

• 基础研究 •

白藜芦醇通过抑制 TGF- β_1 、COL- I 过表达
治疗骨骼肌损伤的实验研究刘 杏¹ 魏晓菡¹ 邓 洁¹ 刘金龙² 马兰仙³ 李仲铭¹

摘要 目的 观测骨骼肌急性钝挫伤修复过程中转移生长因子(TGF- β_1)、I 型胶原蛋白(COL- I)的表达规律,探讨白藜芦醇(Res)促进受损骨骼肌结构与功能恢复之作用机制。方法 33 只新西兰兔随机分为 3 组:正常组(3 只)、自然恢复组(15 只)、Res 组(15 只)。除正常组外均制造骨骼肌钝挫伤模型,损伤后自然恢复组不予处理,Res 组每天给予 Res 15 mg/kg 灌胃治疗。分别于伤后 1、3、7、14、21 天处死动物,采用免疫组织化学(IHC)、免疫印记法(Western Blot)检测骨骼肌中 TGF- β_1 、COL- I 蛋白表达。结果 一般结果:损伤组损伤区肿胀,12 h 至肿胀峰值,72 h 后肿胀消退至实验前状态。HE 显示:正常组肌纤维多边形、形态规则、排列紧密,肌核均匀分布于肌膜下,无增生与固缩,肌膜完整;各损伤组第 1 天见血细胞渗出,第 3 天炎症细胞开始浸润至 7 天达峰值,伤后第 21 天肌纤维形态基本恢复正常,Res 组在炎症细胞浸润,修复时间上整体优于自然恢复组。Masson 染色显示:正常肌细胞中胶原纤维含量极少,损伤后随着瘢痕组织形成,胶原纤维逐渐增加,并于 14 天达高峰,Res 组胶原纤维含量低于自然恢复组。IHC 显示:TGF- β_1 、COL- I 主要为胞浆表达,其蛋白含量在损伤后呈现先升后降趋势,自然恢复组和 Res 组均于 7 d 达高峰,自然恢复组高于 Res 组, ($P<0.05$)。Western Blot 显示:TGF- β_1 、COL- I 蛋白表达结果与 IHC 结果相似。结论 TGF- β_1 和 COL- I 蛋白在骨骼肌修复过程中呈现先升高后降低的变化规律,与骨骼肌修复一般规律相类;TGF- β_1 和 COL- I 蛋白表达量变化与瘢痕组织出现有联系,出现明显瘢痕组织时 TGF- β_1 和 COL- I 蛋白含量也达最大值;Res 能抑制 TGF- β_1 和 COL- I 蛋白表达,促进骨骼肌损伤修复,但并不改变骨骼肌损伤修复过程中蛋白表达量的整体变化规律。

关键词 骨骼肌; 损伤修复; 转移生长因子- β_1 ; I 型胶原蛋白; 白藜芦醇

Resveratrol Inhibited Over-expressions of TGF- β_1 and COL- I in Treatment of Skeletal Muscle Injury LIU Xing¹, WEI Xiao-han¹, DENG Jie¹, LIU Jin-long², MA Lan-xian³, and LI Zhong-ming¹
1 Faculty of Anatomy, Histology and Embryology, Basic Medical College, Kunming Medical University, Kunming(650500); 2 Department of Surgery, Clinical Medical School, Dali University, Yunnan (671003); 3 Department of Clinical Medicine, School of Basic Medical Sciences, Kunming Medical University, Kunming (650500)

ABSTRACT Objective To observe the expressions of transforming growth factor (TGF- β_1) and collagen type I (COL- I) during the repair of skeletal muscle acute blunt contusion, and to study the effect of resveratrol (Res) in promoting injured muscle structure and function recovery. **Methods** Thirty-three New Zealand rabbits were randomly divided into three groups: normal group ($n=3$), natural recovery group ($n=15$), and Res group ($n=15$). Except for the normal group, skeletal muscle blunt contusion models were established. After the injury, rabbits in the natural recovery group were not treated. Rabbits in the Res group were given Res at 15 mg/kg per day. They were sacrificed at day 1, 3, 7, 14, and 21 after injury, and the expressions of TGF- β_1 and COL- I protein in skeletal muscle were detected by immunohis-

基金资助: 云南省科技厅-省应用基础研究(昆医联合专项)(No. 2017FE468(-189))

作者单位: 1. 昆明医科大学基础医学院人体解剖学与组织胚胎学系(昆明 650500); 2. 大理大学临床医学院外科学(云南 671003); 3. 昆明医科大学基础医学院临床医学系临床专业(昆明 650500)

