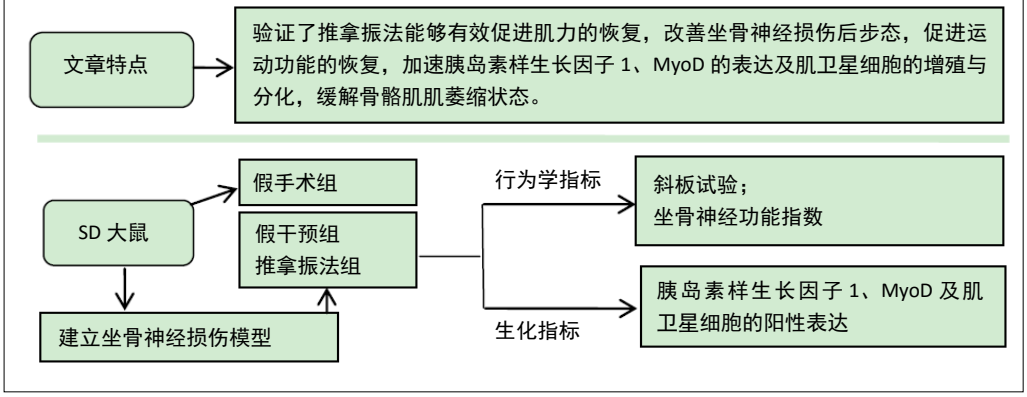
推拿振法干预坐骨神经损伤模型大鼠 MyoD 表达及肌卫星细胞的增殖与分化

https://doi.org/10.12307/2022.218
投稿日期：2020-11-26
送审日期：2020-12-02
采用日期：2021-01-16
在线日期：2021-07-26
中图分类号：
R446；R496；R318
文章编号：
2095-4344(2022)08-01160-07
文献标识码：B

孔亚敏[1]，严隽陶[2]，马丙祥[1]，李华伟[1]

文章快速阅读：



文题释义：

推拿振法：推拿手法是指以治疗、保健为目的，用手或肢体其他部位，采用推、拿、按、揉、捏等技巧动作，在身体的特定部位或腧穴等位置进行操作的方法。操作振法时将手指或手掌着力在体表，前臂和手部的肌肉强力地静止性用力，产生振颤动作，具有祛瘀消积、缓解痉挛、和中理气及消食导滞等作用。

周围神经损伤：指周围神经干或其分支意外受到外界直接或间接创伤而发生的损伤，导致躯干和肢体的运动、感觉及自主神经功能出现障碍的一种临床病症，严重影响患者的生活质量。目前动物实验中关于周围神经损伤的研究常采用较为粗大且便于观察的坐骨神经。

摘要

背景：推拿振法治疗周围神经损伤疗效明确，但其作用机制的相关研究较少。

目的：探讨推拿振法对周围神经损伤后再生的作用机制。

方法：将28只SD大鼠随机分成假手术组(8只)和模型组(20只)。模型组大鼠给予坐骨神经钳夹损伤建立坐骨神经损伤模型，再随机取4只进行模型鉴定后，将剩余大鼠随机分为假干预组(8只)与推拿振法组(8只)；假手术组仅开皮后缝合。分别于造模7 d后进行干预，推拿振法组用振动仪笔尖接触右下肢皮肤进行治疗，频率为8 Hz，1次/d，2 min/次，连续4周；假干预组振动仪仅接触皮肤，不给予推拿振法治疗；假手术组不做治疗。于干预后7，14，28 d行斜板试验及坐骨神经功能指数行为学指标检测，治疗28 d后取材行肌卫星细胞、胰岛素样生长因子1、MyoD生化指标检测。实验方案经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物实验伦理委员会批准。

结果与结论：①治疗7，14，28 d，假干预组和推拿振法组斜扳试验角度显著小于假手术组(均$P < 0.05$)；假干预组与推拿振法组的斜板试验角度整体呈上升趋势，但两组之间差异不明显($P > 0.05$)；②治疗14，28 d推拿振法组坐骨神经功能指数明显优于假干预组；③治疗28 d后推拿振法组肌卫星细胞、胰岛素样生长因子1、Myod的吸光度值均显著高于假干预组，假干预组高于假手术组(均$P < 0.05$)；④结果提示：推拿振法能促进大鼠运动功能的恢复，加速胰岛素样生长因子1、MyoD的表达及肌卫星细胞的增殖与分化，缓解骨骼肌肌萎缩状态，加速坐骨神经损伤后再生。

关键词：推拿；振法；周围神经；坐骨神经；肌卫星细胞；胰岛素样生长因子1；实验

Massage vibration intervenes with MyoD expression and proliferation and differentiation of muscle satellite cells in rats with sciatic nerve injury

Kong Yamin[1], Yan Juntao[2], Ma Bingxiang[1], Li Huawei[1]

[1]Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan Province, China; [2]Department of Tuina, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China

Kong Yamin, Master, Physician, Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Corresponding author: Yan Juntao, Chief physician, Department of Tuina, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China

[1] 河南中医药大学第一附属医院儿科，河南省郑州市 450000；[2] 上海中医药大学岳阳中西医结合医院推拿科，上海市 200000

第一作者：孔亚敏，女，1988 年生，河南省项城市人，2019 年上海中医药大学毕业，硕士，住院中医师，主要从事中西医结合康复的研究。

通讯作者：严隽陶，主任医师，上海中医药大学岳阳中西医结合医院推拿科，上海市 200000

https://orcid.org/0000-0002-8128-1523 (严隽陶)

基金资助：河南省特色骨干学科中医学学科建设项目 (STG-ZYXKY-2020023)，项目负责人：马丙祥；河南省中医药科学研究专项课题 (2019JDZX2006)，项目负责人：马丙祥

引用本文：孔亚敏，严隽陶，马丙祥，李华伟 . 推拿振法干预坐骨神经损伤模型大鼠 MyoD 表达及肌卫星细胞的增殖与分化 [J]. 中国组织工程研究，2022，26(8):1160-1166.

