论著

文章编号:1000-5404(2011)19-2012-04

按摩增强琥珀酸脱氢酶和钾-钠ATP酶活性促进兔股四头肌的损伤修复

侯懿烜[1],郑元义[2],张 萍[3],刘祖丽[1],郜 婕[1],唐成林[1] (400016 重庆,重庆医科大学中医药学院[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院超声科[2];445000 湖北 恩施,湖北省恩施土家族苗族自治州恩施市妇幼保健医院内儿科[3])

[摘要] **目的** 研究按摩对骨骼肌损伤修复关键酶琥珀酸脱氢酶(SDH)、钾-钠ATP酶(K^+-Na^+-ATPase)活性的影响。**方法** 将30只雄性新西兰大白兔分为健康对照组(3只)、自然恢复组(15只)和按摩组(12只)。根据损伤造模后观察时间的不同,自然恢复组分为3个时相点,即自然恢复7 d组(3只)、按摩7 d对照组(自然恢复14 d,6只)和按摩14 d对照组(自然恢复21 d,6只),按摩组分为按摩7、14 d组(各6只)。重物打击法制作兔股四头肌急性损伤模型。HE、超声影像技术检测组织病理变化,酶组化法检测SDH酶、K^+-Na^+-ATPase活性。**结果** 组织病理检测显示按摩对照组受损肌组织肿胀、萎缩退变,按摩治疗后修复或新生肌纤维明显增多。超声影像研究显示按摩对照组受损肌纤维纹理消失、回波呈弥漫性非均匀增强,按摩组回波呈弥漫均一性增强、边缘清晰。SDH和K^+-Na^+-ATPase活性研究结果进一步显示:按摩7 d组(0.003 3±0.000 2) *vs* (0.002 2±0.000 2)和14 d组(0.003 9±0.000 2) *vs* (0.003 2±0.000 1)较对应的按摩对照组SDH活性明显增加($P<0.01$),SDH深染的Ⅰ型肌纤维数量百分比高于对应的按摩对照组[7 d组:(38.6±2.6)% *vs* (25.1±1.7)%,$P<0.01$;14 d组:(56.2±4.5)% *vs* (30.3±2.1)%,$P<0.01$];ATPase活性分别在按摩7 d组和14 d组比对应的按摩对照组升高约47%和72%($P<0.01$)。**结论** 按摩可能通过提高受损肌组织有氧代谢相关酶类活性,促进受损肌组织的修复。

[关键词] 按摩;股四头肌;琥珀酸脱氢酶;钾-钠ATP酶;损伤修复

[中图法分类号] R244.1; R363.27; R685.405 [文献标志码] A

Massage promotes repairing of injured quadriceps femoris muscle of rabbit through enhancing activity of SDH and K^+-Na^+-ATPase

Hou Yixuan[1], Zheng Yuanyi[2], Zhang Ping[3], Liu Zuli[1], Gao Jie[1], Tang Chenglin[1] ([1]College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Ultrasound Imaging, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [3]Department of Internal Pediatrics, Enshi Municipal Maternal and Children Care Hospital, Enshi, Hubei Province, 445000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and its mechanism of massage on the recovery of damaged skeletal muscle. **Methods** A total of 24 adult male New Zealand rabbits were randomly divided into 3 groups, normal control ($n=3$), self-repairing group ($n=15$, further divided into 7, 14 and 21 d time points), and massage group ($n=12$, further divided into 7 and 14 d time points). The quadriceps femoris injured models were established by hammering the muscle with self-made lead hitter. Massage was given from the 8 d after the model establishment with the aid of a massager at 3 000 to 3 100 r/min, for 15 min once per day for 7 or 14 d. In the end of experiment, the animals were killed and muscle samples of 1.5 cm×1.0 cm×0.5 cm were removed from quadriceps femoris. H&E staining was used to detect the pathologic change. Nachlas dyeing or Wachstein-Meisel was used to detect the activity of succinate dehydrogenase (SDH) or K^+-Na^+-ATPase of quadriceps femoris tissue from massage therapeutic and unmassaged rabbits. **Results** Obvious broken muscular fibers, muscle atrophy, and tortuosity of muscle fibers were observed in self-repairing tissue. The non-homogenous and diffusive echoes were detected in the unmassaged quadriceps femoris with disappearing muscular texture. And the homogenous and weak diffusive echoes were tested in the massaged recovery quadriceps femoris. Comparing with its controls, the activity of SDH was increased in massaged 7 d rabbits (0.0033±0.0002 *vs* 0.0022±0.0002, $P<0.01$) and massaged 14 d rabbits (0.0039±0.0002 *vs* 0.0032±0.0001, $P<0.01$). More I-type muscular fibers were found in the massaged rabbits than in the control rabbits [7 d group:

