

· 基础研究 ·

推拿手法对家兔骨骼肌失神经支配后肌萎缩及卫星细胞增殖的影响

郭汝宝 严隽陶 张喜林 沈国权

【摘要】目的 探讨推拿手法对骨骼肌失神经后肌萎缩及卫星细胞增殖的影响。**方法** 将 90 只家兔按随机数字表法分为手法治疗组(42 只)、模型对照组(42 只)和正常对照组(6 只);手法治疗组和模型对照组按照推拿手法治疗时间或取材检测时间的不同再细分为 7 个亚组,分别为 1 周亚组、2 周亚组、3 周亚组、1 月亚组、2 月亚组、4 月亚组和 6 月亚组,每组 6 只家兔。除正常对照组外,其余 84 只家兔均行右后肢胫神经切断术,建立骨骼肌失神经模型。制模成功率为 100%。手法治疗组给予按揉法治疗,模型对照组和正常对照组不做任何干预处理。正常对照组与手法治疗组及模型对照组的 1 周亚组同时取材检测腓肠肌肌湿重和卫星细胞计数;手法治疗组和模型对照组的 2 周亚组、3 周亚组、1 月亚组、2 月亚组、4 月亚组和 6 月亚组的家兔分别按治疗时间的不同,在相对应的时间点进行取材及检测。**结果** 正常对照组家兔的腓肠肌湿重比为(1.013 ± 0.102);手法治疗组和模型对照组的各时间亚组腓肠肌肌湿重比均小于正常对照组;各时间点手法治疗组的肌湿重比均大于同期模型对照组,且手法治疗组在 2 月亚组、4 月亚组和 6 月亚组的肌湿重比与同期模型对照组比较[(0.578 ± 0.163)比(0.470 ± 0.062)、(0.575 ± 0.110)比(0.453 ± 0.101)和(0.559 ± 0.083)比(0.446 ± 0.048)],差异均有统计学意义($P < 0.05$)。正常对照组的腓肠肌卫星细胞数为(2.33 ± 0.82)个/高倍视野;手法治疗组和模型对照组各时间点肌卫星细胞数量均明显升高,手法治疗组 1 周亚组和 2 周亚组的肌卫星细胞数分别为(16.83 ± 5.31)和(51.83 ± 7.94)个/高倍视野,明显高于同期模型对照组的(8.67 ± 2.58)和(32.00 ± 6.93)个/高倍视野,且 2 组同期比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);但从 1 月以后,手法治疗组的各亚组肌卫星细胞数逐步明显低于同期模型对照组,且手法治疗组在 4 月亚组和 6 月亚组的肌卫星细胞数与同期模型对照组比较,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);手法治疗组 6 月亚组的肌卫星细胞数减少至(2.67 ± 1.63)个/高倍视野,已基本接近正常对照组,但仍高于正常对照组($P > 0.05$)。**结论** 推拿手法可以延缓失神经支配后骨骼肌的萎缩,并可促进骨骼肌卫星细胞的增殖转化。

【关键词】 失神经支配; 骨骼肌萎缩; 卫星细胞; 推拿手法

The effects of tuina on muscle atrophy and muscle satellite cell proliferation after denervation GUO Ru-bao*, YAN Jun-tao, ZHANG Xi-lin, SHEN Guo-quan. * Department of Tuina, The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medicine University, Hangzhou 310005, China

Corresponding author: Yan Jun-tao, Email: doctoryjt@sina.com

【Abstract】Objective To observe the effects of tuina on muscle atrophy after denervation and on muscle satellite cell proliferation. **Methods** Ninety male rabbits with denervated skeletal muscles were randomly divided into a normal group, a control group, and a treatment group. Tuina was applied daily to the right gastrocnemius muscles beginning one day after the modeling. Changes in muscle wet weight ratio and the amount of skeletal muscle satellite cells (SCs) were observed 1, 2 and 3 weeks and 1, 2, 4 and 6 months post-modeling. **Results** The muscle wet weight ratios of both the treatment group and the control group were lower than those of the normal group. The weight ratio in the treatment group was significantly different from that in the control group after 2 months (0.578 ± 0.163 vs 0.470 ± 0.062), 4 months (0.575 ± 0.110 vs 0.453 ± 0.101) and 6 months (0.559 ± 0.083 vs 0.446 ± 0.048). The amount of SCs was also significantly different in the treatment and control groups after 1 week (16.83 ± 5.31 vs 8.67 ± 2.58), 2 weeks (51.83 ± 7.94 vs 32.00 ± 6.93) and 4 months (11.17 ± 3.49 vs 17.67 ± 4.18). **Conclusion** Tuina therapy can promote proliferation of satellite cells and delay the atrophy of denervated skeletal muscles.

