

杨敏, 梁春花, 杨童, 等. 内关穴 CD34⁺ 和 c-kit⁺ 双阳性 Telocytes 的鉴定及其对“逆灸”的形态响应 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (6): 118-123.
YANG M, LIANG C H, YANG T, et al. Identification of CD34⁺ and c-kit⁺ double-positive Telocytes from Neiguan acupoints and its morphologic response to reverse moxibustion [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (6): 118-123.

内关穴 CD34⁺ 和 c-kit⁺ 双阳性 Telocytes 的鉴定 及其对“逆灸”的形态响应

杨敏, 梁春花, 杨童, 黄海翔, 乐建铭, 张臻玮, 梅璐, 张迎鑫, 陈秋生*
(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为探究 telocytes (TCs) 在内关穴的形态特征及其与周围结构的关系, 分析“逆灸”对其微细结构的形态响应, 本文选用健康 SD 雄性大鼠为研究对象, 分为正常组和艾灸干预组, 正常组不做处理, 艾灸干预组进行“逆灸”内关穴 10 d, 通过 HE、Masson 染色, CD34⁺ 和 c-kit⁺ 免疫荧光双标, 透射电镜检测, 进行系统研究。结果显示, 内关穴分布有丰富的 TCs, 它们与皮肤中的血管、神经、脂肪细胞、筋膜和胶原纤维等密切相关, 显示出其与周围成分的联系功能。进一步发现, 与正常组对比, “逆灸”组 TCs 的突起 (Tps) 增长, TCs 周围胞外囊泡增多, TCs 之间的细胞连接增加, 表明“艾灸”可在形态上激活 TCs, 并增强其信息传递功能。提示, 作为心包经的关键穴位, 内关穴中的 TCs 有望成为艾灸预防心血管疾病机制研究的新靶位。

关键词: 内关穴; 未病逆灸; 远细胞; 通讯; 大鼠

中图分类号: S853 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)06-0118-06

Identification of CD34⁺ and c-kit⁺ double-positive Telocytes from Neiguan acupoints and its morphologic response to reverse moxibustion

YANG Min, LIANG Chunhua, YANG Tong, HUANG Haixiang, YUE Jianming, ZHANG Zhenwei,
MEI Lu, ZHANG Yingxing, CHEN Qiusheng*
(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to investigate the morphological characteristics of telocytes (TCs) at the Neiguan acupoints and their relationship with the surrounding structures, and to analyze the morphological response of “reverse moxibustion” by their microstructures, in this study, healthy SD male rats were used as research subjects, which were divided into the normal group and the moxibustion intervention group. The normal group was not treated, and the moxibustion intervention group was subjected to “reverse moxibustion” at the Neiguan point for 10 days. And a systematic study was conducted using HE and Masson staining, CD34⁺ and c-kit⁺ immunofluorescence double labeling, transmission electron microscopy, and the “reverse moxibustion” method. The results showed that the Neiguan acupoints were richly distributed with TCs, which were closely connected with the blood vessels, nerves, adipocytes, fascia, and collagen fibers in the skin of the rats, demonstrating their function of connecting with the surrounding components. It was further found that, compared with the normal group, the TCs in the “reverse moxibustion” group showed increase in the number of telopodes (Tps), in the secretion of extracellular vesicles, and in the cell junction between the TCs; which suggested that “moxibustion” morphologically activated the TCs and enhanced their information transmission function. This indicated that, as a key acupoint in the pericardium meridian, the TCs in the Neiguan acupoint was expected to be a new target for the study of the mechanism of moxibustion in the prevention of cardiovascular diseases.