Abstract

BACKGROUND: Massage vibration therapy has definite effects on peripheral nerve injury. However, less is reported on its mechanism of action.

OBJECTIVE: To explore the mechanism of massage vibration on peripheral nerve regeneration after injury.

METHODS: Twenty-eight SD rats were randomly divided into sham operation group (*n*=8) and model group (*n*=20). Animal models of sciatic nerve injury were established in the model group by sciatic nerve clamping. Four rats in the model group were then randomly selected for model identification, and the remaining rats in the model group were randomly divided into sham intervention group (*n*=8) and massage vibration method group (*n*=8). In the sham operation group the skin was opened and sutured with no injury. The rats were intervened on the 7th day after modeling. In the massage vibration group, massage vibration was given using a vibrator by touching the skin of the right lower extremity at a frequency of 8 Hz, once a day, 2 min per time, for 4 consecutive weeks. In the sham intervention group, the vibrator only touched the skin but with no massage treatment. No treatment was given in the sham operation group. Incline plane test and behavioral indexes of sciatic function index were performed and measured after 7, 14, and 28 days of treatment, and muscle satellite cells, insulin-like growth factor 1, and MyoD biochemical index were detected after 28 days of treatment. The study protocol was approved by the Animal Experiment Ethics Committee of Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine.

RESULTS AND CONCLUSION: In the inclined plane test, the inclination angle of the sham intervention group and the massage vibration group was significantly smaller than that in the sham operation group after 7, 14, and 28 days of treatment ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the sham intervention group and the massage vibration group ($P > 0.05$). The sciatic function index value in the massage vibration group was significantly better than that in the sham intervention group after 14 and 28 days of treatment. The positive expression of muscle satellite cells, insulin-like growth factor 1, and MyoD in the massage vibration group was highest after 28 days of treatment, followed by the sham intervention group and sham operation group ($P < 0.05$). To conclude, massage vibration method can effectively promote the recovery of motor function, accelerate the expression of insulin-like growth factor 1 and MyoD, expedite the proliferation and differentiation of muscle satellite cells, alleviate skeletal muscle atrophy, and accelerate sciatic nerve regeneration after injury.

Key words: massage; vibration; peripheral nerve; sciatic nerve; muscle satellite cell; insulin-like growth factor 1; experiment

Funding: *The Discipline Construction Project of Traditional Chinese Medicine in Henan Province, No. STG-ZYXKY-2020023 (to MBX); Henan Province Traditional Chinese Medicine Scientific Research Special Project, No. 2019JDZX2006 (to MBX)*

How to cite this article: *KONG YM, YAN JT, MA BX, LI HW. Massage vibration intervenes with MyoD expression and proliferation and differentiation of muscle satellite cells in rats with sciatic nerve injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(8):1160-1166.*

0 引言 Introduction

周围神经损伤属于中医“痹症”“痿证”“筋伤”等范畴，会引起该神经所支配区域功能出现部分缺失，造成运动、感觉等功能障碍，部分患者甚至可能造成永久性损伤导致终身残疾，严重影响患者的生活质量[1-3]。有报道指出，2009–2018年周围神经损伤患者显著增加，预后差且致残率高[4-5]。因此如何治疗周围神经损伤成为国内外学者研究的热点。目前，周围神经损伤的治疗主要集中在促进神经再生、延缓失神经骨骼肌萎缩两个方面，但是效果均不能令人满意。有学者发现，推拿可以有效推动骨骼肌卫星细胞的分裂、增殖及分化[6-7]，缓解肌纤维变性，加速快肌纤维的修复，改善失神经后骨骼肌的结构异常和损伤状况，达到延缓失神经骨骼肌萎缩的效果[8]。由此，实验从推拿手法振法着手，探讨推拿振法对周围神经损伤后再生的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组对照，行为学评价重复测量方差分析，分子生物学评价单因素分析。

1.2 时间及地点 于2018年9月至2019年3月在上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物实验中心进行。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 体质量(140±10) g的4周龄健康清洁级雄性SD大鼠30只，由Shanghai Slack Laboratory Animals提供，合格证SCXK(沪)2012-0002。于实验前1周在上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物实验中心进行适应性饲养，许可证号SYXK(沪)2018-0040，5只/笼，12 h光照/12 h黑暗交替，自由进食饮水，室温(20±2) ℃，湿度(45±5)%。每周垫料、笼盒更换2次。实验操作严格遵守《关于善待实验动物的指导性意见》进行，依照实验动物的管理条例以及伦理委员会的相关规定执行。

1.3.2 实验仪器和试剂 2%戊巴比妥钠(上海新亚药业有限公司)；显微外科器械(江苏视卓)；甲醛、无水乙醇、氨水、二甲苯(上海国药集团)；石蜡切片机(徕克公司)；精密电子天平(江苏衡器厂)；DFS系列数显测力计(上海中医药大学研制)；拿捏手法特征参数采集系统(上海中医药大学研制)；IMS图像分析系统(基尔顿生物科技有限公司)；自制推拿手法操作模拟器(上海中医药大学与上海复旦大学联合研制)；CX41正置显微镜(日本OLYMPUS公司)；RM-6240BD多道生理信号处理系统。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 采用SPSS 24.0统计软件生成随机数字法，将28只SD大鼠随机分成假手术组(8只)和模型组(20只)，模型组取4只处死后行模型鉴定，随后将模型组大鼠随机分为假干预组(8只)、推拿振法组(8只)。

