

电针委中穴对腰肌损伤家兔 CK、VEGF 和 MVD 的影响

彭博,张莉,陈欢,李富运,卫肖艳

【摘要】 目的:观察电针委中穴对腰肌损伤模型家兔腰肌磷酸肌酸激酶(CK)、血管内皮生长因子(VEGF)及微血管密度(MVD)表达的影响,从血管再生角度探讨针刺委中穴修复腰肌损伤的可能作用机制。方法:将32只雄性家兔随机分为电针委中穴组(委中组)、电针阿是组(阿是组)、模型组和空白组。委中组、阿是组、模型组均采用腰肌钝挫伤的方法造模,造模后委中组和阿是组分别给予对应穴位的电针治疗。2周后取材进行指标检测。结果:造模2周后,与空白组比较,模型组血清CK及腰肌VEGF和MVD的表达均明显增加($P<0.01$),委中组和阿是组血清CK和腰肌MVD的表达较空白组明显增加($P<0.01, 0.05$),但腰肌VEGF的表达变化差异无统计学意义。与模型组比较,委中组和阿是组CK及腰肌VEGF和MVD的表达均下降($P<0.01$),委中组和阿是组的组间比较差异无统计学意义。结论:家兔腰肌损伤2周后,电针委中穴可以降低血清CK的含量,促进腰肌损伤修复,其机制可能与电针调控VEGF表达规律而使其提前发挥其再生血管的作用,缩短微血管再生时间而使微血管密度降低有关。

【关键词】 腰肌损伤;电针;委中;微血管密度;血管内皮生长因子

【中图分类号】 R49;R685 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2014.01.001

Effects of electroacupuncture at BL40 on CK, VEGF and MVD in rabbits with psoas muscle damage PENG Bo, ZHANG Li, CHEN Huan, et al. School of Acupuncture, Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

【Abstract】 Objective: To study the effect of electroacupuncture (EA) at BL40 on CK, VEGF and MVD in rabbits with psoas muscle damage, and discuss the possible mechanism of EA at BL40 repairing the psoas muscle damage from the perspective of angiogenesis. Methods: Thirty-two male rabbits were randomly divided into the EA at BL40 group (BL40 group), EA at Ouch point (OP) group (OP group), model group and blank group. In model group, BL40 group and OP group, the rabbit psoas muscle damage model was established by psoas muscle contusion, thereafter, the BL40 group and OP group were given electroacupuncture treatment. Two weeks later, CK, VEGF and MVD contents were detected. Results: Two weeks after modeling, the serum CK and the expression of VEGF and MVD in the psoas muscle in the model group were significantly increased as compared with the blank group ($P<0.01$). The serum CK and the expression of MVD in the psoas muscle in the BL40 and OP groups were statistically increased ($P<0.01, 0.05$), but the expression of VEGF in psoas muscle had no significant change in comparison to the blank group. As compared with the model group, the serum CK and the expression of VEGF and MVD in the psoas muscle in the BL40 and OP groups were significantly decreased ($P<0.01$). There was no statistically significant difference between the BL40 group and OP group. Conclusion: Two weeks after psoas muscle injury in rabbits, EA at BL40 can reduce serum CK levels and promote repair of the psoas muscle damage, probably by down-regulating the expression of VEGF to advance its role in angiogenesis, and reducing capillary regeneration time to cut down the expression of MVD.

【Key words】 psoas muscle damage; electroacupuncture; BL40; microvessel density; vascular endothelial growth factor

基金项目:1. 国家自然科学基金(81141120);2. 高等学校博士学科点专项科研基金(20100013110014)

收稿日期:2013-05-17

作者单位:北京中医药大学针灸推拿学院,北京 100029

作者简介:彭博(1989-),男,硕士,主要从事针灸临床机理方面的研究。

通讯作者:张莉, zhangli1572@sina.com

腰痛是临床常见病,腰肌劳损是腰部疼痛的常见病因之一,病变过程发生了骨骼肌损伤及修复。针灸作为中医传统疗法,具有疏通经络、调畅气血、激发经气运行等作用,在脑卒中、心肌缺血等疾病中,针刺对

