·基础研究·

电针对骨骼肌钝挫伤模型大鼠细胞周期素依赖性蛋白激酶 5 表达的影响

曹净　唐成林　袁海洲　黄思琴　田源　张毅　高睿琦　郭全虎

【摘要】 **目的**　观察电针对骨骼肌钝挫伤大鼠细胞周期素依赖性蛋白激酶 5(CDK5)表达的影响,探讨电针治疗骨骼肌损伤、促进肌肉功能恢复的作用机制。**方法**　将 32 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为正常组(n=4)、模型组(n=4)、自然恢复组(n=12)、电针组(n=12),正常组不做特殊处理,其余各组使用自制重物打击器建立骨骼肌钝挫伤模型。自然恢复组不做电针干预、自然恢复;电针组于造模 48 h 后开始电针干预,每日 1 次,每次 15 min。模型组于建模 24 h 后处死,目的在于验证造模成功,自然恢复组、电针组分别于造模后第 7、14、21 天处死取材,使用苏木精-伊红(HE)染色观察组织形态变化,采用免疫印迹和实时定量荧光 PCR 分别检测 CDK5 蛋白及其 mRNA 的表达情况。**结果**　HE 染色显示,与正常组比较,各组可见大量肌纤维断裂溶解及炎性细胞浸润。电针组与自然恢复组比较,肌卫星细胞增殖更快,新生肌纤维明显增多,修复更为迅速。自然恢复组、电针组两组 CDK5 蛋白表达量较正常组均升高(P<0.05),且电针组明显低于自然恢复组(P<0.05),PCR 检测结果也进一步表明,自然恢复组 mRNA 表达水平显著高于电针组(P<0.05),且均高于正常组(P<0.05)。**结论**　骨骼肌钝挫伤可使大鼠骨骼肌中 CDK5 蛋白表达升高,电针促进骨骼肌肌肉功能恢复的机制可能与抑制 CDK5 蛋白及 mRNA 的表达水平有关。

【关键词】 电针;　骨骼肌钝挫伤;　骨骼肌修复;　Cdk5

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)

Effects of electroacupuncture on the expression of cyclin-dependent kinase 5 after skeletal muscle contusion

Cao Jing, Tang Chenglin, Yuan Haizhou, Huang Siqin, Tian Yuan, Zhang Yi, Gao Ruiqi, Guo Quanhu. Medical University of Chongqing, Chongqing 400016, China

Corresponding author: Tang Chenglin, Email: CYTCL996@163.com

【**Abstract**】 **Objective**　To observe the effect of the electroacupuncture (EA) on the expression of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in rats with muscle contusion and to explore its mechanism. **Methods**　Thirty-two Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group of 4, a model group of 4, a natural recovery group (NR) of 12 and an EA group of 12. All except those in the normal group had acute skeletal muscle contusion induced through a heavy blow. The EA group was treated with 15 minutes of EA daily beginning 48 h after the injury while the other rats received no EA. The model group was sacrificed 24 h after modeling, and rats from the NR and EA groups were sacrificed on the 7th, 14th and 21st day after the modeling to collect tissues. Hematoxylin eosin (HE) staining, Western blotting and quantitative real-time fluorescence PCR were used to observe any histological changes, as well as Cdk5 protein and mRNA expression. **Results**　The HE staining showed that the other 3 groups displayed larger amounts of muscle fiber fracture, dissolution and inflammatory cell invasion than was observed in the normal group. Compared with the NR group, quicker recovery was seen in the EA group as evidenced by faster muscle satellite cell proliferation and more new muscle fiber generation. The average Cdk5 protein expression in both the NR and EA groups was higher than in the normal group, and that of the EA group was significantly lower than that of the NR group. **Conclusions**　Muscle contusion can increase Cdk5 expression in skeletal muscles, at least in rats. EA can promote the restoration of skeletal muscle function, probably by inhibiting CDK5 protein and mRNA expression.

