

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.17.013

电针干预远近端穴位对肌筋膜疼痛综合征模型大鼠致痛物质、巨噬细胞及相关炎症因子的影响

刘阅阅¹, 郑林遥¹, 陈佳彦¹, 黄于婷¹, 方燕平¹, 饶天予¹,
刘科志¹, 童秀冰¹, 阚宇¹, 景向红², 廖军[✉]

1. 福建中医药大学, 福建省福州市闽侯县上街镇邱阳东路1号, 350122; 2. 中国中医科学院针灸研究所

[摘要] **目的** 探讨电针干预远近端穴位治疗肌筋膜疼痛综合征(MPS)的外周镇痛机制。**方法** 将24只SD大鼠随机分为空白组、模型组、近端组、远端组, 每组6只。除空白组外, 其余各组采用“打击结合离心运动”方式制备MPS模型。造模后近端组大鼠在局部激痛点结节即阿是穴处进行电针干预, 频率2/100 Hz、电压2~4 V的疏密波, 电流强度以大鼠左下肢出现轻微颤动为宜, 每日1次, 每次15 min, 连续14天。远端组大鼠电针阳陵泉穴加阴陵泉穴, 余同近端组。空白组和模型组只做抓取和套头, 不做其他干预。干预后测定左右足机械缩足反射阈值(PWMT), 计算差值; 进行左下肢股内侧肌肌骨超声影像学、肌电监测检测; HE染色法观察左下肢股内侧肌肌肉形态学变化; 免疫组化法检测肌肉组织中P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)、CD68、CD206的阳性表达; ELISA法检测腹主动脉血清中白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素10(IL-10)、白细胞介素8(IL-8)的含量。**结果** 与空白组相比, 模型组大鼠左下肢股内侧肌肌纤维断裂、扭曲、纤维粗细不等, 肌筋膜断裂, 出现纤颤电位, 肌细胞增大、核内移, 肌间隙增宽, 左右足PWMT差值明显增大, 股内侧肌SP、CGRP、CD68、CD206水平明显升高($P<0.01$), 血清IL-8、TNF- α 水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 近端组与远端组肌纤维形态完整, 排列有序, 肌筋膜连续无断裂, 肌细胞形态规则, IL-8水平明显降低($P<0.01$); 近端组自发性放电幅度及频率降低, 左右足PWMT差值显著降低, 股内侧肌SP、CGRP、CD68水平明显降低, CD206水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 远端组出现复杂性放电, 股内侧肌CD68水平下降, CD206水平升高($P<0.01$)。与近端组相比, 远端组IL-8水平明显升高($P<0.05$)。**结论** 电针近端穴位能显著改善大鼠痛阈和局部肌组织形态, 其作用机制可能与降低致痛物质及相关炎症因子水平, 促进巨噬细胞极化有关; 电针远端穴位镇痛作用不明显, 机制尚不清楚。

[关键词] 肌筋膜疼痛综合征; 激痛点; 电针; 近端穴位; 远端穴位; P物质; 降钙素基因相关肽; 巨噬细胞; 炎症因子

肌筋膜疼痛综合征(myofascial pain syndrome, MPS)以激痛点(myofascial trigger points, MTrPs)为主要临床特征, 伴或不伴有放射性疼痛, 或触诊激痛点产生疼痛并伴有肌肉僵硬、相关关节活动受限、局部压痛、紧绷肌带等症状中的至少三个, 症状持续3个月及以上^[1]。MPS好发于中青年女性,

以背部发病最为常见^[2]。研究表明, 使用针刀^[3]、浮针^[4]、电针^[5]、艾灸^[6]、推拿^[7]等方式干预MPS局部MTrPs能够有效调节局部肌组织中P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)等致痛物质的表达, 调节血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)等相关炎症因子与蛋白的表达。在对肌性疼痛的干预中, 远端取穴具有一定疗效^[8], 且远端取穴镇痛效果优于近端取穴^[9]。另有研究表明, CGRP能够启动和维持外周致敏和相关的痛觉过敏^[10], 促进巨噬细胞极化产生抗炎作用,

基金项目: 国家自然科学基金(82074181, 82204908); 福建省自然科学基金项目(2022J01874); 福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JAT190232); 福建中医药大学高层次人才项目(X20190010-人才); 福建中医药大学针灸学科开放课题(XZJ2022004)

