

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20131115

兔骨骼肌钝挫伤恢复过程中碱性成纤维细胞生长因子的变化及按摩的干预作用

刘仁建,唐成林,邹敏,郜婕,谢辉,陈晓琳,唐曦

(重庆医科大学中医药学院中医药研究室,重庆 400016)

【摘要】目的:研究新西兰兔股四头肌经重物外力损伤后,在肌组织损伤修复过程中,按摩对肌肉组织的病理修复、超声影像学观察以及对碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)的影响,探讨按摩促进肌肉损伤修复的作用机制。**方法:**健康成年雄性新西兰大白兔 32 只,体质量(2.0 ± 0.5) kg,按随机抽样法分为正常对照组(A 组, $n=4$)和模型组,模型组分为按摩前对照组(B 组, $n=4$)、自然恢复组(C 组, $n=12$)和按摩组(D 组, $n=12$)。A 组实验动物不作任何处理,作为正常对照;B、C、D 组实验动物用自制打击器制备兔右后肢股四头肌损伤模型。C 组不予按摩,D 组于制模后第 5 天开始按摩。C、D 组于伤后第 7、14 天及第 21 天各取 4 只实验动物股四头肌样本,免疫组化方法检测 bFGF 蛋白表达,HE 染色观察其组织病理变化,微泡超声影像技术检测制模后第 7、14 天的组织坏死情况。**结果:**按摩干预后,C 组和 D 组比较,第 7 天 bFGF 表达量 D 组>C 组($P=0.016$),而在制模后第 14、21 天 bFGF 表达量 C 组均>D 组($P=0.000$, $P=0.020$)。超声微泡造影及 HE 染色显示,D 组与 C 组比较,损伤部位较轻,血供较丰富,坏死区明显减轻且血管恢复较快。**结论:**按摩可有效防止肌细胞的萎缩、退变及坏死,为损伤区域提供丰富血供,促进血管生成,其利于损伤修复及新生血管形成的机制可能与 bFGF 有关。

【关键词】按摩;骨骼肌;成纤维细胞生长因子

【中国图书分类法分类号】R264;R247.9;R685.4;R244

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-05

Changes in basic fibroblast growth factor during the healing process of rabbit skeletal muscle contusion and intervention effect of massage

LIU Renjian, TANG Chenglin, ZHOU Min, GAO Jie, XIE Hui, CHEN Xiaolin, TANG Xi

(Teaching and Research Section of Traditional Chinese Medicine, Traditional Chinese Medical College, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of massage on quadriceps femoris repair after injury by external force with the histological observation and ultrasound imaging observation as well as the influences of basic fibroblast growth factor (bFGF) in New Zealand rabbits so as to explore the possible molecular mechanisms of massage in repair of muscle injury. **Methods:** Thirty-two New Zealand white rabbits, weighing (2.0 ± 0.5) kg, were randomly divided into 4 groups: normal control (group A, $n=4$), control group before the massage (group B, $n=4$), self-repairing group (group C, $n=12$, further divided into 7, 14, 21 d groups) and massage group (group D, $n=12$, further divided into 7, 14, 21 d groups). In group A, no treatment was made and rabbits were taken as normal controls; in groups B, C, D, rabbit models of quadriceps femoris injury were prepared by self-made beater; in group C, no massage therapy was given and rabbits were taken as natural recovery controls; in group D, massage therapy was given at the 5th after model was built. At 7, 14, 21 d after injury, 4 different animal quadriceps samples were taken in groups C and D respectively. Immunohistochemical method was used to detect expression of bFGF protein. HE staining was employed to inspect pathological changes. Ultrasound imaging was employed to inspect the tissue necrosis situation at 7, 14 d after model build. **Results:** After massage intervention, expression of bFGF was higher in group D than in group C at 7 d ($P=0.016$), higher in group C than in group D at 14, 21 d ($P=0.000$, $P=0.020$). Ultrasound of micro-bubble angiography and HE staining showed that injury was lighter, blood supply was richer, necrotic area was significantly decreased and vascular restored faster in group D compared with those in group C. **Conclusions:** Massage can effectively prevent muscle atrophy, degeneration and necrosis, provide a rich blood supply for the damage regions and promote the angiogenesis. Mechanism of beneficial effect of massage on injury repair and neovascularization may be related with bFGF.

