

本文引用: 阮磊, 黄博, 王兰兰, 薛惠天, 孙梦龙, 段苗苗, 彭亮. 推拿揉法对兔骨骼肌钝挫伤修复及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1685-1692.

推拿揉法对兔骨骼肌钝挫伤修复及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

阮磊, 黄博, 王兰兰, 薛惠天, 孙梦龙, 段苗苗, 彭亮*

湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208

〔摘要〕 **目的** 探讨推拿揉法对家兔骨骼肌钝挫伤修复及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。**方法** 36 只健康成年新西兰大耳白兔, 随机分为对照组、模型组、揉法组(每组 12 只), 再根据不同取材时间点分为 1、3、6 d 3 个亚组(每组 4 只)。对照组实验全程正常饲养不予处理。模型组与揉法组采用自制改良重力锤打击装置制备骨骼肌钝挫伤模型, 于造模成功后 7 d 开始治疗, 滚动频率 140 次/min, 3 min/次, 2 次/d, 共治疗 3 d。分别于干预结束后 1、3、6 d 进行取材。通过 HE 和 Masson 染色观察家兔股四头肌病理改变; ELISA 检测家兔血清中白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达; Western blot 检测家兔股四头肌 Wnt3 α 、 β -catenin、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β , p-GSK-3 β)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、I 型胶原蛋白(Collagen I, COL-I)表达。**结果** (1) HE 和 Masson 染色结果显示: 对照组可见肌纤维排列规整有序, 结构完整; 模型组肌纤维大小、粗细、形态不一, 排列紊乱, 间隙增宽, 炎细胞浸润、结缔组织增生以及胶原纤维沉积明显; 揉法组肌纤维无明显变性坏死, 结构相对完整, 可见少量炎细胞浸润, 结缔组织增生与胶原纤维沉积皆明显减少, 修复优于模型组。(2) ELISA 与 Western blot 检测结果: 与对照组相比, 模型组家兔血清 IL-6、TNF- α 以及股四头肌中 Wnt3 α 、 β -catenin、p-GSK-3 β 、TGF- β 1、COL-I 表达量在 1、3、6 d 均显著升高($P < 0.01$), GSK-3 β 表达量显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 揉法组于 1、3、6 d 家兔血清 IL-6、TNF- α 与股四头肌中 Wnt3 α 、 β -catenin、p-GSK-3 β 、TGF- β 1、COL-I 表达量皆明显降低($P < 0.01$), GSK-3 β 表达量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 推拿揉法能有效减轻骨骼肌损伤后体内炎症反应, 减少胶原蛋白沉积, 抑制骨骼肌纤维化, 进而减轻骨骼肌损伤, 促进骨骼肌损伤修复, 其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活性有关。

〔关键词〕 推拿揉法; 骨骼肌钝挫伤; 炎症; 骨骼肌纤维化; 骨骼肌损伤修复; Wnt/ β -catenin 信号通路; 机制

〔中图分类号〕 R244.1

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.09.020

Effects of Tuina rolling manipulation on repair of skeletal muscle blunt contusion and Wnt/ β -catenin signaling pathway in rabbit

RUAN Lei, HUANG Bo, WANG Lanlan, XUE Huitian, SUN Menglong, DUAN Miaomiao, PENG Liang*

School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine,

Changsha, Hunan 410208, China

〔Abstract〕 Objective To explore the effects of Tuina rolling manipulation on the repair of skeletal muscle blunt contusion and Wnt/ β -catenin signaling pathway in rabbit. **Methods** A total of 36 healthy adult New Zealand big-eared white

〔收稿日期〕 2023-05-27

〔基金项目〕 国家自然科学基金面上项目(82174521)。

〔第一作者〕 阮磊, 女, 硕士研究生, 研究方向: 推拿治病机制的研究。

〔通信作者〕 * 彭亮, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 550639573@qq.com。