Keywords: neiguan point; undiseased reverse moxibustion; telocytes; communication; rat

根据中医经络学说, 内关穴是手厥阴心包经的主

要穴位, 一直以来是中医治疗心胸血管疾病的首选经典穴位。早在《灵枢·邪客》《灵枢·经别》和《针灸甲乙经》中提及心为五脏六腑之主, 心包经为心之主脉, 内关穴为心包经之主穴, 可治心胸疾病^[1]。

随着社会发展, “治未病”的预防医学理念逐渐被认可, 并在防治心血管疾病上取得显著疗效^[2]。治未病主要分为 3 个层次, 未病先防、既病防范和

收稿日期: 2024-01-08; 修回日期: 2024-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31872433); 中央高校基本科研业务费项目 (KYZ202102)

第一作者: 杨敏, 女, 博士研究生

* 通信作者, 陈秋生, 教授, 博导, 研究方向为经络实质细胞研究, E-mail: chenqsh305@njau.edu.cn。

病后防复。中医针灸包括针刺与艾灸,两者均为治未病的重要方法。相关文献研究报道,针刺多用于既病防变的方面,而艾灸多用于正常机体的未病先防,因此在“治未病”中艾灸的应用多于针刺^[3-4]。艾灸预处理,也被称为“逆灸”法,具有温经活络,提高免疫力等疗效^[5]。现代中医学研究证明艾灸预处理内关穴对心肌缺血等心血管疾病具有较好的预防作用^[6-8]。然而内关穴发挥作用的实质,目前尚无明确定论。

Telocytes (TCs),又名远细胞,广泛分布于体内间质,具有数量不等极细而长的突起(Tp),突起上有大小不等的膨大结节^[9],并与同型细胞和异型细胞之间可形成缝隙连接网络,实现细胞之间的直接通讯^[10]。而且在远细胞的突起和膨大结节中有丰富的内质网,线粒体,钙窖和分泌的胞外囊泡,能促进细胞之间的远距离联系^[11-12]。近期相关研究报道远细胞与经络特点吻合,远细胞可能是经络中发挥关键作用的细胞^[13]。但目前仍需要大量的试验验证。

本文在前期观察与分析的基础上^[14-18],选取了大鼠心包经络线上的皮肤内关穴,并通过艾灸预处理(“逆灸”),从形态结构与细胞功能的角度,鉴定TCs在皮肤内关穴上存在及其动态变化,力图阐明TCs为艾灸治未病的效应细胞之一。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SD雄性大鼠($n=6$),购买于北京斯贝福生物技术有限公司,饲养于南京农业大学实验动物中心。试验中所有动物试验程序均得到了南京农业大学动物医学院实验动物伦理委员会的许可和江苏省科技厅[SYXK(SU)2021-0086]的批准。试验随机分为2组,正常组和艾灸组,每组各3只。

1.2 穴位定位与艾灸方法

内关穴在距离腕关节约3 mm的桡尺骨缝间,根据针刺研究《实验动物常用穴位名称与定位第2部分:大鼠》取穴定位。将大鼠用魔术贴平躺并固定在自制木板上,剃去前肢内侧的内关穴位处的毛,点燃艾灸条,将艾灸条对准双侧内关穴悬在穴位上方0.5 cm左右,并及时除去艾灰,调整施灸距离,控制穴区温度在43℃左右,1天1次,共计10 d。在10 d内,正常组进行和艾灸组一样的绑定方式,但不艾灸,每次20 min,共10 d。试验用艾条购买于临湘市湖香艾生物科技有限责任公司,规格为4 mm×120 mm×40支。

1.3 主要试剂与仪器

CD34兔多克隆抗体,DAPI细胞核染色液(武

汉博士德生物工程有限公司);c-kit鼠单克隆抗体(美国圣克鲁斯生物技术有限公司);抗荧光淬灭剂(上海碧云天生物技术有限公司);CoraLite 488-conjugated山羊抗兔IgG(H+L)和CoraLite 594-conjugated山羊抗鼠IgG(H+L)(武汉三鹰生物技术有限公司);组织自发荧光淬灭剂(北京普利莱基因技术有限公司);苏木精和伊红染色液(上海源叶生物技术有限公司);masson染色试剂盒和中性树胶(北京索莱宝科技有限公司)。

石蜡切片机(德国Leica公司),Olympus DP73光学显微镜(日本Olympus公司),超微切片机(奥地利Reichert Jung公司),日立透射电镜H-7650(日本Hitachi公司)。

1.4 HE染色

取大鼠皮肤内关穴位(根据穴位定位取材),将组织固定在4%多聚甲醛中48 h。再进行修块,脱水,透明,浸蜡与包埋。将组织切为6 μm的薄片,烘干,脱蜡至水,苏木精伊红染色后,中性树胶封片,显微镜观察并拍照。

