

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.12.028

◇临床医学◇

基于磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路探讨针刺对超负荷运动致骨骼肌损伤大鼠氧化应激损伤及骨骼肌细胞凋亡的影响

刘祥华, 罗湘筠, 李文倩

作者单位: 湖南中医药高等专科学校附属第一医院(湖南省直中医医院)针灸科, 湖南 株洲 412000

摘要: **目的** 探究针刺对超负荷运动致骨骼肌损伤大鼠氧化应激损伤及骨骼肌细胞凋亡的影响, 初步了解针刺对超负荷运动致骨骼肌损伤的治疗机制。 **方法** 于2018年12月至2019年6月选取60只6周龄SPF级SD大鼠, 采用随机数字表法将SD大鼠分为四组: 空白组(Control, C)、超负荷运动组(Overload, O)、针刺组(Acupuncture, A)和超负荷运动+针刺组(Overload and Acupuncture, OA), 各15只; O组及OA组实行超负荷运动, 运动结束立即针刺A组及OA组足三里、阳陵泉、内关和肾俞穴, 留针20 min, 持续14 d; 检测各组SD大鼠骨骼肌中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛、琥珀酸脱氢酶(SDH)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性; 使用流式细胞仪检测SD大鼠骨骼肌细胞凋亡情况, 使用蛋白质印迹法检测细胞凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)活性; 检测SD大鼠血清中肌酸激酶水平并使用苏木精-伊红(HE)染色观察SD大鼠骨骼肌情况; 使用蛋白质印迹法检测磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K-Akt)信号通路相关蛋白表达情况。 **结果** 相比C组丙二醛水平(4.75 ± 0.29) mol/L、骨骼肌细胞凋亡水平(9.89 ± 1.02)%和肌酸激酶(457.54 ± 45.02) kU/L, O组丙二醛水平(13.97 ± 0.55) mol/L、骨骼肌细胞凋亡水平(32.58 ± 3.50)%、Bax、Caspase-3蛋白表达水、血清肌酸激酶水平(1985.50 ± 88.87) kU/L均显著升高($P < 0.05$); 相比C组GSH-Px水平(142.25 ± 8.39) kU/L、SOD水平(2.50 ± 0.25) kU/L、SDH水平(35.75 ± 8.78) kU/L, O组GSH-Px水平(55.68 ± 6.97) kU/L、SOD水平(1.02 ± 0.17) kU/L、SDH水平(10.58 ± 6.50) kU/L、Bcl-2、PI3K、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(m-TOR)水平均显著降低($P < 0.05$), Akt蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$); 相比O组, A组丙二醛水平(4.99 ± 0.32) mol/L、骨骼肌细胞凋亡水平(11.52 ± 1.02)%、Bax、Caspase-3蛋白表达水、血清肌酸激酶水平均(557.56 ± 54.25) kU/L显著降低, GSH-Px水平(130.25 ± 7.14) kU/L、SOD水平(2.38 ± 0.30) kU/L、SDH水平(31.25 ± 5.50) kU/L、Bcl-2、PI3K、p-AKT、m-TOR蛋白水平显著升高($P < 0.05$), Akt蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$); 相比A组, OA组丙二醛水平(7.89 ± 0.41) mol/L、骨骼肌细胞凋亡水平(22.58 ± 2.51)%、Bax、Caspase-3蛋白表达水、血清肌酸激酶水平(1402.51 ± 64.50) kU/L均显著升高, GSH-Px水平(135.58 ± 8.14) kU/L、SOD水平(2.10 ± 0.21) kU/L、SDH水平(24.28 ± 4.99) kU/L、Bcl-2、PI3K、p-AKT、m-TOR蛋白水平显著降低($P < 0.05$), Akt蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$); 相比O组, OA组丙二醛水平、骨骼肌细胞凋亡水平、Bax、Caspase-3蛋白表达水、血清肌酸激酶平均显著降低, GSH-Px水平、SOD水平、SDH水平、Bcl-2、PI3K、p-AKT、m-TOR蛋白水平显著升高($P < 0.05$), Akt蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。HE染色观察结果显示: O组纤维弯曲, 肌红蛋白溶解, 肌细胞核固缩、溶解, 肌束膜破裂; OA组少量肌纤维断裂溶解弯曲, 余未见异常。 **结论** 针刺可以通过调控PI3K-Akt信号通路抑制SD大鼠氧化应激和骨骼肌细胞凋亡来实现治疗超负荷运动致骨骼肌损伤。

关键词: 运动损伤; 肌, 骨骼; 针刺疗法; 骨骼肌损伤; PI3K-Akt信号通路; 氧化应激; 磷脂酰肌醇3-激酶; 超氧化物歧化酶; 琥珀酸脱氢酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 大鼠, Sprague-Dawley

