

基于工程化巨噬细胞治疗小鼠骨骼肌损伤修复

李德溢^{1,2}, 高 贇², 张 砾^{1,2}, 王卫东^{1,2}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院医学创新研究部, 工业和信息化部生物医学工程与转化医学重点实验室, 北京 100853

摘要: **背景** 骨骼肌损伤修复是组织再生领域的重要研究前沿, 深入揭示其细胞与分子调控机制对于应对运动损伤、人口老龄化及退行性疾病具有重要意义。**目的** 该研究旨在通过工程化改造巨噬细胞, 构建稳定表达胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)且缺失促纤维化因子转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)的细胞, 评估其在骨骼肌损伤修复中的作用及潜在应用价值。**方法** 利用RAW264.7小鼠巨噬细胞系, 通过CRISPR-Cas9技术敲除巨噬细胞TGF- β 基因, 继而利用慢病毒介导IGF-1稳定表达, 构建稳定表达IGF-1且缺失TGF- β 的工程化巨噬细胞(IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M)。采用蛋白质印迹和酶联免疫吸附试验对细胞进行鉴定, 并通过转录组学分析描绘其与对照细胞的差异表达。将120只C57BL/6鼠随机分为6组, 分别为正常对照组(NC)、PBS对照组、野生型巨噬细胞组(M)、TGF- β 敲除巨噬细胞组(M-TGF^{ko})、IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M治疗组(IGF1M-TGF^{ko})和重组IGF1蛋白组, 于损伤后7 d和14 d利用CatWalk系统对小鼠站立时间、摇摆时间、足印面积及强度等进行统计, 处死取肌组织进行HE、Masson染色并定量分析, 荧光实时定量验证IGF1、Pax7、TNF和IL-1 β 表达情况。**结果** 成功构建IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M细胞。Western blot显示TGF β ^{ko}M细胞TGF- β 蛋白表达缺失, IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M的IGF1表达显著增强; ELISA检测IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M的IGF-1分泌量相比M升高32倍($P < 0.001$)。转录组分析发现, 与M组比较, IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M组中IGF1表达上调, TGF β 下调, 差异基因富集于JAK-STAT、PPAR、ECM-受体相互作用等通路($P_{adj} < 0.05$)。qPCR检测显示, 与PBS组比较, IGF1M-TGF^{ko}组7 d的IGF1($P < 0.001$)和Pax7($P = 0.038$)表达升高, TNF($P = 0.007$)、IL-1 β ($P < 0.001$)短暂升高; 14 d时IGF1因子($P < 0.001$)和Pax7因子($P < 0.028$)持续升高, 炎症因子恢复正常($P > 0.05$)。步态分析显示, 与PBS组比较, IGF1M-TGF^{ko}组7 d的支撑时长[(0.189 \pm 0.025) s vs (0.154 \pm 0.040) s, $P = 0.043$]、摆动时长[(0.140 \pm 0.017) s vs (0.109 \pm 0.016) s, $P = 0.017$]和足印面积[(0.385 \pm 0.057) cm² vs (0.485 \pm 0.079) cm², $P = 0.009$]均显著改善。14 d时功能恢复持续优于对照组。组织学检测表明, IGF1M-TGF^{ko}组7 d肌纤维直径[(51.09 \pm 17.95) μ m vs (39.39 \pm 17.65) μ m, $P = 0.002$]和横截面积[(1 287.48 \pm 734.42) μ m² vs (730.23 \pm 599.48) μ m², $P = 0.040$]显著增大。IGF1M-TGF^{ko}组14 d肌纤维直径[(57.47 \pm 13.86) μ m vs (46.79 \pm 11.54) μ m, $P = 0.002$]和横截面积[(1 698.86 \pm 458.11) μ m² vs (999.24 \pm 150.81) μ m², $P = 0.040$]进一步增大, 胶原纤维面积(0.69% \pm 0.56% vs 6.66% \pm 2.78%, $P = 0.043$)显著减少。**结论** 工程化巨噬细胞注射加速了小鼠骨骼肌功能恢复, 减少了损伤肌肉组织的纤维化。

关键词: 巨噬细胞; 胰岛素样生长因子-1; 转化生长因子 β ; 骨骼肌; 损伤

中图分类号: R392.12

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)04-0337-10

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.24121402

引用本文: 李德溢, 高贇, 张砾, 等. 基于工程化巨噬细胞治疗小鼠骨骼肌损伤修复 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (4): 337-346.

Treatment of skeletal muscle injury in mice based on engineered macrophages

LI Defu^{1,2}, GAO Yun², ZHANG Luo^{1,2}, WANG Weidong^{1,2}

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Key Laboratory of Biomedical Engineering and Translational Medicine, Ministry of Industry and Information Technology, Beijing 100853, China

Corresponding author: WANG Weidong. Email: wangwd301@126.com

Abstract: Background Research on skeletal muscle injury repair represents a critical frontier in tissue regeneration. A deeper understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in muscle repair is pivotal for developing effective strategies to address sports injuries, challenges associated with aging, and degenerative diseases. **Objective** To evaluate the therapeutic potential of engineered macrophages that stably express IGF-1 while lacking transforming growth factor- β (TGF- β), a key driver of fibrosis, investigate their efficacy in promoting skeletal muscle repair and explore their potential for clinical application.

收稿日期: 2024-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(32371490)

