

颈椎病颈椎终板软骨的转录组学特征及针刀干预对FGF18/Akt轴关键分子表达的影响

刘福水^{1,2}, KHALIUNAA Tumurbaatar², 曹奇光², 杨煜乾², 任长安¹, 朱金超², 赵小兰², 曹 钊², 邓 彪², 王小乐¹
¹江西中医药大学附属医院骨伤九科, 江西 南昌 330006; ²江西中医药大学临床医学院, 江西 南昌 330006

摘要:目的 分析颈椎病(CS)终板软骨的转录组学特征及针刀对FGF18/Akt轴关键分子表达的影响。方法 基于GEO数据库结合生物信息学方法分析CS终板软骨的差异基因、关键信号通路等转录组学特征,并开展针刀干预CS兔模型的动物实验进行验证。24只SPF级新西兰兔随机分为正常组、CS组、针刀组,8只/组。除正常组兔外,余兔采用低头位法构建CS模型,采用X线验证CS模型是否成功构建。造模成功1周后,正常组和CS组兔正常饲养,针刀组兔进行针刀干预,1次/周,共干预3周。HE染色观察颈椎间盘病理结构改变,Tunel法检测细胞凋亡,实时荧光定量PCR检测椎间盘FGF18、FGFR3、Akt的mRNA表达,免疫组化法检测椎间盘髓核、终板软骨和纤维环的FGF18、p-Akt、Akt蛋白定位和表达情况。结果 与正常终板软骨相比,CS终板软骨存在大量差异表达基因,并显著富集于PI3K-Akt、钙离子、Rap1等信号通路;X线结果表明造模前后颈椎生理曲度、关节退行性改变等符合CS临床表现;HE染色结果发现CS颈椎间盘纹理杂乱,椎间盘纤维环变薄,髓核变小消失,针刀可缓解CS以上病理改变;qPCR结果发现与正常组兔相比,CS颈椎间盘FGF18、FGFR3、Akt表达差异无统计学意义($P>0.05$),与CS组相比,针刀组FGF18、FGFR3、Akt表达差异亦无统计学意义($P>0.05$);免疫组化结果表明,针刀可显著提高CS颈椎终板软骨FGF18及p-Akt的蛋白表达($P<0.05$),降低CS颈椎终板软骨周围Akt与p-Akt的比值($P<0.05$);Tunel显示CS组终板软骨凋亡细胞增多($P<0.05$),针刀可减轻细胞凋亡($P<0.05$)。结论 CS颈椎终板软骨存在大量差异表达基因,针刀可能通过有效激活FGF18/Akt轴,减轻终板软骨细胞凋亡,从而延缓椎间盘退行性改变治疗CS。

关键词:颈椎病;针刀;转录组特征;终板软骨;FGF18/Akt轴

Transcriptomic characteristics of cervical endplate cartilage in cervical spondylosis and effects of acupotomy on the FGF18/Akt axis with cervical spondylosis

LIU Fushui^{1,2}, KHALIUNAA Tumurbaatar², CAO Qiguang², YANG Yuqian², REN Changan¹, ZHU Jinchao², ZHAO Xiaolan², CAO Li², DENG Biao², WANG Xiaole¹

