

电刺激对兔膝关节挛缩的治疗作用及其抗纤维化机制研究

刘阿英¹, 张全兵^{1*}, 周云¹, 王华², 王锋¹, 黄鹏鹏¹, 杨帆¹, 王婷婷¹

摘要 目的 观察早期低频电刺激对兔伸直型膝关节挛缩的治疗作用,并探讨其可能的干预机制。方法 将24只新西兰白兔随机分成对照(C)组、单纯电刺激(E)组、自然恢复(NR)组和电刺激治疗(EST)组,每组6只。C组自由活动7周;E组先自由活动4周,随后对左后肢股四头肌给予3周的低频电刺激;NR组先将左膝关节伸直固定4周,随后解除固定自然恢复3周;EST组先将左膝关节伸直固定4周,随后对左后肢股四头肌给予3周的低频电刺激。每组干预结束后,分别测量兔左膝关节剔除肌肉前后的活动范围(ROM),对股直肌进行HE和Masson染色,Western blot检测股直肌和关节囊中转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的蛋白表达量。结果 与NR组相比,EST组膝关节的总挛缩和肌源性挛缩减轻($P < 0.01$),关节源性挛缩未见改善;股直肌HE染色显示EST组肌纤维的形状和肌膜完整性较NR组改善,Masson染色的定量分析显示EST组股直肌纤维化的改善程度高于NR组($P < 0.01$)。此外,EST组股直肌中TGF- $\beta 1$ 和 α -SMA的表达量较NR组减低($P < 0.05$),EST组关节囊中TGF- $\beta 1$ 和 α -SMA的蛋白表达量较NR组关节囊相比差异无统计学意义。结论 早期低频电刺激可通过降低骨骼肌纤维化水平来改善兔膝关节伸直型挛缩;且对骨骼肌纤维化的抑制作用大于对关节囊纤维化的抑制作用。

关键词 纤维化; 低频电刺激; 伸直型膝关节挛缩; 骨骼肌; 关节囊

中图分类号 R 686.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)10-1570-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.012

在骨科和康复科临床工作中,膝关节伸直型挛

2021-07-15 接收

基金项目: 安徽医科大学2021年临床医学学科建设项目(编号: 2021lcxk031); 安徽省重点研究和开发计划项目(编号: 201904a07020067); 安徽医科大学校科研基金项目(编号: 2018xkj050)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院康复医学科, 合肥 230601;

² 安徽医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 刘阿英,女,硕士研究生;

周云,男,博士,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: zhoukeg@163.com

* 对本文具有同等贡献

缩是一种常见的关节挛缩类型^[1-2]。限制关节活动的解剖学因素可以分为肌源性因素(肌肉、肌腱和筋膜等)和关节源性因素(骨、软骨、关节囊和韧带等),分别导致了肌源性和关节源性挛缩^[3-4]。本课题组通过对家兔研究发现,肌源性挛缩至固定4周基本达到稳定状态,关节源性挛缩在固定4周后进一步发展^[5]。低频电刺激(low frequency electrical stimulation, LFES)作为一种安全有效的物理因子治疗手段,在一定条件下具有增加肌纤维的收缩功能,改善骨骼肌萎缩的作用,但它改善关节周围组织纤维化的作用尚无人探讨^[6]。该研究观察LFES对兔早期伸直型膝关节挛缩的治疗作用,并探讨其对骨骼肌和关节囊纤维化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 24只3~4月大的骨骼发育成熟的雄性新西兰白兔,体质量2.0~2.5 kg,购自安徽医科大学实验动物中心。将家兔单独饲养在60 cm×50 cm×40 cm的笼子中,环境温度为24℃,光暗循环12 h,允许兔子在笼中自由活动,自由获取水和食物。实验开始前采用标准的家兔饮食将所有的兔子进行适应性饲养两周。本实验方案经安徽医科大学动物伦理委员会批准(伦理编号: LLSC20190761)。

