

大鼠脊髓横断早期比目鱼肌重量与肌球蛋白重链亚型 mRNA 表达的变化

范晓华^{1,2,3}, 纪树荣^{1,2}, 周红俊^{1,2}

[摘要] 目的 观察大鼠脊髓横断后早期比目鱼肌重量及肌球蛋白重链(MHC)各亚型 mRNA 表达的变化规律。方法 40 只雌性 Wistar 大鼠随机分为对照组(10 只)与脊髓横断 7 d 组(ST7)、15 d 组(ST15)、30 d 组(ST30),各 10 只,脊髓横断水平 T₈~T₁₀。分别于横断后 7、15、30 d 取后肢比目鱼肌称重,采用半定量 RT-PCR 方法观察 MHC 各亚型 mRNA 表达的变化。结果 脊髓横断各组比目鱼肌重量均较对照组下降($P < 0.05$)。ST15、ST30 组比目鱼肌绝对与相对重量均较 ST7 组下降($P < 0.05$)。对照组比目鱼肌只表达 MHC-I 与 MHC-IIa,脊髓横断各组在横断 7 d 后出现 MHC-IIx 与 MHC-IIb 的表达,横断后各时间点 MHC-I mRNA 的表达持续下调;MHC-IIa 与 MHC-IIx mRNA 的表达持续上调;MHC-IIb mRNA 的表达维持在低水平。结论 脊髓横断主要在早期影响肌肉的重量;脊髓横断后 MHC 的表达发生由慢型向快型的转化,MHC 随神经肌肉活动的减少表现出可塑性。

[关键词] 脊髓横断;比目鱼肌;肌肉重量;肌球蛋白重链;逆转录聚合酶链式反应

Changes of the Soleus Muscle Mass and Expression of Myosin Heavy Chain Isoforms mRNA after Acute Spinal Cord Transection FAN Xiao-hua, JI Shu-rong, ZHOU Hong-jun. Faculty of Rehabilitation Medicine of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100068, China

[Abstract] **Objective** To investigate the rule of changes of the soleus mass and expression of myosin heavy chain (MHC) isoforms mRNA. **Methods** 40 female Wistar rats were divided randomly into the control group and three spinal cord transection (ST) groups, ST7, ST15, and ST30 with 10 animals in each group. Rats in ST groups were subjected to a complete ST between T₈ and T₁₀ levels. The right soleus was dissected and weighed at 7, 15, 30 days after ST, and the expression of MHC mRNA isoforms was measured by semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The absolute and relative soleus masses in three ST groups were lower significantly than those of control group ($P < 0.05$). The soleus mass in ST15 and ST30 groups were lower than that of ST7 group ($P < 0.05$). The soleus of control group predominantly expressed MHC-I and some MHC-IIa, whereas the soleus began to express MHC-IIx and MHC-IIb after ST, except for MHC-I and MHC-IIa. ST induced consistently down-regulation of MHC-I mRNA and up-regulation of MHC-IIx and MHC-IIa at three time points after ST. The level of MHC-IIb mRNA expression was very low at three time points after ST. **Conclusion** ST can influence the soleus mass at early stage after ST. ST induces a shift toward a faster muscle phenotype from slow to fast MHC isoform. MHC demonstrates plasticity in response to decrease neuromuscular activation.

[Key words] spinal cord transection; soleus; muscle mass; myosin heavy chain; reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)04-0298-03

[本文著录格式] 范晓华,纪树荣,周红俊. 大鼠脊髓横断早期比目鱼肌重量与肌球蛋白重链亚型 mRNA 表达的变化[J]. 中国康复理论与实践,2006,12(4):298—300.

肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)作为骨骼肌纤维中肌球蛋白的主要组成成分之一,具有 ATP 酶的活性,不同肌纤维中不同 MHC 亚型的表达对肌纤维的收缩与组化特性起着决定性作用。脊髓损伤后神经肌肉电活动与负荷均减少^[1],可引起骨骼肌明显萎缩,MHC 亚型发生转化。本研究采用大鼠脊髓横断模型,观察抗重力肌比目鱼肌重量的变化规律,以及 MHC 的适应性,以期为临床脊髓损伤后制定康复策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及脊髓横断模型建立 选取成年雌性 Wistar 大