Effects of acupuncture on oxidative stress injury and apoptosis of skeletal muscle cells in rats with skeletal muscle injury caused by overload exercise based on phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway

LIU Xianghua, LUO Xiangjun, LI Wenqian

Author Affiliation: Department of Acupuncture, The First Affiliated Hospital of Hunan TCM Junior College (Hunan Provincial TCM Hospital), Zhuzhou, Hunan 412000, China

Abstract: Objective To explore the effects of acupuncture on oxidative stress injury and apoptosis of skeletal muscle cells in rats with skeletal muscle injury caused by overload exercise, and to preliminarily understand treatment mechanism of acupuncture for skeletal muscle injury caused by overload exercise. **Methods** Sixty 6-week-old SPF-level SD rats were enrolled from December

2018 and June 2019, and were assigned into four groups by random number table method: blank group (Control, C), overload exercise group (Overload, O), acupuncture group (Acupuncture, A) and overload exercise + acupuncture group (Overload and Acupuncture, OA), 15 cases in each group. O group and OA group were given overload exercise. Immediately after end of exercise, acupuncture was performed at Zusanli, Yanglingquan, Neiguan and Shenshu acupoints in group A and OA group, retaining needle for 20 min, lasting for 14 d. The activities of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), succinate dehydrogenase (SDH) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in skeletal muscle of each group were detected. Flow cytometry was applied to detect apoptosis of skeletal muscle cells. Western blot was applied to detect activities of apoptosis-related proteins [B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax), cysteinyl aspartate specific protease3 (Caspase-3)]. The level of serum creatine kinase was detected. The skeletal muscle conditions of rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of PI3K-Akt signaling pathway-related protein was detected by Western blot. **Results** Compared with MDA level $[(4.75 \pm 0.29) \text{ mol/L}]$, apoptosis level of skeletal muscle cells $[(9.89 \pm 1.02)\%]$ and creatine kinase $[(457.54 \pm 45.02) \text{ kU/L}]$ in group C, levels of MDA $[(13.97 \pm 0.55) \text{ mol/L}]$, apoptosis level of skeletal muscle cells $[(32.58 \pm 3.50)\%]$, expressions levels of Bax and Caspase-3 proteins, and level of serum creatine kinase $[(1985.50 \pm 88.87) \text{ kU/L}]$ in group O were significantly increased. Compared with GSH-Px level $[(142.25 \pm 8.39) \text{ kU/L}]$, SOD level $[(2.50 \pm 0.25) \text{ kU/L}]$ and SDH level $[(35.75 \pm 8.78) \text{ kU/L}]$ in group C, GSH-Px level $[(55.68 \pm 6.97) \text{ kU/L}]$, SOD level $[(1.02 \pm 0.17) \text{ kU/L}]$, SDH level $[(10.58 \pm 6.50) \text{ kU/L}]$, Bcl-2, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-AKT) and level of mammalian target of rapamycin (m-TOR) in group O were significantly decreased ($P < 0.05$), and there was no significant difference in expression of Akt protein between the two groups ($P > 0.05$). Compared with group O, MDA level $[(4.99 \pm 0.32) \text{ mol/L}]$, apoptosis level of skeletal muscle cells $[(11.52 \pm 1.02)\%]$, expression level of Bax and Caspase-3 proteins, and level of serum creatine kinase $[(557.56 \pm 54.25) \text{ kU/L}]$ in group A were significantly decreased, GSH-Px level $[(130.25 \pm 7.14) \text{ kU/L}]$, SOD level $[(2.38 \pm 0.30) \text{ kU/L}]$, SDH level $[(31.25 \pm 5.50) \text{ kU/L}]$, Bcl-2, PI3K, p-AKT and m-TOR levels were significantly increased ($P < 0.05$), and there was no significant difference in expression of Akt protein between the two groups ($P > 0.05$). Compared with group A, MDA level $[(7.89 \pm 0.41) \text{ mol/L}]$, apoptosis level of skeletal muscle cells $[(22.58 \pm 2.51)\%]$, expression levels of Bax and Caspase-3 proteins, and level of serum creatine kinase $[(1402.51 \pm 64.50) \text{ kU/L}]$ in group OA were significantly increased, GSH-Px level $[(135.58 \pm 8.14) \text{ kU/L}]$, SOD level $[(2.10 \pm 0.21) \text{ kU/L}]$, SDH level $[(24.28 \pm 4.99) \text{ kU/L}]$, Bcl-2, PI3K, p-AKT and m-TOR proteins were significantly decreased ($P < 0.05$), and there was no significant difference in expression of Akt protein between the two groups ($P > 0.05$). Compared with group O, levels of MDA, skeletal muscle cell apoptosis, Bax and Caspase-3 protein, and level of serum creatine kinase in group OA were significantly decreased, while levels of GSH-Px, SOD, SDH, Bcl-2, PI3, p-AKT and m-TOR proteins were significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in expression of Akt protein between the two groups ($P > 0.05$). The observation results of HE staining showed that there were fiber waviness, myoglobin dissolution, muscle corpuscle pyknosis and dissolution, and perimysium rupturing in group O. In OA group, there were few muscle fibers dissolution, rupturing and waviness. And there were no abnormalities in the rest. **Conclusion** Acupuncture can inhibit oxidative stress and skeletal muscle cell apoptosis in rats by regulating PI3K-Akt signaling pathway to treat skeletal muscle injury caused by overload exercise.

