

电针对大鼠急性骨骼肌损伤修复中生长相关蛋白和聚集蛋白表达的影响*

袁海洲¹ 唐成林^{1,2} 田源¹ 张毅¹ 唐念珍¹ 高睿琦¹ 曹净¹ 黄思琴¹

摘要

目的:通过观察电针治疗对急性骨骼肌损伤中生长相关蛋白(GAP-43)及聚集蛋白(agrln)表达的影响,探讨电针促进受损骨骼肌功能恢复的作用机制。

方法:将32只SD大鼠随机分为正常组(A组,n=4)、模型组(B组,n=4)、自然恢复组(C组,n=12)、电针组(D组,n=12),A组为空白对照不做任何处理,其余各组使用自制重物打击器建立骨骼肌急性钝挫伤模型,C组不做电针处理自然恢复,D组于造模后48h开始电针干预,每日1次,每次15min。于造模后24h处死B组取材观察造模是否成功,C组及D组于建模后第7、14、21天三个时间点同时取材使用HE染色观察组织形态变化,Western-bolt检测GAP-43及agrln表达情况。

结果:HE染色显示:与A组比较,各组肌细胞大量溶解、肌纤维排列紊乱及炎性细胞浸润。D组与C组比较,肌卫星细胞增殖较快,新生肌纤维明显增多,修复更为迅速。在正常组织中GAP-43表达量极少,骨骼肌损伤后各组中GAP-43表达量显著增高($P<0.05$);在第14天,GAP-43表达量达到高峰,D组继续表达呈上升趋势($P<0.01$),C组开始下降,但仍高于A组($P<0.05$)。与A组相比,骨骼肌受损后各时间点C、D两组agrln的表达明显增多($P<0.05$),其中D组差异最为显著($P<0.01$)。

结论:电针有促进受损骨骼肌恢复的作用,可能与提高GAP-43和agrln的表达水平有关。

关键词 电针;骨骼肌修复;生长相关蛋白;聚集蛋白

中图分类号:R245,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-08-0857-05

Effects of electroacupuncture on expressions of growth associated protein-43 and agrin in acute skeletal muscle injury/YUAN Haizhou, TANG Chenglin, TIAN Yuan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016,31(8): 857—861

Abstract

Objective: To observe effects of electroacupuncture on of expressions growth associated protein (GAP-43) and agrin in acute injury of skeletal muscle, to investigate effects of electroacupuncture on mechanism of recovery of damaged skeletal muscle function.

Method: Thirty-two SD rats were randomly divided into normal group (group A, n=4),model group (group B, n=4), natural recovery group (group C, n=12), electroacupuncture group (group D, n=12).The group A was a control group without any treatment, while other groups were established acute skeletal muscle blunt contusion model, by using homemade heavy blow group C without electroacupuncture treatment, only had natural recovery, group D after modeling 48h had electroacupuncture, 1 times a day, every time 15min. At 24h after modeling, rats group B were sacrificed and observed. After modeling, at the 7th,14th,21st d three time points group C and group D were used to observe the morphological changes with HE staining, and defect GAP-43 as well

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.08.006

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273870);重庆市体育局科研项目(B201408);重庆市渝中区科技计划项目(20140117)

1 重庆医科大学中医药学院,400016; 2 通讯作者

作者简介:袁海洲,男,硕士; 收稿日期:2015-04-20

as agrin expressions with Western-blot technique.

Result: HE staining showed that, compared with group A, the muscle cells of other groups dissolved, muscle fibers arranged in disorder and inflammatory cell infiltrated. Compared with group C, the muscle satellite cells of group D increased rapidly, new muscle fibers increased significantly, and repaired more rapidly. The expression of GAP-43 in normal tissues was few, but in bone injury increased significantly ($P < 0.05$). At the 14th d, the expression of GAP-43 reached the peak, but in group D the expression increased ($P < 0.01$), and in group C the expression began to decline, but still higher than that of group A ($P < 0.05$). Compared with group A, the agrin expression in skeletal muscle damage increased significantly in groups C and D ($P < 0.05$), the difference at three time points in D group was the most significant ($P < 0.01$).

Conclusion: Electroacupuncture could promote the role of skeletal muscle function recovery. It may be related to the increasing of GAP-43 and the expression of agrin.

