

·针灸推拿·

本文引用:艾瑛萍,罗婷,吴安林,黄晓蒂,杨程,叶平,谢秀惠,彭亮.小鱼际滚法对组织机化期骨骼肌钝性损伤家兔 Fibronectin-1 与 CTGF-1 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(2):204-208.

小鱼际滚法对组织机化期骨骼肌钝性损伤家兔 Fibronectin-1 与 CTGF-1 表达的影响

艾瑛萍¹,罗婷²,吴安林¹,黄晓蒂³,杨程¹,叶平¹,谢秀惠¹,彭亮^{1*}

(1.湖南中医药大学针灸推拿学院,湖南长沙 410208;2.长沙医学院,湖南长沙 410219;

3.湖南中医药大学中医学基础教学实验中心,湖南长沙 410208)

[摘要] 目的 观察小鱼际滚法对组织机化期骨骼肌钝性损伤家兔纤连蛋白-1(fibronectin-1, FN-1)、结缔组织生长因子-1(connective tissue growth factor, CTGF-1)表达的影响。方法 选取 30 只成年新西兰大耳白兔,随机均分为手法治疗组、模型对照组、空白对照组,各 10 只。手法治疗组予造模、治疗处理,模型对照组予造模、不治疗处理,空白对照组予不造模、不治疗处理,采取自制重力铅锤击打兔右后下肢股四头肌造成骨骼肌钝性损伤模型,并在疗程 3 d 后 3 组全处死,在兔股四头肌受损区域内取肌肉组织,HE 染色观察组织形态的变化,Western-Blot 检测治疗前后 FN-1、CTGF-1 的变化情况。结果 HE 染色结果显示:模型对照组与空白对照组对比,其模型对照组肌纤维受损较多,并有不规则结缔样组织填充其中;手法治疗组与模型对照组对比,手法治疗组新生的肌纤维及新生血管更明显,炎性细胞较少,肌肉形态受损较轻。Western-Blot 结果显示:模型对照组 FN-1、CTGF-1 指标显著高于空白对照组,手法治疗组 FN-1、CTGF-1 指标均显著高于空白对照组、低于模型对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在组织机化期骨骼肌钝性损伤模型家兔股四头肌修复过程中,运用小鱼际滚法治疗,可有助修复受损的骨骼肌,使炎性细胞减少,促进骨骼肌新生,改善家兔运动功能,提高疗效,值得推广应用。

[关键词] 骨骼肌;组织机化期;钝性损伤;小鱼际滚法;纤连蛋白-1;结缔组织生长因子-1

[中图分类号] R244.1

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.02.017

The Effects of Interthenar Rolling Method on Rabbit Fibronectin-1, Ctgf-1 Induced By Tissue Mechanization of Skeletal Muscle Injury

AI Jueping¹, LUO Ting², WU Anlin¹, HUANG Xiaodi³, YANG Cheng¹, YE Ping¹, XIE Xiuhui¹, PENG Liang^{1*}

(1. College of Acupuncture and Moxibustion, Hunan University of CM, Changsha, Hunan 410208, China 2. Changsha Medical University, Changsha, Hunan 410219, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Interthenar rolling method on the expression of skeletal muscle blunt injury fibronectin-1 (Fibronectin-1, FN-1) and connective tissue growth factor (CTGF-1) in rabbits with blunt injury of skeletal muscle in tissue mechanization stage. **Methods** A total of 30 adult New Zealand rabbits with big ears were randomly divided into a manual treatment group, a model control group and a blank control group, with 10 cases in each group. The manipulation treatment group was given model making and treatment, and the model control group was given modeling without treatment. The blank control group do not make model and treatment. A blunt injury model of skeletal muscle was made by hitting the rabbit's right lower limb quadriceps with a self-made homemade gravity lead hammer, and all the groups were sacrificed after 3 days of treatment. Muscle tissue was taken from the rabbit quadriceps damaged area, and HE staining was used for observing tissue morphological changes. The changes of Fibronectin-1 and CTGF-1 before and after treatment were detected by Western-Blot. **Result** The results of HE showed that compared with the model control group and the blank control group, the muscle fibers in the model control group were more damaged and serious than those in the manipulation treatment group,

