

· 基础研究 ·

# 针刀疗法对第三腰椎横突综合征模型大鼠成纤维细胞增殖与凋亡的影响\*

汲广成<sup>1</sup> 乔晋琳<sup>2,4</sup> 李金牛<sup>1</sup> 郭长青<sup>3</sup> 陈裔英<sup>2</sup> 路平<sup>2</sup> 付本升<sup>2</sup> 向东东<sup>2</sup> 马广昊<sup>2</sup> 刘灿坤<sup>1</sup>

**摘要 目的:**观察针刀疗法对 L3 横突综合征模型大鼠软组织中成纤维细胞增殖与凋亡的影响。**方法:**建立 L3 横突综合征大鼠模型。68 只 SD 大鼠随机分为针刀组、封闭组、模型组、正常对照组,每组 17 只大鼠。第 15 天对相应组别进行针刀和封闭干预。于第 21、30 天时,每组各处死 8 只大鼠,取材后,行 HE 染色,及免疫组化和凋亡的检测,并计算成纤维细胞的增殖和凋亡指数。**结果:**第 21 天和第 30 天时,针刀干预组的增殖指数、凋亡指数与模型对照组相比有非常显著的差异( $P<0.01$ );针刀干预组与封闭对照组在第 21 天时无显著差异( $P>0.05$ ),在第 30 天时有显著差异( $P<0.05$ )。**结论:**针刀干预对 L3 横突综合征模型大鼠的组织修复有效,可能是通过调节成纤维细胞增殖与凋亡的平衡,从而防止了组织瘢痕挛缩的形成,印证了中医微观阴阳平衡理论。

**关键词** 针刀疗法;第三腰椎横突综合征;成纤维细胞;增殖;凋亡

**中图分类号:**R493,R246.2,R681 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2009)-03-0244-04

**The effect of acupotomy intervention on the proliferation and apoptosis of fibroblasts in rats with the third lumbar vertebrae transverse process syndrome/JI Guangcheng, QIAO Jinlin, LI Jinniu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(3): 244—247**

**Abstract Objective:**To observe the effect of acupotomy intervention on the proliferation and apoptosis of fibroblasts in rats with the third lumbar vertebrae transverse process syndrome. **Method:** Rat model of the third lumbar vertebrae transverse process syndrome was established. Sixty-eight SD rats were randomly divided into 4 groups: acupotomy group, blockade group, model group and normal control group, 17 rats in each group. On the 15th day, acupotomy and blockade were applied to the corresponding group respectively. On the 21<sup>st</sup> d and 30<sup>th</sup> d, 8 rats were sacrificed in each group. After HE staining morphological changes of muscle, tendon, and other tissues were observed. Immunohistochemistry method was used to detect the proliferation of fibroblasts and the proliferation index were calculated. TUNEL technique was used to detect the apoptosis of fibroblasts, and the apoptosis index were calculated. **Result:** On the 21<sup>st</sup> d and 30<sup>th</sup> d, there were very significant differences of proliferation index and apoptosis index in acupotomy group and model group ( $P<0.01$ ). Compared acupotomy group with blockade group, on the 21<sup>st</sup> d there was no significant difference ( $P>0.05$ ), on the 30<sup>th</sup> d there were significant differences ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The acupotomy therapy is effective for the tissue repairing on rat model with the third lumbar vertebrae transverse process syndrome, and the effect may be caused by regulating the balance between proliferation and apoptosis of fibroblasts to prevent the scar formation.

