

·基础研究·

基于 miR-146a 调控 NF-κB 信号通路探讨芍药甘草汤治疗颈型颈椎病兔颈后肌炎症损伤的作用机制

陈进城^{1,2},林 荣^{2,3},张圆芳⁴,董继泉^{2,3},柳维林^{2,3},
江 征^{2,3},陈少清^{2,3},王彦斌^{2,3},何 坚^{1,2,3*}

1 福建中医药大学附属康复医院,福建 福州 350003;

2 福建省康复技术重点实验室,福建 福州 350003;

3 福建中医药大学康复医学院,福建 福州 350122;

4 湖州市南浔区人民医院,浙江 湖州 313000

* 通信作者:何坚,E-mail:591003659@qq.com

收稿日期:2019-07-09;接受日期:2019-12-13

基金项目:国家自然科学基金项目(8157150620);福建省康复技术重点实验室开放课题(KF2019015);

福建省卫生计生委青年科研课题资助项目(2017-2-54)

DOI:10.3724/SP.J.1329.2020.03008

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 目的:从组织学及分子学层面探讨芍药甘草汤对兔颈后肌炎症损伤的作用及其可能的机制,为临床运用芍药甘草汤治疗颈型颈椎病提供实验依据。**方法:**将30只6月龄的新西兰白兔随机分为高剂量组、中剂量组、低剂量组、模型组、正常组,每组6只,参照课题组前期成功制备的寒湿型颈型颈椎病模型进行造模。造模8周后,高剂量组、中剂量组、低剂量组分别予以16、8、4 g/kg的芍药甘草汤进行灌胃治疗,正常组和模型组给予正常饲养。于治疗4周后用ELISA法检测5组血清中炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α的表达水平。HE染色法观察5组兔颈后肌组织形态的变化。Western blot法检测5组兔颈后肌组织中核转录因子(NF)-κB信号通路关键节点髓样分化因子88(MyD88)、NF-κB P65蛋白表达水平。RT-qPCR法检测5组兔颈后肌TLR4、miR-146a及其下游靶基因TRAF-6的mRNA表达水平。**结果:**芍药甘草汤可降低兔血清炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α的含量($P<0.01$);明显改善受炎症损伤的兔颈后肌细胞形态结构;降低MyD88、NF-κBP65蛋白的表达($P<0.05$);同时提高颈后肌组织中miR-146a的表达水平($P<0.05$),降低TLR4、TRAF-6的表达水平($P<0.05$)。**结论:**服用芍药甘草汤可以减轻颈型颈椎病模型兔颈后肌的炎症损伤,其作用机制可能是通过改变模型兔颈后肌组织中miR-146a的表达而抑制NF-κB信号通路释放TNF-α、IL-1β、IL-6等炎症因子,从而改善颈型颈椎病模型兔颈部炎症损伤,起到治疗颈型颈椎病的作用。

关键词 颈后肌;芍药甘草汤;miR-146a;NF-κB;炎症因子

颈型颈椎病是颈椎病的早期分型,伴随着其他类型颈椎病的发展过程^[1],颈部疼痛是其最常见的症状^[2]。成年人口中患病率为48.5%,长期使用电脑工作者的患病率为55%^[3-4]。IL-1β、IL-6、TNF-α等作为促炎细胞因子在颈椎退变发展过程中起重要作用,NF-κB(nuclear factor-κB)信号通路已被证明可以调节IL-1β、IL-6、TNF-α等促炎细胞因子和趋化

因子的转录,从而导致和加速颈椎的退变^[5-6]。miR-146a通过其重要的靶基因TRAF-6发挥抗炎功能,通过抑制靶基因TRAF-6的水平和减少TLR4下游NF-κB的表达从而减少炎症因子的水平^[7]。芍药甘草汤出自《伤寒论》。现代研究证明其具有抗炎、解痉之功效,被广泛应用于临床各种疾病^[8-9]。本课题组前期研究已证实芍药甘草汤对颈型颈椎病的疼

引用格式:陈进城,林荣,张圆芳,等.基于miR-146a调控NF-κB信号通路探讨芍药甘草汤治疗颈型颈椎病兔颈后肌炎症损伤的作用机制[J].康复学报,2020,30(3):206-211.

