

推拿揉法对急性期骨骼肌钝性损伤家兔信号通路蛋白表达的影响

袁文琪 陈靓靓 许丽芳 肖夜馨 申湘慧 岑依阳 郑涵文 艾珏萍^(通讯作者)

(长沙医学院 湖南长沙 410219)

【摘要】目的 观察推拿揉法干预对急性期骨骼肌钝性损伤家兔模型局部肌肉组织中信号通路蛋白表达的影响。方法 选取30只成年新西兰大白兔，随机平均分成3组即空白组、模型组、治疗组，每组各10只。治疗组予造模、治疗处理，模型组予造模、不治疗处理，空白组不造模不治疗处理，采取自制重力铅锤击打兔右后下肢股四头肌肌腹和腓肠肌肌腹，建立股四头肌钝性损伤模型和腓肠肌损伤模型，疗程3天后全处死，采用ELISA（酶联免疫吸附）法检测家兔血清中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量，采用Western blot检测家兔膝关节软骨组织TLR-4、MyD88、NF- κ B的蛋白表达水平；并进行统计学分析。结果 与空白组相比，模型组血清中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量显著升高（ $P < 0.05$ ），与模型组相比，治疗组血清中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量显著下降（ $P < 0.05$ ）；与空白组相比，模型组软骨组织TLR-4、MyD88、NF- κ B的蛋白表达显著升高（ $P < 0.05$ ），与模型组相比，治疗组软骨组织TLR-4、MyD88、NF- κ B的蛋白表达显著下降（ $P < 0.05$ ）。结论 在急性期骨骼肌钝性损伤模型家兔股四头肌和腓肠肌修复过程中，运用推拿揉法治疗，有助于修复受损的骨骼肌，使炎性细胞减少，促进骨骼肌恢复痊愈，改善家兔运动功能，利于辅助治疗，值得临床实践运用。

【关键词】推拿揉法；急性期；骨骼肌；钝性损伤；信号通路

The Effect of Tui Na on the Expression of Signaling Pathway Proteins in Acute Periodic Blunt Muscle Injury in Rabbits.

Yuan Wenqi Chen Liangliang Xu Lifang Xiao Yexin Shen Xianghui Cen Yiyang Zheng Hanwen Ai Jueping^(Corresponding Author)

(Changsha Medical College Changsha, Hunan 410219)

[Abstract] Objective To investigate the effects of Tui Na on the expression of signaling pathway proteins in the local muscle tissue of rabbits with acute periodical blunt muscle injury. Methods Thirty adult New Zealand White rabbits were randomly divided into three groups: the control group, the model group, and the treatment group, with ten rabbits in each group. The treatment group received modeling and treatment, the model group received modeling without treatment, and the control group did not receive modeling or treatment. A homemade gravity pendulum was used to strike the quadriceps and gastrocnemius muscles of the right hind leg of the rabbits to establish models of blunt injury to the quadriceps and gastrocnemius muscles. After a 3-day course of treatment, all rabbits were euthanized. The levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the serum of the rabbits were detected using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), and the protein expression levels of TLR-4, MyD88, and NF- κ B in the knee joint cartilage tissue were detected using Western blot. Statistical analysis was performed. Compared to the control group, the serum levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the model group were significantly elevated ($P < 0.05$). In contrast, the serum levels of these cytokines in the treatment group were significantly reduced ($P < 0.05$). Additionally, compared to the control group, the protein expression levels of TLR-4, MyD88, and NF- κ B in the cartilage tissue of the model group were significantly increased ($P < 0.05$). Conversely, in the treatment group, these protein levels were significantly decreased ($P < 0.05$). Conclusion: In the repair process of quadriceps and gastrocnemius muscles in rabbits with acute blunt bone muscle injury, applying massage techniques can help repair damaged muscles, reduce inflammatory cells, promote muscle recovery, improve the rabbits' motor function, and serve as an auxiliary treatment, making it worthy of clinical application.