**Author's address** Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 55002

**Key words** acupotomy therapy; the third lumbar vertebrae transverses processus syndrome; fibroblast; proliferation; apoptosis

第三腰椎横突综合征是由于 L3 横突周围组织的损伤,造成慢性腰痛,出现以 L3 横突处明显压痛为主要特征性疾病。本病症在中医学中属于“腰痛”、“痹症”、“经筋病”范畴。针刀治疗 L3 横突综合征有一定的优越性<sup>[1]</sup>,但是报道以临床研究居多,实验研究较少,这使针刀疗法对该病的治疗机制目前尚未完全明了。本实验主要观察针刀疗法对 L3 横突综合征模型大鼠软组织中的成纤维细胞(fibroblast,FB)增殖与凋亡的影响,试从软组织的损伤修复方面来探求针刀疗法的治疗机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 68 只,3 月龄,体重 200—

\* 基金项目:国家重点基础研究“973”计划课题(2006CB504508)

1 贵阳中医学院,贵阳,550002

2 北京海军总医院

3 北京中医药大学针灸学院

4 通讯作者

作者简介:汲广成,男,硕士研究生

收稿日期:2008-10-17

250g, 二级, 由北京维通利华实验动物中心(SCXK[京]2007-0001)提供, 北京海军总医院海战伤实验动物中心二级动物室喂养。

## 1.2 实验试剂、仪器

明胶(南京); 0.40mm×40mm 汉章牌一次性针刀(北京); 显微外科手术器械; DS2-1 手术放大镜(6×); 光学显微镜; TUNEL 试剂盒(Roche 公司出品); 兔抗鼠增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体, 丹麦 DAKO 公司出品。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 分组:**将健康雄性 SD 大鼠 68 只按照随机数字表分为 4 组, 针刀组(n=17)、封闭组(n=17)、模型组(n=17)、正常对照组(n=17)。

**1.3.2 造模方法:**采用王健瑞等<sup>[2]</sup>建立的 L3 横突综合征动物模型制作 SD 大鼠模型 51 只, 以 10%速眠新(25mg/kg), 肌注麻醉 SD 大鼠, 无菌条件下在 SD 大鼠腰背部纵切口 3cm, 向两侧剥离骶棘肌, 显露 L3/4 棘突, 完整分离腰脊深筋膜脊神经后支穿出部分。将 0.3cm×0.3cm 大小明胶海绵植入 L3 横突尖端, 保留完整肌筋膜, 彻底止血, 用 0 号线等距离缝合骶棘肌筋膜及皮肤, 切口用庆大霉素冲洗。麻醉苏醒后与另外 17 只正常 SD 大鼠在同一饲养条件下饲养。

**1.3.3 干预措施:**针刀组于造模后第 15 天时, 在麻醉下进行针刀操作。先徒手探及大鼠髂嵴最高点, 与其相平处相当于大鼠的 L4 棘突, 再向上探及一个棘突, 探寻 L2/3 棘突之间, 向外约 1.0—1.5cm, 可触及有条索处(此处条索形成的原因可能是造模后局部组织纤维性增生所致)即为 L3 横突尖端表皮投影, 用针刀于此处刺入约 1.5—2.0cm 抵至 L3 横突尖端, 先与脊柱平行纵切 2 刀, 旋转刀柄 90°后再横切 1 刀, 即出针刀, 按压针孔止血。封闭组在无菌条件下, 用 0.45mm×12mm 一次性无菌注射针刺入 L3 横突尖端(定点方法与针刀操作相同), 注入 2%利多卡因注射液 0.05ml+地塞米松注射液 0.01ml+VitB<sub>12</sub> 0.01ml+氯化钠注射液 0.13ml, 出针, 按压止血。模型组、正常对照组不给予任何干预措施。

## 1.4 检测方法及指标

造模后第 15 天, 各组处死大鼠一只进行病理组织形态学观察, 验证造模成功与否。于第 21 天、第 30 天时各组处死 8 只大鼠, 并取 L3 横突段的软组织, 4%福尔马林固定, 酒精逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 将蜡块标本切成 5μm 厚的石蜡切片。

**1.4.1 对石蜡切片脱蜡后行 HE 染色, 并在光镜下进行组织形态学观察。**

**1.4.2 免疫组化检测:**采用链霉亲和素-过氧化酶连接法(SP法)检测 PCNA。二甲苯脱蜡, 乙醇逐级(100%→95%→80%→70%)至自然水水化, 蒸馏水洗; 采用 0.01M 枸橼酸钠缓冲溶液, 高温高压修复抗原; 参照说明书进行 SP 染色, 每批染片均有已知阳性同一蜡块作阳性对照, 及 PBS 为一抗做阴性对照。

