

膏摩疗法对骨骼肌急性钝挫伤模型大鼠炎症及氧化应激和血管生成的影响

钟伟兴¹ 湛祖江¹ 王宁¹ 李俊桦¹ 彭伟杰¹ 古瑞宾¹ 冯梓誉¹ 李义凯²

¹南方医科大学中医药学院针灸推拿骨伤系, 广州 510515; ²南方医科大学南方医院中医正骨科, 广州 510510

通信作者: 李义凯, Email: ortho@smu.edu.cn

【摘要】 目的 观察膏摩疗法对大鼠骨骼肌急性钝挫伤修复过程中炎症、氧化应激和血管生成的影响, 探讨膏摩疗法治疗骨骼肌损伤的作用机制。方法 将 42 只成年雄性 SD 大鼠随机分为对照组(6 只)、膏摩组(18 只)、模型组(18 只), 膏摩组和模型组均采用自制打击器建立腓肠肌急性钝挫伤模型, 膏摩组和模型组按造模后时间分为第 1 天、第 3 天和第 7 天三个亚组, 每亚组 6 只大鼠。膏摩组于造模 2 h 后开始膏摩治疗, 由专人在损伤局部涂抹消炎止痛膏, 并运用食指摩法, 推拿手法均匀和缓, 每次 5 min, 每日 2 次(间隔 12 h)。模型组和对照组不予处理。分别于造模后第 1、3、7 天时间点取材, 对各组大鼠进行腹主动脉采血后取损伤侧腓肠肌, 检测和分析苏木精-伊红(HE)染色、免疫荧光(CD34)染色, 以及血清超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量。结果 HE 染色显示, 各时间点模型组腓肠肌肌纤维均较对照组肿胀变形, 崩塌溶解, 大量炎症细胞浸润; 各时间点膏摩组较模型组恢复更佳, 新生成肌细胞较多, 炎症浸润减轻, 形态更趋正常。免疫荧光染色显示, 模型组与膏摩组各时间点较对照组的红色荧光(CD34)更较明显; 与模型组比较, 膏摩组各取材时间点则更明显。模型组和膏摩组各时间点的 SOD 和 MDA 含量均较对照组明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中第 1 天和第 3 天膏摩组的 SOD 含量较同时间点模型组明显升高($Z_1 = -2.882, P_1 = 0.004; Z_3 = -2.882, P_3 = 0.004$), 第 7 天膏摩组 SOD 含量与模型组比较, 差异无统计学意义($Z_7 = -1.992, P_7 = 0.55$); 而膏摩组各时间点的 MDA 含量均低于同时间点模型组($Z_1 = -2.887, P_1 = 0.004; Z_3 = -2.089, P_3 = 0.037; Z_7 = -2.722, P_7 = 0.006$)。结论 膏摩疗法可有效减轻骨骼肌损伤后的局部炎症反应, 减少氧化应激损害, 加快局部血管生成, 进而加速受损组织的修复。

【关键词】 膏摩疗法; 骨骼肌钝挫伤; 炎症; 氧化应激; 血管再生

基金项目: 李义凯广东省省中医传承工作室建设项目(粤中医办函 2023_108); 广东省教育厅广东省普通高校重点领域专项(2022ZDZX3004); 深圳市“医疗卫生三名工程”项目(SZZYSM202108013); 广东省基础与应用基础研究基金(2024A1515011263)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2024.05.003

The effects of ointment and massage on inflammation, oxidative stress and angiogenesis after blunt skeletal muscle injury

Zhong Weixing¹, Chen Zujiang¹, Wang Ning¹, Li Junhua¹, Peng Weijie¹, Gu Ruibin¹, Feng Ziyu¹, Li Yikai²

¹Department of Acupuncture, Massage and Orthopedics and Traumatology, College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Traditional Chinese Medicine Bone-Setting, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510510, China

