

周期性低压低氧运动对大鼠多裂肌急性损伤后骨骼肌卫星细胞自我更新与运动功能的影响

杨承卓¹, 刘红珍², 李森³, 王海燕³, 杨策³, 张宏英¹, 谢友红^{1*}

¹重庆医科大学附属康复医院康复医学科, 重庆 400050; ²重庆医科大学附属第二医院康复医学科, 重庆 400010;

³陆军军医大学大坪医院野战外科研究部/创伤与化学中毒全国重点实验室, 重庆 400042

[中图分类号] R493 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2025.0813

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 杨承卓, 刘红珍, 李森, 等. 周期性低压低氧运动对大鼠多裂肌急性损伤后骨骼肌卫星细胞自我更新与运动功能的影响[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(1): 94-102.

[收稿日期] 2024-09-03 [录用日期] 2024-12-29 [上线日期] 2025-08-13

[摘要] **目的** 探究周期性低压低氧运动对大鼠多裂肌急性损伤后骨骼肌卫星细胞自我更新与运动功能的影响。**方法** 将50只健康成年雄性SD大鼠随机分为对照组、BaCl₂组、低压低氧+BaCl₂组(HH+BaCl₂组)、运动+BaCl₂组(E+BaCl₂组)、低压低氧运动+BaCl₂组(HH+E+BaCl₂组), 每组10只, E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组分别进行常压常氧跑步训练和低压低氧跑步训练。21 d运动结束后, 除对照组外其余各组于L₄~L₅多裂肌注射1.2% BaCl₂盐溶液构建大鼠多裂肌损伤模型, 对照组L₄~L₅多裂肌注射生理盐水。各组大鼠分别于造模前及造模后1、7、14 d进行旷场实验、转棒疲劳实验和机械刺激缩足反射阈值(MWT)测量。取45只健康成年雄性SD大鼠, 分组与干预造模同上, 于造模后3、7、14 d取多裂肌, 进行伊文思蓝和HE染色并采用Western blotting检测Notch1、Notch1细胞内结构域(N1ICD)、RNA结合蛋白-J(RBP-J)蛋白的表达, 免疫荧光染色检测配体蛋白7(Pax7)的表达。**结果** 造模后14 d, HH+E+BaCl₂组旷场步行总路程、转棒疲劳最大跌落速度和MWT明显长于或高于BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 伊文思蓝染色提示造模14 d后HH+E+BaCl₂组多裂肌损伤程度最小, HE染色显示造模14 d后HH+E+BaCl₂组多裂肌细胞横截面积大于BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组($P<0.01$); Western blotting检测结果显示, HH+E+BaCl₂组Notch1、N1ICD、RBP-J蛋白表达水平明显高于BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 免疫荧光染色显示HH+E+BaCl₂组Pax7⁺细胞数量明显多于BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 周期性低压低氧运动可能通过增强多裂肌卫星细胞自我更新能力, 促进多裂肌肌肉再生与急性腰痛恢复。

[关键词] 周期性低压低氧运动; 多裂肌; 骨骼肌卫星细胞; 自我更新; 腰痛

Effects of cyclic hypobaric hypoxic exercise on skeletal muscle satellite cell self-renewal and motor function after acute injury to multifidus muscles of rats

Yang Cheng-Zhuo¹, Liu Hong-Zhen², Li Sen³, Wang Hai-Yan³, Yang Ce³, Zhang Hong-Ying¹, Xie You-Hong^{1*}

¹Department of Rehabilitation Medicine, the Affiliated Rehabilitation Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400050, China

²Department of Rehabilitation Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

³Department of Field Surgery Research/State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China

*Corresponding author, E-mail: 202508@hospital.cqmu.edu.cn

This work was supported by the Army Medical Center Talent Innovation Capability Development Program (ZXZYTSYS11), and the Special Program for Improvement of Science and Technology Innovation Capability of Army Medical University (2023XJS43)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of hypobaric hypoxic exercise on skeletal muscle satellite cell self-renewal

[基金项目] 陆军特色医学中心人才创新能力培养计划(ZXZYTSYS11); 陆军军医大学科技创新能力提升专项项目(2023XJS43)

[作者简介] 杨承卓, 硕士研究生, 主要从事战创伤康复治疗方面的研究

[通信作者] 谢友红, E-mail: 202508@hospital.cqmu.edu.cn

and motor function following acute injury of the multifidus muscle of rats. **Methods** Fifty healthy adult male SD rats were randomly divided into 5 groups ($n=10$): control group, $BaCl_2$ group, hypobaric hypoxic+ $BaCl_2$ group (HH+ $BaCl_2$ group), exercise+ $BaCl_2$ group (E+ $BaCl_2$ group), and hypobaric hypoxic+exercise+ $BaCl_2$ group (HH+E+ $BaCl_2$ group), with 10 rats in each group. The E+ $BaCl_2$ and HH+E+ $BaCl_2$ groups underwent running training under normoxic normobaric and hypobaric hypoxic conditions, respectively, for 21 d. After the training period, all groups except the control group received an injection of 1.2% $BaCl_2$ solution into the L_4 - L_5 multifidus muscle to construct a rat multifidus muscle injury model, while the control group received an injection of normal saline. The Open field test, Rotarod test, and mechanical withdrawal threshold (MWT) measurement were performed before modeling and on days 1, 7 and 14 after modeling. Another 45 rats were grouped and treated in the same way and were sacrificed on days 3, 7 and 14 post-modeling to harvest the multifidus muscle. Evans blue and HE staining were performed. Western blotting was used to detect the protein expression levels of Notch1, Notch1 intracellular domain (NICD), and RNA binding protein-J (RBP-J), and immunofluorescent staining was used to detect the expression of paired box protein 7 (Pax7). **Results** At 14 days after modeling, HH+E+ $BaCl_2$ group showed significantly longer total distance traveled in the Open field, higher maximum falling speed on the Rotarod test, and higher MWT values compared with those in $BaCl_2$, HH+ $BaCl_2$, and E+ $BaCl_2$ groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). Evans blue staining indicated the multifidus muscle in HH+E+ $BaCl_2$ group had the least damage at 14 days after modeling. HE staining revealed that the average cross-sectional area of multifidus muscle cells in HH+E+ $BaCl_2$ group was significantly larger than that in $BaCl_2$, HH+ $BaCl_2$, and E+ $BaCl_2$ groups at 14 days after modeling ($P<0.01$). Western blotting results showed that the protein expression levels of Notch1, NICD, and RBP-J in HH+E+ $BaCl_2$ group were significantly higher than those in $BaCl_2$, HH+ $BaCl_2$, and E+ $BaCl_2$ groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). Immunofluorescent staining demonstrated that the number of Pax7⁺ cells in HH+E+ $BaCl_2$ group was significantly greater than that in $BaCl_2$, HH+ $BaCl_2$, and E+ $BaCl_2$ groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Hypobaric hypoxic exercise may promote multifidus muscle regeneration and the recovery of acute low back pain by enhancing self-renewal capacity of multifidus muscle satellite cells.