rabbits were randomly divided into a control group, a model group, and a rolling group (12 rabbits in each group), and then divided into 3 subgroups (4 rabbits in each group) according to the different time points of sampling, namely, 1 d, 3 d, and 6 d. The control group was fed normally throughout the entire experimental period without treatment. The skeletal muscle blunt contusion model was prepared by self-made improved gravity hammer percussion device in model group and rolling manipulation group, and the treatment started 7 days after the successful modeling, with a frequency and duration of 140 rolls/min, 3 min/time, and 2 times/d, for a total of 3 days. Samples were taken on 1d, 3d, and 6d after the intervention. HE and Masson staining were used to observe the pathological changes of quadriceps femoris in rabbits; the expressions of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rabbit serum were checked by ELISA; Western-Blot was used to measure the protein expressions of Wnt3 α , β -catenin, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β (p-GSK-3 β), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and Collagen I (COL-I) in the muscles. **Results** (1) The results of HE and Masson staining showed that: the muscle fibers of the quadriceps femoris of rabbits in the control group were well arranged and structurally intact; those in the model group were of different sizes, thicknesses and forms, and were arranged in a disordered manner, with widened gaps as well as obvious inflammatory cell infiltration, connective tissue proliferation, and collagen fiber deposition; those in the rolling manipulation group showed no obvious degeneration and necrosis, and the structures were relatively intact with a low degree of inflammatory cell infiltration, and the connective tissue proliferation and collagen fiber deposition were significantly reduced, which made the repair superior to that of the model group. (2) The results of ELISA and Western blot showed that: compared with the control group, the serum levels of IL-6 and TNF- α as well as the expressions of Wnt3 α , β -catenin, p-GSK-3 β , TGF- β 1, and COL-I in the quadriceps femoris of rabbits in the model group were significantly elevated on 1 d, 3 d, and 6 d ($P<0.01$), while GSK-3 β expression was significantly lower ($P<0.01$); compared with the model group, the serum levels of IL-6 and TNF- α and the expressions of Wnt3 α , β -catenin, p-GSK-3 β , TGF- β 1, and COL-I in the quadriceps femoris of rabbits in the rolling manipulation group on 1 d, 3 d, and 6 d were significantly reduced ($P<0.01$), while GSK-3 β expression was significantly elevated ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Tuina rolling manipulation can effectively reduce the inflammatory response in vivo after skeletal muscle injury, decrease collagen deposition and inhibit skeletal muscle fibrosis, thereby alleviating skeletal muscle injury and promoting the repair of injured skeletal muscles, the reason for which may be related to the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway activity.

[**Keywords**] Tuina rolling manipulation; skeletal muscle blunt contusion; inflammation; skeletal muscle fibrosis; repair of injured skeletal muscles; Wnt/ β -catenin signaling pathway; mechanism

骨骼肌钝挫伤是骨骼肌损伤中较为常见的类型之一,主要是指由外界重力物体造成的机械损伤,常伴随受损局部肌细胞受损、毛细血管破裂、浸润性出血、水肿、炎症以及氧化应激等一系列内在病理变化,从而进一步加重组织损伤^[1-2]。病理性纤维化是骨骼肌损伤修复异常的主要病理表现,是由于细胞外基质生成或累积过度使得原有正常组织被胶原瘢痕取代所致^[1-3],其外在常表现为肢体功能受限或障碍,且易发生二次损伤^[4]。因此,进一步探究骨骼肌损伤的相关病理机制,探讨如何有效减轻骨骼肌损伤后的病理改变,提高骨骼肌功能恢复质量,是当下医体结合领域研究的重要课题之一。研究显示,Wnt/ β -catenin 信号通路与转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/smads 信号通路之间存在一定串扰^[5-7],二者的激活与多种组织、器官纤维

化的形成关系密切,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可有效降低细胞外基质的沉积、抑制纤维化,进而提高骨骼肌修复质量,促进骨骼肌功能恢复^[8-9]。故 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制可能是抑制骨骼肌纤维化,从而减轻骨骼肌损伤的另一关键靶点。前期研究证实,推拿揉法对骨骼肌损伤修复具有明显的促进作用,并能通过调控 TGF- β 1/smads 信号通路,减少损伤骨骼肌纤维化,从而促进修复^[1]。但推拿揉法抑制骨骼肌损伤后纤维化与 Wnt/ β -catenin 信号通路的关系尚未见相关研究。基于此,本实验拟通过建立家兔骨骼肌钝挫伤模型,观察推拿揉法对家兔受损骨骼肌病理变化、胶原沉积、炎症因子以及 Wnt/ β -catenin 信号通路表达水平的影响,探究推拿揉法通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制骨骼肌损伤后纤维化的可能性,为进一步探讨推拿揉法促进骨骼

肌损伤修复提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

36只成年健康普通级新西兰大耳白兔,雌雄各半,体质量2~2.5 kg,由湖南中医药大学动物实验中心采购供应[动物许可证号:SCXK(湘)2020-0005]。于湖南中医药大学动物实验中心普通级动物房进行饲养,室温20~25℃,湿度50%~70%,定时进食进水。实验方案由湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准并通过(批准编号:LL2022042006)。

1.2 主要仪器与试剂

实验动物揉法按摩器(授权公开号:CN216365872U);按摩手法测试仪(上海腾荫教学仪器有限公司,型号:ZTC-II);脱水机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JJ-12J);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);病理切片机(浙江金华益迪试验器材,型号:YD-315);电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,型号:MS204TS];电泳电源、脱色摇床、抗体孵育盒(武汉 Servicebio 公司,型号:SPW-6S、DS-2S100、G9055-4)。

