

电针委中穴对腰肌钝挫伤大鼠骨骼肌中TNF- α 及IGF-1表达的影响*方忆生¹ 陈少清¹ 连晓阳¹ 王诗忠¹ 林建平^{1,2}

摘要

目的:观察电针委中穴对钝挫伤模型大鼠腰肌组织中炎症因子——肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α ,TNF- α)及修复因子——胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1,IFG-1)表达的影响,探讨电针对大鼠腰肌修复的机制。

方法:将40只SD大鼠随机分为4组:正常组(Z组,n=10),模型组(M组,n=10),非穴组(F组,n=10)及电针组(D组,n=10)。D组、M组及F组采用腰肌钝挫伤模型造模,电针干预14天。采用免疫组化法及ELASA法分析大鼠IGF-1和TNF- α 的表达水平,HE染色法观察腰肌形态改变。

结果:TNF- α 表达:模型组、非穴组及电针组均高于正常组且有显著差异($P<0.05$);电针组低于模型组和非穴组且有显著差异($P<0.05$);模型组和非穴组无差异。IGF-1表达:模型组、非穴组及电针组均高于正常组且有显著差异($P<0.05$);电针组高于模型组和非穴组且有显著差异($P<0.05$);模型组和非穴组无差异。HE染色:电针组较其余组炎症减少,肌细胞再生增多。

结论:电针委中穴可能通过降低TNF- α 及提高IGF-1表达水平,促进大鼠腰肌修复。

关键词 腰肌劳损;电针;委中穴;胰岛素样生长因子;肿瘤坏死因子- α

中图分类号:R245,R685,R493 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-1242(2016)-02-0201-04

腰肌劳损,隶属于中医“腰痛”范畴,是腰部病痛的常见病因之一。我国腰痛年发病率为22%左右^[1]。电针作为我国特有康复疗法,既保留了针刺止痛快、无毒副作用的优点,又增加了电刺激对肌肉修复的促进作用。研究表明,电针委中穴能有效治疗腰肌劳损等腰痛病^[2-3],其机制尚未明确。胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor-1,IGF-1)是一种与肌肉组织生长关系十分密切的小分子多肽;在骨骼肌的再生修复阶段,以IGF-1的作用最为明显^[6-7]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)在介导炎症反应中起着至关重要的介导作用,能直接引起骨骼肌蛋白降解^[8]。但目前缺乏电针委中穴对腰肌劳损后骨骼肌中TNF- α 和IGF-1表达影响的研究。基于以上,本研究通过观察电针委中穴后大鼠腰肌镜下形态学以及炎症因子——TNF- α 及修复因子——IGF-1的表达变化,研究电针对大鼠腰肌修复的影响,进而探讨电针委中穴治疗腰肌劳损的作用机制,为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

动物:清洁级8周龄健康SD雄性大鼠40只,体重(280 $\pm$ 20)g。实验动物由福建中医药大学动物中心(许可证号:SCK(沪)2012-0002)提供,采用随机数字表法把40只SD大鼠分为2组,空白组(n=10)和造模组(n=30;腰肌钝挫伤模型),造模组30只大鼠随机分为3组,每组10只:模型组、非穴组、电针组,4组相同条件饲养。

仪器:华佗牌电针仪(G-6805,上海华谊仪器厂);华佗牌针灸针(0.16mm $\times$ 10mm,上海华谊仪器厂);微型离心机(EW-6000,东胜创新生物科技有限公司);架盘药物天平(HC-TP11-2,上海精科);电热恒温水浴锅(HWS-24,上海一恒科学仪器有限公司);倒置显微镜(Leica DM IL LED,徕卡仪器有限公司);全自动酶标仪(Multiskan MK3,美国Thermo公司);低温高速离心机(Heraeus PICO 17,美国Thermo公司)。

试剂:兔抗TNF- α 、IGF-I抗体(博奥森公司);TNF- α 、IGF-I酶联检测试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);DAB显色剂(迈新生物技术公司)。

1.2 动物模型建立及干预方法

建立动物模型参照张海平^[9]分别对30只(M组、F组和D

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.02.015

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81303017);福建省自然科学基金资助项目(2014101346)校管课题重点学科专项(X2014081-学科)

