

引用:韦庆波,顾嘉凌,张峰,林佳,李风雷,吴云川.推拿手法对SD大鼠肌腱末端病碱性成纤维细胞生长因子的影响[J].湖南中医杂志,2021,37(5):170-173.

# 推拿手法对SD大鼠肌腱末端病碱性成纤维细胞生长因子的影响

韦庆波<sup>1</sup>,顾嘉凌<sup>2</sup>,张峰<sup>1</sup>,林佳<sup>2</sup>,李风雷<sup>3</sup>,吴云川<sup>1</sup>  
(1. 南京中医药大学针灸推拿学院,江苏 南京,210023;  
2. 南京中医药大学翰林学院,江苏 泰州,225300;  
3. 江苏省海滨康复医院,江苏 连云港,222042)

[摘要] 目的:通过建立SD大鼠肌腱末端病模型,观察跟腱大体标本形态、组织学及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达量的变化,探讨推拿手法干预肌腱末端病的治疗作用及其作用机制。方法:将20只SD雄性大鼠喂养1周后,随机分成A、B、C、D组,每组各5只。A组大鼠的右后肢为正常组(A1),左后肢为模型组(A2);B、C、D组大鼠分为自然恢复组(B1、C1、D1)与治疗组(B2、C2、D2)。A1组不做任何处理,其余各组均采用跟腱注射I型胶原酶的方法建立SD大鼠肌腱末端病模型。造模2周后对B2、C2、D2组进行推拿治疗,于患侧下肢施按揉手法,其余各组不做处理。A、B、C、D组分别在造模成功2周后及干预7、14、21d后处死,对每组大鼠跟腱进行肉眼观察及病理组织形态学观察,并检测bFGF表达情况。结果:治疗组的损伤修复程度优于同期自然恢复组,且粘连程度比同期自然修复组轻。模型组bFGF含量升高,高于正常组( $P<0.01$ ),随着损伤愈合,bFGF表达量逐渐下降,治疗组优于同期自然修复组,治疗后第14、21天最明显( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:推拿手法可下调bFGF表达量,促进受损组织愈合,防止肌腱粘连,对肌腱末端病起到干预作用。

[关键词] 肌腱末端病;推拿;bFGF;实验研究  
[中图分类号]R244.13,R274.96 [文献标识码]A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.05.061

## Effect of massage manipulation on basic fibroblast growth factor in rats with enthesitis

WEI Qingbo<sup>1</sup>,GU Jialing<sup>2</sup>,ZHANG Feng<sup>1</sup>,LIN Jia<sup>2</sup>,LI Fenglei<sup>3</sup>,WU Yunchuan<sup>1</sup>

(1. School of Acupuncture and Massage, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu, China;  
2. Hanlin College, Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou 225300, Jiangsu, China;  
3. Jiangsu Haibin Rehabilitation Hospital, Lianyungang 222042, Jiangsu, China)

[Abstract] Objective:To investigate the changes in the morphology and histology of the gross specimen of calcaneal tendon and the expression level of basic fibroblast growth factor (bFGF) in Sprague-Dawley rats without-enthesitis,as well as the therapeutic effect of massage manipulation on enthesitis and its mechanism of action. Methods: After 1 week of feeding,20 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into groups A,B,C,and D,with 5 rats in each group. The right hindlimbs of the rats in group A were selected as normal group (A1),and the left hindlimbs were selected as model group (A2). Groups B,C,and D were each divided into natural recovery group (B1,C1,and D1) and treatment groups (B2,C2,and D2). Group A1 was not given any treatment,and the other groups were given the injection ofcollagenase type 1 via the calcaneal tendon to establish a Sprague-Dawley rat model of enthesitis. After 2 weeks of modeling,massage was performed for groups B2,C2,and D2,with fouflage manipulation for the ipsilateral lower limb,and no treatment was given for the other groups. The rats in groups A,B,C,and D