[收稿日期] 2019-09-01

[基金项目] 湖南省自然科学基金(2018JJ2292);湖南省教育科学“十三五”规划 2017 年度课题(编号 85)。

[作者简介] 艾瑛萍,女,在读硕士研究生,研究方向:推拿治病机制的研究。

[通讯作者] *彭亮,男,副教授,硕士研究生导师, E-mail: 513376829@qq.com。

in which irregular connective tissue was filled. Compared with the manipulation treatment and model control group, the new muscle fibers and neovascularization in the manipulation treatment group were more obvious, and the inflammatory cells were fewer than those in the model control group. The results of Western-Blot showed that the indexes of FN-1 and CTGF-1 in the manipulation treatment group were significantly higher than those in the blank control group. The indexes of FN-1 and CTGF-1 in the manual treatment group were significantly higher than those of the blank control group and lower than those in the model control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** In the process of repairing quadriceps femoris in rabbits with blunt injury of skeletal muscle in organized phase, the method of interthenar rolling was used, which can help to repair the damaged skeletal muscle, to reduce inflammatory cells, to promote skeletal muscle regeneration, to improve the motor function of rabbits, and improve the curative effects. It is worthy of popularizing and applying.

[Keywords] skeletal muscle; tissue mechanization period; blunt injury; interthenar rolling method; fibronectin-1; connective tissue growth factor-1

运动损伤中,骨骼肌损伤很常见,发生概率约10%~55%^[1],多由长期性耐力运动引起,其比较常见的损伤类型有钝挫性、撕裂性及牵拉性等。骨骼肌损伤后发生炎症反应,局部瘢痕组织增生并纤维化,受损肌肉组织弹性渐渐丧失,伴有肌肉强硬、活动性能下降,肌电指标和生理生化指标改变,如果得不到及时康复治疗,愈合期拖延,甚至迁延不愈,最终可能造成受损的肌组织功能丧失^[2]或组织脆性增加,极易发生再次损伤。因此,充分研究骨骼肌损伤机制,探讨怎样减少肌肉纤维化,提高患者功能恢复及生活质量,是当今医学研究领域中的一个重要课题。有前期实验研究发现,肌成纤维细胞分化受多种细胞因子、信号通路的调控,力学因素几乎影响着体内所有的细胞,细胞的生长、发育、增殖、死亡都和细胞的力学特性有关^[3]。而既往研究已证明,力学因素对肌成纤维细胞分化有十分重要影响,细胞内的应力释放可直接导致其凋亡^[4-5]。因此,手法或许能减少肌成纤维细胞的增生,促进其凋亡,从而控制纤维化的进程^[6-7]。临床研究证实^[8-10],对骨骼肌纤维化疾患,推拿疗法对肌成纤维增生具有干预作用,但大多研究的推拿在骨骼肌钝性损伤早期的作用机制,未研究推拿在骨骼肌钝性损伤组织机化期的作用机制。本研究运用小鱼际滚法进行干预,观察其对纤维连接蛋白-1(fibronectin-1, FN-1)、结缔组织生长因子-1(connective tissue growth factor, CTGF-1)表达的影响,旨在确定在组织机化期小鱼际滚法能否促进骨骼肌钝性损伤后运动功能的恢复,以为推拿临床治疗提供更优化的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3月龄健康SPF级成年新西兰大耳白兔30只,雌雄各半,由湖南中医药大学基础研究所实验动物中心提供。体质量252.41~320.67(315.71±22.98)g。饲养环境温度20~25℃,湿度在50%~70%。适应性喂养7d后,先随机抽取空白对照组10只,余20只用自制重力铅锤打击装置建立股四头肌损伤模型后,按随机数字表法均分为2组:模型对照组、小鱼际滚法治疗组(手法治疗组),每组10只。