1 福建中医药大学,福建福州,350122; 2 通讯作者

作者简介:方忆生,男,硕士研究生; 收稿日期:2015-09-25

组)SD大鼠,用3%戊巴比妥钠按0.5ml/100g的计量,腹腔注射麻醉。剪除大鼠打击处被毛,大鼠俯卧位并在中点做标记,予以连续打击3次。打击器总质量为500g,由48cm处自由落体,垂直打击标记部位,打击器与损伤处接触面积约为1cm×1cm,动能为2.352J。观察打击部位无骨折,表皮无破损,有散在红色斑点,皮下暗红。打击部位在俯卧位大鼠第五腰椎水平腰肌^[10]。通过解剖和病理证实钝挫伤模型成功^[11]。

干预方法:电针组予电针委中穴,非穴组予电针非穴点,其余各组不电针。委中穴和非穴点都予直刺0.5cm(针灸针规格0.16mm×10mm),针刺后委中穴或非穴点(在委中穴内侧旁开5mm处^[12])接负极,正极置于同侧下肢内侧蘸有生理盐水的纱布处,予疏密波,频率2Hz,以后肢出现轻微颤抖为准,每次治疗30min^[10],共14天^[13-14]。

1.3 取材及标本处理

剔除皮毛、筋膜,暴露分离出下腰部肌肉,锐性切取L₄—L₆水平的肌肉组织,宽度、厚度约1cm,生理盐水冲洗,10%中性福尔马林漂洗后固定。用于观察指标。

1.4 TNF-α、IGF-1 表达水平测定

Elisa法检测大鼠体内肿瘤坏死因子TNF-α和胰岛素样生长因子IGF-1蛋白表达情况。具体步骤:按0.5ml/100g剂量腹腔注射3%戊巴比妥钠溶液,麻醉后经腹主动脉取血约10ml,注入玻璃试管中,4℃静置1h,4000 r/min低温离心10min后分离血清,保存于-40℃冰箱,备测IGF-1和TNF-α。

免疫组化法检测腰肌组织中肿瘤坏死因子TNF-α和胰岛素样生长因子IGF-1。具体步骤:65℃烤片6h,常规二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,双蒸水冲洗以封闭内源性过氧化氢酶,冲洗、热修复抗原,PBS冲洗封闭,4℃孵育14h,一抗、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中终止反应。自来水冲洗,复染,脱水透明,中性树胶封片。显微镜下观察、采集图像,采用IPP 6.0软件进行图像分析,测量平均光密度值(MOD)。

1.5 组织学观察

将取下的腰肌组织放入10%中性福尔马林中固定,然后脱水透明,石蜡包埋,正中冠状切片,5μm厚,脱蜡进行HE染色,封片后在显微镜下观察腰肌组织的形态。

1.6 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件,计量数据均以均数±标准差表示, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验各组腰肌组织中TNF-α和IGF-1免疫组化法检测结果

见图1,正常组细胞质内未见TNF-α阳性染色;模型组和非穴组见大量细胞呈深棕色或棕褐色TNF-α强阳性染色;电针组细胞呈浅棕色TNF-α弱阳性染色。见表1,模型组、非穴组和TNF-α表达都较正常组上调,均有显著性差异($P<0.05$);电针组的表达明显低于模型组和非穴组($P<0.05$);模型组和非穴组无差异。见图1,正常组细胞质内无IGF-1阳性染色;电针组见大量细胞呈深棕色或棕褐色IGF-1强阳性染色;模型组和非穴组呈浅棕色TNF-α弱阳性染色。模型组和非穴组IGF-1表达都较正常组上调,差异均有显著性意义($P<0.05$);电针组表达强度高于模型组和非穴组,差异有显著性意义($P<0.05$);模型组和非穴组无差异,见表1。

图1 各组大鼠腰肌TNF-α和IGF-1免疫组化染色结果 (组化染色,×200)