[基金项目] 国家自然科学基金(30900371);重庆市教委科学技术研究项目(KJ100307)

[通信作者] 唐成林, E-mail:CYTCL996@163.com

(38.6 ± 2.6)% *vs* (25.1 ± 1.7)%, $P < 0.01$; 14 d group: (56.2 ± 4.5)% *vs* (30.3 ± 2.1)%, $P < 0.01$]. The activity of K^+-Na^+-ATPase was also increased by 47% ($P < 0.01$) and 72% ($P < 0.01$) respectively in massaged 7 d and 14 d rabbits when compared with corresponding self-repairing groups. **Conclusion** Massage promotes the recovery of injured muscle through stimulating activity of SDH and K^+-Na^+-ATPase.

[**Key words**] massage; quadriceps femoris; K^+-Na^+-ATPase; succinate dehydrogenase; skeletal muscle recovery

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900371) and the Program of Science & Technology Research of Chongqing Committee of Education (KJ100307). Corresponding author: Tang Chenglin, E-mail: CYTCL996@163.com

肌肉的外力损伤在临床上较为普遍,严重的肌损伤可导致有氧代谢向糖酵解的转变,引起肌纤维退变、坏死。Ⅰ型肌纤维量的变化反映受损骨骼肌有氧代谢水平、损伤修复的状况。有氧呼吸、肌纤维损伤关键酶类琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)、钾-钠ATP酶(K^+-Na^+-ATPase)是评价受损骨骼肌生理生化、有氧代谢水平和损伤修复的重要指标[1-4]。当肌组织受损,肌膜上 K^+-Na^+-ATPase 异常,首先影响肌细胞 K^+-Na^+ 交换、Ca^{2+} 超载,导致线粒体结构受损,线粒体内膜的SDH酶活性下降,三羧酸循环中琥珀酸向延胡索酸的转变发生困难,氧化磷酸化过程中的能量转换异常,活性氧类物质累积,进一步造成肌膜、线粒体膜的破坏,导致能量代谢障碍以至细胞死亡[5-6]。在祖国的传统医学中按摩治疗有助于骨骼肌损伤修复,如提高血红蛋白和肌红蛋白水平、促进血液流动、加强对受损部位的养分供给,有效防止受损肌纤维的萎缩、退变[7-9]。但按摩治疗促进受损肌组织的修复是否与肌纤维成分,SDH、K^+-Na^+-ATPase 等相关酶类活性有关,报道较少。

为了进一步了解按摩对受损肌肉康复的作用机制,本研究以重物撞击兔股四头肌为损伤模型,研究按摩对受损股四头肌的病理恢复,与能量代谢及肌损伤康复密切相关的 SDH、K^+-Na^+-ATPase 活性,以评价按摩对受损肌组织的抗萎缩、促康复能力。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性新西兰大白兔30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)20050002]。

实验兔于室温24 ℃分笼适应性喂养1周,分为正常对照组(3只)、自然恢复组(15只)和按摩组(12只)。根据损伤造模后观察时间的不同,自然恢复组分为3个时相点,即自然恢复7 d组(3只)、按摩7 d对照组(自然恢复14 d,6只)和按摩14 d对照组(自然恢复21 d,6只),按摩组分为按摩7、14 d组(各6只)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模 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。铅锤(锤长10 cm,质量0.5 kg,底面直径2.5 cm)沿PVC塑料导向管(直径3.0 cm)自60 cm高处自由下落,同一部位连续打击3次。打击部位出现肿胀和淤血,类似肌肉受撞击损伤,表明建模成功。

1.2.2 按摩治疗方法 根据肌肉损伤的病理状况,按摩始于造模后第8天[7,10]。按摩治疗采用RT-N2按摩器(北京瑞天盛达电器有限公司),按摩受损及临近肌组织,按摩转速3 000 ~ 3 100 r/min,时间15 min,每天1次,连续按摩7、14 d。健康对照组、自然恢复组不予按摩。

