

·中医中药·

# 毫针针刺对SD大鼠膈穴筋膜组织CSK、ATP和PCNA影响

胡铁汉<sup>1,2</sup>,李程<sup>1,2</sup>,司原成<sup>1</sup>,陈波<sup>1</sup>,张婷<sup>1</sup>,赖清<sup>1</sup>

(1.贵州中医药大学针灸推拿学院,贵州 贵阳 550025;

2.贵州省第二人民医院中医科,贵州 贵阳 550004)

**摘要:**目的 研究毫针针刺对膈穴筋膜组织细胞骨架(CSK)的调节作用及其对三磷酸腺苷(ATP)含量、增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响,为针刺作用原理提供新的实验证据。方法 将16只SPF级SD大鼠,随机均分为空白组( $n=8$ )和针刺组( $n=8$ ),针刺组针刺中脘穴,捻转行针( $60\pm 3$ )次/min,共5 min,留针10 min,共操作3轮后出针,1次/d,连续3 d。术毕剪取以大鼠中脘穴的穴点为圆心、直径约0.5 cm区域的筋膜组织块。采用免疫组织化学法检测CSK微丝(actin)、中间丝(vimentin)、微管(tubulin)和PCNA的差异变化,应用ELISA法检测组织中ATP的含量差异。结果 针刺组的CSK微丝、微管表达的平均光密度(Mean density, MD)均低于空白组( $P<0.01$ );两组中间丝的表达比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );针刺组膈穴组织ATP含量及PCNA阳性细胞计数率均高于空白组( $P<0.01$ )。结论 毫针针刺可能通过细胞骨架通路,增强膈穴组织能量代谢和细胞活力,进而激发针刺治疗作用,是现代针灸医学研究的机理之一。

**关键词:**针刺;力学信号传导;CSK;ATP;PCNA

中图分类号:R245

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.03.045

文章编号:1006-1959(2022)03-0168-03

## The Effect of CSK, ATP and PCNA in the Fascia Tissues of Acupoints on SD Rats by Filiform Needle Acupuncture

HU Tie-han<sup>1,2</sup>, LI Chen<sup>1,2</sup>, SI Yuan-cheng<sup>1</sup>, CHEN Bo<sup>1</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, LAI Ting<sup>1</sup>

(1.College of Acupuncture and Tuina, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2.Department of Traditional Chinese Medicine, Guizhou Second People's Hospital, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**Abstract: Objective** To study the regulatory effect of filiform needle acupuncture on the cytoskeleton (CSK) of acupoints' fascia tissue and its effect on ATP content and PCNA expression, so as to provide new experimental evidence for the mechanism of acupuncture. **Methods** A total of 16 SPF SD rats were randomly divided into blank group ( $n=8$ ) and acupuncture group ( $n=8$ ). The acupuncture group was treated with acupuncture at Zhongwan acupoint, twisting the needle ( $60\pm 3$ ) times/min for 5 min, retaining the needle for 10 min, and the needle was removed after 3 rounds of operation, once daily for 3 days. At the end of the operation, the fascia tissue blocks with the central point of Zhongwan point in rats as the center and the diameter of about 0.5 cm were cut. Immunohistochemistry was used to detect the difference of actin, vimentin, tubulin and PCNA in CSK, and ELISA was used to detect the difference of ATP content in tissues. **Results** The mean density (MD) of CSK filaments and microtubules in acupuncture group was lower than that in blank group ( $P<0.01$ ); there was no significant difference in the expression of interfilament between the two groups ( $P>0.05$ ). ATP content and PCNA positive cell count rate in acupuncture group were higher than those in blank group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Filiform needle acupuncture may enhance the energy metabolism and cell vitality of acupoints through the cytoskeleton pathway, thereby stimulating the therapeutic effect of acupuncture, which is one of the mechanisms of modern acupuncture medical research.

