

• 临床研究 •

“柔筋温通”手法干预家兔骨骼肌慢性损伤的作用机制

向 勇¹, 王春林², 田启东², 李蕊蕊², 董有康^{1*}

(1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500; 2. 云南省中医医院, 云南 昆明 650021)

摘要: **目的** 探讨“柔筋温通”手法干预家兔骨骼肌慢性损伤的作用机制。**方法** 选用 40 只健康成年家兔, 30 只造模成功后分别设为实验组、对照组、模型组各 10 只, 余下 10 只设为正常组。实验组采用“柔筋温通”手法干预, 对照组采用地塞米松药物治疗, 共治疗 10 次, 模型组和正常组均正常喂养, 治疗结束后取材检测, 采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6 的含量以及采用 Western blot 检测 TGF- β 1、CTGF 的蛋白表达。**结果** 实验组兔骨骼肌中 TNF- α 、IL-6 含量显著降低; CTGF、TGF- β 1 蛋白表达明显降低。**结论** 通过研究, “柔筋温通”手法通过降低骨骼肌损伤局部炎症因子(TNF- α 、IL-6)的含量以及通过降低的 TGF- β 1、CTGF 的蛋白表达, 来抑制炎症粘连和炎症纤维组织增生, 促进骨骼肌慢性损伤的修复。

关键词: “柔筋温通”手法; 慢性骨骼肌损伤; 作用机制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2024)04-0020-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2024.04.005

The Mechanism of "Softening Tendons and Warming Tong" Manipulation to Intervene Chronic Skeletal Muscle Injury in Rabbits

XIANG Yong¹, WANG Chunlin², TIAN Qidong², LI Ruirui², DONG Youkang¹

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

2. Yunnan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China)

ABSTRACT: Objective To explore the mechanism of "softening tendons and warming Tong" manipulation to intervene chronic skeletal muscle injury in rabbits. **Methods** 40 healthy adult rabbits were selected, 30 rabbits were set as experimental group, control group and model group, and the remaining 10 rabbits were set as normal group. The experimental group used "soft tendons warming Tong" manipulation intervention, the control group used dexamethasone drug treatment, co-treatment 10 times, the model group and the normal group were fed normally. After treatment, samples were collected for detection, and TNF- α and IL-6 were detected by ELISA, and the protein expression of TGF- β 1 and CTGF were detected by Western blot. **Results** The contents of TNF- α and IL-6 in skeletal muscle were significantly decreased. The protein expressions of CTGF and TGF- β 1 were significantly decreased. **Conclusion** Through the study, "softening tendons and warming Tong" manipulation can reduce the content of local inflammatory factors (TNF- α , IL-6) in skeletal muscle injury as well as reduce the content of inflammatory factors TGF- β 1, CTGF protein expression, to inhibit inflammatory adhesion and inflammatory fibrous tissue hyperplasia, promote skeletal muscle chronic damage repair of injury.

KEY WORDS: "softening tendons and warming Tong" manipulation; chronic skeletal muscle injury; mechanism of action

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(81860884); 云南省科技厅中医联合专项-面上项目[202001AZ070001(-022), 2019FF002(-024)]; 云南省卫生科技计划项目(2018NS0024); 云南中医药大学校院联合基金项目(YXLH202107); 云南省 2020 年高层次中医药人才学科带头人培养对象项目(云卫中医发展发[2021]1 号)