1.2 实验材料 电子针灸治疗仪(型号: SDZ-IV型)购自苏州华佗针灸器械总厂。家兔膝关节活动范围(range of motion, ROM)的测量采用本课题组设计的具有实用新型专利的关节活动度测量仪(ZL201720251124.6)。BCA蛋白检测试剂盒(货号: P0010)购自上海碧云天生物技术有限公司;检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)(货号: bsm-33287M-HRP)和转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)(货号: bsm-33187M-HRP)蛋白表达量的一抗购自北京博奥森生物技术有限公司。GAPDH(货号: F2612)抗体购自美国Santa Cruz生物技术公司。化学发光(ECL)检测试剂盒(货号: 32109)购自美国Thermo Scientific公司。HE染色试剂盒(货号: G1120)购自北京博奥森生物技术有限公司,Masson染色试剂盒

(货号: G1340) 购自北京索莱宝科技有限公司; 尼康倒置显微镜(型号: TE2000-U) 购自日本东京 Nikon 公司, Image-Pro Plus 6.0 软件购自美国银泉市马里兰州 Media Cybernetics 股份有限公司。

1.3 分组及干预措施 将 24 只家兔随机分为对照(C)组、单纯电刺激(E)组、自然恢复(NR)组和电刺激治疗(EST)组, 每组 6 只。C 组允许家兔自由活动 7 周; E 组家兔先自由活动 4 周, 随后进行 3 周每天 20 min 频率为 10 Hz、电流强度为 5 mA 的 LFES 治疗; NR 组家兔左膝关节管型石膏固定 4 周后建立兔膝关节伸直挛缩模型^[4], 随后拆除石膏, 自然恢复 3 周; EST 组采用同样的方法将家兔左膝关节用管型石膏固定 4 周, 随后拆除石膏进行 3 周每天 20 min 频率为 10 Hz、电流强度为 5 mA 的 LFES 治疗。电子针灸仪的工作方式为断续波, 脉冲持续时间 15 s, 暂停时间 5 s。电刺激的干预部位为兔左后肢股四头肌。首先, 将左后肢的毛发剃除, 然后将 2 片 3 cm × 3 cm 的电极贴在左后肢膝关节前上方的皮肤上。两电极片之间的距离为 0.5 cm。

1.4 组织准备和关节活动度测量 耳缘静脉注射过量 3% 的戊巴比妥钠将各组家兔安乐死后, 将兔左后肢于左髌关节处离断, 并切断髌关节处大腿肌群的起始点, 完全分离左下肢。使用本课题组前期研究设计的关节活动度测量仪测量各组家兔左膝关节在肌切开前后的活动范围(range of motion, ROM)^[4]。将股骨近端、胫骨近端和胫骨远端用金属钳固定在表盘上。所有的膝关节在施加力量前均从 0° 屈曲位开始。在之前的实验中, 通过测量正常家兔的 ROM, 发现扭矩为 0.077 N·m 可使家兔膝关节屈曲 140° 左右。在此之后, 即使继续增加扭矩, 膝关节弯曲角度也很难增加。因此, 以 0.077 N·m 为标准扭矩测量膝关节 ROM, ROM 测量由 3 名检查人员进行, 每个人重复测量 2 次。测量结果对彼此保密, 每只家兔的左膝关节活动度用重复测量结果的平均值表示。随后, 分离股直肌并从中切取 2 个肌肉组织样品, 大小约为 1 cm × 1 cm × 0.5 cm, 一份样品用于组织学染色, 另一个样品保存在 -80 °C 的冰箱中用于骨骼肌纤维化蛋白的检测。最后, 剔除膝关节周围的骨骼肌, 再次测量兔膝关节 ROM。分离兔膝关节的关节囊保存在 -80 °C 的冰箱中用于关节囊纤维化蛋白的检测。肌切开前, 实验组膝关节屈曲 ROM 较正常对照组的减少值称为总挛缩, 肌切开后屈曲 ROM 较对照组肌切开后 ROM 的减少值称为关节源性挛缩。肌源性挛缩为