【Key words】 massage; skeletal muscle; basic fibroblast growth factor

作者介绍:刘仁建, Email: liujian8875627@163.com,

研究方向:推拿对损伤修复机制研究。

通信作者:邹敏, Email: zoumin12345@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81273870);重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ110311);九龙坡区科技计划资助项目[编号:(2010)43号文]。

《灵枢·经脉篇》“脉不通,脉不通则血不流”。中医学认为,急性软组织损伤多因急性跌、打、扭、挫等外力作用而引起筋肉、脉络损伤,血溢脉外所致,主要病机是气滞血瘀、脉络不通,治当活血化瘀、消肿通络、行气止痛。《医宗金鉴·正骨心法要旨》指出:“按其经络,以通郁闭之气,摩其雍聚,以散淤结之肿,其患可愈”。推拿按摩是祖国医学的特色疗法,具有简、便、验、廉等特点,可促进损伤部位新生毛细血管的形成和成熟,改善局部血液循环,增加血流量,促进新陈代谢,减轻受损组织肿胀,清除坏死成分,加快炎症消散,促进受损肌肉形态结构的恢复。其他研究亦表明按摩疗法在肌肉损伤康复方面具有独到效果^[1-2]。而现代研究表明,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种多种生物学活性的创伤愈合因子^[3]。从理论上讲 bFGF 与肌肉钝挫损伤的修复密切相关。本实验借助新西兰大白兔股四头肌损伤模型探索按摩对肌肉损伤修复过程中局部组织病理学变化及 bFGF 的影响,为肌肉损伤修复提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

共选取健康成年雄性新西兰大白兔 32 只,体质量(2.0 ± 0.5) kg,由重庆医科大学实验动物中心提供(医学动物合格证 SCXK 渝 20070002)。主要实验试剂及仪器:一抗为山羊抗兔 bFGF 单克隆抗体,二抗为通用型 SP 系列工作液试剂盒(SP-9000),均由武汉博士德生物工程有限公司提供。8%硫化钠脱毛剂,自制软组织打击器,AFY-10 按摩器(天津京康瑞福科技发展有限公司)。80-2 型低速离心机(上海手术器械厂)、生物显微镜、图像采集系统等设备由重庆医科大学基础医学院提供。

1.2 实验动物分组及制模

上述 32 只实验兔均分笼饲养(室温 25 °C),经适应性喂养 7 d 后采用简单随机抽样法将实验兔分为 4 组,正常对照组(A 组, $n=4$)、按摩前对照组(B 组, $n=4$)、自然恢复组(C 组, $n=12$)和按摩组(D 组, $n=12$)。C、D 组又分为制模后 7、14、21 d 3 个亚组(各 4 只)。A 组实验动物不作任何处理,作为正常对照;B、C、D 组实验动物用自制打击器制备兔右后肢股四头肌损伤模型。C 组不予按摩, D 组于造模后第 5 天开始按摩。

于制模前 1 d 采用 8%硫化钠脱毛剂去除各组实验兔后腿被毛,采用自制重力铅锤打击兔右后肢股四头肌肌腹中段以建立股四头肌损伤模型,具体制模过程如下:将家兔仰卧

位固定,于右后肢打击部位垫一层纱布防止皮肤损伤;采用自制重力铅锤(锤长 10 cm,重 0.5 kg,底面平滑,直径 2.5 cm)沿 PVC 硬塑料导向管(长 100 cm,直径 3.0 cm)自 70 cm 高处自由下落,同一部位连续打击 3 次,重力铅锤的投放和塑料导向管的固定每次均由同一人操作,以保证撞击力和损伤范围的一致性。肉眼可见打击部位出现肿胀和淤血,类似肌肉受撞击损伤,打击后无骨折,无皮肤破裂,表明模型建立成功^[4]。造模后放回笼中常规饲养。

