

电针对去神经支配骨骼肌萎缩大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响*

高睿琦¹ 唐成林^{1,2} 曹净¹ 郭全虎¹ 赵丹丹¹ 罗翱¹ 张安宁¹ 黄思琴¹

摘要

目的:研究电针对去神经支配骨骼肌萎缩大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响,探讨电针延缓去神经支配骨骼肌萎缩的治疗机制。

方法:SD雄性大鼠63只随机分为假手术组(n=21)、模型组(n=21)和电针组(n=21)。模型组、电针组通过暴露并切断坐骨神经的方法制作去神经支配腓肠肌动物模型,假手术组暴露坐骨神经但不切断。术后1d,电针组术侧进行电针治疗,其余两组不做任何处理。分别在术后7d、14d和21d取材,测定术侧腓肠肌湿重比,Masson染色测定腓肠肌纤维直径、截面积,Western Blot检测PI3K、Akt以及mTOR蛋白表达、Akt以及mTOR蛋白磷酸化,PCR检测PI3K、Akt和mTOR基因表达。

结果:模型组与电针组大鼠腓肠肌的湿重比、肌纤维截直径以及面积均显著低于假手术组($P<0.001$),且模型组与电针组比较,差异具有显著性($P<0.05$);电针组的PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达量均高于模型组与假手术组($P<0.05$);电针组的PI3K、Akt、mTOR mRNA表达也明显高于其余两组($P<0.05$)。

结论:电针可延缓去神经性骨骼肌萎缩,其作用机制可能与电针激活PI3K/Akt/mTOR信号通路有关。

关键词 电针;肌萎缩;PI3K/Akt/mTOR信号通路

中图分类号:R245,R746.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2018)-01-015-07

Effects of electroacupuncture on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in denervated skeletal muscle atrophy in rats/GAO Ruiqi,TANG Chenglin, CAO Jing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(1): 15—21

Abstract

Objective: To investigate the effects of electroacupuncture on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in denervated skeletal muscle atrophy in rats, and the mechanism of retarding the denervated skeletal muscle atrophy.

Method: Totally 63 male SD rats were randomized to 3 groups(n=21 in each): control group, model group, EA group. model group and EA group were exposed and transected the rat sciatic nerve to build the model of denervated skeletal muscle atrophy. control group was exposed sciatic nerve only and not transected. Electroacupuncture was given to rats in EA group on the operation side 1d after modeling. While no any treatment were given to the other two groups. 3 groups were divided randomly into three subgroups on 7, 14, 21 days post operation. The muscle wet weight ratio of the operational side gastrocnemius were measured. Fiber diameter and cross-sectional area of the operational side gastrocnemius were determined by Masson staining. PI3K, Akt and mTOR protein expression and gene expression were detected by Western Blot and RT-PCR. The phosphorylation level of Akt and mTOR were observed by Western Blot.

Result: The wet weight ratio, fiber diameter and cross-sectional area were significantly lower in model group

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.01.004

*基金项目:国家自然科学基金项目(81273870);重庆卫计委中医药科研项目(ZY20150249)

1 重庆医科大学中医药学院,重庆,400016; 2 通讯作者

作者简介:高睿琦,女,硕士研究生; 收稿日期:2016-09-25

and EA group than those in control group($P<0.001$), and the wet weight ratio, fiber diameter and cross-sectional area were observably higher in EA group than those in model group ($P<0.05$). Comparing to model group and control group, the protein expression of PI3K, p-Akt and p-mTOR in EA group were higher markedly($P<0.05$). And the gene expression of PI3K, Akt and mTOR were more higher in EA group than the other two groups ($P<0.05$).

Conclusion: Electroacupuncture could retard the process of denervated skeletal muscle atrophy. Its mechanism may be related to the activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathways.

