

冲击波对兔复合肌肉动作电位及肌组织形态学的影响*

徐春燕¹ 陈禹彤¹ 欧吉兵¹ 肖熠斐¹ 刘 锋¹ 姚黎清^{1,2}

摘要

目的:评估单侧小腿后方放散式体外冲击波(radial extracorporeal shock wave treatment,rESWT)处理后兔的双侧腓肠肌复合肌肉动作电位和肌组织形态学。

方法:体重 2 ± 0.2 kg雄性新西兰兔63只,其中3只兔进行预实验确定rESWT强度,对剩余60只兔左小腿三头肌肌腹最粗大的位置稍偏外侧行强度1.5bar,频率10Hz的2000次冲击。分为6组,在放散式体外冲击波处理当天和处理后第1、2、4、6、8周在麻醉情况下用日本光电MEB-9100K肌电图仪记录双侧腓肠肌外侧头复合肌肉动作电位,比较两侧波幅、潜伏期,每组抽取一个样本对其双侧腓肠肌外侧头行重复电刺激,记录不同频率刺激后波幅衰减情况。肌电图检查完成立即取下双侧腓肠肌外侧头肌组织,冰冻切片后进行HE染色,观察肌肉组织形态学变化。

结果:前三组实验兔(处理当天和处理后第1、2周)实验侧动作电位波幅降低,与对照侧比较差异显著($P < 0.05$),后三组实验兔实验侧动作电位波幅与对照侧无明显差异。所有实验兔双侧动作电位潜伏期差异不明显,HE染色未见肌组织形态学明显异常。

结论:运用rESWT对兔小腿三头肌肌腹最肥大处行强度1.5bar,频率10Hz的2000次冲击可降低其复合肌肉动作电位的波幅但作用持续时间较短且对肌组织形态学不会产生较大影响。

关键词 放散式体外冲击波;复合肌肉动作电位;HE染色

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2018)-09-1019-05

Effects of shock wave on compound muscle action potential and muscle morphology in rabbits/XU Chun-yan,CHEN Yutong,OU Jibing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(9): 1019—1023

Abstract

Objective:Evaluate the compound muscle action potential and the morphology of the muscle in the bilateral gastrocnemius after unilateral radial extracorporeal shock wave therapy.

Method:Totally 63 male New Zealand rabbits with weight in 2 ± 0.2 kg were used in this study. Three rabbits were pretested to determine the radial extracorporeal shock wave intensity. Two thousand shock waves at an energy flux density of 1.5bar and the frequency of 10Hz were applied to the slightly outside of the most bulky position in the left calf muscles.Divided into six groups,the compound muscle action potential of bilateral triceps surae was recorded by Japanese photoelectric MEB-9100K electromyogram instrument on the day of radial extracorporeal shock wave treatment and 1,2,4,6,8 weeks after radial extracorporeal shock wave treatment. The amplitudes and latencies were compared. One rabbit in each group was extracted by repeated electrical stimulation of its bilateral triceps surae. The amplitude decline after different frequency stimulation was recorded. Immediately after EMG was completed, HE staining was performed and the morphological changes of muscle were observed.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.09.003

*基金项目:云南省教育厅科学研究基金项目(2015C022Y)

1 昆明医科大学第二附属医院,昆明,650000; 2 通讯作者

作者简介:徐春燕,女,主治医师; 收稿日期:2017-06-05

Result: The action potential amplitude of experimental side decreased in the first three groups(on the day of treatment and 1,2 weeks after treatment) and the difference was significant compared with the control side($P < 0.05$). There had no significant difference when compared with the control side for the latter three groups. The difference was not obvious about the action potential latency of bilateral triceps surae in all experimental rabbits. HE staining showed no obvious abnormality of muscle morphology.

Conclusion: Suitable dose of rESWT can not only reduce the amplitude of compound muscle action potential although the effect lasted for a short time, but also have no a greater impact on morphology of muscle tissue.