Corresponding author: Li Yikai, Email: ortho@smu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the effects of ointment and massage on inflammation, oxidative stress and angiogenesis after skeletal muscle trauma, and to explore their mechanisms. **Methods** Forty-two adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a blank group ($n = 6$), an ointment and massage (O&M) group ($n = 18$) and a model group ($n = 18$). The blunt contusion model of gastrocnemius malformation was established in both the O&M and model groups using self-made percussion instruments. Two hours after successful modeling, the anti-inflammatory pain-relieving cream was applied to the injured area, and massaged evenly and gently for 5 minutes. That was repeated with an interval of 12 hours. No treatment was given to the model and blank groups. On the 1st, 3rd and 7th days after modeling, injured gastrocnemius muscles were resected after collecting abdominal blood. Hematoxylin-eosin (HE) staining and immunofluorescent (CD34) staining were applied, and serum superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) contents were detected. **Results** HE staining showed that at

each time point the gastrocnemius muscle fibers of the model group were significantly more swollen and deformed, collapsed and dissolved than those of the blank group, with a large number of inflamed cells. The O&M group had better recovery, with more newly-generated muscle cells, less inflammatory infiltration and more normal cell shapes than the model group. Fluorescence was stronger in the O&M and model groups than in the blank group at each time point, with that of the O&M group significantly stronger than in the model group. The average SOD and MDA levels in the model and O&M groups were significantly higher than in the blank group, and on the 1st and 3rd days the O&M group's average SOD level was significantly higher than the model group's average, though by the 7th day there was no significant difference. The average MDA content of the O&M group was significantly lower than the model group's average at each time point. **Conclusion** Ointment and massage can effectively reduce the local inflammatory response and oxidative stress after a skeletal muscle injury. They can accelerate local angiogenesis, promoting the repair of damaged tissues.

【Key words】 Ointments; Massage; Skeletal muscles; Muscle trauma; Inflammation; Oxidative stress; Angiogenesis

Funding: Li Yikai Guangdong Province Famous Traditional Chinese Medicine Inheritance Studio Construction Project (letter 2023_108); Guangdong's Provincial Department of Education (project 2022ZDZX3004); Shenzhen's Sanming Medicine Project (SZZYSM202108013); Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2024A1515011263)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2024.05.003

骨骼肌急性钝挫伤是指骨骼肌因外界突然直接的暴力作用造成的肌纤维损害,损伤局部出现肿胀瘀血,肌纤维断裂,肌细胞溶解崩塌等表现,从而导致骨骼肌功能和结构的不可逆损害。研究表明^[1],骨骼肌急性钝挫伤后恢复不完全或治疗过程中方法不当均会提高肌肉二次损伤的可能性。由于骨骼肌损伤及修复机制极其复杂,虽然国内外学者对其相关修复机制进行了大量的研究,但尚未得到统一观点和意见^[2-3]。膏摩疗法^[4]是一种将中药外用膏药与按摩手法相结合的治疗方法,是最古老的医疗实践技术之一、中医外治法的重要组成部分。作为体表刺激疗法中的一种,膏摩疗法具备中药与按摩的双重功效,曾与针灸、导引、吐纳等疗法并列,广泛应用于临床。对骨骼肌钝挫伤一类的筋伤疾病均有较好的疗效^[5-6]。本研究通过建立大鼠骨骼肌急性钝挫伤模型,观察不同时间点膏摩疗法对大鼠骨骼肌损伤修复过程中炎症水平、氧化应激状态和血管内皮生成的影响,旨在探讨膏摩疗法对骨骼肌钝挫伤的可能疗效机制。

材料与方法

一、实验动物及分组

成年健康的 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 42 只,体重(300±20)g,由南方医科大学实验动物管理中心提供[SCXK(粤)2016-0041]。实验动物饲养于南方医科大学南方医院实验动物研究中心无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物房,室温(24±2)℃,室内保持 12 h/12 h 昼夜节律,一周适应性饲养,期间自由饮食。将成年雄性 SD 大鼠 42 只采用随机数字表法分为对照组($n=6$)、模型组($n=18$)、膏摩

