

电针“委中”穴对大鼠腰多裂肌损伤后的再生促进作用及对 IGF-1 表达的影响

彭园园 张莉 刘通 陈玉佩 葛东宇 毛颖秋

【摘要】 目的 观察电针委中穴对腰部多裂肌损伤后的干预作用及对胰岛素样生长因子 1 (insulin like growth factor 1, IGF-1) 表达的影响, 探求委中穴对大鼠腰肌损伤后再生修复的可能机制。**方法** 雄性 SD 大鼠 120 只, 随机分为空白组、模型对照组、模型组、电针委中组、电针肾俞组, 共 5 组, 观察 3 个时间点 (4 天、7 天、14 天) 的变化, 每个时间点 8 个样本。将 0.5% 布比卡因盐酸盐溶液按每点 100 μ L 注射于模型组和电针组大鼠 L4、L5 水平的多裂肌上。模型对照组采用同样方法注射生理盐水, 空白组不做处理。造模后进行电针双侧委中穴或肾俞穴分别治疗 4 天、7 天、14 天, HE 染色观察肌细胞形态学的改变, 免疫组化方法检测肌细胞 IGF-1 的表达。**结果** 造模前后多裂肌形态学改变显著, 损伤后第 14 天仍未完全恢复。电针委中组与电针肾俞组从形态学上优于模型组。第 4、7 天模型组多裂肌 IGF-1 的表达显著高于空白组 ($P < 0.01$); 第 4 天电针委中组表达显著高于模型组 ($P < 0.01$), 电针委中组表达高于电针肾俞组 ($P < 0.05$), 电针肾俞组表达高于模型组 ($P < 0.05$), 而在第 14 天, 电针肾俞组表达显著高于模型组与电针委中组 ($P < 0.01$)。**结论** 电针委中穴和电针肾俞穴均能够促进大鼠腰多裂肌损伤后的再生, 电针委中穴在肌肉损伤的早期效果显著。

【关键词】 电针; 多裂肌损伤; 布比卡因; 委中; 肾俞; 胰岛素样生长因子 1

【中图分类号】 R245 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.05.001

Effect of electroacupuncture at BL40 on morphology repairment and IGF-1 expression in rats with multifidus muscle injury PENG Yuan-yuan, ZHANG Li, LIU Tong, et al. School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: ZHANG Li, E-mail: zhangli1572@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of electroacupuncture on multifidus muscle injury by morphological observation and insulin like growth factor 1 (IGF-1) expression of rats with bupivacaine induced multifidus muscle toxicity, and discuss the possible mechanism of muscle tissue regeneration. **Methods** 120 male Sprague Dawley rats were randomly divided into blank group (BG), model control group (CG), model group (MG), Weizhong (BL40) electroacupuncture group (WG) and Shenshu (BL23) electroacupuncture group (SG), each group then was divided evenly into three time points (day4, day7 and day14) and each time point has 8 samples. Multifidus muscle (L4 and L5 sections) toxicity was established by injecting 0.5% bupivacaine hydrochloride, and normal saline injection as control (CG). The WG and LG accepted electroacupuncture for 4d, 7d or 14d after modeling. The multifidus muscle of each rodent was stained with HE to observe pathological changes, and immune-histochemical staining was used to observe IGF-1 expression. **Results** Bupivacaine caused a process of degeneration-regeneration of the muscle fibers and did not normalize at day 14. WG and SG were recovered faster than MG. The expression

基金项目: 国家自然科学基金 (81141120)

作者单位: 100029, 北京中医药大学针灸推拿学院 [彭园园 (硕士研究生)、张莉、刘通 (博士研究生)、陈玉佩 (硕士研究生)], 基础医学院 (葛东宇), 科研实验中心 (毛颖秋)

作者简介: 彭园园 (1988 -), 女, 2012 级在读硕士研究生。研究方向: 针灸临床机理研究。E-mail: 175808605@qq.com

通讯作者: 张莉 (1957 -), 女, 博士, 博士生导师, 教授。研究方向: 针灸临床机理研究。E-mail: zhangli1572@sina.com

of IGF-1 at day 4 ranked as MG higher than BG ($P < 0.01$), WG higher than MG and SG ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and SG higher than MG ($P < 0.05$), while ranked as SG higher than MG and WG ($P < 0.01$) at day 14. Conclusion Electro-acupuncture at both BL40 and BL23 could promote the regeneration of tissue after multifidus muscle injury, and it seems better therapy effect when electro-acupuncture at BL40.

