

痉挛型瘫痪大鼠骨骼肌肌球蛋白重链亚型的蛋白表达研究

史姗姗^{1,2} 卢淑卿¹ 刘师宇¹ 刘东海³ 庞伟^{1,4,5,6}

摘要

目的:探讨痉挛型瘫痪大鼠骨骼肌肌球蛋白重链亚型的蛋白水平。

方法:将50只5d龄新生Sprague-Dawley大鼠随机分成假手术组和模型组,每组25只。建模后大鼠20日龄时,HE染色观察锥体束病理损伤情况,Western blotting检测瘫痪侧比目鱼肌和腓肠肌中MHC-I、MHC-IIb蛋白的表达。

结果:与假手术组相比,模型组大鼠患侧肢体屈曲痉挛、走路缓慢、跛行,HE染色显示仅锥体束处出现细胞坏死、核固缩;模型组比目鱼肌MHC-I蛋白表达(3.78 ± 0.32)显著高于假手术组(0.24 ± 0.11), $P<0.001$;模型组腓肠肌MHC-I蛋白表达(3.68 ± 0.28)显著高于假手术组(2.34 ± 0.26), $P<0.001$;模型组比目鱼肌MHC-IIb蛋白表达(0.34 ± 0.16)显著低于假手术组(0.77 ± 0.21), $P<0.001$;模型组腓肠肌MHC-IIb蛋白表达(0.32 ± 0.18)显著低于假手术组(0.78 ± 0.22), $P<0.001$ 。

结论:痉挛状态下大鼠骨骼肌肌球蛋白重链亚型MHC-I蛋白高表达、MHC-IIb蛋白低表达。

关键词 痉挛;瘫痪;骨骼肌;肌球蛋白重链

中图分类号:R442.6,R742.3,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2019)-06-0631-05

Expression of myosin heavy chain in skeletal muscle in rats with spastic paralysis/SHI Shanshan, LU Shuqing, LIU Shiyu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(6): 631—635

Abstract

Objective: To investigate the protein level of myosin heavy chain subtype in skeletal muscle of spasmodic paralytic rats

Method: Fifty Sprague-Dawley rats aged 5 days were randomly divided into sham operation group and model group, with 25 rats in each group. After the modeling, when the rats were 20 days, HE staining was used to observe the pathological damage at the pyramidal tract. Western blotting was used to detect the expression of MHC-I and MHC-IIb proteins in the paralyzed flounder muscle and gastrocnemius muscle.

Result: Compared with the sham group, the rats in the model group suffered from lateral limb flexion spasm, slow walking and claudication. The expression of MHC-I protein was significantly higher in the model group than in the sham group (0.24 ± 0.11) ($P<0.001$). MHC-I protein expression in the model group was significantly higher than that in the sham group (2.34 ± 0.26) ($P<0.001$). The expression of MHC-IIb protein in the soleus muscle of the model group (0.34 ± 0.16) was significantly lower than that of the sham group (0.77 ± 0.21) ($P<0.001$). The expression of MHC-IIb protein in the model group was significantly lower than that in the sham group (0.78 ± 0.22) ($P<0.001$).

Conclusion: Skeletal muscle myosin heavy chain subtype MHC-I protein was highly expressed and MHC-IIb protein was lowly expressed in rats with spastic paralysis.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.06.002

1 佳木斯大学康复医学院,黑龙江佳木斯市,154007; 2 首都医科大学附属北京康复医院; 3 佳木斯大学临床医学院; 4 佳木斯大学儿童康复神经实验室; 5 通讯作者; 6 佳木斯大学附属第三医院

作者简介:史姗姗,女,硕士研究生; 收稿日期:2018-08-27

Author's address The Rehabilitation Medical College of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, 154007

