

基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨推法对骨骼肌过劳性损伤大鼠的影响及作用机制

段苗苗, 黄博, 阮磊, 穆盼盼, 陈亦民, 彭亮*

湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208

*通信作者: 彭亮, E-mail: pengliangleo@foxmail.com

收稿日期: 2024-04-25; 接受日期: 2024-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(82174521)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2024.06013

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 **目的** 观察推法对骨骼肌过劳性损伤大鼠修复再生的影响, 基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨其作用机制。**方法** 选择42只SD大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组和干预组, 每组14只。除空白组外, 模型组、干预组参考Armstrong离心运动方案训练建立大鼠骨骼肌过劳性损伤模型。空白组、模型组右后肢腓肠肌及相邻肌肉部位涂抹医用级凡士林, 但不给予推法干预; 干预组右后肢腓肠肌部位进行推法干预(压力约为2 N、频率80次/min, 3 min/次, 每天上午、下午各干预1次, 共持续3 d)。分别于造模结束后24 h和干预结束后24 h采用平衡木测试评估大鼠骨骼肌损伤后的运动功能; 苏木精-伊红染色法(HE)观察腓肠肌的病理学改变; 采用EM-1400型透射电子显微镜观察骨骼肌纤维超微结构; 采用荧光定量PCR仪检测肌源性调节因子成肌分化抗原(MyoD)、肌肉生成素(MyoG)和配对盒转录基因7(Pax7) mRNA转录水平; 采用Western blot法检测MyoD、MyoG、Pax7、Wnt3a、Axin2和 β -catenin蛋白表达水平。**结果** ①运动功能: 与空白组比较, 模型组、干预组平衡木通过时间、滑爪次数均明显增加, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 干预组干预后平衡木通过时间、滑爪次数均明显减少, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。②腓肠肌组织病理学改变: 模型组腓肠肌内大量的肌细胞内可见裂纹, 肌原纤维断裂; 与模型组比较, 干预组腓肠肌组织损伤程度减轻, 可见肌纤维形态规则, 排列整齐。③腓肠肌组织超微结构改变: 模型组局部肌原纤维束断裂、溶解, 少量Z线结构溶解、模糊; 与模型组比较, 干预组腓肠肌细胞轻微水肿, 肌原纤维束结构清晰, 部分肌原纤维束断裂, Z线结构清晰、排列较整齐。④腓肠肌组织MyoD、MyoG、Pax7 mRNA转录水平: 与空白组比较, 模型组和干预组MyoD、MyoG、Pax7 mRNA转录水平均明显更高($P < 0.05$); 与模型组比较, 干预组MyoD、MyoG、Pax7 mRNA转录水平均明显更高($P < 0.05$)。⑤腓肠肌组织MyoD、MyoG、Pax7蛋白表达水平: 与空白组比较, 模型组和干预组的MyoD、MyoG、Pax7蛋白表达水平均明显更高($P < 0.05$); 与模型组比较, 干预组MyoD、MyoG、Pax7蛋白表达水平均明显更高($P < 0.05$)。⑥腓肠肌组织Wnt3a、Axin2、 β -catenin蛋白表达水平: 与空白组比较, 模型组和干预组Wnt3a、Axin2、 β -catenin蛋白表达水平均明显更高($P < 0.05$); 与模型组比较, 干预组Wnt3a、Axin2、 β -catenin蛋白表达水平明显更高($P < 0.05$)。**结论** 推法可改善过劳性损伤模型大鼠腓肠肌损伤和运动功能, 其机制可能与激活Wnt/ β -catenin信号通路有关。

关键词 过劳性损伤; 骨骼肌; 修复再生; 运动功能; 推法; Wnt/ β -catenin信号通路

在竞技运动中, 为提高肌肉力量与耐力, 经常采用高负荷(离心)运动训练, 这会导致骨骼肌过劳

性损伤, 表现为肌肉功能减退、肌肉迟发疼痛, 给患者日常生活和工作带来不便^[1]。推拿作为我国传统

引用格式: 段苗苗, 黄博, 阮磊, 等. 基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨推法对骨骼肌过劳性损伤大鼠的影响及作用机制[J]. 康复学报, 2024, 34(6): 617-624.

DUAN M M, HUANG B, RUAN L, et al. Effect and mechanism of massage manipulation on rats with skeletal muscle overuse injury based on Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Rehabil Med, 2024, 34(6): 617-624.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2024.06013

