

## 骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002562

## 体外冲击波对大鼠骨骼肌损伤修复研究

曹 宇, 王 伟, 吕 欣, 周达岸

(锦州医科大学附属第三医院、锦州医科大学骨外科学研究所, 锦州 121000)

**【摘要】目的:**探讨体外冲击波(extracorporeal shock wave, ESW)对骨骼肌损伤修复的影响,为临床应用 ESW 治疗骨肌疾病提供理论依据。**方法:**建立骨骼肌钝挫伤模型,将实验分为治疗组、对照组。治疗组在损伤后第 2 天进行 ESW 治疗,治疗组和对照组于治疗第 1、4、7 天取损伤区域组织进行 HE 染色观察组织形态;免疫组化检测肌肉生长抑制素(myostatin, Mstn)的表达,并利用图像分析软件进行平均光密度(average optical density, AOD)分析;Western blot 检测生肌决定因子(Myod)、Mstn 蛋白的表达水平。**结果:**①治疗组肌纤维萎缩逐渐减轻,炎症细胞浸润减少,期间可见大量新生肌细胞,治疗后肌纤维排列整齐。②免疫组化结果显示,治疗组 Mstn(第 1 天:  $0.158 \pm 0.015$ ,  $t=3.229$ ,  $P=0.032$ ; 第 4 天:  $0.203 \pm 0.004$ ,  $t=6.069$ ,  $P=0.004$ ; 第 7 天:  $0.149 \pm 0.009$ ,  $t=2.821$ ,  $P=0.048$ )表达低于对照组(第 1 天:  $0.190 \pm 0.006$ ; 第 4 天:  $0.242 \pm 0.189$ ; 第 7 天:  $0.171 \pm 0.011$ );③Western blot 结果显示,Myod 蛋白治疗组的表达量随着强度的增加呈上升后下降的趋势( $F=50.074$ ;  $P=0.000$ ),且随着时间的变化表达量也呈先上升后下降的趋势( $F=46.217$ ;  $P=0.000$ );在  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  下,治疗组(第 1 天:  $0.998 \pm 0.163$ ; 第 4 天:  $1.155 \pm 0.059$ ; 第 7 天:  $0.733 \pm 0.077$ )表达均高于对照组(第 1 天:  $0.410 \pm 0.115$ ; 第 4 天:  $0.560 \pm 0.194$ ; 第 7 天:  $0.250 \pm 0.103$ )。Mstn 蛋白随着冲击强度的增加,表达量呈逐渐减少的趋势( $F=86.103$ ;  $P=0.000$ ),不同时间的表达量先上升后下降( $F=32.380$ ;  $P=0.000$ );  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  强度下,治疗组(第 1 天:  $0.131 \pm 0.044$ ; 第 4 天:  $0.383 \pm 0.022$ ; 第 7 天:  $0.162 \pm 0.027$ )表达均低于对照组(第 1 天:  $0.388 \pm 0.060$ ; 第 4 天:  $0.829 \pm 0.192$ ; 第 7 天:  $0.508 \pm 0.112$ )。 **结论:**本实验证实 ESW 能够促进大鼠骨骼肌损伤的修复。

