

·基础研究·

温热银质针疗法三种体外留针长度银质针温度及对大鼠骨骼肌作用的比较研究

王 飞¹ 高 谦^{2,3} 杨志丽² 王 刚²

摘要

目的:研究温热银质针疗法时体外留针长度与温热银质针温度及大鼠骨骼肌形态学变化的关系,以明确最适的留针长度。

方法:将 54 只大鼠随机分为 3 组采用温热银质针治疗,银针刺入鼠左后腿皮肤深度均为 3cm,各组体外留针长度分别为 9cm、7cm、5cm,艾条在针柄顶端点燃。使用数字测温仪测量针尖、皮肤进针点及二者中点的温度。光镜下观察针尖处肌肉组织形态学变化及波形蛋白和结蛋白表达情况。

结果:温热银质针治疗过程中,各组针尖、中点、皮肤进针点温度波动明显(体外留针 9cm 组针尖温度除外),第 10min 时最高。体外留针 5cm 组针尖($43.6\pm0.6^{\circ}\text{C}$)和皮肤进针点温度($46.8\pm1.1^{\circ}\text{C}$)最高,体外留针 9cm 组皮肤进针点温度($36.6\pm0.6^{\circ}\text{C}$)最低,体外留针 9cm 组针尖温度($35.2\pm0.7^{\circ}\text{C}$)与体外留针 7cm 组($35.6\pm0.7^{\circ}\text{C}$)无显著差异。各组大鼠骨骼肌细胞呈现损伤-修复过程,体外留针 5cm 组组织损伤范围大,程度严重,以瘢痕修复为主,波形蛋白和结蛋白表达少,另两组以肌细胞再生修复为主。

结论:根据温热银质针体内针身温度和大鼠骨骼肌损伤-修复情况,体外留针 9cm 和 7cm 时更合适。

关键词 银质针;温度;留针长度;肌肉再生;波形蛋白;结蛋白

中图分类号:R246

文献类型:A

文章编号:1001-1242(2010)-12-1170-06

Comparison of thermo-silver needle temperatures of three kinds of needle lengths out of body during thermo-silver needle therapy and effects on rats' muscle/WANG Fei, GAO Qian, YANG Zhili, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(12):1170—1175

Abstract

Objective: To determine the optimal needle length out of body during thermo-silver needle therapy, by comparing the relations between different needle lengths out of body and needle temperatures, and investigating the morphologic changes of rats' muscle at different needle lengths out of body.

Method: Fifty-four rats were randomly divided into three groups according to the needle length out of body. The silver needles were punctured into skin and muscle of rats' left hind legs, the needle lengths out of body were 9cm, 7cm and 5cm respectively, the needle lengths staying in body were all 3cm and cones were ignited on the handles of needles. Temperature of needle tips, the puncture spots on skin and midpoints of needles were measured with semi-conductor thermistor digital thermometer. Morphologic changes of muscle and expressions of vimentin and desmin were observed under light microscope.

Result: During thermo-silver needle therapy temperatures of three points of each needle in all groups fluctuated significantly and ascended at the 10th min except the needle tips in 9cm group. Among three groups, average temperature of the needle tip ($43.6\pm0.6^{\circ}\text{C}$) and the puncture spot on skin ($46.8\pm1.1^{\circ}\text{C}$) in 5cm group were the highest; however, average temperature of the puncture spot on skin($36.6\pm0.6^{\circ}\text{C}$) in 9cm group was the lowest. Temperature of

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.12.011

1 空军总医院中西医结合正骨治疗科,北京,100142; 2 解放军总医院康复医学科; 3 通讯作者

作者简介:王飞,男,主治医师,硕士; 收稿日期:2009-01-12

the needle tip showed no significant difference between 9cm group ($35.2\pm0.7^{\circ}\text{C}$) and 7cm group($35.6\pm0.7^{\circ}\text{C}$). Muscle cells in all groups presented injury and regeneration. Muscles in 5cm group were injured most severely, with obvious scar repairing, and the expressions of vimentin and desmin were scarce. However, regenerations were obvious in the other two groups.

