

· 基础研究 ·

消肿止痛膏对腓肠肌损伤大鼠 MEF2 mRNA 与蛋白表达的影响

王钢, 赵勇

(中国中医科学院望京医院骨伤综合科, 北京 100102)

【摘要】 目的: 基于微小 RNA 表达机制, 探讨消肿止痛膏对大鼠骨骼肌损伤后重塑和修复的影响。方法: 通过钝挫伤模型的方法建立大鼠腓肠肌损伤模型, 观察消肿止痛膏对大鼠损伤后 4、7、14、21 d 大鼠定量 PCR 检测腓肠肌 MEF2 mRNA 与蛋白质的表达水平, 探讨消肿止痛膏对大鼠腓肠肌钝挫伤模型的肌肉重塑与修复的作用机制。结果: 治疗组 MEF2 的表达水平高于空白组与模型组, 进一步证实了 MEF2 在外用药物中引起骨骼肌重塑及修复过程中的重要作用。MEF2 在损伤后 7 d 上升, 其后表达一直维持在较高水平, 至损伤后 21 d 仍可以表达出较高水平。与模型组相比较, 其表达的高峰期在 14 d 左右, 其后则基本回归到一般状态。结论: MEF2 的表达水平呈现上升趋势, 即使至损伤后 21 d, 其表达仍未见明显下降, 可见消肿止痛膏可以促进 MEF2 的表达。同时, 消肿止痛膏可以调节骨骼肌的再生修复, 因此, 消肿止痛膏可以通过基因调控, 发挥对骨骼肌损伤后的再生修复作用。

【关键词】 腓肠肌; 创伤和损伤; 生肌调节因子; 植物药疗法; 大鼠

中图分类号: R393, R242

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2019.06.019

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of Xiaozhong Zhitong Ointment (消肿止痛膏) on MEF2 mRNA and protein expression in rats with gastrointestinal muscle injury WANG Gang and ZHAO Yong. Department of Orthopaedics and Trauma, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Xiaozhong Zhitong Ointment (消肿止痛膏, XZZTO) on remodeling and repair of skeletal muscle injury in rats based on the expression mechanism of microRNA. **Methods:** The rat gastrocnemius injury model was established by blunt contusion model. The expression of MEF2 gene and protein in gastrocnemius muscle was detected by quantitative PCR at 4, 7, 14 and 21 days after injury with XZZTO. The mechanism of the effect of XZZTO on the muscle remodeling and repair of rat gastrocnemius contusion model was discussed. **Results:** The expression level of MEF2 in the treatment group was significantly higher than that of the control group and model group, which further confirmed the important role of MEF2 in inducing skeletal muscle remodeling and repair process in the topical drugs. The expression of MEF2 increased at 7 days after injury and remained at a high level until 21 days after injury. Compared with the model group, the peak expression period was about 14 days, and then returned to the general state. **Conclusion:** The expression level of MEF2 shows an upward trend. Even 21 days after injury, the expression of MEF2 dose not show a significant downward trend. It can be seen that XZZTO can promote the expression of MEF2. At the same time, XZZTO can regulate the regeneration and repair of skeletal muscle. Therefore, XZZTO can play a regeneration and repair role after skeletal muscle injury through gene regulation.

KEYWORDS Muscle, skeletal; Wounds and injuries; Myogenic regulatory factor; Phytotherapy; Rats

骨骼肌在人类日常活动中发挥着极为重要的作用, 在日常生活中, 人们往往会因为反复活动、体育活动等而导致损伤。近年来, miRNA 在疾病发生发展中的作用已成为了研究热点, 其与炎症反应、各种

细胞因子的密切关系逐渐被大家所关注。miRNA 是一种存在于生物基因组中, 由内含子和编码基因间隔区的基因编码的, 长度 20~22 nt 的内源性非蛋白单链小分子 RNA。自发现 lin-4 以来, 越来越多的 miRNA 被发现。miRNA 可通过调控转录因子、细胞因子、生长因子、促凋亡抗凋亡基因的表达, 来调控细胞的增殖与凋亡^[1]。随着 miRNA 研究的深入, 其与骨关节炎、骨质疏松症、骨肿瘤发病密切相关^[2-3]。可以说, miRNA 是从更高级的调节顺序上, 通过调控包括细胞因子、酶、各种细胞的表达, 达到对骨骼肌损伤修复再生的宏观调节^[4]。