【Key words】 Electro-acupuncture; Multifidus muscle injury; Bupivacaine; BL40; BL23; IGF-1

位于腰部竖脊肌深面的多裂肌是稳定腰椎的“钢索”。以多裂肌为代表的腰部骨骼肌功能紊乱或损伤可导致各种急慢性腰痛^[1-2]。研究表明,急性或慢性腰痛患者其多裂肌的 I 型和 II 型纤维会发生异常改变并伴有脂肪浸润或出现多裂肌的萎缩。L4、L5 节段的多裂肌对脊柱的稳定性贡献最高,达 70% 以上^[3]。因此,多裂肌损伤后的修复尤为重要。四总穴歌中的“腰背委中求”是委中穴治疗腰背部疾病存在独特疗效的临床经验总结,也体现了“经脉所过,主治所及”的取穴原则。胰岛素样生长因子 1 (insulin like growth factor 1, IGF-1) 可以促进肌卫星细胞的增殖,并且选择性的表达生肌调节因子。IGF-1 是目前确定的唯一一种既参与肌卫星细胞的增殖又参与肌母细胞分化的生长因子^[4]。前期实验证明电针委中穴能够促进兔腰肌急性钝挫伤后碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、结蛋白 (desmin) 以及细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的表达^[5]。说明委中穴对腰肌急性钝挫伤有促进再生修复的作用。本实验进一步观察电针委中穴对布比卡因所致大鼠腰多裂肌毒性损伤后的再生修复作用及对 IGF-1 表达的影响,进一步探求委中穴对腰部肌肉损伤后再生修复的部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级健康成年雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 120 只,体重 300 ~ 350 g。由北京维通利华实验动物中心提供,许可证号:SCXK (京) 2012-0001。分笼饲养,明暗周期 12 小时,自由饮食和饮水,环境温度 24℃,湿度 40 ~ 50%,适应性饲养 7 天。大鼠按体重分层,随机分为:空白组、模型对照组、模型组、电针委中组和电针肾俞组各 24 只,再随机分为三个时间点 4 天、7 天、14 天,每组各 8 只。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 仪器 G6805-1 电针治疗仪 (青岛鑫升实业有限公司); RM2235 石蜡切片机 (德国 LEICA 公司); DH-101 电热恒温鼓风干燥箱 (北京利康科技

发展有限公司); BX43 显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); Mshot MC50 显微成像系统 (广州市明美科技有限公司)。

1.2.2 试剂 布比卡因盐酸盐 (美国 sigma-FLUKA 公司,生产批号:B5274-1G); IGF-1 抗体 (美国 millipore 公司,生产批号:05-172); 小鼠超敏二步法检测试剂盒 (中杉金桥,生产批号:PV-9002)。

1.3 模型的建立和处理方法

1.3.1 造模 模型组和电针组大鼠 10% 水合氯醛腹腔注射 (350 mg/kg) 麻醉后,选择双侧脊柱 L4、L5 水平两旁的 4 个点,使用一次性 4 号针头注射器抽取 0.5% 布比卡因溶液,针头紧贴棘突旁进入肌肉,直到接触关节突和乳突所在的骨面回抽套管 1mm 无血,表明针头已到达多裂肌后注射布比卡因溶液 400 μ L (100 μ L \times 4),时间不得小于 3 秒,以利于药物的吸收^[6],单次造模完成。模型对照组采用同样办法注射生理盐水。

1.3.2 处理方法 电针委中组和电针肾俞组从造模后的第 2 天开始干预,将大鼠固定在特制的固定器上,分别暴露后肢和背部。采用华佗牌 0.30 \times 13 mm 一次性针灸针,直刺进针后连接电针仪,频率 2/10 Hz 疏密波,电流 1 ~ 2 mA,持续 20 分钟,每天 1 次,直至取材前 1 天。参照《实验针灸学》^[7] 常用实验动物穴位图谱,分别选取双侧“委中穴” (膝关节背面正中) 和双侧“肾俞穴” (第 2 腰椎旁开 7 mm)。

1.4 取材

分别在造模后的第 4 天、7 天、14 天每组同步取材 8 只。10% 水合氯醛腹腔注射 (350 mg/kg) 麻醉后,剔除背部皮毛、筋膜,充分暴露腰部肌肉,剥离最长肌和髂肋肌,锐性切取 L4 和 L5 水平多裂肌组织,置 4% 多聚甲醛溶液中固定。

