

· 基础研究 ·

脉冲电磁场对大鼠骨骼肌急性挫伤后成肌分化因子 D 表达的促进作用

王晶 张长杰 顾旭东 姚云海

【摘要】目的 观察脉冲电磁场(PEMFs)对大鼠骨骼肌急性挫伤(ASMC)后组织学及成肌调节因子 D(Myod)表达的影响,并探讨脉冲电磁场在大鼠骨骼肌急性挫伤早期治疗中的应用。**方法** 将 42 只 Sprague-Dawley 大鼠随机等分为治疗组(造模 + PEMFs 干预)、造模对照组(造模)、空白对照组(不予任何处理),每组大鼠 14 只。治疗组与造模对照组大鼠均选取大鼠左后肢小腿三头肌,采用金属砝码在 PVC 管引导下垂直下落建立 ASMC 模型。治疗组造模成功后即刻予以 PEMFs 干预 1 次。每组分别在造模成功后第 12 小时和第 18 小时随机处死 7 只大鼠,取小腿三头肌进行 HE 染色观察,测定 MyoD 荧光强度。**结果** 造模对照组在两个时间点均出现胞浆淡染、胞核多形态改变,在治疗组,其程度明显减轻,但较空白对照组严重;治疗组及造模对照组的 MyoD 荧光强度,第 18 小时均高于第 12 小时($P < 0.01$),且两组在各时间点的表达均高于空白对照组($P < 0.01$),第 18 小时,治疗组高于造模对照组($P < 0.01$)。**结论** 大鼠骨骼肌急性挫伤后早期应用 PEMFs,可以在干预后 18 h 出现 MyoD 的表达上调,这可能是 PEMFs 促进骨骼肌再生的机理之一。

【关键词】 骨骼肌; 挫伤; 成肌分化因子 D; 脉冲电磁场

Effects of pulsed electromagnetic fields on the expression of MyoD after acute skeletal muscle contusion

WANG Jing*, ZHANG Chang-jie, GU Xu-dong, YAO Yun-hai. * Department of Rehabilitation Medicine, Jiaxing 2nd Hospital, Jiaxing University, Jiaxing 314000, China

Corresponding author: GU Xu-dong, Email: jxgxd@hotmail.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) on histological changes and myogenic differentiation factor D (MyoD) expression in rats with acute skeletal muscle contusion (ASMC), and to explore the effects of PEMF therapy on rats with ASMC in its very early stages. **Methods** Forty-two rats were randomly divided into three groups: a treatment group, a control group and a blank control group. ASMC models were established with all the animals in the treatment and control groups. PEMF treatment was administered to the treatment group immediately after the establishment of the ASMC model. Seven rats in each group were sacrificed at the 12th and 18th h after the models were set up. Their triceps surae muscles were sampled and treated with haematoxylin-eosin staining for study using immunofluorescence techniques and a fluorescence microscope. **Results** In the control group at the 12th h and 18th h, HE staining showed pale cytoplasm and polymorphism in the cell nuclei; in the treatment group these effects were significantly lighter, but in both groups it was more serious than in the blank control group. In the treatment and control groups, the fluorescence intensity of MyoD at the 18th h was higher than at the 12th h, and at each time point in both groups it was higher than in the blank control group. At the 18th h, fluorescence in the treatment group was stronger than in the control group. **Conclusion** MyoD expression in rats with ASMC is upregulated by the 18th h after early PEMF treatment. This might be one of the mechanisms accelerating the regeneration of skeletal muscles after trauma.

【Key words】 Skeletal muscle; Contusion; Myogenic differentiation factor D; Pulsed electromagnetic fields

肌肉挫伤是钝性外力直接作用于机体而引起的肌肉急性损伤,发生率较高^[1]。其主要特征是疼痛与功能障碍,严重者可继发骨化性肌炎。

肌肉损伤后再生的启动环节在于卫星细胞被激

活,以及激活的卫星细胞在短时间内迅速大量增殖的能力。成体骨骼肌卫星细胞是一多潜能干细胞,位于骨骼肌的基底膜下。当肌肉受损伤时,卫星细胞由静息状态被激活并表达成肌调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs),重新进入细胞循环^[2]。肌卫星细胞的激活和成肌分化受成肌分化因子 D(myogenic differentiation factor D, MyoD) 家族调节^[3]。因此,MyoD 的水平在成体骨骼肌被认为是激活态肌卫星细胞的一

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.05.002

作者单位:314000 嘉兴,嘉兴学院附属第二医院康复医学中心(王晶、顾旭东、姚云海);中南大学湘雅二医院康复医学科(张长杰)

