

针刺对大负荷运动大鼠骨骼肌线粒体结构和功能的影响*

尚画雨^{1,2} 白胜超² 夏志³ 周越² 王瑞元^{2,4}

摘要

目的:研究针刺对大负荷运动大鼠骨骼肌线粒体结构与功能的影响,探讨针刺干预对运动性骨骼肌损伤的恢复和预防的作用。

方法:128只成年雄性SD大鼠,随机分为4组:空白对照组(C组,n=8)、单纯运动组(E组,n=40)、单纯针刺组(A组,n=40)和运动针刺组(EA组,n=40)。其中,E和EA组进行一次下坡跑运动,A组和EA组在运动后即刻施加针刺处理。各组根据干预后不同时相又分为0h、12h、24h、48h和72h组(n=8),分别于对应时间点分离比目鱼肌进行检测。使用透射电子显微镜观察骨骼肌线粒体超微结构变化,采用ELISA方法检测各组大鼠比目鱼肌线粒体定量酶CS的含量以及线粒体呼吸链复合体Ⅱ、Ⅳ的活性,应用Western Blot方法检测骨骼肌COXⅠ的蛋白表达。

结果:单纯针刺后骨骼肌COXⅠ蛋白表达上调。大负荷运动后比目鱼肌线粒体出现明显肿胀、肌膜下积聚等超微结构异常变化,且伴有大量自噬体形成,同时柠檬酸合成酶(CS)的含量明显减少,呼吸链复合体Ⅱ、Ⅳ活性以及COXⅠ蛋白表达出现一过性的下调($P<0.05$)。与运动组相比,运动针刺后明显改善大负荷运动所致线粒体超微结构的异常变化,有自噬溶酶体的出现,CS含量有所增加,呼吸链复合体Ⅱ活性及COXⅠ蛋白表达上调。

结论:针刺促进了大负荷运动后骨骼肌线粒体结构的恢复,有效增加了运动后线粒体的数量,减轻了大负荷运动对线粒体功能的损害。

关键词 大负荷运动;针刺;骨骼肌;线粒体;呼吸链复合体

中图分类号:R246,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-08-0901-09

Effects of acupuncture on mitochondrial structure and function of skeletal muscle in rats with heavy load exercise/SHANG Huayu, BAI Shengchao, XIA Zhi, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(8): 901—909

Abstract

Objective: To study the influence of acupuncture on mitochondrial structure and function of skeletal muscle in rats with heavy load exercise, and to explore the effect of acupuncture on the recovery and prevention of exercise-induced skeletal muscle damage.

Method: One hundred and twenty-eight male adult SD rats were randomly divided into four groups: control group (C, n=8), exercise group (E, n=40), acupuncture group (A, n=40), exercise and acupuncture group (EA, n=40). Rats in E and EA groups were subjected to an eccentric exercise, and those in A and EA groups were applied acupuncture treatment immediately after exercise. Each group was further divided into 0h, 12h, 24h, 48h and 72h sub-groups(n=8), and at each time point the soleus muscle was collected under anesthesia. Mitochondrial ultrastructural changes in skeletal muscle were observed by a transmission electron microscope. The content

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.08.005

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(31471133);北京体育大学重点实验室项目(2014SYS005);成都体育学院校级科研项目(17YJ04);国家体育总局运动医学重点实验室资助项目(CX17B04)

1 成都体育学院运动医学与健康学院,四川成都,610041; 2 北京体育大学运动人体科学学院; 3 井冈山大学体育学院; 4 通讯作者
作者简介:尚画雨,男,博士,讲师; 收稿日期:2017-04-11

of quantitative enzyme citrate synthase(CS) and the activities of mitochondrial respiratory chain complex II and IV were measured by ELISA. Protein expression of skeletal muscle COX I was determined by western blot.

Result: The protein expression of COX I in skeletal muscle was up-regulated after acupuncture alone. After the heavy load exercise, the mitochondria structure appeared the typical abnormal changes such as swelling and accumulating under cell membrane, and formed a large number of mitophagosomes. The content of CS, the activities of respiratory chain complex II and IV and the protein expression of COX I were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the exercise group, acupuncture intervention significantly promoted the recovery of mitochondrial ultrastructure, induced the formation of mitophagolysosome, alleviated the reduction of CS content, increased the activity of respiratory chain complex II and the expression of COX I in skeletal muscle.

Conclusion: Acupuncture can promote the recovery of mitochondrial structure and effectively increase the number of mitochondria after heavy load exercise, thereby alleviating the damage of mitochondrial function within rat skeletal muscle.

Author's address School of Sport Medicine and Health, Chengdu Sport Institute, Chengdu, Sichuan, 610041

Key word heavy load exercise; acupuncture; skeletal muscle; mitochondrion; respiratory chain complex

骨骼肌收缩和舒张是人体运动的原动力。但长时间和/或大负荷运动,特别是离心运动后,骨骼肌纤维会出现损伤(exercise-induced muscle damage, EIMD),它可造成延迟性肌肉酸痛(delayed onset muscle soreness, DOMS)和肌力下降,从而影响人体的运动和日常生活。北京体育大学实验室长期以来致力于EIMD发生机制及防治方法的研究。前期研究发现,4周大负荷运动可导致骨骼肌线粒体在肌膜下聚积,大小不一;肌纤维内线粒体肿胀、嵴稀少,呈空泡化,表现出严重的结构异常^[1]。而线粒体结构异常常导致其功能障碍,从而影响骨骼肌的功能,进而通过后续反应导致肌肉损伤。若不及时治疗,会加剧运动损伤并造成慢性疼痛或损伤。因此,探寻促进大负荷运动后的骨骼肌超微结构快速恢复的干预手段,是目前运动医学界的热点和难点。

