弱，但經某些免疫分子如干擾素- γ (Interferon-gamma; IFN- γ)和細菌成份如脂多醣(lipopolysaccharide; LPS)的刺激活化後便能有效的毒殺腫瘤細胞，並分泌細胞激素例如：TNF- α 、IL-1、IL-6 引起一連串發炎反應(Brunelli & Rovere-Querini, 2008)。

脂多醣 (lipopolysaccharide; LPS)

是細菌的細胞壁成分，當體內免疫系統受到 LPS 的刺激時，會釋放出許多的細胞激素如：TNF- α 、IFN- γ 及一氧化氮(nitric oxide; NO)等，並且進一步活化補體系統(complement system)、白血球和血管內皮細胞等，產生不同的免疫反應，以抵抗外來微生物的侵襲(Cohen, 2002)。

干擾素- γ (Interferon-gamma; IFN- γ)

IFN- γ 原名叫做巨噬細胞活化因子(macrophage-activating factor)，是前發炎細胞激素，且具有抗發炎的功用，並能夠調控其他前發炎細胞激素的產生(Muhl & Pfeilschifter, 2003)，在部分的適應性免疫反應中，IFN- γ 是由自然殺手細胞及淋巴細胞產生(Schroder, Hertzog, Ravasi & Hume, 2004)。

細胞激素 (cytokine)

細胞激素的功能在傳遞細胞間的訊息，是具有調節體內免疫反應的低分子量蛋白質 (Cannon & St Pierre, 1998)。在某些情況下，細胞激素也會引起發燒、發炎、休克等過程，目前已知淋巴球、單核球、巨噬細胞、內皮細胞及纖維母細胞 (fibroblast) 等具有合成、分泌細胞激素的能力。

腫瘤壞死因子- α (Tumour necrosis factor-alpha; TNF- α)

主要由單核球、巨噬細胞所分泌，是具有抗癌及調節免疫的細胞激素 (Tracey & Cerami, 1993)。TNF- α 也參與了局部的發炎反應、刺激細胞毒殺作用、蛋白質的分解、急性期反應物的釋出及增加體溫等功效。

介白素-6 (Interleukins-6; IL-6)

IL-6 屬於前發炎性細胞激素 (pro-inflammatory cytokines)，當發炎症狀產生時，由 T 細胞、巨噬細胞及內皮細胞分泌的物質，IL-6 也會由肌肉細胞分泌。IL-6 的升高反應在疾病、老化及劇烈運動中，此外，IL-6 也會減少肌原纖維蛋白質含量，造成肌肉萎縮 (Haddad, Zaldivar, Cooper & Adams, 2005)。

第二章 文獻探討

第一節 肌肉細胞的形成與分化

骨骼肌的形成是肌原母細胞停止細胞生長週期（分裂及增生）、誘導肌肉特異性基因的表現，產生融合作用，形成多核的肌小管細胞 (Di Carlo et al., 2004)。透過小鼠體內實驗及體外細胞培養，肌肉組織中的肌原母細胞會進行融合作用，形成肌小管細胞，因此肌小管細胞的產生是由多個肌原母細胞相互結合，且產生細胞膜融合現象而成 (Konigsberg, 2001; Mintz & Baker, 1967)。當肌原母細胞停止細胞的生長週期時，就是肌肉細胞形成的開始，只要特定的生長因子存在（特別是纖維母生長因子 (fibroblast growth factors)），肌原母細胞就會開始分化，當這些生長因子被耗盡時，肌原母細胞就會停止分裂，且細胞外基質 (extracellular matrix) 的纖維連接蛋白 (fibronectin) 會與細胞膜上的蛋白質受體 ($\alpha 5 \beta 1$ integrin) 結合，最後促使分化成為肌肉細胞 (Menko & Boettiger, 1987; Boettiger et al., 1995)。

MyoD (Myogenic Differentiation 1)、myogenin、Myf-5 (Myogenic factor 5) 和 MRF4 (Muscle Regulatory Factor 4) 是肌原母細胞形成肌肉細胞過程中所出現的肌生性調節因子 (myogenic regulatory factors; MRFs)，它們都有一個共同的區域：bHLH (basic helix-loop-helix)，bHLH 是一段蛋白質的功能調節區，通常會有特定的轉錄因子結合在上面而啟動特定的機制表現。經過基因淘汰的實驗證明 Myf-5 及 MyoD 似乎是間質幹細胞 (mesenchymal stem cell) 分化成為肌原母細

胞的調節因子，同時也是肌原母細胞進行增生及存活不可或缺的條件；而 MRF4 及 myogenin 是肌原母細胞分化成為肌小管細胞及形成肌肉纖維所表現的調節因子 (Megeney & Rudnicki, 1995; Rawls et al., 1995; Kassar-Duchossoy et al., 2004; Rudnicki & Jaenisch, 1995)。

第二節 肌肉損傷後的修復及再生

在許多流行病學的研究中，骨骼肌的損傷大多與運動時所造成的傷害有關 (Garrett, 1996; Croisier et al., 2002)，中度至重度的肌肉拉傷可能會導致數個星期無法參與訓練或比賽，並具有較高的復發風險 (Verrall et al., 2001; Orchard & Best, 2002)，造成肌肉損傷有直接及間接原因，直接原因包括外傷性傷害，如撕裂傷 (lacerations)、拉傷 (contusions) 及挫傷 (sprains) (Hughes et al., 1995; Kasemkijwattana et al., 1998; Kasemkijwattana et al., 2000; Fukushima et al., 2001)，而間接原因可能與疾病有關，如局部缺血 (ischemia) 或神經功能障礙 (neurologic dysfunction) (Day et al., 2002; Paoni et al., 2002)。

肌肉損傷會引起一連串的事件，首先會產生發炎反應，接著肌纖維再生及膠原蛋白合成 (Bischoff & Heintz, 1994)。肌肉的再生及修補有三個階段 (1) 衰退-發炎 (degeneration-inflammation)；(2) 再生 (regeneration)；(3) 纖維化 (fibrosis) (Tidball, 1995; Huard, Li & Fu, 2002; Jarvinen, Jarvinen, Kaariainen, Kalimo & Jarvinen, 2005)。

衰退-發炎階段會在肌肉損傷的第一天出現，此階段描述肌肉損傷後所產生的血腫及發炎反應，當肌肉損傷時，過大的機械 (mechanical) 力量通常會造成整個橫切面的肌纖維受到傷害，由於肌纖維非常長，是細長管狀型的細胞 (string-like cells)，因此肌纖維壞死的部位可能不大，但其傷害卻會影響並擴大延伸至整條肌纖維 (Jarvinen, Jarvinen, Kääriäinen, Kalimo & Jarvinen, 2005)。骨骼肌組織中有一個特殊的結構

稱為收縮帶(contraction band)，也被稱作“防火門”(fire doors)，它能集結(condensation)細胞骨架(Hurme, Kalimo, Lehto & Järvinen, 1991)，細胞骨架是真核細胞中的蛋白纖維網狀結構，主要功能是維持細胞形狀、細胞內物質的運輸、細胞分裂以及其他許多功能等。在受傷後幾小時，壞死部位的肌纖維會停止擴散，因為收縮帶會封鎖(seals off)壞損的細胞膜形成保護屏障，而撕裂的細胞膜也會被修復(Hurme et al., 1991)。除了受傷的肌纖維，肌肉組織中的血管也會一同撕裂，因此單核球、被活化的巨噬細胞以及 T 細胞會經由微血管直接進入受傷部位(Tidball, 1995; Toumi & Best, 2003; Huard et al., 2002)，此外，這些被活化的淋巴細胞會分泌多種的細胞激素(例如：IL-8、IL-6、IL-1)、黏著分子(例如：P-selectin、L-selectin、E-selectin)、TNF- α ，並影響局部的血流和血管的通透性(permeability)且引發發炎反應(Honda, Kimura & Rostami, 1990; Aronson et al., 1998; Tidball, 1995; Cannon & St Pierre, 1998; Altstaedt, Kirchner & Rink, 1996)。

而肌肉的再生階段通常發生在肌肉損傷的第七至十天，並在第十四天左右達到高峰。新的肌肉形成過程中需要靜止的肌原母細胞活化、增生、分化，最後融合形成多核的肌小管細胞，而這些肌小管細胞會形成具有功能性(受神經支配)的肌纖維。修補損傷後的骨骼肌前趨細胞被認為有三種：(1)肌纖維中的衛星細胞；(2)來自其他肌纖維中不同類型的細胞(3)受損的肌纖維中其細胞核內的肌質可能會重新進入細胞週期(Ground, White, Rosenthal & Bogoyevitch, 2002)，其中，骨骼肌損傷後的再生能力主要是經由衛星細胞的複製。肌肉衛星細胞存在於成熟肌纖維的基底層及肌纖維膜中

(Grounds & Yablonka-Reuveni, 1993)，肌肉纖維受傷後，衛星細胞會再進入細胞週期，有部分衛星細胞會成為新生的肌纖維而其他則是會自我更新(self-renew)，形成新的衛星細胞(Anderson, 1998)。在此階段還有許多生長因子被釋放，包括：基本纖維母生長因子(basic fibroblast growth factors; bFGF)、胰島素生長因子(insulin-like growth factor-1; IGF-1)、肝細胞生長因子(hepatocyte growth factor; HGF)、表皮生長因子(epidermal growth factor; EGF)、轉化生長因子- β (transforming growth factors- β ; TGF- β)及神經生長因子(nerve growth factor; NGF)，這些生長因子會影響肌原母細胞及衛星細胞的增生與分化(Sheehan & Allen, 1999; Deasy, Qu-Peterson, Greenberger & Huard, 2002; Huard et al., 2002)。Menetrey et al. (2000)的研究指出，胰島素生長因子、基本纖維母生長因子及神經生長因子都能夠提高肌肉的再生能力。

纖維化階段則是在二至三週後出現，受傷的肌纖維會癒合並形成疤組織(scar tissue)。骨骼肌主要是由受神經支配具有收縮功能的肌纖維及結締組織所組成，損傷的肌纖維、神經的再生及結締組織疤痕的形成是同時進行並互相配合。在損傷的部位，結締組織會重建並牢固的附著在肌纖維末端，如果結締組織疤痕形成過度，可能會阻礙肌纖維的再生及神經的再支配(Kääriäinen, Järvinen, Järvinen, Rantanen & Kalimo, 2000)。

第三節 巨噬細胞與細胞激素對損傷肌肉的作用

骨骼肌受傷的急性期，大量的嗜中性白血球會移至損傷部位，釋放細胞激素刺激發炎反應的產生，並吸引及活化發炎細胞，且在一天內單核球就會取代嗜中性白血球，成為主要的族群。這些單核球最終會轉化成巨噬細胞，然後吞噬壞死的組織，並以溶酶體酵素 (lysosomal enzymes) 分解 (Best & Hunter, 2000; Hurme et al., 1991; Tidball, 1995)。研究指出肌肉損傷後約 12 小時，巨噬細胞是主要的發炎細胞 (Orimo, Hiyamuta, Arahata & Sugita, 1991)，Round, Jones & Cambridge (1987) 發現離心運動後，發炎細胞會滲透到血管周圍、肌束 (perimysial) 及肌內膜，且巨噬細胞佔發炎細胞總數的 42~100%，此外 T 細胞雖然佔發炎細胞數的三分之一，但只有約 30% 的 T 細胞會被活化，這表示在急性肌肉損傷時，T 細胞在發炎反應過程中並不是扮演著主要的角色。

在大部分情況下，巨噬細胞被活化後，具有殺菌的功能並分泌前發炎細胞激素產生發炎反應、同時誘導免疫細胞的聚集，隨後吞噬微生物或釋放有毒的代謝產物 (Schroder, Hertzog, Ravasi & Hume, 2004)。但有研究指出巨噬細胞除了吞噬作用外，對骨骼肌的再生及恢復也有直接作用，可以防止肌肉細胞產生凋亡、釋放因子提升肌肉前趨細胞的活化及生長、分泌細胞激素及生長因子促進血管及肌纖維的恢復 (Smith, Kurger, Smith, Myburgh, 2008; Merly et al., 1999)。這可能是由於不同的巨噬細胞亞群所造成的 (即 ED1⁺、ED2⁺)，在肌肉損傷時會有一群專門進行吞噬作用的巨噬細胞 (ED1⁺) (Honda, Kimura & Rostami, 1990)，ED1⁺ 巨噬細胞

