

超早期推拿对骨骼肌急性钝挫伤模型大鼠肌细胞膜修复相关蛋白 dysferlin 表达的影响*

郭全虎¹ 唐成林^{1,2} 黄思琴¹ 曹 净¹ 高睿琦¹ 罗 翱¹ 赵丹丹¹ 张安宁¹

摘要

目的:观察超早期推拿对骨骼肌急性钝挫伤模型大鼠肌细胞膜修复相关蛋白 dysferlin 表达的影响,探寻 dysferlin 在骨骼肌钝挫伤肌细胞膜修复中的作用机制。

方法:SD大鼠55只,随机分为正常对照组(n=5)、自然恢复组(n=25)、推拿组(n=25)。根据推拿治疗的天数计时,自然恢复组和推拿组分别在1d、2d、3d、5d、7d五个时间点处死,每亚组每个时间点5只,在腓肠肌标记的区域内取肌肉组织,HE观察组织的形态变化,运用Western blot检测蛋白 dysferlin 的表达情况,并进行统计学分析。

结果:HE结果显示,与正常对照组相比,骨骼肌钝挫伤后,1d和2d肌纤维出现肿胀;3d出现炎性细胞浸润且自然恢复组比推拿组更加严重;5d炎性细胞浸润更加明显;7d推拿组炎性细胞较5d明显减少,结缔组织形成较少,7d自然恢复组有大量的结缔组织填充在肌纤维之间。WB结果显示:dysferlin在模型组中比在正常对照组中的表达明显增多;各个相应时间点推拿组较自然恢复组表达量明显增多($P < 0.05$),且随着时间的推移 dysferlin 在推拿组各亚组、自然恢复组各亚组中的表达量呈逐渐上升趋势。

结论:在骨骼肌急性钝挫伤模型大鼠腓肠肌修复过程中,超早期推拿可增加膜修复蛋白 dysferlin 的表达,促进破裂的肌细胞膜及时修复,可能有利于损伤肌细胞的修复,从而帮助受损的骨骼肌修复。

关键词 推拿;骨骼肌钝挫伤;膜修复;Ca²⁺

中图分类号:R244.1, R685 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-02-0151-07

The mechanism of ultra-early massage on membrane repair in acute skeletal muscle injury/GUO Quan-hu, TANG Chenglin, Huang Siqin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(2): 151—157

Abstract

Objective: To observe the effect of ultra-early massage on the expression of membrane repair associated protein dysferlin in rats with acute skeletal muscle injury, and demonstrate a possible mechanism how ultra-early massage protects myocytes from skeletal muscle contusion.

Method: Fifty-five SD rats were randomly divided into normal control group (n=5), natural recovery group (n=25) and massage group (n=25). Rats in the natural recovery groups and the massage groups were sacrificed after treatment for 1d, 2d, 3d, 5d, 7d. There were 5 rats in subgroups at each time point. Muscle tissue was harvested in the region of the marked muscle. Morphological changes in the skeletal muscle tissues were observed using HE stain. The expression level of dysferlin was detected by Western blot.

Result: HE: Compared with the normal control group, muscle fiber blunt swelling appeared at 1d and 2d after skeletal muscle contusion. Inflammatory cells of the natural recovery group was more than that of the massage group at 3d. More inflammatory cells were observed at 5d. Inflammatory cells in 7d massage group significantly decreased compared with that in 5d massage group. Less extensive fibrosis was observed in the massage group than the natural recovery group at 7d. WB: The expression level of dysferlin in the model groups was

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.02.006

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273870);重庆市体育局科研项目(B201409)

1 重庆医科大学,重庆,400016; 2 通讯作者

作者简介:郭全虎,男,硕士研究生; 收稿日期:2016-11-16

significantly higher than that in the normal control group. The expression of dysferlin in the massage group was significantly higher than that in the natural recovery group at each corresponding time ($P < 0.05$). The level of dysferlin in the subgroups of the massage group and the natural recovery group presented gradual increase with the time goes on.

Conclusion: In the course of acute contusion, ultra-early massage can increase the expression of dysferlin, promote the timely repair of ruptured membrane and decrease the muscle injury, which facilitate the repair of damaged skeletal muscle.

