

单侧电刺激训练对双侧同源肌肉生长因子 mRNA 表达的影响*

曹龙军¹ 黄力平¹ 周 石^{1,2} 向 珩¹ 王文龙¹ 张建琦¹

摘要 **目的:**观察单侧电刺激训练对双侧同源肌肉生长因子表达的影响,探讨电刺激促进肌肉生长修复和对侧交叉迁移现象的机制。**方法:**SD 大鼠 30 只,随机分为 5 组,每组 6 只,分别为对照组和 1、2、3、4 周电刺激组,刺激部位为右侧腓肠肌,实时荧光定量 PCR 法分别检测双下肢腓肠肌和前肢肱二头肌的胰岛素样生长因子-1(IGF-1)不同变构体肝型胰岛素样生长因子(IGF-1Ea)和机械力生长因子(MGF)以及成肌分化因子(Myogenin, MyoG)mRNA 表达。**结果:**训练侧各电刺激组 MGF mRNA 表达较对照组分别增长了 3.97、4.05、4.13、4.25 倍;IGF-1Ea mRNA 表达较对照组分别增长了 1.55、3.99、5.11、5.27 倍;MyoG mRNA 表达较对照组分别增长了 2.14、2.48、2.99、3.02 倍,与对照组相比差异有显著性($P<0.01$),而 MGF 和 MyoG mRNA 表达在各训练组之间无显著性差异($P>0.05$);IGF-1Ea mRNA 表达在 1、2、3 周训练组间有显著差异($P<0.01$),第 4 周与第 3 周间无显著性差异($P>0.05$);对侧同源肌肉和前肢肱二头肌 IGF-1Ea、MGF、MyoG mRNA 表达与对照组相比无显著性变化。**结论:**电刺激训练促进肌肉生长与修复机制中肌肉生长因子高表达可能起着重要作用;而对侧肌肉生长因子无显著性增长,表明对侧交叉迁移现象的机制可能不是由于肌肉生长因子表达所致,提示内分泌机制不占主导地位。

关键词 电刺激;生长因子;交叉迁移

中图分类号:R454.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-02-0103-04

The growth factors expressing of the homologous muscle by unilateral electrical stimulating / CAO Longjun, HUANG Liping, ZHOU Shi, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(2):103—106

Abstract **Objective:** Through investigating the effects of electrical stimulation on expression of growth factors in homologous muscle, to discuss mechanism of electrical stimulating promoting the skeletal muscle growing and cross education. **Method:** Thirty SD rats were randomly divided into five groups: control, 1 week, 2 week, 3 week and 4 week and stimulating the right triceps surae was stimulated by electrical stimulator. Using real-time quantitative PCR measurement to measure two alternative splices of IGF-1 (IGF-1Ea and MGF) and MyoG mRNA expressing of gastrocnemius and right biceps brachii. **Result:** IGF-1Ea mRNA expression of muscle was increased 1.55, 3.99, 5.11, 5.27 fold respectively, and from first week to third week, IGF-1Ea mRNA expressing consecutively kept increased, but compared with the third week, there was no increasing at the fourth week. MGF mRNA of muscles increased 3.97, 4.05, 4.13, 4.24 fold respectively and MyoG increased 2.14, 2.48, 2.99, 3.02 fold respectively, there was no significant increase from 1—4 weeks. However in the contralateral hind limb and forelimb skeletal muscles, the growth factors were no statistical significance. **Conclusion:** The processing of long-time electrical stimulation promote muscle function, the growth facts were playing a key role in the process of muscle regeneration and repairment; However no significant effects of electrical stimulation on the expression of these regulatory factors were observed in the non-stimulated contralateral hind limb and forelimb muscles, indicating that the expression of these regulatory factors was caused by direct electrical-mechanical stimulation, while the neural-endocrine might not play a main role in it.

Author's address University of Tianjin Sport, Tianjin, 300371

Key words electrical stimulating; growth factors; cross education

电刺激训练已经证明是增长肌肉力量和促进康复的有效方法,电刺激训练一侧肢体能够增长对侧肢体同源肌肉的力量,即表现为肌肉力量增长的交叉迁移现象(cross education)^[1]。肌肉力量增长与肌纤维增生肥大及神经适应过程有关^[2]。肌肉的生长和修复、肌纤维增生和肥大是由许多生长因子调控的,其中胰岛素样生长因子-1 (insult-like growth

factor-1, IGF-1)、不同变构体肝型胰岛素样生长因子-1(IGF-1Ea)和机械力生长因子(mechano growth factor, MGF),以及成肌分化因子(myogenin, MyoG)

