

不同方法干预大鼠腓肠肌急性钝挫伤模型的实验观察

肖 响 张 茜 苏 波 续 畅 指导老师:林彩霞 李文迅 李 健

(北京中医药大学,北京,100029)

摘要 目的:观察不同方法对腓肠肌急性钝挫伤组织修复的影响,为肌肉损伤的临床治疗提供理论依据。方法:采用定量负荷自由落体打击法复制骨骼肌急性钝挫伤模型。造模成功后将大鼠随机分为 6 组,即刻予以不同方法干预,观测各组大鼠小腿周径变化;IL-1、IL-8、TNF 含量变化;电镜观察肌原纤维损伤情况。结果:电镜下针刺组改变显著,可见肌原纤维损伤部位聚集较多线粒体和肌质网,正常的肌节附近有普遍增多的线粒体,同样范围内肌卫星细胞较其他组多 3~4 倍;IL-1、TNF 水平明显增高的是正红花油组,其次是针刺组和冰敷组,2 组间无显著差异;IL-8 水平明显增高的是正红花组、针刺组、模型组。结论:骨骼肌损伤后需要良性修复,在临床治疗中,不要一味的消肿、消炎,应考虑如何用药,使肌肉损伤处良性修复,非瘢痕修复,促进肌肉的再生,功能的恢复。

关键词 腓肠肌急性闭合性钝挫伤;骨骼肌再生;良性修复

Observations of Different Methods in Treating Acute Contusion on Rat Gastrocnemius

Xiao Xiang, Zhang Qian, Su Bo, Xu Chang, Lin Caixia, Li Wenxun, Li Jian

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To compare the different emergency treatment to acute closed skeletal gastrocnemius muscle injury of rats, and provides theoretical basis to clinical therapeutics on muscle injury. **Methods:** Modeling gastrocnemius muscle in rats' hindquarter by using method of free falling with quantitative load to simulate acute skeletal muscle injury. Rats are divided into 6 groups and intervened in acute stage with different methods. After acute stage, we took out gastrocnemius of affected side to measure calf circumference, observed under electron microscope, and performed ELISA analysis. **Results:** Significant change was seen in the acupuncture group under electron microscopic observation, around myofibrillar injury site there were more mitochondria and sarcoplasmic reticulum, and more mitochondria around normal sarcomere. There was three to four times more muscle satellite cells in the same range than were in other groups. Using Zhenghonghua oil can cause IL-1&TNF level to increase most significantly. The acupuncture & ice groups had IL-1&TNF level increased without significant difference. IL-8 level increased in Zhenghonghua oil, acupuncture and model groups. **Conclusion:** The skeletal muscle injury need benign repair. Clinical treatment should not focus only on anti-swelling or anti-inflammation medications, but also medication that work to make muscle injury repair benignly and scarlessly, promoting muscle regeneration and functional recovery.

Key Words Acute Skeletal Gastrocnemius Muscle Injury; Muscle Regeneration; Benign repair

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.09.031

肌肉损伤无论在军事训练、体育锻炼及日常生活中都十分常见,损伤类型可分为挫伤、牵拉伤和撕裂伤等。其中 90% 以上的损伤是挫伤或牵拉伤,撕裂伤很少见^[1]。肌肉挫伤是由于突然重力直接撞击导致的肌纤维机械损伤,在运动或非运动损伤中十分常见,并可导致肌肉功能障碍,肿胀、萎缩、挛缩、增加再损伤的可能性等。创伤康复医学一直致力于研究促进肌肉损伤快速修复而且功能恢复完全的方法,其最大的难点在于找到一种切实可行的临床治疗方法,既可以增加细胞增殖又可以防止纤维化^[2]。目前常用的方法是根据 RICE^[3] 原则进行制动、冷敷、加压、抬高和 24 h 内冰敷,24 h 后热敷。本文通过观察不同方法干预对骨骼肌损伤急性期组织修复产生的影响和疗效,探寻较好应急处置方法,为肌肉损伤的临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 大鼠腓肠肌急性钝挫伤模型的建立 健康雄性