會吞噬細胞碎片及微粒物質 (particulate material) (Frisé, Risling & Fried, 1993; Honda, Kimura & Rostami, 1990), 在完成吞噬作用後, ED1⁺巨噬細胞的數量會減少 (St Pierre & Tidball, 1994)。當吞噬作用完成及肌肉開始再生時, 另一群不進行吞噬作用的巨噬細胞會出現在損傷部位 (ED2⁺) (McLennan, 1993), St Pierre & Tidball (1994)的研究發現 ED2⁺巨噬細胞並不會侵入或吞噬壞死的肌纖維。Cantini et al. (1994)透過體外培養的模式將衛星細胞與巨噬細胞共同培養, 結果發現肌小管細胞的數量增多, 且巨噬細胞與肌原母細胞共同培養後也增加了肌原母細胞的數目。造成巨噬細胞對肌肉的恢復產生作用, 可能是因為巨噬細胞在恢復過程中透過釋放生長因子及細胞激素, 影響這些細胞的增生及分化。

巨噬細胞存在於肝臟、脾臟及周遭組織中, 當受到感染時, 部分的巨噬細胞會被活化, 並且產生特定的免疫反應及合成多種細胞激素, 細胞激素在免疫反應上同時有著前發炎及抗發炎的作用 (Frost, Nystrom & Lang, 2002)。細胞激素是重要的調節因子, 能使組織產生防禦、生長及修復過程, 當發生感染或組織損傷時, IL-1、IL-6、TNF- α 為首批產生反應的細胞激素 (Hopkins, 2003), TNF- α 主要是經由活化的巨噬細胞所產生 (Jaattela, 1991; Vassalli, 1992), 此外, 非造血、非發炎細胞也能產生 TNF- α , 例如: 在不同壓力下如局部缺血或壓力超載, 心肌會合成或釋放 TNF- α 。在許多慢性疾病中 (例如: 癌症、敗血症), TNF- α 被認為是造成肌肉萎縮的原因之一 (Espat, Copeland & Moldawer, 1994)。而 Li & Reid (2001)的研究也指出 TNF- α 會加速肌肉蛋白的代謝、造成肌肉收縮功能障礙及破壞肌肉生成, 且 TNF- α 及 IL-6 可作為運

動造成肌肉損傷的重要指標之一 (Steinacker, Lormes, Reissnecker & Liu, 2004; Warren et al., 2002)。IL-6 是細胞間的信號分子，並能夠控制和協調免疫反應，在骨骼肌中，IL-6 的增加被認為是潛在的有害物質 (Haddad, Zaldivar, Cooper & Adams, 2005)，例如：IL-6 能夠直接或間接影響骨骼肌的代謝作用，造成肌肉蛋白質的分解 (Goodman, 1994)。

第四節 不同的氧分壓對肌肉細胞的影響

大氣中的氧氣濃度約為 21%，而在體內組織中氧氣的含量卻顯著減少。其中，動脈血的氧約為 12%，組織中氧含量約為 3% (Li et al., 2007)，Li 說明了降低氧濃度會更接近生理狀態的體內氧環境，“低氧”在生長的時間及位置其實是“常氧”(normoxic)，這種生理的低氧條件在細胞及組織中是存在的。在健康的組織中，氧壓通常在 20 至 70 mmHg (約 2.5~9% 的氧氣)，病害的組織中會造成暫時的或長期的局部缺氧(低氧分壓)，氧壓約為 10 mmHg(即不到 1% 的氧)(Lewis, Lee, Underwood, Harris & Lewis, 1999)，而這種病理性的缺氧可以在惡性腫瘤、發炎損害(inflammatory lesions)、組織缺血、傷口癒合及阻塞性肺疾病(obstructive pulmonary diseases)當中見到(Vaupel & Hockel, 2003; Le, Denko & Giaccia, 2004; Harris, 2002; Bjornheden, Levin, Evaldsson & Wiklund, 1999; Distler et al., 2004)。

哺乳動物細胞需要氧氣的持續供應，以維持足夠的能量產生，確保細胞能夠維持正常功能及存活，而持續的和長期的能源生產中斷，會造成生長停滯或細胞凋亡(Di Carlo et al., 2004)，有大量的證據顯示肌原母細胞的增生和分化是依賴氧氣濃度的供應，Csete et al. (2001)提出較高的氧濃度(20-40%)能夠促進肌原母細胞融合形成肌小管細胞，而輕微的缺氧(6%)會增加細胞的增生及存活。Chakravarthy, Spangenburg & Booth (2001)研究將年老大鼠的衛星細胞培養在氧濃度分別為 21% 及 3% 的環境中長達 31 個月，並觀察細胞的活化作用及增生程度，並表示在 3% 的氧含量會促進細胞增生及提高肌

小管細胞的形成。而 Csete et al. (2001) 也發現低氧 (6%) 會增加成熟的骨骼肌纖維中的衛星細胞增生及存活率。

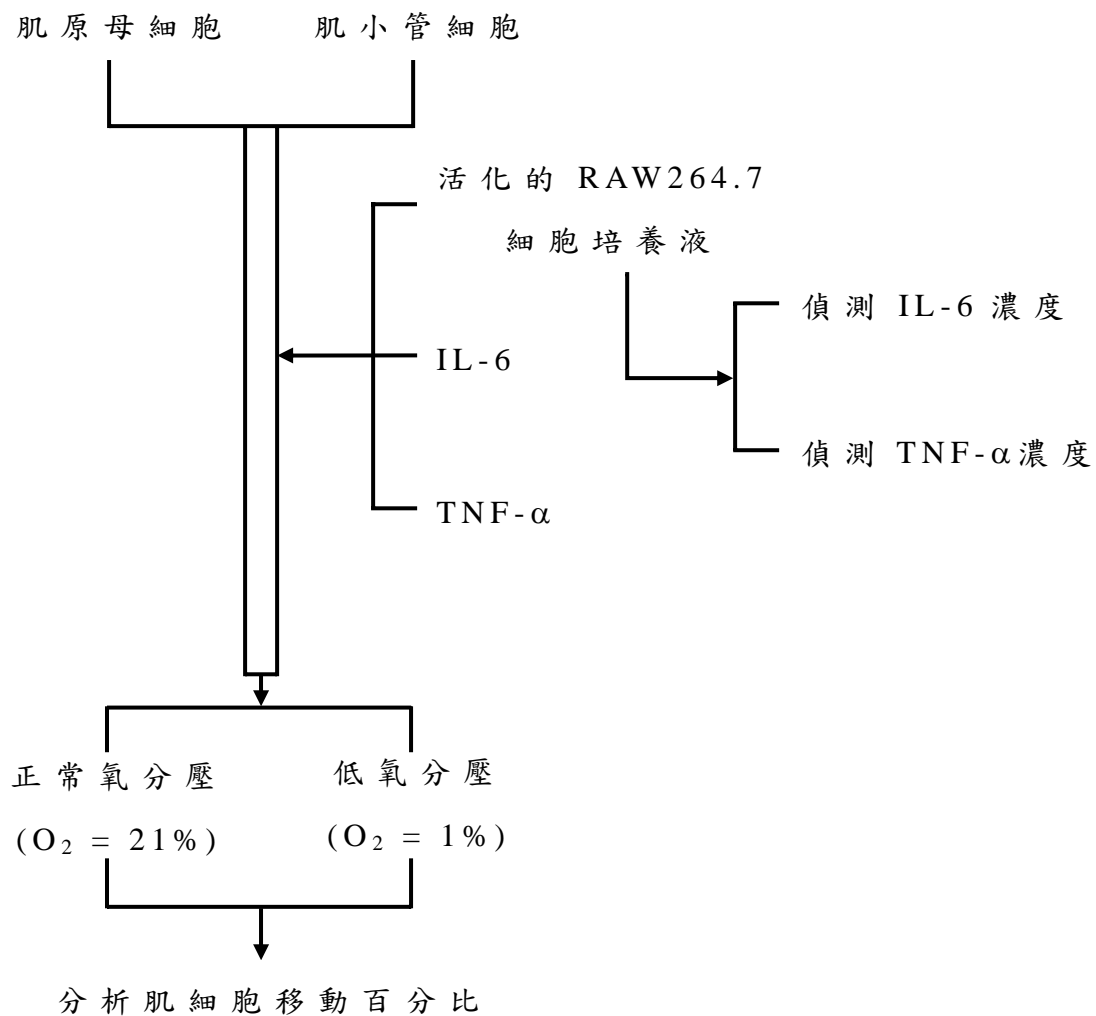
生理性的低氧可能會增加幹細胞的增生與分化，這應該是發展期間建立的機制，對組織或器官形成及功能建立有益，這也是生理自我更新的基礎。相反的，在體內，疾病、損傷和快速代謝造成的不利條件下，幹細胞會停止細胞週期並抑制分化作用，這可能是一種保護反應，可以防止幹細胞分化為受到損害的功能細胞，這個過程會將有機體的傷害降至最低 (Li et al., 2007)。

此外，缺氧也會使巨噬細胞產生特定基因的表現或造成細胞的凋亡。Scannell et al. (1993) 指出巨噬細胞在缺氧狀態下會引起 TNF- α 及其可溶性受體的表現，Albina et al. (1995) 也指出缺氧會誘導巨噬細胞的活化並釋放 TNF- α 及 IL-6。另外，Yun et al. (1997) 的研究發現當巨噬細胞在第一次接觸到低氧環境時，會造成大於 25% 的細胞死亡，但隨著反覆的缺氧，巨噬細胞會開始產生適應現象並釋放 TNF- α ，這些研究證明了巨噬細胞在缺氧的條件下是屬於活化狀態。

第三章 研究方法與步驟

第一節 實驗設計

為了解肌肉細胞在肌肉受損後的自我恢復速度，因此我們利用 In vitro 的方式將小鼠 C₂C₁₂ 肌原母細胞及其分化後的肌小管細胞分別放入正常氧分壓及低氧常壓的培養環境中，模擬肌肉組織損傷時，不同的氧環境對肌肉細胞移動情形的影響，並觀察加入經由 LPS 和 IFN- γ 刺激活化的吞噬細胞 (RAW267.4 cell) 培養液，及分別單獨加入 TNF- α 、IL-6 是否會影響肌肉細胞移動的能力，最後再將顯微鏡下拍攝到細胞移動的距離量化成數值，計算並分析其移動速度百分比(圖一)。



圖一、實驗流程圖

首先將肌原母細胞及肌小管細胞分別培養在培養皿中，當肌肉細胞長至滿度約九分滿時，以 Tip 的尖端劃出一道刮痕後加入活化的吞噬細胞培養液，並將肌肉細胞放入不同的氧環境中觀察其移動速度。另外觀察在正常氧分壓下單純加入 TNF- α 及 IL-6 對肌肉細胞移動速度的影響，且將肌肉細胞移動的距離量化。

第二節 實驗材料與方法

壹、細胞培養

(一) 細胞株

本實驗中使用的細胞株為肌原母細胞 C_2C_{12} 及巨噬細胞 RAW264.7。 C_2C_{12} 為小鼠肌肉細胞之細胞株(食工所, 台灣)由小鼠的骨骼肌取得, 使用的培養基為 RPMI-1640 MEDIUM (SH30011.01; HyClone)、1% L-Glutamine (SH30034.01; HyClone)、1% 盤尼西林 (SV30010; HyClone) 及 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (SH30071.03; HyClone), pH 值 7.4。 C_2C_{12} 培養於恆溫 37°C 、5% 的二氧化碳培養箱中, 每隔三~四天進行一次繼代培養, 以維持細胞生長所需的養分及酸鹼值。而 RAW264.7 細胞株為小鼠巨噬細胞之細胞株, 購買自食品工業研究與發展機構的生物資源保存及研發中心 (Bioresource Collection & Research Center, Cat: 60001), 細胞培養時所使用的培養基與 C_2C_{12} 相同。

(二) 細胞繼代

C_2C_{12} 及 RAW264.7 細胞繼代培養的步驟為: 將培養皿中舊的培養基倒出, 以 1 倍 PBS 清洗培養皿, 再加入 2 毫升 1 倍的胰蛋白酶 (trypsin) 靜置約 1 分鐘; 準備另一支 15 毫升離心管並先加入約 6 毫升的 1 倍 PBS, 將胰蛋白酶作用後的細胞收集入上述離心管中, 然後以 4°C 及 1800 rpm 的轉速離心三分鐘後, 倒掉離心後的培養液, 加入 1 毫升含 10% 胎牛血清的培養基後將細胞混合均勻。取 20 μl 的細胞液用 Trypen Blue 染色計算每毫升細胞數含量, 再依實驗結果換算實驗所

需的細胞數進行繼代培養。

(三) 細胞保存方式

收集到的細胞以胎牛血清將細胞混合均勻。再以等量的比例(1:1)與冷凍劑(20% DMSO)混合，然後將混有冷凍液的細胞液分裝至冷凍小管中，先放於-20℃冰箱一小時，再移入-80℃冰箱，隔日即可移至液態氮桶中保存。冷凍細胞的方式利用漸進式低溫的方式，將細胞逐步放入低溫環境，以避免細胞突然接觸低溫環境而導致細胞膜破裂。