微循环的改善及血管再生方面的作用得到验证和认同^[1-2],但针刺对骨骼肌损伤修复过程中微循环改变情况却未见报道。本实验旨在通过建立家兔腰肌损伤模型,观察电针委中穴对腰肌损伤后肌磷酸肌酸激酶(creatine kinase, CK)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和微血管密度(microvessel density, MVD)表达的改变^[3-4],从血管再生角度探讨针刺委中穴促进腰肌损伤修复的可能作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 ①动物:健康成年雄性新西兰家兔,体质量1.8~2.0kg,购自北京兴隆实验动物养殖中心[SCXK(京)2011-0006]。②仪器:德国 Thermo Scientific Biofuge® Stratos 全能台式高速冷冻离心机;RM2235 石蜡切片机,购自德国莱卡公司;DH-101 电热恒温鼓风干燥箱,购自北京利康科技发展有限公司;BX43 显微镜,购自日本 OLYMPUS 公司;Mshot MC50 显微成像系统,购自广州市明美科技有限公司;G6805-1 电针治疗仪,购自青岛鑫升实业有限公司。③试剂:VEGF 的 ELISA 试剂盒、兔多抗 VEGF 抗体、鼠抗 CD34 抗体,均购自北京博奥森生物技术有限公司;通用型二抗、DAB 显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;CK 试剂盒,购自北京柏定生物工程有限公司。

1.2 方法 ①分组:将 32 只雄性家兔按随机数字表分为:空白组、模型组、委中组、阿是组,每组各 8 只。②造模:对模型组、委中组、阿是组进行造模。造模方法^[6]:每只兔于第 5 腰椎水平双侧腰背部剪毛,面积约为 4cm×5cm,再用 80g/L Na₂S 液脱毛,检查局部皮肤无损伤,以乌拉坦常规麻醉,俯卧于兔台上固定。用导向筒固定打击部位和面积,以 500g 重物距兔腰部 48 cm 高度自导向筒落下,反复 30 次,重力势能为 2.352J。着力点为双侧腰 5 平面肌肉,直径约 2~3cm。③处理方法:基于以往研究及相关文献^[7-9],本实验对模型家兔采取针灸早期干预,从造模后第 1 天开始干预。委中组参照《实验针灸学》选取“委中”穴(膝关节正后方凹陷)^[10],电针频率为 2/10Hz 的疏密波,电流强度 1~2mA,持续 20min,每天 1 次,连续 2 周;阿是组电针阿是穴位(打击着力点中心),其余处理与委中组一致;模型组与委中组、阿是组同步抓取与固定,不做治疗;空白组不做任何处理。

1.3 评定标准 取材:造模后 2 周,各组实验动物用 20%乌拉坦溶液按 5ml/kg 行腹腔注射麻醉。耳缘静脉取血 10ml,室温静置 2h 后,离心(4℃, 3500rpm,

10min),将上层血清转移至-20℃冰箱保存。无菌操作,剔除皮毛、筋膜,暴露分离出下腰部肌肉,锐性切取 L₄~L₆ 水平的病灶组织,宽度、厚度均约 1.5cm,生理盐水冲洗,4%多聚甲醛溶液漂洗后固定。观察 4 个指标。①腰肌 HE 染色:将固定满意的组织块,清水冲洗,二甲苯透明,常规梯度乙醇(70%、80%、90%、95%、100%)脱水,石蜡包埋切片。苏木素染色 5min,自来水冲洗;盐酸乙醇分化 30s(提插数下),自来水浸泡 15min,置伊红液 2min,再脱水、透明,树胶加盖玻片封固。光镜下观察组织结构变化。②血清 CK 检测:采用双抗体夹心 ELISA 方法参照试剂盒说明书进行。③腰肌 VEGF、MVD 免疫组化检测:将固定满意的腰肌标本制成石蜡切片。免疫组化抗原染色程序按下述进行:65℃烤片 6 h,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 (Image-professional plus) 6.0 软件进行图像分析。VEGF 的结果判断^[11]:VEGF 的阳性染色模式为胞浆着色,呈现黄色或棕黄色颗粒;染色判断标准:阴性胞浆未见着色,弱阳性胞浆内颗粒较细,呈淡黄色,显色高于背景,强阳性胞浆内阳性颗粒粗而多,呈棕黄色甚至棕褐色,显色明显高于背景。光镜下(200×),利用无偏体视学(unbiased stereology)技术,全视野无偏采样方法每张切片选取 5 个视野,进行图像分析,测量每个视野中 VEGF 表达阳性区域的平均光密度值(mean optical density, MOD),求均值。MVD 的结果判断^[12]:用 CD34 进行血管内皮细胞的免疫组化染色,新生血管内皮细胞的阳性染 MOD 色模式为胞核着色,呈浅黄色至棕黄色颗粒。阴性不着色,弱阳性呈淡黄色,阳性呈黄色,强阳性呈棕黄色或黑色。采用微血管密度计算方法,在低倍镜下寻找微血管密集区,然后在高倍镜下计数 5 个不同视野中的微血管数,取平均值为间质微血管密度,单位为个/400×视野,单个着色的内皮细胞或者内皮细胞丛均按独立血管计数,不以血管腔形成或管腔内有无红细胞为计数标准,管腔较大且有较厚肌层或管腔内有 8 个以上红细胞不在计数之列。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-t 检验,相关性分析用 Pearson 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

