

# 超短波治疗对脊髓损伤炎症因子和丝裂原活化蛋白激酶通路的影响

王帅<sup>1,2</sup> 刘佳琳<sup>1</sup> 那里<sup>1,3</sup> 苏朋<sup>4</sup> 董洪选<sup>5</sup> 李琳<sup>1</sup> 高健<sup>5</sup> 张立新<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国医科大学附属盛京医院康复中心, 沈阳 110134; <sup>2</sup>中山大学附属第一医院康复医学科, 广州 510000; <sup>3</sup>辽宁省人民医院, 沈阳 110134; <sup>4</sup>中国医科大学附属盛京医院本溪研发基地, 本溪 117004; <sup>5</sup>辽宁启福干细胞生物有限公司, 沈阳 110134

通信作者: 张立新, Email: zhanglx@sj-hospital.org

**【摘要】 目的** 观察超短波治疗对脊髓损伤(SCI)后炎症因子和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路的影响。**方法** 将79只Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分成对照组( $n=35$ )、干预组( $n=35$ )和假手术组( $n=9$ )。采用Allen's法对干预组和对照组大鼠行SCI挫压伤造模,假手术组仅暴露脊髓组织,不进行打击。SCI后24h后,干预组给予无热量超短波治疗,每日1次,每周5次,每次7min直至取材前。造模成功1d后和各组对应的取材时间点(提前1h),采用SCI行为学评分(BBB)对3组未取材的大鼠进行运动功能评估。造模成功1d、3d、7d后,采用免疫荧光和免疫印迹技术观察3组大鼠损伤区域内炎症因子和MAPK通路的动态变化。**结果** 造模成功14d后,干预组大鼠的BBB评分为( $7.30\pm 1.04$ )分,显著优于对照组造模成功14d后,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。造模成功7d后,假手术组大鼠脊髓组织炎症因子NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白(NLRP3),白介素-6(IL-6),白介素-6受体(IL-6R)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量均显著低于对照组和干预组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );干预组大鼠脊髓组织炎症因子NLRP3、IL-6、IL-6R和TNF- $\alpha$ 的含量亦显著低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。造模成功7d后,干预组大鼠损伤区域内锌指蛋白36(TTP)的阳性细胞数量显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。造模成功7d后,对照组和干预组大鼠损伤区域MAPK通路核心蛋白丝裂原活化蛋白激酶2(MK2)、磷酸化抗体(p-MK2)和TTP蛋白均显著高于假手术组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。造模成功7d后,干预组大鼠损伤区域MAPK通路核心蛋白MK2、p-MK2和TTP蛋白与对照组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 超短波治疗可通过调节MAPK炎症通路来抑制炎症因子的产生,从而促进SCI大鼠运动功能的恢复。

**【关键词】** 脊髓损伤; 超短波; 丝裂原活化蛋白激酶通路; 炎症因子

**基金项目:**国家自然科学基金青年基金项目(81101462);辽宁省自然科学基金项目(201602875);辽宁省公益科学基金项目(2016003001);中国医科大学校培育学科建设经费资助项目(112-3110119071)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2023.01.002

## Ultrashortwave therapy can inhibit inflammation and promote recovery from spinal cord injury

Wang Shuai<sup>1,2</sup>, Liu Jialin<sup>1</sup>, Na Li<sup>1,3</sup>, Su Peng<sup>4</sup>, Dong Hongxuan<sup>5</sup>, Li Lin<sup>1</sup>, Gao Jian<sup>5</sup>, Zhang Lixin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rehabilitation Center, Shengjing Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110134, China; <sup>2</sup>Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong 510000, China; <sup>3</sup>Liaoning Provincial People's Hospital, Shenyang 110134, China; <sup>4</sup>Benxi Research and Development Base of Shengjing Hospital Affiliated to the Chinese Medical University, Benxi 117000, China; <sup>5</sup>Liaoning Qifu Stem Cell Biology Co., Ltd., Shenyang 110134, China

