



## • 科研简报 •

## 交感神经和肌卫星细胞对肌筋膜激痛点修复的影响 \*

武 凯<sup>1</sup> 袁仕国<sup>2</sup> 廖立青<sup>1</sup> 李义凯<sup>1△</sup>( <sup>1</sup> 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; <sup>2</sup> 南方医科大学第三附属医院广东省骨科研究院, 广州 510515)

肌筋膜激痛点 (myofascial trigger points, MTrPs) 是骨骼肌中坚硬、离散的肌紧张带, 可引起自发性疼痛, 或受压时疼痛<sup>[1]</sup>, 而 MTrPs 又是肌筋膜疼痛综合征的核心<sup>[2]</sup>。肌筋膜疼痛综合征在临床中发病率较高, 流行病学研究显示肌筋膜疼痛综合征影响 95% 的慢性疼痛病人<sup>[3]</sup>。目前国内外已经有许多针对肌筋膜疼痛的机制研究, 普遍认为肌筋膜疼痛综合征的主要病理改变是局部炎症因子和致痛递质浓度的升高<sup>[4]</sup>。近年来国内外对肌筋膜的报道集中在各种治疗方法上, 但何种治疗方法最有效, 始终没有定论, 究其原因缺少对肌筋膜痛发病机制的研究<sup>[1]</sup>。有文献报道交感神经和肌卫星细胞<sup>[5,6]</sup>影响局部炎症因子及致痛递质的浓度, 其中肌卫星细胞又参与肌纤维的修复<sup>[7]</sup>。本文将通过构建交感神经阻断和 MTrPs 模型, 对影响肌筋膜痛发展的相关因素进行研究。以探究交感神经与肌卫星细胞在肌筋膜痛的发展和预后中发挥的作用。

## 方 法

## 1. 实验动物与分组

健康 8 周龄的雄性 SD 大鼠共 30 只, 质量 (222±8.66 g), 由南方医科大动物试验中心提供, 许可证号: SCXK (粤) 20160041, 动物正常饲养, 恒温 (22.0℃)、恒湿 (55.0%), 自由饮水、饮食。将 30 只大鼠按照随机表法分为: 注射对照组 (A 组)、试验组 (B 组)、注射结合打击组 (C 组)、打击对照组 (D 组)、神经阻断组 (E 组), 每组 6 只。造模分两阶段。

## 2. 实验试剂与仪器

段氏动物试验跑台 (上海欣软信息科技有限公司, XR-PT-10A), 自制打击器 1 台 (主要部分是长度为 50 cm 的木棒, 下端为圆形, 打击面直

径 1 cm。木棒顶端加有附加物, 总质量为 1200 g。打击高度为 20 cm, 动能为 2.352 J), 全波长多功能读数仪酶标仪 (美国 Thermo 赛默飞, Varioskan LUX), 超微量分光光度计 (美国 Thermo 赛默飞, NanoDrop2000), 荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo 赛默飞, ABI Stpone plus), 光学显微镜 (日本 OLYMPUS, BX-53)。冰冻切片机 (德国莱卡 Leica, CM1860)。一次性病理刀片 (日本 Feather 羽毛, A35), 6-OHDA (美国 Sigma, H4381), Rat TNF- $\alpha$  ELISA-Kit (中国 Multi Sciences, EK382/3-48), Rat Noradrenaline-(NE) ELISA-Kit (中国 Cloud-Clone Corp, CEA907Ge), Rat 5-Hydroxytryptamine (5HT) ELISA-Kit (中国 CSB, E08364r), 其他实验用试剂及耗材均购自美国 Sigma 公司。

## 3. 方法

(1) 实验动物分组、交感神经干预及打击造模: 造模分两阶段, 第一阶段为化学阻断交感神经: 试验组 (B 组)、神经阻断组 (E 组) 大鼠在前 3 天分别适应性注射 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg 后, 每日腹腔注射 6-OHDA (100 mg/kg), 持续 7 天<sup>[8]</sup>, 注射对照组 (A 组)、注射结合打击组 (C 组) 在相同时间腹腔注射相同剂量生理盐水。打击对照组 (D 组) 大鼠在第一阶段不予处理, 正常喂养。

