

银质针导热治疗肌筋膜疼痛综合征大鼠骨骼肌线粒体和 SIRT3 表达的变化

王玥¹, 张玉函¹, 王家益¹, 黄媛馨², 沃春新², 王彩霞¹, 周沛然³, 王林²

https://doi.org/10.12307/2024.300

投稿日期: 2023-02-24

采用日期: 2023-04-12

修回日期: 2023-06-03

在线日期: 2023-06-17

中图分类号:

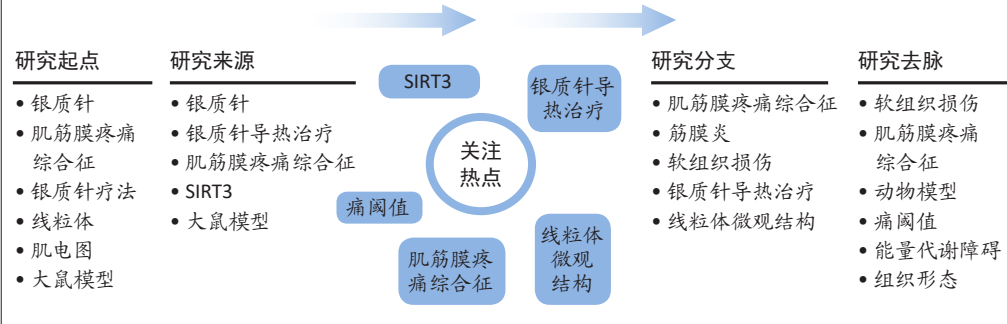
R496; R318; R446

文章编号:

2095-4344(2024)14-02202-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 银质针导热治疗肌筋膜疼痛综合征大鼠线粒体超微结构和 SIRT3 变化



文题释义:

沉默信息调节因子同源蛋白3(Silent information regulator homolog3, SIRT3): 是端粒保护蛋白, Sirtuins家族中的重要成员, SIRT3在整个线粒体Sirtuins中具有最高的脱乙酰酶活性, 特异性的定位于线粒体基质中, 参与线粒体能量代谢及蛋白乙酰化的调节, 与线粒体新陈代谢、细胞免疫和炎症调节、细胞存活和凋亡以及昼夜节律调控等重要生物学特性密切相关, 通过对活性氧簇的抑制、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活化来保护线粒体, 防止DNA受损和氧化性应激而导致的细胞死亡。在代谢能力强、高耗氧量和线粒体细胞内表达增高; 对缓解慢性疼痛有一定作用。

Sirtuins: Sirtuins家族包含7个成员(SIRT1-SIRT7), 是第III类NAD⁺依赖性脱乙酰化酶, 控制着哺乳动物的多种细胞功能和机体特性, 包括线粒体代谢、细胞减数分裂、炎症、自噬、凋亡等。可被NAD⁺、NADH、烟酰胺等细胞中的代谢辅因子或中间产物活化或抑制, 并通过对包括组蛋白或转录因子在内的底物蛋白翻译后修饰, 调节一系列细胞功能, 参与细胞代谢以及在应激下细胞存活与死亡的平衡调节, 有研究发现其抗炎作用可能有助于延长寿命。

摘要

背景: 临床研究发现银质针导热治疗对肌筋膜疼痛综合征患者具有良好镇痛作用, 但其具体机制仍不清楚。

目的: 观察银质针导热治疗对肌筋膜疼痛综合征大鼠线粒体超微结构和沉默信息调节因子同源蛋白3变化的影响。

方法: 26只大鼠随机取20只予以打击结合运动疲劳的方法复制肌筋膜疼痛综合征大鼠模型, 造模成功的16只大鼠随机分为模型组和银质针导热组, 每组各8只; 银质针导热组给予银质针导热处理; 剩余6只为正常对照。分别于造模前1 d、造模完成后第1天、银质针导热处理后第14天检测大鼠机械刺激缩足阈值、热缩足潜伏期; 银质针导热处理后第14天检测大鼠股内侧肌肌电图电活动, 取大鼠右侧股内侧肌分别进行苏木精-伊红染色观察局部形态、透射电镜观察线粒体超微结构、Western blot检测沉默信息调节因子同源蛋白3表达。

结果与结论: ①痛阈值: 与正常组和造模前相比, 模型组、银质针导热组造模后机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期显著缩短($P < 0.01$); 经银质针导热处理后, 与模型组相比, 银质针导热组机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期显著延长($P < 0.01$); ②肌电图: 模型组大鼠右侧股内侧肌出现自发电活动, 银质针导热组自发电活动较模型组减少, 时限较模型组延长($P < 0.01$), 波幅较模型组降低($P < 0.05$); ③苏木精-伊红染色: 正常组大鼠肌纤维排列紧密规则, 模型组大鼠肌纤维萎缩、变性, 排列紊乱, 银质针导热组大鼠肌肉结构紊乱改善; ④骨骼肌线粒体超微结构: 透射电镜显示正常组肌组织线粒体结构正常; 模型组肌组织线粒体肿胀, 嵴断裂或消失; 银质针导热组肌组织线粒体肿胀明显缓解或趋于正常; ⑤沉默信息调节因子同源蛋白3表达: 模型组较正常组明显下调, 银质针导热组较模型组明显上调($P < 0.05$); ⑥结果表明: 肌筋膜疼痛综合征大鼠局部肌肉线粒体出现异常, 沉默信息调节因子同源蛋白3的表达下调, 提示存在能量代谢障碍; 银质针导热处理后线粒体变化恢复, 接近正常, 且沉默信息调节因子同源蛋白3的表达上调接近正常组, 推测银质针导热疗法可能通过促进线粒体修复而改善能量代谢障碍发挥治疗作用。

关键词: 肌筋膜疼痛综合征; 银质针导热治疗; 肌肉线粒体; SIRT3; 肌筋膜激痛点

缩略语: 沉默信息调节因子同源蛋白3: silent information regulator homolog3, SIRT3

Effects of silver needle-thermal conduction therapy on skeletal muscle mitochondria and silent information regulator homolog 3 expression in a rat model of myofascial pain syndrome