基金项目: 2012 年北京市科委中医药外治法科技项目 (编号: WZF2012-01)

Fund program: Science and Technology Project of External Therapy of Traditional Chinese Medicine of Beijing Science and Technology Commission in 2012 (No. WZF2012-01)

通讯作者: 赵勇 E-mail: zhaoyong423@163.com

Corresponding author: ZHAO Yong E-mail: zhaoyong423@163.com

1 材料与方 法

1.1 主要实验仪器

TRIzol Reagent: 批号 28218, 丹麦哥本哈根, in-vitrogen 公司。TIANScrip t cDNA 第 1 链合成试剂盒: 批号 M1301, 北京, 天根生化科技(北京)有限公司。2×Tap Plus PCR MasterMix: 批号 M1110, 北京, 天根生化科技(北京)有限公司。DNA 引物: 上海, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 实验动物与方 法

健康清洁级 SD 雄性大鼠 90 只, 8 周龄, 体重 (150±50) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证明: SCXK(京)2006-0011。动物饲养于清洁柜中, 喂以普通大鼠饲料, 饲养时温度控制在 (20±1) °C, 湿度 50% 左右。大鼠适应性饲养 1 周后进入实验。大鼠根据体重的不同进行分组, 通过随机数字表的办法, 分为: 空白组、模型组、治疗组, 每组各 30 只。

采用多次机械冲击产生钝挫伤^[5]的方法建立骨骼肌损伤模型。20% 乌拉坦溶液行腹腔麻醉, 剪除被毛。大鼠采用俯卧位使腓肠肌位于胫腓骨内侧。腓肠肌肌腹中点做标记, 予以 3 次连续打击。打击器总质量为 500 g, 动能为 2.352 J。观察打击部位无骨折, 有散在红色斑点, 表皮无破损。如此每周进行机械冲击钝挫伤与离心运动 1 次, 连续 4 周。

(1) 空白组: 不作任何处理, 与治疗组和模型组同步取材。(2) 模型组: 与治疗组同步抓取和固定, 但不予外用药物。(3) 治疗组: 以局部打击点(即腓肠肌肌腹的中点)为外用药物作用部位, 消肿止痛膏, 由中国中医科学院望京医院药剂科提供。批号: 051209。处方: 生大黄, 红花, 桃仁, 川芎, 赤芍, 草薢, 泽泻, 生侧柏叶, 制乳香, 制没药, 桂枝, 黄柏, 薄荷, 冰片。配制方法: 以上 14 味药, 除冰片外, 其余药材分别粉碎成细粉, 过 100 目筛; 取冰片, 加入少量乙醇溶解; 另取黄凡士林融化至 80 °C, 加入上述细粉, 混匀, 待温度降至 40 °C 时, 加入冰片乙醇溶液, 搅拌均匀后冷凝, 制成软膏。给药途径: 皮肤局部给药。给药量: 每日 1 次, 每次软膏 2 g/kg。

腔麻醉, 剪除被毛, 游离腓肠肌, 切除腓肠肌肌腹中段的病灶组织, 约 1 cm³。转移至 2 ml 冻存管, 入液氮罐降温, 最后转移至 -80 °C 冰箱保存。部分生理盐水冲洗, 4% 多聚甲醛溶液漂洗, 后置于 4% 多聚甲醛溶液固定 2 d 以上, 行石蜡包埋。

1.3 检测指标

(1) RNA 的提取与鉴定。组织总 RNA 提取: 取约 100 mg 组织+1 ml Trizol→匀浆器匀浆, 混匀室温静置 5 min→加 200 μl 氯仿→离心, 4 °C, 12 000 r/min,

15 min→转上层水相到 1.5 ml EP 管→加等体积异丙醇, 振荡器混匀, 冰浴 10 min→离心: 4 °C, 12 000 r/min, 15 min→弃上清→加 1 ml 75% 乙醇→离心, 4 °C, 8 000 r/min, 5 min→弃上清, 放置待酒精挥发→加 40 μl DEPC 水, 把 RNA 沉淀吹匀→立即保存于 -80 °C 冰箱。

