

· 基础研究 ·

针刀干预对 L₃ 横突综合征模型大鼠骨骼肌 NOS 及 NO 的影响

李金牛¹, 乔晋琳², 郭长青³, 汲广成¹, 马广昊², 付本升², 向东东², 陈裔英², 路平⁴, 刘灿坤¹

(1. 贵阳中医学院针灸推拿系, 贵州 贵阳 550002; 2. 海军总医院康复理疗科, 北京 100037; 3. 北京中医药大学针灸学院; 4. 海军总医院病理室)

【摘要】目的: 研究 L₃ 横突综合征模型大鼠损伤局部软组织 NOS 活性及 NO 含量与软组织损伤程度的关系, 并观察针刀干预后的影响。**方法:** 成年雄性 SD 大鼠 128 只随机分为正常组、模型组、氨基胍组、针刀组, 每组 32 只。建立 L₃ 横突综合征动物模型, 造模后 14 d, 对造模局部软组织的硬结和条索状物无菌条件下用一次性针刀行纵行切割 3 刀, 横行切割 1 刀, 随即出针刀。氨基胍组从造模 14 d 开始, 按 50 mg/kg 剂量经腹腔内给药, 2 次/d, 直至处死前一天为止。通过针刀、氨基胍干预后在 1、3、7、14 d 检测各组 L₃ 横突周围软组织 NOS 活性、NO 含量及观察组织形态学变化。**结果:** ①模型组 iNOS 活性及 NO 含量比正常组明显升高 ($F=522.860, P<0.01$), 针刀组、AG 组比模型组明显降低 ($F_{iNOS}=28.894, P<0.01$), 且各组 iNOS 活性及 NO 含量与损伤局部炎症反应及组织损伤程度相一致。②模型组、针刀组 eNOS 阳性表达增强, 7 d 达到峰值, 针刀组与模型组比较差异有统计学意义 ($F_{eNOS}=3.454, P<0.05$)。③模型组、氨基胍组、针刀组 nNOS 阳性表达较高, 组间比较无统计学意义 ($F_{nNOS}=0.962, P>0.05$)。**结论:** 针刀干预后可明显抑制高浓度 NO 的生成, 减轻损伤软组织炎症反应和损伤程度, 改善微循环, 防止病理性瘢痕组织的形成, 对慢性软组织损伤动物模型有明显的促修复作用。

【关键词】 第三腰椎横突综合征; 肌, 骨骼; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

Nitric oxide synthase (NOS) expression and nitric oxide (NO) content in the skeletal muscles in transverse process syndrome of the 3rd lumbar vertebra of model rats treated with acupotomy therapy LI Jin-niu, QIAO Jin-lin*, GUO Chang-qing, JI Guang-cheng, MA Guang-hao, FU Ben-sheng, XIANG Dong-dong, CHEN Yi-ying, LU Ping, LIU Can-kun.
*Department of Rehabilitation and Physiotherapy, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

ABSTRACT Objective: To study the relation between the nitric-oxide synthase (NOS) expression and nitric oxide (NO) content in the skeletal muscles and the injury condition of soft tissue in the 3rd lumbar vertebrae syndrome model rats, and to observe the effect of acupotomy therapy. **Methods:** One hundred and twenty-eight adult SD rats were allocated to 4 groups randomly: normal group, model group, aminoguanidin group and acupotomy treatment group, 32 rats in each group. NOS expression, NO content and injury of the soft tissue in the 3rd lumbar vertebra were observed on the 1st, 3rd, 7th and 14th day after the acupotomy treatment and aminoguanidine intervention. **Results:** ①Inducible NOS (iNOS) activity and NO content in model group was significantly higher ($F=522.860, P<0.01$), in acupotomy group and aminoguanidine group was significantly lower than the model group ($F_{iNOS}=28.894, P<0.01$), and iNOS activity and NO content in all groups was in competence with the condition of soft tissue injuries. ②Endothelium NOS (eNOS) expression raised in model group and acupotomy group, and achieve peak on the 7th day. There was significant difference between the eNOS expression in acupotomy group and the model group ($F_{eNOS}=3.454, P<0.05$). ③The expression of neuron NOS (nNOS) in the model group, aminoguanidine group and acupotomy group had no significant ($F_{nNOS}=0.962, P>0.05$). **Conclusion:** Acupotomy treatment can restrain the development of high content NO, release the inflammatory reaction and injury condition, improve microcirculation, prevent the development of scar tissue of the injured soft tissue, and has significant recovering effectiveness in the soft tissue injured model rats.

