

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*

田源¹ 唐成林^{1,3} 黄思琴¹ 张毅¹ 袁海洲¹ 曹净¹ 高睿琦¹ 唐念珍¹ 杨辉²

摘要

目的:研究大鼠骨骼肌急性钝挫伤后,按摩对细胞膜特异性修复蛋白 dysferlin 和 annexin A1 表达的影响,探讨按摩促进骨骼肌急性损伤修复的可能机制。

方法:42只成年SD雄性大鼠随机抽取6只作为正常对照组,其余36只为模型组。模型组在建立右下肢急性腓肠肌钝挫伤模型后,随机分为自然恢复组和按摩治疗组,根据治疗时间分为损伤后7d、14d、21d三个时间点,每个时间点6只。正常对照组和自然恢复组不做治疗;按摩治疗组在建模后48h开始每天于损伤局部行按摩治疗。免疫荧光双标法标记 dysferlin 和 annexin A1,运用激光共聚焦显微镜摄片,观察其在细胞内分布及表达;运用蛋白质印迹法检测其表达量。

结果:激光共聚焦显微镜结果显示:正常肌细胞中两种荧光信号主要分布于近细胞膜周围,强度较弱,无共表达现象;模型组各时间点,两种荧光信号强度均明显增加,胞浆内也有弥散性分布,随着时间的延长,信号强度逐渐减弱,细胞膜共表达现象增加;其中按摩治疗组荧光信号强度较同时期自然恢复组减弱明显,细胞膜上共表达现象增多。蛋白质印记结果显示:模型组各时间点较正常对照组, dysferlin 和 annexin A1 蛋白表达升高,差异显著;随着时间的延长,模型组蛋白表达量均下降,自然恢复组和按摩治疗组在损伤后14d和21d比较,差异均有显著性意义($P<0.05$);损伤后21d,自然恢复组较按摩治疗组 dysferlin 表达量比较,差异有显著性意义($P<0.05$);损伤后14d和21d,自然恢复组较按摩治疗组 annexin A1 表达量比较,差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:这可能是其促进肌细胞膜修复相关机制之一。

关键词 dysferlin; annexin A1; 急性钝挫伤; 按摩; 膜修复

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-08-0841-06

Effects of massage on expressions of membrane repair proteins dysferlin and annexin A1 in rats with skeletal muscle acute contusion/TIAN Yuan, TANG Chenglin, HUANG Siqin, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(8): 841—846

Abstract

Objective: To investigate the effect of massage on the expressions of cytomembrane repair proteins dysferlin and annexin A1 in rats with acute skeletal muscle contusion and to explore the possible mechanism of massage therapy on repairment of skeletal muscle injury.

Method: Forty-two SD rats were randomly divided into control group ($n=6$) and model group ($n=36$). Acute contusion on the right gastrocnemius muscle were made in model group and rats of the model group were divided randomly into three groups with 7, 14, 21 days treatment respectively. Each point in time contains natural recovery group ($n=6$) and massage therapy group ($n=6$). Massage was given to rats in massage therapy group on damaged surface daily since 48 h after injury while no treatment was given to other groups. The distribu-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.08.003

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273870);重庆市体育科研项目(B201409)

1 重庆医科大学中医药学院,重庆,400016; 2 重庆医科大学第一临床学院; 3 通讯作者

作者简介:田源,男,在读硕士; 收稿日期:2015-11-03

tion and quantity of protein expressions of dysferlin and annexin A1 were taken by double-labeling immunofluorescence staining and Western-blot analysis.

Result: In normal cell, double-labeling immunofluorescence staining revealed that dysferlin and annexin A1 distributed on cytomembrane with lower expressions and no co-expressions. In model group and diffusely distributed in cells, But it reduced with time. The expressions of two proteins in massage therapy group were lower than natural recovery group at the same time points and had more co-expressions on cytomembrane. Western blot showed that upregulation of two proteins in model groups significantly more than in control group. The expressions of two proteins in natural recovery group and massage therapy group reduced with time and the differences among two groups were statistically significant ($P < 0.05$). The massage therapy group had lower expressions of dysferlin than natural recovery group at 21d ($P < 0.05$), as well as lower annexin A1 at day 14 and day 21 ($P < 0.05$).

Conclusion: Massage can reduce the expressions of dysferlin and annexin A1 at cytomembrane of acute contusion muscle. It may be related to the mechanism of cytomembrane repair.