Conclusion: During thermo-silver needle therapy, the needle lengths of 9cm and 7cm out of body were optimal based on the needle temperature and injury-repair of rats' muscle.

Author's address Air Force General Hospital, PLA, Beijing, 100142

Key words silver needle; temperature; needle length outside; muscle regeneration; vimentin; desmin

肌筋膜疼痛综合征由位于骨骼肌纤维紧张带上的触发点引起,其特征是定位准确、高度敏感、有压痛,按压能够复制患者平时的症状,并产生牵涉痛。它是引起腰背痛、颈肩痛及关节周围疼痛的常见疾病^[1-2]。根据来自不同专科的资料统计结果,其发病率在 21%—93%^[3]。很多治疗方法被用来灭活触发点,针刺就是其中很常用的一种。针刺肌筋膜触发点时出现局部颤搐反应,疼痛会明显减轻,肌紧张会缓解,可能与针刺机械性地破坏了功能障碍终板的完整性,激活抑制疼痛的内源性阿片肽系统,阻断触发点伤害感受信息向脊髓背角的传递等有关^[4]。我国骨科学前辈创用的温热银质针疗法将针刺和温热疗法有机地结合在一起,在治疗顽固肌筋膜痛时既有即时的镇痛作用,又有持久的解除肌肉痉挛效果^[5]。

温热作用与温度的关系密切,而温热银质针疗法通过热传导对针体进行加热,因此针在组织内的温度受体外留针长度影响很大。但是目前尚无不同体外留针长度下体内针身温度及肌肉组织形态学改变方面的研究,医生在临床操作中多是根据经验和患者皮肤进针点处的耐受程度来把握体外留针长度。体外留针太短容易烫伤皮肤,留针太长虽然治疗安全,但可能对深部组织没有温热作用,达不到效果。为此,本研究选取临幊上常用的 9cm、7cm、5cm 三个体外留针长度,使用半导体热敏电阻测温针直接测量温热银质针在大鼠体内的温度,通过 HE 染色动态观察针尖处肌肉组织的损伤-修复情况,并通过免疫组织化学方法观察波形蛋白和结蛋白的表达情况,为临幊治疗时选用适宜的体外留针长度提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物:Wistar 大鼠 (由解放军总医院医学

动物中心提供)54 只,雌性,体重 300—350g。分为 3 组,每组 18 只大鼠。三组大鼠左后腿均使用温热银质针治疗,所用银质针的长度分别为 12cm、10cm、8cm,进针深度均为 3cm,体外留针长度分别为 9cm、7cm、5cm。

1.2 实验仪器

银质针:采用 85% 白银及掺杂少许铜镍合金熔炼而成。直径 1.0mm,针端尖而不锐,针体长度分别为 12cm、10cm、8cm,针柄长 5cm,直径 1.6mm,针柄轧花,球形针尾。

艾条:直径 1.5cm,北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司生产。

数字测温仪:四通道,量程 15—99°C,精度 0.5°C,反应时间 0.85s,针式半导体热敏电阻传感器,测温针长 12cm,直径 1mm,南京理工大学研制。

石蜡切片机:美国 A0820 型。自动染片仪:英国 SHANDON,型号 GEMINI。显微镜及照相机:日本 Olympus20 型。图像分析系统:Image-pro 5.0 彩色多媒体病理图文分析系统。

1.3 实验试剂

一抗:抗结蛋白单克隆抗体(Maixin-Bio 公司),编号 MAB-0055,抗波形蛋白单克隆抗体 (Maixin-Bio 公司),编号 MAB-0178。

二抗:即用型非生物素免疫组化 EliVision™ plus 检测试剂盒(Maixin-Bio 公司),编号 KIT-9903。

显色剂:DAB (3,3'-四盐酸二氨基联苯胺) 显色剂(Maixin-Bio 公司)。

缓冲液:冲洗玻片时采用 PBS 缓冲液,抗原修复时采用 Tris 缓冲液,均由 Maixin-Bio 公司提供。

1.4 方法

1.4.1 实验动物准备:将大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3ml/100g 体重),仰卧位固定于鼠板上。

