

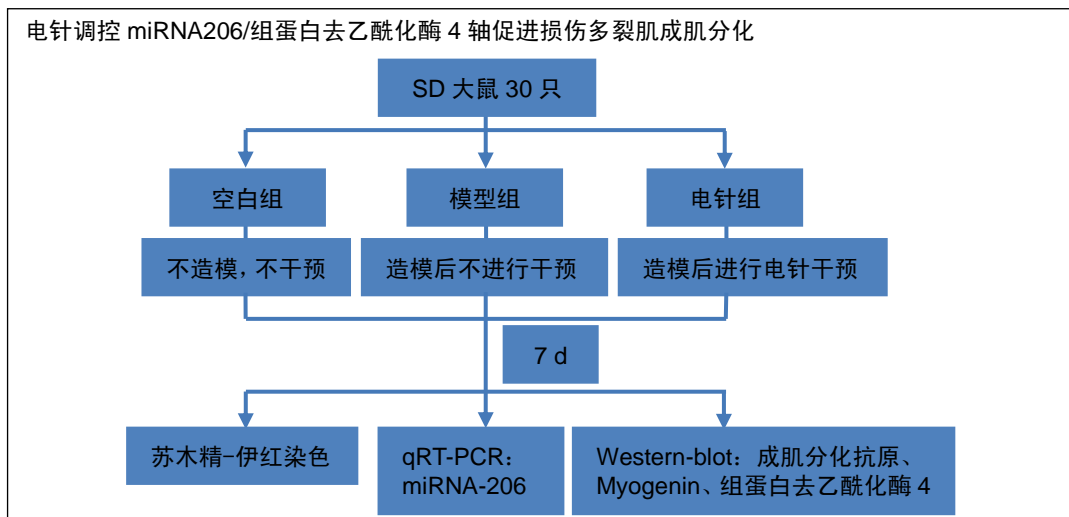
# 电针调控miRNA206/HDAC4轴促进损伤多裂肌修复过程中成肌细胞分化的机制

刘通<sup>1</sup>, 于佳妮<sup>2</sup>, 邹德辉<sup>3</sup>, 邝伟川<sup>1</sup>, 王小寅<sup>1</sup>, 文希<sup>1</sup>, 江焯<sup>1</sup>, 邱晓佳<sup>1</sup>, 曾遥<sup>1</sup>, 刘悦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>广东省第二中医院针灸康复科, 广东省广州市 510095; <sup>2</sup>广东省中医院康复科, 广东省广州市 510120; <sup>3</sup>华北理工大学中医学院, 河北省唐山市 063210)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1816

ORCID: 0000-0002-5185-2188(刘通)

文章快速阅读:



刘通, 男, 1987 年生, 山东省莱芜市人, 汉族, 主治医师, 2016 年北京中医药大学毕业, 博士, 主要从事针灸临床机理研究。

通讯作者: 刘悦, 硕士, 主任中医师, 硕士生导师, 广东省第二中医院针灸康复科, 广东省广州市 510095

并列通讯作者: 于佳妮, 博士, 主治医师, 广东省中医院康复科, 广东省广州市 510120

文献标识码: B

稿件接受: 2019-05-20



Liu Tong, PhD, Chief physician, Department of Acupuncture and Rehabilitation, Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China

Corresponding author: Liu Yue, Master, Chief physician, Master's supervisor, Department of Acupuncture and Rehabilitation, Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China

Corresponding author: Yu Jiani, PhD, Attending physician, Department of Rehabilitation, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

文题释义:

**多裂肌:** 多裂肌位于脊柱最内侧, 是附着面积最大的椎旁肌, 由多束组成, 起于腰椎椎板、棘突, 止于骶骨背面, 在腰部比较发达, 对维持腰椎的稳定性尤为重要。

**成肌分化:** 成肌分化是肌肉干细胞——肌卫星细胞的特性之一, 当肌卫星细胞增殖到一定阶段后, 即开始出现分化倾向, 为后期的成肌融合准备。

摘要

**背景:** 作者前期的动物及细胞实验研究已证明电针可提高损伤腰多裂肌中 Pax7 和成肌分化抗原的表达, 促进多裂肌的损伤修复。亦有研究证明 miRNA206 促进成肌分化主要是通过抑制组蛋白去乙酰化酶 4 实现的。

**目的:** 观察电针对布比卡因致大鼠腰多裂肌损伤修复过程中 miRNA206/组蛋白去乙酰化酶 4 表达的影响。

**方法:** 实验方案经广东省第二中医院动物实验伦理委员会批准(批准号为 048604)。将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、电针组, 每组 10 只。模型组、电针组采用 0.5% 布比卡因肌肉内注射复制大鼠多裂肌损伤模型; 对照组予注射等量生理盐水。对照组与模型组不进行针刺干预, 电针组予针刺双侧委中穴、肾俞穴, 针刺后连接电针, 波形选用疏密波, 电针频率采用 2 Hz/10 Hz, 电流强度选择 1 mA, 持续治疗 20 min, 每天治疗 1 次, 共治疗 7 d。干预 7 d 后, 通过苏木精-伊红染色观察损伤部位多裂肌形态学变化, 采用 qRT-PCR 检测多裂肌中 miRNA206 的表达量, Western-blot 检测多裂肌中成肌分化抗原、Myogenin 及组蛋白去乙酰化酶 4 蛋白的表达。