Corresponding author: Zhang Lixin, Email: zhanglx@sj-hospital.org

**【Abstract】 Objective** To observe any effect of ultrashortwave (USW) therapy on inflammatory cytokines and the MAPK pathway of rats with a spinal cord injury. **Methods** Seventy-nine Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group ( $n=35$ ), an intervention group ( $n=35$ ) and a sham group ( $n=9$ ). Allen's method was used to establish a contusion model of SCI in the rats of the control and intervention groups, while the sham group's spinal tissues were exposed but not stricken. Beginning twenty-four hours after SCI modeling, the intervention group was given 7min of USW therapy daily, five days a week till the day of sacrifice for sampling the target area of spinal cord for tests. Then, motion function was evaluated using Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scoring. One,

three and seven days after the SCI modeling, immunofluorescence and western blotting were employed to observe any changes in inflammatory factors and the MAPK pathway in the lesioned area. **Results** Fourteen days after the modeling the average BBB score of the intervention group was significantly higher than the control group's average. Moreover, 7 days after the modeling the average content of the domains containing protein 3 (NLRP3), interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the target area of the spinal cord of sham group showed significantly lower levels than in the other 2 groups. And the levels in the intervention group were significantly lower than in the control group. Seven days after the modeling the number of cells positive for zinc finger protein 36 (TTP) in the lesioned area of the intervention group was significantly greater than among the control group. At the same time the levels of MAPK-activated protein kinase 2 (MK2), phosphorylated-mitogen-activated protein kinase-activated version (p-MK2) and TTP in the control and intervention groups were significantly higher than in the sham group. And there were significant differences between the intervention group and control group in the levels of MK2, p-MK2 and TTP. **Conclusion** Ultrashortwave therapy can inhibit inflammation by regulating the MAPK inflammatory pathway, promoting the recovery of motion functions, at least in rats.

**【Key words】** Spinal cord injury; Ultrashortwave therapy; MAPK; Inflammatory factors

**Funding:** A National Natural Science Youth Fund Project (81101462); a Liaoning Natural Science Foundation Project (201602875); a Liaoning Provincial Public Welfare Science Foundation Project (2016003001); a Cultivate Discipline Construction Funding Project of CMU (112-3110119071)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2023.01.002

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是严重的中枢神经损伤疾病之一<sup>[1]</sup>,目前仍无有效的治疗手段可以完全恢复损伤平面以下的运动与感觉功能<sup>[2]</sup>。有研究发现,SCI急性期的病理过程与继发性炎症反应息息相关,即SCI区域内坏死的神经元会激活发挥免疫监视作用的小胶质细胞与星形胶质细胞<sup>[3]</sup>,而这些细胞可通过多种信号通路分泌白介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-6(interleukin, IL-6)等炎症因子,从而促进炎症反应发生,并吸引外周炎症细胞通过受损的血-脊屏障聚集于损伤区域<sup>[4]</sup>。有研究指出,炎症微环境的形成会给SCI后的神经再生和轴突修复创造不利的生长环境,而过度激活的炎症反应也会形成纤维瘢痕填充受损区域,影响神经细胞的再生和轴突连接<sup>[5]</sup>。

超短波(ultrashort wave, USW)治疗属高频电治疗的方式之一,有研究发现,小剂量、无热量的USW在临床上可以较好地解决神经、肌肉的方面炎症和水肿,以及疼痛症状,该研究认为,USW对于干预SCI后的炎症微环境具有潜在的治疗作用<sup>[6]</sup>。本课题组过去的研究显示,在SCI早期,无热量、小剂量的USW治疗可以调节损伤区域内炎症细胞的数量,促进SCI大鼠运动功能的恢复<sup>[7]</sup>。据文献报道,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路会参与SCI后炎症微环境的调节,而抑制MAPK信号通路的过度激活可以更好地促进SCI后的组织修复和轴突再生<sup>[8]</sup>。本次研究旨在通过观察USW治疗对于SCI后大鼠MAPK通路和炎症因子释放的影响,以期