Author's address Chinese Medicine College, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016

Key word massage; acute skeletal muscle injury; membrane repair; dysferlin; Ca^{2+}

骨骼肌损伤的主要原因包括钝挫伤、劳损和撕裂伤,其中钝挫伤和劳损大约占运动相关损伤的90%,其中有超过60%属于钝挫伤,并且高发部位在四肢部和臀部^[1]。任玉衡等^[2]在对49种运动项目、6810名优秀运动员运动创伤流行病学调查结果显示:肌肉损伤占损伤总数的51.23%;急性损伤占21.10%,急性转慢性损伤占45.95%。骨骼肌钝挫伤后主要表现为损伤局部充血,部分肌纤维断裂、扭曲,明显肿胀,横纹不清楚,肌丝紊乱,肌细胞膜破裂^[3]。肌细胞膜是肌细胞维持完整性的关键所在,也是维持细胞内外环境稳态的天然屏障。此外,骨骼肌的再生能力很弱,其再生因肌细胞膜是否存在及肌纤维是否完全断裂而有所不同,肌细胞膜未被破坏或损伤不太重时,肌原纤维仅发生部分坏死^[4],肌细胞膜破裂严重或破裂后不能及时修复都会导致肌细胞死亡。因此,膜修复是骨骼肌细胞在生理和各种病理性膜损伤后存活的必要条件。骨骼肌细胞膜破裂后,若能在最短的时间完成膜修复,就能减少骨骼肌损伤早期的炎症反应,减轻损伤后的炎症反应中对受损肌细胞的吞噬,从而减少因损伤而裂解的肌细胞数目,抑制瘢痕组织的形成^[5],促进骨骼肌完全再生,使损伤的骨骼肌尽可能恢复到未损伤时的状态,也可防止骨骼肌急性损伤转化为慢性损伤,这将大大地提高患者的生存、运动质量。因此,骨骼肌膜修复逐渐成为了一个人们感兴趣且深入研究的课题,但国内关于推拿对骨骼肌损伤后膜修复的研究少之又少。

在细胞膜损伤修复过程中, dysferlin 发挥着至关重要的作用; dysferlin 是触发囊泡融合的 Ca^{2+} 传感器^[6], dysferlin 的缺失将导致依赖 Ca^{2+} 的膜修复缺陷^[7]。dysferlin 是囊泡融合蛋白 ferlin 家族的一个成

员, 230kDa, 具有7个串联的C2结构域, 具有可与 Ca^{2+} 调节的磷脂或蛋白结合的基序^[8]。dysferlin 在骨骼肌和心肌、肾脏、胎盘、肺、大脑等各种组织中都有表达, 但是在骨骼肌和心肌中高度表达。

我们前期研究发现, 推拿可以通过改变骨骼肌中损伤生长因子 bFGF、IGF- I 与致瘢痕因子 TGF- β 1、COL- I、自由基相关酶与成肌调节因子^[9]的表达量, 改善 VEGF 活性及损伤区的血供^[10], 影响炎症的发展及肌卫星细胞增殖^[11]、肌纤维再生^[12]等来促进骨骼肌损伤的修复, 其中田源等^[13]研究发现在骨骼肌损伤后的7—21d 当中, 膜特异性修复相关蛋白 dysferlin 和 Annexin A1 的蛋白表达量增高, 推拿能够下调损伤骨骼肌中该蛋白表达, 并增强两种蛋白的相互绑定作用, 提高其与细胞膜的融合, 从而促进肌细胞膜的修复。由于上述研究大都集中在骨骼肌钝挫伤7d 后推拿的作用机制, 未研究1—7d 超早期推拿是否能促进钝挫伤后的骨骼肌运动功能的恢复, 特别是能否促进骨骼肌细胞膜的修复。本研究主要观察1—7d 超早期推拿对骨骼肌急性钝挫伤模型大鼠腓肠肌内膜修复相关蛋白 dysferlin 表达的影响, 探寻1—7d 推拿对上述蛋白在膜修复机制中所发挥的作用, 为深入探明推拿治疗骨骼肌钝挫伤的作用机制奠定基础, 可进一步确定在骨骼肌急性钝挫伤临床治疗中推拿介入的最佳时机, 为推拿临床治疗提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康的成年 SPF 级雄性 SD 大鼠 55 只, 体重 $(300 \pm 30)\text{g}$, 重庆医科大学实验动物中心提供, 动物许可证号: SYXK(渝)2012-0001。先随机抽取正常