1.5 Masson染色

将切片进行常规脱蜡至水,使用Weigert铁苏木素染色液染色8 min,酸性乙醇分化10 s,水洗,Masson蓝化液返蓝4 min,蒸馏水洗,丽春红品红染色液染色8 min,配置弱酸工作液(液蒸馏水:弱酸溶液=2:1),用弱酸工作液洗1 min,磷钼酸溶液洗1 min 30 s,用弱酸工作液洗1 min后,苯胺染色液中染色1 min 30 s,用弱酸工作液洗1 min,95%乙醇和无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.6 免疫荧光鉴定TC细胞

组织切片被脱蜡至水。磷酸盐缓冲液(PBS)清洗切片,再放入0.01 mol柠檬酸钠溶液中以修复抗原。3%的H₂O₂灭活过氧化物酶,PBS清洗。CD34兔多克隆抗体(1:100)和c-kit小鼠单克隆抗体(1:100)在4℃下培养过夜。用PBS清洗,二抗(1:100)在37℃下孵育1 h。细胞核用DAPI(Boster)染色,组织自发荧光淬灭剂室温孵育30 min后,抗荧光淬灭剂封片。通过荧光显微镜(日本奥林巴斯DP73)收集图像。

1.7 透射电镜观察

将皮肤内关穴组织修剪为1 mm³的小块,用预冷的2.5%戊二醛在4℃下固定48 h后,然后用PBS清洗并在1%四氧化锇中孵育。再用PBS清洗,用乙醇梯度(50%、70%、80%和100%)脱水,用氧化丙烯-Araldite混合物渗透,并嵌入Araldite。用超微切片机制备超薄切片(50 nm)。超薄切片经1%乙酸铀和雷诺铅染色20 min。最后超薄组织切片用透射电子

显微镜（日本日立 H-7650）观察。

1.8 数据统计分析

数值均使用“平均值±标准差”表示，数据处理与图片分析通过 GraphPad Prism 8.0.2, Image J 和 Photoshop 软件完成。采用 *t* 检验进行组间差异性对比分析，所有检测至少独立进行 3 次， $P < 0.05$ 为显著性差异， $P < 0.01$ 为极显著性差异。

