

电针风池穴对颈肌慢性损伤大鼠肌卫星细胞及TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响

黄于婷¹, 陈佳彦¹, 阚宇¹, 方燕平¹, 王金伟², 郑林遥¹, 景向红³, 廖军^{1*}

1 福建中医药大学针灸学院, 福建 福州 350122;

2 四川省卫生康复职业学院, 四川 自贡 643000;

3 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700

* 通信作者: 廖军, E-mail: 2007065@fjtem.edu.cn

收稿日期: 2023-02-20; 接受日期: 2023-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074181); 福建省自然科学基金项目(2023J01151); 福建省教育厅中青年教师项目(JAT190233); 福建中医药大学校管课题(X2019010-人才专项); 福建省康复重点实验室联合福建省康复产业研究院开放课题(2015Y2001)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.05006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



摘要 目的:观察电针风池穴对颈肌慢性损伤大鼠肌卫星细胞、生肌决定因子(MyoD)、增殖细胞核抗原(PCNA)、Toll样受体-4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)及核转录因子(NF- κ Bp65)蛋白表达的影响,探讨电针促进肌肉慢性损伤修复的可能机制。**方法:**从45只Wistar大鼠中选取10只作为空白组,将剩余大鼠造模后按照随机数字表法分为模型组、电针组和美洛昔康组,每组10只(5只造模不成功)。采用长时间低头固定并注射高渗盐水的方法复制大鼠颈肌慢性损伤模型。造模3个月后,使用超声诊断仪观察大鼠颈后肌的形态学变化;用肌电生理检测验证模型是否成功。电针组电针双侧风池穴,每次25 min,每日1次,连续治疗10 d为1个疗程,疗程之间间隔2 d,共治疗2个疗程。干预结束后,取各组大鼠颈后肌组织,在电镜下观察颈后肌组织的形态学变化;采用免疫组织化学法检测PCNA、MyoD、TLR4、MyD88及NF- κ Bp65蛋白的含量。**结果:**①形态学检测:与空白组相比,模型组的超声诊断结果显示大鼠颈后肌组织不连续,厚度明显变薄;肌电生理检测结果表明模型组肌电波幅及频率较空白组明显衰减;与空白组相比,模型组的肌肉电镜结果显示肌原纤维结构的排列不连续,部分线粒体肿胀,肌纤维和肌节之间有断裂,并有空泡现象存在;与模型组相比,电针组肌原纤维清晰可见,肌丝横断面呈点状分布,肌节和肌浆膜完整,个别线粒体肿胀,其中少量与肌原纤维的断裂处有空泡;美洛昔康组肌原纤维结构偶见不规则,在肌原纤维的断裂处有空泡,出现少量的线粒体肿胀。②免疫组织化学:与空白组相比,模型组中的PCNA、MyoD的表达呈现弱阳性,TLR4、MyD88、NF- κ Bp65的蛋白表达量明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,电针组与美洛昔康组中PCNA和MyoD的蛋白表达量明显增加($P < 0.05$),TLR4、MyD88、NF- κ Bp65的蛋白表达量明显减少($P < 0.05$)。电针组与美洛昔康组中PCNA、MyoD、TLR4、MyD88、NF- κ Bp65的蛋白表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**电针风池穴治疗颈肌慢性损伤,其途径可能与促进肌卫星细胞的增殖分化有关,其机制可能通过调节TLR4/MyD88/NF- κ B信号转导通路来实现。

关键词 颈肌慢性损伤;电针;肌卫星细胞;MyoD;TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路

慢性肌肉损伤作为颈椎病发病的首要常见原因,在颈椎病的发病过程中其发病率高达50%~

70%,长期低头伏案工作人群发病率更高,给社会带来了沉重的医疗和经济负担^[1]。肌卫星细胞(mus-

引用格式:黄于婷,陈佳彦,阚宇,等.电针风池穴对颈肌慢性损伤大鼠肌卫星细胞及TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响[J].康复学报,2023,33(5):428-435.

HUANG Y T, CHEN J Y, KAN Y, et al. Effects of electroacupuncture at Fengchi Acupoint on myosatellite cells and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in chronic cervical muscle injury rats [J]. Rehabil Med, 2023, 33(5): 428-435.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2023.05006

cle satellite cells, MSC)作为成体专能干细胞,拥有较强的自我更新以及增殖分化能力,能够在肌肉损伤时,在生肌决定因子(myogenic determine factor, MyoD)的作用下,从静息状态进入细胞周期,进行大规模的细胞分裂和增殖,达到促进骨骼肌的损伤与修复的功能^[2-4]。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)作为细胞增殖的标记蛋白,能反映肌卫星细胞的增殖活性^[5]。骨骼肌损伤后,机体立即发生一种自我的保护机制,其首发症状即是炎症反应。炎症反应可以清除坏死组织,释放肌肉生长因子以及相关的促炎细胞因子,从而达到促进肌纤维细胞再生的功能。基础实验研究发现,有许多炎症细胞及因子参与颈型颈椎病的损伤与修复过程^[6]。Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)被证实可介导组织免疫炎症反应过程。Toll样受体-4(toll-like receptor 4, TLR4)可以启动髓样分化因子88(myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)所介导的信号通路。炎性细胞生物因子主要通过MyD88的依赖性途径介导而起作用,当TLRs的细胞外区段识别到相对应的特异配体之后,引起特异的TIR结构域出现改变,结合MyD88的羧基端并互相作用。MyD88活化后可诱使核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)激活, NF- κ B信号通路中的关键节点NF- κ Bp65与相关炎症因子的表达密切相关,可促进炎症信号及趋化因子释放,并招募炎症反应细胞到病灶局部,介导局部免疫炎症反应^[7-8]。因此推测,TLR4/MyD88/NF- κ B可能参与骨骼肌细胞损伤修复的发生、发展过程。

