

· 基础研究 ·

中药松弛膏联合跑台训练对废用性肌萎缩大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及炎症反应的影响

努尔比亚·克其克 苗田雨 帕丽达·买买提 王宁宁 李晶晶

新疆医科大学护理学院, 乌鲁木齐 830011

通信作者: 帕丽达·买买提, Email: parida7301@126.com

【摘要】 目的 观察中药松弛膏联合跑台训练对废用性肌萎缩 (DMA) 大鼠腓肠肌磷脂酰肌醇激酶 3 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路及炎症反应的影响。**方法** 将 45 只 Wistar 大鼠分为正常对照组 ($n=8$) 及造模组 ($n=37$), 选用 Nagai 法将造模组大鼠制成左后肢 DMA 模型。采用随机数字表法将 32 只 DMA 制模成功大鼠分为模型对照组 (MC 组)、运动干预组 (EX 组)、中药松弛膏组 (SC 组) 及联合治疗组 (CR 组), 每组 8 只大鼠。MC 组大鼠不给予任何干预; EX 组大鼠给予跑台训练 (跑台速度为 18 m/min), 每天训练 1 次, 每周训练 6 d; SC 组大鼠给予中药松弛膏局部涂抹, 每天治疗 1 次, 每周治疗 6 d; CR 组大鼠先给予跑台训练 (同 EX 组), 再给予中药松弛膏局部涂抹 (同 SC 组), 每天治疗 1 次, 每周治疗 6 d。于干预 6 周后采用 HE 染色法评估各组大鼠左后肢腓肠肌病理形态变化, 采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测各组大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10 (IL-10) 含量, 采用实时荧光定量 PCR 法 (qRT-PCR) 及蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组大鼠 PI3K、Akt、mTOR mRNA 水平及蛋白含量。**结果** MC 组肌纤维排列紊乱, 有大量炎性细胞浸润, CR 组肌纤维排列紊乱、炎性细胞浸润情况均显著缓解。干预后 CR 组炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 含量 [分别为 (0.138 ± 0.004) pg/ml 和 (0.272 ± 0.020) pg/ml] 均较 MC 组、EX 组及 SC 组显著降低 ($P < 0.05$), 抗炎因子 IL-10 含量 [(0.240 ± 0.014) pg/ml] 均较 MC 组、EX 组及 SC 组明显增加 ($P < 0.05$); 另外 CR 组 PI3K、Akt、mTOR mRNA 水平及蛋白含量亦较 MC 组、EX 组明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** 中药松弛膏联合跑台训练能协同上调 DMA 大鼠抗炎因子 IL-10 水平及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路表达, 下调促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 含量, 抑制肌纤维炎性反应, 促进肌纤维蛋白质合成, 有助于 DMA 病情缓解。

【关键词】 废用性肌萎缩; 白细胞介素-10; 肿瘤坏死因子- α

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82060417, 81660380)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.05.003

Effects of traditional Chinese Songchi ointment combined with treadmill training on PI3K/Akt/mTOR signal pathway and inflammation in rats with disused muscles atrophy

Nuerbiya Keqike, Miao Tianyu, Palida Maimaiti, Wang Ningning, Li Jingjing

School of Nursing, Xinjiang Medical University, Urumqi 830013, China

Corresponding author: Palida Maimaiti, Email: parida7301@126.com

【Abstract】 Objective To observe any effect of supplementing treadmill training with applications of the traditional Chinese Songchi ointment in the rehabilitation of gastrocnemius muscles atrophied through disuse. **Methods** Forty-five Wistar rats were randomly divided into a normal control group ($n=8$) and a model group ($n=37$). The rats in the model group had their left hind limbs immobilized by the Nagai method to induce disused muscle atrophy (DMA). That group was then randomly subdivided into a model control (MC) group, a treadmill training group (the EX group), a Songchi ointment group (SC group) and a comprehensive rehabilitation group (the CR group), each of 8. The EX and SC groups were given treadmill training at 18m/min or topical application of Songchi ointment once a day, 6 days a week for 6 weeks. The CR group was given both treatments. After the 6 weeks, hematoxylin and eosin staining was used to evaluate the pathological changes in the gastrocnemius of each rat's left hind limb. Serum levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) were detected using enzyme-linked immunosorbent assays. PI3K, Akt and mTOR mRNA and protein were assayed using real-time quantitative PCR and western blotting. **Results** The arrangement of muscle fibers in the MC group was disordered and there was a large number of infiltrated inflammatory cells. Such conditions were significantly relieved in the CR group. After the intervention the levels of inflammatory factors TNF- α and IL-1 β in the CR group were, on average, significantly

lower than those observed in the MC group, the EX group or the SC group, while the level of anti-inflammatory factor IL-10 was significantly higher. The average PI3K, Akt and mTOR mRNA and protein levels of group CR were significantly higher than those of the MC and EX groups. **Conclusions** The traditional Chinese Songchi ointment can usefully supplement treadmill training to relieve DMA. It upregulates IL-10, activates the PI3K Akt/mTOR signaling pathway and promotes the synthesis of muscle fiber protein while down-regulating TNF- α and IL-1 β and muscle fiber inflammatory response.

