

针刺对骨骼肌急性钝挫伤模型形态学影响的实验观察

黄怡然 张 茜 李文迅 董摩扬 李 娜 丁婷婷 路问天 严 安 郭长青

(北京中医药大学针灸推拿学院, 北京, 100029)

摘要 目的:观察针灸针斜刺阿是穴对家兔腓肠肌急性钝挫伤修复的形态学影响。方法:采用定量负荷自由落体复制肌肉急性闭合性钝挫伤的方法对模型家兔右后肢腓肠肌进行造模,分别于造模后即刻、造模后 24 h、造模后 48 h 测量腓肠肌肿胀度,肌肉硬度,于造模后 48 h 取材,并检测血清中肌酸激酶、乳酸脱氢酶含量,并通过 HE 染色光镜和透射电镜观察家兔腓肠肌形态学改变。结果:造模后 48 h 各组家兔血清肌酸激酶(CK)含量比较,与正常组相比,模型组、针刺组、CsA 模型组、CsA 针刺组均显著升高($P < 0.05$),与模型组相比,CsA 模型组显著升高($P < 0.05$);造模后 48 h 各组家兔乳酸脱氢酶(LDH)含量,与空白组比较,模型组和 CsA 模型组显著升高($P < 0.05$),与模型组相比,针刺组和 CsA 针刺组显著降低($P < 0.05$);HE 染色光镜下,模型组及各干预组可见不同程度的肌纤维损害;透射电镜下模型组及各干预组可见不同程度的超微结构变化。结论:本实验中的造模方法可以成功复制腓肠肌急性闭合性钝挫伤模型,针灸针斜刺阿是穴可有效地促进腓肠肌急性钝挫伤修复,环孢素干预一定程度降低了针刺的修复作用。

关键词 针刺;骨骼肌;形态学

Observation on Experiment of the Morphological Effects of Acupuncture on Acute Blunt Skeletal Muscle Contusion Model

Huang Yiran, Zhang Qian, Li Wenxun, Dong Moyang, Li Na, Ding Tingting, Lu Wentian, Yan An, Guo Changqing

(School of Acupuncture and Moxibustion, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To observe the morphological effects of acupuncture on Ashi points of rabbits with acute gastrocnemius blunt contusion. **Methods:** Modeling was given on gastrocnemius muscle in rabbits' hindquarter by using method of free falling with quantitative load to duplicate acute skeletal muscle injury. The swelling degree and hardness of gastrocnemius (immediately, 24hours, 48hours after building the model) was measured. Materials were taken 48hours after building the model. The content of CK and LDH in serum were tested. The morphological changes of gastrocnemius under light microscope and electron microscope were observed. **Results:** 48 hours after building the model, the content of CK of model group, acupuncture group, CsA model group and CsA acupuncture group increased significantly compared the nature group ($P < 0.05$); compared with the nature group, differences of the content of LDH of model group and CsA model group increased significantly ($P < 0.05$); compared with the model group, acupuncture group, CsA model group and CsA acupuncture group decreased significantly ($P < 0.05$). Under light microscope, different kinds of muscle fiber trauma could be found in all groups except the nature group. Under electron microscope, Ultrastructural changes could be seen in all groups except the nature group. **Conclusion:** The modeling method can successfully copy acute closed skeletal gastrocnemius muscle injury model. Acupuncture could promote the reparative process of acute blunt muscle effectively, while CsA would partially reduce the repairing effect of acupuncture.

Key Words Acupuncture; Skeletal muscle; Morphology

中图分类号:R274.3;R246.9 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.04.025

骨骼肌的损伤在生活及运动中非常常见,包括多种原因导致的急性损伤、疲劳性损伤以及废用性肌肉萎缩^[1],其发生率从 10% ~ 55% 不等^[2]。骨骼肌的损伤和再生是一个连续病理过程中的不同阶段^[3-5],包括骨骼肌的变性坏死和肌纤维结构破坏、炎症反应细胞浸润(主要是巨噬细胞)吞噬坏死细胞成分、卫星细胞的激活、分裂增殖形成新的肌管细胞进而发育成肌纤维、再生肌纤维的分化成熟和肌肉功能恢复等过程。中医治疗肌肉损伤历史悠久,针刺治疗效果佳,具有疗

效高,见效快,疗程短,费用低,简便易行等显著优点。但针刺治疗骨骼肌肌损伤的机制尚不明确,有待研究。骨骼肌应对环境刺激的重塑是肌纤维在生理、生化、形态、功能等各方面的协调适应,这一过程可能涉及细胞内多种信号转导通路的激活以及多个基因的程序化表达,最终引起肌肉体积、质量、代谢状态与工作能力的适应性变化。对骨骼肌细胞信号转导通路以及骨骼肌重塑的细胞分子机制研究中,钙调神经磷酸酶(CaN)信号在骨骼肌重塑中的作用近几年备受关注。研究者

基金项目:北京中医药大学青年教师自主课题(编号:2012-QNJSZX010);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201210026019)

第一作者:黄怡然(1981—),北京中医药大学针灸推拿学院,博士生,研究方向:针推康复治疗运动神经系统疾病,E-mail:caicai13@126.com

通信作者:郭长青(1959—),男,教授,主任医师,北京中医药大学针灸推拿学院针刀中心主任,电话传真:64287525,通信地址:北京市朝阳区北三环东路 11 号,100029,E-mail:guochangqing66@163.com

