

• 实验研究 •

家兔骨骼肌急性钝挫伤早期推拿干预的实验研究^{*}

李应志¹, 张吉¹, 王春林^{2△}

(1. 云南中医学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南中医学院第一附属医院, 云南 昆明 650021)

摘要: **目的** 研究家兔骨骼肌急性钝挫伤后推拿在急性期干预的作用机制。**方法** 24只家兔用计算机随机分为4组, 每组6只: 伤后20 min手法组(A)、伤后72 h手法组(B)、损伤观察组(C)、正常对照组(D)。以上除正常对照组外均造成右侧腓肠肌钝挫伤模型, 各组第14天取材观察。**结果** 肿胀度方面, 从第1~14天中, A、B 2组无明显统计学意义($P>0.05$); 体重与腓肠肌湿重比, A、B 间有统计学意义($P<0.05$); IGF-1 mRNA 和 MyoD mRNA 结果统计, A、B 间无统计学意义($P>0.05$), 但从数据趋势分析上, B 组数值偏大。**结论** 家兔骨骼肌在急性损伤后72 h进行推拿治疗可能优于伤后20 min推拿治疗。

关键词: 推拿; 骨骼肌; 钝挫伤; 兔

中图分类号: R244.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)05-0001-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.05.001

Experimental Study on Early Massage Intervention on Acute Blunt Contusion of Skeletal Muscle in Rabbits

LI Yingzhi¹, ZHANG Ji¹, WANG Chunlin²

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. The First Affiliated Hospital of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China)

ABSTRACT: **Objective** To study the mechanism of massage therapy during the acute phase of acute blunt contusion in rabbits. **Methods** 24 rabbits were randomly divided into 4 groups by computer, there are 6 rabbits each group: massage group after 20 minutes injury(A), massage group after 72 hours injury(B), injury observation group(C), blank group(D). All the rabbits's right gastrocnemius muscles were blunt injury except the normal control group. **Results** There was no significant statistical significance in A and B from 1d to 14 d in terms of swelling degree. The ratio of body weight to wet weight of gastrocnemius was statistically significant between A and B ($P<0.05$). The IGF-1 mRNA and MyoD mRNA results were no statistical significance between A and B, but the value of group B was relatively large. **Conclusion** The 72 hours massage therapy of skeletal muscle after acute injury may be better than that in 20 minutes in rabbits.

KEY WORDS: massage; skeletal muscle; blunt trauma; rabbits

骨骼肌损伤在运动训练以及军事训练中是一种常见的损伤, 其发生率占运动损伤总数的10%~55%, 其中急性钝挫伤和牵拉伤的发生率占90%以上^[1]。在对抗性运动项目中, 股四头肌和腓肠肌是骨骼肌钝挫伤的最好发部位^[2]。推拿在软组织损伤的保守治疗中占有重要地位, 对软组织损伤恢复有很好疗效^[3], 近年

来被广泛运用于运动损伤治疗中。推拿能否在急性期介入治疗, 在中医学界是一个有争议的话题, 到目前为止还缺乏相应的实验基础^[4]。笔者设计了相应的动物实验, 以探索急性期手法干预的可行性和作用机制。

1 研究方法

1.1 研究对象 以6月龄新西兰雄兔24只为研究

收稿日期: 2018-09-16

^{*} 基金项目: 云南省卫计委课题(2014NS313)

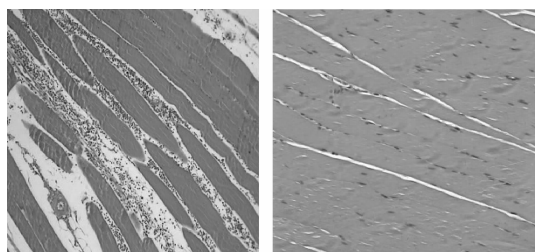
第一作者简介: 李应志(1982-), 博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 推拿治疗损伤性疾病的机理。

△通信作者: 王春林, E-mail: 2478026881@qq.com

对象, 体质量(2.66 ± 0.21) kg, 由昆明楚商科技有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(滇)K2018-0001。

1.2 分组 把 24 只家兔用计算机随机分为 4 组: 伤后 20 min 手法组(A)6 只, 伤后 72 h 手法组(B)6 只、损伤观察组(C)6 只、正常对照组(D)6 只。以上除正常对照组外均造成右侧腓肠肌钝挫伤模型, 各组第 14 天取材观察。