Author's address Chinese Medical Department, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016

Key word electric acupuncture; muscle atrophy; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

去神经支配骨骼肌萎缩是指肢体在失去神经支配的情况下骨骼肌发生的一系列生理、生化、形态学以及功能的变化,而这种肌萎缩会给日常生活及工作产生较为严重的影响。因此,对去神经性骨骼肌萎缩的预防和治疗则显得尤为重要。现阶段对骨骼肌萎缩的研究已深入生物分子学领域,然而由于其发生机制过于广泛,尚未完全研究透彻。目前已有研究发现 PI3K/Akt/mTOR 信号通路与骨骼肌的修复密切相关,在肌肉萎缩过程中,PI3K/Akt/mTOR 信号通路活性下降,而激活这条通路可以降低肌肉萎缩的程度^[1]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路不仅能够促进骨骼肌蛋白质合成,而且还能够激活肌卫星细胞的增殖^[2-3],而增殖的肌卫星细胞再生新的肌细胞达到延缓骨骼肌萎缩的作用。因此,本实验主要通过研究电针对去神经支配骨骼肌萎缩大鼠骨骼肌中磷酸肌醇 3-激酶(phosphoinositide3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)和哺乳类动物雷帕霉素(the mammalian target of rapamycin, mTOR)的影响,从激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的角度探讨其作用机制,为临床应用电针治疗去神经支配骨骼肌萎缩奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性清洁级 SD 大鼠 63 只,体重(260±10)g,8 周龄,由重庆医科大学动物实验中心提供,医学动物合格证号为 SCXK 渝 2012-0002。并饲养于重庆医科大学动物实验中心 SPF(specific pathogen free, 无特定病原体)级动物房。实验过程中对动物的处理完全符合重庆医科大学医学研究伦理委员会标准。

1.2 主要试剂与仪器

PI3K 一抗(购于北京博奥森),Akt 一抗以及 Akt 磷酸化一抗、mTOR 一抗以及 mTOR 磷酸化一抗(购于美国 CST),多聚甲醛(购于 Sigma),TRNzol 总 RNA 提取试剂(购于北京天根),Rever Tre Ace-逆转录试剂盒(购于 TOYOBO 公司),华佗牌 0.30mm×13mm—25mm 无菌针灸针以及电子针治疗仪(购于苏州医疗用品有限公司),柔软型实验大鼠固定器(购于温州原上草医疗科技有限公司),AL204 型电子天平(购于梅特勒-托利多仪器有限公司),电泳仪以及 CFX PCR 仪(购于 Bio Rad 公司),低温高速离心机(购于 SIGAM 公司)。

1.3 模型制备及分组

在 SPF 级动物房适应性喂养 1 周后的 63 只雄性 SD 大鼠,依据随机数字表法分为假手术组(Control, n=21)、模型组(Model, n=21)和电针组(EA, n=21),三组大鼠均经腹腔注射 10%水合氯醛(0.3ml/100g)麻醉,并俯卧位固定在手术台,无菌操作,在右后肢股后外侧作切口,沿臀大肌间隙钝性分离、暴露坐骨神经。模型组与电针组于坐骨神经中段切断并将两游离段反折造成神经缺损,制备去神经支配腓肠肌动物模型^[4],而假手术组只暴露但不切断坐骨神经。

1.4 干预方法

术后第 2 天开始,每日 9:00 将电针组的大鼠固定于柔软型固定器上^[5-6],毫针进针术侧足三里、承山 5—7mm,针刺后两穴连接电针仪。穴位定位则参照《大鼠穴位图谱的研制》以及李忠仁版的《实验针灸学》^[7],电针参数参考吴珍元以及袁海洲等研究结果^[8-9]:强度 1.5mA、连续波、频率 5Hz,每日 1 次,每次 10min,连续治疗 3 周。假手术组和模型组每日只固定,以排除固定时的应激反应导致的误差。

1.5 标本采集

假手术组、模型组和电针组大鼠分别在造模后第7d、14d、21d随机各取7只大鼠,用10%水合氯醛(0.3ml/100g)注射麻醉后,快速分离并切取双侧腓肠肌后均用电子天平称重,并仔细观察术侧腓肠肌萎缩情况(肌肉弹性、饱满度以及色泽等)。经PBS缓冲液冲洗,将腓肠肌迅速保存于液氮罐中后,一部分组织用4%多聚甲醛固定,脱水待石蜡包埋,另一部分组织转入-80℃超低温冰箱储存待测。

1.6 指标检测

1.6.1 腓肠肌湿重比:取材时对比健侧观察术侧腓肠肌萎缩程度,并用电子天平称取双侧腓肠肌湿重(取材以近端于股骨内、外髁起点剪下,远端从跟腱止点处剪断为准),根据自身双侧腓肠肌湿重,计算腓肠肌湿重比=(术侧腓肠肌肌湿重/健侧腓肠肌肌湿重)×100%。

