

神经肌肉电刺激预防废用性肌萎缩作用机制及研究进展

杨佳佳,徐义明,白跃宏

【关键词】 神经肌肉电刺激;废用性肌萎缩;机制;研究进展

【中图分类号】 R49;R493 【DOI】 10.3870/zgkf.2020.03.010

骨骼肌的生长和维持依赖于对肌肉活动与机械负荷的刺激反应,肌肉活动减少或机械负荷减少都会导致废用性肌萎缩,如因疾病长期卧床、骨折外伤石膏固定及其他原因需肢体制动等均会造成废用性肌萎缩,其主要特征是肌肉蛋白合成代谢下降,分解代谢增强,主要表现为肌肉湿重减少、肌纤维横截面积减少、慢肌纤维向快肌纤维转换、肌肉力量下降等^[1-3]。

神经肌肉电刺激作为肌萎缩的一种常用物理治疗手段,可诱导骨骼肌非自主收缩,替代废用状态下肌肉活动,限制或逆转废用状态下肌萎缩进程的发生^[4]。神经肌肉电刺激诱导的收缩使肌肉容积、横截面积增加、蛋白质合成增加等^[5-6]。但利用神经肌肉电刺激预防废用性肌萎缩的机制尚不明确,故对于最佳刺激方案,如刺激频率、作用时间及周期的选择,目前亦无统一的说法,了解神经肌肉电刺激在预防肌萎缩中的作用机制可为临床诊疗策略制定提供实验依据,本文拟从废用性肌萎缩发生机制以及神经肌肉电刺激作用机制展开论述。

1 促进肌肉蛋白合成

1.1 Akt相关信号通路 激酶Akt(又称蛋白激酶B)是骨骼肌生长相关级联反应中的重要成分,Akt可活化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mammalian Target of Rapamycin,mTOR)调控肌蛋白质合成,Akt信号传导能够使葡萄糖转运蛋白4(Glucose Transporter 4, GLUT4)易位到细胞膜,增加骨骼肌对葡萄糖的摄取,从而对抗肌萎缩^[7]。在后肢悬吊的废用性肌萎缩试验模型中,Akt/mTOR信号通路是被抑制的^[8]。研

究发现电刺激可使肌微管细胞的Akt, GLUT4激活和表达上调^[9]。另一方面,Akt通过调控叉头盒O(Forkhead box O,FOXO)的磷酸化水平调节肌蛋白降解过程。动物实验中,通过给予后肢悬吊14d的大鼠100Hz的神经肌肉电刺激,观察到Akt活化、FoxO3a磷酸化水平上升,比目鱼肌萎缩情况得到缓解^[10]。Dirks等^[11]对重症卧床肌萎缩病人神经肌肉电刺激的研究中,通过对6名患者采取自身双侧股四头肌刺激对照的方式,予以侧股四头肌频率为100Hz的神经肌肉电刺激,每天2次,每次30min,持续7±1d,对照组不予神经肌肉电刺激,但仍安放电极,结果表明:对照组肌肉横截面积减少了20%,电刺激组未检测到明显肌萎缩,电刺激组FOXO1的信使RNA(Messenger RNA,mRNA)水平下降,mTOR磷酸化水平增高。上述研究表明Akt相关信号通路在废用性肌萎缩中扮演着重要角色,神经肌肉电刺激能通过激活蛋白合成相关的Akt/mTOR途径同时抑制Akt/FOXO蛋白降解途径来缓解废用性肌萎缩。

1.2 MAPK信号通路 哺乳动物丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated Protein Kinase,MAPK)家族由几种信号分子包括细胞外调节激酶(Extracellular Signal-regulated Kinase,ERK)、c-Jun氨基末端激酶(C-Jun Amino-terminal Kinase,JNK)及p38组成,他们通过调控基因表达来调节肌细胞的增殖、分化及凋亡,ERK和p38也通过丝裂原和应激激活激酶的磷酸化来增加帽状mRNA的翻译,进而增加肌纤维蛋白的合成^[12]。在各种诱导因素(包括神经肌肉电刺激,负重,阻抗运动和耐力性活动)作用下,均可检测到激酶(JNK、ERK、P38)的激活^[13]。在大鼠的废用性肌萎缩模型中,JNK,P38和ERK的表达降低,而通过频率为30Hz,每天30min,持续30d的神经肌肉电刺激后,肌纤维中JNK,ERK,P38的表达上调,肌萎缩得到缓解,说明神经肌肉电刺激可通过激活MAPK信号通路,延缓废用性肌萎缩的发生^[14]。