Author's address The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, 650000

Key word radial extracorporeal shock wave treatment; compound muscle action potential; HE staining

冲击波是一种高能机械波,在医疗领域最初应用于体外冲击波碎石术,随着该治疗手段在尿路结石方面取得的巨大成功,在其他疾病治疗中能否发挥疗效及其作用机制便成为争相研究的热点。在肌腱末端病等疾病的治疗方面,冲击波能将能量传递到疼痛区域从而促进组织愈合、再生和修复。在临床工作中我们发现放散式体外冲击波(radial extracorporeal shock wave treatment,rESWT)对卒中患者的四肢痉挛均有缓解作用,且已有系统评价证实^[1],相比对照组rESWT能即刻有效地缓解脑卒中后上肢的痉挛状态并改善上肢运动功能,且缓解痉挛这一治疗效果能在短期内维持。近年有研究发现运用rESWT对卒中患者痉挛下肢进行治疗,治疗后改良Ashworth评分结果及被动关节活动度均有所改善^[2]。但这些研究均仅说明了冲击波的临床治疗结果,其缓解痉挛的机制尚不明确,不利于临床推广。根据对痉挛及rESWT原理的复习,我们推测rESWT可能在神经肌肉接头处发挥重要作用,于是进行动物实验探究其对神经肌肉传导的具体影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

健康成年雄性新西兰兔63只,体重 2.0 ± 0.2 kg,其中3只进行预实验以确定正式实验时冲击波使用强度,另60只随机分为6组(每组10只)。

1.2 冲击波处理

1.2.1 预实验:对参与预实验的3只兔双侧小腿后方剃毛,暴露皮肤,涂抹等量耦合剂。使用BTL-6000型冲击波处理仪对双侧小腿三头肌肌腹最粗大的位置稍偏外侧(冲击波处理头中心距胫神经入腓肠肌肌肉点处约1.5cm,冲击波处理头直径约

1.3cm)分别行强度1.5bar、2bar和3bar,频率均为10Hz的2000次冲击。

1.2.2 正式试验:对参与正式实验的所有兔(60只)双侧小腿后方剃毛,暴露皮肤,涂抹等量耦合剂。

实验侧:综合考虑兔踝关节跖屈活动度不足使得俯卧位下肢略呈外旋状态等因素,使用BTL-6000型冲击波处理仪对所有兔左小腿后方小腿三头肌肌腹最粗大的位置稍偏外侧(冲击波处理头中心距胫神经入腓肠肌肌肉点处约1.5cm,冲击波处理头直径约1.3cm)行强度1.5bar,频率10Hz的2000次定点冲击。

对照侧:将冲击波处理头放置于右小腿后方(放置位置、施加压力、放置时长均与左侧相同)但不进行冲击。

1.3 检查方法

1.3.1 肉眼观察:肉眼观察冲击波处理后左小腿后方是否出现红肿、出血等严重的皮肤、肌肉损伤,与右侧对比。并观察其行走、跳跃等情况。

1.3.2 麻醉:各组在行心电图检查前以3%戊巴比妥钠(剂量100mg/kg体重),耳缘静脉注射麻醉,麻醉深度判断为至兔无角膜反射即可。

1.3.3 电生理检测:运动神经传导(motor nerve conduction velocity,MCV):在冲击波处理当天和第1、2、4、6、8周后(分别为第1—6组)在麻醉下用日本光电MEB-9100K肌电图仪记录双侧腓肠肌外侧头复合肌肉动作电位(compound muscle action potential,CMAP),比较两侧波幅、潜伏期。曾有研究人员对正常健康志愿者的正中神经、尺神经、胫神经及腓总神经进行常规神经传导速度测定,将结果按照不同年龄、性别、体重、左右侧肢体分别进行统计学分析,结果显示仅年龄对远端CMAP参数值会产