细胞核呈黄色或棕黄色者为阳性。在显微镜下每张切片随机选择 5 个视野(每个视野中至少 200 个细胞), 计数增殖细胞和正常细胞数目, 按如下公式计算增殖细胞占总细胞数的比例, 并计算出平均增殖指数(proliferative index, PI)。

$$\text{增殖指数} = \text{增殖细胞} / \text{总细胞} \times 100\%$$

**1.4.3 组织细胞凋亡的检测:**采用原位缺口末端标记法即 TUNEL 法: 石蜡切片二甲苯脱蜡, 乙醇(100%→95%→80%→70%)逐级至自然水水化, 蒸馏水洗; 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇灭活内源性过氧化物酶 10min; 滴加 20μg/ml 蛋白酶 K, 37℃, 消化 10min; 室温下封阻 30min; 滴加 TUNEL 反应液每张切片 50μl, 保持 37℃1h; 滴加小牛抗 FITC 的二抗 50μl, 保持 37℃ 40min; DAB 显色液室温下显色 3min, 显微镜下控制; 蒸馏水洗终止反应, 苏木素复染细胞核, 蒸馏水冲洗蓝化, 乙醇脱水, 二甲苯透明、中性树脂胶封片。阴性对照 TUNEL 反应液中不含 TdT, 阳性对照用 DNA 酶处理切片 10min。

细胞核中有棕色颗粒者为 TUNEL 阳性细胞, 即凋亡细胞。在显微镜下每张切片随机选择 5 个视野(每个视野中至少 200 个细胞), 计数凋亡和正常细胞数目, 按如下公式计算凋亡细胞占总细胞数的比例, 并计算出平均凋亡指数(apoptotic index, AI)。

$$\text{凋亡指数} = \text{凋亡细胞} / \text{总细胞} \times 100\%$$

## 1.5 统计学分析

采用 SPSS11.5 软件包, 各组数据均以平均值±标准差表示, 组间比较用均数差别的 *t* 检验。P<0.05 为差异有显著性, P<0.01 为差异有非常显著性。

## 2 结果

### 2.1 组织形态学变化

第 15 天时, 正常对照组结构正常, 未见炎细胞浸润; 针刀组、封闭组、模型组三组血管充血, 肌肉结缔组织内炎症反应程度相当, 纤维组织增生, 淋巴细胞、浆细胞及少许中性粒细胞浸润, 并见淋巴小结形成, 材料已崩解, 大多被组织细胞吞噬, 见图 1(见彩色插页)。第 21 天时, 针刀组与封闭组的大鼠组织内, 成纤维细胞较少, 炎细胞减少, 部分区域肌腱筋

膜内炎性细胞集聚,毛细血管增生扩张,胶原重建开始;模型组,成纤维细胞较多,纤维组织增生较重,胶原分泌增多,见图2(见彩色插页)。第30天时,模型组成纤维细胞增生,纤维有断裂,可见红细胞散在分布,有增生的毛细血管;针刀组与封闭组,可见纤维组织排列成行,炎性细胞偶见,针刀组较其他组胶原纤维形成减少,瘢痕面积小,见图3(见彩色插页)。

### 3.2 成纤维细胞增殖情况

第21天时,针刀组与封闭组的大鼠组织内的成纤维细胞增殖较少;而此时模型组,可见成纤维细胞增殖较重,胶原分泌增多,见图4(见彩色插页)。针刀组和封闭组的PI均低于模型组,且有非常显著性差异( $P<0.01$ )见表1。第30天时,针刀组、封闭组、模型组的成纤维细胞增殖程度均有增强的趋势,但针刀组的增殖程度最低,与其他三组均有非常显著性差异( $P<0.01$ );正常对照组可偶见增殖的成纤维细胞见图5(见彩色插页),表1。