HE染色试剂盒、Masson染色试剂盒、兔源Wnt3a抗体、鼠源 β -catenin抗体、兔源糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)抗体、兔源磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β , p-GSK-3 β)抗体、兔源TGF- β 1抗体、兔源I型胶原蛋白(Collagen I, COL-I)抗体、鼠源 β -actin抗体、50 \times Cocktail蛋白酶抑制剂、磷酸化蛋白酶抑制剂、RIPA裂解液、脱脂奶粉、转膜缓冲液、电泳缓冲液、TSB缓冲液(武汉 Servicebio 公司批号:G1005、G1006、GB113750、GB12015、GB11099、GB114582、GB111876、GB114197、GB15001、G2006-250UL、G2007-1mL、G2002、GC310001-100 g、G2017、G2018、G0001-2L);戊巴比妥钠(德国 Merck 公司,批号:P3761)。

1.3 动物分组与造模

实验家兔适应性喂养7 d后,依照随机数字表分为对照组、模型组、揉法组,每组12只,再根据不同取材时间点随机分为干预结束后第1天、第3天、第6天(下称干预结束后1、3、6 d)3个亚组,每组4只。

对模型组、揉法组家兔参考文献[10-12]的方法建立骨骼肌钝挫伤模型。重力锤打击装置参数:重力锤0.85 kg;打击面为直径1.5 cm的平滑木制圆柱;导向管为长30 cm、直径1.8 cm的中空不锈钢管。造模方法:将家兔仰卧位固定在兔台,在家兔右下肢股四头肌背面与兔台之间放置厚度约1 cm的脱脂棉垫以充分暴露股四头肌平面;击打部位为家兔右下肢内侧股四头肌肌腹(约髌底上3.5 cm)中段;实验人员控制重力锤,将重力锤提至导向管最上端(重力锤最下端与导向管最上端处于同一水平),随后放手让重力锤沿导向管自由落体,连续打击6次,打击面积约为1.77 cm²,动能为3.33 J,冲量为2.38 N·s。打击处肉眼可见红肿、瘀血但无皮肤破损,且经检查(触碰)股骨结构完整,光镜下可见明显肌细胞变性、水肿、出血以及炎症反应,表明造模成功^[13]。预实验造模后随机选取并处死2只家兔患处取材进行病理检测,详见图1。对照组家兔正常喂养。

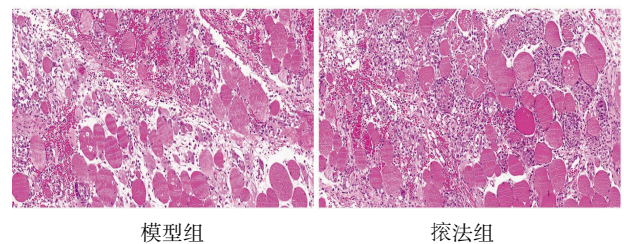


图1 造模后骨骼肌病理改变(HE, $\times 200$)

1.4 干预方法

为保证手法操作标准化,由同一实验人员完成操作。在正式实验前,实验人员在ZTC-II按摩手法测试仪上进行反复多次测试训练以便熟练掌握。造模成功后7 d开始进行干预^[14]。将揉法组家兔仰卧位固定于兔台,充分暴露右下肢股四头肌内侧损伤部位,采用课题组自制揉法按摩器附于股四头肌实施揉法^[15],前后滚动力度比约为3:1,最大下压力约为3 N,操作频率为140次/min,3 min/次,2次/d,连续治疗3 d。对照组、模型组家兔进行同时段捆绑,不予任何其他干预。

1.5 指标检测

1.5.1 取材 分别于干预结束后1、3、6 d进行取材。按批次家兔耳中动脉采血,静置分层后对称放入离心机中离心。采血完成后,2%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉。待家兔完全麻醉后,家兔颈动脉分离放血处死,死后立即进行取材。取右下肢股四头肌患处组织一小块(约1 cm \times 1 cm \times 0.5 cm),于冰板上

对肌肉组织进行切割分离成两等份。其中,一份采用4%多聚甲醛浸泡固定,用于HE和Masson染色;另外一份立即放入-80℃冰箱保存,用于Western blot检测。

1.5.2 骨骼肌病理形态观察 (1)取材:将组织用4%多聚甲醛固定24 h以上,取出修正放入对应脱水盒内。(2)脱水浸蜡:脱水盒放置于脱水机内降梯度(95%→85%→70%)浸入乙醇内脱水。(3)包埋、切片:将组织完全浸入热蜡中包埋,待组织热退成块后修整切片。(4)HE染色:室温下将所制备的切片滴加适量苏木精染液,时间到后取出再将切片放入1%乙醇盐酸溶液中,以达到去除多余苏木精的目的,随后反染5 min。(5)Masson染色:将制备的切片依次使用重铬酸钾隔、铁苏木素、丽春红浸染,每步时间长度不等,浸染完成后皆用自来水清洗;随后,使用磷钼酸与苯胺蓝染色、醋酸分化,透明封片,使用专业阅片软件进行图像采集分析。