1.6.2 肌纤维截面积及直径:将4%多聚甲醛固定的腓肠肌,经酒精脱水、石蜡包埋、切片、Masson染色后,在400倍光学显微镜下观察,每张切片随机采取5个视野的图像,通过Image Pro Plus 6.0分析软件分析图像并计算肌纤维的截面积及直径。

1.6.3 Western Blot检测骨骼肌PI3K、Akt和mTOR蛋白表达量以及Akt、mTOR磷酸化水平:取腓肠肌样本80mg左右,低温快速匀浆并提取它的总蛋白;进行SDS-PAGE凝胶电泳,电泳结束之后取出凝胶,转膜至二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)上,约90min;转膜后放入5%的脱脂奶粉内封闭,室温约4h;加入低温稀释后的一抗(1:500,0.01MPBT),并于4℃过夜;次日复温后PBS冲洗(3×5min次),加

二抗(1:1000,0.01MPBST),恒温箱内孵育1h;把PVDF膜转移至化学发光试剂中进行发光反应约3min,暗室条件下曝光、显影及定影(以GAPDH为内参),最后凝胶成像系统分析图像并计算光密度值。

1.6.4 RT-PCR检测腓肠肌PI3K、Akt和mTOR mRNA表达:取各组腓肠肌样本60mg,到装有1ml TRNzol的2ml EP管内,提取大鼠腓肠肌的总RNA,分别采用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测所提取的RNA质量;进行反转录:25℃,10min→42℃,60min→70℃,10min→4℃,5min;进行PCR反应:94℃,5min→(94℃,30s→55—60℃,45s→72℃,45s)×30—35个循环→72℃,7min;反应完成后在上样孔中加入15μl的PCR产物,用已制备好的琼脂糖凝胶进行电泳(5V/1cm),成像后保存图片;PI3K、Akt和mTOR/GAPDH的荧光强度比值的均值±标准差表示其结果。上下游引物序列如表1。

1.7 统计学分析

运用SPSS19.0统计学软件进行实验数据分析,结果以均值±标准差表示,组间比较采用单因素的分差分析,两两比较则采用LSD多重检验分析。

2 结果

2.1 各组大鼠腓肠肌湿重比

假手术组腓肠肌红润且饱满、收缩性良好,各亚组之间的湿重比无明显差异, $P>0.05$ 。模型组和电针组的术侧腓肠肌弹性逐渐减弱、肌肉灰白无光泽,均发生渐进性萎缩,各亚组之间的湿重比差异明显, $P<0.001$ 。与假手术组比,模型组与电针组在各时间点的肌肉湿重比均明显降低, $P<0.001$ 。与模型组

表1 引物序列

基因	引物序列	产物长度
PI3K	上游(Forward) 5'-GCTCGACACGCTCCAGAC-3'	185bp
	下游(Reverse) 5'-TGCCTCTGATCTTGACCCTGAAC-3'	
Akt	上游(Forward) 5'-CGGGCACATCAAGATAACGGAC-3'	120bp
	下游(Reverse) 5'-TCGTTGTCCTCCAGCACCTCAG-3'	
mTOR	上游(Forward) 5'-TACAGATTGACACTTGGTTAC-3'	138bp
	下游(Reverse) 5'-GGGGGTAGATGAGGGCCTGT-3'	
GAPDH	上游(Forward) 5'-GGGGTGTGCTGGTGCTGAGTATG-3'	518bp
	下游(Reverse) 5'-CCGCCTGCTTCACCACCTTCTT-3'	

比,电针组的肌肉湿重比在各时间点内明显高于模型组, $P<0.001$ (图1)。

2.2 各组组织形态学改变的比较

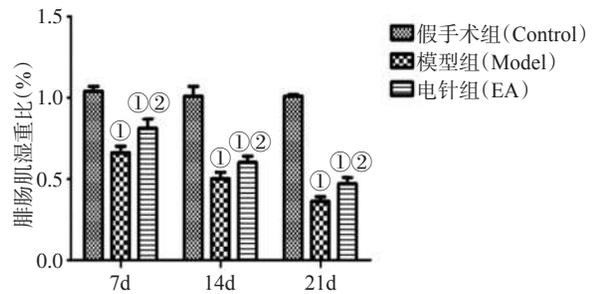
Masson 染色显示,假手术组的右侧腓肠肌肌纤维排列整齐且形态较规则,未见明显萎缩。而随着去坐骨神经时间的延长,模型组与电针组右侧腓肠肌萎缩明显,其形态较假手术组明显缩小,胶原纤维逐渐增多且肌纤维间距因胶原纤维的增生而变宽。但模型组与电针组比较,7d、14d、21d的肌纤维直径及截面积均有明显差异, $P<0.05$ (见图2—3)。