1.4.2 动物模型制备

模型组：参考文献[9]的方法建立坐骨神经损伤模型。SD大鼠(20只)用2%戊巴比妥钠(0.2 mL/kg)行腹腔注射麻醉，右侧下肢备皮后采取俯卧位置于固定台，常规消毒，无菌状态于坐骨切迹下约5 mm处沿坐骨神经走向做臀部横向切口，切口约1.5 cm，钝性分离筋膜及肌肉组织，使用撑开器撑开皮肤及肌肉后充分显露坐骨神经，显微手术器械对坐骨神经进行游离，在梨状肌下约10 mm处分别使用JZ06Cr14 cm止血钳3扣的压力钳夹神经干，钳夹3次，每次10 s，中间间隔10 s，即10 s钳夹+10 s间隔+10 s钳夹+10 s间隔+10 s钳夹，全程共50 s，钳夹后于显微镜下在损伤点上1 mm处用11-0的缝合线进行外膜标记，术后使用注射用青霉素钠消炎并缝合肌肉和皮肤，为保证实验的均一性，肌肉均缝一针，皮肤缝2针。所有的钳夹及缝合均由同一操作人员完成，术后30 min随机取4只大鼠止血钳夹伤神经进行苏木精–伊红染色，出现神经纤维断裂，神经束膜仍保持完整即为造模成功，见**图1–3**。

实验动物造模过程的相关问题	
造模目的	探讨推拿振法对周围神经损伤后再生的作用机制
动物来源及品系	雄性 SD 大鼠 30 只，由 Shanghai Slack Laboratory Animals 提供
模型与所研究疾病的关系	通过对坐骨神经损伤模型大鼠行为学及相关因子的检测，观察推拿振法对周围神经损伤后再生的影响
造模技术描述	参考文献 [9] 的方法建立坐骨神经损伤模型。麻醉大鼠，无菌状态于坐骨切迹下约 5 mm 处沿坐骨神经走向做臀部横向切口，钝性分离筋膜及肌肉组织，充分显露坐骨神经，显微手术器械对坐骨神经进行游离，在梨状肌下约 10 mm 处使用 JZ06Cr14 cm 止血钳 3 扣的压力钳夹神经干，钳夹 3 次，每次 10 s，中间间隔 10 s，钳夹后于显微镜下在损伤点上 1 mm 处用 11-0 的缝合线进行外膜标记，缝合肌肉和皮肤
动物数量及分组方法	将 28 只 SD 大鼠随机分成假手术组 (8 只)；模型组 (20 只，其中取 4 只处死后行模型鉴定)；随后将模型组大鼠随机分为假干预组 (8 只)、推拿振法组 (8 只)
造模成功评价指标	止血钳夹伤神经苏木精－伊红染色，出现神经纤维断裂，神经束膜仍保持完整即为造模成功
造模后实验观察指标	①大体观察；②斜板试验结果；③坐骨神经功能指数；④干预 28 d 后肌卫星细胞、胰岛素样生长因子 1、Myod 表达
造模后动物处理	干预 7，14，28 d 进行行为学检测；治疗 28 d 后麻醉下取右侧腓肠肌
伦理委员会批准	实验方案经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物实验伦理委员会批准

假手术组：采用与模型组相同的操作对 SD 大鼠坐骨神经进行游离，但不钳夹神经干。术后注射用青霉素钠消炎并缝合肌肉和皮肤，为保证实验的均一性，肌肉均缝一针，皮肤缝两针。手术及缝合均由同一操作人员完成。

1.4.3 干预方法 造模后第 7 天开始治疗干预。假干预组振动仪仅接触皮肤，不给予推拿振法治疗；假手术组不做治疗干预；推拿振法组给予推拿振法治疗。

推拿振法组：使用自制大鼠固定仪将大鼠固定，充分暴露右下肢，用振动仪 (联合复旦大学联合研制) 笔尖接触皮肤，振法参数设定：根据《中医推拿学》中局部振法的频率为 5−11 Hz，选择中间频率 8 Hz，1 次 /d，2 min/ 次，连续 4 周。每组于干预 7，14，28 d 进行行为学检测，于干预 28 d 后取材，进行化学指标检测。实验治疗干预及取材检测均在上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物实验中心进行。

1.4.4 大体观察 持续性观察大鼠术后伤口愈合及感染情况，足趾溃疡程度，失神经肌肉萎缩改变及神经横断后步态变化等情况。

1.4.5 斜板实验 参考文献 [10] 使用 Rivlin 方法检测振动治疗干预前后大鼠肢体的肌力状况。斜板实验仪器由一个四合板组成的矩形立体盒与一块矩形四合板通过连接轴连接而成。矩形四合板作为底板，与量角尺 0° 相齐平，矩形立体盒的底板与角度测量直尺齐平，矩形立体盒从水平位置绕连接轴缓缓上升，测量矩形四合板底板与矩形立体盒的底板之间的角度。测量在室温 (20±2) ℃、湿度 (45±5)% 的环境里进行，将大鼠头部保持向前，水平状态下，身体纵轴与矩形立体盒纵轴保持平行，缓缓上升矩形立体盒，逐渐增大矩形立体盒底板与矩形四合板之间的角度，直至大鼠不能在矩形立体盒底板上保持 5 s 而滑落，记录此时所形成的角度值。每只大鼠每次测量 5 次，取 5 个记录结果的平均值。见**图 4**。

1.4.6 坐骨神经功能指数 (SFI) 参考文献 [11-12] 制作一条宽约 10 cm、高约 15 cm、长约 60 cm、上不封顶的纸箱跑道，取 70 g 厚度、宽 10 cm、长 70 cm 的白纸铺满跑道，使大鼠双侧后肢蘸满墨水后置于跑道起始段，记录大鼠沿跑道跑向尾端行走时留下的脚印，每侧后肢留下五六个足印。测量时选择最为清晰的脚印进行测量，分别测量出患侧组 (E) 和正常足 (N) 的足印长度 (PL)、足趾宽度 (TS)、中间足趾宽度 (IT)，测量时精确到 mm，代入坐骨神经功能指数计算公式：SFI=109.5(ETS−NTS)/NTS−38.3(EPL−NPL)/NPL+13.3(EIT−NIT)/NIT−8.8，SFI=0 代表坐骨神经功能正常，SFI=−100 代表坐骨神经完全损伤。见**图 5**。