CHEN J C, LIN R, ZHANG Y F, et al. Effect of Shaoyao Gancao decoction on inflammatory injury of posterior cervical muscle based on miR-146a regulation of NF-κB signaling pathway [J]. Rehabilitation Medicine, 2020, 30(3): 206-211.

DOI:10.3724/SP.J.1329.2020.03008

痛和痉挛均具有显著的疗效^[10]。为探究芍药甘草汤对颈型颈椎病炎症损伤的作用,本研究通过建立颈椎病兔模型,观察芍药甘草汤对兔颈后肌炎症损伤的作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

选取6月龄SPF级新西兰白兔(3.0~3.5 kg)38只,雌雄各半,由福建中医药大学实验动物中心代购,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0011。

1.2 试剂及仪器

苏木素伊红染液(碧云天,美国);IL-1β、IL-6、TNF-α(ELISA)试剂盒(上海西唐生物);RT-qPCR试剂盒(艾德莱,北京);兔子固定装置(苏州苏杭科技器材有限公司);酶标仪(Tecan,瑞士);包埋机(Leica,德国);电子显微镜(Leica,德国);PCR分析仪(Bio-Rad,美国);Anti-NFκB Antibody,p65 sub-unit,active subunit,clone 12H11(Merck Millipore,美国);Anti-MyD88 Antibody(aa263-273)(Isbio,美国)。

1.3 模型的建立与评估

1.3.1 兔颈型颈椎病模型的建立 参照张圆芳等^[11]寒湿型兔颈型颈椎病模型进行造模。将兔子剃除颈部毛发后置于兔子固定装置中,将其颈部前屈45°固定,于颈后放上平整的冰袋,冰袋两端固定在装置上,每次5 h,每天1次,连续干预8周后将动物置于室温25~28 °C中饲养,自由饮食、饮水。

1.3.2 兔颈型颈椎病模型的评估 造模后第2天,兔耳源静脉采血,观察兔血清中炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α的表达水平;观察兔颈肌的僵硬程度。

1.4 实验分组与给药

1.4.1 分组 将38只6月龄的新西兰白兔按照随机数字表法分为正常组6只和造模组32只,造模后剔除不合格的和造模中死亡的兔子,再随机分为模型组、高剂量组、中剂量组、低剂量组,每组6只。

1.4.2 给药 芍药甘草汤方由白芍12 g、炙甘草12 g组成;所用药材购自福建中医药大学承创堂河洛中医馆。按此量(24 g)为60 kg成人每日临床用药有效量计算,按人与兔体质量系数折算公式进行换算:

$$\text{每兔日服药量} = \frac{\text{人每千克体质量服药量} \times \text{换算系数}}{20} \times \text{每只兔子体质量}$$

给兔子服用高、中、低剂量的芍药甘草汤分别是成人用药等效剂量的2、1、0.5倍,故根据公式算得高剂量组、中剂量组、低剂量组兔子每千克体质

量用药量分别为16、8、4 g/kg。每周对兔子测量体质量1次,根据兔子的具体体质量和每兔日服药量公式计算出每只兔子每天所需药材量,进而计算出每组兔子的日需药材量。将药材用自动煎药机常规煎法,再用小火浓缩,每剂中药均浓缩煎至160 mL,每次80 mL,每日2次;正常组和模型组予以等量的生理盐水,连续给药4周。

1.5 取材及样本处理

1.5.1 血清标本的采集 分别于造模前1天上午、造模结束后第2天上午和芍药甘草汤干预结束后第2天上午,对5组兔子均进行耳缘静脉采血,并收集于标记好的采血管中,及时于4 °C,转速3 000 r/min,进行离心,离心30 min后吸取血清上清液,-80 °C冰箱保存。

