

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.09.017

腓肠肌斜刺联合环孢素 A 对软组织钝挫伤模型兔 IGF-1 表达的影响

李娜, 黄怡然, 余飞, 雷林丹, 王少怀, 李玉波, 李文迅*

(北京中医药大学针灸推拿学院, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029)

基金项目: 北京中医药大学科研基金资助项目 (2012-QNJSZX010)

摘要 目的 观察腓肠肌斜刺联合环孢素 A (CsA) 对软组织钝挫伤修复的影响及其作用机制。方法 30 只新西兰大白兔随机分为空白组、模型组、CsA 组、针刺组、针刺合并 CsA 组, 每组 6 只。采用“重物自由落体打击法”连续 20 次撞击造成急性软组织钝挫伤模型。针刺组造模后 24 h 后采用阿是穴斜刺干预, CsA 组于造模前 3 天开始腹腔注射 CsA 9.25 mg/(kg·d), 针刺合并 CsA 组采用针刺合并 CsA 干预, 模型组和空白组不干预。于损伤后 72 h 采用 Real-time PCR、蛋白免疫印迹法 (Western blot) 方法检测各组腓肠肌胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) mRNA 及其蛋白表达量。结果 与空白组相比, 其余各组 IGF-1 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 模型组、CsA 组与针刺组 IGF-1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比, 针刺组和针刺合并 CsA 组 IGF-1 mRNA 与蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与 CsA 组相比, 针刺组与针刺合并 CsA 组 IGF-1 mRNA 及其蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$)。结论 软组织钝挫伤可使兔骨骼肌 IGF-1 mRNA 及其蛋白表达降低, 腓肠肌斜刺联合 CsA 可上调急性期骨骼肌损伤局部 IGF-1 mRNA 及其蛋白表达, 促进软组织修复。

关键词 骨骼肌; 软组织挫伤; 胰岛素样生长因子-1; 针刺; 环孢素 A

临床研究发现, 斜刺阿是穴可有效缓解肌肉损伤后的疼痛, 促进肌肉运动功能恢复^[1-3]。相关实验研究表明针刺可改善损伤局部软组织微循环^[4], 增强卫星细胞的激活与增殖, 促进肌肉功能恢复^[5]。胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 是体内调节肌肉生长的重要因子, 能够促进损伤骨骼肌的再生^[6-7], 可介导骨骼肌重塑中与肌纤维类型转化、线粒体代谢转换、骨骼肌肥大等密切相关的 Calcineurin/NFAT 通路^[8]。环孢素 A (CsA) 属于强效免疫抑制剂, 其对 IGF-1 诱导的骨骼肌肥大过程中 Calcineurin/NFAT 信号通路有抑制作用^[9]。本研究通过钝性打击复制兔软组织钝挫伤模型, 并通过斜刺阿是穴针法干预, 观察针刺与 CsA 对急性骨骼肌损伤修复过程中的影响及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康新西兰大白兔 30 只, 雌雄各半, 体重 2.0~2.5 kg, 由北京金牧阳实验动物养殖有限责

任公司提供, 实验动物许可证号: SYXK (京) 2013-0022。

1.2 主要试剂及药品

Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 批号 15596026); EDTA (批号 ZLI-9068) 购于北京中杉金桥公司; M-MLV 反转录试剂盒 (批号 2641Q)、Real-time PCR 扩增试剂盒 (批号 RR055A) 购自 Takara 公司 [宝生物工程 (大连) 有限公司]; IGF-1 一抗: 小鼠抗大鼠 (美国 Abcam 公司, 批号 GR99884), 二抗: 山羊抗小鼠 (Takara 公司, 批号 zb-2305); 新山地明 (环孢素软胶囊, 诺华制药, 25 mg/粒, 批号 S0072)。

1.3 主要仪器设备

Real-Time PCR 仪 (型号 7500, 美国 ABI 公司); 稳压稳流电泳仪 (型号 PowerPac 3000), 垂直电泳槽 (型号 PROTEAN II xi and XL Cells), 半干转电转印仪 (型号 170-3940) 均为美国 Bio-Rad 公司产品; Image pro plus 6.0 计算机图像分析仪 (美国 Media Cybernetics 公司); 数码凝胶成像系统 (型号 Gel Doc 2000, 美国 Bio-Rad 公司); 光学显

