

·针灸推拿·

本文引用: 黄 博, 阮 磊, 王兰兰, 薛惠天, 孙梦龙, 段苗苗, 彭 亮. 推拿揉法介导机械敏感性离子通道 Piezo1 对骨骼肌损伤模型大鼠细胞凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2249-2255.

推拿揉法介导机械敏感性离子通道 Piezo1 对骨骼肌损伤模型大鼠细胞凋亡的影响

黄 博¹, 阮 磊¹, 王兰兰¹, 薛惠天¹, 孙梦龙², 段苗苗¹, 彭 亮^{1*}

1.湖南中医药大学针灸推拿与康复学院,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007

[摘要] **目的** 观察推拿揉法对骨骼肌损伤模型大鼠的机械敏感性离子通道 Piezo1 及细胞凋亡的影响,探讨推拿揉法治疗骨骼肌损伤的作用机制。**方法** 32只SD大鼠随机分成正常组、模型组、揉法组、揉法+抑制剂组,每组8只。采用肌内注射200 μL虎蛇毒素(notexin, NTX)(10 μg/mL)制备大鼠腓肠肌损伤模型。造模24 h后,揉法组使用实验动物揉法器模拟揉法治疗,滚动频率为140次/min,每天2次,每次3 min,连续治疗3 d;揉法+抑制剂组在实施揉法治疗前,给予腹腔注射Piezo1抑制剂GsMTx4(270 μg/kg),每天1次,连续注射3 d;正常组和模型组腹腔注射等体积生理盐水。采用平衡木测试进行行为学评估,HE染色观察腓肠肌组织显微结构变化,TUNEL染色计算腓肠肌组织细胞凋亡率,Western blot法检测大鼠腓肠肌组织Piezo1、B淋巴细胞瘤-2(B-lymphoma-2, Bcl-2)、B淋巴细胞瘤2相关X蛋白质(B-lymphoma-2 related X protein, Bax)、胱天蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)表达。**结果** 与正常组比较,模型组和揉法+抑制剂组平衡木行走时间延长($P<0.01$),滑爪次数增加($P<0.01$),腓肠肌细胞凋亡率升高($P<0.01$),腓肠肌组织Piezo1、Bcl-2蛋白表达降低($P<0.01$),Bax、Caspase-3蛋白表达升高($P<0.05$),肌细胞破裂、坏死、大小不一,排列稀疏、无规律,周围有大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润。与模型组比较,揉法组平衡木行走时间缩短($P<0.01$),滑爪次数减少($P<0.01$),腓肠肌细胞凋亡率降低($P<0.01$),腓肠肌组织Piezo1、Bcl-2蛋白表达升高($P<0.01$),Bax、Caspase-3蛋白表达降低($P<0.05$),肌细胞病理情况好转,有少量细胞破裂、萎缩、坏死,细胞间隔缩小,轻度局灶性炎性细胞浸润。与揉法组比较,揉法+抑制剂组平衡木行走时间延长($P<0.01$),滑爪次数增多($P<0.01$),腓肠肌细胞凋亡率增高($P<0.01$),腓肠肌组织Piezo1蛋白表达降低($P<0.05$),Caspase-3蛋白表达升高($P<0.01$),见较多肌细胞萎缩、坏死、大小不一,排列间隔较大,周围仍有一定数量中性粒细胞和淋巴细胞浸润。**结论** 推拿揉法可促进骨骼肌运动功能恢复,缓解骨骼肌损伤,其作用机制可能与激活Piezo1,抑制细胞凋亡有关。

[关键词] 骨骼肌损伤;推拿;揉法;细胞凋亡;Piezo1;胱天蛋白酶-3;B淋巴细胞瘤-2

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.12.015

Effects of tuina rolling manipulation on mechanosensitive ion channel Piezo1 on apoptosis of skeletal muscle injury in model rats

HUANG Bo¹, RUAN Lei¹, WANG Lanlan¹, XUE Huitian¹, SUN Menglong², DUAN Miaomiao¹, PENG Liang^{1*}

1. School of Acupuncture-moxibustion, Tuina, and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of tuina rolling manipulation on mechanosensitive ion channel Piezo1 and cell apoptosis in skeletal muscle injury model rats, and to explore the mechanism of tuina rolling manipulation in treating skeletal