1.2 主要仪器与试剂

蛋白酶抑制剂(北京金泰宏达);蛋白磷酸酶抑制剂(北京普利莱);石蜡切片机(浙江金华);标准电泳装置(北京六一);ZTC-II按摩手法测试仪(上海腾荫教学仪器有限公司提供);自制股四头肌损伤模型打击装置^[11]。

1.3 模型制备

造模前1天,对兔右后肢进行剪毛处理。建模时,将家兔处仰卧位平置,捆绑固定,暴露股四头肌和邻近肌肉部位;以侯懿烜^[11]自制重力锤直线下落击打的造模方法为基础进行改进,采取右后肢股四头肌肌腹中段做打击中心,先铺一层纱布以防皮肤损伤;用自制重力铅锤(锤长50cm,重0.85kg,底面平滑,直径1.5cm)沿PVC硬塑料导向管(长40cm,直径1.8cm)自由下落(自由落高40cm),同一部位连续打击4次,以肉眼可察受打击部位呈现肿胀及瘀血,类似肌肉受撞击损伤,无皮肤受损、无骨折,触碰兔子有躲避反射为准。5d后模型建立成功

(在预实验过程中采用新西兰大耳白兔 14 只,动物造模,测试钝性损伤造模方法,于造模后第 1、3、5、7、10、14、21 天各随机抽取 2 只,取股四头肌肌肉组织,形态学观察,实验结果验证第 5 天进入组织机化期表现)。

1.4 治疗方法

为保证每次手法操作标准化,在实验操作前检测手法数据,规范手法操作参数。实验手法操作人员应为针灸推拿学专业研究生,根据标准滚法参数,在 ZTC-II 按摩手法测试仪上测试并训练实验手法操作人员达标,并在实验动物股四头肌进行练习,每天 2 次,每次操作练习 3 min,总练习时间 >30 min/d,连续练习 3 d。

造模后第 5 天开始小鱼际滚法治疗,对手法治疗组家兔进行捆绑局部小鱼际滚法治疗,全程手法操作要求保持兔子情绪相对稳定状态,防止应激情况出现,以免影响实验结果。若行手法过程中家兔乱动、乱叫可待其安静后继续施予小鱼际滚法,空白对照组和模型对照组捆绑后不做其他处理。

具体操作手法:先将家兔固定于实验台处仰卧位,暴露股四头肌和邻近肌肉部位,以小鱼际吸附于体表施术部位实施滚法,前后滚时着力轻重比为 3:1,峰值压力为 500 g 重力,操作频率为 140 次/min。每次操作 5 min,每天上午、下午共 2 次,共治疗 3 d。

1.5 取材及检测

1.5.1 HE 染色 先烤片,再用石蜡切片机切片置于二甲苯中,然后梯度酒精脱水;染色,再梯度酒精脱水;最后取出后置于二甲苯,中性树脂封片、显微镜观察并采集图像。

1.5.2 Western-Blot 检测骨骼肌匀浆中 FN-1、CTGF-1 蛋白表达量 取骨骼肌组织,放入容器中密封并冻存于 -80 °C 冰箱,剪取 0.030 g 组织,加入 400 μ L RIPA 裂解液反复研磨组织直至看不见组织块,冰上裂解(10 min),4 °C 离心(15 min),将上清液转移到 15 mL 的离心管中,并测定蛋白浓度,取 30 μ g 蛋白上样,电泳,转膜,封闭,敷抗体,显影。检测骨骼肌匀浆中 FN-1、CTGF-1 蛋白表达情况,以 GAPDH 为内参照蛋白,重复 3 次。