* 基金项目:天津科委科技发展计划(05YFGDSF02100)

1 天津体育学院,天津,300371

2 澳大利亚南十字星大学

作者简介:曹龙军,男,讲师,硕士研究生

收稿日期:2008-06-04

是调节肌肉生长的重要因子^[3-4]。单侧电刺激训练提高双侧肌肉力量是否由于两侧同源肌肉内生长因子表达增加所致尚未见报道,因此,本研究旨在探讨单侧不同时间的电刺激训练对双侧同源肌肉 IGF-1 不同变构体和 MyoG 表达的影响以及时间依赖性规律,探讨电刺激促进肌肉生长与修复以及交叉迁移的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

2月龄健康雄性SD(Sprague-Dawley)大鼠30只,体重210—220g,普通SD大鼠饲料(中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供)喂养,1周后采用完全随机设计的方法分为5组,每组6只,分别为对照组(W0),1周(W1),2周(W2),3周(W3),4周(W4)电刺激训练组,饲养环境为20—28℃,动物自由饮食。

1.2 主要试剂及仪器

电刺激训练仪(北京,KD-2A型经皮神经电刺激仪);引物、TaKaRa荧光定量PCR反应试剂盒SYBR® Premix Ex TaqTM(大连宝生物有限公司);Fermentas反转录试剂盒Revert AidTMFirst Strand cDNA Synthesis Kit(中国晶美公司);超净工作台(苏州净化设备厂);高速低温离心机(Beckman Co,美国),iCycler荧光定量PCR仪(BIO-RAD Co,美国)。

1.3 引物

Real-time PCR引物序列IGF-1Ea:上游:cat tcg gag ggc acc aca ga;下游:cac ttg atg ccc aag act cag (150bp);MGF:上游:gca ttg tgg atg agt gtt gc;下游:ctt ttc ttg tgt gtc gat agg(163bp);MyoG:上游:tcg ggg cac tca ctg tet ct;下游:act acc cac cgt cca ttc ac(233);18S核糖体RNA:上游:tga ggt ttc ccg tgt tga g;下游:gac cat aaa cga tgc cga ct (190bp)。

1.4 动物训练

电刺激时,先将大鼠浅麻醉(10%水合氯醛腹腔麻醉,0.3ml/100g)后俯卧位固定四肢,右小腿硫化钠(10%)脱毛,以双层生理盐水湿纱布包裹,将电极固定于皮肤表面,正极置于肢体近侧,负极置于远侧,刺激频率10 Hz、脉宽200μs、电流20mA、可以见到腓肠肌明显收缩,每次刺激时间45min、1次/d。为了消除麻醉和饲养时间带来的系统误差,在此期间对所有实验对象(包括对照组)实施麻醉,并俯卧位固定四肢45min,从第1周开始先训练4周训练组,然

后每隔1周分别加入3周、2周和1周训练组,4周后同时处死,取双侧下肢腓肠肌外侧头和上肢肱二头肌,用生理盐水清洗后液氮速冻,最后-70℃保存。

1.5 RT-PCR实验

大鼠IGF-1不同变构体和MyoG的mRNA表达水平的SYBR Green I荧光定量RT-PCR方法建立和RNA提取按试剂盒说明书操作。RNA质量由A260/A280比值和0.8%琼脂糖凝胶电泳确定。取5μg总RNA,按Fermentas反转录试剂盒以随机6核苷酸为引物反转录,逆转录产物稀释10倍后-20℃保存备用;实时荧光定量PCR按宝生物实时荧光定量PPCR试剂盒说明书操作。扩增条件:95℃ 2min;95℃ 10s,55—58℃(根据不同引物的退火温度)20s,54℃时检测荧光,共40个循环。扩增完毕进行熔解曲线分析,对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析特异性。

1.6 统计学分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行半定量分析^[5], ΔCt 值由目标基因的Ct值减去18s的Ct值得到,每组目标基因的 ΔCt 都与正常饮食组的平均 ΔCt 相减得到 $\Delta\Delta Ct$,然后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示其相对于对照组的表达量,并进行单因素方差分析,检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 训练侧大鼠腓长肌IGF-1Ea、MGF、MyoG mRNA相对表达量的变化