SD 大鼠,清洁级,体重(250±20) g,60 只。采用定量负荷自由落体打击的方法制作动物模型。常规饲养,饲养房间为每 12 h 光暗循环,温度控制在 24℃,食物与水无限制。7 d 后用 10% 的水合氯醛以 3 mL/kg 腹腔内注射麻醉,麻醉生效后,测量左后肢小腿周径并记录,俯卧位固定于鼠板上,将左后肢褪毛,置于伸膝、踝背屈 90 度、稍外展位固定,使小腿后群肌置于胫、腓骨内侧,腓肠肌暴露清楚。打击部位取腓肠肌中段。将 500 g 码从 30 cm 高处自由下落,动能为 1.47 J,打击 1 次,造成大鼠腓肠肌钝性损伤,形成软组织损伤动物模型^[4],造模后左后肢明显肿胀,未见瘀血,无明显跛行。

1.2 分组

造模后将 60 只大鼠利用随机数字表随机分为 6 组:模型组、冰敷组、热敷组、针刺组、正红花油组、西药组。

1.3 干预方法

模型组:不进行任何处理;冰敷^[5]组:将碎冰块装入塑料袋内,在伤处垫薄纱布,用绷带将冰

袋固定在伤处,每次 25 min^[6],每日 10 时、18 时处理,2 次/d;热敷^[7]组:在伤处垫薄纱布,在患部进行 60 ℃ 的水袋热敷 25 min,无热感时应立即更换,每日 10 时、18 时处理,2 次/d;针刺组:取局部、承山、承筋。参照中国针灸学会实验针灸委员会实验动物穴位图谱。方法:皮肤常规消毒,使用一次性无菌针灸针,规格 0.3 mm×25 mm,刺入受伤肌束内,远近端各一针,留针 20 min,行针 1 次,2 次/d;正红花油组:每日 8 时、18 时涂抹 2 次正红花油,清洁伤部皮肤,直接涂于伤处皮肤约 1~1.5 cm,轻轻摩擦致药物吸收;西药组:在受损部涂抹复方水杨酸甲酯苯海拉明制剂,每日 8 时、18 时涂抹 2 次,方法同正红花油组。实验周期:连续观察 3 d。

1.4 取材及固定 氯醛以 3 mL/kg 腹腔内注射麻醉,然后取整个腓肠肌,将肌腹正中 0.5 cm×0.5 cm×0.1 cm 的肌肉放入液氮中,剩余组织固定于 4% 多聚甲醛固定液中。

1.5 指标检测 形态学指标:主要测量大鼠左后肢腓肠肌损伤部位的小腿周径;采用 ELISA 法检测细胞内外 IL-1、IL-8、TNF 含量变化;电镜观察:由 oltrolomeNova 切片,用日本电子 JEOL-1230 电镜分别在 2 microns 和 500 nm 的视野下观察肌原纤维损伤,如肌小节的变化,Z 线 M 线的变化等。

1.6 统计学方法 数据采用 SPSS 10.0 软件分析,计量资料均以($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较进行 *t* 检验。

2 实验结果

2.1 大鼠小腿周径变化 结果显示造模 12 h 后各组大鼠左后肢明显肿胀,各组小腿周径值增加。干预 72 h 后各实验组大鼠周径数值均有所下降,肿胀程度略有减轻。涂抹正红花油组的小腿周径经治疗后减小最为显著,其次是针刺组,其余 4 组无明显差别。

2.2 电镜结果 图 1、图 2 中模型组肌小节普遍呈梭形,肌节肿胀,I 带减小,M 线溶解,部分肌原纤维断裂溶解,z 线溶解,部分消失。图 3 中电镜下冰敷组肌原纤维未见明显肿胀,在损伤肌原纤维附近有较多肌质网出现。图 4、图 5 中热敷组电镜下可见部分肌丝断裂、溶解,肌原纤维肿胀较冰敷、针刺、西药及正红花油组明显。图 6、图 7 中电镜下见西药组肌卫星细胞无改变,肌原纤维形态正常,未见明显肿胀。图 8 中电镜下见正红花油组在肌原纤维损伤部位出现线粒体聚集,肌原纤维形态正常,肌小节未见明显肿胀。图 9、图 10 中电镜下可见针刺组肌原纤维损伤部位聚集较多线粒体和肌质网,正常的肌节附近有普遍增多的线粒体,同样范围内肌卫星细胞较其他组多 3~4 倍。