组($n=18$),膏摩组和模型组根据取材时间按随机数字表法进一步分为 1 d、3 d、7 d 共 3 个亚组($n=6$)。

二、主要试剂与仪器

消炎止痛膏由血竭、冰片、乳香、没药、红花、儿茶、橄榄油、蜂蜡组成。

主要试剂和仪器及软件:苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色试剂盒、免疫荧光(CD34 和 DAPI)试剂盒(均购自武汉赛维尔生物科技有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(均购自南京建成生物工程研究有限公司)。全自动生化分析仪(中国雷杜 Chemray800),正置白光拍照显微镜(日本 Nikon),倒置荧光显微镜(日本 Nikon),高速组织研磨仪(中国 Servicebio),酶标检测仪(美国 BioTek),病理切片机(上海徠卡仪器有限公司),台式高速冷冻离心机(中国 Dragon)。Image-Pro Plus 6.0(美国 Media Cybernetics),Graphpad Prism 8(美国 Graphpad 软件公司)。自制钝挫伤模型重物打击装置。

三、大鼠骨骼肌急性钝挫伤模型制备

本研究模型组和膏摩组大鼠分别建立骨骼肌急性钝挫伤模型,对照组不予处理。

大鼠模型制备:用动物剃毛器剔除大鼠右侧小腿腓肠肌毛发,用戊巴比妥腹腔注射麻醉,将大鼠右后足屈髋屈膝 90°固定于自制打击器底部,打击器参照 Kami 的造模方法自制,打击器为一段固体不锈钢制圆柱体(见图 1),其下端为一段胶质圆柱打击头,直径 2.0 cm,下落物体主体长 7.5 cm,重 2000 g,从 12 cm 高处落下,重力 19.61 N,产生动能 2.35 J。打击部位为右侧小腿内侧面,其皮下为腓肠肌中段。放出圆柱体

使其下落导致一次性打击伤,造成腓肠肌急性钝挫伤模型。圆柱体的释放和大鼠固定均由同一位实验员操作,以保证打击力和损伤部位及程度的一致性。造模后,由两位实验员观察和触诊判断损伤部位的肌肉组织断裂程度及是否有骨折,并证实腓肠肌收缩功能障碍、局部肿胀、瘀血且无骨折,即属急性腓肠肌钝挫伤大鼠造模成功。



图1 大鼠骨骼肌急性钝挫伤实验模型

四、干预措施

造模后 2 h,膏摩组开始用消炎止痛膏进行膏摩治疗,消炎止痛膏剂量参照《药理实验方法学》^[7] 计算得

出实验大鼠所需用量为 16.7 g/kg。首先用自制的大鼠固定器将大鼠的头部和躯干固定,待其情绪稳定后,由专人在损伤局部涂抹消炎止痛膏,并运用食指摩法,推拿手法均匀和缓,每次 5 min,摩法(300±20)圈,膏药 5 g,每日 2 次(间隔 12 h)。治疗后,将大鼠制动 1 h,擦净药渍后放回笼中,防止大鼠舔食残留膏药影响吸收。模型组和对照组不予处理。

五、标本采集与处理

分别于造模后第 1、3、7 天各时间点取材,将大鼠用 2%戊巴比妥钠(0.25 ml/100 g)腹腔麻醉后进行腹主动脉采血,然后迅速解剖并暴露分离局部损伤腓肠肌(图 2),将离体的腓肠肌分为 2 份,一份置于液氮中速冻 2 h 后转移到-80℃冰箱保存,另一份放于骨骼肌固定液固定。

六、腓肠肌组织 HE 染色

取出固定的腓肠肌组织,修理至适合大小并置于组织包埋盒中,然后酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片厚度为 4 μm。随即进行 HE 染色。切片常规脱蜡至水,苏木素染色 5 min,1%盐酸-酒精中分化,自来水中返蓝 30 min,1%伊红染色 3 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察腓肠肌组织病理学变化并采集图像。

