

· 论 著 ·

热敏灸信号在骨质疏松症大鼠筋膜结缔组织传导途径的研究

欧阳厚淦* 赵志东 卢文静
江西中医学院,南昌 340004

中图分类号: R322. 6 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013) 09-0919-03

摘要: **目的** 为研究筋膜中结缔组织在热敏灸信号转导中的作用,揭示热敏灸产生疗效的有关机制,为临床更好应用热敏灸提供相关理论支持。**方法** 选取 80 只 SD 雌性大鼠随机分为正常组、空白模型组、艾灸模型组及热敏灸模型组各 20 只,并对后三组进行造模使其处于骨质疏松症病理状态下,然后对艾灸模型组及热敏灸模型组取“肾俞”穴进行常规艾灸及热敏灸治疗,并取其灸点周围结缔组织进行染色,从形态学上及光密度值上观察各组筋膜中 ERK1/2 和 P38 的改变情况,并进行统计学分析。**结果** 正常组与空白模型组中 ERK1/2 和 P38 改变不大,艾灸与热敏灸模型组中 ERK1/2 和 P38 表达情况都有不同程度改变,尤其热敏灸模型组改变情况明显,ERK1/2 阳性染色区域多集中在成纤维细胞或巨噬细胞核周围;P38 在筋膜中的表达稍弱,表达阳性区域也多集中在筋膜中成纤维细胞或巨噬细胞核周围。定量分析其差异有显著性意义。**结论** 实施热敏灸时,灸信号通过使热敏态穴位筋膜结缔组织中 MAPK 信号通路蛋白发生变化,进而对人体生理病理状态起调节作用。**关键词:** 热敏灸;筋膜;MAPK 信号;骨质疏松症

Study of the thermal moxibustion signal pathway in fascial connective tissue in osteoporotic rats OUYANG Hougao, ZHAO Zhidong, LU Wenjing
Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 340004, China
Corresponding author: OUYANG Hougao, Email: oyhg20043132@126. com

Abstract: Objective To investigate the effect of fascial connective tissue in the thermal moxibustion signal transduction, and to reveal the relevant mechanism of the thermal moxibustion, in order to provide relevant theory basis for the better use of thermal moxibustion in clinical work. **Methods** Eighty female SD rats were randomly divided into normal group, model group, moxibustion model group, and thermal moxibustion model group. Each group had 20 rats. Osteoporosis model was established in the latter 3 groups. Rat in moxibustion model group and thermal moxibustion model group were given the conventional moxibustion or thermal moxibustion treatment in the Shenshu point. The connective tissue around the point was collected for staining, and the changes of ERK1/2 and P38 in the fascia were observed by morphology and optical density. The data were statistically analyzed. **Results** The expression of ERK1/2 and P38 in normal group and the blank model group changed very little. In the moxibustion model group and thermal moxibustion model group, the expression of ERK1/2 and P38 changed in varying degree. Especially in thermal moxibustion model group, the ERK1/2 positive staining area mostly located around the nucleus of fibroblasts and macrophages. The expression of P38 was slightly weak, and the positive staining area also mostly located around the nucleus of fibroblasts and macrophages. The quantitative analysis showed the variance of expression had significant difference. **Conclusion** In the process of thermal moxibustion, the moxibustion signal can promote the changes of MAPK signaling pathway proteins in fascial connective tissue around the moxibustion area, thus regulating the physiological and pathological status. **Key words:** Thermal moxibustion; Fascia; MAPK signal; Osteoporosis

热敏灸现已广泛有效地应用于临床多种疾病的治疗,并已开始对其机理做相关的研究。根据前期

研究有关筋膜在针灸机理中发挥着重要作用的理论^[1],故对热敏灸机理提出假说:实施热敏灸时,灸刺激能使周围大量成纤维细胞可逆性收缩,成纤维细胞收缩本身可以导致胶原纤维变形,进而导致基质变形的“波浪”式传导,而后到达整个间隙结缔组

基金项目:江西省青年基金项目(20122BAB215047);江西省卫生厅中医药科研基金项目(2012A055)

万方数据

* 通讯作者: 欧阳厚淦, Email: oyhg20043132@126. com

织,最终细胞通过分子通道将信号传递到胞内不同结构及细胞器上,实现化学转化,从而调节其生理功能。为证实假说,拟通过造模 60 只骨质疏松症大鼠进行实验观察筋膜中结缔组织中热敏灸信号是如何通过蛋白通道进行转导的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组:SD 大鼠 80 只,雌性,2~3 个月龄,由江西中医学院实验动物中心提供(合格证编号:20120321)。适应性喂养 1 周后,采用随机数字表将大鼠分为正常组(A 组)、空白模型组(B 组)、艾灸模型组(C 组)和热敏灸模型组(D 组)各 20 只。A 组:20 只/笼,正常饮食进水。B、C、D 组:孤养,1 只/笼,正常饲养。