Author's address Chinese Medicine College, Chongqing Medical University, 400016

Key word electroacupuncture; skeletal muscle repair; growth associated protein-43; agrin

急性骨骼肌损伤是临床最为常见的运动损伤之一,常导致肌纤维断裂、溶解,造成骨骼肌结构破坏及功能障碍,甚至进一步造成肌肉萎缩。研究表明,骨骼肌损伤常伴随不同程度的周围神经损伤,而受损骨骼肌功能的恢复取决于周围神经的再生和乙酰胆碱受体(acetyl choline, AChR)数量的多少^[1],因此促进局部受损神经功能的恢复,是骨骼肌功能恢复的关键之一。电针能够有效地治疗各种急慢性骨骼肌损伤,加速受损骨骼肌的修复,但尚未有电针对急性骨骼肌损伤后肌肉功能恢复作用的报道^[2]。生长相关蛋白(growth associated protein, GAP-43)被认为是神经突触再生的重要分子标志物,在调节和引导突触再生使神经和靶区形成新的联系上起关键作用^[3]。Agrin/MuSk信号通路是AChR的聚集的关键通路之一,聚集蛋白(agrin)起着重要的作用^[4]。那么电针促进骨骼肌修复的作用与二者是否有关,电针能否促进受损骨骼肌局部神经的再生和AChR的聚集,进而加速受损骨骼肌功能的恢复?为此,本研究选择在这方面有代表性的两个蛋白,探讨电针促进肌功能恢复的相关作用机制,为临床上电针治疗骨骼肌损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

1.1.1 实验动物: 8周龄雄性SD大鼠32只,SPF级体重(250±20)g,重庆医科大学动物实验中心提供(SCXK(渝)2012-0001)。32只动物分为4组:A组为正常组,4只鼠;B组为模型组,4只鼠;C组为自然恢

复组,12只鼠;D组为电刺组,12只鼠。

1.1.2 主要试剂及仪器: 电针仪(华佗牌SDZ-II型);自制重物打击器;一次性针灸针(0.25mm×25mm,华佗牌);低温离心机(德国LEICA);试剂:一抗gap-43(购自博士德);agrin(购自Santa)。

1.2 动物模型建立及干预方法

1.2.1 动物造模: A组为空白对照组不予处理,B、C、D组用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,动物俯卧位右后肢外展、伸膝屈踝约90°位固定,使腓肠肌充分暴露,于腓肠肌肌腹中点处标记打击位置,使用自制重物打击器建立骨骼肌急性钝挫伤模型^[5]。打击器:重物铁球220g,导管高度110cm,重力2.2N,打击面积为1cm²,打击能量为2.37J;为保证每只动物腓肠肌受损程度及部位一致,铁球投放及动物固定均由一人操作完成。确认皮肤完整,胫腓骨无骨折,肉眼观察有明显肿胀及淤血,表明造模成功。

1.2.2 干预方法: 于建模成功48h后D组介入电针治疗,C组不做电针干预。用大鼠固定器固定动物后,使其双后肢伸出,取右后肢“足三里”穴(参照李忠仁2007年版《实验针灸学》)、阿是穴作为针刺穴位。阿是穴选取打击部位中心位置,针刺后接电针仪。电针参数:频率2Hz,强度0.4mA,时间15min,每日1次^[6]。C组同步进行模拟固定,但不进行电针刺激。

1.3 取材及标本处理

A组于造模前处死取材,B组造模后24h处死取材,其余各组分别于造模后第7、14、21天三个时间点各取4只动物处死。沿打击部位快速切取腓肠

肌,用PBS缓冲液冲洗干净后,一部分放入事前准备好的冻存管中,于液氮冻存0.5h,然后转移到-80℃冰箱。另一部分,用4%多聚甲醛固定,备以石蜡切片及HE染色。

1.4 HE染色观察

将待测组织从4%多聚甲醛中取出,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切取4 μ m厚度的组织切片,常规脱蜡,染色。于生物显微镜下观察组织形态结构变化,经图像采集系统收集图片。

1.5 GAP-43, agrin 表达水平测定

组织加入裂解液提取GAP-43和 agrin 蛋白,分装,置-80℃冰箱待用。称取等量蛋白样品经SDS聚丙烯酰胺电泳分离后,并转至聚偏二氟乙烯(PVDF)上,5%脱脂奶粉室温封闭1h,再加入Tris-HCl缓冲盐溶液和吐温-20稀释的一抗,4℃过夜。TBST洗3次,加入相应二抗室温孵育1h,洗3次,每次10min,用ECL试剂进行化学发光反应,X线胶片曝光,显影及定影。上述孵育和洗膜过程均在水平摇床上进行,胶片曝光在暗室内进行。

1.6 统计学分析

各组数据采用SPSS19.0软件进行统计学分析,结果以均数 \pm 标准差表示,组间采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 组织形态学改变