1.5 指标检测

1.5.1 HE 染色 4% 多聚甲醛溶液固定 48 小时以上,石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察形态学变化。

1.5.2 免疫组化染色 将切片 60℃ 烤片 2 小时,常规二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,热修复抗原, PBS 冲洗,过氧化氢封闭 10 分钟,滴加一抗, 4℃ 孵育 16 小

时,加二抗,DAB 显色,显微镜下观察,出现棕黄色后即把切片放入自来水冲洗终止反应。脱水透明,中性树胶封片。利用无偏体视学技术,光镜下(400×)全视野无偏采样方法每张切片选取 3 个视野,采用 image-professional plus 6.0 软件进行图像分析,测量每个视野中 IGF-1 阳性表达区域的平均光密度值(mean optical density, MOD),取平均值为该样本 MOD 值。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理。各组数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),各组均服从正态分布,且方差齐,组间比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学变化

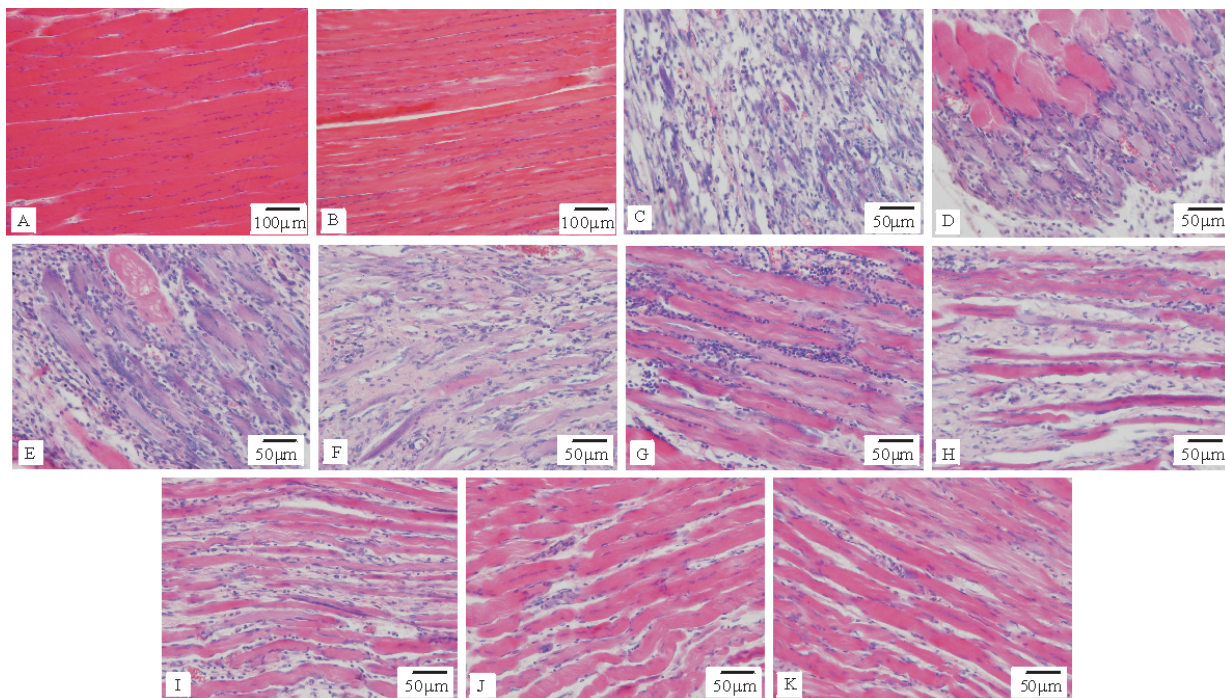
如图 1 所示:空白组和模型对照组多裂肌 HE 染色:肌细胞呈细长纤维状,排列整齐,细胞核均匀的分布在细胞周围。模型组:造模后第 4 天可见肌纤维广泛变性坏死,此时,大部分坏死的肌纤维已被巨噬细胞吞噬,坏死区可偶见散在的未受损纤维束,电针委中组和电针肾俞组可见少量的新生幼稚纤维。至第 7 天,出现更多的新生红色肌纤维,且直