基金项目:江苏省中医药管理局科技计划发展项目(YB201849)  
第一作者:韦庆波,男,讲师,研究方向:针灸推拿治疗常见病  
通讯作者:吴云川,男,教授,研究方向:针灸推拿治疗颈肩腰腿痛,E-mail:njwywch@126.com

were sacrificed after 2 weeks of successful modeling and 7, 14, and 21 days of intervention; the calcaneal tendon was observed with the naked eye, and pathological and histomorphological observations were also performed; the expression of bFGF was measured. Results: Compared with the natural recovery group at the corresponding period of time, the treatment group had a significantly better degree of damage repair and a significantly lower degree of adhesion. Compared with the normal group, the model group had a significant increase in the content of bFGF ( $P < 0.01$ ), and the expression level of bFGF gradually decreased with the healing of injury; the treatment group was superior to the natural recovery group at the corresponding period of time, with the most significant effect on days 14 and 21 after treatment ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Conclusion: Massage manipulation can downregulate the expression level of bFGF, promote the healing of injured tissue, prevent tendon adhesion, and thus exert a therapeutic effect on enthesitis.

[**Keywords**] enthesitis; massage; basic fibroblast growth factor; experimental study

肌腱末端病是指由于过度用力或受力不均造成肌腱或韧带指点处因损伤甚至断裂而出现肌腱及腱周疼痛、活动受限的综合征。本病好发于运动员或体育工作者,有研究表明,近年来国内外运动员因运动过量或损伤致肌腱发生无菌性炎症甚至断裂的案例正逐年增多,且影响着患者的职业生涯<sup>[1]</sup>。目前对该病发病机制的认识主要有2个方面,一是肌腱反复承受过度负荷或过度使用而产生的代偿性反应;二是末端区域局部微循环障碍引发多种活性因子对末端结构造成破坏作用<sup>[2-3]</sup>。

西医治疗末端病分为手术疗法和非手术疗法。手术疗法一般是对跟腱断裂合并跟腱末端病变的患者采用跟骨结节及变性跟腱切除、带线铆钉止点重建术<sup>[4]</sup>,非手术疗法有体外冲击波、离心训练等<sup>[5-6]</sup>。中医治疗采用中药外敷、针灸、刃针等方法<sup>[7-9]</sup>,在临床取得了良好的疗效。本研究在SD大鼠肌腱末端病模型的基础上,观察推拿对SD大鼠肌腱组织学形态、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的影响,初步探讨推拿对肌腱末端病的治疗作用及作用机制。

## 1 实验材料

1.1 动物 选取健康SPF级、雄性SD大鼠20只,5~8周龄,体质量180~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2012-0001,于南京中医药大学实验动物中心进行饲养。

1.2 药物及试剂 硫酸庆大霉素(山西芮城科龙兽药有限公司,批号:20190201);10%水合氯醛(上海源叶生物科技有限公司,货号:R21477);4%多聚甲醛(福麦斯生物技术有限公司,货号:FMS-FZ013);I型胶原酶(大连美仑生物技术有限公司,货号:MB2686);bFGF ELISA试剂盒(上海邦景实业有限公司,货号:BJ-R2014)。

1.3 主要仪器 酶联免疫检测仪(华东医疗装备有限责任公司,型号:DG5033A);HH-4数显恒温水浴锅(常州国华电器,型号:HH-4);组织包埋机(阔海科技,型号:KH-BL);病理切片机(维克科教,型号:VCM-3558Ⅲ);显微镜(日本Olympus,型号:CX33)。

## 2 实验方法

2.1 动物分组 将SD雄性大鼠20只喂养1周后,按照随机数字表法进行分组,分别为A、B、C、D组,每组各5只。将A组大鼠的右后肢和左后肢分别设为正常组(A1)和模型组(A2);B组右后肢和左后肢分别为7 d自然恢复组(B1)和7 d治疗组(B2);C组右后肢和左后肢分别为14 d自然恢复组(C1)和14 d治疗组(C2);D组右后肢和左后肢分别为21 d自然恢复组(D1)和21 d治疗组(D2)。