✉ 通讯作者: 2007065@fjtcu.edu.cn

同时与 SP 之间存在协同作用^[11], CGRP 在疼痛患者皮肤中表达水平较高^[12]。因此, 本实验比较远端取穴与近端取穴对 MPS 模型大鼠局部肌组织致痛物质 SP、CGRP、巨噬细胞极化以及相关炎症因子表达的影响, 为针灸临床治疗 MPS, 尤其在抗炎镇痛方面提供取穴依据。本研究通过福建中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号: 2021076)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 24 只, 7 周龄, 体质量(200±20)g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物使用许可证号为: SYXK(闽)2019-0007。动物饲养于福建中医药大学 SPF 级动物实验室, 昼夜 12 h/12 h, 温度(20±2)℃, 湿度 40%~60%。实验过程严格遵守福建中医药大学《关于善待实验动物的指导性意见》等相关规定进行。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗 SP 抗体(货号: bs-0065R)、兔抗 CGRP 抗体(货号: bs-0791R), 北京博奥森生物技术有限公司; CD68 小鼠单克隆抗体(货号: SC-20060)、CD206 小鼠单克隆抗体(货号: SC-58986), 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 通透剂(货号: P1080)、HE 染色试剂盒(货号: G1120), 北京索莱宝科技有限公司; 小鼠/兔 IgG 免疫组化试剂盒(货号: SA1020)、DAB 显色试剂盒(货号: AR1027)、TNF-α ELISA 试剂盒(货号: EK0526)、白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒(货号: EK0412)、白细胞介素 10 (IL-10) ELISA 试剂盒(货号: EK0418)、IL-1β ELISA 试剂盒(货号: EK0393), 武汉博士德生物工程有限公司; 白细胞介素 8 (IL-8) ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司, 货号: MM-0175R1); 异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司, 批号: 20221102); 乌来糖(上海山浦化工有限公司, 批号: LYHG2145487); 4% 多聚甲醛(福州沃森生物技术有限公司, 货号: BL539A)。

动物实验跑台(上海继德教学实验器械厂, 型号: JD-PT); 华佗牌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司, 批号: 190442); 小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 型号: R540IE); 韩式电针仪(南京济生医疗科技有限公司, 型号: HANS-200A); Vonfrey 针刺触觉测量套件(Danmic Aesthesio 公司, 型号: 514000-20C); 多通道信息生理

信号采集处理系统(成都仪器厂, 型号: RM6240 CD); 光学显微镜[日本尼康仪器(上海)有限公司, 型号: Eclipse Ci-L]; 离心机(赛默飞世尔科技有限公司, 型号: Sorvall ST16R); 便携式彩色超声诊断仪(美国索诺声公司, 型号: M-Turbo)。

1.3 模型制备方法

参照姚明华等^[13]提出的“打击结合离心运动”方法建立 MPS 模型, 模型组大鼠每周第 1 天进行打击处理, 打击前在大鼠左下肢股内侧肌上段处标记, 使用小动物麻醉机将大鼠在 4% 异氟烷诱导下麻醉(氧气流量计 0.3~0.5 L/min, 4% 异氟烷浓度 3.5 L/min)。大鼠处于麻醉状态后, 将大鼠仰卧固定于自制的打击器下方, 使重量为 1200 g 的打击器从 20 cm 的高度自由落下, 打击标记部位, 接触面积大约为 1 cm×1 cm, 动能为 2.352 J, 打击后检查皮肤骨骼完好无损后正常喂养。于第 2 天在倾斜角度为-16°的电动跑台上进行持续性下坡跑训练, 速度由 0 m/min 逐渐增至 16 m/min, 每次时间 90 min。其余 5 天均正常饲养。以上干预方式每周进行 1 次, 持续进行 8 周, 为造模期。此后 4 周正常饲养, 不做任何干预, 为恢复期。共计 12 周完成 MPS 大鼠造模, 大鼠出现紧张带结节、局部抽搐反应、自发电位即为造模成功^[13]。

1.4 分组、造模及干预方法

24 只 SD 大鼠按照体重编号, 使用 Excel 2003 软件产生随机数字, 将大鼠随机分为空白组、模型组、近端组、远端组, 每组 6 只。除空白组外, 其余各组大鼠进行 MPS 模型制备, 所有大鼠均造模成功。造模结束后次日, 近端组大鼠在打击部位及附近肌肉寻找激痛点结节即阿是穴, 采用 0.30 mm×25 mm 毫针斜刺并贯穿激痛点结节, 提插、捻转引发局部抽搐反应后, 连接韩式电针仪, 施以频率 2/100 Hz、电压 2~4 V 的疏密波, 电流强度以大鼠左下肢出现轻微颤动为宜。远端组根据《实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分: 大鼠》^[14]选取左侧“阳陵泉”(小腿外侧, 在腓骨头前下方凹陷处, 距足三里上外侧约 3 mm), 结合人体经穴定位以及郑利岩等^[15]实验结果, 选取大鼠左侧“阴陵泉”穴(后肢内侧, 胫骨内侧髁后下方凹陷处)进行针刺, 将“阴陵泉”穴与“阳陵泉”穴同时连接电针, 电针方法同近端组。两组均每日干预 1 次, 每次 15 min, 7 天为 1 个疗程, 连续治疗 2 个疗程。空白组和模型组大鼠同时时间只做抓取和套头, 不做其他干预。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 机械缩足反射阈值 (PWMT) 测定 干预结束后次日, 非麻醉状态下采用 VonFrey 针刺触觉测量套件对各组大鼠进行机械缩足反射阈值测定, 左下肢股内侧肌为击打侧, 右下肢股内侧肌为非击打侧, 纤维丝位于足心处, 用力均匀、垂直向上移动纤维丝, 同一只大鼠左右足测量方式一致, 每只大鼠左右足分别测量 3 次, 取平均值, 结果以左右足 PWMT 差值表示。