对照组($n=5$),再将剩余的50只大鼠在运用自制打击装置制造腓肠肌钝挫伤模型后(造模失败大鼠剔除后补入),用随机数字表法分成自然恢复组($n=25$)和推拿组($n=25$),造模成功时记为0d,不干预。根据推拿治疗时间的不同,自然恢复组和推拿组又分别分为1d组、2d组、3d组、5d组、7d组5个亚组,每个亚组5只。

1.2 主要试剂和仪器

抗dysferlin抗体(Santa Cruz公司,美国);免疫印迹试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);多聚甲醛(Sigma);石蜡切片机;Bio-Rad标准电泳装置;自制钝挫伤模型打击装置。

1.3 模型制备

参照Markert^[14]的方法,设计出钝挫伤模型的打击装置。先用乙醚麻醉大鼠,剃去双下肢毛发;再将大鼠俯卧、右下肢伸膝屈踝约90°外展位充分暴露腓肠肌;然后将打击装置的打击头紧贴腓肠肌肌腹中段;最后利用重物自由落体运动,行1次打击肌腹,造成大鼠腓肠肌急性闭合性钝挫伤。打击参数^[15]:220g重物,重力2.16N,自由下落110cm,打击的面积约1cm²,打击的动能2.37J。造模成功的标准:①望诊右后肢打击部位皮肤无破损,皮下有出血、有瘀斑,与左后肢相比有明显肿胀;右后肢活动不利。②切诊打击部位有硬结肿块,胫腓骨无骨折。

1.4 治疗方法

推拿组在24h后,开始推拿治疗。先用自制的头套将大鼠的头部套住,待其情绪稳定后,由专人在损伤局部运用拇指揉法进行推拿干预。标准:推拿时以大鼠刚好不因疼痛而乱动乱叫等的安静状态为该只接受治疗的大鼠的最佳刺激量,如果治疗期间大鼠乱动可待其安静后继续推拿;推拿手法缓和,均匀持久,1300次,120—140次/min,每次推拿操作约10min,每天治疗1次。自然恢复组仅将头套套上,不做任何干预。自然恢复组和推拿组各亚组分别于损伤后1d、2d、3d、5d、7d取材、分装并做适当保存,以备检测。

1.5 评定方法

1.5.1 HE染色:从多聚甲醛中取出组织,首先酒精梯度脱水,二甲苯透明,再石蜡包埋;然后用石蜡切片机切片,脱蜡,染色;最后将制作好的切片放于光

学显微镜下进行观察并采集图像。

1.5.2 蛋白质印记法(Western-Blot)检测膜修复相关蛋白dysferlin的表达量:从-80℃冰箱中取出冻存的腓肠肌组织样本,剪取约30mg,放入液氮,速冻后反复研磨。加入适量的蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂,充分离心,然后吸取上清液并测定蛋白浓度。将上清液煮沸3min。根据蛋白测定结果加样,SDS-PAGE恒压电泳2h,PVDF转膜,5%的脱脂奶粉室温封闭2h,用TBST洗膜3次之后滴加dysferlin抗体、4℃过夜,洗膜3次,加二抗室温孵育2h。洗膜3次,加ECL显色3min,X线胶片曝光。以GDPH为内参照蛋白,采用image J软件进行图像分析。

1.6 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,分析结果以均数±标准差表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 HE染色

Con正常组大鼠腓肠肌肌纤维横切面为多边形,呈粉红色,细胞核大多为椭圆形且位于肌纤维的边缘。1d MT和1d NR组肌纤维较正常组明显肿胀,推拿组和自然恢复并无明显差异。3d组肌纤维横切面与正常组相近,3d MT推拿组和3d NR自然恢复组均观察到有炎性细胞浸润;3d推拿组与自然恢复组相比,炎性细胞浸润较少。

5d MT和5d NR组均观察到大量的炎性细胞浸润,已有结缔组织生成。7d MT推拿组与7d NR自然恢复组相比,炎性细胞明显较少,推拿组结缔组织形成较少,自然恢复组大量的结缔组织填充在肌纤维之间。见图1。