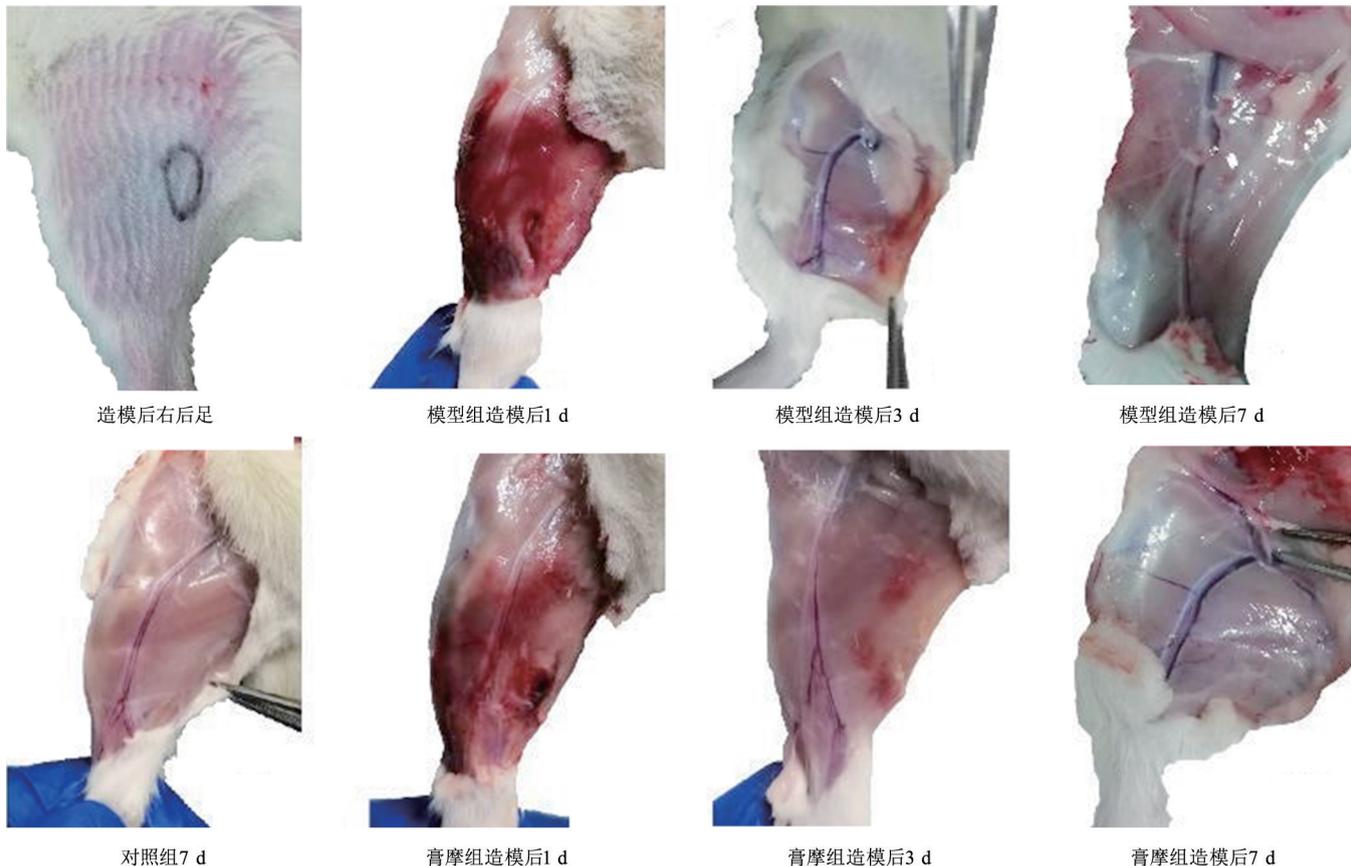


图2 大鼠右后足腓肠肌急性钝挫伤造模后大体解剖图

七、腓肠肌组织免疫荧光

腓肠肌组织的石蜡切片常规脱蜡至水后,将切片置于 EDTA 抗原修复缓冲液中于微波炉内进行抗原修复。后用组化笔画圈,加入自发荧光淬灭剂 5 min,用 PBS 洗 10 min,5% BSA 孵育 30 min。按比例稀释一抗(CD34,1:50),滴加覆盖组织,放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。PBS 清洗后滴加二抗(HRP 标记山羊抗兔鼠通用,1:500)覆盖切片组织,室温避光孵育 50 min;再次用 PBS 清洗,滴加 DAPI 染液,室温避光孵育 10 min。后用抗荧光淬灭封片剂封片。倒置荧光显微镜下观察并采集图像,每张片子随机选取 5 个视野。DAPI 为蓝色荧光,CD34 为红色荧光。用 Image J 半定量分析红色荧光强度,将图像统一转换为 8 位黑白图像,选择自动阈值,计算各组平均灰度值,并用 Graphpad Prism 8 软件制作相对荧光强度(%)柱状图。