### 3.3 成纤维细胞凋亡情况

第21天时,针刀组与封闭组的大鼠组织内可见有少量成纤维细胞细胞凋亡;模型组可偶见凋亡成纤维细胞,见图6(见彩色插页)。第30天时,针刀组、封闭组和模型组可见成纤维细胞凋亡有增强的趋势,以针刀组为著,其凋亡指数高于模型组( $P<0.01$ );正常对照组可偶见凋亡的成纤维细胞,见图7(见彩色插页),表2。

表1 大鼠不同时期成纤维细胞增殖指数 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	鼠数	第21天	第30天
正常对照组	8	2.36±2.52 <sup>②</sup>	2.90±2.06 <sup>②</sup>
模型组	8	51.71±13.25 <sup>①</sup>	61.56±9.64 <sup>①</sup>
封闭组	8	39.26±8.79 <sup>①②</sup>	48.73±10.21 <sup>①②</sup>
针刀组	8	36.46±3.93 <sup>①②</sup>	38.09±11.87 <sup>①②</sup>

①与正常对照组比较  $P<0.01$ ;②与模型对照组比较  $P<0.01$

表2 大鼠不同时期成纤维细胞凋亡指数(AI) ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	鼠数	第21天	第30天
正常对照组	8	0.11±0.17 <sup>③</sup>	0.34±0.43 <sup>③</sup>
模型组	8	1.50±1.94 <sup>①</sup>	3.08±0.58 <sup>①</sup>
封闭组	8	2.81±0.83 <sup>①②</sup>	4.40±1.19 <sup>①②</sup>
针刀组	8	3.54±1.59 <sup>①③</sup>	5.53±0.91 <sup>①③</sup>

①与正常对照组比较  $P<0.01$ ;与模型对照组比较② $P<0.05$ ,③ $P<0.01$

## 3 讨论

成纤维细胞是主要的软组织损伤修复细胞,是疏松结缔组织的主要细胞成分,也是致密结缔组织如肌腱、韧带分泌胶原的主要细胞。成纤维细胞能够维持各种生长因子、细胞素、基质金属蛋白酶及金属蛋白酶组织抑制因子的合成与分解平衡。因此, Lekic 等<sup>[3]</sup>认为,它是创伤修复的工程师、建筑者和管理员。但是,因损伤组织的修复而引起的局部瘢痕增

生或挛缩进而导致周围组织或器官严重的病理变化,使成纤维细胞有时在整个疾病过程中扮演了正反两个不同的角色<sup>[4]</sup>。了解与控制成纤维细胞的生物学行为是促进软组织损伤修复、创伤愈合、预防瘢痕形成的基础与关键<sup>[5]</sup>。

中医阴阳学说认为人体的形成、组织形态结构及正常生理功能的发挥无不是阴阳结合、阴阳协调、相互依赖、相互滋生的。一旦阴阳失调则会导致机体功能紊乱,疾病发生。细胞是构成人体的最小功能单位,它同样包含阴阳两方面的属性,即细胞增殖属阳,细胞凋亡属阴。增殖与凋亡的平衡实质上是阴阳在细胞水平上的平衡<sup>[6]</sup>。在组织的损伤修复的整个过程中,成纤维细胞也存在着增殖与凋亡的平衡。在组织修复的早期,成纤维细胞的增殖可以促进肉芽组织的形成,有利于组织的修复。但是成纤维细胞的增殖不足或过度则会导致组织的修复过缓或瘢痕粘连的形成<sup>[7-8]</sup>。当肉芽组织成熟、塑性向瘢痕组织转化时,大量的细胞凋亡消失。若该过程障碍,则也可能导致瘢痕挛缩的形成<sup>[9]</sup>。可见,如果促进软组织的损伤修复,就要保持成纤维细胞增殖与凋亡的平衡,调控它们的平衡很有可能是预防组织瘢痕、粘连、挛缩的新思路<sup>[10-11]</sup>。