通信作者:顾旭东, Email: jxgxd@hotmail.com

个很好的标记蛋白,是受损肌纤维再生的间接标志。本研究拟观察脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMFs)对骨骼肌急性挫伤后大鼠骨骼肌组织学及 MyoD 表达的影响,并探讨 PEMFs 在大鼠骨骼肌急性挫伤早期治疗中的应用。

材料与方法

一、主要仪器与试剂

XT-400A 型脉冲电磁场治疗仪(天津希统公司)、打击装置(参照文献[4]的制作过程完成)、Motic 荧光显微镜和 Motic B5 显微摄像系统(Motic Company, USA)、Shandon325 型石蜡切片机(Shandon 公司,英国)、MyoD 兔抗大鼠多克隆抗体(Thermo Scientific, USA)、IgG Cy3(武汉博士德公司)。

二、实验动物分组及模型建立

健康 Sprague-Dawley 大鼠 42 只(由中南大学湘雅二医院动物实验室提供),体重(200 ± 10)g,雌雄不限,随机分为治疗组、造模对照组和空白对照组,每组大鼠 14 只。动物饲养条件:室温 $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 、正常昼夜节律、避强光与噪音刺激。动物可自由进食、饮水。治疗组和造模对照组均按照文献[4]所述,选取大鼠左后肢小腿三头肌,用重 500 g 圆柱状金属砧码在 PVC 管引导下从 120 cm 高度垂直下落,建立大鼠骨骼肌急性挫伤(acute skeletal muscle contusion, ASMC)模型。空白对照组不予任何处理。

三、治疗干预

建模成功后,治疗组即刻予以 PEMFs 干预 1 次,造模对照组及空白对照组置于相同环境,不予以 PEMFs 干预。将治疗组大鼠左后肢置于对置的两极板中心,脉冲电磁场参数设置:频率 14 Hz,频率可自动下调 50% 幅度,自动跳变周期为 1 min,磁感应强度 9 mT;脉冲持续时间 1 ms,变化的频率可以避免骨骼肌产生耐受性。

四、标本采集

各组大鼠按预定的时间点(造模后第 12 小时和第 18 小时)随机断颈处死 7 只大鼠,取左后肢挫伤灶边缘 3 mm 处肌肉,标本大小 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$,厚度为 5 mm,立即放入 4°C 、4% 多聚甲醛中固定 24 ~ 36 h。常规脱水透明,石蜡包埋,切片 $4 \mu\text{m}$,分别进行 HE 染色和免疫荧光组织化学研究。

五、观测指标

1. 组织学观察:光镜下观察 HE 染色后的各组骨骼肌组织学特征并记录。

2. 免疫荧光组织化学检测:①脱蜡;②蒸馏水洗 2 次,然后置入 0.01 mol/L PBS 中浸泡 10 min;③切片自然干燥后经 0.01 M PBS 漂洗,用 5% BSA 室温下封闭

30 min,用兔抗 MyoD(1:200)孵育,置于 4°C 冰箱过夜,然后用 PBS 漂洗 $3 \times 5 \text{ min}$,用 Cy3 标记的抗兔二抗(1:200)室温孵育 2 h 后用 PBS 漂洗 $3 \times 5 \text{ min}$,终止反应,自然干燥,整个过程避光;④甘油封片,荧光显微镜观察并拍照;⑤观察各组切片的免疫荧光阳性信号的表达部位与表达强度,使用图像分析软件测定各组切片中阳性信号强度值(荧光强度)。

3. 荧光强度的测量:通过 Motic 正置荧光显微镜拍摄荧光照片,采用 Image J 1.032 图像分析软件对 MyoD 表达的荧光强度进行测量。每张切片随机选择 4 ~ 6 个阳性表达区域,分别测量其荧光强度,求其平均值。测量时灰度值设置为 0 ~ 225,荧光强度以每平方微米任意单位(Arbitrary Units, AU)表示,即 $\text{AU}/\mu\text{m}^2$ 。

六、统计学分析

计量数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 14.0 版统计软件进行统计处理,统计方法组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 SNK-q 检验;组内比较采用重复测量数据的方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