【Key words】 Disuse muscle atrophy; Treadmill training; Traditional Chinese Songchi ointment; interleukin-10; Tumor necrosis factor- α

Funding: National Natural Science Foundation of China (82060417 and 81660380)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.05.003

废用性肌萎缩(disuse muscle atrophy, DMA)是指肢体因活动受限或失重引起骨骼肌功能、形态结构、生化及分子生物学指标等的一系列变化^[1],影响患者肢体功能恢复及生活质量。WHO 相关调查分析表明^[2],全球约有 17.1 亿人患有肌肉骨骼疾病,其中以 DMA 最为常见^[3]。肌萎缩被认为是由磷脂酰肌醇激酶 3(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路介导的骨骼肌蛋白合成代谢减弱以及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)等介导的骨骼肌蛋白分解代谢增强共同作用的结果^[4-5]。

已有研究证实,有氧运动可缓解肌肉萎缩、促进肌肉再生^[3]及相关蛋白质合成^[6]。本课题组在前期研究中发现中药松弛膏联合康复干预对改善废用综合征患者肌力具有积极作用^[7],能显著减轻炎症反应^[8],但具体作用机制尚未明确。基于此,本研究联合采用中药松弛膏及跑台训练对 DMA 大鼠进行干预,旨在探讨其对机体 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及炎症反应的影响。

材料与方法

一、制模及分组

选取 45 只 8 周龄无特定病原体级(specific pathogen free, SPF)雄性 Wistar 大鼠,体重(285 $\pm$ 28) g,均购自新疆医科大学动物实验中心,动物合格证号为 SYXK(新)2018-003;饲养环境温度 22~24 $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~70%。本实验同时经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审核(20200326-03)。采用随机数字表法将上述 45 只大鼠分为正常对照组(normal control group,简称 NC 组)及模型组,两组分别有 8 只和 37 只大鼠。

采用 Nagai 等^[9]介绍的方法将模型组大鼠制成肌萎缩(由关节固定诱导)模型,主要制模步骤如下:深度麻醉大鼠,剃去左后肢被毛并消毒,以股骨 1/2 处为进针点,使带螺纹克氏针(0.8 mm)垂直穿过股骨且未

冲破内侧皮肤,再将外露的克氏针剪至超出皮肤约 1.8 cm;以胫骨下 1/3 处作为进针点,垂直进针穿过胫骨但未穿过内侧皮肤,将外露克氏针剪至超出皮肤约 1.8 cm;然后将大鼠股骨与胫骨夹角固定于 45 $^{\circ}$ 位,利用无菌软铁丝连接股骨、胫骨外露的克氏针,再将牙托粉与牙托水按比例混合后包裹软铁丝与外露的克氏针,固定完毕后经 X 线检查确认有无骨折,共发现有 37 只大鼠固定成功。于制动 3 周后从造模大鼠中随机抽取 3 只取腓肠肌组织进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,确定肌肉萎缩后拆除所有制模大鼠固定装置,拆除后检查发现有 2 只大鼠骨折并剔除,最终共有 32 只 DMA 大鼠制模成功。采用随机数字表法将 DMA 大鼠分为模型对照组(model control group,简称 MC 组)、运动干预组(exercise intervention group,简称 EX 组)、中药松弛膏组(songchi ointment group,简称 SC 组)及联合治疗组(comprehensive rehabilitation group,简称 CR 组),每组 8 大鼠。

二、主要试剂及仪器

本研究主要试剂包括中药松弛膏(专利号 2018114781048)、大鼠 TNF- α 试剂盒(江莱生物, JL3202)、大鼠 IL-1 β 试剂盒(江莱生物 JL20884)、大鼠 IL-10 试剂盒(江莱生物, JL13427)、抗兔 PI3K 抗体(武汉 ABclonal 公司, A11526)、抗兔 AKT1 抗体(武汉 ABclonal 公司, A17909)、抗兔 mTOR 抗体(武汉 ABclonal 公司, A11354)、辣根过氧化物酶二抗(美国 Cell Signaling, 7074S)等;主要实验仪器包括 FT-200 型动物跑步机(成都泰盟软件有限公司)、0.8 mm 带螺纹定制骨牵引针(天津希冀器械公司)、义齿聚托聚合物自凝牙托粉(上海贝琼齿材有限公司)、义齿聚托聚合物自凝牙托水(上海贝琼齿材有限公司)等。

三、干预方法

NC 组及 MC 组均不给予特殊处理, EX 组大鼠则给予跑台训练,跑台训练各项参数参照文献[8]进行设定:跑台速度为 18 m/min,每次训练 20 min,每天训练 1 次,每周训练 6 d,共训练 6 周。SC 组大鼠左后肢膝关节上方 2 cm 至踝关节处(包括腓窝)均匀涂