图 1 模型组电镜下肌原纤维及 M 线溶解



图 2 模型组电镜下肌节肿胀,I 带减小

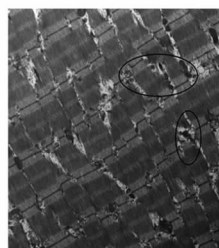


图 3 冰敷组电镜下损伤肌原纤维附近出现较多肌质网

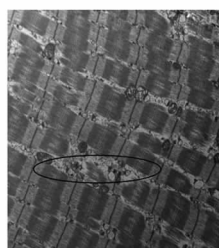


图 4 热敷组电镜下肌丝断裂溶解,肌原纤维肿胀

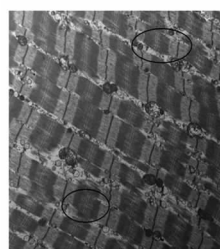


图 5 热敷组电镜下肌丝断裂溶解

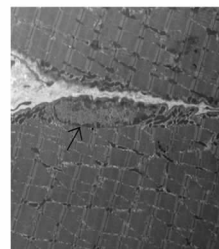


图 6 西药组肌卫星细胞

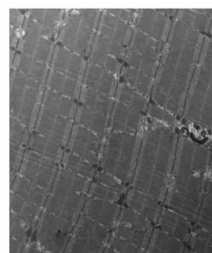


图 7 西药组正常形态肌原纤维

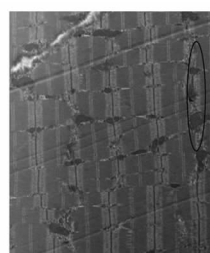


图 8 正红花油组损伤部位线粒体聚集,肌原纤维形态正常

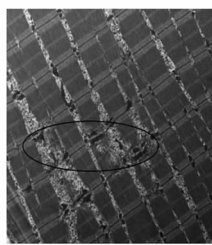


图 9 针刺组见损伤部位较多线粒体和肌质网聚集

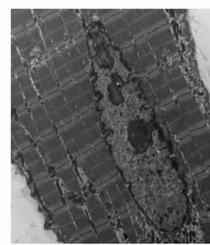


图 10 针刺组较多出现肌卫星细胞

2.3 IL-1、IL-8、TNF 含量分析 IL-1、TNF 水平明显增高的是正红花油组,其次是针刺组和冰敷组,2 组间无显著差异,无明显变化的为热敷组、西药组和模型

组,此 3 组间无显著差异。IL-8 水平明显增高的是正红花组、针刺组、模型组;西药组、冰敷组、热敷组 3 组无显著差异,见表 1。

表 1 各组 IL-1、IL-8、TNF 含量 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1	IL-8	TNF
冰敷组(I)	0.3810 ± 0.052767 **	0.3843 ± 0.023805 **	0.8547 ± 0.03308 **
热敷组(H)	0.2665 ± 0.032917	0.3868 ± 0.063572	0.6217 ± 0.02746
西药组(W)	0.2878 ± 0.028868	0.3597 ± 0.041351	0.5537 ± 0.09233
正红花油组(Y)	1.0138 ± 0.237952 **	1.2427 ± 0.058442 **	1.4177 ± 0.08505 **
针刺组(Z)	0.4692 ± 0.027636 **	0.6453 ± 0.045737 **	0.8568 ± 0.09786 **
模型组(K)	0.2435 ± 0.057518 **	0.4935 ± 0.028048	0.555 ± 0.103000