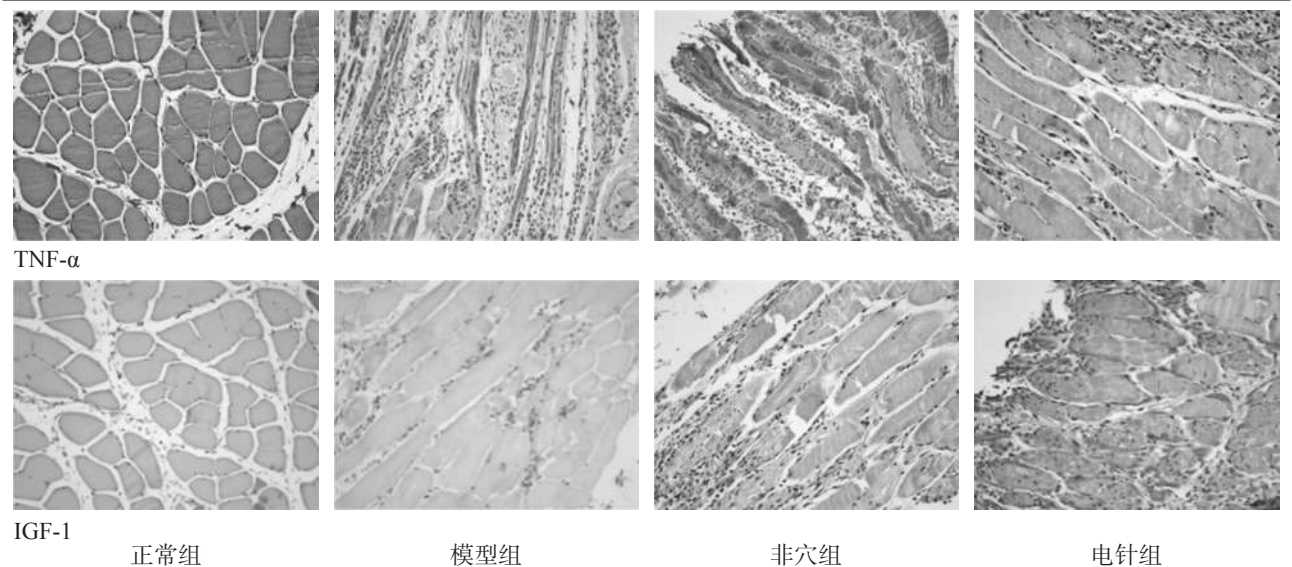


表1 各组大鼠腰肌中TNF-α和IGF-1染色平均光密度值 ($\bar{x}\pm s$, ng/ml)

组别	动物数	TNF-α	IGF-1
正常组	10	0.1039±0.0195	0.0980±0.0122
模型组	10	0.2594±0.0777 ^{①②}	0.1915±0.0612 ^{①②}
非穴组	10	0.2537±0.0891 ^{①②}	0.1987±0.0459 ^{①②}
电针组	10	0.1769±0.0319 ^①	0.3407±0.0823 ^①

注:①与正常组比较 $P<0.05$;②与电针组比较 $P<0.05$

2.2 实验各组腰肌组织中TNF-α和IGF-1的Elisa法检测结果

TNF-α检测结果:模型组、非穴组、电针组与正常组比较水平升高($P<0.05$),电针组低于模型组和非穴组且有显著差异($P<0.05$);模型组和非穴组无差异。

IGF-1检测结果:模型组、非穴组、电针组与正常组比较水平升高($P<0.05$),电针组高于模型组和非穴组且有显著差

异($P<0.05$);模型组和非穴组无差异。见表2。

2.3 实验各组大鼠腰肌组织形态变化

正常组大鼠腰肌肌丝排列整齐,结构完整,肌细胞正常,无炎症细胞浸润。模型组炎症细胞浸润明显,肌丝排列紊乱,肌细胞坏死严重,成肌细胞少。非穴组炎症浸润明显,肌细胞坏死,排列紊乱,有少量成肌细胞。电针组有新肌丝生成,炎症细胞浸润不明显,排列趋于整齐(图2)。

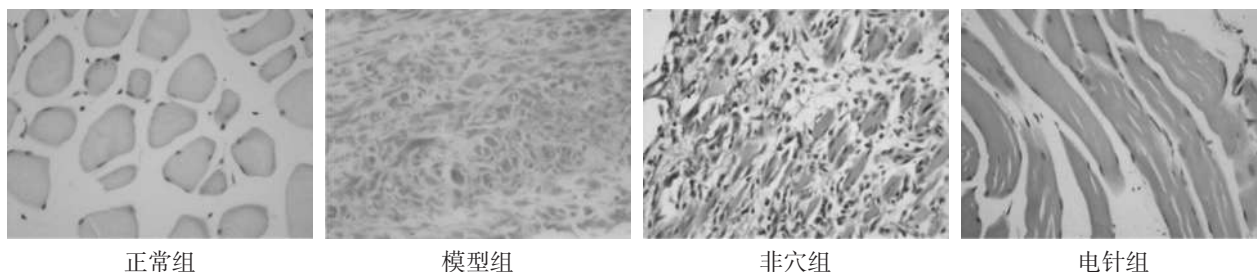
表2 各组大鼠腰肌中TNF-α和IGF-1的ELISA检测水平 ($\bar{x}\pm s$, ng/ml)

组别	动物数	TNF-α	IGF-1
正常组	10	12.6349± 4.6448	7.9250± 2.7675
模型组	10	48.3437±22.8999 ^{①②}	26.9745±11.0128 ^{①②}
非穴组	10	48.3453±23.5702 ^{①②}	27.4918± 9.0579 ^{①②}
电针组	10	21.7131± 1.9628 ^①	46.7839± 2.7150 ^①