严格消毒针刺部位,用18号针头作为穿刺针刺破左后腿跟腱与腓肠肌连接处皮肤,将银质针与1号和2号测温针(1号测温针针尖与银质针针尖平齐,2号测温针针尖位于银质针针身距针尖1.5cm处)针身平行紧贴刺入左小腿三头肌内3cm,体外留针长度分别为9cm、7cm和5cm。用隔热套筒保护测温针紧邻银质针针尾的部分,并将银质针、测温针针尾搭于搭线架上。

1.4.2 加热、测温:将1.5cm长艾条套入银质针球形针尾,点燃。打开数字测温仪电源,1号和2号测温针显示温度为银质针针尖和中点(皮肤进针点与针尖的中点)温度,再用3号测温针测量皮肤进针点的温度。记录加热前以及加热5min、10min、15min、20min时1、2、3号针的温度。加热结束后将银质针、测温针拔出,再次消毒穿刺部位。

1.4.3 动物取材:大鼠术后于解放军总医院动物实验中心动物房饲养,标准食水喂养。分别于针刺后2d、2周、4周将各对应观察组6只大鼠处死,解剖分离左侧小腿三头肌,肉眼观察骨骼肌情况。垂直于针道取针尖处肌肉组织,10%甲醛固定。

1.4.4 HE标本制作:10%甲醛固定,苏木精伊红染色,中性树胶封片。

1.4.5 免疫组织化学标本制作:SP法染色,DAB显色,中性树胶封片。

1.4.6 免疫组化标本的图像分析:各组中每个观察时间组每块肌肉两种染色各取三张切片做图像分析,从每张切片中组织的上中下随机选取6个视野进行分析,参数值由图像分析软件自动给出并存储,然后进行后期数据统计处理。

测量参数为:①每个视野中两种蛋白在肌纤维中各自阳性区域平均光密度。②每个视野中两种蛋白在肌纤维中各自阳性区域面积值。

计算参数为:两种蛋白在肌纤维中各自阳性区域占各自总测试面积的百分比。面积百分比=每组每种蛋白阳性区域面积/(测试的视野数×每个视野的面积值)×100%。每个视野的面积值为1110000 μm^2 。

1.5 统计学分析

选用SPSS13.0统计软件进行数据分析,数据用均数±标准差表示,组间温度比较及组内不同时间、部位温度比较均采用单因素方差分析,以P<0.05为

有显著性差异。

2 结果

2.1 温热银质针治疗三种体外留针长度下针尖、中点、皮肤进针点温度测量结果

治疗后三种体外留针长度下针尖、中点、皮肤进针点温度随时间变化情况:温热银质针治疗体外留针7cm和5cm时,治疗过程中针尖、中点、皮肤进针点的温度先升高后降低,10min时各点温度最高(P<0.01),体外留针9cm时,针尖温度没有明显波动(P>0.05),中点和皮肤进针点的温度先升高后降低,10min时最高(P<0.01)(图1—3)。

治疗10min时三种体外留针长度下针尖、中点、皮肤进针点的温度:温热银质针治疗10min时,三组针尖温度比较:体外留针5cm组最高(P<0.01),体外留针9cm和7cm组差异无显著性(P>0.05);中点温度比较:体外留针5cm组>7cm组>9cm组(P<0.01);