Key word spastic; paralysis; skeletal muscle; myosin heavy chain

脑性瘫痪(cerebral palsy, CP)简称脑瘫,由发育不成熟的大脑(产前、产时或产后)先天性发育缺陷(畸形、宫内感染)或获得性(早产、低出生体重、窒息、缺氧缺血性脑病、核黄疸、外伤、感染)等非进行性脑损伤所致^[1]。在脑性瘫痪的分型里,痉挛型脑瘫所占比例最多,并且儿童不像成人会有更多的主诉和极高的配合度,在评测肌力以及肌张力时难免会产生主观误差,所以定性定量的指标更为需要,研究痉挛型瘫痪大鼠痉挛肌肌球蛋白重链亚型的蛋白表达,未来可以作为评测肌张力程度的一个指标或参考。哺乳动物骨骼肌的收缩特征由肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)亚型决定,肌纤维类型可以通过运动负荷、血液灌注、神经支配或能量代谢改变使MHC亚型发生相互转换而改变^[2-5]。本研究从分子水平探讨痉挛状态下大鼠骨骼肌肌球蛋白重链亚型的蛋白表达水平,为基础研究和临床康复提供启示。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

足月新生5d龄清洁级SD大鼠50只,哈尔滨医科大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(黑)2013-001。雌雄不计,体重9—12g,饲养于佳木斯大学动物实验饲养中心。将大鼠随机分为假手术组和模型组。

1.2 主要仪器和试剂

ST-5ND-B 脑立体定位仪:成都仪器厂。微量进样器:上海高鸽工贸有限公司。DYCZ-24DN型蛋白凝胶电泳仪、DYCZ-40D型转印电泳仪:北京六一仪器厂。RM2235型切片机:德国LEICA公司。无水乙醇:天津市凯通化学试剂有限公司。MHCI、MHC-II b、 β -actin抗体:沈阳WANLEIBIO公司。羊抗兔IgG-HRP:中国BEYOTIME公司。PVDF膜:美国MILLIPORE公司。

1.3 动物模型制备

1.3.1 痉挛型瘫痪大鼠模型的制备:通过脑立体定位仪向大鼠头颅锥体束定位注射无水乙醇,锥体束的定位参照大鼠脑立体定位图谱^[6]。选定术中大鼠

颅骨的定位坐标数值为:对耳线后1500 μ m,矢状缝左侧500 μ m,腹侧11500 μ m。模型组注射2.5 μ l无水乙醇,假手术组注射2.5 μ l生理盐水。

1.3.2 手术结果:制备模型过程中,由于定位坐标数值十分精确,但大鼠之间存在个体差异,操作过程中难免有各种原因导致的失误和误差。术后假手术组死亡6只,存活19只,模型组死亡7只,存活18只。

1.3.3 临床表现:分别于7d龄和20d龄观察两组大鼠的临床表现。

1.4 HE染色

灌注取脑后取锥体束进行石蜡包埋、染色。

两组大鼠分别于20d龄在提取完肌肉组织后做心脏灌注,断头取脑,蒸馏水冲洗,4%多聚甲醛溶液固定后,常规石蜡包埋,4 μ m厚度切片。石蜡组织切片常规脱蜡,二甲苯I、II、III,每次10min;100%、95%、75%梯度酒精水化,每次5min;双蒸水洗片2次,每次2min;苏木素染色5min,流水冲洗1min;1%盐酸乙醇分化3s,流水冲洗1min;置伊红液中2min,流水冲洗3min;酒精由低至高梯度脱水,二甲苯透明,干燥后中性树脂封片。光镜下拍照观察。