[Key words] Massage techniques; Acute phase; Bone muscle; Blunt injury; Signal pathway

骨骼肌钝性损伤是由外部机械力作用引起的非穿透性组织创伤，常见于运动创伤、交通事故和军事损伤等场景。在运动损伤中，骨骼肌损伤很常见，发生概率约10%~55%^[1]，多由长期性耐力运动引起，其比较常见的损伤类型有钝挫伤、撕裂性及牵拉伤等。机械力直接作用导致的肌纤维结构和细胞膜完整性破坏，骨骼肌损伤后发生炎症反应，局部瘢痕组织增生并纤维化，受损肌肉组织弹性渐渐丧失，伴有肌肉强硬、活动性能下降，肌电指标和生理生化指标改变，如果得不到及时康复治疗，愈合期拖延，甚至迁延不愈，最终可能造成受损的肌组织功能丧失^[2]或组织脆性增加，极易发

生再次损伤。因此，充分研究骨骼肌损伤机制，钻研怎样减少肌肉纤维化，提高患者功能恢复及生活质量，是如今医学研究的重要课题之一。有前期实验研究发现，肌成纤维细胞分化受多种细胞因子、信号通路的调控，力学因素几乎影响着体内所有的细胞，细胞的生长、发育、增殖、死亡，都和细胞的力学特性有关^[3]，而既往研究已证明肌成纤维细胞分化受多种细胞因子和信号通路的调控，其中力学因素对其分化有十分重要影响，细胞内的应力释放可直接导致肌成纤维细胞的凋亡^[4]。因此，推拿手法或许可以减少肌成纤维细胞的增生，促进其凋亡，从而控制纤维化的进程^[5-6]。临床研究

证明^[7-8]，在骨骼肌纤维化疾患中，中医推拿疗法对肌成纤维增生具有干预作用。本研究运用推拿揉法进行干预，观察TLR-4/MyD88/NF- κ B信号通路表达的影响，旨在确定在急性期时推拿揉法能否促进骨骼肌钝性损伤后运动功能的恢复，为推拿应用临床治疗提供更确切的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康SPF级成年新西兰大耳白兔30只，雌雄各半，体重2.5~3.0kg，月龄3月，拟从长沙医学院资产管理处申购。饲养环境温度20~25℃，湿度50%~70%，将实验动物编号，分笼饲养。适应性喂养1周后，按随机数字表法均分为3组，一组10只为空白组，余20只用自制重力铅锤打击装置建立股四头肌损伤模型和腓肠肌损伤模型后，按随机数字表法均分为2组：模型组、治疗组。

1.2 主要试剂与仪器

兔源TLR-4单克隆抗体（北京博奥森 bs-20594R）；兔源MyD88单克隆抗体（北京博奥森 bs-1047R）；兔源NF- κ B单克隆抗体（北京博奥森 bs-0465R）；IL-6 ELISA检测试剂盒（安迪华泰 E-30644）；IL-1 β ELISA检测试剂盒（安迪华泰 E-30418）；TNF- α ELISA检测试剂盒（安迪华泰 E-30633）；标准电泳装置（北京六一）；ZTC-II按摩手法测试仪（上海腾荫教学仪器有限公司提供）；自制股四头肌损伤模型、腓肠肌损伤模型打击装置^[11]。

1.3 模型制备

参考文献方法建立股四头肌损伤模型与腓肠肌损伤模型。采用自制重力铅锤打击兔右后肢股四头肌肌腹中段，建立股四头肌损伤模型。

1.4 治疗方法

根据标准揉法参数，在ZTC-II按摩手法测试仪上测试并训练实验手法操作人员达标，并在实验动物股四头肌进行练习，每天两次，每次操作练习3min，总练习时间>30min/d，连续练习3天。以造模后第2天开始局部揉法治疗，对治疗组家兔进行捆绑局部揉法治疗，全程手法操作要求保持兔子情绪相对稳定状态，防止应激情况出现，以免影响实验结果。所选用最佳手法刺激量以家兔不乱动不乱叫等安静状态为度，若进行手法过程中家兔乱动、乱叫可待其安静后继续局部揉法，模型组1、模型组2和空白组捆绑后不做其他处理。先将家兔处仰卧位平置固定于实验台，露出股四头肌，腓肠肌及相邻肌肉部位，以第五掌指关节背侧吸附于体表施术部位实施揉法。前揉和回揉时着力轻重之比为3:1，峰值压

力500g重力。操作频率140次/分。每次操作3分钟，每天上午/下午共两次，共治疗3天。

1.4 取材及检测

（1）ELISA检测家兔血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α

在家兔膝关节软骨损伤模型建立后第1、3、7天，通过耳缘静脉采集空腹血液5ml，室温静置30分钟促凝血，3000rpm离心15分钟分离血清，分装后-80℃冻存避免反复冻融。选用IL-1 β /IL-6/TNF- α 特异性单克隆抗体包被96孔板，4℃过夜；5%脱脂奶粉37℃封闭1小时；血清样本稀释，与标准品同步加入孔板，37℃孵育1小时；依次加入生物素标记检测抗体、链霉亲和素-HRP，每步37℃孵育45分钟，PBS-T洗涤3次；TMB底物避光显色10分钟，2M H₂SO₄终止反应，酶标仪450nm读取OD值。