由图1可见,正常组大鼠肌纤维排列整齐,形态结构完整(图1-A),模型组大鼠肌纤维断裂、降解、排列紊乱,有炎性细胞出现(图1-B)。自然恢复组7d后肌纤维排列依然紊乱,但炎性细胞明显减少,出现少量的成肌细胞(图1-C),14d后大量肌细胞核出现并有少量新肌纤维生成(图1-D),21d后肌纤维排列紊乱,大量结缔组织出现(图1-E)。D组7d后炎性细胞大量减少,出现少量的成肌细胞核,肌卫星细胞增殖明显(图1-F),14d后肌管及新生肌纤维明显增多,肌细胞核开始较为规则的排列于肌纤维两侧(图1-G),21d后仍可见肌纤维出现,肌管融合肌纤维排列整齐,结缔组织出现,损伤基本愈合(图1-H)。

2.2 不同时间点各组 GAP-43 表达

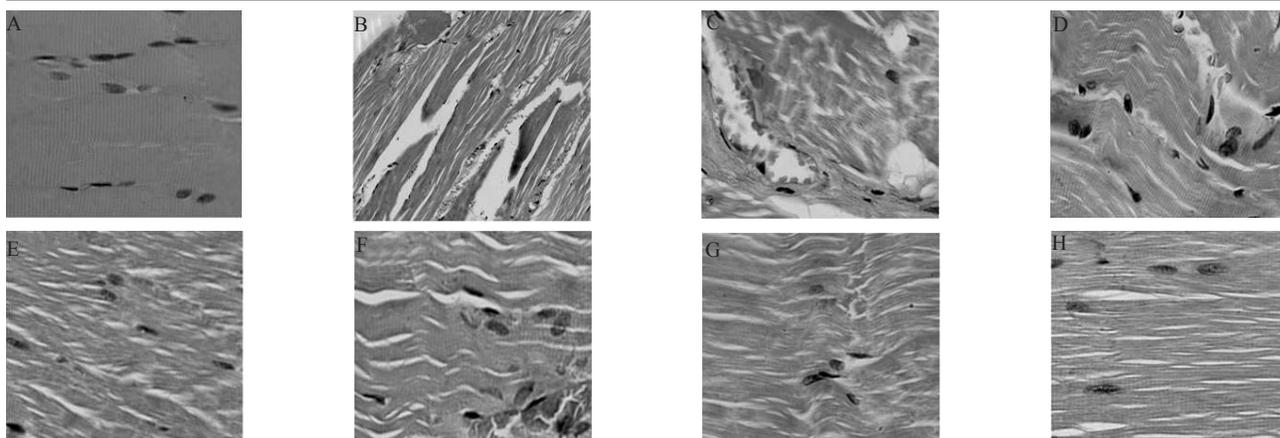
经Western-blot检测,GAP-43在正常骨骼肌中有少量表达,受损骨骼肌中较正常组表达开始增加,第7天各组呈持续性升高,到第14天表达到最高峰,第21天开始下降(图2,表1),C、D两组各取材时间点GAP-43的表达均高于A组($P < 0.05$),D组伤后各取材时间点GAP-43表达量均显著高于C组($P < 0.05$)。

2.3 不同时间点各组 agrin 表达

与正常组相比(图3,表1),骨骼肌受损后各组 agrin 表达量均有所升高($P < 0.05$),各取材时间点各组持续表达呈上升趋势且D组伤后各取材时间点 agrin 表达量均显著高于C组($P < 0.05$)。

图1 损伤大鼠骨骼肌组织形态改变图

(HE, $\times 400$)



A: 正常组; B: 模型组; C: 7d自然恢复组; D: 14d自然恢复组; E: 21d自然恢复组; F: 7d电刺激组; G: 14d电刺激组; H: 21d电刺激组