抹 1 勺中药松弛膏(约 18 g),该药膏主要成分包括亚麻籽、没药、葫芦巴、乳香、蜀葵子、洋甘菊、秋水仙、马油及马骨髓等药材,采用乙醇回流技术提取、除杂、浓缩后与药用辅料制成乳膏剂,涂抹完毕后用手指腹按摩约 3 min,每天治疗 1 次,每周治疗 6 d,共治疗 6 周。CR 组先按照 EX 组方法进行跑台训练,待训练结束后再按照 SC 组方法涂抹中药松弛膏,涂抹部位及涂抹量同 SC 组,每天治疗 1 次,每周治疗 6 d,共治疗 6 周。

四、组织取材处理

干预 6 周后各组大鼠进行取材,取材前禁食、不禁水持续 24 h,按 30 mg/kg 体重标准腹腔注射 2%戊巴比妥钠麻醉后采腹主动脉血,室温静置 2 h 后以 3000 rpm 离心 10 min 并抽取上清液置于-80 ℃冰箱内待测;完整剥离左后肢腓肠肌并将部分组织置于 4%多聚甲醛液中固定,余下组织经液氮速冻后置于-80 ℃冰箱内待测。

五、腓肠肌病理切片染色

取经 4%多聚甲醛液固定的左后肢腓肠肌组织并制作石蜡包埋切片,片厚约 6 μm,经脱蜡处理后进行 HE 染色,采用光学显微镜观察各组大鼠腓肠肌组织形态并拍照。

六、炎症因子含量检测

取各组大鼠血清样本,根据试剂盒说明书要求处理样本后,采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测各组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 及 IL-10 含量

七、qRT-PCR 法检测 PI3K、Akt 及 mTOR mRNA 含量

采用 Trizol 试剂裂解法从腓肠肌组织样本中分离出总 RNA,再反转录为 cDNA。用该 cDNA 为模板,采用 SYBR Green Master Mix 进行 qRT-PCR 反应,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)作为内参,采用 2^{-ΔΔCT}法计算各目标基因 mRNA 相对表达量,PCR 各引物序列情况详见表 1。

表 1 qRT-PCR 各引物序列表

引物名称	引物序列(5' to 3')	碱基数	扩增片段长度
GAPDH	F: TGCTGAGTATGTCGTGGAG	19	92
	R: GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT	20	92
PI3K	F: CTGCTGGGACTTGATGTGGCTTC	23	119
	R: GGTGGTGAATGGAGGCAAGGAATC	24	119
AKT-1	F: CACAGGTCGCTACTATGCCATGAAG	23	95
	R: GCAGGACACGGTTCTCAGTAAGC	25	95
mTOR	F: AAAGTGAAGCCGAGAGCAATGAGAG	25	128
	R: GATAGAACGGAAGAAGCCTTGGACAG	26	128

八、Western blot 法检测 PI3K、Akt 及 mTOR 蛋白表达

提取各组大鼠腓肠肌组织蛋白,经 BCA(bicinchoninic acid)试剂盒进行定量处理,随后将样品按照 20 μg 总蛋白上样至 8%~12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)凝胶中,在 100 V 电压下电泳 90 min,在 4 ℃环境下将蛋白电转移至 0.2 μm 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜上,加入 5%脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h,再加入相应一抗 PI3K(1:2000)、Akt(1:2000)及 mTOR(1:2000)4 ℃孵育过夜。次日采用三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液(tris-buffered saline with tween-20,TBST)洗去多余的一抗,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000),室温摇床孵育 40 min;再经 TBST 漂去多余的二抗,滴加电化学发光液(electrochemiluminescence,ECL)曝光并置于化学凝胶成像仪器中进行蛋白条带显影,采用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值,以 GAPDH 作为内参计算目标蛋白相对表达量。

九、统计学分析

本研究所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graph-Pad Prism 6.02 版统计学软件包进行数据分析,经正态性检验及方差齐性检验后,计量资料两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance,ANOVA),*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