**结果与结论:** ①苏木精-伊红染色显示, 7 d 后, 对照组可见视野中骨骼肌纤维大部分排列整齐, 无明显破坏及巨噬细胞浸润; 模型组视野内可见大量肌纤维被破坏, 但出现部分肌纤维修复, 巨噬细胞数量仍较多; 电针组新生肌纤维较多, 巨噬细胞较模型组减少; ②Western-blot 结果显示, 7 d 后, 模型组成肌分化抗原、Myogenin、组蛋白去乙酰化酶 4 蛋白表达均较对照组升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 电针组成肌分化抗原、Myogenin 蛋白表达较模型组升高( $P < 0.01$ ), 组蛋白去乙酰化酶 4 蛋白较模型组降低( $P < 0.01$ ); ③qRT-PCR 结果显示, 7 d 后, 模型组 miRNA206 表达高于对照组( $P < 0.01$ ), 电针组 miRNA206 表达高于模型组( $P < 0.05$ ); ④结果说明, 电针可促进多裂肌损伤后成肌分化, 其作用可能是通过提高 miRNA206 表达抑制组蛋白去乙酰化酶 4 活性实现的。

**关键词:**

电针; 多裂肌; 修复; 形态学; 成肌分化; miRNA206; 组蛋白去乙酰化酶 4; 成肌分化抗原; Myogenin

中图分类号: R496; R454; R318

**基金资助:**

国家自然科学基金青年基金项目(81704179), 项目负责人: 刘通

**缩略语:**

成肌分化抗原: Myogenic Differentiation Antigen, MyoD

## Regulation of miRNA206/histone deacetylase 4 by electroacupuncture promotes myogenic differentiation during multifidus muscle repair

Liu Tong<sup>1</sup>, Yu Jiani<sup>2</sup>, Zou Dehui<sup>3</sup>, Kuang Weichuan<sup>1</sup>, Wang Xiaoyin<sup>1</sup>, Wen Xi<sup>1</sup>, Jiang Ye<sup>1</sup>, Qiu Xiaojia<sup>1</sup>, Zeng Yao<sup>1</sup>, Liu Yue<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Acupuncture and Rehabilitation, Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Department of Rehabilitation, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>School of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, Hebei Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Our preliminary studies on animal and cell experiments have shown that electroacupuncture can improve the expression of Pax7 and myogenic differentiation antigen in injured multifidus muscle and facilitate the repair of multifidus muscle injury. Studies have also shown that miRNA206 promotes myogenic differentiation mainly through inhibition of histone deacetylase 4.

**OBJECTIVE:** To explore the effect of electroacupuncture on miRNA206/histone deacetylase 4 during muscle regeneration after bupivacaine-induced multifidus muscle injury in rats.

**METHODS:** The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine with the approval No. 048604. Thirty male Sprague Dawley rats were randomly divided into control group, model group and electroacupuncture group ( $n=10/\text{group}$ ). Rat models of multifidus muscle injury were established by injecting 0.5% bupivacaine hydrochloride in model and electroacupuncture groups, while normal saline injection was only given in control group. No acupuncture intervention was given in the control and model groups. Electroacupuncture at bilateral *Shenshu* (BL23) and *Weizhong* (BL40) acupoints was given in the electroacupuncture group. Needles were then stimulated electrically using a Han's Acupoint Nerve Stimulator for 20 minutes daily for 7 continuous days, with a density wave, frequency of 2 Hz/10 Hz and continuous current of 1 mA. At 7 days of intervention, morphological changes of the multifidus muscle was observed using hematoxylin-eosin staining, and qRT-PCR was used to detect miRNA206 expression, and western blot was used to observe the expression of myogenic differentiation antigen, Myogenin and histone deacetylase 4 in the multifidus muscle.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Hematoxylin-eosin staining indicated that, most of the skeletal muscle fibers in the control group were neatly arranged at 7 days of treatment, with no obvious damage and macrophage infiltration. The muscle fibers in the model group were largely damaged, but partially repaired and there were still a lot of macrophages. More newborn muscle fibers and fewer macrophages could be seen in the electroacupuncture group compared to the model group. (2) Western blot results indicated that the expression of myogenic differentiation antigen, Myogenin and histone deacetylase 4 proteins was significantly increased in the model group relative to the control group after 7 days of treatment ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the expression of myogenic differentiation antigen and Myogenin increased significantly in the electroacupuncture group ( $P < 0.01$ ), but the expression of histone deacetylase 4 decreased significantly ( $P < 0.01$ ). (3) qRT-PCR results indicated that the expression of miRNA206 in the model group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ) and lower than that in the electroacupuncture group after 7 days of treatment ( $P < 0.05$ ). Therefore, electroacupuncture could accelerate myogenic differentiation after multifidus muscle injury, which may be achieved by improving the expression of miRNA206 to inhibit activity of histone deacetylase 4.