1.5.2 颈后肌组织标本的采集 采用空气栓塞法处死动物,后迅速取出颈后肌组织,一般取C₃₋₆棘突旁约2 cm处的肌肉部分约1 cm³。将取下的组织分2个部分,一部分投入装有4%多聚甲醛的EP管中固定,用作HE染色;另一部分置于EP管中,封盖,-80 °C冰箱保存,用作RT-qPCR检测。

1.6 ELISA法检测血清中炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α的表达水平

5组血清按ELISA的说明书进行操作;酶标仪吸收450 nm波长检测A值。各孔检测的A值减去空白组的A值为各孔实际A值,来反映血清中IL-1β、IL-6、TNF-α的含量。

1.7 HE染色观察兔颈后肌组织形态的变化

将取下的颈后肌组织放入4%多聚甲醛中固定48 h,后放入10%EDTA脱钙,室温脱钙60 d。脱钙完成后,进行石蜡包埋,制作石蜡切片,切片厚度为5 μm,常规脱蜡后,苏木素染色5 min,自来水冲洗30 s,1%盐酸分色3 s后,再用自来水冲洗30 s,PBS返蓝30 min,再用苏木素复染1 s。对每张切片依次进行常规逆梯度酒精脱水,最后用中性树胶封片,常温晾干,显微镜下观察兔颈后肌组织形态的变化。

1.8 Western blot法检测兔颈后肌组织蛋白的表达

收集颈后肌组织,将其在液氮中迅速研磨成细致粉末,研磨后加入蛋白裂解液按1 mg:3 μL进行裂解,每20 min震荡1次,2 h后取混合液至于1.5 mL离心管中4 °C 14 000 r/min离心30 min,收集上清液,吸取上清液200 μL置于0.6 mL离心管中,加入50 μL蛋白上样缓冲液;在95 °C下变性5 min,根据BCA蛋白定量结果上样,通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶分离并转移至PVDF膜,转膜后用高

效封闭液室温封闭 30 min。分别加入针对 β -actin(1:10 000)、NF- κ B P65(1:800)、MyD88(1:1 500)的一抗 4 ℃孵育过夜。TBST 洗涤缓冲液洗 3 次,每次 10 min,加入二抗,在室温下保持 2 h,TBST 洗涤缓冲液洗 3 次,每次 10 min; 使用 ImageQuant LAS 4000 微型化学发光成像分析系统,并使用 ImageJ 软件分析条带密度,计算蛋白相对表达量。

1.9 RT-qPCR 法检测兔颈后肌组织中 miR-146a、TLR4 及 TRAF-6 的 mRNA 表达

从 -80 ℃冰箱中取出兔颈后肌标本组织,液氮研磨成细粉后,各取 75 mg 粉末于 1.5 mL EP 管中,加入 1 mL Lysis/Binding buffer、200 μ L 氯仿、无水乙醇等混匀搅拌,将混合液每次以 700 μ L 加入至一个吸附柱 RA 中,多次离心后,取出吸附柱 RA,提取总 RNA。总 RNA 经处理后,根据逆转录试剂盒说明书将纯化的 RNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增。最后在荧光定量仪器中根据荧光定量试剂盒进行操作,设置的反应条件为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 10 s,60 ℃ 34 s。

表 1 干预前(造模后)5 组血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of expression levels of serum inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α in five groups before intervention (after modeling) ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常组	6	3.84±0.10	2.69±0.13	4.55±0.08
模型组	6	13.46±0.18 ¹⁾	9.02±0.14 ¹⁾	9.41±0.40 ¹⁾
低剂量组	6	13.67±0.23 ¹⁾	8.88±0.17 ¹⁾	9.34±0.34 ¹⁾
中剂量组	6	13.77±0.20 ¹⁾	8.80±0.27 ¹⁾	9.30±0.39 ¹⁾
高剂量组	6	13.60±0.21 ¹⁾	8.83±0.25 ¹⁾	9.36±0.31 ¹⁾

注:与正常组比较,1) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, 1) $P<0.01$.

