

· 基础研究 ·

减重平板步行训练对脊髓横断大鼠骨骼肌细胞凋亡与萎缩的影响

范晓华 纪树荣 周红俊 张樱

【摘要】目的 研究细胞凋亡是否参与脊髓损伤引起的骨骼肌萎缩过程,观察减重平板步行训练对骨骼肌萎缩及超微结构的影响。**方法** 将 70 只雌性 Wistar 大鼠随机分为对照组与脊髓横断 7 d 组(简称横断 7 d 组)、横断 15 d 组、横断 30 d 组以及脊髓横断 5 d 训练 2 d 组(简称训练 2 d 组)、训练 10 d 组、训练 25 d 组。对照组未给予特殊处理,余 6 组行 T₈₋₁₀ 水平脊髓完全横断,各训练组大鼠于脊髓横断 5 d 后进行减重平板步行训练。采用 TUNEL 方法检测比目鱼肌肌细胞凋亡情况,采用透射电镜观察肌纤维超微结构变化。**结果** 实验大鼠脊髓横断后,其比目鱼肌 TUNEL 阳性细胞核数量较对照组及相应时间点训练组均明显增多($P < 0.05 \sim 0.001$);电镜观察发现,随着脊髓横断时间延长,萎缩肌纤维数量逐渐增多,肌节与肌丝排列紊乱加重,细胞核形态不规则,毛细血管管腔狭窄;经减重平板步行训练后上述改变有所改善。**结论** 细胞凋亡参与脊髓损伤后引发的骨骼肌萎缩过程;减重平板步行训练能够抑制肌细胞凋亡、缓解肌萎缩,改善肌肉血供。

【关键词】 脊髓横断; 比目鱼肌; 细胞凋亡; 肌萎缩; 减重平板步行训练

The effect of spinal cord transection and body-weight-supported treadmill training on cell apoptosis and atrophy of rat soleus muscle FAN Xiao-hua*, JI Shu-rong, ZHOU Hong-jun, ZHANG Ying. * Department of Rehabilitation Medicine, Shandong Provincial Hospital, Jinan, 250021, China

【Abstract】Objective To study whether cell apoptosis is involved in the process of skeletal muscle atrophy, and observe the effect of body-weight-supported treadmill training (BWSST) on skeletal muscle ultramicrostructure after spinal cord transection (ST). **Methods** A total of 70 healthy adult female Wistar rats were divided randomly into 7 groups: a control group, a spinal transection (ST) group consisted of 3 subgroups observing for 7, 15, 30 days, respectively, and a training group subdividing into 3 subgroups observing for 2, 10, 25 days starting from 5 days after spinal transection. The rats in the control group did not undergo surgery, while those in the other groups underwent a complete spinal transection at the thoracic level (T₈ ~ T₁₀). Five days after the ST, BWSST was employed to treat the rats in the training group. TUNEL technique was used to measure the myonuclear apoptosis of soleus, and transmission electron microscope was used to observe muscle fiber ultramicrostructure. **Results** The number of TUNEL-positive cell nuclear increased significantly in ST groups as compared with that in the control group and that in the corresponding time points of training group ($P < 0.05 \sim 0.001$). The number of atrophied fibers increased, sarcomeres and myofilaments deranged gradually with the prolonged time after ST, the morphology of myonuclear was irregular, the capillary lumina was narrower than control group. These phenomena were ameliorated after BWSST. **Conclusion** The results showed that cell apoptosis contributed to skeletal muscle atrophy. BWSST could attenuate cell apoptosis, muscle atrophy, and improve blood-supply of muscle.

【Key words】 Spinal cord transection; Soleus; Cell apoptosis; Muscle atrophy; Body-weight-supported treadmill training

由脊髓损伤、后肢悬吊、太空作业、失神经支配等导致的神经肌肉电活动和/或负荷减少均能诱发机体骨骼肌萎缩。有研究报道,骨骼肌萎缩与肌细胞核数量丢失有关^[1-3]。对于细胞凋亡是否参与肌细胞核丢失过程以及减重平板步行训练能否减缓肌细胞凋亡,目前则鲜见相关报道。为此本研究观察了脊髓损伤及减重平板步行训练对大鼠骨骼肌萎缩和肌细胞超微结构的影响。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及脊髓横断模型建立

共选取成年雌性 Wistar 大鼠 70 只(购于山东鲁抗医药集团质检中心实验动物室,清洁级),体重(250 ± 50)g,采用随机数字表法将其分为对照组、脊髓横断 7 d 组(简称横断 7 d 组)、横断 15 d 组、横断 30 d 组以及脊髓横断 5 d 训练 2 d 组(简称训练 2 d 组)、训练 10 d 组和训练 25 d 组,每组 10 只。参照 Talmadge 等^[4]介绍的脊髓横断模型方法,将各实验组大鼠用