作者简介: 向 勇(1983-), 男, 讲师, E-mail: 630458355@qq.com

* **通信作者:** 董有康(1978-), 男, 教授, 研究方向: 脊柱疾病的手法治疗, E-mail: 408750926@qq.com

随着生活工作方式的改变,慢性骨骼肌损伤疾病发病率呈逐年上升趋势,并且呈年轻化趋势,属临床中一种常见病、多发病,严重影响着人们的身心健康甚至劳动能力^[1],长期慢性劳损或者外界原因导致肌肉局部受力超负荷而损伤,骨骼肌局部结构变化,使应力代偿能力下降是慢性骨骼肌损伤的主要原因^[2-4]。临床主要表现为慢性疼痛^[5]。推拿手法长期以来广泛的应用慢性骨骼肌损伤疾病的治疗,临床疗效确切,“柔筋温通”法是以“脏腑-经络”理论为基础,从“阳气者,柔则养筋”生理特点出发,结合传统脏腑推拿和筋伤推拿的特点,提出的一种治疗慢性骨骼肌损伤疾患的新的思路,临床已经广泛应用,为了探讨其中作用机制,进行实验研究。

1 资料与方法

1.1 实验动物 健康成年白兔40只,体质量1.8~2.5 kg,雌雄不限,重量分布均一,由昆明医科大学动物实验中心提供,清洁级,许可证号:SCXK(滇)K2020-0004,饲养于SPF级动物实验室,温度(22±1)℃,湿度55%±5%,12 h明暗循环。

1.2 实验试剂 兔白介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(MB-3996B);兔白介素-1(IL-1)ELISA试剂盒(MB-3935B);兔肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒(MB-3901B),以上试剂盒均由江苏酶标生物科技有限公司提供。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)抗体(bs-0743R)由北京博奥森生物科技有限公司提供,转化生长因子 β 1(TGF- β 1)抗体(bsm-33345M)由北京博奥森生物科技有限公司提供,BCA蛋白定量测试盒(P0012)由碧云天生物科技有限公司提供,SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(P0012A)由碧云天生物科技有限公司提供,蛋白marker(26616)由赛默飞世尔科技公司提供。

1.3 实验仪器 离心机:国产湘仪(CTK150R)离心机,酶标仪(美国EPOCH酶标仪),恒温箱(国产新芝(GH-30)),水平电泳仪(美国BIO-RAD公司),超微量核酸蛋白检测仪(Thermo Nano Drop)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及造模 将40只家兔随机分为实验组,对照组及模型组,加上10只未造模家兔设为正常组,共4组。造模参照朱利敏等^[6]机械冲击挫伤的造

模方法,实验前1 d用8%硫化钠脱毛剂除去右小腿腓肠肌被毛。造模时固定动物,在右小腿腓肠肌处做好标记,模采用200 g砧从1 m高处坠落,造成标记处局部软组织损伤,打击点面积为2 cm×2 cm。连续打击10下,连续3周后停止打击,无骨折及皮肤破裂,不做任何处理正常饲养2周,在损伤局部取出损伤骨骼肌进行后续实验。

1.4.2 治疗方法

1.4.2.1 实验组 采用“柔筋温通”手法治疗。实验前1 d用8%硫化钠脱毛剂除去实验组10只家兔背部的被毛。①使用家兔固定架,仰卧位固定家兔,充分暴露家兔腹部,以神阙穴为中心,采用掌按压法操作1 min;再以神阙穴为中心用揉摩法按手套装置设定的方向顺时针1 min,逆时针方向1 min;仰卧位固定家兔,捏脊法治疗5次;②术者采用拇指按揉法在损伤的腓肠肌部位操作1 min。每只实验家兔每次共操作5 min,每天1次,共治疗10次。

1.4.2.2 对照组 采用地塞米松药物治疗^[7]。每天灌胃治疗,剂量为0.005 g/kg,每天1次,共治疗10次。

1.4.2.3 模型组和正常组 不做手法治疗,仅给饲料正常喂养。

1.4.3 取材 静脉栓塞处死家兔,然后在家兔腓肠肌治疗局部取材,采用无菌操作,剔除皮毛、筋膜暴露分离出腓肠肌,锐性切取腓肠肌肌腹中段的病灶组织,宽度、厚度约1 cm,生理盐水冲洗,4%多聚甲醛溶液漂洗,后置于4%多聚甲醛溶液固定24 h以上,低温保存。