1.5.3 ELISA检测血清中白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达 家兔耳中动脉采血,静置1~2 h,待分层后匀称放入离心机内,以1 300 r/min、半径8 cm离心10 min,取出,使用移液枪吸取上清液至离心管,随后立即放入-80℃冰箱保存。采用ELISA测定样本中IL-6和TNF- α 两者浓度,具体操作方法按试剂盒说明书步骤进行。

1.5.4 Western blot检测股四头肌中Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、TGF- β 1、COL-I表达

剪取受损骨骼肌组织,并加入400 μ L RIPA裂解液,在低温条件下反复研磨10 min,置于4℃左右的离心机内,以12 000 r/min、半径8 cm离心15 min,提取上清液转移至1.5 mL离心管中,后经过制胶、蛋白上样、电泳、转膜、封闭、抗体孵育(β -actin一抗1:2 000,Wnt3a一抗1:3 000, β -catenin一抗1:2 000,GSK-3 β 一抗1:3 000,p-GSK-3 β 一抗1:3 000,TGF- β 1一抗1:3 000,COL-I一抗1:3 000、二抗1:5 000)、显色曝光,检测骨骼肌中Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、TGF- β 1、COL-I蛋白表达量。采用专业灰度分析软件对所得蛋白条带进行分析。

1.6 统计学方法

采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,服从正态分布采用One-Way ANOVA检验,方差齐采用LSD检验,方差不齐则采用Games-Howel检验;组内比较采用重复测量的方差分析;不满足正态分布用秩和检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组家兔股四头肌病理变化

对照组肌细胞排列规整有序,细胞间隙狭小,细胞膜完整,细胞质均匀,细胞核统一位于肌细胞边缘;模型组肌细胞大小、形态不一,排列紊乱,间隙增宽,细胞膜边界不清,细胞质染色不均,炎细胞浸润,结缔组织增生明显,随时间延长炎细胞浸润有所减少;揉法组肌细胞结构相对完整,细胞间隙缩小,排列规整,少量炎细胞浸润,结缔组织明显减少。详见图2。

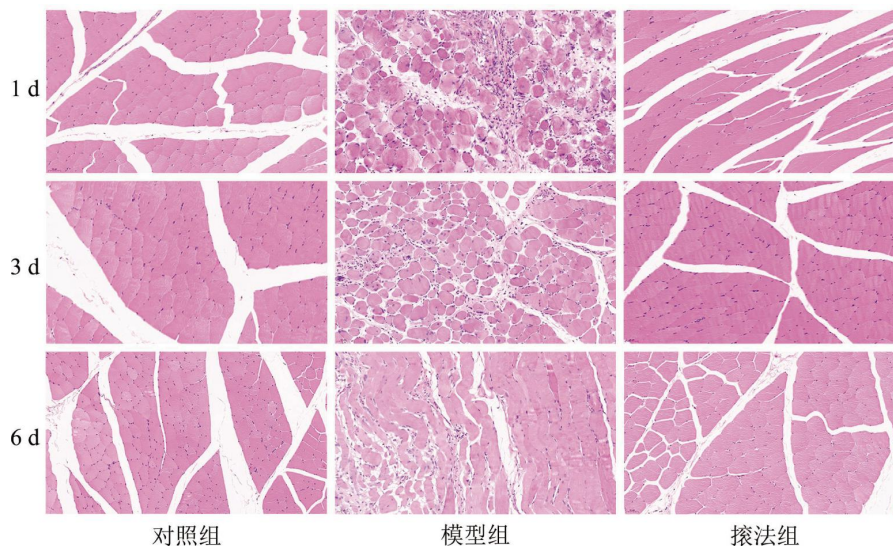


图2 各组家兔股四头肌病理变化(HE, $\times 200$)

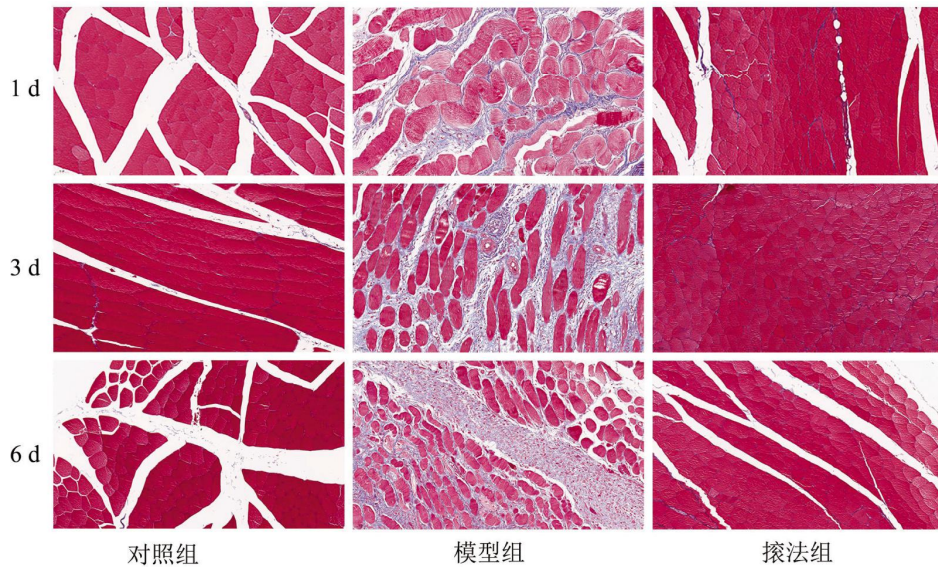


图3 各组家兔股四头肌肌纤维变化(Masson 染色, $\times 200$)

