

·基础研究·

脑缺血再灌注损伤大鼠患侧骨骼肌早期形态及 atrogin-1、MuRF-1 mRNA 表达的变化

张海娜¹ 徐永立² 王 帅¹ 李铁山^{3,4}

摘要

目的:观察大鼠脑缺血再灌注损伤后患侧骨骼肌早期形态学变化及肌萎缩素1(atrogin-1)和肌环指蛋白1(MuRF-1) mRNA表达水平的变化。

方法:60只雄性Wistar大鼠,10只为假手术对照组(A组),其余50只采用Longa线栓法建立大鼠左侧大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,其中30只造模成功大鼠随机分为B、C、D组,每组10只。B组为造模成功后1d组, C组为造模成功后4d组, D组为造模成功后7d组。应用Bederson评分评价大鼠的神经损伤后的恢复情况;分别获取A、B、C、D四组右侧肱二头肌,对各组通过HE染色检测肌纤维横截面积;通过荧光定量RT-PCR观察大鼠患侧骨骼肌中atrogin-1和MuRF-1 mRNA表达的变化。

结果:B、C、D组大鼠Bederson评分明显高于对照组A组($P<0.05$);B、C、D组大鼠间Bederson评分差异无显著性($P>0.05$)。患侧骨骼肌HE染色显示A、B、C组肌纤维横截面积两两比较,差异无显著性意义($P>0.05$);D组大鼠患侧骨骼肌肌纤维横截面积分别与其余3组相比,差异均有显著性意义($P<0.05$)。B、C、D组大鼠患侧atrogin-1和MuRF-1 mRNA的表达水平分别与对照组相比,差异均有显著性意义($P<0.05$);B组与C组相比较差异无显著($P>0.05$);D组大鼠分别与B、C组相比,差异均有显著性意义($P<0.05$)。

结论:脑缺血再灌注损伤大鼠早期患侧骨骼肌形态学即发生变化,其机制可能与Atrogin-1和MuRF-1 mRNA在骨骼肌中高表达,泛素连接酶蛋白降解通路被激活有关。

关键词 脑缺血再灌注;骨骼肌;组织形态学;肌萎缩素-1;肌环指蛋白-1

中图分类号:R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-07-610-05

The early histomorphological changes and expressions of atrogin-1 and MuRF-1 mRNA in skeletal muscle of paralytic limb of cerebral ischemia/reperfusion injury rats/ZHANG Haina, XU Yongli, WANG Shuai, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(7): 610—614

Abstract

Objective:To study the early histomorphological changes and levels of atrogin-1 and MuRF-1 mRNA in skeletal muscle of paralytic limb in cerebral ischemia/reperfusion injury rat's model.

Method:Sixty male Wistar rats were prepared, of which 10 for the sham operation group (A), and the remaining 50 for establishing model with Longa suture method on left side using middle cerebral artery occlusion (MCAO). Thirty successful model rats were randomly divided into B, C and D groups, each 10 rats. Rats of groups B, C and D were taken at 1 day, 4 days and 7 days after successful modeling respectively. Bederson score was used for evaluation of rats recovery after nerve injury. Right biceps brachii muscles of four groups were sectioned off for histomorphologic examination. The cross-sectional area of muscle fibers were compared with HE staining. Fluorescence quantitative RT-PCR was used to observe changes of skeletal muscle atrogin-1 and MuRF-1 mRNA expression.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.07.004

1 青岛大学医学院,266071; 2 中国科学院海洋研究所; 3 青岛大学医学院附属医院康复医学二科; 4 通讯作者
作者简介:张海娜,女,在读硕士; 收稿日期:2013-09-14

Result: Bederson scores of B, C and D groups were significantly higher compared with that of group A ($P < 0.05$); there was no significant difference among B, C and D groups ($P > 0.05$). Paralyzed muscles HE staining showed: muscle fiber cross-sectional area of A, B and C groups were compared in pairs, the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). The muscle fiber cross-sectional area of D group was compared with that of the other three groups, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Atrogin-1 and MuRF-1 mRNA expression levels of B, C and D groups were compared with control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$); there was no significant difference between B group and C group ($P > 0.05$); but when D group was compared with B and C group respectively, the differences were statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion: In cerebral ischemia-reperfusion injury in rat's early paralyzed skeletal muscles, appeared morphological changes, it's mechanism may be related to atrogin-1 and MuRF-1 mRNA high expression in rats' skeletal muscle and ubiquitin ligase pathway of protein degradation was activated.

