

☆ 机制探讨 ☆

穴区外泌体在电针促进多裂肌损伤大鼠
肌肉再生修复中的作用

吕宗泽¹, 谢森¹, 陈颖¹, 徐小琳¹, 黄志宾¹, 王迪霖², 李文敏², 温春娣², 刘通^{1,3}
(¹广州中医药大学第五临床医学院, 广州 510095; ²广东省第二中医院针灸康复科, 广州 510095; ³广东省中医药研究开发重点实验室, 广州 510095)

【摘要】 目的:观察电针对多裂肌损伤模型大鼠肌肉再生修复的影响,探讨穴区外泌体在针刺调节中的作用。方法:将40只SD大鼠随机分为正常组、模型组、电针组、抑制剂组,每组10只。模型组、电针组和抑制剂组采用0.5%布比卡因肌肉注射制备多裂肌损伤模型。电针组和抑制剂组分别予以电针“委中”和“肾俞”治疗,疏密波,频率2 Hz/10 Hz,1 mA,每次20 min,1次/d,连续干预7 d。抑制剂组在每次电针前1 h予双侧“委中”和“肾俞”穴位注射外泌体抑制剂GW4869(3 mg/mL, 50 μL/穴)。造模后第7天取多裂肌,HE染色观察多裂肌组织形态变化,Masson染色观察多裂肌胶原纤维,免疫组织化学法观察配对盒转录因子7(Pax7)、成肌分化抗原(MyoD)的阳性表达,提取各组大鼠血清外泌体并采用透射电子显微镜(TEM)、纳米颗粒追踪分析技术(NTA)进行鉴定,Western blot法检测各组大鼠多裂肌组织中肌细胞生成素(MyoG)、肌球蛋白重链(MyHC)及血清外泌体中CD63、程序性细胞死亡因子6相互作用蛋白(Alix)、肿瘤易感基因101蛋白(TSG101)的表达。结果:模型组大部分肌纤维变性坏死,肌纤维周围可见大量炎性细胞浸润,可见大片蓝染胶原纤维;电针组肌纤维形态较完整,新生肌纤维较多,损伤区炎性细胞减少,胶原纤维明显减少;抑制剂组肌纤维破坏及炎性细胞浸润仍较多,可见直径不均的新生肌纤维,胶原纤维较多。TEM、NTA及Western blot的结果均显示外泌体提取成功,电镜下其形态为典型茶托样,粒径范围集中分布在70~200 nm,标志蛋白CD63、Alix、TSG101均为阳性。与正常组比较,模型组多裂肌中Pax7的表达,血清外泌体Alix、CD63表达升高($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.001$)。与模型组比较,电针组多裂肌中Pax7、MyoD、MyoG、MyHC表达,血清外泌体Alix、TSG101表达显著升高($P<0.01$, $P<0.05$)。与电针组比较,抑制剂组多裂肌中Pax7、MyoD、MyoG、MyHC表达,血清外泌体TSG101、CD63表达显著降低($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.001$)。结论:电针能显著上调损伤多裂肌Pax7、MyoD、MyoG和MyHC的表达,促进腰多裂肌再生修复,该作用可能与穴区外泌体释放有关。

【关键词】 电针;多裂肌损伤;穴位;血清外泌体;肌肉修复与再生

Exosomes in acupoint area involved in the effect of electroacupuncture on muscle regeneration and repair in rats with multifidus muscle injury

LÜ Zong-ze¹, XIE Miao¹, CHEN Ying¹, XU Xiao-lin¹, HUANG Zhi-bin¹, WANG Di-lin², LI Wen-min², WEN Chun-di², LIU Tong^{1,3} (¹The Fifth Clinical School of Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China; ²Department of Acupuncture and Rehabilitation, Guangdong Provincial Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095; ³Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) on the expressions of paired box transcription factor 7 (Pax7), myogenic differentiation antigen (MyoD), myogenin (MyoG) and myosin heavy chain

[DOI] 10.13702/j.1000-0607.20241250

引用格式:吕宗泽,谢森,陈颖,等.穴区外泌体在电针促进多裂肌损伤大鼠肌肉再生修复中的作用[J].针刺研究,2026,51(1):1-10.

项目来源:国家自然科学基金面上项目(No.82174482);广东省特支计划青年拔尖人才项目(No.0720240248);广州地区中医药重大科技项目(No.2025CX001);广东省第二中医院青年培优项目;广东省第二中医院院内基金项目(No.SEZYY2023B17)

共同通信作者:刘通,E-mail:liutongmama@163.com

温春娣,E-mail:wen13719261878@163.com

(MyHC) in the multifidus muscle, and CD63, programmed cell death protein 6 interacting protein (Alix) and tumor susceptibility gene 101 (TSG101) proteins in the serum exosomes in rats with lumbar multifidus muscle injury (MFMI), so as to explore the effect of exosomes in acupoint areas on EA improvement of muscular regeneration and repair.

Methods Forty male SD rats were randomly divided into normal control, model, EA and EA+exosome inhibitor (EA+inhibitor) groups, with 10 rats in each group. The MFMI model was established by injection of 0.5% bupivacaine (150 μ L \times 4) into the 4 points of the multifidus muscle along the bilateral lumbar (L)4—L5 spinous processes. EA (2 Hz/10 Hz, 1 mA) was applied to bilateral “Weizhong” (BL40) and “Shenshu” (BL23) for 20 min, once a day for 7 d. For rats of the EA+inhibitor group, exosome inhibitor GW4869 (3 mg/mL, 50 μ L/acupoint) was injected into bilateral BL40 and BL23 1 h before each EA intervention. The morphological changes of the multifidus muscle were observed after H.E. staining and Masson staining. The immunoactivity of Pax7 and MyoD was observed by immunohistochemistry. The serum exosomes were extracted and identified by transmission electron microscope (TEM) and nanoparticle tracking analysis (NTA). The expression levels of MyoG and MyHC in the multifidus muscle tissue and CD63, Alix and TSG101 proteins in the serum exosomes were detected by Western blot. **Results** Morphological results showed that in the model group, most of the muscle fibers were degenerated and necrotic, a large number of inflammatory cells infiltrated around the muscle fibers and more blue-stained collagen fibers were observed. In the EA group, the morphology of muscle fibers was relatively complete, with more new muscle fibers and reduced inflammatory cells in the injured area, and the collagen fibers were significantly reduced. In the EA+inhibitor group, there were still more muscle fiber destruction and inflammatory cell infiltration, new muscle fibers with uneven diameter and more collagen fibers. Compared with the normal control group, the immunoactivity of Pax7 in the multifidus muscle, the expression of Alix and CD63 proteins in the serum exosomes were significantly increased in the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.001$). In comparison with the model group, the immunoactivity of Pax7 and MyoD, the expression levels of Alix and TSG101 in the serum exosomes and MyHC and MyoG proteins in the multifidus muscle were considerably up-regulated in the EA group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). After local injection of GW4869 at BL40 and BL23, the immunoactivity of Pax7 and MyoD, the protein expression levels of TSG101, CD63, MyHC and MyoG were significantly lower in the EA+inhibitor group than those of the EA group ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.001$). The results of TEM and NTA showed that the exosomes were successfully extracted. The morphology of the exosomes was typical saucer-like under electron microscope, and the particle size range was concentrated in 70—200 nm. **Conclusion** EA of BL40 and BL23 can significantly up-regulate the expressions of Pax7, MyoD, MyoG and MyHC in the injured multifidus muscle, and promote the regeneration and repair of lumbar multifidus muscle, which may be related to its functions in promoting the release of exosomes in the acupoint area.