**Key words:** Acupuncture; Mechanical signal transduction; CSK; ATP; PCNA

毫针针刺(filiform needling)对膈穴的刺激作用在本质上是机械力刺激<sup>[1]</sup>。实验针灸学研究证实,毫针针刺作用除了存在神经生物学机制外,还存在非神经生物学机制<sup>[1,2]</sup>。由于对膈穴非神经组织细胞如何感受和传递针刺机械力学信号尚缺乏研究,因此,针刺非神经生物学机制还存在诸多未知环节。为此课题组前期通过离体细胞实验,屏蔽掉神经、体液各种环境因素,从始动环节观察了各种力学刺激对膈穴筋膜组织成纤维细胞的影响和力学信号传导通路

(整合素-细胞骨架-细胞效应)的变化情况<sup>[3-5]</sup>。但是,活体生物的在体实际环境要复杂得多,因此,本实验以大鼠膈穴筋膜组织为研究对象,以毫针对膈穴进行刺激,在体观察膈穴筋膜组织CSK在针刺力学信号传导中的变化情况,并以ATP和PCNA为效应指标观察膈穴筋膜组织能量代谢和细胞活力的改变情况,观察细胞骨架在活体生物膈穴内传导力学信号时的变化,旨在为毫针针刺作用机理提供新的实验证据,现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 16只雄性SPF级SD大鼠,8周龄,体重( $190\pm 10$ )g。购自湖南长沙天勤生物技术有限公司,动物许可证编号:SCXK(湘)2014-0011。实验方案通过贵州中医药大学动物伦理委员会审核。

**1.2 主要试剂和药品** 抗actin、vimentin、tubulin、PC-

基金项目:1.国家自然科学基金(编号:81860882、81160456);2.贵州省科技基金(编号:黔科合基础[2018]1018)

作者简介:胡铁汉(1979.9-),男,河南南阳人,硕士,主治医师,主要从事针刺推拿的基础与应用研究

通讯作者:司原成(1988.2-),男,安徽阜阳人,博士,副教授,主要从事针刺推拿的基础与应用研究

NA 抗体 (Abcam; 型号: Ab52614、Ab92547、Ab108342、Ab92522)、EnVision 抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(Dako, 型号: K5007)、水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司; 批号: 22011026)等。

1.3 主要器材 毫针(苏州针灸用品有限公司; 型号: 13052)、电子天平(上海奥豪斯; 型号: 00000027)、半自动脱水机(Leica; 型号: TP1020)、全自动石蜡包埋机(Leica; 型号: EG1150)、全自动石蜡切片机(Leica; 型号: RM2235)、显微镜(Olympus 型号: 1\*71)、数码照相机(Nikon; 型号: DS-Fil)、全自动酶标仪(美国宝特公司, 型号: ELX808IU-P)。

#### 1.4 方法

1.4.1 动物分组处理 采用随机数字表法将 16 只 SD 大鼠分为空白对照组、毫针针刺组, 每组 8 只。两组饲养条件一致, 适应性饲养 1 周后开始实验。抓取空白对照组各只, 用 4% 的水合氯醛按照 4 ml/kg 进行麻醉, 首次麻醉成功后用脱毛剂以中脘穴为中心 3 cm 范围内进行脱毛, 然后放回盒中饲养。麻醉 1 次/d, 共 3 d。抓取毫针针刺组大鼠麻醉和脱毛成功后, 将大鼠仰卧位固定于鼠台上, 然后用 30 号 1 寸毫针在中脘穴处向胸部平刺, 进针 0.5 cm, 以平补平泻手法按照  $(60 \pm 3) \text{ r/min}$  均匀捻转 5 min, 捻转幅度在  $180^\circ \sim 360^\circ$ , 中间留针 10 min, 然后同样的手法速率再捻转 5 min, 留针 10 min, 共操作 3 轮, 然后出针, 1 次/d, 共 3 d。

1.4.2 动物取材 第 3 天末次操作后, 各组大鼠分别继续固定进行取材。以大鼠中脘穴穴点为中心, 用外科剪剪取  $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$  组织块, 切取其中一部分组织块, 迅速放入盛有 4% 多聚甲醛瓶中固定备测微丝、中间丝、微管和 PCNA。另一部分组织块(约 200 mg)立即放入冻存管内, 放入液氮罐中保存, 待检 ATP。取材完毕后将大鼠脱颈处死。