2.2 ELISA 法检测 5 组血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平

1.10 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理。计量资料服从正态分布均采用($\bar{x}\pm s$)表示,选用单因素方差分析检验组间差异的显著性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 模型评估

在整个造模操作过程中,兔颈后肌肉组织慢慢从柔软变得痉挛、僵硬;造模结束后,兔颈后肌肉组织出现更明显的条索状肌痉挛症状,证明本次兔颈型颈椎病模型的成功建立。

造模结束后,除正常组在造模前后没有明显变化外,其他 5 组动物的相应血清炎症因子表达水平均比造模前显著升高,且造模 4 组与正常组相比,差异均有统计学意义($P<0.01$),而造模 4 组之间比较差异均无统计学意义($P>0.05$),这也证明了本次兔颈型颈椎病模型的成功建立。见表 1。

表 2 干预后 5 组血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of serum inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression in five groups after intervention ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常组	6	3.84±0.09	2.69±0.13	4.55±0.08
模型组	6	14.75±0.59 ¹⁾	9.27±0.30 ¹⁾	9.69±0.23 ¹⁾
低剂量组	6	11.38±0.45 ²⁾	6.60±0.33 ²⁾	8.17±0.31 ²⁾
中剂量组	6	7.21±0.45 ²⁽³⁾	5.37±0.29 ²⁽³⁾	6.59±0.30 ²⁽³⁾
高剂量组	6	4.84±0.38 ²⁽³⁾⁴⁾	3.30±0.26 ²⁽³⁾⁴⁾	5.22±0.16 ²⁽³⁾⁴⁾

注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.01$;与低剂量组比较,3) $P<0.01$;与中剂量组比较,4) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, 1) $P<0.01$; Compared with the model group, 2) $P<0.01$; Compared with the low dose group, 3) $P<0.01$; Compared with the middle dose group, 4) $P<0.01$.

见表 2。

表 2 干预后 5 组血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of serum inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression in five groups after intervention ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常组	6	3.84±0.09	2.69±0.13	4.55±0.08
模型组	6	14.75±0.59 ¹⁾	9.27±0.30 ¹⁾	9.69±0.23 ¹⁾
低剂量组	6	11.38±0.45 ²⁾	6.60±0.33 ²⁾	8.17±0.31 ²⁾
中剂量组	6	7.21±0.45 ²⁽³⁾	5.37±0.29 ²⁽³⁾	6.59±0.30 ²⁽³⁾
高剂量组	6	4.84±0.38 ²⁽³⁾⁴⁾	3.30±0.26 ²⁽³⁾⁴⁾	5.22±0.16 ²⁽³⁾⁴⁾

注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.01$;与低剂量组比较,3) $P<0.01$;与中剂量组比较,4) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, 1) $P<0.01$; Compared with the model group, 2) $P<0.01$; Compared with the low dose group, 3) $P<0.01$; Compared with the middle dose group, 4) $P<0.01$.

2.3 HE 染色观察 5 组颈后肌形态的变化

正常组肌细胞核椭圆形,颈肌纤维排列有序;模型组肌细胞变形,肌纤维断裂,断裂处出现大量炎症细胞;低剂量组细胞核数量较模型组增多;中

剂量组细胞核增加更明显,肌纤维断裂减少;高剂量组细胞核较多,炎症细胞比中剂量组的更少。见图 1。

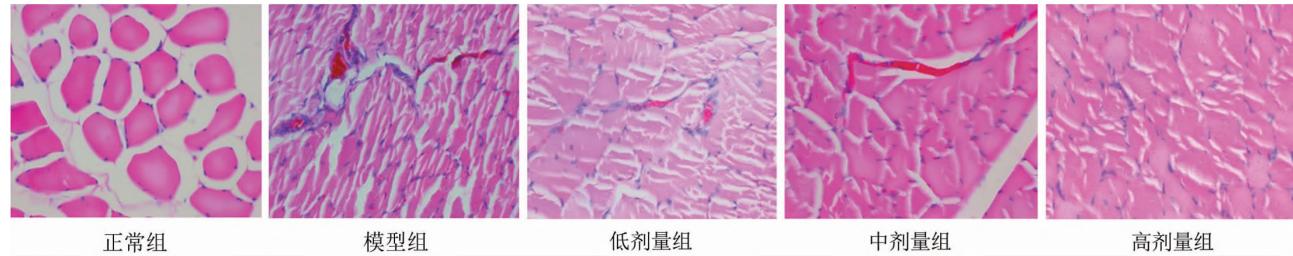


图 1 5 组颈后肌形态变化 ($\times 400$)