【**Key words**】 Electroacupuncture;　Skeletal muscles;　Contusion;　Muscle repair;　Cyclin-dependent kinase 5

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81273870); Scientific Research Project of

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2016.12.002

作者单位:400016 重庆,重庆医科大学中医药学院

通信作者,唐成林,Email:CYTCL996@163.com

Chongqing Sports Bureau(B201408);Yuzhong District Chongqing Science and Technology Project (20140117)

骨骼肌损伤是日常生活中最为常见的运动损伤,其中 90%属于牵拉伤及钝挫伤,这类损伤往往会造成局部肌纤维坏死以及神经损伤,导致神经与肌肉之间的联系被破坏[1]。损伤修复后由于新生的肌肉组织与神经不能完全有效地联系起来,致使机体功能不能达到正常水平。电针作为一种安全、便捷的治疗手段,被证实具有促进受损骨骼肌修复的作用,但其作用机理尚未完全明确[2]。周期素依赖性蛋白激酶 5(cyclin-dependent kinases 5,CDK5)是细胞周期素依赖蛋白酶家族中的一个特殊成员,其既没有细胞周期素依赖,也不能调节细胞周期,在细胞有丝分裂后神经元迁移、神经突触重构及神经肌肉接头(neuromuscular junction,NMJ)的重塑过程中起着非常关键的作用。

研究表明,CDK5 能够通过乙酰胆碱作用于 NMJ 的突触后膜上,导致乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor,AChR)解散,提示受损肌肉功能的恢复与 NMJ 处 AChR 的含量密切相关[3-4]。本研究旨在探讨电针治疗骨骼肌损伤与 CDK5 之间的关联,为临床工作中采用电针治疗骨骼肌损伤提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物、分组及主要材料

8 周龄雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 32 只,体重(250±20)g,由重庆医科大学动物实验中心提供[SCXK(渝)2012-0001],普通环境下单笼饲养。将大鼠随机分为 4 组,正常组、模型组、自然恢复组、电针组,其中正常组、模型组各 4 只,自然恢复组、电针组各 12 只。自制重物打击器,电针仪(华佗牌 SDZ-Ⅱ型),一次性针灸针(0.25×25 mm,华佗牌)。CDK5 试剂(购自 Santa 公司),逆转录试剂盒(购自 Toyobo 公司)。

二、动物造模

参照 Kami 等[5]的造模方法,正常组不予处理,其余各组大鼠采用 10%水合氯醛 4 ml/kg 腹腔注射麻醉动物,采用俯卧位、右后肢外展、膝关节伸直、踝关节屈曲约 90°位固定,充分暴露腓肠肌,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。重物打击器:铁球 220 g,金属导管高度 110 cm,打击面积为 1 cm^2,重力 2.2 N,打击能量为 2.37 J。为保证每只动物腓肠肌受损部位及程度一致,铁球投放及动物固定均由专人操作完成。确认皮肤完整,胫腓骨无骨折,肉眼观察局部有明显肿胀及淤血,表明造模成功。

三、干预方法

正常组、模型组两组不予干预,模型组于建模 24 h 后处死,目的在于验证造模成功。其余各组于建模成功 48 h 后开始干预。电针组介入电针治疗,使用大鼠固定器固定动物后,使其双后肢外展,取右后肢“足三里”穴(参照李忠仁 2007 年版《实验针灸学》)、阿是穴(打击部位中心位置)作为针刺穴位,针刺后连接电针仪,电针频率 2 Hz,强度 0.4 m,时间 15 min,每日 1 次[6]。自然恢复组同步进行模拟固定,但不进行电针刺激。

四、取材及标本处理

正常组处死取材,模型组于造模 24 h 后处死取材,其余各组大鼠分别于造模后 7 d、14 d、21 d 各取 4 只动物处死。沿打击部位快速切取腓肠肌,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBS)冲洗,将腓肠肌分为两部分,一部分放入 4%多聚甲醛固定,另一部分放入预备的冻存管中,于液氮冻存 0.5 h 后,转移到 -80 ℃冰箱冻存。

五、组织形态学检测

4%多聚甲醛固定组织 48 h,PBS 冲洗,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋切片,切片厚度 4 μm,常规苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色染色。于 400 倍光镜下观察组织结构形态,使用图像采集系统收集组织形态图片。