本实验拟通过电针干预颈肌慢性损伤大鼠模型,探讨电针对肌细胞损伤修复中肌卫星细胞的影响,并对其与TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的相关性进行研究,探讨肌卫星细胞的增殖分化与炎症因子的相关性,阐释电针修复颈肌慢性损伤的可能机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

1月龄SPF级雄性Wistar大鼠45只,体质量80~120 g,由福建中医药大学动物实验中心提供[实验动物生产许可证号:SYXK(闽)2018-001]。饲养于福建中医药大学动物实验中心,温度22~25℃,湿度45%~65%,12 h/12 h明暗周期,自由饮水。本实验操作严格遵守中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规

定,并通过福建中医药大学动物伦理委员会审批(审批号:2021040)。

1.2 主要试剂

多聚甲醛(Sigma-alorich),枸橼酸缓冲液、DAB(美国Boster公司);Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9免疫组织化学SP试剂盒(美国Bio-Rad公司);免疫组织化学一抗、细胞凋亡检测试剂盒(美国Boster公司);免疫印迹一抗(美国Bio-Rad公司)。

1.3 主要仪器

HANS-100韩式穴位神经刺激仪(石家庄福赛医巧器械有限公司);YB-6LF石蜡包埋机(亚光医用有限公司);RM2235切片机(德国徕卡仪器有限公司);YS2-H光学显微镜(上海普赫光电科技有限公司);15 mm×0.3 mm针刺针(苏州医疗器械厂);JEM-1230电子显微镜(日本电子株式会社);M-Turbo便携式彩色超声诊断仪(美国索诺声公司);RM6240型多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂)。

2 实验方法

2.1 实验分组及模型制备

将45只实验大鼠适应性喂养1周后,按照随机数字表法选取10只作为空白组,其余35只大鼠按照刘志华等^[9]制备颈肌慢性损伤模型方法改良后进行造模,具体方法为:根据人类颈型颈椎病常见的发病方式,复制大鼠颈肌慢性损伤动物模型。向大鼠颈部C₃~C₅间注射3%高渗盐水1 mL;次日再次注射1 mL;第2天采用颈部低头法,采用自制固定器,将大鼠放入并固定颈椎后,使大鼠保持低头位30°,确定不影响其他部位的活动,并使呼吸道保持通畅。每次使用固定架固定大鼠保持颈前屈5 h,每天1次,反复3个月。同时每隔5 d在颈部C₃~C₅注射1次3%高渗盐水。3个月后,用超声诊断仪对大鼠颈后肌组织行超声诊断检测,观察大鼠颈后肌的形态学变化,以验证模型是否成功。模型大鼠可见颈后肌组织断续,排列紊乱,肌组织边界模糊,回声欠均匀。之后将复制成功的模型大鼠按照随机数字表法分为模型组、电针组、美洛昔康组,每组10只(其中5只大鼠经超声诊断仪检测提示模型复制不成功,故剔除)。

2.2 实验动物干预方法

造模成功后电针组大鼠选用双侧风池穴进行电针干预治疗。先用自制固定器固定好大鼠,再根据李忠仁主编的《实验针灸学(新世纪第2版)》结合比较解剖学方法选取风池穴(双侧),风池穴的针刺

深度为3 mm,抵骨面,之后连接韩氏穴位神经刺激仪,刺激参数采用疏密波,电流为1 mA,频率为2/100 Hz^[10]。治疗时间:每次25 min,每天1次,连续干预10 d为1个疗程,每个疗程间隔2 d,共干预2个疗程。模型组造模后仅抓握固定而不予针刺。美洛昔康组按照大鼠体质量选取定量的美洛昔康溶液灌胃。每周1次测量体质量调整灌胃剂量,灌胃剂量根据体表面积比率计算为0.787 8 mg/kg。模型组和美洛昔康组的治疗疗程、次数、时间与间隔时间,均与电针组相同。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 超声诊断仪检测 造模3个月后,对模型大鼠进行超声诊断检测,目的是判断造模是否成功。以大鼠颈后肌为检查体位,选择造模部位、肌肉结节处,利用高频超声探头进行多方位、多位置扫描检查,并与空白组大鼠相同部位比较。观察颈后肌肌肉情况,并明确造模损伤范围与位置,观察其内部回声信号分布情况。

2.3.2 肌电生理检测 经超声检测后,对模型组大鼠颈后肌行肌电生理检测。大鼠麻醉后固定姿势,充分暴露颈后肌,在颈后肌结节处放置正、负电极,两针相距1~2 cm,在大鼠尾部放置地极,使用5 mA电流刺激大鼠,产生诱发电位,最后在电生理记录仪上连续5 s记录大鼠诱发电位M波的肌电电位和振幅的衰减变化程度。

2.3.3 取材 电生理检测结束后,准备取材。使用20%的乌拉坦行腹腔麻醉,确认大鼠完全麻醉后,保持大鼠的背部朝上并完全暴露头部和颈部。采用钝性分离的方式找到右侧颈后肌,用手术剪将其剪下,操作时注意保证肌肉组织的完整性。用PBS液体清洗颈后肌,剔除筋膜及其他杂质,仅保留完整的肌肉组织。将组织置于4%多聚甲醛中放置24 h,备用。