针刺疗法作为中医传统疗法之一,在治疗肌肉病患和促进肌肉功能恢复方面占据重要地位。20世纪70年代中期,卢鼎厚等^[2]按照《灵枢》中提出的应用斜刺针法治疗肌肉损伤的理论依据,摸索采用针刺(斜刺)方法干预骨骼肌损伤,取得了良好的治疗效果。后续王瑞元等^[3-4]研究证实针刺能够治疗肌肉损伤,缓解大负荷运动后DOMS,促进骨骼肌功能恢复,而且注意到在治疗运动性肌肉疾患时,斜刺比直刺的效果更为显著。目前北京体育大学实验室罗丽娜等^[5]沿用卢鼎厚、王瑞元等的斜刺手法,研究发现针刺可有效抑制大负荷运动后骨骼肌骨架蛋白的解聚或降解,加强骨架蛋白的合成代谢,从而有效地促进大负荷运

动后骨骼肌骨架蛋白结构和功能的重塑。

大量的实验结果表明,EIMD的发生与骨骼肌细胞内线粒体功能改变有着极为密切的关系,因而研究运动对线粒体功能的影响越来越受人们的重视。目前研究热点为长时间和/或高强度运动引起的线粒体功能紊乱,包括能量代谢障碍、线粒体基质 Ca^{2+} 超载、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生、线粒体渗透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放、凋亡前体蛋白的释放等,通过研究线粒体的这些变化从而找到预防EIMD的方法。已有文献报道,线粒体呼吸链受到抑制或酶活性降低均能引起能量代谢障碍,进而导致一系列相互作用的损伤过程^[6-8]。目前,国内外鲜见对线粒体呼吸链功能与EIMD关系的研究,本实验拟通过建立大负荷运动诱导的骨骼肌损伤动物模型,并在运动后即刻施加针刺干预,通过斜刺骨骼肌来观察针刺能否对骨骼肌线粒体损伤起到缓解作用,并分析其作用机制,为针刺干预骨骼肌损伤的恢复和预防提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

8周龄雄性SD大鼠128只,体重 $221.77\pm 7.32\text{g}$ (动物等级:SPF级,使用许可证号:SCXK(京)2012-0001,北京维通利华实验动物技术有限公司提供)。用标准大鼠饲料分笼饲养于北京体育大学科研实验中心动物房内,获得北京体育大学运动科学实验伦

理委员会批准,保持室内相对湿度40%—70%,温度20—26℃,室内12h明暗自动切换,自由摄食、饮水。本实验采用随机数字表法,借助Excel随机分组程序将所有大鼠适应性喂养3天后分为4组:空白对照组(Control, C)、单纯运动组(Exercise, E)、单纯针刺组(Acupuncture, A)和运动针刺组(Exercise + Acupuncture, EA)。其中,E组、A组、EA组根据干预后不同时间点,又分为干预后即刻组,干预后12h组,干预后24h组,干预后48h组和干预后72h组。本实验共分为16个组别,每组8只,见表1。

表1 实验动物分组 (n=8)

空白对照组	单纯运动组	单纯针刺组	运动针刺组
C	E0	A0	EA0
	E12	A12	EA12
	E24	A24	EA24
	E48	A48	EA48
	E72	A72	EA72

1.2 运动方案

大鼠训练使用小动物电动跑台进行运动。所有运动组的实验动物在正式实验前进行适应性跑台训练3天,具体方案为:第1天跑台坡度0°,16m/min,5min;第2天跑台坡度0°,16m/min,10min;第3天休息。

适应训练后第2天开始正式实验。本研究的运动方案参照Armstrong^[9]的离心运动模型,采取持续性下坡跑,跑台坡度为-16°,速度为16m/min,运动时间为90min。

1.3 针刺方案

在一次大负荷运动后即刻对EA组大鼠进行针刺干预,同期对A组予以相同的针刺处理。固定好大鼠后对其双后肢进行消毒,用直径0.25mm的针灸针[汉医牌,津食药监械(准)字2009第2270002号]沿大鼠小腿三头肌的纵向,从远端斜刺(进针角度约30°)穿过小腿三头肌肌腹,并留针2min^[5]。

1.4 取材及样品制备

按照实验设计时间点,将大鼠分批称重后腹腔注射10%水合氯醛(3.5ml/kg)麻醉,腹主动脉取血,迅速分离大鼠比目鱼肌,用刀片去除两侧肌腱和结缔组织,剪取约[1×1×1]mm的小块比目鱼肌,然后放入4℃预冷的2.5%戊二醛固定液,用于电镜检测。再切取100mg新鲜的比目鱼肌放入离心管内称重后,使用碧云天动物组织线粒体分离试剂盒

(C3606),按照试剂盒说明书差速离心提取骨骼肌线粒体,随即加入适量线粒体储存液,重悬线粒体,先置于液氮速冻后再放入-80℃冰箱待测线粒体酶活性。最后,用锡纸包裹剩余的比目鱼肌后放入液氮,之后转至-80℃冰箱保存,备用。