图1 三种体外留针长度下针尖温度随时间变化情况

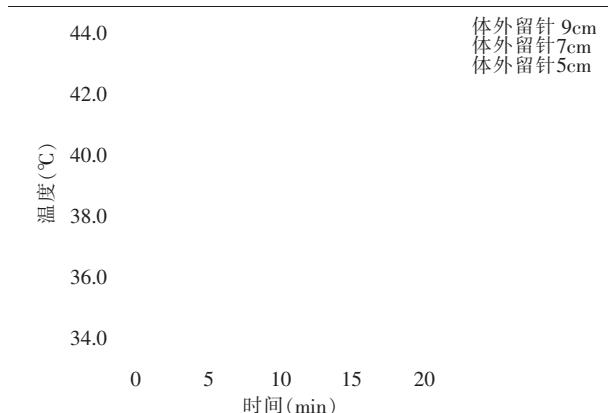


图2 三种体外留针长度下中点温度随时间变化情况

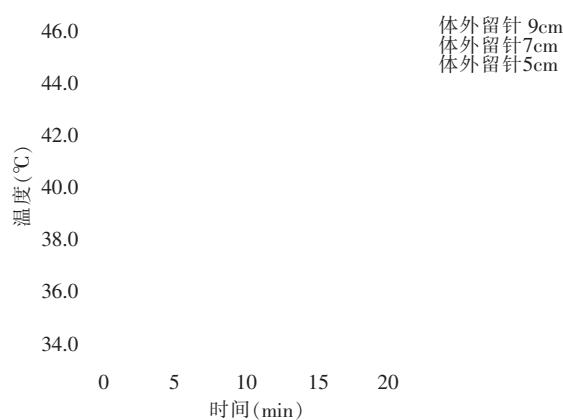
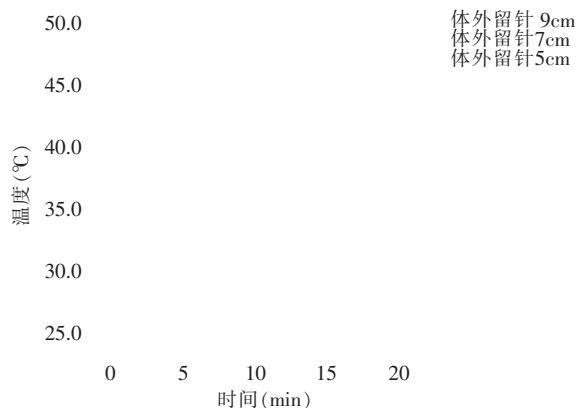


图3 三种体外留针长度下进针点温度随时间变化情况

皮肤进针点温度比较：体外留针5cm组>7cm组>9cm组($P<0.01$)。每组3个部位温度比较：进针点>中点>针尖($P<0.001$)，见表1。

表1 治疗后三种体外留针长度下针身不同部位的温度 ($\bar{x}\pm s$, °C)

组别	例数	温度		
		针尖	中点	进针点
体外留针9cm组	18	35.2±0.7 ^②	36.0±0.5 ^{①②}	36.6±0.6 ^①
体外留针7cm组	18	35.6±0.7 ^②	37.1±0.9 ^{①②}	37.8±1.0 ^①
体外留针5cm组	18	43.6±0.6 ^{①②}	44.7±0.8 ^②	46.8±1.1

注：大鼠麻醉后体温 $34.8\pm0.4^{\circ}\text{C}$ ，①与其它组相应部位温度比较， $P<0.01$ ，②与组内其它部位温度比较， $P<0.001$

2.2 温热银质针治疗对大鼠骨骼肌作用的形态学观察

治疗后各组大鼠后腿骨骼肌肉眼观察结果见表2。治疗后大鼠骨骼肌HE染色观察结果：①各组大鼠治疗后2d，体外留针9cm和7cm组损伤区肌细胞胞浆崩解、变性，轮廓可见，越接近针尖处，肌细胞变性、坏死程度越重，坏死纤维内可见单核细胞，周围有炎性细胞浸润，毛细血管增生。体外留针5cm组损伤区肌细胞胞浆崩解程度重，轮廓不清，大量炎性细胞浸润，毛细血管增生明显。②治疗后2周，体外留针9cm和7cm组针尖周围见大量新生的骨骼