1.3 造模方法 将家兔右下肢腓肠肌肌腹处用 8% 硫化钠脱毛剂脱毛, 固定在兔盒内后, 再将右下肢固定在造模的打击台上, 造模方法在胡军^[9]等基础上进行改良, 在家兔腓肠肌最高点处用记号笔标记“+”号, 用重力锤对准标记从高处自由落体造成打击伤。打击物重 500 g, 下落高度 50 cm, 动能为 2.45 J, 连续打击 3 次。打击后 30 min 可见家兔被打击处的腓肠肌肿胀, 为验证造模效果, 造模后第 2 天将家兔空气栓塞处死后即刻在受伤处取材, 经 HE 染色后观察, 和空白组比较, 发现造模组有肌纤维断裂、肿胀, 间质中渗出大量红细胞、炎症细胞。部分肌丝破坏损伤, 炎症细胞浸润。见图 1。



a. 伤后第 2 天(20X) b. 空白组(20X)

图 1 造模组与空白组切片 HE 染色比较

1.4 干预手段和方法 为尽量保证手法的统一性, 参与手法干预的人员为一名有 10 年工作经验的推拿医生, 采取分批造模和取材。常规手法组: 伤后 72 h, 按揉法作用于家兔委中穴 1 min, 而后在损伤的部位按揉法操作 10 min, 1 次/d。急性期手法组: 伤后 20

min 组用按揉法作用于家兔委中穴 1 min, 而后用推抹法, 压力以刚带动皮肤向前滚动为宜, 频率为 40 次/min, 每次治疗时间 10 min, 1 次/d, 72 h 后改为常规组手法。对照组: 造模后不做任何手法治疗, 每日测量重量和肿胀度变化, 到第 14 天取材。空白组: 不进行任何干预, 同等条件下饲养, 仅进行体重和下肢周长测量, 到第 14 天取材。

1.5 检验指标和方法 取材组织为家兔腓肠肌, 以受伤最明显处为最佳取材部位。成肌生长因子 MyoD 和胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) mRNA 含量采用 RT-PCR 试剂盒进行检测。试剂盒采用天根生化科技有限公司 (DP431), 编号分别为 DRR036A 和 DRR820A。所用设备为超微量核酸蛋白检测仪 Thermo Nano Drop; ABI PCR 仪 (型号: Veriti); 安捷伦核酸扩增荧光检测仪 (型号: MX3000P)。RNA 提取试剂盒说明书操作, RNA 含量测定、拟转录等均严格按照测检步骤进行。

HE 染色: 将腓肠肌组织修切成小块放入 10% 中性福尔马林溶液中固定。然后按照操作步骤包埋、切片、染色。

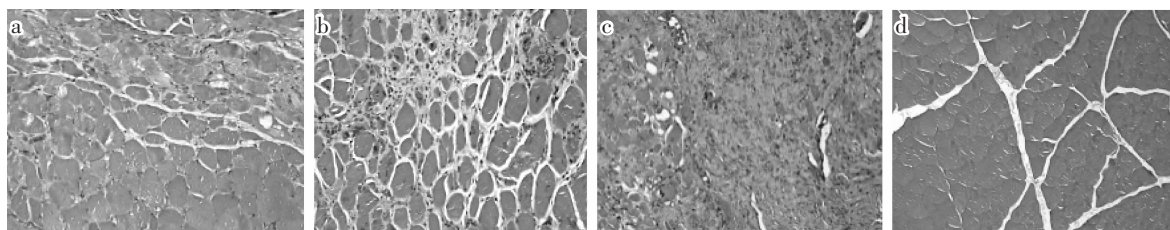
肿胀度测量: 用细软皮尺以“+”号为中心绕其 1 周测量, 记录周长读数, 治疗前后均测量 1 次。

1.6 统计学分析 用 SPSS22.0 软件统计分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间数据用单因素方差分析 (ONE WAY ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 各组光镜情况 各组样本, 经 HE 染色后切片显示如图 2。

从切片上看, a、b、c 3 组切片中的肌组织都不是完好无损的组织, 说明在伤后 14 d 家兔的腓肠肌仍没有完全恢复。伤后 72 h 推拿组肌纤维排列相对整



a. 伤后 20 min 按摩组(20X); b. 伤后 72 h 按摩组(20X); c. 损伤对照组; d. 空白组

图 2 各组切片 HE 染色比较

齐,有少量脂肪变性,少量新生肌纤维形成。20 min后推拿组表现出大量的炎性细胞堆积,脂肪组织较多,肌纤维严重萎缩变化,大量再生细胞增生。损伤对照组可见大量萎缩的肌纤维,并有瘢痕组织形成。