Author's address Medical College of Qingdao University, Qingdao, 266071

Key word cerebral ischemia/reperfusion; skeletal muscle; histomorphology; atrogin-1 MuRF-1

脑卒中是导致患者残疾的主要原因之一,超过2/3的脑卒中患者伴有慢性运动功能障碍^[1]。脑卒中导致的上运动神经元损伤表现为阳性、阴性及适应性变化,阳性征象包括反射活跃、痉挛等表现;阴性征象包括肌力减弱、灵巧性丧失等;适应性变化主要表现为肌肉缩短、僵硬、运动模式变化等^[2]。脑卒中患者慢性期神经肌肉损伤的适应性表现包括:肌小节丢失,肌纤维类型的改变,骨骼肌蛋白的降解等,从而导致肌肉运动模式的改变,引起患侧肢体活动障碍^[3]。

泛素连接酶系统是负责骨骼肌蛋白质降解的主要途径之一,肌萎缩Fbox-1蛋白(muscle atrophy F-box,MAFbx)也称作肌萎缩素1(atrogin-1)和肌环指蛋白1(MuRF-1)属于泛素E3酶家族,是肌肉特异性泛素—蛋白连接酶。Sacheck等^[4]研究表明,在去神经支配或脊神经切断后,atrogin-1和MuRF-1在腓肠肌的表达上调40倍。在多种原因所致的肌肉萎缩动物模型中,泛素蛋白连接酶atrogin-1和MuRF-1 mRNA的水平表达明显增加,且先于代谢的变化,因此认为atrogin-1和MuRF-1作为骨骼肌萎缩早期的分子标记^[5]。

目前,对于脑卒中后骨骼肌适应性变化的研究主要集中于慢性期,而对急性期骨骼肌是否存在适应性变化研究很少,本研究通过观察大鼠脑缺血再灌注损伤后早期患侧骨骼肌的变化以及atrogin-1和MuRF-1 mRNA的表达,从而探讨大鼠缺血再灌注模型早期骨骼肌内是否存在适应性改变,为临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性Wistar大鼠60只,体重260—300g,由山东省青岛市药检所实验动物中心提供(SCXK鲁20090007,SPF级)。大鼠常规环境适应性生长1周,自由进食、饮水。室温控制(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,自然光照,术前12h禁食。

1.1.1 造模方法:符合体重260—280g的大鼠用10%的水合氯醛溶液进行腹腔注射麻醉(0.3ml/100g)。根据日本学者Koizumi J^[6]发明的线栓法制备局灶性脑缺血大鼠模型。在颈总动脉(common carotid artery,CCA)分叉部或颈外动脉(external carotid artery, ECA)残端插入栓线法,经左侧颈总动脉制作大脑中动脉缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)2h再灌注损伤模型。

1.1.2 分组:MCAO模型评分参照Bederson等^[7]、Longa等^[8]五级4分评分方法并改进。0分:未见神经病学征象;1分:轻微的神经营养功能缺损,大鼠被提尾悬空时病灶对侧前肢呈屈曲、抬高、肩内收、肘关节伸直;2分:中度局灶性神经营养功能缺损,有向瘫痪侧旋转征象,大鼠被提尾悬空时脑缺血对侧前肢呈屈曲、抬高、肩内收、肘关节伸直;3分:重度局灶性神经营养功能缺损,有向病灶对侧跌倒征象;4分:无自发活动及意识水平下降。苏醒后大鼠按上述评分标准进行评分。1—3分的30只大鼠纳入试验,随机数字表法分B组、C组、D组,每组10只,B组为造模成功后1d组,C组为造模成功后4d组,D组为造模成功后7d组;A组为假手术对照组,假手术组造模时

不阻断大脑中动脉血流。在实验过程中,动物死亡及时补充,确保每组动物数量。

用 Bederson 评分^[9]作为大鼠脑缺血再灌注损伤后神经功能恢复的评分标准,具体操作由同一名不知情的研究人员对 A 组、B 组、C 组、D 组大鼠进行神经损伤评分。

1.2 标本采集

造模成功后 1d、3d 及 7d 取 B、C、D 组大鼠患侧肱二头肌, A 组取大鼠肱二头肌,将所取标本迅速放置于液氮中 10min,转移至 -80℃ 冰箱保存,以备后期处理。

1.3 HE 染色

各组分别取 6 个标本,于 -24℃ 冷冻切片机 (MIRCOM HM505E) 进行冷冻切片,切片厚度 6—8μm。HE 染色:苏木精染色 5min,蒸馏水冲洗 2min,促返蓝液返蓝 2min,伊红染色 2min,蒸馏水冲洗,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察切片,每个样品至少观察 8 个切片,应用 IPP6.0 专业图像分析软件测量肌纤维横截面积,每个切片取 5 个视野,测量面积平均值。

