

· 基础研究 ·

不同强度脉冲超声波促进大鼠骨骼肌挫伤修复的实验研究

杨志金 舒彬 曾登芬 邓皓月 方响琴

【摘要】目的 观察不同强度脉冲超声波对大鼠骨骼肌挫伤修复的疗效。**方法** 共选取成年雄性 SD 大鼠 48 只,将其制成右侧腓肠肌挫伤模型,然后分为自然恢复组及超声波组。自然恢复组大鼠制模后未给予特殊处理,让其自然恢复;超声波组根据超声波强度不同,细分为 A、B、C 共 3 个亚组,于制模后 24 h 分别接受强度为 0.25、0.50、0.75 W/cm² 的脉冲超声波(频率均为 3 MHz)治疗,每天治疗持续 5 min,共治疗 14 d。于制模后 4、7 及 14 d 时取材,采用 HE 染色、免疫组化染色等手段检测各组大鼠肌卫星细胞的增殖情况。**结果** 制模后 4、7 及 14 d 时,发现各超声波亚组结蛋白染色阳性平均光密度值(AOD)均明显高于自然恢复组($P < 0.05$),各超声波亚组间 AOD 值组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 脉冲超声波治疗可促进挫伤骨骼肌再生,有利于损伤肌肉组织修复;采用 0.25~0.75 W/cm² 超声波治疗肌肉挫伤时,其治疗效应无明显量效关系。

【关键词】 超声波; 骨骼肌挫伤; 肌卫星细胞; 增殖

An experimental study of pulsed ultrasound for treating skeletal muscle contusions YANG Zhi-jin*, SHU Bin, CENG Deng-fen, DENG Hao-yue, FANG Xiang-qin. *Department of Rehabilitation Medicine, Institute of Surgery Research, Third Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: SHU Bin, Email: shubin1017@163.com

【Abstract】Objective To evaluate the effects of pulsed ultrasound at different intensities on the healing of standardized contusions in an animal model. **Methods** Forty-eight 3-month-old, male Sprague-Dawley rats were given experimental contusions of the right gastrocnemius muscle before being divided into four groups randomly ($n = 12$ in each group): (1) a muscle injury control group (muscle injury without treatment); (2) a muscle injury and pulsed ultrasound (0.25 W/cm²) group; (3) a muscle injury and pulsed ultrasound (0.5 W/cm²) group; and (4) a muscle injury and pulsed ultrasound (0.75 W/cm²) group. Pulsed ultrasound treatment (frequency 3 mega Hz) was started 24 hours post injury and delivered 5 min daily for 14 days on the injured right hindlimb. At days 4, 7 and 14 after injury, muscle samples were analyzed through hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry for the detection of muscle satellite cells and desmin. **Results** The average optical density (IOD) of desmin-positive mononucleated cells had increased significantly at days 4, 7 and 14 post injury in the treatment groups compared to the control group, but with no statistically significant difference among the 3 ultrasound treatment groups. **Conclusions** The pulsed ultrasound treatment played a beneficial role in skeletal muscle regeneration after contusion. There was no significant dose-dependent effect over the intensity range of 0.25-0.75 W/cm².

【Key words】 Ultrasound; Skeletal muscle contusions; Muscle satellite cells; Proliferation

肌肉损伤在军事训练或体育锻炼中均十分常见,其发生率占运动损伤的 10%~55%。根据损伤机制不同,肌肉损伤可分为挫伤(contusions)、牵拉伤(strains)和撕裂伤(lacerations)等,其中 90% 以上的肌肉损伤都是挫伤或牵拉伤^[1]。无论何种类型的肌肉损伤其愈合过程均大致相同,包括炎症坏死、再生修复、组织重塑三个时期^[1]。相关研究发现,肌肉损伤

的修复主要依赖肌卫星细胞(muscle satellite cell, MSC)的增殖与分化^[2],而 MSC 通常存在于骨骼肌基底层下,是具有增殖和自我更新能力的成肌前体细胞。由于肌肉损伤的修复速度较慢,且功能恢复往往不及损伤前水平,故如何促进受损肌肉快速修复一直是创伤康复领域研究的重要内容。目前采用超声波治疗骨、肌腱及韧带损伤的临床研究较多,其治疗效果也较为肯定^[3];但鲜见采用超声波治疗肌肉损伤的相关报道。本研究通过观察不同强度脉冲超声波对肌肉挫伤后 MSC 增殖、分化情况的影响,从而探讨超声波治疗肌肉损伤的最佳频率、强度等参数,并分析其量效关系