2.2 各组家兔下肢周长比较

2.2.1 各组家兔下肢周长分析结果 第1天,20 min推拿组周长是手法干预后所测。该组与72 h推拿组和损伤对照组比较均无统计意义($P>0.05$),说明20 min推拿组并无明显的消肿作用。第2天,空白组与各组比较均有统计学意义($P<0.05$),说明各组肿胀程度仍较明显。第3天,72 h推拿组和20 min推拿组和损伤对照组比较都有统计学意义($P<0.05$),说明手法干预在消肿上有明显疗效。从第4天起,72 h推拿组和20 min推拿组之间均无统计意义($P>0.05$),但从数据分布上看,72 h推拿组在改善肿胀度上略优于20 min推拿组,2个推拿组都有消肿作用。见表1。

表1 各组第1-14天下肢肿胀度比较($\bar{x}\pm s$,mm,n=6)

组别	空白组 (D)	损伤对照组 (C)	72 h推拿组 (B)	20 min推拿组 (A)
第1天	9.2±0.3	9.9±0.5	9.9±0.7 [▲]	9.9±0.7 [▼]
第2天	9.2±0.3 [*]	10.2±0.4	10.4±0.3	10.1±0.4
第3天	9.2±0.3 [*]	10.3±0.4	10.0±0.0 [*]	10.0±0.0 [△]
第4天	9.2±0.3 [*]	10.5±0.4	10.0±0.3 [*]	10.1±0.5
第5天	9.2±0.3	9.9±0.5 [*]	9.7±0.6	9.8±0.4 [▼]
第6天	9.5±0.4	10.1±0.6	9.7±0.5	10.0±0.6
第7天	9.5±0.4	10.0±0.5	9.8±0.6	10.0±0.5
第8天	9.7±0.3	9.9±0.6	9.9±0.5	10.0±0.6
第9天	9.8±0.3	9.9±0.6	9.6±0.3	9.8±0.4
第10天	9.9±0.3	9.9±0.6	9.7±0.6	9.9±0.4
第11天	9.8±0.3	10.0±0.7	9.8±0.4	10.0±0.5
第12天	10.0±0.4	10.0±0.8	10.1±0.2	10.1±0.2
第13天	10.3±0.3	10.0±0.8	10.0±0.0	10.2±0.3
第14天	10.3±0.3	10.1±0.9	10.1±0.2	10.1±0.2

注:D与C比较,^{*} $P<0.05$;D与A比较,[▼] $P<0.05$;D与B比较,[▲] $P<0.05$;D与各组比较,^{*} $P<0.05$;B与C比较,^{*} $P<0.05$;A与C比较,[△] $P<0.05$

2.2.2 各组体重和腓肠肌湿重比 72 h推拿组和损伤对照组比较有统计学意义($P<0.05$),20 min推拿组和损伤对照组比较有统计学意义($P<0.05$),72 h推拿组和20 min推拿组比较有统计学意义($P<0.05$),其余各组 and 空白组比较都有统计学意义,由于该平均值

反映的是体重和腓肠肌比,因此比值越小说明腓肠肌的值偏大。提示72 h后推拿组家兔腓肠肌湿重较重。见表2。

表2 各组家兔第14天体重和腓肠肌湿重比($\bar{x}\pm s$,n=6)

空白组 (D)	损伤对照组 (C)	72 h推拿组 (B)	20 min推拿组 (A)
136.55±3.60 [*]	184.54±6.51	169.23±10.52 [△]	181.74±8.52 [▲]

注:A与B比较,[▲] $P<0.05$;B与C比较,[△] $P<0.05$;D与各组比较,^{*} $P<0.05$

3 PCR比较结果

3.1 各组IGF-1 mRNA值分析 在促进IGF-1 mRNA表达方面,72 h推拿组(B)和20 min推拿组(A)比较无统计学意义,前者在数据趋势上大于后者,两组与空白组(D)比较都有统计学意义($P<0.05$),说明手法对软组织的修复有一定的积极作用。见表3。

表3 各组家兔第14天IGF-1 mRNA含量比较(n=6)

空白组 (D)	损伤对照组 (C)	72 h推拿组 (B)	20 min推拿组 (A)
0.208±0.0471	0.823±0.468	1.11±0.45 [*]	1.01±0.48 [▲]

注:A与D比较,[▲] $P<0.05$;B与D,^{*} $P<0.05$;B与C比较,[△] $P<0.05$

3.2 各组MyoD mRNA值分析 72 h推拿组(B)均数高于其余各组,但72 h推拿组(B)和20 min推拿组(A)比较无统计学意义($P>0.05$)。见表4。

