

推拿手法防治失神经骨骼肌萎缩的实验研究

马书杰¹ 严隽陶¹ 黄品贤²

(1.上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院、上海市中医药研究院推拿研究所,上海 200437;

2.上海中医药大学统计教研室,上海 201203)

摘要 目的:探讨推拿手法对延缓失神经骨骼肌萎缩的作用及途径。方法:六月龄新西兰家兔 84 只,切断右下肢胫神经后随机分为失神经手法治疗组(手法组)42 只、失神经模型对照组(模型组)42 只。手法组给予按揉法治疗,模型组不予手法干预。分别在造模后第 1、2、3 周和第 1、2、4、6 个月时间点每组各取 6 只家兔检测腓肠肌肌湿重、收缩力及卫星细胞计数。结果:造模后 2 周起手法组家兔腓肠肌收缩力明显高于模型组;造模后 2 月起手法组家兔腓肠肌肌湿重明显高于模型组;腓肠肌失神经后 4 周内,手法组肌卫星细胞增殖趋势高于模型组,而 4 周以后,手法则不再起作用。结论:推拿手法在一定程度上可延缓失神经后骨骼肌萎缩,手法促进骨骼肌卫星细胞增殖与分化是手法减缓肌萎缩的可能途径之一。

关键词 骨骼肌萎缩 失神经 肌卫星细胞 推拿手法

中图分类号 R685.05

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2014)11-0079-03

骨骼肌损伤是临床常见的一大类疾患,在临床实际中,骨骼肌急性损伤往往同时伴有神经损伤,由于治疗手段应用不当或是治疗不及时彻底,常常导致肌肉萎缩和再损伤。研究骨骼肌急性损伤的修复方式以及促进修复的手段,已成为国际运动、医学界的研究热点,包括手法治疗的物理治疗是目前治疗骨骼肌损伤的有效手段。我们对手法在防治骨骼肌失神经萎缩中的作用及其机制进行了研究,现报告如下。

1 实验材料

1.1 实验动物 新西兰家兔,6 月龄,雄性,体重(2.21±0.15)kg,由上海海军研究院动物房提供。单笼,自由饮水,20℃恒温环境饲养。

1.2 主要试剂及仪器 3%戊巴比妥钠(上海西唐生物科技有限公司提供,批号:20110112);苏木精、伊红染色剂;YF-3 手法测试仪(由上海中医药大学和复旦大学共同研发);

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973806);上海市中医药事业发展三年行动计划(海派中医流派传承工程)丁氏推拿项目(ZYSNXD-CC-HPGC-JD-011);严隽陶全国名老中医药专家传承工作室项目

理论,中医治疗立法以养阴活血为主,方中熟地黄、山茱萸、何首乌、枸杞子补肝肾,益精血,固涩精微;丹参、水蛭、川芎、丹皮、川牛膝活血化瘀通络,川牛膝又引药下行,丹皮兼清肝热;天麻、钩藤平息肝阳;泽兰活血利水。全方共奏养阴活血、固摄精微之功效。前期研究发现,养阴活血合剂可显著降低高血压合并早期肾损害患者的尿 mALB、 β_2 -MG 和 24h 尿蛋白^[5-6]。本研究通过养阴活血合剂治疗自发性高血压大鼠的实验发现,养阴活血合剂能降低 SHR 大鼠的血压,显著降低尿 mALB 和尿 β_2 -MG,具有保护高血压肾脏损害的作用,安博维与养阴活血合剂合用则有协同作用。进一步研究发现,养阴活血合剂和安博维都可显著抑制 SHR 大鼠肾脏组织 TGF- β_1 和 ET-1 mRNA 的表达,两者合用则作用更明显,显示养阴活血合剂可通过抑制肾组织 TGF- β_1 和 ET-1 mRNA 的表达,进而抑制高血压引起的肾间质纤维化、肾小球硬化,从而起到肾保护的作用。

5 参考文献

[1] Schnaper H, Hayashida T, Hubchak SC, et al. TGF- β signaling transduction and mesangial cell fibrogenesis. Am J Physiol Renal

Physiol, 2003, 283(2): 243

[2] Li JH, Huang XR, Zhu HJ, et al. Role of TGF- β signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. Kidney Int, 2003, 63(6): 2010