Figure 1 Morphological changes of the posterior cervical muscle in five groups ($\times 400$)

2.4 Western blot 法检测兔颈后肌组织蛋白的表达

见表 3 和图 2。

表 3 干预后 5 组颈后肌组织中 MyD88、NF-κB P65 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Protein expression of MyD88 and NF- κ B P65 in posterior cervical muscles in five groups after intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MyD88	NF-κB P65
正常组	6	0.35±0.06	0.63±0.04
模型组	6	3.25±0.33 ¹⁾	2.84±0.21 ¹⁾
低剂量组	6	2.40±0.30 ²⁾	2.03±0.01 ²⁾
中剂量组	6	1.44±0.11 ^{2,3)}	1.36±0.20 ^{2,3)}
高剂量组	6	0.38±0.06 ^{2,3,4)}	0.64±0.05 ^{2,3,4)}

注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.05$;与低剂量组比较,3) $P<0.05$;与中剂量组比较,4) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, 1) $P<0.01$; Compared with the model group, 2) $P<0.05$; Compared with the low dose group, 3) $P<0.05$; Compared with the middle dose group, 4) $P<0.01$.

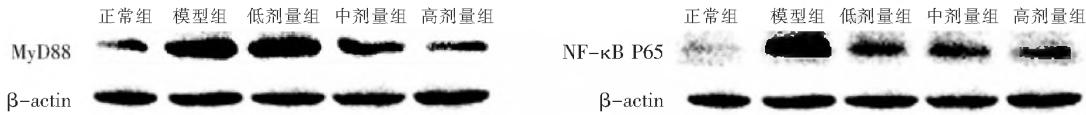


图 2 干预后 5 组颈后肌组织中 MyD88、NF-κB P65 蛋白表达

Figure 2 Protein expression of MyD88 and NF-κB P65 in posterior cervical muscles in five groups after intervention

皮生长因子的产生,促进神经血管的生长,它还促进基质降解和增强物质 p,这表明 TNF-α 可能与神经痛苦反应或促进结构中断相关^[19]。KISHIMOTO 等^[20]提出,IL-6 是一种参与细胞增殖和分化、维持免疫稳态、巨噬细胞功能等关键功能的多功能细胞因子。经证实,IL-6 作为促炎细胞因子,可导致继发性损伤^[21-22]。本研究对血清样本进行了评估,发现

2.5 RT-qPCR 法检测兔颈后肌中 miR-146a、TLR4 及 TRAF-6 的 mRNA 表达

见表 4。

3 讨 论

颈型颈椎病属于颈椎病的早期分型,主要有酸胀、疼痛等不适,少数可伴有上肢的感觉异常^[12-13]。研究发现,当颈前屈时,颈椎所承受的压力增大,容易使其损伤、退变^[14]。本研究参照张圆芳等^[11]的方法建立兔颈型颈椎病模型,操作简便,成功率高,与临床实际基本相符。研究发现长期低头姿势能够引起兔颈椎炎症损伤的产生,而炎症反应是引起颈椎退变的重要原因之一^[15]。IL-1β 被认为是最重要的细胞因子,具有强烈的促炎活性,通过刺激产生多种促炎症介质,如细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶^[16-17]。此外,IL-1β 通过诱导细胞衰老凋亡促进氧化应激并加速细胞外基质的降解,从而加速颈椎退变^[18]。TNF-α 的水平与颈椎病患者的颈椎疼痛密切相关,TNF-α 通过增加神经生长因子和血管内