作者单位:250021 济南,山东省立医院康复医学中心(范晓华);首都医科大学康复医学院,北京博爱医院(纪树荣,周红俊,张樱)

10%水合氯醛按 30 mg/kg 体重行腹腔注射麻醉,暴露 T₈₋₁₀ 水平对应的脊髓背面与两侧部位,于 T₈₋₁₀ 水平完全横断脊髓组织。各训练组大鼠于脊髓横断 5 d 后开始减重平板步行训练^[5],每天 1 次,每次 30 min,每周 5 次;减重量为大鼠体重的 75%,跑台速度设为 7.0 ~ 10.5 m/min,以后减重量及运动速度依据大鼠实际能力而定。各实验组大鼠分别于脊髓横断 7 d、15 d 及 30 d 时取材,按上述方法麻醉大鼠,仔细分离右侧比目鱼肌,从肌肉右侧中腹处取 1 mm 肌组织置于 2.5% 戊二醛内固定(供电镜观察用),余下肌组织标本则置于含 4% 多聚甲醛、0.1% PBS 缓冲液中固定,经常规石蜡包埋后进行横切面切片。对照组大鼠未给予特殊处理,其标本制备及检测方法同上。

二、肌细胞凋亡的原位检测方法

TUNEL 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。比目鱼肌石蜡切片经常规脱蜡至水,加 1:200 蛋白酶 K (37℃) 消化 15 min;切片加 TdT 和 DIG-dUTP (TUNEL 混合液,20 μl/片),置于湿盒内(37℃)标记 2 h,加封闭液 50 μl/片(30 min);取 1:100 生物素化抗地高辛抗体加至切片上(50 μl/片),置于湿盒中反应 30 min(37℃);然后取 1:100 SABC 加至切片上(50 μl/片),于 37℃ 环境下反应 30 min。用 DAB(二氨基联苯胺)显色 10 ~ 30 min,然后用苏木素轻度复染,蒸馏水洗、梯度酒精脱水、透明、中性树胶封片。阴性对照采用 PBS 缓冲液代替 TUNEL 混合液孵育切片,其它步骤同上;阳性对照采用 TUNEL 染色阳性的乳腺癌组织切片作为标准,并与各实验组切片进行比较。本研究判定凋亡骨骼肌细胞的标准如下:光镜下正常骨骼肌细胞核呈蓝色,凋亡肌细胞核呈深浅不一的棕黄色。在光镜(×400 倍)下计数比目鱼肌纤维横切面 10 个视野范围内的 TUNEL 阳性细胞核数量。

三、电镜标本的制作

取各实验组大鼠比目鱼肌中腹部位约 1 mm 肌组织,经 2% 多聚甲醛-2.5% 戊二醛前固定,1% 锇酸后固定、梯度酒精脱水、置换、环氧树脂 Epon 812 包埋后,进行半薄切片,厚度为 1 μm,经天青-美蓝染色后置于光镜下定位,行超薄切片及醋酸双氧铀/枸橼酸铅染色,将处理好的标本置于 Philips EM 208s 型透射电镜下观察。

四、统计学分析

所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 11.5 版统计学软件包进行分析,计量数据比较选用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

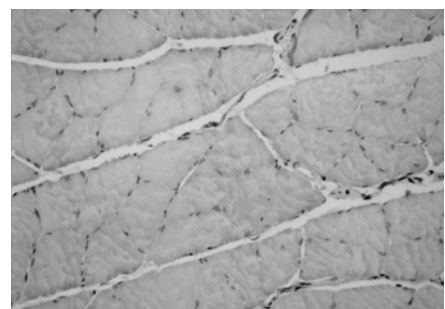
一、各组大鼠肌细胞凋亡情况比较

对照组大鼠比目鱼肌 TUNEL 阳性细胞核很少(表 1、图 1),而横断 7 d 组、横断 15 d 组及横断 30 d 组大鼠 TUNEL 阳性细胞核数量均较对照组明显增多($P < 0.05$),随着脊髓横断时间延长,发现横断 15 d 组和横断 30 d 组 TUNEL 阳性细胞核数量均较横断 7 d 组明显增多($P < 0.01$),但横断 15 d 组与横断 30 d 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果见表 1、图 2。各训练组大鼠经减重平板训练后,除训练 2 d 组与横断 7 d 组间 TUNEL 阳性细胞核数量差异无统计学意义外($P > 0.05$),训练 10 d 组、训练 25 d 组 TUNEL 阳性细胞核数量均较相应时间点处死的横断 15 d 组、横断 30 d 组显著减少($P < 0.05$),具体情况见图 3;各训练组大鼠 TUNEL 阳性细胞核数量仍显著多于对照组($P < 0.05$),具体数据详见表 1。

