

碱性成纤维细胞生长因子对大鼠骨骼肌拉伤修复的影响*☆

冯鑫, 王生, 李国珍

冯鑫, 王生, 李国珍, 北京大学医学部公共卫生学院职业与环境卫生学系, 北京市 100083

冯鑫☆, 女, 1975年生, 山东省烟台市人, 汉族, 北京大学医学部博士在读, 主要从事肌肉损伤修复的研究。tanxin99@sohu.com
电话: +86-10-82801533

国家自然科学基金资助项目(30171206)*

中图分类号 R681 文献标识码 A 文章编号 1671-5926(2004)05-0846-02

收稿日期 2003-09-29 修回日期 2003-12-12 (03/GY)

Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of strain injured skeletal muscle in rats Xin Feng, Sheng Wang, Guo-Zhen Li
Xin Feng, Sheng Wang, Guo-Zhen Li, Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China

Xin Feng☆, Female, Han Nationality, Born in 1975 in Yantai City, Shandong Province, China, Studying in Peking University Health Science Center for doctor. Research direction: repair of muscle damage.

tanxin99@sohu.com

Telephone: +86-10-82801533

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30171206*

Received: 2003-09-29 Accepted: 2003-12-12

Abstract

AIM: To investigate the effect of exogenous basic fibroblast growth factor (bFGF) on the healing of strain injured skeletal muscles in rats.

METHODS: Eighteen male Sprague-Dawley rats were divided into three groups according to randomized block design: muscle strained bFGF treated group, muscle strained normal saline treated control group and sham strained group, each of which had 6 rats. The gastrocnemius muscles in the former two groups were strained caused by universal testing machine, and treated with bFGF(200 AU/d) and normal saline for six days, respectively. Desmin expression, an indicator of muscle regeneration(expressed as integra optical density, IOD) in muscle fibers, was measured by immunohistochemistry.

RESULTS: The IOD of desmin was higher in the normal saline treated group [$(25.79 \pm 10.44) \times 10^3$] than the sham strained group [$(9.28 \pm 4.83) \times 10^3$] ($t = 13.85, P < 0.01$). The IOD of desmin in the bFGF treated group [$(34.48 \pm 10.62) \times 10^3$] was higher than the normal saline treated group [$(25.79 \pm 10.44) \times 10^3$] ($t = 24.08, P < 0.01$).

CONCLUSION: Exogenous bFGF can improve desmin expression after the muscle is stained, and accelerate the regeneration of muscles, and thus facilitate the healing of muscle structure after muscle strain injury in rats.

Feng X, Wang S, Li GZ. Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of strain injured skeletal muscle in rats. *Zhongguo Linchuang Kangfu* 2004; 8(5): 846-7 (China)冯鑫, 王生, 李国珍. 碱性成纤维细胞生长因子对大鼠骨骼肌拉伤修复的影响 [J]. *中国临床康复* 2004 8(5) 846-7

http://www.zglckf.com/2004ml/04-05/846.pdf

摘要

目的: 探讨外源性碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对大鼠骨骼肌拉伤后肌肉再生修复的影响。

方法: 雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体质量约 250 g, 随机分组分为 3 组, 每组 6 只: 肌肉拉伤后给 bFGF 组、拉伤后给生理盐水对照组以及假拉伤组。用万能材料测试仪对大鼠腓肠肌造成拉伤后, 于损伤肌肉皮下肌膜外注射 bFGF(200 AU/d × 6) 或生理盐水, 免疫组织化学染色观察再生肌纤维中结蛋白的表达(用其积分光密度 integra optical density, IOD 表示)。

结果: 生理盐水对照组结蛋白 IOD 值 $(25.79 \pm 10.44) \times 10^3$ 显著高于假拉伤组 $(9.28 \pm 4.83) \times 10^3$ ($t = 13.85, P < 0.01$)。bFGF 治疗组肌肉结蛋白 IOD 值 $(34.48 \pm 10.62) \times 10^3$ 高于生理盐水对照组 $(25.79 \pm 10.44) \times 10^3$ 组, 差异具有显著性 ($t = 24.08, P < 0.01$)。