[3] 王甜,李静,时晔,等.转化生长因子 β 与结缔组织生长因子在自发性高血压大鼠肾脏的增龄性变化. 陕西医学杂志, 2012, 41(8): 952

[4] 王小丹,郑秋甫,谷庆阳,等.碱性成纤维细胞生长因子和内皮素在自发性高血压大鼠肾脏损害中的作用. 解放军医学杂志, 2000, 25(4): 270

[5] 周婷.中西药合用治疗高血压病早期肾损害疗效研究. 辽宁中医杂志, 2008, 35(2): 256

[6] 周婷,屈长宏.养阴活血方联合安博维治疗高血压病早期肾损害患者 30 例. 中医杂志, 2009, 50(11): 1009

第一作者:周婷(1963-),女,本科学历,主任中医师,主要从事肾脏疾病的中西医结合诊治研究。Yzzt11757@163.com

收稿日期:2014-05-26

编辑:吴宁

Powerlab/16 型多道生理记录仪(澳大利亚 ADInstruments 公司产品);Dual BIO Amp/Stimulator 隔离电刺激仪(澳大利亚 ADInstruments 公司产品);光学显微镜(OLYMPUS CH);图像分析系统(OLYMPUS BX50);电子天平(上海天平仪器厂)。

2 实验方法

2.1 动物造模 骨骼肌失神经动物模型:

每只家兔均行下肢胫神经切断术,造成失神经模型。3%戊巴比妥钠溶液,1.5mL/kg 体重,家兔腹腔缓慢注射麻醉,麻醉成功后右下肢剃毛,暴露腓窝及大腿后部,将家兔固定在动物手术台上,局部消毒,做腓上股后外侧切口,于腓窝解剖后暴露胫神经,钝性分离出家兔右侧胫神经,切断胫神经干,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,左下肢不做任何处理。

2.2 实验分组 计算机随机将造模成功的家兔分为 2 组:失神经手法组(手法组)42 只,失神经模型对照组(模型组)42 只。

2.3 干预手段 手法组大鼠造模成功后予按揉法干预^[4],干预手法的轻重及频率通过 YF-3 手法测试仪标定,由专人经训练,在实验家兔右下肢后侧腓肠肌肌腹操作。按揉法参数设为:压力 2kgf、频率 140 次/min,每日 1 次,每次治疗时间为 15min。模型组不作手法干预。

2.4 检验指标 各组在造模后第 1、2、3 周和第 1、2、4、6 个月各取 6 只家兔行以下指标检测:腓肠肌收缩力、腓肠肌肌湿重、卫星细胞切片光镜 PCNA 染色半定量计数。

2.5 统计学方法 数据的分析与处理采用 SPSS18.0 软件包,数据用($\bar{x} \pm s$)表示。组间采用 2×7 析因设计方差分析方法行统计检验,所有的统计检验以 $P < 0.05$ 被认为所检验的差别有统计学意义。

3 实验结果

3.1 2 组家兔造模后不同时间点腓肠肌收缩力比较 见表 1、表 2、图 1。在造模后第 2、3 周以及第 1、2、4 和 6 月时间点,手法组家兔腓肠肌收缩力明

显高于模型组($P < 0.01$)。虽然失神经后腓肠肌收缩力总体呈下降趋势,但是自第 2 周至第 2 个月,手法组家兔腓肠肌收缩力下降平缓,略低于第 1 周,说明手法能维持、减缓急性失神经损伤后的腓肠肌收缩力的降低,但是 2 个月之后,2 组腓肠肌收缩力出现明显下降趋势,但手法组仍明显高于模型组,可见手法对于骨骼肌急性失神经后减缓腓肠肌收缩力下降有很大作用。

3.2 2 组家兔造模后不同时间点腓肠肌肌湿重比较 结果见表 3、表 4、图 2。由趋势图走势可见腓肠肌肌湿重比总

表 1 手法组与模型组家兔造模后不同时间点腓肠肌收缩力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	统计量	不同时间点腓肠肌收缩力						
			1 周	2 周	3 周	1 月	2 月	4 月	6 月
手法组	6	$\bar{x}$	4.22	3.83	3.69	3.70	3.60	2.58	2.13
		s	0.16	0.11	0.11	0.14	0.12	0.22	0.24
模型组	6	$\bar{x}$	4.22	3.06	2.82	2.77	2.69	1.93	1.52
		s	0.15	0.26	0.32	0.27	0.31	0.15	0.27
相同时间点组间比较		F	0.651	25.972	23.674	24.645	19.155	26.253	18.200
		P	0.446	0.001	0.002	0.002	0.003	0.001	0.004