第二阶段为 MTrPs 造模, 试验组 (B 组)、注射结合打击组 (C 组)、打击对照组 (D 组) 大鼠处理相同, 造模方法参照黄强民等研究<sup>[9]</sup>: 每周第 1 天腹腔注射 10% 水合氯醛 (3 ml/kg) 麻醉后暴露大鼠左侧股四头肌, 保持股四头肌与打击台直接接触, 对大鼠左侧股四头肌进行打击处理。第 2 天进行跑台离心运动: 大鼠在多通道跑台进行离心运动, 速度为 8 m/s, 每次维持 15 min。同样干预方式每周进行 1 次, 维持 8 周。

\* 基金项目: 海南省自然科学基金面上项目 (817339); 海南省自然科学基金面上项目 (817340); 广州市科技计划重大项目 (201604020095)

△ 通讯作者 1169546158@qq.com



(2) 评估大鼠肌筋膜痛模型造模成功率：造模完成正常喂养 1 周后，取材前通过对试验组（B 组）大鼠打击部位触摸检测 MTrPs 造模是否成功。评估方法参照周理等<sup>[10]</sup>研究：轻度麻醉大鼠（1 mg/kg），轻度抓握大鼠股二头肌，通过触诊仔细寻找骨骼肌中的紧张带。确定肌紧张带后，沿着肌紧张带走行方向挤压，引起局部颤搐反应的大鼠即为肌筋膜痛造模成功。本研究共行三组肌筋膜痛造模，其中试验组（B 组）和打击对照组（D 组）组内 6 只大鼠全部造模成功，注射结合打击组（C 组）中共 5 只大鼠造模成功。

(3) 采用 ELISA 法检测大鼠血浆中 5-HT、NE 和 TNF- $\alpha$  的水平：腹腔注射 10% 水合氯醛（3 ml/kg）麻醉大鼠。通过腹腔静脉采血，将每次所取血标本加入含有 60  $\mu$ l 10% EDTA 和 80  $\mu$ l 抑肽酶的无菌离心管中混匀，3000 rpm 离心 15 min，分离血浆。取上清置于 -80℃ 冰箱中保存待测。待检测 NE、TNF- $\alpha$  和 5-HT 在血浆中浓度时，严格按照各样品 ELISA 试剂盒说明书中操作步骤实施检测。大鼠血浆中 NE、TNF- $\alpha$  和 5-HT 检测完成后，采用 Curve Expert 2.20 软件进行标准曲线拟合，绘制标准曲线并确定曲线方程，计算样本各指标浓度值进行统计分析。

(4) 取材、制片与 HE 染色：各组大鼠在取血后以脊髓脱臼法处死，解剖分离股四头肌。在 MTrPs 局部取下 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小的肌组织块，用生理盐水漂洗 2~3 次，再投入液氮中，后置于 -80℃ 冰箱中保存待测。将冰冻肌肉组织切片，厚度为 5  $\mu$ m，横切纵切各一张固定在同一载玻片上，苏木精-伊红染色，光学显微镜下观察股内侧肌局部组织形态及其病理变化。

(5) Realtime-PCR 法测量 MyoG 和 MyoD 基因表达：在 GenBank 中检索 MyoG 和 MyoD 基因表达序列（见表 1），使用 Nanodrop 2000 检测样品 RNA 浓度及纯度，将浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释，使其终浓度为 200 ng/ $\mu$ l。依次加入 4  $\mu$ l 5×Reaction Buffer、2  $\mu$ l 10 mM dNTP Mix、1  $\mu$ l Ri-

boLock RNAase 抑制剂（20 U/ $\mu$ l）和 1  $\mu$ l RevertAi M-MuLV 逆转录酶（200 U/ $\mu$ l）进行反转录。取 0.2 ml PCR 管，分别加入如下反应体系：12.5  $\mu$ l 2×qPCR Mix，2.0  $\mu$ l 7.5  $\mu$ M 基因引物，2.5  $\mu$ l 反转录产物和 8.0  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O，每个反转录产物配制 3 管，进行实时定量 PCR 扩增。结果报告为通过 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 方法计算的 MyoG 基因表达的倍数变化。