¹Ninth Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; ²Clinical Medical College, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To explore the transcriptomic characteristics of the endplate cartilage of the cervical intervertebral disc in cervical spondylosis (CS) and the effects of acupotomy on expressions of fibroblast growth factor 18 (FGF18)/protein kinase B (Akt) axis key molecules. **Methods** Transcriptomic analyses were performed using bioinformatics methods based on the GEO database. In the animal experiment, 24 New Zealand rabbits were randomized equally into control, CS model, and acupotomy groups. In the latter two groups, CS models were established followed 7 days later by acupotomy intervention (once a week for 3 weeks) or no particular treatment. Histopathological changes and cell apoptosis in the intervertebral discs were examined with HE staining and TUNEL assay, and the mRNA expressions of FGF18, FGFR3, and Akt in the intervertebral discs were detected using RT-qPCR; the localization and expressions of FGF18, p-Akt, and Akt proteins were examined with immunohistochemistry. **Results** The endplate cartilage in CS exhibited numerous differentially expressed genes enriched in the PI3K-Akt signaling, calcium signaling, and Rap1 signaling pathways. CS rabbits showed obvious changes in the cervical spine curvature and joint degenerations, changes in cervical intervertebral disc texture, thinning of the annulus fibrosus, shrinkage or even absence of the nucleus pulposus, and increased apoptotic cells in the endplate cartilage, which were all obviously alleviated after acupotomy. No significant differences were found in the mRNA expressions of FGF18, FGFR3, and Akt in the cervical intervertebral discs among the 3 groups. Acupotomy significantly increased FGF18 and p-Akt protein expressions and reduced the Akt/p-Akt ratio in the cervical endplate cartilage of CS rabbits. **Conclusion** The cervical endplate cartilage of CS show numerous differentially expressed genes. Acupotomy may delay degenerative changes of the intervertebral discs and improves CS by activating the FGF18/Akt axis to reduce apoptosis of endplate cartilage cells.

Keywords: cervical spondylosis; acupotomy; transcriptome characteristics; intervertebral disc; FGF18/Akt axis

收稿日期:2025-08-24

基金项目:国家重点研发计划(2023YFC3502701);国家自然科学基金(82360940);江西省教育厅科技项目(GJJ2200990);江西省中医药管理局项目(2023B1191)

Supported by National Key Research and Development Program of China (2023YFC3502701); National Natural Science Foundation of China (82360940).

作者简介:刘福水,博士,教授,E-mail: 20050827@jxutcm.edu.cn

通信作者:王小乐,博士,副教授,E-mail: Jony_wang@live.com

颈椎病(CS)是指颈椎椎间盘退行性改变及其继发病理改变累及周围组织结构从而出现一系列临床表现的疾病,属中医“项痹”“项强”等范畴,欧美地区常称之为颈痛^[1-3]。我国CS的患病率高达13.76%并呈现广泛化低龄化趋势,且对CS的知晓率和防治意识有待提高,防治形势严峻^[4,5]。研究证实,椎间盘退变是CS发生的前提条件和病理基础,严重者可致瘫痪,有效干预、延缓椎间盘退行性改变是防治CS的关键^[6,7]。

循证医学研究表明CS是针刀的优势病种,针刀可有效延缓CS颈椎间盘退变,疗效显著^[8,9]。多项研究证实针刀可通过减轻炎性因子表达、升高和激活丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(Akt)蛋白表达以减少椎间盘软骨细胞凋亡等发挥作用^[10,11],但现有研究呈“碎片化”状态,大多围绕单一通路的相关指标研究分析,对于针刀干预如何多靶点、多维度地协调椎间盘退变过程中的关键分子事件仍缺乏整体性认识。为此,本研究借助生物信息学及针刀干预CS兔动物实验,从系统生物学层面结合动物实验初步探究CS终板软骨的转录组特征及针刀干预对关键通路相关分子表达的影响,以期深入阐释针刀治疗CS的科学机制提供方向和思路。

1 材料和方法

1.1 转录组数据分析

1.1.1 数据检索及下载 通过探索GEO数据库检索关键词“cervical spondylosis”“neck pain”下载与CS相关的基因表达数据集,使用R语言GEOquery包(2.72.0)下载相关原始数据。

1.1.2 差异表达基因分析及可视化 使用R语言的limma包(3.60.6)进行基因差异表达分析,并以 $P < 0.05$ 和 \log_2 的基因表达差异倍(\log_2FC)数绝对值 > 1 定义为差异表达基因,并构建差异表达基因的表达矩阵,并使用ggplot2包(3.5.1)对差异表达基因绘制火山图可视化,同时筛选出差异表达倍数Top 150的基因并使用R语言的pheatmap包(1.0.12)绘制热图进行可视化。

1.1.3 差异基因功能分析 基于差异表达矩阵,参考R语言的人基因数据注释包org.Hs.eg.db,使用R语言的clusterProfiler包(4.12.6)对差异表达基因进行通路功能富集分析,基于基因差异表达结果,采用基因集富集分析(GSEA)对显著富集的信号通路进一步验证。