表 1 各组实验大鼠比目鱼肌 TUNEL 阳性细胞核数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

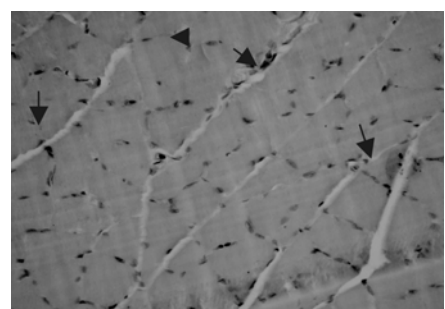
组 别	只数	TUNEL 阳性细胞核数量 (个/10 个高倍镜视野, ×400)
对照组	10	2.10 ± 1.10
横断 7 d 组	10	10.57 ± 3.64 ^a
横断 15 d 组	10	29.88 ± 9.23 ^{ab}
横断 30 d 组	10	34.75 ± 14.3 ^{ab}
训练 2 d 组	10	9.43 ± 3.46 ^{acd}
训练 10 d 组	10	20.14 ± 4.91 ^{abcde}
训练 25 d 组	10	18.71 ± 5.73 ^{abcde}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与横断 7 d 组比较,^b $P < 0.05$;与横断 15 d 组比较,^c $P < 0.05$;与横断 30 d 组比较,^d $P < 0.05$;与训练 2 d 组比较,^e $P < 0.05$



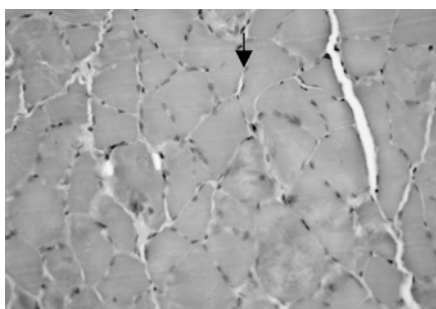
注:仅发现很少 TUNEL 阳性细胞核

图 1 对照组凋亡细胞观察(免疫组化染色, ×400)



注:箭头所指系 TUNEL 阳性细胞核

图 2 横断 15 d 组凋亡细胞观察(免疫组化染色, ×400)



注:箭头所指系 TUNEL 阳性细胞核

图 3 训练 10 d 组凋亡细胞观察(免疫组化染色, $\times 400$)

二、各组大鼠肌细胞超微结构比较

对照组大鼠比目鱼肌纤维、肌丝、肌节排列整齐,明带、暗带清晰,肌细胞核呈梭形,位于肌纤维边缘;未见肌卫星细胞,肌丝间、肌膜下或核周区域均可见散在分布的线粒体,线粒体形态正常,可见线粒体嵴,电子密度不高;毛细血管内皮细胞核扁平,管腔正常无狭窄;肌膜表面可见终板形成很多皱褶,终板内线粒体形态正常,有兴奋性神经递质囊泡(图 4A)。

随着实验大鼠脊髓横断时间延长,其萎缩肌纤维数量逐渐增多,肌节与肌丝排列紊乱现象加剧,如大鼠脊髓横断 7 d 与横断 15 d 时以肌节、肌丝排列紊乱为主,偶见肌丝溶解或肌节破坏、消失;当脊髓横断 30 d 后,发现肌节、肌丝破坏更显著;形态不规则的细胞核数量逐渐增多,核膜凹陷或突起,染色质浓缩边聚,可见成簇链状肌细胞核,核内移现象明显;肌卫星细胞数量随脊髓横断时间延长而增多,细胞核增大,核内染色质积聚,有细胞凋亡现象;肌膜下、肌丝间、核周线粒体减少浓缩,电子密度增高,部分肌纤维肌膜下、肌丝间线粒体聚集增加;毛细血管内皮细胞核数量增多,体积增大明显,管腔狭窄或闭塞现象多见,肌细胞间隙逐渐增宽,肌束间结缔组织增生,可见散在分布的胶原纤维与纤维细胞(图 4B, 4C)。

各训练组大鼠于脊髓横断 5 d 后进行减重平板步行训练,发现大鼠经训练后其萎缩肌纤维数量减少,肌节、肌丝排列紊乱现象好转;各训练组大鼠偶见成簇排列的链状细胞核,形态不规则的细胞核数量明显减少,有轻度核内移现象;其肌卫星细胞数量较相应未给予