径变大;委中组较肾俞组可见较多的红色新生条状纤维。至第 14 天,新生的肌纤维已接近正常肌纤维的形态,平行排列,部分中央核开始向细胞周围迁移分化为成熟的肌纤维。由图可见,在同一时间内,电针委中组与电针肾俞组的肌纤维再生程度优于模型组,尤其是电针委中组。从形态学上说明电针委中/肾俞可加快肌细胞的再生。

2.2 免疫组化 IGF-1 的表达

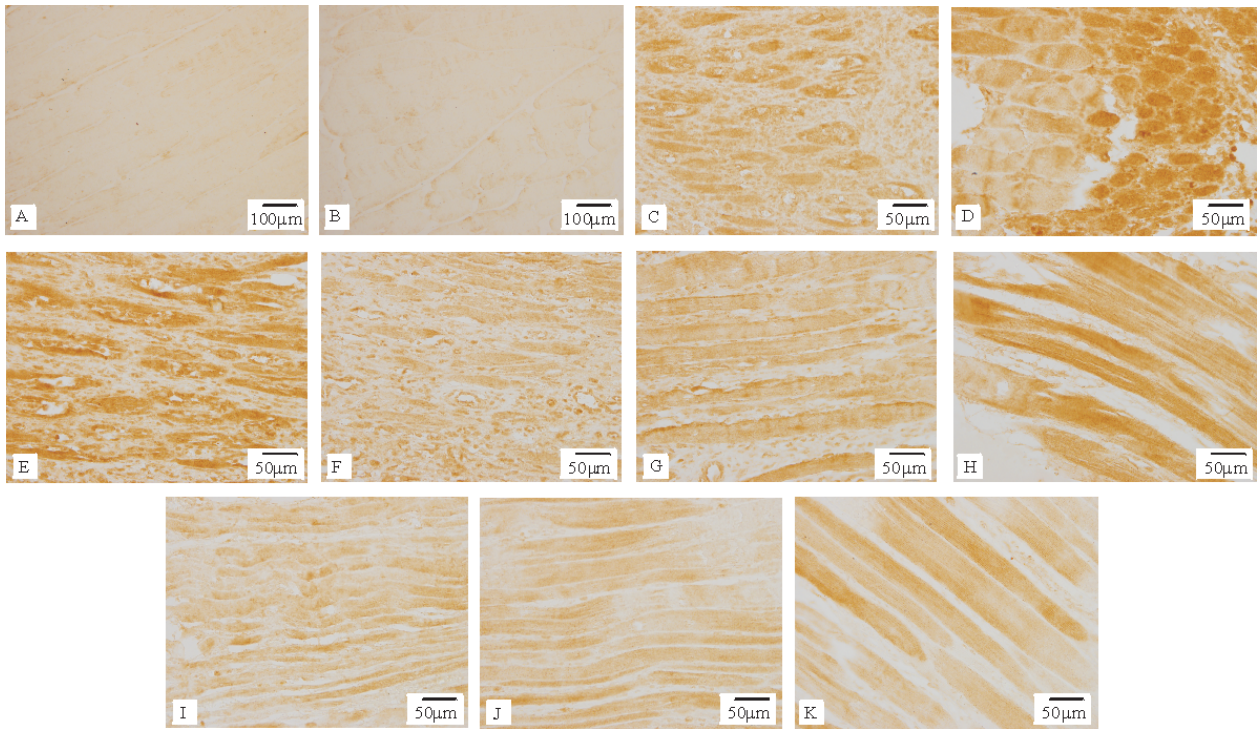
如图 2 所示:空白组与模型对照组 IGF-1 几乎无表达,略高于背景,分布较均匀。造模后第 4 天各组均可见 IGF-1 强阳性表达,从图 2(D)可见左侧未损伤肌细胞(uninjured muscle, UM)着色浅,右侧损伤肌细胞(injured muscle, IM)着色深。造模后 7 天,IGF-1 仍然呈阳性表达,肾俞组略高于模型组合委中组。造模后 14 天,IGF-1 阳性表达减少。

图像分析显示,第 4 天、7 天模型组多裂肌 IGF-1 的表达显著高于空白组($P < 0.01$)。第 4 天电针委中组表达显著高于模型组($P < 0.01$),电针委中组表达高于电针肾俞组($P < 0.05$),电针肾俞组高于模型组($P < 0.05$)。第 7 天,模型组、电针委中组、电针肾俞组之间均无统计学意义,但肾俞组已表现出高于其他两组的趋势。第 14 天,电针肾俞组表达显著高于模型组与电针委中组($P < 0.01$),见表 1。