[收稿日期]2023-09-14

[基金项目]国家自然科学基金项目(82174521);湖南中医药大学研究生创新课题立项项目(2022CX109)。

[第一作者]黄 博,女,硕士研究生,研究方向:推拿治疗机理研究。

[通信作者]*彭 亮,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:pengliangleo@foxmail.com。

muscle injury. **Methods** A total of 32 SD rats were randomly assigned into normal group, model group, tuina rolling manipulation group, and tuina rolling manipulation together with inhibitor group, with eight rats in each group. Rat gastrocnemius muscle injury model was prepared by intramuscular injection of 200 μL notexin (NTX)(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After 24 h of modeling, experimental animal tuina roller was used in tuina rolling manipulation group for simulating the rolling manipulation, and the rolling frequency was 140 times/min, twice a day, 3 min each time for 3 d; rolling manipulation together with inhibitor group was given intraperitoneal injection of Piezo1 inhibitor GsMTx4 (270 $\mu\text{g}/\text{kg}$) before tuina rolling manipulation, once a day, for 3 d; the normal group and the model group were intraperitoneally injected with the same volume of normal saline. Behavioral evaluation was assessed by the balance beam test, microstructural changes in gastrocnemius muscle tissue were observed by HE staining, the apoptosis rate of gastrocnemius muscle tissue was calculated by TUNEL staining, and the expressions of Piezo1, B-lymphoma-2 (Bcl-2), B-lymphoma-2 related X protein (Bax), and cysteine aspartic acid specific protease-3 (Caspase-3) in gastrocnemius muscle tissue was measured by Western blot. **Results** Compared with the normal group, in the model group and tuina rolling manipulation together with inhibitor group, the balance beam walking time was prolonged ($P<0.01$), the number of paw slipping increases ($P<0.01$), the apoptosis rate of gastrocnemius muscle cells was higher ($P<0.01$), the expressions of Piezo1 and Bcl-2 protein in gastrocnemius muscle tissue were lower ($P<0.01$), and the expressions of Bax and Caspase-3 protein were higher ($P<0.05$); the muscle cells are broken, necrotic, of different sizes, arranged sparsely and irregularly, surrounded by a large number of neutrophil and lymphocyte infiltrating. Compared with model group, the tuina rolling manipulation group showed shorter balance beam walking time ($P<0.01$), less paws slipping ($P<0.01$), lower apoptosis rate of gastrocnemius muscle cells ($P<0.01$), higher expressions of Piezo1 and Bcl-2 protein in gastrocnemius muscle tissue ($P<0.01$), and lower expressions of Bax and Caspase-3 protein ($P<0.05$); the pathological condition of muscle cells of rats in the tuina rolling manipulation group was improved, with a small number of cells ruptured, atrophic, necrotic, cell spacing narrowed, and mild focal inflammatory cell infiltration; compared with the tuina rolling manipulation group, the rats in the rolling manipulation together with inhibitor group had longer walking time on the balance beam ($P<0.01$), more paws slipping ($P<0.01$), higher apoptosis rate of gastrocnemius muscle cells ($P<0.01$), lower expression of Piezo1 protein in gastrocnemius muscle tissue ($P<0.05$), and higher expression of Caspase-3 protein ($P<0.01$); more muscle cells were atrophic, necrotic, of different sizes, with large arrangement intervals, and there were some neutrophils and lymphocytes infiltrating around. **Conclusion** Tuina rolling manipulation can promote the recovery of skeletal muscle motor function and alleviate skeletal muscle injury, and its mechanism may be related to the activation of Piezo1 mediated apoptosis.

[**Keywords**] skeletal muscle injury; tuina; rolling manipulation; apoptosis; Piezo1; cysteine aspartic acid specific protease-3; B-lymphoma-2

骨骼肌损伤是骨骼肌纤维受到外力击打或长期耐力牵拉引起损伤的一类创伤性疾病,是人们日常锻炼或运动员专业训练中常见的损伤。在运动所受的损伤类型中,最主要的是骨骼肌损伤,占有所有损伤的40.9%^[1]。机械门控离子通道 Piezo1 可将细胞膜接收到的机械力学信号转换为电信号或化学信号,传递至胞内引起一系列生化反应。国外研究报道,肌肉损伤可由细胞凋亡诱导^[2]。而 Piezo1 可能参与骨骼肌损伤时细胞凋亡的过程,在损伤后, Piezo1 表达下降会导致更多的骨骼肌细胞凋亡^[3]。由于 Piezo1 可直接感受到膜张力的变化而进行门控,因此,任何改变膜张力的生理作用力理论上都可激活 Piezo1 通道^[4]。