2.3 各组大鼠PI3K、Akt和mTOR蛋白表达水平以及Akt、mTOR蛋白磷酸化水平的比较

在7d时,模型组的PI3K蛋白含量与假手术组

无明显差异($P>0.05$),但电针组则显著升高且高于其他两组($P<0.05$);在14d与21d时间点,模型组的PI3K蛋白含量虽较假手术组有所升高但仍明显低

图1 各组各时间点骨骼肌湿重比 ($\bar{x}\pm s$)



注:①与假手术组比较 $P<0.001$;②与模型组比较 $P<0.001$

图2 观察各组骨骼肌病理改变

(Masson染色, $\times 400$)

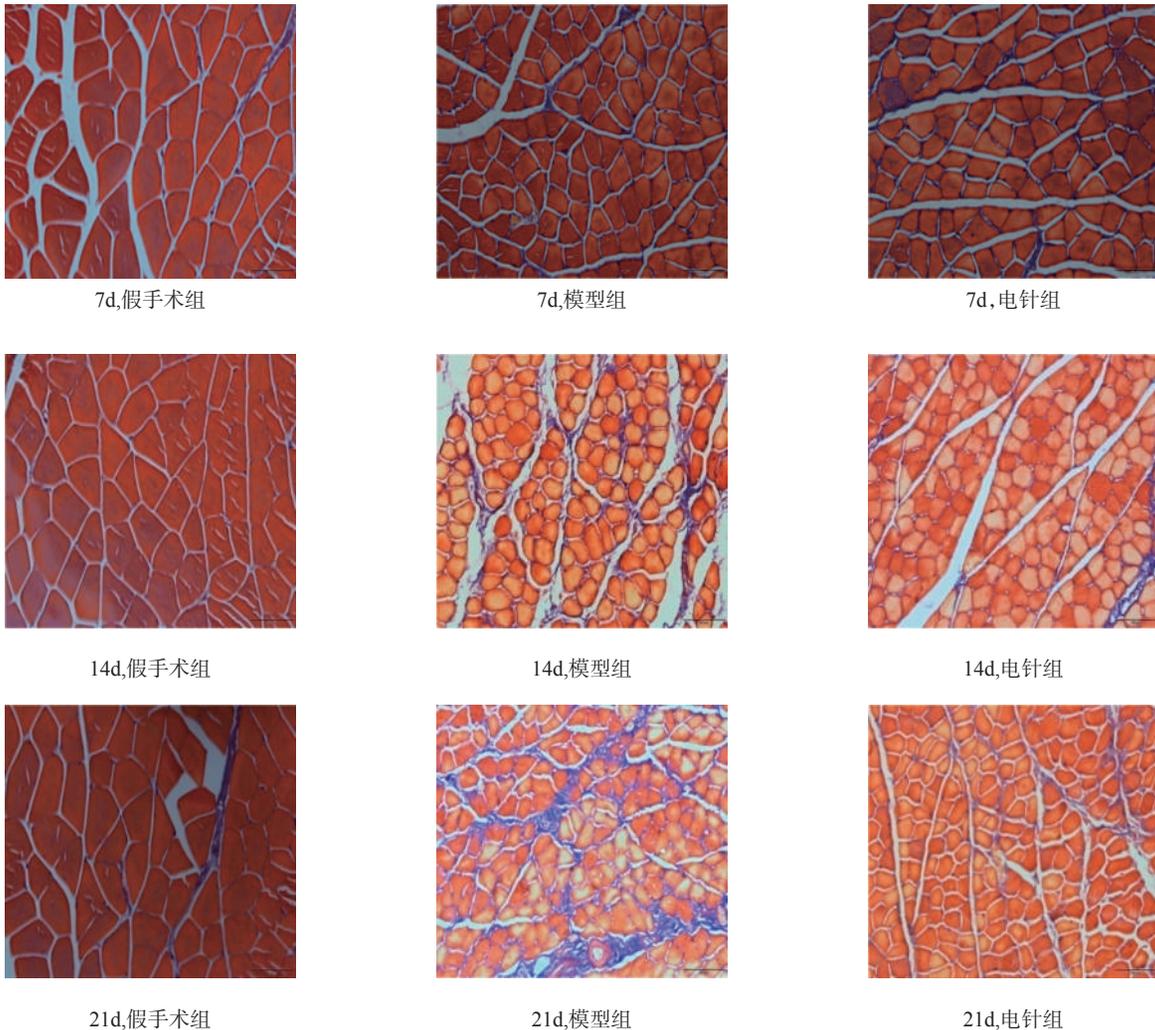
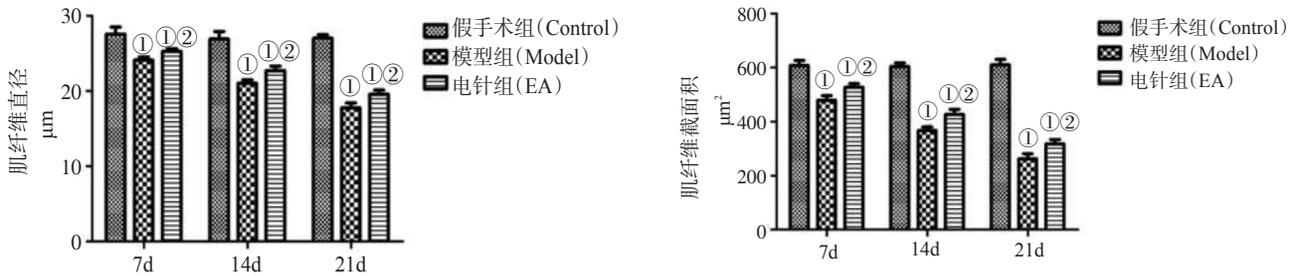