第一作者: 李德溢, 硕士. Email: 17301395034@163.com

通信作者: 王卫东, 博士, 研究员, 博士生导师. Email: wangwd301@126.com

Methods The RAW264.7 mouse macrophage cell line was used. The TGF- β gene in macrophages was knocked out using CRISPR-Cas9 technology, and then lentiviral vectors were used to mediate the stable expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Thus, engineered macrophages (IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M) that stably expressing IGF-1 but lacking TGF- β were constructed. The cells were identified using Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and transcriptomic analysis was performed to depict the differential expression between them and control cells. A total of 120 C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group (NC), PBS control group, wild-type macrophage group (M), TGF- β knockout macrophage group (M-TGF^{ko}), IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M treatment group (IGF1M-TGF^{ko}), and recombinant IGF-1 protein group. At 7 d and 14 d after injury, parameters such as the standing time, swing time, footprint area, and intensity of the mice were measured using the CatWalk system. The mice were then sacrificed, and muscle tissues were collected for hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining, followed by quantitative analysis. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to verify the expression of IGF-1, Pax7, TNF, and IL-1 β . **Results** The IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M cells were successfully constructed. Western blot showed that the expression of TGF- β protein was absent in TGF β ^{ko}M cells, while the expression of IGF-1 in IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M cells was significantly enhanced. ELISA results indicated that the secretion of IGF-1 in IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M cells was significantly increased by 32-fold compared with that in the M group ($P < 0.001$). Transcriptomic analysis revealed that compared with the M group, the expression of IGF-1 was up-regulated and the expression of TGF- β was down-regulated in the IGF1^{sec}TGF β ^{ko}M group. The differentially expressed genes were enriched in pathways such as JAK-STAT, PPAR, and ECM-receptor interaction ($P_{adj} < 0.05$). qPCR results showed that compared with the PBS group, the expression of IGF-1 ($P < 0.001$) and Pax7 ($P = 0.038$) in the IGF1M-TGF^{ko} group was increased at 7 d, and the expression of TNF ($P = 0.007$) and IL-1 β ($P < 0.001$) was transiently increased. At 14 d, the expression of IGF-1 ($P < 0.001$) and Pax7 ($P < 0.028$) continued to increase, and the levels of inflammatory factors returned to normal ($P > 0.05$). Gait analysis showed that compared with the PBS group, the support duration (0.189 ± 0.025 s vs 0.154 ± 0.040 s, $P = 0.043$), swing duration (0.140 ± 0.017 s vs 0.109 ± 0.016 s, $P = 0.017$), and footprint area (0.385 ± 0.057 cm² vs 0.485 ± 0.079 cm², $P = 0.009$) of the IGF1M-TGF^{ko} group were significantly improved at 7 d. The functional recovery at 14 d was still better than that of the control group. Histological examination showed that the myofiber diameter (51.09 ± 17.95 μ m vs 39.39 ± 17.65 μ m, $P = 0.002$) and cross-sectional area (1287.48 ± 734.42 μ m² vs 730.23 ± 599.48 μ m², $P = 0.040$) of the IGF1M-TGF^{ko} group were significantly increased at 7 d. At 14 d, the myofiber diameter (57.47 ± 13.86 μ m vs 46.79 ± 11.54 μ m, $P = 0.002$) and cross sectional area (1698.86 ± 458.11 μ m² vs 999.24 ± 150.81 μ m², $P = 0.040$) further increased, and the collagen fiber area ($0.69\% \pm 0.56\%$ vs $6.66\% \pm 2.78\%$, $P = 0.043$) significantly decreased. **Conclusion** The injection of engineered macrophages accelerates the functional recovery of skeletal muscles in mice and reduces the fibrosis of injured muscle tissues.

Keywords: macrophage; insulin-like growth factor-1; transforming growth factor β ; skeletal muscle; injury

Cited as: Li DF, Gao Y, Zhang L, et al. Treatment of skeletal muscle injury in mice based on engineered macrophages[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(4): 337-346.

骨骼肌损伤作为运动医学与创伤修复领域的重要课题,其修复过程常因炎症失衡导致纤维化与再生障碍,严重影响功能恢复^[1-2]。尽管巨噬细胞通过动态表型转换调控炎症消退、肌生成及血管重建的核心作用已被证实^[3-5],但现有干预策略仍难以精准协调其促再生与抗纤维化的双重功能^[5-7]。近期研究发现,基因工程改造巨噬细胞(如过表达IL-10或递送抗纤维化蛋白)在多种组织修复模型中展现出抗炎和促再生双重潜力^[8-14]。本研究旨在突破传统物理治疗和生长因子疗法的局限性^[15-19],通过构建基因修饰的巨噬细胞递送系统,探讨其调控胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)/转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)信号轴平衡的作用机制,为开发抑制纤维化、促进功能恢复的新型治疗策略提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

RAW264.7细胞、293T细胞为本实验室冻存。载体、质粒及引物由通用生物安徽股份有限公

司合成。

1.2 主要试剂及仪器

蛇毒心脏毒素(cardiotoxin, CTX; ZX0005)、EastepTM Super Total RNA Extraction Kit(Promega公司, LS1040)、FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂II(天根试剂有限公司, KP118-02)、FastUniversal快速荧光定量PCR预混试剂(SYBR Green)(天根试剂有限公司, FP217)、酶联免疫吸附检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, EK0376)、戊巴比妥钠(美国Sigma, P3761-25G)、CatWalk步态分析(荷兰诺达思信息技术公司)。

1.3 巨噬细胞的培养、改造及验证

(1) RAW264.7细胞的培养:小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞在含10%胎牛血清、100 μ g/mL青霉素/链霉素抗生素以及100 μ g/mL谷氨酰胺添加物的RMPI 1640完全培养基中生长,将细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温细胞培养箱中培养。

(2)构建敲除TGF- β 的巨噬细胞:根据TGF- β 基因序列,利用在线工具设计针对TGF- β 基因的

特异性 sgRNA(CAACAGCACCCGCGACCGGG)。该sgRNA与目标基因的同源序列识别后,介导Cas蛋白进行结合并切割,从而达到敲除目标基因的目的。将合成的sgRNA克隆到含有Cas9编码序列的慢病毒载体中,得到质粒pCas9Blas-Tgf β 。质粒pCas9Blas-Tgf β 与包装质粒psPAX2、pMD2.G按4:3:1的比例转染至提前准备好的293T细胞内,取转染48 h后得到的慢病毒Lenti-Cas9Blas-Tgf β 感染RAW细胞。RAW感染72 h后用2 μ g/mL浓度的Blasticidin进行筛选,去除阴性细胞。筛选后得到的RAW-TGF β^{ko} 细胞稀释至适当浓度铺至96孔板(50/mL),以此得到RAW-TGF β^{ko} 单克隆细胞,培养扩增后Western blot验证敲除效果。

(3)构建过表达IGF1且敲除TGF- β 的巨噬细胞:使用分子克隆的方式将IGF1序列克隆至慢病毒载体pCDH-GFP中得到pCDH-IGF1-GFP,并放置一个Myc蛋白标签。得到载体后进行过表达IGF1的慢病毒包装。将提前1 d铺板的6孔板293T细胞从培养箱中取出,更换1.5 mL新鲜DMEM完全培养基,然后开始配制转染试剂与质粒复合物,在1.5 mL EP管中按比例加入psPAX2、pMD2.G与pCDH-IGF-GFP质粒,比例依次为3:1:4,然后加入转染试剂进行混匀,静置10 min后加至293T细胞6孔板中,再放入培养箱中培养。4~6 h后更换新鲜DMEM完全培养基,于转染后36 h收集病毒上清液即为慢病毒粗病毒。取IGF1过表达慢病毒感染RAW-TGF β^{ko} 细胞,24 h后弃去含病毒的上清并继续培养48 h,在10 mg/mL的嘌呤霉素中继续培养18 h进行筛选得到稳定表达IGF1的巨噬细胞。