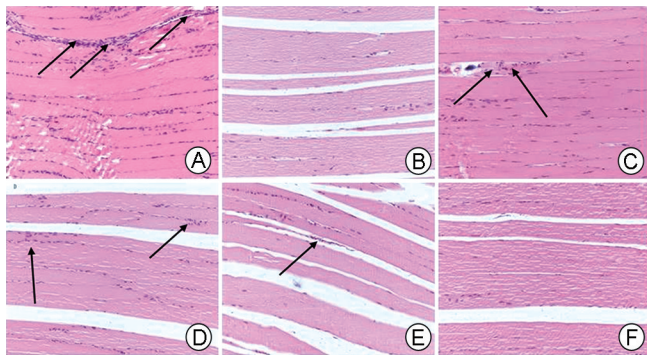
结 果

一、各组大鼠腓肠肌病理形态学观察

制模期间实验大鼠经制动 3 周后,通过 HE 染色发现模型大鼠肌纤维变性坏死、肌横纹消失,有大量炎性细胞浸润,与肌肉萎缩形态学特征类似,表明 DMA 模型制作成功;干预 6 周后通过 HE 染色发现,NC 组大鼠肌纤维排列整齐,胞质深染,细胞核位于纤维边缘并呈椭圆状,无炎性细胞浸润;MC 组肌纤维排列紊乱,有大量炎性细胞浸润,胞质浅染;与 MC 组比较,EX 组肌纤维排列呈部分紊乱,可见炎性细胞浸润;SC 组肌纤维排列较整齐,有炎性细胞浸润;CR 组肌纤维排列整齐,肌横纹明显可见,肌纤维无断裂,细胞核位于边缘,有少量炎性细胞浸润,整体表现趋于正常大鼠水平。各组大鼠腓肠肌病理形态学结果详见图 1。

二、各组大鼠血清 TNF-α 及 IL-1β 含量比较

如图 2 所示,各组大鼠血清中炎症因子 TNF-α 及 IL-1β 含量组间差异均具有统计学意义(*F* 值分别为 254.6和54.11,*P*<0.0001);通过进一步比较发现,MC



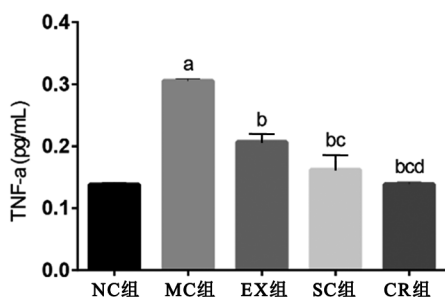
注:①为干预前造模验证结果;②为 NC 组;③为 MC 组;④为 EX 组;⑤为 SC 组;⑥为 CR 组;箭头处为炎性细胞浸润区域

图 1 各组大鼠腓肠肌病理形态学结果比较(HE 染色,×200)

组 TNF- α 、IL-1 β 含量[分别为(0.305 $\pm$ 0.004) pg/ml、(0.427 $\pm$ 0.030) pg/ml]均较 NC 组显著升高($P<0.01$);EX 组 TNF- α 及 IL-1 β 含量[分别为(0.261 $\pm$ 0.012) pg/ml、(0.322 $\pm$ 0.033) pg/ml]、SC 组 TNF- α 及 IL-1 β 含量[分别为(0.162 $\pm$ 0.022) pg/ml、(0.310 $\pm$ 0.026) pg/ml]、CR 组 TNF- α 及 IL-1 β 含量[分别为(0.138 $\pm$ 0.004) pg/ml、(0.272 $\pm$ 0.020) pg/ml]均较 MC 组明显降低,组间差异均具有统计学意义($P<0.01$);并且 CR 组血清中 TNF- α 及 IL-1 β 含量亦显著低于 EX 组、SC 组水平,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

三、各组大鼠血清 IL-10 含量比较

如图 3 所示,各组大鼠血清中抑炎因子 IL-10 含量组间差异均具有统计学意义($F=30.45, P<0.0001$)。MC 组 IL-10 含量为(0.197 $\pm$ 0.008) pg/ml,较 NC 组显著升高($P<0.05$)。EX 组、SC 组及 CR 组 IL-10 含量[分别为(0.212 $\pm$ 0.003) pg/ml、(0.223 $\pm$ 0.008) pg/ml 及 (0.240 $\pm$ 0.014) pg/ml]均较 MC 组显著增高,组间差异均具有统计学意义($P<0.001$);并且 CR 组 IL-10 含量亦显著高于 EX 组及 SC 组水平,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

