

Based on P38/ERK-MAPK Signal Pathway, to Explore the Mechanism of Using Li Jin Manipulation to Repair Exercise-induced Skeletal Muscle Injury in Rats

Yanshuang Li huisheng Ma Jing Mu Huan Shi Manman Li Tao Sang Maomao Song Lany-ing Yuan

Ningxia Medical University College of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan, Ningxia, 750004, China

Abstract

Objective: Explore the mechanism of skeletal muscle injury repairing by Li jin manipulation by the P38MAPK/ERK signaling pathway. **Methods:** 54 SPF healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into model control group (n=9), blank group (n=9), natural recovery 1w, 2w group, 9 each, treatment 1w, 2w group, 9 each. Except for the blank group, the other groups were all on the running platform for a one-time continuous downhill running. After the end of the model for 4 weeks, the treatment group was given a rational treatment. At the end of treatment, the quadriceps muscles of each group were taken. The changes of rat muscle fibers were observed by HE staining. The expressions of ERK and P38MAPK protein in rat muscle tissue were detected by Western Blot. **Results:** After 4 weeks of modeling, the muscle fibers of the model group were disordered, the muscle fibers were distorted and broken, the transverse stripes disappeared, and a large number of inflammatory cells infiltrated; the expression of ERK/P38MAPK was enhanced. After the treatment with the Li jin manipulation, the expression of ERK/P38MAPK was significantly decreased in each group, the muscle fiber mechanism was significantly improved, and the inflammatory cells were decreased. **Conclusion:** Li jin manipulation may interfere with the repair of skeletal muscle injury by regulating P38MAPK and ERK signaling proteins.

Keywords

skeletal muscle injury; Li Jin manipulation; HE staining; ERK; P38MAPK; Western Blot

Fund Project

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Project No.: 81860892); Ningxia Medical University First-Class Subject Graduate Project (Project No.: NXYLXK2017A06).

基于 P38/ERK-MAPK 信号通路探讨理筋手法对大鼠运动性骨骼肌损伤的修复作用机制

李彦双 马惠昇 穆静 史欢 李嫚嫚 桑涛 宋毛毛 袁兰英

宁夏医科大学中医学院, 中国·宁夏 银川 750004

摘要

目的: 从 P38MAPK/ERK 信号通路探索理筋手法促进骨骼肌损伤修复的作用机制。**方法:** 选用 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 54 只, 随机分为模型对照组 9 只, 空白组 9 只, 自然恢复 1w、2w 组各 9 只, 治疗 1w、2w 组各 9 只。除空白组外, 其余各组均在跑台上进行一次性持续下坡跑运动, 造模 4 周结束后, 治疗组给予理筋手法治疗。治疗结束后分别取各组大鼠股四头肌, 采用 HE 染色法观察大鼠肌纤维的改变、Western Blot 法检测大鼠肌组织 ERK、P38MAPK 蛋白表达水平。**结果:** 造模 4 周结束后, 模型组肌纤维排列紊乱, 肌纤维扭曲变形、断裂, 横纹消失, 大量炎性细胞浸润; ERK/P38MAPK 表达增强。而经理筋手法治疗后, 各组 ERK/P38MAPK 表达明显降低, 肌纤维机构均明显改善, 炎性细胞浸润减少。**结论:** 理筋手法可能是通过对 P38MAPK、ERK 信号蛋白的调节, 从而干预骨骼肌损伤的修复。