通过环孢素 A 抑制大鼠 CaN 活性来研究 CaN/NFAT 信号通路^[6]。有研究表明抑制 CaN[抑制剂:环孢素 A(CsA)]显著减少大鼠 I 型和 II 型肌纤维的生长^[7]。CaN/NFAT 通路能促进 I 型肌表型和刺激肌肉生长,然而,机械刺激通过神经钙蛋白信号促进肌肉生长,是否反映肌肉对机械刺激的直接应答仍然不清楚^[8-11]。本实验试图通过观察针灸斜刺阿是穴干预腓肠肌急性钝挫伤家兔,研究针灸斜刺对家兔腓肠肌急性钝挫伤修复的形态学影响,探究斜刺治疗骨骼肌损伤的机制,进一步揭示损伤的骨骼肌组织结构是如何恢复正常的,从而为临床治疗肌肉损伤提供科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 健康清洁级 6 月龄新西兰兔 30 只,雌性,体重(2.25 ± 0.1)kg,由北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司提供,动物生产许可证号:SYXK(京)2013-0022。实验过程中对动物的处置严格遵守国家科技部 2006 年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。正常环境下单笼常规饲养,饲养房间为每 12 h 光暗循环,温度控制在 24℃,湿度 60%。自由进食与饮水。

1.2 动物分组及处理方法 将 30 只新西兰兔随机分为 5 组,每组各 6 只,分别为空白组、模型组、针刺组、CsA 模型组和 CsA 针刺组。

1.2.1 空白组(N) 正常饲养。

1.2.2 模型组(M) 造模后正常饲养。

1.2.3 针刺组(Z) 于造模成功后 24 h 进行腓肠肌斜刺治疗,常规备皮、消毒,然后腓肠肌移行跟腱的部位进针,直刺过皮后,将毫针调整角度至与腓肠肌成 30 度角,斜刺穿过腓肠肌肌束,出针并按压片刻止血。不留针,治疗 1 次。

1.2.4 CsA 模型组(CsAM) 于造模前 3 d 注射开始注射 CsA,按每只兔 $9.25 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ (诺华制药 25 mg)剂量分 2 次行腹腔注射,直至取材(于造模成功后 48 h 以空气栓塞法处死各组兔进行取材)。

1.2.5 CsA 针刺组(CsAZ) CsA 注射同 CsA 模型组;针刺治疗同针刺组。

1.3 仪器与试剂 4% 多聚甲醛,100% 乙醇,石蜡,二甲苯等试剂均采购自北京化学试剂公司。CK、LDH 试剂盒由北京中杉生物工程高技术公司提供。毫针:环球牌不锈钢针灸针,直径 0.40 mm,长 40 mm,苏州环球针灸医疗器械有限公司制。

1.4 模型制备 25% 乌拉坦 4 mL/kg 耳缘静脉麻醉,俯卧位固定在解剖台上,右后肢褪毛,右后肢于伸膝、

踝背屈约 90 度位固定,显示腓肠肌。选定腓肠肌肌腹中段做为打击中心(距跟骨 6.5 cm 处),将固定导管(直径 2.2 cm)置于小腿腓肠肌上方,压紧,以防目标肌群发生位移,500 g 铁棒(直径 1.5 cm)从固定导管内 30 cm 标记处自由下落,动能为 1.47 J,导致一次肌肉挫伤,同一部位连续打击 20 次,造成家兔腓肠肌钝性损伤,不作任何处理,正常环境下常规饲养,形成急性腓肠肌钝挫伤动物模型。

判定模型成功的标准:1)肉眼观察可见砸伤部位皮肤完整,局部肿胀、皮肤青紫、瘀血。2)砸伤后动物活动减少,伤肢屈曲,行走不利。3)解剖病理观察:局部解剖可见损伤范围涉及整个腓肠肌,表现为肿胀充血,并波及周边其他肌肉组织,但没有骨折;HE 染色光镜下显示,部分的肌纤维断裂、肌细胞的变性坏死和大量的炎性反应细胞浸润。

1.5 行为学观测 各组动物分别于造模后即刻、造模后 24 h、造模后 48 h 测试行为学。行为学指标的检测为观察造模前后动物的双侧后肢肿胀程度(距跟骨 6.5 cm 处测量周径),骨骼肌(距跟骨 6.5 cm 处)硬度。

1.5.1 肿胀 肿胀程度用测量法,测试仪器采用皮尺,测试时,兔采取侧卧、膝踝关节屈曲 90 度放松位,实验侧在上,在距跟骨 6.5 cm 处测量周径,同时测量健侧对称部位。

1.5.2 硬度 测试仪器采用国家体委科研研制的皮脂计。测试时,兔采取侧卧、膝踝关节屈曲 90 度放松位,实验侧在上。测试部位:距跟骨 6.5 cm 处的肌肉硬度。

1.6 生化检测 所有动物均于取材前从耳缘静脉采血 3 mL,然后放于离心机中 1 000 r/min,离心 10 min,将上层淡黄色血清移于小离心管保存在 -20℃ 冰箱中。利用 ECOM-F 6124 型半自动生化分析仪对 CK、LDH 活性进行测定:1 mL 工作液 + 20 μL 血清,延迟 1 min 后,测定其 1 min 内吸光度的变化(CK);500 μL 工作液 + 20 μL 血清,延迟 30 s 后,测定其 1 min 内吸光度的变化(LDH)。

1.7 取材与形态学观察 于造模成功后 48 h 以空气栓塞法处死各组兔进行取材。

1.7.1 光镜标本制作 于腓肠肌肌腹中段取 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 8 mm 方块,切取两块 3 cm $\times$ 3 cm $\times$ 4 cm 大小的新鲜骨骼肌,标本均放入 10% 甲醛溶液中固定 3 d,梯度脱水、浸蜡、包埋处理,分别将两块标本纵向和横向包埋,以 5 μm 厚度连续切片,HE 和甲苯胺蓝染色后光镜下观察,观察肌细胞的形态、肌纤维断裂情况和