1.4.4 指标检测 ELISA检测兔骨骼肌IL-6、TNF- α 、IL-1表达情况,Western Blot检测TGF- β 1、CTGF蛋白表达。

1.4.5 统计分析 数据采用SPSS 26.0统计软件包处理。若计量资料符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析;若计量资料不符合正态分布方差齐,采用K独立样本检验如Kruskal-Wallis H检验。所有计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;若偏态分布,采用秩和检验,以中位数和四分位距表示。统计检验均以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA检测骨骼肌中IL-6、TNF- α 含量结果

比较 经 Kolmogorow-Smornov 正态性检验及方差齐性检验, 计量资料符合正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析。与正常组比较, 模型组兔骨骼肌 IL-6、TNF- α 表达均明显升高 ($P < 0.05$), 组间比较, IL-6、TNF- α 的表达 ($P < 0.05$), 具有统计学意义; 对照组与模型组比较 IL-6、TNF- α 表达均降低 ($P > 0.05$), 无统计学意义; 经过“柔筋温通”手法治疗后, 实验组中 IL-6、TNF- α 表达显著降低 ($P < 0.05$), 具有统计学意义。以上表达情况说明: 兔骨骼肌慢性损伤经过治疗后情况得到明显改善(见表 1、图 1、图 2)。

表 1 4 组兔骨骼肌中 IL-6、TNF- α 含量比较

组别	例数	IL-6	TNF- α
正常组	6	78.33 \pm 5.91	546.84 \pm 31.14
模型组	6	97.53 \pm 6.07 ⁴⁾	638.72 \pm 32.53 ¹⁾
对照组	6	87.06 \pm 4.06	618.16 \pm 71.65
实验组	6	83.01 \pm 6.06 ²⁾	552.31 \pm 62.31 ³⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

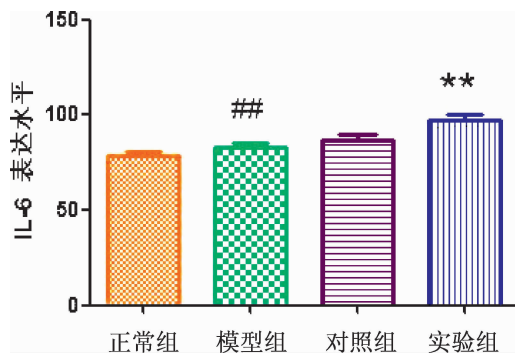


图 1 兔骨骼肌中 IL-6 含量比较

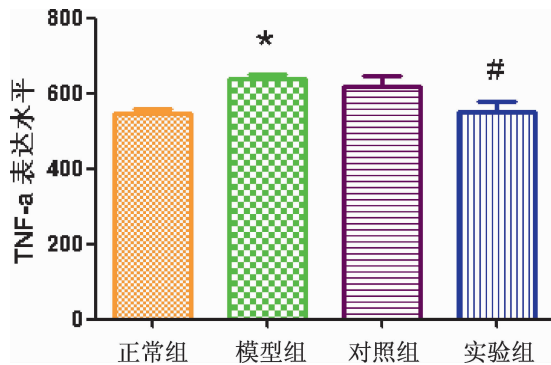


图 2 兔骨骼肌中 TNF- α 含量比较

2.2 Western Blot 检测骨骼肌中 CTGF、TGF- β 1 蛋白表达情况 经 Kolmogorow-Smornov 正态性检验及方差齐性检验, 计量资料符合正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析。与正常组比较, 模型组 CTGF、TGF- β 1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 组间比较, CTGF、TGF- β 1 的表达 ($P < 0.05$), 具有统计学意义; 肌对照组 CTGF、TGF- β 1 表达均降低, 组间比较, CTGF、TGF- β 1 的表达 ($P > 0.05$), 无统计学意义; 经过“柔筋温通”手法干预后, 实验组中 CTGF、TGF- β 1 蛋白明显降低, 其中 CTGF 的表达 ($P > 0.05$), 无统计学意义, TGF- β 1 的表达 ($P < 0.05$), 具有统计学意义; (见表 2、图 3、图 4、图 5)。

