

推拿联合跑台训练对失神经大鼠不同时间神经吻合术后骨骼肌的影响*

王春红¹ 严隽陶^{1,3} 马书杰² 陆永嘉¹ 马颖¹ 史智君¹ 孔亚敏¹ 陶然¹

摘要

目的:探讨推拿手法联合跑台训练对失神经大鼠在不同时间行吻合术后骨骼肌随干预时长增加的变化规律。

方法:160只大鼠随机分为I期缝合组(立即缝合)80只,II期缝合组(4天缝合)80只。I期缝合组分干预组40只,模型组40只;II期缝合组分干预组40只,模型组40只。对干预组大鼠给予手法-跑台干预,模型组不做干预。

结果:造模类型、干预手法、干预时长三个因素的主要效应均有显著意义,各因素主效应大小顺序为造模类型、干预时长、干预手法。

结论:对于坐骨神经吻合术后大鼠的肌肉湿重比造模类型起主要作用,其次为干预时长,再次为干预手法。因此,失神经后及时予以神经吻合术,以及保证一定的干预时长,对于失神经支配肌肉术后的恢复至关重要。

关键词 推拿;跑台;神经外膜缝合;肌肉萎缩;肌肉湿重比

中图分类号:R493,R244 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-09-1069-05

Effects of Tuina combined with treadmill training on skeletal muscle of rats with denervation after nerve anastomosis in different time/WANG Chunhong, YAN Juntao, MA Shujie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(9): 1069—1073

Abstract

Objective:To investigate the effect of manipulation of massage and running exercise on the change of skeletal muscle of rats' after the anastomosis.

Method: A total of 160 rats were randomly divided into two groups. Stage I suture group (immediate suture after transection) composed of 80 rats. Stage II suture group (suture at fourth days after transection) also composed of 80 rats. Each group was divided into treatment group(40 cases)and control group(40 cases). Treatment groups accepted massage and running on treadmill every day. The control group was not treated.

Result: The main effects of three factors were significant, and the order of main effects of each factor was modeling type, intervening time and intervening method.

Conclusion: After sciatic nerve anastomosis in rats, the type of modeling played a major role in the wet weight ratio of muscle, followed by intervening time, and intervening manipulation again. Therefore, timely nerve anastomosis after denervation, as well as to ensure a certain intervening time, is essential for the recovery of denervated muscle after after nerve anastomosis.

Author's address Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 200080

Key word tuina; running; epineurium suture; muscle atrophy; muscle weight ratio

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.09.012

*基金项目:国家自然科学基金项目(81373764);国家杰出青年科学基金项目(81603713);上海市中医康复临床基地建设项目(ZY3-LCPT-1-1008)

1 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院,200080; 2 上海中医药大学康复医学院; 3 通讯作者

作者简介:王春红,女,住院医师; 收稿日期:2017-12-01

外周损伤引起运动神经元轴突损伤,可导致效应肌永久的松弛性瘫痪,最后导致神经性肌萎缩。外科神经修复手术足够精细,则可有效恢复,因为外周轴突将每天再生数毫米使得肌纤维重新获得神经支配^[1]。

课题组前期研究发现推拿手法可通过促进肌卫星细胞的增殖有效防止失神经支配的骨骼肌萎缩^[2],然而临床上神经损伤的患者除了利用推拿干预外还会结合康复训练以求更好的疗效,本实验结合临床采用推拿手法联合跑台训练的方法对不同时间神经吻合术后的失神经大鼠进行干预,以期临床处方提供理论基础,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠160只,体重180—200g,用于建立坐骨神经即时缝合模型(80只);坐骨神经第4天缝合模型(80只)。

1.2 主要仪器及试剂

采用YLS-15A大鼠轮转式跑步机;按摩仪(与复旦大学合作研制出的1台模拟人手捏法的仪器);电子天平(上海天平仪器厂)。

1.3 造模及分组

1.3.1 I期缝合模型(坐骨神经即时缝合模型):80只大鼠分别以10%水合氯醛30mg/kg做腹腔注射麻醉,无菌条件下行臀部切口,于臀肌间显露右侧坐骨神经,距梨状肌下缘1cm处切断坐骨神经,立即在外科显微镜下用11/0缝合线行外膜缝合,关闭伤口,其中40只于术后3周后行推拿联合跑台训练为干预组,干预时间分别为1、2、3、4个月,另40只为模型组,行神经外膜吻合术,但不予以干预。每个时间点各组选取10只处死,进行指标检测。