异常细胞数量。

1.7.2 电镜标本制作 剩余标本切成 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 大小,经戊二醛固定 1 周,2.5% 的戊二醛固定液 4°C 固定 2 h,之后电镜常规制样操作,在透射电镜下观察肌纤维超微结构的变化。

1.8 数据分析方法 运用 SPSS 18.0 软件,进行单因素 ANOVA 分析、秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 行为观测结果

2.1.1 肿胀 测量结果显示,造模后即刻各组右后肢均无明显肿胀 ($P > 0.05$);造模后 24 h,与空白组比较,其他四组的右后肢肿胀程度均有明显增大 ($P < 0.01$),说明造模成功,与模型组相比,针刺组和 CsA 模型组肿胀度降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);造模后 48 h,与正常组相比,其他四组肿胀差异有统计学意义 ($P < 0.01$),模型组比较,CsA 模型组肿胀明显降低 ($P < 0.05$),针刺组和 CsA 针刺组的肿胀程度差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 CsA 模型组比较,针刺组和 CsA 针刺组的肿胀程度较高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 CsA 阻断的 CaN/NFAT 通路可能是损伤肌肉进行修复的重要通道。详见表 1。

表 1 各组肿胀程度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	造模后即刻	造模后 24 h	造模后 48 h
空白组	0.067 ± 0.082	0.100 ± 0.110	0.083 ± 0.075
模型组	0.067 ± 0.082	$1.933 \pm 1.093^{**}$	$1.967 \pm 0.662^{**}$
针刺组	0.067 ± 0.082	$1.450 \pm 0.789^{**\Delta}$	$1.817 \pm 0.574^{**\Delta}$
CsA 模型组	0.063 ± 0.121	$1.400 \pm 0.482^{**\Delta}$	$1.233 \pm 0.273^{**\Delta}$
CsA 针刺组	0.083 ± 0.076	$2.133 \pm 0.698^{**}$	$2.017 \pm 1.092^{**\Delta}$

注: * 均值差的显著性水平为 0.05,与空白组组比较 ($P < 0.05$); ** 均值差的显著性水平为 0.01,与空白组组比较 ($P < 0.01$); Δ 均值差的显著性水平为 0.05,与模型组组比较 ($P < 0.05$); Δ 均值差的显著性水平为 0.05,与 CsA 模型组比较 ($P < 0.05$)。

2.1.2 硬度 测量结果显示,造模后即刻,与空白组比较,其他四组右后肢腓肠肌硬度具有统计学意义 ($P < 0.01$),组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明造模成功,且造模各组损伤程度相当;造模成功后 24 h,与正常组相比,其他四组腓肠肌硬度极显著升高 ($P < 0.01$),与模型组比较,针刺组、CsA 模型组、CsA 针刺组的腓肠肌硬度差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),与 CsA 模型组比较,针刺组、CsA 针刺组的腓肠肌硬度无统计学意义 ($P > 0.05$),与针刺组比较,CsA 针刺组的腓肠肌硬度差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$);造模成功后 48 h,与空白组比较,其他四组腓肠肌硬度升高,有统计学意义 ($P < 0.01$),与模型组相比,针刺组和 CsA 模型组组的腓肠肌硬度明显下降 ($P < 0.05$),与

CsA 模型组相比,模型组、针刺组和 CsA 针刺组腓肠肌硬度升高,有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 各组腓肠肌硬度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	造模后即刻	造模后 24 h	造模后 48 h
空白组	0.333 ± 0.408	0.417 ± 0.204	0.583 ± 0.124
模型组	$6.583 \pm 0.917^{**}$	$6.667 \pm 2.443^{**}$	$4.583 \pm 1.281^{**\Delta}$
针刺组	$6.417 \pm 2.710^{**}$	$5.417 \pm 3.169^{**}$	$3.333 \pm 2.160^{**\Delta\Delta}$
CsA 模型组	$5.500 \pm 2.214^{**}$	$5.417 \pm 2.311^{**}$	$2.333 \pm 2.090^{**\Delta}$
CsA 针刺组	$6.000 \pm 2.259^{**}$	$6.000 \pm 2.280^{**}$	$6.833 \pm 3.125^{**\Delta}$

注: * 均值差的显著性水平为 0.05,与空白组组比较 ($P < 0.05$); ** 均值差的显著性水平为 0.01,与空白组组比较 ($P < 0.01$); Δ 均值差的显著性水平为 0.05,与模型组比较 ($P < 0.05$); $\Delta\Delta$ 均值差的显著性水平为 0.05,与 CsA 模型组比较 ($P < 0.05$)。

2.2 生化检测结果

2.2.1 血清肌酸激酶 (CK) 检测结果显示,与空白组,其他四组 CK 值显著升高 ($P < 0.05$),四组之间无统计学差异 ($P > 0.05$);与模型组比较,CsA 模型组显著升高 ($P < 0.05$);与 CsA 模型组组相比,模型组、针刺组和 CsA 针刺组均显著降低 ($P < 0.05$)。详见表 3。

2.2.2 乳酸脱氢酶 (LDH) 检测结果显示,与空白组比较,模型组和 CsA 模型组显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组和 CsA 针刺组显著降低 ($P < 0.05$);与 CsA 模型组比较,针刺组和 CsA 针刺组显著降低 ($P < 0.05$),针刺组和 CsA 针刺组之间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 3

表 3 各组 CK 值和 LDH 值比较 ($\bar{x} \pm s, U/L, n = 6$)

