

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.24.003

类固醇肌萎缩症与上皮钠通道表达的实验研究*

陆幸妍¹,翟玉莹¹,陈鑫¹,刘洋¹,林晓文¹,陈珺¹,杨国柱¹,卢丽¹,李青南²,黄韧^{2△}
(1. 广东药科大学生命科学与生物制药学院/广东省生物技术候选药物研究重点实验室,广州 510006;
2. 广东省实验动物监测所/广东省实验动物重点实验室,广州 510633)

[摘要] **目的** 基于类固醇肌萎缩症(SMA)大鼠模型,分析大鼠骨骼肌萎缩与其上皮钠通道蛋白(ENaC)表达的相关性,探讨 ENaC 在 SMA 发病机制中的可能作用。**方法** 将 32 只 3 个月龄雌性 SD 大鼠分为 4 组分别给药:对照组(C 组)每周 4 次肌肉注射生理盐水;低频给药组(L 组)、中频给药组(M 组)和高频给药(H 组)分别予以每周 2、4、6 次肌肉注射地塞米松(Dex)每次 1.0 mg/kg。给药 4 周停药处死,取腓肠肌称质量,石蜡包埋制片,行苏木精-伊红(HE)染色形态学观察,肌纤维横截面积(FCSA)测量,以及糖皮质激素受体(GR)和 α -ENaC 免疫组织化学检测(IHC)及其相关性分析。**结果** (1)各给药组大鼠体质量和腓肠肌湿质量均较 C 组下降,且有剂量依赖性。(2)各给药组 FCSA 均较 C 组减少,且有剂量依赖性。(3)GR 的 M 和 H 组积分光密度(OD)值较 C 组增高; α -ENaC 的 L、M 和 H 组 OD 值较 C 组增高,且有剂量依赖性;GR 和 α -ENaC 的 OD 值变化呈正相关。**结论** GC 诱导骨骼肌组织 ENaC 表达增高,可能与 SMA 的肌萎缩病变相关。

[关键词] 地塞米松;类固醇性肌萎缩;受体,糖皮质激素; α -上皮钠通道蛋白;免疫组织化学

[中图分类号] R337;R685 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)24-3320-03

The study of the relationship between epithelial sodium channel expression and glucocorticoid-induced muscle atrophy*

Lu Xingyan¹, Zhai Yuying¹, Chen Xin¹, Liu Yang¹, Lin Xiaowen¹,
Chen Jun¹, Yang Guozhu¹, Lu Li¹, Li Qingnan², Huang Ren^{2△}

(1. School of Life Science and Biopharmacy, Guangdong Pharmaceutical University/ Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology Candidate Drug Research, Guangzhou, Guangdong 510006, China;
2. Guangdong Provincial Laboratory Animal Monitoring Institute/ Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal, Guangzhou, Guangdong 510633, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the correlation between epithelial sodium channel (ENaC) protein expression and skeletal muscle atrophy on the base of steroids muscle atrophy (SMA) SD rat model, and to explore the possible effect of ENaC in the pathogenesis of SMA. **Methods** Thirty-two female SD rats aged 3 months were randomly divided into four groups: normal control group (C group, 0.9% NaCl, 4 times a week), treatment groups including low frequency group (L group), medium frequency group (M group) and high frequency group (H group). Dexamethasone (Dex) of 1 mg/kg was injected into the muscle, and the frequency of administration was, in order, 2 times, 4 times, 6 times a week. After 4 weeks, the rats were executed. The gastrocnemius were got for being weighed, being paraffin-embedded, HE staining, and morphological observed. FCSA was tested. α -ENaC and glucocorticoid receptor (GR) immunohistochemical were analyzed. **Results** (1) The rat body weight and gastrocnemius wet weight decreased when compared to C group and between them there was a dose-dependent relationship. (2) Compared with C group, FCSA of treatment groups rats decreased, and between them there were dose dependent. (3) α -ENaC immunohistochemical analysis of gastrocnemius showed that, compared with C group, the OD values of L group, M group and H group rised. There was a dose-dependent relationship. GR immunohistochemical analysis showed that compared with C group, the OD values of M group and H group rised. The OD value change of α -ENaC and GR were positively correlated. **Conclusion** Increased expression of ENaC in skeletal muscle induced by GC, may be associated with steroid myopathy.