为SCI的临床治疗提供参考。

## 材料与方法

### 一、实验动物

选取无特定病原体、清洁级Sprague-Dawley(SD)雌性大鼠79只,体重(250 $\pm$ 10)g,由辽宁长生公司提供,饲养于中国医科大学附属盛京医院本溪研发基地无特定病原体(specific pathogen free,SPF)实验动物中心,适应性饲养1周后开始实验。

### 二、主要试剂和仪器设备

放射免疫沉淀法缓冲液(radio immunoprecipitation assay, RIPA)(中国索莱宝公司);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白质浓度测定试剂盒(中国索莱宝公司);10-245kd彩虹Maker(中国索莱宝公司);免疫荧光封闭用正常山羊血清(中国中山金桥公司);丝裂原活化蛋白激酶2(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2, MK2)(美国Abcam公司);磷酸化抗体(p-MK2)(美国Abcam公司);锌指蛋白36(Tristetraprolin, TTP)(美国Santa公司);NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)(美国Thermo公司);IL-6(中国山鹰公司);IL-6R抗体(美国Abcam公司);TNF- $\alpha$ 抗体(中国山鹰公司);磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(中国山鹰公司);免疫印迹山羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)IgG二抗(中国山鹰公司);山羊抗兔异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)荧光二抗(中国中山金桥公司);山

羊抗小鼠三甲川花菁染料 (Cyanine 3, Cy3) 荧光二抗 (中国中山金桥公司); 4,6-联脒-2-苯基吲哚荧光染料 (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI) (中国中山金桥公司)。

CD-1A-CII 型五官科超短波治疗仪 (上海医用设备厂); 改良 Allen's SCI 打击装置 (自制); LSM 880 型双光子共聚焦显微镜 (德国蔡司公司); ImageQuant LAS 4000 型化学发光成像仪 (美国 GE 公司); 电转仪 (中国天能公司); 1.3111 系列单道型微量移液器 (美国 Eppendorf 公司)。

### 三、分组和造模方法

按照随机数字表法将其分为假手术组 9 只, 对照组 35 只和干预组每组 35 只。3 组大鼠造模方法如下。

SCI 挫压伤模型的建立: 对照组和干预组大鼠参考改良的 Allen's 法<sup>[9]</sup> 制作 SCI 挫压伤模型。以胸 10 为特异性骨性标致点进行常规备皮、消毒、1% 戊巴比妥溶液腹腔注射麻醉, 使用手术刀片、剪刀小心分离胸 10 周围 1.5 cm 范围内肌肉和附属结缔组织, 以充分暴露棘突和椎体, 然后使用咬骨钳去除胸 10 周围骨性结构, 避免刺伤血管与脊髓组织。采用 Allen's 法打击器, 在距离冲击棒 10 mm 距离使用 10 g 砝码进行打击, 打击后, 对照组和干预组大鼠出现一过性后肢痉挛、摆尾, 脊髓打击区域硬脊膜下出现血肿则视为造模成功。假手术组大鼠仅去除胸 10 节段软组织和骨性结构, 不进行脊髓打击操作。实验过程中遇大鼠死亡则进行补足。

### 四、运动功能评估

造模成功 1 d 后和各组对应的取材时间点 (提前 1 h), 采用 SCI 行为学评分 (Basso-Beattie-Bresnahan, BBB) 对 3 组未取材的大鼠进行运动功能评估<sup>[10]</sup>。评估者仅可见大鼠编号, 但不知道分组的情况。

### 五、USW 治疗

干预组大鼠于造模成功 1 d 后开始 USW 治疗, 将大鼠放置于塑料固定器内, 采用 CD-1A-CII 型五官科 USW 治疗仪进行治疗<sup>[2,7]</sup>。将 2 块直径 5 cm 的圆形电极片 (2 号电极片) 采用对置法置于大鼠损伤区域两侧, 输出功率 11 W, 无热量处方, 每周治疗 5 d, 每日治疗 7 min, 直至取材。假手术组和对照组的放置和治疗方法均同干预组, 但不打开 USW 治疗仪的电源。

