DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.06.033

基于 BDNF－TrkB－p38/JNK 信号通路研究电针对肌筋膜疼痛综合征大鼠的分子生物学机制

王列[1,2],王树东[1,2],董宝强[1,2],林星星[1,2],于嘉祥[1,2],马俊杰[1,2],卞镝[1,2],王鹰[1,2],胡哲[1,2],李记泉[1,2],陈怡然[1,2],马帅[3],马铁明[1,2]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.辽宁省针灸养生康复重点实验室,辽宁 沈阳 110847;
3.沈阳市第七人民医院,辽宁 沈阳 110847)

摘要:目的 基于脑源性神经营养因子(brain－derived neurotrophic factor,BDNF)－酪氨酸激酶受体 B(tropomyosin receptor kinase B,TrkB)－丝裂原活化蛋白激酶 p38(P38 MAPK,p38)/c－Jun 氨基末端激酶(c－Jun N－terminal kinase,JNK)信号通路,探讨电针对治疗肌筋膜疼痛综合征(myofascial pain syndrome,MPS)的机制。方法 将 24 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、电针组、西药组,每组 6 只。采用打击结合离心运动方式建立 MPS 大鼠模型。造模成功后电针组予以电针干预,连续治疗 7 d。西药组给予塞来昔布(21 mg·kg^{-1})干预,连续给药 5 d,停药 2 d。治疗后分别测定各组大鼠左下肢热缩足潜伏期、自发电活动;苏木精－伊红染色法(hematoxylin－eosin,HE)观察局部肌肉组织病理形态学变化;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中白细胞介素 6(interleukin－6,IL－6)、白细胞介素 10(interleukin－10,IL－10)、肿瘤坏死因子－α(tumor necrosis factor－α,TNF－α)、白细胞介素 1β(interleukin－1β,IL－1β)的水平;免疫荧光法观察脊髓组织胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)、小胶质细胞特异性标志物(OX－42)[microglia specific marker(OX－42)]的阳性表达情况;逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT－PCR)检测脊髓组织 BDNF、TrkB、p38、JNK mRNA 表达水平;Wes 法检测脊髓组织 BDNF、TrkB、磷酸化酪氨酸激酶受体 B(phospho－tropomyosin receptor kinase B,p－TrkB)、P38、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(phospho－p－P38MAPK,p－P38)、JNK、磷酸化 c－Jun 氨基末端激酶(phospho－c－Jun N－terminal kinases,p－JNK)蛋白表达水平。结果 电针及西药干预能提高大鼠热缩足潜伏期,改善局部肌肉组织形态及炎症状态,抑制血清促炎因子释放,促进抗炎因子分泌,减少脊髓组织 GFAP、OX－42 阳性表达,降低 BDNF、TrkB、P38、JNK 的 mRNA 表达水平和 BDNF、TrkB、p－TrkB、P38、p－P38、JNK、p－JNK 的蛋白表达水平,且电针组疗效优于西药组。结论 电针及塞来昔布均可以显著改善 MPS 大鼠痛阈,但电针在局部组织病理形态及自发电位恢复中更具优势,其机制可能与抑制 BDNF－TrkB－p38/JNK 通路、减少炎症因子释放,降低胶质细胞活化有关。

关键词:"BDNF－TrkB－p38/JNK"信号通路;肌筋膜疼痛综合征;电针;激痛点
中图分类号:R245.97 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)06-0165-10

Exploring Mechanism of Electroacupuncture Intervention in Treating Myofascial Pain Syndrome Rats Based on BDNF－TrkB－p38/JNK Signal Pathway

WANG Lie[1,2],WANG Shudong[1,2],DONG Baoqiang[1,2],LIN Xingxing[1,2],YU Jiaxiang[1,2],MA Junjie[1,2],BIAN Di[1,2],WANG Ying[1,2],HU Zhe[1,2],LI Jiquan[1,2],CHEN Yiran[1,2],MA Shuai[3],MA Tieming[1,2]
(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2. Key Laboratory of Acupuncture Moxibustion and Health Rehabilitation in Liaoning Province,Shenyang 110847,Liaoning,China;
3. Shenyang Seventh People's Hospital,Shenyang 110847,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To explore the mechanism of electroacupuncture intervention in treating myofascial pain syndrome rats based on brain－derived neurotrophic factor(BDNF)－tropomyosin receptor kinase B(TrkB)－p38/c－Jun N－terminal kinase(JNK) signal pathway. *Method* Twenty－four SD rats were randomly divided into blank group,model group,electroacupuncture group and Western medicine group,with 6 rats in each group. The MPS rat model was established using a combination of striking and centrifugal movements. After successful modeling,the electroacupuncture group received electroacupuncture intervention for 7 consecutive days. The Western medicine group was intervened with celecoxib(21 mg·kg^{-1}) for 5 consecutive days and

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81574050);辽宁省科技厅博士基金启动项目(2023－BS－137);辽宁省科技厅创新能力提升联合基金项目(2022－NLTS－13－04);辽宁省科学技术计划项目(2019－ZD－0947);辽宁省教育厅基本科研项目青年项目(JYTQN2023462)
作者简介:王列(1985－),女,吉林德惠人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:针灸基础与临床。
通讯作者:马铁明(1964－),男,辽宁沈阳人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:针刺机理。E-mail:matieming999@sohu.com。
马帅(1985－),男,辽宁营口人,副主任医师,博士,研究方向:针灸基础与临床。E-mail:mashuaipost@126.com。

stopped for 2 days. After treatment, the latent period of left lower limb thermal contraction foot and spontaneous electrical activity were measured in each group. HE staining was used to observe the pathological and morphological changes of local muscle tissue. ELISA method was used for detecting the levels of interleukin-6(IL-6), interleukin-10(IL-10), tumor necrosis factor-α(TNF-α) and interleukin-1β(IL-1β) in serum of each group. Immunofluorescence was used to observe the positive expressions of glial fibrillary acidic protein(GFAP) and microglia specific marker(OX-42) in spinal cord tissue. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) was used to detect the mRNA expression levels of BDNF, TrkB, p38 and JNK in spinal cord tissue. The Wes method was used to detect the protein expression levels of BDNF, TrkB, p38, phospho-p-p38MAPK(p-p38), JNK, phospho-c-Jun N-terminal kinases(p-JNK) in spinal cord tissue. *Results* Electroacupuncture and Western medicine intervention can increase the latent period of thermal contraction in rats, improve local muscle tissue morphology and inflammatory status, inhibit serum pro-inflammatory factor release, promote anti-inflammatory factor secretion, reduce GFAP and OX-42 positive expressions in spinal cord tissue, reducing mRNA expression levels of BDNF, TrkB, P38 and JNK, and protein expression levels of BDNF, TrkB, P38, p-p38, JNK and p-JNK, and the efficacy of electroacupuncture was better than that of the Western medicine. *Conclusion* Both electroacupuncture and celecoxib can significantly improve the pain threshold in MPS rats, but electroacupuncture has advantages in local tissue pathological morphology and spontaneous potential recovery. Its mechanism may be related to inhibiting BDNF-TrkB-p38/JNK signal pathway, reducing the release of inflammatory factors, and reducing glial cell activation.