作者单位:1. 首都医科大学康复医学院,北京市 100068;2. 北京博爱医院,北京市 100068;3. 山东省立医院,山东济南市 250021。作者简介:范晓华(1970-),女,山东青州市人,副主任医师,博士研究生,主要研究方向:肢体伤残患者的康复和康复治疗技术。

鼠 40 只(购于首都医科大学实验动物中心),体重(250±50)g,按“随机数字表法”随机分成对照组与脊髓横断 7 d 组(ST7)、15 d 组(ST15)、30 d 组(ST30),每组 10 只。对照组不做处理,脊髓横断组应用 10% 水合氯醛 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉,常规备皮,暴露 T₈~T₁₀ 脊髓背面与两侧,参照 Talmadge^[2,3] 与 Roy^[4] 建立脊髓横断模型的方法在 T₈~T₁₀ 水平完全横断脊髓。术后 3 d 常规给予青霉素 10 万单位腹腔内注射,预防感染。分别于脊髓横断 7 d、15 d、30 d,按上述方法麻醉大鼠,仔细分离右侧比目鱼肌,称重并迅速置于液氮内冷冻,-80℃ 冰箱内保存备用。比目鱼肌的相对重量=比目鱼肌重量(mg)/大鼠体重(g)^[5,6]。

1.2 肌肉总 RNA 提取 将重约 30 mg 的肌肉放入预先消毒并用无离子水处理过的玻璃匀浆器中,加入 TRIzol 0.6 ml(1 ml TRIzol/100 mg 肌肉),快速研磨,制成匀浆,加入 120 μl 氯仿(200 μl 氯仿/1 ml TRIzol),剧烈震荡混匀 30 s,12000 r/min

室温离心 5 min。将上清液小心转移至无 RNA 酶 1.5 ml 离心管中,加入等体积的异丙醇,室温下放置 5 min;12000 r/min 室温离心 5 min,小心移去上清液;70%酒精洗涤两次,每次 300 μl,12000 r/min,室温离心 5 min,尽可能彻底地吸走上清,室温下使酒精完全挥发。沉淀用 10~20 μl 无离子水溶解,混匀后应用分光光度计在 260 nm 与 280 nm 测定 RNA 的质量。OD 260/280 在 1.8~2.0 之间表示抽提的 RNA 纯度很高,样本置于-80℃冰箱内保存备用。

1.3 MHC-I、MHC-IIa、MHC-IIx、MHC-IIb mRNA 的表达与分析

1.3.1 逆转录反应 取 2 μg 的 RNA,加 5×第 1 链合成缓冲液 4 μl、dNTP 混合液 1 μl、RNA 酶抑制剂 1 μl、Oligo (DT)18 2 μl、逆转录酶 (M-MLV)(200 U/μl) 1 μl,加无 RNA 酶水至反应容积为 20 μl,混匀后室温放置 10 min,置于 PCR 仪中 42℃反应 1 h,反应结束后置于冰中冷却 2 min 终止反应。

1.3.2 PCR 扩增

1.3.2.1 引物设计 按文献报道^[7,8]设计 MHC-I、MHC-IIa、MHC-IIx、MHC-IIb 的引物序列(见表 1)。所有引物均由上海 Sangon 生物工程技术有限公司合成。

1.3.2.2 反应条件 在 0.5 ml 离心管中加入 dNTP 混合液(各 2.5 mM)4 μl、10×PCR 缓冲液(含 Mg²⁺)5 μl、TaqDNA 聚合酶(5U/μl)0.25 μl、RT 溶液 1 μl、上下游引物各 2 μl,加 RNA 酶水调至反应体系为 50 μl。

表 1 PCR 反应各引物序列

mRNA	序列	引物	产物长度
MHC-I	上游序列	5' GAA GGC CAA GAA GGC CATC 3'	545 bp
	下游序列	5' GGT CTC AGG GCT TCA CAG GC 3'	
MHC-IIa	上游序列	5' GAA GGC CAA GAA GGC CAT C 3'	519 bp
	下游序列	5' TCT ACA GCA TCA GAG CTG CC 3'	
MHC-IIx	上游序列	5' GAA GGC CAA GAA GGC CAT C 3'	523 bp
	下游序列	5' GGT CAC TTT CCT GCT TTG GA 3'	
MHC-IIb	上游序列	5' GAA GGC CAA GAA GGC CAT C 3'	539 bp
	下游序列	5' GTG TGA TTT CTT CTG TCA CC 3'	