Wang Yue¹, Zhang Yuhan¹, Wang Jiayi¹, Huang Yuanxin², Wo Chunxin², Wang Caixia¹, Zhou Peiran³, Wang Lin²

¹贵州医科大学, 贵州省贵阳市 550004; 贵州医科大学附属医院, ²疼痛科, ³电生理中心, 贵州省贵阳市 550004

第一作者: 王玥, 女, 1995年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 贵州医科大学在读硕士, 主要从事慢性疼痛与治疗研究。

并列第一作者: 张玉函, 女, 2000年生, 贵州省六盘水市人, 汉族, 贵州医科大学在读本科生。

通讯作者: 王林, 硕士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 硕士生导师, 贵州医科大学附属医院疼痛科, 贵州省贵阳市 550004

https://orcid.org/0000-0003-0017-605X(王玥); https://orcid.org/0009-0001-6441-7644(张玉函)

基金资助: 国家自然科学基金项目(82060811), 项目负责人: 王林; 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2021]), 项目负责人: 黄媛馨; 2022年国家级大学生创新创业训练计划项目(202210660129), 项目负责人: 张玉函

引用本文: 王玥, 张玉函, 王家益, 黄媛馨, 沃春新, 王彩霞, 周沛然, 王林. 银质针导热治疗肌筋膜疼痛综合征大鼠骨骼肌线粒体和 SIRT3 表达的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(14):2202-2208.

2202 | 中国组织工程研究 | 第28卷 | 第14期 | 2024年5月



¹Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; ²Department of Pain, ³Neuroelectrophysiology Center, Union Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Wang Yue, Master candidate, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Zhang Yuhang, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Wang Yue and Zhang Yuhang contributed equally to this work.

Corresponding author: Wang Lin, Master, Professor, Chief physician, Doctoral/Master's supervisor, Department of Pain, Union Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: Clinical studies have found good analgesic effects of silver needle-thermal conduction therapy in patients with myofascial pain syndrome, but the exact mechanism remains unclear.

OBJECTIVE: To observe the effect of silver needle-thermal conduction therapy on silent information regulator homolog 3 (SIRT3) changes and mitochondrial ultrastructure in a rat model of myofascial pain syndrome.

METHODS: Twenty rats were randomly selected from 26 Sprague-Dawley rats and were subjected to percussion combined with motor fatigue for replicating the rat model of myofascial pain syndrome. Sixteen rats that were successfully modeled were randomly divided into model group and silver needle-thermal conduction therapy group (treatment group), with eight rats in each group. The remaining rats were used as controls (normal group). The treatment group was treated with silver needle-thermal conduction therapy. Mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency of rats were measured at 1 day before modeling, 1 day after modeling and 14 days after treatment. Electromyographic activities of the right medial femoral muscle were measured at 14 days after treatment. The right medial femoral muscle tissue was taken for hematoxylin-eosin staining to observe the local morphology and for transmission electron microscopy to observe the mitochondrial ultrastructure. Western blot assay was performed to detect SIRT3 expression.

RESULTS AND CONCLUSION: Pain threshold: The mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency of the model and treatment groups were significantly decreased compared with those in the normal group and before modeling ($P < 0.01$). After treatment, the mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency of rats were significantly higher in the treatment group compared with the model group ($P < 0.01$). Electromyography: The rats in the model group showed spontaneous electrical activity in the right medial femur, while the rats in the treatment group showed reduced spontaneous electrical activity, longer time frame ($P < 0.01$) and lower wave amplitude ($P < 0.05$) compared with the model group. Hematoxylin-eosin staining: In the normal group, rat muscle fibers arranged closely and regularly. In the model group, the muscle fibers of rats were atrophied, degenerated, and disordered in arrangement. In the treatment group, rat muscle structure disorder improved. Mitochondrial microstructure: Under the transmission electron microscope, mitochondrial structure in the normal group was normal; mitochondrial swelling with broken or disappeared cristae appeared in the model group; mitochondrial swelling in the treatment group was obviously relieved or tended to be normal. SIRT3 expression: SIRT3 expression was significantly downregulated in the model group compared with the normal group, but was significantly upregulated in the treatment group compared with the model group ($P < 0.05$). To conclude, abnormalities in local muscle mitochondria and downregulation of SIRT3 expression suggest the presence of impaired energy metabolism in the rat model of myofascial pain syndrome. Mitochondrial changes recover and are close to normal after the silver needle-thermal conduction therapy, and the expression of SIRT3 is also upregulated close to the normal group, indicating the silver needle-thermal conduction therapy may play a therapeutic role by promoting mitochondrial repair and improving energy metabolism disorder.

Key words: myofascial pain syndrome; silver needle-thermal conduction therapy; muscle mitochondria; SIRT3; myofascial trigger point

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 82060811 (to WL); Guizhou Provincial Science and Technology Program, No. ZK[2021] (to HYY); 2022 National Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project, No. 202210660129 (to ZYH)

How to cite this article: WANG Y, ZHANG YH, WANG JY, HUANG YX, WO CX, WANG CX, ZHOU PR, WANG L. Effects of silver needle-thermal conduction therapy on skeletal muscle mitochondria and silent information regulator homolog 3 expression in a rat model of myofascial pain syndrome. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(14):2202-2208.