### 六、取材方法

使用足量 1% 戊巴比妥致大鼠心脏停跳, 于大鼠呼吸消失后使用大剪刀、止血钳等工具充分暴露胸腔、固定游离肋骨断端, 充分暴露心耳、心尖并剪开, 使用 4 °C 预冷的 200 ml 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 灌洗至流出液体澄清无血色。

用于免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 检测的组织使用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 固定, 若四肢出现伸展震颤、摆尾则说明甲醛固定成功, 用于免疫印迹 (western blot, WB) 检测的组织不进行固定操作。

### 七、免疫荧光染色

造模成功 1 d、3 d、7 d 后, 假手术组取 3 只大鼠, 对照组和干预组各取 7 只大鼠采用上述取材方法进行取材, 然后进行 IF 检测。使用 4 °C 预冷的 PBS 洗掉残血后, 移至预冷的 4% PFA 中保存, 然后进行脱水和切片步骤。染色前, 采用 PBS 在摇床上漂洗片子 3 次, 每次 10 min, 接着采用含 0.1% Triton PBS 溶液室温下打孔 10 min。用封闭血清在 37 °C 温箱内封闭 1 h, 甩掉血清后滴入 p-MK2, TTP 一抗稀释液。一抗孵育 21 h 后, 在避光的情况下, 依据种属和不同颜色标签滴入二抗 37 °C 温箱孵育 2 h, 随后使用 DAPI 染液染核 5~10 min, 在荧光显微镜下观察染色成功后封片, 边缘使用指甲油封闭。使用双光子共聚焦显微镜进行拍摄, 在相同强度下对各组损伤区域进行拍摄, 以便后续统计分析。

### 八、免疫印迹

造模成功 7 d 后, 假手术组取 3 只, 对照组和干预组则各取 7 只大鼠采用上述方法取材, 用于免疫印迹 (western blot, WB) 检测。于灌流后取损伤区域中心取 6 mm 脊髓组织, 加入磷酸酶抑制剂 1% 苯甲基磺酰氟 (phenylmethyl-sulfonyl fluoride, PMSF) 的 RIPA 裂解液裂解组织, 裂解过程中使用剪刀剪碎脊髓组织使其与裂解液充分接触。冰上裂解 20 min 后, 使用 4 °C 预冷的离心机  $1.2 \times 10^4$  进行离心 30 min。取适量蛋白原液进行 BCA 蛋白定量, 随后依据蛋白浓度, 配制上样蛋白为 50 mg/10  $\mu$ l。

将组织存放于深度冰箱中, 检测前先使用金属浴 95 °C 加热 3 min, 随后使用自行配置的 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 进行电泳操作。电泳的条件为 (先恒压 80 V 压齐, 再恒压 100 V 跑至胶底部); 电泳结束后, 采用湿转法冰上进行转膜, 其条件为 (恒压 110 V, 100 min)。转膜结束后, 使用一抗封闭液进行封闭; 随后将 PVDF 膜放入稀释好的一抗当中 4 °C 过夜。一抗使用如下: 兔源 p-MK2, MK2, NLRP3, IL-6, IL-6R, TNF- $\alpha$ , GAPDH。一抗孵育结束后, 在摇床上使用 Tris 缓冲液 (tris buffered saline tween, TBST) 洗膜 3 次每次 10 min, 随后在 37 °C 二抗孵育 2 h, 二抗使用山羊抗兔 IgG 进行孵育。孵育结束后, 再次在摇床上使用 TBST 洗膜 5 次, 每次 10 min, 随后采用发光机进行发光。

表 1 3 组大鼠不同时间点 BBB 评分比较(分,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	造模成功 1 d 后	造模成功 3 d 后	造模成功 7 d 后	造模成功 14 d 后
假手术组	9	21.01±0.33	21.01±0.33	21.01±0.33	21.01±0.33
对照组	35	0.45±0.33 <sup>a</sup>	2.21±0.49 <sup>a</sup>	3.22±0.57 <sup>a</sup>	5.81±0.93 <sup>a</sup>
干预组	35	0.40±0.29 <sup>a</sup>	2.24±0.68 <sup>a</sup>	3.75±0.87 <sup>a</sup>	7.30±1.04 <sup>ab</sup>