八、血清 SOD 和 MDA 含量

腹主动脉取全血,静置 1 h 后 3500 r/min,离心 10 min,取上层血清进行 SOD 测定。取出 96 孔板,按照说明书加入标准孔、空白孔、测定孔、对照孔相应试剂及样品,涡旋混匀器混匀,95℃ 沸水浴 30 min,取出冷却后 3500 r/min 离心 10 min,取上清,于相应波长处,用酶标仪测定各管吸光度值,并根据公式(1)计算出血清中 MDA 含量:

$$\text{血清中 MDA 含量} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{样本测试前稀释倍数} \quad (1)$$

九、统计学方法

使用 SPSS 22.0 版统计软件对所得数据进行统计学分析处理,并采用 Graph Pad Prism 8 软件制图,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布且方差齐用 One-Way ANOVA 检验,各组间比较采用 LSD 检验,非正态分布用非参数检验(Mann-Whitney U 检验、Wilcoxon 符号秩和检验、Kruskal-Wallis H 检验);计数资料以频

数表示,比较采用 Chi-square 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠腓肠肌病理形态学观察

HE 染色显示,对照组肌纤维呈钝角多边形,结构完整,大小均一。第 1 天,模型组可见明显的炎症浸润,肌细胞肿胀变形,崩塌溶解;膏摩组肌纤维基本同模型组,炎症浸润明显,但细胞肿胀程度明显轻于模型组。第 3 天,模型组可见明显的成肌细胞核和新生肌细胞,且细胞形态较小,炎症浸润依然明显;膏摩组可见更多的新生肌细胞,且形态更趋正常,炎症浸润也明显减轻。第 7 天,模型组可见较多的新生肌细胞,但大小不一,形态各异;膏摩组可见大量的成肌细胞,且细胞排列较紧密,大小形态较为均一,炎症浸润也明显减轻(图 3)。

二、各组大鼠腓肠肌 CD34 表达比较

免疫荧光染色(图 4)及 Image J 定量分析计算 CD34 相对荧光强度(%)显示,与对照组比较,第 1 天、第 3 天、第 7 天模型组和膏摩组的血管内皮细胞标志物 CD34(红色荧光)表达均明显上调($P < 0.01$);与模型组比较,第 1 天、第 3 天、第 7 天膏摩组 CD34(红色荧光)表达亦均上调($P < 0.01$),且第 7 天较前上调明显($P < 0.01$)。如图 5 所示。