推拿是中医传统治疗手法,有其独特的生物力学特征^[5],同样属于细胞外力学机械刺激,在骨骼肌

肉疾病中进行推拿治疗可以缓解疼痛并改善功能^[6],其中,擦法是临床上治疗骨骼肌损伤的常用手法。本课题组前期研究表明,推拿擦法可促进骨骼肌损伤后的修复进程,减少炎症反应,抑制组织纤维化,加快功能恢复^[7-8]。本实验在前期研究基础上,复制虎蛇毒素(notexin, NTX)诱导的大鼠骨骼肌损伤模型,观察作为细胞外力学机械刺激的推拿手法——擦法对大鼠骨骼肌损伤后运动功能、组织形态学、Piezo1、B 淋巴细胞瘤-2 (B-lymphoma-2, Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤 2 相关 X 蛋白质(B-lymphoma-2 related X protein, Bax)、胱天蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)的影响,探讨推拿擦法治疗骨骼肌损伤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只, 体质量 220~250 g, 由湖南中医药大学动物实验中心提供, 动物许可证号: SCXK(湘)2019-0004。每笼 4 只, 饲养于温度 20~25 °C, 湿度 50%~70% 的环境中, 所有大鼠均按标准饮食喂养, 并保持 12 h 光照/12 h 黑暗周期。本研究已通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查和批准(审批号: LLBH-202106070002)。

1.2 主要试剂与仪器

NTX(法国 Latoxan 公司, 批号: L8104-100UG); 戊巴比妥钠(德国 Merck KGaA 公司, 批号: P3761); 4% 多聚甲醛(安徽白鲨生物有限公司, 批号: BL539A); 苏木素染液套装(武汉谷歌生物科技有限公司, 批号: G1005); TUNEL 试剂盒(瑞士 Roche 公司, 批号: 11684817910); DAPI 染液(上海碧云天生物技术有限公司, 批号: C1002); Bax 抗体(美国 AAB 公司, 批号: A23917); Caspase-3 抗体(批号: AD6311)、Bcl-2 抗体(批号: DF14173)、Piezo1 抗体(批号: DF12083)均购自美国 Affinity 公司; β -actin 抗体(批号: MD6553)、HRP 山羊抗兔二抗(批号: MD912565)、HRP 山羊抗小鼠二抗(批号: MD912566)均购自英国 MDL 公司; PVDF 膜(美国 Millipore 公司, 批号: ISEQ00010)。

自制实验动物擦法器(专利号: ZL202122808068.0); 脱水机(型号: JJ-12J)、包埋机(型号: JB-P5)均购自中国武汉俊杰电子有限公司; 病理切片机(上海徠卡仪器有限公司, 型号: RM2016); 正置光学显微镜(型号: Eclipse E100)、正置荧光显微镜(型号: Eclipse)、成像系统(型号: DS-U3)均购自日本尼康公司; 电泳仪(北京百晶生物技术有限公司, 型号: BG-subMIDI); 低温离心机(美国 Sigma 公司, 型号: 3-30K); 凝胶成像系统(美国 UVP 公司, 型号: Gel-Doc-It310); 化学发光成像系统(上海勤翔科技有限公司, 型号: ChemiScope6100)。

1.3 分组及造模

32 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 按照随机数字表法分成正常组、模型组、擦法组、擦法+抑制剂组, 每组 8 只。除正常组外, 其余各组建立 SD 大鼠腓肠肌损伤模型^[9]。具体操作如下: 在大鼠的右侧下肢腓肠肌部位进行剃毛处理, 用马克笔画圈标记。以 1%

戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 保证每只大鼠注射部位一致。在大鼠的右侧下肢腓肠肌以 10 μ g/mL 肌内注射 200 μ L NTX, 造成肌内损伤, 肌内注射 NTX 时缓慢推进液体, 并在注射完毕后停留 3 s 再拔出针头, 以保证每只大鼠腓肠肌充分吸收药物。肌内注射 24 h 后观察平衡木测试结果, 大鼠行走时间延长、滑爪次数增加, 表明造模成功^[10-11]。正常组大鼠在同样位置注射 200 μ L 生理盐水。

1.4 干预方法

24 只大鼠均造模成功后, 对擦法组大鼠损伤局部进行推拿擦法治疗, 用实验动物擦法器在标记部位进行模拟擦法治疗, 配合节拍器软件, 滚动频率为 140 次/min。每天 2 次, 上午、下午各 1 次, 每次 3 min, 共 3 d。擦法+抑制剂组先给予 Piezo1 抑制剂GsMTx4 腹腔注射, 剂量 270 μ g/kg^[10], 每天注射 1 次, 而后进行擦法治疗, 手法操作同擦法组, 共 3 d。正常组和模型组腹腔注射相同剂量生理盐水, 不予特殊治疗。治疗前, 操作者配合节拍器软件, 控制滚动频率, 利用实验动物擦法器练习 3 次以上, 以保证操作规范。