©《康复学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 4.0 协议

© Rehabilitation Medicine, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

特色疗法,具有减轻损伤骨骼肌炎症反应、促进线粒体修复^[2]、改善迟发型肌肉酸痛^[3]、减轻肌力损失^[4]等作用,但其具体机制仍未达成共识。

骨骼肌损伤修复的过程中,骨骼肌卫星细胞(muscle satellite cells, MSC)作为再生修复的主体细胞,受到多种修复分子标志物的调控,包括配对盒转录因子7(paired box 7, Pax7)及肌源性调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs)[如肌源性因子5(myogenic factor 5, Myf5)、成肌分化抗原(myogenic differentiation, MyoD)、肌肉生成素(myogenin, MyoG)]^[5]。Wnt/ β -catenin信号通路可调控多个肌源性因子表达,进而调控多核肌管形成,以促进骨骼肌损伤修复^[6]。当敲除Wnt通路关键因子时,可使小鼠出现严重的组织损伤和肌肉发育不良,最终导致死亡^[7]。但推拿手法中的推法是否能通过Wnt/ β -catenin信号通路促进骨骼肌过劳性损伤后的修复尚不清楚。本研究基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨推法对骨骼肌过劳性损伤大鼠的影响及其作用机制,以期推法干预骨骼肌过劳性损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择SPF级健康成年SD雄性大鼠42只,7~8周龄,体质量220~250 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004]提供,饲养在湖南中医药大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009]。本研究经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批通过(审批号:SLBH-202304130007)。

1.2 主要实验仪器和试剂

1.2.1 主要实验仪器 小动物实验跑步机(北京众实迪创科技发展有限责任公司,型号:ZS-PT-III);自制实验动物按法仪(自制,专利号:ZL202320894776.7);智能推拿手法参数测定系统(上海中宏科教设备有限公司,型号:ZTC-II);电子节拍器(杭州艺钛乐器有限公司,型号:AM-705);宠物脱毛剃毛器(奥克斯集团,型号:AUX-C5);透射电子显微镜[日本科学仪器(北京)有限公司,型号:HT7800];荧光定量PCR仪(赛默飞世尔科技有限公司,型号:StepOne Software);电泳仪和凝胶成像仪均购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope6100)。

1.2.2 主要实验试剂 蛋白提取液、蛋白酶抑制

剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自北京百奥思科生物技术有限公司;蛋白二抗(北京百奥思科生物技术有限公司,批号:912565);Actin抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:AF7081);Wnt3a抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:Bs-1700R);Axin2抗体、Pax7抗体(成都正能生物技术有限公司,批号:R23574、R381466); β -catenin抗体、MyoD抗体、MyoG抗体(上海贝博生物科技有限公司,批号:A23898、A18000、A18004);医用级凡士林(英科医疗科技股份有限公司,批号:ACQ038-2023);戊巴比妥钠(德国Merck KGaA,批号:3761)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组 实验大鼠按照随机数字表法分为空白组、模型组、干预组,每组14只。

1.3.2 动物模型制备 模型组和干预组均参照Armstrong离心运动方案^[8],使用小动物实验跑步机,采取下坡跑离心运动,制作骨骼肌过劳性损伤模型。先让大鼠适应性运动1周。第1~2天: 0° , 10 min, 16 m/min;第3~4天: -5° , 15 min, 16 m/min;第5天: -10° , 30 min, 16 m/min;第6~7天休息。适应性运动结束后开始造模,模型组和干预组大鼠进行为期4周的离心运动(6 d/周)。第1周: -16° , 60 min, 16 m/min;第2周: -16° , 60 min, 20 m/min;第3~4周: -16° , 90 min, 20 m/min。造模结束24 h后进行平衡木测试,观察测试结果,大鼠通过平衡木时间延长、滑爪次数增加,表明造模成功^[9-11]。造模未成功的大鼠后续予以补充。

1.3.3 干预方法

1.3.3.1 空白组和模型组 造模成功后,用黑色透气棉布对大鼠进行包裹,露出右后肢腓肠肌及相邻肌肉部位,进行剃毛处理,涂抹医用级凡士林,但不给予推法干预。

1.3.3.2 干预组 在模型组基础上,对干预组大鼠右后肢腓肠肌部位进行推法干预。为解决动物实验中徒手推法难以规范化和量化的问题,使用本团队设计的实验动物按法仪(专利号:ZL202320894776.7),并配合电子节拍器控制操作时间及频率。干预前,使用按法仪在ZTC-II智能推拿手法参数测定系统测试3次以上,以保证操作规范。推法是以适当的力量着力于施术体表进行单方向的直线或弧线推动;而按法在着力于施术部位后,逐渐用力下压停留片刻后放松。本研究使用自制实验动物按法仪将硅胶接触头置于大鼠右后肢腓肠肌部位,并通过按法仪力度定位控制下压力度,随后朝大鼠右后

肢腓肠肌近心端方向,施以单方向的直线推动。推拿下压力约为 2 N ^[12-13]。为达到深度按摩效果,频率 $80\text{ 次}/\text{min}$ ^[14]。3 min/次,每天上午、下午各干预 1 次,共持续 3 d。

1.4 观察指标

1.4.1 大鼠运动功能 分别于造模结束后 24 h 和干预结束后 24 h 采用平衡木测试评估大鼠骨骼肌损伤后的运动功能。将木梁(2 cm×120 cm)放置在离地面 120 cm 高度,记录大鼠从木梁一端通过木梁后到达暗箱所需时间(通过平衡木时间)以及滑爪次数,记录 3 次测试结果的平均值。在测试前 1 d 进行 3 次适应性实验,让大鼠熟悉木梁和暗箱,每次实验后用 75% 酒精清洗木梁和暗箱。

