

肩袖损伤患者肩袖组织促氧化状态及 Beclin-1 和 mTOR 的表达

刘治军, 魏合伟, 郑维蓬, 万雷, 廖志浩, 陈胜
(广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510240)

【摘要】 目的: 探讨急性慢性肩袖损伤患者肩袖组织的促氧化状态及 Beclin-1、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 的表达水平, 分析肩袖损伤与氧化应激和自噬的关系。方法: 选取 2019 年 7 月至 2020 年 12 月行肩关节镜下肩袖修复术治疗的 40 例肩袖损伤患者, 分为男性慢性损伤组、男性急性损伤组、女性慢性损伤组和女性急性损伤组, 每组 10 例。术中提取肩袖损伤部位的肌腱样本, 检测其总活性氧(reactive oxygen species, ROS)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平; 反转录酶-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测 Beclin-1、mTOR mRNA 的表达情况, Western-blot 法检测 Beclin-1、p-mTOR/mTOR 蛋白的表达。结果: 男性与女性慢性损伤组、男性与女性急性损伤组 ROS、SOD 以及 Beclin-1、mTOR mRNA 的表达比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 男性慢性损伤组较急性损伤组 ROS、SOD 以及 Beclin-1 基因和蛋白表达水平明显上调, 而 mTOR 基因和蛋白表达水平明显下调($P<0.05$); 女性慢性损伤组较急性损伤组 ROS、SOD 以及 Beclin-1 基因和蛋白表达水平明显上调, 而 mTOR 基因和蛋白表达水平明显下调($P<0.05$)。结论: 慢性肩袖损伤比急性肩袖损伤更容易激发肩袖组织促氧化状态, 上调自噬因子 Beclin-1 的表达、下调 mTOR 的表达。慢性肩袖损伤患者氧化应激反应和自噬水平可能更高。

【关键词】 肩袖损伤; Beclin-1 蛋白; 雷帕霉素靶蛋白; 活性氧; 超氧化物类

【临床试验注册】 中国临床试验注册中心(注册号: CHICTR2000037969)

中图分类号: R336

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2023.12.006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Pro-oxidation status of rotator cuff tissue and expression of Beclin-1 and mTOR in patients with rotator cuff injury
LIU Zhi-jun, WEI He-wei, ZHENG Wei-peng, WAN Lei, LIAO Zhi-hao, CHEN Sheng (The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240, Guangdong, China)

ABSTRACT Objective To explore pro-oxidative state of rotator cuff tissue and expression levels of Beclin-1 and mammalian target of rapamycin (mTOR) in patients with acute and chronic rotator cuff injury, and then analyzed relationship between rotator cuff injury and oxidative stress and autophagy. **Methods** Forty patients with rotator cuff injury were selected from July 2019 to December 2020, and divided into male chronic injury group, male acute injury group, female chronic injury group, and female acute injury group, 10 patients in each group. All patients were performed rotator cuff repair under arthroscopy. The sample of tendon at the rotator cuff injury site of the patient was taken during operation, and total reactive oxygen species (ROS) and superoxide dismutase (SOD) were detected by detection kit; expression of Beclin-1 and mTOR mRNA were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and Western-blot was applied to detect protein expression of Beclin-1 and p-mTOR/mTOR. **Results** There were no significant difference in expression of ROS, SOD, Beclin-1 mRNA and mTOR mRNA between male and female chronic injury groups, and between male and female acute injury groups ($P>0.05$); ROS, SOD and Beclin-1 mRNA in male chronic injury group were higher than those in male chronic injury group, while mTOR mRNA and protein decreased ($P<0.05$); ROS, SOD and Beclin-1 mRNA in female chronic injury group were up-regulated compared with female acute injury group, while mTOR mRNA was down-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** Chronic rotator cuff injury is more likely to stimulate the pro-oxidation state of rotator cuff tissue than acute rotator cuff injury, which could up-regulating expression of autophagy factor Beclin-1 and down-regulating expression of mTOR. Therefore, patients with chronic rotator cuff injury may have higher levels of oxidative stress and autophagy.