表 2 4 组兔骨骼肌中 CTGF、TGF- β 1 蛋白表达水平比较

组别	例数	CTGF	TGF- β 1
正常组	4	0.161 \pm 0.096 ¹⁾	0.397 \pm 0.134 ¹⁾
模型组	4	0.543 \pm 0.067	0.768 \pm 0.088
实验组	4	0.351 \pm 0.209	0.370 \pm 0.193 ¹⁾
对照组	4	0.452 \pm 0.120	0.673 \pm 0.120

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.05$

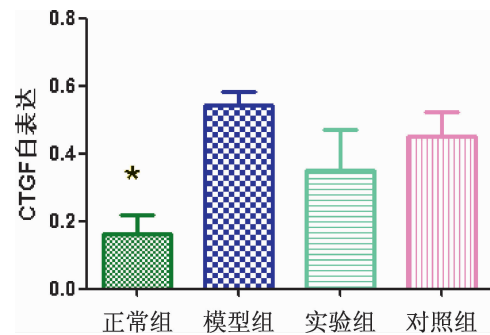


图 3 兔骨骼肌中 CTGF 蛋白表达水平比较

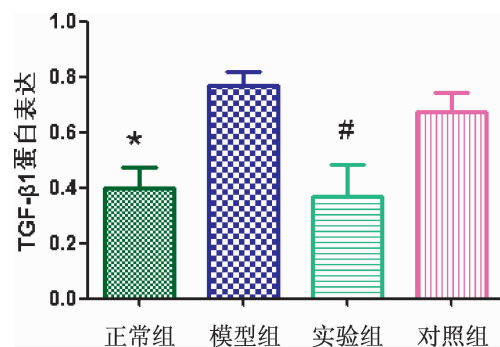


图 4 兔骨骼肌中 TGF- β 1 蛋白表达水平比较

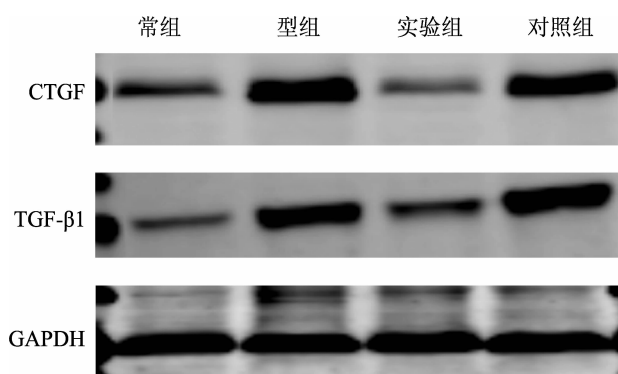


图5 兔骨骼肌中CTGF、TGF- β 1蛋白表达情况

3 讨论

慢性骨骼肌损伤后,有大量的细胞因子产生参与局部的炎症反应和修复过程。其中白介素-6(IL-6)、白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在软组织损伤后的局部含量明显升高^[7-9]。IL-6、IL-1和TNF- α 均是重要的促炎症细胞因子,可刺激内皮细胞、巨噬细胞、白细胞等聚集,从而活化炎症因子NF- κ B信号通路^[9]进而诱发生成更多的致炎因子,引起炎症形成。同时炎症因子的释放诱导大量肉芽成纤维细胞增生,形成过多的瘢痕组织和粘连。由于瘢痕结构在生物力学上的缺陷,损伤的骨骼肌容易发生再损伤^[10]。转化生长因子 β 1(TGF- β 1)是骨骼肌纤维化的重要因素,可启动骨骼肌纤维化并以级联形式促进诱导成肌细胞向成纤维细胞分化^[11-12],骨骼肌损伤后局部TGF- β 1表达显著增高,TGF- β 1刺激细胞外基质合成,导致纤维化进程发展^[13-14],结缔组织生长因子(CTGF)是TGF- β 1下游的特异性效应因子,可促进成纤维细胞增殖和分泌胶原,其过表达直接导致细胞外基质的过量分泌,促进组织和器官纤维化^[15]。因此,TGF- β 1—CTGF信号通路在骨骼肌纤维化病变过程中起着重要作用^[16]。