1.4.2 腓肠肌组织病理学改变 末次平衡木测试结束,每组随机抽取 3 只大鼠腹腔内注射 2% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)深度麻醉。冰上迅速剥离大鼠右后肢腓肠肌组织,将腓肠肌组织浸泡于 4% 多聚甲醛中过夜,常规石蜡包埋,并制成厚度为 $5\ \mu\text{m}$ 切片,60 °C 烤片过夜,再通过二甲苯和乙醇溶液脱蜡和脱水,依次行苏木精染色 5 min、伊红染色 3 min,封片后拍照分析。苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)观察腓肠肌的病理学改变。

1.4.3 腓肠肌组织超微结构改变 末次平衡木测试结束,每组随机抽取 3 只大鼠按“1.4.2”项步骤取右后肢腓肠肌组织,经戊二醛固定,四氧化锇再固定,丙酮溶液脱水,环氧树脂包埋后,制备超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅双染色。采用 EM-1400 型透射电子显微镜观察骨骼肌纤维超微结构。

1.4.4 腓肠肌 MyoD、MyoG、Pax7 mRNA 转录水平 末次平衡木测试结束,每组随机抽取 8 只大鼠按“1.4.2”项步骤取右后肢腓肠肌组织,分为 2 份,将腓肠肌组织存入 -80 °C 冰箱中。第 1 份腓肠肌组织加入液氮后研磨粉碎,加入 TRIzol 1 mL,依次采用氯仿、异丙醇、75% 乙醇经反复离心分离提纯样本总 RNA。经超微量紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测浓度和纯度后,将 RNA 逆转录合成 cDNA。采用荧光定量 PCR 仪检测 MyoD、MyoG、Pax7 mRNA 转录水平。引物序列见表 1。

1.4.5 腓肠肌 MyoD、MyoG、Pax7、Wnt3a、Axin2 和 β -catenin 蛋白表达水平 第 2 份腓肠肌组织加液氮进行匀浆后,加入裂解液,4 °C, 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,将分离后的蛋白条带通过转移电泳方式转印至 NC 膜,65 V 转膜 2 h;室温、摇床封闭 1 h;一抗[MyoG 抗体、Pax7 抗体、 β -catenin 抗体、Wnt3a 抗体、Axin2 抗体、 β -catenin 抗体和 MyoD 抗体(稀释比例均为 1:1 000)]4 °C 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 2 种液体,均匀铺在 NC 膜表面,放入化学发光成像系统成像。

表 1 目标基因引物序列

Table 1 Primer sequence of target gene

基因名称	引物序列
β -actin	正向:CTGAACGTGAAATTGTCCGAGA
	反向:TTGCCAATGGTGATGACCTG
MyoD	正向:CCAGGACACGACTGCTTTCT
	反向:CCGGAACCCCAACAGTACAA
MyoG	正向:CAGCCCAGCGAGGGAATTTA
	反向:AGAAGCTCCTGAGTTTGCC
Pax7	正向:GAGAACCCCGGGATGTTTCAG
	反向:ATCGAACTCACTGAGGGCAC

1.5 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。计量资料服从正态分布以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。数据不服从正态分布采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠运动功能比较

与空白组比较,模型组、干预组干预后平衡木通过时间、滑爪次数均明显增加,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,干预组干预后通过平衡木时间、滑爪次数均明显减少,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 3 组腓肠肌组织病理学改变

空白组腓肠肌组织形态和结构未见异常;模型组腓肠肌内大量的肌细胞内可见裂纹,肌原纤维断裂(黑色箭头所示),肌细胞胞核数量较多(黄色箭头所示),部分炎性细胞浸润;与模型组比较,干预组腓肠肌组织损伤程度减轻,可见肌纤维形态规则,排列整齐,肌细胞胞浆丰富,着色均匀,细胞核位于细胞周边近肌膜处,少量炎性细胞浸润,未见明显的肌纤维坏死。见图 1。

表2 3组运动功能比较[M(P₂₅,P₇₅)]

Table2 Comparison of motor function in the three groups [M(P₂₅,P₇₅)]

组别	n	通过时间/s		滑爪次数/次	
		干预前	干预后	干预前	干预后
空白组	14	8.00(6.00,8.25)	8.00(6.00,9.00)	1.00(0.00,1.25)	1.00(0.00,1.00)
模型组	14	14.00(11.75,16.50) ¹⁾	12.00(9.75,14.50) ¹⁾	4.00(3.00,4.25) ¹⁾	3.00(2.00,4.00) ¹⁾
干预组	14	13.50(11.00,15.25) ¹⁾	9.00(7.00,10.50) ¹⁾²⁾	3.00(3.00,5.00) ¹⁾	2.00(1.00,3.00) ¹⁾²⁾

注:与空白组比较,1) P<0.05;与模型组比较,2) P<0.05。

Note: Compared with the blank group, 1) P<0.05; compared with the model group, 2) P<0.05.