* 通讯作者: agoodfriend@126.com, (010) 64282833

显微镜 (型号 CX31, Olympus 公司); 荧光分光光度计 (型号 F-4500, 日本日立公司)。

1.4 动物分组与造模方法

30 只白兔按照随机数字表分为空白组、模型组、针刺组、CsA 组、针刺合并 CsA 组, 每组 6 只。除空白组外, 其余各组建立改良急性腓肠肌挫伤模型^[10]。方法: 25% 乌拉坦 4 ml/kg 耳缘静脉麻醉, 俯卧位固定在解剖台上, 右后肢褪毛并于伸膝、踝背屈约 90° 位固定, 显示腓肠肌。选定腓肠肌肌腹中段距跟骨 6.5 cm 处作为打击中心, 将固定导管 (直径 2.2 cm) 置于小腿腓肠肌上方压紧以防目标肌群发生位移, 500 g 铁棒 (直径 1.5 cm) 从固定导管内 30 cm 标记处自由下落, 动能为 1.47 J, 导致一次肌肉挫伤, 同一部位, 重复连续打击 20 次, 不作任何处理, 正常环境下常规饲养, 形成腓肠肌急性钝挫伤动物模型, 皮肤无破裂。观察局部肿胀, 于损伤后 12 h 从模型组用随机数表法抽取 1 只处死, 解剖见局部骨骼肌组织肿胀明显, 有少量淤血块; HE 染色光镜下见骨纤维肿胀、变性, 炎症细胞浸润等肌纤维损害标志提示造模成功。

1.5 动物处理

空白组: 正常饲养; 模型组: 造模后正常饲养; CsA 组: 于造模前 3 天开始注射 CsA, 按每天每只兔 9.25 mg/kg^[11] 分 2 次行腹腔注射, 直至取材; 针刺组: 造模后 24 h 用一次性无菌针灸针 (规格 0.4 mm × 40 mm, 苏州针灸用品有限公司, 批号 121220) 进行腓肠肌斜刺干预, 常规备皮、消毒, 然后从腓肠肌移行跟腱的部位进针, 直刺过皮后, 将毫针调整角度至与腓肠肌成 30° 角, 斜刺穿过腓肠肌肌束, 提插 3 次, 不留针, 出针并按压片刻止血; 针刺合并 CsA 组: CsA 注射同 CsA 组, 针刺干预同针刺组。

1.6 观察指标及方法

针刺后 48 h 后进行取材, 采用空气栓塞法处死动物, 迅速切取受损腓肠肌组织 2 cm × 1 cm 标本两块, 立即投入标本冻存管内, -80℃ 冷冻。

1.6.1 Real-time PCR 法检测兔腓肠肌 IGF-1 mRNA 表达 ①引物设计与合成: 检索 NCBI GenBank 数据库中兔腓肠肌 IGF-1 的全长 mRNA 序列, 应用 Premier 5.0 软件设计引物序列。IGF-1 引物序列, 上游: 5'-CTCTTCTACCTGGCCCTCTG-3', 下游: 5'-TGTCTCCACACAGGAAGTGA-3', 扩增长度: 112 bp; 内参照 GAPDH 引物序列, 上游: 5'-CCCTCAATGACCACTTTGTG-3', 下游: 5'-GGTTT-