1.4.3 免疫组织化学法检测细胞骨架微丝、中间丝、微管和 PCNA 表达 组织块脱水、透明、浸蜡、包埋和切片( $4 \mu\text{m}$ )后经二甲苯脱蜡, 梯度酒精至水化, PBS 洗涤; 再用 pH6.0 的 0.01 mol/L 柠檬酸钠抗原修复液修复, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  抑制内源性过氧化物酶室温孵育; 加入抗 actin、vimentin、tubulin、PCNA 抗体  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜; 经 EnVision 抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(二抗)  $37^\circ\text{C}$  孵育、显色、复染、封片后, 在显微镜下观察, 应用 Image pro plus6.0 软件在同等参数设置下分别测定微丝、中间丝、微管的积分光密度值(integrated option density, IOD)和阳性区域面积(area), 通过计算  $(\text{IOD}/\text{area})$  平均光密度(mean density, MD) 反应目标物质的单位面积浓度; PCNA 实验图片用直接观察法计数 PCNA 阳性细胞核数量和图片中总的细胞核数量, PCNA 的阳性百分率 =  $\text{PCNA 细胞数}/\text{总细胞数} \times 100\%$ , 观察各组的变化。

1.4.4 采用酶联免疫吸附法检测膈穴穴区组织块中 ATP 的含量 将备存的膈穴穴区组织块进行匀浆,  $3000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ , 取上清, 在严格按照 ATP 的检测试剂盒的说明及流程进行操作, 观察各组膈穴穴区组织块中的含量变化。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计软件分析, 所有数据均以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 采用独立样本  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义,  $P < 0.01$  表示统计学意义显著。

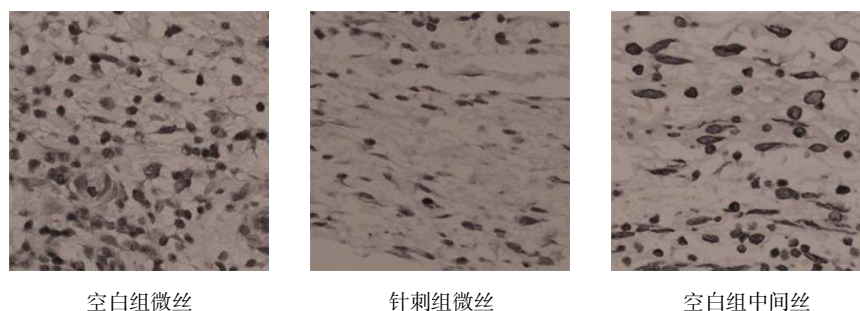
## 2 结果

2.1 毫针针刺对膈穴筋膜组织 CSK 表达的影响 针刺组膈穴穴区局部组织 CSK 微丝、微管的表达低于空白组, 统计学意义显著 ( $P < 0.01$ ); 针刺组膈穴穴区局部组织 CSK 中间丝的表达高于空白组, 但差异无统计学意义 ( $P = 0.203$ ), 见表 1、图 1。

表 1 针刺对膈穴筋膜组织 CSK 微丝、中间丝、微管表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , MD)

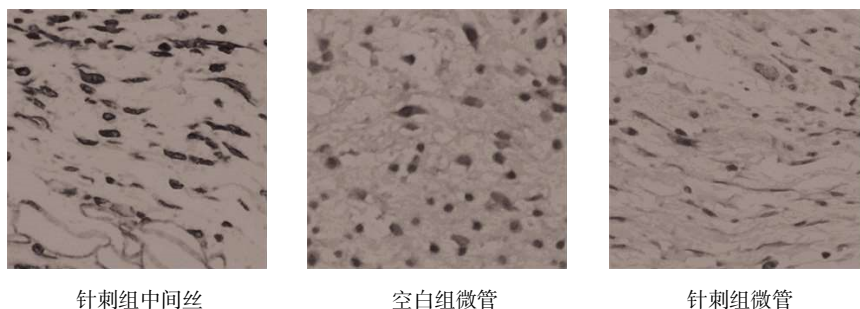
组别	n	微丝	中间丝	微管
空白组	8	0.021 500 $\pm$ 0.007 373	0.026 275 $\pm$ 0.010 495	0.003 425 $\pm$ 0.001 912
针刺组	8	0.010 638 $\pm$ 0.005 832*	0.021 300 $\pm$ 0.003 403	0.000 800 $\pm$ 0.000 444*