[Key words] Dexamethasone; steroids muscular atrophy; receptors, glucocorticoid; α -epithelial sodium channel protein; immunohistochemistry

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)具有抗炎、抗过敏、抗休克等多种药理作用,临床上应用广泛。患者往往需要短期大量、长期甚至终生使用 GC,其严重不良反应之一是诱发骨和骨骼肌损伤。骨骼肌损伤以类固醇肌病(steroid myopathy, SM)最为常见,其主要临床表现为肌无力和肌萎缩。氟化类固醇激素制剂[如地塞米松(Dex)]比非氟化制剂(如泼尼松龙)

更易诱导 SM^[1]。SM 分急性和慢性两种类型,慢性 SM 也称类固醇肌萎缩症(steroid muscular atrophy, SMA)。本文前期研究发现:以 Dex 诱发大鼠糖皮质激素性骨质疏松模型,其骨骼肌组织萎缩性病理特征明显,且免疫组织化学法(IHC)检测结果显示上皮钠通道蛋白(ENaC)表达增加。ENaC 是细胞膜上非电压依赖性钠离子(Na⁺)通道蛋白,介导 Na⁺单向内流从

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30971172);广东省科技计划项目(2013B060300022);广东省实验动物重点实验室开放课题(2010-03)。作者简介:陆幸妍(1963—),本科,副教授,主要从事骨和骨骼肌代谢性疾病分子机制及药物靶点发现的研究。△ 通讯作者, Tel: (020) 84106801; E-mail: labking@sohu.com。

而维持离子代谢平衡。骨骼肌肌膜内外 Na^+ 变化是影响动作电位传递的关键机制,且主导骨骼肌“兴奋-收缩耦联”的产生。据此推测,骨骼肌 ENaC 表达的变化可能与肌萎缩相关。本研究利用大鼠 SMA 模型探讨两者的相关性,为 SM 机制研究和药物靶标发现提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 3 个月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 32 只,体质量 $(200\pm20)\text{g}$ [广州中医药大学实验动物中心,合格证号:syxk(粤)2008-0085]。适应性喂养 1 周后,分为 4 组,如下给药:对照组(C 组)肌内注射生理盐水 1.0 mL/kg ,每周 4 次;低频给药组(L 组)、中频给药组(M 组)和高频给药组(H 组)分别每周 2、4、6 次肌内注射 Dex 和磷酸钠注射液(广州白云山天心制药股份有限公司, $1\text{ mL}:1\text{ mg}$) 1.0 mg/kg 。连续给药 4 周,停药次日按动物实验规范麻醉、处死,取腓肠肌称质量。

1.2 方法 取大鼠左侧腓肠肌,经多聚甲醛固定,常规石蜡包埋及切片,用于以下检测。

1.2.1 腓肠肌切片形态学观察和 FCSA 测量 腓肠肌切片苏木精-伊红(HE)染色后,光镜下观察腓肠肌组织形态变化,并分别自 100 倍镜下随机选取 100 个肌纤维,用 IPP 6.0 图像分析系统测量骨骼肌纤维横截面积(FCSA)[单位:PPI(pixels

per inch)],计算各组肌纤维 FCSA 平均值。
1.2.2 腓肠肌切片 IHC 检测糖皮质激素受体(GR)和 α -ENaC 的表达 以光镜下可视棕黄色颗粒为 IHC 阳性反应。在 400 倍下随机选取 15 个视野,用 Bioquant-Osteo 图像分析系统采图,以 IPP 6.0 图像分析系统进行光密度扫描获取阳性反应区域积分光密度值(IOD)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

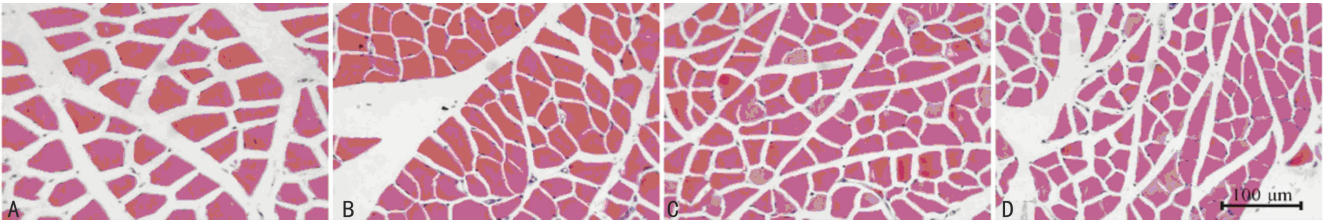
2.1 各组大鼠体质量变化 C 组大鼠随生长时间延长而体质量增加,显示增加状态无异常。与 C 组比较,H 组给药 1 周体质量即明显下降($P<0.01$);L、M 组自 2 周起明显下降,且有剂量依赖性($P<0.01,P<0.05$),见表 1。