基金项目:上海市卫计委重要薄弱学科建设(2015ZB0403)

收稿日期:2019-05-29

作者单位:上海交通大学附属第六人民医院康复医学科,上海200233

作者简介:杨佳佳(1993-),女,硕士研究生,主要从事周围神经损伤康复研究。

通讯作者:白跃宏,aibyh@126.com

2 抑制肌肉蛋白水解

2.1 抑制泛素蛋白水解相关途径 骨骼肌萎缩发生时,泛素-蛋白酶体系统协调蛋白水解分子程序,对靶蛋白进行泛素化,完成蛋白质的降解过程。其中,泛素连接酶E3对靶蛋白的特异识别是蛋白降解的关键。肌肉萎缩盒F蛋白(Muscle Atrophy F-box, MAFbx)和肌环状指蛋白1(Muscle RING Finger1, MuRF1)是两种肌肉特异性表达的泛素连接酶E3,MAFbx与MuRF1的mRNA水平在肌萎缩早期都明显上升,可能与肌萎缩的启动有关^[15]。上述Dirks ML等在健康志愿者的肌萎缩模型的研究中,通过5d的单侧下肢制动建立短期肌萎缩模型,实验组(n=12)予100Hz,每天2次,每次40min的神经肌肉电刺激治疗,对照组(n=12)不予电刺激,与对照组MAFbx和MuRF1升高相比,实验组MAFbx和MuRF1无明显变化,表明电刺激可阻止肌萎缩连接酶的表达而缓解肌肉废用性肌萎缩^[16]。但Dirks等^[11]随后在重症患者肌萎缩的研究中,肌萎缩患者对照组与电刺激组MAFbx和MuRF1表达均增高,统计学无明显差异。两次试验的结果的差异可能与废用性肌萎缩的模型不同有关,故尽管泛素蛋白水解系统在废用性肌萎缩中有重要作用,但电刺激在泛素蛋白水解系统中的作用尚需更进一步的研究。

2.2 阻断钙蛋白酶活性 泛素蛋白酶体系统不能直接降解完整的肌原纤维内蛋白质,需要钙蛋白酶切割肌巨蛋白、伴肌动蛋白等使肌原纤维解分解^[17]。研究表明,阻断钙蛋白酶活性可抑制泛素蛋白酶体途径活化,保留肌肉蛋白合成代谢信号,减少废用性骨骼肌萎缩^[18]。研究中,将大鼠后肢悬吊14d建立肌萎缩模型,实验组予以胫骨前肌100Hz神经肌肉电刺激。结果发现,相比空白对照组,后肢悬吊后的钙蛋白酶2的表达仅轻度升高,且电刺激未使钙蛋白酶的表达发生明显变化,表明后肢悬吊的废用性肌萎缩模型中,神经肌肉电刺激胫骨前肌时可能并非通过调节钙蛋白酶的表达缓解废用性肌萎缩^[19]。

3 阻止肌生成抑制蛋白表达

肌生成抑制蛋白是一种肌生成负向调节因子,其通过阻滞成肌调节因子使肌生成基因表达受阻^[20],研究表明肌生成抑制蛋白明显促进废用性骨骼肌萎缩^[21]。在Dirks等^[16]的试验中检测到实验组肌生成抑制蛋白mRNA未发生改变,肌肉横截面积及肌肉湿重均未明显下降,而对照组肌生成抑制蛋白mRNA表达

