

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002119

低强度聚焦超声促进 SD 大鼠慢性骨骼肌损伤修复

梁丹丹, 蒋璟玮, 罗 东, 陈俊林, 汪 威, 刘宝茹, 王 嫣, 陈锦云, 陈文直

(重庆医科大学生物医学工程学院、省部共建国家重点实验室培育基地-重庆市超声医学工程重点实验室、
重庆市生物医学工程学重点实验室、重庆市微创医学协同创新中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨低强度聚焦超声(low intensity focused ultrasound, LIFU)对大鼠慢性骨骼肌损伤的修复作用。**方法:**用重力打击器构建大鼠慢性骨骼肌损伤模型,构建成功后模型分为超声组和对照组,超声组采用 LIFU 每天 1 次,连续辐照患处 14 d,对照组假治疗。2 组分别于治疗第 3、10、21 天取损伤区域组织,采用苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色法观察组织变化,免疫组化定量生肌决定因子(Myf-5)和辅肌动蛋白(α -actinin)表达强度并使用图像分析软件进行平均光密度(average optical density, AOD)分析,实时荧光定量多聚酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析肌分化因子(MyoD)mRNA 表达水平,对组织修复情况进行评价。**结果:**HE 染色图片提示超声组坏死肌纤维逐渐被新生排列整齐肌纤维取代;对照组纤维组织形成,炎症细胞浸润,肌纤维萎缩明显。治疗开始的第 3、10、21 天,超声组 α -actinin(3 d=0.270 $\pm$ 0.026, t =2.963, P =0.018; 10 d=0.244 $\pm$ 0.011, t =2.865, P =0.027; 21 d=0.222 $\pm$ 0.031, t =1.073, P =0.317)、Myf-5(3 d=0.291 $\pm$ 0.050, t =2.691, P =0.027; 10 d=0.246 $\pm$ 0.015, t =2.726, P =0.032; 21 d=0.166 $\pm$ 0.021, t =0.369, P =0.722)、MyoD mRNA(3 d=5.613 $\pm$ 0.379, t =4.679, P =0.002; 10 d=3.276 $\pm$ 0.261, t =2.377, P =0.048; 21 d=1.810 $\pm$ 0.200, t =0.634, P =0.546)的表达均高于对照组 α -actinin(3 d=0.234 $\pm$ 0.008; 10 d=0.214 $\pm$ 0.020; 21 d=0.203 $\pm$ 0.023)、Myf-5(3 d=0.225 $\pm$ 0.023; 10 d=0.211 $\pm$ 0.025; 21 d=0.161 $\pm$ 0.016)、MyoD mRNA(3 d=4.465 $\pm$ 0.397; 10 d=2.807 $\pm$ 0.356; 21 d=1.712 $\pm$ 0.280),且在第 3、10 天差异有统计学意义(P <0.05)。**结论:**LIFU 能促进大鼠慢性骨骼肌损伤再生修复,改善组织结构。

【关键词】低强度聚焦超声;骨骼肌损伤;修复**【中图分类号】**R318**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-08-11

Low intensity focused ultrasound promotes the repair of chronic skeletal muscle injury in sprague-dawley rats

Liang Dandan, Jiang Jingwei, Luo Dong, Chen Junlin, Wang Wei,

Liu Baoru, Wang Yan, Chen Jinyun, Chen Wenzhi

(College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University; State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-founded by Chongqing and the Ministry of Science and Technology; Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering; Chongqing Collaborative Innovation Center for Minimally-invasive and Noninvasive Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of low intensity focused ultrasound(LIFU) on the repair of chronic skeletal muscle injury in rats. **Methods:** An impactor was used to establish a rat model of chronic skeletal muscle injury, and then the rats were divided into ultrasound group and control group. The rats in the ultrasound group were given LIFU once a day for 14 consecutive days, and those in the control group were given sham treatment. Tissue samples of the injured area were collected on days 3, 10, and 21 of treatment, and HE staining was used to observe histological changes. Immunohistochemistry was used to measure the expression of Myf-5 and α -actinin; image analysis software was used to measure average optical density(AOD); real-time quantitative polymerase chain reaction was used to measure the mRNA expression of MyoD. Tissue repair was also evaluated. **Results:** HE staining showed that necrotic muscle fibers were gradually replaced by newly formed muscle fibers in ordered arrangement in the ultrasound group,