1.2.3 取材 空气栓塞法处死动物,取受损股四头肌组织2块(约1.5 cm × 1.0 cm × 0.5 cm)置入4%多聚甲醛固定过夜,用于HE染色。另取受损组织2块立即用液氮冷冻, −80℃低温冰箱备用。常规法冰冻切片(7 μm),用于SDH、K^+-Na^+-ATPase组织化学染色。

1.2.4 HE染色、SDH和 K^+-Na^+-ATPase 组化检测 常规法行HE染色,即固定肌组织经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,苏木精和伊红染色。SDH酶染色采用硝基蓝四唑法(Nachlas法),阳性部位呈蓝紫色颗粒。K^+-Na^+-ATPase 采用经典的Wachstein-Meisel镁激活法,阳性部位呈棕黑色硫化铅沉淀。

1.2.5 超声影像学检查 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,迅速振摇至其完全溶解,耳缘静脉注射,即刻用飞利浦iu22高端彩超诊断仪(L12-5高频探头,频率为10 MHz)对受损股四头肌进行局部超声诊断,观察并记录病灶组织及回波图像。

1.2.6 图像采集与分析 每组切片各取5张,分别在100 ×、200 ×和400 ×光镜下对目标位点照相、至少记录10个不同视野。Image Pro Plus 6.0图像分析软件测量SDH深染肌纤维(Ⅰ型肌纤维)目标面积,SDH深染肌纤维、ATPase阳性肌纤维积分光密度(IOD)。分别以Ⅰ型肌纤维目标面积/整个视野面积代表每个视野Ⅰ型肌纤维目标面积百分比,Ⅰ型肌纤维IOD值/Ⅰ型肌纤维面积代表其SDH染色光密度值(OD);ATPase阳性肌纤维目标面积/整个视野肌纤维面积代表ATPase阳性肌纤维OD值。

1.3 统计学分析

各组股四头肌的肌纤维直径、Ⅰ型肌纤维目标面积百分比、Ⅰ型肌纤维占整个肌纤维的百分比、Ⅰ型肌纤维酶活性OD值、ATPase阳性肌纤维酶活性的OD值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件,进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 股四头肌损伤的组织病理及超声检测结果

光镜下观察到兔股四头肌经外力重物损伤后,前7 d随着损伤时间的延长,横断面肌纤维直径逐渐减小,肌纤维变细,萎

缩退化现象明显。自然恢复过程中,按摩7、14 d对照组部分肌纤维虽然能得到一定程度的修复,但效果较差;按摩7、14 d组,随按摩治疗时间的延伸,肌纤维平均直径逐渐增大,修复和新生肌纤维明显增多(图1)。

超声影像显示正常股四头肌纹理结构清晰,走向自然、延续;按摩7 d对照组:损伤区域肌肉肿胀,正常纹理结构消失,回声呈弥漫性增强,边界不规则,损伤严重部位回声呈不均匀减低;按摩14 d对照组:损伤区域肌肉纹理结构、回声反射强弱、特点与按摩7 d对照组相似,弥漫性回波的均一性仅稍有改善。按摩7 d组:受损肌肉纹理结构尚未恢复,损伤区域回声呈均一弥漫性增强,边界不规则,边缘较清楚。按摩14 d组:受损肌肉纹理结构开始恢复,损伤区域范围缩小,回声呈均一性增强,边界较规则,边缘清楚。见图2。