1.4.7 神经营养因子胰岛素样生长因子 1、Myod 及肌卫星细胞的阳性表达 治疗 28 d 后麻醉下取右侧腓肠肌称质量后，立即于腓肠肌肌腹部切取 3 mm×3 mm×10 mm 大小组织块，固定于 40 g/L 中性多聚甲醛溶液 4 ℃保存，经常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切片，经过脱蜡、水化、抗原修复及孵育、显色、苏木精染色并透明后，采用图像采集分析系统进行显微镜拍照，计算阳性表达吸光度值。

1.5 主要观察指标 ①大体观察；②各组大鼠各干预不同时间后斜板实验分析；③各组大鼠各干预不同时间后坐骨神经功能指数实验结果分析；④各组大鼠治疗 28 d 后肌卫星细胞、胰岛素样生长因子 1、MyoD 表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 24.0 软件包进行数据统计与分析，所有计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义，根据实验设计类型，行为学指标采用重复测量方差分析，分子生物学指标采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 采用 SD 大鼠 28 只，其中取 4 只处死后行模型鉴定，实验分为 3 组，实验过程无脱失，全部进入结果分析。

2.2 实验流程图 见**图 6**。

2.3 大体观察 造模手术后大鼠正常饮食，活动量减少，手术缝合处无感染现象。术后 3 d 假干预组及推拿振法组大鼠术侧下肢出现行走拖拉、无法弯曲的现象，其中部分 SD 大鼠存在足趾红肿。术后 1 周左右 SD 大鼠伤口基本痊愈结痂，无神经溃疡，部分大鼠存在咬指现象，术侧后肢不主动接触地面，腓肠肌萎缩，跳跃行走，肢体僵硬。

图 1 | 造模位置示意图
Figure 1 | Schematic diagram of modeling position

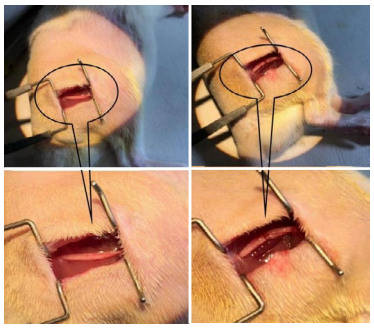
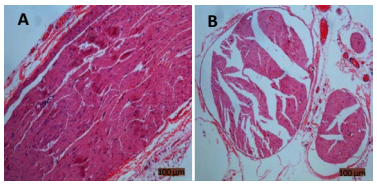


图 2 | 坐骨神经钳夹伤造模
Figure 2 | Model of sciatic nerve clamp injury



图注：图 A 为纵切；B 为横切。可见出现神经纤维断裂，神经束膜仍保持完整

图 3 | 神经钳夹伤后纵切和横切苏木精－伊红染色 (×100)
Figure 3 | Longitudinal and transverse sections after sciatic nerve clamp injury (hematoxylin-eosin staining, ×100)

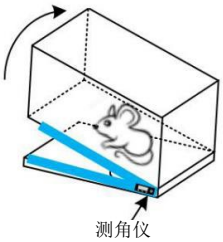
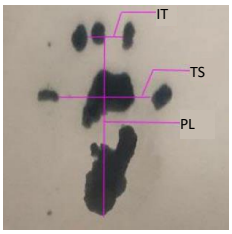


图 4 | 斜板实验示意图
Figure 4 | Schematic diagram of the inclined plane test



图注：IT 为中间足趾宽度；TS：足趾宽度；PL：足印长度
图 5 | 坐骨神经功能指数测量示意图
Figure 5 | Schematic diagram of sciatic nerve functional index measurement

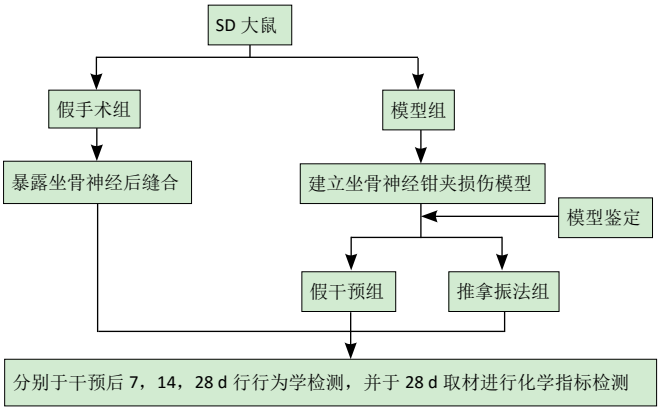
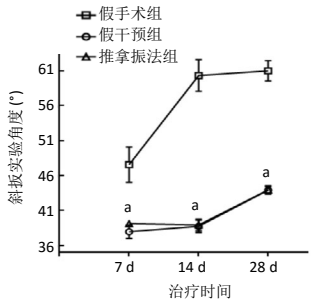