1.2 动物实验

1.2.1 动物 24只SPF级新西兰兔(雌雄各半,体质量 2.5 ± 0.5 kg)购于赣州市畜牧水产研究所,动物合格证号:SCXK(赣)2018-0009,兔子饲养于江西中医药大学实验动物科技中心,单笼饲养,标准饲料,饲养过程中可自由摄食饮水。

1.2.2 伦理审批 本实验遵循江西中医药大学动物实验中心有关实验动物管理和使用的规定,并通过江西中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:JZLLSC20230678)。

1.2.3 主要试剂与仪器 异丙醇、无水乙醇、二甲苯、邻苯二甲酸二丁酯、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司);RNA提取液、氯仿替代物、SweScript All-in-One RT SuperMix for qPCR、 $2 \times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix、通用型组织固定液、组化笔、 $20 \times$ Tris-

EDTA抗原修复液、苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒、EDTA脱钙液、牛血清白蛋白、DAB显色剂、Tunel试剂盒、冷冻研磨仪(Servicebio);乙二醇乙醚乙酸酯、甲基丙烯酸甲酯、过氧化苯甲酰(麦克林);p-PI3K抗体、AKT抗体、FGF18抗体(bioss);台式高速冷冻型微量离心机(DragonLabR);荧光定量PCR仪(Bio-rad);硬组织切片机(Leica);生物组织摊片机(KEDEE);包埋机、冻台(武汉俊杰电子有限公司);正置光学显微镜、成像系统(尼康);脱水机(DIAPATH)。

1.2.4 分组与造模 24只新西兰兔经7 d适应性饲养后,按照随机数字表分为正常组、CS组、针刀组,8只/组。除正常组兔子外,根据课题组前期研究及文献^[12,13]报道,余兔子采用低头位法构建CS兔造模。将CS组兔放置于自制的低头固定木盒中,保证兔固定时低头角度为 45° ,从 -20°C 取冻好的冰袋置于造模箱顶部至每次造模结束(图1),每次造模持续5 h,1次/d,连续造模12周。造模前后各组随机选取3只兔子拍摄颈椎X线侧位片,观察椎间隙、椎体前后缘骨质增生、椎体上下关节突骨质增生、颈椎生理曲度等情况,以验证CS模型是否构建成功。



图1 CS兔模型构建

Fig.1 Construction of cervical spondylosis (CS) rabbit model.

1.2.5 针刀干预 造模成功后正常组和CS组兔正常饲养;针刀组:造模成功1周后进行针刀干预,针刀干预1次/周,共干预3次,操作步骤如下:固定备皮:将兔固定在治疗台上,待兔平静后用小动物剃毛器进行常规颈部备皮;治疗点选取:如图2治疗点触诊所示,分别于斜方肌起点区域、胸锁乳突肌乳突附着点区域、颈椎关节突区域及颈部其它可明显触及的硬结或条索状物等筋结

点,对各触及到的筋结点用记号笔进行标记,每次选取4~6个点为针刀进针治疗点并进行消毒;针刀操作:戴无菌手套,左手拇指为押指,在进针点按压以固定筋结点,右手持针刀于筋结点进针,进针时保持针刃与肌肉走行平行,垂直刺入皮下,到达骨面后先行纵向疏通,再辅以横向剥离,操作各3次,范围在3 mm内,随后快速出针并用无菌棉球按压进针点至不再出血。

1.2.6 指标检测

1.2.6.1 HE染色法观察各组兔椎间盘形态学变化 各组兔子干预结束1周后,采用空气栓塞法处死兔子,剪开脊柱周围肌肉,横断C1、T1之间的脊柱,放于冰块上操作。取下后用锋利的刀片切开各个关节,在椎间盘的

最近、最远端下刀,切下尽可能完整的椎间盘。放于冰冻生理盐水中清洗干净。随即将椎间盘置于4%多聚甲醛中固定48 h后,再经石蜡包埋、切片,将石蜡切片脱蜡至水,切片入高清恒染预处理液中处理1 min,HE染色,最后脱水封片并于光学显微镜观察椎间盘微观改变。