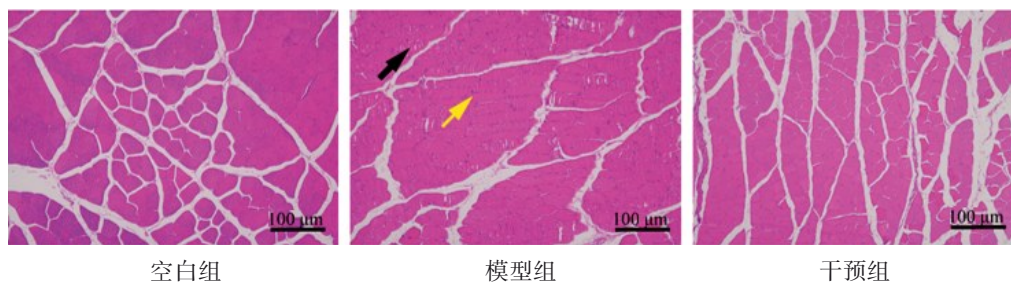


图1 3组腓肠肌病理学形态HE染色图(×100)

Figure 1 HE staining diagram of pathological morphology of gastrocnemius muscle in three groups (×100)

2.3 3组腓肠肌组织超微结构改变

空白组腓肠肌组织超微结构未见异常。模型组腓肠肌细胞整体轻度水肿,基质变淡,基质存在局部低电子水肿区域,局部肌原纤维束断裂、溶解(黑色箭头所示),少量Z线结构溶解、模糊(红色箭头所示);H带结构较清晰;线粒体部分呈轻度肿胀,基质分布不均,嵴减少、排列紊乱,膜结构局部模

糊,个别损伤严重者呈中度肿胀,基质基本溶解,嵴大量消失。与模型组比较,干预组腓肠肌细胞轻度水肿,肌原纤维束结构清晰,部分肌原纤维束断裂,Z线结构清晰、排列较整齐;H带结构清晰;线粒体数量少,排列分布肌原纤维束间,呈轻度肿胀,嵴排列紊乱。见图2。

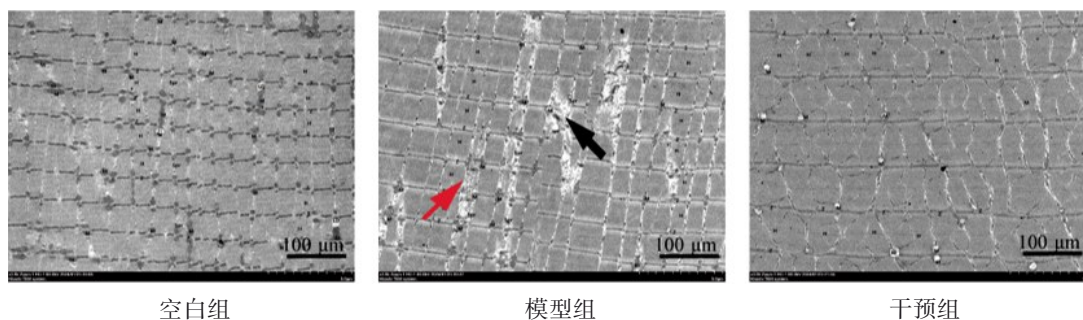


图2 3组大鼠腓肠肌组织超微结构电镜图(×100)

Figure 2 Ultramicrography of gastrocnemius tissue in three groups (×100)

2.4 3组腓肠肌组织 MyoD、MyoG、Pax7 mRNA 转录水平比较

与空白组比较,模型组和干预组 MyoD、MyoG 和 Pax7 mRNA 转录水平均明显更高(P<0.05);与模型组比较,干预组 MyoD、MyoG、Pax7 mRNA 转录水平均明显更高(P<0.05)。见表3。

2.5 3组腓肠肌组织 MyoD、MyoG、Pax7 蛋白表达水平比较

与空白组比较,模型组和干预组 MyoD、MyoG、Pax7 蛋白表达水均明显更高(P<0.05);与模型组比较,干预组 MyoD、MyoG、Pax7 蛋白表达水平均明显更高(P<0.05)。见表4、图3。

表3 3组 MyoD、MyoG、Pax7 mRNA 转录水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of mRNA transcription levels of MyoD, MyoG and Pax7 in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MyoD mRNA	MyoG mRNA	Pax7 mRNA
空白组	8	0.98 \pm 0.09	0.99 \pm 0.11	1.03 \pm 0.12
模型组	8	1.63 \pm 0.15 ¹⁾	1.62 \pm 0.11 ¹⁾	1.47 \pm 0.10 ¹⁾
干预组	8	2.11 \pm 0.17 ¹⁾²⁾	2.05 \pm 0.15 ¹⁾²⁾	1.64 \pm 0.11 ¹⁾²⁾

注:与空白组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。
 Note: Compared with the blank group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$.