2.2 各组家兔股四头肌肌纤维变化

对照组可见红染骨骼肌纤维排列规整紧凑,形态大小一致,肌束膜包裹完整,未见有明显胶原纤维沉积;模型组可见肌纤维形态多样,粗细不均,间隙增宽,四周被大量蓝染的胶原纤维包绕,且随时间推移胶原沉积逐渐增多;揉法组肌纤维结构相对完整,粗细较为均匀一致,周围包绕的蓝色胶原纤维显著减少,随时间推移逐渐接近对照组。详见图3。

2.3 各组家兔股四头肌胶原沉积比较

与对照组相比,1、3、6 d 模型组家兔股四头肌胶原沉积均显著升高($P<0.01$);与模型组相比,揉法组同一时间点的家兔股四头肌胶原沉积明显降低($P<0.05, P<0.01$)。详见图4。

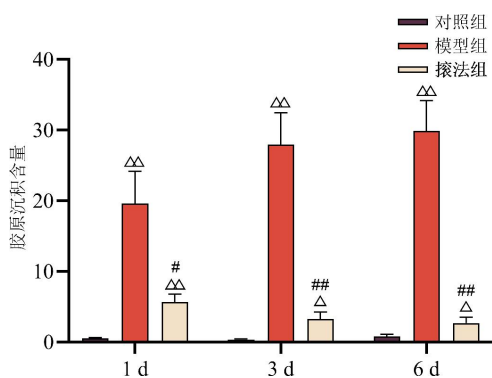


图4 各组家兔股四头肌胶原沉积比较

注:与对照组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较, $\# P<0.05$, $\#\# P<0.01$ 。

2.4 各组家兔血清中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 表达比较

与对照组相比,模型组家兔血清中 IL-6 和 TNF- α

水平在 1、3、6 d 均显著升高($P<0.01$);与模型组相比,揉法组家兔血清中 IL-6 和 TNF- α 水平于 1、3、6 d 均显著降低($P<0.01$)。详见图5—6。

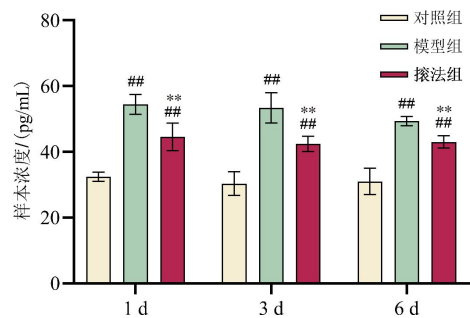


图5 各组家兔血清中 IL-6 表达比较

注:与对照组比较, $\# P<0.01$;与模型组比较, $\#\# P<0.01$ 。

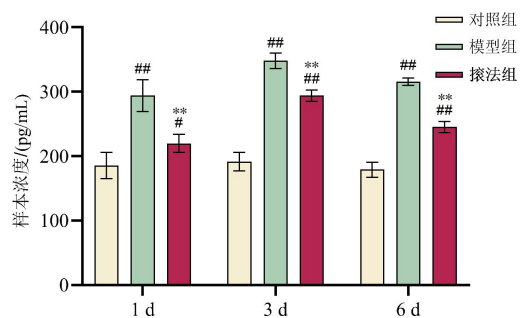


图6 各组家兔血清中 TNF- α 表达比较

注:与对照组比较, $\# P<0.05$, $\#\# P<0.01$;与模型组比较, $\#\# P<0.01$ 。

2.5 各组家兔股四头肌通路蛋白 Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 表达比较

与对照组相比,1、3、6 d 模型组家兔股四头肌中 Wnt3a、 β -catenin、p-GSK-3 β 表达量均显著升高($P<0.01$), GSK-3 β 表达量显著降低($P<0.01$);与模

表 1 各组家兔股四头肌 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Wnt3a			β -Catenin		
		1 d	3 d	6 d	1 d	3 d	6 d
对照组	4	0.25±0.07	0.26±0.08	0.30±0.06	0.22±0.03	0.20±0.04	0.22±0.03
模型组	4	0.82±0.03 ^{##}	0.87±0.09 ^{##}	0.96±0.17 ^{##}	0.62±0.10 ^{##}	0.68±0.08 ^{##}	0.78±0.05 ^{##}
揉法组	4	0.54±0.08 ^{###}	0.43±0.03 ^{###}	0.18±0.04 ^{**}	0.41±0.06 ^{###}	0.38±0.09 ^{###}	0.22±0.06 ^{**}