总挛缩和关节源性挛缩的差值。

1.5 组织学检测 兔股直肌先用 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA) 固定, 随后包埋在石蜡中。取包埋股直肌的蜡块, 于肌肉中间部分垂直于肌纤维方向切片, 切片层厚 10 μm, 每个股直肌标本取 8 张切片, 随后各取 4 张切片分别按 HE 染色和 Masson 染色试剂盒说明书上的操作步骤进行染色。使用尼康倒置显微镜(型号: TE2000-U) 于 200 倍下对切片进行观察拍摄, 每张切片在 200 倍下随机拍摄 4 个视野, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量各组兔股直肌横截面中胶原沉积百分比。

1.6 Western blot 在裂解缓冲液中将兔股直肌(70 ~ 80 mg) 进行匀浆、离心, 取上清液进行 BCA 蛋白定量。用 12.5% SDS-PAGE 电泳凝胶分离总的溶解产物(每孔 8 ~ 20 μg), 然后将凝胶中分离的目的蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂牛奶(溶于由 Tris 和 Tween-20 配制的 TBST 缓冲液) 室温孵育 90 min 后, 将膜分别用 TGF-β1(1 : 10 000)、α-SMA(1 : 10 000) 或 GAPDH(1 : 50 000) 一抗孵育 1 ~ 2 h。随后用 TBST 每 8 min 洗 1 遍, 共 3 遍。再用辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 二抗(bs-0296G, 1 : 10 000, bioss) 孵育 90 min。最后, 再用 TBST 将膜洗涤 3 遍。将 ECL 化学发光液滴加到目的条带的位置, 用数字成像设备检测该信号。Western blot 结果重复 3 遍。用 Image J 软件对各个条带灰度值进行半定量分析。将目的条带与各组内参条带(GAPDH) 的灰度值的比值进行比较, 最终确定 Western blot 结果差异是否有统计学意义。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 23.0 对实验数据进行分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 Levene 法进行方差齐性检验, 在方差的同质性检验之后, 组间差异采用单因素方差分析或 *t* 检验, 非正态分布数据采用非参数检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 关节活动度测量仪检测肌肉切开后兔左膝关节 ROM 如表 1 所示, 经过 4 周石膏固定, 解除固定自然恢复 3 周, C 组、E 组、NR 组和 EST 组总的关节挛缩角度相比差异有统计学意义($F = 52.780$, $P < 0.05$); 4 组肌源性挛缩角度相比差异有统计学意义($F = 69.061$, $P < 0.05$); 4 组关节源性挛缩角度相比差异有统计学意义($F = 45.889$, $P < 0.05$)。其中, NR 组的总挛缩、肌源性挛缩和关节源性挛缩

表1 4组新西兰白兔挛缩角度测量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	关节固定	电刺激	总挛缩(°)	肌源性挛缩(°)	关节源性挛缩(°)
C	-	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
E	-	+	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
NR	+	-	74.07 ± 1.91 ^{***}	36.38 ± 2.77 ^{***}	37.68 ± 2.46 ^{***}
EST	+	+	59.07 ± 4.95 ^{***△△}	24.50 ± 1.40 ^{***△△}	34.57 ± 1.47 ^{***}

与 C 组比较: ^{***} $P < 0.01$; 与 E 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 NR 组比较: ^{△△} $P < 0.01$