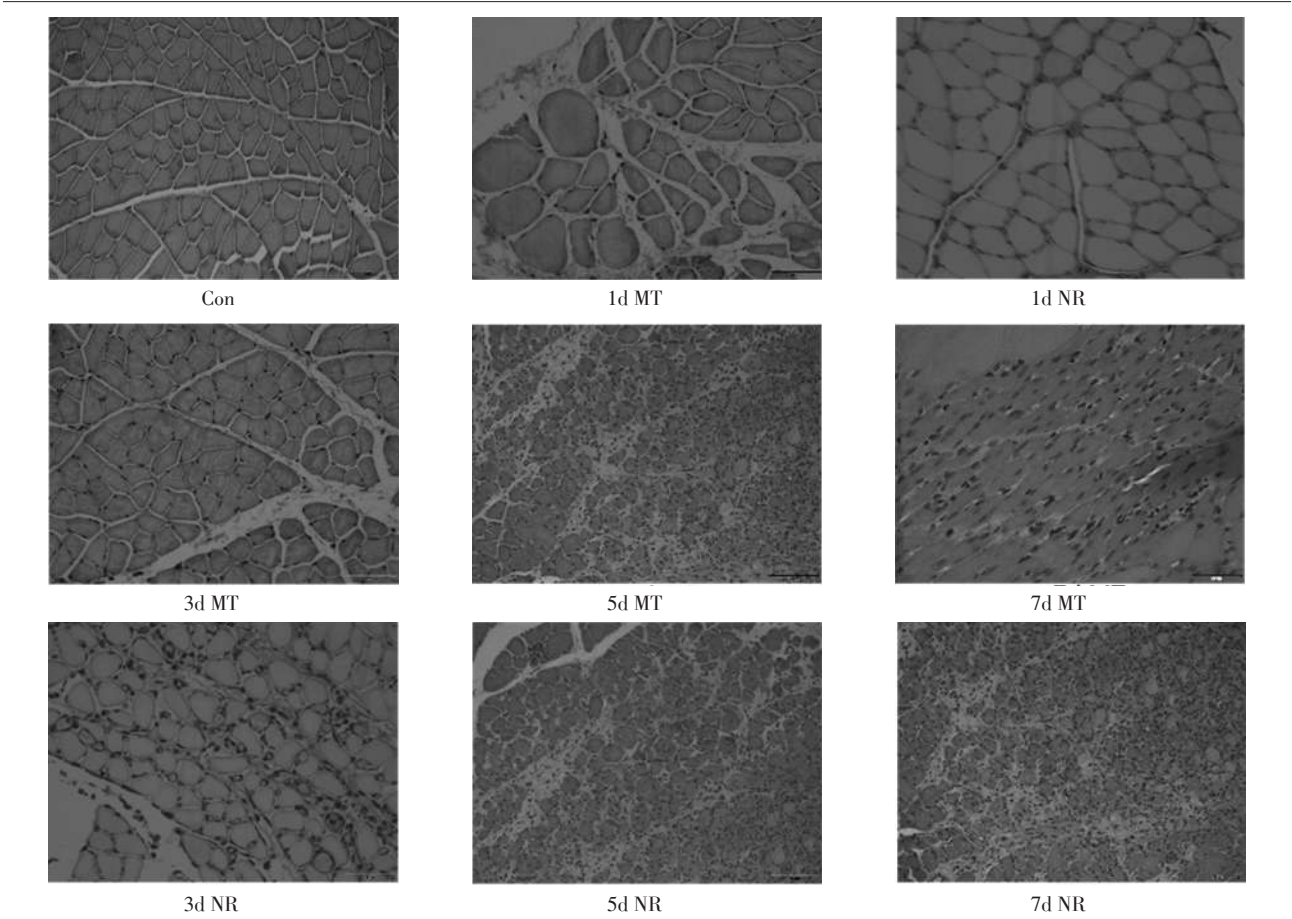
2.2 Western-Blot

dysferlin在Con正常对照组中表达较少;骨骼肌钝挫伤后,dysferlin的表达量在各个时间点随着时间的增长而增长,在推拿组各亚组、自然恢复组各亚组中其表达量呈逐渐上升趋势。1d、2d、3d、5d、7d各个时间点MT推拿组较相应NR自然恢复组表达量增多,均有明显差异($P<0.05$)。见图2。