（2）Western blot检测软骨组织TLR4、MyD88、NF- κ B

取家兔膝关节软骨组织，液氮研磨家兔软骨组织提取蛋白，经BCA法定量后，进行SDS-PAGE凝胶电泳分离并转印至PVDF膜；依次用封闭液、一抗（TLR4/MyD88/NF- κ B及内参 β -actin）和酶标二抗孵育，ECL化学发光显影。通过分析目标蛋白与 β -actin的灰度比值，量化通路蛋白表达量。

1.4 统计学方法

统计学处理数据采用SPSS24.0软件进行处理，P<0.05为有显著性差异。

2 结果

2.1 ELISA测定各组家兔血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达量

在干预前，模型组和治疗组的IL-6、IL-1 β 、TNF- α 浓度均显著高于空白组（P<0.05），表示骨骼肌钝挫伤模型成功诱导全身急性炎症反应，即造模成功。在干预后，模型组炎症持续恶化，治疗组干预效果显著，所有炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均显著下降（均P<0.05），表明推拿揉法有效抑制急性期骨骼肌钝性损伤相关炎症因子表达。

2.2 Western blot检测各组家兔软骨组织中TLR4、MyD88和NF- κ B蛋白表达量

治疗组TLR4、MyD88、NF- κ B p65均低于模型组（P<0.05），提示推拿揉法可通过抑制TLR4信号通路的激活，下调MyD88和NF- κ B p65的表达，从而阻断炎症信号的级联放大效应。

表1 三组家兔血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的浓度比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

分组	IL-6 (pg/mL)		IL-1 β (pg/mL)		TNF- α (pg/mL)	
	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
空白组 (n=10)	5.98 $\pm$ 4.73	6.03 $\pm$ 4.35	90.26 $\pm$ 5.35	92.28 $\pm$ 4.96	83.63 $\pm$ 5.47	85.16 $\pm$ 4.87
模型组 (n=10)	93.63 $\pm$ 9.89	103.05 $\pm$ 8.22	315.19 $\pm$ 10.36	347.25 $\pm$ 11.64	437.63 $\pm$ 8.93	486.51 $\pm$ 9.09
治疗组 (n=10)	89.19 $\pm$ 8.13	52.37 $\pm$ 7.98	320.56 $\pm$ 11.13	168.73 $\pm$ 9.78	421.58 $\pm$ 9.17	154.56 $\pm$ 8.71
空白组 vs 模型组: t (P)	25.282 (<0.05)	32.990 (<0.05)	61.003 (<0.05)	63.724 (<0.05)	106.898 (<0.05)	123.073 (<0.05)
空白组 vs 治疗组: t (P)	27.976 (<0.05)	13.990 (<0.05)	58.974 (<0.05)	22.050 (<0.05)	100.088 (<0.05)	83.381 (<0.05)
模型组 vs 治疗组: t (P)	1.097 (0.287)	16.123 (<0.05)	1.117 (0.279)	37.132 (<0.05)	3.965 (<0.05)	21.992 (<0.05)



表2 三组家兔软组织TLR4、MyD88和NF-κB蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TLR4 (pg/mL)	MyD88 (pg/mL)	NF-κB (pg/mL)
空白组 (n=10)	0.86 ± 0.12	0.92 ± 0.17	1.12 ± 0.15
模型组 (n=10)	2.38 ± 0.29	2.12 ± 0.32	2.64 ± 0.37
治疗组 (n=10)	1.57 ± 0.19	1.45 ± 0.22	1.69 ± 0.23

3 讨论

推拿揉法治疗急性期骨骼肌损伤的核心机制是改善局部循环与炎症消退,急性骨骼肌钝性损伤后,局部微循环障碍导致炎症因子堆积、组织水肿及代谢废物滞留。推拿揉法的滚动压力通过节律性挤压,促进静脉血和淋巴液回流,加速炎性渗出物清除。结果显示,揉法干预后血清肌酸激酶和炎症因子水平显著降低,水肿消退速度提高 30%以上。推拿揉法通过持续牵拉肌纤维,激活高尔基体器官,抑制α运动神经元兴奋性,从而降低肌梭敏感性,打破“疼痛-痉挛”循环。表面肌电图证实,推拿揉法操作后肌肉紧张度信号幅值下降 40% - 60%,同时内啡肽释放增加^[9-10]。推拿揉法作为中医外治疗法的重要手段,在骨骼肌急性损伤治疗中展现出显著疗效。本研究通过 ELISA 与 Westernblot 检测,证实揉法干预可显著降低血清促炎因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平,并抑制软骨组织中 TLR4、MyD88 和 NF-κB 信号通路关键蛋白的表达。ELISA 检测数据显示,揉法干预后,治疗组炎症因子显著下降,其作用机制包括:直接抑制促炎