1.3.2 II期缝合模型(坐骨神经4d缝合模型):与I期缝合模型组相同,切断坐骨神经后,缝合伤口,放入笼中饲养至第4天时,按原路径打开伤口,将两断端神经游离修剪齐整,行外膜缝合。此时为课题组前期研究选出的延期缝合最佳有效时间,即此时的神经两断端之间距离不大于4mm,且最大幅度反复活动患侧下肢后缝合线仍不断裂,为无张力直接神经缝合,该状态下的神经缝合后愈合仍良好^[3]。关

闭伤口,其中40只于术后3周后行推拿联合跑台训练为干预组,干预时间分别为1M、2M、3M、4M,另40只为模型组,行神经外膜吻合术,但不予以干预。每个时间点各组选取10只处死,进行指标检测。

1.4 干预方法

对待肢体功能障碍,中医传统康复的干预理念是整体观念、动静结合。现代康复对神经损伤的康复,要求功能锻炼,通过被动、助动运动,达到主动训练。本课题研究干预方法采用推拿联合跑台训练的方法,模拟临床失神经患者行神经外膜吻合术后的干预方案,既有推拿手法的干预,又强调配合主动训练以提高康复疗效。

①推拿手法(捏法):采用与复旦大学合作研制出的1台模拟人手捏法的按摩仪器,按摩头为一环形充气气囊,由按摩仪主机控制其参数,气囊绑缚在大鼠患侧小腿,对腓肠肌进行按摩。手法刺激参数为6kPa,刺激2min,休息1min,再刺激2min,每次总共5min。手法干预每天1次。

②跑台训练:采用YLS-15A大鼠轮转式跑步机,转速为5转/min,每转0.65m,持续5min。每天训练1次,均在手法干预结束后进行。

1.5 检测指标

各组大鼠干预后1、2、3、4个月分别选取10只麻醉后取双侧腓肠肌称重记录,计算双侧腓肠肌重量之比(肌肉湿重比=患侧腓肠肌重量/健侧腓肠肌重量)。切取肌肉样本包埋并固定,免疫组化染色后,采集分析样本相关部位,计算阳性面积。进行统计分析。

1.6 统计学分析

所有统计检验以 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。采用SPSS 21.0进行统计学分析,实验数据用均数±标准差表示,并进行正态性检验和方差齐性检验,组间比较采用析因设计方差分析,两两比较采用Bonferroni检验。

2 结果

2.1 大鼠不同造模类型、不同疗法后在4个干预时间的肌肉湿重比变化

造模类型的I期缝合模型和II期缝合模型两个水平间有显著性意义($F=49.043, P=0.000$),提示I

期缝合模型的肌肉湿重比高于Ⅱ期缝合模型;不同干预手法的干预组和模型组两个水平间也有显著性意义($F=4.260, P=0.041$),提示干预组的肌肉湿重比高于模型组;4个不同干预时长(1M、2M、3M和4M)的肌肉湿重比有显著性意义($F=7.464, P=0.000$),说明4个干预时间点肌肉湿重比不完全相同。结果见表1—2。

造模类型、干预手法、干预时长三个因素的主要效应均有显著意义,不存在二阶交互作用和三阶交互作用,因此需逐一分析各因素的主效应。从表2三因素析因设计方差分析中三个因素的主效应的方差贡献及F值来看,大小顺序为造模类型、干预时长、干预手法。肌肉湿重比关于造模类型、干预手法、干预时长的多元线性回归模型,三个自变量(造模类型、干预手法、干预时长)的标准化偏回归系数分别为-0.462、-0.132、0.307,对肌肉湿重比造模类型起主要作用,其次为干预时长,再次为干预手法。见图1—3。

2.2 大鼠不同造模类型、不同疗法后在4个干预时间的卫星细胞变化

造模类型的Ⅰ期缝合模型和Ⅱ期缝合模型两个水平间有显著性意义($F=8.328, P=0.005$),提示Ⅱ期缝合模型的卫星细胞高于Ⅰ期缝合模型;不同干预手法的干预组和模型组两个水平间无显著性意义($F=1.802, P=0.182$),提示模型组的卫星细胞与干预组相同;4个不同干预时长(1M、2M、3M和4M)的卫星细胞比较也有显著性意义($F=49.661, P<0.001$),说明4个干预时间点卫星细胞不完全相同。干预时长为3M时,干预组的卫星细胞均数高于模型组。