1.2.6.2 RT-qPCR法检测椎间盘FGF18、FGFR3、Akt1的mRNA表达情况 微量天平称取20 mg椎间盘样本,冷冻研磨仪制备组织匀浆,提取总RNA,再经反转录、扩增后获取各样本CT值,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对结果进行数据处理用于后续统计分析。相关引物序列由武汉赛维尔生物科技有限公司合成(表1)。

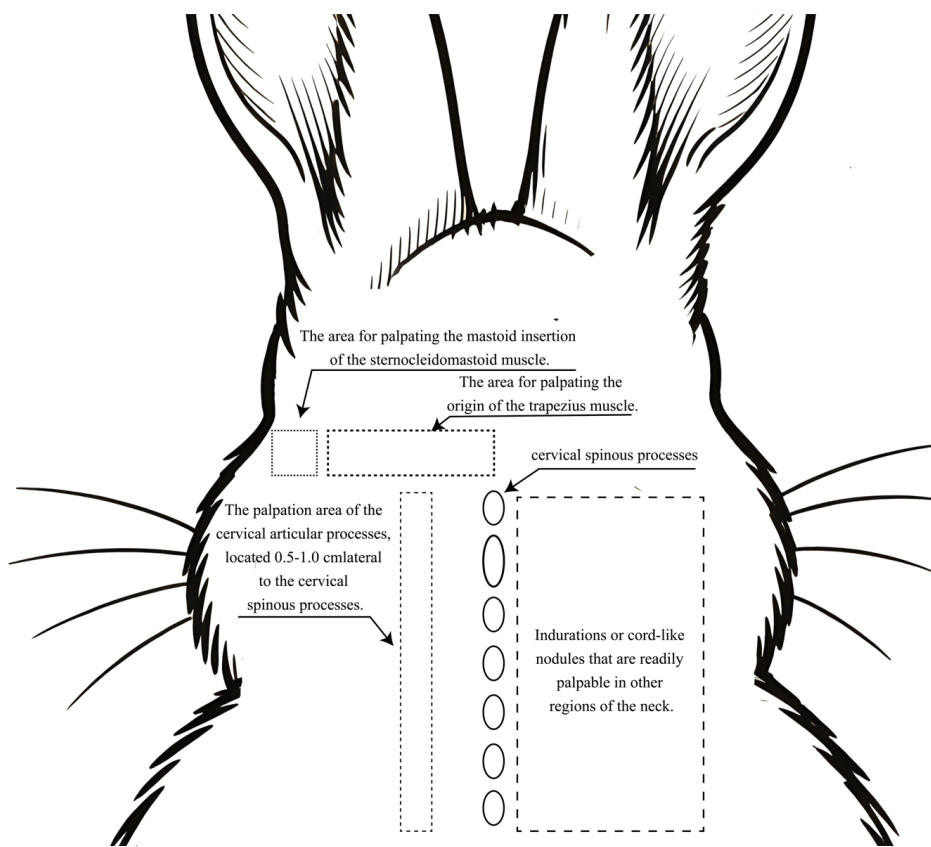


图2 治疗点选取触诊区
Fig.2 Palpation areas selected as the treatment points.

1.2.6.3 免疫组化法检测兔椎间盘FGF18、p-Akt、Akt蛋白定位及表达情况 取石蜡固定的兔椎间盘样本,制备石蜡切片,脱蜡至水,抗原修复,加入3%双氧水溶液阻断内源性过氧化物酶,经3%BSA封闭液室温封闭30 min后甩干,在切片上滴加PBS稀释的FGF18(1:300)、p-Akt(1:300)、Akt(1:300)一抗4℃过夜,随后PBS洗片后加入山羊抗兔二抗(1:200)室温孵育50 min;PBS洗片后加入新鲜配制的DAB显色液,显微镜下控制显色

时间,后复染细胞核脱水封片。镜下阳性为棕黄色,采用Image J2软件(2.16.0/1.54p)及该软件中的IHC Toolbox插件提取图片阳性平均光密度值用于统计分析。