Key words: Athletic Injuries; Muscle, skeletal; Acupuncture therapy; Skeletal muscle injury; PI3K-Akt signaling pathway; Oxidative stress; PI3K; Superoxide dismutase; Succinic dehydrogenase; Glutathione peroxidase; Rats, Sprague-Dawley

近年来,随着人们对体育竞技的重视,出现超负荷运动损伤的人日益增加。长时间或大负荷运动后骨骼肌纤维会出现损伤,不仅会出现延迟性肌肉酸痛现象同时会伴随肌力下降,严重影响正常生活^[1]。研究表明:超负荷运动后,会使得骨骼肌细胞膜结构破坏,从而导致细胞内的肌酸激酶进入血液循环,使得肌酸激酶可以作为骨骼肌微细损伤的重要指标^[2]。现阶段有生物或化学药物改善超负荷运动导致的骨骼肌损伤,但这些药物会在体内留下代谢垃圾甚至有一定的毒副作用^[3]。针灸是一种传统的中医治疗方式,相对药物治疗具有一定的优势^[4]。尚画雨等^[5]研究证明:针刺可以缓解超负荷运动后

的延迟性肌肉酸痛,同时具有促进骨骼肌恢复的效果。刘晓然等^[6]研究证明:针刺可以有效抑制超负荷运动后骨骼肌骨架蛋白的解聚或降解,并加强骨架蛋白的合成代谢。本研究于2018年12月至2019年6月进行,旨在研究针刺足三里、阳陵泉、内关和肾俞穴等穴位对超负荷运动致骨骼肌损伤大鼠氧化应激损伤及骨骼肌细胞凋亡的影响,以期了解针刺对超负荷运动致骨骼肌损伤大鼠氧化应激损伤及骨骼肌细胞凋亡的作用机制,从而为超负荷运动致骨骼肌损伤的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级6周龄SD大鼠60只,购于湖南师

范大学医学院,医学实验动物合格证号:SYXK(湘)2017-0054;医学实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2016-0004,所有SD大鼠分12个笼子饲养,每个笼子5只。所有SD大鼠均在湖南省直中医医院动物中心实验室饲养,饲养温度20~25℃,相对湿度50%~65%,本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 药物与试剂 丙二醛、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)和琥珀酸脱氢酶(Succinic acid dehydrogenase, SDH)试剂盒均购于上海恒远生物科技有限公司;肌酸激酶试剂盒购于北京吉美生物技术有限公司;苏木素、伊红购于武汉博士得生物有限公司;中性甲醛、乙醇、二甲苯购于天津科密欧有限公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)凋亡检测试剂盒购于杭州四季青生物工程材料有限公司;B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)等一抗蛋白购于美国Santa Cruz公司;蛋白抑制剂、辣根过氧化物酶(HRP)羊抗兔IgG、HRP羊抗鼠IgG等二抗蛋白购于美国Thermo公司。

1.3 仪器 BS-124s型电子天平购于北京赛多斯仪器有限公司;TGL-16M低温离心机购于济南来宝医疗器械有限公司;SG-51正置型金相显微镜购于上海光学仪器厂;蛋白电泳及转膜仪购于美国Bio-Rad公司;凝胶成像系统购于以色列DNR公司;LD-66实验室切片机购于长沙益广制药机械公司;流式细胞仪购于赛默飞世尔科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 分组及超负荷运动 将60只SD大鼠适应性喂养1周,采用随机数字表法分为四组:空白组(Control, C)、超负荷运动组(Overload, O)、针刺组(Acupuncture, A)和超负荷运动+针刺组(Overload and Acupuncture, OA),每组各15只;空白组不做任何处理;超负荷运动组和超负荷运动+针刺组均建立超负荷运动模型,具体操作如下:在100 cm×100 cm的游泳池中,注入70 cm深的水,保持温度在32~35℃,每次持续训练120 min,训练前60 min让SD大鼠适应水性,后60 min负重大鼠体质量5%的重物,第2周开始120 min均让大鼠负重其体质量8%的重物。