基金项目: 广东省中药管理局科研项目(编号: 20203011); 广东省医学科学技术研究基金项目(编号: B2020030)

Fund program: Scientific Research Project of Guangdong Administration of Traditional Chinese Medicine (No. 20203011)

通讯作者: 魏合伟 E-mail: whwhou@163.com

Corresponding author: WEI He-wei E-mail: whwhou@163.com

KEYWORDS Rotator cuff injury; Beclin-1; Target of rapamycin proteins; Reactive oxygen species; Superoxides

Clinical Trail Registration Chinese Clinical Trial Registry (No. CHICTR2000037969)

肩袖损伤是肩关节最常见的疾病之一, 主要症状包括疼痛, 活动受限, 无力以及功能障碍等^[1-2]。在老年人中更为普遍。随着人口老龄化以及肩袖损伤诊断的不断完善, 其发病率呈快速上升趋势^[3-4]。除肩袖本身退变因素外, 急性损伤以高速冲击扭伤患者居多, 慢性损伤以体力劳动肩峰撞击劳损居多^[5-6]。虽然大多数情况下手术治疗可以取得较为满意的效果, 但目前其发病机制尚不明确。自噬是细胞依赖溶酶体对蛋白质和细胞器进行降解的过程, 能帮助细胞适应各种不良刺激, 在维持细胞内环境稳态和实现自我更新中起着重要作用^[7]。氧化应激是机体氧化和抗氧化系统之间的稳态被破坏而造成的应激状态。大量研究^[8]表明, 氧化应激中产生的活性氧能诱导自噬产生, 而自噬能缓解氧化应激造成的损伤, 从而保护细胞存活。Beclin-1 是细胞自噬关键的正调控因子, 能介导细胞的自噬或凋亡, 在互反馈信号通路中调控着自噬和凋亡之间的平衡^[9]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mam-malian target of rapamycin, mTOR) 也是细胞自噬过程中重要的调控因子, 通过与多种蛋白结合发挥生理功能, 其活性受多个信号通路调控^[10]。本研究收集急慢性肩袖损伤患者的肩袖组织, 检测其氧化应激状态与自噬因子 Beclin-1, mTOR 的表达情况, 进而分析氧化应激与自噬对肩袖损伤的发生机制。

1 资料与方法

1.1 病例选择

纳入标准: (1) 符合肩袖损伤诊断标准^[11]。(2) 急性肩袖损伤患者病程 3 周内或者有明确外伤史, 慢性肩袖损伤患者病程 1 个月以上有慢性劳损病史。(3) 年龄 30~65 岁。(4) 均采用肩关节镜治疗。排除标准: (1) 存在严重疾病者, 如心脏病、糖尿病、肝病、肾病、脑部疾病等。(2) 其他类型的肩关节疾病, 如冻结肩。(3) 系统性关节炎, 如类风湿关节。(4) 凝血功能异常者。(5) 精神病患者或因智力障碍等原因无法配合的患者。(6) 临床资料不全者。本研究患者均对本试验知情同意并签署知情同意书, 且本研究经过医院医学伦理委员会批准[批号: KY(2019)002]。

1.2 临床资料

选择自 2019 年 7 月至 2020 年 12 月行肩关节镜下肩袖修复术治疗的肩袖损伤 40 例患者, 分为男性慢性损伤组、男性急性损伤组、女性慢性损伤组和女性急性损伤组, 每组 10 例。所有患者就诊时主诉为明显的肩关节疼痛不适及活动功能障碍, 经 MRI 检查确诊。各组年龄比较, 差异无统计学意义 ($P >$