1.5 测试指标与方法

1.5.1 透射电子显微镜观察骨骼肌线粒体超微结构的变化:将比目鱼肌从2.5%的戊二醛固定液中取出,首先用0.1mol/L磷酸缓冲液冲洗,再用1%锇酸后固定,用0.1mol/L磷酸缓冲液再次冲洗后进行脱水(乙醇溶液梯度为50%、70%、90%、100%),环氧树脂Spurr包埋后将其纵切,制成超薄切片,用醋酸双氧轴、柠檬酸铅双染色,待样品干燥后置于透射电镜下观察其线粒体超微结构。

每一张组织切片,先在低倍视野(×500—1000)下确定观察区域,后在高倍视野(×2000—8000)下观察其超微结构,主要观察线粒体的分布、大小、形态、嵴的结构、自噬体的形成变化等。

1.5.2 酶联免疫吸附法(ELISA)检测比目鱼肌线粒体柠檬酸合成酶(citrate synthase, CS)的含量以及呼吸链复合体Ⅱ、Ⅳ的活性:CS是线粒体数量的定量酶标。采用大鼠CS ELISA分析试剂盒(美国USCNLIFE公司)检测酶的含量。此外,采用大鼠呼吸链复合体Ⅱ ELISA分析试剂盒和呼吸链复合体Ⅳ ELISA分析试剂盒(英国Abcam公司)评估线粒体呼吸链的功能。检测步骤严格按照ELISA试剂盒说明书进行。

1.5.3 蛋白质免疫印迹(Western Blot)方法测定比目鱼肌COX I的蛋白含量:将称取的比目鱼肌置于研钵中加入液氮,将组织研磨成粉末后按照1mg组织加入10μl裂解液的比例进行裂解,再以4℃、12000g离心10min,取上清液。用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后统一调整,使上样量保持一致。然后以4:1比例加入5×上样缓冲液,98℃煮沸5min。

取已分装保存的样品加样:样品体积20μl/孔,蛋白浓度1.5μg/μl。随后进行SDS-PAGE电泳,电泳后转至PVDF膜,封闭经一二抗孵育后放入凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司)中显像。所用抗体:Anti-COX I(英国Abcam公司)、Anti-GAPDH(美

国 Santa Cruz 公司)、Goat Anti-Mouse IgG(H+L), HRP(北京中杉金桥生物技术公司)。使用 Gel-pro 软件分析蛋白条带灰度值,蛋白表达量用“目的蛋白/内参”计算,即骨骼肌目的蛋白 COX I/内参 GAPDH。

1.6 统计学分析

所有数据以“均数±标准差”表示,数据处理使用 SPSS 16.0 统计软件包统计。实验数据采用双因素方差分析,对处理因素(安静对照、单纯运动、单纯针刺和运动针刺)和取材时间因素(运动后 0h、12h、24h、48h 和 72h)的主效应以及两者的交互作用进行分析。各组间的单独效应统计方法使用单因素方差分析,若方差齐性,采用 LSD 法进行事后检验;若方差不具齐性,则将原始数据转换至齐性后再作统计。对于不能转换至齐性的指标数据,直接采用 Tamhane T2 的统计结果进行分析。 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为非常显著性差异。

2 结果

2.1 骨骼肌线粒体超微结构变化

本实验使用透射电镜观察了一次大负荷运动及针刺后不同时相骨骼肌线粒体超微结构的变化,如图 1 所示,①C 组大鼠骨骼肌线粒体均匀分布于 Z 线两侧,肌膜下较少。线粒体呈长线形或卵圆形,未观察到明显的自噬体(双层膜结构)。②A 组大鼠在针刺后即刻骨骼肌线粒体在肌膜下开始出现增多,大小较为均一。针刺后 12h 和 24h 肌膜下线粒体也有所增多,线粒体大小不均一。针刺后 48h 和 72h 线粒体分布较为均一,大小较均一,各时相均未见明显的自噬体。③E 组大鼠在运动后即刻骨骼肌线粒体分布不均,在肌膜下大量积聚,线粒体开始变大、肿胀,自噬体较少(如图中标识)。运动后 12h,Z 线部分断裂,线粒体分布更不均匀,肌膜下线粒体大量积聚,有大量自噬体形成,线粒体肿胀,变圆,出现大量不同成熟阶段的自噬体,此时线粒体损伤最为严重。

运动后 24h,Z 线较为清晰,肌膜下线粒体数量减少,线粒体形态有所恢复,自噬体变少。运动后 48h 线粒体再次出现损伤表现,线粒体但损伤程度大大小于运动后 12h 的表现,同时自噬体较少。运动后 72h 线粒体的形态已经基本恢复到正常水平,未观察到明显的自噬体。④EA 组大鼠在运动针刺后即刻肌膜下线粒体数量增多,部分线粒体变圆、肿胀,自噬体较少。运动针刺后 12h 线粒体损伤最为严重,其表现比单纯运动后 12h 较轻,肌膜下线粒体体积减少,但此时线粒体仍较大,自噬体与单层膜被的溶酶体融合形成自噬溶酶体。在运动针刺后 24h 和 48h,观察到线粒体的结构逐渐向正常结构恢复的趋势,仍可见少量的自噬溶酶体。运动针刺后 72h,线粒体已经恢复到正常状态,未观察到明显的自噬体和自噬溶酶体。