1.4.2 针刺干预 各组SD大鼠针刺按照2003年《实用动物针灸手册》^[7]标准,在超负荷运动后针刺SD大鼠双侧足三里、阳陵泉、内关和肾俞穴,每日1

次,每次留针20 min。

1.5 检测项目

1.5.1 氧化应激相关物质检测 各组SD大鼠完成针刺干预后12 h内,使用腹腔注射10%水合氯醛麻醉,行颈部脱臼处死,颈动脉采血并保存在-80℃超低温冰箱中,后续实验使用;切下SD大鼠骨骼肌,使用0.9%氯化钠溶液冲洗,剪碎置于匀浆器内匀浆,研磨后转移到离心管内,在4℃恒温下,以3 700 r/min,离心5 min,取沉淀使用超声破碎仪破碎线粒体并加入倒入1.5 mL裂解液,使用丙二醛、SOD、GSH-Px、SDH试剂盒,严格按照试剂盒操作进行检查其水平。

1.5.2 血清中肌酸激酶活性检测 取上述各组SD大鼠血清,在4℃的恒温离心机中以3 000 r/min速度离心10 min,按照肌酸激酶试剂盒操作说明书方法检测各组SD大鼠血清中肌酸激酶含量水平。

1.5.3 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 取SD大鼠骨骼肌,使用剪刀剪碎,使用胰蛋白酶消化成单层细胞后,使用恒温离心机保持4℃,离心5 min收集细胞;收集细胞后加入100 μL结合缓冲液(Binding Buffer)重悬细胞并加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL碘化丙啶(PI),轻轻混匀;室温避光孵育15 min并加入400 μL Binding Buffer使用流式细胞仪检测SD大鼠骨骼肌细胞凋亡情况。

1.5.4 蛋白质印迹法(Western Blot)检测蛋白表达水平 使用蛋白质印迹法检测Bcl-2、Bax、Caspase-3、Akt、P-Akt、PI3K蛋白,取大鼠骨骼肌,使用胰蛋白酶消化后,提取总蛋白,使用半干法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜),置于5%脱脂奶粉室温封闭2 h后加入各需要检测蛋白的一抗,二抗,孵育2 h,以β-肌动蛋白(β-actin)为内参蛋白,采用显色液显色后行吸光度分析,计算各蛋白相对表达量。

1.5.5 苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠骨骼肌情况 HE染色观察大鼠骨骼肌,使用二甲苯浸泡、不同梯度乙醇脱水、苏木精浸泡、盐酸乙醇分化、冲洗、伊红染色、乙醇浸泡、二甲苯浸泡后中性树脂封片即并在400倍的光学显微镜下观察大鼠骨骼肌组织情况。

1.6 统计学方法 研究数据分析采用软件为SPSS 22.0,作图采用软件为GraphPad Prism5,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间采用单因素方差分析,当组间差异有统计学意义时,采用SNK方法进行进一步的多重比较,若 $P < 0.05$ 则表明数据差异有统计学意义,本研究所有检验均为双侧检验。

2 结果

2.1 各组大鼠氧化应激情况 由表1可以看出,相比空白组,超负荷运动组大鼠丙二醛水平显著升高, GSH-Px、SOD、SDH 水平显著降低 ($P < 0.05$); 相比超负荷运动组, 超负荷运动+针刺组大鼠丙二醛水平显著降低, GSH-Px、SOD、SDH 水平显著升高 ($P < 0.05$); 相比超负荷运动组, 针刺组大鼠丙二醛水平显著降低, GSH-Px、SOD、SDH 水平显著升高 ($P < 0.05$); 相比针刺组, 超负荷运动+针刺组大鼠丙二醛水平显著升高, GSH-Px、SOD、SDH 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠氧化应激相关物质检测结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	丙二醛/ (mol/L)	GSH-Px/ (kU/L)	SOD/ (kU/L)	SDH/ (kU/L)
空白组	15	4.75±0.29	142.25±8.39	2.50±0.25	35.75±8.78
超负荷运动组	15	13.97±0.55 ^a	55.68±6.97 ^a	1.02±0.17 ^a	10.58±6.50 ^a
针刺组	15	4.99±0.32 ^b	130.25±7.14 ^b	2.38±0.30 ^b	31.25±5.50 ^b
超负荷运动+针刺组	15	7.89±0.41 ^{bc}	135.58±8.14 ^{bc}	2.10±0.21 ^{bc}	24.28±4.99 ^{bc}
F 值		1 681.193	416.066	121.047	41.517
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: GSH-Px 为谷胱甘肽过氧化物酶, SOD 为超氧化物歧化酶, SDH 为琥珀酸脱氢酶。与空白组相比, ^a $P < 0.01$; 与超负荷运动组相比, ^b $P < 0.01$; 与针刺组相比, ^c $P < 0.01$