1.6 统计分析

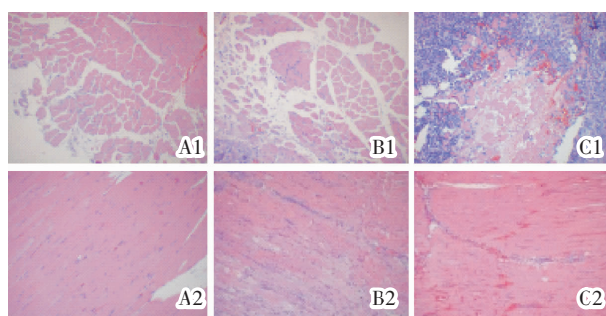
统计学处理数据应用 SPSS 24.0 统计软件进行

分析。计量资料采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示;符合正态分布,采用单因素方差分析并进行多重比较;不符合正态分布,采用 *Kruskal-Wallis H* 检验并进行多重比较。均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学观察

HE 染色观察由图 1 可见:空白对照组兔股四头肌肌纤维大小较均一,形状、分布较整齐,未见结缔样组织;模型对照组受损部分肌纤维较多受损扭曲、崩解、变性,分布较松散,不规则的结缔样组织填充其中,变性坏死肌纤维束周边有较明显的纤维样组织增生包裹,可察炎性细胞浸润、少许自然恢复或新生的肌纤维及新生血管;手法治疗组肌纤维形状维持较好,肌纤维较粗,分布较紧密,可见炎性细胞浸润较少及自然恢复或新生的肌纤维,与空白对照组对比还是可以观察到少量的结缔样组织,与模型对照组对比,新生血管更明显,组织病理结构更接近正常组织。

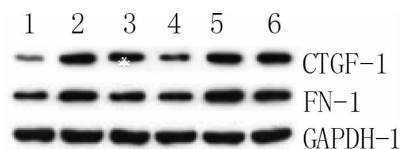


注:A1-2 空白对照组;B1-2 模型对照组;C1-2 手法治疗组;A1、B1、C1 为肌肉组织横切面,A2、B2、C2 为肌肉组织纵切面

图 1 各组股四头肌肌肉组织观察(HE, $\times 100$)

2.2 FN-1 和 CTGF-1 蛋白质印迹结果

由图 2 和表 1 可见,在损伤手法治疗后,与空白对照组相比,模型对照组和手法治疗组在 FN-1 和 CTGF-1 的表达水平均上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型对照组与手法治疗组的 FN-1、CTGF-1 表达水平比较,模型对照组两种蛋白水平均高于手法治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:1、4 空白对照组,2、5 模型对照组,3、6 手法治疗组

图 2 各组 FN-1、CTGF-1 蛋白表达量

表1 各组 FN-1、CTGF-1 蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FN-1	CTGF-1
空白对照组	10	0.1800±0.10789	0.0000±0.1100
模型对照组	10	0.4950±0.18512*	0.1464±0.4175*
手法治疗组	10	0.3150±0.12755* [△]	0.0512±0.1825* [△]
F值		0.150	9.208
P值		0.006	0.010

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较, $\Delta P<0.05$

3 讨论

中医学中,骨骼肌损伤属于“筋伤”范围。《说文解字·筋部》:“筋,肉之力也……竹,物之多筋者。”竹,是含纤维较多的物质;肉,即为肉体。肉、竹、力合起来,即纤维组织,为人体产生力量。肌肉收缩及神经冲动靠的是人体产生力量,因此,从现代意义看,《内经》中所指的筋就是肌肉和神经^[12]。《正体类要》谓:“肢体损于外……脏腑由之不和。”^[13]俗语“伤筋动骨”则说明伤筋会影响骨骼。在骨折的同时也会有筋伤,两者紧密相连。故筋络骨,骨连筋,二者相互协同,才能保证人体关节的正常活动。而传统推拿理论认为^[14]推拿具有舒经通络、活血化瘀、消肿止痛、放松肌肉、滑利关节等作用。现代医学认为在人体的关节、肌肉、韧带、肌腱、鞘膜等特定部位,推拿通过手法可刺激受损肌组织及相邻部位的经络,或经过神经反射调节机体生理、病理状态以达到治疗效果^[15-16],同时利用力学原理,推拿可纠正关节移位、错位,使脊柱、躯干、四肢得以维持其正常形态。这些都证明在骨骼和肌肉损伤康复治疗方面,推拿治疗具有独特优势。