通讯作者: 李仲铭, Tel: 0871-65922899, E-mail: copyy1998@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200315. 137

tochemistry (IHC) and Western Blot. **Results** General states: Swelling in injured areas peaked at 12 h. After 72 h, the swelling subsided to the pre-experimental state. HE staining showed muscle fibers in rabbits of the normal group showed polygon, regular shape, and tight arrangement. The muscle nucleus were evenly distributed under the sarcolemma, with no hyperplasia or pyknosis. The sarcolemma was intact; Exudation of blood cells could be seen on the 1st day in each injury group, and the inflammatory cells began to infiltrate from the 3rd day and reach the peak on the 7th day. The morphology of muscle fibers returned to normal basically at day 21. In the Res group, the infiltration of inflammatory cells and the repair time were better than the natural recovery group. Masson staining showed that the collagen fiber content was extremely little in normal muscle cells, and the collagen fiber gradually increased with the formation of scar tissue, and peaked at day 14. The collagen fiber content of the Res group was lower than that of the natural recovery group. IHC showed that TGF- β_1 and COL- I were mainly expressed in cytoplasm, and their protein content increased first and then decreased after injury. They reached the peak at day 7 in the natural recovery group and Res group, and they were higher in the natural recovery group than the Res group ($P < 0.05$). Western Blot showed that expressions of TGF- β_1 and COL- I protein were similar to the IHC results. **Conclusions** The expressions of TGF- β_1 and COL- I protein increased first and then decreased during skeletal muscle repair, which was similar to the general rule of skeletal muscle repair. The expressions of TGF- β_1 and COL- I protein were correlated with the appearance of scar tissue, and the contents of TGF- β_1 and COL- I protein also reached the maximum when scar tissue appeared. Res inhibited the expressions of TGF- β_1 and COL- I protein and promoted the repair of skeletal muscle injury, but it did not change the overall changing rules of protein expression during skeletal muscle injury repair.

KEYWORDS skeletal muscle; injury repair; transforming growth factor- β_1 ; collagen type I; resveratrol

骨骼肌损伤修复主要以肌细胞再生、瘢痕组织化修复两种方式为主,趋向何种方式主要受其受损程度、骨骼肌再生能力、干预措施等因素共同抉择。损伤局部瘢痕化存在于肌损伤修复过程中。适度瘢痕组织可增加伤口愈合强度,且可作为促进成肌分化媒介,利于受损组织正常张力维持与恢复。但过度瘢痕化则降低骨骼肌收缩效能。同时,因瘢痕结构存在生物力学(强度、抗牵拉力等)缺陷,易致使肌组织再次损伤;其次,瘢痕过度沉积堵塞微循环,阻碍局部微循环之物质流通,延缓组织修复时间;再者,过于密集瘢痕组织,阻断新生肌纤维与损伤肌组织间融合,阻碍损伤骨骼肌结构与功能重建^[1,2]。故肌组织损伤后如何平衡肌细胞再生与瘢痕增生间关系成为治疗关键所在。

有研究表明转移生长因子(transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)与瘢痕形成关系密切,是组织修复、纤维变性过程中关键介质,高表达于瘢痕组织,具有趋化炎症细胞、促进 IL-1、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等刺激 TGF- β_1 生成因子表达的作用^[3,4]。胶原蛋白是瘢痕组织结构支架主体,亦是瘢痕组织弹性主要来源,对瘢痕组织形成有着非常重要的作用^[5]。鉴于 TGF- β_1 在瘢痕组织形成中发挥着复杂多样的作用, I 型胶原蛋

白(collagen type I, COL- I)是瘢痕组织的重要结构,抑制 TGF- β_1 和 COL- I 的表达对抑制瘢痕组织过度增生、促进损伤肌肉组织修复有重要意义。

白藜芦醇(resveratrol, Res)可抑制皮下组织、脏器周围、器官内部纤维化过程,减轻组织纤维化引起的超微结构损伤性变化,其作用机制与降低 TGF- β_1 、COL- I 基因过量表达、减轻胶原蛋白沉积,维护局部细胞结构与功能稳定有关^[6]。Res 抗纤维化作用的研究对象多为内脏器官与皮下组织,对其在肌组织损伤修复方面鲜有报道。本实验设想 Res 在改善骨骼肌超微结构变化、抑制肌组织瘢痕组织异常增生方面亦能发挥重要作用。因此,在骨骼肌损伤后给予 Res 治疗,通过检测损伤部位致痕因子 TGF- β_1 和 COL- I 变化情况,探讨 Res 促进骨骼肌损伤修复的作用及可能的机制。

材料与方法

1 动物与分组 普通级健康成年雄性新西兰兔 33 只,体重 2.5~3.0 kg。动物称重,按体重由高向低进行编号排序,将其编号输入 Excel 表后进行随机数字分组法进行分组,正常组(N 组,3 只)、自然恢复组(NR 组,15 只)、Res 组(15 只)。实验动物由昆明医科大学实验中心提供,动物许可证号:SYXK(滇)