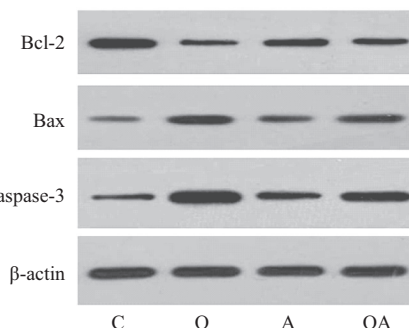
2.2 各组大鼠骨骼肌凋亡情况 相比空白组, 超负荷运动组大鼠 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低, Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 相比超负荷运动组, 针刺组大鼠 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高, Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 相比针刺组, 超负荷运动+针刺组大鼠 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低, Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 相比超负荷运动组, 超负荷运动+针刺组大鼠 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高, Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。相比空白组, 超负荷运动组大鼠骨骼肌细胞凋亡水平显著升高 ($P < 0.05$); 相比超负荷运动组, 针刺组大鼠细胞凋亡水平显著降低 ($P < 0.05$); 相比针刺组, 超负荷运动+针刺组大鼠细胞凋亡水平显著升高 ($P < 0.05$); 相比超负荷运动组, 超负荷运动+针刺组大鼠骨骼肌细胞凋亡水平显著降低 ($P < 0.05$)。见表2、图1、图2。

2.3 各组大鼠骨骼肌损伤情况 由图3可以看出, 相比空白组大鼠肠骨骼肌肌肉组织正常, 肌外膜完整, 可见血管及神经; 肌束膜包裹肌纤维, 肌纤维完整, 肌细胞核大小形态未见异常; 超负荷运动组大

表2 各组大鼠骨骼肌凋亡检测结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Bcl-2/ β -actin 值	Bax/ β -actin 值	Caspase-3/ β -actin 值	细胞凋亡 率/%
空白组	15	1.62±0.20	0.55±0.09	0.35±0.08	9.89±1.02
超负荷运动组	15	0.41±0.10 ^a	1.59±0.19 ^a	1.53±0.25 ^a	32.58±3.50 ^a
针刺组	15	1.25±0.15 ^b	0.56±0.10 ^b	0.52±0.09 ^b	11.52±1.02 ^b
超负荷运动+针刺组	15	0.82±0.09 ^{bc}	1.52±0.18 ^{bc}	1.38±0.18 ^{bc}	22.58±2.51 ^{bc}
F 值		204.690	231.524	194.899	323.283
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤/白血病-2, β -actin 为 β -肌动蛋白, Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白, Caspase-3 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3。与空白组相比, ^a $P < 0.01$; 与超负荷运动组相比, ^b $P < 0.01$; 与针刺组相比, ^c $P < 0.01$



注: Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤/白血病-2, Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白, Caspase-3 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3, β -actin 为 β -肌动蛋白, C 为空白组, O 为超负荷运动组, A 为针刺组, OA 为超负荷运动+针刺组

图1 蛋白质印迹法检测各组大鼠凋亡蛋白表达水平

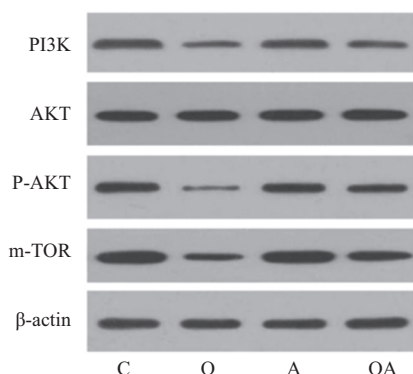
鼠骨骼肌肌肉组织肌纤维弯曲, 肌红蛋白溶解, 肌细胞核固缩、溶解, 肌束膜破裂; 针刺组大鼠肠骨骼肌肌肉组织正常肌肉组织, 肌外膜完整, 可见血管及神经; 超负荷运动+针刺组大鼠少量肌纤维断裂溶解弯曲, 余未见异常。相比空白组肌酸激酶水平 (457.54 ± 45.02) kU/L, 超负荷运动组大鼠血清肌酸激酶水平显著升高至 ($1 985.50 \pm 88.87$) kU/L; 相比超负荷运动组肌酸激酶水平, 超负荷运动+针刺组大鼠肌酸激酶水平显著降低至 ($1 402.51 \pm 64.50$) kU/L ($F = 485.60, P < 0.001$)。