**【关键词】**体外冲击波;骨骼肌;损伤修复**【中图分类号】**R493**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-01-15

## Study on repair of skeletal muscle injury by extracorporeal shock wave in rats

Cao Yu, Wang Wei, Lü Xin, Zhou Da'an

(Institute of Orthopaedics of Jinzhou Medical University, The Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of extracorporeal shock wave (ESW) on repair of skeletal muscle injury, so as to provide theoretical basis for clinical application of ESW in the treatment of skeletal muscle disease. **Methods:** A model of skeletal muscle blunt contusion was established, and the experiment was divided into the ESW group and the injury group. The ESW group were treated with ESW on the 1st day after injury, and the tissues in the injury area of the two groups were taken for HE staining on the 1st d, 4th d, and 7th d after treatment to observe the tissue morphology; immunohistochemistry was used to detect the expression of myostatin (Mstn), and the images analysis software was used to perform average optical density (AOD) analysis; Western blot was used to detect expression levels of Myod and Mstn protein. **Results:** In the ESW group, the muscle fiber atrophy was gradually alleviated and the inflammatory cell infiltration was decreased. During this period, a large number of new muscle cells were seen and post-treatment muscle fiber was lined up in order. Results of immunohistochemistry showed that Mstn (1st d:  $0.158 \pm 0.015$ ,  $t=3.229$ ,  $P=0.032$ ; 4th d:  $0.203 \pm 0.004$ ,  $t=6.069$ ,  $P=0.004$ ; 7th d:  $0.149 \pm 0.009$ ,  $t=2.821$ ,  $P=0.048$ ) expression was lower than that in the control group (1st d:  $0.190 \pm 0.006$ ; 4th d:  $0.242 \pm 0.189$ ; 7th d:  $0.171 \pm 0.011$ ). Western blot results showed that the expression of Myod protein in the ESW group was firstly increased with increasing intensity and then decreased ( $F=50.074$ ,  $P=0.000$ ). And over time, the amount of expression also showed a trend of rising at first and then falling ( $F=46.217$ ,  $P=0.000$ ). With the concentration of  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$ , expressions in the treatment group (1st d:  $0.998 \pm 0.163$ ; 4th d:  $1.155 \pm 0.059$ ; 7th d:  $0.733 \pm 0.077$ ) were higher than those in the control group (1st d:  $0.410 \pm 0.115$ ; 4th d:  $0.560 \pm 0.194$ ; 7th d:  $0.250 \pm 0.103$ ). With the increase of the impact strength, the expression of Mstn

作者介绍: 曹 宇, Email: lan857373993@163.com,

研究方向: 骨骼肌损伤的研究和治疗。

通信作者: 周达岸, Email: 737782440@qq.com。

基金项目: 辽宁省自然科学基金指导计划资助项目(编号: 20180551081)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200619.1425.004.html>

(2020-06-19)

protein was gradually decreased ( $F=86.103, P=0.000$ ). Expression at different time was risen at first and then decreased ( $F=32.380, P=0.000$ ). With the concentration of  $0.14 \text{ mJ/mm}^2$ , expressions in the ESW group (1st d:  $0.131 \pm 0.044$ ; 4th d:  $0.383 \pm 0.022$ ; 7th d:  $0.162 \pm 0.027$ ) were lower than those in the control group (1st d:  $0.388 \pm 0.060$ ; 4th d:  $0.829 \pm 0.192$ ; 7th d:  $0.508 \pm 0.112$ ). **Conclusion:** This experiment confirms that ESW can promote the repair of skeletal muscle injury in rats.

**【Key words】**extracorporeal shock wave; skeletal muscle; injury repair

骨骼肌损伤是运动中最常见的损伤类型, 损伤发生率为 35%~55%<sup>[1]</sup>。愈合质量成为影响生活质量和运动寿命的重要因素之一<sup>[2]</sup>。骨骼肌损伤治疗的常用治疗方法包括冷疗<sup>[3]</sup>、超声疗法<sup>[4]</sup>、非甾体类抗炎药 (non-steroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)<sup>[5]</sup>, 以及富含血小板的血浆 (platelet-rich plasma, PRP)。

体外冲击波 (extracorporeal shock wave, ESW) 是利用冲击波发生器产生的巨大能量, 对人体组织产生效应<sup>[7]</sup>。因其创伤性小、精准高效等优点, 在骨科已成功用于治疗运动相关的肌腱病, 如肌肉运动损伤、足底筋膜炎、肱骨外上髁炎及钙化或非钙化性肌腱炎<sup>[8-9]</sup>。此外, ESW 是治疗脑瘫和中风患者疼痛和肌肉张力的一种治疗选择<sup>[10]</sup>, 还可以促进烧伤后瘢痕修复、减轻腿部溃疡<sup>[11]</sup>。ESW 对骨骼肌损伤修复的机制至今仍不明确, 故本实验研究 ESW 对骨骼肌损伤修复的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选用健康雄性 SD 大鼠 45 只, 体质量 ( $200 \pm 30$ ) g、所有动物实验经锦州医科大学实验动物伦理委员会批准, 动物许可证号: SCXK(辽)2017-0003。所有动物被安置在 ( $22 \pm 1$ ) °C, 12 h 明暗交替环境下, 可自由获取食物和水, 通风良好, 在实验开始前有 1 周的适应时间。