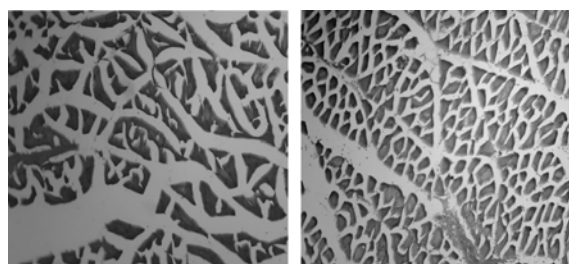
结 果

一、组织学观察

造模对照组:第 12 小时,肌纤维胞浆淡染,细胞核呈多形态改变,血管周围炎性细胞(巨噬细胞等)渗出;第 18 小时,肌纤维胞浆淡染较前明显,细胞核出现内移及聚集现象。血管周围炎性细胞(巨噬细胞等)渗出较前增多(图 1)。

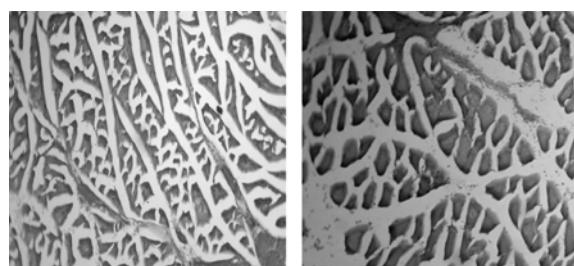
治疗组:第 12 小时和第 18 小时,胞浆淡染及细胞核多形态改变程度均较造模对照组同一时间点轻,血管周围炎性细胞(巨噬细胞等)渗出,较造模对照组同一时间点增多;且第 18 小时,胞浆淡染程度较同组第 12 小时减轻,肌核内移及聚集现象未见加重(图 1)。

空白对照组:肌纤维排列整齐,呈圆形或不规则块状,直径大小不一。肌核少,扁椭圆形,位于肌膜下方。肌束膜间可见少量散在巨噬细胞分布,肌束膜间散在毛细管分布,血管壁完整,血管外无红细胞(图 1)。



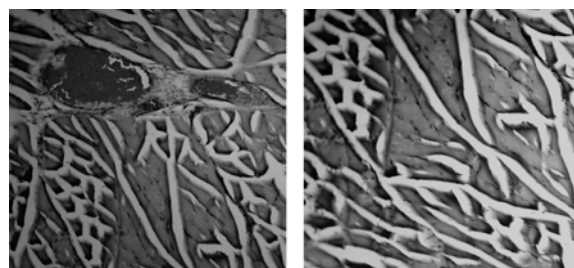
造模对照组第 12 小时

造模对照组第 18 小时



治疗组第 12 小时

治疗组第 18 小时



空白对照组第 12 小时

空白对照组第 18 小时

图 1 3 组大鼠各时段骨骼肌组织学特征(HE 染色, $\times 100$)

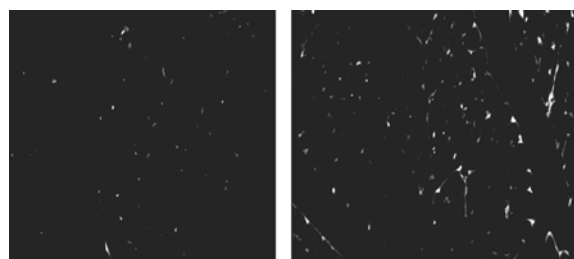
二、免疫荧光组织化学研究

ASM 后第 18 小时,治疗组与造模对照组 MyoD 荧光强度均高于 ASM 后第 12 小时($P < 0.01$),且两组在各时点的表达均高于空白对照组($P < 0.01$),第 18 小时,治疗组高于造模对照组($P < 0.01$),见表 1 和图 2。

表 1 各组 MyoD 表达的荧光强度值比较($\text{AU}/\mu\text{m}^2$, $\bar{x} \pm s$)

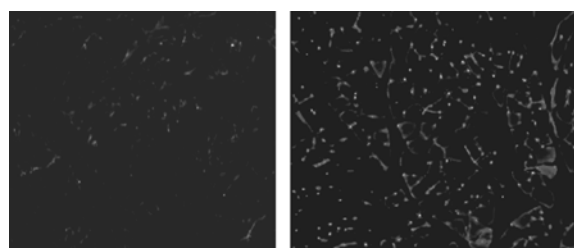
组 别	n	第 12 小时	第 18 小时
治疗组	14	25.943 ± 2.320^a	45.328 ± 2.760^{abc}
造模对照组	14	22.368 ± 2.812^a	37.121 ± 2.929^{ac}
空白对照组	14	10.845 ± 2.117	10.609 ± 2.233

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与造模对照组比较,^b $P < 0.01$;与第 12 小时比较,^c $P < 0.01$