(4)Western blot检测IGF1-Myc蛋白表达:取对数生长期细胞,使用细胞裂解液和PMSF混合物(100:1)提取总蛋白,SDS-PAGE进行分离(80 V, 20 min; 120 V, 50 min)。随后转移至0.45 μ m PVDF膜上,用脱脂牛奶进行室温封闭,再分别使用Myc抗体(1:1 000)与内参Actin抗体(1:1 500)于4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜,次日用二抗(1:2 000)在室温孵育1 h后用全自动发光图像分析系统显影。

(5)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测IGF1因子表达:培养巨噬细胞24 h后,吸取上清液100 μ L,采用酶联免疫法,酶标仪450 nm处测定IGF的吸光度,具体操作按照ELISA试剂说明书进行。

1.4 实验动物(小鼠)的饲养与分组

本实验使用120只健康的7~8周龄雄性SPF级C57BL/6小鼠,购自北京斯贝福生物科技有限公司。饲养环境设定为温度20~25 $^{\circ}$ C,日温差不超过3 $^{\circ}$ C,相对湿度为55.6% \pm 4%。昼夜节律为12 h光照和12 h黑暗循环。小鼠被分笼饲养,每笼5只,给予自由饮食和自由饮水。将小鼠随机分为以下6组,分别为空白对照组(NC组)、肌内注射PBS组(磷酸缓冲盐溶液)、M细胞组(巨噬细胞)、M-TGF $^{\text{ko}}$ 细胞组(TGF敲除巨噬细胞)、IGF1M-TGF $^{\text{ko}}$ 细胞组(过表达IGF1巨噬细胞)和IGF1因子组,每组10只。所有关于小鼠的实验均严格遵循解放军总医院动物管理和使用委员会的指导原则进行(伦理批准号:2023-X19-114)。

1.5 小鼠骨骼肌损伤模型的建立及取材

使用1%戊巴比妥钠新鲜配制的溶液(10 μ L/g),对小鼠进行腹腔注射0.1 mL以实现麻醉。牵动其下肢确认小鼠麻醉完全后,双下肢表面均匀涂抹脱毛膏脱毛,露出皮肤后将小鼠置于平板上,常规消毒、铺巾、固定于仰卧位,暴露胫骨前肌(tibialis anterior, TA)。使用30 G针头的1 mL注射器,局部注射100 μ L,浓度为50 μ g/mL的CTX溶液,以造成胫骨前肌的局部损伤。NC组不做处理,构建小鼠骨骼肌损伤模型。待小鼠麻醉苏醒后,将其放回笼中,观察其运动状态。造模损伤后3 d对小鼠进行原位注射治疗,注入1 \times 10 6 个工程化巨噬细胞;对照小鼠则注射100 μ L无菌PBS或0.5 μ g/100 μ L的IGF1因子。

损伤后7 d和14 d,通过注射过量麻药(戊巴比妥钠400 mg/kg)致死,在TA损伤处进行取材。左侧标本立即置于冻存管中并用液氮保存,右侧标本则用0.9%氯化钠注射液冲洗后,放入40 g/L多聚甲醛溶液中固定。正常组在7 d时采用相同方法进行取材。

1.6 组织学分析

苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE):胫骨前肌固定后,石蜡包埋,横切3~4 μ m厚的连续薄片,脱蜡后进行HE染色,中性树脂封片。通过观察HE染色结果,评估肌肉损伤后的形态变化。Masson染色:将切片置于染缸内进行脱蜡、复水、温热水漂洗后,使用核染液染色60 s,浆染液染色40 s,黄色分色液分色8 min,直至观察到胶原纤维部分褪成淡粉红色,弃去分色液,蓝色复染液染色5 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透

明,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.7 功能学评估

CatWalk XT 10.6 动物步态分析系统(Noldus, 荷兰)标准化测试流程如下:采用75%乙醇清洁玻璃平台,通过光学校准模块设定高速摄像机参数(30 Hz 帧率/1 920×1 080 分辨率),配置爪印检测阈值(灰度值 ≥ 120)及有效周期判定标准;使用红色背景滤光片增强对比度,限定中央60 cm有效采集区;实验前禁食2 h,于温控隔音测试间[(25 \pm 1) $^{\circ}$ C]适应环境;通过归巢行为诱导自发运动,系统自动记录足底接触面积、压强分布及时相关系,人工剔除停顿/探索行为干扰片段;质量控制:每只小鼠获取至少3次有效数据(连续3个完整周期,速度CV $< 10\%$),经软件算法(v3.1.12)进行标准化处理。

1.8 荧光实时定量

总RNA从动物组织样本中提取,按照Shanghai ProgeMa的RNA提取试剂盒操作。提取后的RNA经Nanodrop测定浓度和纯度。利用天根反转录试剂盒将1 μ g总RNA逆转录为cDNA。实时定量PCR(quantitative PCR, qPCR)反应使用SYBR Green体系,按照天根快速荧光定量试剂盒说明书操作。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因相对表达水平,结果由三重复的平均值表示。所用目的基因引物信息见表1。

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

引物名称	序列(5' - 3')
IGF1	F:GCTGGTGGATGCTCTTCAGT R:CACTCATCCACGATGCCTGT
IL-1 β	F:TGACGTTCCCATAGACAACCTG R:CCGCTCTTCATTACACAGGACA
mGapdh	F:ACTCCACTCACGGCAAATTC R:TCTCCATGGTGGTGAAGACA
Pax7	F:GACTCGGCTTCCTCCATCTCAG R:GTAGGTGGTGGGCAGTAAGAC
TNF- α	F:CTTCTGTCTACTGAACTTCGGG R:CACTTGGTGGTTTGCTACGAC