图3 各组各时间点肌纤维直径及截面积



注:①与假手术组比较 $P < 0.01$; ②与模型组比较 $P < 0.05$

于电针组 ($P < 0.05$)。在各时间点,模型组与电针组的Akt蛋白含量虽较假手术组有所升高 ($P < 0.001$),但模型组与电针组之间的差异无显著性意义 ($P > 0.05$);而与假手术组比较,模型组与电针组的p-Akt蛋白表达量在术后各时间点均明显升高 ($P < 0.001$),且电针组明显高于模型组 ($P < 0.05$)。在各时间点,模型组与电针组的mTOR蛋白含量虽均高于假手术组 ($P < 0.001$),但模型组与电针组之间的差异无显著性意义 ($P > 0.05$);而与假手术组比较,模型组与电针组的p-mTOR蛋白表达量在术后不同时间均显著升高 ($P < 0.001$),且电针组明显高于模型组 ($P < 0.05$)。图4。

2.4 各组大鼠骨骼肌PI3K、Akt和mTOR mRNA表达水平的比较

在7d时,模型组与假手术组的PI3K mRNA荧光强度无明显差异 ($P > 0.05$),而14d以后,模型组逐渐增强但仍显著低于电针组 ($P < 0.05$);而电针组在任何时间点均强于其余两组,差异具有显著性意义 ($P < 0.05$)。在各时间点,模型组与电针组的Akt mRNA荧光强度明显强于假手术组 ($P < 0.05$),且电针组明显高于模型组 ($P < 0.05$)。在各时间点,模型组与电针组的mTOR mRNA荧光强度明显强于假手术组 ($P < 0.05$),且电针组显著高于模型组 ($P < 0.05$)。见图5。