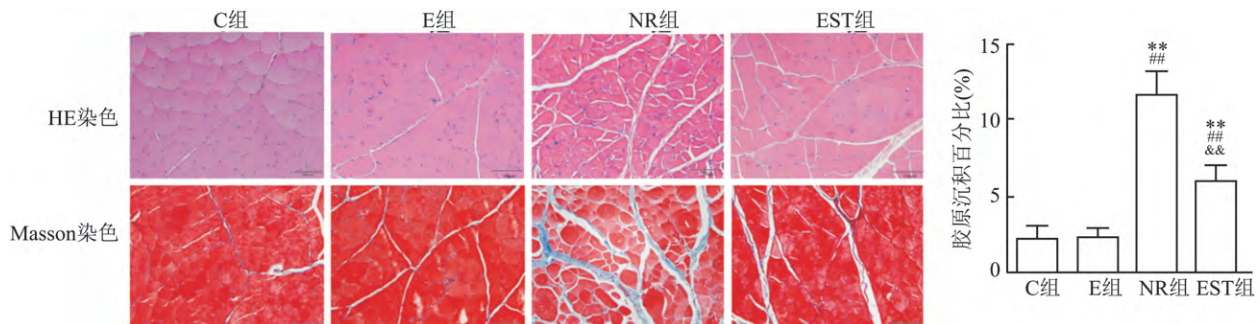


图1 组织学检测结果比较 × 200

与 C 组比较: ^{***} $P < 0.01$; 与 E 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 NR 组比较: [&] $P < 0.01$

相对于 C 组和 E 组均有所增加 ($P < 0.01$); 经过 4 周石膏固定和 3 周 LFES 治疗后, EST 组的总挛缩、肌源性挛缩和关节源性挛缩相对于 C 组和 E 组均增加 ($P < 0.01$); 与 NR 组相比, EST 组的总挛缩和肌源性挛缩减轻 ($P < 0.01$), 关节源性挛缩未见改善。

2.2 各组骨骼肌纤维间间质表达和胶原沉积情况

与 C 组相比, HE 染色结果提示, NR 组和 EST 组中均出现了不同程度的间质增多, 间质中可见细胞核呈梭形的成纤维细胞, 其中 NR 组较 EST 组增多的较为明显。Masson 染色结果进一步表明, 经过 4 周固定处理的家兔骨骼肌样品中, 即使经过 3 周的自然恢复或电刺激治疗, 骨骼肌纤维间仍存在不同程度的胶原纤维沉积。但 NR 组和 EST 组相比, EST 组的胶原纤维沉积更少。骨骼肌 Masson 染色的定量分析结果显示, 4 组骨骼肌胶原沉积水平相比差异有统计学意义 ($F = 66.436, P < 0.05$) (图 1), 与 C 组相比, NR 组和 EST 组的股直肌中纤维化面积增高 ($P < 0.01$), 但 EST 组的骨骼肌纤维化面积低于 NR 组 ($P < 0.01$)。

2.3 各组股直肌中 TGF-β1 和 α-SMA 的蛋白表达

4 组股直肌中 TGF-β1、α-SMA 蛋白的相对表达量差异有统计学意义 ($F = 13.985, P < 0.05$; $F = 15.030, P < 0.05$)。如图 2 所示, 与 C 组比较, E 组的股直肌中 TGF-β1 和 α-SMA 蛋白表达差异无统计学意义; 与 C 组比较, NR 组的 TGF-β1 和 α-SMA 的

蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 C 组相比, EST 组的 TGF-β1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), α-SMA 蛋白表达也相应升高 ($P < 0.05$); 与 E 组比较, NR 组的 TGF-β1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), α-SMA 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); EST 组和 E 组相比, TGF-β1 的蛋白表达未见差异, α-SMA 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 NR 组比较, EST 组的 TGF-β1 和 α-SMA 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。