0.05), 具有可比性; 急性损伤组与慢性损伤组病程比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组肩袖损伤患者临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of clinical data of patients with rotator cuff injury among each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄/岁	病程/周
男性急性损伤组	10	44.57±6.49	2.12±0.45
男性慢性损伤组	10	46.34±7.21*	8.12±2.79**
女性急性损伤组	10	42.56±8.51	2.32±0.66
女性慢性损伤组	10	45.41±7.02 [▲]	8.88±3.10 ^{▲▲}

注: 与男性急性损伤组比较, * $t=0.623$, $P=0.541$, ** $t=6.718$, $P=0.001$; 与女性急性损伤组比较, [▲] $t=0.817$, $P=0.425$, ^{▲▲} $t=6.545$, $P=0.000$

1.3 试验试剂与仪器

试验试剂: Trizol 试剂 (批号: DP424, 北京天根生化), cDNA 合成试剂盒 (批号: KR118, 北京天根生化), 荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒 (批号: QP002, 广州复能基因), 组织活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号: BB-470532, 贝博生物), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (批号: S0060, 碧云天), Beclin-1 (D40C5) Rabbit mAb (批号: 3495T, CST), mTOR (7C10) Rabbit mAb (批号: 2983T, CST), Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) Rabbit (批号: 5536T, CST), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: P0012, 碧云天), ECL 发光液 (批号: P0018S, 碧云天)。试验仪器: 离心机 (型号: ST16, Thermo Fisher 公司), 荧光定量 PCR 仪 (型号: 7500, ABI), 核酸微量分析仪, 多功能酶标仪。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 总 ROS 及组织 SOD 检测 取肩关节镜手术治疗取损伤的肩袖组织, 使用液氮保存标本。称取 50 mg 组织, 加入 1 ml 匀浆缓冲液 A, 用玻璃匀浆器充分匀浆。在 1 000×g, 4 °C 离心 10 min, 弃沉淀, 取上清。(1) 总 ROS 水平检测。采用 ROS 检测试剂盒 (贝博, BB-470532) 检测组织中 ROS 水平, 在 37 °C 避光孵育 15~30 min; 置于酶标仪中, 后于激发波长为 488 nm、发射波长 526 nm 检测荧光强度; ROS 水平计算公式: 相对荧光强度 = (荧光强度_{样品 1} - 荧光强度_{空白对照}) / (荧光强度_{样品 n} - 荧光强度_{空白对照}) × 100%。(2) 组织 SOD 检测。采用组织超氧阴离子检测试剂盒 (GENME, GMS10096.2 v.A) 检测组织中超氧阴离子水平。

1.4.2 RT-PCR 检测 Beclin-1 和 mTOR mRNA 的表达 取出液氮保存的标本, 每组选取 10 例, 解冻后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗净。称取 50 mg 组织, 加入 1 ml TRIzol, 用玻璃匀浆器充分匀浆。将液体转移到灭菌的 1.5 ml 离心管内, 加入 250 μ l 三氯甲烷, 颠倒离心管 15 s, 充分混匀, 静置 3 min。4 $^{\circ}$ C 下 13 000 \times g 离心 8 min。将上清液转移到一新的离心管中, 加入 0.8 倍体积的异丙醇, 颠倒混匀。-20 $^{\circ}$ C 放置 15 min。4 $^{\circ}$ C 下 13 000 \times g 离心 10 min, 管底的白色沉淀即为 RNA。吸除液体, 加入 75%乙醇 1.5 ml 洗涤沉淀。4 $^{\circ}$ C 下 13 000 \times g 离心 5 min。将液体吸除干净, 将离心管置于超净台上吹 3 min。加入 20 μ l 无 RNA 酶的水溶解 RNA。另取 PCR 管, 加入含 2 μ g RNA 的溶液。加入 1 μ l oligo (dT)15。用无核糖核酸酶的去离子水补足至 12 μ l。于 PCR 仪上 70 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 迅速置冰上冷却。依次加入 4 μ l 15 \times buffer, 2 μ l 10 mM 脱氧核糖核苷三磷酸 (Deoxyribonucleoside-5'-triphosphate, dNTPs), 1 μ l RNA 抑制剂和 1 μ l 反转录酶, 用移液枪抽吸混匀。于 PCR 仪上 42 $^{\circ}$ C 保温 30 min, 结束后 80 $^{\circ}$ C 保温 5 min 灭活反转录酶, 定量 PCR 反应, 循环结束后从 55 $^{\circ}$ C 升高到 95 $^{\circ}$ C 获取熔解曲线。结果分析 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法: A=CT(目的基因, 待测样本)-CT(内标基因, 待测样本); B=CT(目的基因, 对照样本)-CT(内标基因, 对照样本)K=A-B; 表达倍数=2^{-K}。见表 2。