1.4 总 RNA 提取

各组取 20mg 骨骼肌组织于 2ml 去酶 EP 管,用液氮将组织研碎,用 Trizol 法提取总的 RNA,提取结束后,取 1μl 提取的总 RNA,用核酸浓度测定仪 (艾本德公司),分别测定总 RNA 的浓度、A260/A280 比值, A260/230 比值,各个样本总 RNA 浓度在 1.8—2.0 之间, A260/A280 比值在 1.9 左右以上,可认为所提取的 RNA 较纯,可进行下一步实验。

1.5 逆转录

按照罗氏生物试剂公司提供的反转录试剂盒进行逆转录, 0.2ml 离心管加入 5×RTbuffer 4μl、RNase inhibitor 1μl、10mM dNTP Mixture 2μl、Oligo (dT) 1μl、Reverse Tra Ace 1μl、1μg RNA (0.7—1.2μl),加水至 20μl。振荡混匀离心, 25℃ 10min, 55℃ 30min, 85℃ 10min,然后逆转录产物 -20℃ 保存待用。

1.6 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 条件:在 0.2ml 离心管中加入荧光染料预混液 12.5μl (Roche)、cDNA 2.0μl,上下游引物各 0.75μl, 9.0μl 水, 94℃ 预热变性 4min, 94℃ 变

性 20s, 62℃ 退火 20s, 72℃ 延伸 10s, 扩增 40 个循环, 末次循环 72℃ 延伸 5min, 4℃ 保存 5min。见表 1。

表 1 引物设计序列表

引物		碱基序列
Atrogin-1	F	TGAAGACCGGCTACTGTGGAAGAGAC
	R	TTGGGGTGAAAAGTGAGACGGAGCAG
MuRF-1	F	TCGACATCTACAAGGAA
	R	CTGTCCTTGGAAGATTT
GAPDH	F	TCAGTGCCGGCCTCGTCTCAT
	R	TGACCAGGCGCCAATACGG

注:以上引物由上海生工生物工程有限公司购买

用 Ct 值来计算转录水平的差异。

计算方法: $\Delta\Delta Ct = (Ct1 - Ct2) - (Ct3 - Ct4)$ Folds = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Ct1:处理样品待测基因的临界循环数

Ct2:处理样品持家基因的临界循环数

Ct3:对照样品待测基因的临界循环数

Ct4:对照样品持家基因的临界循环数

1.7 统计学分析

数据用均数 ± 标准差表示,用统计学软件 SPSS19.0 进行单因素方差分析,以及多样本均数的两两比较 LSD-t 检验统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著水平。

2 结果

2.1 Bederson 神经损伤评分

Bederson 评分, B (2.30±0.48)、C (2.2±0.63)、D (2.00±0.46) 组大鼠明显高于对照组 A 组 (0.00±0.00) ($P < 0.05$)。B、C、D 组间大鼠两两比较 Bederson 评分无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.2 HE 染色肌纤维横截面积

患侧骨骼肌 HE 染色显示 A (0.22±0.03)、B (0.22±0.03)、C (0.21±0.03) 三组肌纤维横截面积两两比较,差异无显著性意义 ($P > 0.05$); D (0.15±0.02) 组大鼠患侧骨骼肌肌纤维横截面积分别与其余三组相比,差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。

2.3 atrogin-1 mRNA 和 MuRF-1 mRNA 水平表达

B、C、D 组大鼠患侧 atrogin-1 和 MuRF-1 mRNA 的表达水平分别与对照组相比,差异均有显著性意义 ($P < 0.05$); B 组与 C 组相比较无显著差异 ($P > 0.05$); D 组大鼠分别与 B、C 组相比,差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 脑缺血再灌注损伤后大鼠患侧骨骼肌中 atrogin-1 mRNA 和 MuRF-1 mRNA 表达量的变化(倍数)

组别	A组	B组	C组	D组
Atrogin-1mRNA	1.07±0.23	1.85±0.43 ^①	1.89±0.51 ^①	2.67±0.66 ^{②③}
MuRF-1mRNA	1.05±0.30	1.84±0.47 ^①	1.88±0.45 ^①	2.58±0.51 ^{②③}

与对照组相比:①P<0.05,②P<0.01,与B、C组相比:③P<0.05

3 讨论

目前,对于脑卒中的研究更多地集中在对脑损伤的研究,对卒中后患侧骨骼肌变化的研究较少。脑卒中患者患侧骨骼肌不仅仅有中枢神经系统发生病理改变,同时还伴有外周骨骼肌的病理改变,如肌无力、肌痉挛等,这些骨骼肌的病理变化可能是导致肢体残疾的重要原因^[10]。