1.3 按摩干预

D 组实验兔于造模后第 5 天开始按摩治疗,将实验兔置于兔盒内以侧卧位方式固定,将天津产 AFY-10 型按摩器固定于受损部位附近,对受损股四头肌及邻近肌组织进行按摩,按摩振动频率为 2 600 次/min,按摩时间为 15 min,每天 1 次。

1.4 组织样本取材和预处理

A 组于制模前 1 天, B 组于制模后第 5 天, C 组与 D 组于制模后第 7 天、第 14 天及第 21 天时各选出 4 只实验兔按每千克体质量 3 ml 腹腔注射水合氯醛,然后快速提取实验兔右腿损伤最严重区域肌肉。用冰生理盐水洗净残余的血液,将标本置于 4%甲醛缓冲液中固定,脱水后制成常规石蜡切片备用。

1.5 组织学观察

4%多聚甲醛固定液中固定 4 h 后取出股四头肌标本,常规乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,片厚 5 μ m。取其中一部分切片常规法行 HE 染色。100 倍光镜下观察切片病理结构后,200 倍光镜下对目标位点照相、至少记录 5 个不同视野。

1.6 免疫组化检查

将所取组织分别常规石蜡包埋,切片(5 μ m)。免疫组织化学法测定各组的 bFGF,操作按试剂盒说明书要求进行。组织切片脱蜡后用体积分数 3%的 H₂O₂ 室温孵育 15 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗,3 min × 3 次,枸橼酸盐溶液修复抗原 5 min × 3 次,室温放置冷却, PBS 清洗, A 液 37 °C 孵育 15 min, 一抗(bFGF 1:100)37 °C 孵育 2 h, PBS 清洗, B 液室温孵育 15 min, PBS 清洗, C 液孵育 15 min, DAB 显色, PBS 清洗, 苏木精复染, PBS 清洗, 盐酸酒精脱色, PBS 清洗, 梯度乙醇脱水至二甲苯, 中性树胶封片。每张切片随机选取 4 个视野进行拍照, 图片用 IPP 软件进行分析。以表示阳性的棕褐色为标准, 计算每张图片的吸光度值, 得出其平均吸光度值。

1.7 超声微泡检查

兔经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠(25 mg/kg)行全身麻醉, 8%的硫化钠脱毛, 胶布固定于实验台上。造影剂于使用前注入 3 ml 双蒸水, 迅速振荡至其完全溶解, 耳缘静脉注射(0.5 ml/只), 即刻用飞利浦 iu22 高端彩超诊断仪对受损股四头肌进行局部超声诊断, 观察并记录图像。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析, 采用单样本 K-S 进行

正态性检验,数据符合正态分布,采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有的统计检验均采用双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 一般情况

模型制备后当天,实验兔行动减少,饮食下降,第 2~6 天后恢复,实验过程中无死亡。实验期间动物饮食、粪便正常。

2.2 HE 染色结果分析

光镜下观察到,正常肌纤维排列整齐,大小一致(图 1A)。B 组可见肌纤维断裂、崩解,部分开始萎缩,肌纤维间隙明显加大,炎症反应明显(图 1B)。制模后第 7 天 D 组,可见肌纤维明显萎缩、坏死、退变的肌纤维横截面积较 A 组明显变小,肌纤维扭曲,伴强烈炎症反应,C 组与 D 组相比可见肌纤维萎缩,坏死更加明显(图 1C、D)。制模后第 14 天 2 组肌纤维萎缩、坏死均明显减轻,C 组与 D 组相比炎症反应仍很明显,肌纤维间隙较大排列紊乱,肌纤维间可见明显结缔组织填充,而 D 组新生的肌纤维明显较对照组多,且排列紧密(图 1E、F)。制模后第 21 天 D 组,肌纤维排列紧密整齐,走向一致,肌纤维间有少量结缔组织填充,与 A 组已无明显差别,而制模后第 21 天 C 组,肌纤维排列紊乱,与结缔组织交织在一起,