while the formation of fibrous tissue, inflammatory cell infiltration, and marked muscle fiber atrophy were seen in the control group. Compared with the control group on days 3, 10, and 21 of treatment, the ultrasound group had higher expression of α -actinin(0.270 $\pm$ 0.026/0.244 $\pm$ 0.011/0.222 $\pm$ 0.031 vs. 0.234 $\pm$ 0.008/0.214 $\pm$ 0.020/0.203 $\pm$ 0.023, t =2.963, 2.865, and 1.073, P =0.018, 0.027, and 0.317) and Myf-5(0.291 $\pm$ 0.050/0.246 $\pm$ 0.015/0.166 $\pm$ 0.021 vs. 0.225 $\pm$ 0.023/0.211 $\pm$ 0.025/0.161 $\pm$ 0.016,

作者介绍: 梁丹丹, Email: liangdandan824@163.com,

研究方向: 肿瘤学、软组织损伤修复。

通信作者: 陈文直, Email: chenwz@haifu.com.cn。**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(编号: 2011CB707900); 重庆市前沿与应用基础研究计划一般资助项目(编号: cstc2016jcyjA0599)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190510.1308.002.html>

(2019-05-13)

$t=2.691, 2.726$, and $0.369, P=0.027, 0.032$, and 0.722) and higher mRNA expression of MyoD ($5.613 \pm 0.379/3.276 \pm 0.261/1.810 \pm 0.200$ vs. $4.465 \pm 0.397/2.807 \pm 0.356/1.712 \pm 0.280, t=4.679, 2.377$, and $0.634, P=0.002, 0.048$, and 0.546), with statistical significance on days 3 and 10 ($P<0.05$). **Conclusion:** LIFU can promote the regeneration and repair of chronic skeletal muscle injury in rats.

[Key words] low intensity focused ultrasound; skeletal muscle injury; repair

慢性软组织损伤是指人体骨骼肌、筋膜韧带、关节囊、骨膜以及脂肪等运动系统软组织损害性病变的简称,在体育锻炼、军事训练和日常生活中十分常见,成人的发病率高达 90%^[1],其中骨骼肌损伤的概率最大。其病理基础主要为损伤引起的慢性无菌性炎症,引起肌痉挛、肌萎缩、瘢痕形成和粘连,导致局部血液循环障碍、组织缺血缺氧而产生疼痛,病情迁延反复,不易根治,严重影响患者运动功能和心理健康^[1-3]。目前慢性软组织损伤(包括慢性骨骼肌损伤)的治疗方法有口服非甾体类抗炎药、中医治疗、射频热凝治疗、手术治疗等,但各有利弊。如非甾体抗炎药物虽有确定的抗炎镇痛作用,但长期服用可带来胃肠道损伤等副作用^[4]。

超声具有无创、价廉、安全、使用便捷等特点,在欧美等国家已广泛运用于肌肉损伤的治疗^[5]。国内外研究者使用平面超声治疗慢性骨骼肌损伤后并未取得满意的疗效^[6],因此其疗效还颇有争议^[7],Johns 等^[8]认为最大可能是超声波投射剂量的不足。而单纯增加投射剂量可能会受到声通道中敏感组织的影响,特别是较深的病变组织,可能出现声通道浅部组织接受超过病变组织的超声剂量,增加不安全性。因此,在保证安全的前提下,又能增加治疗区域组织的投射剂量,就需寻找一种新的超声治疗方式,低强度聚焦超声(low intensity focused ultrasound, LIFU)进入了大家的视线。