(四) 肌原母細胞分化成肌小管細胞的方法

C₂C₁₂肌肉細胞株較為特殊，其以不同成分血清的培養基培養會表現出兩種不同的肌肉細胞型態。當以含10%胎牛血清的培養基培養時，其為肌原母細胞；而肌原母細胞更換含有2%馬血清(SH30074.04; HyClone)的培養基培養至少三天，C₂C₁₂即分化為成熟肌小管細胞。

貳、Eosin Y 染色法

Eosin-Y stain 是一種鮮紅色酸性染劑，可染鹼性物質，例如：細胞質、血紅素、細胞核及肥大細胞，本實驗利用此染劑強化細胞核在顯微鏡底下的辨識度，藉以提高拍照時的清晰度。

實驗方式為，取出需要染色的肌肉細胞，先以1倍PBS清洗兩次後，接著加入固定液(4% Paraformaldehyde)，然後放在室溫搖擺式振盪器上作用10-15分鐘，作用時間完成後，倒掉固定液，再加入1% Eosin-Y stain 溶液，同樣並在

搖擺式振盪器上作用十至十五分鐘，使 Eosin-Y stain 充分染入細胞質後，以清水清洗多餘的 Eosin-Y stain 溶液，然後以倒立式顯微鏡放大 400 倍拍照。

參、活化吞噬細胞 RAW264.7 培養液與 C₂C₁₂ 細胞共同培養的方式

以 2 µg/ml 的 LPS 及 10 U/ml 的 IFN- γ 加入 RAW264.7 (細胞數為 1×10^7 /ml) 之培養皿中，再放回 37°C、5% 的二氧化碳培養箱中繼續培養備用。

隔日取出培養液，並將其培養液分別加入肌肉細胞中，肌原母細胞和肌小管細胞所需加入新鮮的培養基與巨噬細胞培養液的稀釋倍數分別為 3 倍及 5 倍，透過前測實驗發現，此稀釋倍數，較不易導致肌原母細胞與肌小管細胞的死亡，再將其分別放入二氧化碳培養箱中，及低氧常壓之氧氣含量 1% O₂ 的低氧艙中。

肆、C₂C₁₂ 細胞移動速度百分比的分析方式

細胞移動情形利用倒立式顯微鏡觀察，並以外接式照相機放大 100 倍照像存檔，肌原母細胞照像時間點為加藥後 0、4、8、12、18 小時；肌小管細胞照像時間點為加藥後 0、12、24、30 小時，兩種細胞均準備一盤未加任何藥物的細胞為對照組。

首先當肌原母細胞及肌小管細胞長至滿度約八至九分滿時，以 Tip 的尖端在培養皿表面上劃出一道刮痕，分別加入經由 LPS 及 IFN- γ 刺激活化後 RAW264.7 細胞培養液，觀察在正常氧分壓及低氧環境中，不同時間點肌肉細胞之移動情

形，並以未加任何刺激物之肌原母細胞（肌小管細胞）作為對照組，以比較其他加入外來刺激物之肌原母細胞（肌小管細胞）的移動速度。實驗中給氧的標準分為兩種，一般大氣壓力下氧分壓約佔 21%，而低氧環境的氧氣濃度設定為 1%。

細胞移動速度百分比的換算方式如下：將劃線後的刮痕作為兩條平行線，取平行線中間的距離作為基準線，並設定其位移百分比為 0%，隨著時間的進行該基準線會縮短，再將 0 小時的基準線與縮短後的基準線距離換算成百分比，例：最先畫線之基準點為 5 公分，4 小時後其基準點縮短為 4 公分，則等於 $\frac{5-4}{5} \times 100\%$ ，其位移位置則為 20%。

伍、酵素免疫分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

本實驗利用酵素免疫分析法分析所收集的 RAW264.7 培養液中 TNF- α 及 IL-6 (eBioscience: TNF- α , Cat: 88-7324-88; IL-6, Cat: 88-7064-88) 之濃度，實驗步驟如下：將 Capture antibody 和 1 倍 coating buffer (Purified anti-mouse, TNF- α ; Purified anti-mouse, IL-6) 以 1:250 倍稀釋加入 96 孔盤中(每孔加入 100 μ l)，放入 4 冰箱避光靜置一個晚上，隔天以 Washing buffer (0.05% Tween-20 in 1 倍 PBS) 清洗一次，加入 200 μ l 1 倍 Assay buffer 避光靜置 1 小時後清洗一次，加入 100 μ l 之細胞培養液樣品與標準品 1 μ g/ml 之線性等倍稀釋，避光靜置 2 小時後以 Washing buffer 清洗兩次，加入 Detection antibody (Biotin-conjugate anti-mouse, TNF- α ; Biotin-conjugate anti-mouse, IL-6) 100 μ l 避光靜置 1 小時後以 Washing buffer 清洗三次，再加入 100 μ l 之 Conjugate

Enzyme (Avidin-HRP)避光靜置 30 分鐘後以 Washing buffer 清洗三次，加入 Substrate Solution (Tetramethylbenzidine, TMB)100 μ l 靜置 15 分鐘後，加入 50 μ l Stop solution (1N H₂SO₄)，最後以偵測波長 450 nm 偵測樣品之吸光值，並將所得數據進行相關分析。

陸、統計分析

本文是利用 SPSS 11.0 版本中的 t 檢定分析實驗組中各組的組間差異，所有數據以平均值 \pm 標準差呈現，顯著差異設為 $p < .05$ 。

第四章 結果

第一節 小鼠 C₂C₁₂ 肌原母細胞與肌小管細胞之型態

本實驗結果是先以 Eosin-Y 染劑將細胞染色後，在 400 倍顯微鏡鏡頭下所拍得的照片。照片中明顯可見肌原母細胞 (A) 呈現單核、單顆且獨立的型態；而肌小管細胞 (B) 透過細胞融合作用之後的形態表現與肌原母細胞有明顯不同，肌小管細胞的特性會變成細長管狀且多核 (圖二)。

第二節 正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液對肌原母細胞移動速度的影響

本實驗是利用肌肉細胞在貼附後細胞膜能延伸發展的特性，測試加藥後肌肉細胞移動速度的改變。首先當肌原母細胞或是肌小管細胞長至滿度約八至九分滿時，以 Tip 的尖端在培養皿表面上劃出一道刮痕，並以倒立式顯微鏡照相觀察其移動情形。

本實驗結果發現，外加經 LPS/IFN γ 活化的吞噬細胞培養液共同培養的肌原母細胞在 8 小時及 12 小時(34.46%，56.62%)與未加任何刺激物之肌原母細胞(49.38%，89.38%)，其移動百分比達到顯著差異($p < .05$)。而加入未活化的吞噬細胞培養液之肌原母細胞(44.76%，79.35%)與單純以 LPS/IFN γ 刺激之肌原母細胞(46.19%，83.77%)其移動百分比雖然比對照組慢，但並無顯著差異(圖三(B))。

第三節 低氧常壓環境下活化的吞噬細胞培養液對肌原母細胞移動速度的影響

在低氧常壓環境下，加入經 LPS/IFN γ 活化後吞噬細胞培養液的肌原母細胞在 12 小時及 18 小時(50.57%, 61.12%)與未加任何刺激物之肌原母細胞(65.02%, 95.16%)比較，移動百分比變的比較慢，且達到顯著差異($p < .05$)。而加入未活化的吞噬細胞培養液之肌原母細胞(61.56%, 93.46%)與對照組比較並無顯著差異(圖四(B))。

在低氧常壓環境中，無論是未加任何刺激物之肌原母細胞、加了吞噬細胞培養液與加了經 LPS/IFN γ 活化後吞噬細胞培養液的肌原母細胞，其移動情形都比正常氧分壓慢。

第四節 正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液對肌小管細胞移動速度的影響

本實驗結果發現，外加經 LPS/IFN γ 活化的吞噬細胞培養液共同培養的肌小管細胞在 24 小時及 30 小時(52.74%，55.74%)與未加任何刺激物之肌小管細胞(75.08%，91.64%)比較，其移動百分比達到顯著差異($p < .05$)。而加入未活化的吞噬細胞培養液之肌小管細胞(69.47%，88.03%)與單純以 LPS/IFN γ 刺激之肌小管細胞(71.76%，89.89%)其移動百分比與對照組並無顯著差異(圖五(B))。

第五節 低氧常壓環境下活化的吞噬細胞培養液對肌小管細胞移動速度的影響

本實驗結果發現，在低氧常壓環境下，加入經 LPS/IFN γ 活化後吞噬細胞培養液的肌小管細胞在 12 小時、24 及 30 小時 (21.94%, 39.55%, 44.13%) 與未加任何刺激物之肌小管細胞 (28.71%, 48.76%, 81.14%) 比較其移動百分比達到顯著差異 ($p < .05$)。而加入未活化的吞噬細胞培養液之肌小管細胞 (28.22%, 46.52%, 78.21%) 與對照組並無顯著差異 (圖六(B))。

第六節 正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液中細胞 激素的濃度

我們發現吞噬細胞經 LPS/IFN γ 刺激活化後分泌出 TNF- α 的濃度為 35 ng/ml；IL-6 的濃度為 9 ng/ml（表一）。

在上述實驗中無論是在正常氧分壓或低氧環境中，經 LPS/IFN γ 活化後吞噬細胞培養液對於肌原母細胞及肌小管細胞的移動情形皆會造成影響。因此我們假設造成肌原母細胞及肌小管細胞移動速度變慢的原因可能是活化的吞噬細胞中所釋放出的細胞激素造成肌肉細胞移動情形變慢；本實驗再以濃度為 1 ng/ml TNF- α 及 IL-6 分別加入肌肉細胞中，觀察經由單純以 TNF- α 及 IL-6 的刺激是否也會改變肌肉細胞的移動情形。

第七節 正常氧分壓下 TNF- α 與 IL-6 對肌原母細胞之移動速度的影響

本實驗結果發現，外加 TNF- α 共同培養之肌原母細胞在 8 小時及 12 小時(26.86%, 55.42%)及加入 IL-6 共同培養之肌原母細胞(33.86%, 61.87%)與未加任何刺激物之肌原母細胞(49.38%, 89.38%)比較發現，無論加入 TNF- α 或 IL-6 皆會影響肌原母細胞的移動速度，並達到顯著差異($p < .05$) (圖七(B))。

第八節 正常氧分壓下 TNF- α 與 IL-6 對肌小管細胞之移動速度的影響

本實驗結果發現，外加 TNF- α 共同培養之肌小管細胞在 24 小時及 30 小時 (46.11%, 73.93%) 及加入 IL-6 共同培養之肌小管細胞 (42.57%, 67.92%) 與未加任何刺激物之肌小管細胞 (75.08%, 91.64%) 比較，其移動百分比達到顯著差異 ($p < .05$) (圖八(B))。

第五章 討論

本次研究主要發現的結果如下：首先，我們的研究證明活化後的吞噬細胞培養液，會抑制肌原母細胞及肌小管細胞的移動速度；第二，TNF- α 及IL-6也會抑制肌原母細胞及肌小管細胞的移動速度；第三，低氧常壓環境會造成肌原母細胞及肌小管細胞的移動速度變慢。

在體外培養實驗中，肌原母細胞形成肌小管細胞時，通常是藉由不同成分的血清或減少血清的含量來促進細胞分化(Halevy & Lerman, 1993; Saito, Hammond & Mose, 1995)。Langen et al. (2003)也發現當胎牛血清的含量減少或更換為馬血清時，會使肌原母細胞分化成為肌小管細胞。在本論文中，我們也觀察到加入不同成分的血清會使肌原母細胞與肌小管細胞呈現不同的型態(圖二)。

正常人體血液中，TNF- α 的濃度極微弱，一般是以pg/ml做為濃度單位(Li & Reid, 2001)，但是在敗血症、癌症及發炎性疾病病人中TNF- α 的濃度會顯著上升至以ng/ml做為單位，當罹患類風濕關節炎時，TNF- α 濃度會上升至2.8 ng/ml(Vreugdenhil, Lowenberg, Van Eijk & Swaak, 1997)，而癌症病患血清中TNF- α 的濃度會提高至6 ng/ml(Nakashima, Tachibana, Ueno, Baba, & Tazaki, 1995)。在本實驗中經LPS/IFN- γ 活化後的吞噬細胞所分泌出的TNF- α 及IL-6濃度分別為35 ng/ml、9 ng/ml，而從活化的吞噬細胞培養液加入肌原母細胞及肌小管細胞的稀釋濃度分別為3倍及5倍稀釋，結果發現，以含11 ng/ml TNF- α 及3 ng/ml IL-6的巨噬細胞培養液與C₂C₁₂進行培養，會造成肌原母細胞的移動速