2.3.4 透射电镜 肌肉组织纤维块在2.5%戊二醛溶液固定24 h后,取出组织块,使用四氧化锇固定1.5 h,逐级乙醇脱水,放置在醋酸异戊酯中储存直至过夜,置于纯丙酮与包埋液的比例为2:1的溶液中3 h后取出,改成放置于纯丙酮以及包埋液的比例为1:2的溶液中过夜;环氧树脂包埋液中定向包埋,半薄切片,用2%乙酸双氧铀以及2%柠檬酸铅染色切片定位后,使用透射电镜技术拍摄组织图片,仔细观察并分析样本的颈后肌的超微结构变化。

2.3.5 免疫组织化学检测 对存放于4%多聚甲醛

中的肌肉组织依次进行脱水、浸蜡、包埋、切片、烘片、烤片、脱蜡至水等步骤;枸橼酸修复液中微波修复;用0.01 mol/L PBS漂洗,在切片上滴加适量3% H₂O₂,使用微波震荡10 min后,血清封闭液封闭0.5 h;滴加一抗稀释液稀释抗体,放置在4 °C冰箱中孵育过夜;PBS漂洗,滴入二抗,孵育60 min;滴加HRP,37 °C孵育2 h;DAB显色8 min;显微镜下进行观察染色程度;使用苏木素复染,逐级浓度酒精依次脱水后使用二甲苯二次透明;随后进行封片和镜检;每组切片中随机选择5个不同的视野,拍照后,经图像分析最后处理数据,统计大鼠颈后肌中PCNA、MyoD、TLR4、MyD88、NF-κBp65的蛋白表达量。

2.4 统计学方法

使用SPSS 25.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠颈后肌超声诊断检测

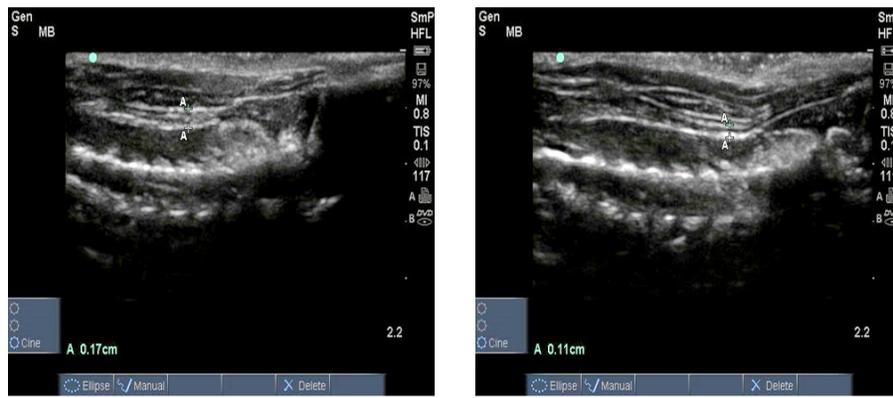
造模3个月后,空白组大鼠颈后肌组织形态规则,边界清楚,回声均匀;模型组大鼠颈后肌组织断续,排列紊乱,且边界较模糊,回声欠均匀,与空白组相比,模型组颈后肌厚度明显变薄,表明大鼠颈肌慢性损伤模型复制成功,见图1。其中40只造模成功,5只造模未成功。

3.2 肌电生理检测

与空白组比较,模型组肌电波幅及频率明显发生衰减,可见诱发波M波、无潜伏期及H波,说明慢性颈肌损伤大鼠肌肉损伤导致肌肉电传导功能降低。见图2。

3.3 4组大鼠颈后肌电镜检测结果比较

空白组肌丝的横截面以点状分布为主,肌节和肌浆膜无破裂,肌原纤维结构排列紧密,核膜光滑,线粒体结构无异常且分布均匀,嵴无断裂。模型组可见单个的肌原纤维结构的排列不连续,细胞中线粒体出现肿胀现象,并且肌原纤维整体排列紊乱,肌纤维和肌节之间断裂,并有空泡现象,但其肌间隙基本接近正常。电针组肌原纤维可见清晰的纹理,且肌丝的横断面呈点状分布,肌节和肌浆膜完整,个别线粒体肿胀,少量与肌原纤维的断裂处有空泡。美洛昔康组肌原纤维的结构偶见不规则且细胞排列混乱,出现少量的线粒体肿胀,其中在肌原纤维的断裂处有空泡存在。见图3。