慢性骨骼肌损伤属于中医的“痹证”范畴,痹证概念首见于《素问·痹论》“风寒湿三气杂至,合而为痹也”,《金匱翼·痹证统论》曰:“痛痹者,寒气偏胜,阳气少、阴气多也”,又如《幼科全针》记载:“痹者,内因肝血不足,外被寒湿所中,盖肝主筋,通一身之血脉也”。由此可见,痹证发病的病机主要是由于阳气不足、外受邪气引起气血生化不足,肝藏之血亏虚,导致筋脉失养所致,而出现疼痛、功能障碍。云南省名中医吴生

元教授认为中焦脾阳运化无力,久而气血亏虚、肝肾渐亏是引起痹证的内因^[17]。根据痹证的主要病机确定痹证的主要治疗原则之根本在于温运阳气,使阳气充足、通畅。“柔筋温通”手法的特点是通过在腹部、腰背部以及病变局部的手法操作,该法以腹部手法健脾益气,激发脾阳升发,生化气血,气血足则充肝气、养肝血,肝气充盈、肝血的濡养才能达到“柔筋”之目的;腰背部和下肢推拿手法操作,从督脉和太阳经激发阳气的升发,阳气足,推动气血的运行输布四肢,从而达到阳气“温煦”筋脉的目的^[18]。

本实验研究结果显示,骨骼肌损伤,骨骼肌细胞膜破裂导致IL-1、IL-6、TNF- α 的释放,与正常组比较,模型组兔骨骼肌IL-1、IL-6、TNF- α 表达均明显升高($P<0.05$),骨骼肌损伤后也进入自然修复过程,但是骨骼肌损伤自然愈合时间长,且愈合质量比较差,常伴有瘢痕形成,而TGF- β 1—CTGF信号通路在骨骼肌纤维化病变过程中起着重要作用,因此在骨骼肌损伤后模型组与正常组对比,模型组CTGF、TGF- β 1蛋白表达明显升高($P<0.05$)。通过“柔筋温通”手法干预模型兔腓肠肌慢性损伤的修复过程,能够明显降低骨骼肌损伤局部TNF- α 、IL-6的含量以及TGF- β 1、CTGF的蛋白表达,改善炎性粘连和炎症纤维组织增生,修复慢性软组织损伤。因此为“柔筋温通”手法治疗慢性软组织损伤提供了客观依据,值得临床推广应用。

参考文献:

- [1] 裴国献,陈孝平,邱贵兴. 外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:1041-1048.
- [2] TONAMI K, HATA S, OJIMA K, et al. Calpain-6 deficiency promotes skeletal muscle development and regeneration[J]. PLoS Genet, 2013, 9(8):e1003668.
- [3] 张琛,周超,常鹏. 软组织相关慢性疼痛治疗现状及发展[J]. 中国疗养医学, 2017, 26(4):361-364.
- [4] 董宏然,李启芳,杨彬奎,等. 慢性软组织损害性疼痛外周不同组织中TNF- α 表达的研究[J]. 颈腰痛杂志, 2014, 35(6):441-443.
- [5] WHO scientific group on the burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new