1.3.2.3 执行程序 MHC-I、MHC-IIa、MHC-IIb:94℃变性 4 min,然后进行 94℃变性 30 s—55℃退火 45 s—72℃延伸 30 s 的循环,共循环 30 次,最后 72℃延伸 10 min,保证 PCR 反应均处在指数增长期。

MHC-IIx:94℃变性 4 min,然后进行 94℃变性 30 s—54℃退火 45 s—72℃延伸 30 s 的循环,共循环 30 次,最后 72℃延伸 10 min。

内参照:以 β-actin mRNA 作为内参照,引物为:①上游序列:5'CCT CTA TGC CAA CAC AGT GC 3';②下游序列:5'GTA CTC CTG CTT GCT GAT CC 3'。产物长度为 211 bp。内参照实验条件同上述 RT-PCR 反应条件。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳 制备 2%的琼脂糖凝胶(含 2 μg 溴化乙锭)。取 PCR 反应产物 9 μl,加 1/10 体积的上样缓冲液,混匀后上样。电泳缓冲液为 1×TBE,于 80 V 电泳 30 min。凝胶在凝胶分析与采集系统(AlphaImager TM 2200, Alpha Innotech Corporation,美国)上观测并拍照,观测的激发光波长为 306 nm。

TRIzol 为上海 Sangon 生物工程技术有限公司产品。

RT-PCR 试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品,由宝生物工程(大连)有限公司分装。DNA 标记物购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.4 PCR 产物分析与数据处理 对电泳图像进行图像分析,测定并记录每一条电泳条带的光密度值,取各目的基因的光密度和与之对应的 β-actin 的光密度的比值做统计学分析。采用 SPSS 11.5 统计软件对上述计量资料进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠体重及比目鱼肌重量的变化 对照组与脊髓横断各组术前的平均体重相似,脊髓横断各组体重与对照组相比均明显降低($P < 0.01$)。对照组每周平均增长 5 g,而 ST7 与 ST15 组的体重呈进行性下降,无增长。脊髓横断 3 周后大鼠体重开始增加,ST30 组体重高于 ST15 组($P < 0.05$),与 ST7 组比较无显著性差异($P > 0.05$),但仍明显低于对照组($P < 0.05$)。脊髓横断各组比目鱼肌绝对重量与相对重量均较对照组降低,ST15 与 ST30 组比目鱼肌绝对与相对重量均低于 ST7 组($P < 0.05$),而 ST15 与 ST30 组肌肉绝对与相对重量无显著性差异($P > 0.05$),见表 2。

表 2 对照组与脊髓横断各组大鼠体重与比目鱼肌重量(x±s)

项目	对照组	ST7 组	ST15 组	ST30 组
大鼠体重	268.0±13.6	243±9.3a	241±10.5a	253±8.6a,c
比目鱼肌绝对重量	119.3±7.4	94.5±5.6a	78.7±3.1a,b	80.3±4.0a,b
比目鱼肌相对重量 (mg)/体重(g)	0.445±0.011	0.387±0.013a	0.327±0.007a,b	0.317±0.013a,b
比目鱼肌绝对重量 下降比例		0.206±0.050	0.339±0.039	0.325±0.413

注:a.与对照组比较, $P < 0.05$;b.与 ST7 组比较, $P < 0.05$;c.与 ST30 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 脊髓横断后比目鱼肌 MHC 各亚型 mRNA 表达的变化 正常对照组大鼠比目鱼肌主要表达 MHC-I 与 MHC-IIa mRNA,脊髓横断各组出现 MHC-IIx 与 MHC-IIb mRNA 的表达。脊髓横断后各时间点 MHC-I mRNA 的表达持续下调,各组间有显著性差异($P < 0.05$)。MHC-IIa 与 MHC-IIx mRNA 的表达持续上调,但 MHC-IIa mRNA 表达上调速度较 MHC-IIx mRNA 慢,且 ST15 组的表达量与 ST30 组无显著性差异($P > 0.05$),而 MHC-IIx 有显著性差异($P < 0.05$)。MHC-IIb mRNA 的表达在脊髓横断后维持在低水平,与正常对照组有显著性差异($P < 0.05$),ST15 组与 ST30 组无显著性差异($P > 0.05$),见表 3 与图 1。