[Key words] hypobaric hypoxic exercise; multifidus muscle; skeletal muscle satellite cells; self-renewal; low back pain

腰背部肌肉损伤是引起腰痛的重要病因。多裂肌(multifidus muscle)作为腰背部深层肌肉^[1],在维持脊柱稳定中起着主要作用,当其发生损伤时,腰部稳定性降低,组织结构发生改变,进而导致腰背疼痛。张超等^[2]利用超声多参数成像评估慢性腰痛患者和无症状者的腰部多裂肌,发现腰痛患者多裂肌厚度和面积减小,提示腰部多裂肌病变可能是导致腰痛的重要原因。因此,探究腰部多裂肌损伤的病理生理机制和干预策略,可为防治腰痛提供新的思路。肌肉再生是肌肉损伤后发生的主要生理过程,直接影响肌肉恢复速度与程度,骨骼肌卫星细胞(muscle satellite cells, MuSCs)作为该过程中发挥主导地位的干细胞,对肌肉再生功能至关重要。MuSCs是位于骨骼肌肌膜与基底膜之间的常驻干细胞,主要参与肌肉再生与损伤修复^[3];其在静止情况下可进行自我更新^[4],当受到外界刺激或发生损伤时会被激活、增殖、分化,并形成新的肌肉纤维或与现有的肌肉纤维融合以修复受损的肌肉组织^[5]。部分被激活的MuSCs会重新退回静息状态并自我更新,参与骨骼肌MuSCs池的补充^[6]。这一过程可维持骨骼肌的再生潜能,影响肌肉再生与损伤修复^[7-9]。配对盒蛋白7(Pax7)作为MuSCs的标志物,可反映这一过程中MuSCs数量的变化^[8,10-11]。Notch蛋白在骨骼肌中主要调节MuSCs的稳态和自我更新^[12]。当Notch受体与其配体结合时被激活,受体活化导致 γ -

分泌酶介导的Notch胞内结构域(NICD)的切割和释放, NICD易位至细胞核并与RNA结合蛋白-J(RBP-J)转录因子相互作用, RBP-J转录因子结合DNA以诱导下游靶向基因包括*Hes1*、*Hey1*和*HeyL*的表达,在前期骨骼肌再生研究中,使用转基因小鼠的研究报道了Notch-RBP-J途径对肌肉发育和再生期间MuSCs功能的调节起着至关重要的作用^[12-17]。

低压低氧运动(hypobaric hypoxic exercise),即高原运动,主要运用于专业运动训练,以提高运动员的身体机能。有研究报道,在低氧环境中卫星细胞的自我更新、活化和增殖能力较高^[18-19]。另有研究表明,低压低氧运动对MuSCs产生积极影响,但具体作用效果和机制并不明确^[20]。基于急性腰痛与多裂肌损伤的关联, MuSCs在肌肉再生中的关键作用,以及低压低氧运动对MuSCs自我更新存在的潜在调节作用。本研究旨在探究低压低氧运动后多裂肌损伤恢复期MuSCs自我更新与肌肉再生的变化,并比较低压低氧运动与常规运动对损伤后肌肉再生干预效果的差异,为急性腰痛的康复治疗提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 兔抗Notch1抗体(D1F11)、兔抗Notch1胞内结构域(NICD)抗体(D3B8,美国Cell Signaling Technology公司);兔抗RBP-J抗体(A00767-1,武汉博士德生物工程有限公司);兔抗 β -tubulin抗体

(AF7011, 澳大利亚 Affinity Biosciences 公司); 小鼠抗 Pax7 抗体 (AB_528428, 美国 Developmental Studies Hybridoma Bank 公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (323-005-024)、Alexa Fluor®488 偶联 ChromPure 小鼠 IgG 二抗 (015-540-003, 美国 Jackson Immunoresearch 公司); 通用型抗体稀释液 (PS119L, 上海雅酶生物医药科技有限公司); 改良 Lillie-Mayer 苏木精染色液 (G4070)、伊红染色液 (G1100)、0.5% 伊文思蓝染色液 (G1810) (北京索莱宝科技有限公司); BaCl₂ (10361-37-2, 上海麦克林生化科技股份有限公司)。小动物五通道跑步机、低压氧舱 (上海望塔智能科技有限公司); 旷场实验仪、转棒疲劳仪 (北京众实迪科技发展有限公司); vonFrey 纤毛机械刺激测试针 (上海玉研科学仪器有限公司); 凝胶成像仪 (上海天能公司); 凝胶电泳仪、湿转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 共聚焦显微镜系统 (德国 Leica 公司)。

1.2 实验动物及分组 清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 95 只, 体重 200~250 g, 由陆军军医大学大坪医院实验动物中心提供 [实验动物生产许可证号: SCXK (渝)2022-0011, 实验动物使用许可证号: SYXK (渝)2022-0018], 参照国际实验动物护理评估和认证协会

推荐的条件进行饲养, 光照/黑暗周期为 12 h/12 h, 可自由获取食物和水。采用随机数字表法将 50 只大鼠分为对照组、BaCl₂ 组、低压低氧+BaCl₂ 组 (HH+BaCl₂ 组)、运动+BaCl₂ 组 (E+BaCl₂ 组)、低压低氧运动+BaCl₂ 组 (HH+E+BaCl₂ 组), 每组 10 只, 进行行为学检测。余 45 只, 分组同上, 每组 9 只, 进行其余指标检测。本研究经陆军军医大学实验动物福利伦理委员会审核 (AMUWEC20237402), 实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

1.3 大鼠跑台运动 E+BaCl₂ 组、HH+E+BaCl₂ 组大鼠在五通道跑步机 (置于低压氧舱内) 上进行跑步锻炼, HH+E+BaCl₂ 组大鼠运动时启动低压氧舱, HH+BaCl₂ 组同时置于低压氧舱内进行低氧暴露, 设定 2500 m 海拔高度^[21-22], 气压上升时间 5 min, 下降时间 5 min, 维持 35 min。初适应跑步机 3 d, 速度 9 m/min, 20 min/d。适应训练结束后, 预训练 1 周, 首先热身 5 min, 速度 9 m/min, 热身结束后以 15 m/min 速度运动 20 min。预训练结束后第 2 周开始正式训练, 首先热身 5 min, 速度 9 m/min, 以 18 m/min 的运动速度训练 30 min; 第 3 周以 20 m/min 的运动速度训练 30 min, 共运动两周。运动强度始终保持中等有氧运动^[23-24]。跑台运动方案如图 1 所示。