1.4.3 Western-blot 检测 Beclin-1 和 p-mTOR/mTOR 蛋白 取出液氮保存的标本, 每组选取 10 例, 解冻后用 PBS 洗净。准确称取 100 mg 组织, 加入 0.1 ml 组织裂解液, 用玻璃匀浆器充分匀浆。4 $^{\circ}$ C 下 12 000 \times g 离心 5 min, 收集上清, 即为总蛋白溶液。根据样品数量, 按 50:1 体积配制适量 BCA 工作液, 充分混匀。用 PBS 完全溶解标准品, 取 10 μ l 稀释至 100 μ l, 最终浓度为 0.5 mg \cdot ml⁻¹。将标准品分别按 0、1、2、4、8、12、16、20 μ l 加到 96 孔板的标准品中, 用 PBS 补充至 20 μ l。加适当体积样品至 96 孔板的样品孔中, 用 PBS 补充至 20 μ l。各孔中加入 200 μ l

的 BCA 工作液, 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min。测定 A562, 540~595 nm 之间的波长也可以接受。根据标准曲线计算出样品蛋白浓度。将待测样本分别与 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 4:1 比例混合, 将加入 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液的样本置于沸水中加热 5 min, 立即置于冰上 3 min。加足够的电泳液后上样电泳。浓缩胶电压 75 V, 分离胶用 120 V。电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳, 进行转膜。准备 6 张 7 cm \times 9 cm 的滤纸和 1 张大小适中的偏二氟乙烯 (polyvinylidene-fluoride, PVDF) 膜, PVDF 膜在使用之前要先用甲醇活化; 在加有转移液的盆里放入转膜用的夹子, 2 块海绵垫, 1 支玻棒, 滤纸和经过活化的 PVDF 膜; 将夹子打开使黑的一面保持水平。在垫子上垫海绵、3 层滤纸; 小心剥下分离胶盖于滤纸上, 将膜盖于胶上, 并除气泡。在膜上盖 3 张滤纸并除去气泡。最后盖上另 1 个海绵垫; 转膜条件: 200 mA, 1 h。将转好的膜于室温下脱色摇床上用 5% 脱脂牛奶 [0.5% TBST (TBS+Tween, 等渗盐溶液加 Tris-HCl 缓冲液)] 配, 封闭 1 h; 稀释一抗 (TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶), 磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5% 牛血清白蛋白 (albumin from bovine serum, BSA), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 5 min; 稀释二抗 (TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶), 室温下孵育 30 min 后, 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 5 min。将 A 和 B 两种试剂在离心管中等体积混合, 将膜蛋白面朝上与此混合液充分接触, 1~2 min 后, 去尽残液, 包好, 放入暗匣中曝光。最后用显影、定影试剂进行显影和定影; 根据不同光强度调整曝光条件。

1.5 统计学处理

采用 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计学分析。各组年龄、病程及 ROS 水平比较, 采用成组设计定量资料的 *t* 检验; 各组 SOD 含量、基因和蛋白先采用 Kolmogorov-Smirnov 进行正态检验, 两组比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用 2 \times 2 析因设计定量资料一元方差分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