1.9 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 工程化巨噬细胞构建及转录组学

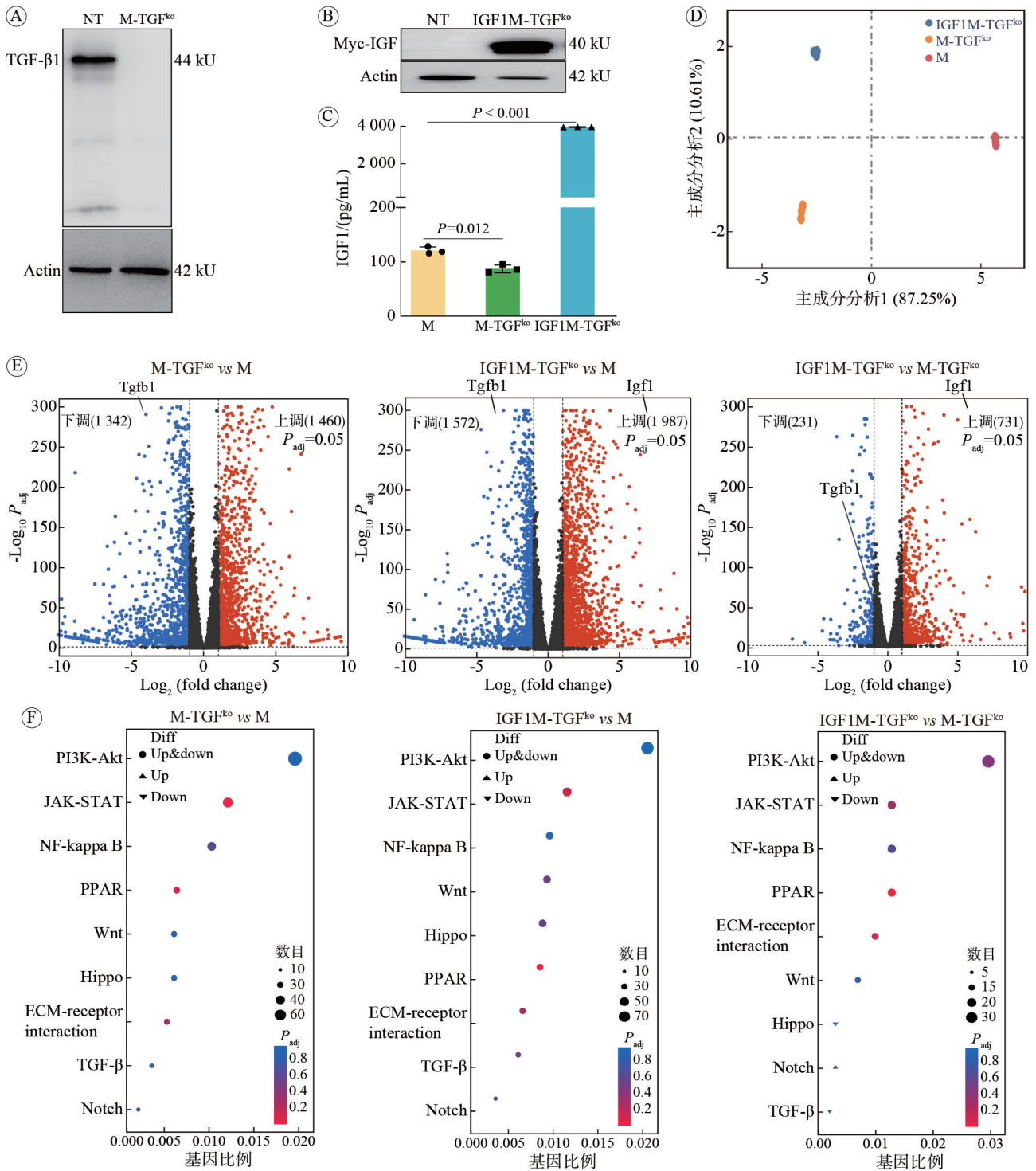
实验结果显示,相比野生型巨噬细胞(M组),M-TGF ko 组中的TGF- β 蛋白表达完全缺失,表明基因敲除效果达到预期(图1A)。在IGF1M-TGF ko 组中,IGF1蛋白表达显著超出M-TGF ko 组,显示出良好的过表达效率(图1B)。通过ELISA试验进一步观察到IGF1分泌水平显著上升,且其与细胞因子分泌相关的功能性指标得到显著增强(图1C)。这些数据有力地证明了TGF- β 敲除和IGF1过表达巨噬细胞模型的成功构建。

对构建的巨噬细胞模型进行转录组学分析后,主成分分析(PCA)结果表明,各组样本的基因表达模式整体差异较小,未呈现显著的聚类或分离趋势(图1D)。火山图结果显示:与M组比较,M-TGF ko 组的巨噬细胞中TGF- $\beta 1$ 表达减少;IGF1M-TGF ko 组的巨噬细胞中TGF- $\beta 1$ 表达减少,Igfl表达增加。与M-TGF ko 组比较,IGF1M-TGF ko 组巨噬细胞的TGF- $\beta 1$ 表达无统计学差异,但Igfl表达增加(图1E)。KEGG通路分析结果显示,与M组比较,M-TGF ko 组和IGF1M-TGF ko 组在JAK-STAT、PPAR通路表达差异;与M-TGF ko 组比较,IGF1M-TGF ko 组在PPAR、ECM-receptor interaction通路表达存在差异。骨骼肌损伤中,巨噬细胞通过JAK-STAT(炎症与修复转换)、PPAR(抗炎与代谢支持)和ECM-receptor interaction(基质重塑与机械信号)3个通路形成动态调控网络。

2.2 动物损伤模型的构建及荧光定量分析

胫骨前肌造模7 d后,肌组织纵切HE染色显示未损伤组肌纤维排列规则,形态完整,肌核位于纤维周边,未见明显炎症细胞浸润或纤维断裂,肌间质结构清晰,未观察到坏死或再生迹象,未见炎性细胞浸润或间质水肿。损伤组(CTX造模)在损伤后呈现典型急性损伤病理特征:局部肌纤维断裂溶解,横纹结构消失,肌膜完整性破坏伴大量嗜酸性物质渗出;间质内可见显著炎性细胞浸润(以中性粒细胞及单核巨噬细胞为主),并伴有血管扩张及水肿带形成(图2A)。验证骨骼肌造模成功。

qPCR检测显示,与PBS组比较,7 d和14 d时,IGF1M-TGF ko 组的IGF1因子表达较高,并且Paired box 7(Pax7)因子表达升高(图2B~图2C)。在炎症方面,与PBS组比较,IGF1M-TGF ko 组的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细



A: 敲除TGF的Western blot条带图; B: 过表达IGF1的Western blot条带图; C: Elisa实验IGF1因子表达; D: 主成分分析表达; E: 组间差异火山图; F: KEGG通路差异气泡图。