**Key word:** electroacupuncture; multifidus muscle; repair; morphology; myogenic differentiation; miRNA206; histone deacetylase 4; myogenic differentiation antigen; Myogenin

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China (Youth Project), No. 81704179 (to LT)

## 0 引言 Introduction

腰椎后路手术是目前临床上使用最多的脊柱手术入路, 临床发现其虽然解决了患者因神经压迫而导致的疼痛及功能障碍等症状, 但是术中对脊旁多裂肌的过度牵拉或钝性损伤往往导致多裂肌炎性肿胀、坏死、萎缩, 成为患者术后再发腰背痛和功能障碍的新来源, 有时这种术后症状甚至会超过术前的程度, 文献称之为“融合病”或“腰椎术后失败综合征”<sup>[1-2]</sup>。因此, 探讨如何促进损伤多裂肌的修复对缓解术后腰痛及功能障碍有重要价值。作者前期的动物及细胞实验已证明电针可提高损伤腰多裂肌中 Pax7 和成肌分化抗原(myogenic differentiation antigen, MyoD)的表达, 促进多裂肌的损伤修复<sup>[3-4]</sup>。MyoD 作为促进成肌分化的重要因子, 主要在成肌分化早期表达, 成肌分化的顺利高效进行是肌肉修复的必要条件, 进一步探讨电针促进 MyoD 表达的深层机制, 一方面可进一步明确电针起效的作用机制; 另一方面可为提高肌肉损伤后 MyoD 表达提供可能的新靶点。微小 RNA(MicroRNAs, miRNAs) 在多种真核生物中广泛存在, 多种疾病的发生发展与 miRNA 的表达密切相关, 如癌症、血液病、内分泌代谢疾病等。有研究表明, miRNA206 是骨骼肌特异性 miRNA, 对骨骼肌损伤后的再生修复发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。肌肉损伤后, miRNA206

的缺乏会导致成肌细胞延迟分化, 亦有研究证明 miRNA206 促进成肌分化主要是通过抑制组蛋白去乙酰化酶 4(histone deacetylase 4, HDAC4) 实现的<sup>[7-8]</sup>。电针在促进多裂肌损伤修复过程中是否有 miRNA206/组蛋白去乙酰化酶 4 的参与尚未明确。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 5 至 12 月在广东省第二中医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 清洁级成年雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 120-140 g, 购买于广州中医药大学动物实验中心, 许可证编号: SCXK(粤)2013-0020。动物购买后, 随机分笼饲养, 24 °C 下适应性饲养 7 d, 明暗周期 12 h, 自由饮食和饮水, 周围环境湿度 40%-50%。7 d 后, 采用随机数字表将所有大鼠随机分为对照组、模型组、电针组, 每组各 10 只。动物的使用符合科技部《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

1.3.2 主要试剂 布比卡因盐酸盐(Bupivacaine Hydrochloride, BPVC)(Sigma); 3% 戊巴比妥钠(60 mg/kg)、

40 g/L多聚甲醛溶液(北京博扬宏达生物科技有限公司); MyoD抗体(abcam), Myogenin抗体(abcam), HDAC4抗体(abcam);  $\beta$ -actin抗体(Bioss), ECL发光液(Thermo Pierce); PVDF膜(美国MILLIPORE公司); 蛋白Marker(Biorad); 总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司); PCR引物(上海生工生物技术公司合成)。

1.3.3 实验仪器 韩氏穴位神经刺激仪(HANS-200A, 北京冀诺科技发展有限公司); 正置智能型显微镜及采集系统(BX53, 奥林巴斯, 中国有限公司); 蛋白质电泳及转膜系统(美国Bio-Rad公司); GDS7600凝胶扫描系统(UVP); 7500FAST荧光PCR仪(美国ABI公司)。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 大鼠多裂肌损伤模型制备 模型组、电针组经适应性喂养后,由助手将大鼠固定,以大鼠双侧髂棘最高点与腰椎连线定位L<sub>6</sub>,后选择双侧脊柱L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub>水平两旁的4个点,使用一次性1 mL注射器抽取0.5%布比卡因溶液600  $\mu$ L,针头紧贴棘突旁刺入,直到接触关节突和乳突所在的骨面,回抽套管1 mm无血,向多裂肌注射布比卡因溶液(150  $\mu$ L $\times$ 4),时间尽量大于5 s,以保证药物的充分吸收<sup>[9]</sup>。对照组采用同样方法注射等量生理盐水溶液。

#### 实验动物造模过程的相关问题

造模目的	观察电针对布比卡因致大鼠腰多裂肌损伤修复过程中miRNA206/组蛋白去乙酰化酶4表达的影响
借鉴已有标准实施动物造模	参考文献 <sup>[9]</sup> 采用0.5%布比卡因肌肉注射复制大鼠多裂肌损伤模型
选择动物的条件	①SD大鼠;②雄性;③成年;④清洁级;⑤体质量120-140 g
动物来源及品系	SD大鼠购买于广州中医药大学动物实验中心
模型与所研究疾病的关系	腰椎后路术后多引起椎旁肌尤其是多裂肌的损伤,以布比卡因进行多裂肌内注射可引起炎性损伤及坏死,病理表现与术后多裂肌的损伤坏死相符
造模技术描述	固定大鼠,以大鼠双侧髂棘最高点与腰椎连线定位L <sub>6</sub> ,后选择双侧脊柱L <sub>4</sub> -L <sub>5</sub> 水平两旁的4个点,使用一次性1 mL注射器抽取0.5%布比卡因溶液600 $\mu$ L,针头紧贴棘突旁刺入,直到接触关节突和乳突所在的骨面,回抽套管1 mm无血,向多裂肌注射布比卡因溶液(150 $\mu$ L $\times$ 4),时间尽量大于5 s,以保证药物的充分吸收
造模主要诱导用药	0.5%布比卡因
动物数量及分组方法	采用随机数字表将所有大鼠随机分为对照组 n=10、模型组 n=10、电针组 n=10
造模成功评价指标	作者前期研究已经进行过模型的组织形态学评价 <sup>[10]</sup>
造模后实验观察指标	①治疗前后多裂肌的形态学变化;②多裂肌组织中MyoD、Myogenin及组蛋白去乙酰化酶4蛋白的表达;③多裂肌组织中miRNA206的表达
造模后动物处理	麻醉后取大鼠双侧L <sub>4</sub> 和L <sub>5</sub> 水平多裂肌组织
伦理委员会批准	实验方案经广东省第二中医院动物实验伦理委员会批准(批准号为048604)