组别	CK 值	LDH 值
空白组	1645.162 ± 424.121	253.262 ± 39.419
模型组	$2457.807 \pm 299.297^{*\Delta}$	$425.572 \pm 58.857^{*}$
针刺组	$2566.788 \pm 827.591^{*\Delta}$	$251.132 \pm 137.429^{\Delta\Delta}$
CsA 模型组	$3214.048 \pm 920.845^{*\Delta}$	$402.730 \pm 83.753^{*}$
CsA 针刺组	$2143.183 \pm 201.294^{*\Delta}$	$235.758 \pm 76.208^{\Delta\Delta}$

注: 均值差的显著性水平为 0.05, * 与空白组组比较 ($P < 0.05$); Δ 与模型组比较 ($P < 0.05$); $\Delta\Delta$ 与 CsA 模型组比较 ($P < 0.05$)。

2.3 光镜结果

2.3.1 空白组 (N) 图 1, A、B、C 为空白组肌纤维横切面分别放大 40 倍、100 倍和 400 倍,镜下可见:肌纤维横切面呈多边形,大小均等,肌原纤维之间的肌浆呈粉红色,核呈圆形或椭圆形位于边缘;D、E、F 为空白组肌纤维横切面分别放大 40 倍、100 倍和 400 倍,镜下可见:肌纤维纵切面肌细胞呈长条状,相互平行排列,肌纤维之间有少量成纤维细胞核,每条肌纤维有许多扁椭圆形的核,位于肌纤维的周边。

2.3.2 模型组 (M) 图 2, A、B、C 为模型组肌纤维横切面分别放大 40 倍、100 倍和 400 倍,镜下可见:肌纤维横切面边界模糊,大小不一,部分肌纤维损伤处肌浆外漏,有大量炎性细胞浸润,且以弥散性炎性细胞增多

为主,毛细血管增生明显;D、E、F为模型组肌纤维横切面分别放大40倍、100倍和400倍,镜下可见:大量肌纤维萎缩,少量肌纤维溶解,肌细胞间质水肿,大量炎性细胞浸润,肌细胞核增多。

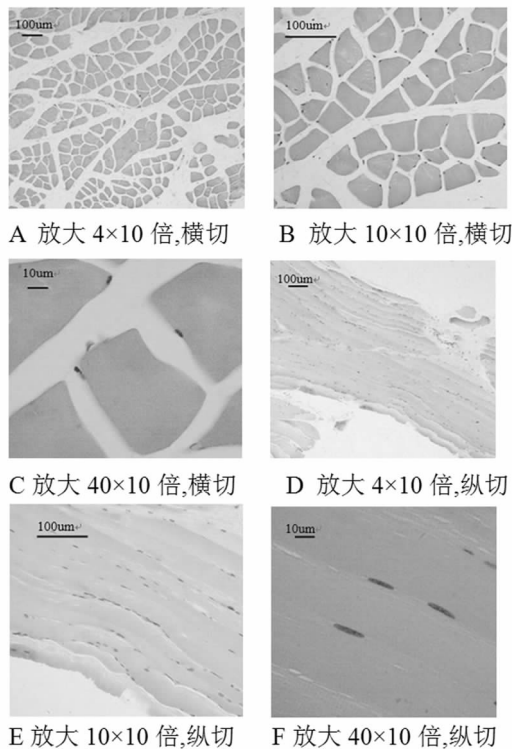


图1 光镜下空白组肌纤维横切及纵切 HE 染色

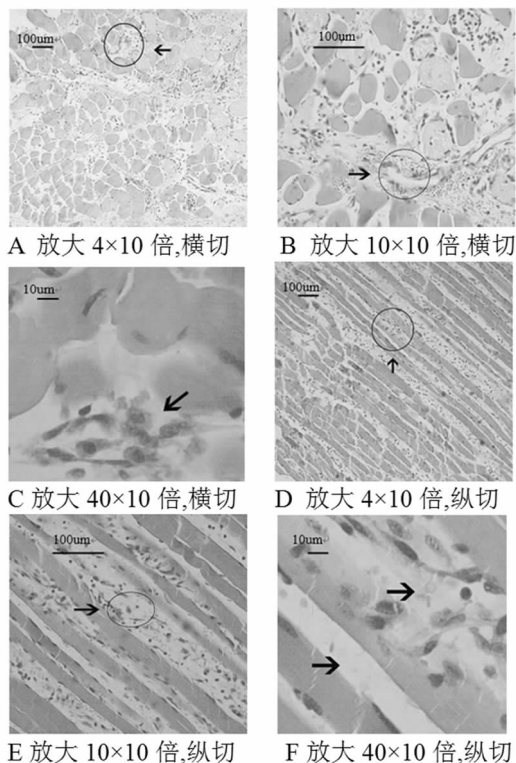


图2 光镜下模型组肌纤维横切及纵切 HE 染色

2.3.3 针刺组(Z) 图3, A、B、C为针刺组肌纤维横切面分别放大40倍、100倍和400倍,镜下可见:肌纤维横切面为不规整多边形,大小较均等,排列较整齐,部分肌细胞水肿,间隙较空白组减小,损伤局部大量红细胞聚集;D、E、F为针刺组肌纤维横切面分别放大40倍、100倍和400倍,镜下可见:损伤局部部分肌纤维肿胀,有大量炎性细胞浸润,且较模型组损伤局部炎性细胞浸润更明显,炎性反应集中于肌纤维损伤处且表现为从外向里渗透。