骨骼肌钝性损伤组织机化期受到各类生长因子的调节,激活的肌卫星细胞除部分负责自我更新外,大部分将转化为具有增殖分化能力的成肌细胞,通过相互融合或与损伤残留的肌纤维融合重建肌组织,以组织增生修复为主。因此,组织机化期骨骼肌钝性损伤期应以活血化瘀、理筋整复手法为主。临床研究进展表明,推拿滚法在临床上应用广泛,尤以治疗颈肩、腰部、肌肉运动损伤等方面临床报道较多。近年来^[18],滚法被广泛引用,属推拿手法中频繁使用的手法之一,不仅能扩张血管、促进推拿部位血液循环与淋巴循环,加快血氧代谢,改善微循环,从而达到祛瘀生新^[19-21]作用。而且能减少炎性渗出,减

少或预防粘连,促进渗出液吸收、坏死组织清除,加快受损组织损伤修复^[22-24]。

本实验手法治疗组经小鱼际滚法治疗后,通过HE染色观察可见,手法治疗组肌纤维形状维持较好,炎性细胞浸润较少且有新生的肌纤维。与模型对照组对比,新生血管更明显,组织病理结构更接近正常组织,说明通过小鱼际滚法治疗,能减少肌成纤维细胞的增生,促进肌纤维的恢复、增强血管新生、减少骨骼肌机化,功能上可有助受损的骨骼肌修复。通过WB结果显示,模型对照组和手法治疗组中FN-1、CTGF-1蛋白表达量比空白对照组高,手法治疗组对比模型对照组FN-1和CTGF-1的蛋白表达水平相对较低。其Fibronectin^[25](FN)起调节细胞迁移、生长、分化,维持组织形态的作用。而^[26]CTGF-1具有诱导横向分化成肌细胞,促细胞增殖、黏附、趋化及调节细胞外基质的能力。因此我们可以推断,说明在使用小鱼际滚法治疗可抑制FN-1、CTGF-1蛋白的表达,在损伤后小鱼际滚法能减少肌成纤维细胞的增生,维持肌纤维形态、增强血管新生、减少骨骼肌机化,抑制瘢痕组织形成,对骨架形态恢复起一定作用。减少肌纤维生成,抑制组织机化。并结合动物形态学观察可见,击打部位肿胀及淤血减退,较模型对照组明显减轻,触碰兔子无躲避反射,活动情况(如跳跃、吃食)较模型对照组更自如。

因此,小鱼际滚法对家兔股四头肌损伤修复进行实验研究发现:小鱼际滚法能促进肌肉修复有关的基因表达,可能与修复作用有关。运用小鱼际滚法对组织机化期骨骼肌钝性损伤介入治疗,提示了与运动损伤后功能障碍有密切关系,对推拿临床治疗有着重要指导作用,值得推广应用。

参考文献

- [1] FANBIN MENG, JIANGHAI CHEN, JUAN LIU, et al. Role of transforming growth factor β 1 in the process of fibrosis of denervated skeletal muscle[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology(Medical Sciences),2011,31(1):77-82.
- [2] 尚画雨,白胜超,夏志,等.运动诱导骨骼肌损伤对大鼠骨骼肌线粒体结构和功能的影响[J].北京体育大学学报,2018,41(1):58-63.
- [3] SHU B, SHEN Y, WANG A M, et al. Histologicall, enzymohistochemical and biomechanical observation of skeletal muscle injury in rabbits[J]. Chinese Journal of Traumatology ,2007,10(3):