将大鼠行腹腔注射麻醉后, 参照 Chongsatiantam A 等<sup>[4]</sup>的实验方法, 采用骨骼肌钝挫伤造模, 建立骨骼肌损伤的动物实验模型。将大鼠后肢褪毛并使其膝关节固定伸直 0°, 踝关节背伸 90°, 将质量为 260 g 的实心不锈钢钢珠置于管道顶端 (高 90 cm, 直径 40 mm) 释放后垂直击中一打击装置, 动能为 2.29 J, 打击装置底端置于小鼠一侧腓肠肌中段。击打后区域皮肤无破损, 皮下有瘀斑, 通过切诊发现胫腓骨无骨折, 醒后发现被打侧肢体跛行严重, 分离腓肠肌发现血肿并且有淤血残留, 提示大鼠骨骼肌钝挫伤模型建模成功。建模成功后, 随机将模型分为对照组 ( $n=9$ ) 和治疗组, 治疗组分别为

$0.06 \text{ mJ/mm}^2$  组 ( $n=9$ )、 $0.1 \text{ mJ/mm}^2$  组 ( $n=9$ )、 $0.14 \text{ mJ/mm}^2$  组 ( $n=9$ )、 $0.18 \text{ mJ/mm}^2$  组 ( $n=9$ ), 每组又按时间点分为第 1、4、7 天 3 个亚组, 每个亚组  $n=3$ 。

### 1.2 试剂和仪器

OCT 包埋剂 (美国, SAKURA 公司), HE 染色试剂盒、AAF 固定液、4% 组织细胞固定液、封闭山羊血清 (中国, 索莱宝公司), DAB 显色试剂盒 (中国, 中杉金桥公司), 标准级盖玻片 (中国, 世泰公司), Myod、Mstn、 $\beta$ -actin 兔抗鼠抗体 (美国, Abcam 公司), 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (美国, Earthox 公司), 蛋白 Marker (美国, Thermo Fisher 公司), 体外冲击波治疗仪 (瑞士, EMS 公司), 显微镜 (日本, Olympus 公司), 全自动电泳仪 (美国, Bio-Rad 公司), 成像分析系统 (美国, 通用电器公司), 冰冻切片机 (德国, 徕卡公司)、-80 °C 超低温冰箱 (中国, 海尔公司)、脱色摇床 (中国, 海门其林贝尔)。

### 1.3 方法

**1.3.1 ESW 治疗** 于造模成功后第 2 天使用冲击波治疗仪进行治疗, 治疗部位选用冲击头直径为 10 mm, 频率 10 Hz, 500 次脉冲, 能流密度为分别为  $0.06 \text{ mJ/mm}^2$ 、 $0.1 \text{ mJ/mm}^2$ 、 $0.14 \text{ mJ/mm}^2$ 、 $0.18 \text{ mJ/mm}^2$ , 治疗前利用褪毛器将治疗区域褪毛, 在治疗部位涂抹适量耦合剂, 损伤治疗 1 次, 治疗后不作任何处理, 正常饲养。对照组以同样方法进行, 但不进行击打 (图 1)。



图 1 ESW 治疗受损骨骼肌

**1.3.2 HE 染色** 于治疗开始后第 1、4、7 天进行组织取材, 迅速取下腓肠肌, 每组左侧取约  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$  肌肉组织, 经过 4% 多聚甲醛固定, 蔗糖脱水后进行冰冻切片, 将切片利用 AAF 固定液固定后, 水洗, 苏木精染色 3 min, 流水冲洗, 分化液分化 30 s, 自来水中返蓝, 伊红染色, 经梯度

酒精脱水、二甲苯透明后中性树胶封片。显微镜下进行观察并拍照。

1.3.3 免疫组化检测 冰冻切片方法如上。将经过 AAF 固定后的冰冻切片,用 0.3% 甲醇双氧水避光孵育 30 min,抗原修复 10 min,山羊血清室温孵育 15 min,滴加 1:200 稀释好的 Mstn 一抗,4 ℃ 孵育过夜。复温 45 min 后 PBS 冲洗,滴加二抗 1:500 稀释,DAB 显色 5~10 min,显微镜下观察染色程度,待细胞着色时吸去,自来水冲洗 10 min,苏木素复染,分化液分化,自来水返蓝 10 min,脱水,透明后封片。使用 IPP 6.0 分析软件对图像进行分析。

1.3.4 Western blot 检测 将大鼠处死后立即取损伤区域肌肉组织,用 BCA 法提取蛋白,定量,制胶,每孔加入 30 μg 样品,然后进行电泳、转膜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,室温封闭 3 h。一抗 Myod、Mstn 按照 1:1 000,β-actin 按照 1:5 000 比例稀释,4 ℃ 孵育过夜后,洗膜 4 次,每次 5 min,孵育二抗,按照 1:10 000 比例稀释,室温下孵育 2 h 后进行洗膜,滴加超敏 ECL 发光液上机进行检测。

#### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 24.0 软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差

( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,平均光密度(average optical density,AOD)值的组间比较采用独立样本 *t* 检验,分析时间和组别的因素对蛋白相对表达量的影响采用双因素方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 损伤骨骼肌形态变化

HE 染色结果如图 2 所示。经过中等强度 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> ESW 治疗第 1 天,治疗组和对照组均可见肌纤维排列紊乱,大量炎症细胞浸润,并迁移至挫伤部位。随着 ESW 治疗的进行,治疗组炎症细胞浸润减少,可见大量新生的大小形态不一的成肌细胞,细胞核逐渐从细胞中央迁移至细胞边缘,肌纤维萎缩逐渐减轻,肌纤维排列整齐。

### 2.2 Mstn 免疫组化 AOD 值

Mstn 免疫组化染色图片结果显示阳性呈棕黄色,定位表达于细胞质,对照组和治疗组的表达量在第 1、4、7 天呈现先上升后下降的趋势,治疗组在每个时间点的表达量均低于对照组( $P<0.05$ )(图 3、表 1)。

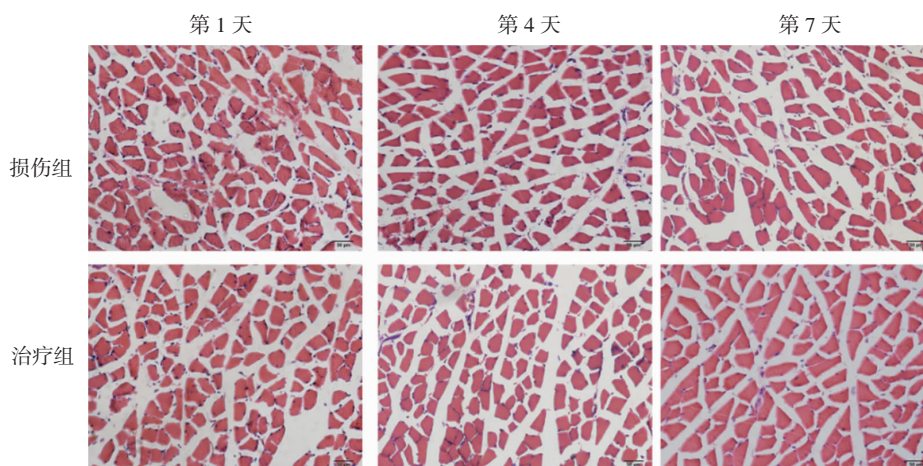


图 2 HE 染色结果 (200 × )

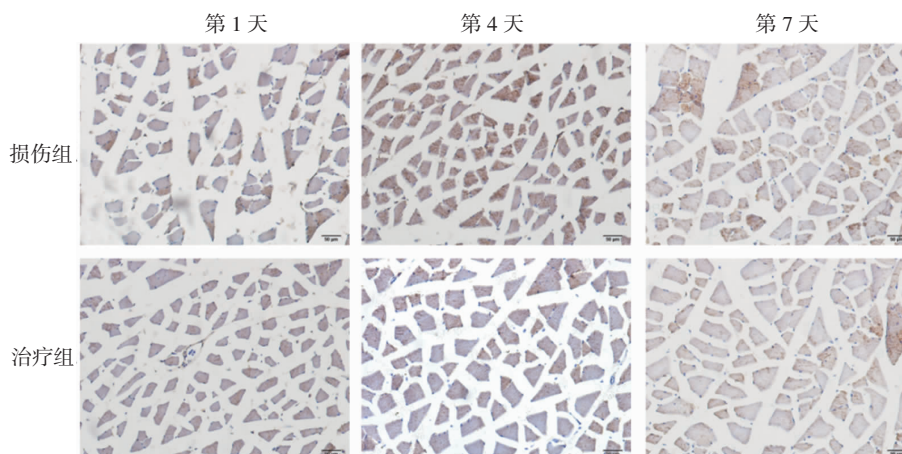


图 3 Mstn 免疫组化图片 (200 × )