1.5 观察指标及方法

最后一次干预结束后, 禁食不禁水 24 h, 采用平衡木测试进行行为学评估以观察大鼠运动功能。行为学测试结束后, 腹腔注射过量戊巴比妥钠麻醉处死各组大鼠, 立即手术切取腓肠肌标记部位组织, 平均分成两份: 一份浸润于 4% 多聚甲醛中用于 HE 染色和 TUNEL 染色; 另一份组织放入 -80 °C 冰箱冻存, 待测相关蛋白表达水平。

1.5.1 行为学测试 干预前以及最后一次干预结束后, 对 4 组大鼠进行平衡木测试^[11]。平衡木测试主要评估大鼠骨骼肌损伤后的运动协调性。将木梁(2 cm \times 120 cm)提升到离地面 120 cm 的高度, 记录大鼠穿过木梁后到达暗箱所需的时间以及爪子滑动的次数。在测试前 1 天进行 3 次适应性试验, 目的是让大鼠熟悉木梁和暗箱。每次试验后用 75% 乙醇清洗木梁和暗箱。

1.5.2 组织学观察 将浸润于 4% 多聚甲醛中的腓肠肌组织块进行石蜡包埋, 制成 5 μ m 厚切片, 先后进行苏木素染色和伊红染色, 脱水封片, 光镜下观察腓肠肌组织的病理变化。

1.5.3 TUNEL 染色 取 4% 多聚甲醛固定的腓肠肌组织, 横切为 5 μ m 厚度的切片, 石蜡包埋。严格按

照 TUNEL 试剂盒说明书进行细胞凋亡检测。染色结束后用抗荧光淬灭封片剂封片,置于荧光显微镜下观察并采集图像。每个切片取 5 个不同视野区域,并利用 Image J 软件记录阳性(绿色)细胞数及细胞总数,计算细胞凋亡率,计算公式:细胞凋亡率=阳性细胞数/细胞总数×100%。

1.5.4 Western blot 检测 SD 大鼠腓肠肌组织中 Piezo1、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达 组织加液氮进行匀浆后,加入裂解液,4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min (离心半径 7 cm),收集上清液;BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度;配制 SDS-PAGE 凝胶,样品轻轻加至凝胶孔中,调制电泳仪(电压约 8 V/cm)使样品通过凝胶;电泳结束后,将分离到的蛋白条带通过转移电泳方式转印至 PVDF 膜,65 V 转膜 2 h;室温、摇床封闭 1 h;一抗[Piezo1 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体、Caspase-3 抗体、β-actin 抗体(稀释比例均为 1:1 000)]4 ℃ 反应过夜;二抗用 TBST 稀释 300 倍,室温、避光缓慢摇动 1 h;按 1:1 混合 ECL 试剂盒中两种液体,均匀铺在 PDVF 膜表面,放入化学发光成像系统获取目的蛋白条带。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学处理。计量资料均符合正态分布时用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较用单因

素方差分析,方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时选择 Tamhane T2 法;不符合正态分布时选择秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠平衡木测试结果比较

在干预前,与正常组比较,模型组、擦法组、擦法+抑制剂组大鼠平衡木行走时间延长、滑爪次数增加($P<0.01$)。在干预后,与正常组比较,模型组和擦法+抑制剂组大鼠平衡木行走时间延长、滑爪次数增加($P<0.01$);与模型组比较,擦法组大鼠平衡木行走时间明显缩短、滑爪次数明显减少($P<0.01$);与擦法组比较,擦法+抑制剂组大鼠平衡木行走时间延长、滑爪次数增加($P<0.01$)。详见图 1。

2.2 各组大鼠腓肠肌组织显微结构观察结果

正常组大鼠肌细胞大小均匀,排列紧密,无炎性细胞浸润;模型组大鼠大量肌细胞破裂、坏死、大小不一,排列稀疏、无规律,周围有大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润;擦法组大鼠肌细胞病理情况好转,有少量细胞破裂、萎缩、坏死,细胞间隔缩小,轻度局灶性炎性细胞浸润;擦法+抑制剂组大鼠有较多肌细胞萎缩、坏死、大小不一,排列间隔较大,周围有中性粒细胞和淋巴细胞浸润。详见图 2。