Key words 3rd lumbar vertebrae syndrome; Muscle, skeletal; Nitric oxide; Nitric-oxide synthase

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(11): 844-847 www.zggszz.com

基金项目: 国家“973”计划项目(编号: 2006CB504508)

通讯作者: 乔晋琳 E-mail: jinlin195@vip.sohu.com

第 3 腰椎(L₃)横突综合征,是指附着在 L₃ 横突上的肌肉、筋膜等软组织受到慢性损伤而引起的局限性压痛等一系列症状的综合征。针刀医学^[1]认为,当人体反复、持久的屈伸活动时,附于横突尖部上的肌肉、韧带、筋膜受到磨擦损伤,病变组织出现水肿、渗出、结痂、挛缩与粘连,导致动态平衡失调。针刀疗法可有针对性地对 L₃ 横突尖部形成的病理性结节、条索等进行剥离和松解,消除痂痕与粘连,使人体的动态平衡得以恢复。

研究表明,一氧化氮(nitric oxide, NO)及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)在急性软组织损伤及修复过程中起重要作用,但其在慢性软组织损伤及修复过程中的作用尚不明确。本实验旨在研究 NO 及 NOS 与慢性软组织损伤模型-L₃ 横突综合征模型大鼠损伤程度的关系,并观察针刀干预后的影响,进而分析针刀治疗慢性软组织损伤性疾病的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物 成年雄性 SD 大鼠 128 只,体重 200~250 g(中国医学科学院实验动物研究所,动物许可证编号:SCXK(京)2005-0013),海军总医院海战伤研究中心二级实验室(实验动物使用许可证号:SYXK(军)2007-014)饲养。实验过程中动物处置符合动物伦理学标准。

1.2 试剂及药品 吸收性明胶海绵(国药准字:H32024096,南京制药三厂);NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所);兔抗大鼠 eNOS/nNOS/iNOS 多克隆抗体、SP 免疫组化试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);氨基胍(aminoguanidine, AG)(Sigma 公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 分组 实验动物(n=128)随机分为 4 组:正常组、模型组、氨基胍组和针刀组,各 32 只。

1.3.2 造模方法 采用王健瑞等^[2]建立的 L₃ 横突综合征动物模型。使用盐酸氯胺酮注射液、速眠新 II 注射液按体积比 1:1 混合,以 1 ml/kg 剂量经腓肠肌给药行大鼠肌肉麻醉后,无菌术下于大鼠腰背部纵向切口 2 cm,剥离骶棘肌,显露 L₃-L₄ 棘突,用微型骨科器械处理其横突周围组织至椎板。切取明胶海绵 0.3 cm×0.3 cm 大小,植入左侧 L₃ 横突后半段深筋膜中层下,彻底止血。骶棘肌筋膜及皮肤均用 0 号线等距离缝合 3 针,切口庆大霉素冲洗,用免贴妥喷雾。

1.3.3 干预方法 ①针刀组:造模后第 14 天,试用上述麻醉方法麻醉成功后,对造模局部软组织的硬结和条索状物,无菌条件下用汉章牌一次性针刀(0.60 mm×40 mm,北京华夏针刀

医疗器械厂,京药监械(准)字:2005 第 2270038 号)行纵行切割 3 刀,横行切割 1 刀,随即出针刀。②氨基胍组:从造模 14 d 开始,按 50 mg/kg 剂量经腹腔内给药,2 次/日,直至处死前一天为止^[3]。4 组大鼠同条件饲养。

1.4 检测指标

1.4.1 eNOS/nNOS/iNOS 免疫组化检测 于针刀干预后 1、3、7、14 d 行气栓法分别处死各组大鼠各 8 只,切取左侧 L₃ 横突周围软组织置于 4%甲醛溶液中固定,石蜡包埋,切片,行免疫组化 SP 染色,细胞浆及基质有棕色颗粒者为阳性信号。采用 HPIAS-1000 病理图文分析系统(中国武汉同济千屏影像工程公司)对 NOS 的阳性表达进行图像分析,每张切片随机采集 5 个视野(×200 倍)获得 5 个灰度值,平均后代表该标本的染色强度。