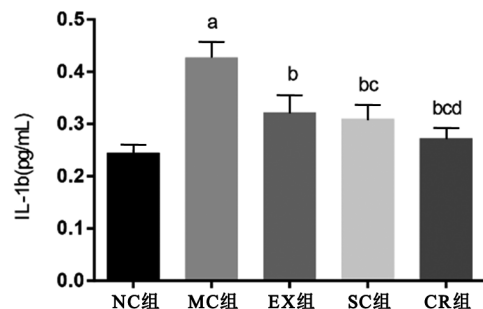


四、各组大鼠 PI3K、Akt 及 mTOR mRNA 表达比较

如图 4 所示,5 组大鼠腓肠肌组织 PI3K、Akt 及 mTOR mRNA 表达组间差异均具有统计学意义($F=68.35, P<0.0001$; $F=43.86, P<0.0001$; $F=309.1, P<0.0001$)。通过进一步比较发现,MC 组 PI3K、Akt 及 mTOR mRNA 表达量[分别为(0.563 $\pm$ 0.037)、(0.726 $\pm$ 0.015)和(0.391 $\pm$ 0.033)]均显著低于 NC 组水平[分别为(0.999 $\pm$ 0.019)、(1.010 $\pm$ 0.043)和(0.974 $\pm$ 0.023)],组间差异均具有统计学意义($P<0.0001$)。EX 组 PI3K、Akt 及 mTOR mRNA 表达[分别为(0.842 $\pm$ 0.041)、(0.841 $\pm$ 0.045)和(0.861 $\pm$ 0.014)]、SC 组 PI3K、Akt 及 mTOR mRNA 表达[分别为(0.881 $\pm$ 0.021)、(0.842 $\pm$ 0.010)和(0.898 $\pm$ 0.029)]及 CR 组 PI3K、Akt 及 mTOR mRNA 表达[分别为(0.969 $\pm$ 0.053)、(0.964 $\pm$ 0.011)和(0.916 $\pm$ 0.008)]均较模型组明显升高,组间差异均具有统计学意义($P<0.01$);并且 CR 组 PI3K、Akt 及 mTOR mRNA 表达均较 EX 组明显升高,CR 组 Akt mRNA 表达亦显著高于 SC 组水平,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

五、各组大鼠 PI3K、Akt 及 mTOR 蛋白表达比较

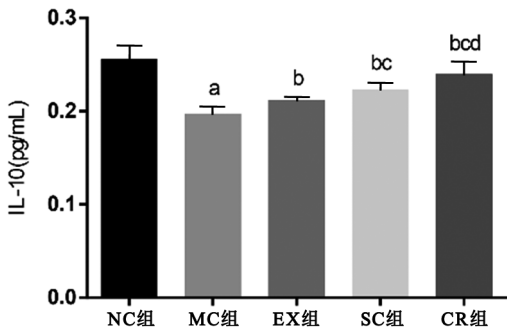
如图 5 所示,5 组大鼠腓肠肌组织 PI3K、Akt 及 mTOR 蛋白表达组间差异均具有统计学意义($F=6.134, P<0.01$; $F=145.3, P<0.0001$; $F=81.17, P<0.0001$)。MC 组 PI3K、Akt 及 mTOR 蛋白表达[分别为(0.695 $\pm$ 0.045)、(0.356 $\pm$ 0.009)和(0.496 $\pm$ 0.017)]均显著低于 NC 组水平[分别为(1 $\pm$ 0.166)、(1 $\pm$ 0.049)和(1 $\pm$ 0.034)],组间差异均具有统计学意义($P<0.01$)。EX 组 Akt 及 mTOR 蛋白表达[分别为(0.585 $\pm$ 0.028)和(0.794 $\pm$ 0.03)]均较 MC 组明显升高($P<0.05$),而 PI3K 蛋白表达[(0.741 $\pm$ 0.027)]与 MC 组无明显差异($P>0.05$);SC 组 Akt 及 mTOR 蛋白表达[分别为(0.738 $\pm$ 0.052)和(0.842 $\pm$ 0.053)]均较 MC 组明显升高($P<0.05$),而 PI3K 蛋白表达[(0.791 $\pm$ 0.072)]与 MC 组无明显差异($P>0.05$);CR 组 PI3K、Akt 及



注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 MC 组比较,^b $P<0.05$;与 EX 组比较,^c $P<0.05$;与 SC 组比较,^d $P<0.05$

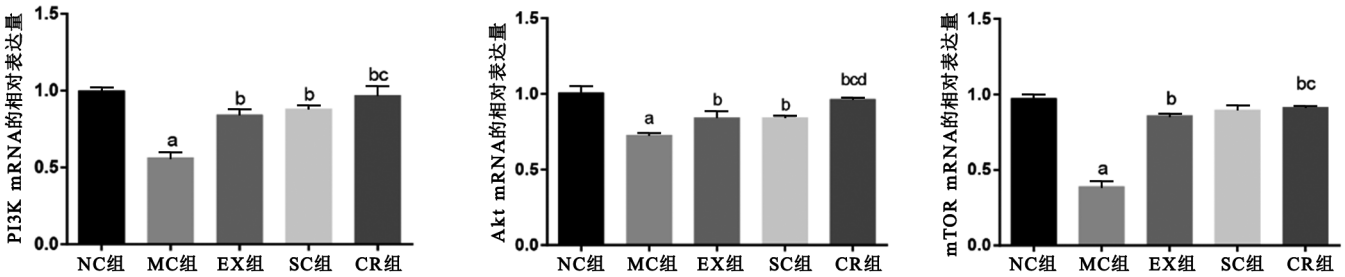
图 2 各组大鼠血清样本 TNF- α 及 IL-1 β 含量比较

mTOR 蛋白表达[分别为(0.996±0.123)、(0.995±0.042)和(0.900±0.031)]均较 MC 组、EX 组明显升高,并且 CR 组 Akt 蛋白表达亦显著高于 SC 组水平,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。