造模类型与干预手法(A*B)之间不存在一阶交互作用($F=0.346, P=0.557$),对于卫星细胞造模类型起主要作用,其次为干预手法。

干预手法与干预时长(B*C)之间存在一阶交互作用($F=4.397, P=0.005$),C因素的单独效应在b2水平时高于b1水平时。

造模类型与干预时长(A*C)之间存在一阶交互作用($F=13.886, P<0.001$),C因素的单独效应在a2水平时高于在a1水平时。

结果见表3—4和图4—6。

表1 大鼠的肌肉湿重比的均数 ($\bar{x}\pm s$)

造模类型/ 不同干预手法	干预时长			
	1个月	2个月	3个月	4个月
Ⅰ期缝合				
干预组	0.796±0.213 ^①	0.736±0.088	0.733±0.160	0.922±0.198 ^③
模型组	0.635±0.168	0.710±0.084	0.807±0.188	0.849±0.167
Ⅱ期缝合				
干预组	0.519±0.840 ^②	0.618±0.170	0.670±0.720	0.727±0.075 ^④
模型组	0.550±0.104	0.547±0.146	0.651±0.123	0.568±0.185

注:①Ⅰ期缝合各时间点不同干预手法组间比较 $P>0.05$;②Ⅱ期缝合各时间点不同干预手法组间比较,只有4个月 $P<0.05$ 。③Ⅰ期缝合治疗组不同时间点比较 $P>0.05$;④Ⅰ期缝合模型组不同时间点比较 $P<0.05$;⑤Ⅱ期缝合治疗组不同时间点比较 $P<0.05$;⑥Ⅱ期缝合模型组各时间点之间比较 $P>0.05$;⑦Ⅰ期缝合不同时间点治疗组与模型组比较 $P>0.05$;⑧Ⅱ期缝合不同时间点治疗组与模型组比较1个月、2个月、3个月时 $P>0.05$,4个月时 $P<0.05$ 。

表2 大鼠的肌肉湿重比的方差分析表

变异来源	SS	df	MS	F	P
干预时长	0.485	3	0.162	7.464	0.000
造模类型	1.063	1	1.063	49.043	0.000
干预手法	0.092	1	0.092	4.260	0.041
造模类型*干预时长	0.096	3	0.032	1.469	0.226
干预手法*干预时长	0.105	3	0.035	1.618	0.188
干预手法*造模类型	0.001	1	0.001	0.064	0.801
造模类型*干预手法*	0.139	3	0.046	2.142	0.098
干预时长					
误差	3.034	140	0.022	-	-
总变异	5.006	155	-	-	-

表3 2×2×4析因设计大鼠卫星细胞的均数的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	干预时长(不同时间点处死动物)			
	1个月	2个月	3个月	4个月
Ⅰ期缝合				
干预组	24.800±10.042	20.625±6.589	34.100±20.086 ^③	41.000±8.367 ^①
模型组	25.400±9.958	23.750±7.246	21.800±7.391	44.700±7.529
Ⅱ期缝合				
干预组	22.500±5.482 ^②	19.778±9.298	55.100±12.679	45.600±9.709 ^④
模型组	17.500±5.778	22.900±10.609	44.100±10.908	46.000±6.146

注:①Ⅰ期缝合治疗组和模型组各时间点比较 $P<0.05$;②Ⅱ期缝合治疗组和模型组各时间点比较 $P<0.05$ 。③Ⅰ期缝合各个时间点不同干预手法组间比较,只有3个月 $P<0.05$;④Ⅱ期缝合各个时间点不同干预手法组间比较 $P>0.05$ 。

表4 2×2×4析因设计大鼠的卫星细胞的方差分析结果

变异来源	SS	df	MS	F	P
干预手法	178.588	1	178.588	1.802	0.182
干预时长	14763.067	3	4921.022	49.661	<0.001
造模类型	825.270	1	825.270	8.328	0.005
干预手法*干预时长	1307.056	3	435.685	4.397	0.005
干预手法*造模类型	34.281	1	34.281	0.346	0.557
造模类型*干预时长	4128.068	3	1376.023	13.886	<0.001
造模类型*干预手法*	72.223	3	24.074	0.243	0.866
干预时长					
误差	13575.631	137	99.092	-	-
总变异	35241.346	152	-	-	-