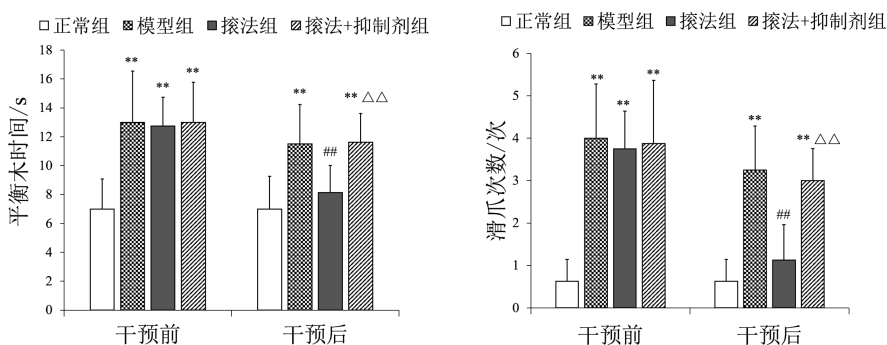


图 1 各组大鼠平衡木时间及滑爪次数结果比较(n=8)

注:与正常组比较,** $P<0.01$;;与模型组比较,## $P<0.01$;;与擦法组比较,△△ $P<0.01$ 。

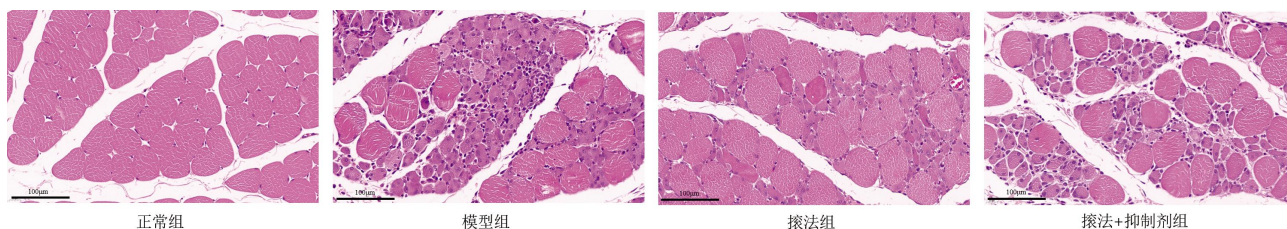


图 2 各组大鼠腓肠肌组织 HE 染色结果(×400)