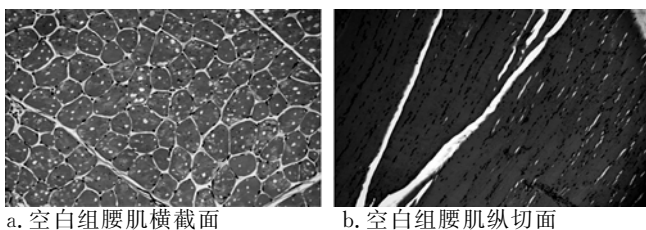
2.1 损伤局部观察比较 大体观察,模型组家兔 L₅ 水平打击点,表皮完好无破损,皮色暗红,有数个小瘀点。剪除表皮,暴露腰肌可见局部肌肉有瘀血,按之肿胀。光镜观察,正常肌细胞横截面呈规则的多边形,大小均匀,排列整齐,肌纤维间隙大小一致,肌细胞核位于细胞边缘,且每个细胞可以见到几个细胞核排列。正常肌细胞纵切面肌纤维为排列紧密而规律的纵向纤维,肌纤维粗细均匀,肌束之间间隙大小一致,肌细胞核排列于每个肌纤维膜下。造模后第 1 天腰肌横切面显示,肌细胞形状十分不规则,细胞体积增大、肿胀明显,肌细胞间隙增大伴有大量红细胞浸润,表示局部充血、水肿,并可见炎症细胞的浸润。造模 2 周后,模型组肌细胞形状、大小不规则,细胞体积增大、肿胀,且增大的细胞周围伴有相对较小的不规则形状的肌细胞,肌细胞之间间隙变大,伴有结缔组织增生。委中组细胞大小、形态较规则,细胞间隙较空白组轻度增大,伴有轻度的结缔组织增生。阿是组细胞大小、形态相对规则,肌细胞间隙较空白组轻度增大,伴有轻度的结缔组织增生。见图 1a~f。

2.2 血清 CK 的变化 造模 2 周后,模型组、委中组及阿是组血清 CK 含量均较空白组明显升高 ($P < 0.01, 0.05$);但委中组及阿是组均低于模型组 ($P < 0.01$);委中组和阿是穴组之间比较差异无统计学意义。见表 1。

2.3 腰肌 VEGF 免疫组化检测结果 造模 2 周后,各组腰肌 VEGF 散在表达于细胞浆或胞膜上;模型组 VEGF 表达较其它 3 组均有显著上升 ($P < 0.01$);委中组、阿是组、空白组 VEGF 的表达组间比较差异无统计学意义。见表 1,图 2a~d。

2.4 腰肌 MVD 免疫组化检测结果 造模 2 周后,各组腰肌 MVD 表达多位于肌细胞边缘;模型组 MVD 值明显高于空白组 ($P < 0.01$);委中组和阿是组 MVD 值均高于空白组 ($P < 0.01$),但都显著低于模型组 ($P < 0.01$);委中组和阿是穴组之间 MVD 值比较差异无统计学意义。见表 1,图 3a~d。

