

Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats

Ratchakrit Sriluea , Chumpol Pholpramool , Yindee Kitiyanant and Tossaporn Yimlamai

บทคัดย่อ

1. มีรายงานที่เป็นหลักฐานอย่างแน่ชัดว่า satellite cells มีส่วนสำคัญในสร้างกล้ามเนื้อขณะอยู่ในระยะพัฒนาการ แต่บทบาทของเซลล์กลุ่มนี้ในการซ่อมแซมกล้ามเนื้อหลังการถูกทุบ ยังเป็นที่รู้กันน้อย รายงานนี้ได้ทำการศึกษากิจกรรมของ satellite cells ของกล้ามเนื้อของหนูแรท โดยใช้สารติดฉลากจำเพาะเพื่อศึกษาด้วย immunofluorescence และศึกษาโดยวิธี real – time PCR ณ เวลาต่างๆ (ระหว่าง 3 ชม. ถึง 7 วัน)
2. พบการอักเสบของกล้ามเนื้อที่บาดเจ็บภายใน 6 ชม. จากนั้นมีการทำลายเส้นใยกล้ามเนื้อในเวลา 12 ชม. และมีการสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อใหม่ปรากฏขึ้นในวันที่ 7
3. มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของนิวเคลียสที่ติดฉลากด้วย MyoD (satellite cells ที่ถูกกระตุ้น) ในกล้ามเนื้อที่บาดเจ็บในเวลา 6 ชม. และสูงสุดที่ 16 ชม. หลังถูกทุบ แล้วจึงลดลงถึงระดับปกติในวันที่ 7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนนิวเคลียสที่ติดฉลากด้วย MyoD เกิดคู่ขนานกับจำนวนนิวเคลียสที่ติดฉลากด้วย bromodeoxy uridine ในทางกลับกันไม่ปรากฏการแสดงออกของโปรตีน myogenin จนกระทั่งหลังวันที่ 3 หลังจากนั้นจึงเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 7 และพบการข้อมติคควบ MyoD และ myogenin ภายในเซลล์เดียวกันเพียงเล็กน้อย
4. การแสดงออกของ MyoD mRNA ณ เวลาต่างๆ สอดคล้องกับโปรตีน MyoD อย่างไรก็ดีตาม มีการแสดงออกของ myogenin mRNA สูงสุด ณ เวลา 6 ชม. และวันที่ 7 หลังถูกทุบ การแสดงออกสูงสุดครั้งที่ 2 เกิดพร้อมกับการเพิ่ม myostatin mRNA
5. ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า การทุบกล้ามเนื้อกระตุ้นประชากรกลุ่มเดียวของ satellite cells ให้เพิ่มจำนวนภายใน 3 วัน ตามด้วยการเปลี่ยนรูปร่างให้กลายเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อใหม่ ซึ่งส่วนหนึ่งอาจอยู่ภายใต้อิทธิพลของ myostatin

คำสำคัญ muscle contusion , muscle regeneration , MyoD , Myogenin , myostatin , satellite cells

Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats

Ratchakrit Srikuera,* Chumpol Pholpramool,* Yindee Kitiyanant^{††} and Tossaporn Yimlamai*

Departments of *Physiology, [†]Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok and ^{††}Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Nakorn Pathom, Thailand

SUMMARY

1. The role of satellite cells in muscle growth during development is well documented, but the involvement of these cells in muscle repair after contusion is less well known. In the present study, we investigated the time-course of satellite cell activity (from 3 h to 7 days) after contusion of rat gastrocnemius muscle using specific molecular markers for immunofluorescence and real-time polymerase chain reaction (PCR).

2. Inflammation of the injured muscle occurred within 6 h, followed by disintegration of the damaged myofibres within 12 h. Newly formed myofibres appeared by Day 7.