K2015-0002。动物伦理经昆明医科大学动物实验伦理委员会批准(No. Kmmu2019057)。分笼喂以普通饲料,自由进食、饮水,室温饲养,湿度(50±5)%,自然光照。

2 药物 Res(购于西安天本生物科技有限公司,生产批号:A01A0400830010,纯度≥98%)用0.5%羧甲基纤维素溶解^[7],溶解后溶液中Res终浓度为15 mg/mL^[8],现配现用。

3 试剂及仪器 4%多聚甲醛固定液购自上海生工生物工程股份有限公司,批号:E672002-0500;EDTA 抗原修复液,批号:P0085、羊血清,批号:C0265、BCA 蛋白定量试剂盒,批号:P0010,均购自上海碧云天生物技术有限公司;蛋白印迹底物(Pierce ECL Western Blotting Substrate),批号:32106、预制蛋白梯(PageRuler Plus Prestained Protein Ladder),批号:26619,均购自美国 Thermo Fisher 公司;过硫酸铵(AP),批号:V900883-25G、十二烷基硫酸钠(SDS),批号:V900859-500G、吐温-20(Tween-20),批号:V900548-500ML,均购自美国 sigma 公司;牛血清白蛋白(BSA),批号:FA016-50G、丙烯酰胺(Acrylamide),批号:GA006-500G、甲叉双丙烯酰胺(Bis-acrylamide),批号:GN199-25G、三羟甲基氨基甲烷(Tirs),批号:BT350-5KG、甘氨酸(Glycine),批号:FG149-500G,均购于美国 Genview 公司;脱脂牛奶,购于美国 BD 公司,批号:232100-500 g;Anti-TGF beta 1 抗体,批号:ab9758、Anti-Collagen I 抗体,批号:ab6308,均购于美国 Abcam 公司;加强型 DAB Plus Kit,批号:DAB-2031、即用型免疫组化 Elivision TMs super HRP (Mouse/Rabbit) IHC Kit,批号:KIT-9922,均购于福州迈新生物技术开发有限公司;苏木素伊红(HE)染色试剂盒 批号:G1120、高效 RIPA 裂解液,批号:R0010、苯甲基磺酰氟(PMSF),批号:P8340,均购于北京索莱宝科技有限公司。全自动荧光显微镜,批号:90i,购于日本 Nikon 公司;自动高压灭菌锅,批号:HIRAYAMA.HV-110,购于日本 Hirayama 公司;电泳仪,批号:164-5050、化学发光成像分析系统,批号:Chemical XRS+,均购于美国 Bio-Rad 公司;生物组织智能自动脱水机,批号:KH-TK,购于湖北孝感阔海医疗科技有限公司;全自动包埋机,批号:EG1160、手动轮转切片机,批号:RM2235,均购于德国 Leica 公司。

4 实验方法

4.1 模型建立 本文参照洪汛宁等^[9]骨骼肌钝挫伤模型的制作方法,进行骨骼肌损伤模型的制作,

即:3% 戊巴比妥(1.3 mL/kg)耳缘静脉麻醉动物,麻醉生效后,将实验兔侧卧位(右侧在上)固定于造模台,右后肢于伸膝、踝背屈约 90° 状态,小腿脱毛,取医用纱布包裹小木板垫于目标肌肉群下起缓冲作用,暴露腓肠肌,取腓肠肌距跟骨后缘 8cm 处做为打击部位并标记,将腓肠肌置于自制重力致伤机下,打击锤重 0.4kg、底面圆形,直径 3.0cm、自由落体高度为 50 cm,在不移位置的情况下,连续打击 4 次。打击后,用 25 g/L 安尔碘溶液处理创面,1 次/天,保持创面干燥避免感染。经预实验解剖及 HE 染色表明骨骼肌损伤程度适中^[10],无骨折出现。

4.2 给药方法 Res 组实验动物于每天 10:00 灌胃给药,剂量为 15 mg/kg。

4.3 取材 NR 组和 Res 组动物于损伤后 1、3、7、14、21 天各选出 3 只动物耳缘静脉注射过量麻药致死(戊巴比妥 100 mg/kg)。用手术刀划开皮肤,暴露出筋膜并分离腓肠肌,采用双面刀片切取腓肠肌肌腹损伤较为严重区域将其平分为 6 份,2 份用生理盐水冲洗后用 4% 多聚甲醛溶液漂洗,然后置于 4% 多聚甲醛溶液固定。其余 4 份提取标本后即刻放于冻存管中,于液氮中冻存 1 天,然后移至 -80 °C 冰箱保存。正常组不做处理,常规饲养 7 天后处死,取材同上。