2.2 骨骼肌线粒体 CS 含量变化

实验结果显示(表 2),空白对照组(C 组)CS 含量为 (11.327 ± 2.474) ng/ml。①A 组在处理后的 CS 含量整体上呈现先增加再减少的趋势,各时相与 C 组相比均无明显差异($P > 0.05$)。针刺后 CS 含量在 12h 增加至最大值,比 C 组增多了 23.2%,此后逐渐减少,48h 和 72h 均略低于 C 组。②E 组在运动后不同时相比目鱼肌线粒体中 CS 含量呈现先减少后增加的趋势,各时相均低于 A 组相应时间点,其中在 12h 和 24h 差异具有显著性($P < 0.05$),且在运动后即刻和 24h CS 含量明显低于 C 组($P < 0.05$)。③EA 组在处理后的 CS 含量总体呈先减少再逐渐增多的趋势,各时相均略高于 E 组相应时间点($P > 0.05$),而在针刺后即刻和 24h CS 含量较 C 组明显减少($P < 0.05$),在 12h 和 24h CS 含量也明显低于 A 组($P < 0.05$)。

2.3 骨骼肌线粒体呼吸链复合体 II、IV 活性变化

为排除线粒体数量变化对线粒体呼吸链复合体活性的影响,目前文献常用三羧酸循环中的 CS 含量对复合体活性进行标准化^[10-11]。首先,复合体 II 活性被标准化后的实验结果显示(表 3),C 组为 $0.109 \pm$

表 2 运动及针刺后不同时相骨骼肌线粒体柠檬酸合成酶含量变化

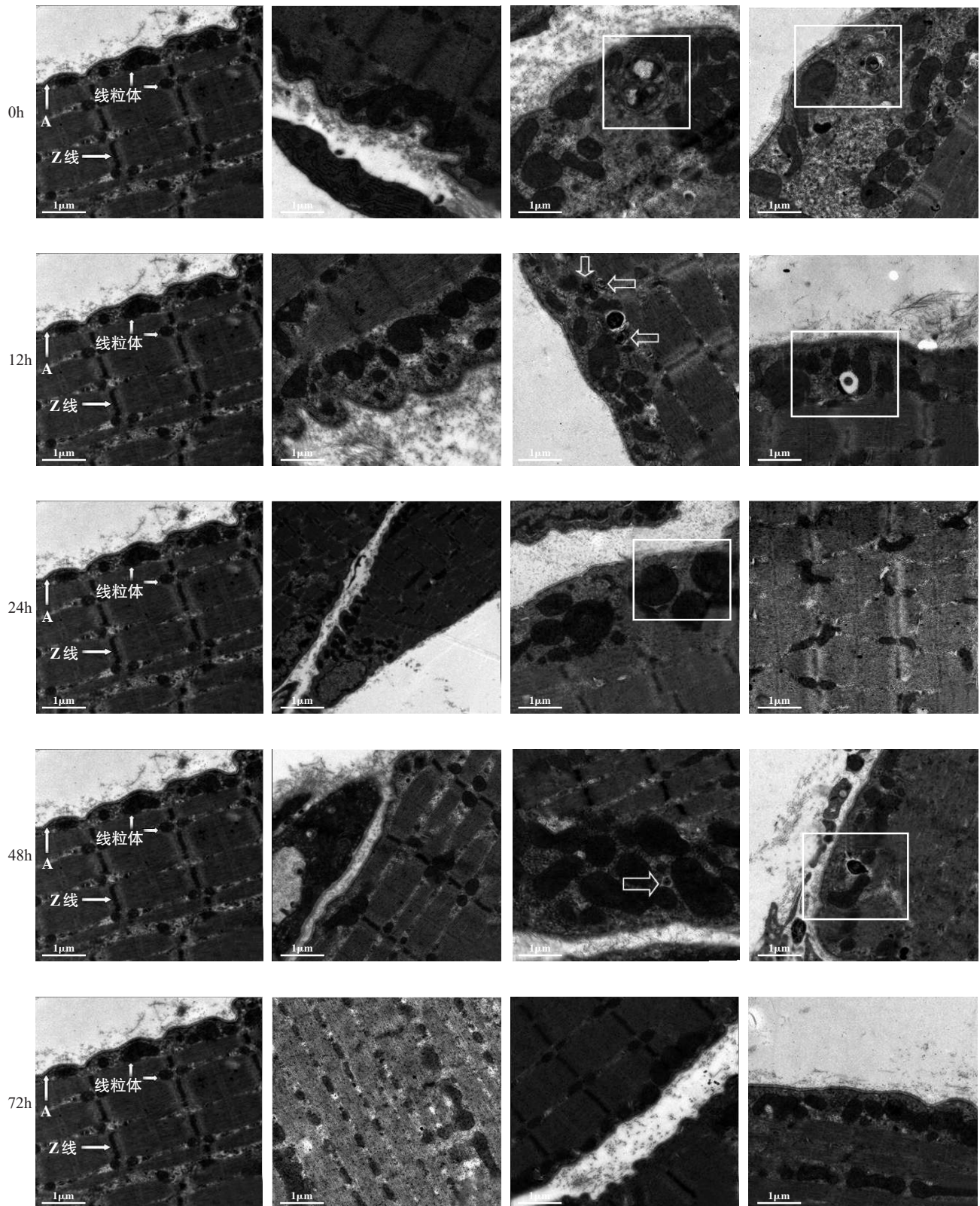
($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	0h	12h	24h	48h	72h
A 组	11.270 ± 4.716	13.954 ± 3.992	12.474 ± 3.943	8.033 ± 2.013	8.414 ± 1.870
E 组	6.135 ± 2.423^{①}	6.658 ± 2.690^{②}	5.656 ± 2.216^{①②}	7.396 ± 3.547	8.408 ± 3.554
EA 组	6.733 ± 2.265^{①}	7.504 ± 2.159^{②}	6.358 ± 1.900^{①②}	8.813 ± 2.943	10.071 ± 2.045