GAGGGCTCTTACTCCT-3', 扩增长度: 117 bp。②总 RNA 提取: 取骨骼肌组织置于 1 ml Trizol 液中匀浆, 参照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, 以荧光分光光度计测定 A260/A280 比值 ≥ 1.8 控制总 RNA 纯度。③mRNA 逆转录产生 cDNA 第一链: 采用 20 μl 逆转录反应体系, 依次加入 RNA 3 μl、Oligo (dT) 1 μl、dd H₂O (DEPC 处理) 9.5 μl, 以上首先 70℃ 孵育 5 min, 然后迅速放在冰上; 加 5 × Buffer 5 μl、dNTP (10 mM) 5 μl、核糖核酸酶抑制剂 0.5 μl、M-MLV RT 1 μl, 以上 42℃ 孵育 60 min, 然后 70℃ 孵育 10 min。④PCR 扩增: 反应体系为 20 μl, 包含: cDNA 1.5 μl、引物 1 (10 pmol/μl) 0.5 μl、引物 2 (10 pmol/μl) 0.5 μl、SYBR mix 10 μl、dd H₂O 7.5 μl, 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 1 min, 反应 50 个循环, 最后一轮 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。扩增产物取 18 μl 目的基因在 1.5% 琼脂糖上电泳, 紫外灯下观察结果并照相, 吸光度扫描仪扫描后 PCR 条带用软件进行定量分析, 结果为基因表达量对 GAPDH 内参的比值, 以上结果重复 3 次, 取平均值。

1.6.2 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测兔腓肠肌 IGF-1 的蛋白表达水平 细胞裂解法提取兔腓肠肌组织总蛋白, Bradford 法测定蛋白含量后, SDS-PAGE 凝胶电泳, 硝酸纤维素膜转印, 一抗、二抗孵育, 酶显法显色。Gel Doc 2000 凝胶成像系统成像, Quantity One 4.62 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 作为内参照蛋白进行校准, 采用目标蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值表示相对蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 18.0 统计分析软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布的采用方差分析, 两两比较用 LSD 检验; 不符合正态分布时采用非参数检验, 两两比较用 Kruskal-Wallis 检验。

2 结果

2.1 各组兔腓肠肌 IGF-1 mRNA 表达比较

表 1 示, 与空白组比较, 各组 IGF-1 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, CsA 组 IGF-1 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 针刺组和针刺合并 CsA 组 IGF-1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$); 与 CsA 组比较, 针刺组和针刺合并 CsA 组 IGF-1 mRNA 表达显著升

高 ($P < 0.05$); 针刺组与针刺合并 CsA 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组兔腓肠肌 IGF-1 mRNA 和蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	IGF-1 mRNA/ GAPDH	IGF-1 蛋白/ GAPDH
空白组	6	1.001 ± 0.013	0.903 ± 0.188
模型组	6	0.316 ± 0.014 **	0.430 ± 0.137 **
针刺组	6	0.540 ± 0.031 *△▲	0.600 ± 0.056 *△▲
CsA 组	6	0.359 ± 0.034 *	0.348 ± 0.084 **
针刺合并 CsA 组	6	0.509 ± 0.0076 *△▲	0.759 ± 0.200 △▲

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与 CsA 组比较, ▲ $P < 0.05$

2.2 各组兔腓肠肌 IGF-1 蛋白表达比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组、CsA 组与针刺组 IGF-1 蛋白表达均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 针刺合并 CsA 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组比较, CsA 组 IGF-1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 针刺组和针刺合并 CsA 组 IGF-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与 CsA 组比较, 针刺组和针刺合并 CsA 组 IGF-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 针刺组和针刺合并 CsA 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组兔腓肠肌 IGF-1 蛋白电泳图见图 1。

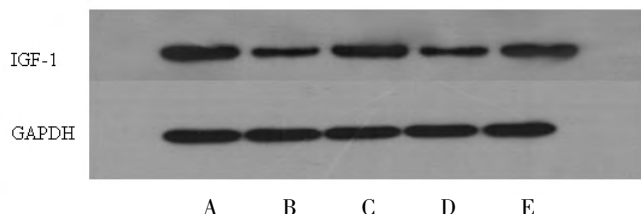


图 1 各组兔腓肠肌 IGF-1 蛋白电泳图

注: A 空白组; B 模型组; C 针刺组; D CsA 组;
E 针刺合并 CsA 组

3 讨论

《灵枢经·经筋第十三》记载要“以痛为腧”。阿是穴又称压痛点、天应穴、不定穴等, 是既无具体名称, 又无固定位置, 而是以压痛点或其他反应点作为针灸部位。本实验根据“以痛为腧”并结合卢鼎厚^[2]在多年的实践中把“以痛为腧”发展为“以损伤的肌束为主、疼痛为辅”方法确定阿是穴。