(6) 主要观测指标：①各组 HE 染色后，观察 MTrPs 局部组织形态及病理变化，观察肌纤维是否有萎缩；②各组大鼠双侧股四头肌 MyoG 和 MyoD 基因浓度检测和分析（Real-time PCR 法）；③各组大鼠血浆中 5-HT、TNF- $\alpha$  和 NE 浓度检测与分析（ELISA 法检测）。

#### 4. 统计学分析

应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析，所采集数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示。同组大鼠不同侧别间的均数比较采用配对样本 *t* 检验。方差齐性检验采用 levene 法。方差齐性时，不同组之间的均数比较采用单因素方差分析 (one-way classification ANOVA)，组间两两比较采用 SNK-*q* 法比较；方差不齐时，采用 Welch 法进行近似方差分析，组间两两比较采用 Dunnett's T3 和 Dunnett's C 法比较；*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1. 苏木精-伊红染色观察

苏木精-伊红染色，光镜下观察可见，对照组（A 组）和神经阻断组（E 组）双侧骨骼肌肌纤维排列规则、整齐，肌间隙均匀一致，未见炎性细胞浸润，E 组肌纤维较 A 组见轻微萎缩（见图 A1、E1）；试验组（B 组）、注射结合打击组（C 组）、打击对照组（D 组）的肌纤维横截面出现不同程度缩小，肌纤维间隙增宽且大小不一（见图 B1、C1、D1），试验组（B 组）肌纤维周围及周围结缔组织炎性细胞浸润严重（见图 B1）。对照组（A 组）肌

表 1 引物信息

| 引物编号        | 引物名称         | 引物序列 (5'-3')            | 片段长度 (bp) |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------|
| NM_017008.4 | R-GAPDH-S    | CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG  | 138       |
|             | R-GAPDH-A    | GGTGAAGAATGGGAGTTGCT    |           |
| NM_176079.1 | R-MYoD-S     | TCCGCTACATTGAAGGTCTGC   | 177       |
|             | R-MYoD-A     | TGTAATCCATCATGCCATCAGAG |           |
| NM_017115.2 | R-Myogenin-S | GCAGTGCCATCCAGTACATTGA  | 279       |
|             | R-Myogenin-A | TGACAGACATATCCTCCACCGTG |           |

纤维排列整齐、紧密(见图A2),神经阻断组(E组)肌纤维排列稍紊乱(见图E2),试验组(B组)、注射结合打击组(C组)、打击对照组(D组)肌纤维排列紊乱、出现不同程度的断裂、扭曲,肌纤维横纹排列不齐、甚至消失以及炎性浸润(见图B2、C2、D2),其中炎性浸润以B组最为严重。

## 2. 不同组间炎症因子5-HT、TNF- $\alpha$ 及NE浓度差异

试验组(B组)与神经阻断组(E组)的5-HT浓度均显著低于对照组(A组)、注射结合打击组(C组)以及打击对照组(D组),B组和E组的5-HT浓度无显著差异,A、C、D三组之间的5-HT浓度无统计学差异(见图2A);B、C、D、E四组大鼠血浆中NE浓度均显著低于A组( $P < 0.001$ ),且四组之间无统计学差异(见图2B);不同组大鼠血浆中平均TNF- $\alpha$ 浓度的差异无统计学意义(见图2C)。

## 3. 不同组大鼠肌肉组织中MyoD和MyoG浓度的差异

试验组(B组)、注射结合打击组(C组)左侧大腿肌肉中MyoG的浓度显著低于对照组(A组)( $P < 0.05$ ),其余各组大鼠同侧肌肉中MyoG浓度差异无统计学意义;试验组(B组)、打击对照组(D组)和神经阻断组(E组)右侧大腿肌肉中MyoD的浓度显著低于A组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ),D、E组大鼠左侧肌肉中MyoD浓度显著低于C组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ );其余各组大鼠同侧肌肉中的MyoD的浓度C差异无统计学意义。任意组大鼠对侧肌肉中MyoG和MyoD浓度的差异均无统计学意义。