浓度计算: 将 RNA 样本稀释 100 倍, 用分光光度计测 OD260 值和 OD280 值。RNA 浓度=OD260 值×稀释倍数(100)×40/1 000

(2) 转 cDNA(详见试剂盒说明书)。计算出 5 μg 总 RNA 上样量+2 μl oligo+2 μl 超纯 dNTP+补 RNase-free ddH₂O 定容至 14.5 μl→70 °C 加热 5 min 后迅速冰上冷却 2 min→加 4 μl 5×First-Strand Buffer+0.5 μl RNasin+1 μl TIANScrip t M-MLV→42 °C 50 min→95 °C 加热 5 min 终止反应→冷冻保存。

(3) PCR(详见试剂盒说明书)。cDNA 1 μl+上游引物 1 μl+下游引物 1 μl+2×Master Mix 12.5 μl+ddH₂O 补至 25 μl→扩增: ①95 °C, 5 min→②95 °C, 30 s→56 °C, 30 s(30 循环)→72 °C, 30 s→③72 °C, 7 min。

(4) 电泳。2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 140 V 电泳 40 min 后成像系统下分析。

定量 PCR 检测腓肠肌 MEF2 mRNA 的表达水平。见表 1。

表 1 定量 PCR 引物
Tab.1 Quantitative PCR primers

名称	引物(5'-3')
GADPH	上游: GGT GGA CCT CAT GGC CTA C
	下游: GGG TGC AGC GAA CTT TAT TGA
MEF2a	上游: ACC GTC TTT GGC AGC CAG CTC
	下游: AGG CCC TTG AGT CTA CAA ATC
U6	上游: GTA TTA TGG CCT CGA AGA GTG
	下游: GTA TTA TGG CCT CGA AGA GTG

1.4 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两两比较用 LSD-t 检验。不服从正态分布的数据, 采用非参数检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 消肿止痛膏对大鼠腓肠肌 MEF2 mRNA 的表达的影响

各组大鼠腓肠肌中 MEF2 mRNA 表达结果见表 2。造模后 14 d, 模型组与治疗组中 MEF2 mRNA 的表达均较 4 d 时升高, 治疗组 21 d 时仍高于 4 d 时

表达。

表 2 不同造模时间大鼠腓肠肌组织 MEF2 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Changes of the expression of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) in different modeling times ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	4 d	7 d	14 d	21 d
空白组	23	1.00±0.10	0.95±0.05	1.01±0.17	0.99±0.13
模型组	22	0.76±0.28	0.75±0.16	1.53±0.15*	1.01±0.02
治疗组	24	0.61±0.18	1.50±0.08 [§]	1.41±0.26 [§]	1.48±0.17 [§]
F 值		1.946	10.203	22.690	18.872
P 值		0.143	0.004	0.000	0.007

注:与本组 4、7 d 比较, * $P < 0.01$; 与本组 4 d 比较, [§] $P < 0.05$
 Note: compared with 4 d and 7 d in same group, * $P < 0.01$; compared with 4 d in same group, [§] $P < 0.05$

2.2 消肿止痛膏对大鼠腓肠肌 MEF2 蛋白表达的影响

各组大鼠腓肠肌中 MEF2 蛋白表达结果见表 3, 图 1。造模后, MEF2 蛋白有所上升, 14 d 均到达顶峰, 随后其含量下降(图 2)。造模 21 d 后, 模型组与治疗组 MEF2 蛋白的表达显著降低($P < 0.01$)。

