·基础研究·

离心跑台运动对小鼠骨骼肌炎性因子、肌再生因子及血管再生因子表达的影响*

刘晓光[1] 陈佩杰[1] 郑莉芳[1] 周永战[1] 赵淋淋[1] 曾志刚[1,2] 肖卫华[1,3]

摘要

目的:观察小鼠离心运动后骨骼肌炎性因子、肌再生因子以及血管再生因子的表达变化,探讨其在离心运动骨骼肌损伤修复中可能发挥的作用。

方法:32只雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组(C组,n=8)和离心运动组(D组,n=24)。根据取材时间,离心运动组又分为3个小组(运动后1d,3d和7d组)。离心运动后不同时间点取双侧腓肠肌。HE染色观察骨骼肌形态学变化,比色法检测血浆肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性,荧光定量PCR检测炎性因子、肌再生因子及血管再生因子基因表达的变化。

结果:小鼠下坡跑后骨骼肌纤维结构无明显破坏,无显著炎性细胞浸润。与对照相比,血浆CK和LDH活性在运动后各时间点均无显著变化($P>0.05$)。从基因层面看,炎性细胞标志物(MPO—嗜中性粒细胞标志物;F4/80—巨噬细胞标志物)在下坡跑后显著上升。部分炎症因子(如肿瘤坏死因子-α、白介素-1β、白介素-6)在下坡跑后显著上调。而肌再生调节因子中,只有机械生长因子和白血病抑制因子在运动后出现显著上调。而肌再生关键细胞——肌卫星细胞的特异性标记分子(分子标志—Pax7,增殖标记—MyoD,分化标记—myogenin)在离心运动后未出现显著变化($P>0.05$)。此外,其他与肌肉和血管再生密切相关的再生因子(如:胰岛素样生长因子1、肝细胞生长因子、尿激酶型纤溶酶原激活物、环氧合酶2、低氧诱导因子-1α、血管内皮生长因子、血管生成素1等)在离心运动后均未见显著变化($P>0.05$)。

结论:从形态学表现、血清指标和基因表达综合来看,离心跑台运动并非小鼠骨骼肌损伤建模的理想方式。

关键词 离心跑台运动;骨骼肌;炎性因子;肌再生因子;血管再生因子

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-11-1220-07

Effects of eccentric treadmill exercise on the expression of inflammatory factors, regulatory factors involved in muscle regeneration and angiogenesis factors in mouse skeletal muscle/LIU Xiaoguang, CHEN Peijie, ZHENG Lifang, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(11): 1220—1226

Abstract

Objective: To confirm the role of inflammatory factors, regulatory factors involved in muscle regeneration and angiogenesis factors in skeletal muscle repair after eccentric exercise-induced skeletal muscle injury by investigating the expression changes.

Method: Totally 32 mice were used in this study. Eight of them were randomly chosen for the control group, the rest was subjected to eccentric treadmill exercise. Subsequently, their gastrocnemius muscles were harvested at 1d, 3d and 7d after downhill running. Hematoxylin and eosin (HE) stain was used to assess the changes of muscle morphology, and the colorimetric method was used to assesse the activity of CK and LDH. In addi-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.11.003

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(31300975;31271273);教育部博士点基金项目(20133156120004);上海市人类运动能力开发与保障重点实验室(上海体育学院)资助项目(11DZ2261100)

1 上海体育学院运动科学学院,上海,200438; 2 井冈山大学体育学院; 3 通讯作者

作者简介:刘晓光,男,硕士研究生; 收稿日期:2016-10-02

tion, the gene expression of inflammatory factors, muscle regeneration regulatory factors and angiogenesis factors was analyzed by real-time polymerase chain reaction.

Result: Morphology of skeletal muscles showed no signs of damage of myofiber structure and no inflammatory cell infiltration after downhill running. The activity of CK and LDH had no obvious change at the time point of 1d, 3d and 7d post-exercise ($P > 0.05$). The data showed that the expression level of neutrophils and macrophages increased significantly after eccentric exercise. In addition, as compared to the control group, eccentric treadmill exercise significantly increased IL-6, TNF-α and IL-1β mRNA levels after exercise ($P < 0.01$). Besides, eccentric treadmill exercise significantly increased MGF and LIF mRNA levels as compared to the control group. However, Pax7, MyoD, myogenin, IGF-1, HGF, uPA, COX-2 mRNA levels did not significantly change from the control group at all time points, and the angiogenesis factors (HIF-1α, VEGF, Angpt1) did not significantly change from the control group at all time points post exercise.