2.2 模型制备 称取30 mg I型胶原酶粉剂,并加入0.9%氯化钠注射液2 ml,充分搅拌溶解,配制成浓度为1.5%的I型胶原酶溶液。分装于EP管中,-20℃保存备用。除A1外其余各组均予跟腱注射I型胶原酶,进行造模。具体操作如下:用10%的水合氯醛溶液进行腹腔注射麻醉,双下肢备皮,常规碘酊消毒,对大鼠的双下肢进行后中线切口,找到全段跟腱,将配置好的溶液20 μl沿跟骨结节后上缘中点注入跟腱<sup>[10]</sup>。缝合伤口,并连续3 d进行预防感染给药。术后大鼠进行正常的饮食和自由活动。

2.3 干预方法 造模成功2周后,对B2、C2、D2 3组大鼠左下肢分别进行推拿治疗,10 min/次,1次/d,手法以局部按揉为主,按揉手法按照《推拿学》(第九版)进行操作,遍及整个左下肢,其余各组不做任何处理。所有推拿操作均由同一人操作完成,保证推拿力量和频率的一致性。

2.4 标本采集 造模成功2周后处死A1和A2大鼠,干预7 d后处死B1和B2大鼠,干预14 d后处死C1和C2大鼠,干预21 d后处死D1和D2大鼠。大鼠处死后立即取双下肢跟腱组织,长度约为1 cm,其中每组各取部分跟腱组织用10%福尔马林进行固定,用于组织形态学观察。其余跟腱组织立即置于液氮罐中,转移至-80℃冰箱中,以备后续使用。

2.5 指标观察与检测 1)肉眼观察。肉眼观察跟腱组织周围有无水肿、炎症反应,肌腱与腱周组织有无粘连,滑动度。2)组织形态学检测。取部分跟腱组织用10%福尔马林进行固定24 h,经脱水、透明、包埋、切片、脱蜡后,进行HE染色,并通过光学显微镜对跟腱组织进行观察。3)酶联免疫

法检测 bFGF 的含量。取部分跟腱组织,0.9%氯化钠注射液充分冲洗后进行称重,并加入 9 倍 0.9%氯化钠注射液后进行匀浆,离心后取上清,按照 bFGF 试剂盒说明进行检测,并用酶标仪测定后,进行 bFGF 含量的计算。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,若数据符合正态分布及方差齐性,则采用配对样本 *t* 检验;以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

3 实验结果

B、D 组由于腹腔注射操作不当各脱落 1 只,其余均完成实验。

3.1 肌腱标本肉眼观察结果 肌腱标本肉眼观察结果见表 1。

表 1 肌腱标本肉眼观察结果

| 组别    | 腱周有无水肿、炎症反应              | 与腱周组织有无粘连 | 滑动度 |
|-------|--------------------------|-----------|-----|
| A1    | 无                        | 无         | 好   |
| A2    | 腱周水肿和炎症反应明显              | 有         | 差   |
| B1、B2 | 2 组之间无明显差异,较模型组水肿和炎症有所减轻 | 有         | 差   |
| C1    | 腱周水肿和炎症反应均减轻             | 有         | 差   |
| C2    | 水肿消失                     | 有         | 有   |
| D1    | 水肿消失、炎症反应明显减轻            | 有         | 有   |
| D2    | 水肿、炎症反应消失                | 轻度粘连      | 好   |