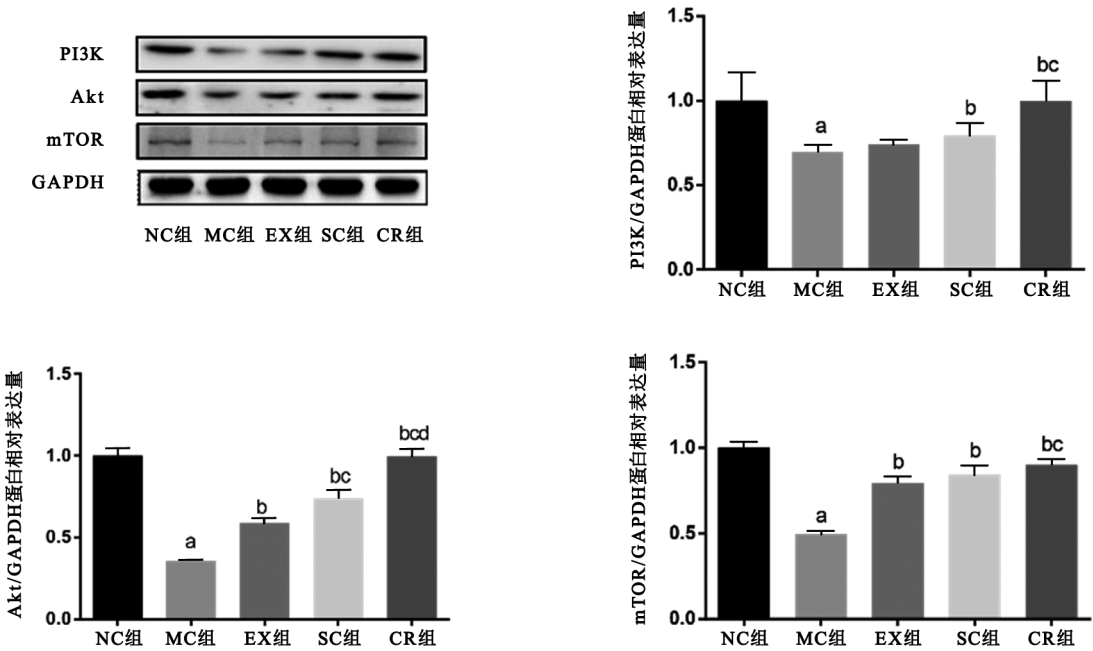
注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 MC 组比较,^b $P<0.05$;与 EX 组比较,^c $P<0.05$;与 SC 组比较,^d $P<0.05$

图 3 各组大鼠血清样本中 IL-10 含量比较



注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 MC 组比较,^b $P<0.05$;与 EX 组比较,^c $P<0.05$;与 SC 组比较,^d $P<0.05$

图 4 各组大鼠腓肠肌组织 PI3K、Akt 及 mTOR mRNA 表达比较



注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 MC 组比较,^b $P<0.05$;与 EX 组比较,^c $P<0.05$;与 SC 组比较,^d $P<0.05$

图 5 各组大鼠腓肠肌组织 PI3K、Akt 及 mTOR 蛋白表达比较

讨 论

大量研究证实:长期肢体制动、卧床在 DMA 各种病理生理改变中具有重要作用,同时也是导致骨骼肌病变的重要因素^[10]。当临床发现骨折或瘫痪患者骨骼肌已出现萎缩时,单纯运动训练往往无法达到快速恢复的目的,需采取辅助措施加速骨骼肌功能改善^[11]。中药涂擦疗法是运用中药透皮吸收理论,使皮肤通透性增加,促进药物自然渗透,通过皮肤经络传导而加速炎症吸收,充分发挥药物治疗作用。本研究所使用的中药松弛膏其主要成分为富含 omega-3(ω -3)的亚麻籽,而 ω -3 具有激活肌纤维卫星细胞从而加速骨骼肌再生、促进肌管细胞线粒体呼吸等作用^[12];另外组方中其他成分如没药、乳香等具有散瘀定痛、消肿生肌之功效;在涂抹药物后采用按摩手法可有效促进血液循环,为肌纤维提供丰富的血液供应及营养,能加