研究证实, LIFU 治疗慢性骨骼肌损伤是安全、有效的^[9-10],单次治疗即可降低慢性损伤肌肉组织炎症因子水平,刺激镇痛物质的释放,且其治疗效果具有维持作用^[11],但以上报道仅仅研究了 LIFU 治疗慢性骨骼肌损伤的效果,缺乏对其治疗机制的深入研究。因此,本实验拟采用 LIFU 对鼠骨骼肌慢性损伤进行治疗,并深入探讨其对骨骼肌损伤修复的效果及作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康清洁级成年(sprague dawley, SD)雄性大鼠 30 只,

体质量 300~350 g,于重庆医科大学动物实验中心购买(许可证号:SCXK[渝]2017-0001)。饲养环境为温度 23 ℃~25 ℃, 12 h 光照,标准饮食,自由饮水,通风良好。实验过程中严格遵守重庆医科大学动物伦理委员会要求。适应性饲养 1 周后开始实验。

将 30 只 SD 大鼠用 2.5%戊巴比妥钠(上海容创生物技术有限公司,中国),按 0.2 mL/100g 腹腔注射麻醉,右后肢褪毛,参照杨志丽等^[12]报道的慢性骨骼肌损伤进行造模。使用自制重力打击器(质量为 300 g),从距大鼠腓肠肌 25 cm 的垂直高度自由下落,连续打击 15 次。打击后目标区域皮肤有红色瘀斑,无皮肤破损和骨折。打击后不作任何处理正常饲养 2 周,大鼠骨骼肌损伤模型即建立成功。模型成功后随机将模型分为超声组($n=15$)和对照组($n=15$)。

1.2 主要试剂及仪器

H5018 型阿是超声波治疗仪由重庆海扶科技股份有限公司提供,自制重力打击器;低温离心机(SIGAM,美国),Bio Rad 3000 紫外可见光度计(Bio Rad,美国),CFX PCR 仪(Bio-Rad,美国),光学显微镜(i Mark-14047,上海万衡精密光学仪器厂,中国),超声耦合剂购买于中国天津成信医用辅助材料厂,Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒购买于日本 TOYOBO 公司,Myf-5 一抗试剂盒(羊抗小鼠)购买于美国 Bio-technie 公司, α -actini 一抗试剂盒(兔抗小鼠)购买于美国 Cell Signaling 公司,DEPC 购买于中国罗氏公司,DAB 显色液试剂盒购买于中国碧云天生物技术研究所,无水乙醇购买于中国重庆川东化工,戊巴比妥钠购买于中国上海容创生物技术有限公司。

1.3 超声治疗

造模完成后第 2 天,使用治疗仪对大鼠进行治疗。治疗头为连续输出模式,直径为 30 mm,频率 0.8 MHz,焦点声强 2.25 W/cm^2 ,中心焦距 15 mm,焦斑大小 $2.3 \text{ mm} \times 2.3 \text{ mm}$ 。将超声组大鼠固定,暴露造模区域,褪毛后涂适量超声耦合剂。治疗头紧贴损伤区域皮肤固定治疗 20 s 后,停顿 5 s,原位螺旋移动治疗 60 s,移动速度 $1 \sim 2 \text{ cm/s}$ 。每天治疗 1 次,连续治疗 14 d。对照组以同样的方法进行假辐照,即不开机治疗。

1.4 HE 染色观察病理特征

于治疗开始后 3、10 和 21 d 随机处死超声组及对照组大鼠,取损伤中心区域骨骼肌组织约 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 于 4%多聚甲醛中固定 24 h,经过脱水、石蜡包埋及切片,再使用 HE 染色法进行染色。光学显微镜下观察组织切片,成像系统拍照。

1.5 免疫组化检测损伤局部 α -actinin 和 Myf-5 的表达及 AOD 值分析

石蜡切片方法同前所述。石蜡切片经常规脱蜡处理后枸橼酸缓冲液行微波抗原修复,10%山羊血清 37℃ 孵育 30 min 后分别滴加 α -actinin 一抗(兔抗小鼠 1:100)、Myf-5 一抗(羊抗小鼠 1:100)4℃ 过夜;生物素标记的羊抗兔/鼠 IgG 37℃ 孵育 30 min,辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液 37℃ 孵育 30 min 后用 DAB 显色试剂盒显色,苏木素复染,常规脱水、透明、封片。封片后显微镜观察读片,使用图像分析软件 IPP 6.0 对染色图像进行光密度分析,计算 AOD 值。