图 6 | 实验流程图
Figure 6 | Trial flow chart

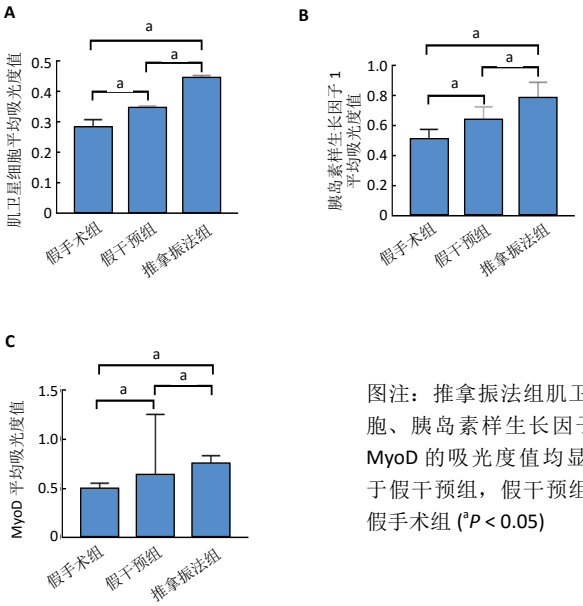
2.4 各组大鼠各干预不同时间后斜板实验分析 在治疗 7，14，28 d 后假干预组和推拿振法组与假手术组之间均有统计学差异 ($P < 0.05$)，但假干预组与推拿振法组之间差异不明显 ($P > 0.05$)，见**表 1**。由趋势图可见假干预组与推拿振法组的斜板实验角度整体呈上升趋势，且推拿振法组略高于假干预组，见**图 7**。



图注：与假手术组比较，$^aP < 0.05$
图 7 | 各组大鼠干预不同时间后斜板实验结果趋势图
Figure 7 | Trend chart of inclined plane test results of rats in each group after different intervention time

2.5 各组大鼠各干预不同时间后坐骨神经功能指数实验结果分析 在治疗 7，14，28 d 后假干预组和推拿振法组与假手术组之间差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)，治疗 7 d 假干预组与推拿振法组之间差异不明显 ($P > 0.05$)，治疗 14，28 d 假干预组与推拿振法组之间差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，见**表 2**。

2.6 各组大鼠治疗 28 d 后肌卫星细胞、胰岛素样生长因子 1、MyoD 表达 治疗 28 d 后假干预组和推拿振法组的肌卫星细胞、胰岛素样生长因子 1、MyoD 阳性表达与假手术组之间差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)，推拿振法组的肌卫星细胞、胰岛素样生长因子 1、MyoD 与假干预组比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)，见**表 3**，**图 8**。



图注：推拿振法组肌卫星细胞、胰岛素样生长因子 1、MyoD 的吸光度值均显著高于假干预组，假干预组高于假手术组 ($^aP < 0.05$)

图 8 | 各组大鼠肌卫星细胞 (A)、胰岛素样生长因子 1(B) 及 MyoD(C) 平均吸光度值比较
Figure 8 | Comparison of mean absorbance values of muscle satellite cells (A), insulin-like growth factor 1 (B), and MyoD (C) in rats

表 1 | 各组大鼠各干预不同时间后斜板实验结果 ($\bar{x}\pm s$，n=8，°)
Table 1 | Results of inclined plane test of rats at different intervention time

组别	治疗时间			F 值	P 值
	7 d	14 d	28 d		
假手术组	47.571±2.537	60.339±2.266	61.016±1.471	100.239	< 0.001
假干预组	37.980±0.951[a]	38.750±0.893[a]	43.943±0.523[a]	127.824	< 0.001
推拿振法组	39.128±0.343[a]	38.940±0.820[a]	43.960±0.609[a]	167.301	< 0.001
F 值	88.27	559.585	829.412		
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001		

表注：[a] 表示与假手术组相比差异有显著性意义

表 2 | 各组大鼠各干预不同时间后坐骨神经功能指数结果 ($\bar{x}\pm s$，n=8)
Table 2 | Sciatic function index results of rats at different intervention time

组别	治疗时间			F 值	P 值
	7 d	14 d	28 d		
假手术组	−17.229±5.609	−1.668±8.698	−2.133±11.679	7.725	0.003
假干预组	−81.147±9.703[a]	−78.277±6.216[a]	−55.351±7.734[a]	24.910	< 0.001
推拿振法组	−74.370±10.657[a]	−64.537±11.311[ab]	−44.360±6.894[ab]	19.436	< 0.001
F 值	123.726	165.295	77.726		
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001		

表注：[a] 表示与假手术组相比差异有显著性意义；[b] 表示与假干预组相比差异有显著性意义

表 3 | 各组大鼠治疗 28 d 后对肌卫星细胞、胰岛素样生长因子 1、Myod 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$，n=8，吸光度值)
Table 3 | Expression of muscle satellite cells, insulin-like growth factor 1, and MyoD in rats after 28 days of treatment

组别	肌卫星细胞	胰岛素样生长因子 1	Myod
假手术组	0.283±0.025	0.511±0.065	0.495±0.061
假干预组	0.346±0.007[a]	0.640±0.087[a]	0.635±0.619[a]
推拿振法组	0.444±0.009[ab]	0.783±0.107[ab]	0.749±0.085[ab]
F 值	212.047	19.064	26.225
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表注：[a] 表示与假手术组相比差异有显著性意义；[b] 表示与假干预组相比差异有显著性意义

3 讨论 Discussion

《医宗金鉴 • 正骨心法要旨》中指出：“若肿痛已除，伤痕已愈，其中或有筋急而转摇不甚便利，或有筋纵而运动不甚自如……而气血之流行未畅……惟宜推拿，以通经络气血也”，表明推拿能够调节气血，具有理筋通脉之效。环跳穴，又称为髋骨、环谷、髀枢等，位于足少阳胆经，髂后上脊与坐骨结节连线的中点处。《针灸甲乙经》对此穴进行解释：“腰胁相引痛急……肢痛不可屈伸……环跳主之”。环跳穴位于臀大肌的深层，其下为梨状肌，坐骨神经由梨状肌下孔穿出。当坐骨神经受到损伤时，其所支配区域的肌肉便会瘫痪，导致肌肉营养缺失，引起肌肉失神经萎缩。环跳穴具有祛风除湿、通经活络以及调和气血的功效，在临床上可以治疗下肢萎痹、腰腿疼痛等症，是治疗坐骨神经损伤的常用之穴。