速药物吸收。运动疗法也是临床治疗 DMA 的常规方法之一,相关动物实验多采用跑台训练对 DMA 模型进行干预,有研究证实每周 5~7 次的运动频率是改善模型大鼠肌萎缩的较佳运动频次^[13],当跑台速度设置为 15~20 m/min 时,实验大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路被明显激活^[14-15]。因本课题组前期实验证实大鼠经 3 周膝关节固定可成功制成废用诱导的 DMA 动物模型^[8],故本研究 MC 组、EX 组、SC 组及 CR 组大鼠均给予 3 周膝关节固定并制成 DMA 模型,其中 EX 组、SC 组、CR 组从制模后第 4 周开始分别给予为期 6 周的跑台训练、中药松弛膏外涂及联合治疗,以观察中药松弛膏联合跑台训练对 DMA 大鼠肌萎缩的影响,并探讨相关作用机制。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路作为细胞内重要的信号通路之一,主要参与细胞增殖及分化等重要生命过程,在促进肌肉蛋白质合成中具有不可或缺的作用^[16]。当 PI3K 活性被激活后,能上调 Akt 磷酸化水平,被 PI3K 激活的 Akt 则能继续激活其下游靶蛋白 mTOR, mTOR 可通过磷酸化其下游靶物来调控与细胞生长、增殖密切相关的蛋白质合成,从而影响细胞增殖、促进细胞分化,有助于延缓骨骼肌萎缩进程^[4-17]。本研究发现 MC 组大鼠腓肠肌中 PI3K、Akt 及 mTOR 表达均明显减弱,而经跑台训练、中药松弛膏外涂或联合干预后大鼠 PI3K、Akt 及 mTOR 表达均有不同程度增强,其中以 CR 组的增强幅度尤为显著,提示跑台训练联合中药松弛膏外涂具有协同作用,能进一步上调 PI3K/Akt/mTOR 表达,加速蛋白质合成。这与在光镜下观察到 CR 组腓肠肌组织肌横纹明显可见、肌纤维无断裂、整体结构趋于正常大鼠的结果相吻合,进一步证实 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与 DMA 病变过程,说明中药松弛膏联合跑台训练能通过该通路缓解 DMA 模型大鼠腓肠肌萎缩。

有研究报道, TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子在肌萎缩表型中起主要作用,炎症能导致废用状态下肌肉受损^[18],调控炎症因子水平是治疗肌肉萎缩的特异性干预策略^[4]。本研究观察到 MC 组 TNF- α 、IL-1 β 表达量明显增高,与 Nguyen 等^[19]报道结果基本一致。EX 组、SC 组及 CR 组经相应干预后其 TNF- α 、IL-1 β 表达量均显著降低,并以 CR 组降低幅度尤为显著,与 CR 组光镜下观察到腓肠肌组织炎性细胞减少相吻合。IL-10 是一种具有抗凋亡特性的抗炎性细胞因子,能调节机体炎症反应,抑制巨噬细胞活化及 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等促炎细胞因子产生,被认为是促进受损组织血管生成、分化及延长生存期的重要因子^[20]。本研究结果显示,MC 组 IL-10 含量明显降低,EX 组、SC 组及 CR 组 IL-10 含量明显升高,并以 CR 组增高幅度尤为

显著,提示中药松弛膏联合跑台训练能进一步增加体内 IL-10 含量,从而抑制受损肌肉组织中 TNF- α 、IL-1 β 产生并加速肌纤维分化,这与中药松弛膏联合跑台训练上调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路表达、促进骨骼肌蛋白合成相一致。

综上所述,中药松弛膏联合跑台训练能协同上调 DMA 模型大鼠抗炎因子 IL-10 水平及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路表达,下调促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 含量,抑制肌纤维炎性反应,加速肌纤维蛋白合成,有助于肌萎缩病情缓解。

参 考 文 献

- [1] 张杨媚,高云芳.废用性肌萎缩的研究进展[J].中华物理医学与康复杂志,2012,34(7):550-553. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.07.022.
- [2] Cieza A, Causey K, Kamenov K, et al. Global estimates of the need for rehabilitation based on the Global Burden of Disease Study 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet, 2021, 396(10267):2006-2017. DOI: 10.1016/s0140-6736(20)32340-0.
- [3] Rocha LC, Barbosa GK. Aquatic training after joint immobilization in rats promotes adaptations in myotendinous junctions[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13):6983. DOI: 10.3390/ijms22136983.
- [4] Yoshida T, Delafontaine P. Mechanisms of IGF-1-mediated regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy[J]. Cells, 2020, 9(9):1970. DOI: 10.3390/cells9091970.
- [5] Howard EE, Pasiakos SM, Fussell MA, et al. Skeletal muscle disuse atrophy and the rehabilitative role of protein in recovery from musculo-skeletal injury[J]. Adv Nutr, 2020, 11(4):989-1001. DOI: 10.1093/advances/nmaa015.
- [6] Smeuninx B, Elhassan YS, Manolopoulos KN, et al. The effect of short-term exercise prehabilitation on skeletal muscle protein synthesis and atrophy during bed rest in older men[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2021, 12(1):52-69. DOI: 10.1002/jcsm.12661.
- [7] 沙代提汗·木沙,吾布力·吐尔地,祖力胡玛·尼加提,等.松筋护理训练联合松筋膏外敷给药治疗对废用性膝关节挛缩患者肌力、肌张力的影响[J].中国实用护理杂志,2021,37(11):801-806.
- [8] 古哈尔·艾思拉洪,帕丽达·买买提,武云云,等.康复护理干预对关节挛缩大鼠模型的作用探讨[J].中国实用护理杂志,2020,36(18):1415-1420.
- [9] Nagai M, Aoyama T, Ito A, et al. Contributions of biarticular myogenic components to the limitation of the range of motion after immobilization of rat knee joint[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2014, 15:224. DOI: 10.1186/1471-2474-15-224.
- [10] Usuki F, Fujimura M, Nakamura A, et al. Local vibration stimuli induce mechanical stress-induced factors and facilitate recovery from immobilization-induced oxidative myofiber atrophy in rats[J]. Front Physiol, 2019, 10:759. DOI: 10.3389/fphys.2019.00759.
- [11] Ou HC, Chu PM, Huang YT, et al. Low-level laser prevents doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy by modulating AMPK/SIRT1/PCG-1 α -mediated mitochondrial function, apoptosis and up-regulation of pro-inflammatory responses[J]. Cell Biosci, 2021, 11(1):200. DOI: 10.1186/s13578-021-00719-w.