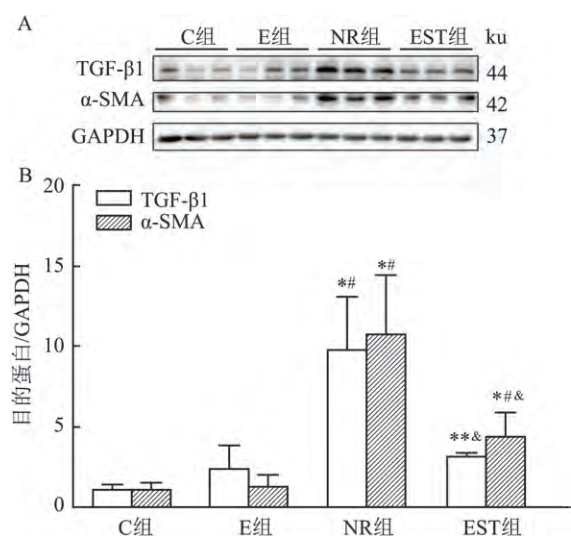


图2 各组股直肌纤维化蛋白检测

与 C 组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与 E 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 NR 组比较: [&] $P < 0.05$

2.4 各组关节囊中 TGF-β1 和 α-SMA 的蛋白表达

4 组关节囊中 TGF- β 1 蛋白的相对表达量差异有统计学意义 ($F = 33.580, P < 0.05$), 4 组关节囊中 α -SMA 蛋白的相对表达量差异有统计学意义 ($F = 17.307, P < 0.05$)。如图 3 所示, 与 C 组比较, E 组关节囊中 TGF- β 1 和 α -SMA 蛋白表达差异无统计学意义; 与 C 组比较, NR 组的 TGF- β 1 和 α -SMA 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与 C 组比较, EST 组的 TGF- β 1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), α -SMA 蛋白表达也升高 ($P < 0.05$); 与 E 组比较, NR 组的 TGF- β 1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), α -SMA 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与 E 组比较, EST 组的 TGF- β 1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), α -SMA 蛋白表达也升高 ($P < 0.05$); 与 NR 组比较, EST 组的 TGF- β 1 和 α -SMA 蛋白表达差异无统计学意义。

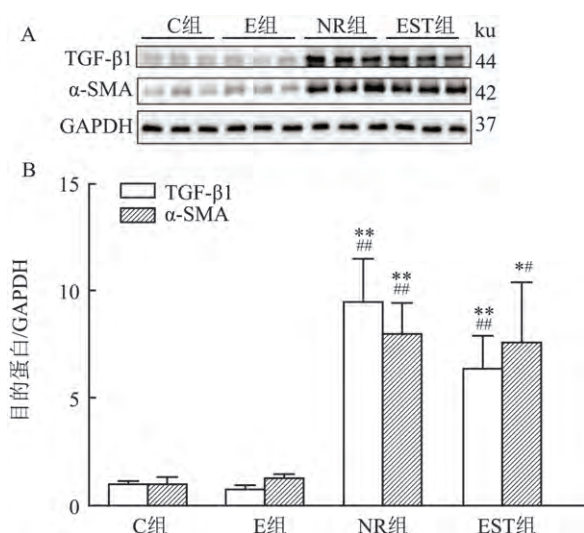


图3 各组关节囊纤维化蛋白检测

与 C 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 E 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

已有的膝关节挛缩研究所使用的动物模型大多为屈曲型关节挛缩模型, 屈曲固定使动物膝关节伸直活动受限^[8-9], 但这不符合膝关节伸直位固定的临床实际。为了更接近于临床, 本研究使用管型石膏外固定建立了伸直型兔膝关节挛缩模型^[7,10]。

既往研究^[6,7,11]表明, 关节周围组织纤维化, 尤其是骨骼肌和关节囊的纤维化在关节挛缩形成过程中发挥着重要作用, 但具体哪种组织纤维化在关节挛缩形成中作用更为显著, 以及康复干预后对哪种组织纤维化的影响更为明显, 研究比较匮乏。本研究探讨了早期 LFES 对骨骼肌纤维化和关节囊纤维