表 2 腓肠肌收缩力指标 2×7 析因设计方差分析结果

变异来源	SS	df	MS	F	P
总变异	58.123	80	—	—	—
治疗方法	9.238	1	9.238	203.632	0.000
治疗时间	43.345	6	7.207	158.864	0.000
治疗方法·治疗时间	1.751	6	0.292	6.433	0.000
误差	3.040	67	0.045	—	—

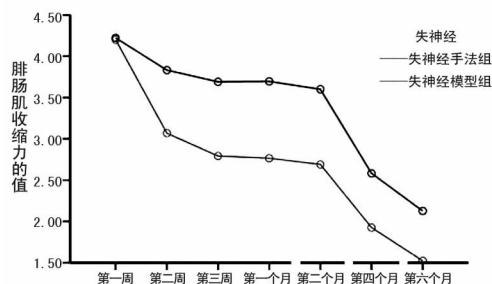


图 1 手法组与模型组家兔造模后不同时间点腓肠肌收缩力的变化

表 3 手法组与模型组家兔造模后不同时间点肌湿重比重比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	统计量	不同时间点腓肠肌湿重比重						
			1 周	2 周	3 周	1 月	2 月	4 月	6 月
手法组	6	$\bar{x}$	0.908	0.584	0.582	0.486	0.577	0.575	0.559
		s	0.117	0.060	0.163	0.046	0.030	0.110	0.083
模型组	6	$\bar{x}$	0.852	0.593	0.520	0.467	0.471	0.453	0.446
		s	0.050	0.040	0.061	0.036	0.062	0.101	0.048
相同时间点组间比较		F	0.379	0.031	1.372	0.323	23.112	0.412	6.530
		P	0.558	0.865	0.280	0.588	0.002	0.541	0.038

表 4 肌湿重比重指标 2×7 析因设计方差分析结果

变异来源	SS	df	MS	F	P
总变异	1.888	80	—	—	—
治疗方法	0.091	1	0.091	13.526	0.000
治疗时间	1.277	6	0.213	31.742	0.000
治疗方法·治疗时间	0.043	6	0.007	1.067	0.391
误差	0.449	67	0.007	—	—

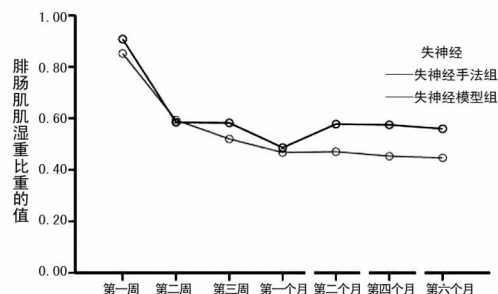


图 2 手法组与对照组家兔造模后不同时间点肌湿重比重变化

体呈下降趋势,于造模后2周开始,手法组肌湿重比重高于模型组,造模2个月后,2组肌湿重比重走势均较平稳,手法组明显高于对照组,说明手法可以减缓腓肠肌肌湿重比重下降幅度与程度,但无神经再支配情况下仍不能阻止腓肠肌萎缩的趋势。

3.3 2组家兔造模后不同时间点腓肠肌卫星细胞计数比较 见表5、表6、图3。手法组与模型组家兔腓肠肌卫星细胞数目在造模后第3周时达到高峰,且手法组肌卫星细胞数目在前3周均高于模型组。而在造模后第1、2、4和6月时,手法组肌卫星细胞数目低于模型组。在第3周到第1个月,手法组与模型组肌卫星细胞数目都出现骤降,且手法组下降幅度超过模型组,第1个月时其数目低于模型组。到第2、4个

月时2组肌卫星细胞数目中位数仍继续下降,手法组明显低于模型组,肌卫星细胞有耗竭趋势。在第6个月时2组家兔肌卫星细胞数目中位数为最低。模型组在前3周肌卫星细胞数增长速度明显低于手法组,说明手法干预在失神经前3周内可以明显提高肌卫星细胞数目。而到第6个月时2组肌卫星细胞数目基本持平且都降至最低,可见如果不能早期恢复神经支配,手法到后期也不能阻止肌卫星细胞耗竭。上述结果说明两个问题:一是肌卫星细胞总数一定,手法治疗可以促进肌卫星细胞早期快速增殖,但不能增加肌卫星细胞的数量,所以会很快耗尽肌卫星细胞,反而造成后期快速下降,并低于模型组;二是早期失神经后手法治疗可以起到促进肌卫星细胞增殖、延缓骨骼肌萎缩的作用。