注:与假手术组同时时间点比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与对照组同时时间点比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

表 2 3 组大鼠造模成功 7 d 后脊髓组织炎症因子蛋白的表达情况( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	IL-6	IL-6R	TNF- $\alpha$	NLRP3
假手术组	3	1.01±0.00	1.01±0.00	1.01±0.00	1.01±0.00
对照组	7	2.41±0.34 <sup>a</sup>	2.81±0.13 <sup>a</sup>	3.02±0.54 <sup>a</sup>	2.68±0.40 <sup>a</sup>
干预组	7	1.76±0.16 <sup>ab</sup>	2.21±0.19 <sup>ab</sup>	2.44±0.45 <sup>ab</sup>	2.01±0.16 <sup>ab</sup>

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与对照组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

## 九、统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 版统计学软件对本研究所得数据进行分析,符合正太分布的计量资料使用( $\bar{x}\pm s$ )表示。多组间比较采用单因素方差分析,再用最小显著性差异法(least significant difference, LSD)(符合方差齐性)或 Dunnet's T3(不符合方差齐性)方法进行两两比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、3 组大鼠不同时间点运动功能比较

造模成功 1 d、3 d、7 d 后,对照组大鼠的 BBB 评分与干预组同时时间点比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );造模成功 14 d 后,干预组大鼠的 BBB 评分显著优于对照组造模成功 14 d 后,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。造模 1 d、3 d、7 d、14 d 后,对照组和干预组大鼠的 BBB 评分均显著低于假手术组同时时间点,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),详见表 1。

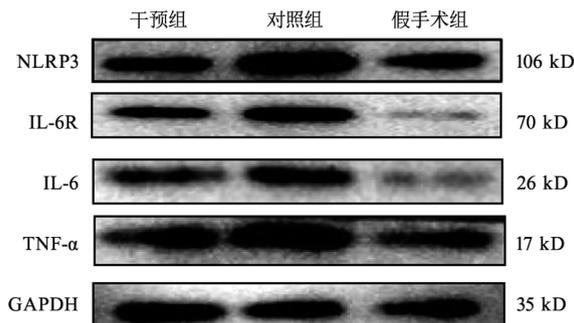
### 二、3 组大鼠造模成功 7 d 后脊髓组织 IL-6、IL-6R、TNF- $\alpha$ 、NLRP3 蛋白的表达情况

造模成功 7 d 后,假手术组大鼠脊髓组织炎症因子 NLRP3、IL-6、IL-6R 和 TNF- $\alpha$  的含量均显著低于对照组和干预组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );干预组大鼠脊髓组织炎症因子 NLRP3、IL-6、IL-6R 和 TNF- $\alpha$  的含量亦显著低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),详见图 1 和表 2。

### 三、3 组大鼠损伤区域 MAPK 通路核心蛋白 p-MK2 和 TTP 阳性细胞在不同时间点的表达情况

假手术组中的 p-MK2 阳性细胞数较少,造模后其变化趋势不明显,且假手术组中的 TTP 阳性细胞在脊髓各区域内均有表达,在造模后变化趋势不明显。造模成功 1 d、3 d、7 d 后,干预组大鼠脊髓组织 p-MK2 阳性细胞均显著低于对照组,差异均有统计学意义

( $P<0.05$ )。造模成功 3 d 后,对照组和干预组损伤区域内的 TTP 阳性细胞数量较组内造模 1 d 后有所增多,于造模成功 7 d 后迅速减少,造模成功 7 d 后,干预组大鼠损伤区域内的 TTP 阳性细胞数量显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),详见表 3。