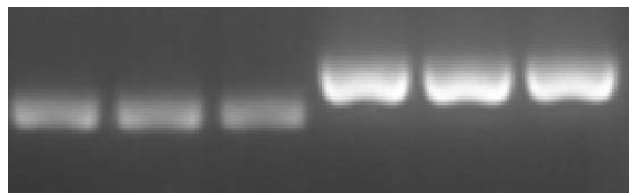
3 讨论

3.1 钝挫伤造模对骨骼肌损伤的影响

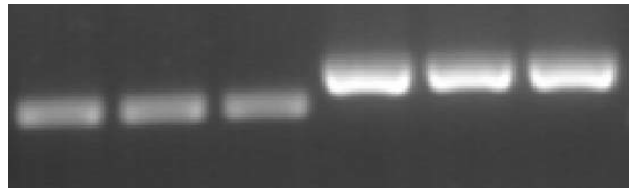
肌肉组织是由具有收缩功能的肌肉细胞构成。由于肌肉细胞呈细长纤维状, 故又称肌纤维。肌纤维收缩是因为细胞内含有发达的肌原纤维。尽管每块肌肉因大小、位置等不同, 在人体活动中发挥不同的作用, 但每块肌肉却都有共同的基本结构。骨骼肌通过产生力而引起骨骼的运动。满足人体功能需求。从解剖学看, 健康的人体共含有 639 块肌肉, 占人体总体重的 10%~15%^[6]。根据位置的不同, 可以把包绕在肌纤维外面的结缔组织分为肌内膜、肌束膜和肌外膜, 其中肌束膜还根据包绕的肌束级别而不同分为 I 级、II 级与 III 级肌束膜。

以钝挫伤模型为代表: 该模型方法模拟的是临床上由外伤撞击引起的骨骼肌损伤, 研究表明在骨

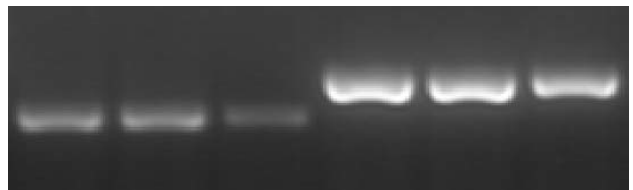
MEF2 蛋白 内参 GAPDH
 空白组 模型组 治疗组 空白组 模型组 治疗组



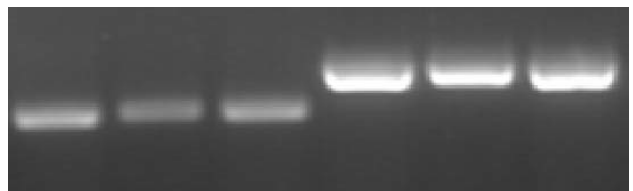
大鼠腓肠肌组织 MEF2 蛋白表达水平条带(4 d)



大鼠腓肠肌组织 MEF2 蛋白表达水平条带(7 d)



大鼠腓肠肌组织 MEF2 蛋白表达水平条带(14 d)



大鼠腓肠肌组织 MEF2 蛋白表达水平条带(21 d)

图 1 大鼠腓肠肌组织 MEF2 蛋白表达水平条带图

Fig.1 Expression of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) protein in rat gastrocnemius muscle

骼肌钝挫伤中, 骨骼肌往往具有较好的再生能力。

本实验采用大鼠腓肠肌钝挫伤模型, 模拟了更加贴切人们日常生活中骨骼肌损伤的模式。从实验的病理切片看, 完全符合骨骼肌损伤的病理变化, 从炎症、水肿到中期巨噬细胞浸润、肌纤维再生、卫星

表 3 不同造模时间大鼠腓肠肌组织 MEF2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, 灰度值)

Tab.3 Changes of the expression of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) protein in different modeling times ($\bar{x} \pm s$, gray value)

组别	例数(例)	4 d	7 d	14 d	21 d
空白组	23	0.164 6±0.001 2	0.168 0±0.001 5	0.267 3±0.001 6	0.255 2±0.001 3
模型组	22	0.205 0±0.0020	0.216 7±0.000 6	0.258 6±0.001 5	0.168 6±0.000 2
治疗组	24	0.188 8±0.0008	0.177 0±0.001 8	0.246 0±0.000 6	0.160 8±0.001 7
F 值		1.882	1.287	2.690	19.110
P 值		0.134	0.288	0.238	0.000

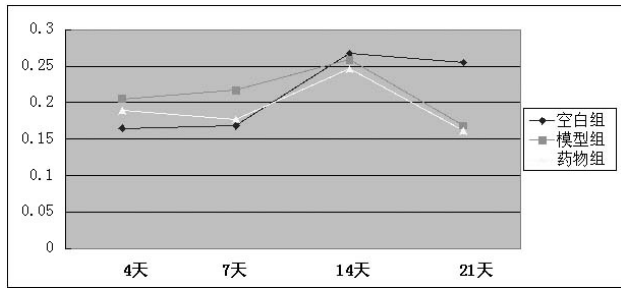


图 2 各个时间点大鼠腓肠肌组织 MEF2 蛋白含量变化趋势图

Fig.2 Changes trend of the expression of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) protein at different timepoint