2.5 VEGF 与 MVD 的相关性分析 VEGF 与 MVD 表达成显著正相关 ($r = 0.709, P < 0.01$)。



a. 空白组腰肌横截面 b. 空白组腰肌纵切面

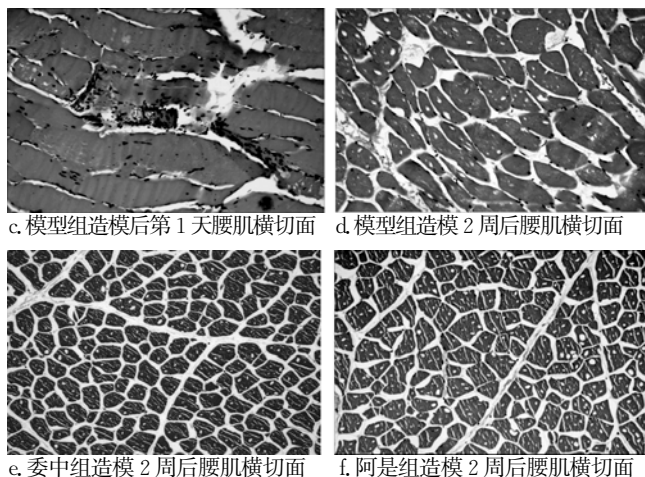


图 1a~f 腰肌 HE 染色(200×)

组别	n	血清 CK 含量(U/L)	腰肌 VEGF	腰肌 MVD(个/400×视野)
空白组	8	90.375±10.663	0.083±0.030	4.387±0.536
模型组	8	147.750±21.776 ^a	0.144±0.013 ^a	11.775±1.267 ^a
委中组	8	106.125±16.583 ^{bc}	0.087±0.015 ^c	5.225±0.324 ^{ac}
阿是组	8	114.250±8.746 ^{ac}	0.101±0.018 ^c	5.773±0.309 ^{ac}

与空白组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$;与模型组比较, ^c $P < 0.01$

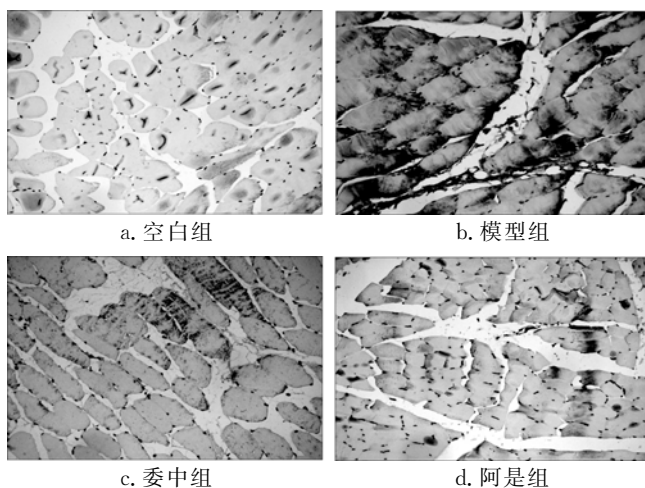


图 2a~d 4 组腰肌 VEGF 免疫组化染色(200×)

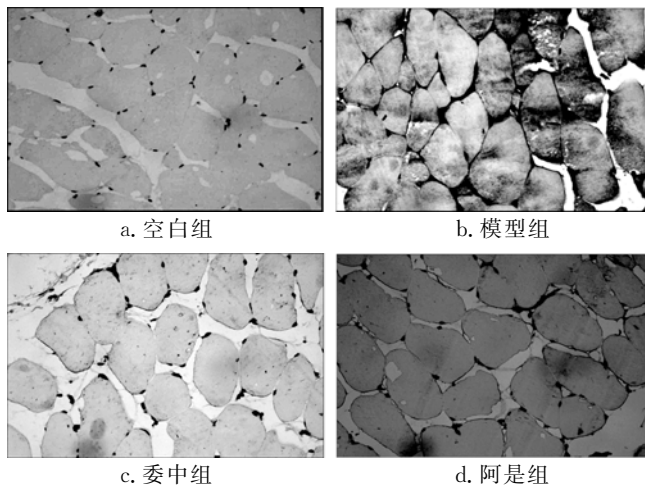


图 3a~d 4 组腰肌 MVD 免疫组化染色(400×)

3 讨论

3.1 各组家兔腰肌损伤修复的情况 CK是骨骼肌细胞内的一种重要的代谢酶。正常骨骼肌中,CK很难透过肌细胞膜而进入血液循环,当骨骼肌细胞受到破坏时,CK可释放进入血液。因此,血清中CK的含量可作为评定骨骼肌损伤情况的重要指标^[13]。血清CK含量的变化时程一般不超过7d,遵循升高-峰值-回落-恢复正常的规律,但有研究表明^[14],运动或损伤后10d~14dCK会出现二次升高,其原因是经过一段时间后,部分变形或断裂的肌纤维开始分解,细胞中大量的肌酸激酶被释放到血液中,使CK含量再次升高。