生较大影响,而性别、体重、左右侧肢体对远端 CMAP 参数值的影响无显著性差异^[3]。相关研究多针对性别、体重等因素探讨 CMAP 参数值的差异,针对左右侧肢体的较少,经查阅著作等发现,CMAP 相关参数参考值均仅就年龄进行划分,未显示左右侧肢体间有差异^[4-5],据此大胆假设兔左右侧肢体对 CMAP 参数值无影响,进而进行如下检查程序。

将麻醉好的兔俯卧于实验台上,固定四肢和头部,剪去小腿后方兔毛后将皮肤层分离,再暴露腓肠肌,游离胫神经。沿肌腱向上将皮肤层及腓肠肌外层的肌肉剥离开后,俯卧位暴露面积最大的肌肉为腓肠肌外侧头(则冲击波处理时最直接接触的肌肉也为腓肠肌外侧头),且本动物试验中电生理检查直接暴露神经和肌肉,若选择较深肌肉(比目鱼肌),较难进行浅层肌肉分离,再综合考虑兔的解剖,胫神经入肌肉点处位于腓肠肌外侧头,于是电生理检查及肌肉组织形态学观察的取材均选取腓肠肌外侧头。记录电极置于腓肠肌外侧头肌腹最中间的位置,参考电极置于腱腹交界处,刺激器位置为距神经入肌肉点处 0.5cm(负极)和 1cm(正极),接地电极置于剥离开肌肉。肌电仪调节到波宽 0.05ms,电流 5mA,频率 20Hz;每侧均刺激 3 次,刺激间隔时长为使肌肉回到松弛状态,波幅和潜伏期取 3 次刺激的平均值。

重复电刺激实验(repetitive nerve stimulation, RNS):每组取 1 只兔的双侧腓肠肌外侧头做重复电刺激实验,电极、刺激器位置不变,电流不变,频率分别为 1、3、5、7、10Hz,每种频率刺激 10 次,测量第 1 与第 5 次诱发电位波幅的比值。若第 5 波与第 1 波幅之比降低大于或等于 15%为有递减现象。

1.3.4 肌组织冰冻切片 HE 染色观察:每只兔在肌电图检查完成后立即处死,取双侧腓肠肌外侧头肌组织,冰冻切片后行 HE 染色观察肌肉组织形态学变化。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 统计分析软件,数据以均数±标准差表示,实验侧和对照侧各参数差异的显著性检验用 *t* 检验(经检验每组数据均满足 *t* 检验所需条件)。组间各参数差异的显著性检验用单因素方差分析(经检验每组数据均满足 *t* 检验所需条件),并采用 LSD-*t* 检验进行两两比较。

2 结果

2.1 预实验结果

使用不同强度冲击波对双侧小腿三头肌肌腹最粗大的位置稍偏外侧进行冲击后,冲击波处理强度为 1.5bar 和 2bar 的兔肉眼观察处理后 5min 内在实验室内部跳跃等运动功能与未施冲击波兔无明显差异,冲击波处理强度为 1.5bar 的兔肉眼仅可见处理部位轻微红肿,但冲击波处理强度为 2bar 的兔肉眼可见冲击波处理部位红肿、局部点状渗血,冲击波处理强度为 3bar 的兔肉眼可见冲击波处理部位红肿、片状渗血,且处理后 5min 内几乎未进行运动。根据以上预实验结果我们选择强度 1.5bar 的冲击波进行正式实验。

2.2 双侧复合肌肉动作电位

2.2.1 双侧复合肌肉动作电位波幅对比结果:表 1 所见,各组别单侧冲击波处理后双侧复合肌肉动作电位波幅对比,前三组(处理当天和处理后第 1、2 周)有显著差异,后三组差异不明显。