1.4.2 NO 含量检测(硝酸还原酶法) 所取软组织于 4℃预冷生理盐水洗净血液,滤纸吸干水分后称重、匀浆,配制 10%匀浆液并于低温离心机 4℃、5 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 ml 置于低温冰箱(-70℃)待检。按照试剂盒说明进行操作,选定 540 nm 波长,0.5 cm 比色杯,全波长紫外分光光度计(THERMO UV550)进行比色,测定各管吸光度。

1.4.3 组织形态学观察 所取软组织,4%甲醛固定,5%硝酸脱钙,乙醇逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,HE 染色。光镜下观察肌肉、韧带等软组织及其炎性病理改变。

1.5 统计方法 各组数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所获数据由海军总医院信息科采用 SPSS 11.0 软件包作统计学处理,采用两因素析因设计定量资料方差分析处理,各组间比较进行最小显著差异(LSD)法检验。

2 结果

2.1 骨骼肌及周围软组织 NOS 免疫反应性 正常组 iNOS 几乎无阳性表达,个别标本可见 iNOS 在血管内皮细胞极少量阳性表达;模型组 iNOS 广泛表达,主要分布在骨骼肌细胞、成纤维细胞和炎性细胞;AG 组从 3 d 开始,iNOS 表达明显减少;针刀组从 7 d 开始,iNOS 表达明显减少。正常组在血管内皮细胞可见少量 eNOS 阳性表达;模型组 eNOS 阳性表达较高,主要分布在血管内皮细胞,7 d 达到峰值;氨基胍组 eNOS 阳性表达接近于模型组;针刀组 eNOS 从 3 d 开始表达增加,7 d 达到峰值。正常组 nNOS 不表达或偶见阳性表达;模型组、氨基胍组、针刀组 nNOS 阳性表达较高,主要分布在间质的神经组织及肌纤维。

正常组与模型组不同时间段 iNOS/eNOS/nNOS 灰度值见表 1。由表 1 得出:正常组与模型组 iNOS/eNOS/nNOS 比较

表 1 正常组与模型组不同时间段 iNOS/eNOS/nNOS 灰度值比较

Tab.1 iNOS, eNOS, nNOS expression of normal and model groups in different time($\bar{x} \pm s$)

是否造模	鼠数(只)	iNOS 灰度值				eNOS 灰度值				nNOS 灰度值			
		1 d	3 d	7 d	14 d	1 d	3 d	7 d	14 d	1 d	3 d	7 d	14 d
否	8	189.8±31.7	191.4±22.7	188.9±32.2	187.5±25.2	134.5±21.6	133.7±24.1	134.0±20.5	134.7±25.0	181.9±25.1	182.3±27.8	182.5±21.7	180.1±21.6
		49.8±20.2	53.1±23.9	40.2±16.2	53.2±19.6	117.8±35.5	106.7±45.2	101.9±21.2	102.1±27.3	91.8±31.6	116.4±40.8	123.4±15.2	136.4±18.1

注:FiNOS=522.860, P<0.01; FeNOS=14.277, P<0.01; FnNOS=96.480, P<0.01

Note: FiNOS=522.860, P<0.01; FeNOS=14.277, P<0.01; FnNOS=96.480, P<0.01

表 2 不同干预因素在不同时间段 iNOS/eNOS/nNOS 灰度值比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 iNOS, eNOS, nNOS expression of model, aminoguanidine and acupotomy groups in different time($\bar{x}\pm s$)