1.5 Western blotting

20d龄时,两组分别提取右侧下肢的比目鱼肌和腓肠肌,放入液氮中冻存,留待Western blotting检测。

称取20mg组织并加入180 μ l的裂解液,用研磨机将组织研碎后,静置30min(4 $^{\circ}$ C),12000rpm离心10min(4 $^{\circ}$ C),取上清液。用BCA法检测蛋白质的浓度,加入5 $\times$ SDS-PAGE蛋白上样缓冲液后放入95 $^{\circ}$ C的水浴锅中水浴10min充分变性后恢复至室温。将样本于SDS-PAGE凝胶电泳,电泳至溴酚蓝离胶板最下端1cm处停止。并按照marker和目的蛋白的分子量来切胶。转膜:将PVDF膜裁剪合适的大小,用甲醇浸润15s,按照阴极-纤维层-滤纸-胶-PVDF膜-滤纸-纤维层-阳极顺序制作“三明治”,恒流270mA进行电转。转膜完毕后放入5%脱脂奶粉封闭1.5h(37 $^{\circ}$ C)。一抗孵育4 $^{\circ}$ C过夜。TBST 5min/遍,洗3遍。二抗室温孵育1h。TBST 5min/遍,洗3遍,ECL曝光。

1.6 统计学分析

数据采用SPSS17.0统计软件进行处理。计量资料采用均数±标准差表示,两组间比较符合正态分布采用 t 检验,不符合正态分布采用秩和检验。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 临床表现

造模后2d(7d龄),两组大鼠临床表现各异。与假手术组相比,模型组大鼠表现精神差、吸吮不佳、活动减少,出现抽搐、翻滚、震颤等异常的神经行为表现,右侧肢体屈曲、痉挛。20d龄时,与假手术组比较,模型组大鼠走路速度缓慢、画圈、跛行、右侧肢体被动活动时表现出肌张力增高。

2.2 HE染色

光镜下假手术组神经元形态正常,胞核大而规整,核膜、核仁清晰可见。模型组表现为细胞坏死及核固缩。见图1。

2.3 Western blotting

20d龄时,与假手术组比较,模型组比目鱼肌MHC-I蛋白表达显著高于假手术组, $P<0.001$;模型组腓肠肌MHC-I蛋白表达显著高于假手术组, $P<0.001$;模型组比目鱼肌MHC-IIb蛋白表达显著低于假手术组, $P<0.001$;模型组腓肠肌MHC-IIb蛋白表达(0.32 ± 0.18)显著低于假手术组, $P<0.001$ 。见图2,表1。

图1 两组大鼠锥体束HE染色 ($\times 200$)

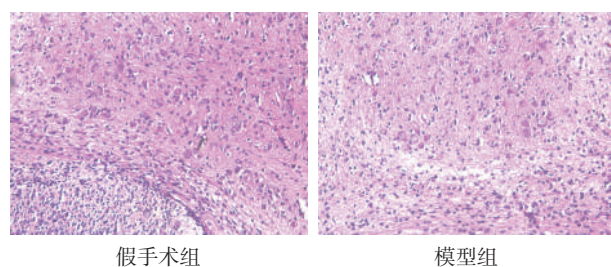
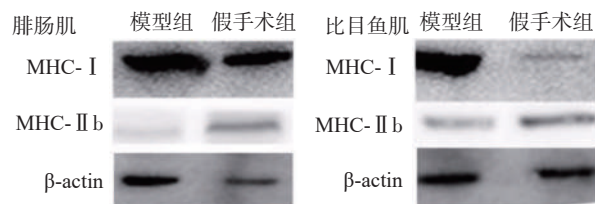


表1 两组大鼠骨骼肌MHC-I、MHC-IIb蛋白表达($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	比目鱼肌		腓肠肌	
		MHC-I	MHC-IIb	MHC-I	MHC-IIb
假手术组	19	0.24±0.11	0.77±0.21	2.34±0.26	0.78±0.22
模型组	18	3.78±0.32	0.34±0.16	3.68±0.28	0.32±0.18
t		-49.84	7.12	-13.08	3.805
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