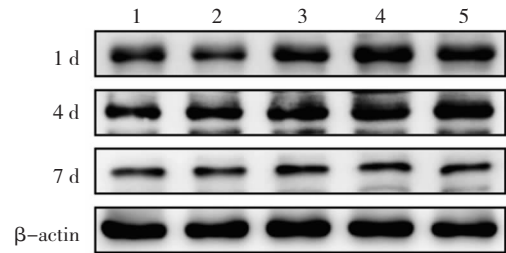
表 1 Mstn 免疫组化图片 AOD 值 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

| 组别         | 第 1 天         | 第 4 天         | 第 7 天         |
|------------|---------------|---------------|---------------|
| 对照组        | 0.190 ± 0.006 | 0.242 ± 0.189 | 0.171 ± 0.011 |
| 治疗组        | 0.158 ± 0.015 | 0.203 ± 0.004 | 0.149 ± 0.009 |
| <i>t</i> 值 | 3.229         | 6.069         | 2.821         |
| <i>P</i> 值 | 0.032         | 0.004         | 0.048         |

## 2.3 Western blot 检测 Myod、Mstn 蛋白表达水平

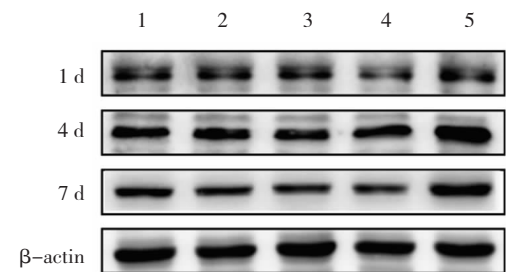
2.3.1 Myod 蛋白表达 治疗组的蛋白表达量随着强度的增加呈现先上升后下降的趋势, 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 强度的表达量最高, 均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。第 1、4、7 天, 各个时间点 0.1 mJ/mm<sup>2</sup>、0.14 mJ/mm<sup>2</sup>、0.18 mJ/mm<sup>2</sup> 组的表达量较对照组和 0.06 mJ/mm<sup>2</sup> 组表达量增多, 均有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。各组强度在不同时间的蛋白表达量均在伤后第 4 天升至最高, 然后开始下降 (图 4、表 2)。

2.3.2 Mstn 蛋白表达 各组表达量均随着时间的延长呈现上升后下降的趋势, 在第 4 天表达量最高, 但是治疗组冲击波各强度组的表达量较对照组低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 随着冲击强度增加, 表达量呈现逐渐减少的趋势, 其中 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 能流密度下降较明显 (图 5、表 3), 0.06 mJ/mm<sup>2</sup> 强度下与对照组差异不具有统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



注: 1, 对照组; 2: 0.06 mJ/mm<sup>2</sup> 组; 3: 0.1 mJ/mm<sup>2</sup> 组; 4: 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 组; 5: 0.18 mJ/mm<sup>2</sup> 组

图 4 不同强度 ESW 治疗后 Myod 蛋白表达电泳图



注: 1, 对照组; 2: 0.06 mJ/mm<sup>2</sup> 组; 3: 0.1 mJ/mm<sup>2</sup> 组; 4: 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 组; 5: 0.18 mJ/mm<sup>2</sup> 组

图 5 不同强度 ESW 治疗后 Mstn 蛋白电泳图

表 2 不同强度 ESW 治疗后 Myod 蛋白相对表达量 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

| 组别                        | 第 1 天                         | 第 4 天                         | 第 7 天                         |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照组                       | 0.410 ± 0.115                 | 0.560 ± 0.194                 | 0.250 ± 0.103                 |
| 0.06 mJ/mm <sup>2</sup> 组 | 0.498 ± 0.075 <sup>b</sup>    | 0.607 ± 0.087 <sup>b</sup>    | 0.309 ± 0.057 <sup>b</sup>    |
| 0.10 mJ/mm <sup>2</sup> 组 | 0.672 ± 0.113 <sup>ac</sup>   | 0.781 ± 0.076 <sup>ac</sup>   | 0.463 ± 0.111 <sup>ac</sup>   |
| 0.14 mJ/mm <sup>2</sup> 组 | 0.998 ± 0.163 <sup>acd</sup>  | 1.155 ± 0.059 <sup>acd</sup>  | 0.733 ± 0.077 <sup>acd</sup>  |
| 0.18 mJ/mm <sup>2</sup> 组 | 0.891 ± 0.009 <sup>acde</sup> | 1.000 ± 0.058 <sup>acde</sup> | 0.616 ± 0.027 <sup>acde</sup> |
|                           | 组间比较                          | 时间比较                          | 交互作用                          |
| <i>F</i> 值                | 50.074                        | 46.217                        | 0.295                         |
| <i>P</i> 值                | 0.000                         | 0.000                         | 0.962                         |