IGF-1 是一种具有广泛生物学效应的多肽, 其对肌肉组织的生长起调控作用, 主要表现为增加肌肉蛋白质合成, 减少蛋白质降解, 在细胞整体水平上对细胞的增殖、分裂、生长及凋亡的生理过程产生影响, 从而促进骨骼肌损伤后的修复与再生。近年来研究显示, 骨骼肌钝挫伤后修复过程中内源性 IGF-1 mRNA 表达水平从损伤后的第 2 天开始升高,

持续至损伤后第 14 天仍然升高^[13-14]。IGF-1 蛋白表达量在骨骼肌钝挫伤后明显升高, 且持续到损伤后 28 天仍然明显^[15]。而本实验研究发现兔软组织挫伤后第 3 天骨骼肌有内源性 IGF-1 mRNA 表达, 但造模及干预各组 IGF-1 mRNA 及蛋白含量表达较正常组降低, 其原因可能与研究动物种属、造模形式、干预措施以及软组织损伤程度不同所造成的微循环障碍有关。软组织损伤后局部代谢紊乱, 血液循环障碍, 氧及营养物质供应不足^[16], 致使损伤局部缺氧, 进而导致 IGF-1 mRNA 及其蛋白表达下降^[17]。研究显示, CsA 可使啮齿动物骨骼肌纤维萎缩^[18-19]。本实验结果显示, 与空白组比较, 模型组 IGF-1 mRNA 和蛋白表达降低, 提示软组织挫伤可造成 IGF-1 mRNA 和蛋白表达降低。

近年来研究发现针刺能显著改善损伤骨骼肌超微结构的变化^[20], 迅速降低肌肉损伤后肌细胞浆内增加的钙浓度^[21], 加强收缩蛋白的组装、合成^[22], 促进损伤肌组织肌卫星细胞的活化, 使增殖及增殖高峰期提前出现, 对骨骼肌损伤修复具有促进作用^[23]。本实验结果显示, 与模型组比较, 针刺组 IGF-1 mRNA 与蛋白表达显著升高, 提示针刺可通过提高受损骨骼肌 IGF-1 mRNA 与蛋白表达促进骨骼肌的修复。与针刺组比较, 针刺合并 CsA 组 IGF-1 mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义, 原因可能是单独使用 CsA 造成 IGF-1 mRNA 和蛋白表达降低, 但针刺可能干预了生长激素 (GH) 的变化, 通过调节 GH/IGF-1 轴, 有效改善微循环, 进而升高了 IGF-1 蛋白的表达。

综上所述, 软组织钝挫伤可使兔骨骼肌 IGF-1 mRNA 和蛋白表达下降; 针刺可上调损伤局部 IGF-1 mRNA 与蛋白表达从而加速骨骼肌的再生和修复, 其内在机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 李建文. 多针斜刺治疗急性慢性软组织损伤 216 例 [J]. 中国针灸, 2000, 20(2): 94.
- [2] 梁飞. 斜刺治疗骨骼肌损伤的疗效观察 [J]. 广州体育学院学报, 2003, 23(1): 40-41.
- [3] 刘思赤. 斜刺治疗骨骼肌急性损伤 156 例的疗效观察 [J]. 中国疗养医学, 2013, 22(8): 709-710.
- [4] 王刚, 高谦, 杨志丽, 等. 不同针刺法对大鼠腓肠肌砸伤后微循环血流灌注的影响 [J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(6): 651-653.
- [5] 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.
- [6] Sato K, Li Y, Foster W, et al. Improvement of muscle

healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis [J]. Muscle Nerve, 2003, 28 (3): 365-372.

[7] Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration [J]. J Cell Physiol, 2010, 224 (1): 7-16.

[8] Tidball JG. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation [J]. J Appl Physiol, 2005, 98 (5): 1900-1908.

[9] Delling U, Tureckova J, Lim HW, et al. A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20 (17): 6600-6611.

[10] 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.

[11] Mitchell PO, Mills ST, Pavlath GK. Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscles [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282 (5): 984-992.