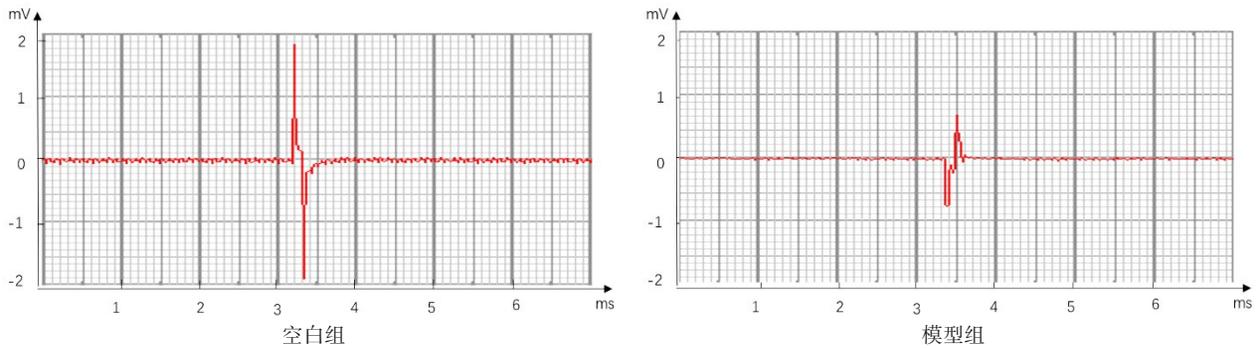


空白组

模型组

图1 大鼠颈后肌超声检测结果

Figure 1 Results of ultrasonic examination on posterior cervical muscle of rats

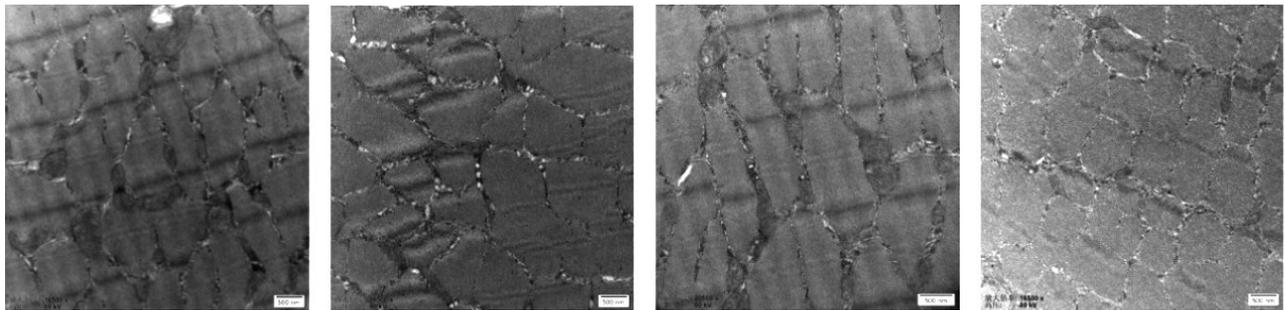


空白组

模型组

图2 大鼠颈后肌肌电检测结果

Figure 2 Results of EMG test on posterior cervical muscle of rats



空白组

模型组

美洛昔康组

电针组

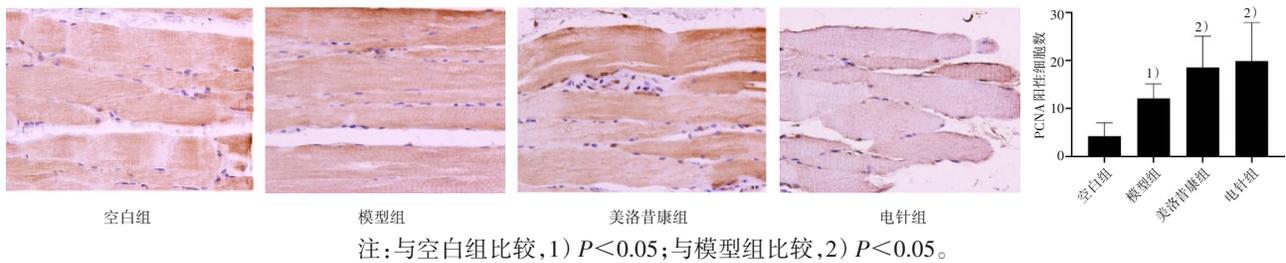
图3 4组颈后肌电镜检测结果比较(×50 000)

Figure 3 Comparison of electron microscopy results in posterior cervical muscle of four groups (×50 000)

3.4 免疫组织化学检测结果分析

3.4.1 4组大鼠颈后肌PCNA、MyoD表达比较 4组大鼠颈后肌组织中均出现肌纤维细胞中PCNA、MyoD蛋白的阳性表达。空白组中PCNA、MyoD的表达量较少,呈散在分布,数量较少。模型组中PCNA、MyoD的表达呈现弱阳性,分布集中、数量多、排列密集、染色较深。在电针组和美洛昔康组大鼠中的

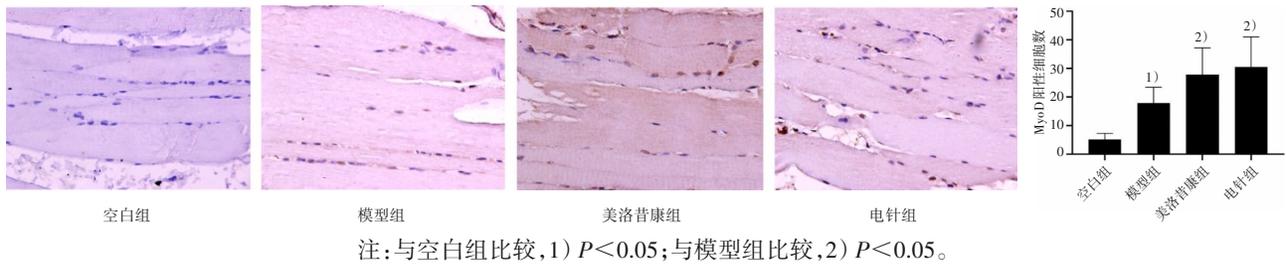
PCNA、MyoD呈阳性表达,细胞排列较紧密、数量多、核染色深。与空白组相比,模型组PCNA、MyoD的阳性细胞数增多,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,电针组和美洛昔康组肌肉组织中PCNA、MyoD的阳性表达细胞明显增多,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图4和图5。



Note: Compared with the blank group, 1) $P < 0.05$; compared with the model group, 2) $P < 0.05$.