注:与对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

表 2 各组家兔股四头肌 GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	GSK-3 β			p-GSK-3 β		
		1 d	3 d	6 d	1 d	3 d	6 d
对照组	4	1.24±0.12	1.43±0.30	1.41±0.32	0.16±0.04	0.13±0.05	0.16±0.04
模型组	4	0.84±0.11 ^{**}	0.75±0.13 ^{**}	0.59±0.07 ^{**}	0.77±0.07 ^{**}	0.84±0.08 ^{**}	1.08±0.04 ^{**}
揉法组	4	1.14±0.07 ^{##}	1.19±0.09 [#]	1.30±0.09 ^{##}	0.35±0.03 ^{###}	0.26±0.04 ^{###}	0.12±0.01 ^{##}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表 3 各组家兔股四头肌 TGF- β 1、COL-I 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF- β 1			COL-I		
		1 d	3 d	6 d	1 d	3 d	6 d
对照组	4	0.32±0.03	0.34±0.01	0.34±0.02	0.21±0.01	0.20±0.02	0.20±0.02
模型组	4	1.14±0.33 ^{##}	0.96±0.31 ^{##}	0.85±0.24 ^{##}	0.98±0.14 ^{##}	0.87±0.13 ^{##}	0.84±0.11 ^{##}
揉法组	4	0.68±0.13 ^{**}	0.52±0.07 ^{**}	0.49±0.08 ^{**}	0.62±0.09 ^{###}	0.58±0.10 ^{###}	0.54±0.09 ^{###}

注:与对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

型组比较,揉法组家兔股四头肌中 Wnt3a、 β -catenin、p-GSK-3 β 表达量于 1、3、6 d 均明显降低($P<0.01$),而 GSK-3 β 表达量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 1—2、图 7。

2.6 各组家兔股四头肌 TGF- β 1、COL-I 蛋白表达比较

与对照组相比,1、3、6 d 模型组家兔股四头肌中 TGF- β 1、COL-I 表达量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,同一时间点揉法组家兔股四头肌中 TGF- β 1、COL-I 表达量皆明显降低($P<0.01$)。详见表 3、图 7。

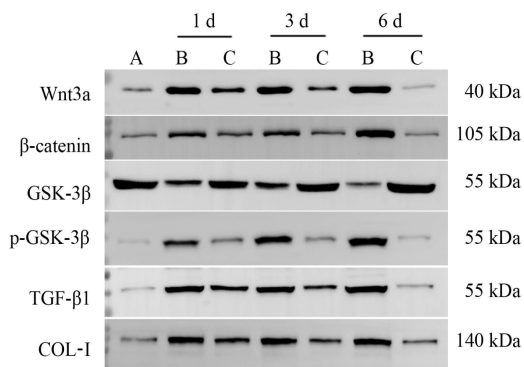


图 7 各组家兔股四头肌 Wnt3a、 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、TGF- β 1、COL-I 蛋白条带图

注:A.对照组;B.模型组;C.揉法组。

3 讨论

骨骼肌损伤是常见的软组织损伤疾病,其主要表现为局部红、肿、热、痛以及功能受限或障碍^[16],现代学者大多将其归属为中医学“筋伤”范畴^[17-18]。“跌打损伤,血瘀气滞,经脉阻塞不通”是筋伤病最为主要的发病机制。现代研究证实,推拿揉法作为传统中医外治法之一,能够产生活血化瘀、解痉镇痛、舒筋通络等治疗效应^[19]。炎症与纤维化是骨骼肌损伤后常见的病理改变。IL-6 是引发各种炎症反应的关键性细胞因子,在组织内环境稳态中发挥着双向调控作用,此外,还可通过介导多条信号传导途径,促进炎症反应与纤维化的发生^[20-21]。TNF- α 是介导炎症反应的促炎因子之一,其长时间高水平表达可对肌肉修复以及纤维化产生重大影响^[22-24]。有研究表明,病理条件下 TNF- α 与 IL-6 含量变化趋势与创伤程度呈正相关,是直接映射损伤程度的重要指标^[25]。TGF- β 1 是目前公认的最强致纤维化因子,与器官、组织等纤维化的形成密切相关^[26]。课题组前期研究显示,推拿揉法治疗骨骼肌损伤疗效显著,可有效改善受损局部微循环、抑制炎症反应与纤维化、减轻骨骼肌损伤、提高修复质量、促进肢体功能恢复^[1, 10-12, 27]。