表 2 引物序列
Tab.2 Primer sequences

基因名称	Gene ID		引物序列 (5'-3')	扩增长度/bp
h-GAPDH	NM_001289745.3	Forward:	CAAGAGCACAAAGGAAGAGAG	102
		Reverse:	CTACATGGCAACTGTGAGGAG	
h-Beclin-1	NM_001313998.2	Forward:	TCCATGCTCTGGCCAATAAG	111
		Reverse:	ACGGCAGCTCCTTAGATTTG	
h-mTOR	NM_001386500.1	Forward:	GGTCGTGGAGAACATGGATTAG	91
		Reverse:	ACCACTGAGGCTCTGGGATA	

2 结果

2.1 各组肩袖损伤患者肩袖组织 ROS 水平比较

男性慢性损伤组与女性慢性损伤组、男性急性损伤组与女性急性损伤组 ROS 比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);男性慢性损伤组与急性损伤组、女性慢性损伤组与急性损伤组 ROS 比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组肩袖损伤患者肩袖组织 ROS 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Comparison of ROS levels in rotator cuff tissue of patients with rotator cuff injury ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	ROS
男性急性损伤组	10	94.44±5.11
男性慢性损伤组	10	138.54±6.25 ^{a1}
女性急性损伤组	10	100.39±4.90
女性慢性损伤组	10	144.59±10.53 ^{b1}
男性×女性		$F=3.821, P=0.067$
急性×慢性		$F=207.008, P=0.000$
性别×急慢性		$F=12.034, P=0.032$

注:与男性急性损伤组比较,^{a1} $t=17.274, P<0.05$;与女性急性损伤组比较,^{b1} $t=12.035, P<0.05$

2.2 各组肩袖损伤患者肩袖组织 SOD 表达比较

男性与女性慢性损伤组、男性与女性急性损伤组 SOD 比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);男性慢性损伤组与急性损伤组、女性慢性损伤组与急性损伤组 SOD 表达比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组肩袖损伤患者肩袖组织 SOD 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Comparison of SOD expression in rotator cuff tissue of patients with rotator cuff injury ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	SOD
男性急性损伤组	10	0.78±0.16
男性慢性损伤组	10	1.22±0.14 ^{a2}
女性急性损伤组	10	0.69±0.07
女性慢性损伤组	10	1.34±0.11 ^{b2}
男性×女性		$F=8.512, P=0.106$
急性×慢性		$F=951.582, P=0.000$
性别×急慢性		$F=66.080, P=0.001$

注:与男性急性损伤组比较,^{a2} $t=6.545, P<0.05$;与女性急性损伤组比较,^{b2} $t=15.765, P<0.05$

2.3 各组肩袖损伤患者肩袖组织中 Beclin-1 及 mTOR mRNA 水平比较

各组肩袖损伤患者肩袖组织中 Beclin-1、mTOR

mRNA 水平比较,结果显示男性与女性慢性损伤组、男性与女性急性损伤组之间 Beclin-1、mTOR mRNA 表达比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);男性慢性损伤组与急性损伤组、女性慢性损伤组与急性损伤组比较,Beclin-1 mRNA 表达显著升高,而 mTOR mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$)。见表 5。

表 5 各组肩袖损伤患者肩袖组织中 Beclin-1 与 mTOR 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.5 Comparison of Beclin-1 and mTOR levels in rotator cuff tissue of patients with rotator cuff injury ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Beclin-1	mTOR
男性急性损伤组	10	1.304±0.158	1.054±0.164
男性慢性损伤组	10	3.584±0.436 ^{a3}	0.356±0.044 ^{a4}
女性急性损伤组	10	1.096±0.152	1.101±0.152
女性慢性损伤组	10	3.540±0.386 ^{b3}	0.336±0.036 ^{b4}
男性×女性		$F=2.209, P=0.156$	$F=0.733, P=0.404$
急性×慢性		$F=776.161, P=0.000$	$F=358.715, P=0.000$
性别×急慢性		$F=192.91, P=0.002$	$F=134.35, P=0.000$