注: 与空白组比较, \*  $P < 0.01$



注: 图中膈穴筋膜组织细胞的细胞核呈蓝色, 周围深棕黄色部分为细胞骨架微丝、中间丝和微管

图 1 两组微丝、中间丝和微管表达情况(免疫组化,  $\times 400$ )



注:图中膈穴筋膜组织细胞的细胞核呈蓝色,周围深棕黄色部分为细胞骨架微丝、中间丝和微管

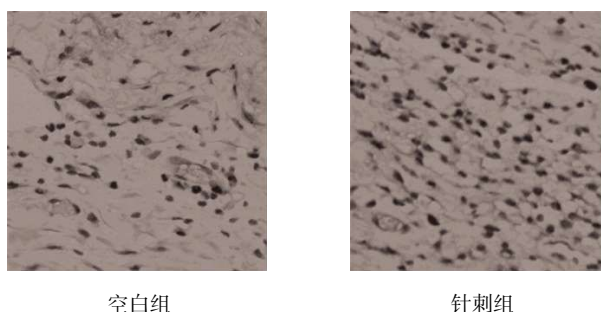
图 1 两组微丝、中间丝和微管表达情况(免疫组化,×400)(续)

2.2 毫针针刺对膈穴穴区局部组织 ATP 含量和 PCNA 表达的影响 针刺组膈穴穴区局部组织 ATP 含量及 PCNA 阳性计数率均高于空白组,统计学意义显著( $P<0.01$ ),见表 2、图 2。

表 2 毫针针刺对膈穴筋膜组织 ATP 含量和 PCNA 表达的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	ATP(nmol/L)	PCNA 阳性细胞比例(%)
空白组	8	1996.875±372.694	26.018±9.231
针刺组	8	2815.875±245.568*	67.684±14.700*

注:与空白组比较,\* $P<0.01$



注:图中膈穴筋膜组织细胞的细胞核 PCNA 表达阴性呈蓝色,阳性呈深棕黄色

图 2 两组 PCNA 表达情况(免疫组化,×400)

### 3 讨论

力学微环境是调节生命形态和功能的重要因素之一<sup>[6]</sup>。现代生物医学工程学研究证实,细胞能够感知力的大小和时域(time scales),并且把机械刺激转化为化学响应,进一步影响到细胞的 DNA 转录、翻译和表达<sup>[7-9]</sup>。目前,关于细胞如何将胞外力信号传递到胞内并且引起细胞反应应答的力信号传导通路目前认为主要有 3 种途径:一是力敏感离子通道(stretch-sensitive ion channels),通过力敏感离子通道将力信号转化成跨膜的电信号或胞内的化学信号<sup>[10]</sup>。针刺作用的神经生物学机制在阐释针刺机械信号的导入和转换时大多采用这一理论进行描述<sup>[11]</sup>;二是胞外基质和粘连分子,这些胞外基质和粘连分子将细胞和细胞,胞外和胞内联系起来,形成一个整体,并将力信号从胞外传递到胞内,引起细胞的下游反应<sup>[12]</sup>。在针灸推拿作用的机制研究中,有研究证实体外模拟推拿之压力刺激能促进血管内皮细胞的 Integrin $\beta_1$ 、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_v$  表达量增加,Integrin $\beta_3$  表达下降<sup>[13]</sup>;而毫针针刺对 SD 大鼠膈穴穴区筋膜结