化的各自影响, 以明确 LFES 是通过抑制骨骼肌纤维化还是关节囊纤维化来改善关节挛缩。实验显示, 膝关节固定 4 周后即使经过 3 周的自然恢复或 LFES 治疗, 仍存在不同程度的肌源性和关节源性挛缩。经过 3 周 LFES 治疗后总挛缩和肌源性挛缩角度均减小, 关节源性挛缩角度未见改善。提示早期 LFES 主要通过减轻肌源性挛缩来改善兔膝关节挛缩。HE 染色结果显示, 经过固定处理后 NR 组和 EST 组股直肌肌纤维间均出现不同程度的间质增多, 间质中可见细胞核呈梭形的成纤维细胞。Masson 染色的结果进一步证实, EST 组的股直肌纤维化较 NR 组明显减轻, 提示早期 LFES 可能是通过减轻骨骼肌纤维化来改善兔膝关节挛缩。

TGF- β 1 与组织纤维化的关系密切。组织在创伤修复的早期阶段大量分泌 TGF- β 1, 促进局部间质组织的增殖和分化^[12]。本课题组前期研究^[7]显示, 在关节挛缩的形成过程中, TGF- β 1 的表达增高, 在关节挛缩的形成过程中发挥着重要作用。在复杂的纤维化信号网络中, TGF- β 1/ α -SMA 通路已被广泛认为可诱导组织肥厚和纤维化^[13]。肌成纤维细胞可在细胞内表达 α -SMA, α -SMA 是细胞的一种骨架蛋白, 在创伤后组织的修复过程中, 有增加组织张力、促进伤口收缩愈合的作用^[14]。 α -SMA 的高表达可以增加纤维组织的黏着程度, 是纤维组织收缩过程中重要的分子学因素^[15]。 α -SMA 可通过细胞膜上的整合素作用于细胞外基质, 从而影响细胞外基质的构成, 导致关节周围组织的纤维化, 促进了关节挛缩的形成。本研究显示, 经过固定处理后 NR 组和 EST 组骨骼肌和关节囊中纤维化蛋白 TGF- β 1 和 α -SMA 均发生不同程度的升高, 提示 TGF- β 1/ α -SMA 通路的激活可能是导致关节挛缩的分子机制。经过 3 周的 LFES 处理后, EST 组的骨骼肌中 TGF- β 1 和 α -SMA 的表达量相对于 NR 组降低, 但 EST 组关节囊中 TGF- β 1 和 α -SMA 的蛋白表达量相对于 NR 组未见差异。提示早期 LFES 主要是通过降低骨骼肌纤维化水平进而改善关节挛缩。

本研究存在一定的局限性: 首先, 本实验仅进行了 TGF- β 1/ α -SMA 纤维化信号通路的研究, 没有做其他相关信号通路的研究。其次, 本实验仅研究了固定早期 LFES 对膝关节挛缩角度的影响, 膝关节挛缩形成后期 (4 周以后) 的康复干预对关节挛缩的长期愈后具有更重要的临床意义。因此, 本课题未来的研究将着重于对关节源性挛缩的探索, 以期找到治疗关节挛缩更为有效的方法。