Author's address Chinese Medicine College, Chongqing Medical University, 400016

Key word dysferlin; annexin A1; acute contusion; massage; membrane repair

骨骼肌急性钝挫伤和牵拉伤是运动损伤中最常见的类型,比例高达90%^[1]。肌肉损伤后,修复过程缓慢且易形成不完全修复而影响其结构和功能,使肌肉损伤康复成为国内外研究的热点和难点问题之一。按摩疗法由于其便捷的操作,患者舒适的体验以及良好的治疗效应在肌肉损伤康复治疗中被广泛应用。虽然,按摩疗法得到了广大临床工作者的认可,但其作用机制尚不十分明确。目前,按摩对于肌肉损伤修复的研究主要集中在其对损伤局部微循环改善、炎症反应调控及肌卫星细胞增殖分化的影响等几方面。但骨骼肌损伤后,按摩能否对损伤的肌细胞膜起到修复作用从而促进骨骼肌损伤的康复尚未做深入研究。因此,本实验检测与骨骼肌细胞膜修复密切相关的膜特异性修复蛋白dysferlin和annexin A1的分布及表达情况,分析按摩对其表达的调控作用,探讨按摩促进骨骼肌损伤修复的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性成年SD大鼠42只,SPF级,体质量270—290g,由重庆医科大学实验动物中心提供(动物许可证号:【SYXK(渝)2012-0001】)。先随机抽取6只为正常对照组(control group),剩余大鼠成功制备右腿腓肠肌钝挫伤模型后用随机数字表法^[2]随机分成自然恢复组(natural recovery group, NR group)和按摩治疗组(massage therapy group, MT group),

根据治疗时间将自然恢复组和按摩治疗组分别分为损伤后7d、14d、21d三个时间点,每个时间点6只。

1.2 主要试剂及仪器

抗dysferlin抗体和抗annexin A1抗体(Santa Cruz公司,美国);荧光二抗FITC和TRITC(北京冠星宇科技有限公司);免疫印迹相关试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司;多聚甲醛(Sigma);恒冷超薄切片机(Leica CM1860,德国);激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP2,德国);大鼠柔性固定器(温州原上草医疗科技有限公司);自制钝挫伤模型重物打击装置。

1.3 骨骼肌钝挫伤模型建立

本实验参照Markert^[3]的方法,自行设计钝挫伤模型重物打击装置。用10%水合氯醛(3ml/kg)腹腔注射麻醉后,剃去双下肢毛。大鼠俯卧位,将右后肢置于伸膝、踝背屈90°、稍外展位固定以充分暴露小腿腓肠肌;将打击装置的打击头紧贴腓肠肌肌腹中间偏外侧,采用重物自由下落打击肌腹造成大鼠腓肠肌急性闭合性钝挫伤模型。打击参数^[4]:重物220g,自由下落高度110cm,重力2.16N,打击头面积约1cm²,打击动能2.37J。

1.4 干预方式

造模后48h,开始干预治疗。采用大鼠柔性固定器固定大鼠,待其情绪稳定后,按摩治疗组由专人在损伤局部施纵向压力约为5N的顺时针环形按摩(经采用RPM薄膜压力测试仪测试,当按摩纵向压

力约为5N时为大鼠将要对按摩刺激产生应激反应阈值)。按摩手法缓和,均匀持久,频率为120—150次/min,每天治疗1次,每次10min。自然恢复组仅做固定,不做任何干预。模型组各亚组分别于损伤后7d、14d、21d取材进行检测。

1.5 免疫荧光双标记染色

在不同时间点,各组大鼠10%水合氯醛(3ml/kg)腹腔注射麻醉后,开胸做快速心脏灌注固定。先灌注肝素生理盐水待右心耳流出无色透明液后,4%多聚甲醛溶液进行灌注固定,迅速取损伤腓肠肌组织投入原固定液继续固定6h,常规脱水后,OCT包埋剂包埋,进行肌肉组织横向连续冰冻切片,切片厚度10 μ m,遂进行免疫荧光双标记染色。10%牛血清封闭切片2h,去封闭液,分别滴加一抗[dysferlin(1:200),annexin A1(1:200)],4 $^{\circ}$ C过夜,PBS漂洗3次,暗室加入二抗[羊抗兔FITC(1:100),羊抗小鼠TRITC(1:100)],37 $^{\circ}$ C避光孵育30min,PBS漂洗3次,DAPI复染细胞核,漂洗3次后用防荧光淬灭剂封片并立即用激光共聚焦显微镜观察、摄片分析。