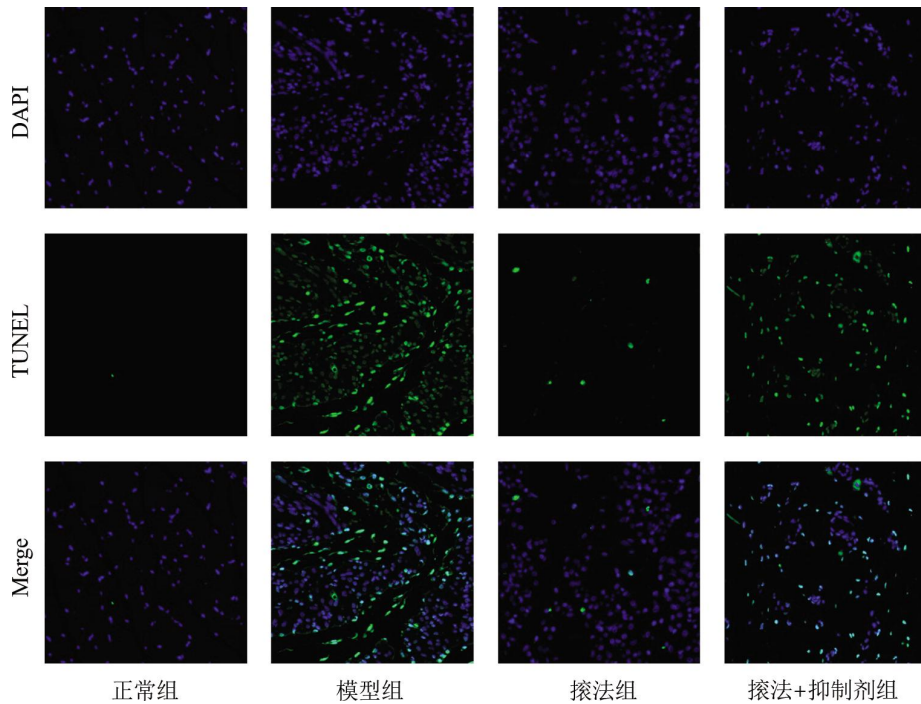


图3 各组大鼠腓肠肌组织 TUNEL 染色($\times 400$)
注:绿色为凋亡细胞,蓝色为正常细胞。

2.3 各组大鼠腓肠肌组织细胞凋亡率比较

正常组几乎未见凋亡细胞;模型组可见较多凋亡细胞;擦法组中凋亡细胞较少;擦法+抑制剂组可见一定数量凋亡细胞。与正常组比较,模型组与擦法+抑制剂组大鼠腓肠肌细胞凋亡率显著升高($P<0.01$);与模型组比较,擦法组腓肠肌细胞凋亡率明显下降($P<0.01$);与擦法组比较,擦法+抑制剂组腓肠肌细胞凋亡率明显升高($P<0.01$)。详见图3、表1。

表1 各组大鼠腓肠肌组织细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

分组	细胞凋亡率/%
正常组	2.31 \pm 1.74
模型组	43.41 \pm 25.02**
擦法组	10.18 \pm 9.37 [#]
擦法+抑制剂组	39.06 \pm 19.62** $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与擦法组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠 Piezo1、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平比较

与正常组比较,模型组与擦法+抑制剂组大鼠腓肠肌组织 Bax、Caspase-3 蛋白表达均升高($P<0.05, P<0.01$),Piezo1、Bcl-2 蛋白表达均降低($P<0.01$);与模型组比较,擦法组腓肠肌组织中 Bax、Caspase-3 蛋白表达降低($P<0.05, P<0.01$),

Piezo1、Bcl-2 蛋白表达升高($P<0.01$);与擦法组比较,擦法+抑制剂组腓肠肌组织 Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.01$),Piezo1 蛋白表达降低($P<0.05$)。详见表2、图4。

表2 各组大鼠腓肠肌组织中 Piezo1、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

分组	Piezo1	Bax	Bcl-2	Caspase-3
正常组	0.43 \pm 0.06	0.24 \pm 0.06	0.34 \pm 0.06	0.30 \pm 0.04
模型组	0.30 \pm 0.08**	0.35 \pm 0.07**	0.22 \pm 0.07**	0.43 \pm 0.05**
擦法组	0.40 \pm 0.05 [#]	0.28 \pm 0.06 [#]	0.31 \pm 0.06 [#]	0.34 \pm 0.04 [#]
擦法+抑制剂组	0.33 \pm 0.06** Δ	0.32 \pm 0.06*	0.26 \pm 0.05**	0.40 \pm 0.04** $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与擦法组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

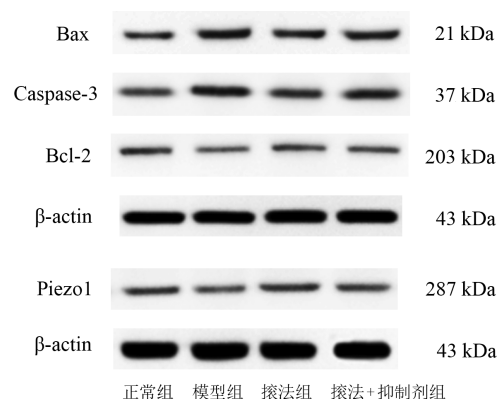


图4 各组大鼠腓肠肌组织中 Piezo1、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白电泳图

3 讨论

骨骼肌损伤时会经历退化、炎症、再生和纤维化的连续过程^[12],过度的炎症反应和细胞凋亡不利于骨骼肌的修复和再生^[13-14],因此,抗炎与抗凋亡治疗对骨骼肌再生和促进损伤后的愈合非常重要。推拿揉法是中医推拿在临床上使用极为广泛的手法之一,可产生行气活血、舒筋活络、缓解痉挛的功效,对骨骼肌损伤疗效显著^[15]。本课题组在前期研究中发现,推拿揉法可改善骨骼肌损伤后的炎症及纤维化情况,促进骨骼肌的修复^[7-8]。Piezo1在肌细胞和肌卫星细胞中均有表达^[16],Piezo1的激活既可促进肌卫星细胞的分化^[17],也参与调控骨骼肌组织中的细胞凋亡过程。有研究表明,在缺失Piezo1的小鼠中,骨骼肌组织中促凋亡因子Bax和Caspase-3表达显著上调,细胞凋亡数量明显增加^[18]。基于此,本研究进一步观察Piezo1对推拿揉法干预后骨骼肌损伤细胞凋亡的影响,以丰富前期研究内容。