[KEYWORDS] Electroacupuncture; Multifidus muscle injury; Acupoints; Serum exosomes; Muscle repair and regeneration

随着医疗水平的不断提高,因腰部疾病如腰椎间盘突出症、腰椎骨折等进行腰椎手术的病人越来越多,脊柱外科手术率不断上升,腰椎后路手术是目前临床上应用最广泛的脊柱手术方法。然而,约有10%~40%的患者术后腰骶部疼痛及下肢放射痛等症状仍然存在或反复发作,文献^[1]称这种腰椎术后症状甚至超过术前的综合征为腰椎术后失败综合征(FBSS)。术中对脊旁多裂肌的医源性损伤往往使多裂肌发生炎性肿胀、坏死、萎缩,导致患者术后出现新的腰背疼痛及功能障碍,是FBSS的主要诱因之一^[2]。因此,探讨如何促进损伤多裂肌的修复对缓解术后腰痛及功能障碍有重要临床意义。

大量临床研究已证实临床应用针刺疗法治疗腰椎术后疼痛疗效确切^[3-4]。目前已有大量研究^[5-7]

证实,外泌体作为一种信息载体在骨骼肌生成、肌肉再生和肌肉萎缩等过程中发挥着重要作用。亦有研究^[8-9]显示,外泌体是针刺信息传递的重要途径。课题组前期研究显示,电针“委中”和“肾俞”可显著改善多裂肌损伤后的形态学并提高损伤腰多裂肌中配对盒转录因子7(Pax7)、成肌分化抗原(MyoD)和肌细胞生成素(MyoG)蛋白的表达,从而促进多裂肌的损伤修复^[10-15]。本研究在前期研究基础上进一步探究电针在促进多裂肌损伤修复过程中调控穴区外泌体释放的相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级健康成年雄性SD大鼠40只,体质量

120~140 g,购于广东省医学实验动物中心,生产许可证编号:SCXK(粤)2022-0002。随机分笼适应性饲养7 d,环境温度约24℃,湿度为40%~50%,明暗周期12 h,自由摄食和饮水。7 d后,所有大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、电针组、抑制剂组,每组各10只。动物的使用符合科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关规定。本实验所有研究方案经广东省第二中医院实验动物伦理委员会批准(批准号:048862)。

1.2 主要仪器和试剂

0.25 mm×13 mm一次性针灸针、华佗牌电子针疗仪(SDZ-II B,苏州医疗用品厂),快速恒温冷冻切片(金华益迪),电热鼓风干燥箱(山东博科),UIS2显微镜(日本奥林巴斯),多功能成像系统、低温型研磨仪(武汉赛维尔),台式高速微量冷冻离心机套装(美国SCILOGEX),酶标仪(北京凯奥),电泳仪和转膜仪(北京东方瑞利),透射电子显微镜(日本电子株式会社),纳米颗粒追踪分析系统(德国Particle Metrix)。

布比卡因盐酸盐(美国Sigma),动物用异氟烷(深圳瑞沃德),MyoD1、肌球蛋白重链(MyHC)一抗(美国Proteintech),Pax7、MyoG、 β -Tubulin、CD63、肿瘤易感基因101蛋白(TSG101)、程序性细胞死亡因子6相互作用蛋白(Alix)一抗(上海Abmart),羊抗鼠IgG-HRP、羊抗兔IgG-HRP(英国Abcam),RIPA裂解液(北京索莱宝),DAB染色液(厦门通灵),ECL发光液(上海雅酶),PVDF膜(美国MILLIPORE),外泌体抑制剂GW4869(北京阿词玛),HE染色试剂盒(上海碧云天),BCA蛋白浓度测定试剂盒、Masson染色试剂盒(北京兰杰柯)。

1.3 模型制备

模型组、电针组和抑制剂组大鼠适应性喂养后,一次性注射布比卡因盐酸盐建立大鼠多裂肌损伤模型^[8]。用异氟烷(诱导剂量为4 mL/min,维持剂量为2~3 mL/min)吸入麻醉大鼠,背部备皮。用1 mL注射器抽取0.5%布比卡因盐酸盐溶液600 μ L,以大鼠双侧髂嵴最高点与腰椎连线定位腰(L)6,取双侧L4、L5水平各4个点,沿棘突边缘刺入,直至触及关节突和乳突所在骨面,回抽套管1 mm无血液,说明针头已抵达多裂肌,每个点注射布比卡因盐酸盐溶液150 μ L,每个点的注射时间尽量保持5 s以上,确保药物充分吸收。造模后第3天每组各取1只大鼠的多裂肌样本HE染色后镜下观察,若出现大量变性坏死的肌纤维并伴有大量炎性细胞浸润,则

表明造模成功^[16]。

1.4 干预方法

正常组和模型组均不予针刺,与其余组同步抓取固定。

电针组:造模24 h后进行电针干预,将大鼠固定于特制固定架。参考《实验针灸学》^[17]中常用实验动物穴位图谱,分别选取双侧“委中”(膝关节背面正中)和“肾俞”(第2腰椎旁开7 mm),使用0.25 mm×13 mm一次性针灸针垂直刺入皮肤5~8 mm,然后分别将同侧“委中”和“肾俞”连接电子针疗仪,疏密波,频率2 Hz/10 Hz,电流强度1 mA,持续20 min,每日1次,连续干预7 d,第7天取材。