干预因素	鼠数(只)	iNOS 灰度值				eNOS 灰度值				nNOS 灰度值			
		1 d	3 d	7 d	14 d	1 d	3 d	7 d	14 d	1 d	3 d	7 d	14 d
模型组	8	49.8±	53.1±	40.2±	53.2±	117.8±	106.7±	101.9±	102.1±	91.8±	116.4±	123.4±	136.4±
不干预		20.2	23.9	16.2	19.6	35.5	45.2	21.2	27.3	31.6	40.8	15.2	18.1
氨基胍	8	63.7±	127.0±	125.4±	128.5±	114.2±	117.4±	123.2±	119.5±	109.7±	110.2±	112.7±	111.1±
干预		26.9	45.5	54.4	45.4	28.7	33.0	27.7	30.9	51.3	37.2	27.2	44.6
针刀	8	45.2±	55.9±	97.1±	111.5±	138.0±	85.3±	76.4±	87.2±	111.1±	126.2±	127.1±	129.6±
干预		16.9	19.0	38.6	35.4	50.0	38.0	25.1	23.8	33.3	63.3	15.4	21.8

注: $F_{iNOS}=28.894, P<0.01$; $F_{eNOS}=3.454, P<0.05$; $F_{nNOS}=0.962, P>0.05$

Note: $F_{iNOS}=28.894, P<0.01$; $F_{eNOS}=3.454, P<0.05$; $F_{nNOS}=0.962, P>0.05$

差异均有统计学意义, 说明模型组造模局部软组织 iNOS/eNOS/nNOS 大量表达。

不同干预因素在不同时间段 iNOS/eNOS/nNOS 灰度值见表 2。由表 2 得出: 模型组、氨基胍组和针刀组 iNOS 比较差异有统计学意义, 说明氨基胍干预和针刀干预后抑制了 iNOS 的表达; 模型组、氨基胍组和针刀组 eNOS 比较差异有统计学意义, 说明针刀干预后促进了 eNOS 的表达; 模型组、氨基胍组和针刀组 nNOS 比较差异无统计学意义, 说明氨基胍干预和针刀干预对 nNOS 的表达无明显影响。

2.2 骨骼肌及周围软组织 NO 含量 正常组与模型组不同时间段 NO 含量见表 3。由表 3 得出: 正常组与模型组 NO 含量比较差异均有统计学意义, 说明模型组造模局部软组织生成了大量的 NO。不同干预因素在不同时间段 NO 含量比较见表 4。由表 4 得出: 模型组、氨基胍组和针刀组 NO 含量比较差异有统计学意义, 说明氨基胍干预和针刀干预后抑制了局部软组织 NO 的大量生成。

表 3 正常组与模型组不同时间段 NO 含量比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 NO content of normal and model groups in different time($\bar{x}\pm s$)

是否造模	鼠数(只)	NO 含量($\mu\text{mol/L}$)			
		时间 1 d	3 d	7 d	14 d
否	8	34.4±3.8	34.2±3.9	34.5±3.3	34.6±3.8
是	8	43.7±2.8	44.4±2.5	43.6±1.6	44.2±3.4

注: F 组别=140.587, $P<0.01$

Note: $F_{\text{group}}=140.587, P<0.01$

表 4 不同干预因素在不同时间段 NO 含量比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 NO content of model, aminoguanidine and acupotomy groups in different time($\bar{x}\pm s$)

干预因素	鼠数(只)	NO 含量($\mu\text{mol/L}$)			
		时间 1 d	3 d	7 d	14 d
模型组不干预	8	43.7±2.8	44.4±2.5	43.6±1.6	44.2±3.4
氨基胍干预	8	33.8±2.3	34.2±2.2	33.5±3.5	34.4±2.4
针刀干预	8	39.3±6.0	35.1±3.1	34.4±2.7	33.9±2.5

注: F 组别=89.551, $P<0.01$

Note: $F_{\text{group}}=89.551, P<0.01$

2.3 组织形态学观察 正常组结缔组织纤维有序排列, 无炎

性细胞浸润。模型组 1、3 d 可见淋巴细胞、中性粒细胞浸润(见图 1); 14 d 成纤维细胞增多, 纤维有断裂, 可见增生的毛细血管, 胶原重建开始, 原始瘢痕形成。氨基胍组、针刀组 14 d 成纤维细胞排列成行, 毛细血管增生扩张, 胶原重建开始, 原始瘢痕形成(见图 2)。