1.4.2 各组干预方法 ①对照组和模型组与电针组同步抓取、固定,不进行针刺干预;②电针组:参照《实验针灸学》常用实验动物穴位图谱<sup>[11]</sup>,选择双侧“委中”穴(膝关节背面正中)和“肾俞穴”(第2腰椎旁开7 mm),直刺进

针后连接电针仪,波形选用疏密波,频率选择2 Hz/10 Hz,电流强度1 mA;持续20 min,造模后每天治疗1次,连续治疗7 d。

1.4.3 取材 实验结束后,以3%戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉,剪开背部皮肤,尽量将背部的皮毛、脂肪及筋膜等组织减除干净,后用镊子剥离开最长肌和髂肋肌,充分暴露腰部多裂肌,依次切取双侧L<sub>4</sub>和L<sub>5</sub>水平多裂肌组织,左侧肌肉置40 g/L多聚甲醛溶液固定以备苏木精-伊红染色,右侧肌肉置于液氮中,冷却后存入-80  $^{\circ}$ C冰箱以备Western-blot及qRT-PCR使用。

#### 1.5 主要观察指标

1.5.1 苏木精-伊红染色观察3组治疗前后多裂肌的形态学变化 40 g/L多聚甲醛溶液固定48 h以上,常规梯度乙醇(体积分数分别为50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%)脱水,进行石蜡包埋、切片,然后将切片进行二甲苯脱蜡,再次梯度乙醇(体积分数分别为100%, 95%, 90%, 80%, 70%)脱水,苏木精-伊红染色,脱水,透明,封固。光镜下观察治疗前后组织形态学变化。于显微镜下取400倍光镜下肌肉横截面切片,以每个样本左下象限视野为观察区域,采用Image J软件统计分析治疗前后肌纤维横截面积的变化。

1.5.2 Western-blot法检测3组治疗前后多裂肌组织中MyoD、Myogenin及组蛋白去乙酰化酶4蛋白的表达 取之前冻存在-80  $^{\circ}$ C冰箱的多裂肌组织,称质量,加入适量RIPA裂解液,用匀浆器进行匀浆,离心,提取细胞总蛋白并测定蛋白含量,加入适量Loadingbuffer,用沸水将蛋白煮沸5 min,进行蛋白变性,按每孔50  $\mu$ g蛋白上样。电泳时采用80 V电压将蛋白电泳至浓缩胶与分离胶分界线处,然后换为100 V继续电泳70 min,当溴酚蓝的条带跑至距胶底1 cm左右时停止电泳,开始电转,电转采用100电压转模70 min。转模完毕后,将蛋白所在区域切下,用含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h,后用MyoD、Myogenin及HDAC4一抗(均为1:1 000)4  $^{\circ}$ C孵育过夜,洗膜后采用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1 h, ECL显色。 $\beta$ -actin为内参对照。Alpha Innotech<sup>®</sup> Fluor Chem FC2凝胶成像系统采集图像, Image J软件定量分析Pax7及MyoD与 $\beta$ -actin的吸光度值,取MyoD、Myogenin及组蛋白去乙酰化酶4与 $\beta$ -actin吸光度比值进行统计分析。

1.5.3 qRT-PCR法检测3组治疗前后多裂肌组织中miRNA206的表达 Trizol法提取各组细胞总RNA,并用紫外分光光度计检测RNA浓度及纯度( $A_{260}/A_{280}>1.8$ )。根据浓度取2  $\mu$ g总RNA,以Oligo(dT)15作为引物进行反转录为cDNA。再以cDNA产物为模版,进行RT-PCR反应。MiRNA206上游引物5'-GGA CTA GTG GTC CTT GAT CTC AGA CTG AA-3',下游引物5'-GGA CTA GTA GCC ATA TGA GCA GAG GAA-3'。引物由上海生工生物公司合成。将配置好的RT-PCR反应液(反应总体积为20  $\mu$ L)离心数秒,混匀后迅速置入实时荧光定量PCR仪中,预变性95  $^{\circ}$ C、120 s; 94  $^{\circ}$ C、10 s; 60  $^{\circ}$ C、10 s, 72  $^{\circ}$ C、40 s,扩增40个循环,获得各样本待测基因的Ct值。以U6(上游