5 观察指标及检测方法

5.1 一般形态学观察 测量腿周。分别在骨骼肌损伤前及损伤后 1、3、7、12、24、48、72 h 用没有弹性的棉线测量其目标腿部周径及健侧相同部位,并记录。

5.2 病理学形态检测 将肌组织从 4% 多聚甲醛中取出,切成合适大小,放入一次性包埋盒并标记,流水冲洗 12 h 后放自动脱水机中程序脱水、脱蜡,然后包埋制成石蜡块。蜡块制成 5 μm 厚切片,常规脱蜡、至水。HE 染色观察其损伤后组织出血,炎症细胞浸润程度等;Masson 染色观察其损伤后胶原纤维形成情况;免疫组化观测其 TGF-β₁、COL-I 蛋白表达量。

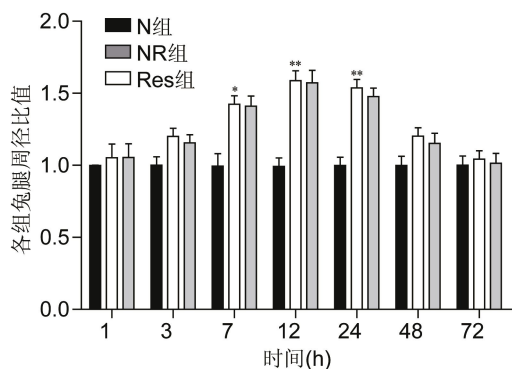
5.3 肌 TGF-β₁、COL-I 蛋白表达量检测 采用 Western Blot 检测法检测。取组织解冻,提取其总蛋白,配置分离胶及浓缩胶,根据蛋白浓度计算上样量,电泳,转膜,剪膜和漂洗,封闭,抗原抗体反应,化学发光、显影、定影,运用 Image J 图像分析软件进行图像分析 TGF-β₁、COL-I 蛋白表达量。

6 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计软件对实验结果进行分析,计量资料经正态性检验和方差齐性检验,各组数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分

析,组间两两比较采用 *LSD* 检验;若方差不齐,则采用 *k* 个独立样本的秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 3 组腿周比较(图 1) NR 组与 Res 组于损伤后 7~24 h 腿周达最大,48~72 h 恢复正常,与 N 组比较,NR 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 NR 组比较,Res 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

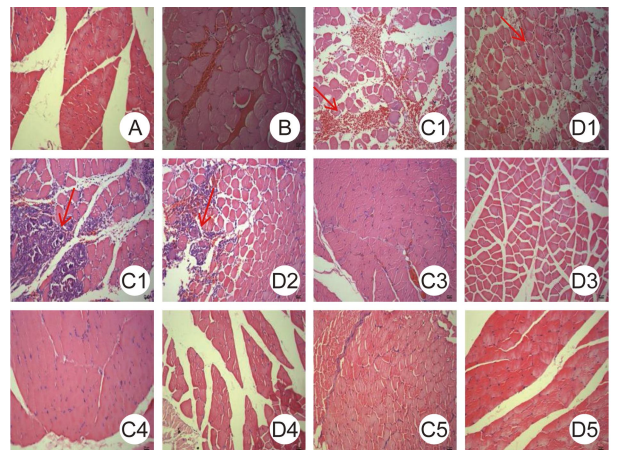


注:与 N 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 3 组兔损伤后腿周测量结果比较

2 3 组兔肌纤维形态及病理变化比较(图 2) N 组肌纤维呈多边形,形态规则,排列紧密,肌核均匀分布于肌膜下,无增生、固缩,肌膜较完整。损伤后 1 天,NR 组和 Res 组均出现水肿,肌纤维形态不规则,肌细胞多呈圆形,面积较 N 组大,排列疏松,肌细胞间隙严重充血,并伴有少量炎性细胞出现;损伤后 3 天,NR 组和 Res 组均出现炎性细胞浸润,尤以血管周围组织为重,肌纤维溶解,部分胞浆完全被巨噬细胞吞噬;造模后第 7 天,NR 组和 Res 组炎性细胞开始减少,胞间隙充血消失,肌纤维水肿减轻,瘢痕组织增多,Res 组恢复情况优于 NR 组;造模后第 14 天,NR 组出现瘢痕组织,Res 组已显现骨骼肌结构;造模后第 21 天,NR 组和 Res 组逐渐恢复,炎性细胞消失,可见再生肌纤维,骨骼肌结构重现,形态趋向 N 组,但与 N 组相比仍有不足,Res 组恢复快于 NR 组。