抑制剂组造模后24 h开始给予电针治疗,方法同电针组,每次治疗前1 h分别予双侧“委中”和“肾俞”外泌体抑制剂GW4869(3 mg/mL,50 μ L/穴)穴位注射,每日1次,连续干预7 d,第7天取材。

1.5 观察指标与检测方法

标本采集:各组干预结束后,异氟烷雾化吸入麻醉大鼠,剔除背部皮毛,剪开背部皮肤,尽可能去除背部的皮毛、脂肪及筋膜等,剥离开最长肌和髂肋肌,将腰部多裂肌完全暴露,锐性切取双侧L4和L5水平多裂肌组织,左侧肌肉置4%多聚甲醛溶液固定以备石蜡切片染色,右侧肌肉于-80℃冷冻保存以备Western blot检测。肌肉取材后,腹主动脉取血5 mL,室温静置2 h后进行外泌体提取。

HE染色观察多裂肌的形态学变化:左侧多裂肌于4%多聚甲醛溶液固定48 h以上,常规乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、切片(厚度5 μ m),脱蜡至水,采用苏木精染色液染8 min,酸性分化液处理3~5 s,伊红染色液染色30~60 s,脱水、透明、封片。光学显微镜下观察多裂肌组织结构的变化。

Masson染色观察多裂肌的纤维变化:取上述切片,脱蜡至水,铁苏木精染色8 min,酸性分化液处理15 s,蓝化液染色5 min,自来水冲水后丽春红染色5 min,冰醋酸处理1 min,磷钼酸分化2 min,苯胺蓝染色2 min,脱水、透明、封片。光学显微镜下观察多裂肌纤维组织结构的变化。

免疫组织化学法检测大鼠多裂肌Pax7、MyoD表达:取上述多裂肌石蜡切片,60℃烘烤2 h,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水。热修复抗原,PBS洗净,双氧水浸浴10 min,切入Pax7(1:100)、MyoD(1:200)一抗4℃孵育16 h。加入聚合剂,DAB显色,在显微镜下观察,呈棕黄色时,用自来水冲洗切片,苏木精复染、脱水、透明、中性胶封片。在显微镜下对图像

进行观察和采集,全视野无偏取样,每张切片取5个视野。使用Image-Pro Plus 6.0进行图像处理,测定各视野Pax7、MyoD阳性表达的平均吸光度值。

Western blot法检测各组大鼠多裂肌组织中MyoG、MyHC蛋白的表达:取出冻存于 -80°C 的多裂肌组织,分别添加RIPA、蛋白酶抑制剂等,匀浆后离心、提取蛋白,测定蛋白含量。加入上样缓冲液, 100°C 煮沸10 min后快速冷却,使蛋白变性。以 $50\ \mu\text{g}/\text{孔}$ 蛋白上样, $80\ \text{V}$ 浓缩胶、 $120\ \text{V}$ 分离胶电泳,转膜,加入含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h。加入MyoG一抗(1:1 000)和MyHC一抗(1:1 000)在 4°C 孵育过夜。洗后加入二抗(1:10 000)孵育1 h,洗膜,显影。以 $\beta\text{-Tubulin}$ 为内参,通过凝胶成像系统获取图像,用Image J软件对其进行定量分析,以MyoG、MyHC和内参蛋白条带灰度值的比值作为目标蛋白的相对表达量。

血清外泌体的提取:取动脉血后室温静置2 h, 4°C 离心3 min,取上清液加至新的EP管中, $2\ 000\times g$ 、 4°C 离心10 min,用吸液枪将上清液转至新离心管中, $10\ 000\times g$ 、 4°C 离心30 min。将上清液用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的针头过滤器过滤,然后用无菌PBS配平。使用超速离心机, $110\ 000\times g$ 、 4°C 离心70 min,弃掉上清,得到初步分离的外泌体。将外泌体用无菌PBS重悬, $120\ 000\times g$ 、 4°C 离心70 min。弃掉上清,将离心管倒置于吸水纸上,排空液体,再用 $50\ \mu\text{L}$ PBS将外泌体溶解,置于 -80°C 冻存。

透射电子显微镜鉴定外泌体形态学:选取200目的载样铜网,滴入外泌体悬液 $15\ \mu\text{L}$,静置2 min后吸干滤液。在2%醋酸铀溶液中避光染色15 s,室温下自然干燥,将铜网安装在100 kV的透射电子显微镜上,观察外泌体形态并拍照。

纳米颗粒追踪分析技术分析外泌体的粒径表征:将冻存的外泌体样品于 25°C 水浴解冻,置于冰上,根据设备和样品浓度要求,使用无菌且无颗粒污染的PBS对样品进行适当稀释。通过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜去除大颗粒和杂质后,涡旋仪轻微振荡混匀样

品。用标准颗粒进行设备校准,调整激光强度、相机增益和检测区域,使用一次性采样器将稀释后的样品注入纳米颗粒追踪分析检测池,启动检测,自动记录数据。检测完后用无颗粒的PBS或超纯水冲洗检测池,采用纳米颗粒追踪分析系统分析结果。

Western blot法检测血清外泌体标记蛋白表达:取冻存的外泌体样品,采用BCA法测定外泌体标记蛋白浓度,其余步骤同上,其中TSG101、Alix稀释比例均为1:1 000,CD63为1:1 200。

1.6 统计学处理

采用SPSS27.0软件进行统计学分析,数据均符合正态分布和方差齐性,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用单因素方差分析进行多组间比较,组间两两比较选择LSD法。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

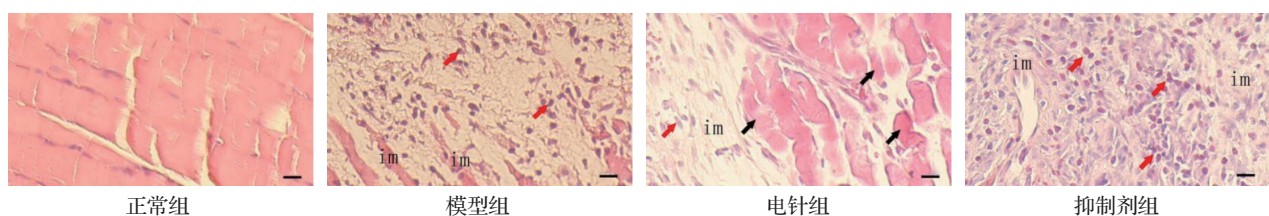
2 结果

2.1 各组大鼠腰部多裂肌形态学比较

HE染色结果显示,正常组可见骨骼肌纤维呈粉红色的规则长条形,细胞核主要分布在肌纤维周围,无明显肌纤维损伤或炎性细胞浸润;模型组肌纤维变性、坏死较多,坏死区内偶见少量无损伤的散在肌纤维,肌纤维周边有大量炎性细胞浸润,表明造模成功;与模型组相比,电针组的肌纤维更加完整,新生肌纤维较多,受损部位炎性细胞减少;与电针组比较,抑制剂组的肌纤维损伤及炎性细胞浸润增多。见图1。