图4 4组大鼠颈后肌PCNA表达比较($\times 200$)

Figure 4 Comparison of PCNA expression in posterior cervical muscle of four groups ($\times 200$)



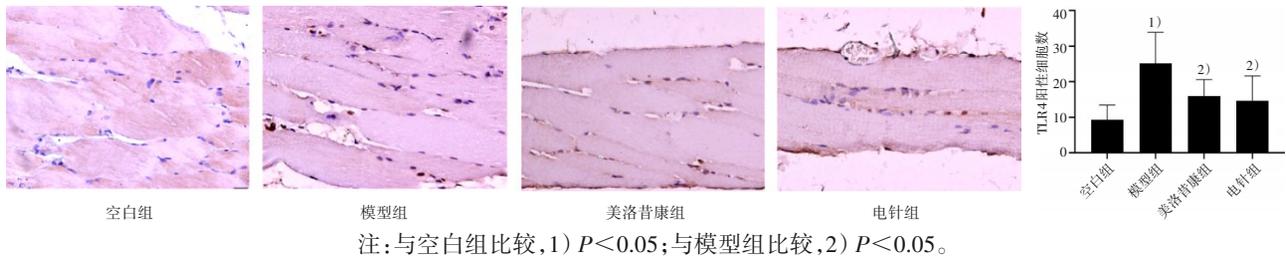
Note: Compared with the blank group, 1) $P < 0.05$; compared with the model group, 2) $P < 0.05$.

图5 4组大鼠颈后肌MyoD表达比较($\times 200$)

Figure 5 Comparison of MyoD expression in the posterior cervical muscle of four groups ($\times 200$)

3.4.2 大鼠颈后肌中TLR4、MyD88、NF- κ Bp65阳性表达分析 4组大鼠颈后肌组织中均检测到TLR4、MyD88、NF- κ Bp65阳性表达。模型组中TLR4、MyD88、NF- κ Bp65的表达呈现阳性,细胞分布集中、排列密集、数量较多、核染色较深;电针组及美洛昔康组中TLR4、MyD88、NF- κ Bp65蛋白的表达呈现出弱阳

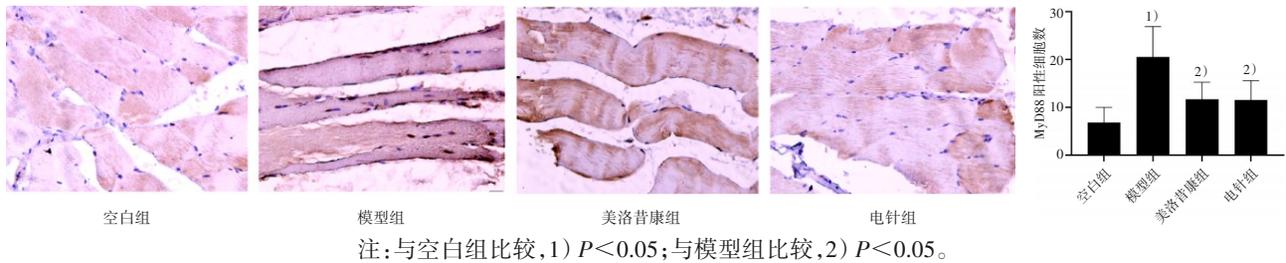
性,染色细胞数量较少,排列较稀疏、染色浅。与空白组相比,模型组中TLR4、MyD88、NF- κ Bp65蛋白表达阳性细胞数均显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,电针组和美洛昔康组中的TLR4、MyD88、NF- κ Bp65阳性细胞数明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图6~8。



Note: Compared with the blank group, 1) $P < 0.05$; compared with the model group, 2) $P < 0.05$.

图6 4组大鼠颈后肌TLR4表达比较($\times 200$)

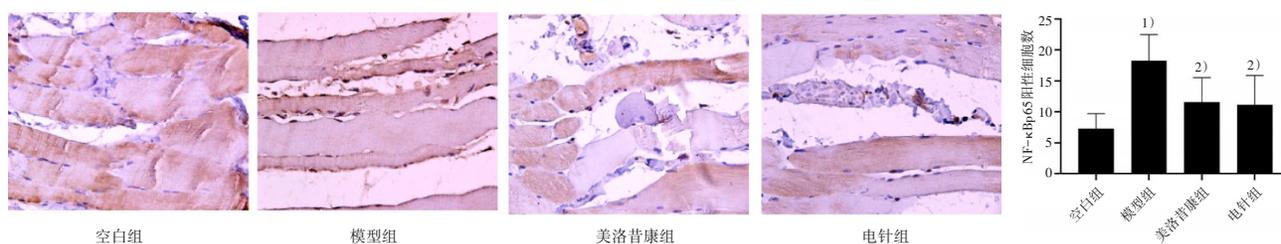
Figure 6 Comparison of TLR4 expression in posterior cervical muscle of four groups ($\times 200$)



Note: Compared with the blank group, 1) $P < 0.05$; compared with the model group, 2) $P < 0.05$.

图7 4组大鼠颈后肌MyD88表达比较($\times 200$)

Figure 7 Comparison of MyD88 expression in posterior cervical muscle of four groups ($\times 200$)



注:与空白组比较,1) $P < 0.05$;与模型组比较,2) $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank group, 1) $P < 0.05$; compared with the model group, 2) $P < 0.05$.