度變慢，而以 7 ng/ml TNF- α 及 1.8 ng/ml IL-6 的巨噬細胞培養液與 C₂C₁₂ 共同培養，也會降低肌小管細胞的移動能力。但在其他文獻指出，損傷期間巨噬細胞所分泌的物質會誘導肌生性細胞產生趨化反應 (Quintero, Wright, Fu & Huare, 2009; Robertson, Maley, Grounds & Papadimitriou, 1993)，並隨著濃度梯度增加的方向遷移 (Bischoff, 1997)。許多研究也證明巨噬細胞會增加肌原母細胞的增生及分化 (Cantini & Carraro, 1995; Cantini et al., 2002; Lescaudron et al., 1999; Robertson et al., 1993)，這可能是巨噬細胞分泌的生長因子所造成的 (例如：TGF- β 、bFGF)。雖然也有研究指出將 TNF- α 注射於小鼠脛前肌 (tibialis anterior) 內會趨化肌原母細胞移動至該部位 (Torrente, 2003)，這些與我們的研究看似矛盾的結果，可以歸因於不同的研究設計和實驗方法，我們的實驗設計並不只是針對巨噬細胞所釋放出的細胞激素及生長因子對肌原母細胞的趨化作用，而是肌原母細胞存在於損傷部位時，這些被活化的巨噬細胞所分泌的前發炎細胞激素對肌原母細胞移動速度的影響。

在單獨加入 1 ng/ml 的 TNF- α 或 IL-6 於肌原母細胞與肌小管細胞的實驗，也發現肌原母細胞與肌小管細胞的同樣也明顯受到抑制。TNF- α 與 IL-6 是一個多功能的細胞激素，在各種發炎性與非發炎性肌肉疾病中扮演著重要角色 (Argiles & Lopez-Soriano, 1998; Tuzun, Li, Wanasen, Soong & Christadoss 2006)，此外肌肉細胞會透過分泌免疫學因子 (例如：TNF- α 、IL-6) 有效的參與肌肉疾病的發病機制 (Stegall & Krolick, 2001; Reyes-Reyna & Krolick, 2000; Mahoney, Parise, Melov, Safdar & Tarnopolsky, 2005)，在各種肌肉疾

病中肌肉細胞的喪失也許部分原因是由於 TNF- α 、IL-6 會直接影響肌肉組織 (Tuzun et al., 2006)，雖然有研究證明 IL-6 會增加肌原母細胞的增生 (Cantini et al., 1995)，但有趣的是，IL-6 也會造成蛋白質的流失以及肌肉的退化 (Tsujinaka, 1995)。而 TNF- α 造成肌肉分解作用的可能機制是在肌肉損傷中 TNF- α 會限制衛星細胞的增生 (Layne & Farmer, 1999; Guttridge et al., 2000)，或使肌小管細胞產生分解作用而引起肌肉蛋白質流失 (Li & Reid, 2000)。

Corti et al. (2001) 指出較高濃度的 TNF- α (200 U/ml) 會趨化肌原母細胞產生明顯的移動，但如果繼續增加 TNF- α 的濃度並不會進一步的刺激肌原母細胞的移動，甚至會導致細胞毒性 (cell toxicity) 造成肌原母細胞的死亡率增加，與我們的實驗是較相近的。Li, Schwartz, Waddell, Holloway & Reid (1998) 的研究也發現 TNF- α 會造成肌小管細胞的蛋白質流失，這些結果表明在本實驗中活化的巨噬細胞培養液所造成肌肉細胞的移動速度被抑制，可能部分原因是由 TNF- α 及 IL-6 所造成的。

本實驗中發現以 2 μ g/ml LPS 及 10 U/ml 的 IFN- γ 會刺激活化巨噬細胞，而其稀釋後的培養液也會影響肌肉細胞的移動，因此推測是否單獨加入 LPS 及 IFN- γ 就會改變肌肉細胞的移動速度，在加入 LPS 及 IFN- γ 與肌原母細胞及肌小管細胞共同培養的實驗中稀釋倍數分別為 3 倍及 5 倍，而實驗結果觀察到單純的加入 LPS 及 IFN- γ 並不會影響肌原母細胞或肌小管細胞的移動速度。巨噬細胞透過 LPS 的活化後會攻擊及清除外來微生物及病原體，但是高劑量的 LPS 則是會引起發炎介質的過度產生並導致致命的系統性疾病 (systemic

disorder)、敗血性休克(septic shock) (Schroder et al., 2004)。而 IFN- γ 的主要功能是活化巨噬細胞來達到殺菌功能 (Farrar & Schreiber, 1993), Smith, Moylan, Smith, Li & Reid (2007) 的研究也發現 IFN- γ 並不會直接引起肌小管細胞中蛋白質的分解, 推測 IFN- γ 可能須透過一些輔助因子例如 TNF- α 或其他的發炎介質, 才能達到對肌肉的分解作用。

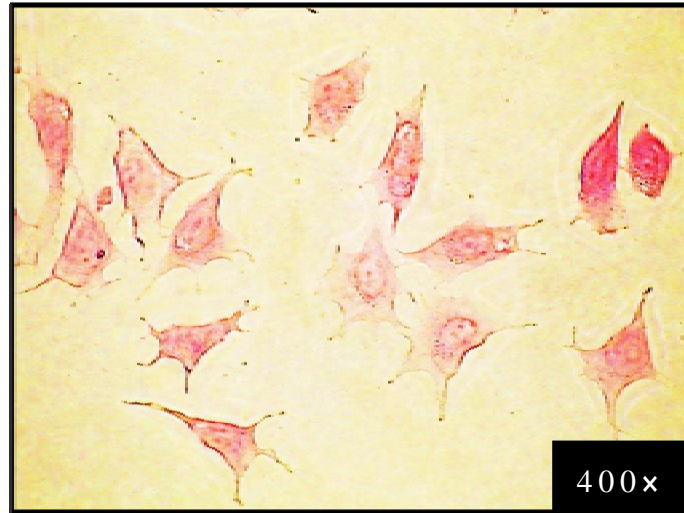
最後, 在氧氣濃度與肌肉細胞的移動情形方面, 本實驗中發現低氧常壓環境下肌原母細胞及肌小管細胞的移動情形都比在正常氧分壓中慢, 雖然有研究證明低氧 (6%) 會增加肌肉細胞的增生 (Csete et al., 2001; Chakravarthy et al., 2001), 但 Greenbaum et al. (1997) 提出肌肉在生理的生長條件下氧濃度約為 6%, 而本實驗中低氧常壓環境下的濃度為 1%, 因此 6% 的氧濃度可能不被視為真正的缺氧。Di Carlo, De Mori, Martelli & Pompilio (2004) 也指出持續或長期中斷氧氣的產生, 可能會導致肌肉細胞生長停滯, 因此氧氣在受損肌肉的修復期間也扮演關鍵的角色。Di et al. (2004) 的實驗將肌原母細胞加入分化培養基後, 分別放在低氧 (1%) 及常氧環境中 72 小時, 他們指出在常氧下隨著時間的增加, 肌原母細胞會融合成為肌小管細胞, 而低氧卻會抑制肌原母細胞的分化作用。此外他們將肌原母細胞加入分化培養基放置低氧環境中 48 小時, 然後移至常氧環境中, 再分別加入生長培養基或分化培養基, 結果發現加入生長培養基的肌原母細胞會再重新進入細胞週期並增生, 而加入分化培養基的肌原母細胞則是會繼續形成肌小管細胞, 此研究證明低氧對於肌原母細胞有著可逆性的作用, 當氧氣濃度恢復正常時肌原母細胞會繼續增長或分化。因此, 我們認為在低氧環境中, 肌肉細胞

的正常功能及代謝可能會跟著改變，進而影響其移動速度。

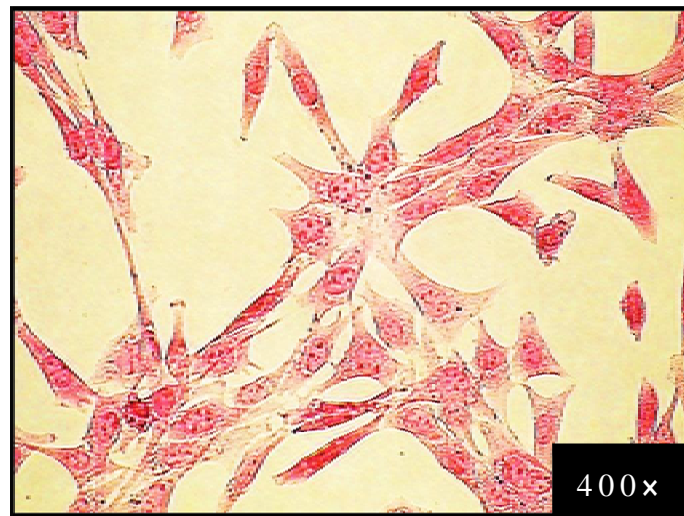
就我們所知，先前的研究沒有比較肌原母細胞及肌小管細胞的移動速度，而我們的研究發現無論在正常氧分壓或低氧環境下，肌小管細胞的移動速度比肌原母細胞慢，而造成這樣的結果可能是因為在正常的生理過程中損傷肌纖維的再生是依靠肌原母細胞的增生及分化來完成修復的。

在本研究中發現活化的吞噬細胞培養液與細胞激素 TNF- α 、IL-6 都會明顯抑制肌原母細胞及肌小管細胞的移動速度，且在低氧分壓下同樣也會限制肌肉細胞的移動速度，顯示細胞激素及氧氣濃度都是調節肌肉細胞的移動速度的作用因素，而影響的可能機制還需要進一步的調查。

(A) 肌原母細胞 (Myoblast)

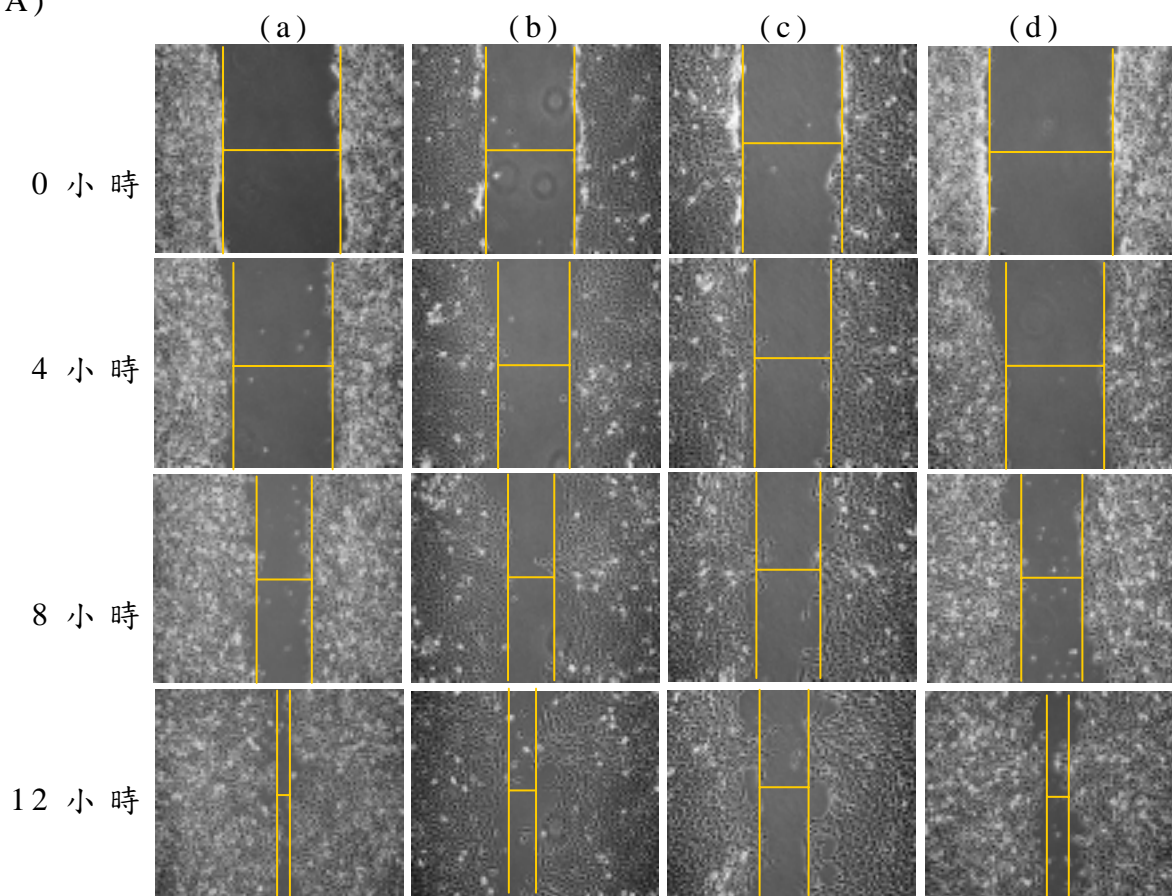


(B) 肌小管細胞 (Myotube)