Keywords: BDNF-TrkB-p38/JNK signal pathway; myofascial pain syndrome; electroacupuncture; pain point stimulation

肌筋膜疼痛综合征(myofascial pain syndrome, MPS)是一种影响每个年龄组的区域性疼痛障碍,其特征是肌肉或筋膜内存在激痛点(myofascial triggerpoints, MTrPs)[1]。MPS是导致慢性和持续区域疼痛的主要原因,包括肩部疼痛、慢性背痛、视神经型头痛和面部疼痛[2]。据报道,在疼痛类门诊中,本病患病率为85%~93%,并且女性多见[3]。MPS的发病机制复杂,与"能量危机学说""整体学说"等有关[4]。目前针对MPS的治疗,西医主要应用非甾体类抗炎药、局部麻醉药、糖皮质激素等进行治疗,缓解近期疼痛明显,但是远期治疗效果不佳[5]。中医疗法中电针通过对激痛点的灭活可有效治疗MPS病症[6],但是具体机制尚不明确。

研究显示,激痛点不仅是MPS的发病因素,也是治疗本病的关键[7]。急慢性损伤后,激痛点周围肌肉组织理化环境发生变化,炎症介质、神经肽、细胞因子等活性物质分泌增多,血清炎性标记物也显著上升[8-9],团队前期研究结果也与之相一致[4]。同时,在以往研究中也显示激痛点活化后脊髓中枢敏化启动,胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、小胶质细胞特异性标志物(OX-42)[microglia specific marker(OX-42)]、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达增多,针刺激痛点后显著下降[10-11]。BDNF通过与酪氨酸激酶受体B受体(tropomyosin receptor kinase B, TrkB)结合参与MPS的痛敏反应。并且还可通过BDNF-TrkB-p38/JNK信号通路促进脊髓组织星形胶质细胞和小胶质细胞的激活与持续增殖,释放肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和白细胞介素6(interleukin-6, IL-6),加重神经炎症和机械性疼痛。而星形胶质细胞和小胶质细胞活化后又能促进BDNF分泌,形成正反馈[12]。因此,本研究拟通过针刺激痛点,观察脊髓组织BDNF-TrkB-p38/JNK通路相关蛋白及基因表达变化,探讨电针对改善MPS的分子生物学机制及潜在效应靶点,为临床精准靶点治疗提供理论及实验依据。

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220~250 g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(辽)2015-0001。大鼠饲养于辽宁中医药大学动物实验中心,实验房间温度(23±2)℃,湿度维持在45%~55%范围内,通风良好,每天明暗时间各12 h。本次实验已经通过辽宁中医药大学动物实验中心伦理委员会的审核,审批编号为:21000042023110。

1.2 实验试剂及药品

BCA蛋白测定试剂盒(康为世纪生物,CW0014),p-JNK(武汉三鹰,80024-1-RR),JNK(武汉三鹰,17572-1-AP),TrKB(武汉三鹰,13129-1-AP),p-TrkB(万类生物,WL02988),pp38(武汉三鹰,28796-1-AP),p38(武汉三鹰,14064-1-AP),BDNF(博奥森,bs-2291R),β-actin(武汉三鹰,66009-1-Ig),TRIzon总RNA提取试剂(康为世纪生物,CW0580),白细胞介素1β(interleukin-1β, IL-1β)、IL-6、TNF-α、白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为H002-1-1、H007-1-1、H052-1-1、H009-1-1),HE染色试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,C0105S),GFAP,(美国Cell Signaling Technology公司,3670),OX-42单克隆抗体(美国Santa Cruz公司,sc-18862),塞来昔布(辉瑞制药有限公司,国药准字J20120063)。

1.3 实验仪器

FT-200动物跑步机(成都泰盟软件有限公司),PL3508型生理记录仪[埃德仪器国际贸易(上海)有限公司],电针仪(汕头医用设备厂有限公司所生产),华佗牌无菌针灸针0.35 mm×25 mm(苏州医疗用品厂有限公司),HI1220型烤片机,DMi8-M型倒置荧光显微镜(德国莱卡公司),BX-51型光学显微镜(日本Olympus公司),Mini-Trans-Blot型转膜仪(美国Bio-rad公司),Power Pac Basic型电泳仪(美国Bio-rad公司),全自动蛋白质印迹定量分析系统(Protein simple,美国),高速冷冻离心机(Thermo Scientific美国,ST 16R),超微量紫外分光光度计(Thermo美国,NANODROP2000),梯度PCR仪(ABI美国,veriti 96 well Thermal Cycler),实时荧光定量PCR仪(ABI美国,7500)。

1.4 MPS模型制备

24只大鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法分为空白组、造模组。参照姚明华等[13]提出的"钝性打击结合离心运动"的方式复制MPS大鼠模型。在每次打击前由经验丰富的研究人员确定大鼠左下肢股内侧肌,并做标记。每周第1天使

用1%戊巴比妥钠(0.1 mL·10 g^{-1})腹腔注射麻醉,大鼠在麻醉状态下固定于自制打击器下方,使重量为1200 g,接触面积约1 cm×1 cm的打击器从20 cm高度自由下落,击打标记部位。第2天在倾斜角度为16°的动物跑台上进行持续性离心运动90 min,速度由0逐渐增加至16 cm·min^{-1}。每周其余5 d正常喂养。以上重复进行8周的造模期干预。此后4周正常喂养,不做任何干预,为恢复期。满足局部肌紧张带或结节出现、静息状态下出现自发电位、针刺局部抽搐反应三点,即表示MPS大鼠模型复制成功[14],将复制成功大鼠用随机数字表分为模型组、电针组、西药组。

1.5 干预方法

造模结束后,电针组予左下肢股内侧肌标记点即激痛点处,采用0.35 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电针正极,另一级连接在尾根部非经非穴上以形成通路,之后施以频率2~20 Hz的疏密波,电流强度以大鼠下肢出现轻微颤动为宜,留针15 min,1次/d,连续治疗7 d。西药组给予塞来昔布(21 mg·kg^{-1})干预,连续给药5 d,停药2 d[15]。空白组、模型组大鼠在相同时间和地点采取相同方式进行抓取和固定,而不采取任何治疗措施。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 热缩组潜伏期检测 所有大鼠在干预后,放入热刺痛仪中,温度调整为(52±0.5)℃,待安静后,移动热辐射刺激筒,光源发射中心正对大鼠左后足足底,记录大鼠从接触光源发射中心到抬起左后爪或舔左后爪的间隔时间,测量时间上限值为25 s,以免烫伤。共测量3次,每次测量间隔15 min,将结果的平均值作为热缩足潜伏期。

1.6.2 自发电活动检测 大鼠腹腔麻醉后固定,剃去左下肢股内侧肌处毛发,由一名经验丰富的研究人员再次确定肌紧张带或结节。连接地线,将肌电图仪电极针缓慢插入紧张带或结节处,若能诱发局部抽搐反应,则定位该处为激痛点。然后将另一电极针缓慢插入该旁5 mm~1 cm处,随后每次缓慢移动约1 mm,至肌电图显示在静息状态下出现30 s~10 min的自发电活动,记录各组的波频、波幅等。

1.6.3 动物取材 末次干预后,予所有大鼠禁食不禁水12 h,用1%的戊巴比妥钠注射液麻醉后腹主动脉取血5 mL,在4℃、3000 r·min^{-1}条件下离心10 min(离心半径182 mm)后取上清液,于-80℃冰箱冻存。随后在各组大鼠左下肢股内侧肌结节或膨大处切取1cm^3肌肉组织,置于4%多聚甲醛固定。然后继续进行俯卧位固定,依次剥离背部组织,暴露脊髓,取L4-6腰膨大段脊髓组织,放置在冻存管中,存放于-80℃冰箱冻存待测。