## 讨 论

本研究中A组和E组两组大鼠双侧骨骼肌肌

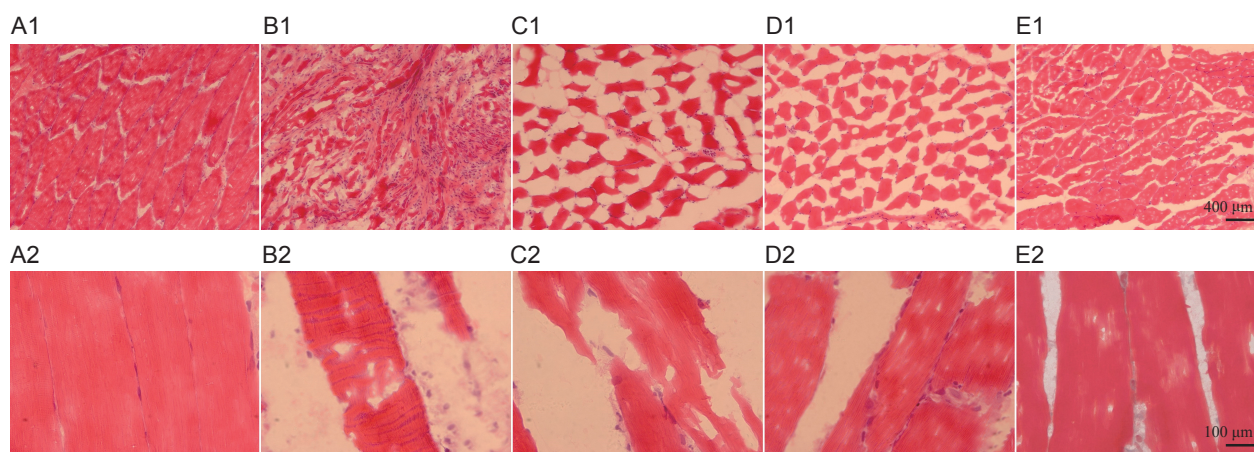


图1 各组大鼠左侧股四头肌切片  
左上角标号为大鼠组别,右下角为标尺(图A1-E1  $\times 100$ 倍, Scale bar = 400  $\mu\text{m}$ , 图A2-E2  $\times 400$ 倍, Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ )

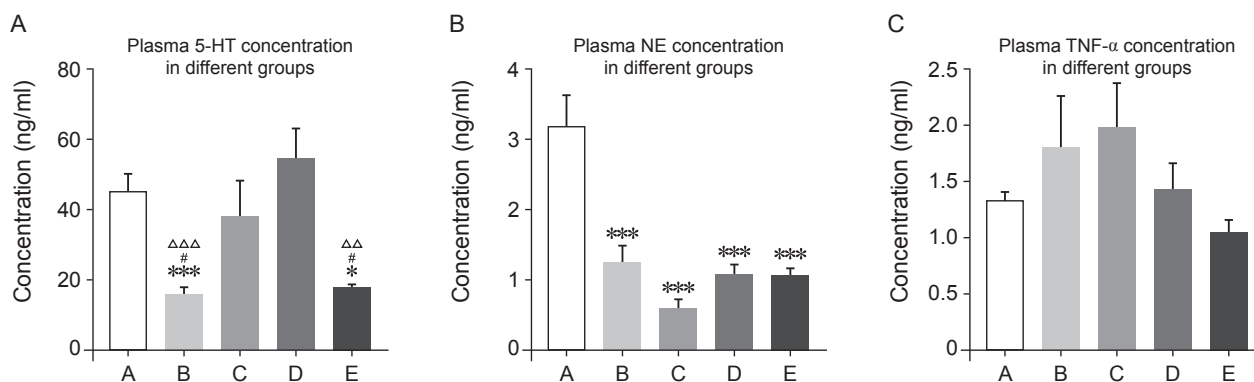


图2 各组大鼠血浆中5-HT、NE和TNF- $\alpha$ 浓度比较( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,与A组相比较; # $P < 0.05$ ,与C组相比较;  $\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ ,与D组相比较