1.6 RT-qPCR 检测 MyoD mRNA 表达水平

处死大鼠后立即取损伤区域肌肉组织约 0.5 g,快速冰冻后-80℃ 保存。首先配制 75%乙醇、1% DEPC 水及电泳缓冲液 50×TAE(贮存液)等液体。按要求提取肌肉组织 RNA,取 2 μ L RNA 稀释 50 倍,紫外分光光度计测定紫外 260 nm/280 nm 处吸光度(absorbance,A)值比值。取 2 μ g RNA 进行逆转录制备 cDNA,反应条件:42℃—10 min→30℃—20 min→99℃—5 min→4℃—5 min。取适量 cDNA 进行荧光定量 PCR,反应条件:96℃—5 min→(96℃—30 s→57℃—30 s→72℃—30 s)×40 循环→72℃—10 min。PCR 引物序列于 GenBank 查找到:上游引物 5'-CGCCATCCGCTACATTGAA-GGTC-3',下游引物 5'-CTCGCTGGACGCCTCACTGTAGT-3'。以 BCL2 为内参基因,计算 MyoD mRNA 的相对表达量,用相对表达倍数评价目标 mRNA 的表达水平。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 损伤骨骼肌组织学变化

由 HE 染色图像(图 1)可见,治疗第 3 天,超声组和对照组肌纤维排列均紊乱,损伤区域肌纤维断裂、萎缩、炎症细胞浸润、纤维组织形成,病理特征表现为慢性损伤。随着治疗的进行,超声组肌纤维逐渐排列整齐,而对照组肌纤维仍可见明显萎缩。

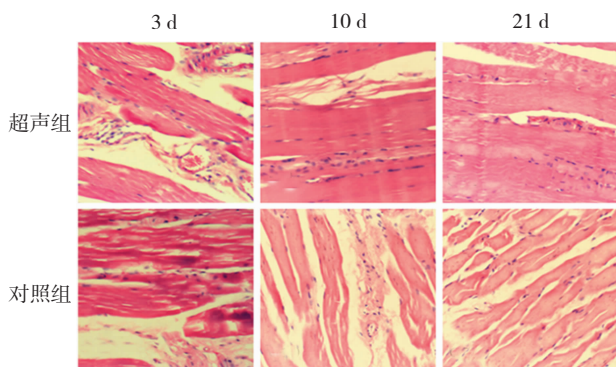


图 1 2 组治疗开始后 3 d、10 d、21 d 组织病理变化 (20×10)

2.2 α -actinin 和 Myf5 免疫组化图片的 AOD 值

α -actinin(图 2)及 Myf-5(图 3)免疫组化染色图片 AOD 值分析结果(表 1、表 2)显示超声组表达均高于对照组,提示超声组活化的肌源性细胞数量多于对照组,且在治疗第 3 和第 10 天差异有统计学意义($P<0.05$)。

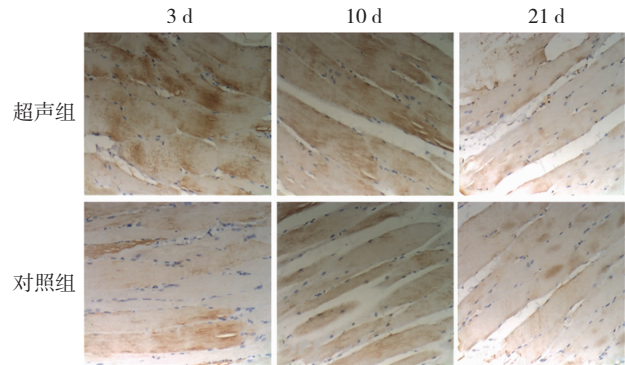


图 2 2 组超声治疗形开始后 3 d、10 d、21 d α -actinin 免疫组化染色图像 (10×20)