1.6.4 HE染色观察局部肌肉组织病理形态学变化 将置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h以上的肌肉组织取出,流水冲洗后进行组织脱水、石蜡包埋、切片(4 μm),在免疫染色之前,将切片在二甲苯中脱蜡,进行苏木精-伊红染色,在光学显微镜(400倍)下观察各组大鼠激痛点处骨骼肌病理形态学变化,选取合适的视野进行拍照。

1.6.5 Elisa法检测血清中IL-6、IL-10、TNF-α、IL-1β的水平 取冻存各组大鼠血清,于37℃的水浴锅解冻后,按照相应试剂盒说明书进行操作,在进行标准品的稀释、加样、温育、配液洗涤等步骤后,加入显色剂,最后终止反应,测定各孔OD值,绘制出标准品线性回归曲线并计算各样本浓度值。

1.6.6 免疫荧光染色法观察脊髓组织GFAP、OX-42的阳性表达 对各组大鼠固定的脊髓组织进行组织脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、抗原修复后,弃去抗原修复液,用PBS液洗片3次后吸干,滴加5%的BSA封闭30 min。然后滴加稀释好的GFAP、OX-42一抗(1∶100),湿盒内4℃孵育过夜。次日恢复室温后,用PBS浸洗3次,每次5 min,滴加稀释好的荧光二抗(1∶200)避光室温孵育1 h,洗涤后滴加DAPI对标本进行核染,用PBS冲洗多余的DAPI,吸干后用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,检测GFAP、OX-42的表达水平。

1.6.7 RT-PCR检测脊髓组织BDNF、TrkB、P38、JNKmRNA表达水平 取冻存的各组大鼠脊髓组织,放入加有TRIzol1 ml的离心管中震荡摇匀,并做好标记。再依次加入三氯甲烷、异丙醇、75%乙醇并分别在4℃,12 000 r·min^{-1}离心后获得RNA样本,使用紫外分光光度仪器测量RNA浓度。按照逆转录试剂盒,逆转录成cDNA样本。按照说明书配置PCR反应体系,设定PCR反应条件(37℃反转录15 min);95℃预变性10 min;95℃变性10 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环。以GADPH为内参,最终各目的基因相对表达量以$2^{-\Delta\Delta Ct}$值为准。引物序列由北京博迈德基因技术有限公司合成,见表1。

表1 PCR引物序列

引物	序列(5′-3′)	长度/(bp)	退火温度/(℃)
BDNF	上游:5′-GGGGTTAGGAGAAGTCAAGC-3′	93	60
	下游:5′-TGGACAGCCACTTTGTTTCA-3′		
TrkB	上游:5′-CGTAGGGACACGCACTCTGA-3′	142	60
	下游:5′-CCCAAGACCAGCAAG CATAA-3′		
p-TrkB	上游:5′-GGTTGAGTGACCTTGGTGA-3′	127	60
	下游:5′-AAGTGGACCTATGACCCCTCTA-3′		
JNK	上游:5′-AGCCTGCCTGCCAAG-TACAAG-3′	89	60
	下游:5′-TCAGGTTGACACCAGCAGCAC-3′		
p-JNK	上游:5′-TCTGGTATGATCCTTCTGAAGCA-3′	246	60
	下游:5′-TCCTCCAAGTCCATAACTTCCTT-3′		
P38	上游:5′-GCAAC-CTCGCTGTGAATGAAGA-3′	148	60
	下游:5′-CACGTAGCCGGTCATTTCGTC-3′		
p-P38	上游:5′-CTGGAGGAGTTCAATGACGTG-3′	122	60
	下游:5′-CGGAGGATTTGGTAGATAAGGA-3′		
GAPDH	上游:5′-GGCA AGTTCAATGGCACAGT-3′	280	60
	下游:5′-TGGTGAAGAC GCCAG-TAGACTC-3′		

1.6.8 Wes法检测脊髓组织BDNF、TrkB、pTrkB、p38、p-P38、JNK、p-JNK蛋白水平 精确称取各组大鼠脊髓组织10 mg,加入裂解液500 μL,提取蛋白并测定蛋白浓度,计算样品所需配置比例,不同样品上样量均为4.5 μL。配置DTT、5×master-mix、Biotin Ladder、样品(配置好的样品95℃5 min变性),稀释一抗,二抗,稀释倍数分别为(BDNF1∶50;TrkB1∶50;pTrkB1∶50;p381∶50;p-P381∶50;JNK1∶25;p-JNK1∶5,GADPH1∶40;二抗1∶5000),并配置发光液,取出试剂板,将配制好的试剂依次加入板内,加液后盖好盖子,配平后在室温2500 r/min离心5 min;按说明书将对应试剂分别加入板内,放置板子及毛细管芯。按顺序依次打开Wes、电脑和Compass软件,并进行自检,输入设计好的布局,自动进行检测,并以GAPDH作为内参对相应蛋白条带进行对比分析。

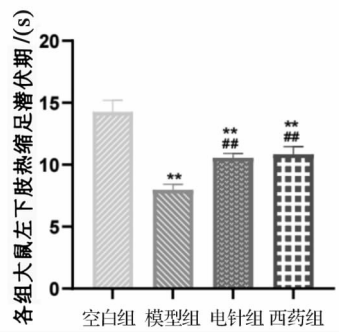
1.7 统计学方法

应用SPSS 27.0对所得的实验数据进行统计学分析,对符合正态分布且方差齐性的计量资料,采用单因素方差分析,不符合者采用非参数检验,对等级资料采用秩和检验,相关指标使用$\bar{x}\pm s$表示,$P<0.05$及$P<0.01$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠左下肢热缩足潜伏期结果

如图1所示，与空白组相比，模型组大鼠左下肢热缩足潜伏期明显缩短，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与模型组相比，电针组、西药组大鼠左下肢热缩足潜伏期显著延长，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与电针组相比，西药组大鼠左下肢热缩足潜伏期无明显变化，差异无统计学意义（$P>0.05$）。



注：**与空白组比较，$P<0.01$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图1 各组大鼠左下肢热缩足潜伏期结果柱状图

2.2 各组大鼠肌肉电生理检测结果

如插页XXⅣ图2所示，空白组大鼠在静息状态下左下肢股内侧肌肌电图形似一条直线，无异常自发电位，证明该组大鼠左下肢股内侧肌无激痛点存在；模型组6只大鼠均可见密集、波幅较大的纤颤电位，可持续超过30 s，但不超过10 min，表明MPS大鼠模型复建成功，激痛点形成；电针组未见纤颤电位，仅有一系列高频低幅的背景电位，偶见振幅相对较高的峰电位；与电针组比较，西药组治疗后仍可见低频、低幅的背景电位及较为频繁的自发电位。

2.3 各组大鼠激痛点组织病理形态变化结果

HE染色结果显示：空白组大鼠肌细胞呈规则多边形，肌纤维排列紧密，细胞核位于肌膜下，无明显炎症细胞浸润；模型组大鼠肌细胞形态不规则，增大圆染，并出现不同程度炎性细胞浸润与核内移现象；电针组、西药组肌细胞形态恢复规则的多边形，结构较清晰，细胞核位于肌膜下，针刺组较西药组肌纤维更为紧密，具体如插页XXⅤ图3所示。

2.4 各组大鼠血清IL－1β、IL－6、TNF－α、IL－10水平变化结果

与空白组相比，模型组大鼠血清IL－1β、IL－6、TNF－α、IL－10水平明显升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与模型组相比，电针组、西药组血清IL－1β、IL－6、TNF－α水平明显降低，IL－10明显升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与电针组相比，西药组血清IL－1β、IL－6、TNF－α水平明显升高，IL－10明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），具体情况如图4所示。