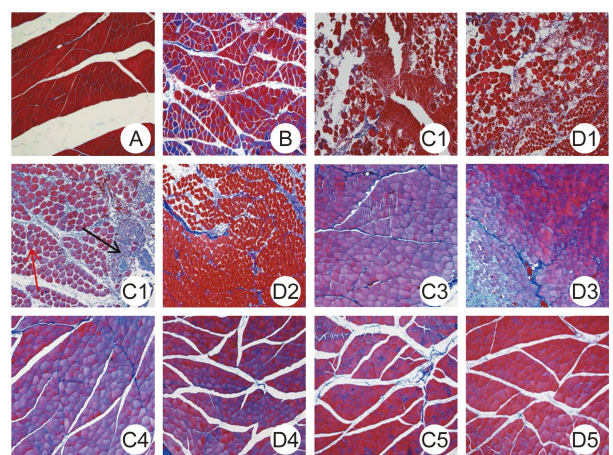
HE 染色结果可发现,NR 组和 Res 组损伤后 1 天均表现出明显的骨骼肌损伤特征,损伤后 3 天有所加重,7 天炎症反应减轻,14 天显现恢复,21 天基本恢复正常。Res 组恢复情况优于 NR 组,虽然 Res 组 3 天时仍出现了炎症加剧的情况,但在损伤后 7 天时已可见瘢痕组织,14 天时骨骼肌结构重现,21 天时组织形态更接近正常骨骼肌形态。



注:A 为 N 组;B 为损伤后立即取材;C 为 NR 组,其中 1~5 分别为 1、3、7、14、21 天;D 为 Res 组,其中 1~5 分别为 1、3、7、14、21 天;C1、D1 箭头所指为红细胞渗出;C2、D2 箭头所指为炎性细胞浸润

图 2 3 组兔肌组织形态及病理结果比较(HE, ×10)

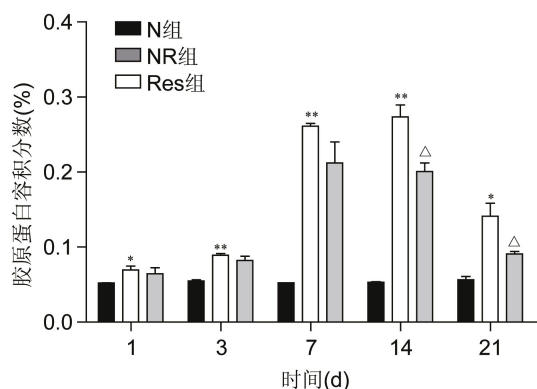
3 3 组胶原纤维量比较(图 3、4) 损伤后 3 天,与 N 组比较,NR 组和 Res 组胶原纤维含量增加 ($P < 0.01$),7 天时均有新生毛细血管及肉芽组织形成。14 天时胶原纤维含量达高峰,但 Res 组较 NR 组胶原纤维含量少,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。损伤后 21 天 Res 组仍有少量胶原纤维存在,但与 N 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 NR 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),与 N 组比较,NR 组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。



注:A 为 N 组;B 为损伤后立即取材;C 为 NR 组,其中 1~5 分别为 1、3、7、14、21 天;D 为 Res 组,其中 1~5 分别为 1、3、7、14、21 天;C2 中红色箭头红细胞内胶原纤维沉积,黑色箭头为炎症细胞着色

图 3 3 组兔腓肠肌胶原纤维量比较 (Masson 染色, ×10)

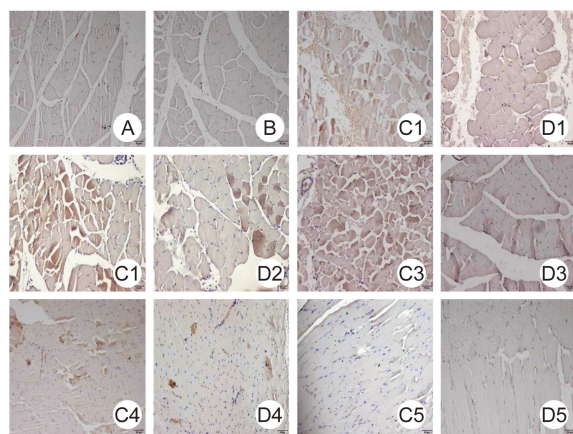
4 3 组兔不同时期 $TGF-\beta_1$ 蛋白表达水平比较(图 5、6) $TGF-\beta_1$ 蛋白主要为胞浆表达。N 组肌细



注:与 N 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 NR 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 4 3 组兔肌组织胶原纤维含量比较

胞中 TGF- β_1 蛋白表达量极低,几乎呈阴性;NR 组和 Res 组 TGF- β_1 蛋白表达量随损伤时间延长呈一定规律性。损伤后 1、3、7 天,NR 组和 Res 组 TGF- β_1 蛋白表达量均持续上升,其中 NR 组较 N 组升高明显 ($P < 0.01$);NR 组较 Res 组蛋白表达量亦显著升高 ($P < 0.01$);损伤后 14 天,NR 组和 Res 组蛋白表达量出现不同程度下降,但 Res 组 TGF- β_1 蛋白表达量低于 NR 组 ($P < 0.01$);损伤后 21 天,NR 组和 Res 组 TGF- β_1 蛋白表达量基本趋于正常,但 NR 组仍高于 N 组和 Res 组 ($P < 0.05$)。