图8 4组大鼠颈后肌NF-κBp65表达比较(×200)

Figure 8 Comparison of NF-κBp65 expression in posterior cervical muscle of four groups (×200)

4 讨论

颈部肌肉慢性损伤属于中医学“经筋病”范畴。由于生活习惯及工作压力的影响,颈肌慢性损伤在临床上发病率较高。针刺在治疗颈肌慢性损伤中具有十分独特的优势。本课题采用大鼠长期低头位制作颈肌慢性损伤模型,符合临床颈肌慢性损伤的发病特征。本课题选用风池穴为足少阳胆经的腧穴,位于颞额处后发际线的凹陷,是十二经脉中足少阳胆经、手少阳三焦经以及奇经八脉中阳维脉和阳跷脉循行的交会穴。“胆可主筋所生之病”“三焦可主司气所生之病”“阳维可主人体一身的腠理”“阳跷可主人体一身的运动功能”,因此风池穴能够平熄少阳上扰清窍,又能够疏通颈部肌肉关节的气血。本实验中促进颈部肌肉慢性损伤的修复进程可能是通过电针“风池穴”达到舒筋通络、调理气血的作用。

从现代医学角度来看,骨骼肌损伤后机体会启动自我再生修复机制,增殖的成纤维细胞所形成的瘢痕组织能够阻碍周围神经对肌纤维的支配作用,造成骨骼肌电生理传导功能障碍。因此,本课题使用超声诊断仪检测慢性颈肌损伤模型中颈后肌的肌肉形态、结节,用于判断是否有瘢痕形成或肌肉形态改变;同时,使用肌电生理检测判断慢性颈肌损伤肌纤维的电生理传导功能,以此来判断慢性颈肌损伤的模型是否成功。在实验中模型组大鼠颈后肌超声检测可见肌组织排列紊乱等病理性改变,肌电生理可见肌电振幅衰减,表明造模成功。本实验研究结果表明:慢性颈部肌肉损伤模型大鼠的超声检测可见其肌纤维形态明显变化,出现肌纤维结构紊乱、厚度变薄、病理性结节产生等现象。在肌电图结果中也可以看到,模型组大鼠右侧颈后肌肌电振幅明显下降,表明慢性颈部肌肉损伤会影响骨骼肌对电生理的传导作用。从电镜结果中可见,模

型组大鼠颈后肌肌原纤维排列较紊乱,线粒体肿胀,且有空泡现象存在,而电针能够有效改善肌纤维情况。在电针组的肌纤维横切面中肌原纤维可见清晰纹理,且肌丝的横断面呈点状分布,肌节和肌浆膜完整,个别线粒体肿胀,其中少量与肌原纤维的断裂处有空泡,表明电针能够有效促进骨骼肌损伤的肌纤维修复。

骨骼肌的损伤后修复是一个完整的病理、生理过程^[11],骨骼肌的再生与修复是在肌纤维损伤后各种因素的刺激及诱导下导致肌细胞产生自我修复的过程。肌卫星细胞的增殖分化是骨骼肌损伤后修复的关键因素。在肌卫星细胞形成肌纤维细胞的特异性基因转录调控过程中,MyoD作为反映肌细胞损伤后再生的指标^[12-13],属于阀门通道,具备总开关的调节作用,可以与各种相关的基因启动子相结合而调控肌细胞的生成,同时促进基因启动子的转录与激活。PCNA又被称为周期蛋白,是细胞中DNA在合成时所需要的特殊核蛋白,可以当作细胞分裂增殖过程的一种标记蛋白。检测PCNA在肌细胞中的蛋白表达可作为判断肌细胞增殖的指标,反映肌卫星细胞的分裂增殖进程^[5]。邹媛等^[14]通过实验验证在股四头肌损伤小鼠中MyoD的表达量增加,斜刺阿是穴能够促进MyoD的表达,促进股四头肌损伤的良性恢复。赵丹丹等^[15]认为电针干预能够上调大鼠腓肠肌中PCNA和配对盒基因7(paired box gene 7, Pax7)的表达,提高肌卫星细胞的增殖水平。本实验的研究中,使用免疫组织化学法检测颈后肌中PCNA和MyoD的指标,结果显示与模型组相比,电针能够明显提高MyoD和PCNA的表达,电针组大鼠颈后肌中MyoD和PCNA均显著性增加,与上述结果一致,说明电针有激活并促进肌卫星细胞分裂增殖的能力,这有可能是电针促进骨骼肌损伤修复的机制。