关键词

骨骼肌损伤; 理筋手法; HE 染色; ERK; P38MAPK; Western Blot

基金项目

国家自然科学基金项目 (项目编号: 81860892); 宁夏医科大学一流学科研究生项目 (项目编号: NXYLXK2017A06)。

1 引言

骨骼肌是人体运动的动力装置,人体的运动主要通过肌肉的收缩和舒张来完成。运动性骨骼肌损伤(Exercise-induced muscle damage, EIMD)是运动中最为常见的软组织损伤,在肌肉损伤中所占比例最大。骨骼肌损伤后,肌肉组织和结构发生病理生理学变化,导致周围关节或关节外软组织结构发生特异性变化,严重者影响其功能^[1]。研究运动引起的骨骼肌损伤机制,了解与认识其病理、病变,探讨预防、治疗及康复措施,一直是运动医学研究中的重要领域之一,已引起医学界的关注。EIMD处理的总原则就是减轻炎症反应和促进新肌纤维的增生。理筋手法是回族医学中治疗筋伤的主要手段,具有纠正小关节紊乱、解除痉挛、缓急止痛、减轻炎症反应、促进局部血液循环等诸多作用^[2]。MAPK是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者,在未受刺激的细胞内,MAPK处于静止状态,当受到其他刺激后MAPK被激活^[3]。本研究通过理筋手法治疗慢性运动性骨骼肌损伤模型大鼠,从组织形态学、P38/ERK-MAPK信号通路来探讨其作用机制。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 实验动物及分组

SPF级健康雄性SD大鼠54只,2月龄,体重200~220g。随机分为6组,每组9只,即模型组、空白组、自然恢复组(又分为两个亚组,即:自然恢复1w组、自然恢复2w组)、治疗组(又分为两个亚组,即:治疗1w组、治疗2w组)。所有大鼠均购自宁夏医科大学实验动物中心,许可证号SCXK(宁)2015-0001。

2.1.2 主要试剂和仪器

主要试剂:苏木素伊红染色液(Bioswamp PAB180015, PAB180016),DAB浓缩型试剂盒(Bioswamp PAB180021),RIPA(强)组织细胞快速裂解液(Bioswamp PAB180006),BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(Bioswamp PAB180007),p38MAPK、ERK(Bioswamp MAB37199, MAB37327), β -Actin(Bioswamp PAB36265),Goat anti rabbit IgG goat(Bioswamp SAB43711)。

主要仪器:石蜡包埋机(湖北泰维科技实业有限公司 TB-718D),石蜡切片机(徕卡显微系统有限公司 RM2235)

,电泳仪(BIO-RAD mini protean 3cell),酶标仪(芬兰雷勃 MK3),全自动化学发光分析仪(上海天能 Tanon-5200)。

2.2 方法

2.2.1 模型制备

将54只大鼠随机分为6组,每组各9只,空白组正常饲养,不做任何处理;其余各组参照Armstrong^[4]的造模方法,运用一次性跑台建立运动性骨骼肌损伤模型,具体参数是:跑台坡度 -16° ,速度19m/min,总运动时间120min,120min/天,5天/周,共4周。

2.2.2 治疗及取材

治疗组于造模结束后行理筋手法治疗,治疗时间为10~15min/次,一天一次。治疗1w组治疗一周后取材,治疗2w组治疗两周后取材,自然恢复1w组与自然恢复2w组在造模结束后不做任何处理,自行恢复,分别在一周、两周后取材,模型组于造模结束后第二天取材。取各组大鼠股四头肌为待测样本。

2.3 样本检测

2.3.1 HE染色

将所取组织在4%多聚甲醛中固定24h,流水冲洗4h后用PBS缓冲液泡过夜,最终固定于70%酒精中。修剪组织,大小为1.5cm \times 1.5cm \times 0.3cm为宜,按常规步骤脱水浸蜡包埋。切片前将包埋好的组织样本置于 -20°C 冷冻数分钟,切片厚度为5 μm 为宜。常规HE染色,中性树脂封片。光镜下观察组织形态学变化。

2.3.3 Western Blot

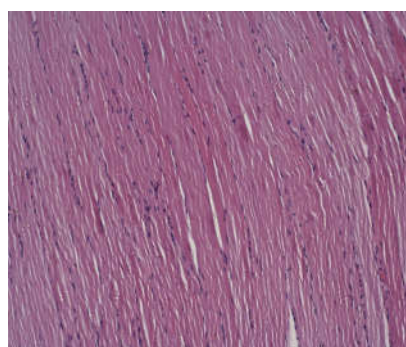
①提取蛋白:将组织样本按每20mg组织加入150~250 μL 裂解液的比例加入裂解液(裂解液中加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂),匀浆器匀浆直至完全裂解,裂解后的样品4 $^\circ\text{C}$ 12000g离心15min,取上清, -80°C 冰箱保存。②BCA蛋白定量法测定蛋白浓度:取酶标板依次加入蛋白标准液,去离子水,将BCA-A与BCA-B按体积比为50:1配置适量BCA工作液,在各孔中加入160 μL BCA工作液,把酶标板放在振荡器上振荡30s,37 $^\circ\text{C}$ 放置30min,然后在562nm下测定吸光度,在酶标板中加入2 μL 待测蛋白和18 μL PBS(稀释10倍),加入160 μL BCA工作液,把酶标板放在振荡器上振荡30s,37 $^\circ\text{C}$ 放置30min,然后在562nm下测定吸光度,