2.5 各组大鼠脊髓组织GFAP、OX－42阳性细胞变化结果

与空白组比较，模型组、电针组、西药组脊髓组织GFAP、OX－42阳性表达明显增加；与模型组比较，电针组、西药组脊髓组织GFAP、OX－42阳性表达显著减少，且电针组减少更为显著，以上组间差异有统计学意义（$P<0.01$），具体情况如插页XXⅤ图5、插页XXⅥ图6、图7所示。

2.6 各组大鼠脊髓组织BDNF、TrkB、p38、JNKmRNA表达水平结果

与空白组比较，模型组、电针组、西药组大鼠脊髓组织中BDNF、TrkB、p38、JNKmRNA表达水平均显著升高；与模型组比较，电针组、西药组大鼠脊髓组织中BDNF、TrkB、p38、JNKmRNA表达水平均显著降低；与电针组比较，西药组BDNF、TrkB、p38、JNKmRNA表达水平均显著升高，以上组间差异具有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$），具体情况如表2所示。

2.7 各组大鼠脊髓组织BDNF、TrkB、pTrkB、p38、p－P38、JNK、p－JNK蛋白含量结果

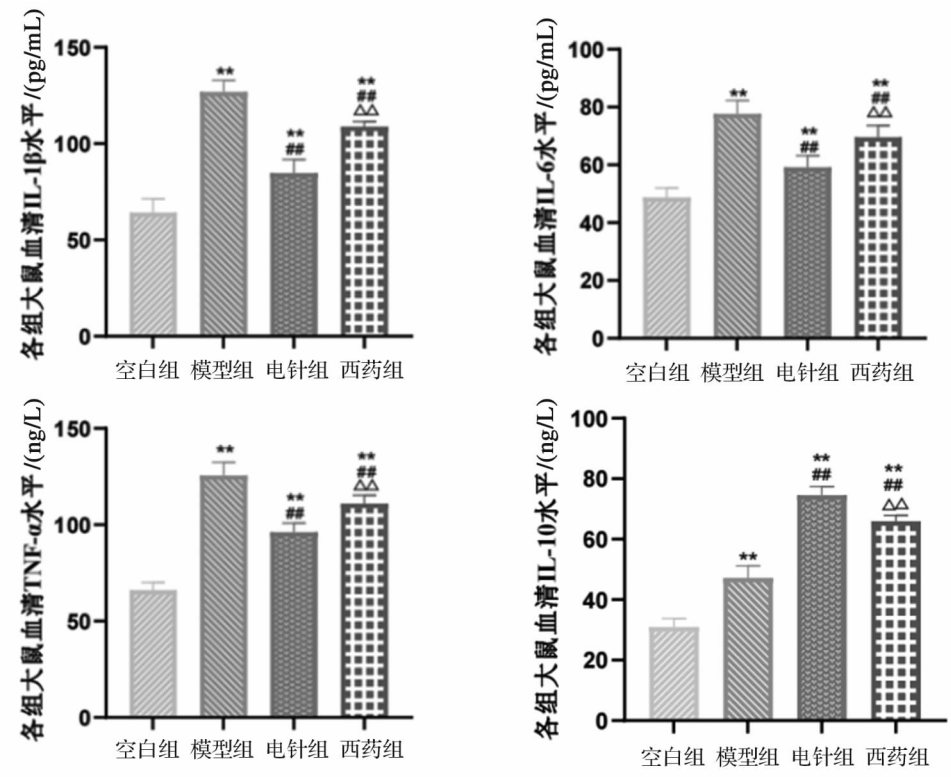
与空白组比较，模型组、电针组、西药组大鼠脊髓组织中BDNF、TrkB、p－TrkB、p38、p－P38、JNK、p－JNK蛋白表达水平显著升高；与模型组相比，以上指标趋势相反；与电针组比较，西药组BDNF、TrkB、p－TrkB、p38、p－P38、JNK、p－JNK蛋白表达水平升高，以上组间差异具有统计学意义（$P<0.05$或$P<0.01$），具体情况如图8、表3示。

3 讨论

肌筋膜疼痛综合征是一种典型的慢性肌肉骨骼疼痛类疾病。肌肉僵硬疼痛是MPS患者最常见的主诉[16]。在中医学中，MPS属“筋痹”“经筋病”范畴，其发病主要由于机体受长期不当体位或反复急慢性劳损等因素影响后，形成的条索、结节及粘连，甚至是发生钙化的骨性赘生物，而这一点与激痛点形成的病理特点非常接近[17]。对于经筋病症的治疗，针刺“解结”是重要手段[18]。所以有“刺筋上为故，刺分肉间，不可中骨也；病起筋灵，病已止”（《素问·长刺节论篇》）的记载。且与《灵枢·经筋》：“以知为数，以痛为输”的治疗原则相一致。相关研究显示，电针作为毫针与电生理效应的结合，其镇痛作用已十分明确，治疗MPS效果显著[19]，但其机制尚不十分清楚。

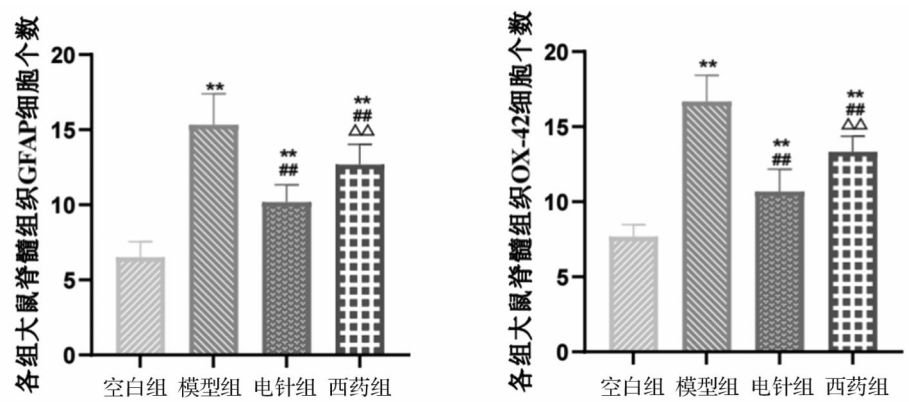
脊髓胶质细胞是近20年来痛觉领域研究的热点，大量与疼痛相关的胶质细胞研究当中，主要集中在星形胶质细胞和小胶质细胞[20]。小胶质细胞是中枢神经系统实质中特有的巨噬细胞[21]，对伤害性刺激十分敏感，是神经系统中最快做出反应的细胞[22]。生理条件下为静息状态，一旦发生神经损伤或炎症反应时，则转化为激活状态。激活的小胶质细胞通常分为两类：M1型（促炎）或M2型（抗炎）[23]。M1型分泌促炎因子TNF－α、IL－β、IL－6等，M2型分泌抗炎因子和神经营养因子白细胞介素4（Interleukin－4，IL－4）、IL－10、胶质细胞源性神经营养因子（glial cell Line－derived neurotrophic factor，GDNF）、转化生长因子β（transforming growth factor－β，TGF－β）等[24－27]。在免疫系统的调节下由M1型转化为M2型的动态变化过程成为极化[19]。星形胶质细胞是一类维持中枢神经系统稳态并为中枢神经系统提供防御作用的神经胶质细胞[28]。在炎症环境下，星形胶质细胞虽比小胶质细胞激活慢，但是在激活后其表达水平与痛行为密切相关[29－30]。星形胶质细胞激活后，会分化为A1和A2两个亚型，A1型会释放炎性因子，导致神经元退行性病变，A2型可以释放神经营养因子，对神经元起保护作用。经典激活的神经炎性小胶质细胞可以诱导A1型星形胶质细胞[31]。