2.4 各组大鼠 PI3K-Akt 信号通路相关蛋白表达情况 由表3、图4可以看出; 相比空白组, 超负荷运动组大鼠 PI3K、p-AKT、m-TOR 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$); 相比超负荷运动组, 针刺组大鼠 PI3K、p-AKT、m-TOR 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$); 相比针刺组, 超负荷运动+针刺组大鼠 PI3K、p-AKT、m-TOR 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$); 相比超负荷运动组, 超负荷运动+针刺组大鼠 PI3K、p-AKT、m-TOR 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$)。各组 Akt 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表3 各组大鼠PI3K-Akt信号通路相关蛋白表达情况/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	PI3K/ β -actin值	Akt/ β -actin值	p-AKT/ β -actin值	mTOR/ β -actin值
空白组	15	1.61 $\pm$ 0.20	1.02 $\pm$ 0.12	1.60 $\pm$ 0.22	1.55 $\pm$ 0.25
超负荷运动组	15	0.75 $\pm$ 0.15 ^a	1.03 $\pm$ 0.11	0.45 $\pm$ 0.14 ^a	0.51 $\pm$ 0.20 ^a
针刺组	15	1.55 $\pm$ 0.18 ^b	1.01 $\pm$ 0.10	1.53 $\pm$ 0.21 ^b	1.54 $\pm$ 0.18 ^b
超负荷运动+ 针刺组	15	1.18 $\pm$ 0.14 ^{bc}	1.03 $\pm$ 0.11	1.30 $\pm$ 0.20 ^{bc}	1.32 $\pm$ 0.21 ^{bc}
F 值		82.528	0.113	110.427	81.006
P 值		<0.001	0.952	<0.001	<0.001

注:PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶, β -actin为 β -肌动蛋白,Akt为蛋白激酶B,p-AKT为磷酸化蛋白激酶B,m-TOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白。与空白组相比,^a P <0.01;与超负荷运动组相比,^b P <0.01;与针刺组相比,^c P <0.01



注:PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,Akt为蛋白激酶B,p-AKT为磷酸化蛋白激酶B,m-TOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, β -actin为 β -肌动蛋白,C为空白组,O为超负荷运动组,A为针刺组,OA为超负荷运动+针刺组

图4 各组大鼠PI3K-Akt信号通路相关蛋白表达情况

3 讨论

针刺是一种传统的中医治疗方法,使用针刺治疗骨骼肌已有较长历史且疗效显著^[8]。使用针刺穴位可以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,使得机体产生一系列的反应,例如脂质过氧化、线粒体游离钙的聚积、改变线粒体内膜通透性等^[9]。本实验探究通过使用针刺超负荷运动致骨骼肌损伤大鼠足三里、阳陵泉、内关和肾俞穴,检测器氧化应激损伤及骨骼肌细胞凋亡情况,初步了解针刺超负荷运动致骨骼肌损伤的治疗机制。传统中医认为:足三里、肾俞两穴位可以平衡阴阳,益精补肾增加体能,具有保健作用^[10]。针刺肾俞穴可以加强机体的抗氧化能力,减少自由基的累积,抑制氧化应激反应实现阴阳平衡。阳陵泉穴归属足少阳胆,内关穴是手厥阴心包经的常用腧穴之一,针刺这两个穴位可以有效刺激免疫系统,同时具有养心安神、醒神开窍的作用^[11]。可以使得超负荷运动后快速恢复。本研究发现,使用针刺后

大鼠骨骼肌均未出现肌红蛋白溶解,肌细胞核固缩、溶解,肌束膜破裂等情况,且骨骼肌微细损伤的重要指标肌酸激酶含量水平也显著降低,说明使用针刺可以有效缓解大鼠超负荷运动后骨骼肌的损伤。这可能是因为刺激足三里、肾俞可以调节大鼠体内阴阳平衡、益精补肾,增强大鼠对氧自由基的抵抗能力增强,同时调节骨骼肌线粒体内膜的钙离子平衡,达到保护骨骼肌线粒体外膜及增加抗疲劳能力,实现保护超负荷运动后骨骼肌的效果。