2.2 各组大鼠腰部多裂肌纤维染色结果比较

Masson染色结果显示,正常组可见大量排列整齐的红染肌纤维,蓝染胶原纤维较少;模型组可见大量被破坏的肌纤维及大片蓝染胶原纤维;电针组可见少量胶原纤维,以及直径不均的新生肌纤维;抑制剂组可见胶原纤维较多,但蓝染程度较浅。见图2。



注:标尺=200 μm 。im示受损肌纤维,黑色箭头示新生肌纤维,红色箭头示炎性细胞浸润。

图1 各组大鼠多裂肌组织形态结构比较(HE染色)

Fig. 1 Comparison of multifidus muscle morphology of rats in the 4 groups(HE staining)

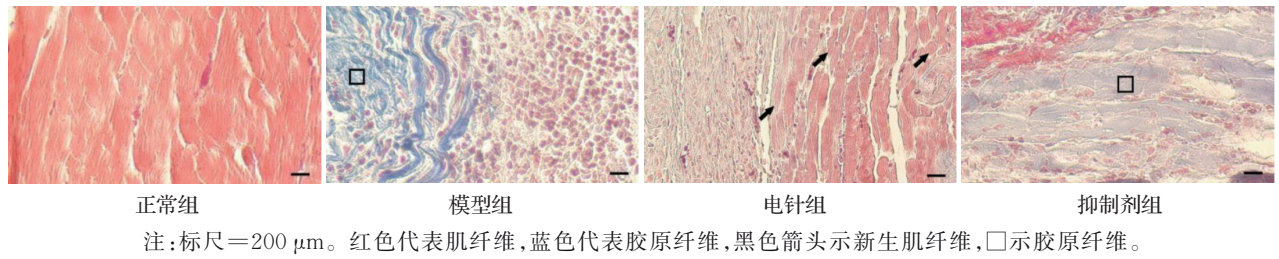
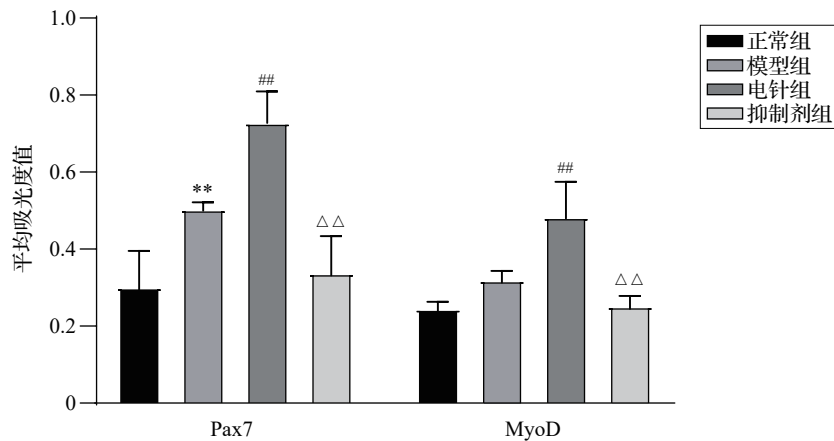
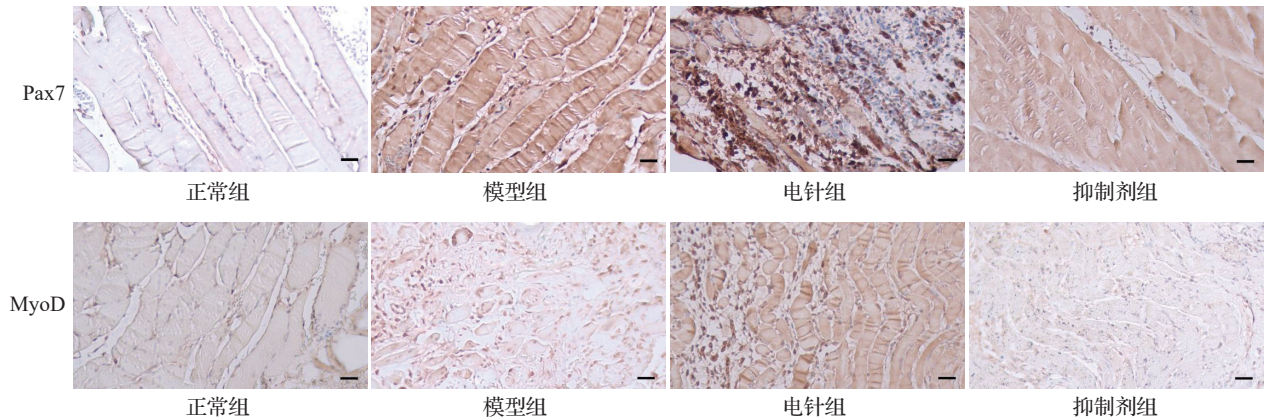


图2 各组大鼠多裂肌纤维组织比较(Masson染色)

Fig. 2 Comparison of multifidus muscle fiber tissue of rats in the 4 groups(Masson staining)

2.3 各组大鼠多裂肌 Pax7、MyoD 蛋白的表达比较
免疫组织化学染色结果显示,与正常组比较,模型组大鼠多裂肌中 Pax7 的表达升高($P < 0.01$), MyoD 表达有升高趋势,但差异无统计学意义。与

模型组比较,电针组大鼠多裂肌中 Pax7、MyoD 的表达显著升高($P < 0.01$)。与电针组比较,抑制剂组大鼠多裂肌中 Pax7、MyoD 的表达显著降低($P < 0.01$)。见图3。



注:Pax7为配对盒转录因子7,MyoD为成肌分化抗原。标尺=200 μm,棕黄色为阳性表达。与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与电针组比较,ΔΔ $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠多裂肌 Pax7、MyoD 的表达比较(免疫组织化学染色, $\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of the expressions of Pax7 and MyoD in multifidus muscle of rats in the 4 groups (immunohistochemistry staining, $\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