A: 正常组;B: 模型对照组;C: 模型组 4d;D: 电针委中组 4d;E: 电针肾俞组 4d;F: 模型组 7d;G: 电针委中组 7d;H: 电针肾俞组 7d;I: 模型组 14d;J: 电针委中组 14d;K: 电针肾俞组 14d

图 1 不同时间点各组大鼠腰部多裂肌 HE 染色



A: 正常组;B: 模型对照组;C: 模型组 4d;D: 电针委中组 4d;E: 电针肾俞组 4d;F: 模型组 7d;G: 电针委中组 7d;H: 电针肾俞组 7d;I: 模型组 14d;J: 电针委中组 14d;K: 电针肾俞组 14d。UM: 未受损纤维;IM: 受损纤维。

图 2 不同时间点各组大鼠腰多裂肌 IGF-1 的表达

表 1 大鼠腰多裂肌 IGF-1 表达的 MOD 值($\bar{x} \pm s$)

组别	4d	7d	14d
空白组($n=8$)	0.019 ± 0.007	0.017 ± 0.009	0.020 ± 0.003
模型对照组($n=8$)	0.022 ± 0.005	0.021 ± 0.008	0.015 ± 0.005
模型组($n=8$)	0.158 ± 0.061^b	0.089 ± 0.021^b	0.039 ± 0.030^a
电针委中组($n=8$)	0.263 ± 0.047^{bde}	0.092 ± 0.029^b	0.043 ± 0.025^b
电针肾俞组($n=8$)	0.203 ± 0.027^{bc}	0.107 ± 0.015^b	0.079 ± 0.010^{bdf}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与电针肾俞组比较,^e $P<0.05$;与电针委中组比较,^f $P<0.01$ 。

3 讨论

全球约 9.2% 的人群受腰痛影响^[8],其中 90% 的腰痛患者为非特异性腰痛^[9],椎间盘源性腰痛占非特异性腰痛中绝大多数。脊柱及椎间盘的不稳定是导致间盘源性腰痛的主要因素,而多裂肌是稳定脊柱的重要肌群。临床研究发现很多急慢性腰痛患者均存在多裂肌功能异常或萎缩或伴有脂肪浸润^[3-5]。因此多裂肌损伤后的再生修复非常关键。胰岛素生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)是肌肉再生和分化的关键生长因子。IGF-1 可以促进肌卫星细胞的增殖,并且选择性的表达生肌调节因子。布比卡因引起肌肉损伤后,在修复的初期伴随

IGF-1 的自分泌并且调控 MyoD 的表达和肌卫星细胞的激活^[10]。因此,IGF-1 在肌肉再生中发挥非常重要的作用。

针刺在治疗运动系统疾病疗效肯定,也是国内外针刺研究者的主要研究方向之一。电针疗法是针刺治疗骨骼肌损伤研究中最常用的一种干预方法。临床和实验室研究表明,电针在治疗骨骼肌损伤能通过多种途径取得疗效^[11-15]。委中穴是治疗腰背部疾患的通用穴,它被高频次的应用于临床^[16-17],或是单穴应用或是众穴协同均效验,“腰背委中求”是委中穴治疗腰背部疾病存在独特疗效的临床经验总结。肾俞穴是治疗腰部疾病的另一常用穴^[18],腰为肾之府,又为局部取穴,可疏通局部气血。本研究结

果显示,布比卡因引起多裂肌损伤后会使得 IGF-1 表达上调,电针委中穴和电针肾俞穴均能使 IGF-1 的表达增加。值得提出的是,在损伤早期(第 4 天)电针委中组 IGF-1 的表达高于电针肾俞组。随后两组 IGF-1 的表达均下降,但仍高于模型组。至第 7 天时两组表达无差异,甚至出现肾俞组高于委中组的趋势,到损伤的中后期时(第 14 天)电针肾俞组的表达却显著高于委中组。说明电针委中穴可在肌肉损伤的早期起到较好的作用,肾俞穴在肌肉再生的中后期仍然有效。即委中穴起效快而肾俞穴作用更持久。从形态学恢复上亦是如此。

委中穴治疗腰背痛多以急性为主如急性腰扭伤、脊柱强直、坐骨神经痛、腰椎间盘突出症等,另外亦可治疗、高热抽搐、急性吐泻等急症^[19]。也有研究表明针刺或刮痧委中穴可使同侧腰部膀胱经皮肤血流量即刻升高^[20-21]。而肾俞穴多以治疗慢性疾病为主如慢性腰肌劳损、肾虚腰痛、慢性疲劳综合征等^[22]。由此可见,本实验研究结果与中医传统理论以及临床实践具有一致性。