参考文献

- [1] 王 锋,张全兵,周 云,等. 发散式冲击波联合常规康复治疗创伤后膝关节伸直挛缩的疗效观察 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2020, 35(2): 187-9.
- [2] 陈 爽,张全兵,周 云,等. 超短波干预对兔伸直型膝关节挛缩模型关节囊纤维化的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 380-5.
- [3] Trudel G, Laneuville O, Coletta E, et al. Quantitative and temporal differential recovery of articular and muscular limitations of knee joint contractures; results in a rat model [J]. J Appl Physiol, 2014, 117(7): 730-7.
- [4] Wang F, Zhang Q B, Zhou Y, et al. Effect of ultrashort wave treatment on joint dysfunction and muscle atrophy in a rabbit model of extending knee joint contracture: Enhanced expression of myogenic differentiation [J]. Knee, 2020, 27(3): 795-802.
- [5] 周 云,王 锋,张全兵,等. 兔膝关节伸直挛缩模型的建立 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2019, 41(7): 488-93.
- [6] 张 玮,苏利强,赵广高. 低频电刺激对坐骨神经损伤大鼠不同类型骨骼肌萎缩及内源性胰岛素样生长因子 1 表达的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(15): 2760-3.
- [7] Zhou Y, Zhang Q B, Zhong H Z, et al. Rabbit model of extending knee joint contracture: Progression of joint motion restriction and subsequent joint capsule changes after immobilization [J]. J Knee Surg, 2020, 33(1): 15-21.
- [8] Baranowski A, Schlemmer L, Förster K, et al. A novel rat model of stable posttraumatic joint stiffness of the knee [J]. J Orthop Surg Res, 2018, 13(1): 185.
- [9] Hagiwara Y, Chimoto E, Ando A, et al. Expression of type I collagen in the capsule of a contracture knee in a rat model [J]. Ups J Med Sci, 2007, 112(3): 356-65.
- [10] Zhang Q B, Zhou Y, Zhong H Z, et al. Effect of stretching combined with ultrashort wave diathermy on joint function and its possible mechanism in a rabbit knee contracture model [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2018, 97(5): 357-63.
- [11] Huang P P, Zhang Q B, Zhou Y, et al. Effect of radial extracorporeal shock wave combined with ultrashort wave diathermy on fibrosis and contracture of muscle [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2021, 100(7): 643-50.
- [12] 李 睿,江扬帆,童 琳,等. 龙血竭总黄酮对免疫性肝纤维化大鼠肝脏中 TGF- β 1 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(4): 549-53.
- [13] Shen H, Wang J, Min J, et al. Activation of TGF- β 1/ α -SMA/Col I profibrotic pathway in fibroblasts by galectin-3 contributes to atrial fibrosis in experimental models and patients [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(2): 851-63.
- [14] 施 鹏,陶 辉,张家贵,等. 靶向沉默 SIRT1 对乳鼠心肌成纤维细胞增殖的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4): 471-5.
- [15] Wang Y Y, Jiang H, Pan J, et al. Macrophage-to-myofibroblast transition contributes to interstitial fibrosis in chronic renal allograft injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(7): 2053-67.

Study on the therapeutic effect of electrical stimulation on the knee joint contracture and its anti-fibrosis mechanism in rabbits

Liu Aying, Zhang Quanbing, Zhou Yun, et al

(Dept of Rehabilitation Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the therapeutic effect of early low-frequency electrical stimulation on knee extension contracture and its possible intervention mechanism in rabbits. **Methods** Twenty-four New Zealand white rabbits were randomly divided into control group (C), electrical stimulation group (E), natural recovery group (NR) and electrical stimulation treatment group (EST), with 6 rabbits in each group. Group C had free activity for 7 weeks. In group E, free activity was performed for 4 weeks, followed by low frequency electrical stimulation on the quadriceps of the left hind limb for 3 weeks. In group NR, the left knee joint was fixed in the straight position for 4 weeks, and then 3 weeks of free activity was given after the fixed removing. In the EST group, the left knee joint was fixed in the straight position for 4 weeks, followed by low frequency electrical stimulation on the quadriceps of left hind limb for 3 weeks. After each group intervention, the range of motion (ROM) of the left knee joint was measured before and after muscle removal. HE staining and Masson staining were performed on the rectus femurs. The protein expression levels of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in rectus and capsule were detected by Western blot. **Results** Compared with NR group, total contracture and myogenic contracture of the knee joint were reduced ($P < 0.01$) and arthrogenic contracture was not improved in EST group. HE staining of rectus femoris showed that the shape and membrane integrity of muscle fibers in the EST group were improved compared with those of the NR group. The quantitative analysis of masson staining showed that

网络出版时间: 2021-8-19 13:49 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1123.013.html>