肌细胞，体积较小，为圆形或椭圆形，胞浆嗜碱性，细胞核大，位于细胞中央区域，同时可见散在一些残存的变性、坏死的肌细胞，炎性细胞浸润，毛细血管丰富，血管周边可见成纤维细胞。体外留针5cm组损伤中央区肌细胞凝固性坏死，损伤区外周可见一些新生的骨骼肌细胞，大量炎性细胞浸润，毛细血管增生明显，血管周围纤维组织增生。③治疗后4周，体外留针9cm和7cm组针尖周围新生的骨骼肌细胞进一步成熟，体积仍较小，胞浆嗜碱性不明显，细胞核大，位于细胞中央区域，周围可见炎性细胞。体外留针5cm组损伤区内大量纤维组织增生，毛细血管增生、炎性细胞浸润明显，周边可见一些体积较小的新生骨骼肌细胞。

治疗后大鼠骨骼肌波形蛋白和结蛋白免疫组织化学图像分析结果见表3。各组治疗2d、2周、4周组内比较时波形蛋白平均光密度差异无显著性($P>0.05$)，阳性区面积差异无显著性($P>0.05$)。损伤2d时各组波形蛋白平均光密度差异无显著性($P>0.05$)，体外留针9cm组和7cm组波形蛋白阳性区面积差异无显著性($P>0.05$)，但都大于体外留针5cm组($P<0.05$)。各组2d、2周、4周结蛋白平均光密度差异无显著性($P>0.05$)，阳性区面积差异无显著性($P>0.05$)。损伤2d时各组结蛋白平均光密度差异无显著性($P>0.05$)，体外留针9cm组和7cm组结蛋白阳性区面积差异无显著性($P>0.05$)，但都大于体外留针5cm组($P<0.05$)。

3 讨论

侯京山等^[6]通过测量温热银质针皮肤进针点的温度推测体内针身温度，程珂等^[7-8]通过红外热像技术以及有限元手段分析温针灸的温度场，但是都没有明确报道温热银质针的体内针身温度。本研究通过半导体热敏电阻测温针直接测量温热银质针在大

表2 治疗后各组大鼠后腿骨骼肌肉眼观察结果

组别	2d	2周	4周
体外留针9cm组	进针点处皮肤、皮下组织粘连	进针点处皮肤、皮下组织轻度粘连，腓肠肌与小腿浅层肌肉粘连	腓肠肌与小腿浅层肌肉无明显粘连
体外留针7cm组	进针点处皮肤、皮下组织粘连	进针点处皮肤、皮下组织轻度粘连，腓肠肌与小腿浅层肌肉粘连	腓肠肌与小腿浅层肌肉粘连
体外留针5cm组	进针点处皮肤、皮下组织粘连，腓肠肌肿胀明显，肌间隙积液	进针点处皮肤、皮下组织粘连明显，腓肠肌与小腿浅层肌肉粘连明显	进针点处被毛脱落，腓肠肌与小腿浅层肌肉粘连明显

表 3 三组大鼠波形蛋白和结蛋白表达图像分析结果

(x±s)

	波形蛋白			结蛋白		
	平均光密度	面积(μm ²)	面积百分比(%)	平均光密度	面积(μm ²)	面积百分比(%)
体外留针 9cm						
2d	0.23±0.03	469492	42.3	0.24±0.05	410571	37.0
2 周	0.26±0.01	502683	45.3	0.25±0.03	410988	37.0
4 周	0.24±0.01	477385	43.0	0.23±0.03	423713	38.2
体外留针 7cm						
2d	0.24±0.03	458600	41.3	0.27±0.05	445516	40.1
2 周	0.25±0.02	536041	48.3	0.24±0.05	434491	39.1
4 周	0.22±0.02	515810	46.5	0.24±0.02	409311	36.9
体外留针 5cm						
2d	0.24±0.05	339993	30.6	0.24±0.05	346758	31.2
2 周	0.27±0.03	298743	26.9	0.26±0.02	325894	29.4
4 周	0.23±0.02	386904	34.9	0.22±0.04	391014	35.2