注:与 C 组相比,① $P < 0.05$;组间同一时间点,与 A 组相比,② $P < 0.05$

图1 运动及针刺后不同时相线粒体超微结构与自噬体的变化

($\times 2000$, 80kV)



0.016。①A组在处理复合体Ⅱ的活性整体上呈现先降低后升高的趋势,各时相与C组相比均无明显差异($P>0.05$)。A组在针刺后即刻复合体Ⅱ的活性降低至最小值,下降了15.6%,12h开始升高,72h恢复至C组水平。②E组在运动后不同时相复合体Ⅱ的活性呈现下降趋势,其中运动后24h组与C组、运动后12h、48h和72h组相比差异具有显著性($P<0.05$),此外E组各时相均低于A组相应时间点,在24h组差异具有显著性($P<0.05$)。③EA组在处理复合体Ⅱ的活性总体呈现先降低后升高的趋势,各时相均高于E组相应时间点,在24h组差异具有显著性($P<0.05$)。EA组较C组和A组差异均无显著性意义($P>0.05$)。

其次,复合体Ⅳ活性被标准化后的实验结果显示(表4),C组为 0.274 ± 0.060 ,①A组在处理复合体Ⅳ的活性整体上呈现先降低后升高的趋势,各时相与C组相比均无明显差异($P>0.05$)。A组复合体Ⅳ的活性在针刺后12h降低至最低,此后逐渐升高,72h升至最高峰,比C组升高了23.0%。②E组在运动后不同时相复合体Ⅳ的活性呈现先升高后降低再升高降低的趋势,与C组相比均无显著性差异($P>$

0.05),但各时相均低于A组相应时间点,其中在72h组差异具有显著性($P<0.05$)。③EA组在处理复合体Ⅳ的活性与E组变化相似,但各时相均高于E组相应时间点,且EA组总体呈现围绕C组水平上下波动的趋势,各时相较E组和C组差异均无显著性意义($P>0.05$)。

2.4 骨骼肌COX I 蛋白表达变化

实验结果显示(表5、图2),C组为1.000,①A组在处理骨骼肌COX I 蛋白表达整体上呈现先升高后下降的趋势,在12h升高至最高峰,此时较C组和0h组分别显著升高了28.2%、31.1%($P<0.05$),随后在24—72h COX I 蛋白表达逐渐下降。②E组在运动后不同时相骨骼肌COX I 蛋白表达整体呈现下降趋势,各时相均低于A组相应时间点,其中在12h组差异具有显著性($P<0.05$),但E组较C组均无明显差异($P>0.05$)。③EA组在处理COX I 蛋白表达总体呈现先升高后降低的趋势,其中72h组显著低于24h组水平($P<0.05$)。此外EA组各时相略高于E组相应时间点,且在0h、24h和48h组均略高于A组水平,但EA组较E组、C组和A组差异均无显著性意义($P>0.05$)。

表3 运动及针刺后不同时相线粒体ETC复合体Ⅱ/CS的比值变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	0h	12h	24h	48h	72h
A组	0.092±0.022	0.097±0.037	0.116±0.034	0.114±0.019	0.104±0.008
E组	0.085±0.018	0.104±0.037	0.050±0.012 ^{①②④}	0.109±0.024 ^③	0.097±0.034 ^⑤
EA组	0.107±0.022	0.102±0.005	0.099±0.013 ^⑤	0.113±0.029	0.105±0.016

注:组内与C组相比,① $P<0.05$;与12h相比,② $P<0.05$;与24h相比,③ $P<0.05$ 。组间同一时间点,与A组相比,④ $P<0.05$;与E组相比,⑤ $P<0.05$ 。

表4 运动及针刺干预后不同时相线粒体呼吸链复合体Ⅳ/CS的比值变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	0h	12h	24h	48h	72h
A组	0.292±0.094	0.247±0.052	0.258±0.056	0.284±0.017	0.337±0.047
E组	0.282±0.089	0.212±0.045	0.275±0.058	0.245±0.069	0.236±0.060 ^①
EA组	0.286±0.052	0.269±0.058	0.273±0.068	0.256±0.057	0.253±0.036