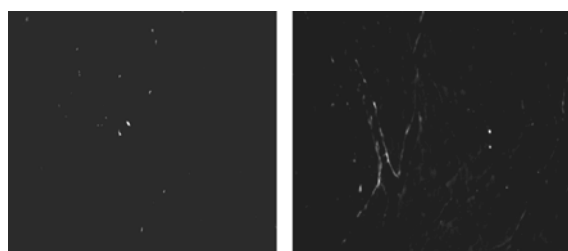
造模对照组第 12 小时

造模对照组第 18 小时



治疗组第 12 小时

治疗组第 18 小时



空白对照组第 12 小时

空白对照组第 18 小时

图 2 3 组大鼠各时段免疫荧光组织化学图($\times 100$)

讨 论

一、骨骼肌挫伤后的修复过程

骨骼肌组织急性损伤的修复过程基本分为炎症期、增生期和塑形期。炎症期表现为出血、肿胀和肌纤维坏死,坏死肌纤维周围有大量炎性细胞的浸润,并于伤后 48 ~ 72 h 达高峰。炎症期之后,肌纤维再生,首先巨噬细胞清除坏死肌纤维,遗留基板,然后卫星细胞在基板上排列,继而局部组织细胞增生,出现肉芽组织。伤口经塑形期对修复性组织进行调整以适应生理需要^[5]。

骨骼肌损伤再生的基础是炎症细胞(巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等)和修复细胞(成纤维细胞、内皮细胞、表皮细胞等)之间的一系列活动。这些细胞以高度协调的方式参与愈合过程。在骨骼肌损伤修复的早期,巨噬细胞迅速出现于损伤区,清除坏死肌纤维,并作为成纤维细胞和内皮细胞的生长介质的来源;另外,由其释放的巨噬细胞衍生生长因子与卫星细胞表面的生长因子受体结合,激活卫星细胞,触发骨骼肌再生。因此,巨噬细胞的出现是骨骼肌再生开始的标志。

本实验研究骨骼肌急性挫伤后炎症期的病理变化,通过 HE 染色发现:ASM 后第 12 小时和第 18 小时均可见肌纤维水肿,细胞核被破坏,广泛的间质出血、水肿、炎性细胞渗出。此表现与骨骼肌急性挫伤的临床病理基本一致。同时观察到巨噬细胞分布于间质中,且治疗组巨噬细胞的渗出较同时时间点的造模对照组增多,提示 PEMFs 可能通过增加巨噬细胞渗出进而促进骨骼肌再生。其可能是 PEMFs 促进骨骼肌再生的机理之一。

二、骨骼肌急性挫伤与 MyoD 的关系

当肌肉受损伤时,肌卫星细胞被激活并表达 MRFs,重新进入细胞循环。这些 MRFs 包括:MyoD、Myf5、myogenin 和 MRF4。其中 MyoD 和 Myf5 决定着肌卫星细胞是否能被激活成为具有成肌特性的肌肉干细胞,而 myogenin 和 MRF4 则调节肌肉干细胞终末分化为肌管肌纤维^[6,7]。MyoD 在成体骨骼肌被认为是

激活态肌卫星细胞一个很好的标记蛋白。MyoD 不仅可以促使静止期的肌卫星细胞向成肌细胞转化,而且能把许多种类型的细胞(如成纤维细胞、脂肪细胞等)转化为成肌细胞^[8-10]。在成肌调节相关基因转录中,MyoD 起着总开关的作用。MyoD 是具有碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)结构域的三维晶体结构。其中 bHLH 结构域是其它具有 bHLH 结构域(肌细胞促进因子 2、myogenin、肌酸激酶)的必需结合位点。其碱性区是与靶基因的启动子区或增强子区相结合的部位,结合后促进靶基因转录,进而促进肌纤维的形成。当骨骼肌受到损伤时,卫星细胞被激活并表达 MRFs,重新进入细胞循环。研究表明,MyoD 的表达随肌肉损伤的方式及受损伤的肌肉不同而有所不同^[11-13]。在 Bupivacain 诱导的肌肉损伤修复实验中,在肌肉损伤后 18 h 可检测到 MyoD 的表达,48 h 后达高峰,随着受损肌肉的逐步修复,MyoD 的表达随之减少,到肌肉损伤后 14 d,只有少量的 MyoD 表达^[14]。早期肌卫星细胞通过 MyoD 和/或 Myf25 途径激活,开始成肌分化过程。MyoD 可以作为反映肌肉再生的指标^[15]。