3 讨论

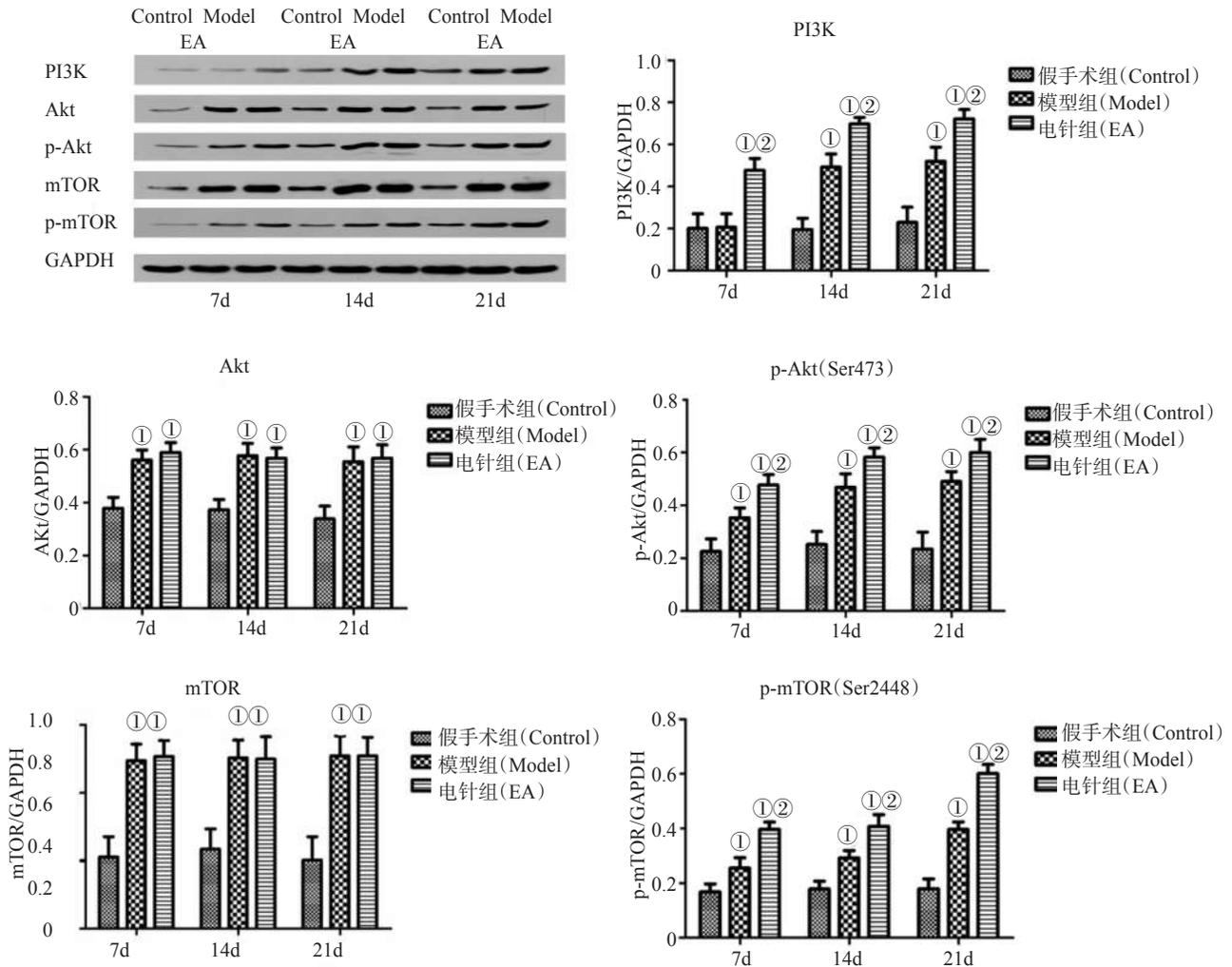
骨骼肌的功能恢复主要需要神经及肌肉两方面的作用。首先需要神经纤维到达其靶肌肉并且与肌细胞形成有效联系,其次需要接受神经纤维支配的肌细胞保持其活性^[10]。而目前由于显微外科技术的

快速发展,成熟的神经移植技术已经能够确保神经吻合后再生轴突生长到达其靶肌肉。然而神经再生的速度相当缓慢,再生轴突需要长时间的生长才能到达其靶肌肉。若肌肉萎缩的速度过快,这将导致即使肌肉重新获得神经支配,靶肌肉也已发生了不可逆的萎缩,肌细胞大量纤维化,无法接受神经的再支配。这让显微外科手术的疗效下降,并最终使骨骼肌的功能完全丧失^[11]。近年来大量的基础研究都着重于神经的再生,而对延缓骨骼肌萎缩速度的研究相对较少。

PI3K/Akt/mTOR信号通路作为细胞内重要的信号通路之一,广泛存在于细胞内,通过不断影响下游相关靶蛋白的活化状态,调控着细胞的增殖、分化以及蛋白质合成,主要参与细胞的增殖及分化等主要生命过程^[12-13]。PI3K作为一种胞内磷脂酰肌醇激酶,是多数生命活动的关键信号分子,也是Akt转位至胞膜且被活化的必要信号分子^[14]。当PI3k的活性被激活后,它能够激活并上调Akt磷酸化水平。而被PI3K激活的Akt则通过磷酸化作用激活其下游靶蛋白mTOR^[15-16],而mTOR作为Akt在下游的一个关键靶点,被Akt磷酸化激活后,通过磷酸化其下游靶物来调控与细胞生长和增殖密切相关的蛋白质合成,影响细胞的增殖,从而达到延缓骨骼肌萎缩速度的目的。