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.04.005

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973806);国家“十二五”中医药重点学科项目(国中医药人教发 2012-32)

作者单位:310005 杭州,浙江中医药大学附属第三医院推拿科(郭汝宝);上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院推拿科(严隽陶、张喜林、沈国权)

通信作者:严隽陶,Email:doctoryjt@sina.com

【Key words】 Denervation; Muscle atrophy; Satellite cells; Tuina

失神经支配后骨骼肌的不可逆性萎缩是周围神经损伤修复研究中的一个治疗热点和难题^[1]。骨骼肌失神经支配后,骨骼肌发生萎缩变性的机制非常复杂,如果骨骼肌不能够及时获得神经的再次支配,失神经支配的骨骼肌将发生不可逆萎缩变性甚至丧失功能^[2]。延缓失神经支配后骨骼肌的萎缩改变是骨骼肌重获神经支配后功能能否恢复的关键因素,推拿手法是中国的传统疗法,已被证明是有效的防治骨骼肌萎缩的方法之一。本研究拟通过对家兔失神经腓肠肌给予推拿手法干预,从家兔腓肠肌肌湿重比和卫星细胞增殖两方面,评价推拿手法对失神经肌萎缩的防治作用,旨在为临床治疗提供一定的理论依据。

材料与方法

一、实验动物与分组

雄性新西兰家兔 90 只,6 月龄,体重(2.0 ± 0.3)kg,上海海军医学研究所实验动物中心提供。按随机数字表法分为手法治疗组(42 只)、模型对照组(42 只)和正常对照组(6 只)。手法治疗组和模型对照组按照推拿手法治疗时间的不同再细分为 7 个亚组,分别为 1 周亚组、2 周亚组、3 周亚组、1 月亚组、2 月亚组、4 月亚组和 6 月亚组,每组 6 只家兔。

二、失神经模型的建立

除 6 只正常对照组外,其余 84 只家兔均行右后肢胫神经切断术,建立骨骼肌失神经模型^[3]。制模方法:用 3% 戊巴比妥钠溶液(1.5 ml/kg)腹腔缓慢注射麻醉,于腓窝解剖后暴露胫神经,钝性分离出大鼠右侧胫神经,然后切断胫神经干后,并将近端游离断端向上折返缝入股二头肌肌膜上,阻止神经间自然生长。84 只家兔制模分 3 d 完成,4 月亚组和 6 月亚组 24 只于第 1 天制模,2 月亚组和 1 月亚组 24 只于第 2 天制模,1 周亚组、2 周亚组和 3 周亚组 36 只于第 3 天制模。制模成功率为 100%。

三、实验仪器与试剂

电子天平(上海天平仪器厂);低温离心机(美国 Sigma 公司);旋涡振荡器(Vortex)(上海青浦泸西仪器厂);干式恒温器(杭州蓝焰科技有限公司);超低温冷冻冰箱(美国 Sigma 公司);生物安全柜(美国 Sigma 公司);移液器(法国吉尔森公司);抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)工作液(美国 oncogene science 公司),过氧化酶复合物(Avidin Biotin Complex, ABC)试剂盒(抗兔,武汉博士德公司),显色剂为二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB);3% 戊巴比妥钠(上海西唐生物科技有限公司提供,批号:

20110112)。

四、治疗方法

为保证操作手法的一致性,本研究选取多名有多年临床工作的医师和手法娴熟的研究生,在治疗前进行一段时间的培训,然后在手法测试仪上进行测试,达标者才可以进行实验治疗,最终筛选出相似度较大的 3 人参与本实验,每人负责 14 只手法治疗组家兔的手法操作。

推拿手法为按揉法。手法的轻重频率通过 YF-3 手法测试仪(上海中医药大学和复旦大学共同开发研制)标定,由专人经训练后,于家兔右后肢腓肠肌上操作。按揉法参数:压力为 19.6 N,频率为 140 次/分左右。手法治疗组均于制模后第 2 天开始手法治疗,每次治疗 15 min,隔日 1 次,至取材前一天结束治疗。模型对照组不作任何手法干预。