- millennium[M]. Geneva: Publications of WHO, 2003.
- [6] 朱利敏,何忠平,朱欣,等. 软组织损伤兔模型的复制[J]. 上海实验动物科学,1999,19(4):222-223.
- [7] 胡波,郭长青,孙红梅,等. 针刀疗法对腰三横突征模型大鼠局部组织 IL-6、IL-10、TNF- α 、TGF- β 的影响[J]. 中华中医药杂志,2008,23(8):699-702.
- [8] 董静. 炎性细胞因子在慢性软组织损伤大鼠骨骼肌中表达及中药青白散的干预作用[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(8):90-92.
- [9] LI Q T, VERMA I M. NF- κ B regulation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol,2002,2(10):725-734.
- [10] ORCHARD J W. Intrinsic and extrinsic risk factors for muscle strains in Australian football[J]. Am J Sports Med,2001,29(3):300-303.
- [11] ANDREETTA F, BERNASCONI P, BAGGI F, et al. Immunomodulation of TGF- β 1 in mdx mouse inhibits connective tissue proliferation in diaphragm but increases inflammatory response: implications for antifibrotic therapy[J]. J Neuroimmunol,2006,175(1/2):77-86.
- [12] 李鸿章,覃霄燕,邵素菊,等. 针刺对哮喘大鼠气道重构
- (上接第19页)
- [17] 周袁申,招煦杰. 当归四逆汤治疗痹证的临床体会[J]. 中国民族民间医药,2015,24(2):83-84.
- [18] 李文梅,夏强. 当归四逆汤加味治疗痹证 80 例[J]. 陕西中医,2004,25(6):540-541.
- [19] 费玉雯,郭华. 重梳《伤寒论》174 条到 177 条的关系[J]. 环球中医药,2017,10(11):1399-1402.
- [20] 时振声. 对《伤寒论》174~178 条的看法[J]. 北京中医,1984(2):47-55.
- [21] 何冠. 加味白虎汤治疗急性痛风性关节炎 46 例[J]. 中国中医急症,2008(3):400.
- [22] 张友堂,潘雪. 白虎汤证的脉症研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2007,13(11):857-858.
- [23] 周桂琴,张浩,周静,等. 桂枝汤对痹证小鼠 T 淋巴细胞的调节作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2004(3):47-48.
- [24] 苏夏,谷松. 桂枝附子汤对佐剂性关节炎大鼠 IL-6 水平影响的实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(6):250-251.
- [25] 杜力. 桂枝附子去桂加白术汤治疗大鼠弗氏完全佐剂性关节炎作用机制的研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2011.
- [26] 赵红波,李国鲁,田晓滨. 类风湿关节炎血清肿瘤坏死因子 α 与骨密度的相关性及其瓜蒌桂枝抗炎机制研究[J]. 广西中医药大学学报,2023,40(10):2472-2479.
- [27] 陈波洋,赵玲婕,管连城,等. 《伤寒杂病论》中桂枝汤类或加桂枝方改善疼痛的作用机制[J]. 湖北民族大学学报(医学版),2022,39(3):69-73.
- [28] 范卫闯,吕立桃. 当归四逆汤对类风湿性关节炎模型大鼠炎性因子表达及 TLR/Beclin-1 信号路的影响[J]. 中药与临床,2020,11(2):27-30.
- [29] 钱凯,杨学文,严士海. 基于网络药理学探究当归四逆汤在类风湿性关节炎中的作用机制[J]. 中国药物经济学,2021,16(11):34-41.
- [30] 张迪. 基于 Artemin/GFR α 3 调控的 TRP 信号通路探讨当归四逆汤寒凉药及其成分的镇痛制[D]. 广州:暨南大学,2020.
- [31] 冯敏. 白虎汤对 LPS 诱导细胞焦亡的抑制作用及机制研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2023.
- [32] 杜世拔,李国政,郑靓,等. 基于网络药理学的新加白虎汤治疗痛风性关节炎的作用机制及炎作用初步验证[J]. 药物评价研究,2022,45(2):266-273.
- [33] 胡转楠,陈佳骏,吴显伟,等. 基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨白虎汤治疗急性肺伤作用机制[J]. 中国中医药信息杂志,2024,31(3):19-25.
- (收稿日期:2024-04-29)