六、大鼠骨骼肌 CDK5 mRNA 转录水平

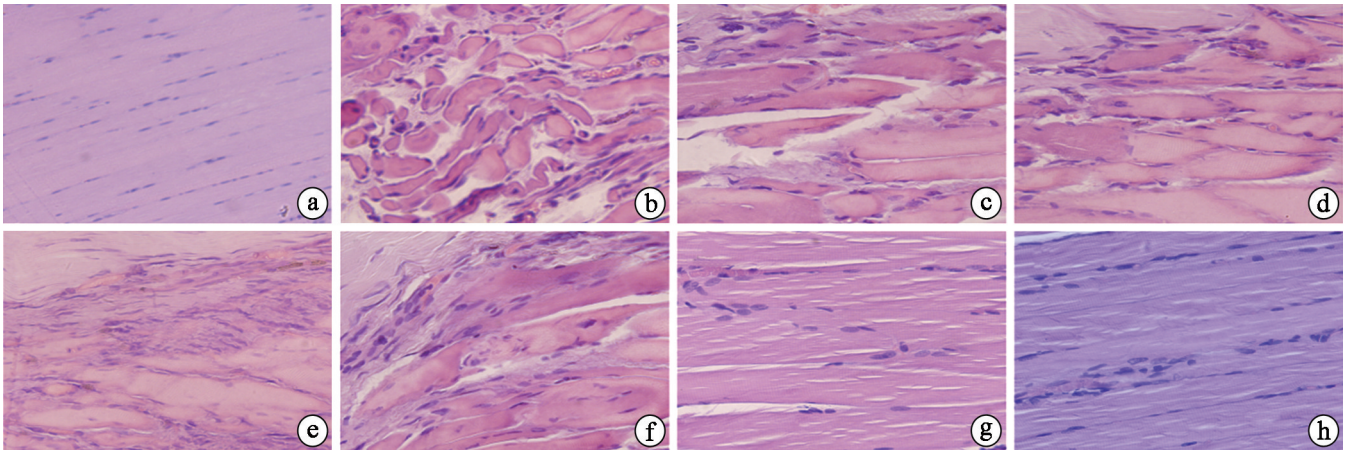
1.引物设计与合成:经检索 NCBI 数据库(Gene Bank)中 CDK5 mRNA 序列,用 Primer Premier5.0 软件设计出 CDK5 基因以及内参 GAPDH 基因的上下游引物序列(均由 TAKARA 生物工程有限公司合成)。

2.实时荧光定量 PCR

将冻存于-80 ℃冰箱中的组织样本,置入加入液氮预冷的研钵中,研磨直至成粉末状。按照试剂盒说明书上步骤逐步提取 RNA。提取完毕后采用 TE Buffer稀释并使用紫外分光光度计检测其吸光度,以吸光度(optical density,OD)260/280 比值在 2.0 左右为优。取 1 μg 总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书上方法配制 PT 反应液(体积为 20 μl),逆转录后得 cDNA 模板。RT-PCR 反应体系为 20 μl,SYBR Green 10 μl,上下游引物各 0.3 μl,模板 2.0 μl。扩增程序为:94 ℃、5 min(94 ℃、30 s;57 ℃、30 s;72 ℃、30 s)35 个循环。根据公式:2-△CT(△CT=CT-target-CTGAPDH),计算出样品目的基因的相对表达量。

七、CDK5 表达水平测定

取冻存组织加入裂解液提取 CDK5 蛋白,分装,置 -80 ℃冰箱待用。称取等量蛋白样品经十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳



注:a 表示正常组骨骼肌形态学变化;b 表示模型组骨骼肌形态学变化;c、d、e 表示自然恢复组损伤后 7 d、14 d、21 d 骨骼肌形态学变化;f、g、h 表示电针组损伤后 7 d、14 d、21 d 骨骼肌形态学变化

图 1　各组各时间点骨骼肌形态学改变(HE 染色,×400)

分离后,并转至聚偏二氟乙烯上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,再加入经抗体稀释液稀释的一抗(1∶1000),4 ℃过夜。洗涤 3 次,加入相应二抗室温孵育 1 h,每次 10 min,用增强化学发光(enhanced chemiluminescence,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。

八、统计学分析

各组数据采用 SPSS 19.0 版软件进行统计学分析,结果以($\bar{x}\pm s$)形式表示,各组均采用单因素方差分析,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