3. The number of MyoD-positive nuclei (activated satellite cells) in the injured muscle was significantly increased by 6 h, reaching a maximum by 12 h after contusion. However, the number of MyoD-positive nuclei decreased towards control levels by Day 7. Changes in the number of bromodeoxyuridine-labelled nuclei (proliferating satellite cells) paralleled the changes seen in the number of MyoD-positive nuclei. Conversely, expression of myogenin protein was not apparent until Day 3 and increased further by Day 7. Colabelling of MyoD and myogenin was seen in only a few cells.

4. The time-course of MyoD mRNA expression corresponded with MyoD protein expression. However, there were two peaks in myogenin mRNA expression: 6 h and Day 7 after contusion. The second peak coincided with upregulation of myostatin mRNA levels.

5. The results of the present study suggest that contusion activates a homogeneous population of satellite cells to proliferate within 3 days, followed by differentiation to form new myofibres. The latter may be regulated, in part, by myostatin.

Key words: muscle contusion, muscle regeneration, MyoD, myogenin, myostatin, satellite cells.

INTRODUCTION

The primary functions of skeletal muscle are for locomotor activity and in postural behaviour. In relation to these functional demands,

skeletal muscle is susceptible to injury after physical trauma. However, a working skeletal musculature is maintained by its remarkable ability to regenerate. Skeletal muscle repair after injury depends on myogenic stem cells, commonly referred to as satellite cells.^{1–3} Electron microscopy has been used to observe satellite cells localized between the basement membrane and basal lamina surrounding individual myofibres.⁴ In mature skeletal muscles, satellite cells are typically quiescent, but can be activated after myotrauma to repair the damaged myofibres, proliferating and differentiating to form myotubes that subsequently mature to form myofibres.¹ Inactivity or a loss of the ability of satellite cells to be activated may lead to sarcopenia, muscle wasting or impaired muscle regeneration after injury.² Therefore, satellite cells play a major role in muscle regeneration.

To date, several approaches have been used to investigate the role of satellite cells in muscle hypertrophy after resistance⁵ or eccentric exercise,^{6,7} as well as regeneration after injury induced by myotoxin,^{8–12} freezing,¹³ muscle atrophy¹⁴ or muscular dystrophy.^{15,16} However, the response of satellite cells in a muscle contusion model, which mimics the physical trauma that occurs in contact sports or after accidents, has been investigated less extensively. In addition, most studies using this model have focused on the histological changes in myofibres,^{17–19} the contractile function of the muscle,²⁰ enhancement of muscle regenerative capacity by growth factors^{21,22} or the expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and interleukin (IL)-6²³ and their receptors in regenerating muscles.²⁴ There have only been a few studies of the direct involvement of satellite cells in muscle regeneration after contusion injury. In one study, *in situ* hybridization was used to demonstrate that both MyoD and myogenin mRNA are expressed within 6 h after injury and that the density of MyoD and myogenin staining is highest at the periphery of the damaged site.²⁵ Conversely, Rantanen *et al.*⁹ compared satellite cell activity after myotoxin and contusion injury, which resulted in disruption of all components of the muscle (i.e. myofibres, nerve and blood vessels) and found that myogenin mRNA was first detected between 8 and 12 h after injury, followed by expression of myogenin protein, with both phenomena occurring before satellite cell proliferation, as evidenced by bromodeoxyuridine (BrdU) staining 24 h after injury. These results suggest that there are at least two populations of satellite cells: committed satellite cells, which are ready to undergo differentiation, and stem satellite cells, which follow the processes of proliferation and differentiation. In addition, it was demonstrated that, in the same time period, changes in myogenin mRNA levels were greater after contusion compared with notexin-induced muscle injury.⁹ In view of the conflicting reports and the differences in the kinetics of muscle degeneration and regeneration in response to different types of injury,^{8,26} the activation and subsequent activity of

Correspondence: Chumpol Pholpramool, Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand. Email: sccpp@mahidol.ac.th

Received 9 January 2010; revision 9 August 2010; accepted 15 August 2010.

© 2010 The Authors

Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology

© 2010 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd