

针刺对大鼠局部筋膜和脊髓细胞外信号调节激酶 1/2 和 P38 丝裂酶原活化蛋白激酶信号通路的影响*

姜雪梅^{1,2} 原林^{1,4} 张学全¹ 杨春¹ 黄泳³ 戴景兴¹ 吴金鹏¹ 余磊¹

摘要 目的:观察针刺捻转拉伸大鼠皮下筋膜对局部筋膜和脊髓背角细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)和丝裂原活化蛋白激酶 P38(P38 MAPK)信号通路的影响及筋膜结缔组织的形态学变化。**方法:**20只SD大鼠通过随机分组,每组5只,针刺后三里组和针刺非穴位组进行手针捻转,拉伸刺激组进行拉伸刺激,采用免疫组化技术观察筋膜和脊髓组织中细胞信号蛋白的变化;利用相差显微镜观察拉伸刺激组局部皮下筋膜形态学变化。**结果:**组织学改变:拉伸刺激组皮下筋膜的纤维以拉伸点为中心呈向心性分布,单位面积内细胞密度增大,细胞骨架和胞核重构成“扁梭形”。细胞信号蛋白变化:针刺组筋膜结缔组织 ERK1/2 和 P38MAPK 表达与对照组相比均有增加,但以非穴组增加显著;ERK1/2 与 P38MAPK 在脊髓中的表达位置由胞质转向胞核,ERK1/2 与空白对照组相比差异没有显著性意义;P38MAPK 的表达有所增加。**结论:**针刺对局部浅筋膜的 ERK1/2 和 P38 有上调作用,但与脊髓中的信号蛋白增加幅度并不完全一致,提示,筋膜结缔组织支架可能在微观的信号转导层面对局部细胞分化与增殖具有促进作用。

关键词 皮下筋膜/针刺;信号转导;细胞外信号调节激酶;丝裂酶原活化蛋白激酶;穴位/非穴

中图分类号:R245.3 文章标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-11-0973-04

Effect of acupuncture on modulation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and P38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways in subcutaneous fascia and spinal medulla of rats/JIANG Xuemei, YUAN Lin, ZHANG Xuequan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2009,24(11):973-976

Abstract Objective: To observe the effect of acupuncture on the expressions of extracellular signal regulated kinase 1/2(ERK 1/2) and P38 mitogen-activated protein kinase(P38 MAPK) in subcutaneous fascia and dorsal horn of spinal cord of SD rats and the morphologic changes of fascia connective tissue. **Method:** Twenty SD rats were randomly divided into 4 groups, 5 rats in each group. Rats of acupuncture acupoint group and acupuncture non-acupoint group received hand acupuncture with twist manipulation. Rats of stretch stimulation group received acupuncture with stretch stimulation. The morphologic changes of subcutaneous fascia were observed by phase-contrast microscope. **Result:** Morphologic changes: fibers of subcutaneous fascia were stretched centripetally to the center of tension, the mean density of cells increased in unit area the configuration of cytoplasm and nucleus were reconstructed as long spindles with unclear boundaries under tension. Changes of signal transduction protein: the expressions of ERK1/2 and P38 MAPK increased especially in acupuncture non-acupoint group; and the location of ERK1/2 and P38 MAPK at neurocyte of spinal cord transferred from cytoplasm to nucleus after acupuncture. The expression of ERK1/2 in neurocyte didn't enhance, while the expression of P38 MAPK enhanced after acupuncture. **Conclusion:** Acupuncture could up-regulate the expressions of ERK1/2 and P38 MAPK in local subcutaneous fascia. But the expressions of ERK1/2 and P38 MAPK in spinal cord were not completely coincidence with the expressions in fascia. Acupuncture can regulate the neuroactivity and maybe promote the cell differentiation and proliferation of local fascia, and it's mechanism maybe due to the modulation of ERK1/2 and P38 MAPK signal transduction pathways by destructive factors produced by mechanical stimulation of acupuncture.

Author's address School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guang zhou, 510515

Key words subcutaneous fascia/acupuncture; signal transduction; extracellular signal regulated kinase 1/2; P38 mitogen-activated protein kinase; acupoint/non-acupoint

以往研究表明,经络和穴位的分布与全身的筋膜结缔组织有密切关系^[1-3],本课题组在数字人研究标记经络走行的基础上,提出全身的非特异性结缔组织支架与人体经络密切相关,据此,通过发育生物学分析提出了人体新的解剖学分科方法——筋膜解剖学,该分科方法认为人体可以分为由全身结缔组

* 基金项目:国家重点基础研究计划(973计划)项目(2007CB512705)

1 南方医科大学基础医学院解剖教研室,广东省组织构建与检测重点实验室,广州,510515

2 广州中医药大学基础医学院解剖教研室

3 南方医科大学中医药学院针灸教研室

4 通讯作者

作者简介:姜雪梅,女,博士研究生,医师

收稿日期:2009-03-26

织支架构成的支持与储备系统和由该支架支持和包绕的功能细胞所构成的功能系统两个部分,在人体的生命过程中前者不间断地为后者提供源源不断的细胞来源,从而维持人体机能和结构的正常状态。中医所使用的各种机械刺激疗法就是对该支架的特定部位进行物理刺激,激发机体的生物活性的改变以起到治病的作用,本文主要目的是通过动物实验证实针刺捻转牵拉刺激对局部筋膜和脊髓的细胞形态学的影响及其在细胞信号转导层面的机制,从而对作用广泛的针刺的生物学机制提供一定的支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

兔多抗 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase1/2) 和 P38 均购自 Santa Cruz 生物科技公司(美国),SABC(兔 IgG)-AP 和 SABC(小鼠 IgG)-AP 试剂盒购自武汉博士德公司。10mg/L 鬼笔环肽(Sigma),0.01%碘化丙啶(PI,Sigma)。

1.2 动物分组及处理方法

1.2.1 分组方法:20 只体重为 180—220g 的 SD 大鼠(购自南方医科大学实验动物中心,合格证编号 0035841),雌雄不限,随机分为 4 组,分别为空白对照组、针刺后三里组、针刺非穴位组、拉伸刺激组,每组各 5 只,各组饲养条件完全一致。

1.2.2 处理方法:在整个实验期间空白对照组不施加任何处理,针刺后三里组和针刺非穴位组大鼠用 10%水合氯醛麻醉,固定后,分别在后三里穴(参照“十五”国家级规划教材《实验针灸学》的定位方法)和大鼠右侧腹股沟处(约在大鼠耻骨联合上 1cm,旁开 2cm 处)选穴后备皮,消毒后刺入,针刺得气后,按 120 转/min 的频率捻转针体,按照针刺操作中平补平泻的手法,捻转 1min 后,休息 4min,然后再捻转 1min,以此类推,共捻转 4 次,留针 20min,隔日 1 次,共针刺治疗 10 次。大鼠后三里穴参照《实验针灸学》(“十五”国家级规划教材)的定位方法,针刺后三里组大鼠的处理方法如上所述。

拉伸刺激组大鼠于 L1—L2 水平脊柱旁开 2cm 处局部备皮,消毒后,以针尾为参照物顺时针捻转 5 周,捻转末用血管夹夹持针柄与皮肤,5min/次,隔日 1 次,共刺激 10 次。

1.2.3 取材方法:末次治疗后,大鼠分别用 10%水合氯醛按 4ml/kg 的量进行腹腔麻醉,麻醉后空白对照组大鼠参照非穴的针刺点为圆心,直径约 1.5cm 的区域取浅筋膜约 200mg,针刺后三里组和针刺非穴位组大鼠,也分别在针刺点周围直径 1.5cm 范围

内,取浅筋膜放入 4%多聚甲醛固定,经冲洗、脱水、透明等处理后,每只大鼠的组织制成 2 张 4 μ m 防脱石蜡切片,分别备 ERK 和 P38 免疫组化染色用。

空白对照组、针刺非穴位组和针刺后三里组大鼠取材后次日用生理盐水和 4%多聚甲醛灌注固定,用“微型椎板咬骨钳”取出脊髓组织,进一步经固定、冲洗、脱水及透明等处理,每只大鼠取 L1—L5 的脊髓制成厚度为 4 μ m 的防脱石蜡切片 2 张。

拉伸刺激组在 L1—L2 水平脊柱旁开 2cm 处取浅筋膜以备做铺片用;空白对照组大鼠在非穴处取材、缝合切口后,也在取材部位取材以备做铺片用。

1.3 组织形态学观察

空白对照组和拉伸刺激组的组织固定按 Langevin HM^[4]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取 0.5cm \times 0.5cm 皮下筋膜,平置于硅化载玻片上约 30min,自然干燥,置铺片于相差显微镜下获取(extracellular matrix,ECM)内纤维分布立体图像。铺片置湿盒内,0.1%Triton X-100 透化(上海生物工程有限公司,中国)5min,10mg/L 鬼笔环肽室温避光染色 2h,PBS 反复冲洗 5min,0.01%PI 避光复染 5min,PBS 冲洗 5min,荧光显微镜下观察细胞形态。

1.4 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,并参考以往的文献^[5]对皮下筋膜和脊髓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 Imagepro-plus6.0 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。

1.5 统计学分析

采用 SPSS10.0 对统计结果进行分析,两样本均数采用独立样本 *t* 检验,对组间采用单因素方差分析,两两比较用 LSD,显著性水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 组织形态学观察

观察 ECM 走行可见,实验组 ECM 内纤维以拉伸点为中心呈向心性分布、张力增高(图 1A,见彩色插页),对照组纤维纵横交错形成众多纤维网格(图 1B,见彩色插页)。实验组细胞在纤维带动下排列方向与受力方向一致、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 2A, 见彩色插页),对照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 2B, 见彩色插页)。

2.2 免疫组化结果

2.2.1 ERK1/2 的表达情况:光镜下观察,大鼠脊髓背角 ERK1/2 蛋白免疫组化反应显色呈棕黄色,阳性细胞分布于脊髓灰质神经元集中的部位,白质较少表达,表达部位主要位于胞质,针刺后深染部位向胞核集中(图 3A—C, 见彩色插页)。但各组脊髓的 ERK1/2 的表达未见显著性差异($P>0.05$)。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),各组大鼠筋膜 ERK1/2 表达强弱情况为:空白对照组<针刺后三里组<针刺非穴位组,在筋膜结缔组织中,ERK 阳性染色区域多集中在成纤维细胞或巨噬细胞核周围(见图 4A—C, 见彩色插页),针刺非穴位组的阳性表达数明显多于后三里组。

2.2.2 P38 的表达情况:与 ERK1/2 相比,P38 在筋膜中的表达较弱,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,针刺非穴位组的阳性表达数也明显多于后三里组(图 6A, 6B, 6C, 见彩色插页)。而在脊髓背角中 P38 的表达也多集中于脊髓灰质,在空白对照组中,P38 的定位多在细胞膜附近的胞浆区域,但针刺后阳性染色区域逐渐像胞核集中(图 5A, 5B, 5C, 见彩色插页)。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),SNK 两两分析显示:空白对照组<针刺后三里组<针刺非穴位组(表 2),而各组大鼠脊髓灰质的 P38 的表达也有显著性差异($P<0.001$)。

3 讨论

3.1 机械拉伸对局部筋膜细胞形态学的影响

有研究认为,机械负荷的细胞转导分为四个不同阶段:①机械偶联阶段;②生化偶联阶段;③细胞内信号转导阶段;④效应细胞产生反应^[9]。而针刺的操作手法,从本质上讲是对胶原的缠绕和牵拉局部组织伸展,进而发生了机械传导的第一个阶段:机械偶联导致的组织发生形变。本课题借助鬼笔环肽对肌动蛋白高亲和力和碘化丙啶对凋亡胞核染色能力,观察到针刺捻转后通过电荷引力和摩擦力,胶原纤维缠绕在针柄周围^[7],牵拉引起胞外基质变形、纤维紧张并与拉力方向平行排列(图 1A),这种改变引起了 Rac 和 Rho 的信号通路的激活和肌动蛋白的收缩而使细胞“纺锤样”变^[8](图 2A),值得一提的是