鼠体内的温度。根据艾条燃烧过程中温度渐升渐降，在10min左右温度达到最高^[7]，可达到300℃以上^[8]的特点，本研究选择了艾条点燃后5min、10min、15min、20min四个温度测量时间点。Barnes和Welch等人通过大量的理论和实验研究后证明，激光对组织的热损伤与作用时间呈线性关系，而与组织所达到的温度的峰值指数相关，可见，温度对组织热损伤更为敏感^[9]。因此本研究中比较三种体外留针长度下针身不同部位温度时将加热10min时的温度（最高温度）作为比较对象，这一点与此前的研究中比较加热后四个时间点的平均温度不同^[10]。另外，为了让大鼠麻醉后体温尽量接近人的体温，实验中使用棉布覆盖大鼠躯干以减少热量散失，这样可以将大鼠体温保持在34.8℃左右。

程珂等^[7]通过红外热像技术观察到温针灸时针道周围组织温度波动明显，从进针点到针尖处组织温度分布呈“V”字形。本研究结果与程珂的观察相似。针身温度随时间和部位的这种变化规律与温热银质针通过针尾燃烧艾条，利用热传导对针体进行加热的原理有关。体外留针9cm组由于热量在向针尖传导过程中散失太多，针尖温度没有呈现出波动。

陈华^[11]通过动物实验发现银质针治疗后能造成大鼠肌细胞损伤并刺激肌细胞再生。本实验发现体外留针9cm和7cm组肌肉组织损伤范围较小，程度较轻，以肌细胞再生修复为主，体外留针5cm组损伤范围较大，程度较重，以纤维性修复为主。这与陈华的研究结果相似，这一结果也提示温热银质针可能使肌筋膜痛触发点所在肌纤维损伤后再生。

波形蛋白和结蛋白是肌肉组织中重要的中等径骨架纤维蛋白，Nonaka等^[12]认为波形蛋白和结蛋白的表达规律是研究肌肉损伤-再生过程的有力手段，但目前尚未见到将这两种蛋白用于研究温热银质针治疗后肌肉损伤-修复过程的报道。本实验采用免疫组织化学方法和图像分析方法，将这两种蛋白的表达量化，并结合肌肉组织病理学变化，对温热银质针治疗后肌肉的损伤-修复过程进行分析。Vater等^[13]通过小鼠比目鱼肌注射蛇毒发现肌肉损伤-修复过程中波形蛋白和结蛋白均有表达，并且同损伤-再生的病理过程紧密相关。本实验发现体外留针9cm和7cm组肌细胞再生明显，两种蛋白表达多，这与Vater的结果相似。

Bornemann等^[14]认为波形蛋白和结蛋白的表达具有时间规律性：损伤后12h波形蛋白表达增加，2d后达到峰值，然后下降，2周后基本消失；损伤开始后结蛋白表达下降，2d后结蛋白表达增加，4d后达到峰值并持续存在。本实验发现各组大鼠治疗后2d、2周、4周时波形蛋白和结蛋白的表达差别不明显，分析原因可能与温热银质针引起组织损伤的特点有关。这种损伤是以针尖为中心向四周扩散，中心区损伤程度最重，离中心越远损伤程度越轻，肌细胞损伤程度不同，修复速度也不同，损伤后2d、2周、4周时分别有处于不同阶段的再生骨骼肌纤维，因此波形蛋白和结蛋白的染色没有呈现出时间规律性。