结论: 外源性碱性成纤维生长因子可以促进肌肉拉伤后的结蛋白表达,

提高肌肉再生能力, 从而改善肌肉损伤后的结构修复。

关键词: 肌, 骨骼, 成纤维细胞生长因子, 碱性, 再生, 结蛋白

0 引言

损伤肌肉的自然愈合包括肌肉再生以及瘢痕组织形成两部分, 肌肉损伤治疗过程中的干预目的在于促进肌肉的再生、抑制纤维化以及瘢痕的形成, 尽可能地恢复肌肉原有的结构和功能。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是促细胞生长作用很强的多肽因子, 国外的研究表明将 bFGF 的基因转入由运动导致的损伤肌肉组织中后, 由转入基因转录翻译以及损伤局部自身产生的 bFGF 均增多, 局部微血管生成增多、血管和肌肉再生的过程加强^[1-3]。结蛋白是骨骼肌中重要的骨架蛋白, 在再生肌纤维中特异性表达, 可作为评价肌肉损伤后再生水平的指标^[4,5]。本研究在造成大鼠腓肠肌拉伤的基础上, 在损伤处皮下肌膜外局部注射外源性的 bFGF, 通过免疫组织化学技术观察肌肉组织中结蛋白的表达水平来探讨 bFGF 对肌肉损伤再生修复的作用。

1 材料和方法

设计: 随机对照的实验研究。

地点和对象: 实验地点为北京大学医学部公共卫生学院。

动物: 雄性 Sprague-Dawley 大鼠(250 g, 12 周), 由北京大学医学部实验动物科学部提供。人冻干重组碱性成纤维细胞生长因子(2 000 AU/支, 溶于 500 μL 生理盐水中, 北京双鹭药业股份有限公司)。抗结蛋白单克隆抗体, 二氨基联苯胺显色液等(北京中山试剂公司)。

参与者: 实验设计者为冯鑫, 实验干预者为冯鑫, 王生, 李国珍。

干预措施: 动物分组及骨骼肌拉伤模型制作^[6]: 18 只雄性 SD 大鼠随机分组分为假拉伤组, bFGF 治疗组和生理盐水对照组。大鼠用水合氯醛(400 mg/kg)经腹腔注射麻醉, 俯卧于手术台上, 使其右后肢膝关节伸展, 备皮、乙醇消毒手术部位, 在足部腓肠肌远端处做一小纵切口, 分离腓肠肌远端肌腱, 然后将大鼠仰卧于万能材料测试仪(TE-10 型, 由北京航空航天大学研制)特制平台上, 将一注射针头横向穿过胫骨近端并将其固定于特制金属架上, 远端肌腱通过手术线与张力传感器相连。自动预调后, 以 6 cm/min 的应变速率牵拉右侧腓肠肌, 材料测试仪自动记录载荷—伸长曲线, 当载荷—伸长曲线出现平台时停止牵拉。去除手术线, 局部消毒后逐层缝合筋膜、皮肤, 术后连续 3 d 给予青霉素抗感染。假拉伤组大鼠行相同手术过程但不作肌肉拉伤处理。

药物干预: 肌肉损伤当天至第 6 天, bFGF 治疗组大鼠损伤肌肉皮下肌膜外注射外源性 bFGF 200 AU/d, 生理盐水对照组注射生理盐水, 注射液容积均为 50 μL, 假拉伤组不给任何处理。

肌肉组织学观察以及图像分析: 损伤第 7 天处死大鼠, 磷酸缓冲液和 40 mL/L 甲醛经心脏灌注, 取右侧腓肠肌 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋、切片。免疫组织化学染色按试剂盒说明书,