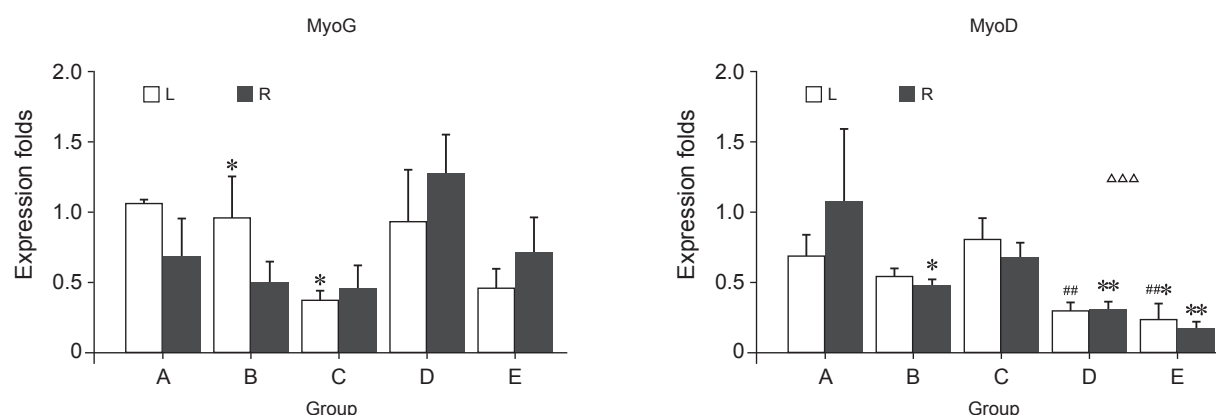


图3 大鼠肌肉中肌调节因子浓度比较 ( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm SD$ )  
 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , 与 A 组相比较;  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ , 与 C 组相比较

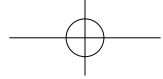
纤维排列规则、整齐、肌间隙均匀一致,未见炎性细胞浸润。两组大鼠均未见炎性浸润,提示阻断交感神经不会引起正常个体炎性因子浓度的改变,但 E 组肌纤维较 A 组出现轻度萎缩,说明阻断交感神经能影响肌纤维的生长。B、C、D 组大鼠左侧肌纤维横截面出现不同程度缩小,出现不同程度的炎性浸润。其中各组肌纤维萎缩程度无明显差异,炎性浸润情况以 B 组为甚。说明在肌筋膜痛个体中,阻断交感神经仅能对局部炎症因子的浓度产生影响,并不会对激痛点局部的肌纤维形态产生影响。B、C、D 三组受打击大鼠双侧腓肠肌出现不同程度萎缩,其中左侧较右侧严重,提示肌筋膜炎症并不只是局限性激痛点局部,同时也会对其他部位的骨骼肌产生一定的影响,这种影响是否受交感神经的调控有待证实。

组织中 NE 浓度是一个动态平衡的过程,可以因为调节组织 NE 浓度的过程之间的动态平衡而增加、减少或不变化。NE 合成、释放、再摄取和代谢过程受交感神经支配。6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 是一种选择性破坏交感神经-去甲肾上腺素神经纤维的神经毒素。由于具有良好的选择性破坏交感神经系统的作用<sup>[11,12]</sup>,现广泛用于化学交感神经切除术。6-OHDA 可通过去甲肾上腺素转运蛋白进入神经突触,并可突触囊泡中的肾上腺素能神经释放儿茶酚胺,造成神经突触吸收和储存内源性儿茶酚胺能力降低<sup>[13]</sup>,间接造成组织中 NE 浓度降低<sup>[14]</sup>。因此,NE 作为交感神经递质,其在血浆中的浓度水平可以有效反应交感神经整体活性。本研究中注射对照组血浆中 NE 浓度显著高于神经阻断组大鼠血浆中 NE 浓度。说明神经阻断组交感神经可能受损,从而导致 NE 释放减少;而其余三组大鼠血浆中 NE 浓