3 讨论

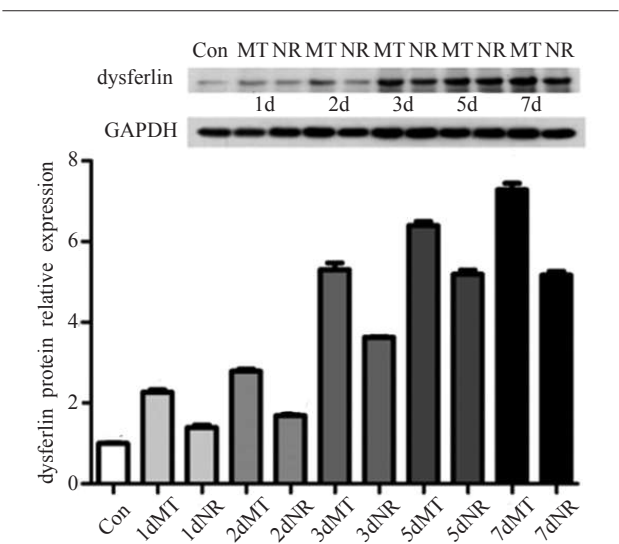
1周以内的骨骼肌钝挫伤,属于直接暴力所导

图1 损伤大鼠骨骼肌组织形态改变图 (HE染色,×200)



注:Con:正常对照组;MT:推拿组;NR:自然恢复组

图2 dysferlin 蛋白相对表达含量



致的急性、闭合性外伤,损伤局部会有红或青紫、肿痛、肢体活动不利等一系列的筋伤初期瘀血凝滞的病理变化。《医宗金鉴》有云“夫皮不破而肉损者,多有瘀血”、“按其经络,以通郁闭之气,摩其雍聚,以散郁结之肿”。《素问·举痛论》“按之则气血散,故按之痛止”、“按之则热气至”。这些都说明推拿这种经过了几千年临床实践所验证的治疗手段在治疗筋伤等各种疾病方面具有至关重要的作用。传统中医理论认为,推拿具有疏通经络、舒和筋脉、行气活血、调神驭形等作用^[16]。现代医学认为,推拿是通过机械力直接作用于局部、改善局部组织生化环境、促进血液循环加速代谢、调节肌肉支配神经的兴奋性和调畅情志放松精神等机制而产生治疗效应的一种物理治疗方法^[17]。骨骼肌损伤急性期应以保护、休息、冷疗、加压包扎、抬高伤肢,即“PRICE”为治疗原则;受

伤24h后,可按摩、热敷和理疗^[18]。王念宏等^[19]认为早期推拿可促进全膝关节置换TKA患者恢复。吴志远等^[20]认为早期综合推拿手法可缓解TKA术后患者的疼痛,改善膝关节的活动度,减少下肢静脉血栓的形成,促进术后骨骼肌修复。胡军等^[21]通过对比早期推拿治疗和常规推拿治疗对兔腓肠肌急性挫伤模型的治疗作用发现:早期手法对卫星细胞数增加作用明显,有助于骨骼肌恢复。吴云川等^[22]通过临床和动物实验证明早期推拿可调节CK、细胞因子IL-2、6、8、PGE2等来促进延迟性肌肉酸痛的筋伤的恢复。骨骼肌钝挫伤初期应施以活血化瘀、消肿止痛的理筋手法。揉法是推拿治疗筋伤最常用的理筋手法之一,具有放松肌肉、缓解症状、活血化瘀、消肿止痛的功效,适用于肢体的各部位损伤等。因此,使用揉法作为骨骼肌钝挫伤初期的推拿治疗手法符合中医辨证论治的基本原则。