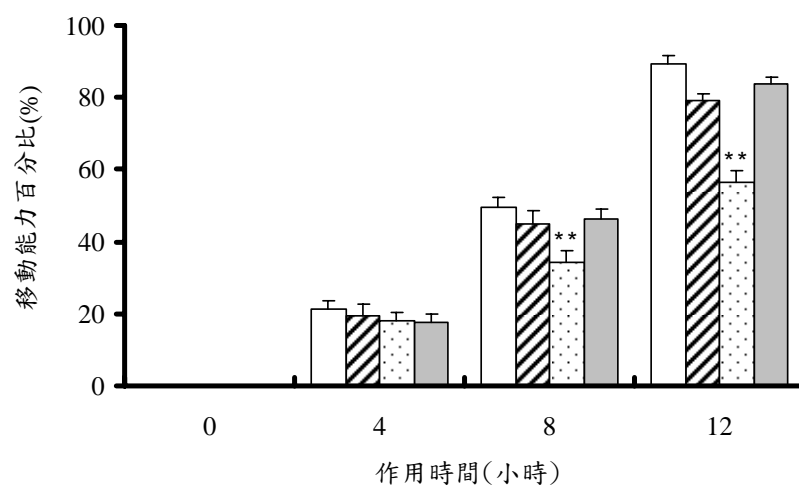


圖二、小鼠 C₂C₁₂ 肌原母細胞與肌小管細胞之型態，Eosin Y stain 染色後拍攝。

(A)



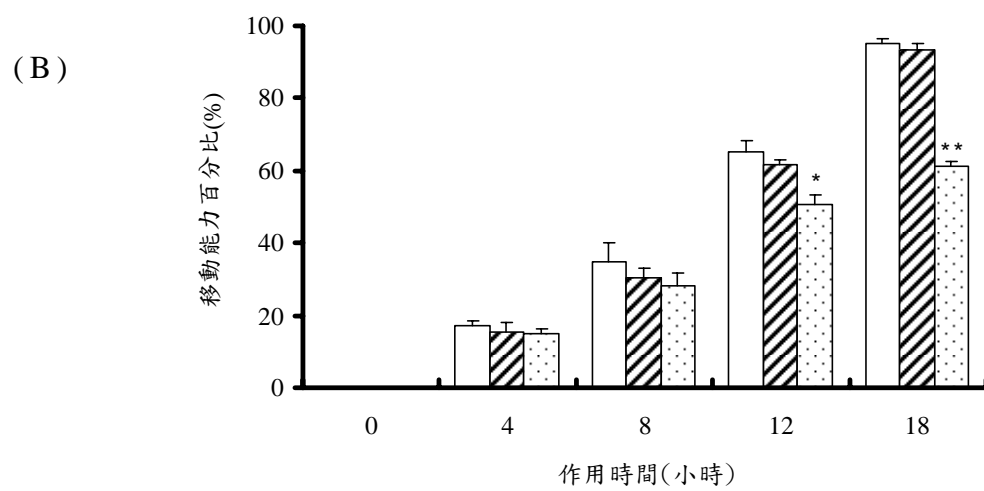
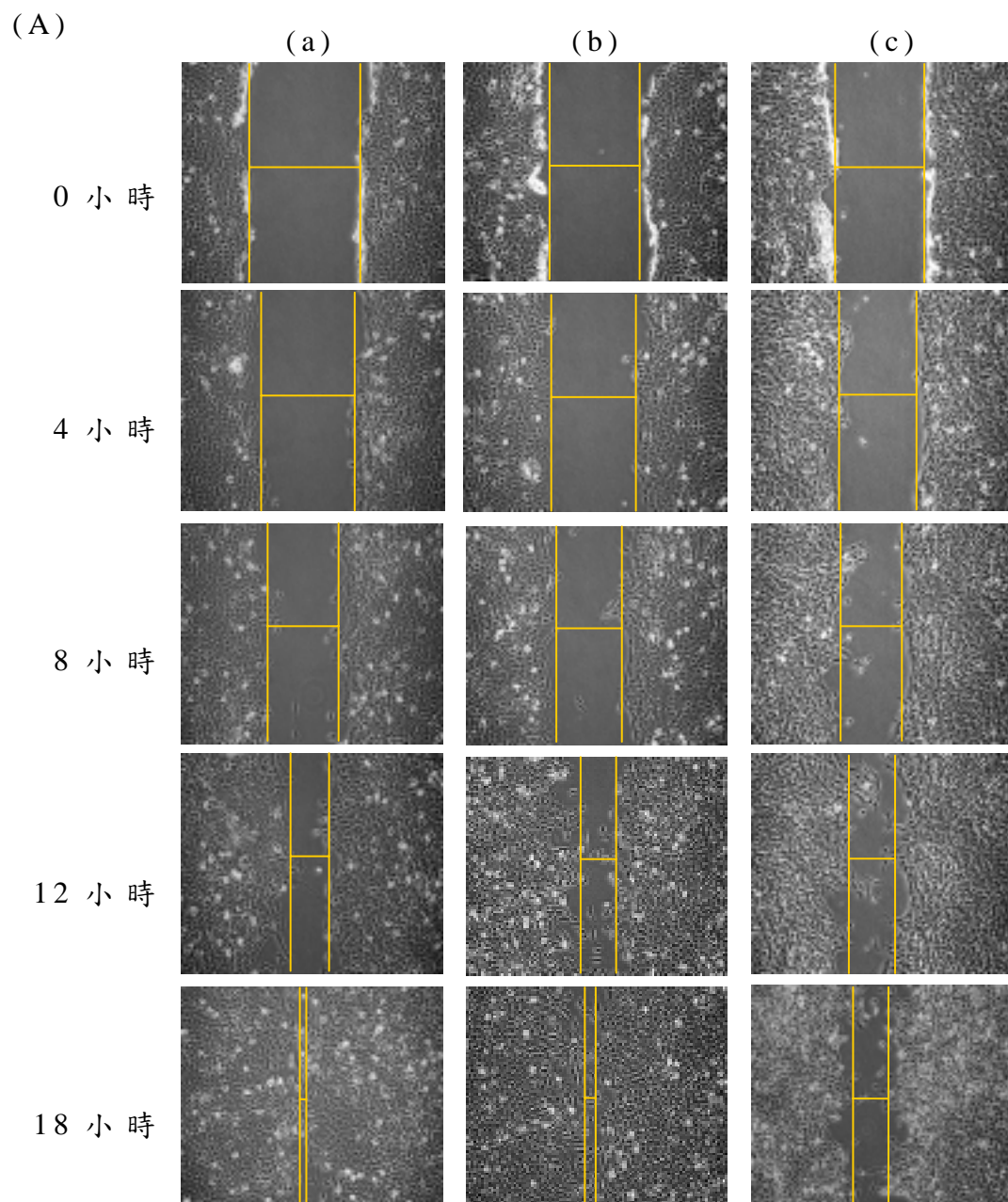
(B)



圖三、正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液對肌原母細胞移動速度及百分比的影響

(A)為肌原母細胞在正常氧分壓下的移動速度圖。(a)對照組為未加任何刺激物；(b)為外加未活化的吞噬細胞培養液共同培養；(c)是外加經 LPS/IFN γ 活化的吞噬細胞培養液共同培養；(d)則是單純外加 LPS/IFN γ 後共同培養的肌原母細胞。左右細胞間的距離設為基準線，以上各組均在基準線設定後的 0-4-8-12 小時以 100 倍的顯微鏡拍下細胞移動的照片。

(B)為肌原母細胞移動速度百分比量化圖。□：未加任何刺激物，▨：未活化的吞噬細胞培養液共同培養，▩：經 LPS/IFN γ 活化的吞噬細胞培養液共同培養，■：單純外加 LPS/IFN γ 後共同培養的肌原母細胞之結果。* $p < .05$ 。

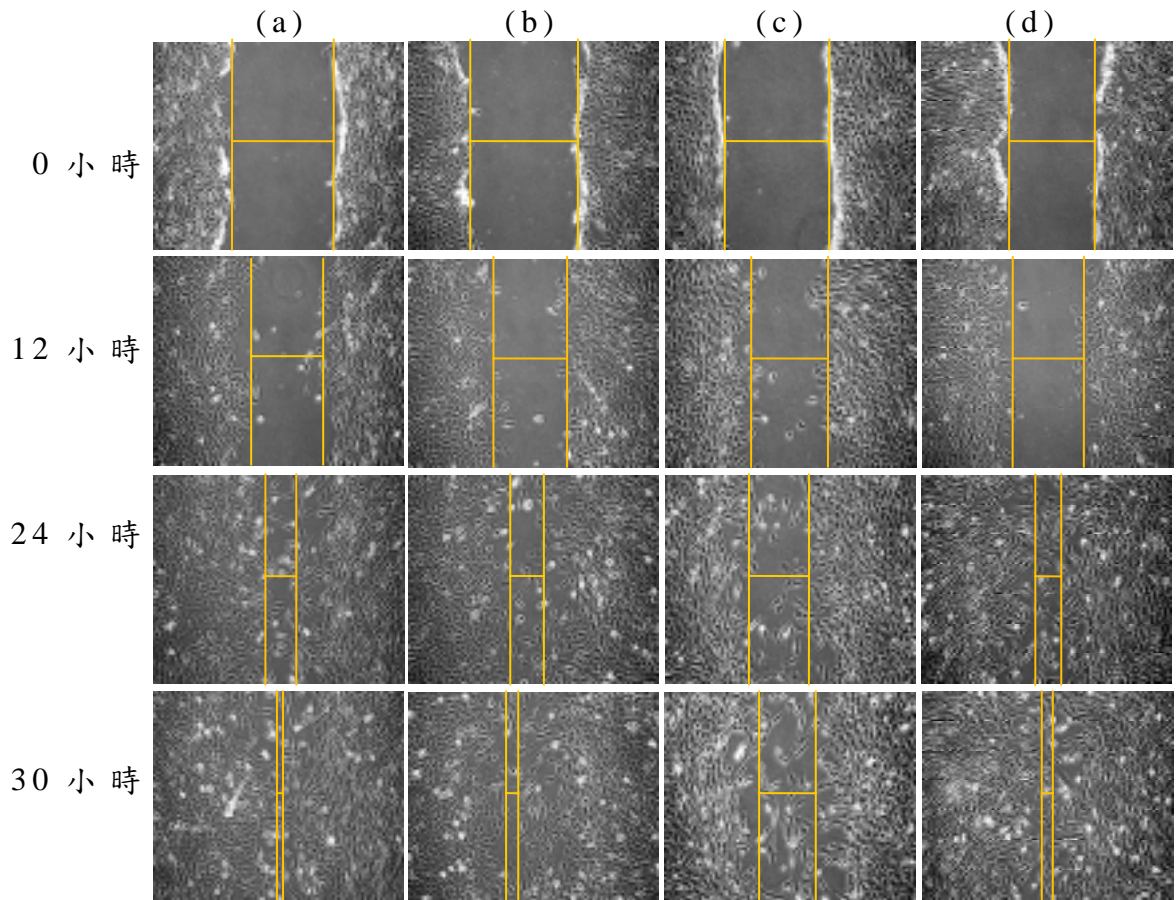


圖四、低氧常壓環境下活化的吞噬細胞培養液對肌原母細胞移動速度及百分比的影響

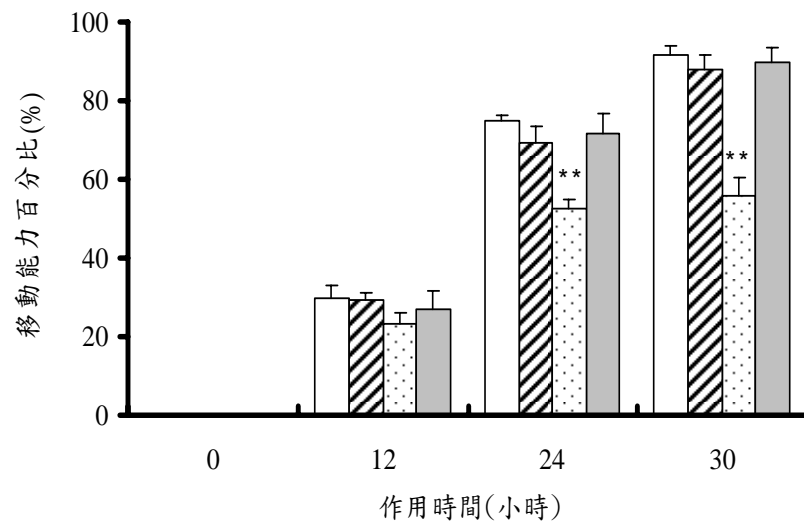
(A)為肌原母細胞在低氧常壓環境下的移動速度圖。(a)對照組為未加任何刺激物；(b)為外加未活化的吞噬細胞培養液共同培養；圖(c)則是外加經 LPS/IFN γ 活化的吞噬細胞培養液共同培養的肌原母細胞。左右細胞間的距離設為基準線，以上各組均在基準線設定後的 0-4-8-12-18 小時以 100 倍的顯微鏡拍下細胞移動的照片。