上升。故阻止肌生成抑制蛋白的表达是神经肌肉电刺激缓解肌萎缩的可能机制之一。

4 减少卫星细胞凋亡

卫星细胞作为一种替补细胞,在骨骼肌损伤后活化募集,分化为成肌细胞,对肌纤维的修复,维持和生长有重要作用^[22]。在废用性肌萎缩发生时,卫星细胞数量下降,再生能力不足^[23],神经肌肉电刺激通过增强卫星细胞的活化和增生,保持足够的卫星细胞池,促进肌纤维再生从而缓解肌肉萎缩进程^[24]。试验证明,后肢悬吊28d大鼠模型中,予比目鱼肌20Hz,每天2次,每次1h的神经肌肉电刺激可减少卫星细胞的丢失,增加肌纤维的横截面积^[25]。另一项动物实验室中,对新西兰兔后肢固定建立腓肠肌废用性肌萎缩模型,给予腓肠肌8Hz,每天1次,每次1h,持续2周的微电流电刺激,检测到卫星细胞有丝分裂活性增加,卫星细胞数量增加,肌萎缩得到明显缓解,表明电刺激可通过刺激肌卫星细胞增值分化来促进萎缩肌肉再生^[26]。

萎缩肌中的卫星细胞需要不同的刺激方案,用于不同的细胞活动,如激活,增殖和肌原性分化,刺激参数的优化可能会强化干预的结果。后肢悬吊14d大鼠试验模型中,予以2Hz,每天2次,每次1h的神经肌肉电刺激参数使卫星细胞增殖增加2倍,在阻止肌纤维横截面积减少方面达到最佳效果^[27]。

5 线粒体及氧自由基的变化

线粒体是参与细胞能量代谢、细胞分化与凋亡及信号传递的重要细胞器。废用状态下肌纤维内线粒体体积及位置发生改变,使线粒体功能受损,产生大量活性氧造成细胞氧化性损伤,破坏正常的膜系统功能,进一步使线粒体肿胀,同时溶酶体膜破坏^[28]。损伤的线粒体氧化磷酸化水平出现障碍,能量产生不足,蛋白合成下降;膜破坏后的溶酶体释放蛋白水解酶,使蛋白质分解增加^[29-30]。电刺激可能通过影响线粒体分裂和融合相关蛋白(Fis1、Drp1、Mfn1、Mfn2、Opa1)的表达从而达到线粒体质量控制和线粒体功能改善,进而缓解肌肉蛋白的丢失^[31],但目前尚缺乏在废用性肌萎缩中,电刺激对线粒体相关蛋白表达的影响。

除了上述机制外,也有学者从神经肌肉电刺激通过调节微小RNA(microRNA)表达从而促进肌肉蛋白表达展开研究。肌肉特异性microRNA(myomiRs)是一种含有22个核酸的保守微小RNA,其中miR-1

和 miR-206 通过靶向胰岛素样生长因子 1 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF1) 的 3' 非编码区从而阻止其翻译, 与肌肉蛋白的减少相关^[32]。myomiRs 在肌生成中扮演的角色是多重的, 其也直接靶向 Pax3 和 Pax7 启动肌生成程序^[33]。目前已对几种肌萎缩模型包括去神经、禁食、糖尿病、癌症恶病质状态下的小鼠肌肉的 miR 进行了分析, 明确了在不同代谢情景下的 miR 独特表达模式^[34]。如研究者给予慢性肾衰竭相关性肌萎缩患者 20Hz 神经肌肉电刺激, 发现 miR-1 和 miR-206 表达增加, 肌细胞生成增多, 表明慢性肾衰竭相关性肌萎缩中, 神经肌肉电刺激可以通过增加 miR-1 和 miR-206 促进肌细胞蛋白生成^[35]。在慢阻肺相关性低氧高二氧化碳导致的肌萎缩大鼠模型中, 检测到肌萎缩发生时, MiR486 明显减少, 但经过神经肌肉电刺激后, MiR486 表达增高^[36]。但在废用性肌萎缩模型中, 对神经肌肉电刺激后 microRNA 表达情况尚未有相关研究, 也是目前的研究方向之一。