缔组织 integrin $\beta_1$  和 integrin $\beta_3$  的表达变化情况呈现不同趋向:中等强度毫针针刺时膈穴筋膜结缔组织中 integrin $\beta_1$  的表达增强,有显著差异,然而高强度毫针针刺时 integrin $\beta_1$  的表达却下降。integrin $\beta_3$  除部分大小血管可见少量表达外,在膈穴筋膜结缔组织中始终为阴性表达<sup>[14]</sup>;三是细胞骨架的重新组建,当细胞受到外界机械力刺激以后,细胞骨架在一些调节因子作用下解聚重组,并进一步引起细胞反应应答。其中,针灸学领域以细胞骨架变化重组这一机械力信号传导途径的研究尚需深入。

细胞骨架<sup>[15,16]</sup>包括微丝、中间丝和微管 3 种成分,是维持细胞形态功能的支柱性、刚性结构,同时也是许多蛋白激酶附着的位点。微丝由肌动蛋白组成,单个微丝直观呈双股、右手螺旋状,实心,在细胞中成平行、二维、三维分布,处于高动态平衡状态,与细胞的形态和运动有密切关系;中间丝化学成分复杂且性质较为稳定,呈实心状,其直径在微丝和微管之间;微管主要由  $\alpha$ 、 $\beta$  两种微管蛋白组成,呈中空的管状,它的直径和微丝、中间丝比较是最大的,也

处于高动态平衡状,对细胞起着支撑的作用和参与胞内物质输送的作用。细胞的形态需要依靠细胞骨架这些呈网状的蛋白来维持,同时细胞骨架对细胞的很多重要生命活动如生长、分裂、物质运输等也十分关键。此外,细胞骨架<sup>[17]</sup>是细胞主要的力学信号传导位点,可以直接将作用于细胞表面的应力传导到细胞内各区。由此可以推测细胞骨架在针刺机械信号细胞内传导过程中也可能发挥重要作用。本实验中,针刺组膈穴穴区局部组织 CSK 中间丝的表达高于空白组,但差异无统计学意义( $P=0.203$ ),而针刺组膈穴穴区局部组织 CSK 微丝、微管的表达低于空白组,统计学意义显著( $P<0.01$ ),这说明中间丝的结构相对稳固,不易受到外来因素的干扰,当毫针刺刺时,中间丝没有发生表达量的变化。微丝、微管由于本身是处于高动态平衡状的细胞结构,在毫针刺刺这一过程中,针刺机械力能使微丝、微管原有的动态平衡遭到打破,部分微丝解聚重构趋势明显,以适应来自针刺的机械外力刺激和传导调整的信号。因此,细胞骨架中微丝、微管可能是细胞内传递针刺机械刺激的主要力学转导途径。

越来越多的证据显示<sup>[18]</sup>,线粒体以细胞骨架蛋白为轨道而得以运动,细胞骨架通过各种非特异性的途径调节线粒体的形态和功能;而线粒体是细胞内氧化磷酸化和合成 ATP 的主要场所,为细胞的活动提供能量,是细胞生命活动的控制中心。本实验中,针刺组膈穴穴区局部组织 ATP 含量高于空白组,统计学意义显著( $P<0.01$ ),说明针刺可以提高膈穴能量代谢水平,可能激发针刺效应启动。

另外,细胞骨架跨核膜联系细胞核,可以调节基因表达。其中,PCNA 与细胞 DNA 合成关系密切,在细胞增殖的启动上起重要作用,是反映细胞活力的特征性指标<sup>[19]</sup>。本次研究,针刺组膈穴穴区局部 PCNA 阳性计数率均高于空白组,统计学意义显著( $P<0.01$ ),说明针刺可能可以调节膈穴穴区细胞核基因和蛋白表达水平,提高膈穴活力。

综上所述,毫针刺刺时膈穴筋膜组织成纤维细胞的细胞骨架中微丝和微管是主要的细胞内力学信息传导通路;通过细胞骨架通路,膈穴组织能量代谢增强、膈穴细胞活力增加,这可能是毫针刺刺激膈穴,激发针刺治疗作用启动的现代医学机理之一。虽然本次研究可能进一步揭示针刺作用原理提供了新的思路,但这也还需要更深入地研究进一步验证。

#### 参考文献:

- [1]郭义.实验针灸学(全国高等中医药院校规划教材第十一版,新世纪第五版)[M].北京:中国中医药出版社,2021:51-75.
- [2]余曙光,徐斌.实验针灸学(第2版)[M].北京:人民卫生出版社,2020:7-25,67-72.