(B)為肌原母細胞移動速度百分比量化圖。□：未加任何刺激物，▨：未活化的吞噬細胞培養液共同培養，◻：經 LPS/IFN γ 活化的吞噬細胞培養液共同培養的肌原母細胞之移動速度百分比結果。*p < .05，**p < .01。

(A)



(B)

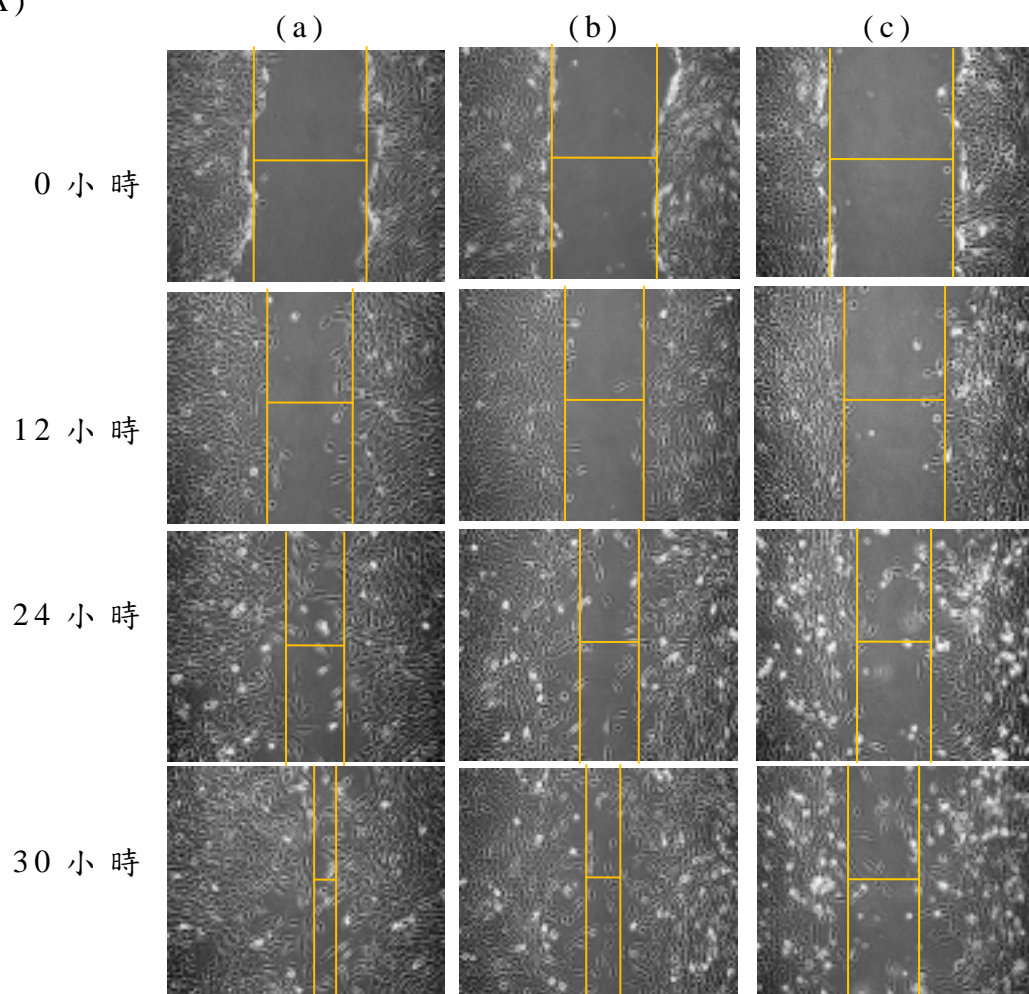


圖五、正常氧分壓下活化的吞噬細胞培養液對肌小管細胞移動速度及百分比的影響

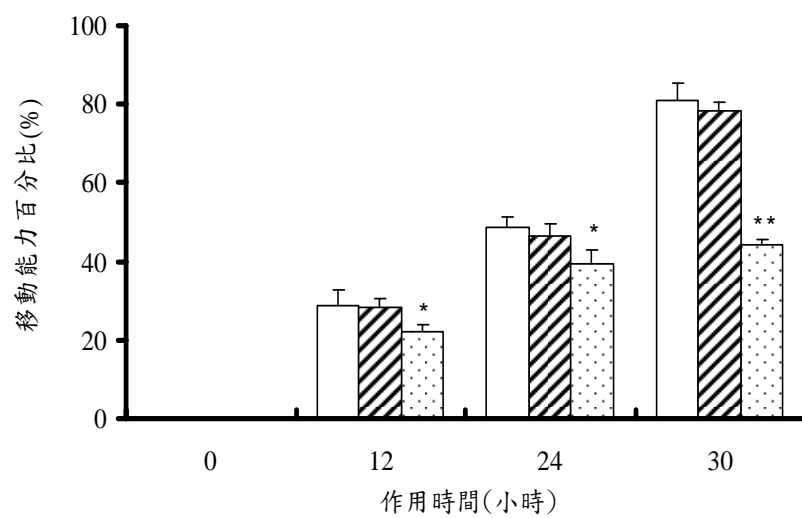
(A)為肌小管細胞在正常氧分壓下的移動速度圖。(a)對照組為未加任何刺激物；(b)為外加未活化的吞噬細胞培養液共同培養；(c)是外加活化的吞噬細胞培養液共同培養；(d)則是單純外加 LPS/IFN γ 後共同培養的肌小管細胞。左右細胞間的距離設為基準線，以上各組均在基準線設定後的 0-12-24-30 小時以 100 倍的顯微鏡拍下細胞移動的照片。

(B)為肌小管細胞移動速度百分比量化圖。□：未加任何刺激物，▨：未活化的吞噬細胞培養液共同培養，▤：經 LPS/IFN γ 活化的吞噬細胞培養液共同培養，■：單純外加 LPS/IFN γ 後共同培養的肌小管細胞之移動速度百分比結果。 ** $p < .01$ 。

(A)



(B)

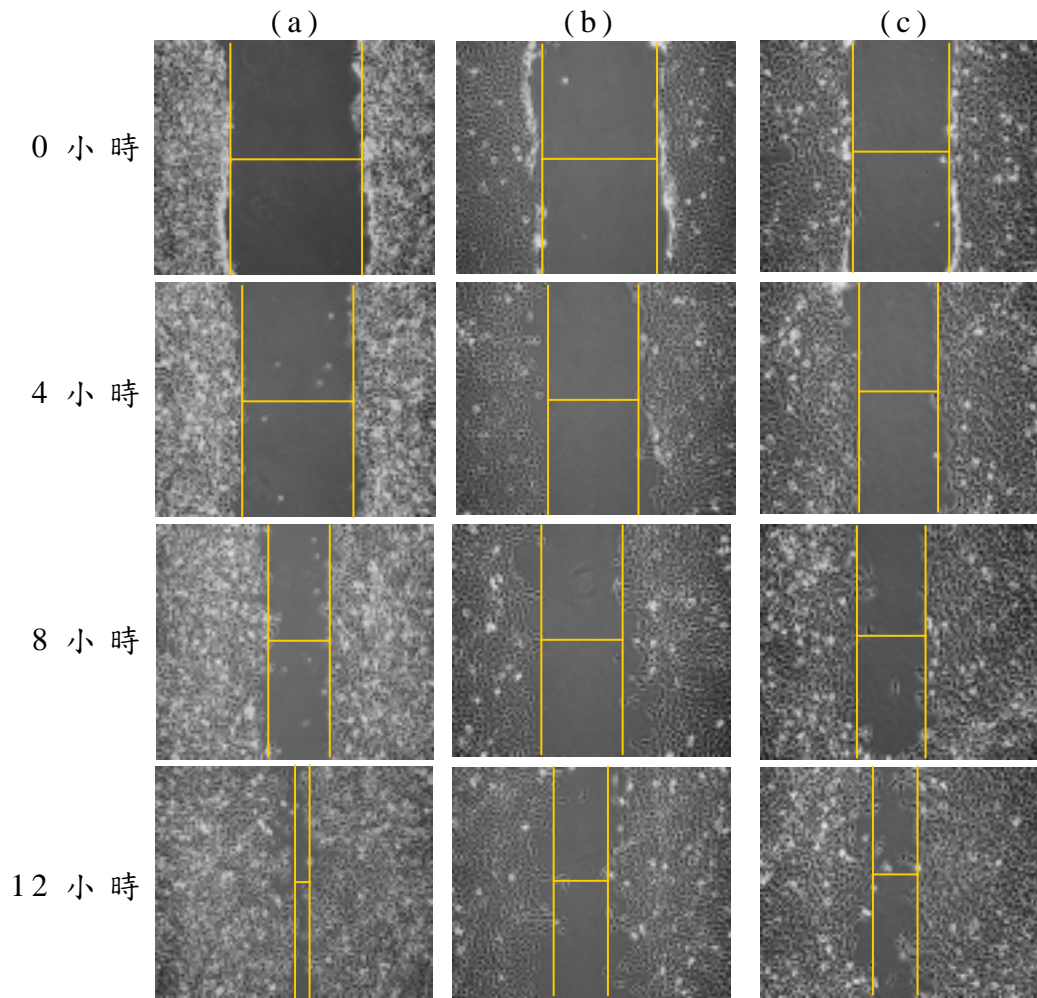


圖六、低氧常壓環境下活化的吞噬細胞培養液對肌小管細胞
移動速度及百分比的影響

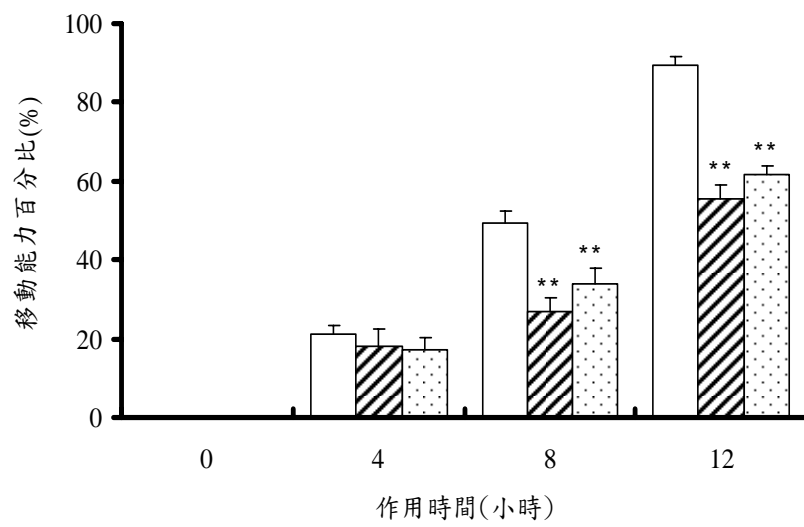
(A)為肌小管細胞在低氧常壓環境下的移動速度圖。(a)對照組為未加任何刺激物；(b)為外加未活化的吞噬細胞培養液共同培養；(c)則是外加經 LPS/IFN γ 活化的吞噬細胞培養液共同培養的肌小管細胞。左右細胞間的距離設為基準線，以上各組均在基準線設定後的 0-12-24-30 小時以 100 倍的顯微鏡拍下細胞移動的照片。

(B)為肌小管細胞移動速度百分比量化圖，□：未加任何刺激物，▨：未活化的吞噬細胞培養液共同培養，▣：經 LPS/IFN γ 活化的吞噬細胞培養液共同培養的肌小管細胞之移動速度百分比結果。* $p < .05$ ，** $p < .01$ 。

(A)



(B)