与模型组相比,芍药甘草汤干预组中血清炎症因子比模型组明显降低,这说明芍药甘草汤能明显降低兔血清中炎症因子的表达,从而抑制炎症反应。

NF-κB 存在于不同类型的细胞中,是一个重要的转录调节因子,影响着细胞的生长、分化、凋亡等^[23]。病毒、细菌、促炎性细胞因子等都会刺激 NF-κB 信号通路,引起 NF-κB 信号通路的激活,进而导

表 4 干预后 5 组颈后肌组织中 miR-146a、TLR4、TRAF-6 表达 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Expression of miR-146a, TLR4 and TRAF-6 in posterior cervical muscle after intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-146a	TLR4	TRAF-6
正常组	6	1.00±0.03	1.00±0.07	0.99±0.03
模型组	6	0.04±0.01 ¹⁾	14.30±0.50 ¹⁾	25.16±0.92 ¹⁾
低剂量组	6	0.20±0.02 ²⁾	9.21±0.35 ²⁾	11.92±0.33 ²⁾
中剂量组	6	0.47±0.02 ²⁽³⁾	5.83±0.28 ²⁽³⁾	5.18±0.33 ²⁽³⁾
高剂量组	6	0.99±0.05 ²⁽³⁾⁴⁾	2.08±0.26 ²⁽³⁾⁴⁾	2.65±0.20 ²⁽³⁾⁴⁾

注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.05$;与低剂量组比较,3) $P<0.05$;与中剂量组比较,4) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, 1) $P<0.01$; Compared with the model group, 2) $P<0.05$; Compared with the low dose group, 3) $P<0.05$; Compared with the middle dose group, 4) $P<0.01$.

致一系列相关疾病的发生。NF-κB 信号通路对调控颈椎退变中的炎症反应起到重要作用,在退变的颈后肌组织中,NF-κB 信号通路被高表达的 IL-6、IL-1β、TNF-α 所调控,引起颈后肌细胞凋亡、蛋白聚糖降解,加剧了颈后肌的退行性病变^[24],当抑制 NF-κB 活性后,能有效降低炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的表达水平^[25]。

miRNA 是一类小的非编码 RNA 分子,可以作为许多途径和生物过程(包括炎症反应)的调节剂发挥关键作用。miR-146a 作为协调免疫和炎症信号传导的最重要的 miRNA 之一,通常通过其公认的靶基因 IL-1 受体相关激酶 1(IRAK1)和肿瘤坏死因子(TNF)受体相关因子 6(TRAF6)发挥作用^[7,26-27],活化的 IRAK1 和 TRAF6 可引起 NF-κB 核位移,促进炎症介质的释放。研究发现,上调 miR-146a 细胞后可负性调节炎症介质的释放^[7]。TLR4 是一种膜结合蛋白,激活的 TLR4 可募集下游细胞内 MyD88 和 TRIF 蛋白,MyD88 通过 miR-146a 的靶基因形成 MyD88-IRAKs-TRAF-6 复合体参加信号传导,最终促进下游 NF-κB 通路的激活,释放炎症因子^[28]。本实验 RT-qPCR 法检测显示,干预后,高、中、低剂量组 miR-146a 的表达均升高,TLR4、TRAF-6 的表达均降低,说明芍药甘草汤可以提高兔颈后肌中 miR-146a 的表达,降低 TLR4 和 TRAF-6 的表达,且高剂量效果最佳。

4 结 论

芍药甘草汤减轻兔颈后肌的炎症损伤,其作用机制可能是兔颈后肌组织中 miR-146a 通过抑制其重要的靶基因 TRAF-6 的水平减少 TLR4 下游 NF-κB 信号通路释放 IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎症因子。