1.6 蛋白质印记法(Western-blot)检测膜修复蛋白Dysferlin和Annexin A1的蛋白表达量

以GDPH为内参照,各组依时间点取损伤处腓肠肌组织样本约30mg,迅速放入液氮中速冻后反复研磨。根据样本量加入适量蛋白裂解液1ml及蛋白酶抑制剂并充分离心,吸取蛋白上清液,测定蛋白浓度。提取蛋白,Lowry法定量。吸取上清液煮沸3min使蛋白变性。根据蛋白定量结果加样。用Bio-Rad标准电泳装置SDS-PAGE恒压电泳2h。然后用转PVDF膜,5%脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭,室温反应2h。TBST洗膜后加Dysferlin和Annexin A1抗体孵育,4 $^{\circ}$ C过夜。TBST洗膜后加入辣根过氧化物标记的二抗,室温反应2h。TBST洗膜后加ECL显色。采用Quantity One软件对Western-blot结果进行图像分析。以目的条带光密度值与内参GAPDH光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.7 统计学分析

采用SPSS19.0统计软件进行数据分析,数据以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用 t 检验,当 $P < 0.05$ 时差异有显著性意义。

2 结果

2.1 免疫荧光双标记染色观察

正常对照组dysferlin和annexin A1荧光信号强度较弱,主要分布在肌细胞膜附近,且分布较为均匀,无共表达现象。损伤后各时间点,两种荧光信号强度均显著增强,自然恢复组荧光强度强于按摩治疗组,dysferlin除了分布在细胞膜上,其在细胞内也有弥散性分布,在损伤后7d尤为明显。随着时间的延长,自然恢复组和按摩治疗组dysferlin和annexin A1荧光强度均呈现减弱趋势,细胞内弥散性分布情况也减少,而两种蛋白在细胞膜上共表达现象增多,按摩治疗组共表达现象多于自然恢复组。见图1。

2.2 Dysferlin和annexin A1蛋白质印迹结果

与正常对照组相比,模型组各时间点dysferlin和annexin A1的表达量在损伤后各时间点均明显升高。随着时间的延长,自然恢复组和按摩治疗组各时间点比较,差异有显著性意义($P < 0.05$);自然恢复组和按摩治疗组dysferlin蛋白表达量在21d时间点相比较,差异有显著性意义($P < 0.05$),见图2;自然恢复组和按摩治疗组annexin A1蛋白表达量在14d和21d时间点相比,差异有显著性意义($P < 0.05$),见图3。

3 讨论

骨骼肌损伤后,按摩作为一种简便且行之有效的治疗方法在其治疗及康复方面起着不可替代的作用。传统中医理论将按摩的作用原理概括为平衡阴阳、调和脏腑、疏通经络、行气活血等^[5]。随着现代医学的进步,按摩促进肌肉损伤康复的分子生物学机制研究也逐步深入。本课题组前期的研究结果显示,按摩能够通过改善琥珀酸脱氢酶、钾-钠ATP酶活性和提高细胞骨架蛋白结蛋白(Desmin)、 α -肌动蛋白(α -actin)的表达来促进损伤肌细胞的修复^[6-7],并能提高成肌调节因子Myf5、MyoD的表达以及肌卫星细胞激活因子神经型一氧化氮合成酶(nNOS)、肝细胞生长因子(HGF)的表达促进肌卫星细胞增殖和成肌纤维再生^[8-9]。且国外近期的研究也显示按摩能有效减轻损伤肌肉组织炎性反应并提高线粒体生物源性合成^[10-11],共同促进肌肉损伤的修复。

众所周知,所有肌肉的损伤都伴随着细胞膜结

图1 激光共聚焦显微镜观察dysferlin和annexin A1双标记染色

(标尺=80μm)