图1 大鼠肌肉湿重比指标造模类型与干预时长的交互作用

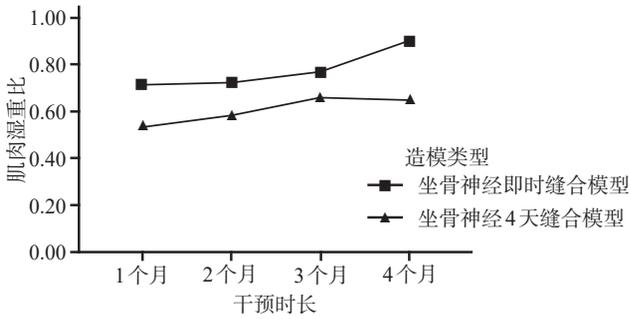


图2 大鼠肌肉湿重比指标干预时长与干预手法的交互作用

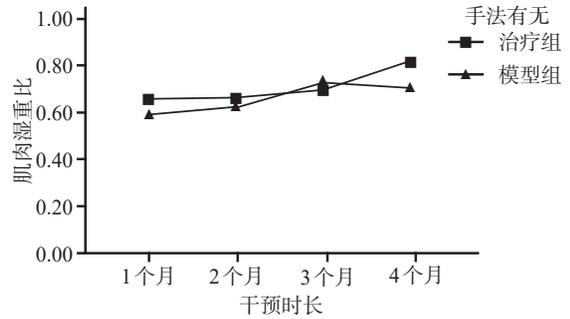


图3 大鼠肌肉湿重比指标造模类型与干预手法的交互作用

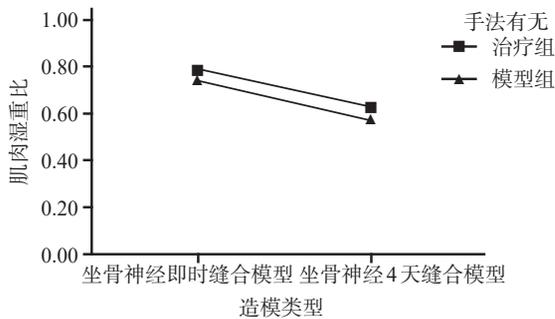


图4 大鼠卫星细胞指标造模类型与干预时长的交互作用

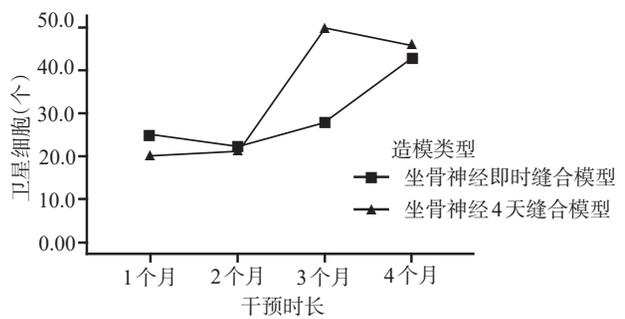


图5 大鼠卫星细胞指标干预手法有无与干预时长的交互作用

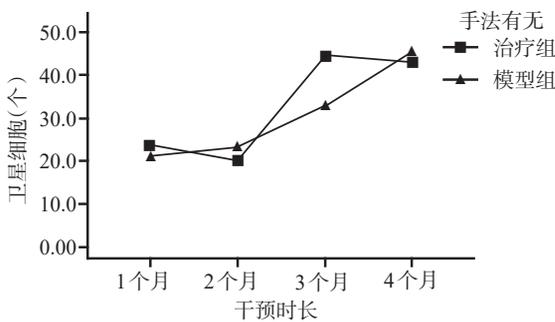
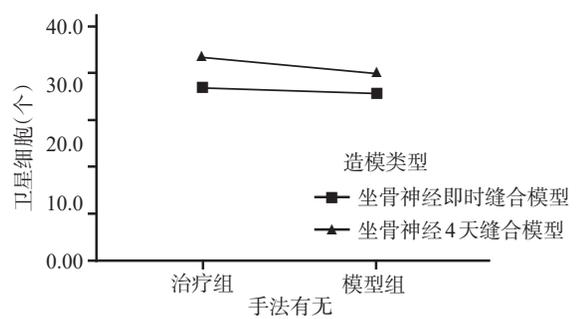


图6 大鼠卫星细胞指标造模类型与干预手法有无的交互作用



3 讨论

运动神经元的轴突在肌纤维表面分成许多支,每一支终止于一个小结与肌纤维形成突触,称为神经肌肉接头(neuromuscular junction, NMJ)。神经末梢释放乙酰胆碱(ACh),兴奋突触后膜的烟碱型胆碱受体(nAChR)产生去极化电位,许多微终板电位总和产生足够引起肌纤维收缩的动作电位,肌肉动作电位调集Ca²⁺引起肌肉收缩^[1]。外伤可引起α