1.5.2 肌骨超声检测 干预结束后次日, PWMT 检测后, 使用便携式彩色超声诊断仪检测各组大鼠打击局部股内侧肌肌组织以及肌筋膜形态, 调整探头深度, 以能清晰看出肌筋膜高亮影像为准。

1.5.3 肌肉电生理 干预结束后次日, 肌肉电生理检测后, 肉眼观察激痛点结节处的局部肌肉抽搐反应; 大鼠在 4% 异氟烷 3.5 L/min 诱导下气体吸入性麻醉, 将 2 根细针电极插入激痛点结节 (参考电极插入右侧股内侧肌)^[16], 两针旁开 1~2 cm, 使用多道信息生理信号采集处理系统记录在短暂高密度地插入电位后静息状态下的肌电信号 2 min, 观察激痛点结节处电位的波幅以及频率。

上述各指标观察完成后对大鼠进行取材, 采用 20% 乌来糖 (0.6 ml/kg) 进行腹腔注射麻醉, 抽取 5 ml 腹主动脉血, 找到打击局部股内侧肌, 用剪刀沿水平方向剪取长约 1 cm 的肌组织, 置于 4% 多聚甲醛溶液中。

1.5.4 HE 染色观察局部肌组织形态 将各组大鼠肌组织修切成 0.5 cm×0.5 cm, 厚度不做修切, 常规脱水、透明、包埋、切片 (厚度 5 μm), 脱蜡后进行 HE 染色, 光学显微镜下观察局部肌组织形态学变化。

1.5.5 免疫组化法检测局部肌组织 SP、CGRP、CD68、CD206 将各组大鼠局部股内侧肌组织 (1 cm×1 cm) 常规脱水、透明、包埋、切片 (5 μm)、脱蜡, 柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复, PBS 缓冲液 3 次, 每次 5 min, 滴加破膜剂 (15 min), PBS 缓冲液 3 次, 每次 5 min, 滴加小鼠/兔 IgG 免疫组化试剂盒中 3% H₂O₂ (10 min), PBS 缓冲液 3 次, 每次 5 min, 滴加 5% BSA 封闭液, 37 °C 烘箱反应 20 min, 滴加一抗 SP、CGRP、CD68、CD206 (1:100), 4 °C 冰箱孵育 18 h, 滴加小鼠/兔 IgG 免疫组化试剂盒中羊抗小鼠 IgG-Biotin (不稀释) 孵育 1 h, PBS 缓冲液 3 次, 每次 5 min, 滴加 SABC, 室温孵育 1 h, PBS 缓冲液 3 次, 每次 5 min, DAB 染色, 苏木素复

染, 封片。光学显微镜下观察, 每一标本随机选取 3 个视野, 采用 ImagePro-Plus 6.0 图像分析软件计算各组大鼠 SP、CGRP、CD68、CD206 标本的平均光密度值, 每个标本的平均光密度值为 3 个视野的平均值。

1.5.6 ELISA 法检测大鼠血清 IL-6、IL-8、IL-10、IL-1β、TNF-α 含量 取大鼠腹主动脉血, 4 °C、3000 r/min 离心 (半径 15 cm) 15 min, 收集血清。按照 ELISA 试剂盒步骤进行操作。将 96 孔板放入酶标仪中, 检测 OD 值, 并计算获得所测物质的浓度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件分析数据。计量资料符合正态分布者以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐者多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 法; 方差不齐者多组比较采用 Welch's ANOVA 方法, 两两比较采用 Games-Howell's 法。不符合正态分布者以中位数和四分位数 [*M* (*Q*₁, *Q*₃)] 表示, 多组比较采用秩和检验, 采用 *k* 个样本独立秩和检验进行组间比较。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 8 对实验结果进行绘图。

2 结果

2.1 各组大鼠左右足 PWMT 差值比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组左右足 PWMT 差值明显增大 (*P*<0.05); 与模型组比较, 近端组大鼠左右足 PWMT 差值显著降低 (*P*<0.05), 远端组差异无统计学意义 (*P*>0.05); 与近端组比较, 远端组大鼠左右足 PWMT 差值显著增大 (*P*<0.05)。

表 1 各组大鼠左右足 PWMT 差值比较

Table 1 The variability of PWMT between the left and right hind paws (g, $\bar{x}\pm s$)

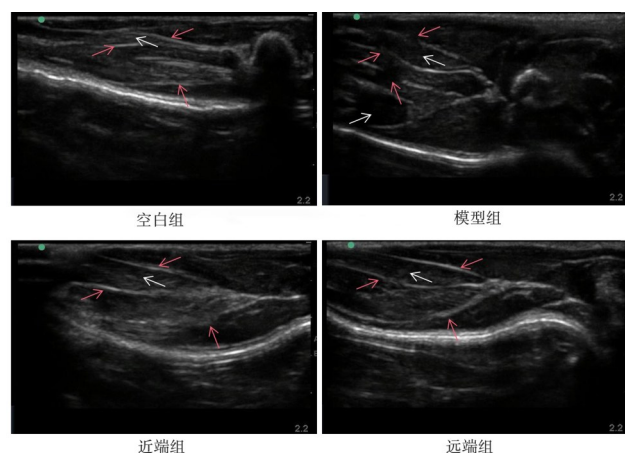
组别	鼠数	左右足 PWMT 差值
空白组	6	0.15±0.12
模型组	6	0.40±0.05 ^{a)}
近端组	6	0.11±0.12 ^{b)}
远端组	6	0.47±0.15 ^{c)}