2.4 血清外泌体鉴定结果

透射电子显微镜下显示大鼠血清外泌体表现为明显膜性边界,并呈外泌体典型的双膜囊泡“茶托样”结构。见图4。

纳米颗粒追踪分析技术结果显示,本研究中外

泌体粒径范围集中分布在70~200 nm,符合外泌体粒径范围要求。见图5。

2.5 各组大鼠血清外泌体 Alix、TSG101、CD63 表达比较

与正常组相比,模型组大鼠血清 Alix、CD63表

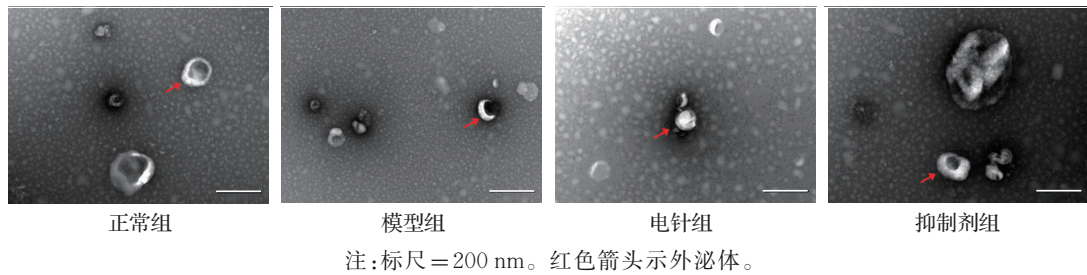


图4 各组大鼠血清外泌体形态结构(透射电子显微镜)

Fig. 4 Morphological structure of serum exosomes of rats in the 4 groups(transmission electron microscope)

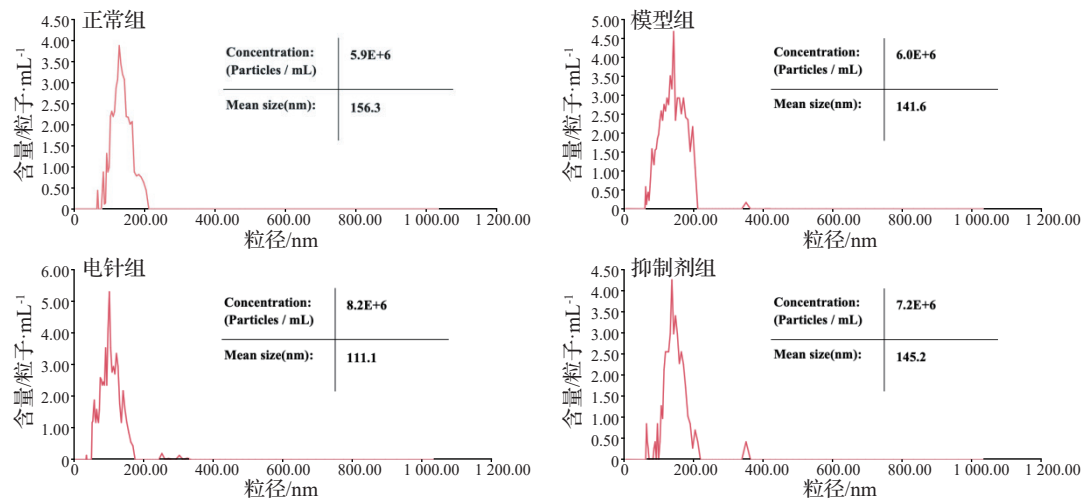


图5 各组大鼠血清外泌体粒径表征

Fig. 5 Characterisation of serum exosome particle size of rats in the 4 groups

达显著升高($P<0.05, P<0.001$)。与模型组相比,电针组 Alix、TSG101 表达升高($P<0.05$)。加用 GW4869 后,与电针组相比,抑制剂组 Alix、TSG101、CD63 表达显著下降($P<0.01, P<0.05, P<0.001$)。见图 6。

2.6 各组大鼠多裂肌 MyHC、MyoG 表达的比较

与模型组相比,电针组大鼠多裂肌 MyHC、MyoG 表达升高($P<0.01, P<0.05$)。与电针组相比,加用 GW4869 后,抑制剂组 MyHC、MyoG 表达下降($P<0.001, P<0.05$)。见图 7。

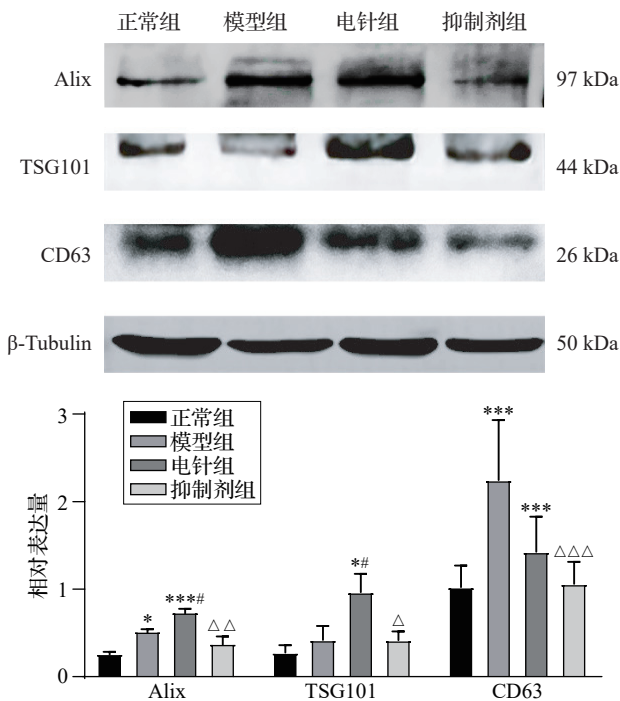
3 讨论

FBSS 是指在进行一次或多次腰椎手术之后,患者由于各种原因出现腰骶部疼痛及下肢放射痛等症状。FBSS 的致病原因较为复杂,近年来大量研究显示在诊断明确、手术计划合理的情况下,术中导致的椎旁多裂肌损伤或是 FBSS 的主要诱因之一^[18-19]。因此,探讨如何促进手术引起的椎旁多裂肌的损伤修复,对防止患者术后出现新的疼痛及功能障碍有重要意义。