2.2 按摩对SDH酶活性的影响

正常股四头肌SDH染色呈蓝色细颗粒沉淀,肌纤维被染成深蓝色(Ⅰ型)和浅色(Ⅱ型)两类,二者呈镶嵌交叉状排列;正常股四头肌SDH活性高,Ⅰ型肌纤维较丰富,且肌纤维较为粗大,即Ⅰ型肌纤维目标面积百分比较高。按摩7 d对照组:受损肌纤维明显萎缩、退变,SDH染色浅,SDH着色较深的区域分布在肌纤维的周边,Ⅰ型肌纤维比例少,Ⅰ型肌纤维目标面积百分比低($P<0.01$);按摩14 d对照组:非着色或浅染的肌纤维仍然占多数,Ⅰ型肌纤维目标面积百分比亦较低($P<0.01$),肿胀的肌纤维较按摩7 d对照组减少。按摩组:Ⅰ型肌纤维的数量百分比、Ⅰ型肌纤维目标面积百分比在按摩7 d组和按摩14 d组明显高于对应的按摩对照组($P<0.01$)。随着按摩时间的延长,按摩14 d组Ⅰ型肌纤维较按摩7 d组Ⅰ型肌纤维亦明显增加($P<0.01$)。有趣的是按摩14 d组Ⅰ型肌纤维SDH着色甚至强于正常对照组。见图3,表1。

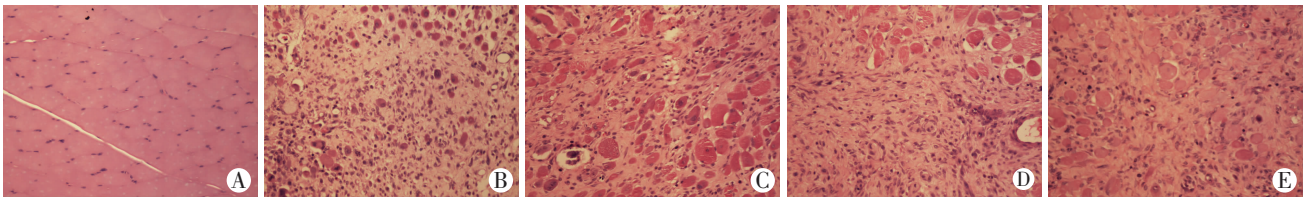
表1 新西兰大白兔股四头肌SDH深染肌纤维面积比、百分含量、OD值

组别	Ⅰ型肌纤维目标面积百分比(%)	Ⅰ型肌纤维百分含量(%)	OD值
健康对照组	40.41±1.89	64.1±3.8	0.004 2±0.000 2
自然恢复组			
自然恢复7 d组	16.03±1.34[a]	21.2±2.4[a]	0.002 2±0.000 2[a]
按摩7 d对照组	24.12±1.57[a]	25.1±1.7[a]	0.002 4±0.000 2[a]
按摩14 d对照组	26.81±1.17[a]	30.3±2.1[a]	0.003 2±0.000 1[a]
按摩组			
按摩7 d组	27.01±0.94[ab]	38.6±2.6[ab]	0.003 3±0.000 2[ab]
按摩14 d组	38.22±1.85[ac]	56.2±4.5[ac]	0.003 9±0.000 2[ac]