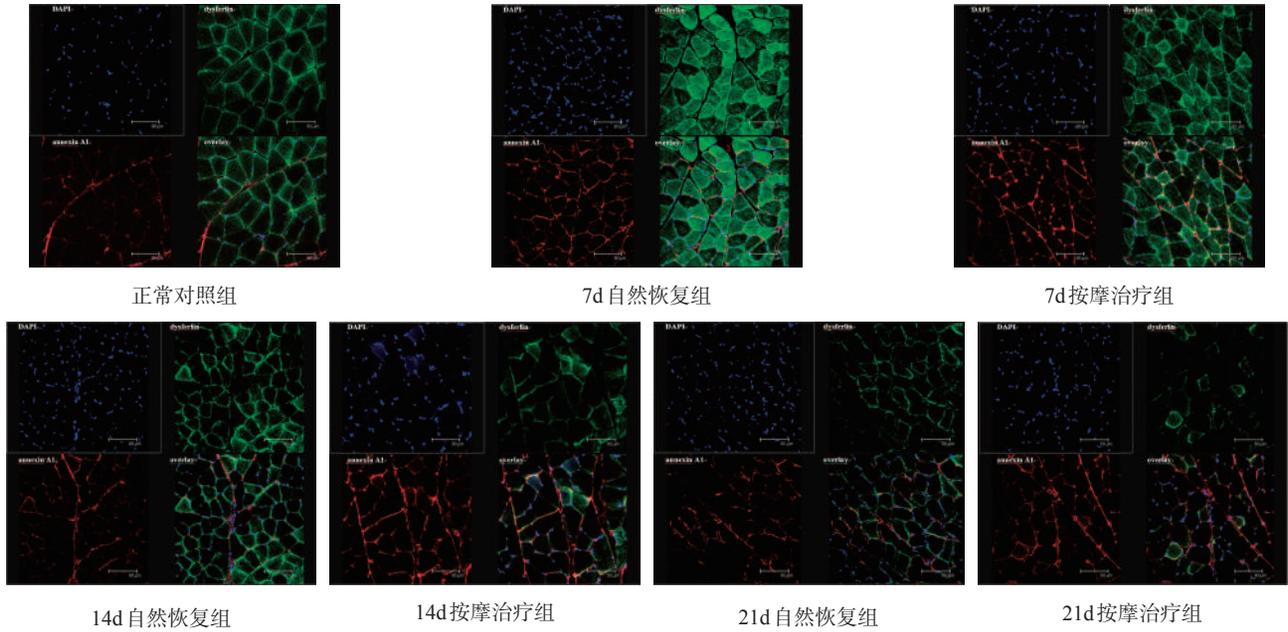
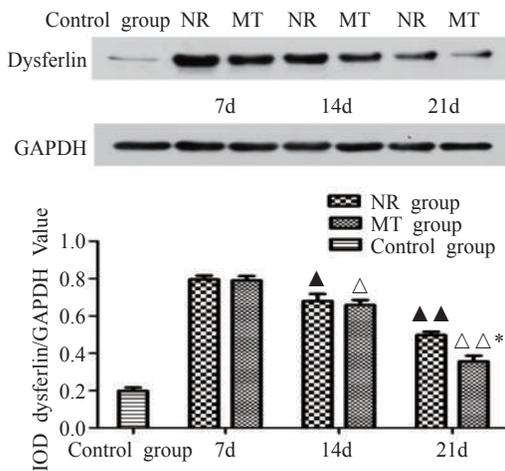


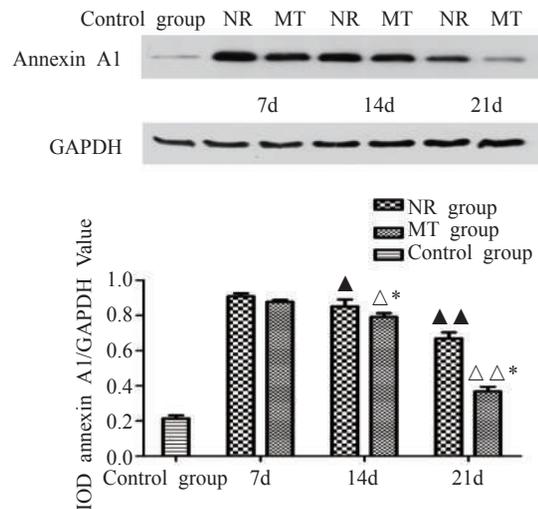
图2 Western bolt 检测不同时间点 dysferlin 蛋白表达量变化



▲与7dNR组比: $P < 0.05$; ▲▲与14dNR组比: $P < 0.05$; △与7dMT组比: $P < 0.05$; △△与14dMT组比: $P < 0.05$; *与21dNR组比: $P < 0.05$