五、检测指标

正常对照组(6 只)家兔不进行制模处理,1 周后与手法治疗组(6 只)及模型对照组(6 只)的 1 周亚组家兔同时处死取材及指标测试。手法治疗组和模型对照组的 2 周亚组、3 周亚组、1 月亚组、2 月亚组、4 月亚组和 6 月亚组的家兔分别按照治疗时间的不同,在相对应的时间点进行处死取材及指标测试。其中正常对照组的检测指标结果仅作为参考依据,不做统计分析。

1. 肌湿重比测定:将家兔处死后,将双侧腓肠肌沿着股骨内外髁起点至跟骨结节止点完整取下,然后用电子天平称量肌湿重,记录右侧实验侧与左侧对照侧的肌湿重比值^[4]。

2. 卫星细胞切片光镜 PCNA 染色半定量计数:腓肠肌组织修切成小块放入 10% 甲醛溶液中固定 24 h。依次用梯度酒精脱水后,浸入二甲苯。再将组织块浸入融蜡中;组织包埋后,投入冷水使其凝固,切成蜡块。用切片机将组织蜡块切成 6 μm 厚的薄片。切片脱蜡入蒸馏水;加入 0.3% H₂O₂ 和甲醇混和液,37 ℃, 30 min;切片水洗、磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗;加 5% 正常兔血清,37 ℃, 15 min;加 1:35 稀释抗 PCNA 工作液,37 ℃, 60 min;PBS 洗 5 min, 3 次;加过氧化酶复合物,37 ℃, 45 min;PBS 洗 5 min, 3 次;二氨基联苯胺显色,水洗 2 次,蒸馏水漂洗;脱水、透明、封片。PCNA 染色后的卫星细胞核呈棕黄色。在每只动物 PCNA 染色切片上,在 400 倍光学显微镜下,数 10 个不相交视野的肌卫星细胞数量,并记录数据,取平均值。

六、统计学分析

采用 SPSS 15.0 版软件包进行数据的分析与处理。本研究数据用($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料用率或百分

比表示。计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用重复测量或多变量方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、推拿手法对家兔腓肠肌肌湿重的影响

正常对照组家兔的腓肠肌湿重比为 (1.013 ± 0.102) 。手法治疗组和模型对照组的各时间点亚组腓肠肌肌湿重比均小于正常对照组; 而手法治疗组各时间点亚组的肌湿重比均大于同期模型对照组, 且手法治疗组在 2 月亚组、4 月亚组和 6 月亚组的肌湿重比与同时间点的模型对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 1。

二、推拿手法对家兔腓肠肌卫星细胞数量增殖的影响

正常对照组的腓肠肌卫星细胞数为 (2.33 ± 0.82) 个/高倍视野。手法治疗组和模型对照组各时间点肌卫星细胞数量均明显升高, 手法治疗组的肌卫星细胞数在 1 周亚组和 2 周亚组均明显高于同时间点的模型对照组 ($P < 0.05$); 但从 1 月亚组以后, 手法治疗组的各亚组肌卫星细胞数逐步明显低于同时间点的模型对照组 (图 1), 到 4 月亚组和 6 月亚组手法治疗组的肌卫星细胞数与同期模型对照组比较, 组间差异均有统计

学意义 ($P < 0.05$); 手法治疗组 6 月亚组的肌卫星细胞数为 (2.67 ± 1.63) 个/高倍视野, 已基本接近正常对照组, 但仍高于正常对照组 ($P > 0.05$)。详见表 2。

讨 论

失神经支配后骨骼肌萎缩的防治一直是周围神经损伤修复研究中的一大难题, 一旦骨骼肌失去神经支配, 最突出的表现是肌肉萎缩, 表现为肌湿重下降。Marques 等^[5] 研究报道, 失神经支配 1 个月时肌湿重下降 30%, 2 个月时下降 50% ~ 60%, 之后下降速度减缓, 至 4 个月时肌湿重丧失可达 60% ~ 80%。本研究结果显示, 骨骼肌失神经支配后, 其所支配的骨骼肌出现不同程度的萎缩, 1 周时肌湿重减少 15% 左右, 时间越长, 萎缩越明显, 2 个月时肌湿重减少 50% 左右, 这与 Marques 等^[5] 报道一致。