图2 各组及各时间点骨骼肌中GAP-43的表达

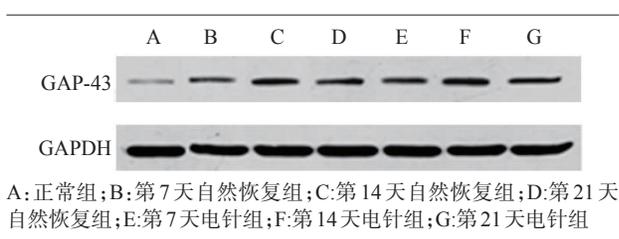


图3 各组各时间点骨骼肌中 agrin 的表达

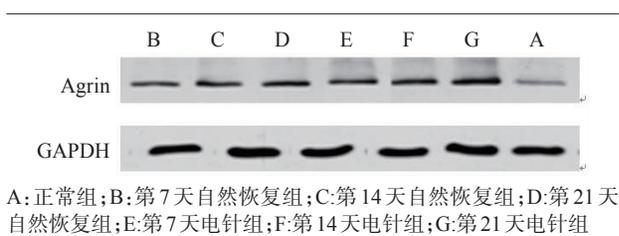


表1 不同时间点各组 Agrin 蛋白及 GAP-43 蛋白表达量的变化

	鼠数	第7天	第14天	第21天
正常组(Agrin)	4	0.22365±0.02018		
正常组(GAP-43)	4	0.06109±0.01513		
自然恢复组(Agrin)	12	0.31311±0.01736 ^①	0.36994±0.04738 ^①	0.55275±0.04650 ^①
自然恢复组(GAP-43)	12	0.23297±0.03159 ^①	0.36923±0.06540 ^②	0.32464±0.05684 ^②
电针组(Agrin)	12	0.44009±0.10792 ^{①③}	0.53837±0.10490 ^{①③}	0.68764±0.04985 ^{①③}
电针组(GAP-43)	12	0.31889±0.04166 ^{①③}	0.40188±0.03389 ^{②③}	0.35465±0.01994 ^{②③}

与正常组相比:①P<0.05,②P<0.01;与自然恢复组相比:③P<0.05

β1 的表达水平达到促进骨骼肌再生和抑制骨骼肌纤维化的目的。史翼鹏^[9]在研究针刺对离心运动造成的骨骼肌损伤的实验中发现针刺能有效调控生肌调节因子的表达使之保持在正常水平。李俊华等^[10]通过实验发现针刺能促使受损骨骼肌的肌卫星细胞增殖并使其活跃期提前,加速骨骼肌肌纤维的再生并使受损骨骼肌提前修复。陈欢等^[11]发现,电针阿是穴能够上调碱性成纤维细胞生长因子的表达水平,促进肌卫星细胞增殖,加快其成肌分化,缩短损伤修复进程。对于局部微循环电针也有改善作用,电针阿是穴能够促使一些细胞因子的表达上调(如 bFGF),进而促进骨骼肌损伤后局部毛细血管的增生^[12]。

GAP-43 是一种钙调蛋白结合的胞膜磷酸蛋白质。研究表明 GAP-43 在生长、分化的神经元纤维末梢中含量极高,而成熟的神经元中表达却相对较少,证明神经纤维的生长、再生和分化与 GAP-43 密

3 讨论

骨骼肌损伤的修复主要经历三个时期:急性损伤期、修复期、塑形期。急性损伤期在损伤后的最初几天,主要由于局部肌纤维、神经及微循环被破坏,导致组织坏死和各种炎症反应等,修复期在损伤后 1—2 周进行,此时肌卫星细胞大量增殖,形成新的肌纤维,局部神经的再生及运动终板的聚集等,塑形期在损伤后的第 2—3 周,新生的肌肉组织逐步成熟神经和肌肉之间建立联系,瘢痕组织的形成及肌肉功能的恢复等。

国内外研究证明,电针治疗急慢性骨骼肌损伤的作用是值得肯定的。Wang 等^[7]发现电针能促进骨骼肌再生和抑制肌纤维过度纤维化。徐前威等^[8]证实电针“足三里”能够提高 vimentin 和抑制 TGF-

切相关^[13]。当局部神经受损与靶区组织联系中断时,由于损伤的刺激导致周围未受损的神经元中 GAP-43 的基因表达,促使附近神经元合成 GAP-43 的水平急剧升高,通过 Ca²⁺、PKC、CaM 等一系列反应促进轴突从其侧枝上长出新的枝芽,新生的枝芽与靶区重建联系,重新恢复原已中断的突触联系,从而使神经功能得到恢复^[14]。本研究发现骨骼肌受损后第 7 天各组均有 GAP-43 的表达,电针组表达量明显高于自然恢复组,说明电针的刺激使受损骨骼肌处神经元加快 GAP-43 的合成,促进神经的再生。骨骼肌受损后第 14 天,自然恢复组 GAP-43 表达量开始下降,而电针组的 GAP-43 表达量却出现不同程度的上升,说明在骨骼肌修复的高峰时期,骨骼肌中 GAP-43 表达开始下降,而电针刺激使其持续表达。第 21 天自然恢复组中表达量明显下降,但电针组的 GAP-43 的表达明显高于自然恢复组。因此,本研究认为电针通过不断的刺激使神经元持续合成 GAP-