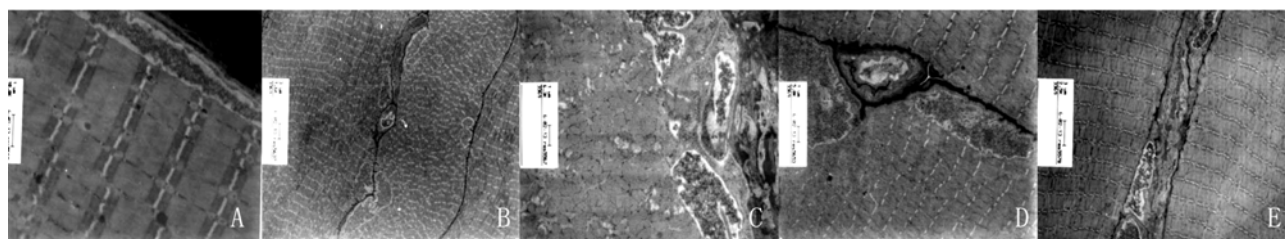
运动训练的脊髓横断组大鼠明显增多,但同时也存在细胞凋亡现象;各训练组大鼠肌膜下、肌丝间、核周线粒体数量均较各横断组大鼠增多,毛细血管管腔狭窄现象亦较各横断组大鼠明显改善(图 4D, 4E)。

讨 论

比目鱼肌作为机体抗重力肌,主要由慢肌纤维组成,对神经肌肉电活动减少极为敏感^[6,7]。脊髓横断后神经肌肉电活动与负荷均减少,比目鱼肌快速发生萎缩。许多学者研究后发现,因各种原因引发的肌萎缩均与肌细胞核数量丢失有关。细胞凋亡是否参与肌细胞核数量丢失过程,目前则鲜见相关报道。Allen 等^[1,8,9]分别对大鼠、鹌鹑、兔等进行悬吊、制动研究,发现细胞凋亡确实参与骨骼肌萎缩过程。

本研究采用 TUNEL 技术检测大鼠脊髓横断后比目鱼肌细胞核的凋亡变化情况,发现脊髓横断后大鼠骨骼肌萎缩,凋亡细胞核数量增多;经减重平板步行训练后,大鼠凋亡细胞核数量较相应时间点脊髓横断组大鼠明显减少。Dupont-Versteegden 等^[2]应用 TUNEL 技术检测脊髓横断 10 d 及横断 10 d 训练 5 d 时比目鱼肌细胞核的凋亡情况,发现脊髓横断 10 d 时与对照组比较, TUNEL 阳性细胞核数量明显增加;当脊髓横断 10 d 训练 5 d 后,发现 TUNEL 阳性细胞核数量下降了 60%,但仍显著高于对照组。本研究结果与上述报道基本一致,不同的是训练 2 d 组大鼠凋亡细胞核数量与横断 7 d 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),训练 10 d 组与训练 25 d 组大鼠凋亡细胞核数量虽然较相应时间点横断组大鼠显著减少,但减少的幅度并不明显,可能与本研究样本数量、脊髓横断后肌肉痉挛诱发的肌纤维损伤有关。

Smith 等^[10]对实验兔后肢制动 2 d 与 6 d 后取比目鱼肌进行电镜观察,发现细胞核染色质浓缩,形状不规则,肌原纤维排列紊乱,肌膜下线粒体异常;采用 TUNEL 技术标记凋亡阳性肌细胞核,发现肢体制动 2 d 时,机体阳性细胞核数量明显增加,制动 6 d 时减少,血管内皮细胞与成纤维细胞也存在阳性细胞核,表明慢肌纤维短期制动可导致其形态快速改变,并伴有



注:A 为对照组 ($\times 6300$);B 为横断 7 d 组 ($\times 1600$);C 为横断 30 d 组 ($\times 6300$);D 为训练 2 d 组 ($\times 5000$);E 为训练 25 d 组 ($\times 2500$)