细胞迁移,到最后的炎症细胞消失,结缔组织再生,肌细胞再生依然存在。

3.2 生肌调节因子与微小 RNA(miRNA)的理化特性及损伤后表达变化

骨骼肌纤维的再生能力较低,有丝分裂甚为少见。但仍有一部分祖细胞,存在人体内,并具有特定再生潜质的干细胞。这些干细胞在人体遇到特定环境或特定情况仍可以分化成特定组织。骨骼肌损伤后,起到再生修复的干细胞就是肌卫星细胞(muscle satellite cell, MSC)。当骨骼肌纤维损伤时,受损的部位肌卫星细胞可以分裂成肌细胞,最后再形成成肌纤维。

最新研究表明^[7],miRNA-133、146等在骨骼肌高水平表达的 miRNA,它对于成肌细胞分化、增殖及骨骼肌的功能都有重要的影响。有学者认为^[8],miRNA-1 和 miRNA-133 对大鼠失神经腓肠肌中的变化规律有明显的直接或间接的影响。另外,上调 miRNA-133a 表达对心肌缺血再灌注损伤的保护^[9],可显著减轻缺血再灌注损伤 24 h 后心肌损害,并改善心脏功能。

本实验显示,治疗组 MEF2 的表达水平高于空白组与模型组,进一步证实了 MEF2 在外用药物中引起骨骼肌重塑及修复过程中的重要作用。本实验还发现:MEF2 在损伤后 7 d 上升,其后表达一直维持在较高水平,至损伤后 21 d 仍可以表达出较高水平。与模型组相比较,其表达的高峰期在 14 d 左右,其后则基本回归到一般状态,一方面印证了骨骼肌损伤自然修复的病程;另一方面,体现出,外用消肿止痛膏促进骨骼肌再生修复不仅仅作用于损伤后的

14 d 前后,在其后的骨骼肌重塑修复中依然起到了重要的作用。

另外,本实验显示,在 miRNA 表达方面,损伤后 4 d,空白组、模型组、治疗组无明显差异,随着时间延长,模型组与治疗组均有所上升,且治疗组上升幅度大于模型组,到达 21 d,模型组表达水平已经下降,趋于回归,而治疗组水平依然有上升趋势。对于中国传统治疗方法,如外用药物等方法,其与 miRNA 的结合研究很少,本实验证实了外用消肿止痛软膏可以促进 MEF2 的表达。

参考文献

- [1] Lodewijk L, Prins AM, Kist JW, et al. The value of miRNA in diagnosing thyroid cancer: a systematic review[J]. *Cancer Biomark*, 2012, 11(6): 229-238.
- [2] Abouheif MM, Nakasa T, Shibuya H, et al. Silencing microRNA-34a inhibits chondrocyte apoptosis in a rat osteoarthritis model in vitro[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, 49(11): 2054-2060.
- [3] 程文. 微小 RNA 与肿瘤相关性研究[J]. *医学研究生学报*, 2011, 24(2): 203-207.
CHENG W. Correlation between micro RNA and tumor[J]. *Yi Xue Yan Jiu Sheng Xue Bao*, 2011, 24(2): 203-207. Chinese.
- [4] 赵勇, 王钢. MicroRNA 基因调控在膝骨关节炎发生发展作用中的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2016, 29(4): 383-385.
ZHAO Y, WANG G. Progress on the regulation of MicroRNA gene on the pathogenesis of knee osteoarthritis[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2016, 29(4): 383-385. Chinese with abstract in English.
- [5] 张海平, 宋洁锐. 急性骨骼肌损伤动物实验模型构建及应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(49): 9984-9988.
ZHANG HP, SONG JR. Construction and application of animal model for acute skeletal muscle injury[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2007, 11(49): 9984-9988. Chinese.
- [6] Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2002, 84(5): 822-832.
- [7] Nakasa T, Lshikawa M, Shi M, et al. Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNA in rat skeletal muscle injury model[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(10): 2495-2505.
- [8] Rao PK, Kumar RM, Farmhondeh M, et al. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(23): 8721-8726.
- [9] Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90(3): 430-440.

(收稿日期: 2018-09-20 本文编辑: 王玉蔓)