3.2 组织形态学 A1 显示肌纤维呈纵行排列,未见增生肥大、萎缩、断裂,无炎性细胞浸润;A2 和 B1 均显示纤维排列状态紊乱,呈波浪状且有部分断裂存在,其中部分变性坏死,炎性细胞浸润明显,成纤维细胞数量增多;B2 纤维紊乱,成波浪状,排列疏松,但较模型明显改善,有少量炎性细胞浸润,大量成纤维细胞存在,可见少量新生毛细血管;C1 纤维排列较前有序,仍有部分断裂,炎性细胞减少,少量成纤维细胞存在,新生毛细血管增多;C2 纤维排列有序,其中有小部分状态疏松,炎性细胞减少,数量明显少于 C1,大量成纤维细胞存在,新生毛细血管丰富;D1 纤维排列有序,但状态较为疏松,且有小部分断裂存在,炎性细胞减少,少量成纤维细胞分布,少量新生毛细血管分布;D2 肌纤维排列有序,炎性细胞消失,成纤维细胞减少,新生毛细血管减少。(见图 1)

3.3 bFGF 表达量测定 A1 跟腱组织中 bFGF 的表达量相对较少,A2 含量升高明显,差异有统计学意义。随着跟腱损伤的逐渐恢复,bFGF 的表达量也呈现逐渐降低的趋势。而进行推拿干预的跟腱组织,bFGF 表达量减少更明显,与 C1 比较,C2 明显降低,差异有统计学意义;与 D1 比较,D2 明显降低,差异有统计学意义。(见表 2)

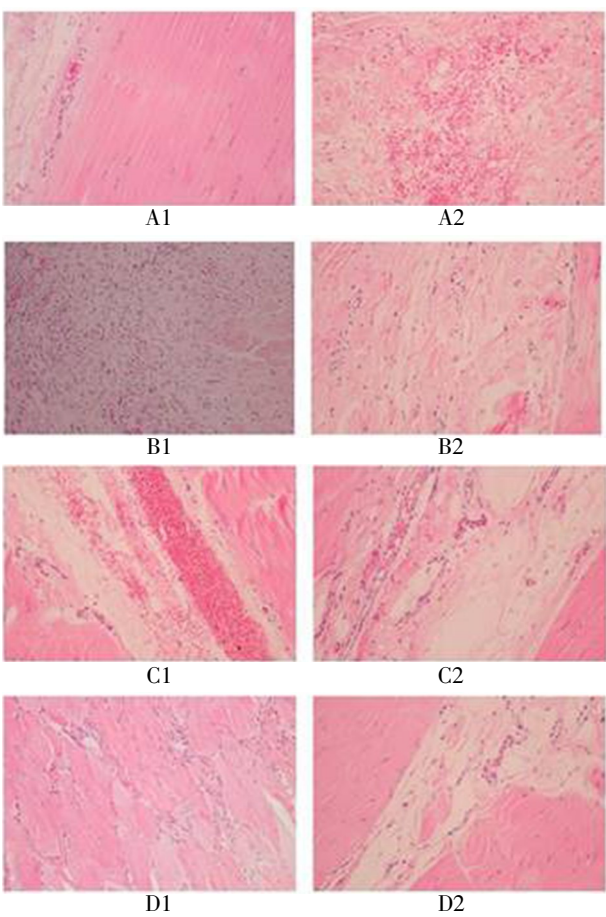


图 1 跟腱组织 HE 染色图(×100)

表 2 bFGF 表达量测定( $\bar{x}\pm s$ ,pg/ml)

| 组别 | 只数 | bFGF                    |
|----|----|-------------------------|
| A1 | 5  | 61.83±3.19              |
| A2 | 5  | 82.48±1.77 <sup>a</sup> |
| B1 | 4  | 78.76±2.54              |
| B2 | 4  | 71.38±8.60              |
| C1 | 5  | 74.29±2.73              |
| C2 | 5  | 66.85±6.08 <sup>b</sup> |
| D1 | 4  | 73.32±3.11              |
| D2 | 4  | 65.22±2.96 <sup>c</sup> |

注:与 A1 比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与 C1、D1 比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