大致步骤如下:石蜡切片脱蜡,30 g/L H₂O₂ 室温孵育-蒸馏水冲洗-磷酸缓冲液浸泡-正常山羊血清工作液封闭-滴加抗结蛋白单克隆抗体过夜-冲洗后加生物素标记的二抗工作液孵育-冲洗二氨基联苯胺溶液现色-蒸馏水冲洗、复染、脱水至封固。每组取4张切片做图像分析,在显微镜下(LEICA MPS30 显微照相机,德国)从每张切片中按顺时针方向依次选取10~15个视野(每个视野面积为331 647 μm²)进行分析,提取每个视野中结蛋白的阳性面积并测量其平均光密度,数值由图像分析仪自动给出并存储(LEICA Q550CM 图像分析系统,德国)。积分光密度(integra optical density, IOD)作为衡量结蛋白表达水平的指标 积分光密度=阳性面积×平均光密度。

主要结局观察指标:用免疫组织化学方法检测组织中结蛋白表达,衡量指标采用切片中结蛋白的IOD。

统计学分析:实验数据采用SPSS 11.0软件由北京大学医学部劳动卫生教研室进行统计学处理,结蛋白积分光密度以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间的差别用独立样本t检验进行比较,取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果 正常肌肉组织中有少量结蛋白表达,染色较浅(见图1a),肌肉拉伤第7天结蛋白表达明显增加,染色较深(见图1b),给予bFGF治疗后的腓肠肌组织中结蛋白表达水平明显高于其他组,染色范围和程度都明显增加(见图1c)。

2.2 肌肉组织中结蛋白表达图像分析结果 假拉伤组腓肠肌组织中结蛋白积分光密度最低(9.28±4.83)×10³,生理盐水对照组损伤肌肉结蛋白IOD明显升高(25.79±10.44)×10³,差别具有显著性意义(t=13.85, P<0.01),bFGF治疗组腓肠肌组织的结蛋白积分光密度(34.48±10.62)×10³高于生理盐水对照组(25.79±10.44)×10³(t=24.08, P<0.01)。

3 讨论

肌肉损伤是运动中最常见的一类创伤,其中肌肉牵拉伤(有时称为肌肉劳损、撕裂或肌肉断裂)是一种作用于肌肉的间接损伤,在运动相关肌肉损伤中发病率最高。损伤肌肉通常可以通过肌肉再生进行修复,但是肌肉的结构和功能却达不到完全的康复,如何治疗肌肉损伤,促进康复提高愈合质量是近年来运动医学研究的热点。

肌肉结构和功能的康复质量取决于肌肉组织的再生能力以及瘢痕形成的程度。肌肉再生是指肌肉损伤后激活位于细胞外间质的基板膜以及肌纤维浆膜上的卫星细胞(肌前体细胞),后者在通常情况下是静息状态的单核干细胞,被激活后会增生,并且偏离细胞周期相互融合成多核肌管代替损伤的肌纤维,这一过程伴随着炎症反应-巨噬细胞亚群聚集驱除细胞碎片,激活生长因子的释放。这些生长因子来自于迅速浸入的中性粒细胞或者随后到来的巨噬细胞亚群,它们以不同的方式作用于卫星细胞、单核神经细胞、细胞外基质,以及趋化作用、炎症反应以及血管再生重塑等过程^[7],在趋化促使吞噬细胞及时清除损伤坏死组织、促使血管再生以及随后的肌肉再生分化过程中发挥了重要的作用^[8,9]。

肌肉早期再生过程中各类生长因子中bFGF是一种刺激所有中胚层来源的细胞,以及许多神经外胚层、外胚层和内胚层

来源细胞增殖生长因子,它可以促进成纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、神经元和神经胶质细胞等生长、增殖、分化及功能表达^[10]。Allen等^[11]的研究表明bFGF在体外对成年大鼠骨骼肌原细胞有明显的促存活及增殖作用^[12]。本研究利用大鼠腓肠肌拉伤模型观察了外源性bFGF对在体肌肉损伤后再生修复的影响。作者应用再生肌肉中结蛋白的表达作为衡量再生程度的特异性指标^[13]。研究表明,结蛋白作为骨骼肌细胞中的细胞骨架蛋白,起到支撑细胞结构,决定细胞形状,赋予细胞机械强度等作用。结蛋白在静息状态下的肌卫星细胞中只有少量分布,肌肉损伤开始后,其表达下降,2d后结蛋白表达增加,4d后达到峰值并持续10d左右,结蛋白在骨骼肌纤维的构建和修复过程中具有重要的调节功能^[14]。