针刀医学认为软组织损伤时会产生瘢痕、挛缩、粘连、堵塞等病理变化,针刀具有松解之功效,可以减轻组织的瘢痕粘连,但是其机理尚未阐释清楚。本实验观察到,在造模后第15天时,组织病理切片显示血管充血,肌肉结缔组织内炎症反应程度相当,纤维组织增生,淋巴细胞、浆细胞及少许中性粒细胞浸润,并见淋巴小结形成。刘仁义等<sup>[12]</sup>观察术中取得L3横突尖部的骨膜外软组织时,发现22例病理切片,其病变基本相同。主要表现为纤维组织增生和玻璃样变性。纤维组织明显增生,排列密集成片状,胶原纤维肿胀互相融合,呈均匀一致的红染状,细胞核的数目弱显减少。可见增生的纤维侵入包绕甚至分割附近的横纹肌组织,少数严重病例增生的纤维组织内可见软骨化生或骨化现象。这说明该模型与人体L3横突综合症的病理变化基本相同,符合软组织慢性损伤模型的要求。对该L3横突综合征动物模型进行研究,能够相对地再现组织真实的病理变化过程。当进行针刀干预后(造模后第21天),可见组织内炎性细胞减少,成纤维细胞减少,胶原纤维增多并开始重建,此时正属于向瘢痕形成过渡阶段。造模后第30天,针刀干预组可见成纤维细胞排列成行,炎性细胞基本消失,胶原纤维增生较少,毛细血管退化,瘢痕形成,而且瘢痕面积较其他组小。可见,针刀

的干预减轻了组织的炎性反应,减轻了胶原纤维增生,促进了组织的修复,有效的抑制瘢痕挛缩的形成。

从成纤维细胞的增殖及凋亡情况上看,造模后的第21天及第30天,针刀组和封闭组的PI均低于模型对照组的,且有显著性意义( $P < 0.01, P < 0.05$ )。说明针刀和封闭均有抑制FB增殖的作用。文献报道<sup>[13-14]</sup>地塞米松具有抑制炎症,抑制成纤维细胞增生,影响胶原的合成和增加胶原的降解的作用,从而减轻了瘢痕组织的形成。而针刀亦可以通过抑制成纤维细胞的增殖减少瘢痕的形成,正所谓“殊途同归”,其作用机制尚待进一步研究。在造模后的第21天及第30天,可见针刀干预组与封闭对照组的AI高于模型对照组,且有显著性意义( $P < 0.01, P < 0.05$ ),说明针刀与封闭两种干预措施均可以促进大鼠组织内成纤维细胞的凋亡。针刀干预组与封闭对照组的AI和PI在第21天时无显著差异( $P > 0.05$ ),在第30天时有显著差异( $P < 0.05$ ),且其差异趋势有利于组织的修复,可能是由于针刀对成纤维细胞的增殖和凋亡的调节作用时间较地塞米松长,这也与临床上针刀疗法的长效性相符合。

实验结果显示,针刀疗法可能是通过抑制成纤维细胞的增殖,促进其凋亡,而对L3横突综合征模型大鼠L3横突段软组织中成纤维细胞的增殖与凋亡有良性调节作用,从而抑制了胶原纤维的过度增生,防止了瘢痕挛缩的形成。针刀疗法是通过什么途径来对成纤维细胞产生影响的呢?可能有以下几点原因:①针刀疗法抑制了L3横突综合征动物模型IL-1 $\beta$ , IL-6和TNF- $\alpha$ 等炎症因子的表达<sup>[15]</sup>,这些炎症因子对成纤维细胞的增殖调控具有重要的作用;②针刀疗法可对L3横突综合征大鼠中枢神经肽P物质(substance P, SP)合成释放的良性调节作用<sup>[16]</sup>,抑制了外周局部SP的释放,减少了通过与SP受体结合而作用于成纤维细胞的机会;③针刀可切割限制张力释放的筋膜、纤维结缔组织等,释放过高的张力<sup>[17]</sup>,使成纤维细胞转化为非增殖型;④针刀通过改善组织缺血缺氧的状态,抑制了成纤维细胞分泌大量的胶原<sup>[18]</sup>;⑤针刀通过松解、减张等作用加快了体内对氧自由基的清除<sup>[19]</sup>,从而限制了成纤维细胞分泌大量的胶原,防止了组织瘢痕挛缩的形成。