图1显示,1d MT和1d NR肌纤维较正常组明显肿胀,1d MT大部分肌纤维较1d NR肌纤维肿胀程度要轻,3d MT比3d NR肌纤维横切面更接近于正常组,说明推拿有助于减轻肌纤维的肿胀程度。7d MT推拿组与7d NR自然恢复组相比,炎性细胞明显较少,推拿组结缔组织形成较少,自然恢复组大量的结缔组织填充在肌纤维之间。这表明,骨骼肌钝挫伤初期进行适当的推拿,能够在一定程度上抑制炎症反应、抑制结缔组织的生成,从而减少瘢痕组织的形成,促进骨骼肌钝挫伤模型大鼠的腓肠肌的修复。WB结果显示推拿组dysferlin蛋白的表达量有所增加,并且dysferlin在模型组中比正常对照组中的表达明显增多,各个相应时间点推拿组与自然恢复组相比表达量明显较多,且随着时间的推移dysferlin在推拿组各亚组、自然恢复组各亚组中其表达量呈逐渐上升趋势。这表明,骨骼肌钝挫伤初期适当的推拿可以促进骨骼肌中dysferlin的表达。研究表明^[6],dysferlin是触发囊泡融合的Ca²⁺传感器,在细胞膜损伤修复过程中发挥着至关重要的作用。dysferlin在骨骼肌和心肌、肾脏、胎盘、肺、大脑等各种组织中都有表达,但是在骨骼肌和心肌高度表达。我们推测,推拿可以通过调节dysferlin的表达,及时地修复钝挫伤所造成的肌细胞膜的损伤,从而抑制炎症反应、抑制结缔组织的生成,促进骨骼肌

损伤的修复。

推拿^[17]等机械刺激可以激活细胞内的很多条信号通路,而细胞膜上Ca²⁺通道被认为是激活这些信号通路的关键因素之一。推拿可引发Ca²⁺浓度改变,通过Ca²⁺诱导Ca²⁺释放机制——CICR机制诱发Ca²⁺波动,从而发挥推拿的治疗作用。但CICR机制之后的具体的下游修复机制并不明确,膜修复机制就是这些下游修复机制中的一个。众所周知,细胞膜是维持细胞内外环境稳态的一种天然屏障,也是维持细胞内Ca²⁺浓度的关键因素。膜修复是骨骼肌细胞在生理和各种病理性膜损伤后可以存活的必要条件。在许多哺乳动物体内都存在很保守的、可以闭合膜损伤的细胞膜修复机制,例如动物细胞可以在打孔实验(>1000μm²)中存活^[6]。目前,大多数研究认为,细胞膜损伤后,胞外的Ca²⁺快速的内流,可触发多种细胞内的依赖Ca²⁺的囊泡胞吐作用,从而完成膜损伤位点的修复,即膜补丁修复机制。该假说认为,膜破裂后的Ca²⁺内流引起损伤位点囊泡—囊泡和囊泡—质膜融合,最终使大量的囊泡聚集于膜损伤位点,通过囊泡—囊泡和囊泡—质膜融合在破损处形成一个新的像补丁一样的膜,闭合膜损伤位点。在血管内皮细胞^[23]、海胆卵^[24]和神经轴突^[25]的膜损伤位点,依赖Ca²⁺的大囊泡会非常迅速的聚集。这些现象也表明:Ca²⁺激发的囊泡的转移和囊泡的融合是在细胞膜损伤后Ca²⁺内流后发生的。最近的研究结果显示,dysferlin缺失的将导致依赖Ca²⁺的膜修复缺陷^[7,26]。这说明:骨骼肌钝挫伤导致肌细胞膜损伤破裂,肌细胞外的Ca²⁺大量内流,激活了肌细胞内的囊泡,激活后的囊泡迅速地聚集到膜损伤位点,完成肌细胞膜的补丁修复;dysferlin缺失会导致膜修复的缺陷,说明dysferlin是触发囊泡融合的Ca²⁺感受器,当肌细胞内的Ca²⁺浓度发生变化时,dysferlin就会被激活。因此,dysferlin在肌细胞膜修复过程中发挥着至关重要的作用。

dysferlin还可以通过与其他蛋白相互作用参与细胞膜的修复。膜损伤后Ca²⁺通过膜损伤位点涌入,激活u-calpain、m-calpain^[27]等钙蛋白酶,并形成强而持久的去极化型VGCC(L-type voltage gated calcium channel,特定的Ca²⁺信号通路L型VGCC)。dysferlin被激活的u-calpain、m-calpain等