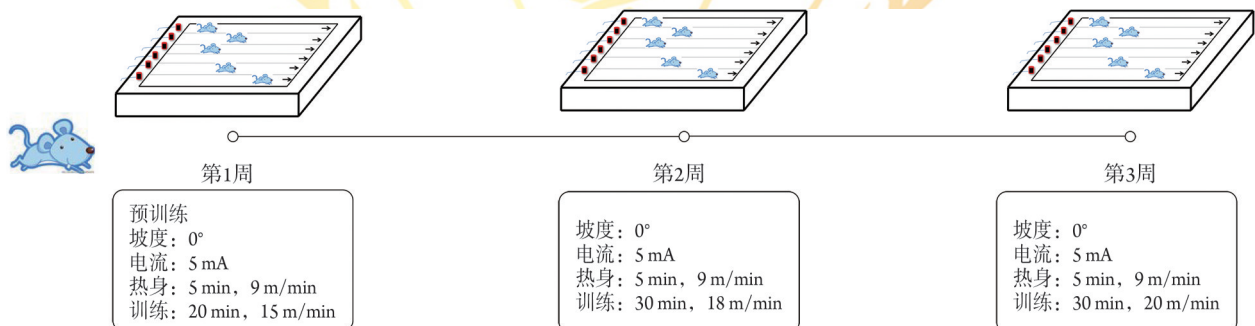


图 1 大鼠跑步训练方案示意图

Fig.1 Schematic diagram of the rat training run programme

1.4 大鼠多裂肌损伤模型制备 E+BaCl₂ 组、HH+E+BaCl₂ 组 21 d 运动结束后注射 BaCl₂ 致腰部多裂肌损伤, 对照组、BaCl₂ 组、HH+BaCl₂ 组同时进行注射^[25]。BaCl₂ 组、HH+BaCl₂ 组、E+BaCl₂ 组、HH+E+BaCl₂ 组大鼠腹腔注射 5 μl/g 1% 戊巴比妥钠盐溶液进行麻醉。将大鼠双侧髂棘最高点与腰椎连线, 根据其连线与脊柱的交点棘突定位 L₆ 椎体, 选择双侧脊柱 L₄-L₅ 水平两旁的 4 个点, 定位消毒后, 用 1 ml 注射器一次性抽取 600 μl 1.2% BaCl₂ 盐溶液, 紧贴棘突垂直刺破皮肤后, 直刺进针, 待针尖碰到关节突和乳突骨面后, 回抽无血, 向定位处多裂肌缓慢注射 BaCl₂ 盐溶液 (150 μl×4), 以保证药物充分吸收, 对照组采用同样方法注射等量生理盐水。

1.5 行为学检测

1.5.1 旷场实验 分别于造模前和造模后 1、7、14 d 进行旷场试验评估大鼠自发行为。将大鼠轻轻放入旷场实验区进行自由活动, 记录时间为 5 min。测试期间采用红外探测记录大鼠在实验区的移动情况, 记录步行总路程, 同时摄像头记录的离线视频可记录大鼠非移动期间内的探索与直立行为, 不同大鼠旷场实验后用 75% 乙醇溶液擦拭去味后, 再进行下一次实验, 以减少不同大鼠气味带来的嗅觉干扰^[26]。

1.5.2 转棒疲劳实验 分别于造模前和造模后 1、7、14 d 进行运动耐力和肌肉疲劳程度测试。使用大鼠转棒疲劳仪进行运动耐力和肌肉疲劳程度评估实验。

各组大鼠在造模前进行预训练2 d。旋转杆从静止状态开始,在5 min内从4 m/min加速到40 m/min。当大鼠从旋转杆上摔下来时,记录最大跌落速度。每组大鼠进行3次实验,每轮实验之间休息20 min^[26]。

1.5.3 后肢机械刺激缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)测量 分别于造模前和造模后1、7、14 d测量MWT。通过系列压力vonFrey纤毛机械刺激测试针测量MWT,以此反映实验大鼠的痛觉敏感性^[26]。将大鼠置于透明的亚克力箱中,底部为铁丝网,实验前使之适应15~20 min,取一系列vonFrey纤维丝(0.6、1.0、1.4、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、15.0 g,共9根),从4.0 g开始按照上下法垂直刺向大鼠后肢足底中央部,避开肉垫,纤维丝弯曲至C形或S形并维持6~8 s。如大鼠在刺激时间内或移开vonFrey纤毛机械刺激针时出现快速缩足反应,则标记为阳性,在其他时间出现的缩足反应或非缩足样反应,均标记为阴性。每轮之间至少休息10 min,在出现“骑跨”反应后连续刺激5次,取左右后足检测值的均值。最后用UpDown Reader软件计算^[27],动物50% MWT(g) = $10^{Xf+k\delta}/10\ 000$,其中Xf为冯弗雷灯丝值(以对数单位为单位), δ 为刺激之间的平均差(以对数单位为单位),在此约等于0.224,k为根据测量获得的“X”“O”序列查表^[28]后获得的系数值;取左右后肢平均数进行分析。

1.6 取材 分别于BaCl₂注射造模损伤后3、7、14 d处死大鼠,取多裂肌。按照1 ml/200 g的剂量腹腔注射1%戊巴比妥钠盐溶液麻醉大鼠后处死。用剃毛刀剔除取材区域的皮毛,随后用剪刀剪去背部皮肤,用镊子剥离最长肌和髂肋肌,显示多裂肌,随后将双侧L₄和L₅水平多裂肌剪下,左侧多裂肌置于4%多聚甲醛溶液中固定进行苏木精-伊红(HE)染色和免疫荧光染色;右侧多裂肌置于-80℃冰箱,用于Western blotting检测。

1.6.1 伊文思蓝染色 每次取材前24 h,大鼠腹腔注射2 ml 0.5%伊文思蓝染色液,每组3只。该制剂是一种常用的非渗透性偶氮染料,具有独特的细胞染色特性。活细胞由于具备外排功能,能够将染料排出细胞外,因此不会被染色;而死细胞因失去外排功能,被染成蓝色。因此,这种染料可用于快速区分活细胞和死细胞。在实验中,可通过观察大鼠皮肤是否呈现蓝色来判断染色是否成功。