注: PWMT, 机械缩足反射阈值。
a) 与空白组比较, *P*<0.05; b) 与模型组比较, *P*<0.05;
c) 与近端组比较, *P*<0.05。

2.2 各组大鼠肌骨超声检测结果比较

图 1 示, 空白组大鼠股内侧肌形态完整, 肌肉边缘包裹的筋膜呈现高亮信号, 筋膜完整并且连续, 肌纤维呈低信号区、无断裂, 排列整齐; 模型

组大鼠有 2 只肌肉形态紊乱、肌筋膜断裂, 其余 4 只肌肉形态未见紊乱、肌筋膜连续; 近端组、远端组所有大鼠肌纤维无断裂, 排列较整齐, 筋膜相对完整并且连续。比较近端组、远端组肌骨超声图像, 仅从肉眼观察未看出明显差异。



注: 白色箭头所指为肌纤维, 红色箭头所指为肌筋膜。

图 1 各组大鼠肌骨超声影像

Figure 1 Musculoskeletal ultrasound images of rats in each group

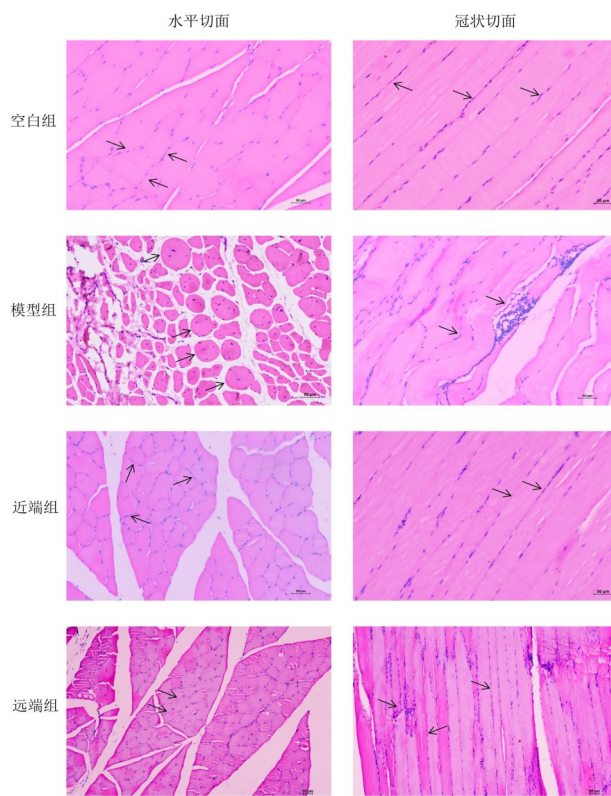
2.3 各组大鼠肌肉电生理监测结果比较

图 2 示, 空白组大鼠股内侧肌出现频率很低且不规则、波幅很小的类似微终板电位的去极化电位, 无纤颤电位。模型组 6 只大鼠均见密集、波幅较大的纤颤电位。近端组未见纤颤电位, 背景电位波幅较低, 间断性出现频率较高且波幅略高的电位; 远端组表现为复杂性放电活动, 低频低幅的背景电位伴随 2 个锋电位。

2.4 各组大鼠股内侧肌形态学比较

图 3 示, 股内侧肌水平切面: 空白组肌细胞形态呈规则多边形, 大小相对均匀, 肌纤维排列紧密, 细胞核均位于肌膜下, 排列有序, 无明显炎性细胞浸润。模型组肌细胞形态不规则, 排列松散无规律, 肌间隙不规则增宽, 结构混乱, 细胞明显增大、变圆, 核内移且大小不均匀。近端组、远端组肌细胞形态恢复规则多边形, 大小相对均匀, 肌间隙相对紧密, 结构较清晰, 细胞核位于肌膜下, 无

明显核内移, 核的大小相对均匀, 近端组细胞核在肌膜下的排列较远端组整齐。



注: 箭头所指为肌细胞。

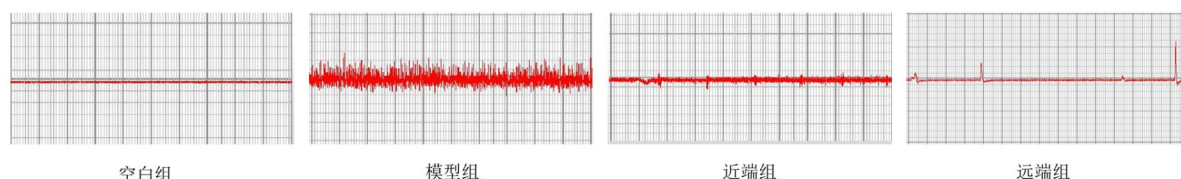
图 3 各组大鼠股内侧肌形态学结果 (HE 染色, $\times 200$)