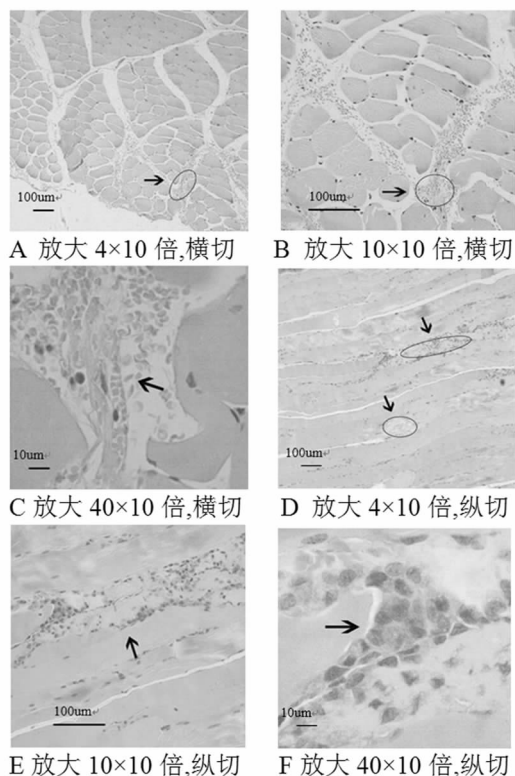


图3 光镜下针刺组肌纤维横切及纵切 HE 染色

2.3.4 CsA模型组(CsAM) 图4, A、B、C为CsA模型组肌纤维横切面分别放大40倍、100倍和400倍,镜下可见:肌纤维横切面为不规整多边形,部分肌纤维边界模糊甚至溶解,肌浆外漏,肌纤维肿胀程度较CsA模型组减轻,肌细胞间隙明显减小,出现少量空泡(因正常血液循环被破坏,使肌纤维缺乏营养供应而坏死、萎缩所致);D、E、F为CsA模型组肌纤维横切面分别放大40倍、100倍和400倍,镜下可见:肌纤维肿胀,损伤处出现炎性细胞浸润,伴有大量红细胞聚集。

2.3.5 CsA针刺组(CsAZ) 图5, A、B、C为CsA针刺组肌纤维横切面分别放大40倍、100倍和400倍,镜下可见:肌纤维横切面为不规整多边形,大小较均等,可见肌纤维肿胀明显,肌细胞间隙明显减小,肌细胞核增多,少量炎性细胞浸润;D、E、F为CsA针刺组肌纤维横切面分别放大40倍、100倍和400倍,镜下可见:

可见部分肌纤维溶解,少量炎性细胞浸润现象。

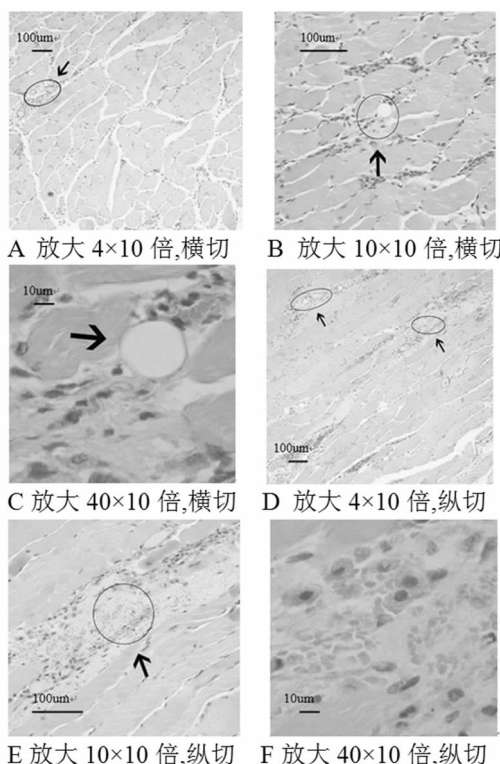


图 4 光镜下 CsA 模型组肌纤维横切及纵切 HE 染色

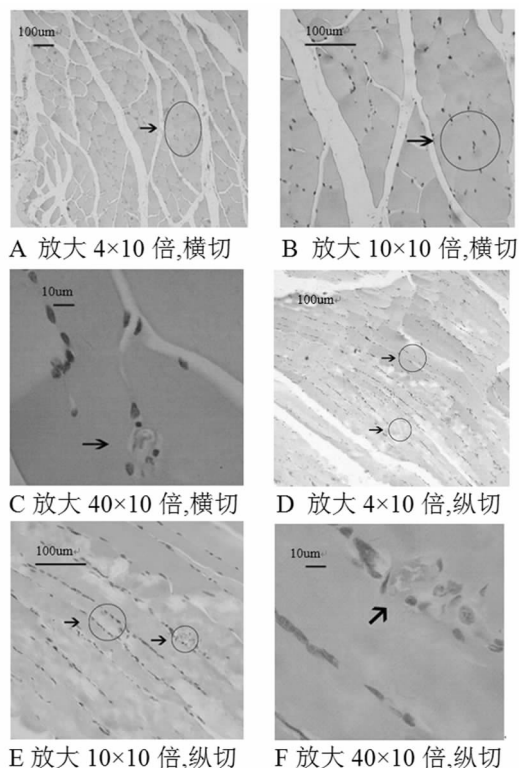


图 5 光镜下 CsA 针刺组肌纤维横切及纵切 HE 染色

2.4 电镜结果

2.4.1 空白组(N) 图 6,透射电镜下 A 图放大 8 000 倍,显示肌节;B 图放大 12 000 倍,显示肌节、线粒体;