表 1 各组之间大鼠筋膜的 ERK1/2 和 P38MAPK 的平均光密度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	平均光密度值(ERK)	平均光密度值(P38)
空白对照组	5	0.005±0.001	0.001±0.000
针刺后三里组	5	0.026±0.015	0.005±0.002
针刺非穴位组	5	0.070±0.014	0.010±0.002
<i>F</i>		79.780	88.171
<i>P</i>		0.000	0.000

表 2 各组之间大鼠脊髓的 ERK1/2 和 P38MAPK 的平均光密度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	平均光密度值(ERK)	平均光密度值(P38)
空白对照组	5	0.032±0.019	0.017±0.005
针刺后三里组	5	0.021±0.004	0.021±0.003
针刺非穴位组	5	0.026±0.005	0.029±0.004
<i>F</i>		1.859	26.423
<i>P</i>		0.175	0.000

对照组荧光染色显示胞浆扩展呈多角形、胞核大而圆(图 2B),提示其在生理状态下也承受着一定的张力,这也进一步证实了非特异性结缔组织参与运动和姿势控制的观点^[9]。

3.2 ERK1/2 和 P38 与针刺力学信号传导

丝裂酶原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路在细胞响应力学传导中有重要作用,其亚型 ERK1/2 和 P38 能调节细胞内信号对多种刺激的反应^[10],包括机械刺激,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^[11-12];国内的一些研究多侧重于观察运动后骨骼肌细胞中 ERK1/2 和 P38 的变化情况,发现这两种信号蛋白运动后激活程度均有所增加^[13-14];这种激活与机械刺激诱导细胞产生核苷酸作为信号转导介质有关^[15],且发现细胞膜的机械敏感性离子通道参与机械信号,特别是伤害性刺激信号的转导^[16]。本研究从筋膜和脊髓背角的不同角度,解释针刺作为一种机械刺激,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,针刺非穴位组和针刺后三里组治疗后两种蛋白表达均有明显增加,但以针刺非穴位组大鼠增加显著。原因可能在于,针刺从本质上来讲是一种损伤性刺激,故无论在穴位和非穴的针刺点局部均可见到这两种信号蛋白的表达增加;另外,通过对大鼠非穴和后三里穴区的解剖发现,针刺非穴位点皮下为腹股沟脂肪垫,筋膜结缔组织非常丰富,针刺入皮下捻转,能够带动较大范围的结缔组织,产生很强的沉紧感,而后三里穴区(即大鼠膝关节后外侧腓骨小头下约 5mm 处)皮下筋膜相对较少,针体刺入约 1.5—2mm 即刺入肌肉,所以捻转针

体只能带动较少的筋膜结缔组织,沉紧感较弱,刺入后较非穴组更容易出针,这也可能是非穴组细胞信号蛋白增加幅度更大的原因。

ERK1/2 和 P38 在大鼠脊髓背角细胞中均有表达,表达部位多集中于胞质(图 3A,5A),但可观察到,针刺后蛋白阳性表达向胞核周围集中(图 3B,3C),其中 ERK1/2 在各组之间的表达差异没有显著性意义,但穴位或针刺非穴位后 ERK1/2 表达均有减弱趋势,而多项研究表明 ERK1/2 的表达上调与神经性疼痛有密切的关系^[7],这也进一步提示针刺后三里可能通过下调脊髓 ERK1/2 的正常表达达到升高痛阈的作用,而本课题选择的非穴的神经支配在同一脊髓阶段,所以也有同样的效应。而各组大鼠脊髓的 P38 表达强弱顺序与局部筋膜的一致,对于针刺影响脊髓 P38 表达的关注多为对于炎性疼痛的研究^[18],还较少关于对于正常大鼠脊髓影响的观察,本研究脊髓背角 P38 的表达与局部筋膜的相关,以及临床意义还需要进一步的研究证实。

3.3 从筋膜学与信号转导角度看经络

原林等^[2]的研究显示经络和穴位的分布与全身的非特异性结缔组织有密切关系,在发育生物学上,非特异性结缔组织是来源于胚胎的间充质,是与血管、微循环、内脏系统的同源组织,均来自中胚层,在生命机能调节中起重要作用,间充质拥有大量的未定向细胞和细胞间质,在生命进程中有分化定向组织、提供组织代谢物质和代谢功能,可对自体组织形成监测和调控作用,但其具体通过何种方式对机体的生理、病理状态进行调控日益引起人们的关注。