多裂肌位于脊柱两旁竖脊肌深部,是附着面积

最大的椎旁肌群。腰椎后路手术时,对该肌肉长时间的牵拉和剥离可直接导致多裂肌损伤。多裂肌是位于脊旁的重要稳定肌,也是足太阳经筋“上挟脊上项”的必经之路。针灸是临床治疗骨骼肌损伤的有效方法之一,课题组前期已证实临床应用针刺疗法治疗 FBSS 患者的腰痛疗效确切^[3]。委中和肾俞为临床治疗腰部疾病的特效穴,“腰背委中求”是委中对腰背部疾病特异性疗效的经验总结。委中为足太阳膀胱经合穴,足太阳膀胱经脉“从腰中,下夹脊,贯臀,入腠中”,膀胱经自腰背而来的两条支脉皆下合于委中,根据“经脉所过,主治所及”,针刺委中能疏调腰背之气。肾俞为肾的背俞穴,为肾气在腰部输注、转输之所,“腰为肾之府”,故取肾俞进行干预可疏导局部之经气,调和局部气血。委中和肾俞相配属远近配穴,可相得益彰,增强疗效。

骨骼肌损伤后都必然经历坏死性炎症反应、肌纤维再生修复与骨骼肌纤维细胞外基质重塑阶段^[20]。其中,坏死性炎症反应期出现较早,从损伤即刻持续到损伤后 10 d 前后,主要表现为肌纤维坏死,中性粒细胞和巨噬细胞浸润;随后,巨噬细胞持



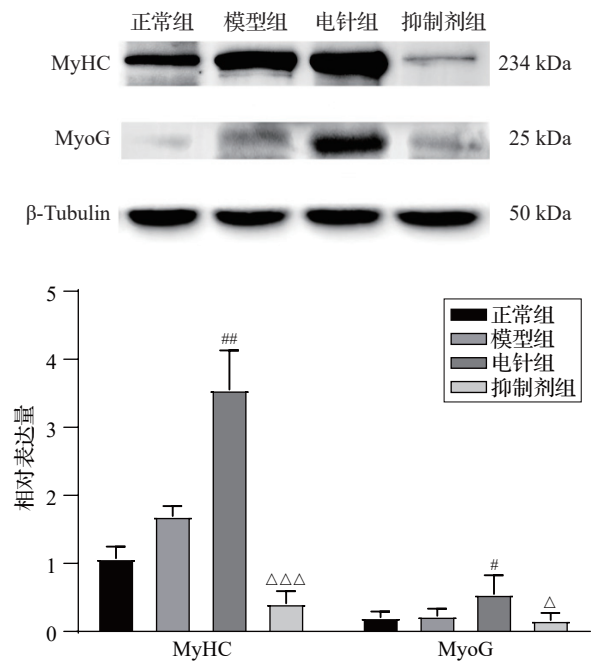
注: Alix为程序性细胞死亡因子6相互作用蛋白, TSG101为肿瘤易感基因101蛋白。与正常组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与电针组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$, △△△ $P < 0.001$ 。

图6 各组大鼠血清外泌体中Alix、TSG101和CD63的表达水平比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of expression levels of Alix, TSG101 and CD63 proteins in serum exosomes of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

续吞噬, 肌肉纤维逐步再生, 瘢痕组织开始出现^[21]。本研究中HE和Masson染色显示造模后大鼠多裂肌肌纤维断裂、排列紊乱, 并有大量炎性细胞浸润及蓝染胶原纤维形成, 提示多裂肌在布比卡因盐酸盐注射造模后发生严重的炎性反应及纤维化; 而电针组炎性细胞数目明显减少, 且新生肌肉纤维数量增多, 排列更加规整, 说明电针局部组织已经处在成肌分化状态, 而模型组局部还处于肌细胞再生阶段。与同一时间点模型组比较, 电针组比模型组恢复更快, 表明电针能够有效降低多裂肌损伤局部的反应, 促进多裂肌形态修复, 此结果与我们前期研究结果^[10, 13, 15]一致。然而, 注射外泌体抑制剂后, 抑制剂组肌纤维破坏及炎性细胞浸润程度与电针组相比明显升高, 说明注射外泌体抑制剂会使电针促进多裂肌再生修复的疗效下降。

外泌体是一种磷脂双分子层细胞外囊泡, 直径在30~150 nm之间, 它可以携带多种生物信息物质与周边靶细胞进行信息交流, 或经血液、体液运输



注: MyHC为肌球蛋白重链, MyoG为肌细胞生成素。与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与电针组比较, △ $P < 0.05$, △△△ $P < 0.001$ 。

图7 各组大鼠多裂肌MyHC及MyoG的表达水平比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of MyHC and MyoG protein expressions in multifidus muscle of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

到远处靶细胞, 是神经、内分泌、免疫等细胞间相互通讯的重要载体^[22]。外泌体物质多、效应多、联系多的特性与针刺多靶点、多途径、多系统共同发挥整体调节作用的特点不谋而合^[23]。本研究采用透射电子显微镜、纳米颗粒追踪分析及Western blot法检测外泌体形态学、粒径大小及标志蛋白并进行外泌体鉴定。本研究结果表明, 各组大鼠血清提取的外泌体形态大小和粒径都符合理论标准, 外泌体的3种重要标志蛋白CD63、Alix、TSG101均出现明显条带, 表明所提取的外泌体未受杂蛋白干扰, 可用于相关生物学分析。同时, 电针组Alix、TSG101的表达显著高于模型组, 表明电针可在一定程度上促进多裂肌损伤后外泌体的分泌, 而在穴区局部使用外泌体抑制剂后, 电针对外泌体的促释放效应显著下降。此外, 电针组CD63表达在数值上低于模型组, 虽未达统计学差异, 但可能反映了电针对外泌体亚群或蛋白分选的特异性调控, 其意义有待深究。