图 4 各实验组大鼠比目鱼肌超微结构电镜观察情况

线粒体损伤与肌核凋亡。本研究结果与上述报道相似,从形态学方面进一步证实了细胞凋亡参与脊髓损伤引发的骨骼肌萎缩过程,肌核凋亡可能是导致骨骼肌萎缩的重要机制之一。

随着大鼠脊髓横断时间延长,肌膜下、肌丝间线粒体数量逐渐减少、固缩;经减重平板步行训练后,肌膜下、肌丝间线粒体数量增加,但仍存在固缩现象,表明脊髓横断后线粒体含量及功能均受到显著影响。线粒体作为细胞有氧代谢合成 ATP 的重要场所,其合成 ATP 的效率是影响运动能力的关键因素。线粒体的数量、功能与骨骼肌抗疲劳程度有关;据相关文献报道,长期耐力训练能使骨骼肌内线粒体数量增多,肌肉抗疲劳能力增强^[11]。本研究发现,脊髓横断大鼠经减重平板步行训练后,其比目鱼肌内线粒体数量增多,由此可推断比目鱼肌的抗疲劳程度增强,可能原因包括:减重平板步行训练激活了低位中枢运动神经元,使神经肌肉电活动增强,而肌肉运动需要较多的线粒体供能等。另外本研究还同时发现,虽然各实验组大鼠肌卫星细胞数量均增多,但都存在细胞凋亡现象,提示增殖的肌卫星细胞不能分化并与肌纤维融合,肌卫星细胞的增殖可能无益于缓解骨骼肌萎缩。这与 Dupont-Versteegden 等^[2]的研究结果相似,他们采用免疫双标技术标记肌核与肌卫星细胞核,发现脊髓横断后运动训练虽然使 BrdU-标记的细胞核(即肌卫星细胞核)数量增加,但肌纤维内 BrdU-标记的细胞核数量并没有增加,提示增殖的肌卫星细胞并没有融入肌纤维内。实验大鼠经运动训练后肌核数量虽然没有增加,但肌纤维横截面积增大,可能与运动训练使蛋白合成率与降解率发生变化有关。

本研究电镜观察显示,脊髓横断后毛细血管内皮细胞增大、细胞凋亡、血管管腔狭窄、存在微循环障碍,与 Fujino^[12]、Borisov^[13]等对后肢悬吊大鼠和失神经支配大鼠骨骼肌毛细血管床结构与功能的研究结果相似,提示脊髓横断后损伤水平以下骨骼肌存在供血不足与营养障碍,这可能也是导致骨骼肌萎缩的重要原因之一。实验大鼠经运动训练后上述现象可部分逆转,可能与运动训练使毛细血管供血改善有关。

综上所述,实验大鼠脊髓横断后骨骼肌发生萎缩,细胞凋亡参与骨骼肌萎缩过程。毛细血管结构改变与

管腔狭窄表明脊髓横断后肌肉存在供血不足与营养障碍,是肌萎缩的重要原因之一。减重平板步行训练不仅能减缓肌细胞凋亡进程,而且还能改善肌肉血供、缓解肌萎缩;另外,经减重平板步行训练后增多的肌卫星细胞可能无益于缓解骨骼肌萎缩。

参 考 文 献

- [1] Allen DL, Yasui W, Tanaka T, et al. Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol*, 1996, 81: 145-151.
- [2] Dupont-Versteegden EE, Murphy RJ, Houle JD, et al. Activated satellite cells fail to restore myonuclear number in spinal cord transected and exercised rats. *Am J Physiol*, 1999, 277: 589-597.
- [3] Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve*, 1999, 22: 1350-1360.
- [4] Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Persistence of hybrid fibers in rat soleus after spinal cord transection. *Anat Rec*, 1999, 255: 188-201.
- [5] Roy RR, Talmadge RJ, Hodgson JA, et al. Training effects on soleus of cats spinal cord transected (T₁₂₋₁₃) as adults. *Muscle Nerve*, 1998, 21: 63-71.
- [6] Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity//Baltimore JH. *Exercise Sport Science Reviews*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1991: 269-312.
- [7] Baldwin KM, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol*, 2001, 90: 345-357.
- [8] Alway SE, Martyn JK, Ouyang J, et al. Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 284: 540-549.
- [9] 金旭红, 瞿宁厚, 何勇, 等. 不同制动时相免骨骼肌萎缩与细胞凋亡的实验研究-原位缺口末端标记法(TUNEL)的观察检测. *生物医学工程学杂志*, 2004, 21: 628-630.
- [10] Smith HK, Maxwell L, Martyn JA, et al. Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res*, 2000, 302: 235-241.
- [11] Edgerton VR, Roy RR, Allen DL, et al. Adaptations in skeletal muscle disuse or decreased-use atrophy. *Am J Phys Med Rehabil*, 2002, 81: 127-147.
- [12] Fujino H, Kohzaki H, Takeda I, et al. Regression of capillary network in atrophied soleus muscle induced by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol*, 2005, 98: 1407-1413.
- [13] Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat Rec*, 2000, 258: 292-304.

(修回日期:2007-10-29)

(本文编辑:易浩)

祝广大读者、作者:

春节快乐 身体健康 万事如意!