a:$P<0.01$,与健康对照组比较;b:$P<0.01$,与按摩7 d对照组比较;c:$P<0.01$,与按摩14 d对照组比较

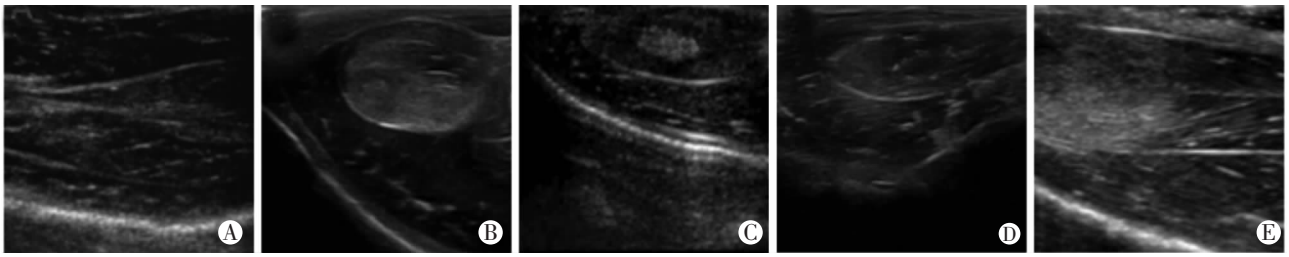
2.3 按摩对肌组织K^+-Na^+-ATPase活性的影响

正常肌细胞中,K^+-Na^+-ATPase阳性表达定位于细胞质内,表达水平较高[OD值(0.044±0.03)],分布均匀。损伤各组肌纤维呈棕黄色,着色明显减弱,纤维化组织仅有微弱的K^+-Na^+-ATPase活性。随着时间的推移,K^+-Na^+-ATPase的表达范围及强度在按摩对照组及按摩组均有增强,但按摩7 d对照组[OD值(0.021±0.003)]和按摩14 d对照组[OD值(0.024±0.002)]阳性表达的范围及酶活性强度均低于同期按摩组[按摩7、14 d组OD值各为(0.027±0.002)、(0.034±0.03)]。按摩组K^+-Na^+-ATPase平均光密度值较对应的按摩对照组分别升高约47%、72%($P<0.01$),且按摩14 d组K^+-Na^+-ATPase染色明显强于按摩7 d组。见图4。



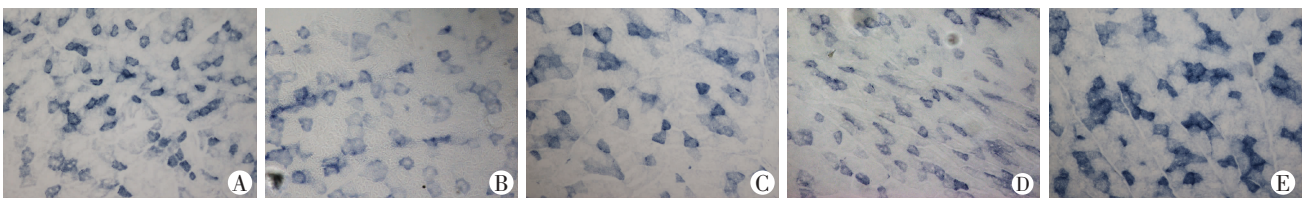
A:健康对照组;B:按摩7 d对照组;C:按摩7 d组;D:按摩14 d对照组;E:按摩14 d组

图1 兔股四头肌损伤组织的病理学变化 (HE ×200)



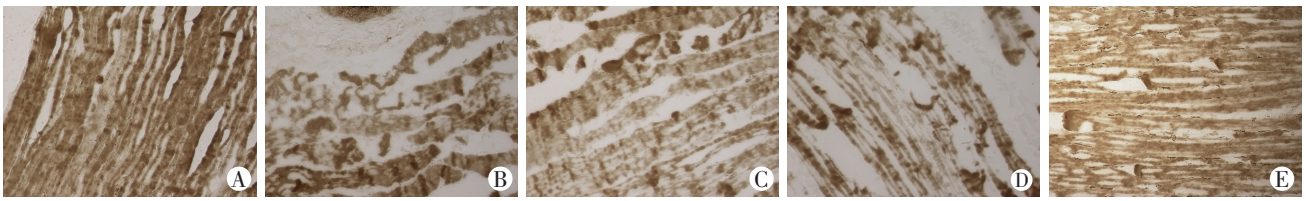
A:健康对照组;B:按摩7 d对照组;C:按摩7 d组;D:按摩14 d对照组;E:按摩14 d组

图2 兔股四头肌损伤组织的超声影像学观察



A:健康对照组;B:按摩7 d对照组;C:按摩7 d组;D:按摩14 d对照组;E:按摩14 d组

图3 按摩对兔股四头肌SDH活性的影响 (硝基蓝四唑法 ×200)