Figure 3 Morphological results of the vastus medialis muscle of rats in each group

股内侧肌冠状切面: 空白组肌纤维排列整齐、连续, 纤维粗细相对均匀, 细胞核呈线状, 均匀排列在肌纤维之间, 未见炎性细胞浸润。模型组肌纤维排列紊乱、扭曲、断裂, 纤维粗细不等。近端组肌纤维排列相对整齐, 无明显肌纤维断裂, 纤维粗细相对均匀, 无炎性细胞的浸润。远端组肌纤维排列相对整齐, 少量肌纤维断裂, 纤维粗细相对均匀, 无炎性细胞的浸润, 部分细胞核排列紊乱。

2.5 各组大鼠股内侧肌 SP、CGRP、CD68、CD206 表达比较

表 2 示, 与空白组相比, 模型组股内侧肌 SP、



注: 扫描速度: 200 ms/D, 灵敏度: 200 μ V。

图 2 各组大鼠肌电图检测结果

Figure 2 Electromyography of rats in each group

表2 各组大鼠局部肌组织SP、CGRP、CD68、CD206表达比较

Table 3 Comparison of expressions of SP and CGRP in local muscle tissue of rats in each group

组别	鼠数	SP/pg·ml ⁻¹ [M (Q ₁ , Q ₃)]	CGRP/pg·ml ⁻¹ [M (Q ₁ , Q ₃)]	CD68/平均光密度值 ($\bar{x}\pm s$)	CD206/平均光密度值 ($\bar{x}\pm s$)
空白组	6	0.002 (0.010, 0.004)	0.004 (0.002, 0.006)	0.131±0.009	0.076±0.003
模型组	6	0.145 (0.107, 0.176) ^{a)}	0.091 (0.086, 0.097) ^{a)}	0.282±0.042 ^{a)}	0.126±0.021 ^{a)}
近端组	6	0.008 (0.005, 0.01) ^{b)}	0.004 (0.004, 0.013) ^{c)}	0.141±0.021 ^{c)}	0.241±0.026 ^{c)}
远端组	6	0.041 (0.030, 0.453)	0.079 (0.058, 0.091)	0.217±0.034 ^{c)}	0.177±0.008 ^{c)}

注：SP，P物质；CGRP，降钙素基因相关肽。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

CGRP、CD68、CD206水平明显升高 ($P<0.01$)；与模型组相比，近端组股内侧肌SP水平降低 ($P<0.05$)、CGRP、CD68水平明显降低 ($P<0.01$)，CD206水平明显升高 ($P<0.01$)，远端组股内侧肌CD68水平下降，CD206水平升高 ($P<0.01$)；与近端组相比，远端组股内侧肌SP、CGRP、CD68、CD206差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.6 各组大鼠血清IL-6、IL-8、IL-1β、IL-10、TNF-α浓度比较

表3示，与空白组相比，模型组大鼠血清IL-8、TNF-α水平明显升高 ($P<0.01$)；与模型组相比，近端组、远端组IL-8水平明显降低 ($P<0.01$)；与近端组比较，远端组IL-8水平明显升高 ($P<0.05$)；各组间其余指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

肌筋膜疼痛综合征的症状以疼痛为主，包含局部疼痛、放射痛，并且因疼痛造成关节等活动障碍。《素问·长刺节论篇》载：“病在筋，筋挛节痛，不可以行，名曰筋痹”，指出疼痛、关节不可屈伸的症状属于筋痹，因而肌筋膜疼痛综合征也属于筋痹范畴。现代医学中，“筋”之定义广泛，包含肌肉、筋膜、肌腱、韧带、结缔组织、血管等，筋挛缩在一起即产生筋结^[17]，欧美国家医生最初将MPS产生疼痛的原因归结为激痛点^[18-19]，Simons等^[18]证实激痛点局部存在挛缩的肌节和肌纤维的

收缩，在运动终板处形成收缩的结节，这与筋结非常相似。关于筋痹的针刺治疗，《素问·长刺节论篇》记载：“刺筋上为故，刺分肉间，不可中骨也”，指出筋痹的治疗应当在筋守筋，不可过深，刺到骨分。《类经·刺厥痹》中详细记述了“分肉之间”所处位置，曰“刺分肉间，刺其痛处筋肉分理之间也，刺筋者不可中骨”，强调针刺深度为筋肉分理之间的同时，也强调针刺部位为局部痛处，即近端取阿是穴。本研究中，近端取穴取局部激痛点结节处，因激痛点具有肿胀隆起结节、自发性放电、局部抽搐反应、肌节挛缩等客观反应，相较于阿是穴的主观疼痛感更容易判断，因此近端取穴采用激痛点结节局部。阳陵泉穴为足少阳胆经下合穴，八脉交会穴之筋会，有疏肝利胆、舒筋活络的作用，是治疗筋病的要穴。阴陵泉为足太阴脾经合穴，《普济方·针灸》载其能治疗“湿痹不能行”，MPS属于痹证范畴，因而选用阴陵泉。