2.2 各组大鼠腓肠肌湿质量的变化 C、L、M、H 组腓肠肌湿质量分别为 (1.59 ± 0.04) 、 (1.40 ± 0.08) 、 (1.29 ± 0.13) 、 $(1.17\pm0.04)\text{g}$ 。与 C 组比较,L、M 和 H 组腓肠肌湿质量依序下降,且差异有统计学意义($P<0.01,P<0.05$),且有剂量依赖性。

表 1 各组大鼠不同时间体质量比较($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周
C 组	241.0 $\pm$ 8.5	240.4 $\pm$ 8.9	249.8 $\pm$ 9.4	252.9 $\pm$ 8.6	252.1 $\pm$ 10.5
L 组	241.5 $\pm$ 6.6	236.6 $\pm$ 9.5	232.9 $\pm$ 12.5 ^a	230.0 $\pm$ 16.2 ^a	233.2 $\pm$ 16.4 ^a
M 组	242.5 $\pm$ 9.4	232.4 $\pm$ 9.7	223.4 $\pm$ 15.2 ^{ab}	217.4 $\pm$ 13.9 ^{ab}	207.8 $\pm$ 14.5 ^{ab}
H 组	241.9 $\pm$ 8.7	224.9 $\pm$ 8.1 ^{abc}	217.9 $\pm$ 12.2 ^{abc}	211.6 $\pm$ 15.7 ^{ac}	199.0 $\pm$ 12.0 ^{ac}

^a: $P<0.01$,与 C 组比较;^b: $P<0.01$,与 L 组比较;^c: $P<0.05$,与 M 组比较。



A:C 组;B:L 组;C:M 组;D:H 组。

图 1 腓肠肌的形态学观察(光镜,×100)