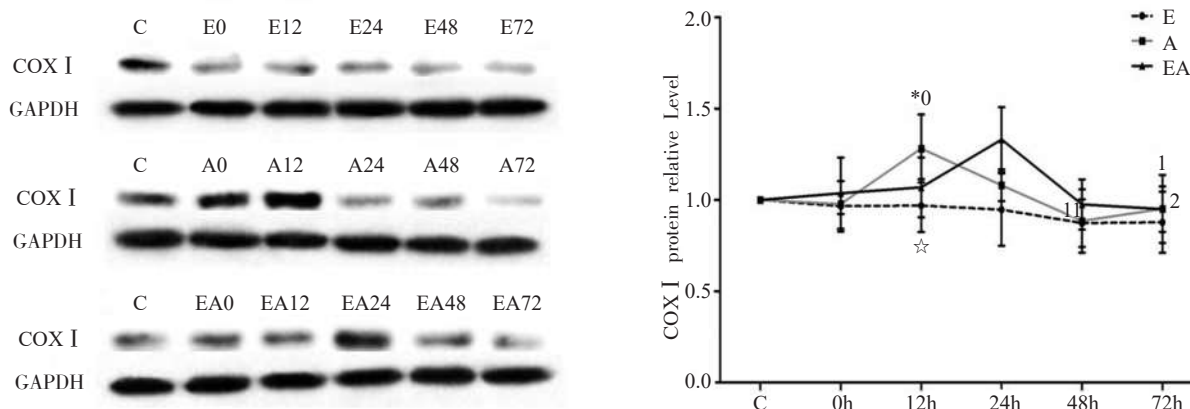
注:组间同一时间点,与A组相比,① $P<0.05$

表5 运动及针刺后不同时相骨骼肌COX I 蛋白表达变化 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	0h	12h	24h	48h	72h
A组	0.978±0.055	1.282±0.186 ^{①②}	1.080±0.087	0.885±0.173 ^④	0.951±0.186 ^③
E组	0.965±0.138	0.969±0.145 ^⑥	0.947±0.199	0.873±0.130	0.878±0.167
EA组	1.037±0.195	1.069±0.164	1.330±0.177	0.975±0.137	0.950±0.125 ^⑤

注:组内与C组相比,① $P<0.05$;与0h相比,② $P<0.05$;与12h相比,③ $P<0.05$,④ $P<0.01$;与24h相比,⑤ $P<0.05$ 。组间同一时间点,与A组相比,⑥ $P<0.05$ 。

图2 运动及针刺后不同时相骨骼肌COX I 蛋白表达及变化趋势



3 讨论

针刺疗法作为中医传统疗法之一,治疗骨骼肌损伤历史悠久,疗效肯定。早期研究报道了针刺肌体特定的部位,可将局部刺激信号通过组织间机械力的传导传递给周边组织,并产生相应的级联反应,引发细胞后续功能性反应^[12-14]。卢鼎厚先生从上世纪70年代初期通过学习陕西省一位针灸医生用“阿是穴斜刺温针”的方法,继承并发展了《黄帝内经》的《灵枢》中记载的治疗方法:从“以痛为腧”发展为“以劳损肌束为腧”为主、以“痛”为辅,这就是“以劳损肌束为腧穴的阿是穴-斜刺”。三十多年来采用斜刺针法治疗骨骼肌运动损伤,获得了显著的疗效。从进针的角度看,我们团队沿袭卢鼎厚教授所采用的针刺方法确实与传统针刺的直刺、斜刺和平刺法的进针角度均存在一定差异。我们参照1989年卢鼎厚教授^[2]的斜刺进针手法:进针时,沿肌肉的长轴,针体不宜过分倾斜,着重注意保持针的斜行走向,使针能准确地刺入损伤的肌肉,不提插捻转。近年来,我们团队在王瑞元教授^[3,5]带领下在后续大量实验研究中发现,采取上述方法斜刺大鼠股四头肌和比目鱼肌时,针与皮肤间的倾斜角均约30°为宜,能够治疗肌肉损伤,缓解大负荷运动后DOMS症状,促进骨骼肌机能恢复。故学生在研究中也沿用这一手法进行针刺干预。

段昌平等^[14]通过人体肌肉活检发现,在大负荷运动后对肌肉进行针刺,可以抑制线粒体肿胀,使线粒体数量增多,缓解肌痉挛,从而促进肌纤维超微结构恢复,对DOMS有较好的缓解作用。张建国等^[4]比较

直刺和斜刺两种方法对大负荷斜蹲后骨骼肌超微结构的作用异同,结果显示,在大负荷斜蹲后骨骼肌超微结构改变主要表现为大范围的Z带变化,还可见肌丝及溶酶体等方面的变化,在斜蹲后进行直刺和斜刺干预均可对Z带和肌丝的变化产生良好影响,且斜刺的效果优于直刺。潘华山等^[15]报道了大鼠运动性疲劳后骨骼肌线粒体病理变化显著,线粒体空泡样变且数量较少,嵴及嵴上颗粒消失明显,伴随线粒体功能紊乱,而针刺干预后线粒体数量增多,线粒体结构损伤得以减轻,线粒体膜电位和Ca²⁺含量显著提高。张学林等^[16]通过动物实验发现,针刺干预能修复骨骼肌超微结构损伤,有效治疗大负荷运动引起的骨骼肌过度使用损伤,其效应与增加线粒体数量有关。

本实验在前期研究的基础上,提取离心运动最易损伤的慢肌(比目鱼肌)进行研究,观察斜刺比目鱼肌对其线粒体结构和功能的影响,试图从线粒体的角度来探寻针刺缓解骨骼肌损伤的作用效果及机理。首先,我们沿用卢鼎厚等肌肉斜刺的针刺手法,观察了运动针刺后比目鱼肌线粒体的结构变化。结果可见,大负荷运动后比目鱼肌线粒体出现明显肿胀、肌膜下积聚等超微结构异常变化,呈现双层膜结构的自噬体形成增多并随时间延长又逐渐减少,且运动后的这种变化具有明显的时相性。然而,针刺处理后即刻,骨骼肌线粒体呈现轻微损伤性改变,运动针刺后12h,线粒体损伤表现比单纯运动后12h较轻,自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体。运动针刺后24—48h,线粒体结构逐渐向正常结构恢复,仍