结　　果

一、各组大鼠不同时间点组织形态学改变

由下图可见,正常组肌纤维排列整齐,细胞核均匀分布在肌纤维周边(图 1a);模型组可见肌纤维断裂溶解,炎性细胞大量增生,局部微血管破裂,红细胞浸润(图 1b);损伤后 7 d,自然恢复组坏死组织较为明显,依然存在大量炎性细胞,肌纤维之间裂缝较大(图 1c);损伤后 14 d,自然恢复组有成肌细胞核出现,肌卫星细胞增殖明显,少量的新生肌纤维出现(图 1d);损伤后 21 d,自然恢复组新生的肌纤维和受损的肌纤维逐渐融合,瘢痕组织出现,损伤部位初步愈合(图 1e);损伤后 7 d,电针组炎性细胞减少,有少量成肌细胞核出现(图 1f);损伤后 14 d,电针组存在大量新生肌纤维,肌卫星细胞增殖更加明显(图 1g);损伤后21 d,电针组受损部位基本愈合,肌纤维排列更加紧密,并伴有大量成肌细胞核(图 1h)。

二、各组大鼠不同时间点 CDK5 蛋白表达量检测

与正常组比较,自然恢复组、电针组骨骼肌受损后 CDK5 蛋白表达量均有所升高($P<0.05$)。电针组损伤后各取材时间点 CDK5 表达量均显著低于自然恢复组($P<0.05$)。详见图 2、表 1。

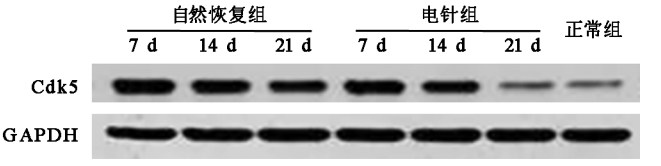


图 2　各组大鼠不同时间点 CDK5 蛋白条带图

表 1　各组大鼠不同时间点骨骼肌 CDK5 的表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	7d	14d	21d
正常组	4	0.74±0.02	–	–
自然恢复组	12	1.40±0.06[a]	1.26±0.06	1.11±0.06
电针组	12	1.27±0.04[ab]	1.07±0.03[b]	0.87±0.09[b]

注:与正常组比较,[a]$P<0.05$;与自然恢复组同时间点比较,[b]$P<0.05$

三、各组大鼠不同时间点 CDK5 mRNA 表达水平检测

与正常组比较,自然恢复组、电针组骨骼肌 CDK5 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与自然恢复组比较,电针组各时间点 CDK5 mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$)。详见表 2。

表 2　各组大鼠不同时间点骨骼肌 CDK5 mRNA 的表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	7d	14d	21d
正常组	4	0.21±0.01	–	–
自然恢复组	12	1.01±0.02[a]	0.82±0.03[b]	0.68±0.02[b]
电针组	12	0.81±0.01[ab]	0.67±0.02[b]	0.54±0.01[b]

注:与正常组比较,[a]$P<0.05$;与自然恢复组同时间点比较,[b]$P<0.05$

讨　　论

骨骼肌损伤后的修复是一个极其复杂的过程,临

床上将修复过程分为 3 个阶段:急性期、修复期、塑形期。急性期是指受伤后初期,由于骨骼肌组织受到外力作用,导致局部肌纤维断裂、肌小管溶解坏死、微血管神经纤维结构被破坏、局部发生炎症反应,肉眼可见瘀血红肿;修复期处于损伤后的 1~2 周,炎症因子浸润导致局部未受损组织被激活,释放一系列细胞因子如血管内皮因子、转化生长因子、神经生长相关因子等,在各种细胞因子作用下,肌卫星细胞大量增殖,形成新的肌纤维,出现微血管建立及周围神经再生等;塑形期在损伤后的 2~3 周,此时新生肌纤维与受损肌纤维结合形成瘢痕组织,局部微循环逐渐完善,神经与肌肉再支配,肌肉功能恢复,受损肌肉组织完成自我修复[7-8]。

针灸治疗急慢性骨骼肌损伤疗效显著。研究发现,电针具有改善骨骼肌钝挫伤后局部微循环的作用[9]。针刺可抑制急性骨骼肌钝挫伤后大鼠肝细胞生长因子的高水平表达,促进肌卫星细胞的增殖,使其活跃期提前出现,从而加速骨骼肌的修复[10]。也有研究发现,电针阿是穴能够使碱性成纤维细胞生长因子的表达水平升高,从而促进肌卫星细胞增殖,进一步缩短骨骼肌损伤后的修复进程[11]。查阅相关文献后,发现多数研究都集中在损伤修复的前中期,对于损伤后肌肉功能恢复的研究相对较少,本研究从骨骼肌损伤修复后期着手,研究电针的治疗作用和受损骨骼肌肌肉功能恢复间的关系,进一步完善了电针治疗急性骨骼肌损伤过程中肌功能恢复的作用机制,为临床上进行电针治疗骨骼肌损伤提供了一定的依据。