脑源性神经营养因子（BDNF）是神经营养家族分泌的蛋白质，在调控神经元增殖、分化、成熟及促神经元再生方面发挥重要作用[32]。研究显示，BDNF即源于小胶质细胞，又能诱导小胶质细胞持续活化，从而形成正反馈机制[33]。TrkB作为神经营养蛋白酪蛋白激酶受体家族的成员，是BDNF的特异性受



注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；##与模型组比较，$P<0.01$；△△与电针组比较，$P<0.01$。

图 4 各组大鼠血清 IL－1β、IL－6、TNF－α、IL－10 水平（$n=6$）



注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；##与模型组比较，$P<0.01$；△△与电针组比较，$P<0.01$。

图 7 各组大鼠脊髓组织 GFAP、OX－42 阳性细胞变化结果（$n=6$）

表 2 各组大鼠脊髓组织 BDNF、TrkB、P38、JNKmRNA mRNA 表达水平（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	JNK	TrkB	BDNF	P38
空白组	6	1.000±0	1.000±0	1.000±0	1.000±0
模型组	6	3.230±0.673＊＊	3.960±0.328＊＊	2.350±0.141＊＊	2.360±0.254＊＊
电针组	6	1.070±0.081##	0.080±0.039##△	1.030±0.091##	1.130±0.049##
西药组	6	2.150±0.349＊#△	2.430±0.654##△△	1.670±0.101##△△	1.570±0.037#△△

注：＊与空白组比较，$P<0.05$；＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；△与电针组比较，$P<0.05$；△△与电针组比较，$P<0.01$。

表 3 各组大鼠脊髓组织 BDNF、TrkB、pTrkB、p38、pp38、JNK、pJNK 蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	BDNF	p－TrkB/TrkB	p－p38/p38	p－JNK/JNK
空白组	6	0.260±0.012	0.330±0.013	0.560±0.060	0.360±0.014
模型组	6	0.570±0.030＊＊	0.690±0.034＊＊	1.490±0.099＊＊	0.720±0.049＊＊
电针组	6	0.320±0.018##	0.350±0.035##	0.970±0.017##	0.350±0.053##
西药组	6	0.380±0.010##	0.470±0.057##	1.170±0.046#	0.530±0.027##

注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$。

体[34]，主要通过激活丝裂原活化蛋白激酶信号通路（p38MAPK）、蛋白激酶 C 信号（PKC）、磷酸肌醇－3－激酶/AKT 信号通路、细胞外调节蛋白激酶 ERK1/2 信号（ERK1/2）等产生一系列磷酸化级联反应[35－37]，从而介导正性信号。细胞外调节蛋白激酶（ERK）、c－Jun 氨基末端激酶（JNK）和丝裂原活化蛋白激酶 p38 抗体（p38MAPK）是 MAPK 信号通路的主要 3 个亚型[38]。特别是 JNK/p38 MAPK 信号通路是 MAPK 级联通路的重要组成部分，研究发现[39－40]当机体受到外界刺激时，JNK/p38 MAPK 信号通路被激活，磷酸化的 JNK、p38

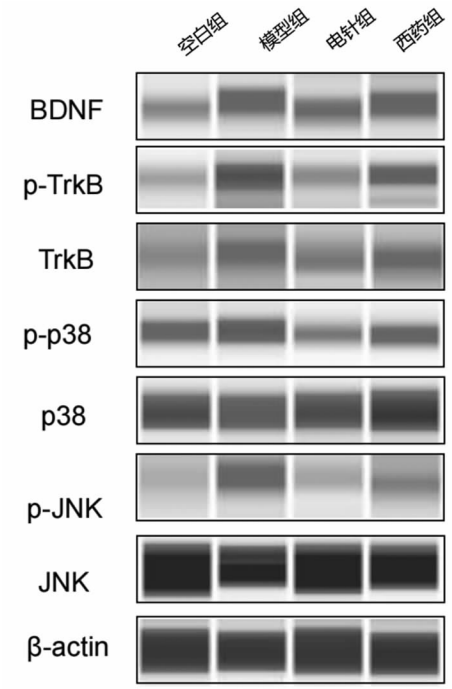


图 8 各组大鼠脊髓组织 BDNF、TrkB、pTrkB、p38、pp38、JNK、pJNK 蛋白表达水平

MAPK 通过调控炎性细胞因子表达,参与调控炎症与氧化应激反应,促进细胞凋亡[41]。同时,有研究表明 BDNF 可通过 TrkB－p38/JNK 信号通路促进小胶质细胞的激活与持续增殖,释放 TNF－α 和 IL－1β,加重神经炎症和机械性疼痛。小胶质细胞活化后又能促进 BDNF 分泌,形成正反馈[12]。在中枢神经系统水平,针刺可以通过抑制 p38MAPK、ERK 和 JNK 信号通路并调节炎症介质的释放来抑制机体的炎症反应,减轻 MPS 临床症状[42]。

钝性打击结合离心运动是目前公认的 MPS 大鼠模型建立方式[13－14]。本实验造模后大鼠左下肢打击局部可触及隆起的结节,针刺后出现局部抽搐反应,并有自发电位产生,表明 MPS 模型复制成功,采用电针和西药干预后,大鼠热缩足潜伏期显著延长,纤颤电位消失,说明电针干预对 MPS 大鼠有效。各组大鼠肌肉 HE 染色结果显示:电针和西药组炎症细胞减少,肌细胞形态恢复趋近正常证实上述结果。同时,本次实验发现:电针干预治疗 MPS 的效果好于西药组,原因可能与局部的“靶向病变”有关。当激痛点形成后,局部病变组织由“静息态”,转变为“激活态”,类似于“穴位敏化”状态。当刺激“敏化穴位”时,随着疾病状态的变化其治疗疾病的功能也明显增强[43]。同时,有报道也显示针刺能抑制实验动物的痛反应,这与辣椒素受体(Trpv－1)密切相关,而 Trpv－1 受体的激活范围也正是“针灸”刺激强度范围[43]。以上这些原因可能都与针刺的良好效果有关。而塞来昔布作为一款传统的非甾体抗炎药,仅具有镇痛、抗炎的作用,机制较为单一。