表 3 对照组与脊髓横断不同时间点大鼠比目鱼肌 MHC 各亚型 mRNA 的表达(x±s)

MHC 亚型	对照组	ST7 组	ST15 组	ST30 组
MHC-I	1.735±0.343	1.283±0.300a	0.826±0.167a,b,c	0.593±0.074a,b,c
MHC-IIa	0.302±0.090	0.362±0.104a	0.440±0.027a,b	0.470±0.022a,b
MHC-IIx	0.000±0.000	0.356±0.083a	0.706±0.225a,b,c	0.890±0.217a,b,c
MHC-IIb	0.000±0.000	0.037±0.022a	0.065±0.033a,b	0.047±0.044a,b

注:a.与对照组比较, $P < 0.05$;b.与 ST7 组比较, $P < 0.05$;c.与 ST15 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

脊髓横断后神经肌肉电活动与负荷均减少,损伤水平以下的肌肉尤其是慢肌如比目鱼肌发生显著的肌萎缩,表现为肌肉重量与体积减少,肌纤维表型发生由慢向快的转化,使肌纤维的收缩特性发生显著变化。肌纤维表型的转化通过 MHC 各亚型的转化反映^[9,10]。MHC 是重要的收缩蛋白,分子量约 200

kD, 现已发现哺乳动物横纹肌细胞中有 9 种亚型^[11]。成年啮齿类动物如大鼠肢体骨骼肌细胞中 MHC 亚型主要包括 4 种亚型: MHC-I、MHC-IIa、MHC-IIx 和 MHC-IIb, 在一条肌纤维内各亚型均单独表达^[1,12]。当骨骼肌神经肌肉电活动和/或负荷状态发生改变时, MHC 表现出一定的适应性, 即 MHC 亚型发生转化。许多研究者认为, MHC 转化遵循一定的顺序, 即 MHC-I—MHC-IIa—MHC-IIx—MHC-IIb^[13-15]。

干预措施提供理论依据。

总之, 脊髓横断早期能够影响大鼠体重与慢肌比目鱼肌的重量, MHC 亚型发生由慢向快的转化, 表现出对神经肌肉电活动与负荷减少的适应性。

【参考文献】

[1] Talmadge RJ. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms[J]. Muscle Nerve, 2000, 23: 661—679.

[2] Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Persistence of hybrid fibers in rat soleus after spinal cord transection[J]. Anat Rec, 1999, 255: 188—201.

[3] Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Prominence of myosin heavy chain hybrid fibers in soleus muscle of spinal cord-transected rats [J]. J Appl Physiol, 1995, 78: 1256—1265.

[4] Roy RR, Hodgson JA, Lauretz SD, et al. Chronic spinal cord-injured cats: surgical procedures and management[J]. Lab Anim Sci, 1992, 42: 335—343.

[5] Graham SC, Roy RR, Hauschka EO, et al. Effects of periodic weight support on medial gastrocnemius fibers of suspended rats[J]. J Appl Physiol, 1989, 67(3): 945—953.

[6] 孙标, 刘春, 倪鹤鸣, 等. 模拟失重大鼠间断性站立或离心对抗骨骼肌萎缩的效果比较[J]. 中华航空航天医学杂志, 2001, 12(3): 140—144.

[7] Wright C, Haddad F, Qin AX, et al. Analysis of myosin heavy chain mRNA expression by RT-PCR[J]. J Appl Physiol, 1997, 83: 1389—1396.

[8] di Maso NA, Haddad F, Zeng M, et al. Role of denervation in modulating IIB MHC gene expression in response to T(3) plus unloading state[J]. J Appl Physiol, 2000, 88: 682—689.

[9] Talmadge RJ, Roy RR, Bodine-Fowler SC, et al. Adaptations in myosin heavy chain profile in chronically unloaded muscles[J]. Basic Appl Myol, 1995, 5: 117—137.

[10] Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Myosin heavy chain profile of cat soleus following chronic reduced activity or inactivity[J]. Muscle Nerve, 1996, 19: 980—988.

[11] Baldwin KM, Haddad F. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle invited review; Effects of different activity and inactivity paradigmson myosin heavy chain gene expression in striated muscle[J]. J Appl Physiol, 2001, 90(1): 345—357.