- [3]李程,陈波,胡铁汉,等.毫针刺刺对膈穴筋膜结缔组织细胞整合素  $\beta_1$ 、 $\beta_3$  亚基和 PCNA 表达的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(16):4442-4444.
- [4]杨榕,缪辉宇,黄志慧.针刺联合拔罐运动疗法治疗膝骨关节炎的临床观察[J].上海针灸杂志,2021,40(2):194-199.
- [5]李程,陈波,胡铁汉,等.不同规格毫针刺刺对大鼠穴区筋膜组织、细胞和胶原纤维的影响[J].中国针灸,2015,35(8):801-805.
- [6]任超,鞠露,陈士炯,等.针刺背俞穴、夹脊穴治疗老年腰椎间盘突出症的临床观察[J].世界中西医结合杂志,2021,16(6):1147-1150.
- [7]Azraq I,Craveiro RB,Niederer C,et al.Gene expression and phosphorylation of ERK and AKT are regulated depending on mechanical force and cell confluence in murine cementoblasts[J].Ann Anat,2021(234):151668.
- [8]Tsai E,Casaccia P.Mechano-modulation of nuclear events regulating oligodendrocyte progenitor gene expression[J].Glia,2019,67(7):1229-1239.
- [9]Nikmanesh M,Cancel LM,Shi ZD,et al.Heparan sulfate proteoglycan, integrin, and syndecan-4 are mechanosensors mediating cyclic strain-modulated endothelial gene expression in mouse embryonic stem cell-derived endothelial cells[J].Biotechnol Bioeng,2019,116(10):2730-2741.
- [10]周艳朋,李长聪,焦雪蕾.针刺颈夹脊配合风池、后溪及束骨穴治疗颈性眩晕的疗效及对血流动力学的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(4):664-667.
- [11]刘云逸,王博,王琳.运动后针刺腓肠肌干预肥胖大鼠肌腱退行性病变[J].中国组织工程研究,2021,25(14):2211-2218.
- [12]曹昂,炎饶毅,庄威,等.从骨骼肌张力传递解读反阿是穴的治疗效果[J].中国针灸,2021,41(2):217-220.
- [13]胡铁汉,江瑜,陈波,等.体外压力刺激对血管内皮细胞不同整合素亚基表达变化影响的研究[J].按摩与康复医学,2016,7(1):11-14.
- [14]魏凯,王春丽.“调理脾胃”针法联合风池穴针刺治疗颈性眩晕的疗效及对椎-基底动脉血流动力学影响[J].针灸临床杂志,2020,36(6):15-18.
- [15]Zhang C,Wang F,Gao Z,et al.Regulation of Hippo Signaling by Mechanical Signals and the Cytoskeleton[J].DNA Cell Biol,2019,39(2):5087-5093.
- [16]Chakraborty S,Jasmin M,Baumeister W.Three-dimensional organization of the cytoskeleton: A cryo-electron tomography perspective[J].Protein Sci,2020,29(6):1302-1320.
- [17]徐丽萌.Anillin 对细胞骨架蛋白和细胞力学特性的调节作用[D].太原:太原理工大学,2019.
- [18]Min YS,Yun NY,Song JH,et al.Functional activity of mitochondria associated with cytoskeleton stability in the HEK293[J].FASEB J,2020,34(S1):1-2.
- [19]Dieckman L.Something's gotta give: How PCNA alters its structure in response to mutations and the implications on cellular processes[J].Prog Biophys and Mol Biol,2021(163):46-59.

收稿日期:2021-07-19;修回日期:2021-07-31

编辑/肖婷婷