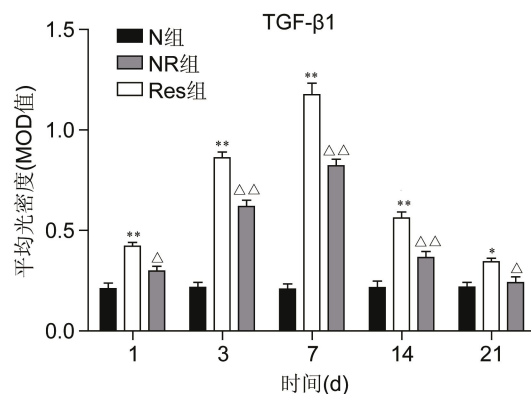


注:A 为 N 组;B 为损伤后立即取材;C 为 NR 组,其中 1~5 分别为 1、3、7、14、21 天;D 为 Res 组,其中 1~5 分别为 1、3、7、14、21 天

图 5 3 组兔 TGF- β_1 表达量比较 (免疫组化, $\times 10$)

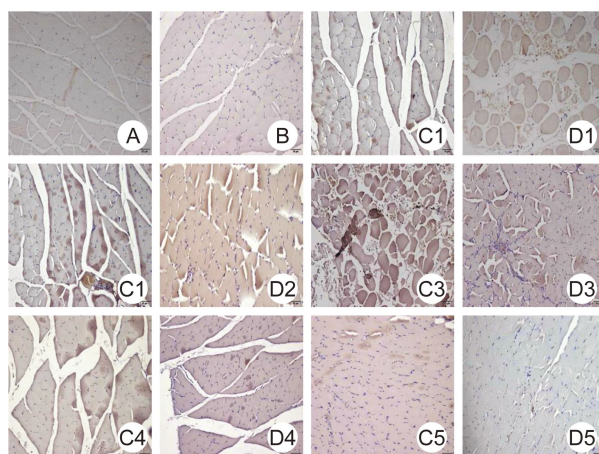
5 3 组兔不同时期 COL- I 蛋白表达水平比较 (图 7、8) COL- I 蛋白亦为胞浆表达。N 组 COL- I 蛋白表达量较低;NR 组及 Res 组 COL- I 蛋白表达量随损伤后时间变化呈一定规律。损伤后 1、3、7 天,NR 组及 Res 组 COL- I 蛋白表达量均持续上升,NR 组较 N 组及 RES 组上升明显 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),到损伤

后 14 天,NR 组及 Res 组 COL- I 蛋白表达量下降,但 NR 组仍较 N 组及 RES 组升高明显 ($P < 0.01$, $P < 0.05$);损伤后 21 天,Res 组逐渐恢复正常,而 NR 组高于 N 组 ($P < 0.05$)。



注:与 N 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 NR 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 6 3 组兔 TGF- β_1 平均光密度值水平比较



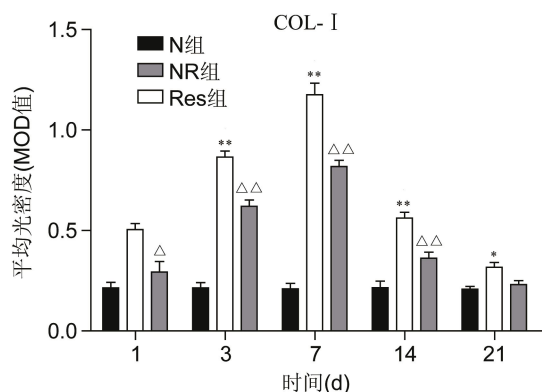
注:A 为 N 组;B 为损伤后立即取材;C 为 NR 组,其中 1~5 分别为 1、3、7、14、21 天;D 为 Res 组,其中 1~5 分别为 1、3、7、14、21 天

图 7 3 组兔 COL- I 表达量比较 (免疫组化, $\times 10$)

6 3 组兔不同时期 TGF- β_1 、COL- I 蛋白表达水平比较 (图 9~11) 骨骼肌损伤后,NR 组与 Res 组蛋白浓度整体呈现先升后降趋势,与 N 组比较,NR 组 TGF- β_1 、COL- I 蛋白浓度差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。Res 组 TGF- β_1 、COL- I 蛋白浓度均低于 NR 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