1.6.2 HE染色 多裂肌用4%多聚甲醛溶液固定24 h后,常规乙醇梯度脱水,石蜡包埋、切片,切片厚度5 μm,二甲苯脱蜡后水化,苏木精染色,1%盐酸乙醇分化,饱和碳酸锂返蓝,伊红染色,脱水,透明,封固。镜下分别观察肌肉横截面及纵截面切片,横截面切片以每个样本左下象限视野为观察区

域,采用ImageJ软件计算至少200个肌纤维进行统计分析,作为造模后14 d多裂肌纤维平均横截面积;纵截面切片用于观察肌肉的损伤修复情况^[26]。

1.6.3 免疫荧光染色 多裂肌用4%多聚甲醛溶液固定24 h后,蔗糖梯度脱水,OTC包埋剂包埋,冷冻切片机切片,厚度8 μm,室温复温15 min,滴加Triton透化30 min,免疫染色封闭液室温封闭30 min,加入Pax7一抗(1:10),4℃孵育过夜。次日,PBS洗涤后加入Alexa荧光缀合的二抗室温孵育1 h,PBS洗涤后滴加DAPI,室温孵育5 min,用抗荧光淬灭封片剂封固。使用Leica共聚焦显微镜系统采集图像。对采集的图像进行全局优化,并使用Adobe Illustrator组装成图形。统计每个冷冻切片的骨骼肌Pax7蛋白数量。

1.6.4 Western blotting检测 取冻存多裂肌组织,剪碎后,加入适量RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合溶液,匀浆后离心配平,离心提取细胞总蛋白,使用Pierce BCA蛋白测定试剂盒定量样品中蛋白浓度。加入适量上样缓冲液,95℃沸水煮5 min行蛋白变性,采用Bio-Rad电泳及转膜系统将蛋白转移到PVDF膜上,转膜完毕后,用含5%脱脂奶粉的TBST封闭2 h,将Notch1、N1ICD、RBP-J、 β -tubulin一抗稀释(稀释倍数1:1000),并与含有电泳转移的蛋白条带的膜在4℃孵育过夜,TBST洗膜后在TBST稀释的HRP缀合的二抗在室温下孵育1 h,TBST洗膜后加入ECL显色,反应3 min。以 β -tubulin为内参对照。采用凝胶成像系统采集图像,ImageJ软件进行定量分析。以目的蛋白灰度值与 β -tubulin灰度值比值作为目标蛋白相对表达量。

1.7 统计学处理 采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,其中行为学数据比较采用双因素方差分析(two-way ANOVA),其他数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐性检验采用Brown-Forsythe检验和Bartlett检验,方差齐时,进一步两两比较采用LSD检验;方差不齐时,进一步两两比较采用Tamhan T₂检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠旷场步行总路程 各组大鼠初始旷场步行总路程差异无统计学意义($P>0.05$)。造模后1、7 d, BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组旷场步行总路程较对照组明显缩短($P<0.01$); HH+E+BaCl₂组旷场步行总路程较BaCl₂组、HH+BaCl₂组明显延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。造模后14 d, BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组旷场步行总路程较对照组明显缩短($P<0.01$); HH+E+BaCl₂组旷场步

行总路程较BaCl₂组、HH+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组明显延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$) (图2A、B)。

2.2 各组大鼠转棒最大跌落速度 各组大鼠初始最大跌落速度差异无统计学意义($P>0.05$)。造模后1、7 d, BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组最大跌落速度较对照组明显降低($P<0.01$); E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组最大跌落速度较BaCl₂组、HH+BaCl₂组明显升高($P<0.01$)。造模后14 d, BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组最大

跌落速度较对照组均明显降低($P<0.01$); E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组最大跌落速度较BaCl₂组、HH+BaCl₂组明显升高($P<0.01$); HH+E+BaCl₂组最大跌落速度较E+BaCl₂组明显升高($P<0.01$) (图2C)。

2.3 各组大鼠MWT 各组大鼠初始后肢MWT差异无统计学意义($P>0.05$)。造模后1 d, BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组后肢MWT较对照组均明显降低($P<0.01$)。造模后7 d, BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组后肢MWT较

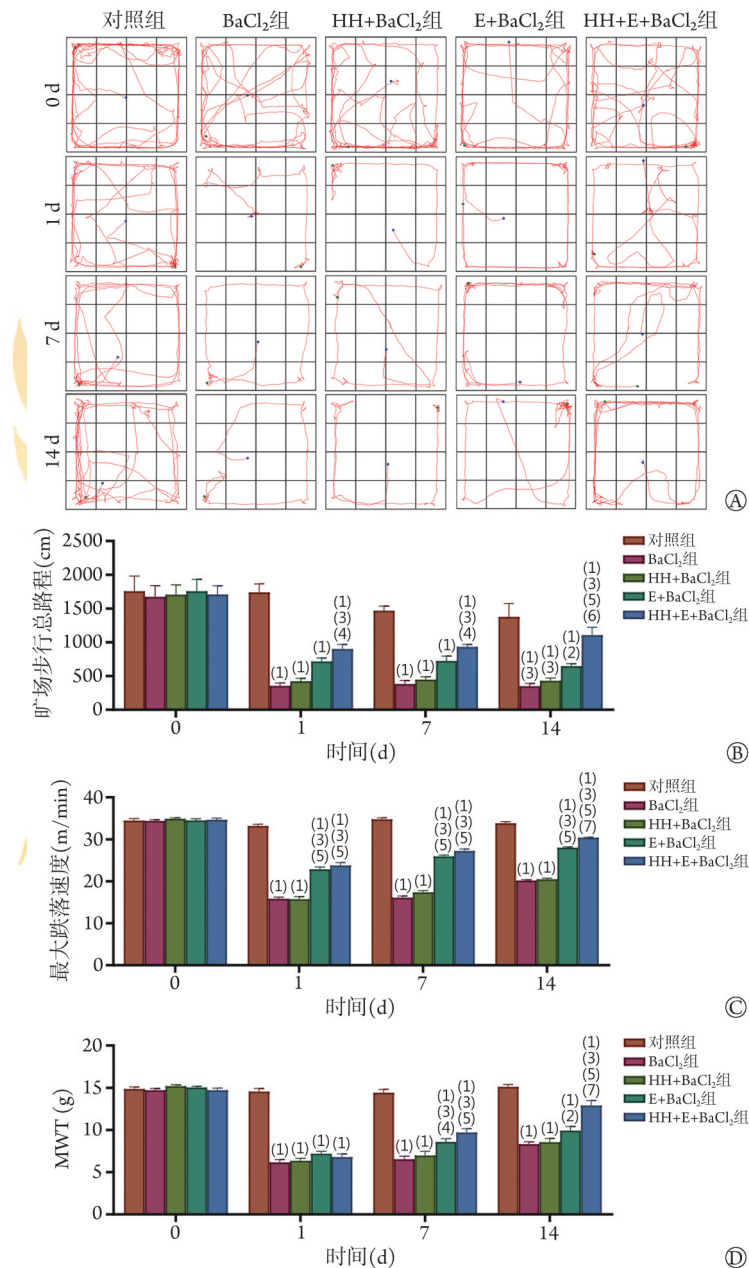


图2 各组多裂肌损伤大鼠行为学变化($n=10$)