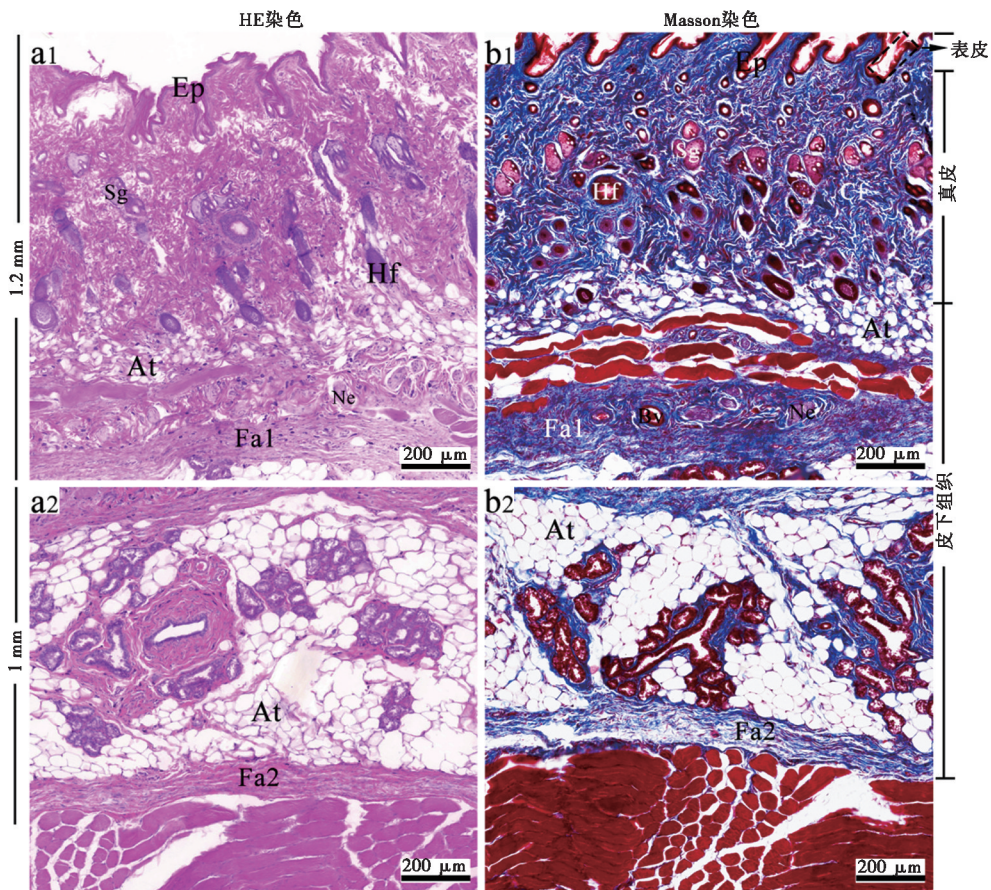
2 结果

2.1 大鼠内关穴皮肤组织的结构特征

HE 染色表明，大鼠皮肤内关穴位处由上到下依

次分为表皮，真皮和皮下组织（图 1-a1 和图 1-a2），在大鼠皮肤内关穴从表皮到皮下组织，穿过真皮层和浅深筋膜带的垂直距离为 2.2 mm 左右。在真皮层中分布有毛囊和皮脂腺等，而皮下组织中分布有毛囊、脂肪、筋膜、血管和神经等。

Masson 染色进一步显示（图 1-b1 和图 1-b2），在大鼠皮肤内关穴位处的真皮、皮下组织中有蓝色的胶原纤维和红色的肌纤维，且胶原纤维主要围绕着皮脂腺、毛囊、脂肪、血管、神经、筋膜分布。与 HE 染色相同，内关穴皮肤亦包括表皮、真皮和皮下组织。