模型组血清中CK含量较空白组明显升高,说明造模2周后模型组腰部骨骼肌损伤仍存在;其原因可能是由于部分变形或断裂的肌纤维分解,大量CK释放到血液中。委中组和阿是穴组血清中CK含量均较模型组降低,这说明电针委中和阿是穴均能降低血清CK的含量,促进腰肌损伤修复;2组CK含量与空白组有差异,可能与2组还存在较轻程度的变形或断裂肌纤维分解有关。

3.2 腰肌VEGF的变化 VEGF是血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor,PDGF)家族的一个成员。组织细胞自身可分泌VEGF,在生理状态下VEGF呈低水平表达,但当骨骼肌损伤后,缺氧和缺血能够诱导组织细胞释放VEGF。VEGF是目前最强有力的血管生成因子,能增加微静脉、小静脉的通透性,促进血管内皮细胞分裂与增殖^[15]。故VEGF的血管化作用是机体生理及病理性组织生长和修复的基础。骨骼肌损伤修复过程可以分为炎症期、修复期和组织塑型期;在炎症期受损细胞开始分泌VEGF,修复期时VEGF发挥其作用,使局部组织微血管再生和毛细血管网重建,修复期约从伤后5d开始,持续到伤后3周^[16]。

MOD表示在视野内所有选定对象的平均反应强度,MOD值越高表示平均单位面积反应的阳性强度越大。模型组腰肌VEGF的MOD值明显高于空白组,这表明模型组腰肌VEGF蛋白表达明显,处于VEGF释放、作用阶段,微血管仍在再生、重建。鉴于本实验HE染色、血清CK的结果及相关文献^[7-9],及针刺对VEGF含量的调控是呈升高-峰值-回落-恢复正常的规律^[17-18],委中组和阿是穴组腰肌VEGF的表达均较模型组低,与空白组相差不大,2组之间的表达也近似,说明委中组和阿是穴组都能降低腰肌VEGF的表达,这可能由于委中组和阿是穴组VEGF

提前发挥作用,使2组处于表达末期,趋近于空白组而致。

3.3 腰肌MVD的变化 研究表明^[19],腰肌损伤时局部组织肿胀可造成局部组织血液循环障碍,一方面加重组织损伤及延缓损伤修复;另一方面缺血可造成局部组织酸性代谢产物堆积,使损伤所引起炎症及微循环障碍过程中产生的缺氧及缓激肽、P物质、前列腺素等物质的升高,从而进一步加重腰肌的损伤。所以,微循环的改善(包括血管再生)对于腰肌损伤修复来说是非常重要的,是腰肌损伤修复的基础。MVD常被用于肿瘤、心肌缺血、脑缺血等方面的研究,是评定局部组织中血管再生的常用指标。CD34是人类造血祖细胞表面的一种糖蛋白,其显示血管内皮细胞时特异性最高,常被用于检测MVD^[20]。

本实验结果显示,模型组腰肌MVD较空白组明显上升,表明模型组腰肌存在大量新生的微血管。虽然委中组和阿是穴组MVD与空白组比较都有统计学差异,但较模型组均明显降低,2组之间MVD差异也无统计学意义,由此可知电针委中穴及阿是穴均可使MVD降低;2组仍有轻度微血管再生,这可能与2组还存在较轻程度的变形或断裂肌纤维分解有关。

3.4 VEGF与MVD的相关性分析 相关分析说明VEGF和MVD存在正相关性,与杜建层等^[21]和龙辉等^[22]的结论一致。本实验出现委中组和阿是穴组的MVD值比模型组少的结果,鉴于本实验HE染色、血清CK的结果及相关文献^[7-9],结合VEGF和MVD相关性分析,我们认为该结果可能是由于电针委中穴和电针阿是穴通过VEGF提前发挥其再生血管的作用从而缩短微血管再生时间而致。

3.5 小结 家兔腰肌损伤2周后,电针委中穴可以降低血清CK的含量,促进腰肌损伤修复,其机制可能与电针调控VEGF表达规律而使其提前发挥其再生血管的作用,缩短微血管再生时间而使MVD降低有关。本实验还存在不足之处,即缺乏对损伤后炎症反应的观察。炎症反应是骨骼肌损伤的中早期影响微循环和血管再生的因素之一,能够从另一角度了解电针对血管再生和腰肌损伤修复的作用过程。

【参考文献】

- [1] 余芳,赵晖,邹然,张唐法.体针加穴位注射治疗缺血性脑卒中及其对血管内皮分泌功能的影响[J].中西医结合研究,2012,12,6(4):285-288.
- [2] 杨孝芳,崔瑾,刘小雨,等.“内关”穴埋针对心肌缺血小型猪心肌组织转化生长因子-B3 mRNA和蛋白表达的影响[J].针刺研究,2010,35(4):267-271.