推拿是以中国传统中医经络理论为基础、以现代局部解剖学理论为依托的中国传统康复手法，已被证实在延缓失神经支配的骨骼肌萎缩方面起着关键作用，并广泛应用于临床实践[13]。刘艳等[14]对推拿病谱进行研究发现，推拿治疗骨骼肌系统疾病的相关文献呈逐年上升趋势。周围神经受损后会抑制抗氧化酶活性，表达神经炎症反应，诱导神经的组织学和超微结构发生改变，产生骨骼肌萎缩，进而导致运动功能障碍。有研究发现，周围神经受到损伤后，其所支配的骨骼肌内血管发生明显改变，管壁变硬，管腔畸形，微循环床的毛细血管及细胞发生显著的结构重塑，肌肉萎缩程度与毛细血管网的减少及结缔组织内的纤维增生有关。长期的失神经支配，导致肌细胞膜上的运动终板发生改变，促使分裂不断减少，直到消失[15]。由于神经的生长速度极为缓慢，平均为 1 mm/d，常在取得神经的再支配之前，骨骼肌肌细胞已无再生能力[16]。因此，如何缓解失神经骨骼肌变性、维持肌细胞活性，成为周围神经损伤后其支配区域结构及功能得以恢复的关键。

大鼠坐骨神经钳夹伤后，出现坐骨神经损伤后典型步态、右侧下肢足趾并拢无法伸展、关节僵硬无法屈曲、足背背伸无法回缩等现象，行走时右侧下肢呈拖拉样行走，或跳跃样行走。坐骨神经受损后由于其所支配区域的腓肠肌缺乏营养支持，导致右侧下肢肌肉出现不同程度的萎缩。术后 2 周，大鼠右后肢能主动接触平面，但不主动持重，患侧下肢足趾红肿，可能与周围神经损伤后许旺细胞的分化，巨噬细胞清除碎片并在神经微循环中持续存在，释放出大量的炎性细胞有关[17]，部分大鼠处现咬指现象，可能与周围神经损伤后其运动、感觉功能受损有关；术后 3 周，大鼠主动持重，步态改善，可能与神经的修复以及神经对靶器官的再支配有关。

斜板试验和坐骨神经功能指数是实验中用于评价坐骨神经损伤以及肌力恢复情况的重要指标。当坐骨神经钳夹伤后，由于肌肉缺乏营养支持萎缩变性，必然会导致肢体肌力下降，从而影响大鼠对斜板的抓力。当肌体受到对非对称性的机械振动时，中枢神经系统便会发出信号，使中枢神经系统一定程度上得到协作功能改善，轴突重塑，从而达到促进周围神经萎缩后肌力缓解的目的[18]。坐骨神经功能指数是通过对大鼠后肢足印分析，对坐骨神经损伤后修复再生以及步态进行分析的评定指标，具有一定的科学性和重复性，可以较好地对坐骨神经运动功能进行评价。研究表明，在目标肌肉上使用局部振动可以增强人体的肌肉力量，改善髋关节外展受限，缓解痉挛[19-20]。此次研究发现假干预组与推拿振法组的斜板试验角度整体呈上升趋势，提示受损的坐骨神经处于不断恢复状态，且推拿振法组略高于假干预组，说明推拿振法组斜板试验结果略优于假干预组，但两者之间无明显统计学差异，可能与右侧后肢坐骨神经受损后，长时间的运动障碍引起大鼠肢体在一定程度上的代偿作用有关；所以研究中将斜板试验结果与坐骨神经功能指数结果相结合发现，治疗 14，28 d 推拿振法组坐骨神经功能指数结果明显优于假干预组，这可能与振动能够缓解痉挛状态、提高运动功能有关。

周围神经损伤后修复是一个复杂的综合作用的结果，失神经后的骨骼肌萎缩及再生是在多因素、多基因高度动态调控的过程中进行的，该过程需要大量的神经生长因子以及炎

性细胞因子协同作用[21]。研究表明，骨骼肌的再生与肌卫星细胞的增殖存在密切关系，肌卫星细胞的增殖受生长因子、成肌调控因子等综合作用的影响，因此胰岛素样生长因子1、MyoD是研究失神经骨骼肌萎缩的重要指标[22-23]。胰岛素样生长因子1属于胰岛素多肽家族，是骨骼肌损伤后修复的重要调节因子。大量文献显示，胰岛素样生长因子1能够激活肌卫星细胞并促进肌卫星细胞的分化增殖，调控骨骼肌蛋白质合成，缓解骨骼肌纤维化，促进神经生长，调节微循环血管再生，为神经、肌肉的修复提供营养支持[24-25]。有学者指出，胰岛素样生长因子1在骨骼肌发育成熟后的表达水平较低，但在骨骼肌发育期间有着较高的表达[26-28]。骨骼肌损伤一定程度上会造成胰岛素样生长因子1的表达出现应激性增加，对肌卫星细胞的激活起到促进作用，诱导成肌纤维的增殖，加速骨骼肌损伤后修复。但是当坐骨神经损伤后，骨骼肌胰岛素样生长因子1表达持续保持在一个较低的水平，从而导致失神经骨骼肌萎缩成为一种不可逆性损伤。MyoD、Myf-5、Myf-6及Myogenin是成肌调节因子的重要组成部分，在肌肉生长发育过程中参与分子调控过程[29]。在成熟的肌肉组织中，MyoD的含量较少，但是在发育及再生过程的肌肉组织中，MyoD的水平较高，MyoD能够促使肌卫星细胞向成肌细胞转化，因此MyoD被认为是一个能够很好的观察肌卫星细胞激活状态的标记蛋白。周围神经损伤后，缺乏营养支持的骨骼肌发生萎缩，MyoD的蛋白水平被迅速上调，使保持静止状态的肌卫星细胞被大量激活，促使肌卫星细胞向成熟的肌纤维转化，加速骨骼肌的再生，达到延缓失神经骨骼肌萎缩的目的[30]。在此次研究中，推拿振法组胰岛素样生长因子1、MyoD在治疗28 d后与假干预组之间均有统计学差异，这可能与推拿振法能够促进胰岛素样生长因子1及MyoD的大量增殖，缓解失神经后骨骼肌萎缩有关。