Hf. 毛囊; Sg. 皮脂腺; At. 脂肪组织; Ep. 表皮; Bv. 血管; Ne. 神经; Fal/Fa2. 筋膜浅层/深层。

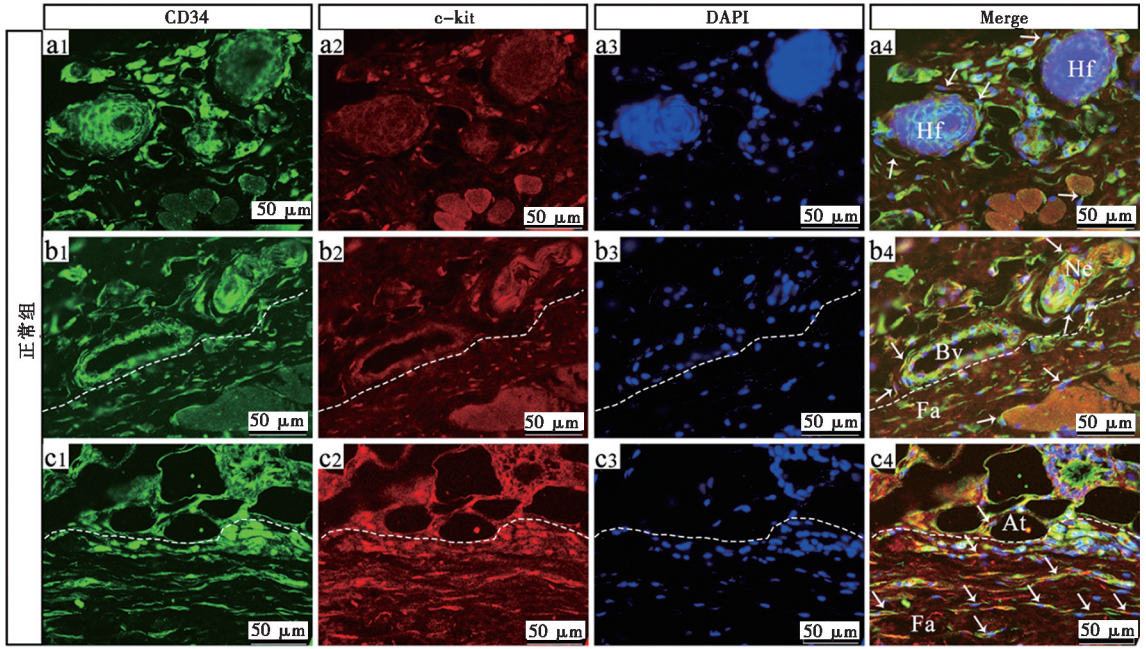
图 1 大鼠内关穴皮肤结构的 HE 和 Masson 染色

2.2 大鼠内关穴荧光双标的鉴定 TCs 及其对“逆灸”的响应

免疫荧光标记鉴定 TCs，常使用 CD34 & c-kit, CD34 & PDGFRA 或 CD34 & Vimentin 双重组合。本试验正常组在真皮层和皮下组织中的毛囊（图 2-a4）、血管（图 2-b4）、神经（图 2-b4）、脂肪周围和筋膜中（图 2-c4）均有双标 CD34（绿色）与 c-kit（红色）为阳性的 TCs，呈细长突起状，筋膜中