图1 工程化巨噬细胞的构建及转录组分析

Fig. 1 Construction of engineered macrophages and transcriptomic analysis

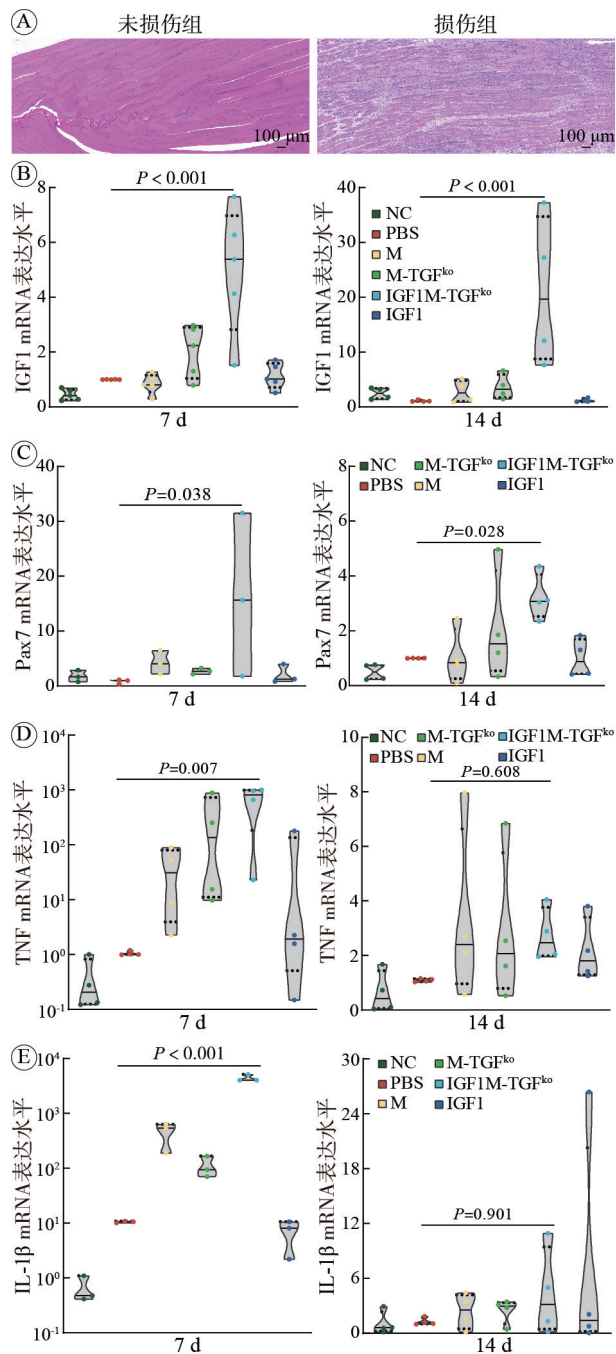
胞介-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)在损伤7 d时均升高, 14 d后无异常(图2D~图2E)。

2.3 骨骼肌运动功能

对7 d和14 d的小鼠进行步态分析, 评估骨骼肌运动功能治疗效果。在整个实验过程中, 定期

监测小鼠的体质量变化(图3A~图3C)。

CatWalk XT 动物步态分析系统采用多模态融合技术(图3D~图3E), 可量化评估以下关键步态参数。支撑时长(Stance Duration): 单肢与平台接触的持续时间, 反映支撑相稳定性; 摆动时长



A: 未损伤组和损伤组肌纤维HE纵切切片(100×); B: IGF1因子7 d、14 d表达情况; C: Pax7因子7 d、14 d表达情况; D: TNF因子7 d、14 d表达情况; E: IL-1 β 因子7 d、14 d表达情况。

图2 动物造模及实时荧光定量

Fig. 2 Animal modeling and real-time quantitative fluorescence analysis

(Swing Duration): 单肢完全离地的时相跨度, 评估运动协调性; 接触面积(Contact Area): 单周期内足底压力区域总和, 表征承重功能恢复; 平均强度(Mean Intensity): 基于标准化压力信号(0~255灰度值)计算的单步平均压强, 体现神经肌肉控制效能。系统通过内置算法(v3.1.12)对步速进行归一

化处理, 可客观量化骨骼肌损伤修复过程中的运动功能动态变化。

与NC组比较, PBS组足部平均强度在损伤7 d和14 d增高, 7 d时IGF1M-TGF^{ko}治疗组在支撑时间、摆动时间上均优于其他治疗组, 有显著改善(图3H)。这表明, 在早期阶段, IGF1M-TGF^{ko}治疗可能更有助于促进骨骼肌损伤的功能修复。14 d时各治疗组小鼠的步态功能进一步改善, 但在支撑时间上仍存在差异, 表明不同治疗组在恢复阶段的效果有所不同。IGF1M-TGF^{ko}组在多个步态参数中持续表现出较高的恢复水平, 显示其治疗效果具备持久性(图3I)。