1.2.6.4 TUNEL检测各组兔椎间盘软骨细胞凋亡情况 取石蜡固定的兔椎间盘样本制备4 μm厚石蜡切片脱蜡至水,组化笔在切片组织周围画圈,滴加蛋白酶K工作液覆盖组织进行蛋白酶K修复,经洗膜后甩干加入破膜

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR in this study

Gene	Primer sequence (5'-3')
GAPDH-sense	TTCCAGTATGATTCCACCCACG
GAPDH-antisense	GGGCTGAGATGATGACCCTTTT
FGF18-sense	GAGTGTGTGTTTCATCGAGAAGGTTT
FGF18-antisense	GAGCGCTTGGTCACTGTGGT
FGFR3-sense	AGGAACAGGTGGTCTTTGGCA
FGFR3-antisense	CGCACAATGAAGTGGCACAG
AKT1-sense	AGTACATCAAGACCTGGCGG
AKT1-antisense	AGTTGTTGAGTGGGGACTCG

液进行破膜处理,再经阻断内源性过氧化物酶后,按tunel试剂盒说明书加入反应液、Streptavidin-HRP、洗膜、DAB染色、细胞核复染、封片步骤后,显微镜下观察蓝色为细胞核,棕黄色为凋亡细胞。凋亡率=有核细胞中阳性细胞数/有核细胞×100%。显微镜下随机选取6个视野,计算凋亡率。

1.2.7 统计学分析 采用R软件进行统计分析。计量资料采用Shapiro-Wilk检验进行正态性检验,Levene检验进行方差齐性检验。若数据满足正态分布且方差齐,两组间比较采用两独立样本t检验;若满足正态分布但方差不齐,则采用Welch's t检验;若不满足正态分布,则采用Mann-Whitney U检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CS椎间盘终板软骨差异表达基因分析

通过检索获取符合本次研究的GSE153761 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=gse153761>, 访问时间:2024年7月22日)数据集,该数据集包含3个正常颈椎间盘终板软骨样本和3个CS退行性改变椎间盘终板软骨样本,差异表达分析结果发现上调表达基因有374个,下调的194个(图3A),其中显著差异表达的前150基因(图3B)。

2.2 基因功能分析

差异表达基因功能分析结果发现PI3K-Akt signaling pathway、Calcium signaling pathway、Rap1 signaling pathway等信号通路显著富集(图4A),基于GSEA分析结果显示,排名前10的通路中PI3K-Akt signaling pathway、Calcium signaling pathway、Rap1 signaling pathway等8条信号通路被显著富集(图4B)。在显著富集通路中的差异表达基因中(图4C),其中与软骨细胞修复密切相关的FGF18($P=0.0126$, $\log_2FC=1.93$)显著富集于多条信号通路(图4D)。

2.3 CS造模前后兔子颈椎影像学改变

X线影像学结果表明,与造模前比较,造模后兔颈

椎曲度反弓,椎间隙变窄,并出现不同程度的椎体骨质增生及上下关节突骨质增生(图5)。

2.4 针刀干预对CS椎间盘组织病理学影响

正常组显示髓核组织正常,纤维环完整,与髓核组织分界清晰,髓核组织完整,髓核细胞核大小正常,少空泡;CS组纤维环板层组织曲折变薄,纤维环与髓核分界模糊,髓核变形,髓核细胞数量减少;针刀组髓核组织正常,纤维环较CS组厚度增加,板层结构明显,与髓核分界清晰,髓核细胞明显增多(图6)。

2.5 针刀干预对CS兔椎间盘FGF18、FGFR3、Akt1的mRNA表达的影响

检测针刀干预兔颈肌影响椎间盘FGF18、FGFR3、Akt1的mRNA表达的影响,结果发现各组间FGF18、FGFR3、Akt1的mRNA差异无统计学意义($P>0.05$, 图7)。