注:与模型组对比, **P<0.01。

3 讨论

骨骼肌损伤后,其组织修复主要包括炎症反应坏死、组织修复、组织重塑 3 个过程。近年相关研究表明,骨骼肌损伤后是可以再生的。骨骼肌组织中的成肌细胞是具有增殖和自我更新能力的细胞,骨骼肌再生主要依赖它的这一功能。一般情况下卫星细胞相对静止和缺乏转录活性,但在特殊情况下,如负重锻炼或创伤等,可以被激活进入有丝分裂期、增殖期,并进一步分化融合形成肌管,肌管成熟后形成正常肌纤维,完成修复^[8]。而炎症反应因子,在损伤部位发挥着双重作用,一方面吞噬坏死细胞和损伤的细胞碎片,另一方面通过分泌生长因子激活肌卫星细胞,使其增殖形成新的肌管细胞进而发育成肌纤维,修复损伤的肌纤维,完成肌肉的再生过程,减少瘢痕组织的出现。适宜的炎症细胞对卫星细胞的激活有一定的促进作用,损伤骨骼肌中的卫星细胞在伤后的 24 h 开始出现,但在炎症细胞出现高峰的第 2 天,其数量并不多;而在炎症细胞减至适宜数量的第 7 天却大幅度升高并且分化。本实验主要观察的炎症反应因子有 IL-1、IL-8 和 TNF。TNF 和 IL-1 二者都出现在炎症反应早期。冰敷疗法的 TNF 和 IL-1 水平较模型组高,而 IL-8 的水平低于模型组,可以说明冰敷减轻肌肉的炎症反应,热敷会增加炎症反应过程中毛细血管的通透性,使水肿加重,所以电镜下可见肌小节肿胀明显。文献报道^[9]热敷有消散炎症反应、促进化脓、止痛等作用。考虑若有出血或瘀血倾向,使用热敷促进局部血液循环,则会增加出血或瘀血倾向,从而增加炎症反应,但本实验中模型未有出血或瘀血的情况,因此热敷组和模型组对比,热敷发挥了其良好的消炎作用。但从骨骼肌损伤后的修复过程与机理来看,局部冰敷、热敷疗法对闭合性钝挫伤腓肠肌的修复及减少形成瘢痕无实验依据和理论支持。针刺组和正红花油组的 3 种炎症因子水平均较高,由于对 3 种炎症因子的监测是非动态的,尚不能明确其变化趋势,与模型组比较,正红花油组和

针刺组的炎症反应明显,涂抹西药组的 ELISA 结果显示 3 种炎症反应因子水平最低,消炎功效明显。在骨骼肌钝挫伤后的 72 h 内应主要为血肿形成、肌肉的坏死、退化以及炎症细胞的浸润,一般不应出现肌卫星细胞的分化。针刺组相同视野内肌卫星细胞数量明显较多,可能说明针刺使肌卫星细胞更早的游移至肌原纤维损伤部位。现有的对针刺治疗骨骼肌损伤机制的研究多侧重于针刺对微循环和血流灌注的影响以及对 CaN/NFAT 信号通路的激活。研究针刺对炎症反应的作用及对肌卫星细胞、线粒体、肌质网等的刺激机制未有明确报道。

本实验中的造模方法可以成功的复制腓肠肌急性闭合性钝挫伤模型,损伤部位肌肉肿胀无瘀血。西药促进炎症反应吸收及消肿作用明显,但从电镜下观察无有助于肌纤维再生的细胞器活动,提示西药对骨骼肌非瘢痕修复、再生修复可能无作用。正红花油促进炎症反应吸收效果不佳。损伤后 3 d 内连续热敷治疗,其促进炎症反应吸收作用较冰敷明显。除热敷外,余下 4 个实验组的方法均可有效减轻腓肠肌急性钝挫伤引起的肿胀。针刺可以促进肌卫星细胞向骨骼肌损伤部位的游移;针刺可有效地使腓肠肌急性钝挫伤的损伤处出现大量线粒体聚集,促进肌肉的自身修复,提示针刺可能有抑制瘢痕修复,促进肌肉再生作用。在临床治疗中,不要一味的消肿、消炎,应考虑如何用药,使肌肉损伤处良性修复、非瘢痕修复,促进肌肉的再生、功能的恢复。

参考文献

- [1] Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, et al. Muscle injuries: optimising recovery[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2007, 21(2): 317-331.
- [2] Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, et al. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model[J]. Am J Sports Med, 1999, 27(2): 222-229.
- [3] 鱼广信, 郑宏伟. 运动损伤和功能恢复[M]. 北京: 人民体育出版社, 2001: 37.
- [4] Gierer P, Mittlmeier T, Bordel R, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition reverses microcirculatory and inflammatory sequelae of closed soft-tissue trauma in an animal model[J]. The Journal of Bone and Joint Surgery, 2005, 87(1): 153-160.
- [5] 仇培九. 冷热疗法在运动性损伤中的应用[J]. 按摩与导引, 2004, 20(1): 41-42.
- [6] Cromack d T. Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction[J]. J Trauma, 1990, 30(13 Suppl): S129.
- [7] Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration[J]. Physiol Rev, 2004, 84(1): 209.
- [8] Machida S, Spangenburg EE, Booth FW. Primary rat muscle progenitor cells have decreased proliferation and myotube formation during passages[J]. Cell Prolif 2004, 37(4): 267.
- [9] 薛福连. 冷敷、热敷功效有别[N]. 医药经济报, 2001-006.

(2012-12-05 收稿)