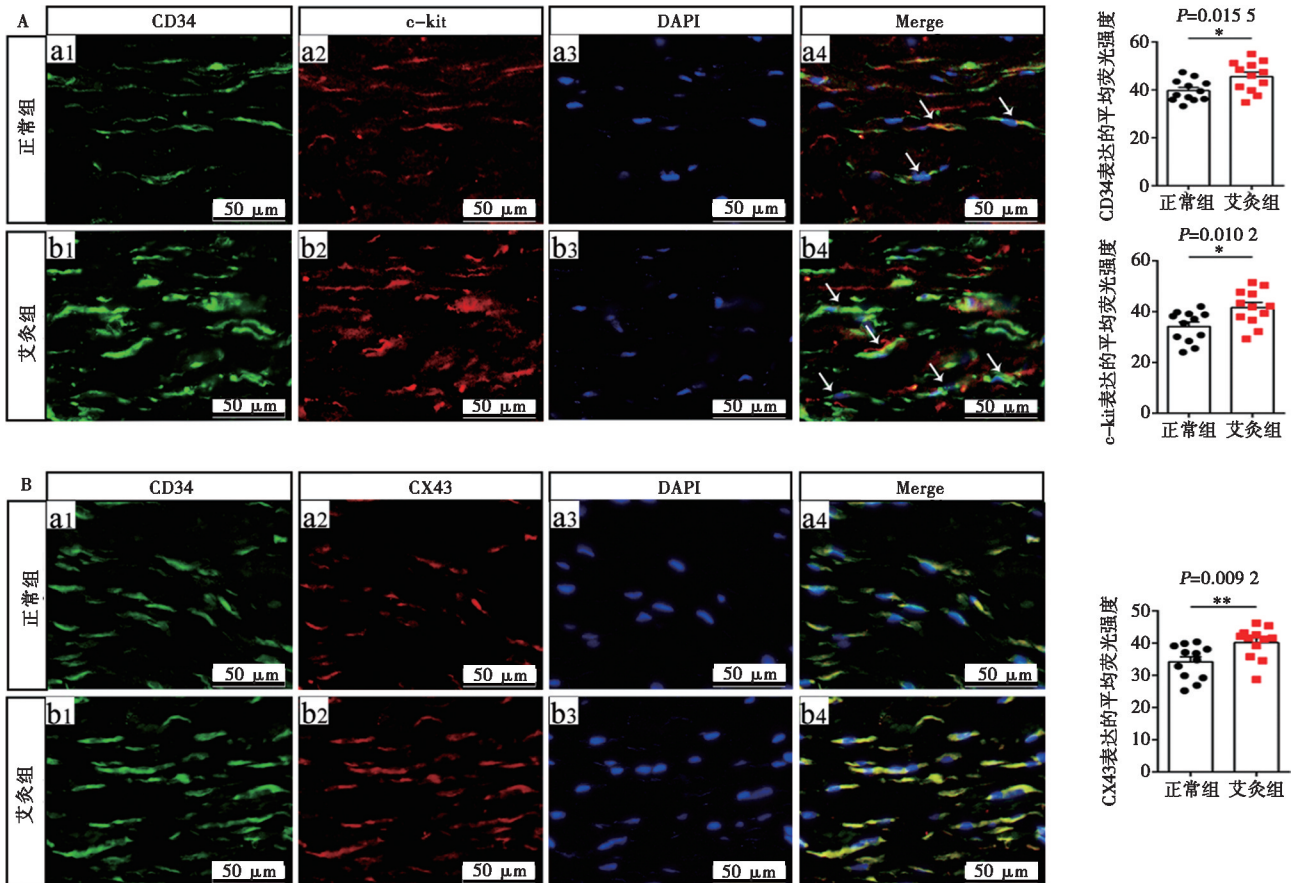
TCs 数量较多，且具有平行排列的特点（图 2-c4）。

艾灸预处理后，CD34 和 c-kit 荧光双标阳性的 TCs 大量分布在筋膜处（图 3）。通过半定量统计分析发现，在“逆灸”组筋膜中 CD34 和 c-kit 蛋白表达的平均荧光强度比正常组筋膜中的显著性增加 ($P < 0.05$)（图 3A），并且“逆灸”筋膜中的 CX43（细胞连接标记物）表达比正常组极显著升高 ($P < 0.01$)（图 3B）。



白色箭头代表免疫荧光双标为 CD34 (绿色) 和 c-kit (红色) 阳性的 TCs。a1~a4. 毛囊周围的 TCs; b1~b4. 血管、神经周围和筋膜中的 TCs; c1~c4. 脂肪和筋膜中的 TCs。Hf. 毛囊; Bv. 血管; Ne. 神经; At. 脂肪组织; Fa. 筋膜。

图 2 大鼠内关穴皮肤免疫荧光双标鉴定 TCs



A. CD34 (绿色) 和 c-kit (红色) 荧光双标为阳性的 TCs, 柱状图分别表示正常组与“逆灸”组 CD34 和 c-kit 阳性平均荧光强度的差异对比结果; B. 正常组与“逆灸”组 CD34 (绿色) 和 CX43 (红色) 荧光双标图, 柱状图表示正常组与“逆灸”组 CX43 表达差异。

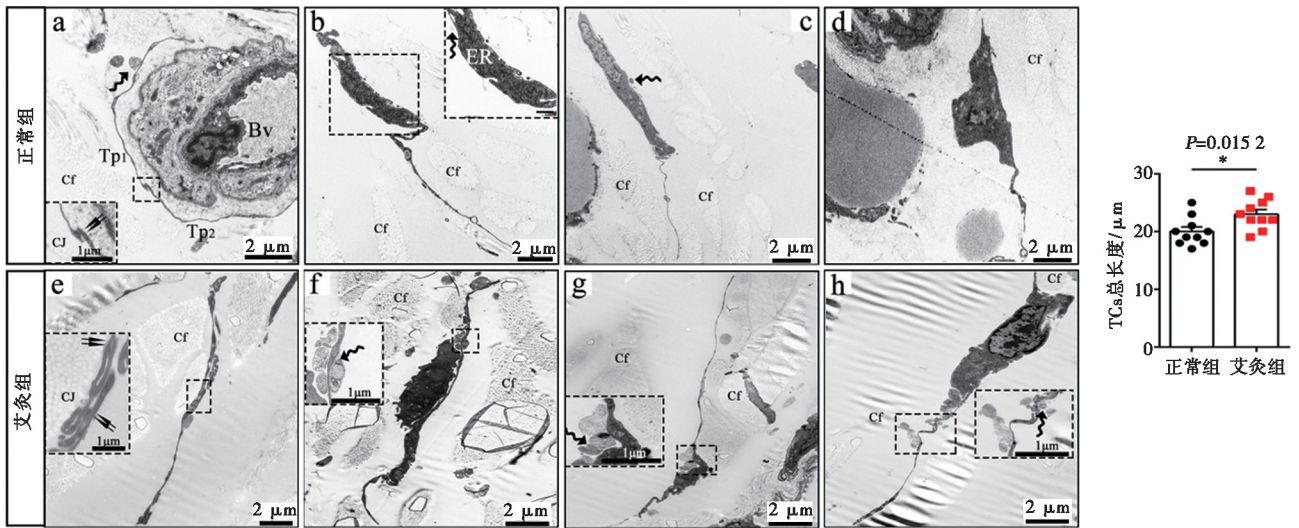
图 3 大鼠内关穴筋膜正常组和“逆灸”组中免疫荧光双标 TCs 和 CX43 表达差异