图2 两组大鼠骨骼肌MHC-I、MHC-IIb蛋白表达



3 讨论

肌张力增高是痉挛型脑瘫的主要特征,病变部位涉及大脑皮质和锥体束^[7]。啮齿类动物7d龄大鼠仔鼠的发育水平相当于人类的足月婴儿(怀孕36—40周)^[8]。本实验采用5d龄新生大鼠制作模型,符合脑性瘫痪损伤的时间窗,且造成的锥体束的坏死损伤是永久性的,定位准确,损伤位置固定,大鼠痉挛症状典型,此模型值得应用。有研究显示,由缺血缺氧造成的大鼠脑损伤症状的严重程度受性别和受损的大脑半球影响,并且这种影响仅表现在3d龄新生雌性大鼠左大脑半球受损有显著的认知障碍,7d龄后雌雄大鼠表现并无差异^[9]。这是本实验未考虑雌雄分组的原因,但在实验设计中,诸如动物年龄,性别和半球受损等关键变量仍然很少受到关注,这也将成为未来实验中研究的一个重点方向。本实验采用向锥体束处注射无水乙醇的方法造成其坏死而导致大鼠对侧肢体痉挛,为了排除因注射液体导致大鼠脑组织肿胀、坏死,本实验采用注射生理盐水作为对照;由于本实验的注射剂量很小,只有5μl,此外,根据实验后大鼠的临床表现及HE染色结果,都能说明大鼠的痉挛症状是由于注射无水乙醇造成锥体束损伤所致,而小剂量的生理盐水对大鼠锥体束无影响,这可能是因为经过一段时间的自身修复,即使当时造成了微弱的损伤也得到了自身的修复,但这仍需要进一步验证。20d龄大鼠的脑重量相当于人类2—3岁的儿童的发育水平,且这个时期的大鼠髓鞘形成率达到峰值,神经递质和受体发生变化^[10—12]。3周龄时啮齿类动物大脑的再生能力降低到与成年期相当或甚至更低的水平,仍然发育中的大脑无法补偿因损伤而损失的神经元^[13]。故本实验选择在大鼠20d龄时对其患侧比目鱼肌和腓肠肌肌球

蛋白重链的蛋白检测、HE染色。

哺乳动物骨骼肌的收缩特征由肌球蛋白重链(MHC)决定,MHC分为4个亚型(MHC-I、MHC-II a、MHC-II x、MHC-II b),MHC-I属于慢收缩氧化型,MHC-II属于快收缩氧化酵解型,MHC-II x见于妊娠30周之前,是较少的未分化纤维,MHC-II b属于快收缩酵解型^[14]。慢肌纤维主要表达MHC-I亚型,因此它们具有较强的有氧能力但收缩速度较慢,从而导致较长的收缩持续时间和较高的抗疲劳能力;相反,快肌纤维主要表达MHC-II亚型,因而具有较强的厌氧容量和更高的局部张力但容易疲劳和持续收缩的时间短^[15]。成年大鼠慢性比目鱼肌由大约80%的慢肌纤维(I型)和20%的快肌纤维(II a型)和少量未分化纤维(II x)组成^[16-17]。

成熟的成年哺乳动物的骨骼肌即使在发育完成之后均保持高度可塑性,运动可以影响肌纤维类型的组成和分布。例如,增加的神经肌肉活动导致MHC亚型从快速肌肉纤维转变为慢速肌肉^[18]。而不活动导致MHC表达和相关的代谢性质在I→II a→II x→II b的顺序发生变化,即不活动导致肌纤维类型由慢肌向快肌纤维转化^[19]。8周的电动跑台耐力训练使大鼠腓肠肌MHC-II a增多,而比目鱼肌无变化;跖肌MHC-II b减少,MHC-II a增多^[20]。每次训练至少60min维持10周的耐力训练使大鼠比目鱼肌MHC-I显著增多,MHC-II a减少^[21]。3个月的耐力训练可以使MHC-II a增多,MHC-II x减少;8个月的耐力训练使MHC-II x显著减少,MHC-I增多;停训3个月后,各亚型的比例逐渐恢复^[22]。痉挛型骨骼肌收缩时肌纤维的募集异于正常骨骼肌^[23]。痉挛肌肌纤维主要表现为以MHC-I亚型为主^[24]。也有研究显示,痉挛型瘫痪大鼠骨骼肌MHC-I mRNA高表达^[25]。本实验支持以上结论,与假手术组相比,模型组比目鱼肌和腓肠肌中MHC-I蛋白均为高表达。