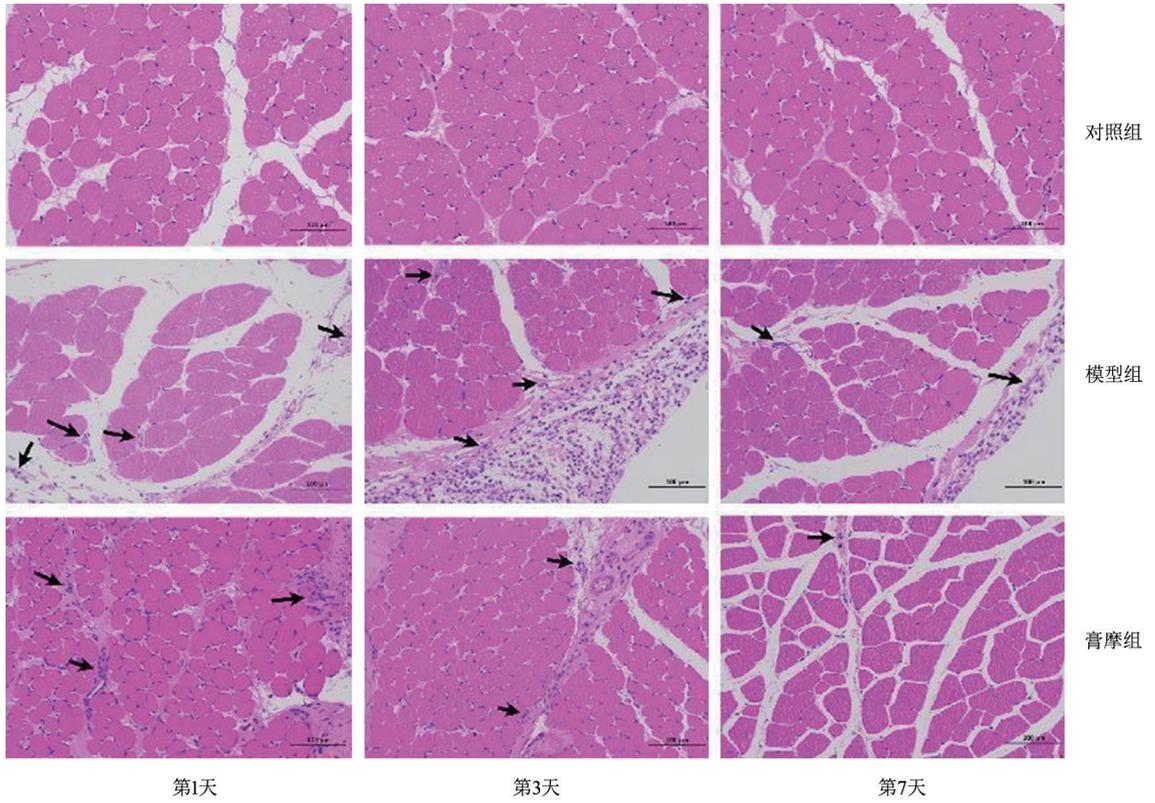
三、各组大鼠血清 SOD 及 MDA 含量比较

与对照组同时间点比较,第 1、3、7 天模型组的 SOD 和 MDA 含量均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组同时间点比较,第 1 天和第 3 天膏摩组的 SOD 含量显著高于模型组($Z_1 = -2.882, P_1 = 0.004; Z_3 = -2.882, P_3 = 0.004$),第 7 天膏摩组 SOD 含量与模型组比较,差异无统计学意义($Z_7 = -1.992, P_7 = 0.55$);而第 1、3、7 天膏摩组的 MDA 含量显著低于同时间点模型组($Z_1 = -2.887, P_1 = 0.004; Z_3 = -2.089, P_3 = 0.037; Z_7 = -2.722, P_7 = 0.006$),差异均有统计学意义($P < 0.05$),具体数据详见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点的血清 SOD 和 MDA 含量($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/ml)			MDA (nmol/ml)		
	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 7 天
对照组	120.60±8.05	105.60±7.35	129.60±6.16	1.74±0.48	1.45±0.32	1.63±0.39
模型组	404.41±7.90 ^a	154.86±6.49 ^a	189.44±5.78 ^a	8.84±0.76 ^a	4.82±0.24 ^a	3.26±0.23 ^a
膏摩组	438.11±8.85 ^{bc}	188.64±5.54 ^{bc}	196.32±4.99 ^a	5.00±0.22 ^{ac}	4.44±0.29 ^{ad}	2.74±0.15 ^{ac}

注:与对照组同时间点比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组同时间点比较,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$



注:黑色箭头示炎性细胞
图 3 各组大鼠造模后不同时间点腓肠肌的横断面病理图(HE 染色,×200)