推拿手法一方面可产生肌肉的被动运动, 通过被动运动, 可机械地将肌纤维拉长和放松, 使肌细胞得到充分伸展, 保持运动侧肢体肌肉弹性, 减轻肌肉内淤血和淋巴液的淤积, 从而改善肢体的血液循环, 改善肌肉营养状况, 有效地减缓肌萎缩进程^[6]; 推拿治疗还可有效改善失神经肌肉的结构、功能和代谢失调状态, 改善失神经电位, 提高运动神经传导速度^[7]。本研究手法治疗组与模型对照组比较的结果显示, 推拿手法可减少失神经支配骨骼肌肌湿重的萎缩程度, 尤其是失神经支配 2 个月与模型对照组同期比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。因此, 笔者推测, 推拿手法延缓肌萎缩的过程可能需要较长时间, 这可能与失神经支配后肌肉内部的微环境改变以及某些因子的产生过程有关。

肌卫星细胞位于肌细胞膜和基膜之间, 是目前公认的肌成体干细胞^[8], 肌卫星细胞在出生后、肌肉损伤及锻炼后可被激活转化成为成肌细胞, 在骨骼肌的生长发育及修复中发挥着重要的作用^[9], 肌肉损伤区卫星细胞的增殖分化是达到骨骼肌损伤再生修复的主要

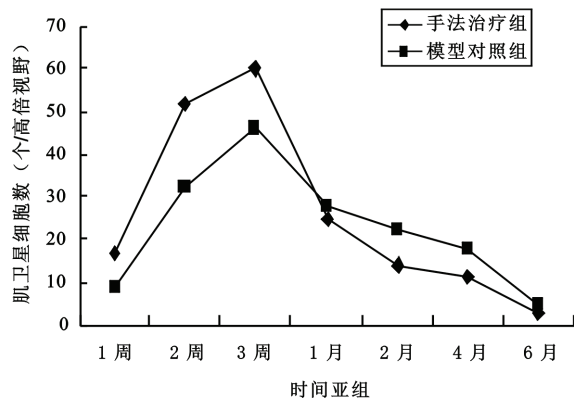


图 1 2 组失神经模型家兔肌卫星细胞数量趋势示意图

表 1 2 组失神经模型家兔推拿手法治疗后不同时间点亚组的肌湿重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	1 周亚组	2 周亚组	3 周亚组	1 月亚组	2 月亚组	4 月亚组	6 月亚组
手法治疗组	6	0.908 ± 0.117	0.585 ± 0.060	0.582 ± 0.163	0.486 ± 0.046	0.578 ± 0.163 ^a	0.575 ± 0.110 ^a	0.559 ± 0.083 ^a
模型对照组	6	0.853 ± 0.044	0.580 ± 0.048	0.523 ± 0.055	0.467 ± 0.035	0.470 ± 0.062	0.453 ± 0.101	0.446 ± 0.048

注: 与模型对照组同时间点比较, ^a $P < 0.05$

表 2 2 组失神经模型家兔推拿手法治疗后不同时间点亚组的肌卫星细胞数比较 (个/高倍视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	1 周亚组	2 周亚组	3 周亚组	1 月亚组	2 月亚组	4 月亚组	6 月亚组
手法治疗组	6	16.83 ± 5.31 ^a	51.83 ± 7.94 ^a	60.33 ± 9.09	24.83 ± 6.05	14.00 ± 1.41	11.17 ± 3.49 ^a	2.67 ± 1.63
模型对照组	6	8.67 ± 2.58	32.00 ± 6.93	46.00 ± 13.12	28.17 ± 4.31	22.33 ± 8.80	17.67 ± 4.18	4.67 ± 3.72

注: 与模型对照组同时间点比较, ^a $P < 0.05$

途径,肌卫星细胞是骨骼肌再生修复的关键因素^[10]。骨骼肌在失神经支配后,肌卫星细胞作出应激反应,开始大量的分裂、增殖及分化,试图来缓解因失神经造成的肌细胞萎缩改变^[11],但由于肌肉组织始终处于失神经支配状态,这就使得肌卫星细胞对凋亡的敏感性增加^[12],增殖分化的肌卫星细胞不能发育成熟,逐渐凋亡,由于肌卫星细胞数量有限,肌萎缩便进入了不可逆期^[13]。