Pax7是影响肌肉损伤后肌卫星细胞增殖分化的关键因子, 它能维持活化后肌卫星细胞的增殖水

平并保持其自我更新潜能^[24]。增殖结束后,部分肌卫星细胞表达 MyoD 使增殖周期终止,促进肌卫星细胞分化为成肌细胞,MyoD 表达的升高表明肌卫星细胞进入活化及分化阶段。MyoG 能够调节肌管的终末分化,在细胞分化结束后,新生肌管中表达 MyHC,形成成熟肌管,发挥骨骼肌纤维的生理功能。在骨骼肌发育和再生过程中,肌管细胞质中的 MyHC 标志着肌纤维再生^[25],其表达强度用于评估肌纤维再生水平^[26-28]。本研究结果表明电针干预能有效上调大鼠损伤多裂肌中 Pax7、MyoD、MyoG 及 MyHC 的表达,而在针刺穴位局部使用外泌体抑制剂后,其表达水平显著下降,说明电针“委中”“肾俞”可以促进肌卫星细胞的增殖和成肌分化,缩短肌肉再生的过程,而拮抗穴区外泌体释放会降低针刺疗效。研究表明,外泌体可能是穴位发挥作用的关键物质基础,抑制穴区外泌体释放可降低针刺的疗效^[8]。也有学者认为针刺作为一种侵入性物理刺激在刺激穴位后,穴位局部纤维组织缠绕、断裂,损伤相关因子释放,激活相应细胞,从而释放外泌体,激活穴位初始动力学小网络——启动子,使针刺信息在穴位局部启动并级联放大,并通过激活神经-内分泌-免疫系统大网络,进一步经多层次、多系统将效应信息输出到靶器官^[29]。此外,外泌体中含有多种生物信息分子可以调控肌肉损伤后的再生修复。研究显示,损伤的肌纤维可以自分泌富含肌原性生长因子的外泌体进行修复^[29]。骨骼肌细胞分泌的外泌体会富集微小 RNA (miR) -1、miR-133a、miR-133b 和 miR-206 4 种肌肉特异性 miRNA,这些由肌肉组织产生释放的外泌体运载至邻近组织的肌卫星细胞,通过负调控肌卫星细胞 Pax7 基因的表达、调节 MyoG 的表达,促进肌肉分化和肌纤维的再生,或通过进入血液循环传递至远处组织,实现远端肌肉组织之间的通讯^[30-33]。同时,其他细胞来源的外泌体也能够富集 miR-125b 等,作用于肌卫星细胞和成肌细胞,使 MyoD 和 MyoG 的表达增加,调控肌肉的增殖和分化,促进损伤肌肉的再生修复^[34-35]。因此,我们认为电针促进损伤肌肉再生修复的作用可能是通过外泌体进行介导,但外泌体中具体的介导物质仍需要进一步研究。此外,本研究穴区局部注射外泌体抑制剂后,抑制剂组相关蛋白的表达甚至低于正常组和模型组,可能是因为穴区局部注射 GW4869 不仅降低了电针对外泌体的促释放效应,同时降低了局部非损伤组织(如肌肉、脂肪等)外泌体的正常释放。研究^[36]表明,肌肉损伤后,局部

非损伤组织外泌体的释放对肌肉再生修复同样具有重要的作用。

综上,本文以外泌体为切入点,观察到抑制穴区外泌体可使电针促进多裂肌再生修复的效应下降,初步验证了外泌体在针刺效应启动中的重要作用。然而,本实验仍然存在一定缺陷:首先,这一过程中外泌体中携带的何种效应物质起到关键作用,目前仍不清楚;其次,针刺后诱导释放的外泌体由何种细胞产生,以及针刺效应如何从穴位传送到病变局部,即针刺的起效路径及调控外泌体分泌的作用机制仍未明确,需要进一步研究。后期,我们将继续运用组学技术(蛋白质组学、基因组学、代谢组学等)探究针刺穴位局部与靶器官的物质表达及其相关性,为揭示针刺的作用机制提供依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] ZDEBLICK T A. A prospective, randomized study of lumbar fusion. Preliminary results[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1993, 18(8): 983-991.
- [2] DANIELL J R, OSTI O L. Failed back surgery syndrome: a review article[J]. Asian Spine J, 2018, 12(2): 372-379.
- [3] 刘通,刘悦,邝伟川,等. 刺骨调筋针法治疗腰椎术后失败综合征临床疗效[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(12): 2914-2917.
LIU T, LIU Y, KUANG W C, et al. Effect of needling method of touching-periosteum and regulating-muscle for failed back surgery syndrome (in Chinese) [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2018, 36(12): 2914-2917.
- [4] 刘郁林,朱文俊,常跃文,等. 电针联合镇痛药物对腰椎管狭窄症术后镇痛的影响[J]. 上海针灸杂志, 2022, 41(5): 515-520.
LIU Y L, ZHU W J, CHANG Y W, et al. Effect of electroacupuncture plus analgesics on analgesia after surgery for lumbar spinal stenosis (in Chinese) [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2022, 41(5): 515-520.
- [5] YU Y Y, SU Y, WANG G X, et al. Reciprocal communication between FAPs and muscle cells *via* distinct extracellular vesicle miRNAs in muscle regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2024, 121(11): e2316544121.
- [6] 杨东丽,杨琼,罗嘉,等. 外泌体参与骨骼肌功能调控研究进展[J]. 动物医学进展, 2018, 39(1): 103-108.
YANG D L, YANG Q, LUO J, et al. Progress on exosomes and its role in skeletal muscle function regulation (in Chinese) [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2018, 39(1): 103-108.