本研究发现,在假拉伤组中结蛋白在第7天仅有少量的表达,主要分布在肌膜下,肌纤维中也有少量表达,说明它在正常肌肉组织中是少量存在的,肌肉损伤后给予生理盐水对照组第7天结蛋白表达有较明显升高,说明肌肉中有再生现象及生理性的损伤修复。更有意义的是,给予bFGF治疗组结蛋白表达明显高于生理盐水对照组,结蛋白广泛分布在再生肌组织中,尤其集聚在Z线周围,说明肌肉再生明显增强,提示bFGF对肌肉拉伤后的肌肉再生具有促进作用。促进肌肉修复的最佳措施就是要促进肌肉再生以及减少瘢痕组织的形成^[15],而且早期肌肉再生的增强可以减少后期瘢痕组织的形成,因为瘢痕形成增多通常认为是由于肌肉再生不充分造成的。

结论:本研究发现bFGF可以提高肌肉中结蛋白的表达,表明bFGF对骨骼肌拉伤后的肌肉再生具有促进作用,提示bFGF有可能作为治疗肌肉损伤、改善肌肉功能的有效药物。

(图1见插图5-1页)

4 参考文献

- 1 Doukas J, Blease K, Craig D, et al. Delivery of FGF genes to wound repair cells enhances arteriogenesis and myogenesis in skeletal muscle. *Mol Ther* 2002; 5(5 Pt 1): 517-27
- 2 Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82(1): 131-7
- 3 Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, et al. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop* 2000; 370: 272-85
- 4 Bornemann A, Schmalbruch H. Desmin and vimentin in regenerating muscles. *Muscle Nerve* 1992; 15(1): 14-20
- 5 黄为, 马文珠, 汪学军. 结蛋白相关心肌病转基因小鼠桥粒相关蛋白表达和分布的变化[J]. 中国临床康复, 2003, 7(15): 2152
- 6 Nikolaou PK, Macdonald BL, Glisson RR, et al. Biomechanical and histological evaluation of muscle after controlled strain injury. *Am J Sports Med* 1987; 15(1): 9-14
- 7 Nguyen HX, Tidball JG. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol* 2003; 547(Pt 1): 125-32
- 8 Barbero A, Benelli R, Minghelli S, et al. Growth factor supplemented matrigel improves ectopic skeletal muscle formation-a cell therapy approach. *J Cell Physiol* 2001; 186(2): 183-92
- 9 Martelly I, Soulet L, Bonnavaud S, et al. Differential expression of FGF receptors and of myogenic regulatory factors in primary cultures of satellite cells originating from fast(EDL) and slow (Soleus) twitch rat muscles. *Cell Mol Biol* 2000; 46(7): 1239-48
- 10 陈惠, 韩彩和, 刘士德, 等. 碱性成纤维细胞生长因子的生物活性分析[J]. 中国临床康复, 2002, 6(20): 3026-7
- 11 Allen DL, Teitelbaum DH, Kurachi K. Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(4): C805-15
- 12 马焰, 高伟, 孙月芬, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对培养的骨骼肌细胞生长作用的研究[J]. 中国临床康复, 2002, 6(19): 2862-3
- 13 程立公, 李国平, 李肃反. 结蛋白和波形蛋白再运动性肌肉损伤和再生过程中表达及意义的实验研究[J]. 中国运动医学杂志, 2001, 20(2): 167-70
- 14 Sato K, Li Y, Foster W, et al. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve* 2003; 28(3): 365-72
- 15 Vaitinen S, Lukka R, Sahlgren C, et al. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60(6): 588-97