2.6 针刀干预对CS兔椎间盘髓核、纤维环、终板软骨FGF18、Akt、p-Akt的蛋白表达及Akt与p-Akt的比值影响

免疫组化结果显示,FGF18、p-Akt、Akt的表达在椎间盘中成弥散分布,主要集中在细胞质、细胞膜及细胞外间质中(图8~10)。与正常组比较,CS组髓核FGF18、Akt的表达差异无统计学意义($P>0.05$),髓核p-Akt的表达升高($P<0.05$);与CS组相比,髓核Akt的表达差异无统计学意义($P>0.05$),髓核FGF18、p-Akt的表达显著升高($P<0.05$)。与正常组比较,CS组纤维环FGF18、Akt、p-Akt的表达差异均无统计学意义($P>0.05$);与CS组比较,针刀组纤维环FGF18、p-Akt的表达差异无统计学意义($P>0.05$),Akt的表达降低($P<0.05$)。与正常组比较,CS组终板软骨FGF18、Akt的表达升高($P<0.05$),p-Akt的表达差异无统计学意义($P>0.05$);与CS组比较,针刀组终板软骨FGF18、p-Akt的表达升高($P<0.05$),Akt的表达降低($P<0.05$)。髓核Akt与p-Akt的比值及纤维环Akt与p-Akt的比值各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,CS组终板软骨Akt