1.1.2 实验材料:10% 水合氯醛,造模器械,兔多抗 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) 和 P38 (美国 invitrogen 公司),SABC(兔 IgG)-AP 和 SABC(小鼠 IgG)-AP 试剂盒(宁波新芝生物科技股份有限公司)。10 mg/L 鬼笔环肽(Sigma),0.01% 碘化丙啶(PI, Sigma),相差显微镜(上海精密科学仪器有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松大鼠模型制作:B、C、D 三组共 60 只 SD 大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 ml/100 g 体质量),并以俯卧姿势固定于自制手术架上。取最末肋骨下、腋中线 and 距脊柱外侧约 2 cm 交叉处,剪除长毛,切开皮肤和背肌约 1~1.5 cm,切口视野中可见一乳白色发亮的脂肪团,分离脂肪团,便可见到粉红色、黄红色的卵巢,将卵巢下输卵管(包括脂肪团)用丝线结扎,摘除卵巢。同法摘除另一侧卵巢,依次缝合内层肌肉和外层皮肤。术后给予青霉素(80 万单位)肌肉注射,每只 0.1 ml,连续 6 d。术后分笼饲养,正常饮食。动物摘除卵巢后,逐只进行阴道上皮角化检查,1 次/d,连续 5 d,观察阴道上皮角化细胞无周期性变化,以证明去势成功。

1.2.2 艾灸取穴与方法:在大鼠骨质疏松模型造成之后,A、B 组不施加任何处理;C、D 两组参照华兴邦的大鼠穴位图谱^[2],于大鼠第二腰椎棘突下双侧旁开 7 mm 取“肾俞”穴。将 C、D 两组大鼠用自制大鼠固定架固定,剪去穴区毛,用直径 0.4 cm,长 10 cm 的艾条(江西中医学院附属医院制),距穴位 2 cm 左右进行温和灸,每日 1 次,C 组 15 min/次,D 组 40 min/次,共 14 d。

1.2.3 检测指标及方法:C、D 组大鼠分别取以施灸点为圆心,A、B 两组以与 C、D 组相对应的点为圆心,直径约 1.5 cm 的区域的浅筋膜约 200 mg。经 4% 多聚甲醛固定,经冲洗、脱水、透明等处理后,分别制作 2 张石蜡切片用于 HE 染色。免疫组化染色:按照 SABC(兔 IgG)-AP 和 SABC(小鼠 IgG)-AP 试剂盒的免疫组化步骤进行操作,并参考以往文献^[3]对皮下筋膜进行细胞外信号调节激酶(ERK1/2)和 P38 的免疫组化染色。利用 Olympus 图像采集系统取图,对每张切片随机选取不连续的 10 个视野拍照,并用 Imageproplus 6.0 图像分析软件进行图像分析,以平均光密度值(Mean Density, MD)作为比较指标,取每张切片的 10 个视野的 MD 的平均值进行统计分析。

1.2.4 统计学方法:以上所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均采用 SPSS13.0 统计学软件进行处理、分析,各组之间比较采用成组 *t* 检验。

2 结果

2.1 ERK1/2 的表达情况

各组大鼠筋膜 ERK1/2 表达强弱情况为:模型组 < 正常组 < 艾灸组 < 热敏灸组,在筋膜结缔组织中,ERK1/2 阳性染色区域多集中在成纤维细胞或巨噬细胞核周围,热敏灸组的阳性表达数明显多于其它三组(图 1A、B)。统计学分析显示,各组筋膜的 ERK1/2 差异有显著性 $P < 0.001$ (表 1),尤其是 C、D 两组的改变都与 A、B 两组都有较大不同,显示后两组都对 ERK1/2 产生了作用,而 D 组与 C 组也有差别,显示热敏灸对 ERK1/2 的作用强于一般的艾灸治疗。

2.2 P38 的表达情况

与 ERK1/2 相比,P38 在筋膜中的表达稍弱,表达阳性区域也多集中筋膜中成纤维细胞或巨噬细胞核周围。其表达强弱:模型组 < 正常组 < 艾灸组 < 热敏灸组,热敏灸组的阳性表达数明显多于其它三组(图 2A、B)。统计学分析表明,各组筋膜的 P38 表达差异有显著性 $P < 0.001$ (表 1),尤其是 C、D 两组的改变都与 A、B 两组都有较大不同,显示后两组都对 P38 产生了作用,而 D 组与 C 组也有差别,显示热敏灸对 P38 的作用强于一般的艾灸治疗。