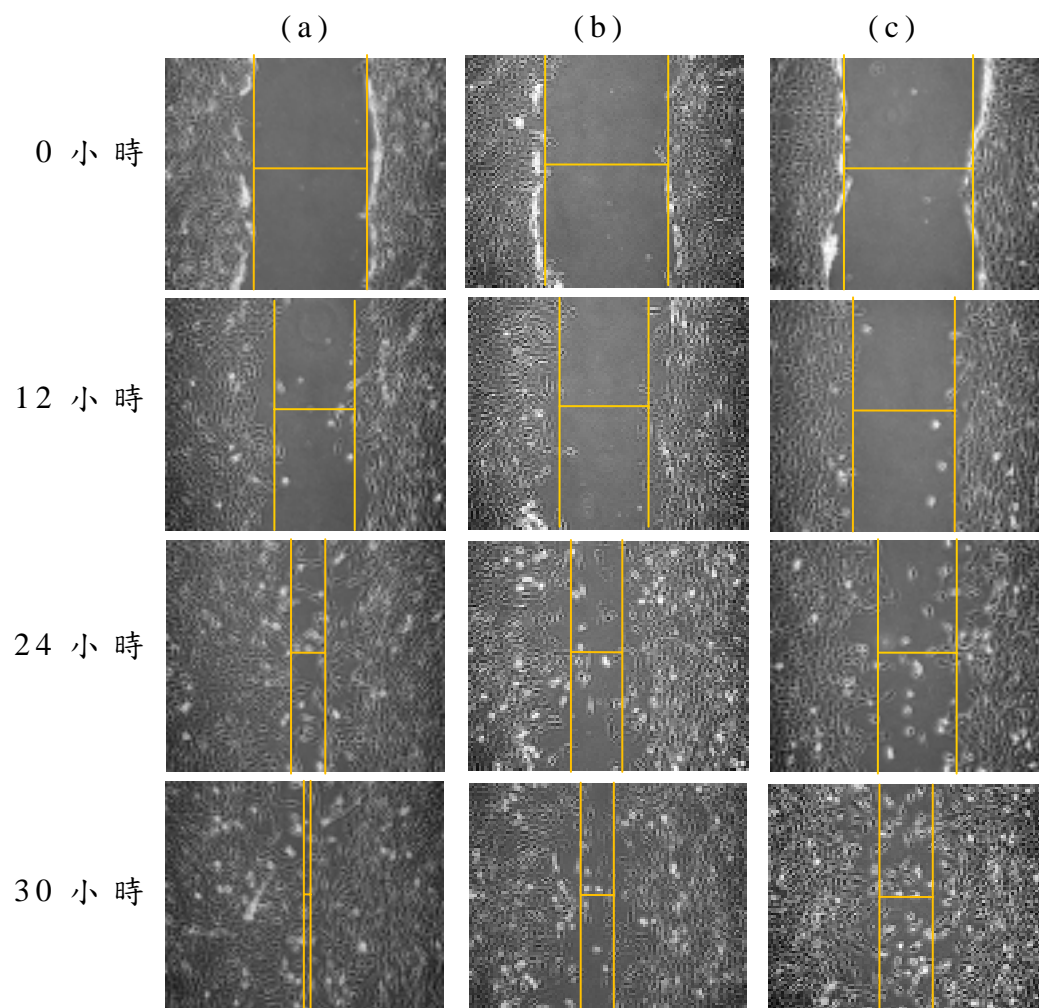


圖七、正常氧分壓下 TNF- α 或 IL-6 對肌原母細胞之移動速度的影響

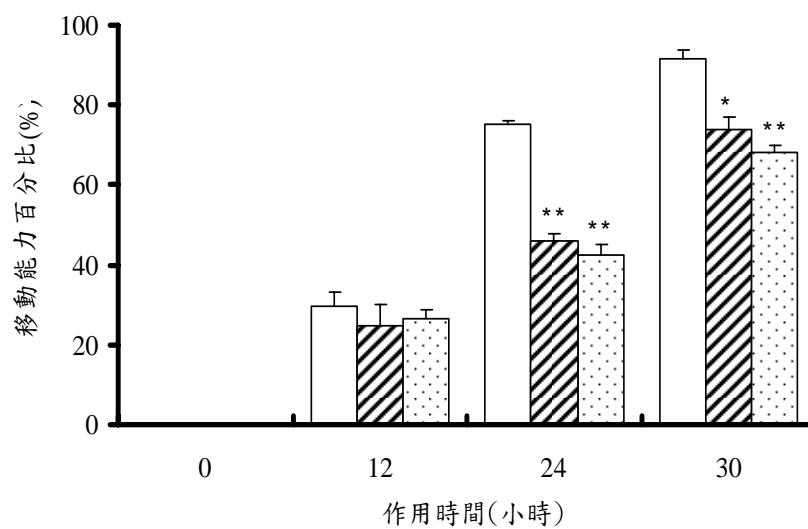
(A)為肌原母細胞在正常氧分壓下的移動速度圖。(a)對照組為未加任何刺激物；(b)為單純外加 1 ng/ml TNF- α 共同培養；(c)則是單純外加 1 ng/ml IL-6 共同培養後的肌原母細胞。左右細胞間的距離設為基準線，以上各組均在基準線設定後的 0-4-8-12 小時以 100 倍的顯微鏡拍下細胞移動的照片。

(B)為肌原母細胞移動速度百分比量化圖，□：未加任何刺激物，▨：單純外加 1 ng/ml TNF- α 共同培養，▩：單純外加 1 ng/ml IL-6 共同培養後的肌原母細胞之移動速度百分比結果。***p < .01。

(A)



(B)



圖八、正常氧分壓下 TNF- α 或 IL-6 對肌小管細胞之移動速度的影響

(A)為肌小管細胞在正常氧分壓下的移動速度圖。(a)對照組為未加任何刺激物；(b)為單純外加 1 ng/ml TNF- α 共同培養；(c)則是單純外加 1 ng/ml IL-6 共同培養的肌小管細胞。左右細胞間的距離設為基準線，以上各組均在基準線設定後的 0-12-24-30 小時以 100 倍的顯微鏡拍下細胞移動的照片。

(B)為肌小管細胞移動速度百分比量化圖，□：未加任何刺激物，▨：單純外加 1 ng/ml TNF- α 共同培養，▩：單純外加 1 ng/ml IL-6 共同培養後的肌小管細胞之移動速度百分比結果。* $p < .05$ ，** $p < .01$ 。

表一、正常氧分壓下活化的吞噬細胞分泌的細胞激素濃度

| 細胞激素 | 濃度 (ng/ml) |
|-----------------------------------|---------------|
| 腫瘤壞死因子- α (TNF- α) | 35 \pm 6.58 |
| 介白素-6 (IL-6) | 9 \pm 3.37 |

(平均值 \pm 標準差)

參考文獻

- Adams, G. R., & McCue, S. A. (1998). Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol*, 84(5), 1716-1722.
- Albina, J. E., Henry, W. L., Jr., Mastrofrancesco, B., Martin, B. A., & Reichner, J. S. (1995). Macrophage activation by culture in an anoxic environment. *J Immunol*, 155(9), 4391-4396.
- Altstaedt, J., Kirchner, H., & Rink, L. (1996). Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology*, 89(4), 563-568.
- Anderson, J. E. (1998). Murray L. Barr Award Lecture. Studies of the dynamics of skeletal muscle regeneration: the mouse came back! *Biochem Cell Biol*, 76(1), 13-26.
- Argiles, J. M., & Lopez-Soriano, F. J. (1998). Catabolic proinflammatory cytokines. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 1(3), 245-251.
- Aronson, D., Wojtaszewski, J. F., Thorell, A., Nygren, J., Zangen, D., Richter, E. A., et al. (1998). Extracellular-regulated protein kinase cascades are activated in response to injury in human skeletal muscle. *Am J Physiol*, 275(2 Pt 1), C555-561.
- Arthur, P. G., Giles, J. J., & Wakeford, C. M. (2000). Protein synthesis during oxygen conformance and severe hypoxia in the mouse muscle cell line C2C12. *Biochim Biophys*

- Acta*, 1475(1), 83-89.
- Best, T. M., & Hunter, K. D. (2000). Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 11(2), 251-266.
- Bischoff, R. (1997). Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn*, 208(4), 505-515.
- Bjornheden, T., Levin, M., Evaldsson, M., & Wiklund, O. (1999). Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(4), 870-876.
- Boettiger, D., Enomoto-Iwamoto, M., Yoon, H. Y., Hofer, U., Menko, A. S., & Chiquet-Ehrismann, R. (1995). Regulation of integrin alpha 5 beta 1 affinity during myogenic differentiation. *Dev Biol*, 169(1), 261-272.
- Brunelli, S., & Rovere-Querini, P. (2008). The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol Res*, 58(2), 117-121.
- Butler, A. A., & Le Roith, D. (2001). Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol*, 63, 141-164.
- Cannon, J. G., & St Pierre, B. A. (1998). Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem*, 179(1-2), 159-167.
- Cantini, M., & Carraro, U. (1995). Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 54(1),

121-128.

- Cantini, M., Giurisato, E., Radu, C., Tiozzo, S., Pampinella, F., Senigaglia, D., et al. (2002). Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci*, 23(4), 189-194.
- Cantini, M., Massimino, M. L., Bruson, A., Catani, C., Dalla Libera, L., & Carraro, U. (1994). Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 202(3), 1688-1696.
- Cantini, M., Massimino, M. L., Rapizzi, E., Rossini, K., Catani, C., Dalla Libera, L., et al. (1995). Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 216(1), 49-53.
- Chakravarthy, M. V., Spangenburg, E. E., & Booth, F. W. (2001). Culture in low levels of oxygen enhances in vitro proliferation potential of satellite cells from old skeletal muscles. *Cell Mol Life Sci*, 58(8), 1150-1158.
- Charge, S. B., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84(1), 209-238.
- Cooney, R. N., Maish, G. O., 3rd, Gilpin, T., Shumate, M. L., Lang, C. H., & Vary, T. C. (1999). Mechanism of IL-1 induced inhibition of protein synthesis in skeletal

- muscle. *Shock*, 11(4), 235-241.
- Corti, S., Salani, S., Del Bo, R., Sironi, M., Strazzer, S., D'Angelo, M. G., et al. (2001). Chemotactic factors enhance myogenic cell migration across an endothelial monolayer. *Exp Cell Res*, 268(1), 36-44.
- Croisier, J. L., Forthomme, B., Namurois, M. H., Vanderthommen, M., & Crielaard, J. M. (2002). Hamstring muscle strain recurrence and strength performance disorders. *Am J Sports Med*, 30(2), 199-203.
- Csete, M., Walikonis, J., Slawny, N., Wei, Y., Korsnes, S., Doyle, J. C., et al. (2001). Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. *J Cell Physiol*, 189(2), 189-196.
- De Benedetti, F., Alonzi, T., Moretta, A., Lazzaro, D., Costa, P., Poli, V., et al. (1997). Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J Clin Invest*, 99(4), 643-650.
- Deasy, B. M., Qu-Peterson, Z., Greenberger, J. S., & Huard, J. (2002). Mechanisms of muscle stem cell expansion with cytokines. *Stem Cells*, 20(1), 50-60.
- Di Carlo, A., De Mori, R., Martelli, F., Pompilio, G., Capogrossi, M. C., & Germani, A. (2004). Hypoxia inhibits myogenic differentiation through accelerated MyoD degradation. *J Biol Chem*, 279(16), 16332-16338.

- Distler, J. H., Wenger, R. H., Gassmann, M., Kurowska, M., Hirth, A., Gay, S., et al. (2004). Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 50(1), 10-23.
- Espat, N. J., Copeland, E. M., & Moldawer, L. L. (1994). Tumor necrosis factor and cachexia: a current perspective. *Surg Oncol*, 3(5), 255-262.
- Espersen, G. T., Elbaek, A., Ernst, E., Toft, E., Kaalund, S., Jersild, C., et al. (1990). Effect of physical exercise on cytokines and lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *APMIS*, 98(5), 395-400.
- Frisen, J., Risling, M., & Fried, K. (1993). Distribution and axonal relations of macrophages in a neuroma. *Neuroscience*, 55(4), 1003-1013.
- Frost, R. A., Nystrom, G. J., & Lang, C. H. (2002). Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283(3), R698-709.
- Fukushima, K., Badlani, N., Usas, A., Riano, F., Fu, F., & Huard, J. (2001). The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med*, 29(4), 394-402.
- Garrett, W. E., Jr. (1996). Muscle strain injuries. *Am J Sports Med*, 24(6 Suppl), S2-8.
- Goodman, M. N. (1994). Interleukin-6 induces skeletal muscle

- protein breakdown in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 205(2), 182-185.
- Greenbaum, A. R., Etherington, P. J., Manek, S., O'Hare, D., Parker, K. H., Green, C. J., et al. (1997). Measurements of oxygenation and perfusion in skeletal muscle using multiple microelectrodes. *J Muscle Res Cell Motil*, 18(2), 149-159.
- Grounds, M. D., White, J. D., Rosenthal, N., & Bogoyevitch, M. A. (2002). The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem*, 50(5), 589-610.
- Grounds, M. D., & Yablonka-Reuveni, Z. (1993). Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser*, 3, 210-256.
- Guttridge, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V., Wang, C. Y., & Baldwin, A. S., Jr. (2000). NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*, 289(5488), 2363-2366.
- Haddad, F., Zaldivar, F., Cooper, D. M., & Adams, G. R. (2005). IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol*, 98(3), 911-917.
- Halevy, O., & Lerman, O. (1993). Retinoic acid induces adult muscle cell differentiation mediated by the retinoic acid receptor-alpha. *J Cell Physiol*, 154(3), 566-572.
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2(1), 38-47.