6 小结

上述研究表明, 神经肌肉电刺激预防废用性肌萎缩的疗效是肯定的, 在预防机制的研究中, 肌肉蛋白合成相关通路 Akt 途径及 MAPK 途径的活化有重要作用; 同时, 神经肌肉电刺激也可通过促进卫星细胞增值, 抑制肌生成抑制蛋白的合成来缓解废用性肌萎缩; 线粒体质量控制及功能改善、microRNA 相关通路改变也是可能机制之一, 进一步明确需要更深入研究; 尽管泛素蛋白酶体及钙蛋白酶是肌萎缩中肌肉蛋白降解的主要途径, 但神经肌肉电刺激对泛素蛋白酶及钙蛋白酶的作用情况尚有争议。综上可知, 神经肌肉电刺激预防废用性肌萎缩的机制中, 促进肌蛋白合成的作用比抑制肌蛋白降解的作用更明显, 同时通过促进卫星细胞再生分化也是电刺激预防废用性肌萎缩的主要机制之一。

【参考文献】

- [1] Campione M, Ausoni S, Guezennec C Y, et al. Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension [J]. *J Appl Physiol* (1985), 1993, 74(3): 1156-1160.
- [2] Clark B C. In vivo alterations in skeletal muscle form and function after disuse atrophy [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2009, 41(10): 1869-1875.
- [3] 陈东, 武继祥, 陈南, 等. 全面承重小腿假肢对小腿截肢后残肢肌肉萎缩速度的影响研究 [J]. *中国康复*, 2017, 32(01): 86-87
- [4] Paillard T. Muscle plasticity of aged subjects in response to electrical stimulation training and inversion and/or limitation of the sarcopenic process [J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 46: 1-13.
- [5] Gibson J N, Smith K, Rennie M J. Prevention of disuse muscle atrophy by means of electrical stimulation: maintenance of protein synthesis [J]. *Lancet*, 1988, 2(8614): 767-770.
- [6] Maffiuletti N A, Gondin J, Place N, et al. Clinical Use of Neuromuscular Electrical Stimulation for Neuromuscular Rehabilitation: What Are We Overlooking? [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2018, 99(4): 806-812.
- [7] Hu F, Li N, Li Z, et al. Electrical pulse stimulation induces GLUT4 translocation in a Rac-Akt-dependent manner in C2C12 myotubes [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(4): 644-654.
- [8] Jackman R W, Kandarian S C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(4): C834-C843.
- [9] Lee I H, Lee Y J, Seo H, et al. Study of muscle contraction induced by electrical pulse stimulation and nitric oxide in C2C12 myotube cells [J]. *J Exerc Nutrition Biochem*, 2018, 22(1): 22-28.
- [10] Tanaka M, Nakanishi R, Murakami S, et al. Effectiveness of daily eccentric contractions induced via kilohertz frequency transcutaneous electrical stimulation on muscle atrophy [J]. *Acta Histochem*, 2016, 118(1): 56-62.
- [11] Dirks M L, Hansen D, Van Assche A, et al. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle wasting in critically ill comatose patients [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 128(6): 357-365.
- [12] Nader G A, Esser K A. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2001, 90(5): 1936-1942.
- [13] Roth R J, Le AM, Zhang L, et al. MAPK phosphatase-1 facilitates the loss of oxidative myofibers associated with obesity in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(12): 3817-3829.
- [14] 杜长亮, 贡建伟. 电刺激对大鼠废用性肌萎缩的抑制作用及调控机制研究 [J]. *中国运动医学杂志*, 2014, 33(01): 42-46.
- [15] Fioletta V C, White L J, Larsen A E, et al. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy [J]. *Pflugers Arch*, 2011, 461(3): 325-335.
- [16] Dirks M L, Wall B T, Snijders T, et al. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle disuse atrophy during leg immobilization in humans [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2014, 210(3): 628-641.
- [17] Hasselgren P O, Fischer J E. The ubiquitin-proteasome pathway: review of a novel intracellular mechanism of muscle protein breakdown during sepsis and other catabolic conditions [J]. *Ann Surg*, 1997, 225(3): 307-316.
- [18] Shenkman B S, Belova S P, Lomonosova Y N, et al. Calpain-dependent regulation of the skeletal muscle atrophy following unloading [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 584: 36-41.
- [19] Matsumoto A, Fujita N, Arakawa T, et al. Influence of electrical stimulation on calpain and ubiquitin-proteasome systems in the denervated and unloaded rat tibialis anterior muscles [J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(5): 936-942.
- [20] Elliott B, Renshaw D, Getting S, et al. The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 205(3): 324-340.