Langevin^[4]皮下组织的成纤维细胞建立了一个广泛的细胞之间互相连接的网络,各个细胞之间通过直接连接进行信息的交流,可以设想,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等的影响,不可能象神经系统通过反射弧这样高级,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。

本研究从针刺作用于人体的始动环节—针体对皮下筋膜的牵拉着手,研究针刺前后筋膜结缔组织中信号蛋白的变化,区别于以往的对于针灸的研究模式“穴位刺激—靶器官反应”,结果发现,针刺对于局部的皮下筋膜组织的 ERK1/2 和 P38 的表达确有影响,且与脊髓阶段的改变并不完全一致,这是否也从一个侧面证实针灸对人体的影响除了神经—体液

调节以外,在微观上还存在另一个较为原始的调控网络,而这种调控网络与各个靶器官之间有何联系,尚需要更深入的实验证实。

参考文献

- [1] 原林,焦培峰,唐雷.中医经络理论的物质基础—结缔组织、筋膜和自体监控体系[J].中国基础科学—研究论坛,2005,(3):44—48.
- [2] 原林,王军,王春雷.人体内新的功能系统—支持储备及自体监控系统新学说[J].科技导报,2006,24(6):85—89.
- [3] 费伦,承煥生,蔡德亨,等.经络物质基础及其功能性特征的实验探索和研究展望[J].科学通报,1998,43(6):658—672.
- [4] Langevin HM, Cornbrooks CJ, Taatjes DJ, et al. Fibroblasts form a body-wide cellular network [J]. *Histochem Cell Biol*, 2004, 122:7—15.
- [5] 李伟忠,丁彦青,李祖国,等. COX-2 和 VEGF-C 在舌癌组织中的表达及与颈淋巴结转移的关系 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(2):180—183.
- [6] Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain [J]. *Calcif Tissue Int*, 1995, 57(5): 344—358.
- [7] Langevin HM, Churchill DL, WUJR, et al. Evidence of connective tissue involvement in acupuncture [J]. *FASEB J*, 2002, 16(8):872—874.
- [8] Langevin HM, Bouffard NA, Badger GJ, et al. Subcutaneous tissue fibroblast cytoskeletal remodeling induced by acupuncture: evidence for a mechanotransduction-based mechanism [J]. *Journal of cellular physiology*, 2006, 207: 767—774.
- [9] Langevin HM. Connective tissue: A body-wide signaling network[J]. *Medical hypothesis*, 2006, 66 (6):1074—1077.
- [10] 赵艳,吴坤.哺乳动物细胞中 MAPK 信号转导途径的研究进展 [J]. *国外医学·卫生学分册*, 2004, 32(1):16—21.
- [11] Kumar AJ, Knox AJ, Boriek AM. CCAAT/enhancer-binding protein and activator protein-1 transcription factors regulate the expression of interleukin-8 through the mitogen-activated protein kinase pathways in response to mechanical stretch of human airway smooth muscle cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 18868—18876.
- [12] You J, Reilly GC, Zhen X, et al. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 13365—13371.
- [13] 胡瑞萍,吴毅,胡永善.运动对大鼠骨骼肌胰岛素信号转导蛋白表达和活性的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(6): 409—411.
- [14] 江钟立,陈家伟,朱红军,等.运动和胰岛素对高血糖大鼠骨骼肌 JNK 和 p38 信号传导系统的调节作用[J]. *中国康复医学杂志*, 2003, 18(2):69—71.
- [15] Katz S, Boland R, Santillán G. Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: Involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, 38(12): 2082—2091.
- [16] 张杨,岳寿伟,万子兵,等.新生大鼠背根神经节机械敏感性离子通道的电生理研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21 (9): 771—775.
- [17] 徐艳冰,宋雪松,曹君利,等.脊髓背角 ERK 激活在大鼠神经病理性疼痛中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2007, 27(1):22—27.
- [18] 龚伟,王升旭.电针夹脊穴在佐剂性关节炎大鼠镇痛过程中磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶的变化及作用 [J]. *中国临床康复*, 2004, 8(8): 1514—1515.