Fig.2 Behavioural changes in each group of rats with multifidus muscle injury ($n=10$)

A. 大鼠0、1、7、14 d旷场实验轨迹图; B. 大鼠旷场步行总路程; C. 大鼠转棒疲劳最大跌落速度; D. 大鼠后肢机械刺激缩足反射阈值(MWT)。与对照组相比, (1) $P<0.01$; 与BaCl₂组相比, (2) $P<0.05$, (3) $P<0.01$; 与HH+BaCl₂组相比, (4) $P<0.05$, (5) $P<0.01$; 与E+BaCl₂组相比, (6) $P<0.05$, (7) $P<0.01$ 。对照组.生理盐水对照组; BaCl₂组. BaCl₂注射组; HH+BaCl₂组. 低压低氧+BaCl₂注射组; E+BaCl₂组. 运动+BaCl₂注射组; HH+E+BaCl₂组. 低压低氧运动+BaCl₂组

对照组均明显降低($P<0.01$); HH+E+BaCl₂组后肢MWT较BaCl₂组、HH+BaCl₂组明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。造模后14 d, BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组后肢MWT较对照组明显降低($P<0.01$); E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组后肢MWT较BaCl₂组升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); HH+E+BaCl₂组后肢MWT较HH+BaCl₂、E+BaCl₂组明显升高($P<0.01$) (图2D)。

2.4 低压低氧运动对大鼠多裂肌损伤后修复能力的影响 伊文思蓝染色结果显示, 除对照组外, 其他组别在造模后3 d均呈现较深颜色, 表明BaCl₂注射对各组多裂肌造成严重广泛性的损伤; 造模后7 d, HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组颜色略变浅, BaCl₂组颜色仍较深; 造模后14 d, BaCl₂处理的各组颜色均变浅, HH+E+BaCl₂组颜色最浅, 其次是E+BaCl₂组(图3)。

2.5 低压低氧运动对大鼠多裂肌损伤后再生能力的影响 HE染色结果显示, 对照组肌细胞结构完整, 排列紧密, 造模后3 d所有经过BaCl₂处理的组别肌肉横截面与纵截面显示出严重的肌纤维溶解, 细胞排列松散, 鲜见完整细胞; 造模后7 d, 各组出现再生肌纤维, 其中HH+E+BaCl₂组可见较大截面积肌细胞; 造模后14 d, 各组出现大量再生肌纤维, 肌纤维形态趋于完整(图4A)。为直观了解多裂肌再生情况, 量化分析伤后14 d肌肉横截面积, 结果显示, BaCl₂组、

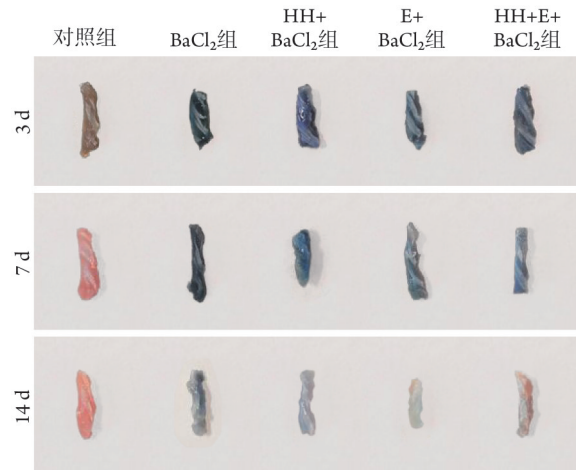


图3 各组大鼠多裂肌伊文思蓝染色

Fig.3 Evans blue staining of multifidus muscle of rats in each group
对照组. 生理盐水对照组; BaCl₂组. BaCl₂注射组; HH+BaCl₂组. 低压低氧+BaCl₂注射组; E+BaCl₂组. 运动+BaCl₂注射组; HH+E+BaCl₂组. 低压低氧运动+BaCl₂组

HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组横截面积较对照组明显缩小($P<0.01$); HH+E+BaCl₂组横截面积较BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组明显增加($P<0.01$), 但与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$, 图4B)。

2.6 低压低氧运动对大鼠多裂肌卫星细胞自我更新能力的影响 Western blotting检测结果显示, 伤后14 d, BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组 Notch1、

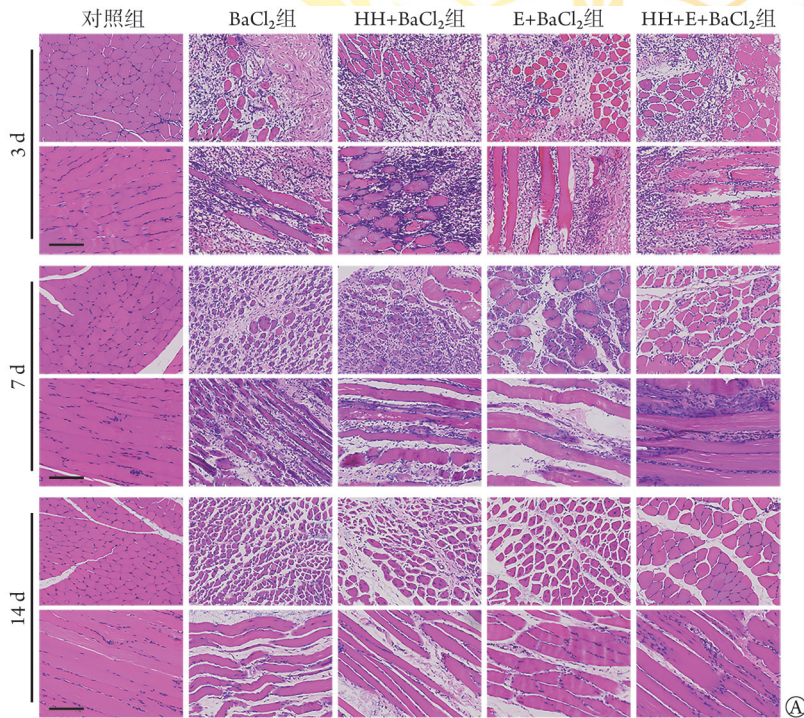


图4 各组大鼠多裂肌HE染色

Fig.4 HE staining of multifidus muscle of rats in each group

A. 大鼠造模后3、7、14 d多裂肌横截面与纵截面HE染色(bar=100 μm); B. 大鼠多裂肌损伤14 d后肌细胞横截面积($n=3$)。与对照组相比, (1) $P<0.01$; 与BaCl₂组相比, (2) $P<0.01$; 与HH+BaCl₂组相比, (3) $P<0.01$; 与E+BaCl₂组相比, (4) $P<0.01$ 。对照组. 生理盐水对照组; BaCl₂组. BaCl₂注射组; HH+BaCl₂组. 低压低氧+BaCl₂注射组; E+BaCl₂组. 运动+BaCl₂注射组; HH+E+BaCl₂组. 低压低氧运动+BaCl₂组