注:与男性急性损伤组比较,^{a3} $t=4.908, P<0.05$;^{a4} $t=12.999, P<0.05$;与女性急性损伤组比较,^{b3} $t=4.908, P<0.05$;^{b4} $t=15.487, P<0.05$

2.4 Beclin-1/β-actin 及 p-mTOR/mTOR 水平比较

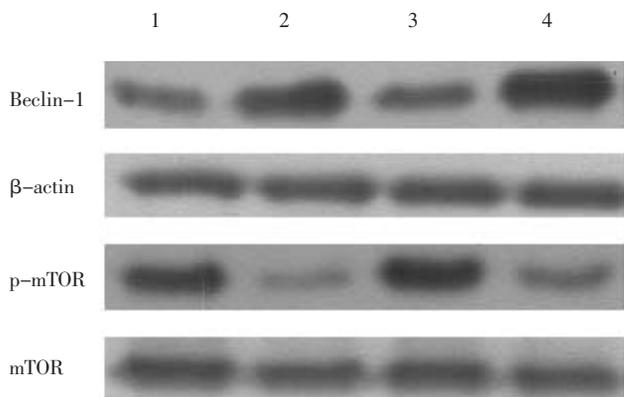
男性与女性慢性损伤组、男性与女性急性损伤组 Beclin-1/β-actin、p-mTOR/mTOR 表达比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);男性慢性损伤组与急性损伤组、女性慢性损伤组与急性损伤组比较,Beclin-1/β-actin 表达显著升高,而 p-mTOR/mTOR 表达显著降低 ($P<0.05$)。见表 6,图 1。

表 6 各组肩袖损伤患者 Beclin-1/β-actin、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.6 Comparison of Beclin-1/β-actin and p-mTOR/mTOR protein expression levels in patients with rotator cuff injury ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Beclin-1/β-actin	p-mTOR/mTOR
男性急性损伤组	10	0.32±0.09	0.80±0.25
男性慢性损伤组	10	0.76±0.28 ^{a5}	0.23±0.09 ^{a6}
女性急性损伤组	10	0.40±0.12	0.89±0.25
女性慢性损伤组	10	0.91±0.36 ^{b5}	0.36±0.14 ^{b6}
男性×女性		$F=0.080, P=0.781$	$F=52.957, P=0.109$
急性×慢性		$F=1480.363, P=0.000$	$F=2948.442, P=0.000$
性别×急慢性		$F=4.170, P=0.047$	$F=8.250, P=0.008$

注:与男性急性损伤组比较,^{a5} $t=4.73, P<0.05$;^{a6} $t=6.79, P<0.05$;与女性急性损伤组比较,^{b5} $t=4.25, P<0.05$;^{b6} $t=5.85, P<0.05$



注:1. 男性急性损伤组;2. 男性慢性损伤组;3. 女性急性损伤组;4. 女性慢性损伤组

图 1 Western-blot 检测各组 Beclin-1/β-actin 及 p-mTOR/mTOR 表达凝胶电泳图

Fig.1 Western-blot detection of Beclin-1/β-actin, p-mTOR/mTOR expression gel electrophoresis in each group

3 讨论

3.1 氧化应激与肩袖损伤的关系

肩袖损伤是人体常见的运动系统疾病,随着肩关节镜手术技术的发展,每年越来越多患者接受了肩袖手术治疗^[11]。临床发现损伤后的肩袖往往无法自行愈合,甚至撕裂严重导致其他结构损伤。修复后的肩袖也往往因肩袖止点处腱-骨愈合差,不能恢复原有的组织学结构和生物力学功能而容易再发撕裂^[12-13]。然而,肩袖损伤的分子生物学机制仍比较复杂。