炎症反应是骨骼肌损伤后的首发症状^[16-17],炎

症反应是机体的一种自我保护机制,其目的是清除坏死组织,促进肌纤维的再生。有研究认为炎症反应能够诱导并激活骨骼肌卫星细胞受损后的分裂、增殖与分化过程^[18]。当骨骼肌损伤后,接收到坏死肌纤维及局部血管、神经损伤的信号刺激,使炎症细胞释放,局部出现炎症反应,浸润损伤部位,吞噬并代谢坏死肌纤维,同时释放相关的细胞生长因子激活肌卫星细胞。而肌细胞损伤的修复与TLR4/MyD88/NF- κ B信号转导途径的异常激活密切相关。马芳菲等^[19]在探究糖尿病患者的骨骼肌受到炎症损伤及用药后损伤的修复过程时,使用免疫印迹法检测TLR4、MyD88、NF- κ B的蛋白表达,实验结果表明TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路在骨骼肌的炎症损伤修复中扮演着重要的作用。何坚团队在兔颈型颈椎病模型中,使用HE染色及免疫印迹法检测兔颈型颈椎病模型中颈后肌的NF- κ Bp65和MyD88的蛋白含量,发现在颈型颈椎病模型中MyD88和NF- κ Bp65均呈显著性的增加,说明在颈椎病肌肉损伤过程中存在MyD88和NF- κ Bp65的影响^[6]。本实验结果显示,肌肉损伤后大鼠颈后肌中TLR4、MyD88和NF- κ Bp65信号因子的表达明显增加,表明在颈肌慢性损伤中TLR4、MyD88及NF- κ Bp65信号因子处于活化状态,给予电针刺激后,大鼠颈后肌组织中TLR4、MyD88及NF- κ Bp65蛋白在电针组的表达均有所下降,说明电针能够抑制大鼠颈肌慢性损伤模型中TLR4/MyD88/NF- κ B信号转导通路的活性。

电针风池穴可以改善颈肌慢性损伤模型中颈后肌的形态变化,促进颈肌慢性损伤修复,其作用机制可能是通过抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号转导通路的炎症反应,促进肌卫星细胞的增殖,进而影响损伤后骨骼肌的再生与修复。

参考文献

[1] 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.

[2] BERARDI E, ANNIBALI D, CASSANO M, et al. Molecular and cell-based therapies for muscle degenerations: a road under construction [J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 119.

[3] CALL J A, NICHENKO A S. Autophagy: an essential but limited cellular process for timely skeletal muscle recovery from injury [J]. *Autophagy*, 2020, 16(7): 1344-1347.

[4] YIN H D, HE H R, CAO X N, et al. miR-148a-3p regulates skeletal muscle satellite cell differentiation and apoptosis via the PI3K/AKT signaling pathway by targeting Meox2 [J]. *Front Genet*,

2020, 11: 512.

[5] 贾单单, 田振军, DU S J. 8周间歇运动激活LIF-LIFR-STAT3信号和诱导骨骼肌细胞增殖[J]. *北京体育大学学报*, 2017, 40(10): 44-49.

JIA D D, TIAN Z J, DU S J. 8-week interval exercise activates LIF-LIFR-STAT3 signal and induces the proliferation of skeletal muscle cells [J]. *J Beijing Sport Univ*, 2017, 40(10): 44-49.

[6] 陈进城, 林荣, 张圆芳, 等. 基于miR-146a调控NF- κ B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- κ B signaling pathway [J]. *Rehabil Med*, 2020, 30(3): 206-211.

[7] TAKEDA K, AKIRA S. Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2001, 54(6): 209-219.

[8] BACHAR O, ADNER M, UDDMAN R, et al. Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(4): 1196-1207.

[9] 刘志华, 马惠昇, 穆静, 等. 回医理筋手法不同时间干预兔颈肌慢性损伤的组织学研究[J]. *宁夏医科大学学报*, 2013, 35(10): 1069-1071, 1064.

LIU Z H, MA H S, MU J, et al. The histologic study of neck muscle chronic injury with intervention of Hui medicine massage technique at different time in rabbits [J]. *J Ningxia Med Univ*, 2013, 35(10): 1069-1071, 1064.

[10] 廖军, 谢巧瑜, 张乐, 等. 电针对颈椎病模型大鼠椎间盘纤维环细胞Wnt- β -catenin信号通路的影响[J]. *中国针灸*, 2014, 34(12): 1203-1207.

LIAO J, XIE Q Y, ZHANG L, et al. Effects of electroacupuncture on Wnt-B-catenin signal pathway in annulus fibrosus cells in intervertebral disc in rats with cervical spondylosis [J]. *Chin Acupunct Moxibust*, 2014, 34(12): 1203-1207.

[11] RINK S, CHATZIPARASKEVA C, ELLES L, et al. Neutralizing BDNF and FGF2 injection into denervated skeletal muscle improve recovery after nerve repair [J]. *Muscle Nerve*, 2020, 62(3): 404-412.

[12] 韩利军, 乔虎云, 梁炳生. 肌卫星细胞研究新进展[J]. *山西医药杂志*, 2020, 49(12): 1508-1513.

HAN L J, QIAO H Y, LIANG B S. Recent progress in the study of muscle satellite cells [J]. *Shanxi Med J*, 2020, 49(12): 1508-1513.

[13] 王震, 蔺海旗, 汤运启, 等. 肌卫星细胞激活增殖与分化的生物学因子研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(2): 484-488.

WANG Z, LIN H Q, TANG Y Q, et al. Research progress on biological factors of activation, proliferation and differentiation of muscle satellite cells [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(2): 484-488.

[14] 邹媛, 刘通, 李健, 等. 斜刺阿是穴对股四头肌损伤小鼠肌卫星细胞成肌分化抗原/生肌转录因子的影响[J]. *针刺研究*, 2021, 46(12): 1011-1015, 1022.

ZOU Y, LIU T, LI J, et al. Effect of oblique needling at Ashi-point on expression of MyoD1/Pax7 in mice with quadriceps femoris injury [J]. *Acupunct Res*, 2021, 46(12): 1011-1015, 1022.