分别绘制标准曲线并计算样品蛋白浓度。③ SDS-PAGE 胶的制备。④上样及电泳。⑤转膜：90V 转膜 50 min。转膜前将 PVDF 膜在甲醇中浸泡 5 min，再孵育于冰冷的电转缓冲液中 2 min。⑥膜的封闭及抗体孵育：封闭：5 % 脱脂奶粉室温封闭 2h 或 4℃ 过夜；一抗孵育：加入一抗（1：1000），室温孵育 1h 或 4℃ 赋予过夜；二抗孵育：：孵育一抗的膜用 PBST 洗涤 3 次，每次 5min。随后根据用量，按照 1:10000 稀释 HRP 标记的二抗，与膜室温孵育 1h 或 4℃ 孵育过夜。用 PBST 洗涤 3 次，每次 5min。⑦ ECL 化学发光显影。

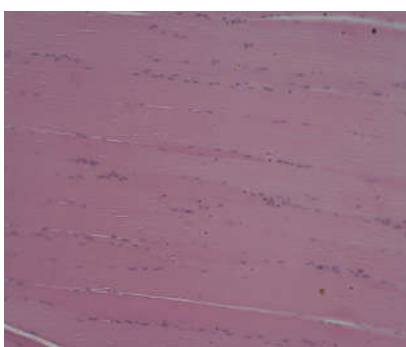
3 结果

3.1 骨骼肌纤维的光镜结构（HE）

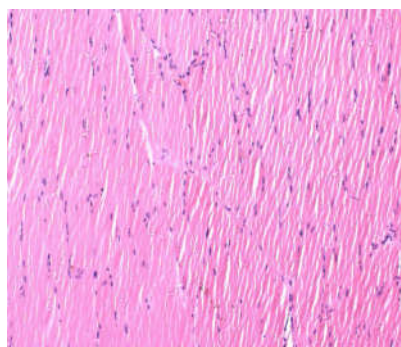
在光镜下观察肌纤维结构如下（纵切），空白组肌组织染色为红色，肌纤维细而长，形似长带状，平行排列成束，细胞核被染成紫色呈扁椭圆形，位于肌膜下方。由肌丝组成的肌原纤维沿肌纤维长轴平行排列，具规律的明暗相间的横纹。模型组肌纤维排列紊乱，肌纤维扭曲变形、断裂，横纹消失，大量炎性细胞浸润。治疗 1w 组行理筋手法一周后，肌纤维结构较自然恢复 1w 组改善明显，炎性细胞浸润减少。而治疗 2 周后，治疗 2w 组及自然恢复 2w 组肌纤维结构均明显改善，与空白组比较已无明显差异。