氧化应激是机体促氧化与抗氧化失衡,产生自由基增多,组织器官抗氧化能力下降的一种病理状态,它可导致创面损害,不利于愈合^[14]。如果急性期时肩袖按照组织学规律适时地愈合,创面暴露于炎症反应时间短,受氧化应激损害较少。然而,肩袖在距离大结节止点 1 cm 处缺乏血管供应,由于缺血缺氧容易造成局部氧化应激状态,炎症反应时间持续延长,肩袖创面一直都暴露在炎症反应中,ROS 将持续过多地产生,细胞损害也将持续进行;同时过量的 ROS 又促成炎症的级联反应,炎症反应又刺激了氧化应激的产生,反过来氧化应激又促进了炎症持续,这样就进入一个恶性循环,导致创面难愈。肩袖损伤难愈合创面与愈合不良都是棘手的医学难题。因此,深入探讨氧化应激状态下肩袖创面修复的细胞分子机制仍是重要的医学科学问题。本研究发现,男性慢性损伤组与女性慢性损伤组、男性急性损伤组与女性急性损伤组 ROS、SOD 比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);男性慢性损伤组与男性急性损伤组 ROS、SOD 表达水平升高;同样,女性慢性损伤组结果比女性急性损伤组的 ROS、SOD 表达水平也升高。结果

表明慢性的肩袖损伤,导致局部肩袖组织缺血缺氧,诱发炎症反应,激活了氧化应激反应,损害了细胞;长此以往,损伤的肩袖组织又加剧了氧化应激反应,促使 ROS、SOD 水平升高,导致慢性的炎症反应,使损伤的肩袖难以愈合。因此,可以说明慢性肩袖损伤的氧化应激反应水平可能更高,且氧化应激反应加剧可能会加重肩袖损伤。这与 YOSHIDA 等^[15]研究发现 SOD 引起的氧化应激的机制可能会导致针对退行性肩袖撕裂的靶向组织治疗相一致。

3.2 自噬对肩袖损伤的影响

自噬在一定程度上具有抵抗细胞凋亡的作用。但是,自噬也并非都是积极保护作用,过度或不足的自噬都可能损伤细胞,甚至导致细胞死亡。自噬对细胞起“双刃剑”的作用,而自噬的程度就是这把“双刃剑”的核心问题。自噬在激活和抑制之间的平衡将决定“双刃剑”的走向^[16]。因此,调控细胞的自噬程度应该是使这把“双刃剑”转向细胞保护作用的关键。Beclin-1 是细胞自噬关键的正调控因子,也称 Beclin-1 基因,是酵母 ATG6 的同系物。研究表明 Beclin-1 介导的自噬/凋亡互反馈信号通路调控着自噬和凋亡之间的平衡,Beclin-1 可能是互反馈作用的交汇点^[9,17],是细胞自噬关键的负调控因子,通过与多种蛋白结合成复合物 mTOR1 和 mTOR2 发挥生理功能,其活性受多个信号通路调控。自噬对 mTOR 具有负反馈调节作用,也有研究认为自噬与 mTOR 之间存在着相互反馈调控作用^[10,18]。由此可见,自噬与 mTOR 的互反馈调控作用是促进细胞存活的重要机制。本研究与急性肩袖损伤组比较,慢性损伤组患者 Beclin-1 mRNA 和蛋白表达升高,而 mTOR mRNA 和 p-mTOR 蛋白表达下降。由此表明,慢性损伤患者的肩袖组织自噬水平增加,在一定程度上延缓细胞凋亡,抑制劳损的进度,对损伤的肩袖起到保护作用。但 Beclin-1 与 mTOR 之间的内在关系以及如何对自噬产生影响,是否通过 mTOR 信号通路影响自噬来抑制肩袖损伤的进展,其内在作用机制有待于进一步探讨。

综上所述,慢性损伤的肩袖损伤患者肩袖组织中 ROS、SOD 水平升高,激活了氧化应激反应;同时自噬因子 Beclin-1 表达升高,mTOR 表达下降,表明肩袖损伤后存在细胞的自噬,且自噬水平增加,在一定程度上对损伤的肩袖起保护作用。但氧化应激是否诱导了自噬的产生,或自噬促进氧化应激反应,或两者同时存在等作用机制,需要后续深入的研究。

参考文献

[1] STAHNKE K, MORAWIETZ L, MORODER P, et al. Synovitis as a concomitant disease in shoulder pathologies[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2019, 139(8): 1111-1116.

