

热敏灸对骨质疏松症大鼠筋膜形态改变的研究

欧阳厚淦* 赵志东 卢文静

江西中医学院, 江西 南昌 330006

中图分类号: R322.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013) 11-1157-04

摘要: 目的 为研究筋膜中结缔组织在热敏灸信号传导中的作用, 揭示热敏灸的普遍机理。方法 选取 80 只 SD 雌性大鼠随机分为正常组、模型组、艾灸组及热敏灸组各 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, 然后对艾灸组及热敏灸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, 观察各组成纤维细胞形态的改变。结果 热敏灸组 ECM 内纤维以灸点为中心呈向心性分布、张力增高, 其他三组纤维纵横交错形成众多纤维网格。热敏灸组细胞在纤维带动下排列方向一致、单位面积内细胞密度较大, 在纤维拉动下, 细胞骨架重构成“扁梭形”、胞浆纵轴长而致密、细胞突起界限不清, 胞核小、呈长梭形, 其他三组大量细胞杂乱无序填充在纤维网格内、单位面积内细胞密度较小、细胞分界清晰, 胞内骨架伸展成“片状”、多突起并相互形成联系, 胞核近似圆形位于胞浆中心。结论 实施热敏灸时, 灸刺激能通过使周围大量成纤维细胞可逆性收缩而到达整个间隙结缔组织。

关键词: 热敏灸; 成纤维细胞; 骨质疏松症; 机理

Study of thermal moxibustion on morphological change of the fascia in osteoporosis rats

OUYANG Hougao, ZHAO Zhidong, LU Wenjing

Jiangxi Medical College 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 universal mechanism of thermal moxibustion. **Methods** Eighty female SD rats were randomly divided into normal group, model group, moxibustion group, and thermal moxibustion group, and each group had 20 rats. Rats in the latter 3 groups were modeled in osteoporosis pathological state. Rats in moxibustion group and thermal moxibustion group were given conventional moxibustion and thermal moxibustion treatment at the Shenshu acupoint, respectively. Then the connective tissue around the moxibustion point was stained, and the morphological change of fibroblasts in each group were observed. **Results** In thermal moxibustion group, fibers in ECM centripetally distributed around the moxibustion point, with increased tension, while fibers in the other 3 groups crossed irregularly and formed numerous fibrous gridding. Cells in thermal moxibustion group arranged in the same direction under the traction of fibers. The density of cells in a unit area was high. Under the traction of fibers, cytoskeleton was reconstructed into flat spindle shape. The vertical axis was long and dense. The bound of cellular processes was unclear, and the nucleus was small and long spindle shaped. Cells in the other 3 groups filled in the fibrous griddings disorderly. The cell density was much lower. And the bound of cells was clear. The cytoskeleton stretched into flake, with abundant processes and connected with each other. The nucleus was approximate round and located in the center of the cytoplasm. **Conclusion** When implementing thermal moxibustion, moxibustion stimulation can reach the whole connective tissue through the reversible contraction of abundant fibroblasts around the moxibustion point.

Key words: Thermal moxibustion; Fibroblasts; Osteoporosis; Mechanism

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

研究中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织, 最终细胞通过分子通道将信号传递到胞内不同

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(81360601); 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)

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

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成纤维的形态改变。

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 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)、模型组(B 组)、艾灸组(C 组)和热敏灸组(D 组)各 20 只。A、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)。10mg/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、腋中线和距脊柱外侧约 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,将用直径 0.4 cm,长 10 cm 的艾条(江西中医学院附属医院制),距穴位