NTX作为一种肌肉毒素,注射入骨骼肌后可导致肌纤维的损害而不影响神经和血管,避免如挤压、撕裂中常见的缺血与纤维化的竞争性并发症,另外还可使损伤程度及范围保持一致性^[19],因而广泛应用于骨骼肌损伤模型中^[9]。平衡木测试可评价大鼠运动状态与平衡能力,因此,可用于测试骨骼肌自身损伤后的运动功能变化,以此评估骨骼肌损伤程度^[11]。在本实验中,平衡木测试结果显示,相比正常组,模型组大鼠行走时间明显延长、滑爪次数显著增多,HE染色显示,模型组大鼠肌细胞萎缩、破裂、坏死、大小不一,排列稀疏、无规律,周围有大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润,这些提示模型组大鼠腓肠肌炎症显著,运动功能下降,损伤明显。在推拿揉法干预后,腓肠肌损伤大鼠的平衡木行走时间缩短、滑爪次数减少,HE染色显示,大鼠肌细胞病理情况相比模型组明显好转,仅有少量细胞破裂、萎缩、坏死,细胞间隔缩小,炎性细胞数量明显减少,表明推拿揉法可减轻骨骼肌损伤,使运动功能得以改善。

Piezo1作为一种大型跨膜蛋白,可接受力学机械刺激,进而激活细胞内信号通路的传导^[20]。有研究发现,Piezo1可促进肌卫星细胞分化^[17]和成肌细胞融合^[21],是骨骼肌再生和修复的关键调节因子。在任

何可以改变膜张力的作用下,理论上都能激活Piezo1通道,如剪切力、机械拉伸等^[4],而GsMTx4是目前唯一已知的Piezo1特异性抑制剂。本实验结果发现,揉法+抑制剂组的行走时间和滑爪次数显著高于揉法组,并且从组织病理学形态结构上观察发现,揉法+抑制剂组的肌细胞仍有较多中性粒细胞和淋巴细胞浸润,萎缩、坏死的肌细胞占据大半。由此可以推测,在抑制Piezo1后,揉法对损伤骨骼肌的疗效有所降低,Piezo1可能参与推拿揉法修复骨骼肌损伤过程。

在骨骼肌损伤重构过程中,细胞凋亡也发挥着重要作用。如Caspases的激活可参与肌源性分化的初始重塑阶段,并防止过度的细胞分解和随后的细胞死亡;Bcl-2蛋白家族可通过调控线粒体凋亡信号的起始步骤,影响调节肌肉再生^[22]。Bcl-2家族调控线粒体膜通透性,影响内源性凋亡途径,家族中Bax可促进线粒体内细胞色素C的释放,在细胞质内与Caspase-9形成复合物,激活与外源性通路共同介导的Caspase-3,进而促进细胞凋亡。Bcl-2家族中的Bcl-2则可通过抑制Bax而起到抗凋亡作用^[23]。BARTOLI等^[18]发现,Piezo1的缺失可上调Bax和Caspase-3,促进骨骼肌组织中的细胞凋亡。本实验结果显示,模型组的肌细胞凋亡率明显高于正常组,且与正常组相比,模型组的Bax、Caspase-3表达水平显著升高,Bcl-2表达水平显著下降;而揉法治疗可减少腓肠肌细胞凋亡数量,升高Bcl-2表达,降低Bax、Caspase-3的表达,提示揉法对骨骼肌损伤后细胞凋亡起到抑制作用;相比揉法组,揉法+抑制剂组中细胞凋亡数量明显增加,Caspase-3的表达显著上升,Bax和Bcl-2的表达水平与揉法组比较,虽无统计学差异,但同样有升高和下降的趋势。故本课题组推断,可能是样本量不足导致的差异无统计学意义,也可能是由于有多种共同介导Caspase-3表达的细胞凋亡途径,除了Bcl-2和Bax介导的线粒体凋亡途径之外,外源性途径同样可影响终末Caspase-3来决定细胞是否凋亡。

综上所述,本研究结果初步表明,推拿揉法治疗骨骼肌损伤的机制可能是通过激活机械敏感性离子通道Piezo1,从而抑制骨骼肌组织中细胞的过度凋亡,在一定程度上改善骨骼肌损伤后的运动功能及