Conclusion: The eccentric treadmill exercise may not be an ideal way to make a skeletal muscle injury model from the point of morphological, serum and mRNA expression.

Author's address School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai, 200438

Key word eccentric treadmill exercise; skeletal muscle; inflammatory factors; muscle regeneration regulatory factors; angiogenesis factors

骨骼肌损伤是常见的软组织损伤,在运动训练和体育训练中频繁出现。大量研究证实,长时间运动,尤其是离心运动可造成运动性骨骼肌损伤,表现为运动后肌肉疼痛以及运动表现下降等[1—2]。骨骼肌具有较强的修复能力,而这种修复能力主要依靠于肌卫星细胞。骨骼肌损伤后,卫星细胞被激活,然后增殖、分化,与残存肌管融合,修复损伤骨骼肌[3—4]。骨骼肌损伤后再生是一个复杂的过程,不仅需要肌卫星细胞,还需各种炎症因子、肌再生因子(muscle regeneration regulatory factors)和血管再生因子(angiogenesis factors)等的相互协调配合,才能较好完成骨骼肌损伤后修复过程[5]。嗜中性粒细胞、巨噬细胞、炎性因子、肌再生因子以及血管再生因子均在骨骼肌损伤修复过程中发挥重要作用。但目前,对离心运动骨骼肌损伤的研究主要集中在药物干预促进损伤修复,以及离心运动骨骼肌损伤后某个因子的表达,缺乏离心运动骨骼肌损伤后的系统性研究。因此,我们建立小鼠下坡跑离心运动骨骼肌损伤模型,探究骨骼肌离心运动损伤后不同时间点炎症因子、肌再生因子和血管再生因子的表达规律,以深入了解离心运动骨骼肌损伤修复机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

9—10周龄健康雄性C57BL/6小鼠32只(清洁级),体重22.1—26.0g,购自第二军医大学实验动物中心,SYXK(沪)2013—0016。常规分笼饲养,每笼8只。饲养环境为21—25℃,湿度40%—50%,12h光照/12h黑暗,自由饮食。适应性喂养1周后,随机选取8只作为对照组(C组),余下进行下坡跑运动,分为运动后1d(D1)组、3d(D3)组和7d(D7)组,每组8只。

1.2 小鼠下坡跑模型

小鼠下坡跑模型参照Kawanishi等[2,6]制作动物模型的方法。正式实验前3天,小鼠进行10min的跑台运动,以熟悉跑台,开始速度为5m/min,随后逐渐增加到20m/min持续10min,跑台坡度为0°。正式实验时,跑台速度为22m/min,坡度为-15%,持续时间为150min。

1.3 动物取材

对下坡跑后不同时间点(1d、3d、7d)小鼠取材,摘眼球取血后颈椎脱位处死小鼠,迅速取双侧受损腓肠肌,对照组取相同部位腓肠肌。

1.4 HE染色

骨骼肌经4%多聚甲醛固定6h后,PBS洗3遍,30%蔗糖(4%多聚甲醛配制)脱水至组织沉底(4℃过夜),用OCT包埋剂包埋后,经液氮骤冷,放于-80℃冰箱保存。解冻至-30℃左右,冰冻切片机横切10μm厚的薄片。切片于室温晾干15—30min后,用冷丙酮(或4%多聚甲醛)固定15min。晾干后,用

苏木精染色，1%盐酸—酒精分化，之后用伊红染色，用梯度酒精脱水，经二甲苯透明，中性树胶封片后，于光学显微镜（Olymps DX70）下观察并拍摄。

1.5 小鼠血浆肌酸激酶及乳酸脱氢酶活性的测定

对照组小鼠及下坡跑后第1d、3d和7d组小鼠，摘眼球取血置于含有肝素钠的EP管中，静置30min后，4℃ 3500r/min离心15min，取上清。通过比色法分别检测血浆肌酸激酶（creatine kinase, CK）和乳酸脱氢酶活性（lactic dehydrogenase, LDH）（试剂盒均购买于南京建成生物工程研究所）。