表4 各组家兔第14天MyoD mRNA比较(,n=6)

空白组 (D)	损伤对照组 (C)	72 h推拿组 (B)	20 min推拿组 (A)
0.485±0.303	0.672±0.294 [△]	3.182±0.858 [▲]	2.158±0.502 [*]

注:B与D比较,[▲] $P<0.05$;A与D比较,^{*} $P<0.05$;B与C比较,[△] $P<0.05$

4 讨论

目前一部分学者认为急性软组织扭挫伤应早期采用“手法”治疗^[9],有些或持相反观点,关于这些争论都缺乏强有力的理论研究依据。本课题的实验结果提示,家兔骨骼肌在急性损伤后72 h进行推拿治疗可能优于伤后20 min推拿治疗。

骨骼肌损伤分3个阶段:破坏和炎症阶段(1~3 d),修复阶段(3~4周),重塑阶段(3~6个月)^[7]。破坏和炎症阶段,血肿和炎性细胞渗出,此期以肿痛表现

为主;在修复期,首先是被破坏的肌纤维再生形成未分化的肌原性前体或卫星细胞。卫星细胞将增殖并最终分化为成肌细胞。其次,是来源于损伤后的血肿血液形成的瘢痕组织。这不仅可以干扰修复过程,而且会中断肌肉再生过程,并在最后阶段导致受伤肌肉功能恢复不全;重塑阶段,新形成的肌纤维成熟,瘢痕组织重组和硬化^[8-9]。

有研究显示,按摩可有效防止肌细胞的萎缩、退变及坏死,促进血管生成,减少结缔组织生成并使肌纤维的排列更加有序,还能调节炎症因子,改善血液流变学的状态^[10]。手法有利于肌肉中毛细血管的扩张,后备毛细血管开放增加,在推拿按摩手法的作用下,肌肉横断面的毛细血管比手法作用前增加 40 倍,并改善微循环中的血液流速、流态,加速体内活性物质的转运和降解,促进炎性物质的排泄^[11]。实验表明,按摩手法可能促进 bFGF 在损伤修复过程中对靶细胞的作用,有效缩短了修复过程。在骨骼肌急性钝挫伤模型大鼠腓肠肌损伤修复过程中,超早期推拿可增加膜修复蛋白 Dysferlin 的表达,促进破裂的肌细胞膜及时修复^[12]。实验表明,中药膏联合手法按摩治疗急性软组织损伤,能通过调节外周血中 5-HT 和 β -EP 的含量发挥镇痛作用^[13]。从本实验的病理切片看,72 h 推拿组新生肌纤维较多,瘢痕组织较少,肌纤维排列相对整齐。提示推拿可能有利于组织对血肿的吸收,减少瘢痕组织的生成,从而促进新生肌原纤维较好的再生。

胰岛素样生长因子 1(IGF-1)存在于细胞外基质中,当肌肉受伤后,这些因子被激活,IGF-1mRNA 的表达水平应激性增加^[14]。有研究认为,IGF-1 通过激活卫星细胞促进肌肉再生,阻止肌肉功能损伤,并对骨骼肌损伤修复起加速作用^[15]。有研究认为回医理筋手法可以调节 IGF-1 及 IGF-1mRNA 的表达,在损伤局部调控细胞的增殖与分化,有效诱导损伤组织细胞的凋亡加速,加速成纤维细胞分化为肌成纤维细胞^[16]。针对人体膝关节病变的试验结果表明,手法有利于血清 IGF-1 表达^[17]。在本实验中,72 h 推拿组的 IGF-1mRNA 的表达水平较高,提示 72 h 后手法有助于肌组织内 IGF-1mRNA 的表达,对肌原纤维的形成有明显的帮助。

MyoD 是生肌调节因子家族中的成员之一,在胚

胎发育过程中决定着干细胞向肌细胞方向定向分化,是一种调节肌肉分化的重要蛋白质^[18]。在肌肉特异基因转录调控中,MyoD 起着总开关的作用^[19]。MyoD 与肌细胞在肌肉损伤后的再生修复过程中起作用,可作为鉴定肌肉前体细胞和反映肌肉再生的指标^[20]。有实验研究证实,按摩可以促进家兔成肌调节因子 Myf5mRNA 和 MyoD mRNA 的表达,利于骨骼肌肌纤维的生成^[21]。在本实验中,两个推拿干预组 MyoD mRNA 的表达水平都比较高,尤其是 72 h 推拿组的最高,这提示伤后适当的手法干预对肌组织修复有益。