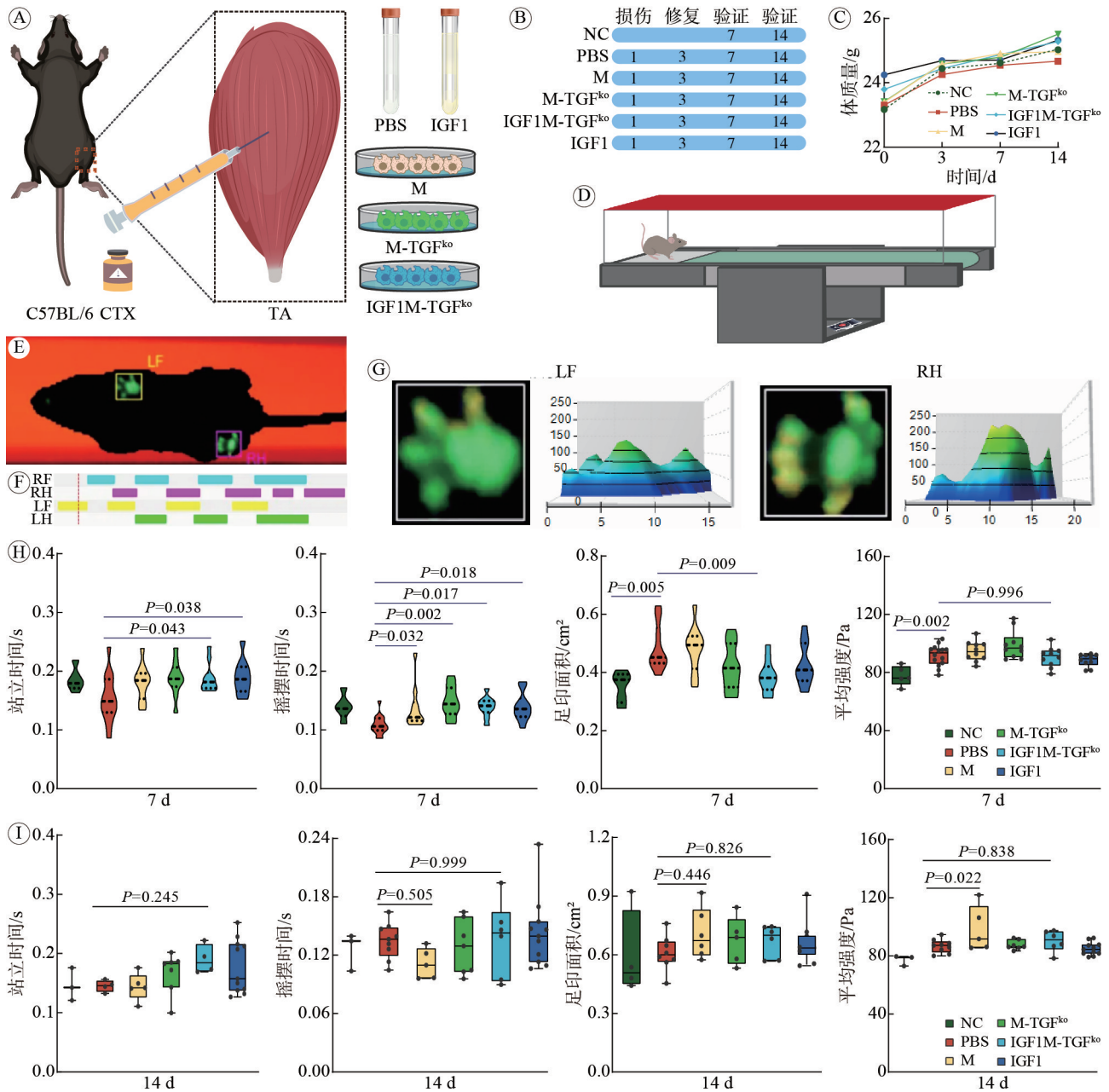
2.4 组织学分析

7 d和14 d分别对小鼠的骨骼肌组织进行称重并计算骨骼肌指数。与PBS组比较, 7 d的M组、M-TGF^{ko}组和IGF1组的肌细胞均出现肿胀(图4B), 而14 d仅PBS组继续显示肿胀(图5B)。对肌肉组织进行HE和Masson染色后, 通过显微镜观察发现, 骨骼肌损伤后, 各组的肌纤维结构均表现出不同程度的紊乱, 肌细胞的细胞质嗜酸性增强, 细胞轮廓变得模糊, 伴随细胞核的肿胀、固缩或消失, 部分细胞甚至可观察到核碎片的形成。此外, 在坏死区域内可见中性粒细胞和巨噬细胞等炎症细胞的显著浸润, 胶原纤维增多在7 d, M组、M-TGF^{ko}组和IGF1M-TGF^{ko}组的损伤部位显示大量巨噬细胞浸润, 且IGF1M-TGF^{ko}组的肌细胞坏死后纤维化较轻(图4A)。14 d时M组中仍可观察到巨噬细胞浸润在损伤部位(图5A)。此外, PBS组和M组的胶原染色明显加深。

使用Image J软件对HE切片进行肌纤维直径和横截面积的定量分析, 并对Masson染色切片进行胶原纤维的定量分析, 以评估纤维化状态。7 d时, 与PBS组比较, IGF1M-TGF^{ko}组的肌纤维直径和面积均有所增大, 表明骨骼肌在损伤后开始再生(图4C、图4D)。14 d时, 与PBS组比较, M组、IGF1M-TGF^{ko}组及IGF1因子组的纤维直径均增大, 其中IGF1M-TGF^{ko}组的肌纤维横截面积也显著增大(图5C、图5D)。胶原纤维定量分析显示, IGF1M-TGF^{ko}组相较于未治疗组有显著改善, 提示骨骼肌的预后良好(图5E)。

3 讨论

骨骼肌损伤作为骨科常见病, 其再生修复涉及复杂的炎症-再生动态平衡过程^[1-2, 20]。传统治疗



A: 小鼠造模及治疗; B: 小鼠实验分组及时间处理; C: 各组小鼠 14 d 内体重变化情况; D: CatWalk 步态分析示意; E: 小鼠脚印 Print; F: 小鼠四肢 RF、RH、LF、LH; G: 小鼠 LF、RH 足部压强; H: 7 d 小鼠站立时间、后肢摇摆时间、足印面积、足迹平均强度统计; I: 14 d 小鼠站立时间、后肢摇摆时间、足印面积、足迹平均强度统计。