2.2.2 双侧复合肌肉动作电位潜伏期对比结果:表 2 所见,各组别单侧冲击波处理后双侧复合肌肉动作电位潜伏期对比,差异均不明显。

2.2.3 各组间复合肌肉动作电位潜伏期及波幅对比结果见表 3。

其余各组间单因素方差分析及两两比较结果均显示差异无显著性意义。

2.3 双侧重复电刺激对比结果

各组别重复电刺激波幅递减情况仅第 2 组一个样本左侧频率 5Hz 刺激时第 5 波与第 1 波波幅之比降低大于 15%。

2.4 各组 HE 染色结果

各组 HE 染色观察未见肌细胞核及肌纤维形态明显改变,肌纤维为块状多边形结构,各纤维束之间联系紧密,肌细胞呈多核,胞核位于肌细胞边缘,形态规则。

3 讨论

传统的冲击波疗法较多运用在肌腱末端病等疾病的疼痛缓解方面,且疗效早已得到临床证实,其具体原理是通过能量转化及能量传递造成不同密度组织间的能量梯度,进而产生松解粘连、刺激微血管再

表1 单侧冲击波处理后各组别双侧波幅 ($\bar{x}\pm s, mV, n=10$)

组别	处理侧	对照侧	t	P
1	12.70±0.45 ^①	18.42±0.73	-23.09	0.000
2	14.43±1.09 ^①	18.18±0.88	-9.37	0.000
3	14.21±3.67 ^①	19.18±1.63	-3.14	0.012
4	16.67±2.43	17.82±1.70	-0.94	0.371
5	17.41±1.13	17.48±4.44	-0.065	0.950
6	20.05±3.51	19.45±2.05	0.949	0.368

注:①与对照侧比较, $P < 0.05$; 第1—6组分别为冲击波处理当天和第1、2、4、6、8周后

表2 单侧冲击波处理后各组别双侧潜伏期 ($\bar{x}\pm s, ms, n=10$)

组别	处理侧	对照侧	t	P
1	1.68±0.07	1.69±0.65	-0.23	0.823
2	1.85±0.57	1.66±0.63	1.04	0.324
3	1.71±0.12	1.70±0.08	0.35	0.735
4	1.82±0.34	1.72±0.47	0.92	0.381
5	1.71±0.19	1.70±0.09	0.15	0.882
6	1.91±0.41	1.71±0.14	1.28	0.232

表3 各组间复合肌肉动作电位潜伏期及波幅 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

	第1组	第2组	第3组	第4组	第5组	第6组	F	P
处理侧								
波幅(mV)	12.70±0.45	18.42±0.73	14.21±3.67	16.67±2.43	17.41±1.13	20.05±3.51	12.379	0.000 ^①
潜伏期(ms)	1.68±0.07	1.85±0.57	1.71±0.12	1.82±0.34	1.71±0.19	1.91±0.41	0.768	0.577
对照侧								
波幅(mV)	20.05±3.51	19.45±2.05	19.18±1.63	17.82±1.70	17.48±4.44	19.45±2.05	1.145	0.348
潜伏期(ms)	1.69±0.65	1.66±0.63	1.70±0.08	1.72±0.47	1.70±0.09	1.71±0.14	0.740	0.597

注:①按 $\alpha=0.05$ 标准, 可认为6个组间处理侧波幅值有显著性差异。且经LSD-检验两两比较, 第1组与第4、5、6组间, 第2组与第4、5、6组间, 第3组与第4、5、6组间, 第4组与第6组间以及第5组与第6组间差异均有显著性意义。

生等作用^[6]。在实际临床工作中, 我们发现rESWT对卒中患者的四肢痉挛也有一定的缓解作用^[7], 但其作用机制不明确, 不利于临床推广。痉挛可由多种因素导致, 例如脊髓损伤源性痉挛多考虑神经机制, 而脑源性痉挛则较常认为是因为肌肉收缩性能的改变^[8]。所以在了解其具体机制的基础上对具体治疗方法针对的具体部位的明确鉴别便是疾病治疗的重点。本研究使用rESWT直接对肌腹进行冲击, 采用肌电图检测技术结合肌组织形态学观察, 对神经传导测定结果进行定量分析, 有助于探明冲击波在治疗痉挛方面具体作用位点。