- [2] VALENCIA A P, LAI J K, IYER S R, et al. Fatty infiltration is a prognostic marker of muscle function after rotator cuff tear[J]. *Am J Sports Med*, 2018, 46(9): 2161–2169.
- [3] SHAH S A, KORMPAKIS I, CAVINATTO L, et al. Rotator cuff muscle degeneration and tear severity related to myogenic, adipogenic, and atrophy genes in human muscle[J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(12): 2808–2814.
- [4] GIBBONS M C, SINGH A, ENGLER A J, et al. The role of mechanobiology in progression of rotator cuff muscle atrophy and degeneration[J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(2): 546–556.
- [5] DANG A, DAVIES M. Rotator cuff disease: treatment options and considerations[J]. *Sports Med Arthrosc Rev*, 2018, 26(3): 129–133.
- [6] KEENER J D, SKELLEY N W, STOBBS-CUCCHI G, et al. Shoulder activity level and progression of degenerative cuff disease[J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2017, 26(9): 1500–1507.
- [7] JAKUBCZYK K, DEC K, KAJDUNSKA J, et al. Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage[J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2020, 48(284): 124–127.
- [8] WANG C G, MAO C, LOU Y T, et al. Monotropein promotes angiogenesis and inhibits oxidative stress-induced autophagy in endothelial progenitor cells to accelerate wound healing[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(3): 1583–1600.
- [9] CHIANG W C, WEI Y J, KUO Y C, et al. High-throughput screens to identify autophagy inducers that function by disrupting beclin 1/bcl-2 binding[J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(8): 2247–2260.
- [10] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease[J]. *Cell*, 2017, 169(2): 361–371.
- [11] SMITH M J, PFEIFFER F M, COOK C R, et al. Rotator cuff healing using demineralized cancellous bone matrix sponge interposition compared to standard repair in a preclinical canine model[J]. *J Orthop Res*, 2018, 36(3): 906–912.
- [12] 刘嘉鑫, 安丽萍, 张广瑞, 等. 促进肩袖止点腱骨愈合的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2020, 33(7): 684–688.
- LIU J X, AN L P, ZHANG G R, et al. Progress on improving tendon-to-bone healing for the enthesis of rotator cuff[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2020, 33(7): 684–688. Chinese.
- [13] 曹寅生, 万云峰. 肩袖撕裂修补术后腱骨愈合的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(12): 1172–1179.
- CAO Y S, WAN Y F. Progress on tendon-to-bone healing after rotator cuff repair[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2018, 31(12): 1172–1179. Chinese.
- [14] YU G W, LUO H W, ZHANG N, et al. Loss of p53 sensitizes cells to palmitic acid-induced apoptosis by reactive oxygen species accumulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6268.
- [15] YOSHIDA K, ITOIGAWA Y, WADA T, et al. Association of superoxide-induced oxidative stress with rotator cuff tears in human patients[J]. *J Orthop Res*, 2020, 38(1): 212–218.
- [16] YU L, CHEN Y, TOOZE S A. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 207–215.
- [17] KANG R, ZEH H J, LOTZE M T, et al. The beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 571–580.
- [18] ZHENG R Z, HUANG S M, ZHU J K, et al. Leucine attenuates muscle atrophy and autophagosome formation by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rotator cuff tears[J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 378(1): 113–125.

(收稿日期: 2022-05-16 本文编辑: 李宜)