Elisa 结果显示,模型组 IL－1β、IL－6、TNF－α、IL－10 水平皆升高,说明打击结合离心运动造成了局部炎症的产生,但是由于长时间的炎症刺激,虽无外界干预,但机体免疫系统已开启自我修复功能,巨噬细胞启动极化过程。电针组与西药组相比,二者均能降低 IL－1β、IL－6、TNF－α 的水平,升高 IL－10,并且电针组更加明显,其作用机制可能是电针刺激激痛点后,进一步抑制了促炎因子释放,促进抗炎因子的分泌,从而起到拮抗炎症反应,参与组织修复及免疫调节的保护作用。免疫荧光结果显示,造模后 GFAP、OX－42 阳性表达显著增加,可能与激痛点出现后,血清中的促炎因子 IL－1β、IL－6、TNF－α 开启了由外周向中枢的疼痛信号传递有关,小胶质细胞及星形胶质细胞迅速被激活,启动机体免疫保护状态,而激活的胶质细胞又可进一步促使炎症因子的释放,加重机体炎症反应。而电针和西药治疗后阳性细胞数显著降低,说明电针激痛点可减低胶质细胞的活化,可能与针刺后减少促炎因子释放,弱化痛觉信号强度,进而降低中枢疼痛敏化程度有关。PCR 及 Wes 结果说明,当 MPS 发病时,大鼠脊髓组织中 BDNF、TrkB、p38、JNK 的 mRNA 及蛋白表达水平和 p－P38、p－JNK 磷酸化水平升高,采用电针及西药干预能降低上述指标的蛋白、mRNA 以及磷酸化水平。以上结果说明:当激痛点活化后,激活脊髓胶质细胞,促进 BDNF 分泌,进一步开启 BDNF－TrkB－p38/JNK 信号通路,而磷酸化的 JNK、p38 MAPK 又促使炎症因子持续释放,胶质细胞不断活化与持续增殖,这些都与前期研究成果相一致[12,41]。而针刺及西药治疗后上述指标的降低,说明针刺和西药干预可以通过抑制炎症反应,削弱疼痛信号的传递,进而抑制胶质细胞活化,从而减少 BDNF 的合成与释放,使其不能与 TrkB 充分结合,进而抑制 BDNF－TrkB －p38/JNK 信号通路的相关指标,进一步又抑制机体的炎症反应,切断“正反馈”信号,从而达到治疗 MPS 的目的,上述机制课题组将进一步深入研究。

综上所述,电针及塞来昔布均可以提升 MPS 大鼠痛阈,但电针优势更为明显,具体机制可能与其减少炎症因子释放,削弱外周向中枢的信号传递,降低胶质细胞活化,抑制 BDNF－TrkB －p38/JNK 信号通路的相应指标表达有关,以上结果可为电针治疗 MPS 的进一步研究提供依据。

参考文献

[1] URITS I, CHARIPOVA K, GRESS K, et al. Treatment and management of myofascial pain syndrome[J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2020, 34(3): 427－448.

[2] LI X, WANG R, XING X, et al. Acupuncture for myofascial pain syndrome: a network meta－analysis of 33 randomized controlled trials [J]. Pain Physician: American Society of Interventional Pain Physicians, 2017, 20: E883－E902.

[3] GALASSO A, URITS I, AN D, et al. Acomprehensive review of the treatment and management of myofascial pain syndrome[J]. Curr Pain Headache Rep, 2020, 24(8): 43.

[4] 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.

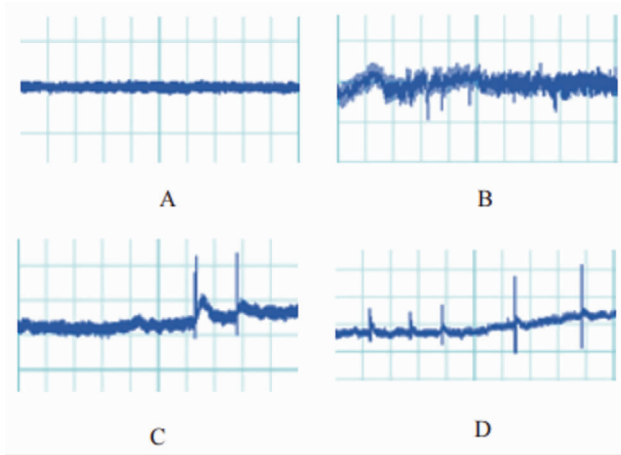
[5] 苏晗, 崔俊武, 王晶晶, 等. 肌筋膜疼痛综合征的治疗研究进展[J]. 广西医学, 2021, 43(5): 621－624.

[6] 盖惠芳, 高华斌, 郑平平, 等. MTrPs 针刺联合电刺激治疗女性盆底肌筋膜相关性慢性盆腔痛的临床效果[J]. 现代妇产科进展, 2023, 32(11): 845－847.