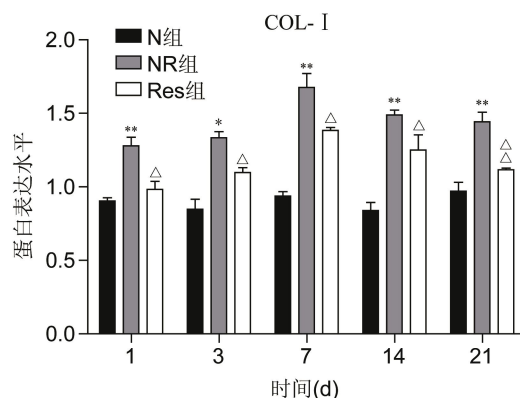
讨 论

骨骼肌损伤后修复主要以肌细胞再生、瘢痕组织化修复两种方式为主,最后趋向何种方式进行修复主要受其受损程度、肌再生能力、是否干预等因素共同抉



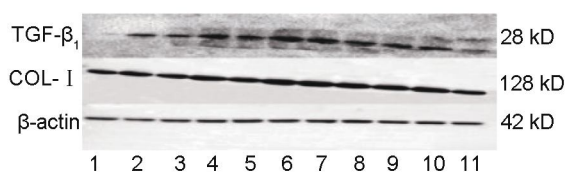
注:与 N 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 NR 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 8 3 组兔 COL-I 平均光密度值水平比较



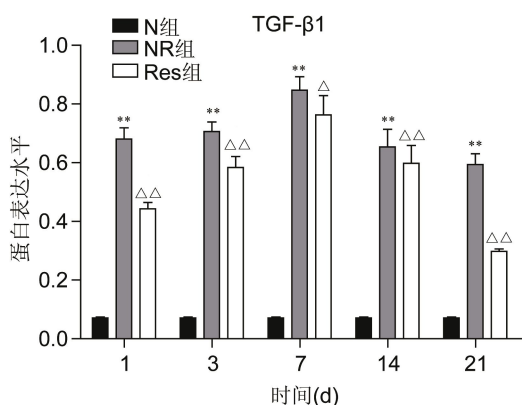
注:与 N 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 NR 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 11 3 组 COL-I 蛋白表达水平比较



注:1 为正常组;2 为 NR 组 1 天;3 为 Res 组 1 天;4 为 NR 组 3 天;5 为 Res 组 3 天;6 为 NR 组 7 天;7 为 Res 组 7 天;8 为 NR 组 14 天;9 为 Res 组 14 天;10 为 NR 组 21 天;11 为 Res 组 21 天

图 9 3 组兔 1、3、7、14、21 天 TGF- β_1 、COL-I 蛋白表达电泳图



注:与 N 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 NR 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 10 3 组兔 TGF- β_1 蛋白表达水平

择。有研究表明骨骼肌损伤与修复过程受多种因子调控,而瘢痕修复是其重要一步,作为瘢痕因子 TGF- β_1 、COL-I 等蛋白含量波动变化关系着预后的好坏^[11]。笔者推测骨骼肌损伤后 TGF- β_1 、COL-I 在受损肌组织中异常表达,在后续研究工作中侧重于找寻改善局部微环境状态、防治瘢痕过度增生的相关药物,为临床治疗骨骼肌损伤提供新思路。

TGF- β_1 能诱导成肌细胞向肌成纤维细胞横向转化^[12-15],是骨骼肌纤维化的始动因子^[16],并可促进成纤维细胞增殖、胞外基质合成、抑制蛋白酶和基质酶活性,减少细胞外基质分解,进而促使细胞外基质沉积。另有研究表明,TGF- β_1 不仅参与间充质和上皮细胞的信号转导,在细胞增殖、迁移和分化中也发挥重要作用,TGF- β_1 还能促进组织修复,在肌肉的形成过程中起到积极作用^[17, 18]。作为细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 主要成分之一, I 型胶原蛋白是反映胶原代谢的主要参数^[19],增生性瘢痕主要是 COL-I 基因过量表达致大量胶原蛋白沉积,伴明显胶原 (降解) 酶活性下降^[20],因此 COL-I 能客观反映了瘢痕的病理状态。本实验结果从动物整体来看,骨骼肌损伤后实验动物活动受限,3 天后略恢复正常。HE 染色结果显示骨骼肌损伤后即刻出现出血水肿,损伤 1 天时出血最为严重并伴有炎症细胞浸润,3 天时炎症细胞浸润最为明显,7 天时炎症细胞浸润较 3 天时少。Masson 染色结果显示,损伤后 14 天胶原纤维含量达峰值,Res 组低于 NR 组。研究表明:骨骼肌损伤修复过程中,适量胶原纤维沉积利于缩小创面形成初步纤维连接,增加伤口抗拉伸力及连接伤口两端肌纤维,促进组织愈合^[21]。若胞外大量胶原沉积,肌纤维再生会被抑制,形成机械屏障延迟,阻碍其连接及创口愈合。并增加患肢二次损伤几率,加重肌肉萎缩和痉挛^[22]。本实验 Western Blot 及 HIC 结果显示,骨骼肌损伤后 TGF- β_1 、COL-I 蛋白表达量明显升高,整体上 NR 组高于 Res 组。其结果与杨宁等人报道相似^[23, 24]。

综上所述:TGF- β_1 和 COL-I 蛋白在骨骼肌修复过程中呈现先升高后降低的变化规律,与骨骼肌修复的一般规律相类;TGF- β_1 和 COL-I 蛋白表达量变化