本研究结果显示,骨骼肌失神经支配后,肌卫星细胞数量早期均有明显的增加;在失神经支配 1 周时,肌卫星细胞数量开始增加,至 3 周时,卫星细胞数量达到增殖顶峰(图 1),此后,失神经支配的骨骼肌卫星细胞数量开始下降,至 6 个月时,肌卫星细胞的数量极少,但仍高于正常对照组,说明仍有卫星细胞的增殖存在,但增殖的肌卫星细胞是否具有转化成肌细胞的活性,这可能需要对肌卫星细胞的超微结构进行研究。可见,失神经支配的时间越长,肌卫星细胞的增殖越少,骨骼肌的再生也就越困难。

本研究手法治疗组在干预第 1~3 周时与模型对照组比较,肌卫星细胞数量增加明显高于模型对照组,这说明推拿手法治疗早期可以促进卫星细胞的增殖,增加肌卫星细胞的数量,但肌卫星细胞数在 1 个月后手法治疗组开始低于模型对照组;4 个月后明显低于模型对照组($P < 0.05$),但 6 个月时 2 组间肌卫星细胞数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而肌湿重在手法治疗 6 月亚组 2 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),说明腓肠肌的萎缩程度好于模型对照组。因此笔者推测,推拿手法后期可能通过促进卫星细胞向肌细胞的转化,从而引起肌卫星细胞的大量消耗。既往的研究表明,肌卫星细胞在失神经支配的情况下不能转化成正常肌细胞,再生的肌细胞往往没有完成终极分化就已经开始凋亡^[14]。但本研究结果提示,推拿手法后期可能促进肌卫星细胞的定向成肌分化,这是否与推拿手法本身的特点以及推拿手法可改善失神经支配后骨骼肌本身的内环境及远端残存的神经节段活性有关,还有待于进行更深入的研究。

总之,本研究提示,推拿手法可能是通过促进肌卫星细胞数量增殖及向肌细胞定向分化来延缓失神经支

配后骨骼肌萎缩,但对于推拿手法如何促进肌卫星细胞的定向成肌分化和骨骼肌再生修复的作用机制目前尚不清楚,尤其是推拿手法远期疗效的研究需要进一步的评价。骨骼肌的再生涉及到大量的神经生长因子和细胞因子共同参与,推拿手法对失神经支配骨骼肌萎缩的具体作用机制还有待于作更进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 邵晨昕,吴欣,刘梅,等. Myostatin 在小鼠排肠肌失神经支配萎缩过程中的表达. 解剖学杂志,2006,29:146.
- [2] 顾玉东. 迎接基因时代-探索肌萎缩的防治. 中华手外科杂志,2000,16:193-194.
- [3] 郭江,孙晓娟,钟世镇. 骨骼肌失神经和再神经化时肌卫星细胞的变化. 中国修复重建外科杂志,2006,20:1047-1051.
- [4] 彭建平,何继业,王栋梁,等. 骨髓间充质干细胞成肌诱导后移植对延缓失神经肌肉萎缩的作用. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12:4824-4828.
- [5] Marques MJ, Mendes ZT, Minatel E, et al. Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of long term regenerated muscle fibers. J Neurocytol,2005,34:387-396.
- [6] 李长宏,吴倩. 被动运动和电刺激对尾吊大鼠比目鱼肌纤维的影响. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:133-135.
- [7] 马建,郭容经,唐启华. 电针、推拿和红外线理疗治疗周围神经损伤的比较实验研究. 中国运动医学杂志,1996,15:22-25.
- [8] Bischoff R, Heintz C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. Dev Dyn,1994,201:41-54.
- [9] 唐休发,鄧克谦,黄元丁,等. 骨骼肌失神经后再生的实验研究. 华西口腔医学杂志,2004,22:89-92.
- [10] Shefer G, Yablonka-Reuveni Z. Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells. Methods Mol Biol,2005,290:281-304.
- [11] 王劲,罗成基,徐辉,等. 骨髓间充质干细胞在肌组织局部成肌分化的实验研究. 中国修复重建外科杂志,2005,19:70-73.
- [12] Jejurikar SS, Marcelo CL, Kuzon WM. Skeletal muscle denervation increases satellite cell susceptibility to apoptosis. Plast Reconstr Surg,2002,110:160-168.
- [13] 孙天威,杨志明,解慧琪,等. 兔组织工程肌的构建与研究. 中国修复重建外科杂志,2005,19:364-368.
- [14] 姜浩,徐建光. 失神经骨骼肌萎缩的研究现状. 国外医学骨科学分册,2002,23:12-14.

(修回日期:2013-01-16)

(本文编辑:汪 玲)