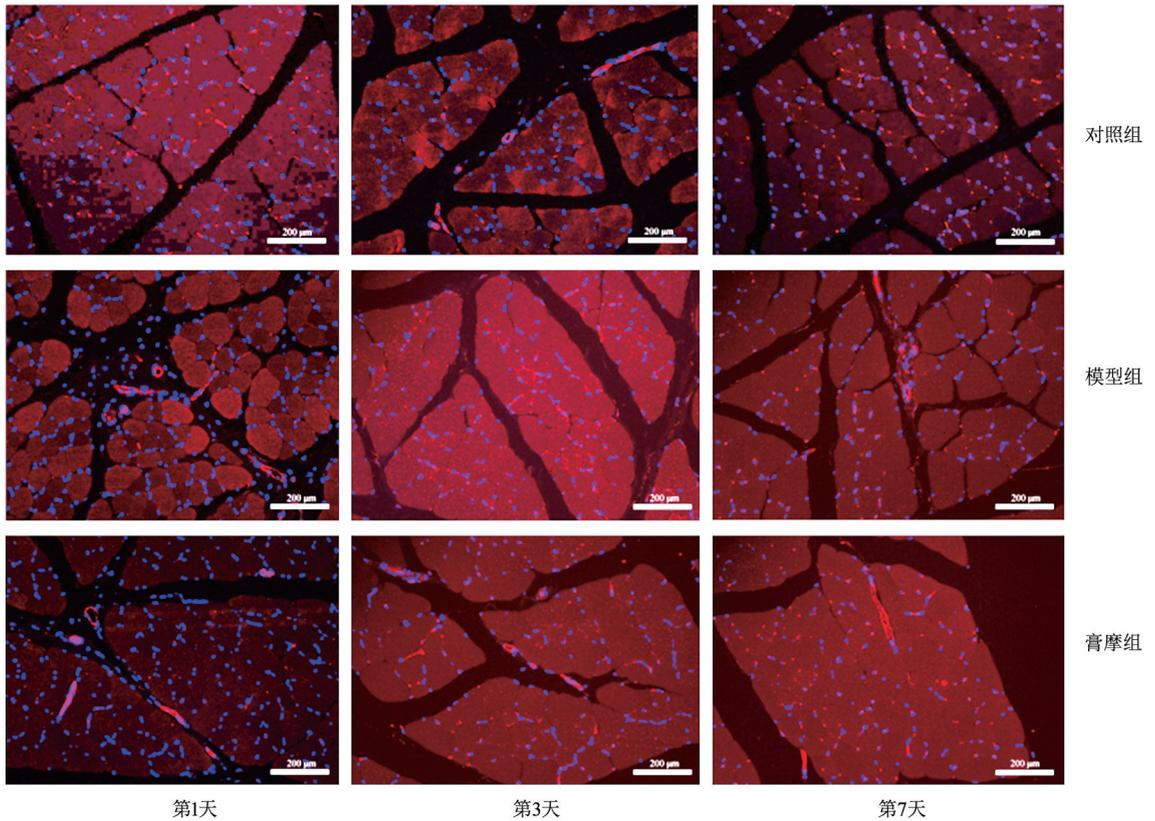
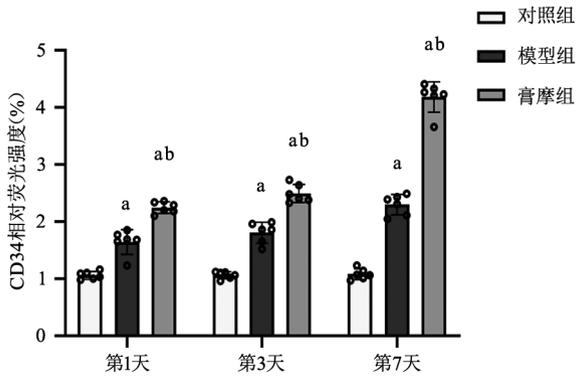


图 4 各组大鼠造模后不同时间点腓肠肌横断面的免疫荧光图(×200,免疫荧光染色)