表4 3组 MyoD、MyoG、Pax7 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of protein expression levels of MyoD, MyoG and Pax7 in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MyoD	MyoG	Pax7
空白组	8	0.41 \pm 0.06	0.45 \pm 0.08	0.46 \pm 0.07
模型组	8	0.51 \pm 0.08 ¹⁾	0.54 \pm 0.05 ¹⁾	0.51 \pm 0.07 ¹⁾
干预组	8	0.61 \pm 0.08 ¹⁾²⁾	0.67 \pm 0.07 ¹⁾²⁾	0.63 \pm 0.07 ¹⁾²⁾

注:与空白组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。
 Note: Compared with the blank group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$.

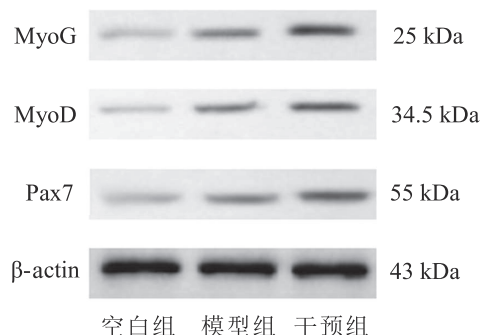


图3 3组 MyoD、MyoG、Pax7 蛋白条带图
Figure 3 Protein band figure of MyoD, MyoG and Pax7 in three groups

2.6 3组腓肠肌组织 Wnt3a、Axin2、 β -catenin 蛋白表达水平比较

与空白组比较,模型组和干预组 Wnt3a、Axin2、 β -catenin 蛋白表达水平均明显更高($P<0.05$);与模型组比较,干预组 Wnt3a、Axin2、 β -catenin 蛋白表达水平均明显更高($P<0.05$)。见表5、图4。

表5 3组大鼠 Wnt3a、Axin2、 β -catenin 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of protein expression levels of Wnt3a, Axin2 and β -catenin in three groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Wnt3a	Axin2	β -catenin
空白组	8	0.43 \pm 0.06	0.34 \pm 0.06	0.45 \pm 0.07
模型组	8	0.53 \pm 0.08 ¹⁾	0.44 \pm 0.07 ¹⁾	0.57 \pm 0.05 ¹⁾
干预组	8	0.62 \pm 0.05 ¹⁾²⁾	0.55 \pm 0.04 ¹⁾²⁾	0.65 \pm 0.03 ¹⁾²⁾

注:与空白组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。
 Note: Compared with the blank group, 1) $P<0.05$; compared with the model group, 2) $P<0.05$.

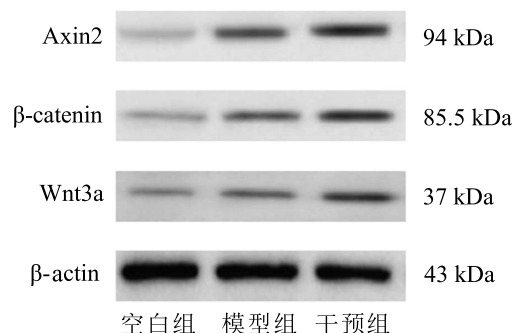


图4 3组 Wnt3a、Axin2 和 β -catenin 蛋白条带图
Figure 4 Protein band figure of Wnt3a, Axin2 and β -catenin in three groups

3 讨论

3.1 推法可改善大鼠骨骼肌过劳性损伤和运动功能

本研究结果显示,与模型组比较,干预组大鼠肌细胞病理情况肌纤维形态规则,未见明显的肌纤维坏死,且电镜结果显示腓肠肌超微结构有明显改善,提示推法可促进长期离心运动所导致的骨骼肌过劳性损伤的修复。与模型组比较,干预组大鼠平衡木通过时间、滑爪次数均明显减少,这提示推法可改善大鼠的运动功能。可能与以下原因有关:腓肠肌主要由 II 型肌纤维组成^[15],属于快肌,在离心运动中易于损伤^[16]。离心运动易造成骨骼肌超微结构变化,导致骨骼肌微损伤,在应对长期的离心运动过程中,微创伤的组织恢复慢,引起机体组织

重复性微创伤累积,从而介导了骨骼肌过劳性损伤发生^[17]。推法具有改善肌营养、促进组织修复、消除水肿、加速血液循环的作用,可有效改善骨骼肌过劳性损伤。这与郭翔和陈美仁^[18]研究结果相似。