颜色呈苍白色,肌纤维之间有大量结缔组织填充(图 1G、H)。对应的免疫组化图见图 2。

2.3 bFGF 免疫组化结果分析

由图 3 可知 A 组 bFGF 表达量很少,肌肉损伤后迅速升高,在第 7 天左右表达量达到高峰,而后随着损伤情况的好转表达量逐渐减少,而在按摩的干预作用下,bFGF 表达量在第 7 天左右较 C 组偏高($P=0.016$),在下降过程中 D 组较 C 组下降明显加快,且差异具有统计学意义($P=0.000$, $P=0.002$)。制模后第 7 天 bFGF 表达量 D 组>C 组($P=0.016$),而在制模后第 14、21 天 bFGF 表达量 C 组均>D 组($P=0.000$, $P=0.020$),且第 21 天 D 组 bFGF 表达量与 A 组差异无统计学意义($P=0.608$)。

2.4 超声微泡结果分析

如图 4 所示,制模后第 7 天 C 组(图 4A)可见较大范围的坏死组织,超声微泡显示坏死组织内无血液供应,无明显血管生成;制模后第 7 天 D 组(图 4B)显示坏死范围较 C 组小,且坏死组织内部有部分微泡,表明坏死组织内部有部分血管生成,且坏死组织周围微泡数量,亮度均较 C 组高,表明 D 组血供情况明显优于 C 组。制模后第 14 天 C 组(图 4C)可见血液供应情况仍然不佳,坏死范围虽明显减少,但与按摩组仍有较大差别;制模后第 14 天按摩组(图 4D)可见血供情况良好,只有微小的坏死组织,恢复情况明显优于 C 组。

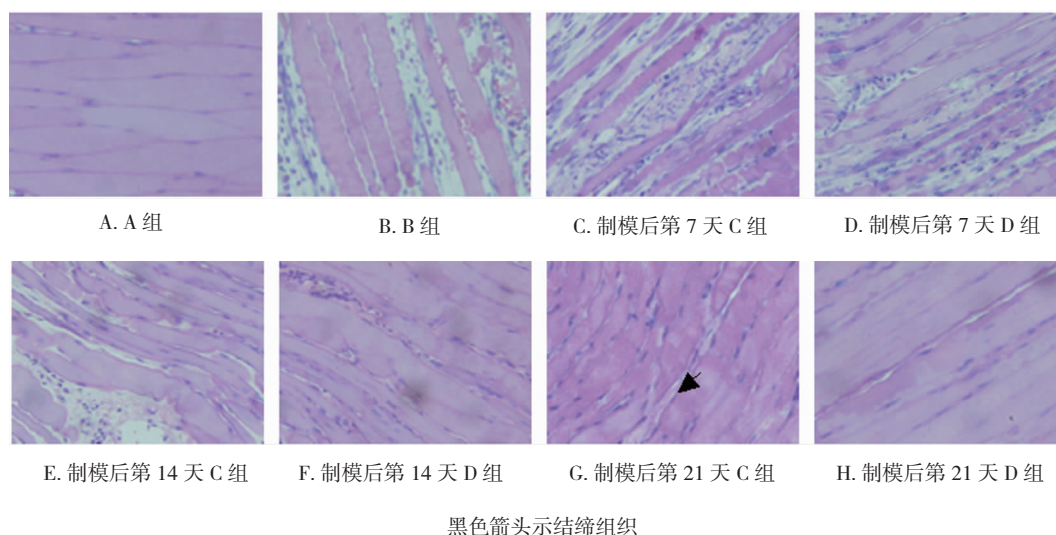


图 1 股四头肌组织学观察 (HE, 200 $\times$)

Fig.1 Histological observation on quadriceps femoris muscle in each group (HE, 200 $\times$)