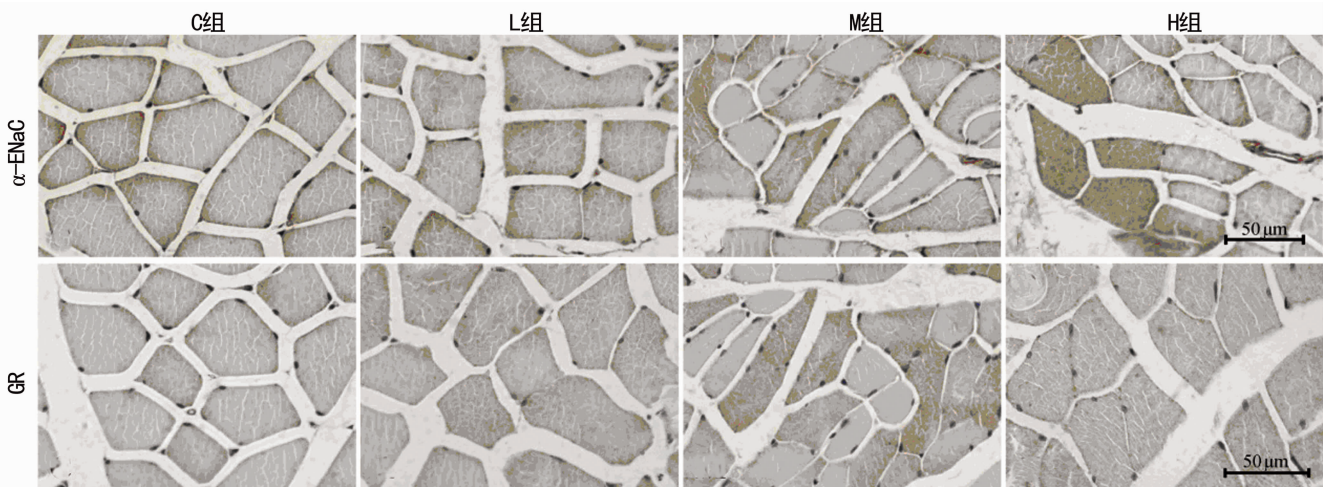


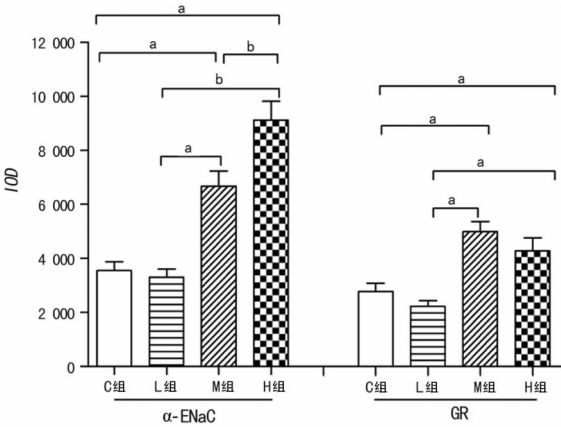
图 2 α -ENaC 和 GR 的 IHC 检测及形态学观察(光镜,×400)

2.3 各组大鼠腓肠肌病理组织学的变化

2.3.1 形态学观察 光镜下观察可见,与 C 组比较,L、M 和 H 组肌纤维大小不一且有不同程度的萎缩性病变征,即肌纤维间隙变窄、部分纤维呈“小角化”改变;未见明显炎症细胞浸润和肌纤维坏死及再生,见图 1。

2.3.2 FCSA 的变化 C、L、M、H 组腓肠肌 FCSA 测量值(PPI)分别为 1 303.83±32.22、936.32±14.75、768.82±18.56 和 777.40±17.80;L、M 和 H 组的肌纤维横截面积均较 C 组明显减少($P<0.01$),L、M 组有剂量依赖性,但 M 与 H 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3.3 α -ENaC 和 GR 的 IHC 检测及分析 α -ENaC 的 IHC 分析显示:各组肌纤维均见 α -ENaC 的棕黄色阳性反应颗粒。IOD 值分析显示,L 组与 C 组比较差异无统计学意义($P>0.05$);M、H 组与 C 组比较明显增高,且 H 高于 M 组,呈剂量依赖性。GR 的 IHC 分析显示:各组肌纤维均见 GR 的棕黄色阳性反应颗粒。IOD 值分析显示,L 组与 C 组比较差异无统计学意义($P>0.05$);M、H 组与 C 组比较明显增高,但 M 与 H 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2、3。



a: $P<0.01$; b: $P<0.05$ 。

图 3 α -ENaC 和 GR 的 IOD 值比较

2.3.4 GR 和 α -ENaC 在腓肠肌中表达的相关性分析 GR 和 α -ENaC 的 IOD 值相关性分析显示,C、L、M 和 H 组腓肠肌的 α -ENaC 与 GR 的表达呈正相关($r=0.176, P<0.01$)。

3 讨 论

3.1 SMA 大鼠模型的建立 SM 分为急性和慢性两种类型。急性 SM 一般出现在用药后 5~7 d 内,与激素用量及持续时间无直接关系,与个体易感性差异有关,其病理表现为大量肌纤维坏死、再生和吞噬现象及肌纤维萎缩,累及 I、II 型肌纤维。慢性 SM 又称为 SMA,可在用药 3~4 周后发生,与激素用量和持续时间有关^[1],主要病变为选择性 II 型肌纤维萎缩,无明显的肌坏死和再生。李建萍等^[2]用 Dex 5 mg/kg 腹腔注射 3 d 建立 SD 大鼠急性 SM 模型,发现肌萎缩病变程度随着注射剂量的增加或者用药时间的延长而逐渐加重。本文以不同给药频率肌内注射 Dex 4 周。结果显示,随给药时间延长及频率增加,大鼠体质量和腓肠肌湿重下降呈剂量依赖性,与 SMA 肌萎缩的体征相符。同时,以肌内注射 Dex 每次 1.0 mg/kg,每周 4 次,可见腓肠肌纤维呈现 SMA 典型的萎缩性病理征。建模过程符合疾病动物模型制作原则^[3]。

3.2 SMA 模型大鼠腓肠肌 GR 和 α -ENaC 的表达及其相关性分析 IHC 结果显示,随着 Dex 给药频率增加,腓肠肌切片 FCSA 减少,反映骨骼肌萎缩程度加重,且有剂量依赖性,为

Dex 的药物效应所然。生理性 GC 由肾上腺皮质分泌,通过血液运送至靶器官,与靶细胞内 GR 结合调节糖、脂、蛋白质等多种代谢功能。药源性 Dex 可通过与靶细胞 GR 结合而产生药效反应。本研究低频给药 Dex 对 GR 表达水平未见显著影响,可能来自外源性 GC 激活并竞争结合存量 GR。随着给药频率增加,GC 诱导 GR 表达增高,但由于平台效应,以及垂体-丘脑-肾上腺轴的负反馈抑制作用增强,中、高频给药诱导 GR 表达增高但不体现剂量依赖性。与此相应, α -ENaC 表达随 Dex 给药频率增加而增高,且有剂量依赖性,提示 GC 可能在通过肌细胞 GR 介导影响 ENaC 表达的同时,还通过其他代谢途径间接诱导骨骼肌组织 ENaC 表达增高,其机制有待探讨。