3.2 推法改善大鼠骨骼肌过劳性损伤和运动功能可能与调节MyoG、Pax7和MyoD表达有关

与模型组比较,干预组大鼠腓肠肌MyoD、MyoG、Pax7 mRNA转录水平均明显升高,提示推法改善大鼠骨骼肌过劳性损伤和运动功能可能与调节MyoG、Pax7和MyoD表达有关。可能与以下因素有关:骨骼肌修复通常依赖于MSC,在肌肉损伤或疾病发生时,MSC被激活进入细胞周期增殖,迁移到受损区域,进入肌源性分化程序,并最终融合形成新的肌纤维^[19]。在骨骼肌损伤修复的过程中,MSC新生肌纤维的形成受多种转录因子调控:Pax7被认为是MSC自我更新和增殖的标志物^[20];MyoG、MyoD是骨骼肌生肌程序的重要调控因子,参与肌肉发育成熟以及骨骼肌损伤修复等进程^[21-22];MyoD在肌细胞增殖和诱导非肌细胞向肌细胞转化方面发挥重要作用^[23];MyoG是肌肉发育晚期的重要调控因子,参与肌管形成与成熟^[24]。具有特定频率、时长和力度的推法可调控MSC状态,调节MyoG、Pax7及MyoD表达,促进损伤骨骼肌再生,抑制骨骼肌萎缩。这与LU等^[25]研究结果相似。

3.3 推法改善大鼠骨骼肌过劳性损伤和运动功能可能与激活Wnt/ β -catenin信号通路有关

本研究结果显示,与空白组比较,模型组Wnt3a、Axin2和 β -catenin蛋白表达水平明显更高,表明Wnt/ β -catenin信号通路已处于被激活状态。与模型组比较,干预组Wnt3a、Axin2和 β -catenin蛋白表达水平明显更高,提示推法改善大鼠骨骼肌过劳性损伤和运动功能可能与激活Wnt/ β -catenin信号通路有关。可能与以下因素有关:Wnt/ β -catenin信号通路可有效调节MSC从增殖状态转为分化状态,促进肌管的融合,加速骨骼肌损伤后修复过程^[26-27]。Wnt配体可通过自分泌或旁分泌的途径选择性与膜上受体相结合,将膜外信号传导至膜内,激活膜内一系列信号传导途径,是Wnt/ β -catenin信号通路的启动因子^[28]。 β -catenin在该信号通路中起中心调控作用,伴随信号通路的激活发生核转移,进而调控下游靶基因的表达^[29]。轴蛋白(Axin)是介于Wnt配体与 β -catenin之间的重要信号传导因子之一。在没有Wnt配体的情况下, β -catenin与Axin、糖原合酶激酶、散乱蛋白、腺瘤息肉蛋白结合形成

复合物,使 β -catenin磷酸化而被泛素化降解^[30]。当Wnt配体出现时, β -catenin将从复合物中释放出来,细胞内游离的 β -catenin水平增加, β -catenin进一步游离到细胞核内。在细胞核内, β -catenin与核内转录因子结合,诱导靶基因(如MRFs、Axin2等)转录^[31-32]。推法干预后,干预组Wnt3a、Axin2、 β -catenin蛋白明显更高,这说明推法可能是通过调控Wnt/ β -catenin信号通路从而改善骨骼肌过劳性损伤和运动功能。

4 小结

推法可改善模型大鼠骨骼肌过劳性损伤和运动功能,可能与激活Wnt/ β -catenin信号通路有关。推法作为一种温和且无创的机械性力刺激,可能涉及多种作用机制,本研究仅基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨推法对骨骼肌过劳性损伤修复的影响与机制,但未增加通路抑制剂组进行验证。下一步研究还需全面考虑多种机制的协同作用,并添加肌电图/肌肉质量检测,以期推法改善骨骼肌过劳性损伤提供理论依据。

参考文献

- [1] 张学林,高晓娟,史冀鹏,等.离心运动引起骨骼肌过度使用损伤机理研究[J].中国运动医学杂志,2012,31(12):1064-1074. ZHANG X L, GAO X J, SHI J P, et al. The mechanism of eccentric exercise-induced skeletal muscle overuse injuries [J]. Chin J Phys Med, 2012, 31(12): 1064-1074.
- [2] VAN PELT D W, LAWRENCE M M, MILLER B F, et al. Massage as a mechanotherapy for skeletal muscle [J]. Exerc Sport Sci Rev, 2021, 49(2): 107-114.
- [3] GUO J M, LI L J, GONG Y X, et al. Massage alleviates delayed onset muscle soreness after strenuous exercise: a systematic review and meta-analysis [J]. Front Physiol, 2017, 8: 747.
- [4] NADERI A, AMINIAN-FAR A, GHOLAMI F, et al. Massage enhances recovery following exercise-induced muscle damage in older adults [J]. Scand J Med Sci Sports, 2021, 31(3): 623-632.
- [5] GIRARDI F, LE GRAND F. Wnt signaling in skeletal muscle development and regeneration [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2018, 153: 157-179.
- [6] ZHANG D H, YIN L Q, LIN Z Z, et al. MiR-136-5p/FZD4 axis is critical for Wnt signaling-mediated myogenesis and skeletal muscle regeneration [J/OL]. J Cell Physiol; 1-17. (2023-05-23) [2024-05-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37218742>.
- [7] VAN AMERONGEN R, BERNIS A. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction [J]. Trends Genet, 2006, 22(12): 678-689.
- [8] LIU Q S, JIN S L, LI L Y, et al. Massage protects skeletal muscle from injury during long-term heavy-duty exercise via integrin β 1 and laminin 2 channels of basement membrane [J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23(1): 266.