Arasaki K等^[11]研究发现脑卒中患者,骨骼肌适应性改变最早开始于卒中后4h,可能与骨骼肌内运动神经元突触传导突然终止有关。Dudley GA^[12]对脊髓损伤后骨骼肌的研究发现,脊髓损伤后6周内骨骼肌肌束丢失25%,atrogin-1和MuRF-1 mRNA在脊髓损伤后2—5d表达水平明显增加。McKenzie MJ等^[13]对慢性期的脑卒中患者患侧与健侧股外侧肌肌肉活检进行对照,发现患侧肌肉的116个基因表达发生显著改变,包括调节肌肉新陈代谢、收缩蛋白、细胞周期进程、有丝分裂、生长因子、细胞代谢、炎症和信号转导通路的基因表达的变化。Hafer-Macko CE等^[14]研究也发现脑卒中患者患侧骨骼肌中炎症因子TNF- α mRNA的表达水平明显增加。在脑卒中患者患侧骨骼肌的变化不仅有分子水平的变化,而且同时也伴有骨骼肌制动引起的一些废用性改变。郟淑燕等^[15]研究发现骨骼肌制动导致患侧肌肉血液供应的改变也可以导致骨骼肌的萎缩性改变。

临床研究发现,脑卒中患者患侧骨骼肌变化的病理生理机制有多种,包括患侧肌肉的运动神经元激活方式发生改变、肌痉挛、肌内脂肪含量增加、快肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)表型的转换、肌小节丢失等^[16—22]。Landin等^[22]用ATP酶染色发现患侧快肌纤维比例明显增加,骨骼肌多由无氧酵解提供能量,而健侧则由有氧呼吸提供能量。脑卒中患者多伴有骨骼肌废用、肌肉结构重塑、肌痉挛,从而导致骨骼肌的异常,如肌纤维类型改变,肌

萎缩、肌小节丢失等^[23—24]。Iversen E等^[25]用CT等成像技术也证实脑卒中后患侧骨骼肌萎缩,CT检查瘫痪侧腿部总的肌肉面积比非瘫痪侧减少20%,皮下脂肪量在瘫痪侧比非瘫痪侧增加。Charlene E等^[3]研究发现脑卒中患者患侧肢体长期制动往往会引起肌纤维横截面积的减小,MHCI mRNA表达水平降低,而MHCIIx mRNA的表达增加。

本研究通过对缺血再灌注损伤大鼠早期患侧骨骼肌在不同时间点的变化发现,Bederson评分的结果脑损伤后第1、3、7天大鼠的神经功能损伤与对照组比较并没有明显的恢复。通过对患侧骨骼肌纤维横截面积的观察发现,第1天和第3天组未发现变化,第7天组出现横截面积明显的缩小。与对照组相比,MACO大鼠第1天泛素连接atrogin-1mRNA和MuRF-1mRNA表达增加,在第7天时atrogin-1mRNA和MuRF-1mRNA的表达水平增加更明显。

本研究结果表明,在没有给予任何干预的条件下,MCAO大鼠的神经功能损伤并没有随着时间的变化而明显恢复。在MCAO大鼠第7天患侧骨骼肌横截面积明显减小,说明患侧骨骼肌可能已发生蛋白降解,这种变化可能与MCAO大鼠患肢活动减少导致的肌肉萎缩有关。这与我们发现的早期泛素连接酶atrogin-1 mRNA和MuRF-1 mRNA的表达增加是一致的。atrogin-1 mRNA和MuRF-1 mRNA的早期表达说明,在卒中早期骨骼肌中泛素连接酶蛋白降解通路可能已经被激活。atrogin-1 mRNA和MuRF-1 mRNA的表达增加可能是脑缺血再灌注损伤大鼠的应激反应、患侧肢体活动减少以及运动神经冲动减少等多种因素共同作用的结果。但是,atrogin-1 mRNA和MuRF-1是否在蛋白水平发生表达,仍需我们进一步研究。

通过动物实验证明,缺血再灌注损伤大鼠早期患侧骨骼肌可能已经发生有蛋白降解通路的激活。临床研究中,脑卒中患者患侧骨骼肌是否在早期也有蛋白降解通路的激活,从而导致肌肉的萎缩,仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] Gresham GE, Phillips TF, Wolf PA, et al. Epidemiologic profile of long-term stroke disability: The Framingham study