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.11.003

作者单位:400042 重庆,第三军医大学第三附属医院野战外科研究所康复科(杨志金、舒彬、邓皓月、方响琴),护理部(曾登芬)

通信作者:舒彬,Email: shubin1017@163.com

及作用机制,为临床采用超声波治疗肌肉损伤提供参考依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及主要试剂

共选取 3 月龄成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只,体重 270 ~ 290 g,由第三军医大学第三附属医院实验动物中心提供;按照国家清洁级标准饲养,标准饲料喂养,自由饮水,室温保持(24.0 ± 1.5)℃,相对湿度为 40% ~ 60%,每天给予 12 h 光照,通风条件良好。采用随机数字表法将上述大鼠分为自然恢复组(12 只)及超声波组(36 只);超声波组又根据给予超声波强度不同细分为 A、B、C 共 3 个亚组,每个亚组 12 只大鼠。

本研究主要试剂包括:兔抗鼠结蛋白(desmin)一抗购自英国 Abcam 公司(编号 ab8592),SABC 试剂盒(即用型)、DAB 显色剂购自武汉博士德生物工程有限公司。

二、大鼠骨骼肌挫伤模型制作

将上述大鼠制成骨骼肌挫伤模型,具体制模方法如下:采用 2.5% 戊巴比妥钠溶液按每千克体重 2 ml 对大鼠进行腹腔注射麻醉,待麻醉剂生效后,将大鼠右后肢褪毛,采用自行设计的挫伤模型打击装置,将大鼠右后肢置于伸膝、踝背屈 90°、稍外展位固定,使腓肠肌部位明显暴露;采用 220 g 重物从 110 cm 高处以自由落体方式直接撞击大鼠腓肠肌肌腹内侧(撞击面积约为 1 cm²),造成一次性撞击伤,大鼠腓肠肌经重物撞击后,相关部位皮肤仍保持完整,胫、腓骨无骨折,此时大鼠腓肠肌急性挫伤模型即制作完成^[4-5]。

三、超声波治疗

自然恢复组大鼠于制模后未给予特殊处理,让其自然恢复;各超声波亚组于制模后 24 h 给予超声波治疗,采用日本产 US-700 型超声波治疗仪,超声波 A 组、B 组及 C 组分别接受强度为 0.25, 0.50, 0.75 W/cm² 的脉冲超声波(频率均为 3 MHz)治疗,治疗时将直径 10 mm 超声波探头紧贴大鼠右后肢腓肠肌部位,探头与皮肤间涂超声耦合剂,治疗过程中探头位置保持固定,每次治疗持续 5 min。

四、HE 染色及免疫组化染色分析

各组大鼠分别于制模后 4, 7, 14 d 时用过量 2.5% 戊巴比妥钠随机处死 4 只,迅速从大鼠右后肢腓肠肌中腹部取材(标本大小约为 1.0 cm × 1.0 cm × 0.2 cm),用 4% 甲醛液固定,经常规脱水、石蜡包埋、切片(厚度约 4 μm)后分别进行 HE 染色和结蛋白免疫组化染色。免疫组化染色采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物技术(streptavidin-biotin-peroxidase

complex method, SABC),苏木精复染、封片;阴性对照选用 PBS 替代一抗,其余步骤同上,结蛋白免疫组化阳性染色呈棕黄色或黄色。

从每只大鼠的结蛋白免疫组化切片中随机选取 1 张,每张切片再随机拍摄 4 张无重叠视野的照片,标本图像分析采用 IPP 6.0 版图像分析软件,将图像中呈棕黄色或黄色的区域作为目标区(area of interest, AOI),检测其平均光密度值(average optical density, AOD)。