HDAC3 负性调控 mTOR 促进低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬

王月涵¹, 黄颖²

摘要 目的 研究组蛋白去乙酰化酶 3 (HDAC3) 调控低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬的功能和机制。方法 体外建立 H9C2 心肌细胞低氧模型, 采用 Western blot 和免疫荧光染色技术检测自噬相关蛋白 LC3B-II、Beclin-1 和 P62 的表达变化以及荧光活性。分别转染 HDAC3 过表达质粒和干扰 RNA 后, 检测自噬调节分子 mTOR 和 LC3B 的蛋白表达和荧光活性变化。结果 与对照组比较, 低氧 1、6、12 h 后, H9C2 心肌细胞中 LC3B-II 和 Beclin-1 表达显著增加 ($P < 0.05$); P62 蛋白表达先增高 (1 h) 后降低 (6 h) ($P < 0.05$)。低氧 1 h 和 6 h 后, HDAC3 和 mTOR 蛋白表达明显增高 ($P < 0.05$); 低氧 12 h 后 HDAC3 和 mTOR 蛋白表达显著减少。过表达 HDAC3 能够降低 mTOR 蛋白表达和荧光活性, 增加 LC3B 的蛋白表达和荧光活性 ($P < 0.05$); 下调 HDAC3 蛋白表达能够升高 mTOR 蛋白水平和荧光活性, 减少了 LC3B 蛋白表达和荧光活性 ($P < 0.05$)。结论 HDAC3 负性调节 mTOR 蛋白, 促进了低氧诱导的 H9C2 心肌细胞自噬。

关键词 自噬; 组蛋白去乙酰化酶 3; H9C2 心肌细胞

中图分类号 R 542.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)10-1575-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.013

细胞自噬是指在生理或病理条件下, 溶酶体降解自身的细胞器或者分子物质的过程^[1]。心肌细胞自噬能够促进心室重构, 是导致心力衰竭的重要原因之一^[2]。但迄今为止, 导致心肌细胞自噬的机

制尚不明确。组蛋白去乙酰化酶 3 (histone deacetylase 3, HDAC3) 是表观遗传学调控的重要分子。研究^[3-4]表明 HDAC3 能够促进心肌细胞肥厚, 诱导心功能不全, 并和先天性心脏病有着密切关系。因此, 该研究探讨 HDAC3 调控低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬的功能和分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 本实验所用大鼠 H9C2 心肌细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 兔抗 LC3B 单克隆抗体、兔抗 P62 单克隆抗体、兔抗 Beclin-1 单克隆抗体、兔抗 HDAC3 单克隆抗体、兔抗 mTOR 单克隆抗体、兔抗 GAPDH 单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术公司; 细胞培养试剂购自美国 Gibco 公司。HDAC3 引物序列 F: 5'-GATGACCAGAGTTACAAG-CACC-3'; R: 5'-TTGAAGCAGCCTAATCGATCAC-3'; siRNA 引物序列: 5'-CTGCATTATGCTCTCTATATT-3'。

1.1.3 实验仪器 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司; 低氧小室购自加拿大 Stem Cell 公司; 蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; GE Amersham Imager 600 自动化学发光凝胶成像分析系统购自美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞低氧实验 大鼠 H9C2 心肌细胞用 DMEM + 10% FBS 培养基培养, 将 H9C2 细胞分

2021-07-16 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1608085QH196)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 心电功能科、² 心血管内科, 合肥 230022

作者简介: 王月涵, 女, 硕士研究生;

黄颖, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ayfyhy@126.com

the fibrosis improvement degree of rectus femoris in the EST group was higher than that of the NR group ($P < 0.01$). In addition, the expression levels of TGF- β 1 and α -SMA in the rectus femurs of EST group were lower than those in the NR group ($P < 0.05$). The expression differences of TGF- β 1 and α -SMA in joint capsule of the EST group were not statistically significant compared with those in the NR group ($P > 0.05$). **Conclusion** Early low-frequency electrical stimulation can improve extension contracture of the knee via reducing the level of skeletal muscle fibrosis. The inhibition of skeletal muscle fibrosis is greater than that of joint capsule fibrosis.

Key words fibrosis; low frequency electrical stimulation; knee extension contracture; skeletal muscle; joint capsule