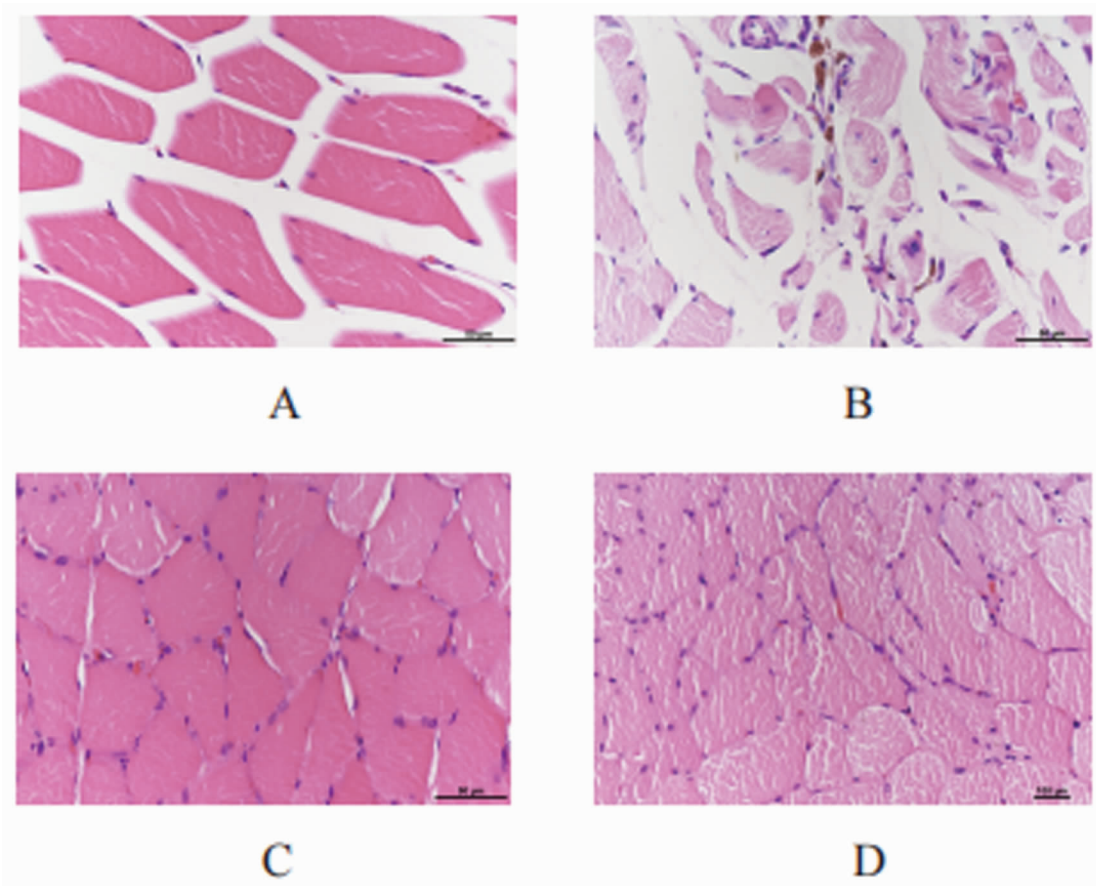
[7] GERWIN R D. Myofascial Trigger Point Pain Syndromes[J]. Seminars in Neurology,2016,36(5):469 - 473.
[8] SHAH J P,DANOFF J V,DESAI M J,et al. Biochemicals associated with pain and inflammation are elevated in sites near to and remote from active myofascial trigger points[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2008,89(1):16 - 23.
[9] GROSMAN - RIMON L,PARKINSON W,UPADHYE S,et al. Circulating biomarkers in acute myofascial pain: A case - control study [J]. Medicine (Baltimore), 2016,95(37):e4650.
[10] 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.
[11] 胡哲,王树东,王列,等. 基于激痛点不同干预方法对 MPS 大鼠模型脊髓背角星型胶质细胞及神经生长因子影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2021,23(11): 171 - 175.
[12] LI W P, SU X H, HU N Y, et al. Astrocytes mediate cholinergic regulation of adult hippocampal neurogenesis and memory through M_1 muscarinic receptor[J]. Biol Psychiatry, 2022, 92(12): 984 - 998.
[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] HUANG Q M, YE G, ZHAO Z Y, et al. Myoelectrical activity and muscle morphology in a rat model of myofascial trigger points induced by blunt trauma to the vastus medialis[J]. Acupunct Med, 2013, 31(1): 65 - 73.
[15] 王潇潇, 李群, 杨超, 等. 基于 cAMP/PKA/PGC1α 信号通路探讨恒古骨伤愈合剂改善肌筋膜疼痛综合征大鼠能量代谢的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(24): 54 - 62.
[16] GÜLOĞLU S B, TUNÇ S. The assessment of affective temperament and life quality in myofascial pain syndrome patients[J]. Int J Psychiatry Clin Pract, 2022, 26(1): 79 - 84.
[17] 吕恒勇. 慢性肌肉筋膜激痛点大鼠模型发病机制及弱激光干预研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
[18] 张鹏. 针刺结筋病灶点、激痛点及传统经穴治疗 KOA 疗效评价研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016: 1 - 61.
[19] 刘阅阅, 郑林遥, 陈佳彦, 等. 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[J]. 中医杂志, 2023,64(17): 1799 - 1806.
[20] 陈菲, 魏思琪, 张琪, 等. 胶质细胞在慢性应激诱发疼痛中的作用[J]. 生理科学进展, 2023, 54(5): 390 - 396.
[21] ALLEN N J, LYONS D A. Glia as architects of central nervous system formation and function[J]. Science, 2018, 362(6411): 181 - 185.
[22] TRANG T,BEGGS S,WAN X,et al. P2X4 - receptor - mediated synthesis and release of brain - derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38 - mitogen - activated protein kinase activation[J]. J Neurosci,2009,29(11):3518 - 3528
[23] GUO S,WANG H,YIN Y. Microglia polarization from M1to M2 in neurodegenerative diseases[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14:815347.
[24] HO I H T, CHANMTV, WUWKK, et al. Spinal microglia - neuron interactions in chronic pain[J]. JLeukoc Biol, 2020, 108(5): 1575 - 1592.
[25] VALLEJO R, TILLEY D M, VOGEL L, et al. The role of *Glia* and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain[J]. Pain Pract, 2010, 10(3): 167 - 184.
[26] ECHEVERRY S, SHI X Q, YANG M, et al. Spinal microglia are required for long - term maintenance of neuropathic pain[J]. Pain, 2017, 158(9): 1792 - 1801.
[27] CHOI B M, LEESH, ANSM, et al. The time - course and RNA interference of TNF - α, IL - 6, and IL - 1β expression on neuropathic pain induced by L5 spinal nerve transection in rats[J]. Korean J Anesthesiol, 2015, 68(2): 159 - 169.
[28] VERKHRATSKY A, ARRANZ A M, CIUBA K, et al. Evolution of neuroglia[J]. Ann N Y Acad Sci, 2022, 1518(1): 120 - 130.
[29] HONORE P, LUGERNM, SABINO M A, et al. Osteoprotegerin blocks bone cancer - induced skeletal destruction, skeletal pain and pain - related neurochemical reorganization of the spinal cord[J]. NatMed, 2000, 6(5): 521 - 528.
[30] MILLIGAN E D, LANGER S J, SLOANE E M, et al. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti - inflammatory cytokine, interleukin - 10[J]. EurJNeurosci, 2005, 21(8): 2136 - 2148.
[31] 于婧文, 郭敏芳, 张冰心,等. 黄芪甲苷可抑制炎性诱导星形胶质细胞激活及炎症反应[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(31): 5022 - 5028.
[32] BJÖRKHOLM C, MONTEGGIALM. BDNF - a key transducer of antidepressant effects[J]. Neuropharmacology, 2016, 102: 72 - 79.
[33] 曾路路. BDNF 调控小胶质细胞持续性活化状态的机制研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2013.
[34] 尤佳伟,孙亚凤,夏君霞,等. 基于 BDNF/TrkB/CREB 信号通路探讨核桃油对东莨菪碱导致认知障碍大鼠的保护作用[J]. 食品与发酵工业,2024,50(20):209 - 215.
[35] WANG G L, LI Y C, LEI C, et al. Quercetin exerts antidepressant and cardioprotective effects in estrogen receptor α - deficient female mice *via* BDNF - AKT/ERK1/2 signaling[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021, 206: 105795.
[36] ZHANG Z T, HU P L, WANG Z, et al. BDNF promoted osteoblast migration and fracture healing by up - regulating integrin β1 *via*TrkB - mediated ERK1/2 and AKT signalling[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(18): 10792 - 10802.
[37] YANG J R, REN T T, LAN R F, et al. Tea polyphenols attenuate staurosporine - induced cytotoxicity and apoptosis by modulating BDNF - TrkB/Akt and Erk1/2 signaling axis in hippocampal neurons[J]. IBRO Rep, 2020, 8: 115 - 121.
[38] BURILLO J, MARQUÉS P, JIMÉNEZ B, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in Alzheimer's disease[J]. Cells, 2021, 10(5): 1236.
[39] ZHANG H, TANG W W, WANG S, et al. Tetramethylpyrazine inhibits platelet adhesion and inflammatory response in vascular endothelial cells by inhibiting P38 MAPK and NF - κB signaling pathways[J]. Inflammation, 2020, 43(1): 286 - 297.
[40] 于竹芹, 汪贯习, 王潇璐, 等. 胡黄连苷Ⅱ干预脑缺血/再灌注损伤后 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路的作用机制[J]. 解剖学报, 2021,52(2): 196 - 204.
[41] SHU Y, YANG Y, ZHANG P B. Neuroprotective effects of penehyclidine hydrochloride against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. Brain Res Bull, 2016, 121: 115 - 123.
[42] DOU B M, LI Y N, MA J, et al. Role of neuroimmune crosstalk in mediating the anti - inflammatory and analgesic effects of acupuncture on inflammatory pain[J]. FrontNeurosci, 2021, 15: 695670.
[43] 景向红,宿杨帅,高昕妍,等. 推进针灸学科的高质量发展[J]. 针刺研究,2024,49(1): 1 - 5.