五、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 版统计学软件包进行数据分析,统计学方法选用单因素方差分析(One-Way ANOVA)及 LSD 法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、制模后 4 d 时各组大鼠 HE 染色及免疫组化染色结果分析

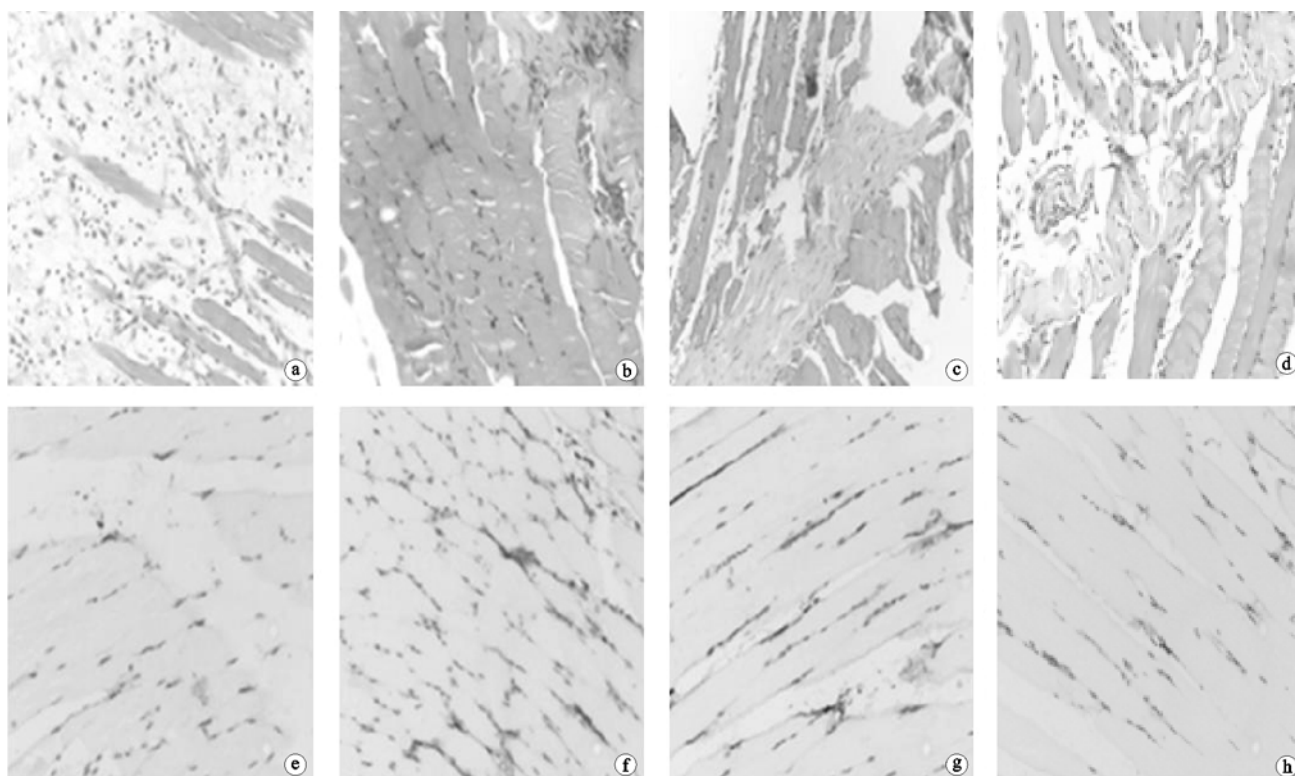
制模后 4 d 时,对各组大鼠 HE 染色结果观察后发现,各超声波组挫伤周边区肌细胞间质水肿不明显,但仍有炎性细胞浸润,以巨噬细胞为主,还伴有少量中性粒细胞;同时可见大量肌细胞核增殖,有成肌细胞及肌管形成,并可见血管再生。自然恢复组挫伤周边区肌细胞间质水肿明显,受损骨骼肌细胞核消失,有大量炎性细胞浸润,并有少量成肌细胞和肌管形成,具体情况详见图 1a ~ d。