注:①与正常组比较 $P<0.05$;②与电针组比较 $P<0.05$

图2 大鼠腰肌组织学观察

(HE, ×400)



3 讨论

《灵枢始终篇》云“痛在腰者,取之膈。”委中穴是足太阳经下合穴,位于腘窝正中间,正值胫神经处,可治疗腰背疾患。委中穴也为膀胱经合穴,“合治内腑”,膀胱与肾相表里,腰为肾之府^[15]。其具备“经脉所过,主治所及”“血之郄穴”、“合穴”等多种特征,所以委中穴是治疗腰痛病的重要穴位之一。贾红玲^[16]等应用数据挖掘,对针灸治疗腰痛的古代文献进行分析、总结,结果提示委中的使用频次最高,表明委中治疗腰痛早已获得古代医家的普遍认可。

腰肌劳损是腰部骨骼肌的无菌性炎症损伤^[17-18],研究表明TNF-α是介导炎症反应的关键因子^[19],而损伤后的炎症反应是骨骼肌修复时必不可少的过程^[20-21]。研究显示,过度炎症时高浓度的细胞溶解物和细胞毒素会损伤肌肉和相邻未损伤肌肉组织^[22],使修复效率大大降低,所以,修复腰肌损伤首先要降低TNF-α介导的炎症反应,减少炎症反应对肌肉组织的损伤。多项研究表明炎症反应可通过增强骨骼肌蛋白的分解代谢,抑制骨骼肌蛋白合成从而延缓修复^[23-25]。本实验应用免疫组化法和Elisa法检测了TNF-α在各组的表达情况,结果提示与模型组和非穴组相比,电针组TNF-α的表达水平明显降低且有显著差异性。结合本实验HE染色形态学

显示:电针组有新肌丝生成,炎症细胞浸润不明显,排列趋于整齐;电针组较模型组和非穴组有明显改善。以上表明电针委中穴可以通过降低TNF-α介导的炎症反应,缩短炎症损伤时间,降低了肌肉修复过程中的进一步炎症损伤从而提高IGF-1修复腰肌的效率。

IGF-1是一种具有广泛生物学效应的多肽,其对骨、肌肉、脂肪组织、肝、肾、脑的生长都有重要作用^[26]。有研究表明IGF-1是肌纤维形成的早期启动子,能强烈增殖成肌细胞^[27]。在骨骼肌损伤后的修复期,IGF-1能够通过调控细胞的增殖与分化、增加蛋白质的合成、减少蛋白质降解等途径促进肌细胞损伤后的修复与再生^[7],最终提高骨骼肌损伤的愈合质量^[28]。有研究表明外源性IGF-1也可以促进骨骼肌再生^[29]。另外,IGF-1不仅在腰肌损伤中扮演着重要的再生修复作用,还可从抑制肌原细胞凋亡和TNF-α介导的骨骼肌细胞凋亡^[30-31]等方面达到修复的作用。故IGF-1是通过直接或间接两个途径来促进骨骼肌损伤后的修复。本实验的结果显示,电针组IGF-1表达水平较模型组和非穴组有明显升高且具有显著差异性,HE染色形态学也显示电针组较模型和非穴组有明显改善。进一步表明了电针通过促进骨骼肌损伤后IGF-1的表达来加速腰肌修复。

综上所述,电针委中穴可以明显促进大鼠腰肌钝挫伤的修复,其机制可能为电针委中刺激钝挫伤大鼠腰肌降低炎症因子TNF- α 及产生更多的修复因子IGF-1,从而促进大鼠腰肌修复,本实验为“腰背委中求”理论及应用电针治疗腰肌劳损提供了实验依据。