度无显著性差异,则说明反复创伤对大鼠 NE 反馈调节的作用大于交感神经对 NE 释放的影响,或者反复创伤会造成大鼠交感神经的损伤。

肌筋膜疼痛在病理上是由骨骼肌的慢性无菌性炎症造成的<sup>[2]</sup>,对激痛点局部骨骼肌会有不同程度的损伤。肌肉再生包括变性、炎症、再生、重塑和成熟<sup>[15]</sup>的过程。其中,炎症过程主要是一些炎症因子:中性粒细胞、巨噬细胞、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和细胞因子如白介素 6 (IL-6) 等在肌肉恢复期间由肌纤维中释放,并介导骨骼肌基本功能的再生<sup>[16]</sup>。其中 TNF- $\alpha$  又被称为促炎症细胞因子,在肌肉修复过程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>:一方面是启动抗菌炎症反应的关键细胞因子;另一方面, TNF- $\alpha$  能通过调节细胞中一氧化氮 (NO) 的含量达到调节 MTrPs 局部炎症因子的作用。本研究所有组大鼠血浆中的 TNF- $\alpha$  浓度无显著性差异。其中 A、E 两组大鼠血浆中 TNF- $\alpha$  浓度无显著性差异,在正常个体中,阻断交感神经对大鼠体内的 TNF- $\alpha$  浓度水平不产生影响;其余三组受打击大鼠与体内血浆中 TNF- $\alpha$  浓度也无显著性差异,证实了交感神经在介导炎症因子参与 MTrPs 局部受损骨骼肌的修复中未直接发挥作用。而三组 MTrPs 造模组 (B、C、D) 血浆中 TNF- $\alpha$  浓度与两组未造模组 (A、E) 无明显差异,分析可能由于以下两种原因造成:①肌筋膜炎属于慢性炎症,在首次打击后经历炎性浸润过程,至造模结束肌肉再生已经进入下一阶段,所以检测到各组 TNF- $\alpha$  浓度相近;②由于反复打击大鼠导致出现适应性的痛阈增加,导致炎症因子释放减少。进一步证实交感神经切除不会影响肌筋膜痛个体血浆中 TNF- $\alpha$  浓度变化。

5-羟色胺 (5-HT) 是一种神经调节剂,参与几种



中枢介导的机制,如内分泌过程、行为和炎症状态<sup>[18]</sup>。在外周大量 5-HT 储存在血小板中并在血小板活化期间释放。5-HT 作为强效外周致痛作用的递质,在疼痛的形成起重要作用,无论在中枢神经系统还是在外周神经系统,5-HT 均参与疼痛的调制<sup>[19,20]</sup>。5-HT 在外周作为致痛因子<sup>[21]</sup>,具有激活伤害性感受器、降低感觉阈值、参与痛觉敏化的作用。有研究证实<sup>[22]</sup>,增高血 5-HT 浓度,可以更有效地缓解疼痛。本研究中注射对照组、注射结合打击组、打击对照组三组中 5-HT 浓度无显著性差异,提示反复打击大鼠后不会造成大鼠血浆中 5-HT 含量升高。而试验组血浆中 5-HT 浓度显著小于注射结合打击组,神经阻断组血浆中 5-HT 浓度显著低于注射对照组,说明外周交感神经阻断可导致大鼠血浆 5-HT 浓度降低,交感神经可以通过调节 5-HT 的浓度,进而对受损骨骼肌局部的炎症状态及外周致痛因子的分布产生影响。