结蛋白免疫组化阳性染色呈棕黄色或黄色,各超声波组均可见大量阳性着色的肌卫星细胞和肌管,其数量明显多于自然恢复组,详见图 1e ~ h。超声波 A 组、B 组及 C 组 AOD 值均明显高于自然恢复组,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);各超声波组 AOD 值顺序如下:超声波 B 组 > 超声波 A 组 > 超声波 C 组,但 3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果详见表 1。

二、制模后 7 d 时各组大鼠 HE 染色及免疫组化染色结果分析

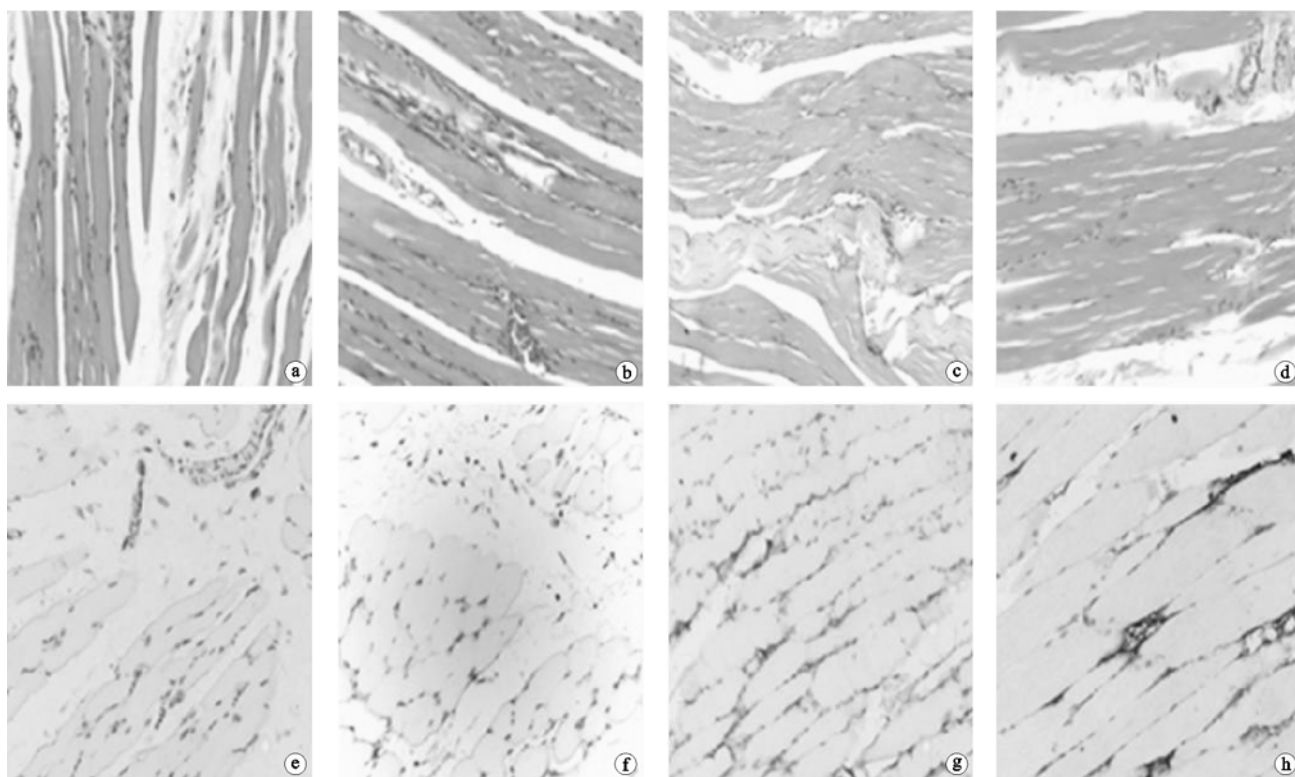
制模后 7 d 时,对各组大鼠 HE 染色结果观察后发现,各超声波组仍有少量炎性细胞浸润,主要为巨噬细胞,有大量成肌细胞和肌管形成,肌细胞核排列成串珠状,有大量肌管融合成肌纤维,并可见胶原纤维形成。自然恢复组仍可见较多炎性细胞浸润,主要是巨噬细胞,成肌细胞和肌管数量进一步增多,有少量肌管融合成肌纤维,并有大量胶原纤维形成,具体结果详见图 2a ~ d。