参考文献

[1] 南登魁,黄晓琳. 实用康复医学[M]. 北京:人民卫生出版社,

- 2009:1-3.
- [2] VOGT M T, CAWTHON P M, KANG J D, et al. Prevalence of symptoms of cervical and lumbar stenosis among participants in the osteoporotic fractures in men study [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(13):1445-1451.
 - [3] KLUSSMANN A, GEBHARDT H, LIEBERS F, et al. Musculoskeletal symptoms of the upper extremities and the neck: A cross-sectional study on prevalence and symptom-predicting factors at visual display terminal (VDT) workstations [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2008, 9:96.
 - [4] FEJER R, KYVIK K O, HARTVIGSEN J. The prevalence of neck pain in the world population: a systematic critical review of the literature [J]. Eur Spine J, 2006, 15(6):834-848.
 - [5] MARTA M, JIAN N, PING F, et al. Pillars article: IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. Science. 1997, 278:1612-1615 [J]. J Immunol, 2013, 190(1):16-19.
 - [6] WANG P, QIU W, DUDGEON C, et al. PUMA is directly activated by NF-κB and contributes to TNF-α-induced apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(9):1192-1202.
 - [7] SABA R, SORENSEN D L, BOOTH S A. MicroRNA-146a: A dominant, negative regulator of the innate immune response [J]. Front Immunol, 2014, 5:578.
 - [8] WANG J X, YANG X, ZHANG J J, et al. Effects of Shaoyao Gancao decoction on contents of amino acids and expressions of receptors in brains of spastic paraparesis rats [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2016, 41(6):1100-1106.
 - [9] SUI F, ZHOU H Y, MENG J, et al. A Chinese herbal decoction, Shaoyao-Gancao Tang, exerts analgesic effect by down-regulating the TRPV1 channel in a rat model of arthritic pain [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(7):1363-1378.
 - [10] 何坚,陈进城,陈水金. 芍药甘草汤治疗颈型颈椎病 60 例[J]. 福建中医药, 2014, 45(1):37-38.
 - [11] 张圆芳,何坚,柳维林,等. 寒湿型颈型颈椎病模型的建立与评估[J]. 福建中医药, 2017, 48(1):26-27.
 - [12] 李冰娜. 循证健康教育在社区医院颈椎病患者治疗中的应用[J]. 中国全科医学, 2012, 15(18):2095-2097.
 - [13] 李子腾,刘佳,温玉洁,等.《内经》毛刺法治疗颈型颈椎病对照观察[J]. 针灸临床杂志, 2019, 35(4):33-36.
 - [14] HAYASHI T, DAUBS M D, SUZUKI A, et al. The compensatory relationship of upper and subaxial cervical motion in the pres-

- ence of cervical spondylosis [J]. Clin Spine Surg, 2016, 29(4): E196–E200.
- [15] NAGASHIMA H, MORIO Y, YAMANE K, et al. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 beta, and interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of patients with cervical myelopathy and lumbar radiculopathy [J]. Eur Spine J, 2009, 18(12): 1946–1950.
- [16] DINARELLO C A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases [J]. Blood, 2011, 117(14): 3720–3732.
- [17] 陈俊, 张世茂, 许惠凤, 等. 颈椎病治疗仪对颈椎病模型大鼠颈椎骨组织中 Ca、P 及血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的影响 [J]. 福建中医药, 2018, 49(4): 44–46.
- [18] YANG W, YU X H, WANG C, et al. Interleukin-1 β in intervertebral disk degeneration [J]. Clin Chim Acta, 2015, 450: 262–272.
- [19] DEVINA P, FREEMONT A J, HOYLAND J A. Expression and regulation of neurotrophins in the nondegenerate and degenerate human intervertebral disc [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): R99.
- [20] KISHIMOTO T, AKIRA S, NARAZAKI M, et al. Interleukin-6 family of cytokines and gp130 [J]. Blood, 1995, 86(4): 1243–1254.
- [21] GRUOL D L. IL-6 regulation of synaptic function in the CNS [J]. Neuropharmacology, 2015, 96(Pt A): 42–54.
- [22] 陈后煌, 李西海, 李俐, 等. 电针后血清对脂多糖诱导的软骨细胞 IL-1 β 、IL-6 表达的影响 [J]. 福建中医药, 2018, 49(1): 50–52.
- [23] CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X. New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation [J]. Am J Pathol, 2001, 159(2): 387–397.
- [24] JIANRU W, DESSISLAVA M, D GREG A, et al. TNF- α and IL-1 β promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc [J]. J Biol Chem, 2011, 286(46): 39738–39749.
- [25] 易威威, 温亚枫, 刘沛, 等. NF- κ B 抑制剂对脂多糖刺激的退变人椎间盘髓核细胞炎症因子表达的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(8): 755–759.
- [26] ZHAO J L, RAO D S, BOLDIN M P, et al. NF- κ B dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(22): 9184–9189.
- [27] HOU J, WANG P L. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2 [J]. J Immunol, 2009, 183(3): 2150–2158.
- [28] KUANG X, HUANG Y, GU H F, et al. Effects of intrathecal epigallocatechin gallate, an inhibitor of Toll-like receptor 4, on chronic neuropathic pain in rats [J]. E J Pharmacol, 2012, 676(1/3): 51–56.