2 讨论

热敏灸是一种“小刺激,大反应”的治疗技术,其特点是透热、扩热、传热、局部不(微)热远部热、

表 1 各组大鼠筋膜的 ERK1/2 和 P38 的平均光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	动物数(例) Cases	平均光密度值(ERK) average optical density value	平均光密度值(P38) average optical density value
正常组 The normal group	20	0.025 ± 0.001	0.021 ± 0.000
空白模型组 The blank model group	20	0.006 ± 0.015	0.005 ± 0.002
艾灸模型组 Moxibustion model group	20	0.067 ± 0.014 *	0.063 ± 0.001 *
热敏灸模型组 Thermal moxibustion model group	20	0.097 ± 0.012 #	0.095 ± 0.015 #

注:与正常组比较, * $P < 0.001$, # $P < 0.001$;与模型组比较, * $P < 0.001$, # $P < 0.001$ 与艾灸模型组比较, # $P < 0.001$

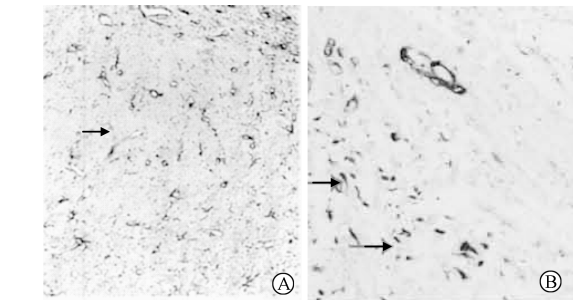


图 1 ERK1/2 表达情况
A 为艾灸组;B 为热敏灸组
Fig.1 The expression of ERK1/2. A: moxibustion group ;
B: thermal moxibustion group

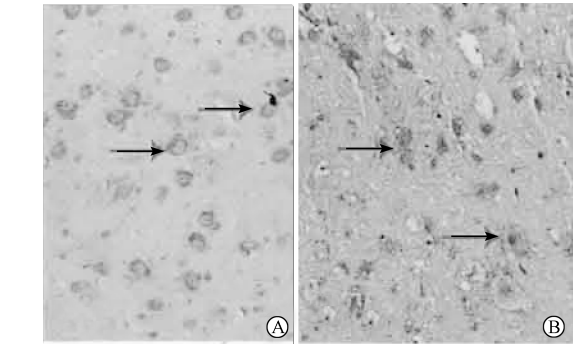


图 2 P38 表达情况
A 为艾灸组;B 为热敏灸组
Fig.2 The expression of P38
A: moxibustion group ; B: thermal moxibustion group

表面不(微)热深部热。现已广泛有效地应用于临床多种疾病的治疗。本研究主要目的在于观察细胞内部如何将热敏灸信号进行转导,进而到达效应细胞产生生理作用。

临床观察表明,人体腧穴存在敏化态与静息态两种功能态,当人体发生疾病时能使体表腧穴发生敏化,因此本实验采用骨质疏松症病理状态大鼠进行研究以证实腧穴发生敏化。其次,与传统的悬

灸相比,热敏灸的灸量不同^[2]。艾灸剂量由艾灸强度、艾灸面积、艾灸时间三个因素组成,在前两个因素基本不变的情况下,艾灸剂量主要由艾灸时间所决定。在施行热敏灸疗法时,每穴的施灸时间不是固定不变的,而是因人因病因穴而不同,是以个体化的热敏灸感消失为度的施灸时间,一般需 40min,而传统悬灸的灸量每次每穴一般从 10 ~ 15min,或者以局部皮肤潮红为度。为此,本实验同时观察并比较传统艾灸和热敏灸大鼠“肾俞”的治疗效果。

丝裂酶原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路是广泛存在于各种动物细胞中的一条信号转导途径。ERK 是 MAPKs 家族一个重要亚族,遵循 MAPKs 三级酶促级联反应,上游激活蛋白—MAPK 激酶的激酶 (MAPKKK) — MAPK 激酶 (MAPKK) — MAPK。在 ERK 传递途径中,从细胞受到刺激至细胞出现相应的生物学效应,就是经过上述 MAPK 信号通路多级激酶级联反应过程。前期研究结果显示,MAPK 信号通路在细胞信号转导中有重要作用,其亚型 ERK1/2 和 P38 能调节细胞内信号对多种刺激的反应^[3],目前已有关于对于细胞的机械刺激可以激活 ERK1/2 和 P38 MAPK 通路的多个相关报道^[4]。本研究从筋膜结缔组织的角度,解释热敏灸作为一种外来刺激,在转化为生物学效应的“细胞内信号转导阶段”是如何在浅筋膜中进行的以及如何在此解剖层面激发生物学活性的。本研究发现,在正常筋膜结缔组织中,ERK1/2 和 P38 均有少量表达,常规艾灸与热敏灸组对两种蛋白表达均有明显增加,但以热敏灸组大鼠增加显著。本实验发现对于造模后加以治疗均使 ERK1/2 和 P38 较之正常组有明显增高,这进一步验证了外来刺激能改变体内转导因子水平^[5]。同时,热敏灸对 ERK1/2 和 P38 的改变强于一般艾灸,

(下转第 940 页)

骨折。

SPECT 全身骨显像可了解骨质疏松患者全身骨骼代谢情况,具有较高的灵敏性,但特异性较差,可作为骨质疏松患者除外骨恶性肿瘤及骨质疏松性骨折的辅助检查手段。

【 参 考 文 献 】

[1] Ma Jixiao, Liu Xiujie. Practical clinical nuclear medicine. Atomic Energy Publishing house, 2002; 343-344.