机体在受到炎症刺激时，神经系统通过轴突反射释放CGRP，抑制免疫细胞（如巨噬细胞），发挥杀伤病原体 and 促炎作用，随着炎症因子不断增加，免疫系统启动负反馈调节机制，CGRP促进巨噬细胞极化而产生抗炎作用^[11]。CGRP只参与炎症反应中的痛觉过敏过程，对巨噬细胞的效应主要表现为抑制M1型（标志物为CD68）、促进M2型巨噬细胞（标志物为CD206）的极化，参与修复组织及抑制炎症^[10,20]。巨噬细胞是天然免疫的重要组成部分

表3 各组大鼠血清IL-6、IL-1β、IL-10、IL-8、TNF-α浓度比较

Table 4 Comparison of serum IL-6, IL-1β, IL-10, IL-8, and TNF-α concentrations in each group of rats (pg/ml)

组别	鼠数	IL-6 ($\bar{x}\pm s$)	IL-8 ($\bar{x}\pm s$)	IL-1β ($\bar{x}\pm s$)	IL-10 ($\bar{x}\pm s$)	TNF-α [M(Q ₁ , Q ₃)]
空白组	6	43.89±23.33	477.31±13.27	68.33±67.32	22.98±11.43	10.16 (8.82, 11.52)
模型组	6	55.02±55.64	665.96±5.45 ^{a)}	33.38±9.61	21.60±14.84	20.63 (19.04, 22.91) ^{a)}
近端组	6	32.42±19.17	539.84±16.17 ^{b)}	27.52±8.68	14.63±7.79	16.15 (15.49, 18.46)
远端组	6	41.69±18.86	573.86±17.14 ^{b)c)}	28.52±5.81	28.30±6.88	17.13 (15.47, 21.83)

注：IL-6，白细胞介素6；IL-1β，白细胞介素1β；IL-10，白细胞介素10；IL-8，白细胞介素8；TNF-α，肿瘤坏死因子α。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与近端组比较， $P<0.05$ 。

分,在免疫系统的调节下由M1表型(促炎型)转变为M2表型(抗炎型)的动态变化过程称为极化。当感染或炎症严重时,巨噬细胞首先表现为M1表型,针对刺激释放TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎介质,CD68等为其标志物^[21-23]。但如果M1期持续,可能会造成组织损伤,此时,M2型巨噬细胞分泌IL-10等抑炎因子抑制炎症反应,促进组织修复、重塑、血管生成和维持体内平衡,CD206为典型的M2型巨噬细胞相关标记物^[24-25]。SP有较强的致炎效应,能够刺激多种免疫细胞释放大量的炎症因子,与疼痛信息的传递密切相关^[26]。Schaible等^[27]观察到CGRP与SP之间存在协同作用,CGRP能够通过抑制SP内切酶而提高SP的含量。在MPS局部,骨骼肌持续收缩造成ATP能量消耗,局部处于缺血缺氧状态,IL-8浓度会异常升高,增加促炎致痛物质的水平^[6],IL-8在TNF- α 的作用下分泌,具有增强中性粒细胞抗感染能力,促进炎症过程的作用^[28]。

本研究结果显示,造模后大鼠在局部触摸到隆起的结节,针刺后均产生局部肌肉抽搐反应,肌电检测中均有自发性放电,造模成功。PWMT差值结果显示,与空白组相比,模型组痛阈差值增大,表明击打侧大鼠足底痛阈值降低,易产生疼痛感;与模型组相比,近端组能够降低PWMT差值,提高击打侧足底痛阈值,减轻疼痛,远端组大鼠PWMT差值无明显变化,足底痛阈值改善不明显;与近端组相比,远端组PWMT差值增大,说明远端组降低足底痛阈值作用弱于近端组。肌电检测结果显示,模型组产生的密集放电为纤颤电位,该电位为自发性放电,其波形先向下后向上,最后回归基线,提示局部有肌纤维炎症等肌源性或者神经源性的损害,近端组未见纤颤电位,背景电位波幅降低,提示炎症减轻,远端组出现的复杂放电目前尚不清楚原因,可能与肌源性和神经源性损害^[29]有关。肌骨超声显示,模型组肌筋膜断裂,肌组织受损,远端组、近端组肌筋膜具有连续性,肌组织一定程度上修复,但未能清晰表示远近端取穴对肌组织修复程度的差异性。HE染色结果显示,模型组肌组织排列紊乱、肌细胞变形、有炎症浸润;近端组、远端组肌组织排列有序、肌细胞形态规则、炎症浸润减少,组织形态修复,炎症减轻,但两组镜下形态对比、炎症减轻程度无明显差异。免疫组化与ELISA结果显示,模型组致痛物质SP、CGRP、