从温度与增强血液循环的关系考虑，41—43℃时充血反应慢，43—45℃时充血反应快，超过45℃充血反应不会进一步上升，还可能出现组织损害，

加热3min后出现充血反应,理想反应出现在30min左右^[15]。本实验中体外留针5cm组虽然针尖温度达到43.6℃,但是肌肉组织损伤程度重,范围大,纤维组织增生明显,波形蛋白和结蛋白表达少,而且进针点温度高达46.8℃,大鼠皮肤进针点处被毛脱落,因此体外留针5cm偏短,临床治疗时需用冷盐水进行局部降温^[16]。体外留针9cm和7cm组虽然针尖温度只有35.2℃和35.6℃,但是针尖处肌肉组织损伤程度轻,范围小,肌细胞再生明显,波形蛋白和结蛋白表达多。这提示温热银质针在体内的温度不能单纯按照温热作用的理想温度来衡量,它毕竟是针刺作用和温热作用的结合。因此从肌细胞的损伤-修复情况考虑,体外留针9cm和7cm时较适宜。既往体外实验发现,艾条点燃后不到20min就燃尽,20min时针体温度已接近环境温度^[17],因此临上治疗时间选择20min是比较适宜的。

本实验比较了不同体外留针长度下单一根银质针的体内针身温度及引起正常大鼠肌肉组织的损伤-修复情况。而临上温热银质针治疗肌筋膜痛时采用多根针密集型针刺,因此为了更符合临床实际,还需要进一步比较研究不同体外留针长度下多根针治疗肌筋膜痛动物模型时的体内针身温度及肌肉组织损伤-修复情况,以为临床治疗时选择合适的体外留针长度提供实验依据。

参考文献

- [1] Rashiq S,Galer BS. Proximal myofascial dysfunction in complex regional pain syndrome:a retrospective prevalence study[J].Clin J Pain,1999,15(2):151—153.
- [2] Harden RN,Breuel SP,Gass S. Signs and symptoms of the myofascial pain syndrome:a national survey of pain management providers[J].Clin J Pain,2000,16(1):64—72.
- [3] Siegfried Mense,David G,I.Jon Russel著.郭传友等译.肌痛[M].北京:人民卫生出版社,2005.173—174.
- [4] Tough EA, White AR, Cummings TM, et al. Acupuncture and dry needling in the management of myofascial trigger point pain:A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials[J].European Journal of Pain, 2009,13:3—10.
- [5] 王福根.银质针疗法在临床疼痛诊治中的应用[J].中国疼痛医学杂志,2003,9(3):173—180.
- [6] 侯京山,陈华,赵艳鸿,等.银质针温度自动控制系统的研究[J].中国临床康复,2004,8(20):4054—4055.
- [7] 程珂,丁轶文,沈雪勇,等.温针灸的传热学研究[J].上海针灸杂志,2007,26(8):32—36.
- [8] 肖敏,李玉榕.电子化温针灸温度场的有限元分析[J].现代生物医学进展,2009,9(1):124—127.
- [9] 赵友权,范世福,李小霞.激光外科中组织的热损伤及其测量技术探讨[J].医疗卫生装备,2001,5:8—10.
- [10] 高谦,王飞,杨志丽,等.银质针与软组织内热治疗仪对大鼠骨骼肌作用的实验研究[J].临床军医杂志,2009,37(5):758—760.
- [11] 陈华.热传导银质针对骨骼肌作用的实验研究.军医进修学院硕士学位论文(2003),19.
- [12] Nonaka Ikuya.实验性肌肉坏死和再生.新肌肉病学[M].日本新知堂,1997.366—383.
- [13] Vater R, Cullen MJ, Harris JB. The fate of desmin and titin during the degeneration and regeneration of the soles muscle of the rat[J]. Acta Neuropathol,1992,84:278—288.
- [14] Bornemann A, Schmalbruch H. Desmin and vimentin in regenerating muscles[J]. Muscle Nerve,1992,15(1):14—20.
- [15] 缪鸿石.电疗与光疗 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.238—240.
- [16] 施燕莉.两种银质针加热方法的疗效比较[J].中国康复医学杂志,2004,19(9): 695—696.
- [17] 王飞,高谦,杨志丽,等.银质针体外温度变化的特点分析[J].临床军医杂志,2010,38(1):11—13.