布比卡因引起的骨骼肌损伤初期伴有 IGF-1 的表达并激活肌卫星细胞进行增殖分化,从而进行骨骼肌的再生。电针委中穴能够明显改善大鼠腰多裂肌损伤后的组织形态学变化并增加生长因子 IGF-1 的表达,尤其是在肌肉损伤的早期,其作用优于电针肾俞组。

参 考 文 献

- [1] Huang Q, Zhang Y, Li D, et al. The Evaluation of Chronic Low Back Pain by Determining the Ratio of the Lumbar Multifidus Muscle Cross-sectional Areas of the Unaffected and Affected Sides [J]. *Journal of Physical Therapy Science*, 2014, 26 (10): 1613.
- [2] 吴巍巍,胡志军,范顺武,等. 慢性腰痛对脊旁多裂肌萎缩影响的临床研究[J]. *中国骨伤*, 2014, 27(3): 207-212.
- [3] Silfies S P, Spuillante D, Maurer P, et al. Trunk muscle recruitment Patterns in specific chronic low back pain populations [J]. *clin Biomech*, 2005, 20(5): 465-473.
- [4] Engert J C, Berglund E B, Rosenthal N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis [J]. *J Cell Biol*, 1996, 135(2): 431-440.
- [5] 陈欢,彭博,李富运,等. 电针对兔腰肌急性钝挫伤后组织修复与碱性成纤维细胞生长因子/细胞外信号调节激酶信号通路的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2014, 20(3): 215-220.
- [6] Toru Taguchi, Ulrich Hoheisel, Siegfried Mense. Dorsal horn neurons having input from low back structures in rats [J]. *Pain*, 2008, 138(1): 119-129.
- [7] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 中国中医药出版社, 2003: 316.
- [8] Vos T, Flaxman A D, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *The Lancet*, 2013, 380(9859): 2163-2196.
- [9] Haldeman S, Kopansky-Giles D, Hurwitz EL, et al. Advances in the management of spine disorders [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2012, 26(2): 263-280.
- [10] Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 70(21): 4117-4130.
- [11] 王研,高维滨. 运用 T 字型取穴法电针治疗下肢肌肉损伤的临床观察 [J]. *针灸临床杂志*, 2012, 28(9): 23-25.
- [12] 邢崇慧,李冬梅,张蔚. 电针配合超声波治疗运动员肌肉损伤 108 例 [J]. *上海针灸杂志*, 2004, 23(5): 18-19.
- [13] 徐前威,王荣国,王云亭,等. 电针对兔钝器伤后骨骼肌中转化生长因子- β_1 和波形蛋白表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29(5): 421-426.
- [14] 陈欢,张莉,崔强,等. 电针阿是穴对骨骼肌损伤大鼠肌肉再生及碱性成纤维细胞生长因子表达的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2013, 19(4): 334-340.
- [15] 马忆南,杨华元,冯麟,等. 针刺诱导胶原信号变化对骨骼肌损伤的修复作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(42): 7888-7892.
- [16] 贾红玲,张学伟,张永臣. 数据挖掘技术在针灸治疗腰痛古代文献中的应用 [J]. *针灸临床杂志*, 2013, 29(11): 40-45.
- [17] 杨辉. 腰痛的中医辨证及针灸治疗 [J]. *中医临床研究*, 2011, 3(20): 70-71.
- [18] 郭桂霞,张阿宏. 综合护理雷火灸治疗寒湿型腰肌劳损 [J]. *实用中医内科杂志*, 2014, 28(7): 160-162.
- [19] 卜彦青,杜广中. 委中穴现代疾病谱 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(10): 1137-1139.
- [20] 徐青燕,杨金生,杨莉,等. 委中穴区刮痧对本经同侧经脉线上皮肤微循环血流灌注量的影响 [J]. *针刺研究*, 2013, 38(1): 52-56.
- [21] 王苓苓,张维波,谢衡辉,等. 使用血流成像技术对“腰背委中求”经典理论的验证 [J]. *针刺研究*, 2007, 3(4): 247-251.
- [22] 金末淑,陈思宇,徐杉,等. 背俞穴研究进展 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2009, 16(S1): 106-109.

(收稿日期:2014-12-18)

(本文编辑:韩虹娟)