1.6 RNA抽提和cDNA合成

于腓肠肌肌腹中点处剪取约60mg组织，剪碎后加入1ml Trizol（Invitrogen公司），用超声机械匀浆器（IKA，德国）粉碎匀浆。静置10min后，加入200ml氯仿并上下颠倒充分混匀后，静置5min使明显分层，4℃ 12000r/min离心15min后小心吸取500ml上清放入一新离心管中，加入等量异丙醇，颠倒混匀并静置20min。4℃ 12000r/min离心10min后，白色沉淀即为RNA，75%酒精洗涤2次后，加入30μl DEPC水溶解。测OD值，OD260/280为1.8—2.0的样品可用。取2μg总RNA，按Fermentas公司第一链cDNA合成试剂盒说明加0.2μg随机引物，20mM dNTP mix，5×Reaction buffer，20U RiboLockTM RNase Inhibitor 200U of RevertaidTM M-MuLV Reverse Transcriptase总体积是20μl。在梯度PCR仪（Mastercycler EP，德国Eppendorf公司）进行反转录。反应过程中的温度控制是25℃ 5min，42℃ 60min，70℃ 5min，然后温度降低到4℃，cDNA合成完成。合成的cDNA储存在-20℃冰箱备用[7—8]。

1.7 荧光定量PCR

荧光定量PCR反应体系包括12.5μl 2×Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix（Thermo Scientific），1μl cDNA，无核酸酶水和300nM的上下游引物。引物来自文献或生工生物工程（上海）股份有限公司合成，见表1。使用荧光定量PCR仪（Step One Plus实时荧光定量PCR系统，Thermo Fisher，USA）进行扩增。反应条件为：预变性95℃ 10min，95℃变性15s，60℃ 1min退火/延伸，40个循环。通过$2^{-\Delta\Delta CT}$方法计算所测样本mRNA的相对含

表1 荧光定量PCR引物序列

靶基因	正向引物序列	反向引物序列
Pax7	5'-CTCAGTGAGTTCGATTAGCCG-3'	5'-AGACGGTTCCCTTTGTCGC-3'
MyoD	5'-GAGCGCATCTCCACAGACAG-3'	5'-AAATCGCATTGGGGTTTGAG-3'
myogenin	5'-CCAGTACATTGAGCGCCTAC-3'	5'-ACCGAACTCCAGTGCATTGC-3'
HGF	5'-AGGAACAGGGGCTTTACGTT-3'	5'-GCTGCCTCCTTTACCAATGA-3'
uPA	5'-AGTGTGGCCAGAAGGCTCTA-3'	5'-GCTGCTCCACCTCAAACTTC-3'
COX-2	5'-TGAGTACCGCAAACGCTTCTC-3'	5'-TGGACGAGGTTTTTCCACCAG-3'
IGF-1	5'-GCTTGCTCACCTTTACCAGC-3'	5'-AAATGTACTTCCTTCTGGGTCT-3'
MGF	5'-GCTTGCTCACCTTTACCAGC-3'	5'-AAATGTACTTCCTTTCCTTCTC-3'
LIF	5'-GGGATTGTGCCCTTACTGCT-3'	5'-ATGAAGAGAGCATTGGCGCT-3'
Myostain	5'-TGCAAAATTGGCTCAAACAG-3'	5'-GCAGTCAAGCCCAAAGTCTC-3'
MPO	5'-CTGAATCTGTTGTCCGTGTCA-3'	5'-GTGATGGTGCGATACTTGTCAT-3'
F4/80	5'-AACATGCAACCTGCCACAAC-3'	5'-TTCACAGGATTCGTCCAGGC-3'
Arg1	5'-ACATTGGCTTGCGAGACGTA-3'	5'-ACTACCTTGCCAATCCCCAG-3'
iNOS	5'-CTGCAGCACTTGGATCAG-3'	5'-CGTACCAGGCCCAATGAG-3'
TGF-beta1	5'-TGCGCTTGCAGAGATTAAAA-3'	5'-CGTCAAAAGACAGCCACTCA-3'
TNF-alpha	5'-CTTCTGTCTACTGAACTTCGGG-3'	5'-CACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
IL-1beta	5'-TGACGTTCCCATTAGACAACTG-3'	5'-CCGTCTTTCATTACACAGGACA-3'
IFN-gama	5'-GCTTTGCAGCTCTTCCTCAT-3'	5'-GTCACCATCCTTTTGCCAGT-3'
IL-6	5'-GAACAACGATGATGCACTTGC-3'	5'-CTTCATGTACTCCAGGTAGCTATGGT-3'
IL-10	5'-CAAGGAGCATTTGAATTCCC-3'	5'-GGCCTTGTAGACACCTTGGTC-3'
gp91phox	5'-CCAGTGAAGATGTGTTCAGCT-3'	5'-GCACAGCCAGTAGAAGTAGAT-3'
HIF-1alpha	5'-GGCGAGAACGAGAAGAAAAAGATGA-3'	5'-GCTCACATTGTGGGGAAGTGG-3'
VEGF	5'-TAACAGTGAAGCCCTGGAGTG-3'	5'-TTTGACCCTTTCCCTTTCCTCG-3'
Angpt1	5'-AACCGGATTCAACATGGGCA-3'	5'-GAGCGTTGGTGTTGTACTGC-3'
GAPDH	5'-ACTCCACTCACGGCAAATTC-3'	5'-TCTCCATGGTGGTGAAGACA-3'