表 1 不同时间段 bFGF 免疫组化平均吸光度值 (sum) 的差异 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Mean absorbance value of bFGF immunohistochemistry at different time periods ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天
A 组	27.142 3 $\pm$ 6.924 0	27.142 3 $\pm$ 6.924 0	27.142 3 $\pm$ 6.924 0
B 组	321.885 0 $\pm$ 46.008 6 ^b	321.885 0 $\pm$ 46.008 6 ^b	321.885 0 $\pm$ 46.008 6 ^b
C 组	509.569 3 $\pm$ 40.993 9 ^{ab}	152.625 0 $\pm$ 44.266 6 ^{ab}	41.435 0 $\pm$ 18.511 7 ^a
D 组	438.222 5 $\pm$ 38.421 8 ^{ab}	302.662 5 $\pm$ 55.309 2 ^{ab}	137.231 5 $\pm$ 17.566 1 ^{ab}

注:a, $P < 0.05$, 同时间段, 对照组 (C 组) 与实验组 (D 组) 比较; b, $P < 0.05$, 与空白对照组 (A 组) 比较; 组间比较: $F=84.988$, $P=0.000$

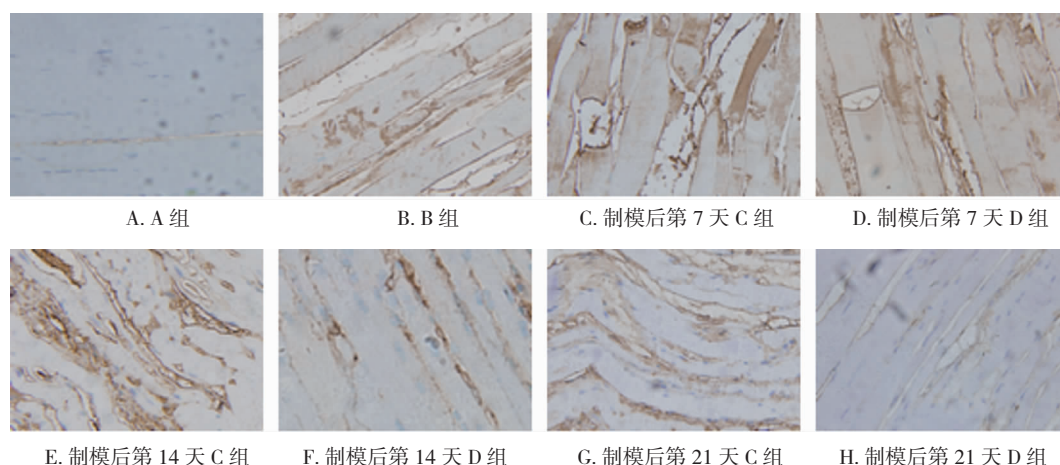


图2 股四头肌免疫组化观察 (200×)

Fig.2 Immunohistochemical observation on bFGF of quadriceps femoris muscle in each group (200×)

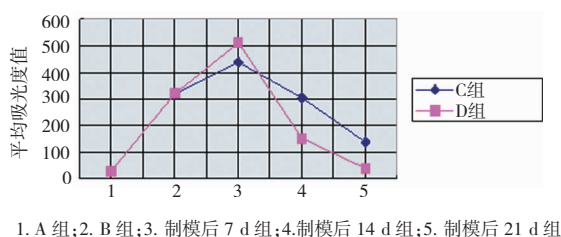
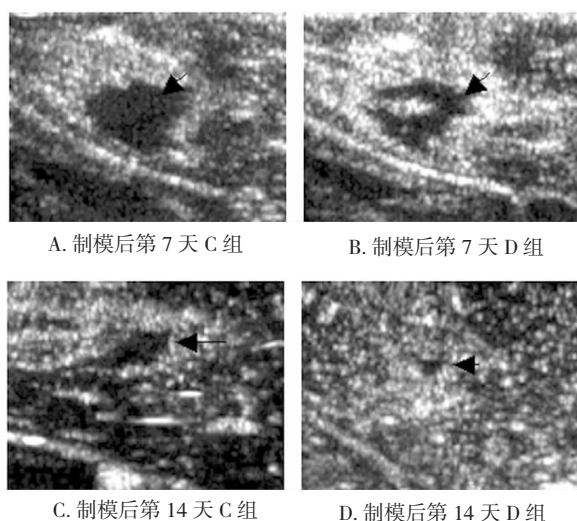