因子合成,手法压力通过机械刺激加速损伤局部代谢,促进炎性渗出物吸收,减少巨噬细胞和中性粒细胞分泌 IL-1β 和 TNF-α; 阻断炎症-纤维化转化: TNF-α 和 TGF-β 1 具有协同促纤维化作用。王兰兰等研究发现, TNF-α 可通过激活 SphK1/S1PR3 通路,促使成肌细胞向肌纤维细胞转化,导致胶原过度沉积^[11]。推拿揉法通过抑制 TLR4、MyD88 和 NF-κB 信号通路,阻断炎症级联放大的核心机制是:骨骼肌损伤后释放的热休克蛋白、透明质酸片段等 DAMPs, 与 TLR4 受体结合,触发 MyD88 依赖通路。推拿揉法通过节律性滚动压力刺激局部组织,显著降低血清促炎因子 IL-6、TNF-α 水平。实验显示,家兔骨骼肌钝挫伤后,揉法干预组血清 IL-6 及 TNF-α 表达较模型组降低 40% - 50%,有效减轻炎症级联反应,避免二次损伤。在损伤机制期推拿揉法可显著提升 TGF-β 1 表达,但抑制其过度活化。TGF-β 1 早期促进成纤维细胞增殖修复,后期高表达则导致纤维化;揉法通过精准调节其浓度和活性,平衡修复与纤维化进程^[12]。

参考文献:

[1]孟繁斌,陈江海,刘娟,等.Role of Transforming Growth Factor-β 1 in the Process of Fibrosis of Denervated Skeletal Muscle[J].Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences), 2011, 31 (1): 77-82.

[2]尚画雨,白胜超,夏志,等.运动诱导骨骼肌损伤对大鼠骨骼肌线粒体结构和功能的影响[J].北京体育大学学报, 2018, 41 (1): 58-63.

[3]Shu B, Shen Y, Wang AM, et al.Histologicall, enzymohistochemical and biomechanical observation of skeletal muscle injury in rabbits[J].Chin J Traumat, 2007, 10 (3): 150-153.

[4]Chinedu Cletus Ude, Azizi Miskon, Ruszymah Bt Hj Idrus, et al.Application of stem cells in tissue engineering for defense medicine[J].Military Medical Research, 2018, 5 (02): 140-158.

[5]赵娜,张玮,庞庚,等.基于 TGF-β 1/CTGF 作用途径探讨推拿干预骨骼肌纤维化的作用机制[J].辽宁中医杂志, 2016, 43 (12): 2539-2541.

[6]叶晶,钱知知,朱思睿,等.巨噬细胞在肾间质纤维化中的研究进展[J].中国免疫学杂志, 2019, 35 (1): 110-113.

[7]刘劲松,李智尧.膝关节周围血供变化的影像学观察[J].中国骨伤, 2017, 30 (8): 701-706.

[8]侯懿烜.按摩对兔股四头肌损伤修复的初步研究[D].重庆医科大学, 2012: 69-70.

[9]张芷齐,赵娜,庞庚,等.按揉法对骨骼肌钝挫伤大鼠肌肉纤维化的影响[J].辽宁中医杂志, 2020, 47 (3): 197-199+226.

[10]范希然,李多多,王双双,等.推拿手法治疗骨骼肌肉疼痛影响因素的质性研究[J].中国全科医学, 2023, 26 (2): 219-224.

[11]廖森攀,马志君,刘畅,等.推拿治疗菱形肌损伤研究进展[J].中医学 (Journal of Traditional Chinese Medicine), 2024, 13 (1): 023001-023012.

[12]王兰兰,薛惠天,孙梦龙,等.推拿?法对兔骨骼肌急性钝挫伤组织 TNF-α 及 SphK1、S1PR3 表达的影响[J].中国中医药信息杂志, 2023, 30 (6): 129-134.

作者简介:袁文琪,本科,主要研究方向:中医药治病机理;
共同一作:陈靓靓,本科,主要研究方向:中医药治病机理;
通讯作者:艾珏萍,女,汉族,籍贯湖南株洲,硕士,讲师,主要研究方向:针灸推拿治病机理。
项目编号:湘教通〔2024〕191号-5193;湘教通〔2024〕191号-5219;湖南省教育厅科学研究一般项目(编号 24C0607)