- [12] Isesele PO, Mazurak VC. Regulation of skeletal muscle satellite cell differentiation by Omega-3 polyunsaturated fatty acids: a critical review [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 682091. DOI: 10.3389/fphys.2021.682091.
- [13] Sakakima H, Yoshida Y, Sakae K, et al. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats [J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2004, 14(3): 186-192. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2004.382.x.
- [14] Sakai H, Kimura M, Isa Y, et al. Effect of acute treadmill exercise on cisplatin-induced muscle atrophy in the mouse [J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(11): 1495-1505. DOI: 10.1007/s00424-017-2045-4.
- [15] Chen CW, Chen CC, Jian CY, et al. Attenuation of exercise effect on inflammatory responses via novel role of TLR4/PI3K/Akt signaling in rat splenocytes [J]. *J Appl Physiol*, 2016, 121(4): 870-877. DOI: 10.1152/japplphysiol.00393.2016.
- [16] Babicheva A, Makino A, Yuan JX. mTOR signaling in pulmonary vascular disease: pathogenic role and therapeutic target [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 2144. DOI: 10.3390/ijms22042144.
- [17] Yoon MS. mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 788. DOI: 10.3389/fphys.2017.00788.
- [18] Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, et al. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy [J]. *Faseb J*, 2002, 16(6): 529-538. DOI: 10.1096/fj.01-0866com.
- [19] Nguyen TN, Choi H, Jun HS. Preventive effects of dulaglutide on disuse muscle atrophy through inhibition of inflammation and apoptosis by induction of Hsp72 expression [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 90. DOI: 10.3389/fphar.2020.00090.
- [20] Nitahara-Kasahara Y, Kuraoka M, Oda Y, et al. Enhanced cell survival and therapeutic benefits of IL-10-expressing multipotent mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 105. DOI: 10.1186/s13287-021-02168-1.

(修回日期: 2021-12-27)

(本文编辑: 易 浩)

• 外刊撷英 •

Long-term efficacy of extracorporeal shock wave therapy on lower limb post-stroke spasticity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials

Objectives The purpose of this systematic review and meta-analysis is to evaluate the long-term efficacy of Extracorporeal Shock Wave Therapy (ESWT) on reducing lower limb post-stroke spasticity in adults.

Methods A systematic electronic search of PubMed/ MEDLINE, Physiotherapy Evidence Database (PEDro), Scopus, Ovid MEDLINE (R), and search engine of Google Scholar was performed. Publications that ranged from January 2010 to August 2020, published in English, French, Spanish, Portuguese, and Italian language and available as full texts were eligible for inclusion and they were searched without any restrictions of country. The study was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) guidelines and followed the recommendations of the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. Two authors screened the references, extracted data, and assessed the risk of bias. The primary outcome was spasticity grade mainly assessed by the Modified Ashworth Scale (MAS). Secondary outcomes were passive range of motion (PROM), pain intensity, electrophysiological parameters, gait assessment, and adverse events.

Results A total of seven recent randomized controlled trials (RCTs) were included in the systematic review and meta-analysis, and a beneficial effect on spasticity was found. The high level of evidence presented in this paper showed that ESWT ameliorates spasticity considering the parameters: MAS: standardized mean difference (SMD) = 0.53; 95% confidence interval (95% CI): (0.07-0.99); Modified Tardieu Scale (MTS): SMD = 0.56; 95% CI: (0.01-1.12); Visual Analogue Scale (VAS): SMD = 0.35; 95% CI: (-0.21-0.91); PROM: SMD = 0.69; 95% CI: (0.20-1.19).

Conclusions ESWT presented long-term efficacy on lower limb post-stroke spasticity, reduced pain intensity, and increased range of motion. The effect of this novel and non-invasive therapy was significant and the intervention did not present adverse events, proving a satisfactory safety profile.

Keywords extracorporeal shock wave therapy; hemiplegia; neurological rehabilitation; spasticity; stroke.

【摘自: Mihai EE, Dumitru L, Mihai IV, et al. Long-term efficacy of extracorporeal shock wave therapy on lower limb post-stroke spasticity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Med*, 2020, 29, 10(1): 86. DOI: 10.3390/jcm10010086.】