图3 不同时间段 bFGF 变化情况

Fig.3 Changes in bFGF at different time periods



黑色箭头示坏死组织

图4 股四头肌超声微泡观察

Fig.4 Ultrasound microbubble observation on quadriceps femoris muscle in each group

3 讨论

本文利用新西兰大白兔股四头肌损伤模型,通过免疫组化学、HE 染色以及微泡超声影像技术研

究了按摩对受损肌组织病理修复及生长因子 bFGF 表达的影响。结果表明,按摩有利于骨骼肌损伤组织的修复,可有效减轻肌细胞的萎缩、退变及坏死,减轻炎症反应,可促进血液供应和新生血管的再生与形成,使肌纤维的排列更加有序,并对 bFGF 蛋白的表达起着一定的影响作用。

bFGF 是成纤维细胞生长因子家族中的一员,它在人体中的分布非常广泛,主要分布于脑、肝、肾、骨、软骨、甲状腺、心脏等组织,还分布于单核巨噬细胞、肝细胞、星形细胞和成肌细胞等^[5]。bFGF 是一种多效能的细胞生长因子,它的基本生物学作用是促进细胞分裂增殖,可增强有丝分裂活性^[6]。在正常骨骼肌纤维,bFGF 几乎没有表达或仅有微弱表达,在大运动量训练后或骨骼肌损伤修复时 bFGF 明显增加^[7]。

本实验通过对 bFGF 蛋白的表达和组织形态学的动态观察(图 1、2)可知,正常肌肉中 bFGF 几乎没有表达或表达量很少,在骨骼肌损伤后 bFGF 的表达量迅速增加,在 1 周左右表达量达到高峰,而后随着损伤情况的好转表达量逐渐减少。骨骼肌损伤后 bFGF 的表达量迅速增加表明在创伤恢复过程中 bFGF 起着重要的作用,制模后第 7 天,D 组 bFGF 表达量较 C 组高,表明按摩的刺激发挥了干预作用,推测损伤早期按摩可能促进 bFGF 的表达,从而加速组织的恢复。而制模后第 14 天、21 天 C 组 bFGF 的相对表达量均高于 D 组,且通过形态学观察(图 1E~H)可知,D 组恢复情况明显好于 C 组,表明随着损伤的恢复,bFGF 表达量逐渐减少而在恢复过程中按摩起了明显的干预作用,且差异具有统

计学意义。制模后第 21 天 D 组与 A 组比较差异无统计学意义,表明 D 组 bFGF 蛋白表达量已恢复 A 组水平。

通过对肌肉损伤后 D 组与 C 组的超声微泡观察(图 3),本研究发现按摩有利于血液向损伤区域流动,为损伤区域提供丰富血供,有利于坏死区血管生成,减轻局部坏死,同时为组织细胞提供更多的血氧,有利于局部内环境的改善,减少代谢紊乱,减少了组织细胞的变性坏死。而研究表明^[8-12],bFGF 是一种重要的血管新生因子,在血管新生的各个环节发挥作用。目前认为 bFGF 和血管内皮细胞生长因子是体内发现的最为有效的促血管因子^[13]。Coudoul 和 Deng^[14]研究证实没有任何细胞可以生存在远离毛细血管 200~500 μm 的地方,充足的血供是细胞生存的必须条件,bFGF 是有效的促有丝分裂因子,也是细胞形态发生分化的诱导因子,其强有效地促进新生血管形成作用,减少缺血及缺血再灌注性损伤。本实验也表明,损伤后 bFGF 表达量迅速升高,且通过按摩的干预作用,发现按摩可在损伤早期促进 bFGF 的表达,推测按摩促进血管新生的机制可能与 bFGF 有关。