C 图放大 25 000 倍,显示线粒体、肌纤维、内质网,镜下可见:空白组肌节、肌丝排列整齐,肌节完整,肌原纤维中 Z 线、M 线清晰。

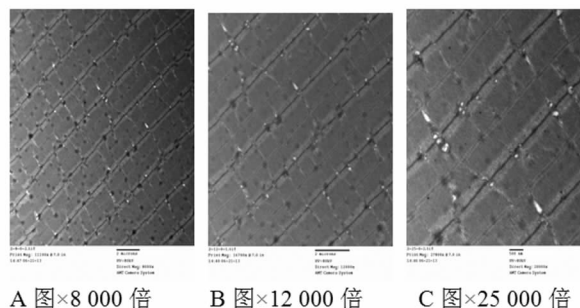


图 6 透射电镜下空白组骨骼肌超微结构(纵切)

2.4.2 模型组(M) 图 7,透射电镜下 A 图放大 8 000 倍,显示肌节;B 图放大 12 000 倍,显示肌节、线粒体;C 图放大 25 000 倍,显示线粒体、肌纤维、内质网,镜下可见:模型组肌原纤维溶解消失,无法区分 A、I 带,Z 线、M 线溶解。

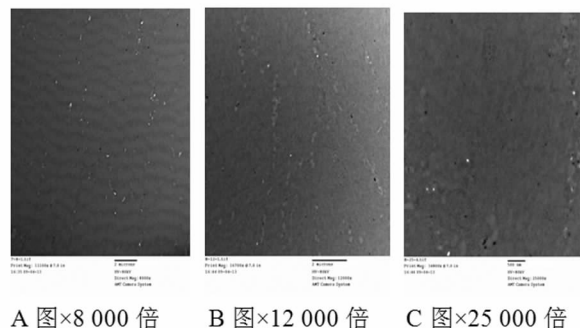


图 7 透射电镜下模型组骨骼肌超微结构(纵切)

2.4.3 针刺组(Z) 图 8,透射电镜下 A 图放大 8 000 倍,显示肌节;B 图放大 12 000 倍,显示肌节、线粒体;C 图放大 25 000 倍,显示线粒体、肌纤维、内质网,镜下可见:针刺组肌原纤维形态正常,肌丝总体排列整齐,肌节未见肿胀,Z 线、M 线清晰,部分损伤局部 Z 线、M 线略有位移,线粒体数量少。

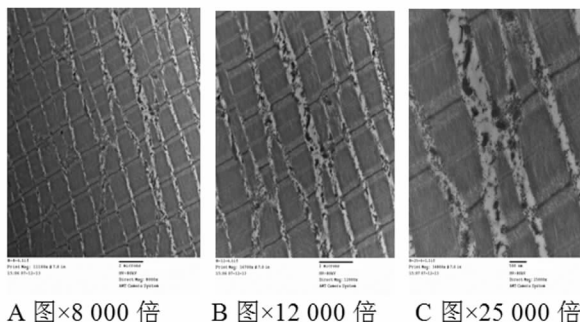
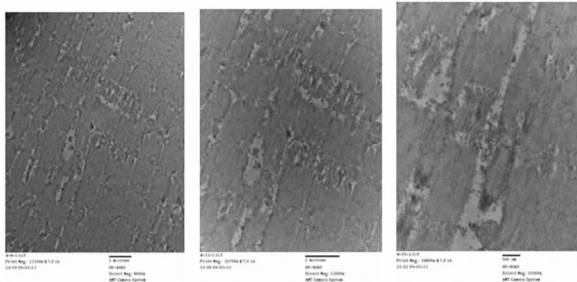


图 8 透射电镜下针刺组骨骼肌超微结构(纵切)

2.4.4 CsA 模型组(CsAM) 图 9,透射电镜下 A 图

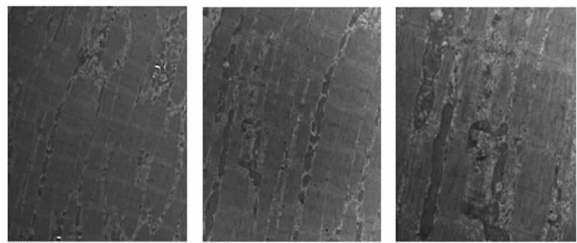
放大 8 000 倍,显示肌节;B 图放大 12 000 倍,显示肌节、线粒体;C 图放大 25 000 倍,显示线粒体、肌纤维、内质网,镜下可见:CsA 模型组肌节肿胀明显,肌丝紊乱,结构不清,大量肌原纤维断裂、溶解,Z 线、M 线溶解消失。



A 图×8 000 倍 B 图×12 000 倍 C 图×25 000 倍

图 9 透射电镜下 CsA 模型组骨骼肌超微结构(纵切)

2.4.5 CsA 针刺组(CsAZ) 图 10,透射电镜下 A 图放大 8 000 倍,显示肌节;B 图放大 12 000 倍,显示肌节、线粒体;C 图放大 25 000 倍,显示线粒体、肌纤维、内质网,镜下可见:CsA 针刺组肌节明显肿胀,部分 Z 线、M 线断裂溶解,部分肌原纤维扭曲、断裂,损伤局部有结缔组织增生,可见大量聚集的线粒体,且部分线粒体明显水肿,嵴开始融解,出现空泡化。



A 图×8 000 倍 B 图×12 000 倍 C 图×25 000 倍

图 10 透射电镜下 CsA 针刺组骨骼肌超微结构(纵切)