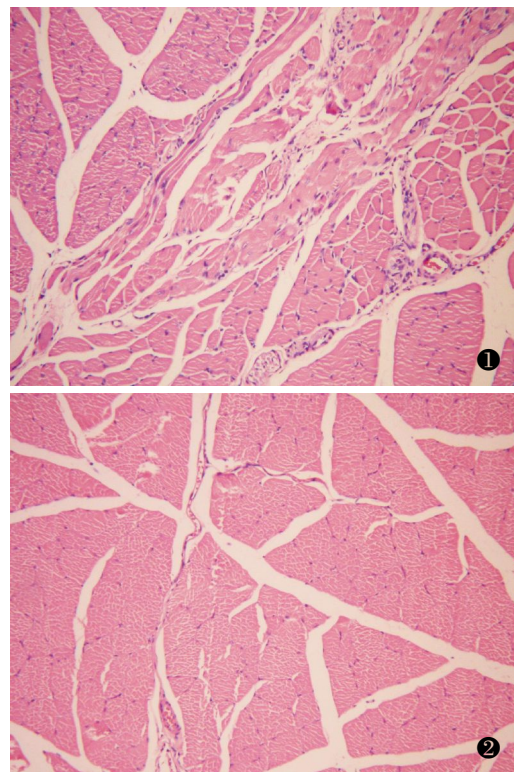


图 1 模型组 HE 染色-3 d ($\times 100$) 图 2 针刀组 HE 染色-14 d ($\times 100$)

Fig.1 Pathological changes in model group at the 3rd day($\times 100$) Fig.2 Pathological changes in acupotomy treatment group at the 14th day($\times 100$)

3 讨论

3.1 NO 及 NOS NO 是由 NOS 催化 L-精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 脱胍基而产生的一种自由基气体, 在机体的生理、病理过程中具有重要作用。NOS 可分为两类: 第一类为构成型 NOS (constitutive NOS, eNOS), 包括神经元型 NOS (neuron NOS, nNOS) 和内皮型 NOS (endothelium NOS, eNOS) 两种^[4];

第二类是诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS)。eNOS 在生理条件下即可少量表达, iNOS 在细胞因子、生长因子和炎症刺激作用于靶细胞后呈诱导性高表达。

3.2 针刀干预对 iNOS 活性及 NO 含量的影响 本实验表明, 模型组损伤局部软组织炎症反应较重, 并且其程度与 iNOS 活性及 NO 含量相一致, 表明高浓度的 NO 可能参与了慢性软组织损伤的过程, 这与急性软组织损伤实验研究结果相似^[5]。高浓度 NO 是反应性自由基, 可参与对受损软组织的继发性损害^[6]; 可调节多种免疫和炎症细胞的活性, 加大炎症反应的损伤程度^[7], 在 NO 形成中起关键作用的 iNOS 是众多炎症病症的潜在致病酶^[8]。氨基胍在结构上与 NO 的合成底物 L-Arg 相似, 是 iNOS 选择性抑制剂^[9]。本实验表明高浓度的 NO 对慢性软组织的损害作用可以被氨基胍所抑制。针刀干预后 iNOS 活性、NO 含量均明显降低, 炎症反应、组织损伤程度明显减轻。针刀干预后可降低 NO 浓度, 抑制炎症^[10]、脂质过氧化反应, 减轻了对组织的损伤。

3.3 针刀干预对 eNOS 活性的影响 经组织形态观察发现, 7 d 时正处于细胞增殖分化及肉芽组织形成期, 肉芽组织中可见新生的毛细血管, 增生修复现象明显。提示此间 NO 的生成可能参与了组织自身修复过程的调控, 可松弛血管平滑肌、扩张血管、抑制血小板凝集^[11]、诱导毛细血管胚芽形成、改善微循环^[12], 适当浓度的 NO 能维持正常的血管舒缩功能和血液的良好流动状态^[13]。针刀干预可松懈损伤局部自我恢复过程中形成的肉芽组织和瘢痕, 从而解除其血管的卡压, 改善微循环, 从而促进软组织损伤的修复。

3.4 针刀干预对 nNOS 活性的影响 文献资料显示, 肌肉损伤后肌膜区 nNOS 释放 NO 能介导肌卫星细胞的活化, 促进肌管新生、肌肉修复^[14]。实验结果提示 nNOS 的阳性表达可能与慢性软组织损伤后的自我修复有关, 而这种修复作用不受针刀和氨基胍干预的影响。