本研究中,造模后模型组家兔病理染色显示炎细胞浸润和胶原纤维沉积明显,且血清 IL-6、TNF- α 与肌肉组织 TGF- β 1、COL-I 表达量显著升高;然经滚法治疗后,滚法组家兔病理染色炎细胞浸润和胶原纤维沉积明显减少,修复优于模型组,血清 IL-6、TNF- α 与肌肉组织 TGF- β 1、COL-I 表达量明显降低。以上结果表明,推拿滚法可有效抑制炎症反应与纤维化,减轻骨骼肌损伤,促进骨骼肌损伤修复,与前期研究结果一致^[12,14,27]。

Wnt 配体是一种富含半胱氨酸的分泌型糖蛋白,可以通过自分泌或旁分泌的途径选择性与膜上受体相结合,将膜外信号传导至细胞膜内,进而激活膜内一系列信号转导途径,是 Wnt/ β -catenin 信号通路激活的始动因子^[28-30]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键调节因子,伴随 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活可发生核转移,进而调节下游靶基因的表达^[29]。GSK-3 β 是介于 Wnt 配体与 β -catenin 之间的重要信号转导因子之一,也是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键负向调控因子。在无 Wnt 配体的条件下,GSK-3 β 能够与腺瘤性结肠息肉蛋白、轴蛋白等形成复合物,使 β -catenin 磷酸化而被泛素化降解。相反,GSK-3 β 因磷酸化失活,致使细胞质中的 β -catenin 磷酸化降解受阻而含量增加,游离的 β -catenin 核转移增加进一步激活 Wnt 信号通路,介导其下游靶基因的表达^[30-32]。由此可知,Wnt3a、GSK-3 β 、 β -catenin 是评判 Wnt/ β -catenin 信号通路活性的重要标志。孟丽红等^[33]通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路相关分子基因及蛋白表达,从而减轻肺纤维化大鼠模型中的肺泡炎症反应,且对肺纤维化的发展产生了抑制作用。刘晶等^[34]研究发现,抑制 Wnt3a/ β -catenin 信号通路可有效减轻膝骨关节炎兔股直肌纤维化程度。此外,国外学者 BRACK 等^[35]通过小鼠体外注射 Wnt3a 重组蛋白观察发现,骨骼肌内细胞外基质沉淀增加,使受损骨骼肌纤维化进一步加剧;反之,Wnt 抑制剂可有效降低胶原蛋白等细胞外基质组分沉积,抑制骨骼肌纤维化的发展。TRENDSZ 等^[36]研究结果与 Brack 等研究相一致。以上研究均表明,Wnt/ β -catenin 信号通路在纤维化的发展进程中扮演着十分重要的角色。本研究结果显示,造模后,家兔股四头肌 Wnt3a、 β -catenin、p-GSK-3 β 表达量均显著升高,而 GSK-3 β 表达量显著降低,表明 Wnt/

β -catenin 信号通路已处于被激活状态;经滚法治疗后,家兔股四头肌 Wnt3a、 β -catenin、p-GSK-3 β 表达量显著降低,而 GSK-3 β 表达量显著升高,说明本研究中推拿滚法对 Wnt/ β -catenin 信号通路产生了一定的抑制作用。

综上所述,推拿滚法能显著改善骨骼肌钝挫伤后炎症反应与纤维化等病理改变,减轻骨骼肌损伤,提高骨骼肌修复质量,其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活性有关。本实验研究为推拿滚法临床治疗骨骼肌损伤提供了一定的基础理论参考,但本实验未对 Wnt/ β -catenin 信号通路下游相关纤维蛋白靶基因进行检测,在后期实验中可针对下游靶基因的表达量进行相关探查,进一步完善 Wnt/ β -catenin 信号通路在骨骼肌损伤修复中的作用机制。

参考文献

- [1] 王兰兰,薛惠天,孙梦龙,等.推拿滚法对兔骨骼肌急性钝挫伤组织 TNF- α 及 SphK1、S1PR3 表达的影响[J].中国中医药信息杂志,2023,30(6):129-134.
- [2] SMITH C, KRUGER M J, SMITH R M, et al. The inflammatory response to skeletal muscle injury: Illuminating complexities[J]. Sports Medicine, 2008, 38(11): 947-969.
- [3] MANN C J, PERDIGUERO E, KHARRAZ Y, et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle[J]. Skeletal Muscle, 2011, 1(1): 21.
- [4] 林建平,王浩,郭明玲,等.骨骼肌钝挫伤的损伤与修复机制研究进展[J].康复学报,2022,32(1):88-94.
- [5] GEWIN L. The many talents of transforming growth factor- β in the kidney[J]. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2019, 28(3): 203-210.
- [6] SUN Q, GUO S, WANG C C, et al. Cross-talk between TGF- β /Smad pathway and Wnt/ β -catenin pathway in pathological scar formation[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015, 8(6): 7631-7639.
- [7] GUO Y, XIAO L, SUN L, et al. Wnt/beta-catenin signaling: A promising new target for fibrosis diseases[J]. Physiological Research, 2012, 61(4): 337-346.
- [8] CISTERNAS P, VIO C P, INESTROSA N C. Role of Wnt signaling in tissue fibrosis, lessons from skeletal muscle and kidney[J]. Current Molecular Medicine, 2014, 14(4): 510-522.
- [9] CISTERNAS P, HENRIQUEZ J P, BRANDAN E, et al. Wnt signaling in skeletal muscle dynamics: Myogenesis, neuromuscular synapse and fibrosis[J]. Molecular Neurobiology, 2014, 49(1): 574-589.
- [10] 艾珏萍,罗婷,吴安林,等.小鱼际滚法对组织化期骨骼