IL-8升高,说明疼痛敏感度增加且产生炎症,CD68、CD206水平升高,巨噬细胞由促炎型转化为抗炎性,减少炎症,说明在未干预的状态下,机体自身已进行修复。对比远近端取穴,二者均能够降低M1型巨噬细胞标志物CD68、升高M2型巨噬细胞标志物CD206的水平,促进巨噬细胞极化。近端组能够显著降低致痛物质SP、CGRP及炎症因子IL-8水平,抗炎镇痛作用优于远端组,其作用机制可能是通过降低肌组织局部炎症因子IL-8的释放,从而使致痛物质SP和CGRP水平上升,促进巨噬细胞的极化,发挥抗炎镇痛、改善肌组织形态作用。

综上所述,近端取穴能显著改善MPS模型大鼠痛阈和局部肌组织形态,其作用机制可能与降低致痛物质及相关炎症因子水平,促进巨噬细胞极化有关。远端组PWMT差值及致痛物质SP、CGRP改善不明显,因而镇痛作用不明显,但在改善其组织形态上有一定作用,能降低CD68、提高CD206水平,促进巨噬细胞极化,但其作用机制尚不清楚。但本实验只从行为学、形态学与致痛物质、相关炎症因子角度探讨了部分机制,今后将结合蛋白组学进一步阐述远近取穴的外周镇痛机制,以提供更强有力的证据。

参考文献

- [1] RIVERS WE, GARRIGUES D, GRACIOSA J, et al. Signs and symptoms of myofascial pain: an international survey of pain management providers and proposed preliminary set of diagnostic criteria [J]. *Pain Med*, 2015, 16 (9): 1794-1805.
- [2] 高巍巍, 邹德生, 王伍超, 等. 红外热像图定位冲击波疗法治疗肌筋膜疼痛综合征的临床分析[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2016, 22(4): 312-314.
- [3] 张义, 张莉, 郭长青, 等. 针刀干预对大鼠触发点肌组织P物质和缓激肽的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35 (1): 97-100.
- [4] 冯昊. 浮针干预对肌筋膜疼痛综合征大鼠的组织形态学及致痛因子表达影响的研究[D]. 西安: 西安体育学院, 2020.
- [5] 王列. 针刺“激痛点”对肌筋膜疼痛综合征大鼠疼痛敏化调控的机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.
- [6] 马俊杰. 针刺、艾灸对肌筋膜疼痛综合征大鼠IL-8、PGE2及脊髓OX-42、BDNF表达影响的对比研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2022.
- [7] 袁媛, 蒋全睿, 吴琼, 等. 按法刺激肌筋膜激痛点模型大

- 鼠局部对 TRPV1 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(8): 1217-1222.
- [8] 曾佳. 针刺不同远部腧穴治疗肱骨外上髁炎的临床疗效对比观察[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2022.
- [9] 舒丽华, 蔡伟. 阳陵泉透刺阴陵泉治疗脑卒中后下肢痉挛状态的临床观察[J]. 中医临床研究, 2012, 4(2): 54-55.
- [10] IYENGAR S, OSSIPOV MH, JOHNSON KW. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine [J]. Pain, 2017, 158(4): 543.
- [11] PINHO-RIBEIRO FA, BADDAL B, HAARSMA R, et al. Blocking neuronal signaling to immune cells treats streptococcal invasive infection [J]. Cell, 2018, 173(5): 1083-1097.
- [12] GYLFADOTTIR SS, ITANI M, KRISTENSEN AG, et al. Analysis of macrophages and peptidergic fibers in the skin of patients with painful diabetic polyneuropathy [J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2021, 9(1): e1111. doi: 10.1212/NXI.0000000000001111.
- [13] 姚明华, 黄强民. 肌筋膜触发点疼痛的实验动物模型研究[J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28(4): 415-418.
- [14] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第2部分: 大鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 351-352.
- [15] 郑利岩, 张小卿, 王熙, 等. 实验大鼠常用经穴检测与定位[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(10): 2058-2060.
- [16] 赵贞妍, 叶刚, 黄强民, 等. 损伤性大鼠肌筋膜疼痛触发点的肌电活动和组织形态学特征[J]. 中国康复医学杂志, 2012, 27(7): 594-599.
- [17] 邵慧婷, 岳公雷, 周岩, 等. 《内经》论“筋”[J]. 中医文献杂志, 2021, 39(1): 25-28.
- [18] SIMONS DG. Fibrositis/fibromyalgia: a form of myofascial trigger points? [J] Am J Med, 1986, 81(3A): 93-98.
- [19] MURPHY GJ. Myofascial trigger points [J]. J Clin Orthop, 1989, 23(9): 627-631.
- [20] GOLDBERG SW, SILBERSTEIN SD. Targeting CGRP: a new era for migraine treatment [J]. CNS Drugs, 2015, 29(6): 443-452.
- [21] CUDA CM, POPE RM, PERLMAN H. The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(9): 543-558.
- [22] FUKUI S, IWAMOTO N, TAKATANI A, et al. M1 and M2 monocytes in rheumatoid arthritis: a contribution of imbalance of M1/M2 monocytes to osteoclastogenesis [J]. Front Immunol, 2018, 8: 1958. doi: 10.3389/fimmu.2017.01958.
- [23] KONG X, GAO J. Macrophage polarization: a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(5): 941-954.
- [24] 韦佳妮, 应燕萍, 赵慧函. 血红素加氧酶-1 促进巨噬细胞极化的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(19): 2404-2408.
- [25] ZHANG YH, HE M, WANG Y, et al. Modulators of the balance between M1 and M2 macrophages during pregnancy [J]. Front Immunol, 2017, 8: 120. doi: 10.3389/fimmu.2017.00120.
- [26] 陈晨, 张义, 郭长青, 等. 针刀干预对大鼠股内侧肌触发点肌组织内 P 物质和降钙素基因相关肽表达的影响[J]. 针灸临床杂志, 2018, 34(1): 55-58, 81.
- [27] SCHAIBLE HG, HOPE PJ, LANG CW. Calcitonin gene-related peptide causes intraspinal spreading of substance P released by peripheral stimulation [J]. Eur J Neurosci, 1992, 4(8): 750-757.
- [28] 徐文轩, 张天鹏, 任新荣, 等. 混合痔术后患者血清 CXCR4、IL-8、IL-22 水平与创面愈合及疼痛程度的相关性[J]. 临床误诊误治, 2022, 35(11): 69-72.
- [29] 李丽辉, 薄成志, 黄强民, 等. PGF2 α 对大鼠肌筋膜疼痛触发点自发肌电活动的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(12): 1399-1404.