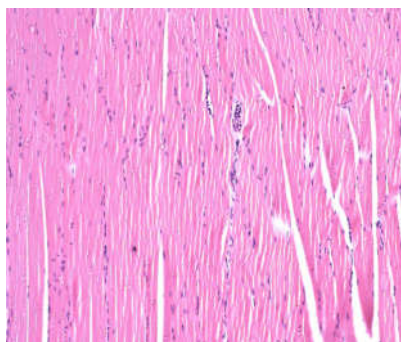
模型组



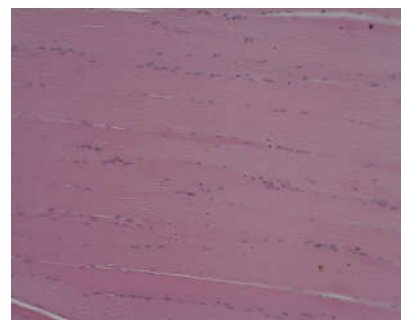
空白组



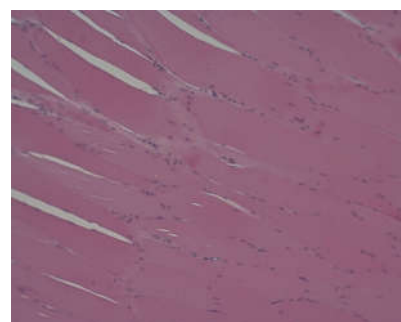
治疗 1w 组



自然恢复 1w 组



治疗 2w 组



自然恢复 2w 组

图 1

3.2 骨骼肌 ERK/P38MAPK 的表达（Western Blot）

各组数据统计如下：模型组 P38MAPK、ERK 表达明显高于各组（ $p < 0.05$ ）；治疗组行理筋手法治疗后，与模型组、

自然恢复组比较, 两蛋白表达都有所降低 ($P < 0.05$); 自然恢复组与模型组比较, 两蛋白表达亦有所降低 ($P < 0.05$); 而治疗 1w 组与自然恢复 2w 比较无明显差异 ($P > 0.05$)。

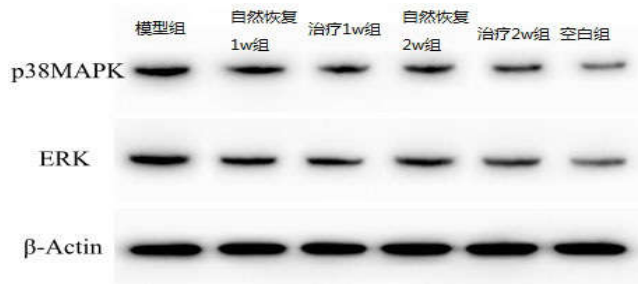


图 2

表 1 各组大鼠 ERK/P38MAPK 灰度值的变化 ($\bar{x} \pm s$)

	n	P38MAPK	ERK
空白组	9	348.33 ± 95.033 [△]	560.56 ± 13.253 [△]
模型组	9	1228.00 ± 157.463	1695.78 ± 282.847
治疗 1w 组	9	739.11 ± 111.250 ^{△*}	943.33 ± 142.812 ^{△*}
自然恢复 1w 组	9	1029.56 ± 129.66 ^{△*}	1390.56 ± 217.765 ^{△*}
治疗 2w 组	9	542.67 ± 131.842 ^{△*}	752.56 ± 165.229 ^{△*}
自然恢复 2w 组	9	827.22 ± 58.734 [△]	1095.89 ± 175.17 [△]

与模型组比较[△] $P < 0.05$; 与自然恢复 1 组比较^{*} $P < 0.01$;
与自然恢复 2w 比较^{*} $P < 0.01$;

4 讨论

骨骼肌损伤是临床常见的软组织损伤之一, 已成为现代医学研究的热点。从组织形态学观察, 不同原因造成的骨骼肌损伤, 修复过程大体相同, 即包括炎症反应阶段, 修复阶段和重塑阶段^[5]。研究表明, 大鼠在经一次性下坡跑运动后 24h 出现炎性细胞浸润, 肌膜模糊, 局部肌丝变性^[6]。卢昊宁^[7]在一次性大鼠离心运动中的研究中发现大鼠在间歇性运动 80min 后损伤后即刻肌纤维排列紊乱, 走行扭曲, 纤维束数量减少, 部分分离、移位。本实验结果显示: 大鼠在经 4 周下坡跑运动结束后, 模型组肌纤维排列紊乱, 扭曲变形、断裂, 横纹消失, 大量炎性细胞浸润。而在损伤一周后, 治疗 1w 组行理筋手法治疗后, 组织病理形态可见肌纤维排列整齐, 无明显扭曲变性, 明显优于自然恢复 1w 组。这表明理筋手法可能是通过改善损伤后的炎症反应和减少肌节的损伤, 而达到促进骨骼肌损伤修复的作用。