0 引言 Introduction

肌筋膜疼痛综合征是一种影响每个年龄段的区域性疼痛疾病^[1], 85%的疼痛门诊患者都与肌筋膜疼痛激痛点相关, 95%的慢性疼痛与此关联^[2]。此病症会导致感觉系统、运动系统及自主神经系统出现相应的症状^[3], 这些自主神经障碍症状包括出汗异常、头晕、视力模糊、耳鸣、麻木、刺痛等, 此外还可能在工作耐受性降低、肌肉疲劳、虚弱和其他功能性疾病, 甚至出现肌肉无力、情绪受损和生活质量下降^[4]。由于对肌筋膜疼痛综合征认识不足, 临床上无统一的诊断标准, 发病机制也尚不完全清楚, 导致肌筋膜疼痛综合征患者易被漏诊而发展为顽固慢性疼痛。由 Simons 和 Travell 在 1981 年首先提出的“能量代谢危机学说”仍是目前肌筋膜疼痛综合征的主流学说^[5], 此学说指出肌筋膜疼痛综合征患者会出现 ATP 减少的能量代谢危机, 而线粒体是机体内产生 ATP、提供能量的主要场所, 肌筋膜疼痛综合征发生时线粒体会出现什么变化? 对调控线粒体能量代谢和细胞器稳态的沉默信息调节因子同源蛋白 3(silent information regulator homolog3, SIRT3) 有何影响尚不清楚, 目前未见相关报道。

由于诱发肌筋膜疼痛综合征的致病机制仍有争议, 导致针对这部分患者的治疗效果不佳。临床研究证实银质针导热治疗对于肌筋膜疼痛综合征患者具有良好疗效^[6-7], 课题组

前期的研究也发现银质针导热治疗对肌筋膜疼痛综合征大鼠有良好的远期疗效^[8], 比较银质针导热疗法后 1, 7, 14 d 痛阈和苏木精-伊红染色病理结果, 发现银质针导热疗法后热缩足潜伏期随时间而呈延长趋势, 肌纤维形态恢复随时间而趋于正常规则, 银质针导热疗法第 14 天, 大鼠痛阈较前明显延长, 肌纤维形态较规则; 但其具体机制尚不完全清楚。因此课题拟通过观察银质针导热疗法 14 d 后对肌筋膜疼痛综合征大鼠骨骼肌线粒体变化及局部 SIRT3 表达变化的影响, 进一步探索银质针导热疗法的可能机制, 为银质针导热疗法的推广应用提供依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 采用随机对照动物实验, 多组对比使用单因方差分析, 组内两两对比使用 Tukey 或 Games-Howell 多重比较试验。
1.2 时间及地点 实验于 2021 年 4 月到 2022 年 12 月在贵州医科大学药学院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选择 SPF 健康成年雄性 SD 大鼠共 26 只, 体质量为 200-250 g, 所有大鼠都由贵州医科大学动物实验中心提供, 许可证号: SYXK(黔): 2018-0001。大鼠饲养于 50% 相对湿度、恒温 (22.0±0.5) °C、昼夜循环光照 12 h(照明

时间为早晨 7:00 至晚上 7:00) 通风良好的清洁级动物房中, 供应充足的词料和水, 勤换垫料。

实验方法、技术已经获得贵州医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号: 2101477)。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。

1.3.2 主要试剂与仪器 RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); GAPDH 抗体(60004-1-Ig)、SIRT3 抗体(10099-1-AP)、山羊抗鼠 IgG(SA00001-1)(中国, Proteintech); 戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司); 2.5% 戊二醛、1% 四氧化锇、10% 明胶、苏木精-伊红染色液、二甲苯(Solarbio, 北京, 中国); 自制打击器(由贵州医科大学疼痛教研室提供); W132812 四通道大鼠跑台(北京东西仪科技有限公司); SN:ME098 肌电图仪(上海海神医疗电子有限公司); Electric Von Frey 电子测痛仪(美国, IITC Life Science Inc); PL-200 型热刺痛仪(成都泰盟软件有限公司); YRX160256 银质针导热检测仪(上海曙新科技发展有限公司); 透射电子显微镜(Talos F200X S/TEM, Thermo Fisher Scientific, Czech Republic)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组及实验流程 随机从 26 只实验大鼠中抽取 6 只大鼠设置为正常组, 不作干预。其余 20 只大鼠基于打击和运动疲劳建立慢性肌肉筋膜疼痛综合征模型, 剔除造模期间因麻醉、击打、斗殴致死及不配合大鼠共 4 只, 造模成功后随机选取 8 只作为模型组, 余下 8 只进行银质针导热处理。银质针导热处理结束后第 14 天处死所有大鼠。

1.4.2 慢性肌肉筋膜疼痛综合征大鼠模型的建立 采用黄强民肌肉筋膜疼痛综合征大鼠模型的制作方法复制模型^[9-11], 该模型的建立过程分为干预期 8 周和恢复期 4 周。造模前 3 d, 将大鼠在跑步机上进行适应性运动。在干预期, 每周的第 1 天用 1% 戊巴比妥钠溶液 3 mL/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 待麻醉生效后, 再把老鼠固定在打击器的下方, 将击打器上的木棍从 20 cm 的高度、以 2.352 J 的动能落在右侧股内侧肌上; 第 2, 3 天, 在 -16° 的电动跑台上进行速度为 16 m/min 的下坡跑, 连续 90 min, 并通过声和电驱赶老鼠以保证效果; 其余 4 d 休息。每周干预 1 次, 共干预了 8 周。在恢复期中对大鼠正常喂养并观察 4 周。恢复期结束第 2 天从造模后的大鼠随机选取 4 只大鼠触摸其股内侧肌是否有质硬膨大结节或紧张带, 并取材进行苏木精-伊红染色检测, 以验证造模成功。

1.4.3 银质针导热治疗 在造模恢复期完成后第 1 天, 用 1% 戊巴比妥钠溶液 3 mL/kg 对银质针导热组的大鼠予以腹腔麻醉。首先由有丰富触诊经验的临床医师触诊到大鼠右侧股内侧肌内的肌紧张带或质硬膨大结节, 这个区域被标记为银质针导热的治疗区域。局部消毒后, 在大鼠右侧股内侧肌紧张带处刺入银质针(针长 10 cm, 直径 0.5 mm), 针尖触及股骨