对于骨骼肌肌球蛋白重链亚型之间的转化机制,近年来也有许多研究。在后肢卸载的大鼠比目鱼肌中MHC-I mRNA表达的快速下降与AMPK去磷酸化有关^[26]。在阻力训练中,补充肌酸(creatine, Cr)可以消除运动诱发的MHC亚型之间的相互转化,维持慢肌肌肉MHC-I的表达,有利于耐力运动

员肌肉氧化能力的维持^[27]。神经生长因子(nerve growth factor, NGF),脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和神经营养因子-3(Neurotrophins-3, NT-3)是神经营养因子家族三个重要成员,NGF, BDNF和NT-3通过调节钙调磷酸酶-FNAT信号通路的活性来调节比目鱼肌和纹状体神经元的基因表达^[28]。不同类型的神经营养因子的表达和分布以及它们在确定肌纤维类型中的各自作用还需要进一步探索。NGF转染可以促进NGF和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白的表达,这不仅可以诱导血管生成,还可以诱导缺血肢体中的I型肌纤维表达^[29]。在新生动物的神经肌肉系统发育期间BDNF表达显示在运动神经元和快速抽动的MHC-II b肌肉纤维的存活和成熟中发挥重要作用^[30]。在新生儿腓肠肌中,MHC-II b纤维比例比比目鱼肌高,其中BDNF水平较高^[31]。

近年来,国内外学者对正常骨骼肌纤维类型之间的相互转换机制做了大量研究,但是很少有探讨痉挛型骨骼肌肌球蛋白重链亚型之间的相互转化机制是否与正常的相同。而研究痉挛型骨骼肌中肌球蛋白重链亚型的分布及转化机制具有重要意义,这不仅可以作为评价痉挛程度的一个参考的指标,而且在了解其转化机制的同时,可能会找到治疗痉挛的突破口。

参考文献

- [1] 中国康复医学会儿童康复专业委员会.中国脑性瘫痪康复指南(2015)[J].中国康复医学杂志,2015,30(7):747—754.
- [2] Furrer R, de Haan A, Bravenboer N, et al. Effects of concurrent training on oxidative capacity in rat gastrocnemius muscle[J]. Med Sci Sports Exerc, 2013,45:1674—1683.
- [3] Matsakas A, Yadav V, Lorca S, et al. Revascularization of ischemic skeletal muscle by estrogen-related receptor- γ Circ Res[J]. Circ Res,2012, 110(8): 1087—1096.
- [4] Chakkalakal JV, Kuang S, Buffelli M, et al. Mouse transgenic lines that selectively label Type I, Type II A, and Types II X+B skeletal muscle fibers[J]. Genesis, 2012,50: 50—58.
- [5] Sillen MJ, Franssen FM, Gosker HR, et al. Metabolic and structural changes in lower-limb skeletal muscle following neuromuscular electrical stimulation: A systematic review[J].