构的破坏,而膜的破坏是启动肌肉组织修复或导致其变性坏死的第一步。研究表明,肌肉组织受损后,机体会启动一种较为复杂的膜结构自我调整过程用于细胞膜的修复。该修复作用的重要机制之一是由

图3 Western bolt 检测不同时间点 annexin A1 蛋白表达量变化



▲与7dNR组比: $P < 0.05$; ▲▲与14dNR组比: $P < 0.05$; △与7dMT组比: $P < 0.05$; △△与14dMT组比: $P < 0.05$; *与相同时间点NR组比: $P < 0.05$

细胞外 Ca^{2+} 内流触发细胞内分子感受器,使破损的细胞膜碎片在细胞内与囊泡结合并募集,通过类似于神经递质释放的“胞外分泌”的形式将其转运至细胞膜损伤处与细胞膜融合形成“补丁”,从而保

证细胞膜的完整性^[12]。细胞内囊泡的转运及其与细胞膜的融合过程需要多种蛋白的参与,其中 dysferlin 和 annexin A1 在此过程中发挥着关键作用。

Dysferlin 是最早发现的与细胞膜自身修复相关的一种跨膜蛋白^[12],主要分布在骨骼肌^[13]。它含有 7 种 C2 结构,其中 C2A 结构可以和 Ca²⁺ 依赖的磷脂酶结合,这是 dysferlin 蛋白发挥膜修复作用的结构基础^[14]。研究表明,dysferlin 蛋白能通过调节细胞内囊泡的转运和囊泡与膜的融合来调节骨骼肌修复功能^[15-16],该蛋白功能发生异常改变会引起细胞内囊泡转运和融合障碍从而继发细胞内炎症反应和细胞死亡^[17-18]。在此调节过程中,dysferlin 需和其他膜修复蛋白如 annexins 蛋白家族等相互绑定,共同发挥修复作用。在细胞凋亡或细胞膜损伤的情况下,annexins 蛋白家族重要成员 annexin A1 是唯一能提高膜损伤处神经酰胺含量的蛋白^[19],从而在膜修复过程中起主导作用^[20]。

由于细胞膜的完整性是保证其发挥正常生理功能的基础,按摩能否对损伤细胞膜起到修复的作用尚不清楚,因此本实验利用骨骼肌钝挫伤为模型,采用荧光双标记染色和蛋白质印记技术观察按摩治疗后骨骼肌细胞膜特异性修复蛋白 dysferlin 和 annexin A1 在肌细胞中的表达和分布变化,分析按摩对其调控作用。荧光结果显示,正常对照组两种蛋白的荧光主要分布在细胞膜和近细胞膜区域且荧光强度较弱,而胞浆内荧光强度极弱,同时蛋白质印记结果显示正常对照组蛋白表达量较低,提示在正常肌细胞中两种蛋白表达量都较低,这与 dysferlin 和 annexin A1 在正常细胞中主要分布在细胞膜上^[21]的结果吻合。损伤后,模型组各时间点两种荧光信号较正常对照组相比其信号强度均明显增加,荧光除了分布在细胞膜上之外还弥散分布在细胞浆内,该现象以损伤后 7d 最为明显,蛋白质印记结果在此时间点两种蛋白表达量也明显升高,说明此时细胞膜破坏严重,胞浆内有大量的含 dysferlin 蛋白的细胞膜碎片,这可能是肌细胞启动膜修复的一种应答状态。同时肌肉在损伤后会引起一系列炎症反应,尤其在损伤后 7d 左右局部炎症反应达到高峰^[22],研究表明,dysferlin 和 annexin A1 对炎症反应起应答作用并能抑制炎症反应^[23-24],这提示该蛋白表达的升高

也可能与免疫应答相关。损伤后 14d 和 21d,自然恢复组和按摩治疗组两种蛋白荧光强度有下降趋势,dysferlin 在细胞内弥散分布程度也有减轻,按摩治疗组与自然恢复组比较荧光强度下降更为明显;同时荧光结果发现在细胞膜上两种蛋白的共表达现象随着时间的延长而增多,按摩治疗组较自然恢复组相比共表达现象更明显。蛋白质印记结果显示两种蛋白表达也随着时间的延长而下降,在损伤后 14d 按摩治疗组 annexin A1 蛋白表达量较自然恢复组蛋白表达量相比,差异有显著性意义 ($P < 0.05$),而损伤后 21d,按摩治疗组与自然恢复组两种蛋白的表达量相比,差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。该结果提示,损伤后按摩能减少细胞损伤后 dysferlin 和 annexin A1 蛋白的表达,并增强两种蛋白的相互绑定作用,提高其与细胞膜的融合。由于按摩治疗可以通过调整炎症反应和免疫应答状态减轻炎症对肌肉的损伤^[25-26],我们推测按摩治疗组较自然恢复组两种蛋白表达量的下降也可能与按摩能减轻炎症反应有潜在联系。