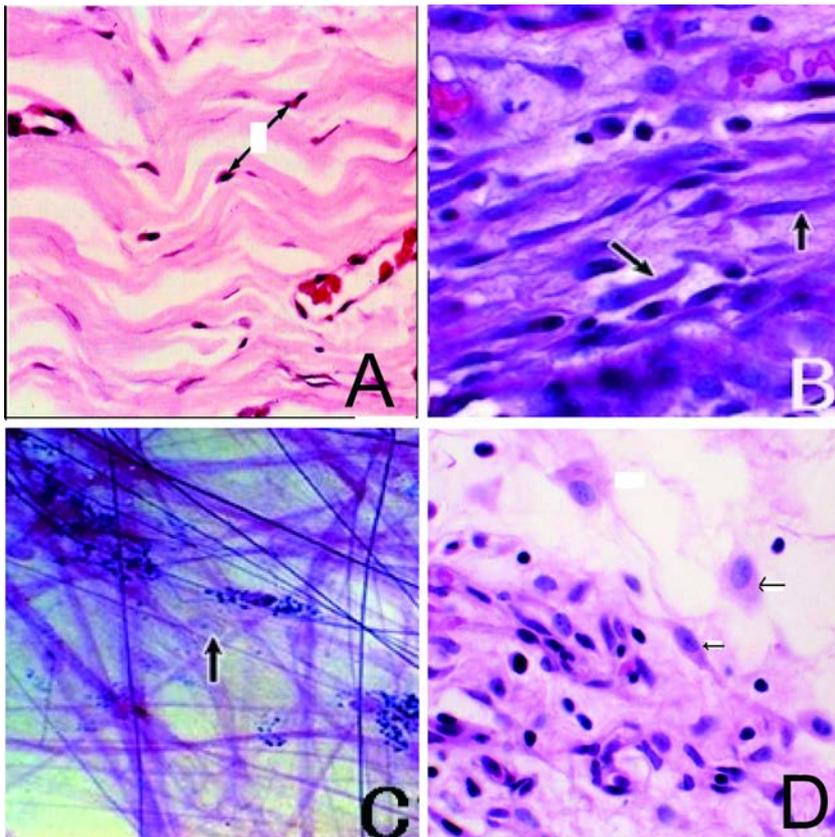


图1 ECM内:纤维走行差异,A为正常组、B为模型组、C为艾灸组、D为热敏灸组

Fig.1 ECM: The difference of fiber distribution. Group A: normal group;

Group B: model group; Group C: moxibustion group; Group D: thermal moxibustion group

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。

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。各组的组织固定按Langevin HM^[3]提供的方法操作:固定后的组织片用0.01MPBS冲洗过夜后固定于支架上,解剖显微镜下小心切0.5 cm × 0.5 cm 皮下疏松结缔组织(避开肉眼可见脂肪组织,尽量少牵拉),并平置于硅化载玻片上约30 min,待其自然干燥以防脱片,铺片置湿盒内,0.1% Triton X. 100 透化5 min,10 mg/L 鬼笔环肽室温避光染色2 h,PBS冲洗5 min × 3次,0.01% PI 避光复染5 min,PBS冲洗5 min,荧光显微镜下观察(激发光分别为495 nm,538 nm)。置铺片于相差显微镜下(extracellular matrix, ECM)获取立体图像。

2 结果

10 × 10 倍显微镜下可见,大鼠皮下组织含有丰

富的脂肪组织和疏松结缔组织,可见脂肪组织外层为薄层胞质,核被脂滴堆积至细胞一侧,组织中常见大小不一的小血管断面。40 × 10 倍显微镜下可见,A、B两组切片中的筋膜结缔组织呈多种形态结构,纤维较松散,且排列较不规则,不易区分胶原纤维和弹性纤维,细胞核呈圆形或椭圆形,同时,成纤维细胞呈长梭形,胞核小,核仁不明显,细胞器不发达。而C、D两组,纤维排列均较前两组规则,细胞核也相应增长呈扁梭形或长条形,其中以D组改变尤甚,细胞体积增大,核仁明显。观察ECM走行可见,D组ECM内纤维以灸点为中心呈向心性分布、张力增高(图1D),A、B、C组纤维纵横交错形成众多纤维网格(图1A、B、C)。D组细胞在纤维带动下排列方向一致、单位面积内细胞密度较大,在纤维拉动下,细胞骨架重构成“扁梭形”、胞浆纵轴长而致密、细胞突起界限不清,胞核小、呈长梭形(图2D),A、B、C组大量细胞杂乱无序填充在纤维网格内、单位面积内细胞密度较小、细胞分界清晰,胞内骨架伸展成“片状”、多突起并相互形成联系,胞核近似圆形位于胞浆中心(图2A、B、C)。