在神经系统生长发育中,CDK5 通过磷酸化信号分子、细胞骨架蛋白及调节蛋白等底物蛋白的特异性丝/苏氨酸位点,在神经元的存活、突触的发生、信息的传递及 NMJ 的重塑等诸多方面起到了重要的调控作用[12]。实验证明,CDK5 作为 NMJ 生长发育中的关键蛋白,被乙酰胆碱激活,从而导致突触后膜上的 AChR 聚集体解离,进而抑制 NMJ 的生长[13]。敲除 CDK5 基因或抑制 CDK5 活性后,乙酰胆碱对抗乙酰胆碱受体簇集的解散能力完全被逆转[14]。本实验结果显示,与正常组比较,自然恢复组和电针组各时间点骨骼肌中的 CDK5 表达水平显著升高,并随时间的推移呈现降低趋势;与自然恢复组比较,电针组 CDK5 蛋白表达量及 mRNA 的表达水平显著降低。

综上所述,我们推测骨骼肌钝挫伤后由于 CDK5 蛋白的高水平表达,导致抗乙酰胆碱受体解离,从而抑制了 NMJ 的重塑,进一步抑制了肌肉功能的恢复;而电针可能通过下调受损骨骼肌中较高水平的 CDK5,增加抗乙酰胆碱受体群集的数量,从而促进受损骨骼肌的修复。

参 考 文 献

[1] Hurme T, Lehto M, Falck B, et al. Electromyography and morphology during regeneration of muscle injury in rats[J]. Acta Physiol Scand, 1991, 142(4): 443-456.

[2] Liu S, Wang R, Luo D, et al. Effects of electroacupuncture on recovery of the electrophysiological properties of the rabbit gastrocnemius after contusion: an in vivo animal study[J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15(1): 1-10. DOI: 10.1186/s12906-015-0601-z.

[3] Chen F, Qian L, Yang ZH, et al. Rapsyn interaction with calpain stabilizes AChR clusters at the neuromuscular junction[J]. Neuron, 2007, 55(2): 247-260.

[4] Lin W, Dominguez B, Yang J, et al. Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism[J]. Neuron, 2005, 46(4): 569-579.

[5] Kami K, Masuhara M, Kashiba H, et al. Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle[J]. Med Sci Sports Exerc, 1993, 25(7): 832-840.

[6] 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, 31(8): 869398. DOI: 10.1155/2013/869398.

[7] Kirk S, Oldham J, Kambadur R, et al. Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration[J]. J Cell Physiol, 2000, 184(3): 356-363.

[8] Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, et al. Growth factors improve muscle healing in vivo[J]. J Bone Joint Surg Br, 2000, 82(1): 131-137.

[9] 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, 27(05): 400-405. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2012.05.004.

[10] 余飞,吕威,黄怡然,等.针刺对骨骼肌钝挫伤模型大鼠肝细胞生长因子表达的影响[J].针刺研究, 2015, 40(01): 50-55. DOI: 10.13702/j.1000-0607.2015.01.010.

[11] 周倩,朱道立.骨骼肌卫星细胞移植对钝挫伤动物模型的修复作用[J].中华物理医学与康复杂志, 2010, 32(10): 744-750. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.10.007.

[12] 张红丽,刘亚玲.CDK5 在神经系统变性疾病的研究进展[J].医学综述, 2012, 18(19): 3166-3169. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2012.19.008.

[13] Yang J, Dominguez B, De Winter F, et al. Nestin negatively regulates postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(3): 324-330. DOI: 10.1038/nn.2747.

[14] Fu AK, Ip FC, Fu WY, et al. Aberrant motoraxon projection, acetylcholine receptor clustering and neurotransmission in cyclin-dependent kinase 5 null mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(42): 15224-15229.

(修回日期:2016-11-20)
(本文编辑:凌　琛)