- Hawke, T. J., & Garry, D. J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91(2), 534-551.
- Honda, H., Kimura, H., & Rostami, A. (1990). Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle. *Immunology*, 70(2), 272-277.
- Hopkins, S. J. (2003). The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med (Tokyo)*, 5 Suppl 1, S45-57.
- Huard, J., Li, Y., & Fu, F. H. (2002). Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am*, 84-A(5), 822-832.
- Hughes, C. t., Hasselman, C. T., Best, T. M., Martinez, S., & Garrett, W. E., Jr. (1995). Incomplete, intrasubstance strain injuries of the rectus femoris muscle. *Am J Sports Med*, 23(4), 500-506.
- Hurme, T., Kalimo, H., Lehto, M., & Jarvinen, M. (1991). Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc*, 23(7), 801-810.
- Jaattela, M. (1991). Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor-alpha/cachectin. *Lab Invest*, 64(6), 724-742.
- Jarvinen, T. A., Jarvinen, T. L., Kaariainen, M., Kalimo, H., & Jarvinen, M. (2005). Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*, 33(5), 745-764.
- Kaariainen, M., Jarvinen, T., Jarvinen, M., Rantanen, J., &

- Kalimo, H. (2000). Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports*, 10(6), 332-337.
- Kasemkijwattana, C., Menetrey, J., Bosch, P., Somogyi, G., Moreland, M. S., Fu, F. H., et al. (2000). Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop Relat Res*(370), 272-285.
- Kasemkijwattana, C., Menetrey, J., Somogyi, G., Moreland, M. S., Fu, F. H., Buranapanitkit, B., et al. (1998). Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. *Cell Transplant*, 7(6), 585-598.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., et al. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature*, 431(7007), 466-471.
- Konigsberg, I. R. (1963). Clonal analysis of myogenesis. *Science*, 140, 1273-1284.
- Kook, S. H., Son, Y. O., Lee, K. Y., Lee, H. J., Chung, W. T., Choi, K. C., et al. (2008). Hypoxia affects positively the proliferation of bovine satellite cells and their myogenic differentiation through up-regulation of MyoD. *Cell Biol Int*, 32(8), 871-878.
- Lang, C. H., Fan, J., Cooney, R., & Vary, T. C. (1996). IL-1 receptor antagonist attenuates sepsis-induced alterations

- in the IGF system and protein synthesis. *Am J Physiol*, 270(3 Pt 1), E430-437.
- Langen, R. C., Schols, A. M., Kelders, M. C., Wouters, E. F., & Janssen-Heininger, Y. M. (2003). Enhanced myogenic differentiation by extracellular matrix is regulated at the early stages of myogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 39(3-4), 163-169.
- Layne, M. D., & Farmer, S. R. (1999). Tumor necrosis factor-alpha and basic fibroblast growth factor differentially inhibit the insulin-like growth factor-I induced expression of myogenin in C2C12 myoblasts. *Exp Cell Res*, 249(1), 177-187.
- Le, Q. T., Denko, N. C., & Giaccia, A. J. (2004). Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 23(3-4), 293-310.
- Lescaudron, L., Peltekian, E., Fontaine-Perus, J., Paulin, D., Zampieri, M., Garcia, L., et al. (1999). Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord*, 9(2), 72-80.
- Lewis, J. S., Lee, J. A., Underwood, J. C., Harris, A. L., & Lewis, C. E. (1999). Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol*, 66(6), 889-900.
- Li, X., Zhu, L., Chen, X., & Fan, M. (2007). Effects of hypoxia on proliferation and differentiation of

- myoblasts. *Med Hypotheses*, 69(3), 629-636.
- Li, Y. P., & Reid, M. B. (2000). NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(4), R1165-1170.
- Li, Y. P., & Reid, M. B. (2001). Effect of tumor necrosis factor-alpha on skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Rheumatol*, 13(6), 483-487.
- Li, Y. P., Schwartz, R. J., Waddell, I. D., Holloway, B. R., & Reid, M. B. (1998). Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J*, 12(10), 871-880.
- Lieskovska, J., Guo, D., & Derman, E. (2002). IL-6-overexpression brings about growth impairment potentially through a GH receptor defect. *Growth Horm IGF Res*, 12(6), 388-398.
- Mahoney, D. J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A., & Tarnopolsky, M. A. (2005). Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J*, 19(11), 1498-1500.
- McLennan, I. S. (1993). Resident macrophages (ED2- and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres. *Cell Tissue Res*, 272(1), 193-196.
- Megeney, L. A., & Rudnicki, M. A. (1995). Determination versus differentiation and the MyoD family of

- transcription factors. *Biochem Cell Biol*, 73(9-10), 723-732.
- Menetrey, J., Kasemkijwattana, C., Day, C. S., Bosch, P., Vogt, M., Fu, F. H., et al. (2000). Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br*, 82(1), 131-137.
- Menko, A. S., & Boettiger, D. (1987). Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell*, 51(1), 51-57.
- Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F., & Gardahaut, M. F. (1999). Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve*, 22(6), 724-732.
- Mintz, B., & Baker, W. W. (1967). Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(2), 592-598.
- Muhl, H., & Pfeilschifter, J. (2003). Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int Immunopharmacol*, 3(9), 1247-1255.
- Nakashima, J., Tachibana, M., Ueno, M., Baba, S., & Tazaki, H. (1995). Tumor necrosis factor and coagulopathy in patients with prostate cancer. *Cancer Res*, 55(21), 4881-4885.
- O'Connor, R. S., Mills, S. T., Jones, K. A., Ho, S. N., & Pavlath, G. K. (2007). A combinatorial role for NFAT5

- in both myoblast migration and differentiation during skeletal muscle myogenesis. *J Cell Sci*, 120(Pt 1), 149-159.
- Orchard, J., & Best, T. M. (2002). The management of muscle strain injuries: an early return versus the risk of recurrence. *Clin J Sport Med*, 12(1), 3-5.
- Orimo, S., Hiyamuta, E., Arahata, K., & Sugita, H. (1991). Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve*, 14(6), 515-520.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S., & Pedersen, B. K. (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol*, 508 (Pt 3), 949-953.
- Paoni, N. F., Peale, F., Wang, F., Errett-Baroncini, C., Steinmetz, H., Toy, K., et al. (2002). Time course of skeletal muscle repair and gene expression following acute hind limb ischemia in mice. *Physiol Genomics*, 11(3), 263-272.
- Quintero, A. J., Wright, V. J., Fu, F. H., & Huard, J. (2009). Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury. *Clin Sports Med*, 28(1), 1-11.
- Rantanen, J., Hurme, T., Lukka, R., Heino, J., & Kalimo, H. (1995). Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells.

Lab Invest, 72(3), 341-347.

- Rawls, A., Morris, J. H., Rudnicki, M., Braun, T., Arnold, H. H., Klein, W. H., et al. (1995). Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev Biol*, 172(1), 37-50.
- Reecy, J., Miller, S., & Webster, M. (2003). Recent advances that impact skeletal muscle growth and development research. *Journal of Animal Science*, 81(Number 13 Electronic Supplement 1), E1.
- Reyes-Reyna, S. M., & Krolick, K. A. (2000). Chemokine production by rat myocytes exposed to interferon-gamma. *Clin Immunol*, 94(2), 105-113.
- Rhoads, R. P., Johnson, R. M., Rathbone, C. R., Liu, X., Temm-Grove, C., Sheehan, S. M., et al. (2009). Satellite cell-mediated angiogenesis in vitro coincides with a functional hypoxia-inducible factor pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(6), C1321-1328.
- Robertson, T. A., Maley, M. A., Grounds, M. D., & Papadimitriou, J. M. (1993). The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp Cell Res*, 207(2), 321-331.
- Round, J. M., Jones, D. A., & Cambridge, G. (1987). Cellular infiltrates in human skeletal muscle: exercise induced damage as a model for inflammatory muscle disease? *J Neurol Sci*, 82(1-3), 1-11.
- Rudnicki, M. A., & Jaenisch, R. (1995). The MyoD family of

- transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays*, 17(3), 203-209.
- Saito, H., Hammond, A. T., & Moses, R. E. (1995). The effect of low oxygen tension on the in vitro-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives. *Exp Cell Res*, 217(2), 272-279.
- Scannell, G., Waxman, K., Kaml, G. J., Ioli, G., Gatanaga, T., Yamamoto, R., et al. (1993). Hypoxia induces a human macrophage cell line to release tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in vitro. *J Surg Res*, 54(4), 281-285.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75(2), 163-189.
- Schwartz, J., Huo, J. S., & Piwien-Pilipuk, G. (2002). Growth hormone regulated gene expression. *Minerva Endocrinol*, 27(4), 231-241.
- Sheehan, S. M., & Allen, R. E. (1999). Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J Cell Physiol*, 181(3), 499-506.
- Smith, C., Kruger, M. J., Smith, R. M., & Myburgh, K. H. (2008). The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med*, 38(11), 947-969.
- Smith, M. A., Moylan, J. S., Smith, J. D., Li, W., & Reid, M.

- B. (2007). IFN-gamma does not mimic the catabolic effects of TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(6), C1947-1952.
- St Pierre, B. A., & Tidball, J. G. (1994). Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol*, 77(1), 290-297.
- Stegall, T., & Krolick, K. A. (2001). Myocytes respond in vivo to an antibody reactive with the acetylcholine receptor by upregulating interleukin-15: an interferon-gamma activator with the potential to influence the severity and course of experimental myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, 119(2), 377-386.
- Thaloor, D., Miller, K. J., Gephart, J., Mitchell, P. O., & Pavlath, G. K. (1999). Systemic administration of the NF-kappaB inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury. *Am J Physiol*, 277(2 Pt 1), C320-329.
- Torrente, Y., El Fahime, E., Caron, N. J., Del Bo, R., Belicchi, M., Pisati, F., et al. (2003). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates chemotactic response in mouse myogenic cells. *Cell Transplant*, 12(1), 91-100.
- Toumi, H., & Best, T. M. (2003). The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med*, 37(4), 284-286.
- Tracey, K., & Cerami, A. (1993). Tumor necrosis factor, other

- cytokines and disease. *Annual review of cell biology*, 9(1), 317-343.
- Tsujinaka, T., Ebisui, C., Fujita, J., Kishibuchi, M., Morimoto, T., Ogawa, A., et al. (1995). Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 207(1), 168-174.
- Tuzun, E., Li, J., Wanasen, N., Soong, L., & Christadoss, P. (2006). Immunization of mice with T cell-dependent antigens promotes IL-6 and TNF-alpha production in muscle cells. *Cytokine*, 35(1-2), 100-106.
- Vassalli, P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 10, 411-452.
- Vaupel, P., & Hockel, M. (2003). Tumor oxygenation and its relevance to tumor physiology and treatment. *Adv Exp Med Biol*, 510, 45-49.
- Verrall, G. M., Slavotinek, J. P., Barnes, P. G., Fon, G. T., & Spriggins, A. J. (2001). Clinical risk factors for hamstring muscle strain injury: a prospective study with correlation of injury by magnetic resonance imaging. *Br J Sports Med*, 35(6), 435-439; discussion 440.
- Vreugdenhil, G., Lowenberg, B., Van Eijk, H. G., & Swaak, A. J. (1992). Tumor necrosis factor alpha is associated with disease activity and the degree of anemia in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Invest*, 22(7), 488-493.

- Warren, G. L., Hulderman, T., Jensen, N., McKinstry, M., Mishra, M., Luster, M. I., et al. (2002). Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J*, *16*(12), 1630-1632.
- Yun, J. K., McCormick, T. S., Villabona, C., Judware, R. R., Espinosa, M. B., & Lapetina, E. G. (1997). Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(25), 13903-13908.