量[9—10]。

1.8 统计学分析

实验数据采用SPSS 20.0软件处理,结果以均数±标准差表示。单因素ANOVA和LSD事后检验。

2 结果

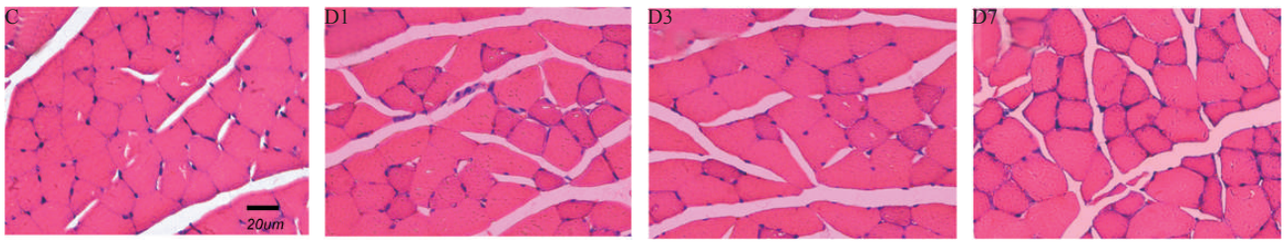
2.1 下坡跑对骨骼肌形态的影响

HE染色结果显示,对照组及下坡跑后第1d、3d和7d组骨骼肌肌纤维结构完整,形态规则,排列紧密,胞质呈粉红色,细胞核分布在肌膜下,呈圆形或卵圆形,未见炎性细胞浸润及坏死肌纤维。见图1。

2.2 下坡跑对骨骼肌CK和LDH活性的影响

小鼠下坡跑后第1d、3d和7d组与对照组相比,血浆CK和LDH活性无显著变化。见表2。

图1 各组腓肠肌形态学变化横切 (HE染色,×400)



注:C:对照组;D1:下坡跑后第1天取材组;D3:下坡跑后第3天取材组;D7下坡跑后第7天取材组

表2 小鼠下坡跑后不同时间点血浆CK和LDH活性的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	CK(U/L)	LDH(U/L)
对照组	1397.73±197.77	2.94±0.21
运动后1天组	1312.07±425.29	2.69±0.35
运动后3天组	1529.96±413.36	2.43±0.42
运动后7天组	1820.47±348.44	2.89±0.39

2.3 下坡跑对骨骼肌炎症因子表达的影响

荧光定量PCR分析显示,与对照组相比,髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)(嗜中性白细胞标志物)mRNA在下坡跑后第3天(3.18倍, P=0.003)和第7天(3.79倍, P=0.001)显著增加;F4/80(巨噬细胞标记物)mRNA在运动后第7天表达量显著增加;TNF-α mRNA在下坡跑后第7天(2.70倍, P=0.003)显著增加;IL-1β mRNA在下坡跑后第3天($P<0.05$)与第7天($P<0.01$)均显著增加;IL-6 mRNA在运动后第3天(2.41倍, P=0.005)和第7天(2.63倍, P=0.002)表达均显著增加。而TGF-β1,IFN-γ,IL-10 mRNA在下坡跑后各时间点均无显著变化。见表3。