注: a, 与对照组比较,  $P=0.000$ ; b, 与对照组比较,  $P=0.145$ ; c, 与 0.06 mJ/mm<sup>2</sup> 组比较,  $P=0.000$ ; d, 与 0.1 mJ/mm<sup>2</sup> 组比较,  $P=0.000$ ; e, 与 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 组比较,  $P=0.007$

表 3 不同强度 ESW 治疗后 Mstn 蛋白相对表达量 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

| 组别                        | 第 1 天                        | 第 4 天                        | 第 7 天                        |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 对照组                       | 0.388 ± 0.060                | 0.829 ± 0.192                | 0.508 ± 0.112                |
| 0.06 mJ/mm <sup>2</sup> 组 | 0.350 ± 0.018 <sup>b</sup>   | 0.771 ± 0.112 <sup>b</sup>   | 0.456 ± 0.058 <sup>b</sup>   |
| 0.10 mJ/mm <sup>2</sup> 组 | 0.292 ± 0.015 <sup>ac</sup>  | 0.646 ± 0.119 <sup>ac</sup>  | 0.323 ± 0.043 <sup>ac</sup>  |
| 0.14 mJ/mm <sup>2</sup> 组 | 0.131 ± 0.044 <sup>ade</sup> | 0.383 ± 0.022 <sup>ade</sup> | 0.162 ± 0.027 <sup>ade</sup> |
| 0.18 mJ/mm <sup>2</sup> 组 | 0.199 ± 0.044 <sup>afg</sup> | 0.483 ± 0.023 <sup>afg</sup> | 0.201 ± 0.025 <sup>afg</sup> |
|                           | 组间比较                         | 时间比较                         | 交互作用                         |
| <i>F</i> 值                | 86.103                       | 32.380                       | 1.014                        |
| <i>P</i> 值                | 0.000                        | 0.000                        | 0.446                        |

注: a, 与对照组比较,  $P=0.000$ ; b, 与对照组比较,  $P=0.192$ ; c, 与 0.06 mJ/mm<sup>2</sup> 组比较,  $P=0.008$ ; d, 与 0.06 mJ/mm<sup>2</sup> 组比较,  $P=0.000$ ; e, 与 0.1 mJ/mm<sup>2</sup> 组比较,  $P=0.000$ ; f, 与 0.1 mJ/mm<sup>2</sup> 组比较,  $P=0.002$ ; g, 与 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 组比较,  $P=0.070$

### 3 讨 论

骨骼肌损伤的修复再生是一个缓慢、复杂且微调的过程,因此在肌肉损伤后缓解疼痛和提高损伤修复速度是目前康复治疗领域研究的重点<sup>[12]</sup>。ESW 是被认为是可以替代激光治疗、高压氧治疗及 PRP,用于治疗肌肉损伤的一种新兴治疗方法<sup>[13,19]</sup>。主要是因为 ESW 创伤性小、非侵入性、精准度较高且方便快捷,并且具有松解粘连、诱导血管再生等生物学效应,产生的机械效应和空化效应能够消除炎症,缓解疼痛<sup>[14-15]</sup>。虽然 ESW 在临床上应用广泛,并且效果良好,但在目前的报道中有关 ESW 对骨骼肌作用的相关研究较少,需要更加全面且深入地对其进行研究,为 ESW 在临床上用于治疗骨肌疾病提供理论依据。

本实验采用的骨骼肌损伤模型参照 Chongsatiantam A 等<sup>[4]</sup>的方法,进行改良后,能够模拟闭合性骨骼肌损伤,与人的肌肉钝挫伤相似。根据造模后的望诊、切诊显示,打击部位皮肤无破损,皮下有出血、有瘀斑,醒后可见肢体跛行严重。受损骨骼肌取材显示受损侧骨骼肌较正常的明显肿大,有淤血<sup>[16]</sup>。HE 染色结果显示,大量炎症细胞浸润、肌纤维断裂、肌外膜的完整性被破坏,提示本建模方法能够用于大鼠腓肠肌钝挫伤后的再生修复研究。