目前研究表明去神经后肌肉纤维开始萎缩^[7],随失神经时间延长肌肉萎缩纤维化逐渐加重,1—4周内萎缩速度逐渐加快,但去神经4周后萎缩纤维化处于相对稳定期,进展较缓慢,因此本实验选择在去神经早期进行电针干预,并在肌肉迅速萎缩期观察电针对其的影响。

图4 Western Bolt 检测不同时间点 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达量变化以及 Akt、mTOR 蛋白磷酸化表达



注:①与假手术组比较 $P < 0.001$; ②与模型组比较 $P < 0.05$

在本实验中,对去神经支配的骨骼肌进行电针治疗3周,且分期观察骨骼肌萎缩的病理变化情况。实验结果显示,电针组的腓肠肌湿重比在7d、14d、21d均明显高于模型组;而通过Masson染色计算出模型组的肌纤维直径以及截面积在7d、14d、21d均显著低于电针组,且模型组的萎缩程度更加严重。结果表明在去神经支配骨骼肌早期进行电针治疗能够明显延缓去神经骨骼肌萎缩程度。本实验结果发现,电针治疗不仅能够上调去神经大鼠骨骼肌内PI3K蛋白的表达,而且对Akt以及mTOR的磷酸化水平起正向调节作用;同时电针能够使PI3K、Akt以及mTOR 基因转录水平显著升高。因此,本

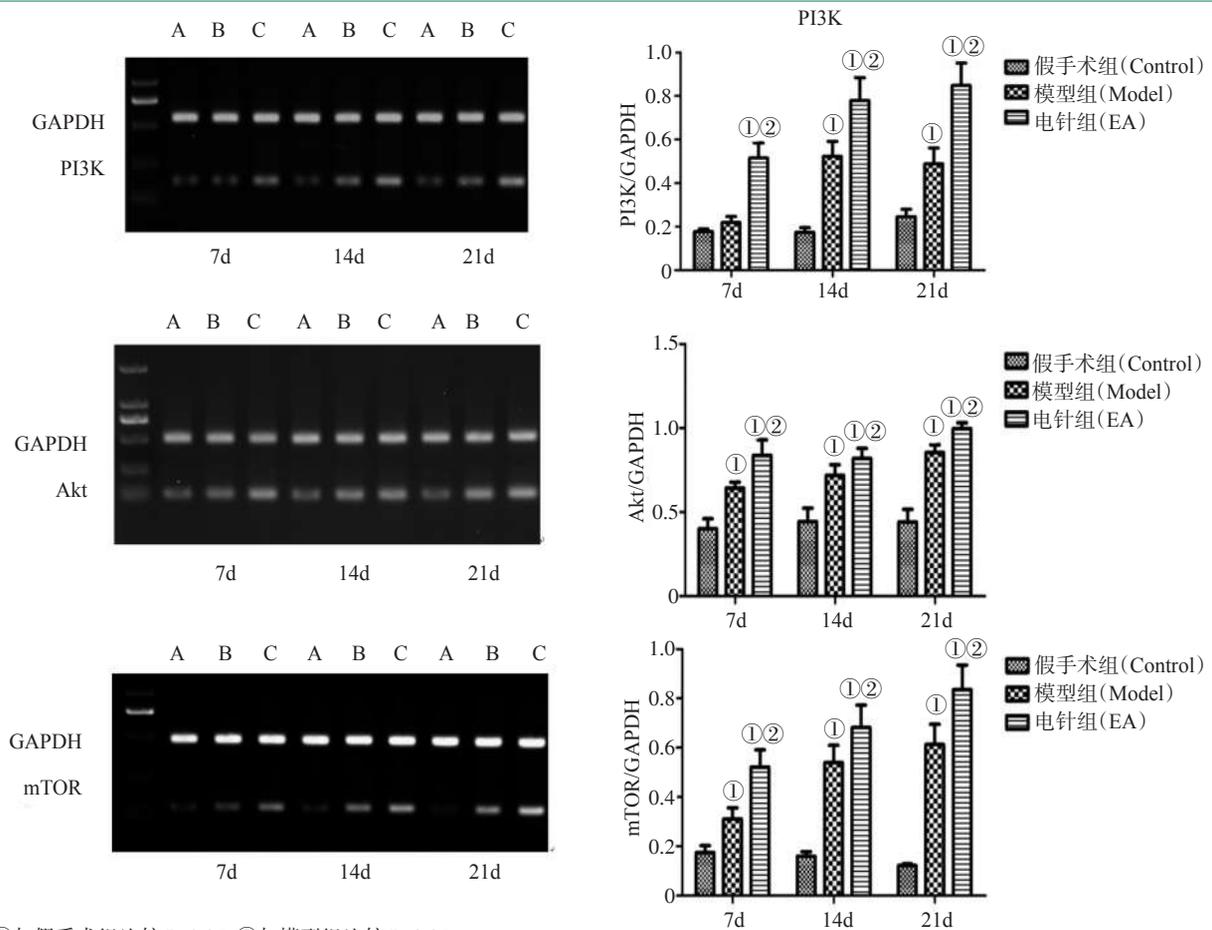
实验认为电针刺激能够上调萎缩骨骼肌的PI3K的表达水平以及Akt、mTOR的磷酸化水平。由此推测电针延缓去神经骨骼肌的萎缩程度与其能够激活PI3K/Akt/mTOR信号通路有着密切联系。