2.4 下坡跑对骨骼肌关键再生因子表达的影响

荧光定量PCR结果显示,与对照组相比,小鼠下坡跑后各时间点Pax7(肌卫星细胞标志物)、MyoD(卫星细胞增殖标志物)、myogenin(卫星细胞分化标志物)mRNA均无显著变化。而机械生长因子(mechano growth factor, MGF)mRNA在运动后第1天显著增加($P<0.05$)。此外,白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)mRNA在运动后第1天表达量显著降低($P<0.05$),第3天表达量显著增加($P<0.05$)。其他一些关键肌再生因子,如肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF),尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA),环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2),胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)以及肌肉生长抑制素(myostain, MSTN)mRNA在下坡跑后各时间点均无显著变化。见表4。

2.5 下坡跑对骨骼肌血管再生因子表达的影响

荧光定量PCR结果显示,与对照组相比,骨骼肌中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、低氧诱导因子1α(hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)和血管生成素1(angiopoietin-1, Ang-1)mRNA的表达和部分肌关键再生因子表达相似,在下坡跑后各时间点均无显著变化。见表5。

3 讨论

有研究报道称,大鼠离心运动后骨骼肌超微结构发生损伤,电镜下可观察到肌原纤维排列不规则,

表3 小鼠下坡跑后不同时间点炎症细胞及炎性细胞因子mRNA相对表达变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	MPO	F4/80	TGF-β1	TNF-α	IFN-γ	IL-1β	IL-6	IL-10
对照组	1.00±0.47	1.00±0.49	1.00±1.28	1.00±0.86	1.00±0.61	1.00±0.57	1.00±0.69	1.00±0.59
运动后1天组	1.03±0.52	0.96±0.26	0.69±0.38	0.77±0.59	0.93±0.46	1.47±0.65	1.59±0.76	0.87±0.84
运动后3天组	3.18±1.85②	1.35±0.41	0.72±0.42	1.08±0.51	1.83±1.32	2.20±1.61	2.41±1.10②	0.45±0.14
运动后7天组	3.79±2.16②	1.57±0.56①	0.64±0.39	2.70±1.67②	1.23±0.58	4.22±2.18②	2.63±0.74②	1.09±0.92

与对照组相比：①$P<0.05$；②$P<0.01$

表4 小鼠下坡跑后不同时间点肌再生因子mRNA相对表达变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	Pax7	MyoD	myogenin	HGF	uPA	COX-2	IGF-1	MGF	myostain	LIF
对照组	1.00±0.33	1.00±0.60	1.00±0.59	1.00±0.56	1.00±0.54	1.00±0.50	1.00±0.45	1.00±0.31	1.00±0.45	1.00±0.16
运动后1天组	1.06±0.32	0.68±0.23	0.98±0.47	1.08±0.33	0.92±0.34	0.96±0.56	1.07±0.61	2.33±1.47①	1.18±0.36	0.68±0.19①
运动后3天组	1.41±0.24	0.98±0.41	1.05±0.40	0.94±0.25	0.93±0.30	1.39±0.59	0.75±0.28	1.43±0.80	1.03±0.29	1.47±0.47①
运动后7天组	0.99±0.34	0.64±0.36	0.79±0.19	1.48±1.08	1.01±0.50	1.45±1.01	1.16±0.53	2.07±1.08	0.97±0.34	1.38±0.48

与对照组相比：①$P<0.05$

表5 小鼠下坡跑后不同时间点血管再生因子mRNA相对表达变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	VEGF	HIF-1α	Angpt1
对照组	1.00±0.67	1.00±0.60	1.00±0.79
运动后1天组	0.96±0.35	1.38±0.96	0.77±0.45
运动后3天组	1.38±0.87	1.67±1.03	1.23±0.68
运动后7天组	1.68±1.66	1.37±0.75	0.94±0.45

肌丝排列混杂、卷曲，Z线排列不规则，呈锯齿状，可见Z线流，T小管和肌浆网模糊不清[11—12]。但本实验HE染色结果显示，小鼠离心运动后骨骼肌形态规则，肌膜完整性较好，未见代表骨骼肌损伤的常见指标的出现，如多核炎性细胞浸润、肌纤维肿胀、肥大以及表示再生肌纤维的中央成核肌纤维的出现[5,13]。造成这种差异的原因可能是，离心运动可造成骨骼肌微小损伤，可通过电镜下观察到超微结构的损伤，但在普通光学显微镜下无法观察到这种超微结构的变化。