2.3 透射电镜观测 TCs 及其对“逆灸”的响应

超微形态结果显示(图4),正常大鼠内关穴皮肤筋膜中有 TCs 分布,这些 TCs 周围总是伴随着胶原纤维,并且 TCs 具有细长的突起(Tp),胞体中有丰富的内质网(图4b),在 TCs 周围有胞外囊泡分布,

Tp 与 Tp 之间形成了细胞连接(图4a)。

与正常组比较,艾灸预处理后皮肤内关穴 TCs 的总长度显著性增长($P < 0.05$,图4f~h),并且胞外囊泡和细胞连接也都增加,且细胞连接更发达(图4e)。



黑色直箭头表示 TCs; 黑色弯箭头表示远细胞分泌的胞外囊泡; 黑色双箭头表示的细胞连接; CJ. 细胞连接; Cf. 胶原纤维; ER. 内质网; Bv. 血管; Tp1/Tp2. TC 的突起。

图4 大鼠内关穴 TCs 及其对“逆灸”响应的透射电镜观察

3 讨论

TCs 一般位于组织器官的间质中,其细长的突起向外延伸^[19],鉴定 TCs 的方法是透射电镜和免疫荧光双重标记,其标记因子包含 CD34 & c-kit, CD34 & PDGFRA 或 CD34 & Vimentin 双重组^[9]。本研究发现,在内关穴位皮肤中由真皮层到皮下组织(浅筋膜),在毛囊、血管、神经、脂肪细胞、筋膜和胶原纤维束的周围均有荧光双标为 CD34 和 c-kit 阳性的 TCs 分布,并得到超微结构的验证。透射电镜结果进一步发现皮肤内关穴位的 TCs 之间具有细胞连接,周围聚集大量的胞外囊泡,显示出其广泛的联络性。

艾灸是中医上常用来预防与治疗疾病的有效方法,主要以温促通,利于气血运行^[20]。艾灸内关穴对心血管系统有特异性的预防保护作用^[6-8],因此在内关穴位靶向到心脏的路径上,必定存在响应艾灸效应的细胞通道实现信息的传递与交流^[21-22],但联络实质未知。中医理论认为,经络能够联络穴位与脏腑。有观点提出“TCs 可能为潜在的经络实质细胞”。本研究发现,艾灸预处理内关穴后,穴位处 TC 突起变长,胞外囊泡增加。这些变化表明,TCs 及其细长突起具有实现远距离信息传递的可能。目前已有研究

报道 TCs 分泌的外泌体(信号载体)可运送到多种细胞和基质中^[23]。进一步的荧光双标和透射电镜试验观察到,TCs 之间存在 CX43 阳性(缝隙连接标记物)的细胞连接,结合相关文献研究,证明 TCs 可实现细胞的单向和双向的信息传递(缝隙连接具有双向传导功能),利于细胞之间发生电偶联和代谢偶联^[24]。由此,TCs 在内关穴位的存在,以及艾灸激活 TCs 分泌胞外囊泡和细胞连接,说明 TCs 可能为艾灸作用的效应细胞,而且能够在皮肤内关穴传递信息,即 TCs 具有合乎中医经络实质的细胞学特点。与此同时,TCs 具有丰富的内质网和线粒体,加之分泌大量的胞外囊泡,是其进行能量和传递信息的保障。因此,光镜(免疫荧光双标法)和电镜技术均能显示 TCs 在内关穴皮肤中存在,并响应“逆灸”作用。试验证明,作为心包经的关键穴位,内关穴中的 TCs 有望成为艾灸预防心血管疾病机制研究的新靶位。