与瘢痕组织出现有关,特别是 COL- I 蛋白,当 TGF- β_1 和 COL- I 蛋白表达量达高峰后瘢痕组织高峰随后出现;Res 通过抑制 TGF- β_1 和 COL- I 蛋白过表达来促进骨骼肌损伤后修复,但其并不改变骨骼肌损伤修复过程中蛋白表达量的整体变化规律。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Cutlip RG, Baker BA, Hollander M, et al. Injury and adaptive mechanisms in skeletal muscle [J]. J Electromyography Kinesiol, 2009, 19(3): 370-372.
- [2] Turner NJ, Badylak SF. Regeneration of skeletal muscle[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(3): 759-774.
- [3] Robert S, Gicquel T, Bodin A, et al. Characterization of the MMP/TIMP imbalance and collagen production induced by IL-1 β or TNF- α release from human hepatic stellate cells[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153118.
- [4] Kim KK, Sheppard D. TGF- β_1 signaling and tissue fibrosis [J]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2018, 10(4). pii: a022293.
- [5] Shen H, Wang J, Min J, et al. Activation of TGF- β_1 / α -SMA/Col I profibrotic pathway in fibroblasts by galectin-3 contributes to atrial fibrosis in experimental models and patients[J]. Cellul Physiol Biochemistry, 2018, 47(2): 851-863.
- [6] Bechmann LP, Zahn D, Gieseler RK, et al. Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells[J]. Hepatol Res, 2010, 39(6): 601-608.
- [7] 李方. 白藜芦醇对高强度跑台运动大鼠尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白酶的影响[A]. 第二届全球华人营养科学家大会论文摘要汇编[C]. 北京: 中国营养学会, 2019.
- [8] 安梅. 白藜芦醇对佐剂性关节炎大鼠抗炎免疫作用及其部分机制探讨[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- [9] 洪汛宁, 王德杭, 王小宁, 等. 肌肉损伤磁共振成像的病理基础研究[J]. 南京医科大学学报, 2000, (5): 362-364.
- [10] Blankenbaker DG. Temporal changes of muscle injury [J]. Sem Musculoskel Radiol, 2010, 14(2): 176-193.
- [11] Liu X, Long X, Liu W, et al. Type I collagen induces mesenchymal cell differentiation into myofibroblasts through YAP-induced TGF- β_1 activation [J]. Biochimie, 2018, (150): 110-130.
- [12] Chen YH, Peng YL, Wang Y, et al. TGF- β_1 -induced synthesis of collagen fibers in skeletal muscle-derived stem cells [J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2013, 33(2): 238-243.
- [13] Chellini F, Tani A, Zecchi-Orlandini S. Influence of platelet-rich and platelet-poor plasma on endogenous mechanisms of skeletal muscle repair/regeneration[J]. Int J Molec Sci, 2019, 20(3): pii: E683.
- [14] Fausther MG, Lavoie E. Liver myofibroblasts of murine origins express mesothelin: Identification of novel rat mesothelin splice variants [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0184499.
- [15] 赵娜, 张玮, 庞赓, 等. 基于 TGF- β_1 /CTGF 作用途径探讨推拿干预骨骼肌纤维化的作用机制[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(12): 2539-2541.
- [16] Kubota S. Correction: Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions [J]. Clin Sci, 2015, 128(3): 181-196.
- [17] 丁维进, 苏志达, 江华. 肌源干细胞在组织工程和再生医学的应用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23): 4328-4333.
- [18] Liu HH, Wang JW, Zhang RP, et al. *In vivo* feeding of IGF-1 to ducks influences neonatal skeletal muscle hypertrophy and muscle mass growth upon satellite cell activation [J]. J Cellul Physiol, 2012, 227(4): 1465-1475.
- [19] 耿中利, 董祥林, 马斌林. 转化生长因子 β I 型受体、I 型胶原在人皮肤增生性瘢痕组织周边区和中心区的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(2): 253-257.
- [20] 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): 899-909.
- [21] Hurme T, Kalimo H, Sandberg M, et al. Localization of type I and III collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle [J]. Lab Invest, 1991, 64(1): 76-84.
- [22] Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research [J]. J Bone Joint Surg, 2002, 84(5): 822-832.
- [23] 杨宁, 周越, 王瑞元, 等. 针刺对骨骼肌拉伤恢复进程中纤维化因子的影响[J]. 北京体育大学学报, 2018, 41(9): 70-74, 82.
- [24] Tall EG, Bernstein AM, Oliver N, et al. TGF- β -stimulated CTGF production enhanced by collagen and associated with biogenesis of a novel 31-kDa CTGF form in human corneal fibroblasts [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2010, 51(10): 5002-5011.

(收稿: 2019-10-25 在线: 2020-04-09)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