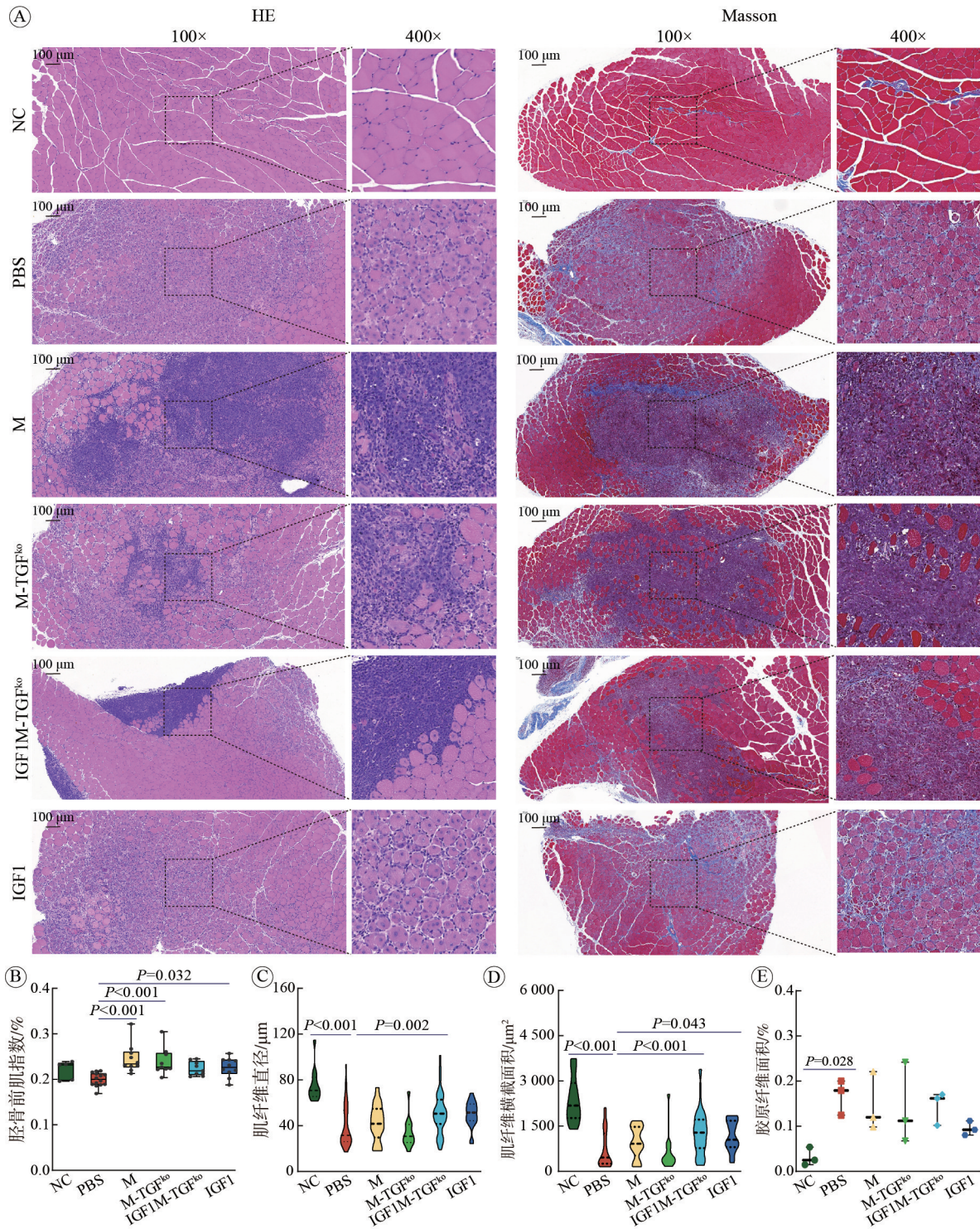
图 3 骨骼肌运动功能

Fig. 3 Skeletal muscle function

手段因抑制炎症反应可能干扰再生进程而存在争议^[17,21]。新兴疗法如生长因子和干细胞干预虽展现出潜力，但靶向性不足限制其临床转化^[22]。本研究基于巨噬细胞的免疫可塑性，通过双基因编辑巨噬细胞，在小鼠模型中实现了抗纤维化与促再生的协同效应，为骨骼肌损伤治疗提供了创新策略。

3.1 双基因协同调控的分子基础

TGF- β 作为骨骼肌损伤后纤维化关键调控因子，其敲除通过抑制 Smad2/3 磷酸化阻断成纤维细胞活化^[23-25]。IGF-1 过表达则通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路促进肌卫星细胞增殖，并通过 STAT3 信号诱导巨噬细胞 M2 极化^[26-27]。值得注意的是，IGF1M-TGF β ^{ko} 组在损伤后 7 d 即呈现肌纤维横截面



A: 各组HE和Masson染色(100 ×); B: 骨骼肌指数; C: 肌纤维直径; D: 肌纤维横截面积; E: 胶原纤维面积。

图4 第7天肌组组织染色及再生情况

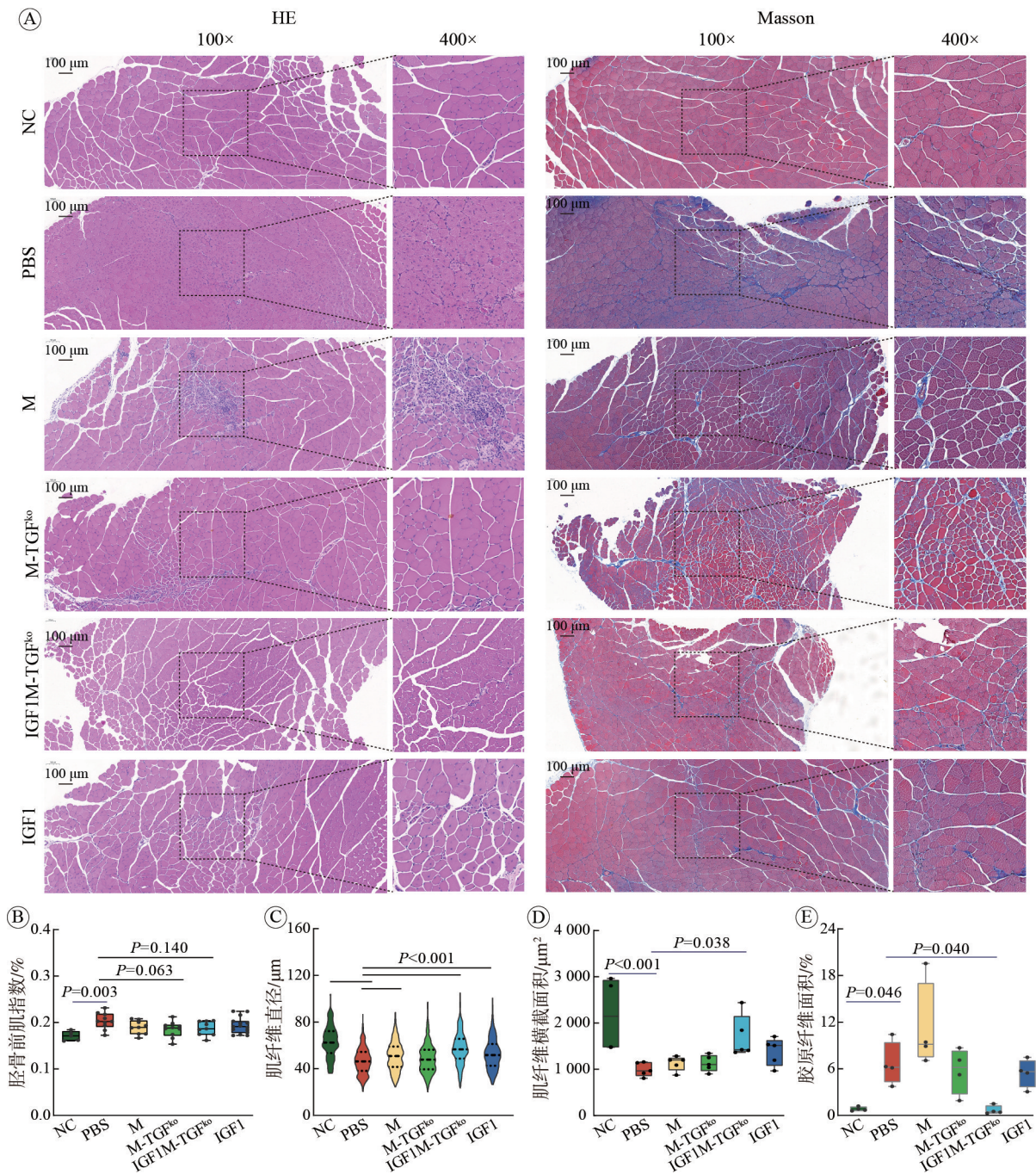
Fig. 4 The staining and regeneration of muscle tissue at 7 d

积增加与胶原沉积减少,表明抗纤维化与促再生信号可早期协同激活。

3.2 炎症-再生时序调控机制

研究揭示了IGF1M-TGF^{ko}组的“双阶段”调控模式:早期(3~7 d)促炎因子TNF- α 短暂升高加

速坏死组织清除,后期(7~14 d)炎症消退伴随Pax7与IGF-1持续表达驱动再生进程。组织病理学显示,早期干预组虽存在肌细胞肿胀,但在14 d呈现更优的肌纤维结构,提示适度炎症可能通过增强巨噬细胞吞噬功能为再生奠定基础。胶原定



A: 各组HE和Masson染色(100×); B: 骨骼肌指数; C: 肌纤维直径; D: 肌纤维横截面积; E: 胶原纤维面积。

图5 第14天肌组组织染色及再生情况

Fig. 5 The staining and regeneration of muscle tissue at 14 d

量显示, IGF1M-TGF β ^{ko}组的纤维化抑制效果显著优于单基因干预组。机制研究表明, TGF- β 敲除通过抑制 Smad3 磷酸化阻断成纤维细胞活化, 而 IGF-1 过表达通过上调 MMP-9/TIMP-1 比值促进胶原降解^[28]。