电刺激对IGF-1Ea mRNA表达的影响:IGF-1Ea mRNA表达较对照组分别增长了1.55、3.99、5.11、5.27倍,经单因素方差分析,1周电刺激组较对照组IGF-1Ea mRNA表达有显著增加($P<0.01$),2—3周电刺激训练持续增加,第3周达到高峰,1—3周组间都有显著性差异($P<0.01$),4周电刺激训练无继续增加,与3周电刺激训练相比无显著性变化($P>0.05$);电刺激训练对MGF mRNA表达的影响:MGF mRNA表达较对照组分别增长了3.97、4.05、4.13、4.25倍,经单因素方差分析,在持续性1周电刺激训练组MGF mRNA的表达就迅速增加,与对照组相比有显著性差异($P<0.01$),以后继续在2—4周训练中保持该高水平,与1周电刺激训练组相比无显著性增加($P>0.05$);电刺激训练对MyoG mRNA表达的影响:电刺激训练能够迅速增加大鼠骨骼肌中MyoG mRNA的表达,与MGF表达几乎同步,分别增长了2.14、2.48、2.99、3.02倍,经过单因素方差分析,在第1周训练后增加显著($P<0.01$),在随后的电刺激训练中仍保持高水平,1—4周电刺激训

练组组间无显著性差异($P>0.05$), 见表 1。

2.2 对侧腓长肌和前肢肱二头肌 IGF-1Ea、MGF 和 MyoG mRNA 相对表达量的变化

第 1、2、3、4 周电刺激训练后对侧同源性肌肉腓长肌和前肢肱二头肌中 IGF-1Ea、MGF、MyoG mRNA 的相对表达量与对照组相比无显著变化($P>0.05$), 见表 2。

表 1 1—4 周各组训练侧腓长肌 IGF-1、MGF 和 MyoG mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	IGF-1Ea(fold)	MGF(fold)	Myogenic(fold)
第 0 周	1.025±0.246	1.029±0.265	1.03±0.22
第 1 周	1.55±0.29 ^①	3.96±0.86 ^①	2.14±0.49 ^①
第 2 周	3.99±0.83 ^{①②}	4.05 ±0.71 ^①	2.48±0.60 ^①
第 3 周	5.11±0.82 ^{①②③}	4.13±0.80 ^①	2.99±0.71 ^①
第 4 周	5.27±0.86 ^{①②③}	4.25±0.77 ^①	3.02±0.68 ^①

①训练组与对照组相比 $P<0.01$; ②2—4 周与 1 周比较 $P<0.01$; ③3—4 周与 2 周比较 $P<0.01$

表 2 1—4 周对侧腓长肌和前肢肱二头肌 IGF-1、MGF 和 MyoG mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	IGF-1Ea(fold)		MGF(fold)		MyoG(fold)	
	对侧	前肢	对侧	前肢	对侧	前肢
第 0 周	1.03±0.23	1.03±0.29	1.04±0.31	1.04±0.29	1.04±0.31	1.04±0.28
第 1 周	1.10±0.32	1.03±0.26	1.05±0.30	1.02±0.28	1.03±0.29	1.05±0.30
第 2 周	1.12±0.36	0.99±0.28	1.04±0.35	1.02±0.28	1.05±0.28	1.02±0.29
第 3 周	1.06±0.33	1.02±0.27	1.08±0.34	1.00±0.29	1.05±0.34	1.02±0.28
第 4 周	1.05±0.30	0.93±0.33	1.06±0.34	1.00±0.28	1.02±0.28	1.01±0.25

3 讨论

Goldspink 近年来研究发现 IGF 存在两种亚型, 其中 IGF-1Ea 即系统型的 IGF-1, 来源于肝脏, 存在于多种组织中, 通常所说的 IGF-1 是指 IGF-1Ea, 可在血液里检测出, 作用于全身组织器官, 对肌肉的主要作用是促进成肌细胞融合形成原肌管和蛋白的合成, 与肌细胞分化有关。第二种亚型是 IGF-1Ec, 它主要是肌肉在受到机械刺激, 牵拉和损伤时通过自分泌产生的, 也称为 MGF^[3], 主要是促进成肌肉卫星细胞分裂和增殖, 补充骨骼肌的卫星(干)细胞池。从本次实验结果发现, 电刺激能够显著增加肌肉 IGF-1Ea、MGF 和 MyoG mRNA 的表达, 表明电刺激在促进肌肉生长与修复过程中, IGF-1Ea、MGF 和 MyoG 的高表达起着关键的作用; 通过不同时间的单侧电刺激训练研究发现, 在 1 周训练组中, MGF 就有显著表达, 并达到高峰, 表明在肌肉损伤修复过程中, MGF 的是始动因素, 启动肌肉干细胞增殖; IGF-1Ea 的表达比 MGF 要晚, 说明 IGF-1Ea 在卫星细胞增殖和分化后, 可能在与肌纤维融合成原肌管和促进肌肉运动蛋白合成中起重要作用; MyoG 表达几乎与 MGF 是同步的, 在第 1 周表达就显著增高之后保持较高水平, MyoG 是肌肉干细胞分化标志物, 进一步表明电刺激训练可引起肌肉干细胞分化增殖发生, 为肌肉增生修复分子生物学奠定基础。