综上所述,骨骼肌去神经后,电针能够上调萎缩骨骼肌PI3K的表达,进一步调控Akt和mTOR的磷酸化,激活PI3K/Akt/mTOR信号通路,从而促进肌卫星细胞的增殖。这可能是电针能够延缓去神经骨骼肌萎缩程度的机制之一。

参考文献

[1] 史仍飞,胡莉莉,李志刚,等. 雷帕霉素和LY294002对游泳训练

图5 RT-PCR检测不同时间点PI3K、Akt、mTOR基因表达量变化



注:①与假手术组比较 $P<0.05$;②与模型组比较 $P<0.05$

大鼠骨骼肌生长及PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 体育科学,2011,31(7):62—66.

[2] 于欢,张敏,赵勇,等. 胰岛素通过PI3K/Akt和MEK/ERK信号通路增强大鼠骨骼肌肌细胞的增殖[J]. 生理学报,2013,65(1):19—25.

[3] 朱哈. IGF-I和运动诱导骨骼肌肥大的机理研究[D]. 北京:北京体育大学,2010.

[4] 吴珍元,黄英如,李沿江,等. 低强度脉冲超声波对大鼠失神经骨骼肌萎缩的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2015,23(23):2191—2197.

[5] 张毅,唐成林,田源,等. 电针对非酒精性脂肪性肝病大鼠蛋白质二硫化物异构酶A3的影响[J]. 四川大学学报(医学版),2016,47(2):208—213.

[6] 田源,唐成林,黄思琴,等. 按摩对大鼠骨骼肌急性钝挫伤后膜修复蛋白dysferlin和annexin A1表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2016,31(8):841—846.

[7] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:255—257.

[8] 吴珍元,黄英如,洗华,等. 电针对失神经骨骼肌萎缩及纤维化的影响[J]. 中国康复医学杂志,2016,31(2):177—182.

[9] 袁海洲,唐成林,田源,等. 电针对大鼠急性骨骼肌损伤修复中生长相关蛋白和聚集蛋白表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,

2016,31(8):857—861.

[10] Fox EA, McAdams J. Smooth-muscle-specific expression of neurotrophin-3 in mouse embryonic and neonatal gastrointestinal tract [J]. Cell Tissue Res, 2010, 340(2): 267—286.

[11] 陈立. 大鼠肌卫星细胞体外培养及移植延缓失神经骨骼肌萎缩的实验研究[D]. 上海:复旦大学,2012.

[12] 崔晓萍,陈建梅,穆军山,等. PI3K-AKT通路对脑缺血损伤神经干细胞的增殖作用[J]. 中国康复医学杂志,2016,31(2):154—159.

[13] Landgren H, Curtis MA. Locating and labeling neural stem cells in the brain[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(1):1—7.

[14] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. Apoptosis, 2004, 9(6): 667—676.

[15] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt /PKB signaling pathway and cell survival [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59—71.

[16] 黄秀兰,崔国辉,周克元. PI3K-Akt信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J]. 癌症,2008,27(3):331—336.

[17] 汤维芳. 失神经骨骼肌纤维化和成肌细胞转分化的分子机制的初步研究[D]. 上海:第二军医大学,2014.