运动神经传导反映的是下运动神经元的状态, 研究的是运动单位的功能和整合性, 通过对运动传导的研究可以评估运动神经轴索、神经肌肉接头的功能状态。运动单位是由一个运动神经元与所支配的全部肌纤维共同组成, 是肌肉随意收缩时的最小功能单位^[9]。肌肉随意收缩时, 肌细胞受到刺激, 细胞膜进行一次去极化, 钠离子大量内流使细胞内进一步去极化, 当钠离子去极化达到临界水平, 就会产生动作电位(action potential)^[10], 由于运动单位本身结构、空间排列和兴奋程序不同, 可记录到不同形状、时限及不同波幅的电位。

3.1 复合肌肉动作电位波幅、潜伏期

复合肌肉动作电位的波幅代表肌纤维兴奋时所产生的动作电位幅度的总和, 而潜伏期则是自刺激

发放至动作电位出现的时间。本研究中前三组实验动物左侧小腿后方在经过冲击波处理后, 腓肠肌外侧头复合肌肉动作电位波幅明显下降, 组内组间比较差异均有显著性意义, 潜伏期并未出现明显改变, 提示冲击波的作用位点可能位于神经肌肉接头, 这便为冲击波处理痉挛的机制方面提供了可能的解释, 即冲击波的处理造成了神经肌肉接头短暂、可逆的功能障碍, 不考虑对周围神经造成损伤是因为周围神经损伤会造成支配肌肉严重的无力, 功能性活动难以进行, 动作电位波幅明显下降(下降 > 50%)甚至引不出波形^[11], 而在本实验中并未出现上述现象。结合后三组实验动物的数据来看, 冲击波的作用结果未对神经肌肉传导功能造成不可逆改变。尽管在降低波幅这一作用上的持续时间不够长, 这与肉毒毒素注射的效果类似, 但不会出现过敏、注射后肌张力低下等不良反应, 且肉毒毒素治疗还存在治疗费用较高、感染风险等现实因素。未来在痉挛模型中再进行实验, 若能得到相同结果, 便可将冲击波这一体外无创治疗手段充分应用于脊髓损伤痉挛患者张力较高的肌肉。

3.2 重复电刺激

各组别重复电刺激波幅递减情况仅第2组一个样本左侧频率5Hz刺激时第5波与第1波波幅之比降低大于15%。有研究观察肉毒杆菌注射后在20—50Hz重复电刺激时波幅呈现明显下降^[12], 肉毒

杆菌的作用方式是抑制胆碱能神经末梢释放乙酰胆碱,导致肌肉松弛型麻痹^[13-14]。本研究中未出现类似重复电刺激波幅明显下降现象,说明冲击波既没有造成其直接作用的肌肉本身的麻痹,也未对神经肌肉接头的乙酰胆碱释放产生绝对的抑制作用,且冲击波处理后实验动物的功能性活动并未出现明显异常,结合近年来研究人员在脑卒中患者痉挛肢体上的冲击波研究,便再次佐证冲击波的处理可降低痉挛状态下的肌肉张力,使肌张力趋向正常,且不会产生肌张力弛缓等异常现象。但由于进行重复电刺激检查样本量过低,不具有较高参考价值。

3.3 HE染色

各组HE染色观察结果表明,冲击波处理与否其肌肉组织形态及细胞核形态没有明显差异,未见肌细胞核及肌纤维形态明显改变,肌纤维为块状多边形结构,各纤维束之间联系紧密,肌细胞呈多核,位于肌细胞边缘,形态规则。结合肉眼观察到的冲击波处理后所有动物运动功能未见明显异常,可以认为本实验使用的冲击波剂量并未对肌组织形态、结构及功能造成破坏。