参考文献:

- [1] 王华. 针灸学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 184.
- [2] 许丞莹, 李瑞. 逆时针灸在冠心病一级预防的浅析 [J]. 环球中医药, 2018, 11 (1): 117-119.
- [3] 程洁, 李忠仁. 针灸治未病的古代文献研究 [J]. 江西中医学院

- 学报, 2002 (3): 49-51.
- [4] 何小琼. 逆时针灸治未病中医机理浅析 [J]. 江苏中医药, 2008 (10): 74-75.
- [5] 杨桦. 近十年艾灸预处理的实验研究进展 [J]. 中国医药导报, 2012, 9 (6): 10-12.
- [6] 王一茗, 孙忠人. 艾灸预处理对心肌缺血高血脂血症大鼠心肌 RyR2 mRNA 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26 (5): 1164-1167.
- [7] 赵宇辉, 孙忠人. 艾灸预处理对心肌缺血再灌注大鼠细胞凋亡及 HSP70 mRNA 表达的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2009, 28 (1): 36-38.
- [8] 黄河, 王晶, 方园, 等. 基于艾灸温通理论探讨艾灸内关穴预处理对大鼠 MIRI 保护机制的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40 (9): 1049-1053.
- [9] CRETOIU S M, POPESCU L M. Telocytes revisited [J]. *Biomol Concepts*, 2014, 5 (5): 353-369.
- [10] POPESCU L M, FAUSSONE M S. TELOCYTES—a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14 (4): 729-740.
- [11] HATTA K, HUANG M L, WEISEL R D, et al. Culture of rat endometrial telocytes [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16 (7): 1392-1396.
- [12] GHERGHICEANU M, POPESCU L M. Heterocellular communication in the heart: electron tomography of telocyte-myocyte junctions [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15 (4): 1005-1011.
- [13] 陈秋生. 中医经络实质研究的新进展 [J]. 针刺研究, 2021, 46 (6): 533-540.
- [14] BAI X, WU R, ZHANG Y, et al. Tissue micro-channels formed by collagen fibers and their internal components: cellular evidence of proposed meridian conduits in vertebrate skin [J]. *Microsc Microanal*, 2020, 26 (5): 1069-1075.
- [15] SHI Y, WU R, ZHANG Y, et al. Telocytes in different organs of vertebrates: potential essence cells of the meridian in chinese traditional medicine [J]. *Microsc Microanal*, 2020, 26 (3): 575-588.
- [16] MEI L, ZHU Q, BAI X, et al. Cellular evidence fortelocytes mediating electroacupuncture to ameliorate obesity in mice [J]. *Microsc Microanal*, 2023, 29 (5): 1746-1754.
- [17] 梁春花, 白雪兵, 杨敏, 等. 逆针“命门”和“腰俞”激活大鼠远细胞的形态机制 [J]. 畜牧与兽医, 2023, 55 (6): 59-68.
- [18] 张迎鑫, 杨敏, 白雪兵, 等. 羊膻穴 Telocytes 形态特征及其与周围结构的关系 [J]. 中国农业科学, 2023, 56 (7): 1417-1428.
- [19] CIONTEA S M, RADU E, REGALIA T, et al. C-kit immunopositive interstitial cells (Cajal-type) in human myometrium [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9 (2): 407-420.
- [20] 张建斌, 王玲玲, 胡玲, 等. 艾灸温通作用的理论探讨 [J]. 中国针灸, 2011, 31 (1): 51-54.
- [21] 林红伍, 李君正, 柴红焱, 等. 内关穴对心脏特异性治疗作用的探讨 [J]. 中国针灸, 1997 (6): 340-341.
- [22] 郑洪新. 中医基础理论 [M]. 4版. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [23] LUESMA M J, GHERGHICEANU M, POPESCU L M. Telocytes and stem cells in limbus and uvea of mouse eye [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17 (8): 1016-1024.
- [24] SMYTHIES J, EDELSTEIN L. Telocytes, exosomes, gap junctions and the cytoskeleton: the makings of a primitive nervous system? [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 7: 278.