综上所述,骨骼肌损伤后,膜特异性修复蛋白 dysferlin 和 annexin A1 的蛋白表达量增高,按摩能够下调损伤骨骼肌中该蛋白表达,并增强两种蛋白的相互绑定作用,提高其与细胞膜的融合,从而促进肌细胞膜的修复,这或许能为深入探讨按摩促进骨骼肌膜损伤修复的机制奠定实验基础。

参考文献

- [1] Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, et al. Muscle injuries: optimising recovery[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2007, 21 (2): 317—331.
- [2] 方积乾. 卫生统计学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012: 287.
- [3] Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, et al. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2005, 86 (7): 1304—1310.
- [4] Shu B, Yang Z, Li X, et al. Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion[J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62 (2): 329—336.
- [5] 金宏柱. 中国推拿[M]. 上海:上海中医药大学出版社, 2002.
- [6] 侯懿烜, 郑元义, 张萍, 等. 按摩增强琥珀酸脱氢酶和钾-钠 ATP 酶活性促进兔股四头肌的损伤修复[J]. 第三军医大学学报, 2011, (19): 2012—2015.
- [7] 侯懿烜, 柳满然, 余敏, 等. 按摩促进兔股四头肌损伤修复的体内研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2012, (03): 346—351.

- [8] 谢辉, 唐成林, 陈晓琳, 等. 按摩促进骨骼肌损伤后肌纤维再生机理的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2015, (02): 171—175.
- [9] 杨辉, 唐成林, 常青, 等. 在大鼠骨骼肌急性损伤修复过程中按摩对肌卫星细胞激活的关键因子 nNOS、HGF mRNA 的表达影响[J]. 中国康复医学杂志, 2015, 30 (03): 224—231.
- [10] Crane JD, Ogborn DI, Cupido C, et al. Massage therapy attenuates inflammatory signaling after exercise-induced muscle damage[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4 (119): 119ra113.
- [11] Best TM, Hunter R, Wilcox A, et al. Effectiveness of sports massage for recovery of skeletal muscle from strenuous exercise[J]. *Clin J Sport Med*, 2008, 18 (5): 446—460.
- [12] Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy[J]. *Nature*, 2003, 423 (6936): 168—172.
- [13] Aoki M, Liu J, Richard I, et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy[J]. *Neurology*, 2001, 57 (2): 271—278.
- [14] Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, et al. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (25): 22883—22888.
- [15] Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, et al. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (50): 50466—50473.
- [16] Kesari A, Fukuda M, Knobloch S, et al. Dysferlin deficiency shows compensatory induction of Rab27A/Slp2a that may contribute to inflammatory onset[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173 (5): 1476—1487.
- [17] Posey AD Jr, Demonbreun A, McNally EM. Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2011, 96: 203—230.
- [18] Nagaraju K, Rawat R, Veszelovszky E, et al. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172 (3): 774—785.
- [19] Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Draeger A. Fluorescent annexin A1 reveals dynamics of ceramide platforms in living cells[J]. *Traffic*, 2008, 9 (10): 1757—1775.
- [20] McNeil AK, Rescher U, Gerke V, et al. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (46): 35202—35207.
- [21] Anderson LV, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development[J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8 (5): 855—861.
- [22] Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16 (8): 906—914.
- [23] Han R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy[J]. *Skelet Muscle*, 2011, 1 (1): 10.
- [24] Kim SW, Rhee HJ, Ko J, et al. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (19): 15712—15719.
- [25] Butterfield TA, Zhao Y, Agarwal S, et al. Cyclic compressive loading facilitates recovery after eccentric exercise[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2008, 40 (7): 1289—1296.
- [26] Haas C, Butterfield TA, Abshire S, et al. Massage timing affects postexercise muscle recovery and inflammation in a rabbit model[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2013, 45 (6): 1105—1112.