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	观察银质针导热治疗肌肉筋膜疼痛综合征大鼠线粒体超微结构和 SIRT3 的变化
选择动物的条件	成年雄性 SD 大鼠
模型与所研究疾病的关系	复制肌肉筋膜疼痛综合征大鼠模型, 模拟肌肉筋膜疼痛综合征的病理变化, 用于银质针治疗该病的机制相关研究
造模技术描述	模型的建立过程分为干预期和恢复期。实验前 3 d, 大鼠在跑步机上进行适应性运动。在干预期, 每周的第 1 天对大鼠麻醉, 将老鼠固定在打击器的下方, 将击打器上的木棍从 20 cm 的高度、以 2.352 J 的动能落在右侧股内侧肌上。第 2, 3 天, 大鼠在 -16° 的电动跑台上进行速度为 16 m/min 的下坡跑, 连续 90 min, 并通过声和电驱赶老鼠以保证效果。休息 4 d。每周干预 1 次, 共干预了 8 周。恢复期大鼠正常喂养并观察 4 周
动物数量及分组方法	26 只大鼠随机取 20 只进行造模, 造模成功 16 只大鼠随机分为模型组和银质针导热组, 每组各 8 只; 剩余 6 只为正常对照组
造模成功评价指标	①指腹按压大鼠股内侧肌可触及质硬膨大结节或紧张带; ②对大鼠进行痛阈值测定, 造模后大鼠痛阈值缩短; ③骨骼肌苏木精-伊红染色可见大鼠肌纤维萎缩、变性, 肌筋膜及肌组织结构紊乱, 即为造模成功
造模后实验观察指标	大鼠肌电图、痛阈值、肌肉病理形态学变化、肌肉线粒体超微结构及 SIRT3 的蛋白相对表达量
造模过程中动物死亡原因	麻醉、击打、斗殴致死 4 只
如何补充造模过程中缺失的动物	由于时间有统一要求, 未予补充
造模后动物处理	痛阈检测完成后, 将大鼠麻醉安乐死, 切除右侧股内侧肌进行指标检测
伦理委员会批准	实验方案经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号: 2101477)

表面。使用银质针导热检测仪对针头进行加热(温度设定为 110 °C, 测温仪测得皮肤进针点的最高温度为 43 °C, 加热时间为 15 min)。拔针后予碘伏消毒, 无菌包扎, 再放回各自饲养笼进行正常喂养。

1.4.4 痛阈值测定 于造模前 1 天(T0)、造模完成后第 1 天(T1)和银质针导热治疗后第 14 天(T2)检测痛阈值。

(1) 机械刺激缩足阈值: 将大鼠置入底部为铁丝网格的透明测试箱中, 先于箱内适应 15-30 min, 当大鼠舔毛和探索行为完全停止后, 用 Electric Von Frey 电子测痛仪的压力探针穿过网格刺激大鼠右后爪足底中心部位, 慢慢向上用力, 当大鼠出现除奔跑、跳跃以外的明显缩足后, 立刻移动探针, 此时以传感器自动记录的刺激强度(g)作为机械刺激缩足阈值, 每个部位反复测量 5 次, 每次间歇 5 min, 取差距最小的 3 次数值的均值作为该大鼠的机械刺激缩足阈值。

(2) 热缩足潜伏期: 使用 PL-200 热刺痛仪, 使大鼠于仪器玻璃板上适应 15-30 min, 将热刺激的照射强度设置为 50%, 将强光的自动切断时限设置为 20 s, 以防足部组织灼伤。热辐射光源照射大鼠的右后爪足底中央区域, 测试仪自动记录从照射至发生缩足反应的时间(s)为热缩足潜伏期, 连续检测 3 次, 每次间歇 5 min, 并以其平均值为该大鼠的热缩足潜伏期。

1.4.5 检测肌电图 银质针导热治疗后第 14 天, 检测各组大鼠肌电图。模型组大鼠腹腔麻醉后约 5 min 将处于麻醉状态的大鼠于仰卧位固定, 用拇指和食指的指腹轻轻按压右侧股

内侧肌,寻找紧张带及质硬膨大结节位置;在肌紧张带内插入一根肌电图仪的探测电极,如引起局部抽搐反应,则暂定此结节位置为可能的激痛点,将参考电极插入到旁开 2.0–3.0 mm 处。随后检测激痛点所在区域在安静状态下是否出现异常自发电位,若出现则表明激痛点的存在,而肌电针插入肌紧张结节外的任何部位以及正常组大鼠肌肉对照部位均无异常电位发生,证明造模成功;随后记录安静状态下探测过程中出现的异常电位的时限和波幅。最后对病灶区肌肉取材,结合病理切片,若显示有圆形或椭圆形肌细胞的出现,肌纤维结构紊乱,则进一步证明模型复建成功。

1.4.6 组织形态学观察

(1) 透射电镜观察骨骼肌线粒体:痛阈检测完成后,将大鼠用 1% 戊巴比妥钠溶液 10 mL/kg 静脉注射麻醉安乐死。切除右侧股内侧肌。将组织分成 3 份,一份切成 1 mm³ 的小片,用 2.5% 戊二醛在 4 °C 下固定过夜,用 PBS 冲洗 3 次,每次 15 min。样品在室温下用 1% 四氧化锇固定 2 h,再用 PBS 冲洗 3 次,每次 15 min。然后用浓度递增的乙醇溶液和丙酮对样品进行脱水。环氧树脂浸泡包埋后,置于烘箱内聚合,用徕卡 UC6 超薄切片机制片,将切片用 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色。最后,在 110 kV 的条件下,通过透射电子显微镜对样品进行观察和拍照。

(2) 苏木精-伊红染色法观察肌肉形态:右侧股骨内侧肌标本的另一部分用于苏木精-伊红染色。将组织在 40 g/L 多聚甲醛中固定 24 h,然后用浓度递增的乙醇脱水及二甲苯透明。石蜡包埋后切成 5 μm 的切片,在免疫染色之前,将切片在二甲苯中脱蜡,通过浓度递减的乙醇进行再水化,用苏木精-伊红染色液染色,通过浓度递增的乙醇和二甲苯脱水、透明。在光学显微镜下以 100 倍放大倍数观察肌纤维的形态和排列。