骨骼肌损伤因为其炎症的产生会阻碍肌肉的再生,长时间会产生纤维化,最终形成瘢痕,影响运动功能<sup>[17-18]</sup>。骨骼肌损伤修复一般可以分为 3 个阶段,即损伤期、修复期和塑型期<sup>[19]</sup>。其中炎症反应在骨骼肌损伤修复过程中至关重要,炎症细胞不仅可以帮助清除细胞碎片,还可以募集骨骼肌卫星细胞<sup>[20]</sup>。卫星细胞与肌肉损伤相关的基因调控有关,例如由 Myod、Myog、Myf5 和 Myf6 组成的成肌调控因子 MRFs 家族,以及肌肉生长抑制素 Mstn。Myod 可以激活静止的肌卫星细胞,使其增殖分化成为成肌细胞<sup>[21-22]</sup>。有研究指出,机体在受损伤后能够快速上调受损肌肉的 Myod 蛋白表达水平<sup>[23]</sup>。Mstn 可以抑制骨骼肌的生长。研究证实,Mstn 抑制骨骼肌的生长主要通过调节成肌细胞的数量、增殖速度来实现<sup>[24]</sup>。研究还证实,Mstn 可能在肌肉生长的各个阶段发生作用<sup>[25]</sup>。

本研究 HE 染色结果显示,随着 ESW 治疗的进行,肌纤维萎缩逐渐减轻,炎症细胞浸润减少,期间可见大量新生肌细胞,治疗后肌纤维排列整齐。这表明 ESW 可能通过促进肌卫星细胞激活、增殖与分化,促进多核肌小管形成,进而促进融合成肌纤维,修复受损骨骼肌。

本研究中,不同组别的 Myod 蛋白表达均呈现先上升后下降的表达趋势,可见骨骼肌损伤后由损伤期进入修复期,肌卫星细胞被激活开始增殖和分化。当使用 0.14 mJ/mm<sup>2</sup> 强度时表达量最高,治疗组均高于对照组,差异有统计学意义,较低强度下刺激与对照组差异不明显。Mstn 蛋白各组表达量均随着时间的延长呈现先上升后下降的趋势,在第 4 天时表达量最高,但是治疗组冲击波各强度组的表达量较对照组低,差异具有统计学意义。随着冲击强度的增加,表达量呈现逐渐减少的趋势。这与已有研究结果一致,Mstn 在损伤的肌肉中呈高表达<sup>[26]</sup>。本研究结果表明,通过冲击波上调 Myod 的表达,同时显著下调 Mstn 的表达促进骨骼肌修复。分析其机制可能是因为骨骼肌损伤的修复与机械刺激有关。ESW 是一种机械刺激,产生机械效应,通过增加蛋白质的合成和肌卫星细胞的增殖与分化诱导肌纤维再生<sup>[27]</sup>。ESW 已经被证实可以上调很多与再生相关的因子,例如胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子、一氧化氮等<sup>[28-29]</sup>。

综上所述,本研究虽然发现 ESW 能够促进肌卫星细胞的增殖分化,并且呈现剂量依赖性地上调 Myod 表达,同时下调 Mstn 的表达,从而有效促进骨骼肌损伤修复,为临床应用 ESW 治疗骨骼肌损伤及治疗强度的选择提供理论依据。但是,其相互作用的确切机制仍不清楚,还需进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] George C, Smith C, Isaacs AW, et al. Chronic Prosopis glandulosa treatment blunts neutrophil infiltration and enhances muscle repair after contusion injury[J]. *Nutrients*, 2015, 7(2): 815-830.
- [2] Pagano AF, Arc-Chagnaud C, Brioché T, et al. Muscle resting and TGF- $\beta$  inhibitor treatment prevent fatty infiltration following skeletal muscle injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53(1): 62-75.
- [3] Point M, Guilhem G, Hug F, et al. Cryotherapy induces an increase in muscle stiffness[J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2018, 28(1): 260-266.