4 讨论

骨骼肌萎缩的防治已成为国内外研究的热点,肌卫星细胞是骨骼肌再生修复的关键因素^[2]。肌卫星细胞是一种具有增殖和自我更新能力的成肌干细胞,主要位于骨骼肌运动终板附近的肌膜与基膜间,在骨骼肌细胞生长和再生时,提供肌细胞核。通常情况下,肌卫星细胞处于未激活的静止状态,当肌细胞受伤时,卫星细胞即被激活并移行到肌纤维附近,形成大范围的增殖与分化^[3]。本实验制成家兔骨骼肌失神经支配模型,在失神经后4周内,手法组家兔骨骼肌收缩力及骨骼肌湿重比均比模型组下降趋势缓慢,说明推拿手法有一定减缓失神经骨骼肌萎缩的作用;但到第4周以后,手法的作用明显减弱或者消失,其原因可能与失神经后营养中断,神经营养因子等不能得以补充,再加上本身的消耗,以及骨骼肌运动终板退化有关。而肌卫星细胞经推拿手法治疗后在失神经第1周即开始增殖,一直持续到第3周,其数量都明显高于模型组,但是从第1个月开始其增殖速度明显下降,且下降速度快于模型组,肌卫星细胞的数量也低于对照组。这说明手法在治疗早期加快了失神经后骨骼肌的肌卫星细

表5 手法组与模型组家兔造模后不同时间点腓肠肌卫星细胞计数比较 个

组别	动物数(只)	统计量	不同时间点腓肠肌卫星细胞数						
			1周	2周	3周	1月	2月	4月	6月
手法组	6	M	17.0	54.5	58.0	23.5	14.0	10.0	2.5
		Min	10.0	41.0	51.0	18.0	12.0	8.0	1.0
		Max	24.0	60.0	76.0	33.0	16.0	16.0	5.0
模型组	6	M	8.5	32.5	40.5	27.5	21.0	16.5	3.5
		Min	5.0	23.0	34.0	22.0	11.0	15.0	1.0
		Max	12.0	39.0	67.0	34.0	37.0	26.0	11.0
相同时间点组间比较		F	12.830	31.304	3.040	1.515	5.079	10.169	0.779
		P	0.005	<0.001	0.112	0.247	0.048	0.010	0.398

表6 失神经损伤后不同疗法肌卫星细胞数指标 2x7 析因设计方差分析结果

变异来源	SS	df	MS	F	P
总变异	49350.500	83	—	—	—
治疗方法	0.012	1	0.012	0.000	0.989
治疗时间	41437.917	6	6906.319	111.412	<0.001
治疗方法·治疗时间	3573.321	6	595.554	9.607	<0.001
误差	4339.250	70	61.989	—	—

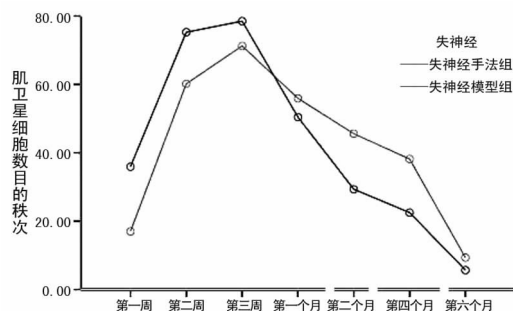


图3 手法组与模型组家兔造模后不同时间点肌卫星细胞数目变化

胞增殖速度,也很有可能加速了肌卫星细胞向成肌纤维的肌组织转化,而这与骨骼肌收缩力及肌湿重的变化趋势缓慢相吻合。所以,促进肌卫星细胞的增殖与分化,是手法防治骨骼肌萎缩的可能途径之一,如果联合现代康复医学的被动训练法,在治疗神经不完全受损肌萎缩的早期应用方面应当有十分积极意义,而手法防治骨骼肌萎缩的分子细胞机制还有待深入研究。

5 参考文献

- [1] 《中医学》编辑委员会.中国医学百科全书·中医学.上海:上海科学技术出版社,1997:856
- [2] Schwarting S, Schroder M, Stennert E, et al. Morphology of denervated human facial muscles. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 1984, 46(5): 248
- [3] Jun Hu, Xilin Zhang, Juntao Yan. Effects of Massage on Satellite Cells of Acute Contusive Skeletal Muscles. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2007, 2(5): 6

第一作者:马书杰(1986-),女,博士研究生,研究方向:推拿的基础研究与临床应用。

通讯作者:严隽陶, doctoryjt@sohu.com

收稿日期:2014-06-17

编辑:吴宁