1.4.7 Western blot 测定大鼠肌组织 SIRT3 表达 将取下的 3 组大鼠右侧股内侧肌组织放置于 -80 °C 冰箱,检测时称取并剪碎组织,加入 RIPA 裂解液匀浆后于冰上裂解 30 min,离心,取上清液,采用 BCA 法蛋白定量,蛋白样品于 100 °C 水浴加热 30 min 变性后,经 SDS-PAGE 电泳分离,转移至 PVDF 膜。洗去 PVDF 膜上转膜液后加入封闭液封闭 1 h,洗膜后加入 SIRT3 一抗 (1 : 3 000) 和 GAPDH 一抗 (1 : 50 000),4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后加入山羊抗鼠 -HRP 二抗 (1 : 1 000),室温孵育 60 min,洗膜后进行电发光法显影,采集图像,采用 Image J 软件处理系统分析蛋白条带灰度值,并以内参 GAPDH 条带灰度值为对照计算 SIRT3 表达水平。

1.5 主要观察指标 各组大鼠肌电图、痛阈值、肌肉病理形态学变化、肌肉线粒体微观结构及 SIRT3 的蛋白相对表达量。

1.6 统计学分析 所有的统计分析都用 SPSS 25.0 版软件计算与分析,用 Graphpad Prism 9.0 绘制统计图,连续数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Shapiro-Wilk 检验和 Levene/Welch 检验,分别评估连续数据的正态性和方差齐性。肌电图数据用独立样本 t 检验比较组间数据差异;其余数据用单因素方差分析比较组

间数据差异, Tukey 或 Games-Howell 多重比较检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文章的统计学已通过贵州医科大学统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用 26 只 SD 大鼠中,因麻醉、击打、斗殴致死 4 只,造模恢复期完成后用于验证造模成功 4 只,最终进入结果分析 18 只。

2.2 大鼠痛阈值 见表 1。

表 1 | 各组大鼠右侧股内侧肌痛阈值 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 1 | Pain threshold of the right medial femoral muscle

指标	组别	T0	T1	T2
机械刺激缩足阈值 (g)	正常组	69.62±11.57	66.11±7.94	64.81±7.39
	模型组	69.24±10.46	27.69±8.23 ^{ac}	25.72±8.24 ^{ac}
	银质针导热组	71.64±8.43	26.85±8.83 ^{ac}	40.77±4.47 ^{abcd}
热缩足潜伏期 (s)	正常组	12.97±0.92	12.65±1.01	11.94±1.19
	模型组	12.90±1.00	7.01±0.43 ^{ac}	6.91±0.23 ^{ac}
	银质针导热组	12.98±0.71	7.22±0.75 ^{ac}	10.64±0.47 ^{abd}

表注:与 T0 时比较, ^a $P < 0.01$; 与 T1 时比较, ^b $P < 0.05$; 与正常组相比, ^c $P < 0.01$; 与模型组相比, ^d $P < 0.01$ 。T0: 造模前 1 d; T1: 造模完成后第 1 天; T2: 银质针导热治疗后第 14 天

2.2.1 组内比较 正常组机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期在 T0、T1 和 T2 时无明显变化。模型组在 T1、T2 时机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期较 T0 时明显缩短 ($P < 0.01$), T1、T2 时比较无明显变化。银质针导热组 T1 时机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期较 T0 时明显缩短 ($P < 0.01$), T2 时机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期较 T1 时明显延长 ($P < 0.05$)。

2.2.2 组间比较 T0 时各组大鼠的平均机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期差异均无显著性意义 ($P > 0.05$); T1 时模型组、银质针导热组机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期较正常组缩短 ($P < 0.01$), 模型组、银质针导热组间无明显差异 ($P > 0.05$); T2 (银质针导热治疗后第 14 天) 时银质针导热组机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期较模型组延长 ($P < 0.01$)。

2.3 肌电图分析 当肌电图电极插入紧张带时,在模型组大鼠中观察到局部抽搐反应和自发电位,这表明在右侧股内侧肌损伤的部位存在肌筋膜激痛点;在正常组大鼠中没有发现局部抽搐反应和自发电位;在银质针导热治疗组大鼠中自发电位较模型组明显减少,见图 1。随后记录静息状态下探测过程中出现的异常电位的时限和波幅,结果表明,银质针导热组时限较模型组延长 ($P < 0.01$)。银质针导热组波幅较模型组降低 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 | 各组大鼠右侧股内侧肌肌电图变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 2 | Duration and amplitude of electromyography in the rat right medial femoral muscle

组别	时限 (ms)	波幅 (μV)
模型组	6.10±0.74	170.00±83.67
银质针导热组	9.04±0.66 ^a	31.67±21.37 ^b

表注:与模型组相比, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$

2.4 苏木精-伊红染色法观察肌肉形态 股内侧肌横截面苏木精-伊红染色显示正常组大鼠肌细胞为较规则的圆形或多

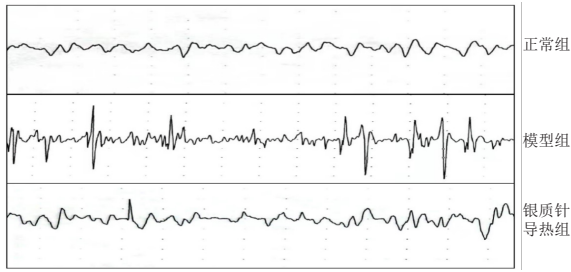


图1 | 各组大鼠股内侧肌肌电图
Figure 1 | Electromyography of the rat medial femoral muscle

边形结构，大小均匀，排列紧密且规则。模型组大鼠肌纤维萎缩、变性，可见大小不等的椭圆形、圆形肌细胞，细胞间隙不规则增宽，并出现部分核内移现象；银质针导热组大鼠肌肉结构紊乱改善，可见肌细胞形态接近正常，见图2。