Effect of Electroacupuncture at Proximal and Distal Acupoints on Pain-inducing Substances, Macrophages and Related Inflammatory Factors in Myofascial Pain Syndrome Model Rats

LIU Yueyue¹, ZHENG Linyao¹, CHEN Jiayan¹, HUANG Yuting¹, FANG Yanping¹, RAO Tianyu¹, LIU Kezhi¹, TONG Xiubing¹, KAN Yu¹, JING Xianghong², LIAO Jun¹

1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian, 350122; 2. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT Objective To explore the possible peripheral analgesic mechanism of electroacupuncture (EA) at proximal and distal acupoints in treatment of myofascial pain syndrome (MPS). **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into blank group, model group, proximal group, and distal group, with six rats in each group. MPS model was prepared by “strike combined with centrifugal exercise” in all groups except for the blank group. After modeling, the rats in the proximal group received EA at the local myofascial trigger points (MTrPs), namely the

Ashi points, with dilatational waves of frequency of 2/100 HZ and voltage of 2–4 V, current intensity depending on a slight trembling of the left lower limbs, once a day, 15min each time, for 14 days. The rats in the distal group received EA at “Yanglingquan” (GB 34) and “Yinlingquan” (SP 9), with the same operations as the proximal group. The rats in the blank group and the model group were only grasped and hedged, without other interventions. After intervention, the paw withdrawal mechanical threshold (PWMT) was measured, and variability between the left and right hind paws was calculated. Musculoskeletal ultrasound imaging and electromyography monitoring were performed on the left lower extremity vastus medialis. The morphological changes of vastus medialis muscle of the left lower extremity were observed by HE staining. The positive expression of substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), CD68 and CD206 in muscle tissue was detected by immunohistochemistry. Abdominal aortic serum interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), and interleukin-8 (interleukin-8) were detected by ELISA. **Results** Compared to those in the blank group, the fibers of the vastus medial muscle of the rats in the model group were broken and distorted with thickness in variation, and the myofascia was broken, with fibrillation potential, enlarged muscle cells, inward moved nucleus, and widened muscle space; the variability of PWMT between the left and right hind paws significantly increased, as well as the levels of SP, CGRP, CD68, and CD206 in the vastus medialis muscle ($P<0.01$), and the serum IL-8 and TNF- α levels were significantly elevated ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to those in the model group, the muscle fibers in the proximal and distal group were complete in shape and arranged in an orderly manner, with continued non-broken myofascia, regular shape of muscle cells, and significantly reduced level of IL-8 ($P<0.01$); the amplitude and frequency of spontaneous discharge in the proximal group significantly decreased, as well as the variability of PWMT between the left and right hind paws, and the levels of SP, CGRP, and CD68 in the vastus medialis muscle, while the CD206 level increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); there was complex discharges in the distal group, with significantly decreased level of CD68 in the vastus medialis muscle and increased level of CD206 ($P<0.01$). Compared to the proximal group, the level of IL-8 in the distal group was significantly higher ($P<0.05$). **Conclusions** EA at proximal acupoints can significantly improve the pain threshold and local muscle tissue morphology in rats, and its mechanism may be related to reducing the levels of pain-causing substances and related inflammatory factors and promoting the polarization of macrophages. The analgesic effect of EA at distal acupoints is not obvious, and the mechanism is still unclear.

Keywords myofascial pain syndrome; myofascial trigger points; electroacupuncture; proximal acupoints; distal acupoints; substance P; calcitonin gene-related peptide; macrophages; inflammatory factors

(收稿日期: 2023-02-12; 修回日期: 2023-06-02)

[编辑: 王利芬]