4 讨论

肌腱末端病在中医学中属“筋伤”范畴,是指由于感受外邪、过度劳累以及损伤等原因导致血瘀、湿滞、寒凝等,其临床表现为肢体肿胀、疼痛或活动不利。“筋”指与骨相连的筋肌组织,有连络四肢百骸、主司运动关节的作用。基于筋“喜柔而不喜刚”“喜温而恶寒”“骨错筋挪,骨正筋柔”“筋骨濡则和,不濡则废”的四大特性,推拿疗法在中医理论的指导下,能针对“筋伤”所产生的挛急、瘀肿、疼痛、痿痹、骨错筋挪等特点进行治疗<sup>[11]</sup>。推拿治疗既可缓解筋肌紧张而止痛,又可消除痉挛而使活动功能恢复。因此,在临

床治疗中,推拿是缓解筋肌紧张、痉挛,调理筋肌状态平衡的有效方法。

本实验考虑到实验目的是观察推拿疗法对肌腱 bFGF 水平的影响与治疗肌腱末端病作用机制的研究,故拟采取跟腱注射 I 型胶原酶的方法建立在体肌腱末端病大鼠模型。临床上,肌腱末端病以慢性损伤为主,故未采用陈亮等<sup>[12]</sup>对肌腱切断后再缝合的手术治疗方法。鉴于实验对象无法很好地配合运动,且造模耗时太长,故也未采用 Soslowsky 等<sup>[13]</sup>运用跑台让实验动物下坡跑的方法建立模型。最后通过比较,本研究采取了操作简单、造模周期短、成功率高的跟腱注射胶原酶方法建立模型。

通过推拿手法作用于体表的经筋、皮部、经络,调整机体功能由异常向正常转归,具有调整脏腑、舒经通络、行气活血、理筋整复的作用。临床上,常见的推拿手法概括为摸、接、端、提、推、拿、按、摩,根据不同需要而选择一种或几种手法配合治疗。本实验选取力度比较轻柔缓和的按揉手法来实施干预,按法是用手指或手掌着力于体表,逐渐用力下压,按而留之;揉法是指以手指或手掌等部位在体表进行左右、上下或环旋揉动操作,本实验中选用拇指揉法,两者常与揉法结合起来运用,组成“按揉”复合手法。在实验过程中,对时间进行定量,每天对治疗组大鼠进行 10 min 的按揉操作;对力度进行定性,课题组令固定者根据大鼠的反应情况(包括强烈挣扎、撕咬、尖叫等为度)决定手法的力度。高玉峰等<sup>[14]</sup>以手法模拟仪为依据,对大鼠进行推拿治疗干预,虽然可保证在时间和力度均能定量,但考虑到每只大鼠的耐受不同,且人工推拿更接近于临床,课题组最终选择由专人在时间定量、力度定性的条件下进行干预。

bFGF 可诱导多种细胞的增殖与分化,对血管形成、促进创伤愈合与组织修复、组织再生及神经组织生长发育均有较好作用。bFGF 作为一种促细胞分裂的肝素结合蛋白,目前在细胞体外培养增殖、诱导分化以及体外组织再生领域有较大的应用潜力<sup>[15]</sup>,因此可作为检测肌腱修复的重要指标。有研究发现,肌腱损伤 1 周后 bFGF 开始表达,明显高于损伤后第 2、4、8 周,且损伤 2 周后 bFGF 对肌腱细胞的迁移和增殖促进作用最大,损伤 8 周后,bFGF 的表达停止并不再激活<sup>[16-17]</sup>。在肌腱愈合方面,bFGF 能够促进肌腱细胞分化,且在早期可促进指屈肌腱的血管再生以及抑制炎症反应<sup>[18]</sup>。此外,bFGF 能够促进肌腱的细胞生长,加速 III 型胶原合成,有助于肌腱损伤的愈合,且对愈合后肌腱的张力无影响<sup>[19]</sup>。本实验证实,bFGF 在正常肌腱中表达量相对较低,当肌腱损伤后,bFGF 的表达量呈现迅速增加趋势;随着肌腱损伤的不断愈合,表达量则逐渐下降,而推拿干预可促进肌腱的愈合,降低 bFGF 的含量。