- [9] 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.
- [10] PABLOS A, CECA D, JORDA A, et al. Protective effects of foam rolling against inflammation and notexin induced muscle damage in rats [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(1): 71-81.
- [11] 黄博, 阮磊, 王兰兰, 等. 推拿技察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.
- HUANG B, RUAN L, WANG L L, et al. Effects of Tuina rolling manipulation on mechanosensitive ion channel Piezo1 on apoptosis of skeletal muscle injury in model rats [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2023, 43(12): 2249-2255.
- [12] 杨丽秋, 夏惠明, 龙鑫, 等. 名医夏惠明教授平推法干预慢性腰肌损伤兔模型的研究[J]. *云南中医中药杂志*, 2021, 42(7): 76-79.
- YANG L Q, XIA H M, LONG X, et al. Research on professor Xia huiming's flat push method on intervention of the rabbit model of chronic lumbar muscle injury [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*, 2021, 42(7): 76-79.
- [13] 梅荣军, 肖显坤, 李旗, 等. 机械振动推拿对大鼠臂丛神经损伤恢复作用机理研究[J]. *针灸临床杂志*, 2007, 23(12): 33-35.
- MEI R J, XIAO X K, LI Q, et al. Study on the mechanism of mechanical vibration massage on the recovery of brachial plexus injury in rats [J]. *J Clin Acupunct Moxibustion*, 2007, 23(12): 33-35.
- [14] 孙武权, 严隽陶. 推拿手法频率的理论探讨与实验研究[J]. *按摩与导引*, 2002, 18(5): 2-4.
- SUN W Q, YAN J T. Theoretical and experimental study on the frequency of manipulation [J]. *Chin Manip Qi Gong Ther*, 2002, 18(5): 2-4.
- [15] HÄMÄLÄINEN N, PETTE D. The histochemical profiles of fast fiber types II B, II D, and II A in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit [J]. *J Histochem Cytochem*, 1993, 41(5): 733-743.
- [16] SONG H S, NAKAZATO K, NAKAJIMA H. Effect of increased excursion of the ankle on the severity of acute eccentric contraction-induced strain injury in the gastrocnemius: an in vivo rat study [J]. *Am J Sports Med*, 2004, 32(5): 1263-1269.
- [17] 张学林, 史冀鹏, 高晓娟, 等. 针刺对离心运动性骨骼肌过度使用损伤的治疗研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2013, 32(10): 899-909.
- ZHANG X L, SHI J P, GAO X J, et al. A therapeutic study of acupuncture in centrifugal motor overuse injuries of skeletal muscles [J]. *Chin J Phys Med*, 2013, 32(10): 899-909.
- [18] 郭翔, 陈美仁. 推拿法的临床运用探究[J]. *教育教学论坛*, 2020(38): 105-106.
- GUO X, CHEN M R. Research on clinical application of push method [J]. *Educ Teach Forum*, 2020(38): 105-106.
- [19] SOUSA-VICTOR P, GARCÍA-PRAT L, MUÑOZ-CÁNOVES P. Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23: 204-226.
- [20] FANG J, SIA J R, SOTO J, et al. Skeletal muscle regeneration via the chemical induction and expansion of myogenic stem cells *in situ or in vitro* [J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(8): 864-879.
- [21] MURACH K A, FRY C S, DUPONT-VERSTEEG DEN E E, et al. Fusion and beyond: satellite cell contributions to loading-induced skeletal muscle adaptation [J]. *FASEB J*, 2021, 35(10): e21893.
- [22] KACZMAREK A, KACZMAREK M, CIAŁOWICZ M, et al. The role of satellite cells in skeletal muscle regeneration—the effect of exercise and age [J]. *Biology (Basel)*, 2021, 10(10): 1056.
- [23] LI L, CHEN Y, NIE L, et al. MyoD-induced circular RNA CDR1 as promotes myogenic differentiation of skeletal muscle satellite cells [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(8): 807-821.
- [24] ZHANG W W, TONG H L, ZHANG Z H, et al. Transcription factor EGR1 promotes differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by regulating MyoG gene expression [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1): 350-362.
- [25] LU Q W, SU C G, LIU H H, et al. Effect of constant compressive stress induced by imitating Tuina stimulation with various durations on the cell cycle, cellular secretion, apoptosis, and expression of myogenic differentiation and myogenic factor 5 of rat skeletal muscle cells in vitro [J]. *Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan*, 2020, 40(4): 550-561.
- [26] BRACK A S, CONBOY I M, CONBOY M J, et al. A temporal switch from Notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 50-59.
- [27] FIGEAC N, ZAMMIT P S. Coordinated action of Axin1 and Axin2 suppresses β -catenin to regulate muscle stem cell function [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(8): 1652-1665.
- [28] HAYAT R, MANZOOR M, HUSSAIN A. Wnt signaling pathway: a comprehensive review [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(6): 863-877.
- [29] LIU J Q, XIAO Q, XIAO J N, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 3.
- [30] WOSCZYNA M N, KONISHI C T, PEREZ CARBAJAL E E, et al. Mesenchymal stromal cells are required for regeneration and homeostatic maintenance of skeletal muscle [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(7): 2029-2035. e5.
- [31] VON MALTZAHN J, CHANG N C, BENTZINGER C F, et al. Wnt signaling in myogenesis [J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(11): 602-609.
- [32] CISTERNAS P, HENRIQUEZ J P, BRANDAN E, et al. Wnt signaling in skeletal muscle dynamics: myogenesis, neuromuscular synapse and fibrosis [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1): 574-589.