血液中的CK主要来自于骨骼肌，但含量很低，大强度运动，特别是可导致骨骼肌结构和功能损伤的大强度离心运动后，细胞中CK进入血液，血液CK活性增加，故将CK作为骨骼肌损伤的一个间接指标[14—15]。当组织结构被破坏时，LDH从组织细胞浸润到血液，会导致血液LDH活性升高[16—17]。如Armstrong等[16]发现，大鼠下坡跑台运动后即刻血浆LDH活性显著增加并达到峰值，之后逐渐降低。但本实验研究发现，血浆CK和LDH活性在小鼠下坡跑后不同时间点与对照组相比，均未出现显著性变化。此结果和Schwane等[18]相似，他们发现，健康成年男性下坡跑后与运动前相比血浆LDH活性无显著性变化。分析其原因可能是，实验所用对象不同，运动强度较小而造成的骨骼肌损伤程度较轻等。

骨骼肌损伤后，中性粒细胞和巨噬细胞浸润，清除受损肌纤维碎片及分泌一些炎症因子，加重机体炎症反应[19]。本实验RT-PCR结果发现，小鼠下坡跑后MPO在运动后第3天表达量显著增加，随后巨噬细胞标志物（F4/80）浸润增多。此时，促炎细胞因子TNF-α、IL-6和IL-1β表达量均显著增加。此结果和Peake等[20]所报道的相似。他们发现，离心运动骨骼肌损伤后，中性粒细胞最先浸润到损伤组织，随后巨噬细胞浸润。同时，中性粒细胞和巨噬细胞可通过释放活性氧族和氮族类物质促进坏死肌纤维降解，也可通过调节炎症因子的表达参与骨骼肌损伤修复的调节。如促炎细胞因子TNF-α，IL-6和IL-1β在运动后显著增加可促进坏死肌纤维的降解[20—21]。与之不同的是，本实验中促炎细胞因子TGF-β1，IFN-γ以及抑炎细胞因子IL-10在离心运动后小鼠和对照组相比并无显著差异。本课题组前期研究发现，骨骼肌严重损伤（如钝挫伤）后，促炎细胞因子TNF-α，IL-6，IL-1β，TGF-β1，IFN-γ以及抑炎细胞因子IL-10表达量均显著增加[13,22]。提示小鼠下坡跑台运动对骨骼肌损伤程度较小，因而炎症反应较弱。

骨骼肌损伤后往往能进行自我修复，而这种修复能力更依赖于骨骼肌卫星细胞[4,23—24]。骨骼肌损伤后，肌卫星细胞激活、增殖、分化并与残存肌管融合，促进损伤骨骼肌修复[3]。此外，HGF[25]，IGF-1[26]，MGF[27]，uPA[28]，COX-2[29]，LIF[30]等均作为骨骼肌再生正向调控因子，在损伤骨骼肌高丰度表达，且在其

损伤后修复过程中发挥重要作用。而MSTN作为骨骼肌生长和再生的负向调控因子,外源性补充MSTN可抑制骨骼肌生长和损伤后再生[31]。本实验发现,小鼠下坡跑后第1天MGF mRNA表达量显著增加。此研究和Roschel等[32]相似,他们发现人离心运动后2h骨骼肌中MGF mRNA表达量和运动前相比显著增加。同时,本实验还发现,LIF mRNA在小鼠下坡跑后第3天表达量显著增加。此前,有研究报道称,60%最大摄氧量的自行车运动3h后LIF mRNA表达量显著增加[33],大鼠骨骼肌钝挫伤后LIF mRNA的表达量也显著增加[30]。这些结果提示,MGF和LIF可能在骨骼肌损伤修复过程中发挥重要作用,但其具体作用还需进一步研究分析。本实验还研究其他一些肌再生因子,如HGF,uPA,COX-2,MSTN和IGF-1。结果发现,小鼠下坡跑后不同时间点HGF,uPA,COX-2,MSTN和IGF-1 mRNA与对照组相比均无显著变化。同时,Pax7,MyoD,myogenin在运动后不同时间点与对照组相比均无显著差异。同时,本课题组及其他研究者发现骨骼肌严重损伤后上述肌再生调节因子以及肌卫星标志物均显著上调表达[34—35]。但在本实验中,肌关键再生因子(Pax7,MyoD,myogenin,IGF-1,HGF,uPA,COX-2)在离心运动后各时间点与对照组相比均无显著差异,究其原因,可能是本次实验的运动强度和下坡跑坡度较小,小鼠骨骼损伤程度较轻。