可见少量的自噬溶酶体。但单纯运动后48h线粒体再次出现损伤表现,未有自噬溶酶体形成。提示,运动后针刺干预对运动导致的线粒体结构破坏有缓解作用,自噬体积累的情况得到明显改善,能见到与溶酶体融合的自噬体,促进了骨骼肌线粒体结构的恢复。另外,大负荷运动引起过度的线粒体自噬,过多的自噬体与线粒体结合,而运动后针刺干预后有自噬溶酶体形成,可能由于针刺减弱了大负荷运动诱导的线粒体自噬程度,改善了自噬流。

其次,线粒体的形态结构是其功能活动的物质基础。本研究我们发现大负荷运动后大鼠比目鱼肌线粒体结构出现明显肿胀、嵴断裂等异常改变,同时线粒体功能受到严重抑制,出现能量代谢障碍。此结果可能与其作用于线粒体损伤三大途径有关。本实验前期研究分别从MPTP开放途径和线粒体动力学途径进行了探索,赵晓琴等^[17]通过激光共聚焦显微镜观察到,针刺干预能明显减小一次大负荷运动后骨骼肌MPTP的开放程度;于滢等^[18]发现,一次大负荷运动导致线粒体动力学异常,出现融合与分裂的失衡,运动后给予针刺处理能明显上调Mfn蛋白表达,下调Drp1的水平,使线粒体的融合与分裂活跃。以上说明,大负荷运动后进行针刺干预不仅能有效地抑制骨骼肌MPTP的异常开放,还可改善线粒体动力学状态。然而,关于大负荷运动导致线粒体能量代谢途径异常的相关研究极少。我们发现,一次大负荷运动后不同时相骨骼肌线粒体数量呈现减少趋势,线粒体呼吸链复合体Ⅱ、Ⅳ活性以及亚基Ⅰ(cytochrome c oxidase subunit I, COX I)蛋白表达出现一过性的下调,导致线粒体功能破坏,出现能量供应障碍。在此基础上,本实验进一步对运动后大鼠进行针刺处理,观察比目鱼肌线粒体能量代谢功能的变化。

本研究发现,A组在处理后的CS含量整体上呈现先增加再减少的趋势,各时相与C组相比均无明显差异。提示,针刺对正常骨骼肌组织线粒体数量可能没有影响。EA组在处理后的CS含量总体呈先减少再逐渐增多的趋势,且总体上EA组各时相CS含量均高于E组相应时间点,其中48h和72h分别增多了19.2%、19.8%。提示运动后施加针刺能有效增加运动后线粒体的数量,这与段昌平^[14]、张学林^[16]等学者的

的研究结果一致。

在利用CS含量对呼吸链复合体活性进行标准化后,我们还发现A组在处理后的复合体Ⅱ、Ⅳ的活性整体都呈现先降低后升高的趋势,各时相与C组相比均无显著性差异。提示,针刺对正常骨骼肌组织复合体Ⅱ、Ⅳ的活性可能没有影响。EA组在处理后的复合体Ⅱ、Ⅳ的活性均呈现围绕C组水平上下波动的趋势,且各时相与C组相比无明显差异。整体上,EA组各时程复合体Ⅱ、Ⅳ的活性均高于E组相应时间点,其中,复合体Ⅱ的活性在处理后的24h比E组显著升高了98%。而呼吸链复合体Ⅳ最大的亚基Ⅰ,其定位在线粒体内膜上,由线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)编码,受损后会导致电子传递障碍,直接影响线粒体功能^[19]。我们发现单纯针刺后COX I变化不大,运动针刺后COX I蛋白表达则出现微弱的上调趋势。由此说明,针刺可通过增加骨骼肌线粒体数量和改善线粒体能量代谢障碍,从而减轻大负荷运动对线粒体功能的损害。

本研究证实了骨骼肌线粒体损伤与运动性骨骼肌损伤之间具有密切的相关性,针刺干预能通过改善骨骼肌线粒体超微结构及线粒体损伤三大途径的异常,抑制线粒体数量的减少,进而改善线粒体功能及能量代谢。

参考文献

- [1] 张学林. 骨骼肌过劳性损伤组织学成因及针刺预防和治疗效应[D]. 北京体育大学博士学位论文, 2010.
- [2] 卢鼎厚, 张志廉. 斜刺对骨骼肌损伤的治疗作用[J]. 中国针灸, 1989, (6): 281—284.
- [3] 王瑞元. 一次力竭性离心运动后大鼠骨骼肌 α -actin代谢、 α -actin和MHC基因表达对其影响[D]. 北京体育大学博士学位论文, 2000.
- [4] 张建国, 卢鼎厚, 樊景禹. 针刺(直刺、斜刺)对大负荷斜蹲后骨骼肌超微结构变化的影响[J]. 体育科学, 1988, 3(1): 61—64.
- [5] 罗丽娜. Rho GTPase/cofilin信号通路在急性离心运动诱导骨骼肌解聚及针刺干预中的作用[D]. 北京体育大学博士学位论文, 2012.
- [6] Martin LJ. Mitochondrial and cell death mechanisms in neurodegenerative diseases[J]. Pharmaceuticals(Basel), 2010, 3(4): 839—915.
- [7] Østergaard E, Wibrand F, Horn N, et al. Mitochondrial diseases. Clinical features, investigation and genetics[J]. Ugeskr Laeger, 2003, 165(7): 663—668.
- [8] Nicholls DG. Mitochondrial function and dysfunction in the cells: its relevance to aging and aging-related disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(11): 1372—1381.