肌卫星细胞分布于肌膜与肌细胞基底膜之间，是具有骨骼肌特异性的成体干细胞，具有很强的自我更新能力及大量增殖能力，在肌肉的再生和恢复进程中扮演着重要角色[31-33]。肌卫星细胞通过转录因子$Pax7^+$表达，其与肌纤维之间存在紧密的联系[34]。一般情况下，骨骼肌卫星细胞处于静止状态。当骨骼肌受到损害时，静止状态的卫星细胞便被激活、增殖，变成具有修复肌肉形态结构的成肌纤维，达到调控肌肉再生的目的[35]。当肌肉修复工作完成，肌卫星细胞便会再次进入休眠状态。唐芳等[36]通过对大鼠钝挫伤后骨骼肌卫星细胞体外增殖情况进行研究发现，钝挫伤大鼠在第8天时可见大量肌卫星细胞增殖，部分肌卫星细胞发生融合，形成肌管，而空白组大鼠肌卫星细胞增值速度缓慢，表明骨骼肌一定程度的损伤能够激活骨骼肌卫星细胞，促进骨骼肌卫星细胞的分化增殖。RODRIGUES等[37]对长期失神经支配的骨骼肌肌卫星细胞及肌细胞进行观察发现，在第7周及第16周时，由肌卫星细胞发生融合作用再生的肌管明显增多，但在20−30周后，肌卫星细胞的百分比出现缓慢下降趋势，直至下降至不足正常值的1/5，提示当大鼠骨骼肌失神经后，肌肉组织缺乏营养支持发生萎缩，除此之外，也会伴随一定的肌纤维丢失，长期的失神经状态，分裂增殖的肌卫星细胞无法达到成熟，从而造成肌纤维基底膜的崩解，由于肌肉失神经萎缩，病理状态下持续刺激Pax7+的表达，导致肌卫星细胞无法重新进入静止状态，肌卫星细胞的异常增殖可能会导致卫星细胞池的耗尽，从而进一步影响骨骼肌失神经萎缩。

此次研究发现，推拿振法组肌卫星细胞的变化趋势基本与胰岛素样生长因子1及MyoD一致，可能与推拿振法通过调控胰岛素样生长因子1、MyoD的表达作用，抑制炎性细胞的产生，改变离子通道活性，促进周围神经损伤后修复，激活肌卫星细胞大量增殖，缓解肌肉萎缩有关，伴随肌卫星细胞的大量增殖，也刺激了胰岛素样生长因子1及MyoD的分泌及表达。

综上所述，推拿振法能够有效促进肌力的恢复，改善坐骨神经损伤后步态，促进运动功能的恢复，加速胰岛素样生长因子1、MyoD的表达及肌卫星细胞的增殖与分化，缓解骨骼肌肌萎缩状态。但周围神经损伤后修复的机制是多种因素综合作用的结果，研究只是对行为学及相关因子进行检测，在以后的研究中，可将宏观与微观相结合，从坐骨神经损伤后运动能力、电生理、炎症因子等分子水平对其作用机制进一步探讨。

作者贡献：研究为第一作者和通讯作者共同设计，全体作者参与实验，第一作者对结果数据进行分析、成文及修改，通讯作者审校。

经费支持：该文章接受了“河南省特色骨干学科中医学学科建设项目(STG-ZYXKY-2020023)”及“河南省中医药科学研究专项课题(2019JDZX2006)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：统计学方法已经上海中医药大学岳阳中西医结合医院统计学专家审核。

4 参考文献 References

[1] PIOVESANA R, FARONI A, TATA AM, et al. Schwann-like adipose-derived stem cells as a promising therapeutic tool for peripheral nerve regeneration: effects of cholinergic stimulation. Neural Regen Res. 2021;16(6):1218-1220.