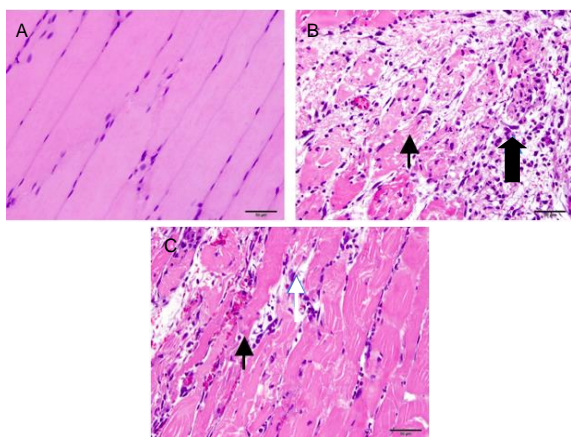
引物: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 下游引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3')作为内参照校正, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行试验数据处理, 其结果代表各目的基因表达的相对定量。

1.6 统计学分析 应用SPSS 20.0软件进行统计学处理。各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。服从正态分布的数据组间差异采用单因素方差分析, 两两比较用LSD-*t* 检验, 不服从正态分布的数据采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义,  $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选取大鼠30只, 分为3组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 各组大鼠多裂肌的形态学变化 结果显示, 7 d后, 对照组可见视野中骨骼肌纤维大部分排列整齐, 无明显破坏及巨噬细胞浸润; 模型组视野内可见大量肌纤维被破坏, 但出现部分肌纤维修复, 巨噬细胞数量仍较多; 电针组新生肌纤维较多, 巨噬细胞较模型组减少。见图1。



图注: 图 A 为对照组骨骼肌纤维大部分排列整齐, 无明显破坏; B 为模型组可见肌纤维大部分被破坏, 少量肌纤维修复, 肌纤维间充满巨噬细胞; C 为电针组可见较多肌纤维修复, 巨噬细胞数量减少。

图 1 各组多裂肌的形态学变化(粗箭头指浸润的巨噬细胞; 细箭头指新生的肌纤维,  $\times 50$ )

Figure 1 Morphological changes of the multifidus muscle (bold arrows: infiltrated macrophages; thin arrows: newborn muscle fibers;  $\times 50$ )

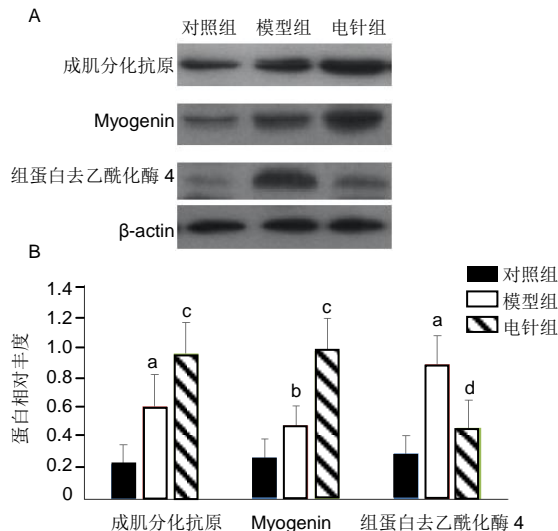
2.3 各组大鼠治疗后肌肉肌纤维横截面积的差异 治疗后, 模型组、电针组肌纤维横截面积与对照组比较差异均有显著性意义( $P < 0.01$ ); 电针组与模型组相比差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。见表1。

表 1 治疗后各组大鼠腰多裂肌纤维横截面积差异 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ ,  $\mu m^2$ )  
Table 1 Difference in the cross-sectional area of multifidus muscle fibers after treatment

组别	肌纤维横截面积
对照组	1 889.28 $\pm$ 137.47
模型组	638.51 $\pm$ 11.22 <sup>a</sup>
电针组	1 182.33 $\pm$ 45.17 <sup>ab</sup>

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

2.4 各组大鼠治疗前后多裂肌组织中 MyoD、Myogenin 及组蛋白去乙酰化酶 4 蛋白的表达 Western-blot 结果显示, 治疗后, 模型组 MyoD、Myogenin、组蛋白去乙酰化酶 4 蛋白表达均较对照组升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 电针组 MyoD、Myogenin 蛋白表达较模型组升高( $P < 0.01$ ), 组蛋白去乙酰化酶 4 蛋白较模型组降低( $P < 0.01$ )。结果见图 2。

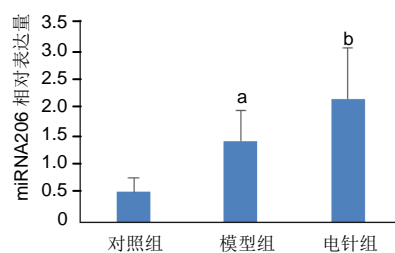


图注: 图 A 为蛋白电泳图谱; B 为统计分析结果, 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>c</sup> $P < 0.01$ , <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠治疗前后多裂肌组织中成肌分化抗原、Myogenin 及组蛋白去乙酰化酶 4 蛋白的表达

Figure 2 Expression of myogenic differentiation antigen, Myogenin and histone deacetylase 4 proteins in the rat multifidus muscle before and after treatment

2.5 各组大鼠治疗前后多裂肌组织中 miRNA206 的表达变化 qRT-PCR 结果显示, 治疗后, 模型组 miRNA206 表达高于对照组( $P < 0.01$ ), 电针组 miRNA206 表达高于模型组( $P < 0.05$ )。结果见图 3。



图注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 治疗前后各组多裂肌组织中 miRNA206 的表达变化

Figure 3 Expression of miRNA206 in the multifidus muscle before and after treatment