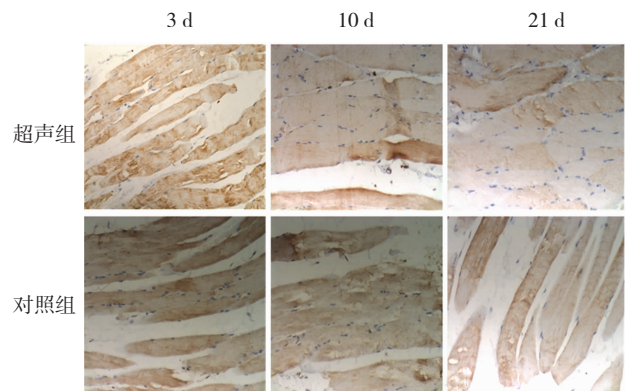


图 3 2 组治疗开始后 3 d、10 d、21 d Myf-5 免疫组化染色图像 (10×20)

表 1 α -actinin 免疫组化染色图片 AOD 值

组别	3 d	10 d	21 d
超声组 ($n=5$)	0.270 ± 0.026	0.244 ± 0.011	0.222 ± 0.031
对照组 ($n=5$)	0.234 ± 0.008	0.214 ± 0.020	0.203 ± 0.023
t 值	2.963	2.865	1.073
P 值	0.018	0.027	0.317

表 2 超声组和对照组 Myf-5 免疫组化染色图片 AOD 值

组别	3 d	10 d	21 d
超声组 ($n=5$)	0.291 ± 0.050	0.246 ± 0.015	0.166 ± 0.021
对照组 ($n=5$)	0.225 ± 0.023	0.211 ± 0.025	0.161 ± 0.016
t 值	2.691	2.726	0.369
P 值	0.027	0.032	0.722

2.3 MyoD mRNA 表达水平

RT-qPCR 结果显示,超声组 MyoD mRNA 表达水平(表 3)均高于对照组,于治疗期间差异有统计学意义($P<0.05$)。提示超声可能在基因层面进行调控以促进肌源性细胞分化。

表 3 超声组和对照组各个时间点 MyoD mRNA 相对表达倍数

组别	3 d	10 d	21 d
超声组 (n=5)	5.613 ± 0.379	3.276 ± 0.261	1.810 ± 0.200
对照组 (n=5)	4.465 ± 0.397	2.807 ± 0.356	1.712 ± 0.280
t 值	4.679	2.377	0.634
P 值	0.002	0.048	0.546

3 讨 论

临床常用平面超声的频率多为 0.75~3.0 MHz, 常选用的治疗强度为 0.3~2.0 W/cm², 由于其强度相对较低, 单一患病部位的单次治疗时间可达 10~30 min, 单次治疗时间及疗程较长, 也仅具有缓解作用^[13]。平面超声在损伤区域的剂量投射不足, 单纯增加超声剂量可能不能达到治疗效果, 还可能因此增加皮肤的能量沉积而带来损伤。LIFU 在不增加皮肤的能量沉积的情况下提高了深部组织的能量沉积, 减少单次治疗时间, 增加患者依从性, 是超声治疗领域的一个创新之处。LIFU 治疗慢性骨骼肌损伤的安全性和有效性已有初步研究和报道。