机体对运动所产生反应有着高度的特异性, 与运动的类型、频率、持续时间有关。长期运动训练所引起的骨骼肌适应是一个反复累加的过程, 该过程不仅激起细胞水平的多种生理

生化反应, 同时也需要机体有着强大的控制网络来调控细胞的各种功能^[8]。哺乳动物细胞内, 许多级联反应调控细胞的各种功能。MAPKs 是一系列级联反应的成分, 是多种细胞外刺激的关键因素, 能够调节基本的细胞过程^[9]。MAPK 信号通路主要有 3 种途径, 即细胞外信号调节激酶 (ERK) 通路; C-JunN2 末端激酶 (JNK) 通路和 P38 通路。ERK 调控细胞生长发育和细胞功能, 是目前研究最为广泛的信号通路。有学者认为骨骼肌运动训练后, 出现形态结构和功能的改变是因为机械力激活了细胞内信号转导, 而转导路径可能是机械性刺激受体与细胞骨架相互作用, 将机械力信号传导到细胞间结合位点、细胞核膜等^[10]。在大鼠进行负重运动、原位收缩、体外收缩等刺激后, 骨骼肌细胞 P38MAPK、ERK 被激活^[11-12], 磷酸化 P38MAPK、ERK 水平代表该激酶活化程度或活性高低。蔡保塔^[10]通过 Western Blot 法检测 P38MAPK 相应磷酸化蛋白, 随着运动量及运动时间的增加, P38MAPK 活性表达增加, 而在安静组未检测到 P38MAPK 活性的表达, 他认为 p38MAPK 途径是运动应激性刺激信号转导途径之一。本实验研究结果表明: 造模 4 周后, 模型组 P38MAPK/ERK 表达明显升高, 这可能是由于炎性细胞等因素在细胞外刺激 MAPK 的活化、磷酸化, 而磷酸化的 MAPK 通过 P38/ERK 通路将信号传递至细胞内, 产生一系列的病理反应。而在治疗一周后, P38MAPK/ERK 活性表达降低, 说明手法的干预抑制了 MAPK 的表达。

5 结语

综上所述, 理筋手法可能是通过抑制 ERK/P38MAPK 蛋白表达的上调而发挥对骨骼肌损伤修复的作用。

参考文献

- [1] 王大鹏, 张桂梅, 罗力佳. 细胞生长因子修复骨骼肌损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2016, (2).
- [2] 刘镭, 马惠昇, 赵宁建, 等. 回医理筋手法治疗肩关节周围炎 200 例临床疗效研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(2):117-120.
- [3] WEI ZHANG. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells [J]. 细胞研究 (英文版), 2002, 12(1).
- [4] Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983, 54 (1):80-93.
- [5] 徐玉明, 王瑞元. 运动性肌纤维 dystrophin、desmin 的变化特征 [J].

- 北京体育大学学报,2007(04):516-518.
- [6] 邓文骞. 缺氧预处理对老年大鼠运动性骨骼肌损伤的作用及机制 [J]. 中国老年学杂志,2016,(1).
- [7] 卢昊宁. 一次离心运动SD大鼠骨骼肌MR-DTI,T2mapping与Myosin,Actin表达相关性研究 [D].2013.
- [8] Aim E, Arkin AP. Biokbeel networks. Curt opin Struct Biol, 2003, 13(2): 193-202.
- [9] 陈建勇,王聪.MAPK信号通路研究进展 [J]. 中国医药科学,2011,01(8).
- [10] 蔡保塔. P38MAPK对细胞凋亡调节及其在骨骼肌运动损伤发生中的作用 [D]. 第一军医大学,2006.
- [11] Boppart MD, Hirshman MF, Sakamoto Ket a1. Static stretch increases c · Jan NH2 — terminal kinase activity and p38 phosphorylation in rat skeletal muscle. Am J Physiol CdlPhysiol, 2001, 280(2): C352- C358.
- [12] Nader GA, Esser KA. IntraceHular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes ofexercise. J Appl Physiol, 2001, 90(5): 1936-1942.