3.4 实验设计缺陷

①预实验确定rESWT剂量时仅选择了对不同强度进行实验,未考虑是否不同频率或冲击次数也会对肌肉和神经肌肉接头等产生不同影响。②在实验动物冲击波处理前后运动能力方面未使用具体的参数测量,仅依靠肉眼观察,结果可靠性不高;在分子水平未进行实验论证,使得实验结论不够有说服力。③电生理检查均在麻醉状态下进行,是否麻醉深度及不同麻醉药物对神经传导会造成不同的影响有待进一步研究证实。④实验过程中冲击波处理头与神经肌肉的位置关系未选取入骨突起处等具体位置进行精确定位,使得实验数据变异度较高。

已有研究证实,CMAP波幅反映的是去极化神经纤维的数目,即具有传导功能的轴突的数目,而时程的延长则多见于脱髓鞘疾病^[15-16]。我们认为,冲击波处理使得腓肠肌外侧头复合肌肉动作电位波幅下降提示,冲击波的作用位点位于神经肌肉接头且不造成神经、肌肉等结构和功能不可逆的损伤,冲击波的处理造成了正常动物模型神经肌肉接头短暂、可逆的功能障碍。但由于痉挛兔和正常兔神经肌肉

病理生理方面的差异,是否有助于使痉挛状态下的肌张力回归正常,还需进一步在痉挛模型上进行实验,并在分子生物学水平上对神经肌肉接头的其他因素进行更为完备的检测,以便获得更为准确的临床证据,并为冲击波疗法是否可广泛应用于痉挛的临床治疗提供确切依据。

参考文献

- [1] 郭佳宝,朱毅,陈炳霖,等. 放散式体外冲击波处理脑卒中后肢体痉挛的系统评价[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(2):207—212.
- [2] Radinmehr H, Nakhostin Ansari N, Naghdi S, et al. Effects of one session radial extracorporeal shockwave therapy on post-stroke plantarflexor spasticity: a single-blind clinical trial [J]. Disabil Rehabil, 2017, 39(5): 483—490.
- [3] 党静霞. 正常成人神经传导远端符合肌肉动作电位参数值正常范围的建立[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2006, 27(6):558—560.
- [4] Ludin HP. 汤晓芙等译. 实用肌电图学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1984, (2).
- [5] 汤晓芙. 10名正常人的肌电图所见[J]. 中华医学杂志, 1984, 64(2):91.
- [6] 冯海清, 陈明亮. 冲击波处理肌腱末端病的疗效分析[J]. 福建体育科技, 2015, (02):16—18.
- [7] Elbasiouny SM, Moroz D, Bakr MM, et al. Management of spasticity after spinal cord injury: current techniques and future directions[J]. Neurorehabilitation and Neural Repair, 2010, 24(1): 23—33.
- [8] Lance JW. Symposium Synopsis. In: Feldman RG, Young RR, Koella WP, editors. Spasticity: disordered motor control [M]. Chicago, IL: Year Book Medical Publications, 1980: 485—500.
- [9] 宋小慧. 发散式体外冲击波对脑梗死患者肢体痉挛和运动功能的影响[D]. 上海交通大学, 2015.
- [10] 熊国星, 张军卫, 洪毅, 等. 脊髓损伤后胫骨前肌运动单位数目测定的意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, (06):429—433.
- [11] 王玉龙, 高晓平, 张秀花, 等. 康复功能评定学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2013:280—281.
- [12] Murray MJ, Brull SJ, Bolton CF. Brief review: Nondepolarizing neuromuscular blocking drugs and critical illness myopathy [J]. Can J Anesth, 2006, 53:1148—1156.
- [13] Shapiro RL, Hatheway C, Swerdlow DL. Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review[J]. Ann Intern Med, 1998, 129:221—228.
- [14] 叶婷, 张雪平. 肉毒毒素作用机制的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2017, (02):89—96.
- [15] 白雪, 于绍斌, 朱琳, 等. 复合肌肉动作电位与周围神经损伤程度的相关性研究[J]. 现代电生理学杂志, 2013, 20(3):142—145.
- [16] Friedman WA. The electrophysiology of peripheral nerve in injuries[J]. Neurosurg Clin Am, 1991, 2(1):43—56.