三、PEMFs 对骨骼肌急性挫伤后 MyoD 表达的影响

PEMFs 是由电流通过螺旋线圈产生,且磁场强度随时间发生变化,而变化的磁场可使其中的导体出现变化的电流。骨骼肌组织是电的导体,当活动的磁场穿经静止的导体时,将在导体中产生电流。脉冲电磁场的生物效应主要包括热效应和非热效应。非热效应与跨膜电位的产生有关,它可引起细胞生物学特性的改变^[16]。生物体在脉冲电磁场的作用下,可在细胞膜原有静息电位基础上,产生一新的跨膜电位。而此跨膜电位的大小、持续时间及产生方式会直接影响细胞的各种生物学特性。且脉冲电磁场的频率、磁感应强度及作用时间可影响其产生的生物效应^[17-19]。

本实验发现正常的骨骼肌组织也可见少量 MyoD 表达,但没有出现有统计学意义的时间相关性波动;ASMC 后 12 h 可见有统计学意义的 MyoD 表达,比文献^[12]报道的 MyoD 表达时间出现早,提示与布比卡因诱导的肌肉损伤相比,ASMC 后的肌纤维再生更早。ASMC 后第 12 小时,PEMFs 的干预未能有效地提高 MyoD 表达的绝对量;ASMC 后第 18 小时,治疗组和造模对照组的 MyoD 表达量在 ASMC 后第 12 小时的基础上继续增加,且 PEMFs 的干预能够促使 MyoD 的表达量增加,推测 PEMFs 可以促进骨骼肌再生,对 ASMC 具有治疗作用。这可能是 PEMFs 促进骨骼肌再生的机理之一,具体机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injuries: current treatment options. J Am Acad Orthop Surg, 2001, 9:227-237.
- [2] 塞克非,杨跃进,杨伟宪,等. 经冠状动脉注射法移植成年犬自体骨骼肌成肌细胞于急性心肌梗死区的病理研究. 中华老年心脑血管病杂志,2006,8:54-56.
- [3] 黄汉伟,徐建光,顾玉东,等. 肌细胞生成素在分化培养人体肌卫星细胞表达的研究. 中华外科杂志,2003,19:181-183.
- [4] 王晶,于鹏,张长杰,等. 改良的大鼠骨骼肌挫伤模型. 实用医学杂志,2008,24: 729-730.
- [5] Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, et al. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. Exp Cell Res,2008,314:3232-3244.
- [6] 沈燕国,徐建光,顾玉东,等. 成肌调节因子 Myogenin 和 MRF4 在人体失神经骨骼肌中的表达及其临床意义,中华外科杂志,2002,18:177-180.
- [7] 沈燕国,徐建光,顾玉东,等. 成肌调节因子 MyoD 和 Myf-5 在人体失神经骨骼肌中的表达及其临床意义. 复旦学报(医学版),200,29: 264-267.
- [8] Wyzykowski JC, Winata TI, Mitin N, et al. Identification of novel MyoD gene targets in proliferating myogenic stem cells. Mol cell Biol, 2002, 22: 6199-6208.
- [9] Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, et al. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 5434-5438.
- [10] Lattanzi L, Salvatori G, Coletta M, et al. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies. J Clin Invest, 1998, 101: 2119-2128.
- [11] Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, et al. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. Cell Tissue Res, 1992, 267:99-104.
- [12] Koishi K, Zhang M, McLennan IS, et al. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. Dev Dyn, 1995, 202:244-254.
- [13] Kami K, Noguchi K, Senba E. Localization of myogenin, c-fos, c-jun, and muscle-specific gene mRNAs in regenerating rat skeletal muscle. Cell Tissue Res, 1995, 280:11-19.
- [14] Jin Y, Murakami N, Saito Y, et al. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, mdx and dy, during regeneration. Acta Neuropathol, 2000, 99: 619-627.
- [15] Antunes-Foschini RS, Miyashita D, Bicas HE, et al. Activated satellite cells in medial rectus muscles of patients with strabismus. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49:215-220.
- [16] 王保义,杨杰斌,郭庆功,等. 毫秒级电脉冲的生物效应实验研究和机理分析. 中国科学(C辑), 1997, 27: 35-37.
- [17] 宋晋刚,许建中,周强,等. 不同频率脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞成骨分化的研究. 中华物理医学与康复杂志,2005, 27:134-137.
- [18] 赵敏,许建中,周强,等. 脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的研究. 中华物理医学与康复杂志,2005,27:5-8.
- [19] 方真华,吴华,马伟明,等. 50Hz 电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:1-4.

(修回日期:2009-04-12)

(本文编辑:阮仕衡)