3.3 外源性 GC 诱导骨骼肌 ENaC 表达增高与骨骼肌萎缩的关系 最新研究已证实,骨骼肌肌膜上有 ENaC 表达^[4]。本研究 IHC 检测可见 C 组腓肠肌纤维有 α -ENaC 阳性反应,与文献结果相符。已知 ENaC 有 α 、 β 、 γ 和 δ 4 种亚基结构。由 α 、 β 、 γ 的异源亚基构成是构建高效能 ENaC 通道所必需的。 α 亚基可以构成同源性功能通道, β 和 γ 亚基在通道复合体中主要起调节作用。 δ 亚基主要存在于大脑中,可能部分发挥 α 亚基功能^[5-6]。本研究以 α -ENaC 表达水平反映 ENaC 的功能变化。

本研究发现,腓肠肌组织 α -ENaC 增高与肌萎缩程度有剂量依赖性,且与 GR 表达呈正相关,提示 Dex 致骨骼肌萎缩,可能存在 GR 诱导 ENaC 表达增高影响骨骼肌收缩及肌蛋白代谢,并导致肌萎缩的信号机制。

Rich 等^[7]研究骨骼肌纤维肌膜去极化对肌纤维兴奋性减退的影响,发现当细胞外钾离子(K^+)升高使膜去极化后,肌纤维的兴奋性减退,其动作电位的产生不再是“全或无”,且阈值升高、峰值降低。随着去极化程度增加,当静息电位达到某一水平时,肌纤维的兴奋性完全丧失,任何去极化的刺激都不能引起肌纤维的反应。 Na^+ 是肌膜去极化的关键离子,有理由推测,肌膜 ENaC 高表达或活性增高引发 Na^+ 内流, Na^+ 升高使膜去极化,肌膜动作电位传导阻滞,肌纤维兴奋-收缩耦联失调,产生功能性麻痹,即肌无力。此外,在生理条件下,ENaC 可以通过调控 Na^+ 内流调节细胞渗透压。沈颖飞等^[8]将电极插入三叉神经节神经元,观察 Na^+ 内流对细胞渗透压的调节及其对神经-肌肉兴奋耦联中电压门控 Na^+ 通道(VGSC)的影响,发现细胞内高渗导致 VGSC 失活,不能激发动作电位,提示 ENaC 表达增高或异常开放导致 Na^+ 内流也可能使 VGSC 功能受损,阻碍动作电位传导,导致功能性肌无力。

持续肌无力使骨骼肌处于失用状态,可以激活 ATP 依赖性泛素-蛋白酶系统降解蛋白质^[9-10]。Reid 等^[11]已证实失重状态下肌特异性 F-box 泛素蛋白酶及连接酶 atrogin/MAFbx 表达显著上调。ENaC 高表达导致持续的功能性肌无力可能构成刺激信号,激活泛素-蛋白酶系统降解骨骼肌收缩蛋白,导致肌萎缩及器质性肌无力。其次,肌无力下调因子 caspase3 诱导肌细胞凋亡也能引起失用性肌萎缩^[11]。

综上所述,外源性 GC 可以诱导骨骼肌组织细胞高表达 GR 并介导骨骼肌肌膜 ENaC 表达增高,后者可能通过影响肌膜 Na^+ 内流而使动作电位传递受阻,导致肌无力及肌萎缩,但其效应机制尚有待证实。

参考文献

[1] 时宏娟,焉传祝,戴廷军.类固醇肌病的研究现状[J].中华医学杂志,2014,94(6):476-478. (下转第 3326 页)