[2] Citrin DL, Bessent RG, Greig WR. A comparison of the sensitivity and accuracy of the ⁹⁹Tcm-phosphate bone scan and skeletal radiograph in the diagnosis of bone metastases. Clin Radiol,1977,28(1):107-117.

[3] Peng Jingjing. Diagnostic imaging orthopedic nuclear medicine. People's Medical Publishing house, 2010; 129.

[4] Fogelman I, Citrin DL, Turner JG, et al. Semi-quantitative interpretation of the bone scan in metabolic bone disease;

definition and validation of the metabolic index. Eur J Nucl Med, 1979,4(4):287-289.

[5] Lu Guangming. Clinical CT differential diagnosis. Jiangsu Science and Technology Publishing house, 2011; 866.

[6] Peng Jingjing. Diagnostic imaging orthopedic nuclear medicine. People's Medical Publishing house, 2010; 60-61.

[7] Shen Yong, Zhou Xiang, Tao Xinquan. Clinical assessment of spect bone scan in diagnosis of multiple myeloma. Applied Journal of General Practice, 2008,6(3):238-239.

[8] Ma Xinfu, Ge Ying, Guan Chunshuang. Differential diagnosis of benign vertebral compression fracture and spine metastasis on conventional MRI. Clin J Med Imaging Technol, 2009, 25(5): 866-869.

[9] Chen Juan, Lin Qingyan, Chen Meiqin. Osteoporosis and rheumatoid diseases. Chinese Journal of Osteoporosis, 2012,18(1):83-86.

(收稿日期: 2013-01-29)

(上接第 921 页)

表明热敏灸之所以能够以“小刺激”产生“大反应”,其疗效不同于一般艾灸,其原因可能就在于此。

文献^[6]显示非特异性结缔组织的这种组织结构对于免疫、血管和神经细胞等组织和器官存在极大影响。而 MAPK 细胞信号转导又几乎存在于所有的真核细胞中,是生物进化中较原始的一种细胞信息间的交流方式。所以,从分子生物学层面研究筋膜结缔组织对于全身生理和病理状态的调节,信号转导是不可忽视的一个环节。因此,本研究进一步解释了筋膜结缔组织在热敏灸产生灸信号过程中所起到的作用。同时也是从形态学角度研究热敏灸机理的一个新的尝试。

【 参 考 文 献 】

[1] Zheng Cuigong Zhang Mingmin, Huang Guangying. Gap junction communication research methods and their possible use in Meridian [J]. Zhejiang journal of traditional Chinese medicine, 2006,41(2):69-72.

[2] Shen Xueyong, party mountain, Chen Eryu, et al. The relationship between calcium enrichment of stomach meridian acupoints and connective tissue structure [J]. Chinese acupuncture,1998, 10;595-597.

[3] Chen bo, Luo Yongfen Cui Jin, et al. The comparative Study on static pressure stimulation on rat “Zusanli” Point district and adjacent areas fibroblasts hole PGE2 and IL -6 cells release [J]. Chinese acupuncture,2007,27(2):135—140.

[4] Adenocarcinoma, Chen Rixin. “Opening the meridians” moxibustion therapy [J]. Jiangxi college of traditional Chinese medicine hospital,2006,1(1):7-8.

[5] Tu Guoqing, Zou Yong, Zhu Yuhui. Effect of thermal moxibustion on the expression of PICP in the senile osteoporosis [J]. CJGMCM, 2012, 27(3):520-521.

[6] Xiao Aijiao, Kang Mingfei, Chen Rixin et al. The effect of thermal moxibustion for depression model rats pain reaction time [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2012, 23(5):1278-1279.

(收稿日期: 2012-03-27)

热敏灸信号在骨质疏松症大鼠筋膜结缔组织传导途径的研究



作者：[欧阳厚淦](#)，[赵志东](#)，[卢文静](#)，[OUYANG Hougan](#)，[ZHAO Zhidong](#)，[LU Wenjing](#)
作者单位：[江西中医学院, 南昌, 340004](#)
刊名：[中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名：[CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)
年，卷(期)：2013, 19(9)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201309005.aspx