- [15] 赵丹丹,唐成林,黄思琴,等. 电针干预对大鼠腓肠肌适应性肥大及肌卫星细胞增殖分化的影响[J]. 针刺研究, 2017, 42(6): 489-495.
- ZHAO D D, TANG C L, HUANG S Q, et al. Effects of electroacupuncture on adaptive hypertrophy of gastrocnemius and proliferation and differentiation of muscle satellite cells in rats [J]. *Acupunct Res*, 2017, 42(6): 489-495.
- [16] 赵淋淋, 刘晓光, 陈佩杰, 等. 小鼠骨骼肌挫伤修复过程中肌再生因子与炎性因子变化特征[J]. 中国康复医学杂志, 2019, 34(11): 1297-1303.
- ZHAO L L, LIU X G, CHEN P J, et al. A study on the expression of muscle regeneration factor, inflammatory factor in the repair of skeletal muscle contusion in mice [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2019, 34(11): 1297-1303.
- [17] MOSELE F C, BISSI RICCI R, ABREU P, et al. Muscle regeneration in adiponectin knockout mice showed early activation of anti-inflammatory response with perturbations in myogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(9): 6183-6193.
- [18] 孙茹. 骨骼肌损伤与修复过程中炎症反应与肌卫星细胞再生关系的研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2009: 13-20.
- SUN R. Study on the relationship between inflammatory reaction and regeneration of muscle satellite cells during skeletal muscle injury and repair [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2009: 13-20.
- [19] 马芳菲, 李婷, 单梦婷, 等. 二甲双胍对2型糖尿病大鼠骨骼肌Toll样受体/髓样分化因子88信号通路的影响及机制[J]. 医学研究生学报, 2018, 31(8): 813-817.
- MA F F, LI T, SHAN M T, et al. Metformin inhibits the TLR4/MyD88 signaling pathway in the skeletal muscle of type 2 diabetic rats [J]. *J Med Postgrad*, 2018, 31(8): 813-817.

Effects of Electroacupuncture at Fengchi Acupoint on Myosatellite Cells and TLR4/MyD88/NF-κB Signaling Pathway in Chronic Cervical Muscle Injury Rats

HUANG Yuting¹, CHEN Jiayan¹, KAN Yu¹, FANG Yanping¹, WANG Jinwei², ZHENG Linyao¹, JING Xianghong³, LIAO Jun^{1*}

¹ College of Acupuncture and Moxibustion, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² Sichuan Health Rehabilitation Vocational College, Zigong, Sichuan 643000, China;

³ Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

*Correspondence: LIAO Jun, E-mail: 2007065@fjtc.edu.cn

ABSTRACT Objective: To observe effects of electroacupuncture at Fengchi acupoint on expression of myosatellite cells, myogenic determining factor (MyoD), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) and nuclear factor-kappa B p65 (NF-κBp65) protein in rat with chronic cervical muscle injury, so as to explore possible mechanism of electroacupuncture in promoting the repair of chronic cervical muscle injury. **Methods:** Ten Wistar rats were selected from 45 Wistar rats as blank group, and the remaining rats were divided into model group, electroacupuncture group (EA group) and meloxicam group according to random number table method, with 10 rats in each group (5 rats were unsuccessful in modeling). Chronic cervical muscle injury model of rats was established by long-term head flexion fixation and hypertonic saline injection. After 3 months of modeling, the morphological changes of posterior cervical muscle were observed by ultrasonic diagnostic detector. The success of modeling was verified by EMG. The EA group received electroacupuncture at Fengchi acupoint on both sides, 25 min each time, once a day, for 10 consecutive days as one course of treatment, with an interval of two days between courses of treatment, for 2 courses of treatment. After intervention, the posterior cervical muscle tissue of rats in each group was collected and the morphological changes of posterior cervical muscle tissue were observed under electron microscope. The protein contents of PCNA, MyoD, TLR4, MyD88 and NF-κBp65 were detected by immunohistochemistry. **Results:** 1) Morphological detection: Compared with the blank group, ultrasonic diagnosis results of the model group showed that tissue of posterior cervical muscle of rats was discontinuous and thickness was significantly narrower. Electrophysiological test results showed that amplitude and frequency of electromyographic significantly decreased in the model group. Compared with the blank group, muscle electron microscopy results of the model group showed that the arrangement of myofibrils was discontinuous, some mitochondria were swollen, and there were breaks between muscle fibers and muscle segments, and there were vacuoles. Compared with the model group, the EA group showed that myofibrils were clearly visible, cross-section of the myofibrils was punctured, sarcomere and serosa were intact, some mitochondria were swollen, and a few of them had vacuoles at the fracture of myofibrils. Myofibril structure of the meloxicam group was occasionally irregular, with vacuoles at the fracture of myofibril and a small amount of mitochondrial swelling. 2) Immunohistochemistry: Compared with the blank group, expression of PCNA and MyoD in model group was weakly positive, and protein expression of TLR4, MyD88 and NF-κBp65 significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the protein expression levels of PCNA and MyoD in the EA and meloxicam groups significantly increased ($P < 0.05$), protein expression levels of TLR4, MyD88 and NF-κBp65 significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in expression levels of PCNA, MyoD, TLR4, MyD88 and NF-κBp65 between the EA and meloxicam groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** The treatment of chronic cervical muscle injury by electroacupuncture at Fengchi acupoint may be related to promoting the proliferation and differentiation of myosatellite cells, and the mechanism may be achieved by regulating the TLR4/MyD88/NF-κB signal transduction pathway.

KEY WORDS chronic cervical muscle injury; electroacupuncture; myosatellite cell; MyoD; TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway

DOI:10.3724/SP.J.1329.2023.05006