- [J]. Arch Phys Med Rehabilitation,1979,60(11):487—491.
- [2] 王华宁,黄永喜,黄真. 脑卒中康复训练—优化运动技巧的练习与训练指南[M]. 北京: 北京大学医学出版社,2007.162.
- [3] Hafer-Macko CE, Ryan AS, Ivey FM, et al. Skeletal muscle changes after hemiparetic stroke and potential beneficial effects of exercise intervention strategies[J]. J Rehabil Res Dev, 2008,45(2):261—272.
- [4] Sacherk JM, Hyatt JP, Raffaello A. Rapiel disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those muscle wasting during systemic disease[J]. FASEB J 2007,21(1):140—155.
- [5] 王慧,罗勇. Atrogin-1 和 MuRF-1 在肌肉萎缩中的作用机制及影响因素[J]. 实用医学杂志, 2012, 28: 11.
- [6] Koizumi JY, Nakazawa TO, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Jpn J Stroke, 1986, 8: 1—8.
- [7] Bederson JB, Pitts H, Tsujim M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of model and development of neurological examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472—476.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle artery occlusion without craniectomy in rat[J]. stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [9] 朱镛连. 脑的可塑性与神经康复[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38: 591—592.
- [10] Scherbakov N, Doehner W. Sarcopenia in stroke—facts and numbers on muscle loss accounting for disability after stroke[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2011, 2: 5—6.
- [11] Arasaki K, Igarashi O, Ichikawa Y, et al. Reduction in the motor unit number estimate (MUNE) after cerebral infarction[J]. J Neurol Sci, 2006, 250(1-2): 27—32.
- [12] Dudley GA, Castro MJ, Rogers S, et al. A simple means of increasing muscle size after spinal cord injury: a pilot study[J]. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1999, 80: 394—396.
- [13] McKenzie MJ, Yu S, Macko RF, et al. Human genome comparison of paretic and nonparetic vastus lateralis muscle in patients with hemiparetic stroke[J]. J Rehabil Res, 2008, 45(2): 273—281.
- [14] Hafer-Macko CE, Yu S, Ryan AS, et al. Elevated tumor necrosis factor-alpha in skeletal muscle after stroke[J]. 2005, 36(9): 2021—2023.
- [15] 鄢淑燕, 岳寿伟. 废用性肌萎缩研究进展[J]. 中国临床康复, 2003, 7(5): 710—714.
- [16] Blaak EE. Basic disturbances in skeletal muscle fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus[J]. Proc Nutr Soc, 2004, 63(2): 323—330.
- [17] De Deyne PG, Hafer-Macko CE, Ivey FM, et al. Muscle molecular phenotype after stroke is associated with gait speed[J]. Muscle Nerve, 2004, 30(2): 209—215.
- [18] Ivey FM, Ryan AS, Hafer-Macko CE, et al. High prevalence of abnormal glucose metabolism and poor sensitivity of fasting plasma glucose in the chronic phase of stroke [J]. Cerebrovasc, 2006, 22(5—6): 368—371.
- [19] Kernan WN, Inzucchi SE. Type 2 diabetes mellitus and insulin resistance: Stroke prevention and management[J]. Curr Treat Options Neurol, 2004, 6(6): 443—450.
- [20] Roth EJ. Heart disease in patients with stroke: Incidence, impact, and implications for rehabilitation. Part I: Classification and prevalence[J]. Arch Phys Med Rehabil, 1993, 74(7): 752—760.
- [21] Vermeer SE, Sandee W, Algra A, et al. Dutch TIA Trial Study Group. Impaired glucose tolerance increases stroke risk in nondiabetic patients with transient ischemic attack or minor ischemic stroke[J]. Stroke, 2006, 37(6): 1413—1417.
- [22] Landin S, Hagenfeldt L, Saltin B, et al. Muscle metabolism during exercise in hemiparetic patients[J]. Clin Sci Mol Med, 1977, 53(3): 257—269.
- [23] Jørgensen L, Jacobsen BK. Changes in Muscle Mass, Fat Mass, and Bone Mineral Content in the Legs After Stroke: A 1 Year Prospective Study[J]. Bone, 2001, 28(6): 655—659.
- [24] Snow LM, Low WC, Thompsn LV. Skeletal Muscle Plasticity After Hemorrhagic Stroke in Rats[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2012, 91(11): 965—976.
- [25] Iversen E, Hassager C, Christiansen C. The effect of hemiplegia on bone mass and soft tissue body composition[J]. Acta Neurologica Scandinavica, 1989, 79: 155—159.