[12] Parry DJ. Myosin heavy chain expression and plasticity: role of myoblast diversity[J]. Exerc Sport Sci Rev, 2001, 29(4): 175—179.

[13] Staron RS, Pette D. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle[J]. Histochemistry, 1993, 100: 149—153.

[14] Termin A, Staron RS, Pette D. Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low frequency stimulation of rat fast hind-limb muscles. A single-fiber study[J]. Eur J Biochem, 1989, 86: 749—754.

[15] Talmadge RJ, Roy RR, Caiozzo VJ, et al. Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection[J]. J Appl Physiol, 2002, 93: 1487—1497.

[16] Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Myosin heavy chain isoform mRNA and protein levels after long-term paralysis[J]. Biochem Biophys Res Communi, 2004, 325: 296—301.

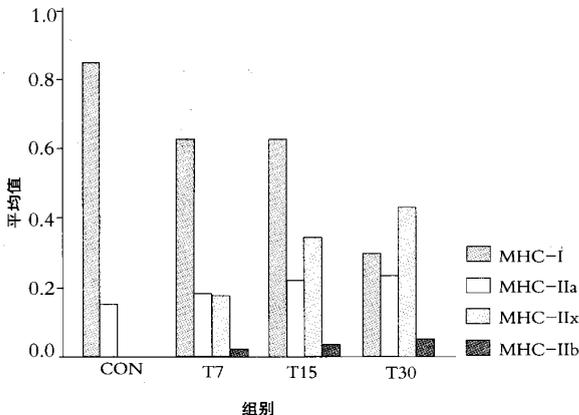


图 1 对照组与脊髓横断各组 MHC 各亚型 mRNA 的表达

3.1 大鼠脊髓横断后体重与比目鱼肌重量的变化 脊髓横断后比目鱼肌重量的变化规律国内尚无文献报道, 本实验结果显示, 正常比目鱼肌的相对重量平均为 0.445 mg/g 体重, 脊髓横断 7 d、15 d 与 30 d 后相对重量分别为 0.393、0.327、0.317 mg/g 体重, 与正常对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), 但 ST15 组的重量与 ST30 组无显著性差异 ($P > 0.05$), 与 Talmadge 等^[2,15]的研究结果相似, 说明比目鱼肌重量的变化主要发生在脊髓横断早期, 原因可能与萎缩早期肌内蛋白合成降低有关。此外, 脊髓损伤后早期机体的应激、体内激素水平的变化、胃肠道功能降低导致摄入减少等也是造成体重下降的因素。

3.2 大鼠脊髓横断后 MHC mRNA 的变化 本实验采用半定量 RT-PCR 的方法检测 MHC 各亚型 mRNA 的表达。对照组主要表达 MHC-I 与 MHC-IIa, 比例分别为 85.3% 与 14.7%。ST7、ST15、ST30 组的 MHC-I mRNA 表达分别下调至正常水平的 62.8%、40% 和 29.3%, 提示脊髓横断后早期即引起 MHC-I mRNA 表达持续性下调。MHC-IIa mRNA 的表达在 ST7、ST15 和 ST30 组分别上调至正常水平的 17.8%、21.8% 和 23.2%, 上调幅度较小。MHC-IIx 与 MHC-IIb mRNA 在正常对照组检测不到其表达, 但 ST7 组可检测到两者的表达; MHC-IIx 的表达在脊髓横断后明显上调, 各时间点的上调幅度均大于 MHC-IIa, 与文献报道一致^[2,10,16]。

MHC-I 与 MHC-IIx mRNA 表达变化速度均较 MHC-IIa mRNA 快, 提示 MHC-I 与 MHC-IIx 的表达对神经肌肉活动或机械负荷的变化敏感, 快亚型 MHC-IIx 与 MHC-IIa 的表达可能存在不同的细胞与分子机制。MHC-IIb mRNA 的表达在脊髓横断后呈现为低水平表达, 提示神经肌肉活动减少不是引起 MHC-IIb 表达下调的主要刺激因素。今后应进一步延长观察时间, 对骨骼肌 MHC 亚型转化的时间框架与程度做进一步深入的研究, 以明确 MHC mRNA 表达的变化规律, 为早期采取

(收稿日期: 2006-02-14)