- [9] 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.
- [10] Hargreaves IP, Duncan AJ, Wu L, et al. Inhibition of mitochondrial complex IV leads to secondary loss complex II-III activity: implications for the pathogenesis and treatment of mitochondrial encephalomyopathies[J]. Mitochondrion, 2007, 7(4): 284—287.
- [11] Picard M, Jung B, Liang F, et al. Mitochondrial dysfunction and lipid accumulation in the human diaphragm during mechanical ventilation[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(11): 1140—1149.
- [12] Langevin HM, Churchill DL, Cipolla MJ. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture[J]. FASEB J, 2001, 15(12): 2275—2282.
- [13] Langevin HM, Yandow JA. Relationship of acupuncture points and meridians to connective tissue planes[J]. Anat Rec, 2002, 269(6): 257—265.
- [14] 段昌平. 针刺和静力牵张对延迟性酸痛过程中骨骼肌超微结构的影响[J]. 北京体育学院学报, 1984, (4): 8—19.
- [15] 潘华山, 汶希, 冯毅翀, 等. 针刺对运动疲劳大鼠骨骼肌线粒体形态和游离 Ca^{2+} 的影响[J]. 北京体育大学学报, 2011, 34(10): 59—61.
- [16] 张学林, 史冀鹏, 高晓娟, 等. 针刺对离心运动性骨骼肌过度使用损伤的治疗研究[J]. 中国运动医学杂志, 2013, 32(10): 899—908.
- [17] 赵晓琴. Omi在离心运动诱导骨骼肌细胞凋亡及针刺干预中的作用[D]. 北京体育大学博士学位论文, 2014.
- [18] 于滢. 一次大负荷运动对大鼠骨骼肌线粒体分布和功能影响及针刺干预作用[D]. 北京体育大学博士学位论文, 2015.
- [19] Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, et al. Genetic defects of cytochrome C oxidase assembly[J]. Physiol Res, 2004, 53 Suppl 1: S213—223.

(上接第895页)

治疗作用是否可以减少细胞凋亡,提高轴突、髓鞘再生。随着未来的研究,超短波治疗促进脊髓损伤功能恢复的机制将更加深入,超短波将可能成为综合治疗脊髓损伤安全有效的物理方法之一。

参考文献

- [1] Yin YM, Lu Y, Zhang LX, et al. Bone marrow stromal cells transplantation combined with ultrashortwave therapy promotes functional recovery on spinal cord injury in rats[J]. Synapse, 2015, 69(3): 139—147.
- [2] Zhang LX, Tong XJ, Sun XH, et al. Experimental study of low dose ultrashortwave promoting nerve regeneration after acellular nerve allografts repairing the sciatic nerve gap of rats[J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2008, 28(4): 501—509.
- [3] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column[J]. A Preliminary Report, 1911, 57(10): 878—880.
- [4] Popa C, Popa F, Grigorean VT. Vascular dysfunctions following spinal cord injury[J]. J Med Life, 2010, 3(3): 275—285.
- [5] Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(2): 236—242.
- [6] Jin K, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling[J]. J Neurobiol, 2006, 66: 236—242.
- [7] Rosenstein JM, Krum JM, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system[J]. Organogenesis, 2010, 6(2): 107—114.
- [8] Leonard MG, Gulati A. Endothelin B receptor agonist, IRL-1620, enhances angiogenesis and neurogenesis following cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res, 2013, 1528: 28—41.
- [9] des Rieux A, De Berdt P, Ansorena E, et al. Vascular endothelial growth factor-loaded injectable hydrogel enhances plasticity in the injured spinal cord[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014, 102(7): 2345—2355.
- [10] Jain A, McKeon RJ, Brady-Kalnay SM, et al. Sustained delivery of activated Rho GTPases and BDNF promotes axon growth in CSPG-rich regions following spinal cord injury[J]. PLoS One, 2011, 6(1): 24—25.
- [11] Jin GZ, Cho SJ, Lee YS, et al. Intrastriatal grafts of mesenchymal stem cells in adult intact rats can elevate tyrosine hydroxylase expression and dopamine levels[J]. Cell Biol Int, 2009, 34(1): 135—140.
- [12] Ji XC, Dang YY, Gao HY, et al. Local injection of lentiviral BDNF at the lesion site promotes M2 macrophage polarization and inhibits inflammatory response after spinal cord injury in mice[J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 5(6): 881—890.
- [13] 周淑华, 蒋小燕, 杨朝晖, 等. 超短波对兔急性肺损伤肺内小动脉血管壁的保护作用[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25(10): 581—582.
- [14] 谭龙, 高文山, 席阿丽, 等. 超短波治疗大鼠断尾再植后血管危象的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2012, 26(10): 1227—1231.
- [15] Pang CJ, Tong L, Ji LL, et al. Synergistic effects of ultrashort wave and bone marrow stromal cells on nerve regeneration with acellular nerve allografts[J]. Synapse, 2013, 67(10): 637—647.