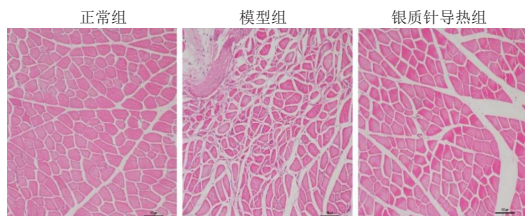
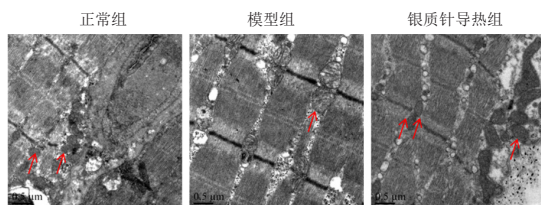


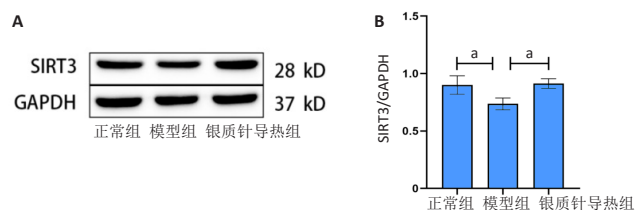
图2 | 各组大鼠右侧股内侧肌苏木精-伊红染色切片(标尺=100 μm)
Figure 2 | Hematoxylin-eosin staining of the rat right medial femoral muscle (scale bar=100 μm)

2.5 透射电镜观察肌肉线粒体 透射电镜显示正常组大鼠肌组织线粒体呈椭圆形，结构正常；模型组大鼠肌组织线粒体肿胀，嵴断裂或消失，板层减少，伴有局部灶性溶解，呈空泡样改变；银质针导热组大鼠肌组织线粒体肿胀明显缓解或趋于正常，板层体明显增多，见图3。



图注：红色箭头所指为线粒体
图3 | 各组大鼠右侧股内侧肌透射电镜切片(标尺=0.5 μm)
Figure 3 | Transmission electron microscope observation of the rat right medial femoral muscle (scale bar=0.5 μm)

2.6 大鼠肌肉组织中 SIRT3 的表达 模型组骨骼肌内 SIRT3 表达较正常组明显下调 ($P < 0.05$)，银质针导热组骨骼肌内 SIRT3 表达较模型组明显上调 ($P < 0.05$)，银质针导热组与正常组比较，SIRT3 表达差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，见图4。



图注：图A为Western blot实验电泳图，B为蛋白表达统计分析结果($n=3$)， $^{\#}P < 0.05$

图4 | 各组大鼠肌肉组织沉默信息调节因子同源蛋白3(SIRT3)蛋白表达
Figure 4 | SIRT3 protein expression in rat muscle tissue

3 讨论 Discussion

肌筋膜疼痛综合征是一种由存在于肌肉或筋膜内的肌筋膜激痛点所导致最常见的引起慢性肌肉疼痛的疾病，是引起腰背痛、颈肩部等软组织疼痛的常见原因，其疼痛特征是局部疼痛和/或牵涉痛^[12-13]。研究发现肌筋膜疼痛影响了高达85%的普通人群^[12]。此次研究采用广为接受的黄强民肌筋膜疼痛综合征大鼠模型的制作方法进行肌筋膜疼痛综合征大鼠造模^[9-11]，研究中出现模型组大鼠机械刺激缩足阈值和热缩足潜伏期的缩短，击打部位出现了紧张带或质硬膨大结节，肌电图出现了自发电活动，组织病理学可见右侧股内侧肌出现组织结构排列紊乱，肌纤维萎缩、变性，结合这些情况，证实肌筋膜疼痛综合征大鼠模型制备成功。

尽管通过动物模型研究对肌筋膜疼痛综合征的组织病理学特性方面取得了重大进展，但关于肌筋膜疼痛综合征的病因和确切发病机制的认识仍然有限^[14]。肌筋膜疼痛综合征的诊断采用主观的临床标准，包括对自述疼痛的测量、排除其他疾病以及对激痛点的临床触诊，暂无广泛接受的客观参考标准，这不利于精确地进行临床诊断、治疗管理和推进高质量科学依据的发展^[15]。最近，越来越多的研究表明，肌筋膜激痛点是由慢性超负荷、过度拉伸或受影响肌肉的直接创伤引起的^[16]。目前被普遍认可的由Simons和Travell提出的“能量代谢危机学说”指出：肌肉持续地超负荷、过度拉伸或受损促使细胞内钙超载，从而引发了钙超载-肌肉收缩-局部循环障碍-能量代谢危机(ATP减少)-游离钙不能清除-肌肉持续收缩的恶性循环，导致肌筋膜疼痛综合征的发生^[5]。而线粒体是骨骼肌内的能量生成单元，是负责通过呼吸和氧化磷酸化产生ATP、提供能量的主要细胞器。线粒体生物生成持续受到抑制和线粒体功能受损可使ATP的生成维持在相对较低的水平，从而产生持续的能量危机。BRANDÃO等^[17]也指出在肌筋膜疼痛综合征的病理过程中，缺乏ATP会导致肌肉挛缩，由此产生的毛细血管受压会导致缺氧环境，并可能损害线粒体功能，从而形成恶性循环。此次研究显示，肌筋膜疼痛综合征模型组大鼠股内侧肌组织肌纤维萎缩、变性，可见大小不等的椭圆形、圆形肌细胞，细胞间隙不规则增宽，并出现部分核内移现象；透射电镜观察发现骨骼肌线粒体肿胀，嵴断裂或消失，板层减少，伴有局部灶性溶解，呈空泡样改变，证实肌筋膜疼痛综合征发生时，骨骼肌线粒体出现损伤。然而线粒体损伤过程中有哪些分子参与了其发生发展尚不清楚。有研究认为肌筋膜疼痛综合征大鼠的线粒体生物合成被持续抑制，刺激或增强线粒体的生物合成可能为未来治疗肌筋膜疼痛综合征提供一个新策略^[18]；但肌筋膜疼痛综合征中，线粒体通过什么途径导致其功能受损和生物合成受抑制，目前未见相关报道。