- 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.
- [11] 卢园, 陈海南, 杨舟, 等. 小鱼际擦法对兔骨骼肌急性钝挫伤组织机化期 GDF-8/Smad2 通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(9): 1345-1349.
- [12] 吴安林, 艾珏萍, 谢秀惠, 等. 推拿对骨骼肌损伤组织机化期 TGF- β 1、IL-6 及 TNF- α 的影响[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(2): 136-138.
- [13] 吴安林, 艾珏萍, 谢秀惠, 等. 兔急性骨骼肌损伤模型的建立及分期确定[J]. 山西中医药大学学报, 2020, 21(4): 257-259.
- [14] 薛惠天, 王兰兰, 孙梦龙, 等. 不同时间点擦法按摩器对骨骼肌损伤家兔炎症反应的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2023, 45(4): 433-438.
- [15] 王兰兰, 薛惠天, 孙梦龙, 等. 一种实验动物擦法器: CN216365872U[P]. 2022-04-26.
- [16] 袁元, 张宏, 张国辉, 等. 运动性骨骼肌损伤微结构改变与康复治疗研究进展[J]. 按摩与康复医学, 2023, 14(6): 29-33.
- [17] 陈羽楠, 林丹红, 陈立典. 试析五体理论与中医运动功能[J]. 中医杂志, 2018, 59(4): 276-280.
- [18] 赖宇阳, 李楠. 基于《黄帝内经》探讨骨骼肌归属范畴[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(6): 491-495.
- [19] 屈庆, 张宏, 张国辉. 推拿擦法舒经通络效应机制浅析[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(3): 598-600.
- [20] FORCINA L, MIANO C, SCICCHITANO B M, et al. Signals from the niche: Insights into the role of IGF-1 and IL-6 in modulating skeletal muscle fibrosis[J]. *Cells*, 2019, 8(3): 232.
- [21] FORCINA L, MIANO C, MUSARÒ A. The physiopathologic interplay between stem cells and tissue niche in muscle regeneration and the role of IL-6 on muscle homeostasis and diseases[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2018, 41: 1-9.
- [22] 黄博, 阮磊, 王兰兰, 等. 推拿治疗骨骼肌损伤的分子生物学机制研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(4): 753-758.
- [23] 薛惠天, 王兰兰, 孙梦龙, 等. 推拿手法对骨骼肌损伤修复炎症因子的影响综述[J]. 亚太传统医药, 2023, 19(4): 247-251.
- [24] PABLOS A, CECA D, JORDA A, et al. Protective effects of foam rolling against inflammation and notexin induced muscle damage in rats[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2020, 17(1): 71-81.
- [25] 张剑, 颜碧清, 徐俊龙, 等. 创伤性休克患者血清 TNF- α 、IL-6 变化的意义[J]. 浙江中西医结合杂志, 2008, 18(2): 103-104.
- [26] 李光璨, 翟超, 张晓轩, 等. 转化生长因子 β 1 在宫腔粘连中的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2023, 42(1): 83-88.
- [27] 薛惠天, 王兰兰, 孙梦龙, 等. 云南白药气雾剂与推拿擦法对兔骨骼肌损伤急性期核因子- κ B 信号通路及炎症因子变化的影响[J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(3): 80-86.
- [28] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [29] LIU J Q, XIAO Q, XIAO J N, et al. Wnt/ β -catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7: 3.
- [30] HAYAT R, MANZOOR M, HUSSAIN A. Wnt signaling pathway: A comprehensive review[J]. *Cell Biology International*, 2022, 46(6): 863-877.
- [31] CLEVERS H, NUSSE R. Wnt/ β -catenin signaling and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-1205.
- [32] HUANG P, YAN R, ZHANG X, et al. Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: Challenges and opportunities[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2019, 196: 79-90.
- [33] 孟丽红, 张晓梅, 周波波, 等. 养阴益气方对肺纤维化大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(1): 68-73, 84.
- [34] 刘晶, 林巧璇, 卢莉铭, 等. 基于 Wnt3a/ β -catenin 信号通路探讨针刀对膝关节兔股直肌纤维化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 136-140.
- [35] BRACK A S, CONBOY M J, ROY S, et al. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis[J]. *Science*, 2007, 317(5839): 807-810.
- [36] TRENSZ F, HAROUN S, CLOUTIER A, et al. A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the Wnt canonical pathway[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2010, 299(5): C939-C947.

(本文编辑 匡静之)