注:与对照组同时时间点比较,^a $P < 0.01$;与模型组同时时间点比较,^b $P < 0.01$

图 5 各组大鼠不同时间点腓肠肌横断面的 CD34 相对荧光强度 (%) 比较

讨 论

本研究结果表明,膏摩疗法对骨骼肌急性钝挫伤具有良好疗效,能有效降低组织炎症反应、减轻机体氧化应激损害、提高受损骨骼肌的血管再生,从而加快损伤的修复速度。

研究表明,骨骼肌损伤和修复是一个非常复杂的过程,包括逐步坏死和凋亡、炎症反应、纤维化与肌卫星细胞增殖、血管再生等^[2,8]。膏摩疗法可有效降低膝关节滑膜炎症水平进而改善膝骨关节炎^[9-10]。本研究通过对损伤后不同时间点大鼠腓肠肌组织 HE 染色观察表明,骨骼肌急性损伤后组织肿胀变形,肌细胞崩塌溶解,大量炎症细胞浸润;与模型组比较,膏摩疗法治疗后炎症浸润减轻,新生成肌细胞增多,加速了损伤修复进程。机体内氧化剂与抗氧化剂不平衡所产生的氧化应激具有双刃剑作用^[11]。本研究通过检测损伤后各个时间点大鼠血清 SOD 和 MDA 含量发现,膏摩疗法可提高损伤机体内 SOD 含量,降低 MDA 含量,从而减少氧化应激对局部骨骼肌的损害,从而促进损伤修复。研究表明^[2,12],血管生成和肌生成是骨骼肌损伤后形态学和功能恢复的先决条件,重建血供对局部组织的氧供应至关重要。CD34 作为最敏感的血管内皮标志物,其含量直接反映了骨骼肌血管的数量^[13]。本研究对损伤后不同时间点大鼠腓肠肌组织 CD34 免疫荧光染色观察还发现,膏摩疗法可增加受损骨骼肌血管生成,进而促进损伤修复。

综上所述,膏摩疗法对骨骼肌急性钝挫伤具有较好的疗效,其可能的机制与降低组织炎症反应、减轻机体氧化应激损害、提高组织血管再生有关。本

研究存在一些不足之处,如未进行大鼠行为学评价,未开展大鼠炎症水平定量研究等。此外,可进一步对比中药外用膏药涂擦、推拿疗法和膏摩疗法的疗效差异,探究摩法等膏摩疗法的推拿种类、力的大小和作用时间等关键参数对中药外用膏药透皮吸收的影响等。

参 考 文 献

- [1] 李同辉. 极低频磁场促进骨骼肌钝挫伤恢复机制研究[J]. 当代体育科技, 2012, 30(2): 14-16. DOI: 10.16655/j.cnki.2095-2813.2012.30.001.
- [2] Zembron-Lacny A, Morawin B, Wawrzyniak-Gramacka E, et al. Multiple cryotherapy attenuates oxi-inflammatory response following skeletal muscle injury[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(21): 7855. DOI: 10.3390/ijerph17217855.
- [3] Langendorf EK, Klein A, Drees P, et al. Exposure to radial extracorporeal shockwaves induces muscle regeneration after muscle injury in a surgical rat model[J]. J Orthop Res, 2020, 38(6): 1386-1397. DOI: 10.1002/jor.24564.
- [4] 李强. 膏摩史略[J]. 山东中医学院学报, 1988, 12(1): 32-35. DOI: 10.16294/j.cnki.1007-659x.1988.01.016.
- [5] 王钢, 赵勇. 消肿止痛膏对腓肠肌损伤大鼠 MyoD mRNA 与蛋白表达的影响[J]. 北京中医药, 2019, 38(2): 114-117. DOI: 10.16025/j.1674-1307.2019.02.004.
- [6] 谢辉, 唐成林, 陈晓琳, 等. 按摩促进骨骼肌损伤后肌纤维再生机理的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(2): 171-175. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000239.
- [7] 徐叔云, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203.
- [8] Gharaiheb B, Chun-Lansinger Y, Hagen T, et al. Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2012, 96(1): 82-94. DOI: 10.1002/bdrc.21005.
- [9] 薛明新, 吕建军, 陈莹, 等. 膏摩法对膝骨关节炎模型兔抗炎作用实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(7): 16-19. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2019.07.004.
- [10] 摆雪, 刘俊昌, 王新军, 等. 膝痹膏摩法对膝骨性关节炎兔血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平的影响[J]. 吉林中医药, 2018, 38(4): 435-438. DOI: 10.13463/j.cnki.jlzyy.2018.04.017.
- [11] Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress; current state[J]. Nutr J, 2016, 15(1): 71. DOI: 10.1186/s12937-016-0186-5.
- [12] Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(1): 22-31. DOI: 10.1016/j.stem.2007.12.012.
- [13] 翁金清, 彭昊, 周建林, 等. HIF-1 α 、VEGF 及 CD34 在大鼠骨关节炎模型软骨中的表达及意义[J]. 生物医学工程与临床, 2015, 19(4): 407-411. DOI: 10.13339/j.cnki.sglc.2015.04.019.

(修回日期: 2024-03-13)

(本文编辑: 汪 玲)