基于 BDNF－TrkB－p38/JNK 信号通路研究电针对肌筋膜疼痛综合征大鼠的分子生物学机制

（正文见 165－171 页）



注：扫描速度 200 ms/D，灵敏度 250 μV。A：空白组，B：模型组，C：电针组，D：西药组。
图 2　各组大鼠左下肢肌电图检测结果



注：扫描速度 200 ms/D，灵敏度 250 μV。A：空白组，B：模型组，C：电针组，D：西药组。
图 3　各组大鼠激痛点组织病理形态学结果（HE 染色，×400）

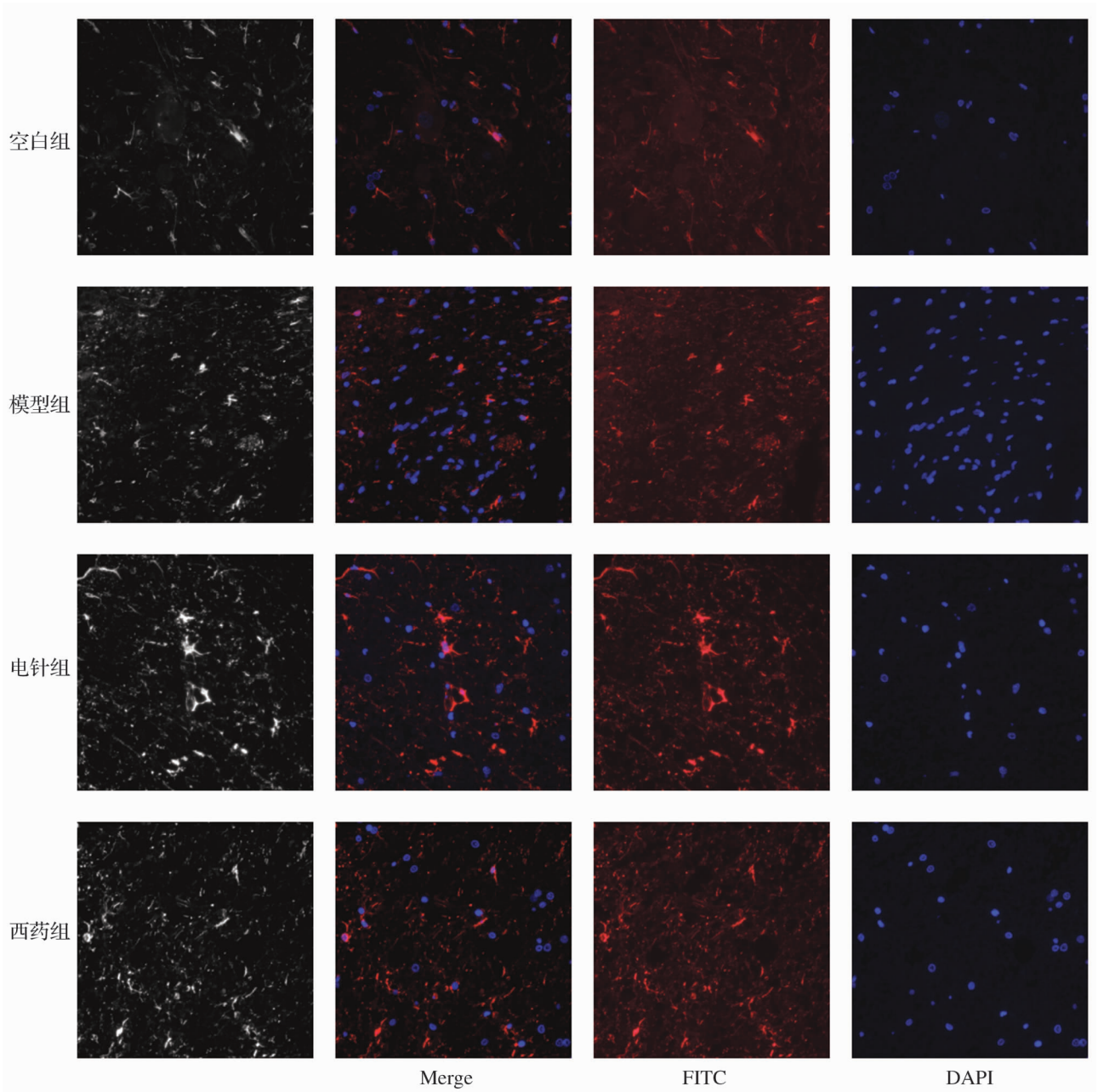


图 5 各组大鼠脊髓组织 GFAP 阳性细胞变化

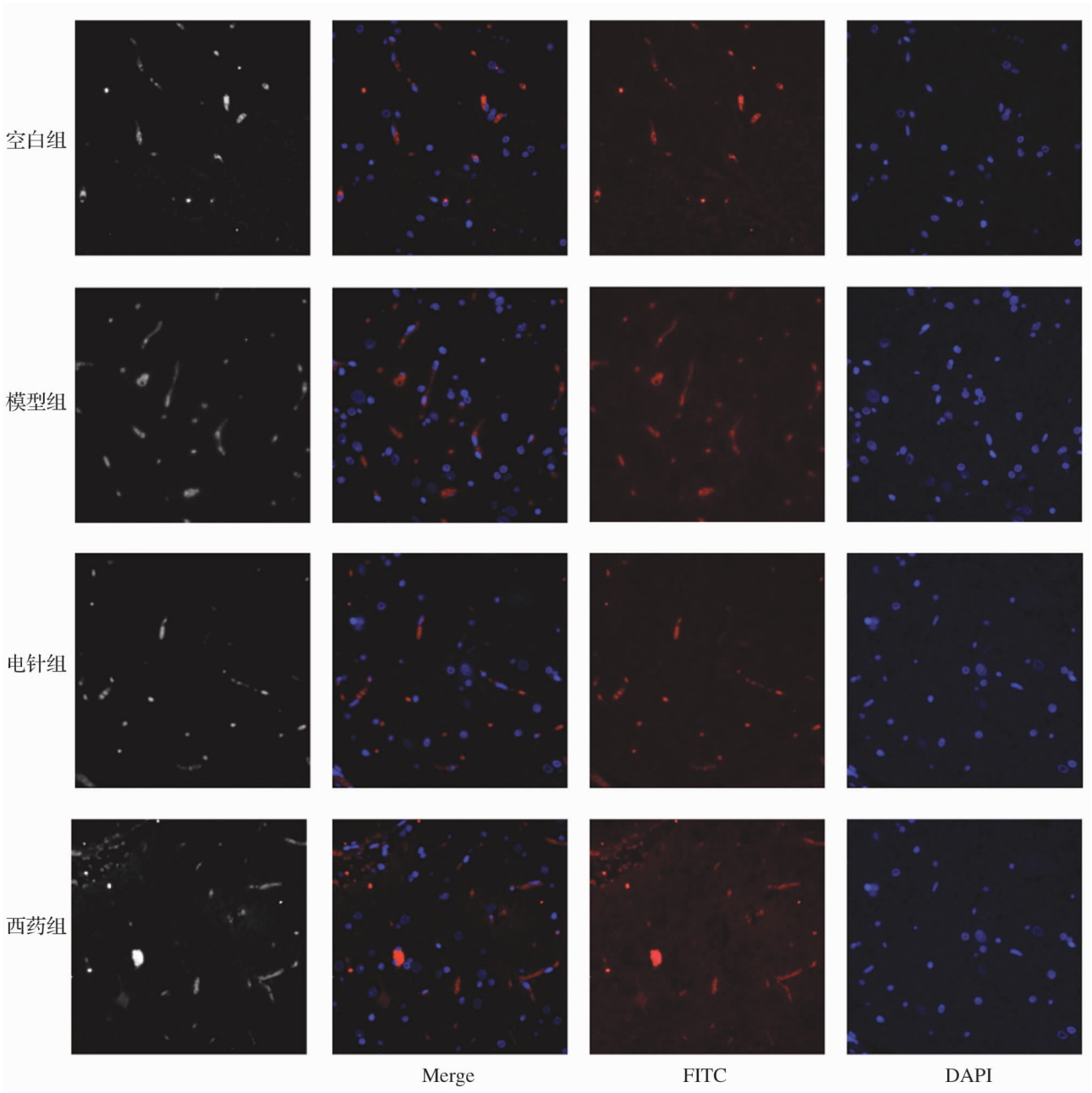


图 6　各组大鼠脊髓组织 OX－42 阳性细胞变化（$n=6$）