A：健康对照组；B：按摩7 d对照组；C：按摩7 d组；D：按摩14 d对照组；E：按摩14 d组

图4 按摩对兔股四头肌 K^+-Na^+-ATPase活性的影响 （Wachstein-Meisel镁激活法 ×200）

3 讨论

既往研究认为，SDH和K^+-Na^+-ATPase活性与骨骼肌损伤及有氧代谢活动关系密切。中医按摩促进受损骨骼肌的修复得到了临床证实，但修复机制仍待认识。

本研究发现：兔股四头肌经外力损伤后，SDH和K^+-Na^+-ATPase活性降低，且损伤越重，酶活性越低；随着按摩对股四头肌修复及其功能恢复，SDH和K^+-Na^+-ATPase活性逐渐恢复。这一结果有力地支持按摩有助于肌组织损伤康复的临床观察，并得到了其他类似研究结果的支持[4]。正常对照组SDH和K^+-Na^+-ATPase活性处于较高水平，损伤后7d，肌细胞酶活性降到最低，这提示肌组织损伤后，能量代谢从有氧代谢向无氧酵解的改变，无氧酵解导致的能量供应不足和代谢废产物积聚使肌组织细胞功能障碍，变性、坏死。研究结果显示，自然恢复7d与14d Ⅰ型肌纤维截面积降低，SDH着色倾向于肌纤维的外周，许多肌纤维因萎缩、退变而不着色；伤后自然恢复21d，肌纤维萎缩、退变才得到初步缓解。按摩治疗7d后，SDH和K^+-Na^+-ATPase活性便有所上升；按摩治疗14d后，SDH和K^+-Na^+-ATPase活性进一步增强，并逐渐接近正常，表明细胞有氧代谢较活跃。这提示按摩治疗可改善骨骼肌损伤引起的能量代谢异常。我们的研究进一步得到了体外细胞研究结果的支持，即对体外培养细胞施加周期性的力学作用，可刺激细胞K^+-Na^+-ATPase活性，增强细胞膜的稳定性和离子稳态[11]。

本研究还证实按摩刺激后，受损肌纤维组成发生变化，肌纤维的数目、直径和深染肌纤维目标面积百分比有显著的增加。自然恢复组受损肌纤维直径减小，骨骼肌发生明显的萎缩性变化。当肌纤维发生萎缩又无足够的再生可能时，受损肌纤维变小、变细并坏死[12]。这些结果表明按摩刺激能够减轻或防止受损兔股四头肌发生的萎缩性变化，阻止骨骼肌的变性坏死，进而促进肌纤维修复。

按摩是否直接或者如何调控肌细胞损伤修复相关的酶活性、基因表达，亟待进一步研究。综上所述，本研究从分子生物角度，初步揭示按摩治疗可通过促进肌细胞有氧代谢有关酶的活性，加速受损肌组织的修复与损伤康复，为阐述祖国传统按摩治疗方法对骨骼肌损伤修复的机制提供了有价值的实验依据。

参考文献：

[1] Silveira P C, Silva L A, Fraga D B, *et al*. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy [J]. J Photochem Photobiol B, 2009, 95(2): 89－92.

[2] Clausen T. Na^+-K^+ pump stimulation improves contractility in damaged muscle fibers[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1066: 286－294.

[3] Silva L A, Pinho C A, Scarabelot K S, *et al*. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle[J]. Eur J Appl Physiol, 2009, 105(6): 861－867.

[4] Rietbroek N J, Dingboom E G, Schuurman S O, *et al*. Effect of exercise on development of capillary supply and oxidative capacity in skeletal muscle of horses[J]. Am J Vet Res, 2007, 68(11): 1226－1231.

[5] Shu B, Shen Y, Wang A M, *et al*. Histological, enzymohistochemical and biomechanical observation of skeletal muscle injury in rabbits[J]. Chin J Traumatol, 2007, 10(3): 150－153.

[6] 邝勇，黄跃生. 微管损伤与缺氧心肌细胞线粒体损害的关系研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(15)：1547－1549.

[7] 田惠林，赵斌，刘玉倩，等. 定量按摩对肌肉损伤修复作用的形态学和生物力学研究[J]. 河北师范大学学报：自然科学版，2005，29(2)：213－216.

[8] 汪光胜. 运动性疲劳恢复的中医按摩探索[J]. 湖北体育科技，2008，27(3)：270－271，257.

[9] 景连喜，石玉恒，冯建玲，等. 电按摩联合球后注射血管扩张剂治疗视神经萎缩[J]. 国际眼科杂志，2007，7(3)：837－839.

[10] 南丕祥. 浅谈按摩手法的力量性、时间性、准确性、技巧性[J]. 中国新医学论坛，2008，8(12)：66－67.

[11] Yuan X, Lin Z, Luo S, *et al*. Effects of different magnitudes of cyclic stretch on Na^+-K^+-ATPase in skeletal muscle cells *in vitro*[J]. J Cell Physiol, 2007, 212(2): 509－518.

[12] Wust R C, Gibbings S L, Degens H. Fiber capillary supply related to fiber size and oxidative capacity in human and rat skeletal muscle[J]. Adv Exp Med Biol, 2009, 645: 75－80.

（**收稿**：2011-06-10；**修回**：2011-07-19）

（编辑 王小寒）