SIRT3是Sirtuins家族中的重要成员，SIRT3在整个线粒体Sirtuins家族中具有最高的脱乙酰酶活性，特异性的定位于线粒体基质中，其去乙酰化酶活性主要取决于烟酰胺腺嘌呤核苷酸(NAD^+)^[19]，参与线粒体能量代谢及蛋白乙酰化的调

节,与线粒体新陈代谢、细胞免疫和炎症调节、细胞存活和凋亡以及昼夜节律调控等重要生物学特性密切相关,通过对活性氧簇的抑制、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活化来保护线粒体。既往多项研究发现,SIRT3通过其去乙酰化作用,能够调控线粒体中多种代谢酶的活性,进而调控细胞线粒体的代谢和功能,如活性氧的产生和清除、电子运输链(ETC)通量、线粒体膜电位维持和线粒体动力学,从而在调节和维持体内ATP水平方面起着重要作用^[20]。SIRT3调节三羧酸(TCA)循环中的乙酰辅酶A的能量代谢,乙酰-CoA合成酶2是三羧酸循环的发生器,是第一个被确认的SIRT3的底物蛋白,SIRT3通过去乙酰化赖氨酸直接调节此代谢酶^[21-22]。三羧酸的中间物异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)和琥珀酸脱氢酶(SDH)也被发现被SIRT3去乙酰化而激活^[23]。SIRT3缺失的动物表现出线粒体电子传递链复合体I活性和基础ATP水平下降,而SIRT3的增加则恢复了复合体I的活性和ATP水平。复合体I的一个附属亚单位,NDUFA9,被确定为受SIRT3去乙酰化的调节,SIRT3的增强可以减少复合体I缺陷患者细胞内的活性氧水平,增加体内ATP的生成^[24-26]。SIRT3在代谢能力强、高耗氧量和高线粒体细胞内表达增高,如心脏、骨骼肌等^[20]。有研究发现SIRT3缺失小鼠的心肌表现出基础ATP含量较野生型大鼠减少50%以上^[24]。已知SIRT3参与调节线粒体蛋白的乙酰化情况,而蛋白乙酰化也是线粒体动力学中最关键的修饰调控因素,所以SIRT3可能直接影响肌肉的代谢和应激反应^[27-28]。有研究中发现肌筋膜疼痛综合征大鼠的SIRT3在调节骨骼肌线粒体氧化应激和生物生成方面起作用^[18]。此次研究发现肌筋膜疼痛综合征大鼠股内侧肌的SIRT3表达比正常组显著下调,提示局部肌肉线粒体能量代谢功能受到削弱,可能是肌筋膜疼痛综合征能量代谢危机的环节之一。

目前临床治疗肌筋膜疼痛的方法多种多样,但是远期疗效不佳,且长期的药物治疗所造成的后遗症较多^[29],临床研究表明银质针在缓解腰背部肌筋膜疼痛综合征的疼痛中效果显著^[30-31]。银质针导热疗法是现代针刺疗法中常用于治疗肌筋膜疼痛综合征的一个独特分支,目前较为普遍认可的银质针导热疗法由王福根教授在宣蛰人教授密集型银质针疗法基础上改进而来^[32]。银质针导热疗法在治疗肌筋膜疼痛综合征等引起的疼痛时,疗效更佳,尤以长期疗效显著^[6]。WANG等^[33]发现银质针导热疗法治疗肌筋膜疼痛综合征的治疗效果优于单纯应用银质针治疗。在临床中发现银质针导热治疗肌筋膜疼痛综合征有良好疗效,但目前相关的动物研究极少,于是此次研究进行了肌筋膜疼痛综合征大鼠模型复制,旨在探讨其产生良好治疗效果的生物机制,为银质针导热治疗肌筋膜疼痛综合征奠定生物学依据。李丽辉等^[34]通过向肌筋膜疼痛综合征大鼠局部肌肉注射引起原发性痛,经测量血清前列腺素F2 α 观察到,前列腺素F2 α 能使肌筋膜疼痛综合征大鼠局部肌肉电活动波幅明显升高。此次研究中使用银质针针刺肌筋膜疼痛综合征大鼠病变肌组织并对银质针加以导热进行治疗,发现治疗后肌筋膜疼痛综合征大鼠痛阈值延长、

肌电图中自发电活动减少,电位波幅降低,苏木精-伊红染色病理切片可见大鼠右侧股内侧肌肌组织结构紊乱改善,证实银质针导热疗法可以促进肌筋膜疼痛综合征大鼠受损肌组织修复以及产生镇痛作用;同时发现经银质针导热治疗后,骨骼肌线粒体肿胀程度显著减轻,板层体明显增多,结构恢复接近正常,肌内SIRT3表达较模型组显著上调并恢复至正常水平,推测银质针导热疗法可能通过促进骨骼肌线粒体修复,改善能量代谢障碍发挥治疗作用。然而此次研究仅观察了银质针导热疗法对肌筋膜疼痛综合征大鼠线粒体结构及SIRT3的影响,尚未对线粒体能量代谢进一步的研究,且样本量不大,相关机制有待今后进一步证实。

综上所述,肌筋膜疼痛综合征激痛点的产生可能与骨骼肌线粒体受损及SIRT3表达下调有关,而银质针导热治疗可能通过促进SIRT3表达上调,从而修复受损的骨骼肌线粒体,提高大鼠痛阈值而起镇痛作用,这为银质针导热治疗肌筋膜疼痛综合征提供了理论依据。

致谢:向贵州医科大学药学院实验室的老师及为该课题提供肌电图技术指导的周沛然老师致谢!