[12] 卢鼎厚. 肌肉损伤和颈肩腰臀腿痛: 阿是穴斜刺治疗肌肉损伤的临床和实验研究 [M]. USA: TCM PRESS, 2000: 4-34.

[13] 李云霞, 陈世益, 马昕, 等. 骨骼肌损伤修复过程中组织胰岛素样生长因子的表达 [J]. 中国运动医学杂志,

2001, 20 (2): 171-173, 163.

[14] 成羿, 董学亮, 王佩. 活血止痛膏对兔骨骼肌急性钝挫伤后组织观察及 IGF mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30 (10): 2216-2221.

[15] 李宏云, 陈世益, 张健, 等. 黄芪皂甙与丹参酮 II A 对大鼠骨骼肌急性钝挫伤后生长因子表达的影响 [J]. 复旦学报 (医学版), 2011, 38 (1): 47-50.

[16] Simons DG. Clinical and etiological update of myofascial pain from trigger points [J]. J Musculoskel Pain, 1996, 4 (1-2): 93-121.

[17] 贺道远, 叶鸣, 曾凡星. 耐力运动和低氧暴露对骨骼肌 IGF-1 mRNA 和蛋白表达的影响 [J]. 沈阳体育学院学报, 2009, 28 (1): 59-61.

[18] Zbreski MG, Helwig BG, Mitchell KE, et al. Effects of cyclosporine-A on rat soleus muscle fiber size and phenotype [J]. Med Sci Sports Exerc, 2006, 38 (5): 833-839.

[19] Miyazaki M, Hitomi Y, Kizaki T, et al. Calcineurin-mediated slow-type fiber expression and growth in reloading condition [J]. Med Sci Sports Exerc, 2006, 38 (6): 1065-1072.

[20] 李澎涛, 于鸿玲, 康锁彬, 等. 针刺对超负荷运动家兔骨骼肌超微结构影响 [J]. 上海针灸杂志, 1994, 13 (3): 126-128.

[21] 屈竹青, 卢鼎厚, 王义润, 等. 针刺对骨骼肌损伤过程中细胞内钙分布的影响及其机制 [J]. 中国运动医学杂志, 1995, 14 (1): 7-12.

Effect of CsA and Oblique Needling the Gastrocnemius on the Expression of Insulin-like Growth Factor 1 in Rabbit Models With Soft Tissue Injury

LI Na, HUANG Yiran, YU Fei, LEI Lindan, WANG Shaohuai, LI Yubo, LI Wenxun

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT Objective To observe the effect of cyclosporine A (CsA) and oblique needling into the gastrocnemius on soft tissue injury (STI) and its mechanism. **Methods** Thirty New Zealand white rabbits were randomized into blank group, model group, CsA group, needling group and needling combined with CsA group, with 6 in each. The acute STI models were established by heavy objects in free fall for 20 consecutive shocks. The needling group was given oblique insertion of the needles into Ashi points, CsA group was given intraperitoneal injection of 9.25 mg/(kg · d) CsA and needling combined with CsA group was given both needling and CsA 24 h after modeling. There was no intervention in the model group and blank group. The expressions of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mRNA and its protein in gastrocnemius were detected with Real-time PCR and Western blot 72 hours after injury.

Results Comparing with the blank group, the expression of IGF-1 mRNA was significantly decreased in other groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and the expression of its protein was significantly decreased in the model group, CsA group and needling group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the model group, the expressions of IGF-1 mRNA and its protein were significantly increased in the needling group and needling combined with CsA group ($P < 0.05$). Comparing with the CsA group, the expressions of IGF-1 mRNA and its protein were significantly increased in the needling group and needling combined with CsA group ($P < 0.05$). **Conclusion** STI can decrease the expressions of IGF-1 mRNA and its protein. The combo therapy of CsA and inserting the needles obliquely into the gastrocnemius can up-regulate the expressions of IGF-1 mRNA and its protein in partially injured skeletal muscles, and improve the soft tissue repairment.

Keywords skeletal muscle; soft tissue injury; insulin-like growth factor 1; needling; cyclosporine A

(收稿日期: 2013-11-10; 修回日期: 2013-12-24)

编辑: 焦爽