## 3 讨论 Discussion

腰椎后路手术目前仍是临床上广泛应用的手术方法, 然而, 与手术相关的软组织损伤已经成为越来越多的外科医生关注的话题, 术中对脊旁肌的医源性损伤往往导致患者术后出现新的腰背疼痛及功能障碍<sup>[12-13]</sup>。尽管目前有大量的微创术式产生, 但有研究发现, 微创与后路开放术式在对脊旁肌的保护方面未显示出临床优势<sup>[14]</sup>。因此, 如何促进手术引起的脊旁肌损伤对患者手术效果及术后功能的恢复有极其重要的作用。



多裂肌为椎旁肌群中的主要肌肉之一，其位于脊柱最内侧，起自横突，向上跨越两三个椎体，止于腰椎的棘突，对维持脊柱的稳定性有至关重要的作用。腰椎后路手术过程中长时间对该肌肉的牵拉和剥离可直接导致多裂肌损伤，目前对其机制主要有三大学说：①手术过程中对脊神经背侧支的直接损害可导致多裂肌出现失神经支配，进一步出现肌肉损伤及萎缩<sup>[15-16]</sup>；②手术过程中对多裂肌长时间牵拉可导致多裂肌出现挤压性缺血，此外，术中电凝止血同样对多裂肌的供血产生影响<sup>[17]</sup>；③术中多裂肌附着点的破坏也可直接导致肌肉出现炎性损伤<sup>[18]</sup>。肌肉损伤修复大致分为3个阶段：首先是肌肉的坏死和炎症，从损伤即时持续到损伤后一两周；肌肉的再生在损伤后1周内开始；肌肉纤维化从2周维持到4周。有研究发现，肌肉损伤后7 d时肌肉开始出现自然修复<sup>[19]</sup>，但肌纤维并不成熟，而电针干预能够提高成肌分化，表现为MyoD蛋白表达升高，促进修复，故而实验选取7 d作为观察时间点。

目前针对腰椎术后失败综合征的治疗已经出现了大量的临床方法<sup>[20-22]</sup>，如脊髓电刺激疗法、硬膜下粘连松解术等。作者前期临床试验已发现，电针在改善腰椎后路术后患者疼痛方面同样有明确疗效<sup>[23]</sup>，临床取穴时，委中穴和肾俞穴为治疗腰部疾病的特效穴，委中穴为足太阳膀胱经的合土穴，足太阳膀胱经脉“从腰中，下夹脊，贯臀，入腠中”，即从腰骶部循行下至腠窝合并于委中，所以委中能疏通腰背之气，即四总穴歌中之“腰背委中求”之义。肾俞穴同位于膀胱经，为肾的背俞穴，为肾气在背部输注、转输之所，“腰为肾之府”，故取肾俞穴可疏导局部之经气，调和局部气血。委中和肾俞相配属远近配穴，可相得益彰，增强疗效。在机制研究方面，作者也发现，电针可促进肌卫星细胞增殖及分化相关因子的表达。

肌卫星细胞存在于骨骼肌基底膜下，是具有增殖和自我更新能力的成肌前体细胞，肌肉损伤后，肌卫星细胞的激活是肌肉修复的前提，肌卫星细胞的增殖和分化过程中有多种细胞因子的参与，成肌分化因子MyoD在肌细胞修复中起重要作用，是肌卫星细胞增殖过程中最重要的生肌调节因子，其一方面可以代表肌卫星细胞的增殖活性，另一方面可以促进成肌分化(成肌分化早期)；Myogenin只有进入分化阶段的肌卫星细胞才会表达，被认为是肌卫星细胞分化早期的标志基因<sup>[24-27]</sup>。

此次研究中发现，电针可促进多裂肌损伤修复过程中成肌分化相关因子MyoD、Myogenin蛋白的表达，同时伴随有MicroRNA-206的表达提高和组蛋白去乙酰化酶4的表达下降，因此推测，电针可能是通过MicroRNA-206/组蛋白去乙酰化酶4轴达到促进成肌分化的目的。越来越多的研究证实miRNA对肌肉发育有重要影响，研究较多的与肌肉密切相关的miRNA主要有microRNA-1，microRNA-133和microRNA-206。而microRNA-1，microRNA-133在心肌和骨骼肌中均有表达，MicroRNA-206是骨骼肌特异性miRNA，仅在骨骼肌中表达，对骨骼肌的损伤修复发挥着重要作用<sup>[28-30]</sup>。Chen等<sup>[31]</sup>发现MicroRNA-206在骨骼肌细胞分化过程中表达增加并且呈现一定的时空特异性，刺激

MicroRNA-206的表达能激活成肌分化。Nakasa等<sup>[32]</sup>用手术刀切割损伤部分大鼠胫骨前肌肌腹，发现大鼠胫骨前肌撕裂7 d内，miRNA206表达先下降再上升。Liu等<sup>[33]</sup>也发现miR-206的缺乏会导致卫星细胞延迟分化，并加剧mdx小鼠营养不良的状况，延迟肌肉的再生和成熟。在骨骼肌损伤早期出现miRNA206的表达下调，这是因为肌肉损伤早期阶段miR-206受到卫星细胞的抗增殖作用<sup>[34]</sup>，在损伤后期，miR-206的表达上升，从而促进卫星细胞的分化和成肌融合。曾有研究指出miRNA206促进MyoD的表达是通过靶向Pax7下调Id2表达实现的，而MyoD的表达上调可进一步促进miRNA206的表达，两者之间呈现一种正向的反馈调控通路<sup>[34-35]</sup>。Kim等<sup>[36]</sup>则发现miRNA206可通过下调MyoD的抑制因子MyoR等上调MyoD基因表达。在大鼠腓肠肌失神经支配后肌萎缩演变过程中同样存在miR-206及MyoD的同步变化规律，两者表达在7 d时达到高峰，随后出现不同程度下降<sup>[37]</sup>。