3.3 局限性与未来方向

在多疾病模型(肺损伤、纤维化、动脉硬化及肿瘤)中, 工程化巨噬细胞的短期存活、靶向归巢

等特性已形成安全性框架^[8-9, 14, 29-30]。本研究通过 14 d 动态监测(图 3C)体质量变化发现, 治疗组与对照组小鼠体质量增长曲线吻合, 提示其未引发以体质量变化为表征的系统性炎症或代谢紊乱。而单一体质量指标无法反映局部器官毒性(如肝肾功能), 后续需结合谷丙转氨酶、血尿素氮等生化检测进一步验证。

本研究还存在一定局限: 需通过流式细胞术

解析巨噬细胞亚群动态演变规律；当前CTX诱导的急性损伤模型虽已阐明分子机制，但策略普适性尚需在慢性损伤模型(如mdx小鼠)及缺血再灌注损伤模型中验证；需延长观察周期评估mTOR通路持续激活的潜在风险；工程化细胞制剂的体内递送效率有待优化。未来研究方向：(1)建立梯度损伤模型(轻/中/重度)及衰老相关损伤模型(SAMP8小鼠)验证策略普适性；(2)开发仿生水凝胶载体提升靶向递送效能；(3)探索心肌缺血再灌注损伤治疗新范式，拟采用冠状动脉结扎模型验证跨组织应用潜力。

3.4 临床转化与科学意义

本研究为骨骼肌损伤治疗提供了两大创新视角。通过双基因编辑突破传统细胞疗法的功能单一性，实现“清创-再生-重塑”一体化修复；利用工程化细胞模拟生理修复时序，为慢性损伤治疗提供新思路。建议未来研究可聚焦于：构建人源化巨噬细胞模型验证跨物种适用性；开发光控/热敏载体实现IGF-1分泌的时空精准调控；探索该策略在心肌或平滑肌损伤中的拓展应用。

本研究发现，TGF- β 敲除联合IGF-1过表达的巨噬细胞工程化策略，通过协调炎症消退与再生激活，显著改善骨骼肌损伤修复质量。其创新性在于将免疫调控与生长因子疗法有机结合，为再生医学领域提供了可借鉴的研究范式。尽管仍需克服技术瓶颈，但该策略展现出良好的临床转化前景，有望成为肌肉损伤个性化治疗的重要手段。

作者贡献 李德溢：实验设计与实施，论文撰写，动物实验及验证；高赞：细胞培养，审读；张路、王卫东：监督指导，审读和修订，获取研究经费。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取，Email: 17301395034@163.com。

参考文献

- Howard EE, Pasiakos SM, Blesso CN, et al. Divergent roles of inflammation in skeletal muscle recovery from injury [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 87.
- Tu H, Li YL. Inflammation balance in skeletal muscle damage and repair [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1133355.
- Rodríguez-Morales P, Franklin RA. Macrophage phenotypes and functions: resolving inflammation and restoring homeostasis [J]. *Trends Immunol*, 2023, 44 (12): 986-998.
- Chazaud B. Inflammation and skeletal muscle regeneration: leave it to the macrophages! [J]. *Trends Immunol*, 2020, 41 (6): 481-492.
- Dort J, Fabre P, Molina T, et al. Macrophages are key regulators of stem cells during skeletal muscle regeneration and diseases [J/OL]. <https://doi.org/10.1155/2019/4761427>.
- Bernard C, Zavoriti A, Pucelle Q, et al. Role of macrophages during skeletal muscle regeneration and hypertrophy-Implications for immunomodulatory strategies [J]. *Physiol Rep*, 2022, 10 (19): e15480.
- Wang XY, Zhou L. The many roles of macrophages in skeletal muscle injury and repair [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 952249.
- Liu HY, He Y, Lu C, et al. Efficacy of pulmonary transplantation of engineered macrophages secreting IL-4 on acute lung injury in C57BL/6J mice [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (9): 664.
- Liu HY, Yang CP, Gao Y, et al. Macrophage-based delivery of anti-fibrotic proteins alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Bioeng Transl Med*, 2023, 8 (5): e10555.
- Wang MY, Zhou SS, Hu YY, et al. Macrophages overexpressing interleukin-10 target and prevent atherosclerosis: Regression of plaque formation and reduction in necrotic core [J]. *Bioeng Transl Med*, 2024, 10 (1): e10717.
- Gao Y, Ju Y, Ren XM, et al. Enhanced infection efficiency and cytotoxicity mediated by vpx-containing lentivirus in chimeric antigen receptor macrophage (CAR-M) [J]. *Heliyon*, 2023, 9 (12): e21886.
- 中国人民解放军总医院第八医学中心. 工程化巨噬细胞RAW-IL10及其在肺纤维化治疗中的应用: CN202310632238.5 [P]. 2023-09-12.
- 中国人民解放军总医院第八医学中心. 稳定表达TGF- β II型受体的工程化巨噬细胞及其在肺纤维化治疗中的应用: CN202310632171.5 [P]. 2023-09-01.
- 王铭仪, 程洋, 蔡星璇, 等. 白细胞介素-10过表达巨噬细胞的极化和靶向成像研究 [J]. *分子影像学杂志*, 2024, 47 (5): 451-457.
- Bisciotti GN, Volpi P. Muscle injury and regeneration: clinical approach [J]. *Minerva Orthop*, 2022, 73 (1): 47-55.
- Tan QY, Li JY, Liu YW, et al. Feasibility of growth factor agent therapy in repairing motor injury [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 842775.
- Eugenis I, Wu D, Rando TA. Cells, scaffolds, and bioactive factors: engineering strategies for improving regeneration following volumetric muscle loss [J]. *Biomaterials*, 2021, 278: 121173.
- Qazi TH, Duda GN, Ort MJ, et al. Cell therapy to improve regeneration of skeletal muscle injuries [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2019, 10 (3): 501-516.
- Sant'Anna JPC, Pedrinelli A, Hernandez AJ, et al. Lesão muscular: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento [J]. *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)*, 2022, 57 (1): 1-13.
- Wu JH, Ren BW, Wang DC, et al. Regulatory T cells in skeletal muscle repair and regeneration: recent insights [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 (8): 680.
- Testa S, Fornetti E, Fuoco C, et al. The war after war: volumetric muscle loss incidence, implication, current therapies and emerging reconstructive strategies, a comprehensive review [J]. *Biomedicines*, 2021, 9 (5): 564.
- Scala P, Rehak L, Giudice V, et al. Stem cell and macrophage roles in skeletal muscle regenerative medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (19): 10867.