43 促进损伤处神经的再生。

肌肉功能情况与 AChR 的关系早已明确。临床上,85%的重症肌无力患者血液中都存在 AchR 抗体,由于运动终板区域内 AChR 的数量大幅度减少,至使神经肌肉接头突触传递功能发生障碍,进而影响肌肉的收缩功能^[15]。Agrin 是一种大分子蛋白聚糖,其分子量约为 220kD,由运动神经元合成,通过轴突运送至神经肌肉接头突触前膜处释放并储存于突触间隙的基底膜上。Agrin/MuSk 信号通路是 AChR 聚集的关键通路之一, agrin 作为启动因子通过结合 Lrp4 刺激 MuSK 磷酸化进一步诱导 AChR 的聚集^[16]。Agrin 还可以引起 AchR β -390 酪氨酸磷酸化,为 AChR 与细胞骨架连接并锚定于突触后膜所必需的^[17]。本实验发现,在骨骼肌损伤后 agrin 的表达出现显著增高,而在各取材时间点电针组表达量明显高于自然恢复组。因此,本研究认为电针的刺激能促进受损骨骼肌更多的合成 agrin,进而加大 AChR 的募集促使受损骨骼肌功能的恢复。

4 结论

电针可提高骨骼肌损伤处 GAP-43 和 agrin 的表达水平,可能是电针治疗急性骨骼肌损伤促进肌功能恢复的机制之一。

参考文献

- [1] 郑宏良,周水森,颜永碧,等.周围神经再生时乙酰胆碱受体免疫电镜与肌功能观察[J].中华显微外科杂志,2000,23(2):42—45.
- [2] 陈欢,彭博,李富运,等.基于 U0126 阻断 ERK 信号通路的电针阿是穴对兔钝挫伤后肌肉再生影响的研究[J].中华中医药杂志,2014,29(7):2304—2308.
- [3] Zhang B,Shen C,Bealmear B, et al.Autoantibodies to agrin in myasthenia gravis patients[J].PLoS One,2014,9(3):e91816.
- [4] Barik A,Zhang B,Shal GS,et al.Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction[J].Dev Neurobiol,2014,74(8):828—838.
- [5] Kami K,Masuhra M,Kasahiba H,et al.Changes of vinculin

- and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle[J].Med Sci Sports Exe,1993,25(7):832—840.
- [6] 王荣国,王云亭,肖诚,等.不同电流强度电针对兔骨骼肌钝器伤后改善微循环、抗纤维化和抗氧化能力的作用[J].中国康复医学杂志,2012,5(27):400—405.
- [7] Wang R, Luo D, Xiao C,et al. The time course effects of electroacupuncture on promoting skeletal muscle regeneration and inhibiting excessive fibrosis after contusion in rabbits [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013,2013: 869398. doi:10.1155/2013/869398.
- [8] 徐前威,王荣国,王云亭,等.电针对兔钝器伤后骨骼肌中转化生长因子- β 1 和波形蛋白表达的影响[J].中国康复医学杂志,2014,29(5):421—426.
- [9] 史翼鹏,徐红旗,张学林,等.针刺对离心运动大鼠骨骼肌生肌调节因子的影响[J].中国运动医学杂志,2014,33(4):333-338.
- [10] 李俊华,王正珍,王军力,等.针刺对急性骨骼肌钝挫伤大鼠肌卫星细胞增殖的影响[J].中国体育科技,2012,48(4):137—140.
- [11] 陈欢,张莉,崔强,等.电针阿是穴对骨骼肌损伤大鼠肌肉再生及碱性成纤维细胞生长因子表达的影响[J].中国康复理论与实践,2013,19(4):334—340.
- [12] 杨志丽,高谦,王刚,等.软组织内热针对大鼠骨骼肌慢性损伤后血管新生的影响[J].军医进修学院学报,2010,31(012): 1240—1242.
- [13] Esdar C, Oehrlein SA, Reinhardt S,et al. The protein kinase C(PKC) substrate GAP-43 is already expressed in neural precursor cells, colocalizes with PKC ϵ and binds calmodulin[J]. Eur J Neurosci, 1999, 11:503—516.
- [14] Kotulska K, Marcol W, Larysz-Brysz M, et al.Impaired regeneration of bcl-2 lacking peripheral nerves[J].Neurol Res, 2005,27(8):843.
- [15] 冉娟娟,古彦铮,薛群,等.重症肌无力患者血清 AChR 抗体和 Titin 抗体检测的临床意义[J].中国现代医学杂志,2009,15(19): 2329—2332.
- [16] Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, et al.Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK[J].Cell,2008,135(2):334—342.
- [17] Borges LS,Ferns M.Agrin-induced phosphorylation of the acetylcholine receptor regulates cytoskeletal anchoring and clustering[J].J Cell Biol,2001,153:1—11.