MicroRNA-206可调控多个靶基因的表达，其中组蛋白去乙酰化酶4是肌肉基因转录表达的抑制位点，可部分介导miRNA206的功能，在人体神经损伤后能促进神经突触的恢复，延缓肌萎缩侧索硬化症模型老鼠发病的进程<sup>[38-39]</sup>。组蛋白去乙酰化酶4属IIa型HDACs，可在细胞核与细胞质之间穿梭，影响组蛋白与染色质结合，调控基因表达<sup>[40-41]</sup>。组蛋白去乙酰化酶4主要通过抑制转录对多种生物学进程起到调控作用，组蛋白去乙酰化酶4在肌肉中呈高表达，特异性的组蛋白去乙酰化酶4可通过对MEF2的直接抑制达到抑制成肌分化的目的<sup>[42]</sup>。研究者首先证实了组蛋白去乙酰化酶4是miRNA206的下游靶基因，敲除miRNA206后，小鼠骨骼肌中组蛋白去乙酰化酶4蛋白表达增加；并且在分化过程中miRNA206的表达受转化生长因子 $\beta$ 的调节，miRNA206可通过抑制组蛋白去乙酰化酶4蛋白的表达促进成肌分化进程<sup>[43-44]</sup>。之前已有研究发现miR-206通过组蛋白去乙酰化酶4下调调控牛骨骼肌卫星细胞成肌分化的机制<sup>[8]</sup>，作者在此基础上进一步验证了电针在促进成肌分化过程中该通路的参与机制。

综上，实验发现了电针可促进损伤多裂肌成肌分化进程，在此过程中伴随有MicroRNA-206的表达提高和组蛋白去乙酰化酶4的表达下降，因此推测，电针可能是通过MicroRNA-206/组蛋白去乙酰化酶4轴达到促进成肌分化的目的。但是仍有不足之处，实验中未设置miRNA206抑制剂组或者MicroRNA-206基因敲除组，因此该结论的得出仍需进一步的严谨验证。

**作者贡献：**实验设计为第一作者和通讯作者，实验实施为第一、二、三、四作者，资料收集和实验评估为第五、六、七、八、九、十作者。第一作者和通讯作者成文，通讯作者审核，通讯作者对文章负责。

**经费支持：**该文章接受了“国家自然科学基金青年基金项目(81704179)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题：**实验方案经广东省第二中医院动物实验伦理委员会批准(批准号为048604)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦

理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:**文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:**文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:**文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:**这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] Snider RK. A prospective, randomized study of lumbar fusion: preliminary results. *Spine*. 1994;19(1):109.
- [2] Aghion D, Chopra P, Oyeyese AA. Failed back syndrome. *Med Health R I*. 2012;95(12):391-393.
- [3] 刘通,于佳妮,邹德辉,等.电针血清对多裂肌卫星细胞增殖及Pax-7、成肌分化抗原、磷酸化蛋白激酶B表达的影响[J].针刺研究,2016,41(5):402-409.
- [4] 刘通.电针“委中”穴对腰多裂肌卫星细胞增殖及PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[D].北京:北京中医药大学,2016.
- [5] Wang YM, Ding XB, Dai Y, et al. Identification and bioinformatics analysis of miRNAs involved in bovine skeletal muscle satellite cell myogenic differentiation. *Mol Cell Biochem*. 2015; 404: 113-122.
- [6] Hudson MB, Woodworth-Hobbs ME, Zheng B, et al. miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014; 306: C551-558.
- [7] Huang QK, Qiao HY, Fu MH, et al. MiR-206 Attenuates Denervation-Induced Skeletal Muscle Atrophy in Rats Through Regulation of Satellite Cell Differentiation via TGF- $\beta$ 1, Smad3, and HDAC4 Signaling. *Med Sci Monit*. 2016;22:1161-1170.
- [8] Dai Y, Wang YM, Zhang WR, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-206 in the proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2016;52(1):27-34.
- [9] Toru Taguchi, Ulrich Hoheisel, Siegfried Mense. Dorsal horn neurons having input from low back structures in rats. *Pain*. 2008;138(1):119-129.
- [10] 陈玉佩,刘通,邹德辉,等.局部注射布比卡因建立大鼠骨骼肌损伤模型的组织形态学评价[J].中国组织工程研究,2016,20(18):2615-2621.
- [11] 李忠仁. 实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:316.
- [12] Hung CW, Wu MF, Hong RT, et al. Comparison of multifidus muscle atrophy after posterior lumbar interbody fusion with conventional and cortical bone trajectory. *Clin Neurol Neurosurg*. 2016;145:41-45.
- [13] Cha JR, Kim YC, Jang C, et al. Pedicle screw fixation and posterior fusion for lumbar degenerative diseases: effects on individual paraspinal muscles and lower back pain; a single-center, prospective study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016;17:63.
- [14] Gilbert F, Heintel TM, Jakubietz MG, et al. Quantitative MRI comparison of multifidus muscle degeneration in thoracolumbar fractures treated with open and minimally invasive approach. *BMC Musculoskelet Disord*. 2018;19(1):75.
- [15] Yarjanian JA, Fetzer A, Yamakawa KS, et al. Correlation of Paraspinal Atrophy and Denervation in Back Pain and Spinal Stenosis Relative to Asymptomatic Controls. *PM&R*. 2013;5(1):39-44.
- [16] Waschke A, Hartmann C, Walter J, et al. Denervation and atrophy of paraspinal muscles after open lumbar interbody fusion is associated with clinical outcome-electromyographic and CT-volumetric investigation of 30 patients. *Acta Neurochirurgica*. 2014;156(2):235-244.
- [17] Gille O, Jolivet E, Douset V, et al. Erector Spinae Muscle Changes on Magnetic Resonance Imaging Following Lumbar Surgery Through a Posterior Approach. *Spine*. 2007;32(11):1236-1241.
- [18] 季传婷,徐平,谢龙.电针对Cardiotoxin肌肉损伤小鼠MyoD表达的影响[J].南京中医药大学学报,2012,28(2):136-138.
- [19] Watanabe K, Matsumoto M, Ikegami T, et al. Reduced postoperative wound pain after lumbar spinous process-splitting laminectomy for lumbar canal stenosis: a randomized controlled study. *J Neurosurg Spine*. 2011;14(1):51-58.
- [20] Sebaaly A, Lahoud MJ, Rizkallah M, et al. Etiology, Evaluation, and Treatment of Failed Back Surgery Syndrome. *Asian Spine J*. 2018;12(3):574-585.
- [21] Scalone L, Zucco F, Lavano A, et al. Benefits in pain perception, ability function and health-related quality of life in patients with failed back surgery syndrome undergoing spinal cord stimulation in a clinical practice setting. *Health Qual Life Outcomes*. 2018;16(1):68.
- [22] Tuijth S J, Van Zundert J, De Vooght P, et al. Does the use of epiduroscopic lysis of adhesions reduce the need for spinal cord stimulation in failed back surgery syndrome: a short term pilot study?. *Pain Pract*. 2018;18(7):839-844.
- [23] 刘通,刘悦,邝伟川,王小寅,文希,于佳妮.刺骨调筋针治疗腰椎术后失败综合征临床疗效[J].中华中医药学刊,2018,36(12):2914-2917.
- [24] 刘宇,肖卫华,罗贝贝,等.急性骨骼肌钝挫伤修复过程及MyoD、Myogenin变化的实验研究[J].中国运动医学杂志,2016,35(2):152-158.
- [25] Joung H, Kwon S, Kim K H, et al. Sumoylation of histone deacetylase 1 regulates MyoD signaling during myogenesis. *Exp Mol Med*. 2018;50(1):e427.
- [26] Testa S, D'Addabbo P, Fornetti E, et al. Myoblast Myogenic Differentiation but Not Fusion Process Is Inhibited via MyoD-Tetraplex Interaction. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:7640272.
- [27] Yamamoto M, Legendre NP, Biswas AA, et al. Loss of MyoD and Myf5 in Skeletal Muscle Stem Cells Results in Altered Myogenic Programming and Failed Regeneration. *Stem Cell Reports*. 2018;10(3):956-969.
- [28] Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007;316:575-579.
- [29] Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*. 2004;5(3):R13. Epub 2004 Feb 16.
- [30] 陈彩珍,李德深,邱守涛,等.肌组织特异性microRNA介导的骨骼肌衰减机制及运动的干预研究[J].西安体育学院学报,2017,34(6):70-78.
- [31] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2006;38(2):228-233.
- [32] Nakasata T, Ishikawa M, Shi M, et al. Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(10):2495-2505.
- [33] Liu N, Williams AH, Maxeiner JM, et al. microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2054-2065.
- [34] Chen J F, Tao Y, Li J, et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol*. 2010;190(5):867-879.
- [35] Dey BK, Gagan J, Dutta A. miR-206 and miR-486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol Cell Biol*. 2011;31(1):203-214.
- [36] Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, et al. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol*. 2006;174(5):677-687.
- [37] 余涛,王平,周翔,等.失神经支配大鼠腓肠肌的演变及其miR-206和MyoD表达的变化[J].中华显微外科杂志,2017,40(2):150.
- [38] Williams AH, Valdez G, Moresi V, et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science*. 2009; 326(5959):1549-1554.
- [39] Yoshihara T, Machida S, Kurosaka Y, et al. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci*. 2016;66(4):337-343.
- [40] Parra M. Class IIa HDACs-new insights into their functions in physiology and pathology. *FEBS J*. 2015;282(9):1736-1744.
- [41] 张鑫愉,牛燕媚,傅力. HDAC4/5在运动改善骨骼肌代谢中的作用研究进展[J].中国运动医学杂志,2018,37(9):67-70.
- [42] McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, et al. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*. 2000; 408(6808):106-111.
- [43] Kirby TJ, McCarthy JJ. MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. *Free Radic Biol Med*. 2013;64:95-105.
- [44] Pan Y, Liu L, Li S, et al. Activation of AMPK inhibits TGF- $\beta$ 1-induced airway smooth muscle cells proliferation and its potential mechanisms. *Sci Rep*. 2018;8(1):3624.