NIICD、RBP-J蛋白表达水平较对照组明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); HH+E+BaCl₂组 Notch1 蛋白表达水平较 BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$, 图5)。

免疫荧光染色结果显示, 造模后 14 d后, BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组、HH+E+BaCl₂组 Pax7⁺细胞数量较对照组明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$); HH+E+BaCl₂组 Pax7⁺细胞数量较 BaCl₂组、HH+BaCl₂组、E+BaCl₂组明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$) (图6)。

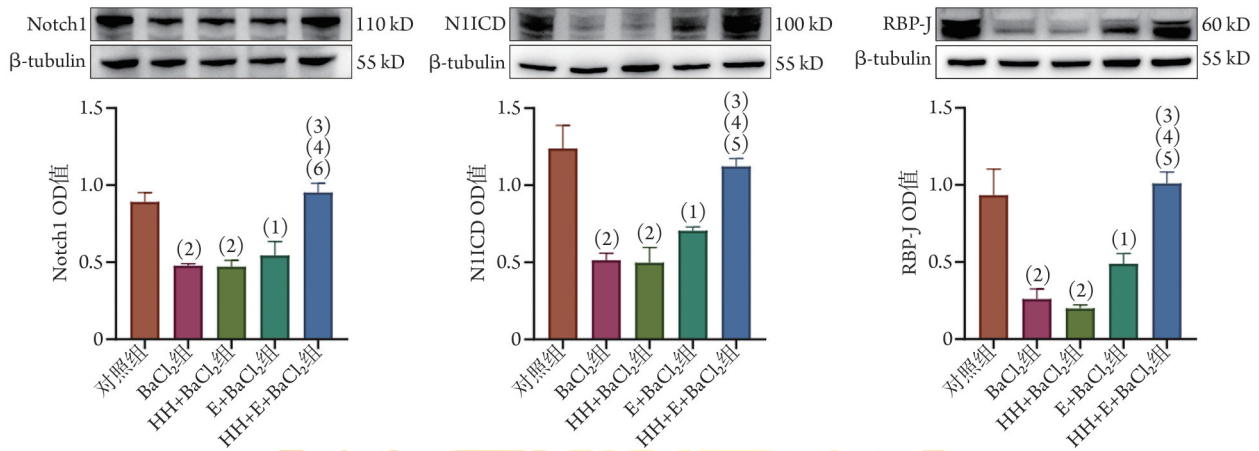


图5 各组大鼠造模后 14 d多裂肌卫星细胞自我更新相关蛋白的表达($n=3$)

Fig.5 Expression of proteins related to self-renewal of multifidus muscle satellite cells of rats in each group 14 days after injury ($n=3$)

与对照组相比, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.01$; 与 BaCl₂组相比, (3) $P<0.01$; 与 HH+BaCl₂组相比, (4) $P<0.01$; 与 E+BaCl₂组相比, (5) $P<0.05$, (6) $P<0.01$ 。对照组.生理盐水对照组; BaCl₂组. BaCl₂注射组; HH+BaCl₂组. 低压低氧+BaCl₂注射组; E+BaCl₂组. 运动+BaCl₂注射组; HH+E+BaCl₂组. 低压低氧运动+BaCl₂组; NIICD. Notch1 蛋白细胞内结构域(NIICD); RBP-J. RNA结合蛋白-J

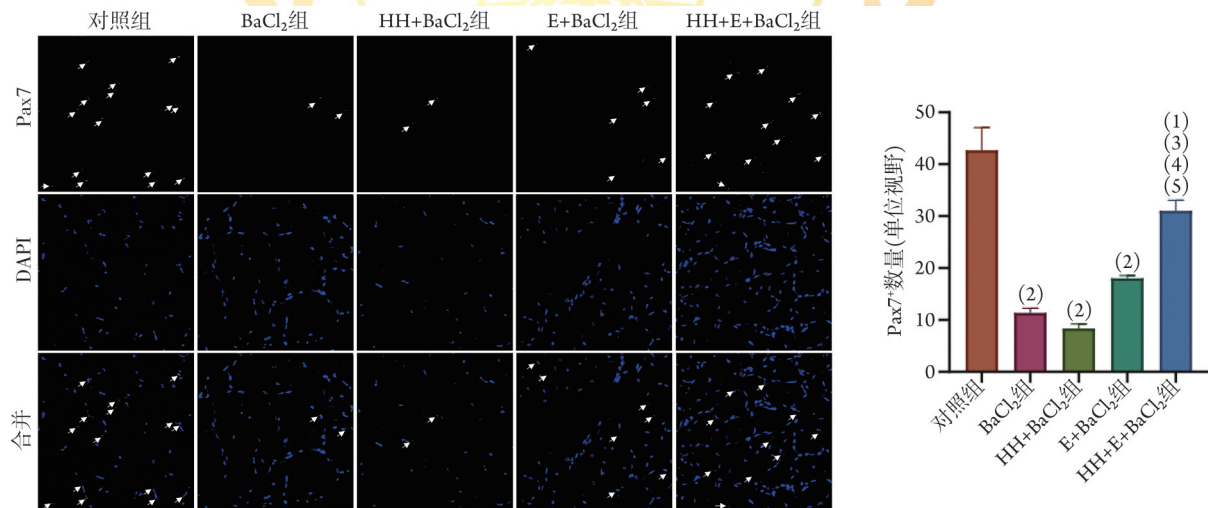


图6 各组大鼠多裂肌组织中配对盒蛋白7(Pax7)免疫荧光染色($\times 400$, $n=3$)

Fig.6 Immunofluorescence staining of paired box gene 7 (Pax7) in multifidus tissues of rats in each group ($\times 400$, $n=3$)

与对照组相比, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.01$; 与 BaCl₂组相比, (3) $P<0.01$; 与 HH+BaCl₂组相比, (4) $P<0.01$; 与 E+BaCl₂组相比, (5) $P<0.05$ 。对照组.生理盐水对照组; BaCl₂组. BaCl₂注射组; HH+BaCl₂组. 低压低氧+BaCl₂注射组; E+BaCl₂组. 运动+BaCl₂注射组; HH+E+BaCl₂组. 低压低氧运动+BaCl₂组