颈椎棘突纵切双开门扩大植骨成形术后椎管面积与神经功能改善的 2 年随访

Two-year follow-up of vertebral canal area and improvement of nervous function after double-door laminoplasty by slitting spinous process of cervical vertebra

(正文见第 824 页)



图 1 术前 MRI 像椎管矢状径小脊髓明显受压
图 2 术前 MRI 像椎管矢状径小脊髓明显受压
图 3 术后 MRI 像椎管矢状径增加脊髓后移

碱性成纤维细胞生长因子对大鼠骨骼肌拉伤修复的影响 * ☆

Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of strain injured skeletal muscle in rats

(正文见第 846 页)



图 1 各组腓肠肌结蛋白免疫组织化学染色结果
a: 假拉伤组
b: 肌肉拉伤后给予生理盐水对照组
c: 肌肉拉伤后给予 bFGF 治疗组

维生素 E 促进骨骼肌拉伤后的修复 * ☆

Facilitating effect of vitamin E on the plerosis of skeletal muscle after strain injury

(正文见第 848 页)

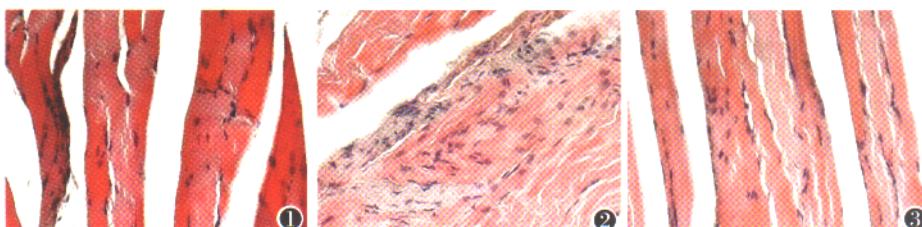


图 1 假损伤组腓肠肌组织切片 (HE × 200)
图 2 对照组腓肠肌组织切片 (HE × 200)
图 3 维生素 E 组腓肠肌组织切片 (HE × 200)

应用激光扫描共聚焦显微镜观察骨组织微损伤的实验研究 * ☆

An experimental study on of bone microdamage observed using laser scanning confocal microscopy

(正文见第 854 页)

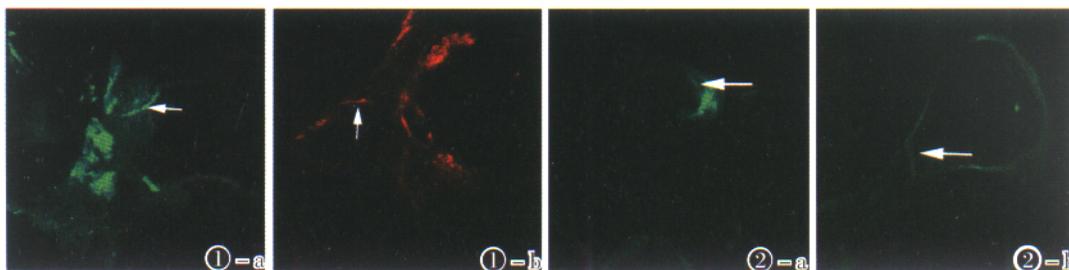


图 1 激光扫描共聚焦显微镜下疲劳损伤后猪髌骨骨小梁微破裂图 (×100) 注: a 为钙黄绿素染色微破裂图; b 为茜素红染色微破裂图 (白色箭头所指), 二者均在激光扫描共聚焦显微镜下观察所得图像, 标本为疲劳损伤 (40 N, 30 万次) 后猪髌骨

图 2 激光扫描共聚焦显微镜下未经疲劳损伤的人股骨头骨小梁微破裂图 (×100) 注: a, b 均为钙黄绿素染色微破裂图 (白色箭头所指)

插图 5-1