课题组选择造模 2 周后进行干预,主要是由于此时胶原酶的功效得到了有效发挥,肌腱细胞亦逐渐开始增殖。但本研究大鼠样本量较少,检测结果可能存在误差相对较大的情况。同时治疗组缺乏阳性对照,无法对推拿与其他干预措施(包括针灸、中药内服、中药外敷等)对肌腱末端病的

治疗效果进行比较和评估。

## 参考文献

- [1] 史晓伟. 末端病非手术治疗研究进展[J]. 中国运动医学杂志,2017,36(1):70-75.
- [2] DIRKS RC, WARDEN SJ. Models for the study of tendinopathy[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact,2011,11(2):141-149.
- [3] PINGEL J, FREDBERG U, QVORTRUP K, et al. Local biochemical and morphological differences in human achilles tendinopathy: a case control study[J]. BMC Musculoskeletal Disorders,2012,13(1):53.
- [4] 魏驰,余黎,邓玲珑,等. 跟腱断裂合并跟腱末端病变的手术治疗[J]. 中国矫形外科杂志,2018,26(16):1516-1520.
- [5] 王刚,李莉,支世宝. 体外冲击波治疗末端病的研究进展[J]. 中国医药指南,2018,16(14):27-28.
- [6] 刘春雨,韩晓燕. 离心训练治疗跟腱末端病的系统评价[J]. 中国康复医学杂志,2016,31(1):71-76.
- [7] 印胜,钱宗彦. 痛血康胶囊外敷治疗末端病的疗效观察[J]. 临床医药文献杂志,2016,3(3):491-492.
- [8] 周世超. 两种方法治疗末端病十年观察[J]. 中医临床研究,2017,9(15):73-74.
- [9] 姜少伟,张富宏. 刃针闭合松解联合静力训练法治疗髌腱末端病的疗效观察[J]. 河北中医,2017,39(11):1722-1725.
- [10] LUI PP, WONG Y. Higher BMP/Smad sensitivity of tendon-derived stem cells (TDSCs) isolated from the collagenase-induced tendon injury model: possible mechanism for their altered fate in vitro[J]. BMC Musculoskelet Disord,2013,21(14):248.
- [11] 苏波,段田田,全乐,等. 基于筋的特性探讨推拿手法与筋伤的关系[J]. 北京中医药大学学报:中医临床版,2012,19(3):42-43.
- [12] 陈亮,尹良军,梁凯路. 大鼠跟腱损伤修复局部生长因子内源性表达变化的研究[J]. 重庆医学,2012,41(15):1476-1478.
- [13] SOSLOWSKY LJ, THOMOPOULOS S, TUN S, et al. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study[J]. J Shoulder Elbow Surg,2000,9(2):79-84.
- [14] 高玉峰,姚斌彬,吴剑聪,等. 推拿对大鼠坐骨神经损伤后 MAP-1 和 NF-M 表达的影响[J]. 中医药导报,2014,20(1):11-13.
- [15] 王远舫. bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子的研究现状与应用[J]. 科技创新与应用,2019(26):165-166.
- [16] LIU B, LUO C, OUYANG L, et al. An experimental study on the effect of safflower yellow on tendon injury-repair in chickens[J]. J Surg Res,2011,169(2):175-184.
- [17] WANG L, GAO W, XIONG K, et al. VEGF and bFGF expression and histological characteristics of the bone-tendon junction during acute injury healing[J]. J Sports Sci Med,2014,13(1):15-21.
- [18] 向磊,杨俊涛. 生长因子在动物肌腱损伤修复中的机制和治疗进展[J]. 临床骨科杂志,2014,17(6):734-738.
- [19] 龙晖,王愉思. 促进肌腱愈合的研究进展[J]. 现代医药卫生,2011,27(14):2160-2161.

(收稿日期:2020-09-24)