3 讨论

腰痛的终生患病率可达 84%^[29]; 急性下腰痛患者 1 年和 2 年随访的复发率分别为 65% 和 35%~44%^[29-30]。预防急性腰痛与腰痛发生后及时治疗是防止腰痛复发的关键, 其中减轻多裂肌损伤、促进其结构和功能修复是防治急性腰痛的重要措施。目前

腰痛康复治疗方案较多, 包括药物治疗、中医康复治疗、物理因子治疗与运动疗法等^[31]。其中运动疗法不仅可作为腰痛后康复的手段, 也是预防腰痛和促进腰痛恢复的干预措施之一。增强腰部力量和耐力有助于稳定躯干, 提升整体稳定性^[32], 如普拉提运动可强化核心肌群, 增强脊柱稳定性^[33]; 水中运动可提高腹部耐力, 改善身体功能和生活质量^[34]。

为进一步提高运动的效果,本研究在运动基础上改变运动环境,将大鼠置于低压低氧环境中运动,并在运动结束后注射BaCl₂致多裂肌损伤,动态观察大鼠行为学改变和多裂肌恢复情况,以验证低压低氧运动是否具有预防损伤的作用。从短时间内旷场步行总路程和转棒疲劳最大跌落速度变化可知BaCl₂注射后大鼠的情绪和运动能力都受到影响,MWT的降低进一步表明大鼠痛觉敏感性增加,值得注意的是,经过低压低氧运动干预的大鼠情绪和运动功能的恢复速度与程度都高于其他组,痛觉敏感性也能快速恢复正常,降低了大鼠对疼痛的敏感性。伊文思蓝染色和HE染色结果显示,BaCl₂注射后短时间内各组多裂肌出现严重损伤,这可能是影响大鼠一系列功能障碍的主要原因;进一步观察发现,在肌肉恢复过程中,低压低氧运动后大鼠同样表现出与行为学变化相似的结果,该组大鼠多裂肌的恢复速度与程度也明显高于其他组,这可能解释了低压低氧运动干预后大鼠行为学有所改善。MuSCs在肌肉再生与修复过程中发挥主导地位,因此低压低氧运动可能影响MuSCs的功能,使得大鼠能表现出良好的肌肉修复与再生能力。

在过去的几十年里,人们对低压低氧条件下的体育活动越来越感兴趣,越来越多的研究支持骨骼肌在该环境条件下可发生积极的变化^[35-36]。然而,尚无研究特别关注MuSCs在低氧条件下对运动的反应的调节。Masschelein等^[37]发现,低氧条件下中等强度运动20 min后,增殖细胞核抗原(PCNA) mRNA水平较常氧条件下更高,虽然没有观察其他MuSCs标志物,但该研究支持MuSCs可在低氧条件下通过运动调节的观点。进一步研究发现,与常氧下相比,在低氧下进行单次抗阻运动后多种MuSCs标志物Pax7、MyoD、Mrf4 mRNA水平升高,肌生成素增加^[38]。Gnimassou等^[38]报道低氧条件下运动后MuSCs会发生一定的改变,但未涉及该干预对骨骼肌损伤的影响。因此,本研究设想并初步验证了低压低氧运动通过影响MuSCs,促进肌肉损伤修复。

前期研究发现低氧环境中MuSCs的自我更新能力较强^[39],尽管未涉及运动干预因素,但提示MuSCs的自我更新能力可能与环境氧气浓度变化有关。基于此,本研究检测MuSCs自我更新过程中关键通道蛋白Notch1及下游分子N1ICD和RBP-J的表达情况,结果显示,造模后14 d低压低氧运动大鼠多裂肌中3种蛋白呈现高表达。衰老肌肉损伤时Notch蛋白的配体Delta-like-1诱导减少,导致肌肉再生能力受损,强制激活Notch蛋白可通过调节干细胞的激活、增殖和自我更新来恢复再生能力,逆转衰老带来的影响^[40]。MuSCs表达3种Notch通道蛋白

(Notch1-3)^[41-45],Notch3可作为卫星细胞增殖的负调节因子^[41],Notch2过表达可诱导肌肉萎缩^[46],而N1ICD过表达可上调并促进MuSCs自我更新,此过程是N1ICD通过与RBP-J相互作用来调节Pax7,RBP-J结合Pax7基因上游的两个共有位点完成的^[47]。本研究中Notch1、N1ICD、RBP-J和Pax7蛋白在低压低氧运动大鼠多裂肌中高表达,提示低压低氧运动可促进MuSCs自我更新,结合HE染色结果,低压低氧运动后大鼠肌肉再生能力提高可能与MuSCs自我更新能力提升有关。

综上所述,本研究结果表明,低压低氧运动可缓解腰痛,提高MuSCs的自我更新能力,促进肌肉再生。然而,本研究仍停留在现象学层面,低压低氧运动对MuSCs自我更新能力的深刻影响尚未得到深入探究。所涉及的多维度、多层次的生物学效应和分子细胞机制尚未得到具体验证,低压低氧运动是否产生其他效应及其机制有待进一步研究。此外,本研究比较了低压低氧跑步与常压常氧跑步,表明在相同的训练强度和持续时间条件下,前者可显著放大运动效果,提示低压低氧环境是运动功效的“放大器”。这种效应是否适用于其他运动方式(如抗阻训练、间歇冲刺、普拉提或水上运动)以及不同运动形式(连续、间歇或循环)在低压低氧条件下的剂量反应关系,需要通过多中心、大样本随机对照试验进行验证。低压低氧运动防治下腰痛的长期安全性、个体化适宜剂量及其与训练周期、性别、年龄、基础疾病的相互作用也缺乏循证支持,有待今后进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] Purushotham S, Hodson N, Greig C, et al. Microscopic changes in the multifidus muscle in people with low back pain associated with lumbar disc herniation[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 31927.
- [2] 张超,毛译,王雁,等.超声多参数成像评价腰部多裂肌损伤的前瞻性临床研究[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2024, 30(6): 432-438.
- [3] Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers[J]. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961, 9(2): 493-495.
- [4] Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 22-31.
- [5] Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(13): 1692-1708.
- [6] Chakkalakal JV, Jones KM, Basson MA, et al. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence[J]. *Nature*, 2012, 490(7420): 355-360.
- [7] 傅鑫,李虎,杨雯隼,等.骨骼肌的再生[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(9): 1690-1702.
- [8] Lepper C, Partridge TA, Fan CM. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration[J]. *Development*, 2011, 138(17): 3639-3646.