组织修复。后期本课题组将进一步优化实验方案,以深入研究推拿滚法对凋亡相关通路的调控作用。

参考文献

- [1] CHEN Y S, LUO Z W, LIN J R, et al. Exploring the potential mechanisms of *Melilotus officinalis* (L.) pall. in chronic muscle repair patterns using single cell receptor–ligand marker analysis and molecular dynamics simulations[J]. *Disease Markers*, 2022, 2022: 9082576.
- [2] WANG Y, CHEN M M, GAO Y, et al. Effect of one–time high load exercise on skeletal muscle injury in rats of different genders: Oxidative stress and mitochondrial responses[J]. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2022, 37(8): e370805.
- [3] BERNAREGGI A, BOSUTTI A, MASSARIA G, et al. The state of the art of Piezo1 channels in skeletal muscle regeneration[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(12): 6616.
- [4] YUAN W H, ZHANG X C, FAN X M. The role of the Piezo1 mechanosensitive channel in heart failure[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(7): 5830–5848.
- [5] 周鑫, 朱清广, 孔令军, 等. 推拿手法生物力学研究方法的基本方向[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(3): 1120–1123.
- [6] YANG J, ZHOU X, MA Q Y, et al. Efficacy and safety of Tui-na for chronic nonspecific low back pain: A PRISMA–compliant systematic review and meta–analysis[J]. *Medicine*, 2023, 102(9): e33018.
- [7] 王兰兰, 薛惠天, 孙梦龙, 等. 推拿滚法对兔骨骼肌急性钝挫伤组织 TNF- α 及 SphK1、S1PR3 表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30(6): 129–134.
- [8] 卢园, 陈海南, 杨舟, 等. 小鱼际滚法对兔骨骼肌急性钝挫伤组织肌化期 GDF-8/Smad2 通路的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(9): 1345–1349.
- [9] JORDA A, CAMPOS–CAMPOS J, ALDASORO C, et al. Protective action of ultrasound–guided electrolysis technique on the muscle damage induced by notexin in rats[J]. *PLoS One*, 2022, 17(11): e0276634.
- [10] LIU M X, LI Y, ZHONG J, et al. The effect of IL–6/Piezo2 on the trigeminal neuropathic pain[J]. *Aging*, 2021, 13(10): 13615–13625.
- [11] PABLOS A, CECA D, JORDA A, et al. Protective effects of foam rolling against inflammation and notexin induced muscle damage in rats[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2020, 17(1): 71–81.
- [12] WANG X Y, ZHOU L. The many roles of macrophages in skeletal muscle injury and repair[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 952249.
- [13] BOUREDJI Z, ARGAW A, FRENETTE J. The inflammatory response, a mixed blessing for muscle homeostasis and plasticity[J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 1032450.
- [14] CASADEVALL C, SANCHO–MUÑOZ A, VICENTE I, et al. Influence of COPD systemic environment on the myogenic function of muscle precursor cells in vitro[J]. *Respiratory Research*, 2022, 23(1): 282.
- [15] 房敏, 宋柏林. 推拿学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 105–106.
- [16] BOSUTTI A, GINIATULLIN A, ODNOSHIVKINA Y, et al. "Time window" effect of Yoda1–evoked Piezo1 channel activity during mouse skeletal muscle differentiation[J]. *Acta Physiologica*, 2021, 233(4): e13702.
- [17] MA N Y, CHEN D L, LEE J H, et al. Piezo1 regulates the regenerative capacity of skeletal muscles via orchestration of stem cell morphological states[J]. *Science Advances*, 2022, 8(11): e–abn0485.
- [18] BARTOLI F, DEBANT M, CHUNTHARPURSAT–BON E, et al. Endothelial Piezo1 sustains muscle capillary density and contributes to physical activity[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2022, 132(5): e141775.
- [19] 严名扬, 唐臻一. 急性骨骼肌损伤实验动物模型种类和选择[J]. *医学信息*, 2021, 34(13): 48–52.
- [20] 何琪, 张罡瑜, 王海彬, 等. 大型跨膜蛋白 Piezo1 在骨科相关疾病中的参与及意义[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(30): 4882–4888.
- [21] ORTUSTE QUIROGA H P, GANASSI M, YOKOYAMA S, et al. Fine–tuning of Piezo1 expression and activity ensures efficient myoblast fusion during skeletal myogenesis[J]. *Cells*, 2022, 11(3): 393.
- [22] RAHMAN F A, QUADRILATERO J. Mitochondrial apoptotic signaling involvement in remodeling during myogenesis and skeletal muscle atrophy[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2023, 143: 66–74.
- [23] BANJARA S, SURAWEEERA C D, HINDS M G, et al. The bcl–2 family: Ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 128.

(本文编辑 周旦)