3 分析及讨论

骨骼肌损伤属于中医的“经筋病”的范畴,《素问·调经论》中指出“病在筋,调之筋”,指出治疗经筋病宜以调筋为主;《灵枢经·官针第七》指出:“病痹气痛而不去者,取以毫针。”“九曰浮刺,傍入而浮之,以治肌急而寒者也。”在适应五脏的五种刺法中又指出:“四曰合谷刺,合谷刺者,左右鸡足,针于分肉之间,以取肌痹。”《灵枢经·经筋第十三》论述筋病的治疗原则时说:“治在燔针劫刺,以知为数,以痛为腧”。《灵枢·官针》云:“傍针刺者,直刺、傍刺各一,以治留痹久居者也”。《内经·十二刺》云:“恢刺者,直刺傍之,举之前后,恢筋急,以治筋痹也”。这些论述指出了肌病、筋病等疼痛日久的痹症,应选用毫针,取阿是穴,采用斜刺的针法治疗。卢鼎厚等^[12-16]借鉴了中医疗法,

通过一系列实验研究发现,斜刺阿是穴治疗肌肉损伤是通过加强收缩蛋白的组装、合成,促进收缩结构和功能的恢复而达到治疗目的的,且其效果主要不是通过神经和经络的调节,而是通过肌肉本身所固有的外周机制实现的。故本实验选取针灸斜刺阿是穴治疗骨骼肌钝挫伤家兔模型,并且选择在造模成功后 24 h 开始进行针刺治疗。

对骨骼肌细胞信号转导通路以及骨骼肌重塑的细胞分子机制研究中,钙调神经磷酸酶(CaN)信号在骨骼肌重塑中的作用近几年备受关注。IGF-I 使肌纤维细胞膜上的 Ca^{2+} 通道活性提高,导致细胞溶质 Ca^{2+} 增加。胞质中的 Ca^{2+} 与钙调节蛋白(CaM)结合激活 CaN,具有活性的 CaN 对激活 T 细胞核因子(Nuclear Factor of Activated T Cells, NFAT)去磷酸化,将活化 T 细胞核因子易位到细胞核并且导致基因转录^[17]。CaN 是蛋白磷酸脂酶,在肌肉肥大中起着重要的作用,是骨骼肌纤维重构的重要信号因子^[18-21],CaN/NFAT 信号激活能促进肌纤维的融合和分化。本实验进一步深入研究就可探讨 CaN/NFAT 通路是否为针刺促进损伤骨骼肌修复的重要通路。

行为学观察结果显示急性钝挫伤造模成功,各组家兔右后肢腓肠肌肿胀程度对比显示,针刺组较 CsA 组、CsA 针刺组骨骼肌较明显修复,而腓肠肌硬度的指标作为检测指标,在造模后 48 h,模型组出现自然恢复,而较模型组相比针刺组、CsA 模型组的肌肉硬度显著降低,说明针刺和环孢素均可在一定时间内降低损伤肌肉硬度,促进其向正常组织硬度恢复。造模后 48 h 各组家兔血清肌酸激酶(CK)含量较正常显著增加,与模型组相比,针刺组、CsA 针刺组无显著差异,CsA 模型组显著升高,说明急性钝挫伤造模及针刺刺激均使模型兔的 CK 值升高,且 CsA 模型组损伤程度最高,急性钝挫伤造模及环孢素均可导致肌损伤,其损伤作用可因损伤条件叠加出现累积效应。乳酸脱氢酶(LDH)含量,与空白组比较,模型组和 CsA 模型组均显著升高,与模型组比较,针刺组和 CsA 针刺组均显著降低,说明急性钝挫伤造模及环孢素均使模型兔血清中乳酸脱氢酶含量升高,而针刺能有效改善肌损伤模型兔血清中乳酸脱氢酶含量,即使环孢素阻断条件下,针刺仍显示其促进骨骼肌外周循环方面的修复作用。

本实验 HE 染色光镜下,模型组可见大量肌纤维萎缩,局部肌纤维断裂,损伤处肌浆外漏,有大量炎性细胞浸润,且以弥散性炎性细胞增多为主,毛细血管增生明显,少量肌纤维溶解,肌细胞间质水肿,肌细胞核增多;损伤局部部分肌纤维肿胀,针刺组肌纤维排列较

整齐,肌细胞间隙较空白组减小,损伤局部大量红细胞聚集,有炎性细胞浸润,且较模型组损伤局部炎性细胞浸润更明显,炎症反应集中于肌纤维损伤处且表现为从外向里渗透。该结果也与田野等在对骨骼肌纤维超微结构的影响中总结出的骨骼肌急性损伤的典型病理变化遵循特点一致^[22-23]。说明本造模方法可成功复制腓肠肌急性闭合性钝挫伤模型,且针刺能有效促进损伤的骨骼肌修复。CsA 模型组可见肌纤维肿胀明显,部分肌纤维溶解肌细胞间隙明显减小,肌细胞核增多,少量毛细血管增生,无大量炎性细胞浸润现象,CsA 针刺组肌纤维肿胀程度较 CsA 模型组减轻,肌细胞间隙明显减小,出现少量空泡(因正常血液循环被破坏,使肌纤维缺乏营养供应而坏死、萎缩所致),损伤处出现炎性细胞浸润,有大量红细胞聚集。说明阻断 CaN/NFAT 通路后,损伤骨骼肌的修复受到了很大的影响。透射电镜下,模型组肌原纤维溶解消失,无法区分 A、I 带,Z 线、M 线溶解,针刺组肌原纤维形态正常,肌丝排列整齐,肌节未见肿胀,Z 线、M 线清晰,损伤局部聚集较多线粒体和肌质网,正常的肌节附近有普遍增多的线粒体,进一步证明了针灸针斜刺阿是穴可以有效地促进腓肠肌急性钝挫伤修复。CsA 模型组肌丝紊乱,结构不清,大量肌原纤维断裂、溶解,Z 线、M 线溶解 CsA 针刺组肌节肿胀明显,肌节肿胀,Z 线溶解,部分肌原纤维扭曲、断裂,损伤局部有结缔组织增生,有大量线粒体聚集,并出现线粒体损伤现象,环孢素可减缓骨骼肌局部损伤反应,同时也降低了针刺的修复作用,也进一步佐证了 CaN/NFAT 通路不是针刺诱导损伤骨骼肌修复的唯一通路,但其在促进骨骼肌修复的过程中起重要作用。