运动神经元轴突断裂,使失去神经支配的肌肉松弛性瘫痪^[1]。缓慢的轴突再生,目标肌肉结构的改变,以及一个越来越不支持再生的基质环境,都不利于功能的完全恢复^[4]。失神经支配后,远端结构发生许多变化。肌肉萎缩,肌肉湿重逐渐下降^[5]。随着纤维化的进展,人们普遍认为如果神经不在12个月左右到达运动终板,肌肉获得神经再支配的机会将减少。随着失神经支配时间的延长,整体肌肉功能

将下降^[6]。周围神经损伤后,失神经骨骼肌会出现体积缩小、重量减轻、收缩功能减弱等肌萎缩现象,目前大多数形态学观察均通过检测靶肌肉的湿重来了解肌肉的萎缩程度^[7]。湿重越小,肌肉的体积越小,肌纤维横截面积越小,肌肉萎缩越明显,功能越差;反之,湿重越大,肌肉的体积越大,肌纤维横截面积越大,肌肉萎缩越轻,收缩功能好。本实验在国际上率先使用手法干预周围神经外膜缝合骨骼肌萎缩的动物模型,分析手法联合跑台干预对骨骼肌的作用规律,考虑大鼠个体发育情况的差异,为减小误差,采用大鼠患、健侧肌肉湿重之比作为观察指标。根据实验观察,发育正常的大鼠左右侧腓肠肌湿重比接近于1,然而失神经支配的骨骼肌因发生萎缩患侧与健侧湿重比小于1,萎缩越严重数值越小。

有研究表明,骨骼肌支配神经切断2—3个月再神经化,增殖能力活跃的肌卫星细胞促使此时的萎缩肌功能恢复良好^[8]。本实验结果发现干预时长在第1至4个月时干预组肌肉湿重比高于模型组,而肌卫星细胞在1、3月时干预组高于模型组,第2、4月时低于模型组,呈动态变化趋势,考虑可能是手法-跑台训练在促进肌卫星细胞分裂增殖的同时,也促进其向有功能的肌纤维转化,从而消耗肌卫星细胞所致。I期缝合组肌肉湿重比高于II期缝合组,而对于肌卫星细胞II期缝合组高于I期缝合组,可能是由于I期缝合组使更多的肌卫星细胞向成熟的肌纤维转化所致。

因此,对于坐骨神经吻合术后大鼠肌肉的恢复干预组优于模型组,I期缝合组优于II期缝合组。相较而言,干预时长起主要作用,其次为造模类型,再次为干预手法。所以,干预时间的长短对于失神经支配肌肉神经吻合术后的恢复也至关重要。

临床上因外伤等造成失神经的患者应及时行神经外膜吻合术,神经外膜吻合术是肌肉功能恢复的基础;术后患者的被动锻炼及主动运动也不可或缺;然而,时间才是失神经损伤吻合术后发挥作用最大的因素,因为没有神经支配的肌肉,其功能则无从谈起,而失神经损伤吻合术后神经以每天一毫米左右的生长速度生长至目标肌肉是需要一定时间的。所以预估推拿康复的干预时长有助于帮助患者建立目标,使之循序渐进,不好高骛远,积极配合干预,树立康复信心。

参考文献

- [1] 朗斯塔夫(著),韩济生(主译).神经科学(中译本)[M].北京:科学出版社,2006:215—217
- [2] 李立志,邵先桃,严隽陶.推拿在急性闭合性软组织损伤早期临床应用与研究现状[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(11):80—82.
- [3] Wu P, Spinner RJ, Gu Y, et al. Delayed repair of the peripheral nerve: a novel model in the rat sciatic nerve[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2013, 214(1): 37—44
- [4] Gordon T, Amirjani N, Edwards DC, et al. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients[J]. *Experimental Neurology*, 2010, 223(1):192—202.
- [5] Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair[J]. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2000, 8(4):243—252.
- [6] Susan Y. Fu, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy[J]. *Journal of Neuroscience*, 1995, 15(5): 3876—3885.
- [7] 吴佳佳,徐建光,马书杰.失神经骨骼肌萎缩的机制及康复治疗[J].安徽医药,2017,21(11):1949—1953.
- [8] 邹江,孙晓娟,钟世镇,等.骨骼肌失神经和再神经化时肌卫星细胞的变化[J].中国修复重建外科杂志,2006(10):1047—1051.