综上所述,针刀疗法对L3横突综合征模型大鼠组织的修复作用可能是能够调节成纤维细胞增殖与凋亡的平衡,使组织的瘢痕挛缩降低到了较小的程

度,恢复了组织的动态平衡。但是,针刀疗法对成纤维细胞的调节途径还有待研究证实,以及何为最利于组织修复的“平衡点”还有待进一步量化。

## 参考文献

- [1] Jin-Lin Qiao, Jian-Riu Wang, Qun Gu, et al. A randomized controlled observation of acupotomy in treating syndrome of third lumbar vertebra transverse process [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2003, 7(26):3606—3607.
- [2] 王健瑞, 乔晋琳, 路平, 等. 第三腰椎横突综合征动物实验模型建立及实验研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25(7):394—398.
- [3] Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell populations: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue [J]. Anat Rec, 1996, 245(2):327.
- [4] 李志康, 崔乃强. 成纤维细胞的双重特性[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2008, 14(2):176—178.
- [5] 王益民, 韦福康, 刘敏. 成纤维细胞与创伤修复的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(2):126—128.
- [6] 葛金文, 陈大舜. 细胞凋亡在中医药研究中的地位[J]. 湖南中医药大学学报, 1997, 17(3):68.
- [7] 李萍, 李光善, 盛巡, 等. 糖尿病大鼠创面愈合过程中成纤维细胞增殖及I型胶原合成减少[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(9):1807—1810.
- [8] 陈世益, 李云霞, 马昕. 外源性胰岛素样生长因子-2促进骨骼肌损伤修复的实验研究 [J]. 中国运动医学杂志, 2002, 21(4):340—345.
- [9] 陕声国, 张端莲, 侯祚琼, 等. 瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖和凋亡状态[J]. 中华皮肤科杂志, 2000, 33(4):280.
- [10] 章建华, 许超, 朱胜良, 等. 舒筋汤对兔跟腱粘连影响的实验研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(4):45—47.
- [11] 段戡, 周江南, 成平. 丹参及其结合玻璃酸钠预防兔膝关节粘连的作用[J]. 中医正骨, 2006, 18(3):163—165.
- [12] 刘仁义, 黄殿栋, 刘成德, 等. 第三腰椎横突症的病理形态学研究 [J]. 中医药学报, 1991(1):32—34.
- [13] O'Kane S. Wound remodelling and scarring [J]. J Wound Care, 2002, 11(8):296—299.
- [14] Wang R, Ghahary A, Shen Q, et al. Hypertrophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor- $\beta$  mRNA and protein than normal skin and cells [J]. Wound Repair Regen, 2000, 8(2):128—137.
- [15] 刘灿坤, 乔晋琳, 向东东, 等. 针刀干预L3横突综合征兔对IL-1 $\beta$ , IL-6和TNF- $\alpha$ 水平的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(1):14—16.
- [16] 胡波, 刘琳, 郭长青, 等. 针刀松解法对第三腰椎横突综合征大鼠下丘脑与脊髓P物质、八肽胆囊收缩素含量的影响[J]. 针刺研究, 2008, 1(33):22—25.
- [17] 朱汉章. 针刀医学体系概述[J]. 中国工程科学, 2006, 8(7):12.
- [18] 沈锐, 利天增. 组织缺氧与增生性瘢痕的关系[J]. 国际外科学杂志, 2006, 33(1):72.
- [19] 章瑛, 李家邦, 周中焕, 等. 腰3横突综合征SOD、MDA的变化及局部松解的临床研究[J]. 颈腰痛杂志, 2006, 27(1):46—48.