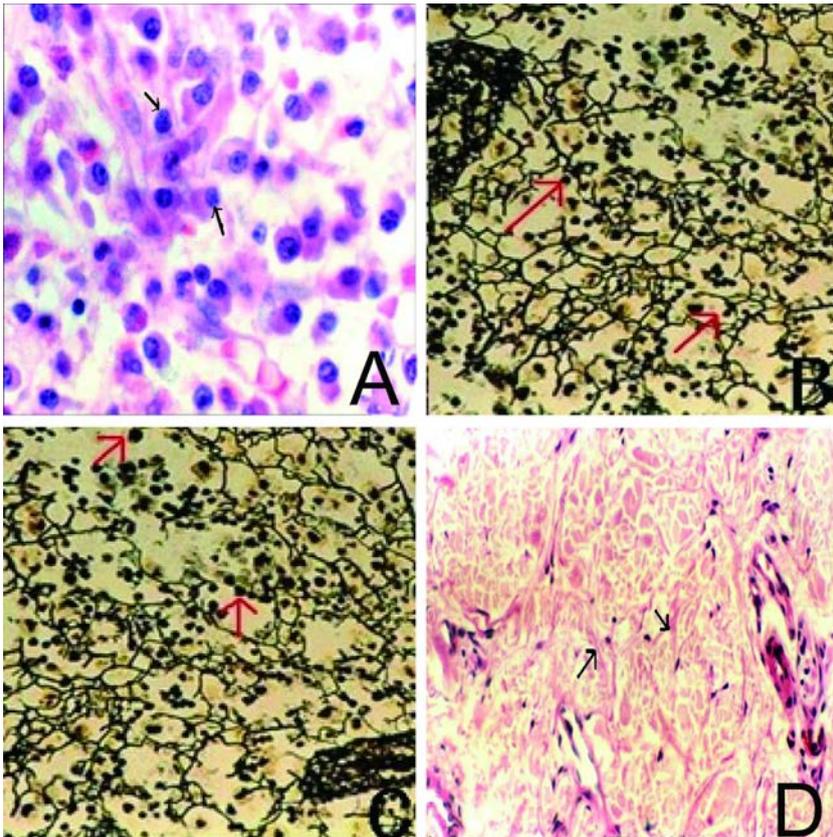


图2 ECM内:细胞核构型差异,A为正常组、B为模型组、C为艾灸组、D为热敏灸组

Fig. 2 ECM: Configuration difference of the nucleus. Group A: normal group; Group B: model group; Group C: moxibustion group; Group D: thermal moxibustion group

3 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。前期文献^[4]指出:当筋膜受到外界刺激时,可引起周围大量成纤维细胞的可逆性收缩,成纤维细胞收缩本身可以导致对于胶原纤维的进一步牵拉,进而导致基质变形的“波浪”式传导,最终细胞收缩传导到整个间隙结缔组织。Duncan RL等^[5]认为可将细胞转导分为4个不同阶段:(1)刺激耦联阶段,刺激引起组织发生形变;(2)生化耦联阶段,将细胞表面信号转化为细胞内生化信号途径,关键结构可能包括细胞骨架-核基层、细胞内应力激活通道、G-蛋白依赖途径;(3)细胞内信号转导阶段;(4)效应细胞产生反应。因此推测:就热敏灸而言,(1)热敏灸热感和结缔组织的耦合和组织对于热感的反应;(2)热敏灸经由热传导将热信号传导到结缔组织内部;(3)这个机制既可以解释针灸的远期效应,又可以解释热敏态穴的机理。基于以上研究与推测,本研究拟首先通过观察结缔组织形态学改变验证该假说:热敏灸首先作用于筋膜结缔组织,热刺激引起周围大量成纤维细胞的可逆性收缩,成纤维细胞收缩本身导致对于胶原纤维的进一步牵拉,进而导致基质变形的“波浪”式传导,最终细胞收缩通过热能传导到整个间隙结缔组织;此后在结缔组织细胞内部进行信号转导,进而到达效应细胞产生作用。

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使其腧穴发生敏化。其次,与传统的悬灸相比,热敏灸的灸量不同^[6]。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40 min,而传统悬灸的灸量每次每穴一般从10~15 min,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。通过上述实验得出的结果,正常对照组形态符合成纤维细胞静息状态的情况,而传统灸疗组与艾灸组形态都发生了改变,其中尤以热敏灸组改变更为明显,细胞在纤维带动下排列方向与灸信号方向一致、单位面积内细胞密度较大,在纤维拉动下,细胞骨架重构成“扁梭形”。因此,我们认为,热敏灸正是首先刺激了筋膜中成纤维细胞,使其形态发生改变,最后把就信号传达发病所。因此,本研究进一步解释了筋膜结缔组织在热敏灸过程中对人体生理病理状态起调节作用的机理。这是从筋膜角度研究针刺机理的一个新的尝试。

【参 考 文 献】

- [1] Zhengcui Hong, ZHANG Mingmin. The research methods of gap junction communication and their potential in the study of the use of meridian [J]. Zhejiang Traditional Chinese Medicine, 2006, 41(2):69-72.
- [2] Shen Xueyong, DANG Rui Shan, CHEN Er Yu, et al. Stomach meridian acupoints and connective tissue structure and the relationship between calcium concentration [J]. Chinese Acupuncture, 1998, 10:595-597.
- [3] Langevin HM, Cornbrooks CJ, Taatjes DJ, et al. Fibroblasts form a body-wide cellular network [J]. Histochem Cell Biol, 2004, 122:7-15.
- [4] Dang Ping, Shi Sheng-gen. Mechanical pressure on periodontal fibroblasts P38 lightning protein kinase activation and dislocation [J]. Journal of Prosthodontics cavity, 2009, 4(2):75-77.
- [5] Chen bo, Luo Yongfen Cui Jin, etc. The comparative study of the static pressure stimulation on rats "st 36" hole area and hole area by fibroblasts PGE2 and IL 6 release effect [J]. Chinese acupuncture, 2007, 27(2):135-140.
- [6] Zhang Bo, Chen Rixin. "opening meridians" moxibustion therapy [J]. Journal of Jiangxi college of traditional Chinese medicine, 2006, 1(1):7-8.

(收稿日期:2013-05-30)

热敏灸对骨质疏松症大鼠筋膜形态改变的研究

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, 江西南昌, 330006](#)

刊名: [中国骨质疏松杂志](#)

ISTIC

英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期): 2013(11)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201311010.aspx