各超声波组结蛋白阳性染色的肌管数量均明显高于对照组,具体结果详见图 2e ~ h。超声波 A 组、B 组



注:a 自然恢复组;b 超声波 A 组;c 超声波 B 组;d 超声波 C 组;e 自然恢复组;f 超声波 A 组;g 超声波 B 组;h 超声波 C 组

图 1 制模后 4 d 时各组大鼠腓肠肌 HE 染色(1a~1d, $\times 200$)及结蛋白免疫组化染色结果(1e~1h, $\times 200$)比较



注:a 自然恢复组;b 超声波 A 组;c 超声波 B 组;d 超声波 C 组;e 自然恢复组;f 超声波 A 组;g 超声波 B 组;h 超声波 C 组

图 2 制模后 7 d 时各组大鼠腓肠肌 HE 染色(2a~2d, $\times 200$)及结蛋白免疫组化染色结果(2e~2h, $\times 200$)比较

及 C 组 AOD 值均明显高于自然恢复组,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);各超声波组 AOD 值顺序如下:超声波 B 组 > 超声波 C 组 > 超声波 A 组,但 3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果详见表 1。

表 1 各组大鼠制模后不同时间点腓肠肌结蛋白阳性染色 AOD 值比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	制模后 4 d	制模后 7 d	制模后 14 d
自然恢复组	12	0.293 ± 0.011	0.298 ± 0.008	0.230 ± 0.014
超声波 A 波	12	0.302 ± 0.009 ^b	0.314 ± 0.010 ^b	0.241 ± 0.012 ^b
超声波 B 波	12	0.304 ± 0.010 ^b	0.320 ± 0.008 ^b	0.239 ± 0.009 ^a
超声波 C 波	12	0.300 ± 0.008 ^a	0.317 ± 0.009 ^b	0.241 ± 0.007 ^b

注:与自然恢复组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

三、制模后 14 d 时各组大鼠 HE 染色及免疫组化染色结果分析

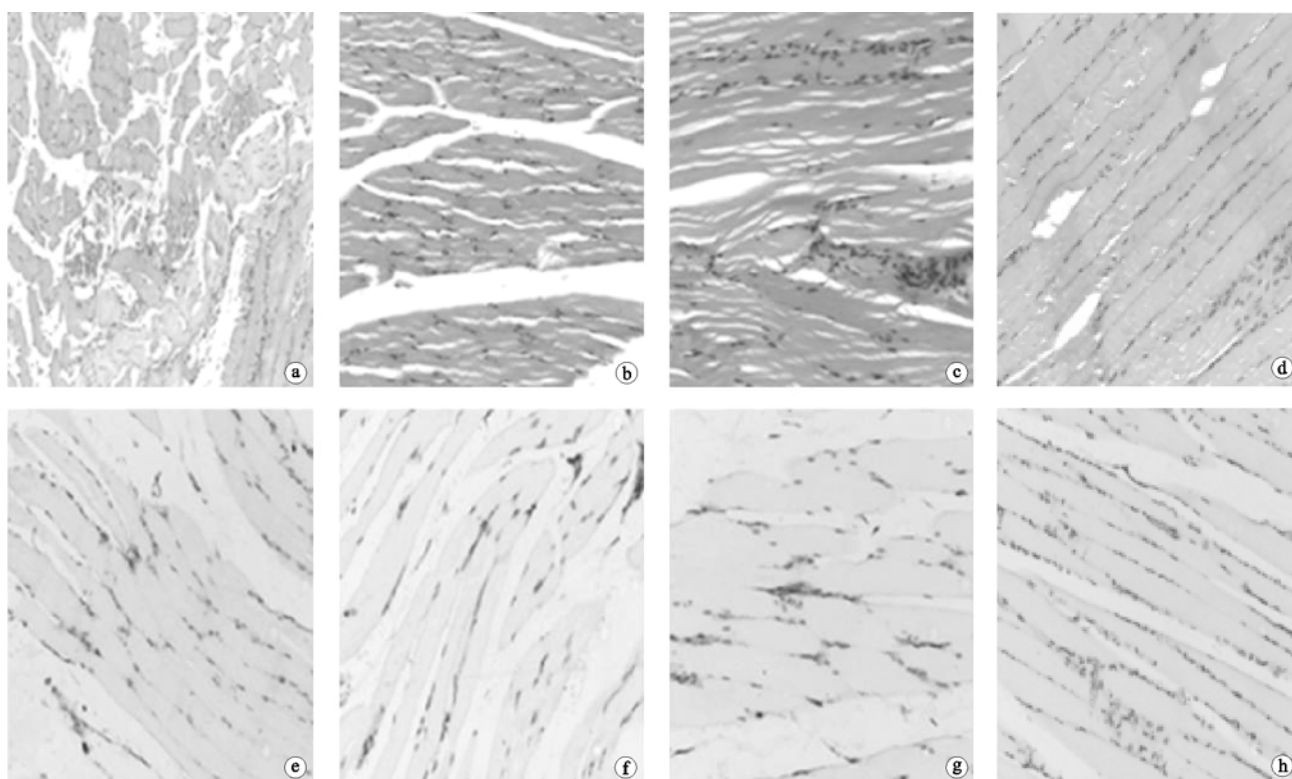
制模后 14 d 时,对各组大鼠 HE 染色结果观察后发现,各超声波组挫伤周边区未见炎性细胞浸润,新生肌纤维排列整齐;自然恢复组挫伤周边区仍有炎性细胞浸润,肌管和再生横纹肌纤维排列不规则,具体情况详见图 3a~d。各超声波组结蛋白阳性着色的肌卫星细胞及肌管数量均明显高于自然恢复组,详见图 3e~h。超声波 A 组、B 组及 C 组 AOD 值均明显高于自然恢复组,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$);各超声