- [21] Latres E, Pangilinan J, Miloscio L, et al. Myostatin blockade with a fully human monoclonal antibody induces muscle hypertrophy and reverses muscle atrophy in young and aged mice [J]. *Skelet Muscle*, 2015, 5: 34.
- [22] Wagers A J, Conboy I M. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis[J]. *Cell*, 2005, 122(5): 659-667.
- [23] Mckenna C F, Fry C S. Altered satellite cell dynamics accompany skeletal muscle atrophy during chronic illness, disuse, and aging[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2017, 20(6): 447-452.
- [24] Guo B S, Cheung K K, Yeung S S, et al. Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30348.
- [25] Zhang B T, Yeung S S, Liu Y, et al. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension[J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 11: 87.
- [26] Moon Y S, Kwon D R, Lee Y J. Therapeutic effect of microcurrent on calf muscle atrophy in immobilized rabbit [J]. *Muscle Nerve*, 2018, 58(2): 270-276.
- [27] Wan Q, Yeung S S, Cheung K K, et al. Optimizing Electrical Stimulation for Promoting Satellite Cell Proliferation in Muscle Disuse Atrophy [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2016, 95(1): 28-38.
- [28] Nielsen J, Suetta C, Hvid L G, et al. Subcellular localization-dependent decrements in skeletal muscle glycogen and mitochondria content following short-term disuse in young and old men[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(6): E1053-E1060.
- [29] Talbert E E, Smuder A J, Min K, et al. Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2013, 115(4): 529-538.
- [30] Xu X, Chen C N, Arriaga E A, et al. Asymmetric superoxide release inside and outside the mitochondria in skeletal muscle under conditions of aging and disuse[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2010, 109(4): 1133-1139.
- [31] Kitaoka Y, Ogasawara R, Tamura Y, et al. Effect of electrical stimulation-induced resistance exercise on mitochondrial fission and fusion proteins in rat skeletal muscle[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2015, 40(11): 1137-1142.
- [32] Elia L, Contu R, Quintavalle M, et al. Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions[J]. *Circulation*, 2009, 120(23): 2377-2385.
- [33] Wang X H. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013, 16(3): 258-266.
- [34] Soares R J, Cagnin S, Chemello F, et al. Involvement of microRNAs in the regulation of muscle wasting during catabolic conditions[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(32): 21909-21925.
- [35] Hu L, Klein J D, Hassounah F, et al. Low-frequency electrical stimulation attenuates muscle atrophy in CKD--a potential treatment strategy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(3): 626-635.
- [36] Shen J, Nie X, Huang S Y, et al. Neuromuscular electrical stimulation improves muscle atrophy induced by chronic hypoxia-hypercapnia through the MicroRNA-486/PTEN/FoxO1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(4): 1021-1027.

·作者·读者·编者·

《中国康复》杂志重要启事

随着联合国“残疾人权利国际公约”在各国落实,世界卫生组织已公布“CBR指南”,世界卫生大会将通过“残疾与康复报告”,我国在逐步实现“人人享有康复”。自然灾害增强了人们康复意识,国家卫生部将康复纳入基本医疗,一个康复事业的新阶段正在到来,康复治疗队伍必将更加壮大。因应这种变化,《中国康复》增加康复治疗方面的报道力度,内容可涉及临床各学科,包括内科(心脑血管疾病、肺功能障碍、糖尿病等的康复治疗)、外科(颅脑外伤恢复期、骨和关节术后的康复治疗等)、妇科(产后的康复)、儿科(婴幼儿生长发育运动、脑瘫等的康复)、残疾人支具支架的制作应用等。为此恳请各大医院康复医学科及相关学科的医务人员,将你们临床医疗、科研、教学的经验撰写为文章投给《中国康复》编辑部,我们将为您搭建一个互相交流、学习的平台,并对您的文章择优、提前刊登。

希望《中国康复》成为广大康复工作者、康复医生、治疗师的重要阵地,成为大家的朋友。我们将竭力为大家服务,为康复治疗学科的发展贡献力量。

《中国康复》编辑部