作者贡献:王林、黄媛馨、王玥参与实验设计,实验实施为王玥、张玉函、王家益、沃春新、王彩霞、周沛然,实验评估为王林,资料收集王玥、张玉函,文章撰写为王玥。

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。

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。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。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。

4 参考文献 References

- FRICTON J. Myofascial Pain: Mechanisms to Management. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2016;28(3):289-311.
- 刘琳,黄强民,汤莉.肌筋膜疼痛触发点[J].中国组织工程研究,2014,18(46):7520-7527.
- BRON C, DOMMERHOLT JD. Etiology of myofascial trigger points. Curr Pain Headache Rep. 2012;16(5):439-444.
- TRAVELL JG, SIMONS DG. Myofascial pain and dysfunction: the trigger point manual. Baltimore, MD: U.S.A. Williams & Wilkins. 1983.
- SIMONS DG, TRAVELL JG. Myofascial trigger points, a possible explanation. Pain. 1981;10(1):106-109.
- 杨子纯,杨晓媛,黄雅倩,等.银质针疗法临床应用概述[J].中医学报,2020,35(9):1904-1907.
- 王福根.银质针导热疗法治疗软组织痛的临床研究[C].中华医学会疼痛学分会第七届年会,北京,2007.
- 穆强.银质针导热疗法对肌筋膜疼痛综合征大鼠中枢5-HT、5-HT2A受体表达影响的实验研究[D].贵阳:贵州医科大学,2020.
- 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.

- [10] 韩蓓, 黄强民, 谭树生, 等. 大鼠筋膜疼痛触发点自发肌电现象和病理组织学研究 [J]. 中国运动医学杂志, 2011, 30(6): 532-535, 531.
- [11] YU S, SU H, LU J, et al. Combined T2 Mapping and Diffusion Tensor Imaging: A Sensitive Tool to Assess Myofascial Trigger Points in a Rat Model. *J Pain Res.* 2021;14:1721-1731.
- [12] FLECKENSTEIN J, ZAPS D, RÜGER LJ, et al. Discrepancy between prevalence and perceived effectiveness of treatment methods in myofascial pain syndrome: results of a cross-sectional, nationwide survey. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010;11:32.
- [13] AREDO JV, HEYRANA KJ, KARP BI, et al. Relating Chronic Pelvic Pain and Endometriosis to Signs of Sensitization and Myofascial Pain and Dysfunction. *Semin Reprod Med.* 2017;35(1):88-97.
- [14] ZHANG H, LÜ JJ, HUANG QM, et al. Histopathological nature of myofascial trigger points at different stages of recovery from injury in a rat model. *Acupunct Med.* 2017;35(6):445-451.
- [15] DUARTE F, WEST D, LINDE LD, et al. Re-Examining Myofascial Pain Syndrome: Toward Biomarker Development and Mechanism-Based Diagnostic Criteria. *Curr Rheumatol Rep.* 2021;23(8):69.
- [16] SHAH JP, THAKER N, HEIMUR J, et al. Myofascial Trigger Points Then and Now: A Historical and Scientific Perspective. *PM R.* 2015;7(7):746-761.
- [17] BRANDÃO ML, ROSELINO JE, PICCINATO CE, et al. Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res.* 2003;110(1):235-240.
- [18] YE L, LI M, WANG Z, et al. Depression of Mitochondrial Function in the Rat Skeletal Muscle Model of Myofascial Pain Syndrome Is Through Down-Regulation of the AMPK-PGC-1 α -SIRT3 Axis. *J Pain Res.* 2020;13:1747-1756.
- [19] CHIU HC, CHIU CY, YANG RS, et al. Preventing muscle wasting by osteoporosis drug alendronate in vitro and in myopathy models via sirtuin-3 down-regulation. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018;9(3):585-602.
- [20] WU J, ZENG Z, ZHANG W, et al. Emerging role of SIRT3 in mitochondrial dysfunction and cardiovascular diseases. *Free Radic Res.* 2019;53(2):139-149.
- [21] HIRSCHHEY M D, SHIMAZU T, GOETZMAN E, et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature.* 2010;464(7285):121-125.
- [22] SCHWER B, BUNKENBORG J, VERDIN RO, et al. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(27):10224-10229.
- [23] CIMEN H, HAN MJ, YANG Y, et al. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry.* 2010;49(2):304-311.
- [24] AHN BH, KIM HS, SONG S, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(38):14447-14452.
- [25] MATHIEU L, LOPES COSTA A, LE BACHELIER C, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress in mitochondrial Complex I deficiency: Involvement of SIRT3. *Free Radic Biol Med.* 2016;96:190-198.
- [26] RARDIN MJ, NEWMAN JC, HELD JM, et al. Label-free quantitative proteomics of the lysine acetylome in mitochondria identifies substrates of SIRT3 in metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(16):6601-6606.
- [27] PIRINEN E, LO SASSO G, AUWERX J. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(6):759-770.
- [28] ALI I, CONRAD RJ, VERDIN E, et al. Lysine Acetylation Goes Global: From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics. *Chem Rev.* 2018;118(3):1216-1252.
- [29] 罗笛. 筋膜疼痛综合征的治疗研究进展 [J]. 贵州医药, 2019, 43(7): 1033-1036.
- [30] 陈岚筠, 尚鸿生, 户红卿. 银质针治疗腰背肌筋膜炎临床研究 [J]. 按摩与康复医学, 2017, 8(3): 23-24.
- [31] 赵景学, 彭丽岚, 唐晨. 细银质针治疗腰肌筋膜炎的临床效果及对患者自主神经功能的影响 [J]. 实用医药杂志, 2018, 35(8): 709-711.
- [32] 王福根. 银质针疗法在临床疼痛诊治中的应用 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2003, 9(3): 173-181.
- [33] WANG G, GAO Q, HOU J, et al. Effects of Temperature on Chronic Trapezius Myofascial Pain Syndrome during Dry Needling Therapy. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:638268.
- [34] 李丽辉, 薄成志, 黄强民, 等. PGE 2α 对大鼠筋膜疼痛触发点自发肌电活动的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(12): 1399-1404.

(责任编辑: WZH, ZN, WL, LCH)