参考文献

- [1] Stewart Williams J, Ng N, Peltzer K, et al. Risk factors and disability associated with low back pain in older adults in low- and middle- income countries. results from the WHO study on global ageing and adult health (SAGE)[J]. PLoS One,2015,10(6):e127880.
- [2] 李江,谭龙旺. 电针联合热敷散治疗腰肌劳损82例观察[J]. 实用中医药杂志,2014,(5):386.
- [3] 章世葛,杨云,武静. 电针配合推拿治疗慢性腰肌劳损疗效观察[J]. 中医药临床杂志,2013,(10):897—898.
- [4] 谢可永,赵光复. 电针为主治疗急性腰扭伤和慢性腰肌劳损[J]. 上海针灸杂志,1987,(2):26—27.
- [5] 赵丽,曲虹. 干扰电治疗腰椎退行性脊椎炎[J]. 中国临床康复,2003,(26):3650.
- [6] Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, et al. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury[J]. Clin Orthop Relat Res,2000,(370):272—285.
- [7] Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, et al. Growth factors improve muscle healing in vivo[J]. J Bone Joint Surg Br,2000,82(1):131—137.
- [8] 李勇俊,翁锡全,林文骥. TNF- α 对骨骼肌蛋白降解的影响及其锻炼效应的研究进展[J]. 首都体育学院学报,2008,(5):63—65.
- [9] 张海平,宋吉锐. 急性骨骼肌损伤动物实验模型构建及应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(49):9984—9988.
- [10] 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,(3):215—220.
- [11] Wang R, Luo D, Xiao C, et al. The time course effects of electroacupuncture on promoting skeletal muscle regeneration and inhibiting excessive fibrosis after contusion in rabbits[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2013,2013: 869398.
- [12] 李忠仁.实验针灸学[M].第2版.北京: 中国中医药出版社,2007.1.
- [13] 董静. 炎症细胞因子在慢性软组织损伤大鼠骨骼肌中表达及中药青白散的干预作用[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,(8): 90—92.
- [14] 罗丽,张健,董宇,等. 大鼠骨骼肌纤维化形成过程中IGF-1、TGF- β 1的表达[J]. 体育科学,2011,(11):61—70.
- [15] 毕海金,何煜宇. “腰背委中求”的机制研究概况[J]. 河北中医,2013,(4):615—617.
- [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,(11):40—45.
- [17] 方铁根,熊常初. 中医传统特色疗法结合现代仪器综合治疗腰肌劳损的临床研究[J]. 光明中医,2013,(3):532—534.
- [18] 焦红波,刘海英,焦念学. 针刺推拿治疗腰肌劳损[J]. 中医外治杂志,2004,(5):26—27.
- [19] 金伯泉.医学免疫学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2008.65.
- [20] 刘树坤,于晓华,吴耀义,等. SD大鼠骨骼肌钝挫伤早期的组织病理变化[J]. 中国组织工程研究,2012,(24):4371—4375.
- [21] 王建国,杨雅丽,郑宝森,等. 红光照射对大鼠急性软组织损伤IGF-1表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2011,(7):795—798.
- [22] 贾雅蕊,刘金锋.臭氧局部注射治疗骨骼肌损伤的研究进展[J]. 浙江临床医学,2014,(8):1334—1336.
- [23] Rodriguez J, Fernandez-Verdejo R, Pierre N, et al. Endurance training attenuates catabolic signals induced by TNF- α in muscle of mice[J]. Med Sci Sports Exerc,2016Feb;48(2):227—234.
- [24] Gallo D, Gesmundo I, Trovato L, et al. GH-releasing hormone promotes survival and prevents TNF- α -induced apoptosis and atrophy in C2C12 myotubes[J]. Endocrinology, 2015,156(9):3239—3252.
- [25] Song J, Saeman MR, De Libero J, et al. Skeletal muscle loss is associated with TNF mediated insufficient skeletal myogenic activation after burn[J]. Shock, 2015, 44(5): 479—486.
- [26] Klover P, Hennighausen L. Postnatal body growth is dependent on the transcription factors signal transducers and activators of transcription 5a/b in muscle: a role for autocrine/paracrine insulin-like growth factor I[J]. Endocrinology,2007, 148(4):1489—1497.
- [27] Yu M, Wang H, Xu Y, et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes myoblast proliferation and skeletal muscle growth of embryonic chickens via the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Cell Biol Int,2015,39(8):910—922.
- [28] 董学亮,成羿,章婵娟. IGF-I对骨骼肌修复作用的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2010,(10):70—72.
- [29] 陈世益,朱文辉,任惠民,等. 外源性IGF-I对大鼠急性骨骼肌钝挫伤后骨骼肌IIB型MHC及I、III型胶原mRNA表达的影响[J].中国运动医学杂志,2002,(6):554—560.
- [30] Kawada M, Inoue H, Masuda T, et al. Insulin-like growth factor I secreted from prostate stromal cells mediates tumor-stromal cell interactions of prostate cancer[J]. Cancer Res, 2006,66(8):4419—4425.
- [31] Saini A, Al-Shanti N, Faulkner SH, et al. Pro- and anti-apoptotic roles for IGF-I in TNF- α -induced apoptosis: a MAP kinase mediated mechanism[J]. Growth Factors,2008,26(5):239—253.