骨骼肌损伤后通常局部血管也会损伤,血管损伤会造成损伤部位的低氧环境,而低氧环境会诱导HIF-1α上调表达[36—37]。VEGF作为HIF-1α的靶基因之一,能被HIF-1α诱导而转录激活[38]。VEGF不仅可促进血管内皮细胞分裂、诱导血管发生、增加血管通透性[39],还可促进成肌细胞迁移,抑制其凋亡[40]。Ang-1除作为重要的血管再生因子外[41],还可直接作用骨骼肌细胞,可促进成肌细胞存活、增殖和分化成肌管[41]。已有研究发现,与肌再生相关的血管再生因子(HIF-1α,VEGF,Angpt1)在骨骼肌损伤后表达量显著增加。如Mofarrahi等[42]发现,心脏毒素注射致伤胫骨前肌后第7天和第14天Ang-1 mRNA表达量与对照组均显著增加;Wagatsuma等[43]发现,小鼠腓肠肌冻伤后第1天和第3天VEGF mRNA表达量均显著增加。与上述研究相似,本课题组在前期实验中也发现,骨骼肌钝挫伤后与肌再生相关的血管再生因子HIF-1α和Ang-1 mRNA与对照组相比均显著增加[44]。但在本实验中,与肌再生相关的血管再生因子在小鼠下坡跑后与对照组相比各时间点均未出现显著变化。其原因可能是本实验采用的是下坡跑运动模型,相对于毒素注射肌肉损伤、顿挫伤及冻伤等动物模型来说,损伤程度较小,因而导致这些因子的表达量较低。

综上所述,从形态学表现、血清指标和基因表达综合来看,离心跑台运动并非小鼠骨骼肌损伤建模的理想方式。

参考文献

[1] Armstrong RB. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review[J]. Med Sci Sports Exerc, 1984, 16(6):529—538.

[2] Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, et al. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 292(6):R2168—2173.

[3] 刘晓光,肖卫华,赵淋淋,等.间充质干细胞移植治疗骨骼肌损伤的研究进展[J].中国康复医学杂志,2015,30(12):1313—1317.

[4] Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage[J]. Development, 2012, 139(16):2845—2856.

[5] Tidball JG. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration[J]. Compr Physiol, 2011, 1(4):2029—2062.

[6] Kawanishi N, Kato K, Takahashi M, et al. Curcumin attenuates oxidative stress following downhill running-induced muscle damage[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(3):573—578.

[7] Xiao W, Chen P, Liu X, et al. The impaired function of macrophages induced by strenuous exercise cnould not be ameliorated by BCAA Supplementation[J]. Nutrients, 2015, 7(10):8645—8656.

[8] Xiao W, Chen P, Dong J, et al. Dietary glutamine supplementation partly reverses impaired macrophage function resulting from overload training in rats[J]. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2015, 25(2):179—187.

[9] 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.

[10] Xiao W, Chen P, Dong J. Effects of overtraining on skeletal muscle growth and gene expression[J]. Int J Sports Med, 2012, 33(10):846—853.

[11] 金其贯,刘霞,李淑艳,等.急性离心运动后骨骼肌超微结构、钙依赖性蛋白酶和泛素的动态变化[J].中国运动医学杂志,2011,

30(08):724—728.

[12] 张海平,宋吉锐.一次力竭性离心运动对大鼠肱三头肌超微结构的影响[J].上海体育学院学报,2008,32(5):44—53.

[13] Xiao W, Liu Y, Luo B, et al. Time-dependent gene expression analysis after mouse skeletal muscle contusion [J]. Journal of Sport and Health Science, 2016, 5(1): 101—108.

[14] McNeil PL, Khakee R. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise- induced damage[J]. Am J Pathol, 1992, 140(5):1097—1109.

[15] Clarkson PM, Nosaka K, Braun B. Muscle function after exercise- induced muscle damage and rapid adaptation[J]. Med Sci Sports Exerc, 1992, 24(5):512—520.

[16] 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.

[17] 宋卫红,汤长发,梁小文,等.运动性骨骼肌损伤相关指标的实验研究[J].首都体育学院学报,2011,23(2):184—192.

[18] Schwane JA, Johnson SR, Vandenakker CB, et al. Delayed-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running[J]. Med Sci Sports Exerc, 1983, 15(1):51—56.

[19] 肖卫华,陈佩杰,刘宇.巨噬细胞在骨骼肌急性损伤修复中的作用研究进展[J].中国运动医学杂志,2014,33(3):269—274.