超负荷运动后氧化应激是导致骨骼肌细胞损伤造成细胞损伤的重要因素之一^[12]。在健康的细胞内氧自由基的产生和清除是平衡的,但是超负荷运动后会产生大量的活性氧,对细胞膜造成损伤,同时还会导致上皮细胞膜通透性增,使得细胞内的SOD、GPX等酶释放至细胞外^[13]。丙二醛的含量可以反映机体内发生脂质过氧化的程度,使自由基与生物膜中的多不饱和脂肪酸发生反应并使得氧化产物分解^[14]。SOD具有抗氧化性,是经典的抗氧化酶之一,可以有效清除活性氧。机体内SOD水平越高说明机体清除活性氧的能力越强,当脑组织损伤时其含量会显著降低^[15]。SDH是线粒体内膜的结合酶,可连接氧化磷酸化与电子传递,在有氧运动中起着关键的作用。SDH主要分布在线粒体中,为有氧呼吸提供电子,其活性直接影响着能量代谢的过程,SDH活性增强,组织的氧利用能力就会提高。本研究中发现,相比超负荷运动组,使用针刺后丙二醛水平显著降低,GSH-Px、SOD、SDH水平显著升高。说明使用针刺有效降低大鼠体内氧化应激,这可能是因为通过针刺物理刺激大鼠足三里、阳陵泉、内关和肾俞穴等穴位后使得大鼠的增强线粒体SOD活性增强,其消除自由基的能力也显著增强,并且减少了运动中的氧化应激,从而减轻了大鼠体内的脂质过氧化;保护了线粒体膜,抑制了骨骼肌线粒体游离钙的聚积,反之进一步抑制脂质过氧化作用,实现有效降低大鼠体内氧化应激反应。孙嫫等^[16]研究表明:针刺可以有效降低氧化应激反应,与本研究得出的结论相类似。

骨骼肌细胞凋亡在大鼠超负荷运动致骨骼肌损伤中起着关键的作用,而骨骼肌的凋亡受相关基因的调控^[17]。Bcl-2家族是一种常见的凋亡控制基因。Bcl-2家族中主要是由Bcl-2和Bax这两种蛋白表达量决定细胞是否凋亡^[18]。Bax和Bcl-2表达呈相反趋势,当Bcl-2表达下降时Bax表达上升,此时会促进细胞的凋亡;当Bcl-2表达升高,而Bax表达降低时,则会抑制细胞的凋亡。除了Bcl-2家族,

Caspase 家族的 Caspase-3、Caspase-9 等是重要的凋亡因子^[19]。Caspase 家族主要执行凋亡基因为 Caspase-3, 其机制依靠凋亡因子启动子作用有活性的 Caspase-9 使得 proCaspase-3 产生有活性的 Caspase-3。并通过剪切另外的 Caspase 底物, 达到引起级联反应的目的最终导致细胞凋亡^[20]。本研究发现, 相比高负荷运动组, OA 组大鼠 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高, Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著降低。这可能是因为超负荷运动后大鼠骨骼肌细胞膜受到损伤后钙离子会大量进入细胞内会引起骨骼肌肌原纤维的损伤, 同时抑制线粒体的氧化代谢酶、激活细胞内凋亡因子的产生, 抑制抑凋亡因子的产生, 引发细胞的凋亡。陈英华、郝志平^[21]研究表明: 针刺可以升高 Bcl-2 阳性细胞表达并降低 Bax 阳性细胞表达, 与本研究得出的结论相类似。

PI3K/Akt 即磷脂酰肌醇-3-蛋白激酶, 这条信号通路在调控细胞的凋亡中发挥重要的作用。刘玫梅等^[22]研究表明: PI3K 活化后的 Akt 可作用于 Bcl-2、Bax 等底物, 抑制细胞凋亡从而保护骨骼肌细胞。本研究发现, 相比超负荷运动组, 超负荷运动+针刺组大鼠 PI3K、p-AKT、m-TOR 蛋白水平显著升高。这可能是因为刺激大鼠的足三里、阳陵泉、内关和肾俞穴后, 促进了 PI3K/Akt 信号通路, 促进 Akt 的磷酸化, 并进一步干预其下游相关凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 的表达, 实现抑制超负荷运动后骨骼肌的凋亡。陈玄等^[23]研究表明: 使用电针刺激足三里和上巨虚减少骨骼肌细胞的凋亡, 与本研究得出的结论相类似。

综上所述, 针刺可以通过调控 PI3K-Akt 信号通路抑制大鼠氧化应激和骨骼肌细胞凋亡实现治疗超负荷运动致骨骼肌损伤。其作用机制可能是通过针刺调控 PI3K-Akt 信号通路实现促进其下游的抑凋亡因子的表达, 实现抑制骨骼肌的凋亡, 同时抑制大鼠体内的氧化应激反应。但本研究仍存在不足之处, 本研究使用的针刺方法较为单一, 在后续的实验中将进一步使用不同针刺方法及针刺不同穴位, 观察其作用效果。