Effect of Shaoyao Gancao Decoction on Inflammatory Injury of Posterior Cervical Muscle Based on miR-146a Regulation of NF-κB Signaling Pathway

CHEN Jincheng^{1,2}, LIN Rong^{2,3}, ZHANG Yuanfang⁴, DONG Jiquan^{2,3}, LIU Weilin^{2,3}, JIANG Zheng^{2,3}, CHEN Shaoqing^{2,3}, WANG Xiangbin^{2,3}, HE Jian^{1,2,3*}

¹ Rehabilitation Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China;

² Fujian Provincial Key Laboratory of Rehabilitation Technology, Fuzhou, Fujian 350003, China;

³ College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

⁴ People's Hospital of Nanxun District, Huzhou, Zhejiang 313000, China

*Correspondence: HE Jian, E-mail: 591003659@qq.com

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of *Shaoyao Gancao* decoction on the injury of rabbit cervical posterior myoinflammation and its possible mechanism from histology and molecular level, and provided experimental basis for the clinical application of *Shaoyao Gancao* decoction in the treatment of cervical spondylopathy. **Methods:** A total of thirty 6-month-old New Zealand white rabbits were randomly divided into high dose group, medium dose group, low dose group, model group and normal group, with 6 rabbits in each group. The model was constructed according to the cold and wet rabbit cervical spondylopathy model prepared by the research group. Eight weeks after modeling, high-dose, medium-dose, and low-dose groups were given 16, 8, 4 g/kg *Shaoyao Gancao* decoction, and the normal and model groups were fed normally. The levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum were detected by ELISA after 4 weeks of treatment. The changes of cervical muscle morphology were observed by HE staining. Western blot was used to detect the expression of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and nuclear factor (NF)- κ B P65 protein in the key nodes of rabbit posterior cervical muscle tissue. The expression levels of miR-146a, TLR4 and TRAF-6 in posterior cervical muscle of rabbits were detected by RT-qPCR. **Results:** *Shaoyao Gancao* decoction could reduce the contents of serum inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α in rabbits ($P<0.01$). It can obviously improve the morphology and structure of the muscle cells of the rabbit posterior neck damaged by inflammation. The expression levels of MyD88, NF- κ B P65 were decreased ($P<0.05$). At the same time, the expression level of miR-146a in cervical posterior muscle tissue was increased ($P<0.05$), and the expression levels of TLR4 and TRAF-6 were decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** *Shaoyao Gancao* decoction can reduce the inflammation and injury of the posterior cervical muscle in rabbits. The mechanism may be that by changing the expression of miR-146a in the posterior cervical muscle tissue of rabbits with cervical spondylosis, it inhibits the release of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and other inflammatory factors in the NF- κ B signaling pathway, so as to improve the inflammatory injury of the neck and treat neck type of cervical spondylosis.

KEY WORDS posterior cervical muscle; *Shaoyao Gancao* decoction; miR-146a; NF- κ B; inflammatory factor

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.03008