总之, 研究结果表明: ① iNOS 诱导生成的高浓度的 NO, 是造成软组织损伤的重要因素。② 针刀干预可抑制高浓度 NO 的生成, 减轻炎症反应程度及氧化应激损伤; 可增强血管内皮细胞 eNOS 的活性, 改善微循环。③ nNOS 活性可能与慢性软组织损伤后的自我修复有关, 而不受针刀和氨基胍干预的影响。

参考文献

- [1] 朱汉章. 针刀医学. 北京: 中国中医药出版社, 2004. 519-521.
- [2] 王健瑞, 乔晋琳, 路平, 等. 第三腰椎横突综合征动物实验模型的建立及实验研究. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25(7): 394-398.
- [3] 王立军, 周树夏, 顾晓明, 等. 氨基胍干预对创伤性面瘫大鼠外周面神经及周围组织一氧化氮合酶表达的影响. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(1): 7-9.
- [4] 张俐, 周海兵, 刘烈刚. 活血化瘀汤影响骨折愈合早期一氧化氮合酶活性的作用机制探讨. 中国骨伤, 2008, 21(2): 93-96.
- [5] 郭锋, 沈霖, 夏远军, 等. 一盘珠颗粒对急性软组织损伤动物模型 NO 的影响. 中国中医骨伤科杂志, 2006, 14(5): 22-24.
- [6] 何黎升, 张明, 薄斌, 等. 兔颌面部撞击伤后血中自由基反应和一氧化氮含量变化. 实用口腔医学杂志, 2001, 17(3): 194-196.
- [7] Giustizieri ML, Albanesi C, Scarponi C, et al. Nitric oxide donors suppress chemokine production by keratinocytes in vitro and in vivo. Am J Pathol, 2002, 161: 1409-1418.
- [8] 张俐, Long-en Chen, Anthony V. Seaber, 等. 敲除诱导性一氧化氮合酶治疗骨骼肌缺血再灌注损伤的实验研究. 中国骨伤, 2002, 15(3): 148-151.
- [9] 张岩, 张新日. 糖皮质激素和氨基胍对机械通气致大鼠急性肺损伤肺组织 iNOS 和 NO 的干预作用. 山西医药杂志, 2008, 37(2): 101-103.
- [10] 刘灿坤, 乔晋琳, 向东东, 等. 针刀干预 L₅ 横突综合征兔对 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平的影响. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(1): 14-16.
- [11] 李毅, 同志超, 陈君长, 等. 激素性股骨头缺血坏死发病机制的实验研究. 中国骨伤, 2003, 16(1): 20-22.
- [12] Zhang R, Wang L, Zhang L, et al. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. Circ Res, 2003, 92(3): 308-313.
- [13] 沙启乐, 陈晓亮, 王英振, 等. 激素性股骨头坏死中内皮素和一氧化氮含量的变化. 中国骨伤, 2002, 15(6): 349-251.
- [14] Anderson JE. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. Mol Biol Cell, 2000, 11(5): 1859-1874.

(收稿日期: 2009-03-10 本文编辑: 连智华)

·读者·作者·编者·

本刊关于参考文献著录的要求

本刊参考文献按 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》采用顺序编码著录, 依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出, 并将序号置于方括号中, 排列于文后。参考文献中的作者, 1~3 名全部列出, 3 名以上只列前 3 名, 后加“等”。题名后标注文献类型标志对电子文献是必选著录项目, 文献类型和电子文献载体标志代码参照 GB 3469《文献类型与文献载体代码》。外文期刊名称用缩写, 以 Index Medicus 中的格式为准; 中文期刊用全名。每条参考文献均须著录起止页。每年连续编码的期刊可以不著录期号。①期刊: [序号]作者. 题名[J]. 刊名, 年, 卷(期): 起止页码。②专著: [序号]著者. 书名[M]. 出版地: 出版者, 出版年. 起止页码。③论著集中析出文献: [序号]作者. 题名[C]. // 编者. 文集名. 出版地: 出版者, 出版年. 起止页码。④学位论文: [序号]作者. 题名[D]. 授予学位地: 授予学位单位, 出版年。⑤电子文献: [序号]作者. 题名[EB/OL]. (发表或更新日期). [引用日期]. 网址。

《中国骨伤》杂志社