Effect and Mechanism of Massage Manipulation on Rats with Skeletal Muscle Overuse Injury Based on Wnt/ β -catenin Signaling Pathway

DUAN Miaomiao, HUANG Bo, RUAN Lei, MU Panpan, CHEN Yiming, PENG Liang*

Acupuncture and Moxibustion and Rehabilitation College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

*Correspondence: PENG Liang, E-mail: pengliangleo@foxmail.com

ABSTRACT **Objective** To observe the effect and its mechanism of massage manipulation on the repair and regeneration of skeletal muscle overuse injury in rats based on Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** A total of 42 SD rats were randomly divided into blank group, model group and intervention group, with 14 cases in each group. Armstrong centrifugal exercise program was used to establish the rat skeletal muscle overuse injury model in the model group and the intervention group, except for the blank group. Medical vaseline was smeared on the right hindlimb gastrocnemius muscle and adjacent muscles in the blank group and the model group, but no massage manipulation was given. Massage manipulation was given at the right hind gastrocnemius muscle in the intervention group, with the pressure of about 2 N, the frequency of 80 beats per minute, three minutes a time, once in the morning and once in the afternoon, lasting for three days. At 24 h after modeling and 24 h after intervention, the balance beam test was used to assess the motor function of rats with skeletal muscle injury; hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes of the gastrocnemius muscle; an EM-1400 transmission electron microscope was used to observe the ultrastructure of the skeletal muscle fibers; fluorescence PCR was used to detect the myogenic regulatory factors including myogenic differentiation antigen (MyoD), myogenin (MyoG) and paired box gene 7 (Pax7) mRNA transcript levels; Western blot was used to detect MyoD, MyoG, Pax7, Wnt3a, Axin2 and β -catenin protein expression levels. **Results** (1) Motor function: compared with the blank group, the time to pass the balance beam and the number of paw slips in the model group and the intervention group increased significantly, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, the time to pass the balance beam and the number of paw slips in the intervention group decreased significantly after intervention, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). (2) Histopathological changes in gastrocnemius muscle tissue: the model group showed a large number of cracks within the muscle cells and broken myofibrils in the gastrocnemius muscle; compared with the model group, the intervention group had a reduced degree of muscle tissue damage, and the muscle fibers were in regular morphology and arranged in order. (3) Ultrastructural changes in gastrocnemius muscle tissue: the local myofibril bundles in the model group were broken and dissolved, and a small amount of Z-line structure was dissolved and blurred. Compared with the model group, the gastrocnemius muscle cells in the intervention group were slightly edematous; the myofibril bundles showed clear structure; some myofibril bundles were broken, and the Z-line structure was clear and arranged neatly. (4) Transcriptional levels of MyoD, MyoG and Pax7 in gastrocnemius muscle tissue: compared with the blank group, the transcriptional levels of MyoD, MyoG and Pax7 in the model group and the intervention group were significantly higher ($P < 0.05$); compared with the model group, the transcriptional levels of MyoD, MyoG and Pax7 in the intervention group were significantly higher ($P < 0.05$). (5) Protein expression levels of MyoD, MyoG and Pax7 in gastrocnemius muscle tissue: compared with the blank group, protein expression levels of MyoD, MyoG and Pax7 in the model group and the intervention group were significantly higher ($P < 0.05$); compared with the model group, protein expression levels of MyoD, MyoG and Pax7 in the intervention group were significantly higher ($P < 0.05$). (6) Protein expression levels of Wnt3a, Axin2 and β -catenin in gastrocnemius muscle tissues: compared with the blank group, protein expression levels of Wnt3a, Axin2 and β -catenin in the model group and the intervention group were significantly higher ($P < 0.05$); compared with the model group, protein expression levels of Wnt3a, Axin2 and β -catenin in the intervention group were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Massage manipulation can improve the gastrocnemius muscle injury and motor function in rats with skeletal muscle overuse injury, and its mechanism may be related to the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

KEY WORDS overuse injury; skeletal muscle; repair and regeneration; motor function; massage manipulation; Wnt/ β -catenin signaling pathway

DOI:10.3724/SP.J.1329.2024.06013