- PLoS One, 2013,8:e69391.
- [6] Paxinos, George, Watson, et al. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. Elsevier Academic Press,2001.
- [7] 李晓捷.实用小儿脑性瘫痪康复治疗技术[M]. 第2版.北京:人民卫生出版社,2016.8.
- [8] Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt[J]. Early Hum Dev, 1979, 3(1):79—83.
- [9] Sanches EF, Arteni N, Nicola F, et al. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats[J]. Neuroscience, 2015, 290:581—593.
- [10] Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, et al. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study[J]. Nature Neuroscience,1999,2:861—863.
- [11] Keshavan MS, Diwadkar VA, DeBellis M, et al. Development of the corpus callosum in childhood, adolescence and early adulthood[J]. Life Science, 2002,70:1909—1922.
- [12] Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby?[J]. Early Human Development,1991, 26:61—67.
- [13] Qiu L, Zhu C, Wang X, et al. Less neurogenesis and inflammation in the immature than in the juvenile brain after cerebral hypoxia-ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(4): 785—794.
- [14] Margareta Nordin, VictorH Frankel. Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System [M]. Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 100—111.
- [15] Trapani L, Melli L, Segatto M, et al. Effects of myosin heavy chain (MHC) plasticity induced by HMGCoA-reductase inhibition on skeletal muscle functions[J]. FASEB J, 2011, 25:4037—4047.
- [16] Pullen AH. The distribution and relative sized of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat[J]. J Anat, 1977, 123(Pt 2):467—486.
- [17] Tasic D, Dimov D, Gligorijevic J. Muscle fiber types and fiber morphometry in the tibialis posterior and anterior of the rat, A comparative study[J]. Medicine and Biology, 2003,10: 16—21.
- [18] Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions[J]. Int Rev Cytol, 1997, 170: 143—223.
- [19] Talmadge RJ. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms[J]. Muscle Nerve, 2000, 23(5):661—679.
- [20] Sullivan VK, Powers SK, Criswell DS, et al. Myosin heavy chain composition in young and old rat skeletal muscle: effects of endurance exercise[J]. J Appl Physiol, 1995, 78(6):2115—2120.
- [21] Demirel HA, Powers SK, Naito H, et al. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship[J]. J Appl Physiol, 1999, 86(3):1002—1008.
- [22] Serrano AL, Quiroz-Rothe Rivero JL. Early and long-term changes of equine skeletal muscle in response to endurance training and detraining[J]. Pflugers Arch, 2000, 441(2—3): 263—274.
- [23] 王玉昌,庞伟,冯欢欢,等. 痉挛型瘫痪大鼠骨骼肌DNA甲基化水平与肌纤维构型[J]. 中国康复理论与实践,2015,21(5): 519—523.
- [24] Klyen BR, Scolaro L, Shavlakadze T, et al. Optical coherence tomography can assess skeletal muscle tissue from mouse models of muscular dystrophy by parametric imaging of the attenuation coefficient[J]. Biomed Opt Express, 2014, 19;5(4):1217—1232.
- [25] 王玉昌,庞伟,冯欢欢,等. 痉挛型大鼠骨骼肌不同功能状态下表面肌电特征性变化的研究[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(14): 2658—2662.
- [26] Vilchinskaya NA, Mochalova EP, Nemirovskaya TL, et al. Rapid decline in MyHC I(β) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation[J]. J Physiol, 2017, 595(23):7123—7134.
- [27] Aguiar AF, Aguiar DH, Felisberto AD, et al. Effects of creatine supplementation during resistance training on myosin heavy chain(MHC) expression in rat skeletal muscle fibers[J]. J Strength Cond Res, 2010, 24(1): 88—96.
- [28] Wenfeng Liu, Gan Chen, Fanling Li, et al. Calcineurin-NFAT signaling and neurotrophins control transformation of myosin heavy chain isoforms in rat soleus muscle in response to aerobic treadmill training[J]. J Sports Sci Med, 2014, 13(4): 934—944.
- [29] Diao YP, Cui FK, Yan S, et al. Nerve growth factor promotes angiogenesis and skeletal muscle fiber remodeling in a murine model of hindlimb ischemia[J]. Chin Med J (Engl), 2016, 129(3): 313—319.
- [30] Mousavi K, Parry DJ, Jasmin BJ. BDNF rescues myosin heavy chain II B muscle fibers after neonatal nerve injury [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(1):C22—29.
- [31] Nagano M, Suzuki H. Quantitative analyses of expression of GDNF and neurotrophins during postnatal development in rat skeletal muscles[J]. Neurosci Res, 2003, 45(4):391—399.