图 1 3 组大鼠脊髓组织 IL-6、IL-6R、TNF- $\alpha$ 、NLRP3 表达表 3 对照组和观察组损伤区域 p-MK2 和 TTP 阳性细胞在不同时间点的表达情况( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	p-MK2	TTP
对照组			
造模成功 1 d 后	3	30.42±7.48	28.57±9.27
造模成功 3 d 后	7	41.17±6.35	35.85±10.83
造模成功 7 d 后	7	58.45±11.64	25.85±13.47
干预组			
造模成功 1 d 后	3	33.54±13.44 <sup>a</sup>	26.15±8.51
造模成功 3 d 后	7	39.08±14.16 <sup>a</sup>	38.57±12.27
造模成功 7 d 后	7	44.81±10.23 <sup>a</sup>	29.09±9.27 <sup>a</sup>

注:与对照组同时时间点比较,<sup>a</sup> $P<0.05$

### 四、3 组大鼠造模成功 7 d 后损伤区域 MAPK 通路核心蛋白 MK2、p-MK2、TTP 蛋白的表达情况

造模成功 7 d 后,对照组和干预组大鼠损伤区域 MAPK 通路核心蛋白 MK2、p-MK2、TTP 蛋白均显著高于假手术组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。造模成

功 7 d 后, 干预组大鼠损伤区域 MAPK 通路核心蛋白 MK2、p-MK2、TTP 蛋白与对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 详见表 4 和图 2。

表 4 3 组大鼠造模成功 7 d 后损伤区域 MAPK 通路核心蛋白 MK2、p-MK2、TTP 蛋白的表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	MK2	p-MK2	TTP
假手术组	3	1.01±0.00	1.01±0.00	1.01±0.00
对照组	7	2.48±0.29 <sup>a</sup>	2.74±0.35 <sup>a</sup>	1.36±0.18 <sup>a</sup>
干预组	7	1.825±0.20 <sup>ab</sup>	1.89±0.23 <sup>ab</sup>	2.15±0.17 <sup>ab</sup>

注: 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

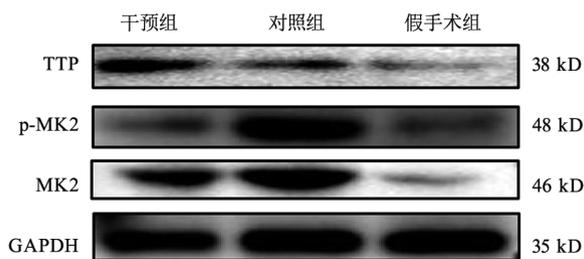


图 2 3 组大鼠造模成功 7 d 后脊髓组织 MK2、p-MK2、TTP 的表达情况

## 讨 论

本研究结果显示, SCI 大鼠经无热量、小剂量 USW 干预后, 其 14 d BBB 运动功能评分显著改善, 且显著优于未经 USW 治疗的对照组, 这与本课题组前期的研究结论相似<sup>[11]</sup>。该结果提示, USW 治疗可促进 SCI 大鼠运动功能的恢复。

IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子由 SCI 区域内巨噬细胞/小胶质细胞分泌, 这些释放的因子会作用于损伤区域存活神经元、星形胶质细胞与小突胶质细胞, 影响这些细胞正常发挥生物活性<sup>[3]</sup>。SCI 后, 炎症小体 NlrP3 作为 NF- $\kappa$ B、MAPK 炎症信号的转录产物, 可促进细胞因子前体 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18 的成熟和分泌, 诱发坏死、凋亡、焦亡等表型加剧损伤区域内炎症微环境的改变<sup>[12]</sup>。本课题组前期的研究发现, USW 治疗可通过抑制损伤区域内小胶质细胞数量和促炎性极化<sup>[11]</sup>, 从而减少 IL-1 $\beta$  等炎症因子的释放, 调节 NF- $\kappa$ B 炎症通路<sup>[2, 11]</sup>。本研究结果发现, USW 治疗可以抑制损伤区域内 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子、调节炎症小体 NlrP3 的释放, 改善炎症微环境, 促进运动功能恢复。