波组 AOD 值顺序如下:超声波 C 组 > 超声波 A 组 > 超声波 B 组,但 3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果详见表 1。

讨 论

相关研究发现,当机体肌肉损伤后,处于静息状态的肌卫星细胞被迅速激活,并增殖、分化为成肌前体细胞,随后进一步融合形成肌管,肌管成熟后即形成正常肌纤维组织^[6-7]。结蛋白是肌细胞内细胞骨架中间丝的构成成分之一,是较早表达的肌源性标志蛋白^[8],同时也是判断骨骼肌运动性微损伤的敏感指标,结蛋白在正常肌纤维中有分布,当肌肉损伤后结蛋白表达往往迅速下降,2~3 d 后结蛋白表达开始增加,于 7 d 左右时达到峰值,2~4 周后逐渐恢复至正常水平^[9],通过观察结蛋白表达的变化,可在一定程度上了解受损肌肉的恢复情况。

目前有大量实验证实,超声波能促进细胞增殖、蛋白质合成,刺激胶原和细胞因子生成^[10],如 Rantanen 等^[7]经实验后发现 3.0 MHz、1.5 W/cm² 脉冲超声波可促进腓肠肌挫伤大鼠肌卫星细胞增殖;Piedade 等^[11]使用 1 MHz、0.57 W/cm² 脉冲超声波治疗大鼠腓肠肌撕裂伤,结果证实超声波治疗可促进成肌细胞分化,有利于损伤肌肉组织再生。



注:a 自然恢复组;b 超声波 A 组;c 超声波 B 组;d 超声波 C 组;e 自然恢复组;f 超声波 A 组;g 超声波 B 组;h 超声波 C 组
图 3 制模后 14 d 时各组大鼠腓肠肌 HE 染色(3a~3d, ×200)及结蛋白免疫组化染色结果(3e~3h, ×200)比较