- [9] Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA. Muscle stem cells at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 21): 4543-4548.
- [10] Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, *et al.* Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells [J]. *Cell*, 2000, 102(6): 777-786.
- [11] Peng J, Han L, Liu B, *et al.* Gli1 marks a sentinel muscle stem cell population for muscle regeneration [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6993.
- [12] Bjornson CR, Cheung TH, Liu L, *et al.* Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(2): 232-242.
- [13] Fukada S, Yamaguchi M, Kokubo H, *et al.* Hesr1 and Hesr3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers [J]. *Development*, 2011, 138(21): 4609-4619.
- [14] Vasyutina E, Lenhard DC, Wende H, *et al.* RBP-J (Rbpsi) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(11): 4443-4448.
- [15] Baghdadi MB, Castel D, Machado L, *et al.* Reciprocal signalling by Notch-collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche [J]. *Nature*, 2018, 557(7707): 714-718.
- [16] Fujimaki S, Seko D, Kitajima Y, *et al.* Notch1 and Notch2 coordinately regulate stem cell function in the quiescent and activated states of muscle satellite cells [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(2): 278-285.
- [17] Huynh D, Hoffmeister P, Friedrich T, *et al.* Effective *in vivo* binding energy landscape illustrates kinetic stability of RBPJ-DNA binding [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 1259.
- [18] Beaudry M, Hidalgo M, Launay T, *et al.* Regulation of myogenesis by environmental hypoxia [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(15): 2887-2896.
- [19] Chaillou T, Lanner JT. Regulation of myogenesis and skeletal muscle regeneration: effects of oxygen levels on satellite cell activity [J]. *FASEB J*, 2016, 30(12): 3929-3941.
- [20] van Doorslaer de Ten Ryen S, Francaux M, Deldicque L. Regulation of satellite cells by exercise in hypoxic conditions: a narrative review [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2021, 121(6): 1531-1542.
- [21] 董致彤, 王勇, 李赞. 高原训练的发展演变历程与关键影响因素研究 [J]. *青少年体育*, 2022, (4): 63-66.
- [22] 窦妍妍, 宋进文. 高原训练对运动员身体机能的影响 [J]. *当代体育科技*, 2024, 14(6): 1-3.
- [23] 李瑞, 董毅. 实验动物运动模型的特点与应用 [J]. *中国体育科技*, 2023, 59(5): 60-68.
- [24] 上官若男, 苏全生, 尚画雨, 等. 运动负荷强度与运动疲劳程度量化分级研究进展 [J]. *中国康复医学杂志*, 2013, 28(2): 188-192.
- [25] Taguchi T, Hoheisel U, Mense S. Dorsal horn neurons having input from low back structures in rats [J]. *Pain*, 2008, 138(1): 119-129.
- [26] 刘红珍, 徐洋杰, 赵秦, 等. 模拟直升机低频振动致大鼠腰痛模型的建立与鉴定 [J]. *陆军军医大学学报*, 2024, 46(1): 58-65.
- [27] Gonzalez-Cano R, Boivin B, Bullock D, *et al.* Up-down reader: an open source program for efficiently processing 50% von Frey thresholds [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 433.
- [28] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [29] Zhou T, Salman D, McGregor AH. Recent clinical practice guidelines for the management of low back pain: a global comparison [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2024, 25(1): 344.
- [30] Pocovi NC, Kent P, Lin CC, *et al.* Recurrence of low back pain: a difficult outcome to predict. Development and validation of a multivariable prediction model for recurrence in patients recently recovered from an episode of non-specific low back pain [J]. *Musculoskelet Sci Pract*, 2023, 64: 102746.
- [31] 岳寿伟. 腰痛的康复评估与治疗 [J]. *康复学报*, 2023, 33(4): 287-294.
- [32] Babagoltabar-Samakoush H, Aminikhah B, Bahiraei S. Effectiveness of dynamic neuromuscular stabilization training on strength, endurance, and flexibility in adults with intellectual disabilities, a randomized controlled trial [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 768.
- [33] Tacchino A, Ponzio M, Confalonieri P, *et al.* Effect of an internet-based pilates telerehabilitation intervention in people with multiple sclerosis: protocol for a randomized controlled trial [J]. *JMIR Res Protoc*, 2025, 14: e58026.
- [34] Zhu H, Jin J, and Zhao G. The effects of water-based exercise on body composition: a systematic review and meta-analysis [J]. *Complement Ther Clin Pract*, 2023, 52: 101766.
- [35] Millet GP, Debevec T, Brocherie F, *et al.* Therapeutic use of exercising in hypoxia: promises and limitations [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 224.
- [36] Brocherie F, Millet GP, D'Hulst G, *et al.* Repeated maximal-intensity hypoxic exercise superimposed to hypoxic residence boosts skeletal muscle transcriptional responses in elite team-sport athletes [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2018, 222(1).
- [37] Masschelein E, van Thienen R, D'Hulst G, *et al.* Acute environmental hypoxia induces LC3 lipidation in a genotype-dependent manner [J]. *FASEB J*, 2014, 28(2): 1022-1034.
- [38] Gnimassou O, Fernández-Verdejo R, Brook M, *et al.* Environmental hypoxia favors myoblast differentiation and fast phenotype but blunts activation of protein synthesis after resistance exercise in human skeletal muscle [J]. *FASEB J*, 2018, 32(10): 5272-5284.
- [39] Li Y, Li C, Sun Q, *et al.* Skeletal muscle stem cells modulate niche function in Duchenne muscular dystrophy mouse through YY1-CCL5 axis [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 1324.
- [40] Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, *et al.* Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle [J]. *Science*, 2003, 302(5650): 1575-1577.
- [41] Kitamoto T, Hanaoka K. Notch3 null mutation in mice causes muscle hyperplasia by repetitive muscle regeneration [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(12): 2205-2216.
- [42] Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, *et al.* Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle [J]. *Cell*, 2007, 129(5): 999-1010.
- [43] Conboy IM, Rando TA. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis [J]. *Dev Cell*, 2002, 3(3): 397-409.
- [44] Qin L, Xu J, Wu Z, *et al.* Notch1-mediated signaling regulates proliferation of porcine satellite cells (PSCs) [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(2): 561-569.
- [45] Fukada S, Uezumi A, Ikemoto M, *et al.* Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(10): 2448-2459.
- [46] Fujimaki S, Matsumoto T, Muramatsu M, *et al.* The endothelial Dll4-muscular Notch2 axis regulates skeletal muscle mass [J]. *Nat Metab*, 2022, 4(2): 180-189.
- [47] Wen Y, Bi P, Liu W, *et al.* Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(12): 2300-2311.