- [3] 周越,李扬,王瑞元,等.运动性骨骼肌损伤评价指标-血清CK、LDH、Mb的比较[J].中国运动医学杂志,2008,27(2):206-208.
- [4] 毛杉杉,潘同斌,高颀,等.高住低训对大鼠骨骼肌低氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子基因表达的影响[J].中国运动医学杂志,2007,26(2):198-201.
- [5] 赵鹏,路瑛丽,冯连世,等.低氧训练对大鼠骨骼肌VEGF mRNA表达及毛细血管密度的影响[J].中国运动医学杂志,2009,28(2):131-135.
- [6] 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.
- [7] 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].中国康复理论与践,2013,19(4):334-340.
- [8] 王荣国,王云亭,肖诚,等.不同电流强度电针对兔骨骼肌钝器伤后改善微循环、抗纤维化和抗氧化能力的作用[J].中国康复医学杂志,2012,27(5):400-405.
- [9] 李俊华,王正珍,王军力,等.针刺对急性骨骼肌钝挫伤大鼠肌卫星细胞增殖的影响[J].中国体育科技,2012,48(4):137-140.
- [10] 林文注,王佩.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社,1999,288-288.
- [11] 孙晓峰,所剑,王琦,等.HIF-1A与VEGF在动脉粥样硬化闭塞症患者缺血下肢血管及肌组织中的表达及意义[J].吉林大学学报(医学版),2009,35(2):337-340.
- [12] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 1995,36(1):169-169.
- [13] 周越,李扬,王瑞元,等.运动性骨骼肌损伤评价指标-血清CK、LDH、Mb的比较[J].中国运动医学杂志,2008,27(2):206-208.
- [14] Armstrong RB. Initial events in exercise-induced muscular injury[J]. MedSci Sports Exerc, 1990,22(4):129-135.
- [15] Kusumanto YH, Weel VV, Mulder NH, et al. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial[J]. Hum Gene Ther, 2006,17(6):683-691.
- [16] Charley Gates, Johnny Huard. Management of Skeletal Muscle Injuries in Military Personnel[J]. Oper Techn Sport Med, 2005,13(4):247-256.
- [17] 潘秀花,杨占山,杨淑琴,等.在创伤愈合中VEGF和Ang-1表达的生物学动力学变化研究[J].苏州大学学报(医学版),2006,26(2):178-181.
- [18] Slevin M, Krupinski J, Slowik A, et al. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β in serum of patients with acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2000,30(8):1863-1870.
- [19] Olmarker K, Rydevik B. Pathophysiology of sciatica[J]. Orthop Clin Nor Am, 1991,22(2):223-223.
- [20] Zolota V, Gerokosata A, Melachrinou M, et al. Microvessel density, proliferating activity, p53 and bcl-2 expression in situ ductal carcinoma of the breast[J]. Anticancer Res, 1999,19(4B):3269-3274.
- [21] 杜建层,孙璐璐,王健.症状性子宫肌瘤子宫内中COX-2、VEGF和微血管密度的表达[J].中国妇幼保健,2009,24(31):4436-4440.
- [22] 龙辉,吴清明,李欢.VEGF的表达及其微血管密度在胃癌组织中的意义[J].世界华人消化杂志,2010,18(6):557-562.

作者·读者·编者

参考文献著录格式

参考文献:文稿中有关引用资料以近期出版的期刊及著作为主,应用的资料必需是正式发行的出版物,按在文稿中首次出现的顺序编码,并用方括号标注如“张某某^[1]报道”。参考文献著录格式应将作者的前1~3名列出,3名后加“等”。①著作:作者.书名[M].出版地:出版社,年,起止页码.②期刊:作者.文稿题[J].期刊名,年,卷(期):起止页码。