钙蛋白酶水解,释放一个C-末端片段,形成 mini-dysferlin C72^[28];在L-型 VGCC 协调下,富含 mini-dysferlin C72 的细胞质中的小泡迅速招募到细胞膜,与 mitsugumin 53(MG53/trim72)修饰的细胞膜成分相互融合;mini-dysferlin C72 利用它的 C2 结构域与 Ca^{2+} 依赖蛋白或磷脂结合,并启动 Ca^{2+} 依赖阶段的 MG53 在损伤处的募集;最终,mini-dysferlin C72 和 MG53 形成一个复杂的结构,在损伤位点突出地标记出暴露出来的磷脂,然后嵌入和固定到膜损伤位点,完成补丁修复。在培养的骨骼肌细胞中,dysferlin 可以与 MG53 相互作用,其中 MG53 是 dysferlin 能够转运到膜损伤部位所必需的协同蛋白^[29]。

细胞膜损伤后, Ca^{2+} 内流,dysferlin 也会与膜联蛋白 Annexin A1 和 A2 相互作用^[22]。在 dysferlinopathy 的患者中,Annexin A1 和 A2 的表达较对照组升高,并且膜联蛋白的表达水平量与临床严重程度评分呈现显著相关^[30]。这些数据表明,在骨骼肌 dysferlin 介导膜修复过程中,Annexin A1 和 A2 也发挥了作用。事实上,最近在 HeLa 细胞中已经证实膜修复需要 Annexin A1^[31]。

综上所述,骨骼肌钝挫伤造成肌细胞膜损伤后,胞外的 Ca^{2+} 快速地内流,可触发多种肌细胞内的依赖 Ca^{2+} 的囊泡胞吐作用来完成膜修复。肌细胞膜损伤后, Ca^{2+} 内流,激活 u-calpain、m-calpain 等钙蛋白酶,dysferlin 被激活的 u-calpain、m-calpain 等钙蛋白酶水解,释放一个C-末端片段,形成 mini-dysferlin C72,在L-型 VGCC 协调下与 MG53 修饰的破损处的肌细胞膜相互融合,形成“补丁”修复肌细胞膜损伤位点;与此同时,肌细胞膜损伤后, Ca^{2+} 内流等细胞内环境发生变化,启动 Ca^{2+} 依赖途径的包含有 MG53 的囊泡在肌细胞膜损伤处的募集,形成 MG53 聚合物^[32],参与肌细胞膜修复;细胞膜损伤后, Ca^{2+} 内流,dysferlin 与 Annexin A1 和 A2 协同作用,促进骨骼肌细胞膜的修复;除此之外,体外实验表明,dysferlin 不足会延误成肌细胞融合/纺锤体微管,这表明 dysferlin 也可通过参与肌肉分化/再生来促进骨骼肌损伤后的修复^[33]。因此,我们推测,超早期推拿可以增加骨骼肌钝挫伤模型大鼠腓肠肌中 dysferlin 的表达,来促进骨骼肌的修复。一方面,dysferlin 可在 MG53、Annexin A1、Annexin A2 等膜修复相关

蛋白的协同作用下促进了 dysferlin 肌细胞膜的修复,从而促进了骨骼肌钝挫伤的修复;另一方面,dysferlin 可通过参与肌肉分化/再生来促进骨骼肌损伤后的修复^[33]。这可能就是推拿具有疏通经络、舒和筋脉、行气活血的作用的内在机制,也是推拿治疗骨骼肌钝挫伤具有疗效的内在基础保障。中医骨伤科常规治疗认为筋伤 24—48h 内禁止推拿,但是从本研究结果来看,1—7d 超早期推拿可以促进骨骼肌损伤细胞膜的修复,因此,我们探究 1—7d 超早期推拿对 dysferlin 在骨骼肌钝挫伤后的表达影响,及其 dysferlin 在骨骼肌细胞膜修复中的作用机制具有重要的意义。