- [7] NAKAMURA Y, MIYAKI S, ISHITOBI H, et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration[J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(11): 1257-1265.
- [8] CHEN B, LI M Y, XING L Y, et al. Participation of local exosomes of acupoints in the initiation of acupuncture analgesic effect [J]. *World J Acupunct Moxibust*, 2018, 28(4): 263-267.
- [9] 李柠岑, 李明月, 李牧洋, 等. 外泌体是针刺信息传递的重要途径[J]. *世界中医药*, 2020, 15(7): 975.
LI N C, LI M Y, LI M Y, et al. Exosomes are an important way to transmit acupuncture information (in Chinese) [J]. *World Chinese Medicine*, 2020, 15(7): 975.
- [10] LI X, ZHAO J, LV Q Q, et al. Electroacupuncture alleviates multifidus muscle injury by modulating mitochondrial function and Ca^{2+} uptake[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2023, 306(12): 3060-3072.
- [11] 刘通, 于佳妮, 邹德辉, 等. 电针血清对多裂肌卫星细胞增殖及 Pax-7、成肌分化抗原、磷酸化蛋白激酶 B 表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2016, 41(5): 402-409.
LIU T, YU J N, ZOU D H, et al. Effect of electroacupuncture serum on proliferation of cultured multifidus muscle satellite cells and expression of Pax-7, MyoD and p-Akt (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2016, 41(5): 402-409.
- [12] 刘通, 于佳妮, 刘悦, 等. 电针血清对饥饿条件下肌卫星细胞成肌分化抗原及自噬蛋白 Beclin 1 表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2019, 44(11): 799-804.
LIU T, YU J N, LIU Y, et al. Effect of electroacupuncture serum on expression of myogenic differentiation antigen and autophagy-related protein Beclin 1 in cultured muscle satellite cells under starvation (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2019, 44(11): 799-804.
- [13] 刘通, 于佳妮, 邹德辉, 等. 电针调控 miRNA206/HDAC4 轴促进损伤多裂肌修复过程中成肌细胞分化的机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(33): 5341-5346.
LIU T, YU J N, ZOU D H, et al. Regulation of miRNA206/histone deacetylase 4 by electroacupuncture promotes myogenic differentiation during multifidus muscle repair (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2019, 23(33): 5341-5346.
- [14] 刘通, 于佳妮, 陈玉佩, 等. 单根肌纤维法分离培养多裂肌卫星细胞及鉴定 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(25): 4065-4070.
LIU T, YU J N, CHEN Y P, et al. Isolation and culture of multifidus satellite cells by single muscle fiber method (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2018, 22(25): 4065-4070.
- [15] 彭园园, 刘通, 陈玉佩, 等. 电针“委中”对布比卡因致大鼠腰多裂肌损伤后再生及组织形态的影响 [J]. *中国针灸*, 2016, 36(3): 287-294.
PENG Y Y, LIU T, CHEN Y P, et al. Effects of electroacupuncture at “Weizhong” (BL40) on regeneration and morphology in rats with bupivacaine-induced multifidus muscle injury (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2016, 36(3): 287-294.
- [16] 陈玉佩, 刘通, 邹德辉, 等. 局部注射布比卡因建立大鼠骨骼肌损伤模型的组织形态学评价 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(18): 2615-2621.
CHEN Y P, LIU T, ZOU D H, et al. Histomorphological assessment of a rat model of skeletal muscle injury induced by local injection of bupivacaine (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2016, 20(18): 2615-2621.
- [17] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
LI Z R. *Experimental acupuncturology (in Chinese)* [M]. 2nd edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007.
- [18] WASCHKE A, HARTMANN C, WALTER J, et al. Denervation and atrophy of paraspinal muscles after open lumbar interbody fusion is associated with clinical outcome: electromyographic and CT-volumetric investigation of 30 patients [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2014, 156(2): 235-244.
- [19] GILLE O, JOLIVET E, DOUSSET V, et al. Erector spinae muscle changes on magnetic resonance imaging following lumbar surgery through a posterior approach [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32(11): 1236-1241.
- [20] CHAZAUD B. Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: application to exercise-induced muscle damage management [J]. *Immunol Cell Biol*, 2016, 94(2): 140-145.
- [21] 黄于婷, 廖军, 饶天子, 等. 电针刺激启动穴位效应促进骨骼肌修复的机制研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47(8): 1160-1170.
HUANG Y T, LIAO J, RAO T Y, et al. Study on the mechanism of electroacupuncture stimulation to activate the acupoint effect and promote skeletal muscle repair (in Chinese) [J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 47(8): 1160-1170.
- [22] TKACH M, THÉRY C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go [J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232.
- [23] 王美娟, 李柠岑, 陈波, 等. 浅析外泌体参与针刺调节作用的特点分析 [J]. *天津中医药*, 2022, 39(3): 325-329.

- WANG M J, LI N C, CHEN B, et al. A brief analysis of the characteristics of exosome participating in the regulation of acupuncture (in Chinese) [J]. *Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 39(3): 325-329.
- [24] VON MALTZAHN J, JONES A E, PARKS R J, et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(41): 16474-16479.
- [25] MA X L, DU Y R, WANG S L, et al. Adjacent segment degeneration after intervertebral fusion surgery by means of cervical block vertebrae [J]. *Eur Spine J*, 2018, 27(6): 1401-1407.
- [26] AGARWAL M, SHARMA A, KUMAR P, et al. Myosin heavy chain-embryonic regulates skeletal muscle differentiation during mammalian development [J]. *Development*, 2020, 147(7): dev184507.
- [27] 余慕雪, 戴杰民, 庄思齐, 等. 亮氨酸对原代新生大鼠骨骼肌卫星细胞肌管形成和MyHC表达的作用研究 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2016, 24(2): 144-148.
- YU M X, DAI J M, ZHUANG S Q, et al. Study on the effect of leucine on myotube formation and MyHC expression in primary neonatal rat skeletal muscle satellite cells (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Child Health Care*, 2016, 24(2): 144-148.
- [28] WILBORN C D, WILLOUGHBY D S. The role of dietary protein intake and resistance training on Myosin heavy chain expression [J]. *J Int Soc Sports Nutr*, 2004, 1(2): 27-34.
- [29] 李柠岑, 郭义, 陈波, 等. “针刺网络药”: 基于针刺网络调节特点的外泌体转化应用策略 [J]. *针刺研究*, 2021, 46(6): 464-468.
- LI N C, GUO Y, CHEN B, et al. “Acupuncture network drug”: transformation and application strategies of exosomes based on characteristics of network regulation of acupuncture therapy (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(6): 464-468.
- [30] GUESCINI M, MAGGIO S, CECCAROLI P, et al. Extracellular vesicles released by oxidatively injured or intact C2C12 myotubes promote distinct responses converging toward myogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2488.
- [31] MYTIDOU C, KOUTSOULIDOU A, KATSIOLUDI A, et al. Muscle-derived exosomes encapsulate myomiRs and are involved in local skeletal muscle tissue communication [J]. *FASEB J*, 2021, 35(2): e21279.
- [32] CUI S, LI L, MUBAROKAH S N, et al. Wnt/ β -catenin signaling induces the myomiRs miR-133b and miR-206 to suppress Pax7 and induce the myogenic differentiation program [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12740-12751.
- [33] FORTERRE A, JALABERT A, BERGER E, et al. Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: a new paradigm for myoblast-myotube cross talk? [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84153.
- [34] PHINNEY D G, DI GIUSEPPE M, NJAH J, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8472.
- [35] NAKAMURA Y, MIYAKI S, ISHITOBI H, et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(11): 1257-1265.
- [36] YING W, RIOPEL M, BANDYOPADHYAY G, et al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal miRNAs can modulate in vivo and in vitro insulin sensitivity [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 372-384.

收稿日期:2024-12-04 修回日期:2024-12-26
网络首发:2025-07-03 编辑:秦田雨