- 150-153.
- [4] CHINEDU CLETUS UDE, AZIZI MISKON, RUSZYMAH BT HJ IDRUS, et al. Application of stem cells in tissue engineering for defense medicine[J]. *Military Medical Research*, 2018,5(2):140-158.
- [5] MANN C J, PERDIGUERO E, KHARRAZL Y, et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle[J]. *Skeletal Muscle*, 2011,1(1):21.
- [6] 赵娜,张玮,庞康,等.基于TGF- β 1/CTGF作用途径探讨推拿干预骨骼肌纤维化的作用机制[J].*辽宁中医杂志*,2016,43(12):2539-2541.
- [7] 叶晶,钱知知,朱思睿,等.巨噬细胞在肾间质纤维化中的研究进展[J].*中国免疫学杂志*,2019,35(1):110-113.
- [8] 刘劲松,李智尧.膝骨关节炎周围血供变化的影像学观察[J].*中国骨伤*,2017,30(8):701-706.
- [9] HUIMIN L I, XIAO GUANG ZHAO, HONG LI SHAN, et al. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis: involvement in pathogenesis and potential use in diagnosis and therapeutics[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*,2016,6(6):531-539.
- [10] EDDY AAL. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis[J]. *Kidney International Supplements*,2014,4(1):2-8.
- [11] 侯懿烜.按摩对兔股四头肌损伤修复的初步研究[D].重庆:重庆医科大学,2012:69-70.
- [12] ANGELA M F, JANE T, JANE E, et al. Increased substance P expression in the trochanteric bursa of patients with greater trochanteric pain syndrome[J]. *Rheumatology International*,2014,34(10):1441-1448.
- [13] 刘新,娄金丽,孙桂珍.巨噬细胞在肝纤维化中的调控作用[J].*北京医学*,2014,36(3):211-213.
- [14] 邝高艳,卢敏,严可,等.骨伤科筋伤的中医思维模式培养[J].*国际中医中药杂志*,2017,39(8):743-745.
- [15] 罗金松,赵永祥,陈奇刚,等.推拿对急性腰扭伤镇痛机制的研究进展[J].*云南中医中药杂志*,2018,39(7):82-84.
- [16] 盛晟,程晓昱,程丹.复方真武冲剂对心肾阳虚型心衰病人的疗效观察[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2016,14(15):1760-1762.
- [17] 侯懿烜,柳满然,余敏,等.按摩促进兔股四头肌损伤修复的体内研究[J].*中国修复重建外科杂志*,2012,26(3):346-351.
- [18] 罗杨,王淑美,童冰杰,等.除痰解毒方联合吉非替尼对肺腺癌H1975荷瘤小鼠 Twist, Fibronectin 表达的影响[J].*天然产物研究与开发*,2018,30(8):1319-1324,1366.
- [19] CHANDRAN AVINASH, NEDIMYER ALIZA K, REGISTER-MIHALIK JOHNA K, et al. Comment on: "incidence, severity, aetiology and prevention of sports injuries: A review of concepts"[J]. *Sports Medicine*,2019,49(10):
- [20] 陈凯宁,农明善,叶青,等.前交叉韧带缺失对膝半月板各部分应力影响的有限元研究[J].*中国运动医学杂志*,2017,36(7):594-598.
- [21] 朱焯,陈峰,赵海音.针灸推拿治疗椎动脉型颈椎病的临床研究进展[J].*当代医学*,2018,24(10):183-184.
- [22] 刘长幸.放松推拿对轮椅击剑运动员反应时的影响研究[J].*体育科技*,2019,40(2):22-23.
- [23] 李必保.推拿联合针灸对椎动脉型颈椎病患者症状体征总分和椎动脉血流状态的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2016,36(9):82-85.
- [24] 彭亮,李江山,李铁浪,等.不同推拿手法对原发性痛经患者血清PGF_{2 α} 含量及疼痛症状的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2012,32(7):64-66,74.
- [25] 罗杨,王淑美,童冰杰,等.除痰解毒方联合吉非替尼对肺腺癌H1975荷瘤小鼠 Twist, Fibronectin 表达的影响[J].*天然产物研究与开发*,2018,30(8):1319-1324,1366.
- [26] 周强.穴位指压推拿治疗腰腿痛的镇痛疗效观察[J].*临床医药文献电子杂志*,2017,4(33):6373-6376.

(本文编辑 匡静之)