本课题组前期研究发现按摩可延缓或阻止骨骼肌和运动终板的损伤,并能促进结蛋白和 α -肌动蛋白的表达以利于细胞骨架的恢复^[4,15]。而本实验通过对肌肉损伤后 bFGF 的表达、超声影像学及组织形态学的动态观察证实,按摩可有效防止肌细胞的萎缩、退变及坏死,有利于血液向损伤区域流动,为损伤区域提供丰富血供,促进血管生成,并使肌纤维的排列更加有序,其利于损伤修复及新生血管形成的机制可能与 bFGF 有关,为按摩对肌肉损伤修复机制的探讨提供了新的实验依据。

参 考 文 献

- [1] 张 宏,严隽陶,徐 俊,等.骨骼肌纤维类型增龄性变化特征及推拿手法对老龄大鼠骨骼肌纤维的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(36):7149-7152.
- [2] 秦渭志,黄明喜,陈金昌,等.推拿治疗软组织损伤的机制研究[J].按摩与导引,2007,23(7):8-9.
- [3] 巫国辉,李小林.重组人表皮细胞生长因子与碱性成纤维细胞生长因子联合应用促进创面愈合[J].整形再造外科杂志,2005,4(2):233.
- [4] 侯懿烜,柳满然,余 敏,等.按摩促进兔股四头肌损伤修复的体内研究[J].中国修复重建外科杂志,2012,26(3):347-352.
- [5] Plotnikov A N,Hubbard S R,Schl es singer J,et al.Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity[J].Cell,2000,101(4):413-424.
- [6] Przybylski M.A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis[J].J Wound Care,2009,18(12):516-519.
- [7] 向 峥,孙林辉,余 斌.碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 在运动性肌损伤骨骼肌中的表达[J].华南国防医学杂志,2007,21(3):28-30.
- [8] Xiang Z,Sun L H,Yu B.Expression of basic fibroblast growth factor mRNA in skeletal muscle injured by exercise[J].Military Medical Journal of South China,2007,21(3):28-30.
- [9] Eliceiri B P.Integrin and growth factor receptor crosstalk[J].Circ Res,2001,89(12):1104-1110.
- [10] Tanghetti E,Ria R,DellEra P,et al.Biological activity of substrate-bound basic fibroblast growth factor(FGF2):recruitment of FGF receptor-1 in endothelial cell adhesion contacts[J].Oncogene,2002,21(24):3889-3897.
- [11] Sahni A,Francis C W.Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires α 5 β 3[J].Blood,2004,104(12):3635-3641.
- [12] Koivisto H,Hyvarinen M,Stromberg A M,et al.Cultures of human embryonic stem cells:serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor[J].Reprod Biomed Online,2004,9(3):330-337.
- [13] Weidenfeller C,Schlot S,Zozulya A,et al.Murine raincapillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone[J].Brain Res,2005,1053(1-2):162-174.
- [14] 徐 杰,左金华.碱性成纤维细胞生长因子促进血管再生的研究进展[J].实用医学杂志,2008,24(24):4317-4318.
- [15] Xu J,Zuo J H.BFGF promoting vascular regeneration research progress[J].The Journal of Practical Medicine,2008,24(24):4317-4318.
- [16] Coudoul X,Deng C X.Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases[J].Birth Defects Res C Embryo Today,2003,69(4):286-304.
- [17] 侯懿烜,柳满然,张 萍,等.骨骼肌损伤修复的生理生化机制研究[J].激光生物学报,2011,20(5):662-667.
- [18] Hou Y X,Liu M R,Zhang P,et al.Physiological and biochemical mechanism of massage on repairing of injury skeletal muscle[J].Acta Laser Biology Sinica,2011,20(5):662-667.

(责任编辑:冉明会)