从本实验结果分析看,骨骼肌急性期内(伤后 20 min)行手法干预也有一定的疗效,但和常规的伤后 72 h 相比无明显优势,手法可能是通过改善伤后组织的血液循环起到消肿作用,在促进钝挫伤后骨骼肌再生方面可能是通过促进组织内 IGF-1mRNA 和 MyoD mRNA 的表达量,从而加快肌纤维再生。由于家兔的代谢速度超过人体,和人体的组织变化无法在时间上对等比较,因此在动物干预和取材设计上应当增加时间窗,在观测肿胀指标和检测肌纤维再生等手段上,应该再拓展新的方法深入研究。

参考文献:

- [1] 张健,陈世益,李云霞,等. 黄芪皂甙、丹参酮 II A 注射液对大鼠骨骼肌急性钝挫伤后骨骼肌组织形态的影响[J]. 中国运动医学杂志,2011,30(3):270-274.
- [2] BEINER J M, JOKL P. Muscle contusion injuries:current treatment options[J]. J Am Acad Orthop Surg,2001,9(4):227-237.
- [3] 王宇峰,丛德毓,高辉,等. 推拿治疗对急性软组织损伤家兔血清神经递质表达影响的研究 [J]. 中国免疫学杂志,2014(11):1552-1553.
- [4] 李应志,邵先桃,严隽陶. 推拿在急性闭合性软组织损伤早期临床应用与研究现状 [J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(11):80-82.
- [5] 胡军,严隽陶. 家兔骨骼肌钝挫伤模型的建立[C]//中华中医药学会推拿分会. 中华中医药学会推拿分会第九届推拿学术年会暨浙江省中医药学会推拿分会继续教育项目论文汇编. 杭州:中华中医药学会推拿分会:2006:26-29.
- [6] 樊春洲. “手法”在伤科治疗中的应用价值[J]. 黑龙江中医药,1984(2):52-53.
- [7] TIDBALL J G. Inflammatory processes in muscle injury

- and repair [J]. American Journal of Physiology, 2005, 288 (2): R345-R353.
- [8] FUKUSHIMA K, BADLANI N, USAS A, et al. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration[J]. Am J Sports Med, 2001, 29(4): 394-402.
- [9] SAPPINO A P, SCHURCH W, GABBIANI G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations [J]. Laboratory Investigation, 1990, 63(2): 144-161.
- [10] 高东梅. 早期康复治疗在全膝关节置换术后功能改善中的应用[J]. 昆明医科大学学报, 2013(6): 95-97.
- [11] 陈中伟. 实用运动医学[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 1996: 26.
- [12] 胡静, 袁军辉, 李娜, 等. dysferlinopathy 患者八例临床及分子病理学特点 [J]. 中华神经科杂志, 2007, 40(12): 807-811.
- [13] 刘松林. 膏摩对急性软组织损伤镇痛作用机制及作用时间规律的研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2015.
- [14] 刘晓光, 徐苗苗, 陈佩杰, 等. IGF-1 在治疗骨骼肌损伤中的应用潜能及其相关机制 [J]. 生命的化学, 2016, 36 (4): 496-502.
- [15] BARTON-DAVIS E R, SHOTURMA D I, MUSARO A, et al. Viral mediated expression of insulin-like growth factor 1 blocks the aging-related loss of skeletal muscle function [J]. Proc Natl Acad sci USA, 1998, 95 (26): 15603-15607.
- [16] 刘志华. 回医理筋手法对家兔骨骼肌损伤修复过程中 IGF-1 表达的影响[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2014.
- [17] 马碧涛, 金立伦, 陈丽丽, 等. 手法对膝关节炎患者血清 IGF-1、IL-1、TNF- α 含量的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(4): 12-15.
- [18] DAVIS R L, WEINTRAUB H, LASSAR A B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts[J]. Cell, 1987, 51(6): 987-1000.
- [19] 李永平, 梁炳生. MyoD 肌形成作用机制研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2007(1): 37-40.
- [20] 曾纛, 张成, 刘克玄, 等. 成肌调节因子 MyoD 与 myogenin 在肌肉损伤修复过程的动态变化 [J]. 第一军医大学学报, 2004(5): 542-545.
- [21] 谢辉. 在骨骼肌损伤修复过程中按摩对自由基相关酶和成肌调节因子的影响研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.

《云南中医学院学报》欢迎网上投稿

网址: <http://www.xb.ynutcm.edu.cn>