参考文献

- [1] Kearns SR, Daly AF, Sheehan K, et al. Oral vitamin C reduces the injury to skeletal muscle caused by compartment syndrome[J]. J Bone Joint Surg Br, 2004, 86(6):906—911.
- [2] 任玉衡,史和福,敖英芳,等.优秀运动员的运动创伤流行病学调查[J].中国运动医学杂志,2000,19(4):377—386.
- [3] 陈世益.骨骼肌损伤后促进愈合的研究[D].上海:复旦大学,2002.
- [4] 张静.按摩对兔骨骼肌挫伤后修复作用的研究[D].河北:河北师范大学,2003.
- [5] 王荣国.电针促进家兔骨骼肌钝器伤后再生的作用和机制研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [6] Han R, Campbell KP. Dysferlin and muscle membrane repair[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(4):409—416.
- [7] Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy[J]. Nature, 2003, 423(6936):168—172.
- [8] Lek A, Evesson FJ, Sutton RB, et al. Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair[J]. Traffic, 2012, 13(2):185—194.
- [9] 谢辉.在骨骼肌损伤修复过程中按摩对自由基相关酶和成肌调节因子的影响研究[D].重庆:重庆医科大学,2014.
- [10] 谢辉,唐成林,陈晓琳,等.按摩通过改善 VEGF 活性及血供促进兔骨骼肌损伤修复[J].中国老年学杂志,2014,12(24):6984—6986.
- [11] 杨辉,常青,唐成林,等.跑台运动训练与按摩联合作用对大鼠骨骼肌急性损伤修复过程中炎症的发展及肌卫星细胞增殖的影响[J].体育科学,2015,35(03):51—58.
- [12] 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(02):171—175.
- [13] 田源,唐成林,黄思琴,等.按摩对大鼠骨骼肌急性钝挫伤后膜

- 修复蛋白 dysferlin 和 annexin A1 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(8): 841—846.
- [14] Markert CD, Merrick MA, Kirby TE, et al. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2005, 86(7): 1304—1310.
- [15] Shu B, Yang Z, Li X, et al. Effect of different intensity pulsed ultrasound on the restoration of rat skeletal muscle contusion[J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62(2): 329—336.
- [16] 李晓丽, 王小平. 《内经》推拿疗法溯源[J]. 山东中医杂志, 2014, (10): 828—830.
- [17] 门志涛, 张宏. 中医推拿舒筋作用机制研究[J]. 按摩与导引, 2008, 24(03): 10—13.
- [18] 李俊华. 针刺对大鼠骨骼肌挫伤后组织修复的影响[D]. 北京: 北京体育大学, 2011.
- [19] 王念宏, 严隽陶, 孙武权, 等. 早期推拿对全膝关节置换患者术后股四头肌表面肌电影响的随机对照研究[J]. 中西医结合学报, 2012, (11): 1247—1253.
- [20] 吴志远. 早期综合推拿手法对全膝关节置换术后康复及预防下肢深静脉血栓形成的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2014.
- [21] 胡军, 张喜林, 严隽陶, 等. Effects of massage on satellite cells of acute contusive skeletal muscles[J]. 针灸推拿医学(英文版), 2007, 5(1): 6—9.
- [22] 吴云川. 推拿对延迟性肌肉酸痛的疗效评价和机理研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [23] Miyake K, McNeil PL. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption[J]. J Cell Biol, 1995, 131(6 Pt 2): 1737—1745.
- [24] McNeil PL, Vogel SS, Miyake K, et al. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane[J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt 11): 1891—1902.
- [25] Eddleman CS, Ballinger ML, Smyers ME, et al. Endocytotic formation of vesicles and other membranous structures induced by Ca^{2+} and axolemmal injury[J]. J Neurosci, 1998, 18(11): 4029—4041.
- [26] Lennon NJ, Kho A, Bacskaï BJ, et al. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing[J]. J Biol Chem, 2003, 278(50): 50466—50473.
- [27] Mellgren RL, Miyake K, Kramerova I, et al. Calcium-dependent plasma membrane repair requires m- or mu-calpain, but not calpain-3, the proteasome, or caspases[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1793(12): 1886—1893.
- [28] Lek A, Evesson FJ, Lemckert FA, et al. Calpains, cleaved mini-dysferlin C72, and L-type channels underpin calcium-dependent muscle membrane repair[J]. J Neurosci, 2013, 33(12): 5085—5094.
- [29] Cai C, Masumiya H, Weisleder N, et al. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(1): 56—64.
- [30] Cagliani R, Magri F, Toscano A, et al. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies[J]. Hum Mutat, 2005, 26(3): 283.
- [31] McNeil AK, Rescher U, Gerke V, et al. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair[J]. J Biol Chem, 2006, 281(46): 35202—35207.
- [32] de Luna N, Gallardo E, Soriano M, et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro"[J]. J Biol Chem, 2006, 281(25): 17092—17098.
- [33] 万婵娟, 王玉娟. TRIM72 蛋白结构及功能研究进展[J]. 生物技术, 2015, 25(01): 93—97.