[20] Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans[J]. Exerc Immunol Rev, 2005, (11):64—85.

[21] Chiang J, Shen YC, Wang YH, et al. Honokiol protects rats against eccentric exercise-induced skeletal muscle damage by inhibiting NF-kappaB induced oxidative stress and inflammation[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 610(1—3):119—127.

[22] Xiao W, Liu Y, Chen P. Macrophage Depletion Impairs Skeletal Muscle Regeneration: the Roles of Pro-fibrotic Factors, Inflammation, and Oxidative Stress[J]. Inflammation, 2016, 39(6):2016—2028.

[23] Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology[J]. J Appl Physiol, 2001, 91(2):534—551.

[24] 刘晓光,肖卫华,赵淋淋,等.脂肪来源干细胞移植治疗骨骼肌损伤和萎缩的研究进展[J].中国康复医学杂志,2016,(9):1040—1043.

[25] Grasman JM, Do DM, Page RL, et al. Rapid release of growth factors regenerates force output in volumetric muscle loss injuries[J]. Biomaterials, 2015, (72):49—60.

[26] 刘晓光,徐苗苗,陈佩杰,等.IGF-1在治疗骨骼肌损伤中的应用潜能及其相关机制[J].生命的化学,2016,36(4):496—502.

[27] Dai Z, Wu F, Yeung EW, et al. IGF-IEc expression, regulation and biological function in different tissues[J]. Growth Horm IGF Res, 2010, 20(4):275—281.

[28] Novak ML, Bryer SC, Cheng M, et al. Macrophage-specific expression of urokinase-type plasminogen activator promotes skeletal muscle regeneration[J]. J Immunol, 2011, 187(3):1448—1457.

[29] Shen W, Li Y, Zhu J, et al. Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury[J]. J Cell Physiol, 2008, 214(2):405—412.

[30] 刘晓光,赵淋淋,陈佩杰,等.白血病抑制因子在骨骼肌损伤与肥大中的作用及其机制[J].生命的化学,2016,36(02):198—202.

[31] Wagner KR. Muscle regeneration through myostatin inhibition[J]. Curr Opin Rheumatol, 2005, 17(6):720—724.

[32] Roschel H, Ugrinowistch C, Barroso R, et al. Effect of eccentric exercise velocity on akt/mtor/p70(s6k) signaling in human skeletal muscle[J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2011, 36(2):283—290.

[33] Broholm C, Mortensen OH, Nielsen S, et al. Exercise induces expression of leukaemia inhibitory factor in human skeletal muscle[J]. J Physiol, 2008, 586(8):2195—2201.

[34] Liu X, Liu Y, Zhao L, et al. Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: The roles of regulatory factors for muscle regeneration[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(3):228—238.

[35] Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(21):4117—4130.

[36] Dehne N, Kerkweg U, Flohé SB, et al. Activation of hypoxia-inducible factor 1 in skeletal muscle cells after exposure to damaged muscle cell debris[J]. Shock, 2011, 35(6):632—638.

[37] Scheerer N, Dehne N, Stockmann C, et al. Myeloid hypoxia-inducible factor-1α is essential for skeletal muscle regeneration in mice[J]. J Immunol, 2013, 191(1):407—414.

[38] Breen E, Tang K, Olfert M, et al. Skeletal muscle capillarity during hypoxia: VEGF and its activation[J]. High Alt Med Biol, 2008, 9(2):158—166.

[39] Giacca M, Zacchigna S. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond[J]. Gene Ther, 2012, 19(6):622—629.

[40] Germani A, Di Carlo A, Mangoni A, et al. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function [J]. Am J Pathol, 2003, 163(4):1417—1428.

[41] Lee EH, Woo JS, Hwang JH, et al. Angiopoietin 1 enhances the proliferation and differentiation of skeletal myoblasts [J]. J Cell Physiol, 2013, 228(5):1038—1044.

[42] Mofarrahi M, McClung JM, Kontos CD, et al. Angiopoietin-1 enhances skeletal muscle regeneration in mice[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2015, 308(7):R576—589.

[43] Wagatsuma A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 298(1—2):151—159.

[44] 刘晓光,赵淋淋,曾志刚,等.骨骼肌损伤修复过程中肌再生调节因子和血管再生因子表达规律研究[J].中国康复医学杂志,2016,31(12):1294—1300.