- [4] Chongsatientam A, Yimlamai T. Therapeutic pulsed ultrasound promotes revascularization and functional recovery of rat skeletal muscle after contusion injury[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2016, 42(12): 2938–2949.
- [5] Morelli KM, Brown LB, Warren GL. Effect of NSAIDs on recovery from acute skeletal muscle injury: a systematic review and meta-analysis[J]. *Am J Sports Med*, 2018, 46(1): 224–233.
- [6] Dueweke JJ, Awan TM, Mendias CL. Regeneration of skeletal muscle after eccentric injury[J]. *J Sport Rehabil*, 2017, 26(2): 171–179.
- [7] Arand M. Physical treatment options with impact on bone healing[J]. *Unfallchirurg*, 2019, 122(7): 526–533.
- [8] Lai TW, Ma HL, Lee MS, et al. Ultrasonography and clinical outcome comparison of extracorporeal shock wave therapy and corticosteroid injections for chronic plantar fasciitis: a randomized controlled trial[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2018, 18(1): 47–54.
- [9] Vitali M, Naim Rodriguez N, Pironti P, et al. ESWT and nutritional supplementation(Tendisulfur Forte) vs ESWT-only in the treatment of lateral epicondylitis, Achilles tendinopathy, and rotator cuff tendinopathy: a comparative study[J]. *J Drug Assess*, 2019, 8(1): 77–86.
- [10] Stieger M, Schmid JP, Yawalkar N, et al. Extracorporeal shock wave therapy for injection site panniculitis in multiple sclerosis patients[J]. *Dermatology*, 2015, 230(1): 82–86.
- [11] Cho YS, Joo SY, Cui H, et al. Effect of extracorporeal shock wave therapy on scar pain in burn patients: a prospective, randomized, single-blind, placebo-controlled study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(32): e4575.
- [12] Chen B, Shan T. The role of satellite and other functional cell types in muscle repair and regeneration[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2019, 40(1): 1–8.
- [13] Schnurrer-Luke-Vrbanic T, Avancini-Dobrovic V, Sosa I, et al. VEGF-A expression in soft tissues repaired by shockwave therapy: differences between modalities[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2018, 32(3): 583–588.
- [14] Kostenko EV, Zuev DS, Zaitseva TN. The role of extracorporeal shock wave therapy in the combined restorative treatment of the patients presenting with myofascial pain syndrome[J]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*, 2018, 95(4): 62–68.
- [15] Sundaram S, Sellamuthu K, Nagavelu K, et al. Stimulation of angiogenesis using single-pulse low-pressure shock wave treatment[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2018, 96(11): 1177–1187.
- [16] Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, et al. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum; animal experiments using a muscle contusion model[J]. *Int J Sports Med*, 2004, 25(8): 582–587.
- [17] Zhao JC, Zhang BR, Shi K, et al. Lower energy radial shock wave therapy improves characteristics of hypertrophic scar in a rabbit ear model[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 933–939.
- [18] Hauck JS, Howard ZM, Lowe J, et al. Mineralocorticoid receptor signaling contributes to normal muscle repair after acute injury[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1324.
- [19] Zissler A, Steinbacher P, Zimmermann R, et al. Extracorporeal shock wave therapy accelerates regeneration after acute skeletal muscle injury[J]. *Am J Sports Med*, 2017, 45(3): 676–684.
- [20] Lu HN, Dang LG, Li N, et al. Combination of mRNA of repair-related genes in rat skeletal muscles for wound age estimation[J]. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 2019, 35(2): 160–165.
- [21] Lassar AB. Finding MyoD and lessons learned along the way[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 3–9.
- [22] Machado L, Relaix F. Heterochromatin compaction is regulated by Suv4–20h1 to maintain skeletal muscle stem cells quiescence[J]. *Stem Cell Investig*, 2016, 3: 23.
- [23] de Morrée A, van Velthoven C, Gan Q, et al. Staufeni inhibits MyoD translation to actively maintain muscle stem cell quiescence[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(43): E8996–9005.
- [24] Castillero E, Akashi H, Najjar M, et al. Activin type II receptor ligand signaling inhibition after experimental ischemic heart failure attenuates cardiac remodeling and prevents fibrosis[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 318(2): H378–390.
- [25] Wu L, Li Y, Xu Y, et al. The roles of two myostatins and immune effects after inhibition in Qi river crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 98: 710–719.
- [26] 张佳怡, 王 彤, 白玉琢, 等. 电针介入时机对腰多裂肌损伤模型大鼠 Foxo1、Myostatin、Myod 蛋白表达的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(3): 598–601, 607.
- [27] 史仍飞. 骨骼肌生长与适应的机械信号与途径[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(24): 4507–4511.
- [28] Rosso F, Bonasia DE, Marmotti A, et al. Mechanical stimulation (pulsed electromagnetic fields “PEMF” and extracorporeal shock wave therapy “ESWT”) and tendon regeneration: a possible alternative[J]. *Front Aging Neurosci*, 2015, 7: 211.
- [29] Cheng JH, Wang CJ, Chou WY, et al. Comparison efficacy of ESWT and Wharton’s jelly mesenchymal stem cell in early osteoarthritis of rat knee[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 586–598.

(责任编辑: 冉明会)