阻时间延长,表达增高。与模型对照组相比,脉血康组 α -SMA 表达减少,第 14 天差异有统计学意义($P<0.05$)。说明 UUO 可以成功建立肾间质纤维化模型,导致肾小管上皮发生 EMT,而脉血康胶囊可以调节肾小管 EMT,减轻肾间质纤维化程度。同时实验观察到,JAK/STAT 信号通路因子 STAT3 在模型对照组及脉血康组各时间点表达均较健康对照组及假手术组明显增高($P<0.01$),且随梗阻时间的延长表达逐渐上升。运用脉血康治疗后,STAT3 表达减少,第 4 天开始减少明显($P<0.05$)。由此可见,脉血康能降低 STAT3 的表达,调节肾小管上皮 EMT,从而减少肌成纤维细胞生成及 ECM 的堆积,延缓肾间质纤维化进程。

参考文献

- [1] Negri AL. Prevention of progressive fibrosis in chronic renal diseases: antifibrotic agents[J]. J Nephrol, 2004, 17(4): 496-503.
- [2] Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanism of action[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 287(1): 7-16.
- [3] Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis [J]. Int J Exp Path, 2011, 92(3): 158-167.
- [4] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis [J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1776-1784.
- [5] 邹德平, 许志忠, 朱再志, 等. 脉血康联合爱西特治疗慢性肾功能衰竭疗效观察[J]. 医学信息(上旬刊), 2011, 24(1): 90-91.
- [6] 薛痕, 樊均明, 陈亮, 等. 大鼠肾间质纤维化动物模型的实验研究[J]. 四川动物, 2004, 23(1): 16-20.
- [7] 张翠薇, 谢茂, 张旭, 等. 威灵仙对单侧输尿管梗阻模型大鼠血液流变学及肾间质纤维化的影响[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(18): 3022-3024.
- [8] 严永兴, 梁丽贞, 沈咏慧, 等. 脉血康胶囊对脑梗死恢复期

患者疗效及对凝血功能的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3667-3668.

- [9] 朱俊江. 疏血通治疗 2 型糖尿病肾病的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(12): 75-76.
- [10] Misseri R, Rink RC, Meldrum DR, et al. Inflammatory mediators and growth factors in obstructive renal injury [J]. J Surg Res, 2004, 119(2): 149-159.
- [11] Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, et al. JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: Approaches for targeted therapies [J]. Genes Cancer, 2010, 1(10): 979-993.
- [12] Fossett N. Signal transduction pathways, intrinsic regulators, and the control of cell fate choice [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(2): 2375-2384.
- [13] Swiatek Machado K, Kaminska B. STAT signaling in glioma cells [J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 986: 189-208.
- [14] Huang JS, Guh JY, Chen HC, et al. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells [J]. J Cell Biochem, 2001, 81(1): 102-113.
- [15] Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY, et al. Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(2): 276-285.
- [16] Nightingale J, Patel S, Suzuki N, et al. Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(1): 21-32.

(收稿日期: 2016-02-04 修回日期: 2016-06-28)

(上接第 3322 页)

- [2] 李建萍, 潘瑞福. 类固醇肌病大鼠模型的建立及其骨骼肌病变的形态学研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2001, 27(1): 7-9.
- [3] 孙伟, 汤球, 江鹏亮, 等. 运用系统论原理复制人类疾病动物模型[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(10): 67-69.
- [4] Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure [J]. Physiol Rev, 2002, 82(3): 735-767.
- [5] Kellenberger S, Gautschi I, Schild L. An external site controls closing of the epithelial Na^+ channel ENaC [J]. J Physiology, 2002, 543(Pt 2): 413-424.
- [6] Staruschenko A, Adams E, Booth RE, et al. Epithelial Na^+ channel subunit stoichiometry [J]. Biophys J, 2005, 88(6): 3966-3975.
- [7] Rich MM, Pinter MJ. Crucial role of sodium channel fast inactivation in muscle fibre inexcitability in a rat model of critical illness myopathy [J]. J Physiol, 2003, 547(Pt 2):

555-566.

- [8] 沈颀飞, 王海业, 麻颖宜, 等. 细胞内渗透压改变对三叉神经电压门控钠离子通道电流的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2012, 30(4): 338-342.
- [9] Witkowski S, Lovering RM, Spangenburg EE. High-frequency electrically stimulated skeletal muscle contractions increase p70s6k phosphorylation independent of known IGF-I sensitive signaling pathways [J]. FEBS letters, 2010, 584(13): 2891-2895.
- [10] Chen JW, Chen SY, Li HY, et al. Effect of exogenous interferon gamma on the healing of injured skeletal muscle following injury [J]. China J Orthop Traumatol, 2008, 21(6): 434-437.
- [11] Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288(6): 1423-1431.

(收稿日期: 2016-02-22 修回日期: 2016-06-29)