超声波的作用深度与其频率有关,频率低时作用部位较深,而频率高时作用部位较浅,如频率为 1 MHz 的超声波治疗深度可达 3 ~ 5 cm,频率为 3 MHz 的超声波治疗深度可达 1 ~ 2 cm^[12]。由于大鼠腓肠肌位置较表浅,因此本研究采用频率为 3 MHz 的超声波进行治疗。超声波的热效应与其强度有关,使用较低强度超声波治疗可降低其热效应,减少热效应对受损肌肉组织的不良影响,因此本研究分别采用 0.25、0.50 及 0.75 W/cm² 3 种较低强度的脉冲超声波对肌挫伤大鼠进行治疗。实验结果发现,肌肉损伤后 4、7 及 14 d 时,各超声波组大鼠肌卫星细胞及肌管数量均明显高于自然恢复组;肌肉损伤后 14 d 时,发现各超声波组受伤部位已基本愈合,可见大量肌管融合成肌纤维,且肌纤维排列较整齐;而此时自然愈合组仍有大量炎性细胞浸润,肌管和再生肌纤维数量较少,且排列不规则;结蛋白免疫组化染色结果显示,肌肉损伤后 4、7 及 14 d 时,各超声波组 AOD 值均明显高于自然恢复组,但超声波各亚组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。上述结果提示超声波治疗能促进肌卫星细胞增殖、分化,加速损伤肌肉修复;并且在一定强度范围 (0.25 ~ 0.75 W/cm²) 内,超声波上述治疗效应没有明显的量效关系。

根据超声波作用于机体组织的产热程度,可将其作用机制分为热效应及非热效应两种,过量的超声波热效应会对机体组织产生损害作用^[13];超声波促进肌肉损伤修复主要是利用其非热效应,包括机械效应、空化效应、声微流效应等,如超声波机械效应作用于损伤肌肉组织时,能导致细胞膜通透性改变,刺激第二信使如 Ca^{2+} 离子跨膜转运,从而加速肌卫星细胞增殖、分化,促进损伤肌肉修复^[14-15];另外还有研究发现,超声波治疗可促进机体血管生成因子 (如白介素 8、碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子等) 合成,血管生成因子能促进再生肌纤维的血管生成^[16],从而加速损伤肌肉组织修复,这可能也是超声波促进损伤肌肉修复的重要机制之一。

综上所述,本研究结果表明,0.25 ~ 0.75 W/cm² 脉冲超声波治疗可促进挫伤骨骼肌再生,有利于损伤肌肉组织修复。由于影响超声波治疗效果的因素较多,涉及强度、频率、作用时间、脉冲通断比等大量参数,故我们下一步研究将争取建立超声波的量效曲线,为制订超声波治疗肌肉损伤的最佳参数提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, et al. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2007, 21: 317-331.
- [2] Le GF, Rudnicki M. Satellite and stem cells in muscle growth and repair. *Development*, 2007, 134: 3953-3957.
- [3] Menetrey J, Kasemki JC, Fu FH, et al. Suturing versus immobilization of a muscle laceration—a morphological and functional study in a mouse model. *Am J Sports Med*, 1999, 27: 222-229.
- [4] McBrier NM, Lekan JM, Druhan LJ, et al. Therapeutic ultrasound decreases mechano-growth factor messenger ribonucleic acid expression after muscle contusion injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 2007, 88: 936-940.
- [5] Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, et al. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil*, 2005, 86: 1304-1310.
- [6] Anderson JE. A role for nitric oxide in muscle repair; nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 1859-1874.
- [7] Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, et al. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med*, 1999, 27: 54-59.
- [8] Lawson-Smith MJ, McGeachie JK. The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *J Anat*, 1998, 192: 161-171.
- [9] Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, et al. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001, 60: 588-597.
- [10] Fu SC, Shum WT, Hung LK, et al. Low-intensity pulsed ultrasound on tendon healing: a study of the effect of treatment duration and treatment initiation. *Am J Sports Med*, 2008, 36: 1742-1749.
- [11] Piedade MC, Galhardo MS, Battlener CN, et al. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics*, 2008, 48: 403-411.
- [12] Larsen A, Kristensen G, Thorlacius UO, et al. The influence of ultrasound on the mechanical properties of healing tendons in rabbits. *Acta Orthop*, 2005, 76: 225-230.
- [13] Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci*, 2001, 16: 44-51.
- [14] Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology*, 2001, 40: 1331-1336.
- [15] Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil*, 2002, 83: 1-4.
- [16] Reher P, Doan N, Bradnock B, et al. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine*, 1999, 11: 416-423.

(修回日期: 2010-08-20)

(本文编辑: 易 浩)