MAPK 是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者, MAPK 激酶激酶 (MAP kinase kinase kinase, MKKK)、MAPK 激酶 (MAP kinase kinase, MKK) 和 MAPK 可依次激活<sup>[13-14]</sup>, 共同调节细胞的生长和炎症反应, 通过依次磷酸化会将上游信号传递至下游应答

分子<sup>[15]</sup>。MAPK 参与 SCI 后炎症反应和凋亡等多种病理类型, 可以抑制 MAPK 在损伤区域的表达, 改善损伤区域内炎症微环境<sup>[15]</sup>, 从而改善运动功能<sup>[16]</sup>。本研究发现, SCI 挫压伤模型大鼠造模成功后, 损伤区域内的 MK2 及其磷酸化分子 p-MK2 的阳性细胞数量增多, MK2 抑制因子 TTP 在损伤 1 d 后出现更多的表达, 于造模成功 3 d 后达到峰值, 随后开始下降。因此在 SCI 早期, 抑制 MAPK 炎症通路激活是改善 SCI 后炎症的策略之一。

本次研究结果还发现, USW 治疗可以抑制 SCI 区域内细胞 MAPK 通路转录因子 MK2 磷酸化, 从而减少炎症因子的释放。同时, USW 治疗还可提高损伤区域内 MK2 蛋白激活抑制因子 TTP 表达、改善炎症微环境, 降低 MAPK 通路激活诱导的炎症和神经元凋亡, 从而缩小损伤区域面积。

综上所述, USW 可通过调节损伤区域内细胞 MAPK 通路的激活来抑制损伤区域内炎症因子的释放, 在 SCI 急性期可发挥神经保护作用。本课题组将在后续研究中继续探索 USW 对 MAPK 通路抑制作用的更深层的机制, 以期为临床研究提供更多的参考。

## 参 考 文 献

- [1] Kathe C, Skinnider MA, Hutson TH, et al. The neurons that restore walking after paralysis[J]. Nature, 2022, 611(7936):540-547. DOI: 10.1038/s41586-022-05385-7.
- [2] Wang S, Jia Y, Cao X, et al. HUCMSCs transplantation combined with ultrashort wave therapy attenuates neuroinflammation in spinal cord injury through NUR77/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Life Sci, 2021, 267:118958. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118958.
- [3] Chen S, Ye J, Chen X, et al. Valproic acid attenuates traumatic spinal cord injury-induced inflammation via STAT1 and NF- $\kappa$ B pathway dependent of HDAC3[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1):150. DOI: 10.1186/s12974-018-1193-6.
- [4] Li Y, He X, Kawaguchi R, et al. Microglia-organized scar-free spinal cord repair in neonatal mice[J]. Nature, 587(7835):613-618. DOI: 10.1038/s41586-020-2795-6.
- [5] Li Z, Yu S, Liu Y, et al. SU16f inhibits fibrotic scar formation and facilitates axon regeneration and locomotor function recovery after spinal cord injury by blocking the PDGFR $\beta$  pathway[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1):95. DOI: 10.1186/s12974-022-02449-3.
- [6] 苏浩, 杜姝, 陈丹莹, 等. 早期跑台训练联合超短波治疗对脊髓损伤大鼠功能恢复的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2019, 41(10):721-726. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.10.001
- [7] Wang N, Feng Z, Zhao W, et al. Ultrashortwave radiation promotes the recovery of spinal cord injury by inhibiting inflammation via suppression of the MK2/TNF- $\alpha$  pathway[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4):1909-1916. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3786.
- [8] Liu Z, Yao X, Jiang W, et al. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation via MAPKs-NF- $\kappa$ B signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1):90. DOI: 10.1186/s12974-020-

01751-2.

[9] Allen A. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column [ J ]. JAMA, 1911, 57(4) :878-880.

[10] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection [ J ]. Exp Neurol, 1996, 139 ( 2 ) :244-56. DOI: 10.1006/exnr.1996.0098.