关于一侧肢体力量训练增加对侧同源肢体肌肉力量已见许多报道, 不同肌群对侧肢体同源肌肉肌力增长幅度变化在 10%—70%, 训练形式包括主动随意抗阻训练、神经肌肉电刺激训练^[6]。最近我们实验室研究发现穴位电针刺激训练, 也可显著增长对侧同源肌肉力量^[7]。研究认为肌肉力量的增长主要有两个因素: ①肌肉体积的增加、肌肉纤维增粗、肌肉细胞蛋白的改变, 以及肌纤维类型的改变; ②改变参

与工作的运动单位的数量和支配骨骼肌的运动神经冲动发放频率, 在神经系统的调节下, 改善了主动肌、拮抗肌和协同肌之间的互相协调关系^[2]。交叉迁移至今普遍被接受的推测机制有两个: ①脑和脊髓即中枢机制对交叉迁移起主要作用; ②训练通过改变机体内分泌调节肌肉生长因子表达的变化, 进而改变肌肉功能。有关神经机制的报导很多, 但也没有统一的结论, 而外周机制大多数报道集中在对血液内分泌激素的研究, 如睾酮、生长激素(growth hormone, GH)等, 结果也差异较大^[8], 其中 GH 是强有力的合成代谢促进剂, 它能调节肌肉和骨骼的合成代谢^[9]。运动对促进 GH 分泌和释放有密切关系, 不同的运动形式都能刺激 GH 分泌增加, GH 分泌的量与运动的强度、时间、和参与运动肌肉多少相关^[10]。Habsen 等^[11]通过上肢训练和上肢加下肢力量训练的实验模型研究发现, 在上肢加下肢力量训练组中上肢力量和生长激素的增加比单纯上肢力量训练有显著增加, 提示参与训练肌群多少对生长激素的分泌产生影响。GH 对机体的作用是通过 IGF-1 来介导的, 在 GH 基因敲除的小鼠中注射 GH 治疗过程中研究发现, 自分泌和旁分泌的 IGF-1 的两种变构体都显著增高^[12]。

本实验通过不同时间电刺激训练单侧大鼠小腿三头肌, 在未训练的对侧同源肌肉和前肢无关肌肉中 IGF 的两种变构体和 MyoG mRNA 的表达没有增加, 推断其原因可能有两个: ①参与训练的肌肉群只有小腿三头肌, 不能引起系统内分泌的变化, 如血液中 GH 和睾酮显著增高, 不能促进骨骼肌中生长因子的表达; ②对侧交叉迁移现象的机制不是通过对侧同源肌肉自分泌生长因子的增加, 而增加肌肉体积和力量, 这与通过观测肌肉体积无显著增加的结果是一致的^[13], 推测对侧交叉迁移很可能与神经

动员肌肉能力增加有关。Sarah 等^[14]通过单侧股四头肌运动训练,研究表明训练侧肢体力量增加显著,同时血液中的睾酮和 GH 在一次运动后 2h 内显著增高,很快就回到基线,认为单个肌群的训练不足以影响全身内分泌变化,这与本实验结果一致。本研究设计弥补了以往研究报道没有对无关肢体肌肉生长因子进行测定的缺陷,从而肯定了外周机制不占主导地位的结论。而本次试验不足之处是没有对血液中的激素如 GH 和 IGF-1 进行检测,还不能充分说明局部电刺激训练能否对系统内分泌激素分泌产生影响。

组织形态学的观察发现,在 1—4 周电刺激训练组对侧同源肌肉和前肢肌肉组织形态学与对照组基本相同,肌肉细胞的形态基本一致,对免疫组化结果分析中 1—4 周电刺激训练组对侧与前肢肌肉中 IGF-1 表达与对照组中阴性、弱阳性、阳性和强阳性的比例相同,都没有显著变化。本次研究中形态学没有变化与肌肉生长因子没有显著增加是一致的,进一步证实了对侧交叉迁移现象的外周机制不占主导作用。

综上所述,本研究证实了:①电刺激训练促进肌肉生长与修复机制中肌肉生长因子 IGF-1Ea、MGF、MyoG 高表达起着关键性作用。②电刺激训练力量增长的对侧交叉迁移现象的机制可能不是由于同源肌肉生长因子表达所致,提示内分泌机制不占主导地位。

参考文献

[1] Zhou S. Chronic neural adaptations to unilateral exercise:

Mechanisms of cross education [J]. Exercise and Sport Sciences Reviews, 2000, 28(4): 177—184.