成人骨骼肌的再生是持续性的,在静息状态下保持较小的再生速率,以修复日常磨损造成的损伤。成体肌肉干细胞(MSC 或肌卫星细胞)是负责再生和愈合的肌原细胞的主要来源。当骨骼肌受到创伤时,静息的 MSC 被激活,会增殖和分化,以融合到受损的纤维中或形成新的肌管<sup>[23]</sup>。MyoD 对肌分化的启动,多种细胞向肌细胞的转化,成肌细胞融合以及肌纤维的形成有重要作用<sup>[24]</sup>;MyoG 对于功能性骨骼肌的发育至关重要<sup>[25]</sup>。有研究证实<sup>[26]</sup>在去坐骨神经支配后,骨骼肌中的 MyoG 表达在 7 天内明显上调,但高表达水平不能维持超过 1 个月。MyoG 高表达可以防止失神经肌肉的萎缩<sup>[27]</sup>。去神经支配不仅诱导肌肉肌细胞生成素表达,还增强肌肉组织中的 MSC 活性。本研究从第 1 次打击造模到取材经历 5 周时间,至取材时所有大鼠的两侧股四头肌之间的 MyoG 和 MyoD 扩增倍数之间无显著性差异,MyoG 未出现高表达。提示肌卫星细胞的激活是从首次打击开始,持续反复打击并不会维持 MyoG 的持续高水平状态;说明慢性 MTrPs 中肌卫星细胞的表达不受交感神经支配。A 组大鼠双侧肌肉中 MyoD 浓度均显著高于 E 组,证实正常个体中交感神经阻断会降低骨骼肌中 MyoD 浓度,导致骨骼肌中肌肉的分化程度降低,进而引起骨骼肌的萎缩。而在行肌筋膜痛造模个体中,B 组大鼠双侧侧肌肉中 MyoD 浓度与 D 组大鼠均无明显差异。则提示,在肌筋膜痛个体中,阻断交感神经并不会引起 MyoD 浓度的变化。交感神经能对正常个体骨骼肌中肌卫星细胞产生影响,尚无法证实交感神经对激痛点局部的肌卫星细胞的增殖分化产生影响。

交感神经能对 MTrPs 局部炎症状态产生影响,尚无充分理由证实交感神经对激痛点局部肌卫星细胞的增殖分化产生影响。

## 参 考 文 献

- [1] Shah JP, Thaker N, Heimur J, *et al.* myofascial trigger points then and now: a historical and scientific perspective[J]. PM R, 2015, 7:746-761.
- [2] Simons DG. Clinical and etiological update of myofascial pain from trigger points[J]. J Musculoskelet Pain, 1996, 4:93-122.
- [3] Malanga GA, Cruz CE. Myofascial low back pain: a review[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2010, 21:711-724.
- [4] 黄丹婧, 吕娇娇, 黄强民, 等. 肌筋膜疼痛触发点内理化环境的改变及其作用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15:5313-5316.
- [5] Schaible HG, Straub RH. Function of the sympathetic supply in acute and chronic experimental joint inflammation[J]. Auton Neurosci, 2014, 182:55-64.
- [6] Perandini LA, Chimin P, Lutkemeyer DDS, *et al.* Chronic inflammation in skeletal muscle impairs satellite cells function during regeneration: can physical exercise restore the satellite cell niche[J]. FEBS J, 2018, 285:1973-1984.
- [7] Pawlikowski B, Pulliam C, Betta ND, *et al.* Pervasive satellite cell contribution to uninjured adult muscle fibers[J]. Skelet Muscle, 2015, 5:42.
- [8] Jiang XH, Guo SY, Xu S, *et al.* Sympathetic nervous system mediates cold stress-induced suppression of natural killer cytotoxicity in rats[J]. Neurosci Lett, 2004, 358:1-4.
- [9] 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, 28:415-418.
- [10] 周理, 罗和平, 李义凯, 等. 肌筋膜痛扳机点模型与造模方法研究进展 [J]. 中国运动医学杂志, 2016, 35:789-792.
- [11] Szpunar MJ, Belcher EK, Dawes RP, *et al.* Sympathetic innervation norepinephrine content and norepinephrine turnover in orthotopic and spontaneous models of breast cancer[J]. Brain Behav Immun, 2016, 53:223-233.
- [12] Penn A, Mohr AM, Shah SG, *et al.* Dose-response relationship between norepinephrine and erythropoiesis: evidence for a critical threshold[J]. J Surg Res, 2010, 163:85-90.
- [13] 姜萍, 马度芳, 姜月华, 等. 桂枝汤不同桂芍比例配伍对 6-OHDA 诱导的心脏去交感神经损伤模型大鼠心肌的保护作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36:608-613.
- [14] Gálosi R, Petykó Z, Kállai V, *et al.* Destruction of nor-

(下转第 703 页)