[2] LI L, XU Y, WANG X, et al. Ascorbic acid accelerates Wallerian degeneration after peripheral nerve injury. Neural Regen Res. 2021; 16(6):1078-1085.
[3] GARG K, SINHA S, SATYARTHEE GD, et al. Microsurgical Outcome of Post-traumatic Peripheral Nerve Injuries: An Experience of 23 Cases and Review of Literature. Turk Neurosurg. 2016;26(2):297-301.
[4] LI NY, ONOR GI, LEMME NJ, et al. Epidemiology of Peripheral Nerve Injuries in Sports, Exercise, and Recreation in the United States, 2009-2018. Phys Sportsmed. 2020;10(23):1-8.
[5] GOSWAMI N, ALEEM M, MANDA K, et al. Clinical relevance of chronic neuropathic pain phenotypes in mice: A comprehensive behavioral analysis. Behave Brain Resk. 2020;10(5):113055
[6] 卢裕强 , 郭汝宝 . 推拿手法对家兔骨骼肌失神经支配后成肌调节因子 Myf-5,Myogenin 表达的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志 ,2019, 29(12):979-984.
[7] 陆永嘉 , 严隽陶 , 马书杰 , 等 . 全程与间断推拿对延缓失神经大鼠骨骼肌萎缩的实验研究 [J]. 上海中医药杂志 ,2017,51(10):97-99.
[8] 赵娜 , 张玮 , 庞赓 , 等 . 基于 TGF-β1/CTGF 作用途径探讨推拿干预骨骼肌纤维化的作用机制 [J]. 辽宁中医杂志 ,2016,43(12):2539-2541.
[9] JANG MS, HAN JH, KIM DO, et al. Dexmedetomidine Improves Locomotor Function and Alleviates Thermal Hyperalgesia Following Sciatic Nerve Crush Injury in Rats. Int Neurourol J. 2020;24(Suppl 1): S11-18.
[10] RIVLIN AS, TATOR CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. J Neurosurg. 1977;47(4):577-581.
[11] TSUANG FY, CHEN MH, LIN FH, et al. Partial enzyme digestion facilitates regeneration of crushed nerve in rat. Transl Neurosci. 2020;11(1): 251-263.
[12] DE SOUZA LG, HENDLER KG, MARCOLINO AM, et al. Photobiomodulation promotes neural regeneration when compared to simvastatin treatment in a sciatic nerve crush model. Lasers Med Sci. 2020 Nov 18. doi: 10.1007/s10103-020-03176-y.
[13] 马颖 , 严隽陶 , 马书杰 , 等 . 推拿联合跑轮训练对大鼠失神经骨骼肌萎缩的效果 [J]. 中国康复理论与实践 ,2018,24(5):530-534.
[14] 刘艳 , 谭曾德 , 刘琳 , 等 . 肌肉骨骼系统推拿病谱文献学研究 [J]. 中医药信息 ,2011,28(2):133-134.
[15] WONG A, GARCIA SM, TAMAKI S, et al. Satellite Cell Activation and Retention of Muscle Regenerative Potential After Long Term Denervation. Stem Cells. 2020;10(16):1-18.
[16] YOSHIMURA K, HARII K. A Regenerative Change during Muscle Adaptation to Denervation in Rats. J Surg Res. 1999;81(2):139-146.
[17] ANNE SJ, ALEXANDRA H, ROSIN NL, et al. Macrophages Regulate Schwann Cell Maturation after Nerve Injury. Cell Rep. 2018;24(10): 2561-2572.
[18] DE OLIVEIRA PA, BLASCZYK JC, SOUZA JUNIOR G, et al. Effects of Elastic Resistance Exercise on Muscle Strength and Functional Performance in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Phys Act Health. 2017;14(4):317-327.
[19] ALGHADIR AH, ANWER S, ZAFAR H,et al.Effect of localised vibration on muscle strength in healthy adults: A systematic review.Physiotherapy. 2018;104(1):18-24.
[20] TSUTSUMI S, URABE Y, MAEDA N, et al. The transition of tensor fasciae latae and iliotibial band hardness after hip abduction exercise and the effect of vibration stimulation. Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine. 2018;67(3):219-223 .
[21] JIAHUI A, XIANG Z, KEQI J, et al. Trichostatin A increases BDNF protein expression by improving XBP-1s/ATF6/GRP78 axis in Schwann cells of diabetic peripheral neuropathy. Biomed Pharmacother. 2021;133: 111062.
[22] 陈玄 , 叶笑然 , 黄晓卿 , 等 . 电针对大鼠失神经支配骨骼肌萎缩及 IGF-1/PI3K/AKT 表达的影响 [J]. 中国针灸 ,2018,38(12):62-68.
[23] AGUERA E, CASTILLA S, LUQUE E, et al. Denervated muscle extract promotes recovery of muscle atrophy through activation of satellite cells. An experimental study. J Sport Health Sci. 2019;8(1):23-31.
[24] LANG F, ARAVAMUDHAN S, NOLTE H, et al. Dynamic changes in the skeletal muscle proteomeduring denervation-induced atrophy. Dis Model Mech. 2017;10(7):881-896.
[25] YOSHIDA T, DELAFONTAINE P. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. Cells. 2020; 9(9):1970.
[26] CONG XX, GAO XK, RAO XS, et al. Rab5a activates IRS1 to coordinate IGF-AKT-mTOR signaling and myoblast differentiation during muscle regeneration. Cell Death Differ. 2020;27(8):2344-2362.
[27] GU LJ, ZHANG YY, WANG L, et al. Changes of insulin-like growth factor 1 axis in chronic kidney disease and its role in skeletal muscle atrophy. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2018;98(10):749-754.
[28] YIN L, LIN LU, LIN X, et al. Crucial role of androgen receptor in resistance and endurance trainings-induced muscle hypertrophy through IGF-1/ IGF-1R- PI3K/Akt- mTOR pathway. Nutr Metab (Lond). 2020;17:26.
[29] ZAMMIT PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. Semin Cell Dev Biol. 2017;72:19-32.
[30] TSUKAMOTO S, SHIBASAKI A, NAKA A, et al. Lactate Promotes Myoblast Differentiation and Myotube Hypertrophy via a Pathway Involving MyoD In Vitro and Enhances Muscle Regeneration In Vivo. Int J Mol Sci. 2018;9(11):3649.
[31] ZHAO Y, CHEN M, LIAN D, et al. Non-Coding RNA Regulates the Myogenesis of Skeletal Muscle Satellite Cells, Injury Repair and Diseases. Cells. 2019;8(9):988.
[32] MUSARÒ A, CAROSIO S. Isolation and Culture of Satellite Cells from Mouse Skeletal Muscle. Methods Mol Biol. 2017;1553:155-167.
[33] FUJIMAKI S, SEKO D, KITAJIMA Y, et al. Notch1 and Notch2 Coordinately Regulate Stem Cell Function in the Quiescent and Activated States of Muscle Satellite Cells. Stem Cells. 2018;36(2):278-285.
[34] FENG X, NAZ F, JUAN AH, et al. Identification of Skeletal Muscle Satellite Cells by Immunofluorescence with Pax7 and Laminin Antibodies. J Vis Exp. 2018;(134):57212.
[35] YASUO K, YUSUKE O. Visualization of PAX7 protein dynamics in muscle satellite cells in a YFP knock-in-mouse line. Skeletal Muscle. 2018;8(1): 26-32.
[36] 唐芳 , 高品操 , 潘同斌 . 钝挫伤对大鼠骨骼肌卫星细胞体外增殖的影响 [J]. 中国老年学杂志 ,2017,37(5):1091-1093
[37] RODRIGUES ADE C, SCHMALBRUCH H. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. Anat Rec. 1995;243(4):430-437.

(责任编辑：WZH，ZN，SX)