- [2] Cabric M, Appell H. Effect of electrical stimulation of high and low frequency on maximum isometric force and some morphological characteristics in man [J]. International Journal of Medicine, 1987, 8:256—260.
- [3] 曹龙军, 黄力平, 周石. 胰岛素样生长因子-1 对骨骼肌生长和修复研究进展[J]. 天津体育学院学报, 2006, 21(3): 242—245.
- [4] 黄力平, 曹龙军, 周石. 不同时间电刺激训练对大鼠骨骼肌 IGF-1 不同拼接体表达的时序性影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(5): 399—402.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402—408.
- [6] Weir JP, Housh DJ, Housh TJ, et al. The effect of unilateral weight training and detraining on joint angle specificity, cross-training, and the bilateral deficit [J]. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy, 1997, 25: 264—270.
- [7] Huang LP, Zhou S, Lu Z, et al. Bilateral effect of unilateral electroacupuncture on muscle strength [J]. J Alternative and Complementary Medicine, 2007, 13(5): 539—546.
- [8] Hartman ML, Veldhuis JD, Thorner MO. Normal control of growth hormone secretion[J]. Horm Res, 1993, 40: 37—47.
- [9] Kassem M, Blum W, Risteli J. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro[J]. Calcif Tissue Int, 1993, 52: 222—226.
- [10] Rennie MJ, Yipton KD. Protein and amino acid metabolism during and after exercise after two weeks of high-volume strength training [J]. Scand J Med Sci Sports, 2005, 13: 159—168.
- [11] Habsen S, Kvorning T, Kjaer M, et al. The effect of short-term strength training on human skeletal muscle: the importance of physiologically elevated hormone levels[J]. Scand J Med Sci Sports, 2001, 11: 347—354.
- [12] Iida K, Itoh E, Kim DS, et al. Muscle mechano growth factor is preferentially induced by growth hormone in growth hormone-deficient lit/lit mice[J]. J Physiol, 2004, 560: 341—349.
- [13] Kim PL, Staron RS, Philips SM. Fasted-state skeletal muscle protein synthesis after resistance exercise and training[J]. Sports Med, 2005, 568: 283—290.
- [14] Wilkinson SB, Tarnopolsky MA, Grant EJ, et al. Hypertrophy with unilateral resistance exercise occurs without in endogenous anabolic hormone [J]. Eur J Appl Physiol, 2006, 98: 546—555.

卫生部第十五届全国小儿脑瘫实用康复技术培训班通知

为适应综合医院康复科、儿科、残疾儿童康复中心、儿童福利院和社区康复的需要,受国家卫生部委托,由卫生部佳木斯康复医学人才培训中心、佳木斯大学康复医学院暨黑龙江省小儿脑性瘫痪防治治疗育中心承办的第十五届全国小儿脑性瘫痪现代康复技术培训班即将招生,经结业考试授国家级 I 类继续教育学分 10 分。

培训内容:①小儿脑性瘫痪康复治疗的新理论、新技术、新进展。②孤独症等发育障碍性疾病的康复治疗。**培训方式:**采用团队式、互动式教学,以治疗演示、医生和治疗师集体评价、实际操作及典型病例讨论相结合的方式授课,突出动手操作能力的培训,重在提高儿童康复专业人员的理论与实践相结合的能力与水平。**培训对象:**从事儿童康复、小儿神经、儿童保健医生、治疗师、护士以及相关专业人员。**培训学员定额:**60 名。**拟开班时间:**2009 年 6 月下旬,为期 1 周。**培训班教师:**英国儿童康复专家、我国著名儿童康复专家及治疗团队。

请参加培训班的同志务必于 2009 年 5 月 15 日前将回执寄至培训中心,中心负责发报到通知,凭报到通知报到。也可直接与培训中心联系。

联系地址:黑龙江省佳木斯市德祥街 419 号,黑龙江省小儿脑性瘫痪防治治疗育中心;**联系人:**庞伟,邹春玉,谭丽萍;邮编:154003; E-mail: pangwei76@yahoo.com.cn, zouchunyu666@sohu.com; 电话: 0454-8623645, 8623588; 网址: www.cp-jms.com

卫生部佳木斯康复医学人才培训中心
黑龙江省小儿脑性瘫痪防治治疗育中心