慢性骨骼肌损伤因炎症和纤维化而阻碍了再生修复, 研究者认为 LIFU 所产生的能量沉积发挥了温热效应, 从而改善局部血液循环, 调节局部炎症降低, 增加细胞膜的通透性和组织营养, 促进局部组织水肿消散, 促进凝胶转化为溶胶, 松解粘连, 而软化瘢痕^[11, 14]; 改善损伤组织病理情况, 有利于超声能量对损伤组织进行调节。另一方面, LIFU 作用于损伤组织时, 可能诱导了稳态空化及微声流效应, 其机械压力变化可能改变了细胞膜的通透性, 刺激第二信使转运, 从而刺激肌卫星细胞增殖分化^[7, 13-14]。生肌调节因子(α -actinin、Myf-5、MyoD)是肌源性细胞向肌细胞分化成熟的调节因子和标志蛋白, 正常情况下不表达^[15]。本研究结果显示 α -actinin、Myf-5 及 MyoD 的表达程度在治疗期间均明显高于对照组。结果表明 LIFU 可刺激肌源性细胞向肌细胞分化, 明显增加新生肌细胞数量, 有效促进再生修复。肌肉 HE 染色图像提示超声组骨骼肌排列较对照组整齐, 印证了超声促进再生修复的作用。

综上所述, 本研究发现 LIFU 可刺激慢性损伤骨骼肌组织肌源性细胞增殖分化为肌细胞, 有效促进损伤骨骼肌再生修复, 为 LIFU 在临床治疗慢性骨

骼肌损伤的应用提供理论基础。研究仅探讨了 LIFU 对骨骼肌再生修复的部分机制, 有待与临床常用平面超声治疗慢性骨骼肌损伤进行对比研究, 可找出慢性骨骼肌损伤最佳的治疗模式。

参 考 文 献

- [1] 周忠群, 卢振和, 高崇荣. 射频热凝治疗兔慢性软组织损伤的实验研究[J]. 中国疼痛医学杂志, 2008, 14(5): 298-301.
- [2] 董 静. 青白散对大鼠慢性骨骼肌损伤后氧化应激的影响[C]. 北京: 中华中医药学会养生康复分会第八次学术年会, 2010: 182-186.
- [3] Warren GL, Summan M, Gao X, et al. Mechanisms of skeletal muscle injury and repair revealed by gene expression studies in mouse models[J]. J Physiol, 2007, 582(Pt 2): 825-841.
- [4] 王 涛. 聚焦超声治疗慢性软组织损伤的可行性研究及其作用机制的初步探讨[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2008.
- [5] Warden SJ. A new direction for ultrasound therapy in sports medicine[J]. Sports Med, 2003, 33(2): 95-107.
- [6] van der Heijden GJ, van der Windt DA, de Winter AF. Physiotherapy for patients with soft tissue shoulder disorders: a systematic review of randomised clinical trial[J]. Br Med J, 1997, 315(7099): 25-30.
- [7] Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions[J]. Rheumatology, 2001, 40(12): 1331-1336.
- [8] Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis[J]. Journal Train, 2002, 37(3): 293-299.
- [9] 黑 光, 李剑峰, 董铁立, 等. 聚焦式超声波治疗腰部慢性软组织损伤的临床对照研究[J]. 中国超声医学杂志, 2015, 31(12): 1105-1108.
- [10] 徐 城, 刘丹彦. 低强度聚焦超声治疗慢性软组织损伤性疼痛的疗效及远期评价[J]. 中国康复医学杂志, 2015, 30(12): 1248-1252.
- [11] 王 涛, 苏 静, 陈文直, 等. 聚焦超声单次治疗慢性软组织损伤兔局部肌组织前列腺素 E2、pH 值以及血浆 β -内啡肽的变化[J]. 中国组织工程研究, 2008, 12(13): 2451-2454.
- [12] 杨志丽, 高 谦, 王 刚, 等. 软组织内热针与银质针对大鼠骨骼肌慢性损伤后 SOD、MDA 水平的影响[J]. 中华保健医学杂志, 2011, 13(1): 28-30.
- [13] Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2002, 83(1): 1-4.
- [14] 周永昌, 郭万学. 超声医学[M]. 4 版. 北京: 科学技术文献出版社, 2003: 1716-1717.
- [15] Panda AC, Abdelmohsen K, Martindale JL, et al. Novel RNA binding activity of MYF5 enhances Ccn1/Cyclin D1 mRNA translation during myogenesis[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(5): 2393-2408.

(责任编辑: 冉明会)