(本文图 2, 3 见插图 12-4)

参考文献

- [1] 夏志, 赵艳, 孟思进, 等. 大剂量补充亮氨酸对抗阻运动所致骨骼肌损伤的影响[J]. 北京体育大学学报, 2017, 40(10): 56-62.
- [2] 毛立伟, 赵梦飞, 王磊. 电针疗法对运动后肌肉损伤相关因子活性的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(9): 1074-1078.
- [3] 潘华山, 汶希, 冯毅, 等. 针刺对运动疲劳大鼠骨骼肌线粒体形态和游离 Ca²⁺ 的影响[J]. 北京体育大学学报, 2011, 34(10): 59-61.
- [4] 张伟波, 徐平, 吴丽洁, 等. 骨骼肌萎缩相关 IGF-1 通路及针灸实验研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(6): 1321-1323.
- [5] 尚画雨, 白胜超, 夏志, 等. 针刺对大负荷运动大鼠骨骼肌线粒体结构和功能的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(8): 901-909.
- [6] 刘晓然, 李俊平, 王蕴红, 等. 大负荷运动及针刺干预对骨骼肌微管蛋白的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(33): 4949-4956.
- [7] 胡元亮. 实用动物针灸手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 22-24.
- [8] 赵晓琴, 白胜超, 孙君志, 等. 针刺对离心运动大鼠骨骼肌 Omi/XIAP 信号通路的影响[J]. 西安体育学院学报, 2018, 35(4): 468-477.
- [9] 詹祥粉, 史曙生. 按摩联合针刺疗法对大鼠运动型骨骼肌损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(2): 311-313, 314.
- [10] 谭惠娟, 罗婷婷, 瞿玉竹, 等. 基于数据挖掘的针灸治疗慢性疲劳综合征膈穴运用规律[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(2): 242-244.
- [11] 杨和亮, 湛松霖, 李金波. 基于数据挖掘的针灸治疗膝关节骨性关节炎取穴规律研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(1): 95-98.
- [12] 李彤, 孙红伟. 元宝枫油对一次性力竭运动大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 重庆医学, 2017, 46(22): 3043-3045.
- [13] DING L, SU XX, ZHANG WH, et al. Gene expressions underlying mishandled calcium clearance and elevated generation of reactive oxygen species in the coronary artery smooth muscle cells of chronic heart failure rats[J]. Chin Med J (Engl), 2017, 130(4): 460-469.
- [14] 罗磊, 张冰洁, 关宁宁, 等. 金银花叶黄酮对衰老模型小鼠的体内抗氧化作用[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 171-176.
- [15] DHAGE PA, KAMBLE LK, BHARGAVA SY. Localization and distribution of superoxide dismutase-1 in the neural tube morphogenesis of chick embryo[J]. Int J Dev Neurosci, 2017, 56(7): 1-9.
- [16] 孙螺, 郑婕, 徐建超, 等. 针刺人迎穴对自发性高血压大鼠血压及延髓头端腹外侧区氧化应激反应的影响[J]. 中医药导报, 2019, 25(2): 101-104.
- [17] HUYSMANS M, SAUL LA, COLL NS, et al. Dying two deaths — programmed cell death regulation in development and disease[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2017, 35(5): 37-44.
- [18] GE Y, CAI YM, BONNEAU L, et al. Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in Arabidopsis[J]. Cell Death & Differentiation, 2016, 23(9): 1493-1501.
- [19] 赵海, 陈明飞, 钱宁, 等. Caspase-3 参与调节孕鼠中后期胎盘细胞凋亡的机制研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 9(15): 234-236.
- [20] 赵英伦, 马元, 莫森, 等. 腰椎间盘突出症患者血清中 Caspase-3 和 Caspase-9 活性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 13-15.
- [21] 陈英华, 郝志平. 针刺四神聪、风池穴对血管性痴呆大鼠海马区 Bcl-2、bax 表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(1): 24-26.
- [22] 刘玫梅, 沈云峰, 陈超, 等. 胰高血糖素样肽-1 受体激动剂改善高糖和缺氧/复氧致心肌细胞损伤的实验研究[J]. 中华内科杂志, 2016, 55(4): 311-316.
- [23] 陈玄, 叶笑然, 黄晓卿. 电针对大鼠失神经支配骨骼肌萎缩及 IGF-1/PI3K/AKT 表达的影响[J]. 中国针灸, 2018, 38(12): 1311-1317.

(收稿日期: 2019-08-26, 修回日期: 2019-11-28)