参考文献

- [1] Mastaglia FL, Papadimitriou JM, Kakulas B A. Regeneration of muscle in duchenne muscular dystrophy: an electron microscopic study[J]. *Neurol*, 1970, 11: 425 - 444.
- [2] Lehto MU, Jarvinen MJ. Muscles injuries, their healing process and treatment[J]. *Ann Chir Gynaecol*, 1991, 80: 102 - 108.
- [3] Zacks SI, Kurek JB, Margarita Romanella, et al. The role of Leukemia Inhibitory factor in skeletal muscle regeneration and growth[J]. *Muscle & Nerve*, 2002, 12: 234 - 256.
- [4] Senf SM, Howard TM, Ahn B, et al. Loss of the inducible Hsp70 delays the inflammatory response to skeletal muscle injury and severely impairs muscle regeneration[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62687.
- [5] Krause MP, Al-Sajee d, D'Souza dM, et al. Impaired macrophage and satellite cell infiltration occurs in a muscle-specific fashion following injury in diabetic skeletal muscle[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70971.
- [6] Angus LM, Chakkalakal JV, Mejat A, et al. Calcineurin - NFAT signaling, together with GABP and peroxisome PGC - 1 alpha, drives utrophin gene expression at the neuromuscular junction[J]. *Am J Physiol Cell*

- Physiol*, 2005, 289(4): C908 - 917.
- [7] Bigard AX, Koulmann N, Bahi L, et al. Thyroid hormones and muscle phenotype: involvement of new signaling pathways[J]. *J SocBio*, 2008, 202(2): 93 - 100.
- [8] 朱一力, 张国华, 曾凡星. 机械刺激诱导肌肉生长的细胞信号通路[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(28): 5507 - 5512.
- [9] 林清, 张宏, 赵谦, 等. 推拿法引发人骨骼肌细胞生物学效应的机制探讨[J]. *上海中医药大学学报*, 2013, 2(27): 81 - 84.
- [10] Adams GR, Bamman MM. Characterization and regulation of mechanical loading - induced compensatory muscle hypertrophy[J]. *Compr Physiol*, 2012, 2(4): 2829 - 2870.
- [11] Angus LM, Chakkalakal JV, Mejat A, et al. Calcineurin - NFAT signaling, together with GABP and peroxisome PGC - 1 alpha, drives utrophin gene expression at the neuromuscular junction[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289(4): C908 - 917.
- [12] 卢鼎厚, 张志愿. 斜刺对骨骼肌损伤的治疗作用[J]. *中国针灸*, 1989, 9(6): 1 - 4.
- [13] 卢鼎厚. 骨骼肌损伤的病因和治疗[M]. 北京: 北京体育学院出版社, 1993.
- [14] 段昌平, 傅湘琦, 赵天德, 等. 针刺和静力牵张对延迟性酸痛过程中骨骼肌超微结构的影响[J]. *北京体育学院学报*, 1984, 10(4): 8 - 19.
- [15] 张建国, 樊景禹, 卢鼎厚. 针刺(直刺, 斜刺)对大负荷斜蹲后骨骼肌超微结构的影响[J]. *体育科学*, 1988, 8(1): 61 - 64.
- [16] 卢鼎厚, 樊景禹, 屈竹青, 等. 针刺和静力牵张对大负荷运动后骨骼肌收缩结构变化影响的免疫电镜研究[J]. *体育科学*, 1992, 12(6): 47 - 51.
- [17] Tidball JG. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation[J]. *J Appl Physiol*, 2005, 98: 1900 - 1908.
- [18] Parsons S A, Millay d P, Wilkins B J, et al. Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(25): 26192 - 26200.
- [19] Sanna B, Brandt E B, Kaiser R A, et al. Modulatory calcineurin interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo[J]. *PNAS*, 2006, 103(19): 7327 - 7332.
- [20] Bassel duby R, Olson E N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling[J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 19 - 37.
- [21] Talmadge R J, Otis J S, Rittler M R, et al. Calcineurin activation influences muscle phenotype in a muscle-specific fashion[J]. *BMC Cell Biol*, 2004, 5: 28 - 40.
- [22] Brock Symons T, Clasey JL, Gater dR, et al. Effects of deep heat as a preventative mechanism on delayed muscle soreness[J]. *J Strength Cond Res*, 2004, 18(1): 155 - 161.
- [23] 田野, 杨锡让. 运动性骨骼肌纤维结构、功能变化的机制研究力竭运动对骨骼肌纤维超微结构的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 1992, 11(4): 202 - 204.
- [24] Sorichter, S, J. Mair, A. Koller, et al. Skeletal muscle troponin I release and magnetic resonance imaging signal intensity changes after eccentric exercise - induced skeletal muscle injury[J]. *Clinica. Chimic. Acta*, 1997, 262: 139 - 146.
- [25] van de Vyver M I, Myburgh KH. Cytokine and satellite cell responses to muscle damage: interpretation and possible confounding factors in human studies[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2012, 33(3-4): 177 - 185.