[11] Na L, Wang S, Liu T, et al. Ultrashort Wave combined with human umbilical cord mesenchymal stem cell ( HUC-MSC ) transplantation inhibits NLRP3 inflammasome and improves spinal cord injury via MK2/TTP signalling pathway [ J ]. Biomed Res Int, 2020, 2020; 3021750. DOI:10.1155/2020/3021750.

[12] Chen Y, Wu L, Shi M, et al. Electroacupuncture inhibits NLRP3 activation by regulating CMPK2 after spinal cord injury [ J ]. Front Immunol, 2022, 13:788556. DOI: 10.3389/fimmu.2022.788556. eCollection 2022.

[13] Xu T, Li X, Guo Y, et al. Multiple therapeutic effects of human neu-

ral stem cells derived from induced pluripotent stem cells in a rat model of post-traumatic syringomyelia [ J ]. EBioMedicine, 2022, 77: 103882. DOI:10.1016/j.ebiom.2022.103882.

[14] Xue MT, Sheng WJ, Song X, et al. Atractylenolide III ameliorates spinal cord injury in rats by modulating microglial/macrophage polarization [ J ]. CNS Neurosci Ther, 2022, 28(7) : 1059-1071. DOI: 10.1111/cns.13839.

[15] 朱毅, 杨雨洁, 邵清华, 等. 电针刺激对脊髓损伤排尿障碍大鼠膀胱 c-Kit 表达的双向调控作用 [ J ], 中华物理医学与康复杂志, 2022, 44(5) :390-394. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.05.002

[16] Bachstetter AD, Xing B, de Almeida L, et al. Microglial p38 $\alpha$  MAPK is a key regulator of proinflammatory cytokine up-regulation induced by toll-like receptor (TLR) ligands or beta-amyloid (A $\beta$ ) [ J ]. J Neuroinflammation, 2011, 8: 79. DOI:10.1186/1742-2094-8-79.

(修回日期:2023-01-02)

(本文编辑:阮仕衡)

## 《中华物理医学与康复杂志》第八届编辑委员会组成名单

总 编 辑: 黄晓琳

副 总 编 辑: 窦祖林 顾 新 郭铁成 何成奇 李 玲 刘宏亮 吴 毅 燕铁斌 岳寿伟 周谋望

编 辑 委 员: (含总编辑、副总编辑)(按姓氏拼音顺序排序)

教丽娟 白定群 白玉龙 毕 胜 陈 红 陈丽霞 陈青山 陈文华 窦祖林 杜 青  
 范建中 冯晓东 冯 珍 高晓平 顾 新 顾旭东 郭钢花 郭 琪 郭铁成 何成奇  
 何晓红 胡昔权 黄东锋 黄国志 黄晓琳 黄 真 贾子善 姜志梅 金 俏 李海峰  
 李红玲 李建华 李 丽 李 玲 李晓捷 李雪萍 梁 英 廖维靖 刘宏亮 刘 楠  
 刘遂心 刘忠良 卢红建 鲁雅琴 陆 敏 陆 晓 罗 军 马 超 牟 翔 倪朝民  
 倪国新 潘 钰 单春雷 邵 明 宋为群 孙强三 唐 强 王宝兰 王冰水 王楚怀  
 王 刚 王宁华 王 强 王 彤 王玉龙 吴 华 吴 霜 吴 毅 武继祥 肖 农  
 谢 青 谢 荣 谢欲晓 许光旭 许 涛 闫金玉 燕铁斌 杨建荣 杨卫新 叶超群  
 尹 勇 于慧秋 余 茜 虞乐华 袁 华 岳寿伟 恽晓平 张长杰 张 芳 张桂青  
 张 皓 张继荣 张锦明 张盘德 张巧俊 张志强 郑光新 周谋望 朱 宁 朱珊珊

中国香港编委: Leonard Sheung Wai Li(中国香港)

外 籍 编 委: Akira Miyamoto (日本) Hao Liu(美国) Hong Wu(美国)

Li-Qun Zhang(美国) Nathan R. Qi(美国) Sheng Quan Xie(新西兰)

Sheila Purves(加拿大) Sheng Li(美国) Wenchun Qu(美国)