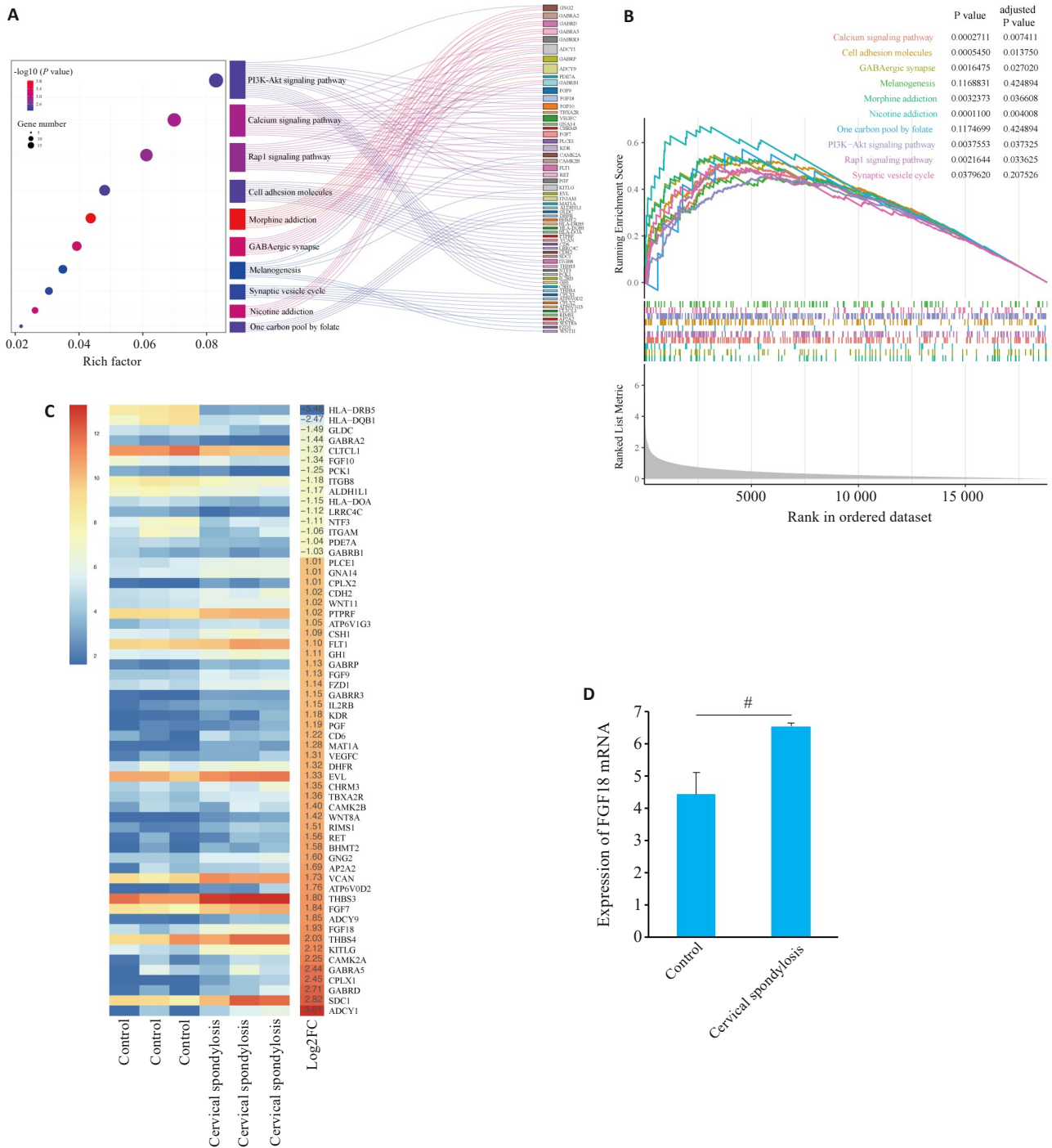


图4 CS终板软骨差异表达基因功能分析

Fig.4 Analysis of the functions of differentially expressed genes. A: Top 10 enriched pathways and the related differentially expressed genes (DEGs). B: GSEA analysis of the top 10 enriched pathways. C: Heatmap of the DEGs in the top 10 enriched pathways. D: Expression of FGF18 mRNA. n=3, *P<0.05.

《灵枢·刺节真邪》有云：“一经上实下虚而不通者，此必有横络盛加于大经，令之不通”，针刀通过对“横络”进行松解，解除经脉受阻以“调筋”从而恢复经筋“主束骨而利机关”的生理功能，达到“治骨”效用^[14,15]。研究证实针刀的疗效机制可能与减轻炎症反应、改善组织损伤等相关^[16,17]，体现出针刀具有多途径、多靶点的作用机制，但针刀延缓椎间盘退行性改变治疗CS的关键作

用靶点有待明确。

为探究针刀干预CS的关键作用靶点，本研究从系统生物学层面，通过生物信息学方法分析CS颈椎终板软骨转录组，结果发现大量差异表达基因，这些差异基因显著富集于PI3K-Akt信号通路、Rap1信号通路、Calcium信号通路等。已有研究证实针刀对PI3K-Akt信号具有双向调节作用，如研究发现针刀可激活PI3K-



图5 造模前后兔子颈椎X线改变
Fig.5 Changes in X-ray of rabbit cervical vertebrae before and after modeling. A: X-ray before modeling. B: X-ray after modeling.

Akt信号通路调节颈后伸肌细胞的自噬、凋亡平衡,参与劳损颈肌修复^[10];另有研究表明针刀可通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路维持软骨细胞稳态,最终延缓软骨退变^[18]。PI3K-Akt信号通路为排名第1的富集通路提示其可能是针刀治疗CS的关键调控途径。虽然目前

尚未有针刀对Rap1信号通路、Calcium信号通路是否存在调控作用的相关报道,但有研究发现Rap1信号通路可能在转录水平和蛋白水平都参与了椎间盘退行性改变的生物学过程^[19];在椎间盘退变过程中,髓核与纤维环细胞会经历Ca²⁺依赖性凋亡过程,Piezo1通过调控Ca²⁺信号加速椎间盘退行性改变^[20]。针刀可通过调节兔软骨终板基质稳态,改善椎间盘退变^[21],抑制软骨细胞外基质降解,进而改善软骨退化与损伤、促进退化的关节软骨修复^[22],与椎间盘退行性改变密切相关且被显著富集的Rap1信号通路和Calcium信号通路可能是阐释针刀延缓椎间盘退行性改变的机制潜在路径。

另外,PI3K-Akt信号通路被证实是关联Rap1信号通路及Calcium信号通路的纽带,共同调控着凋亡、自噬等生物学过程^[23,24]。如有研究发现,鸢尾素可通过Rap1-PI3K-Akt信号通路促进人间充质干细胞向软骨细胞的分化^[25],调控该通路亦可促进骨髓间充质干细胞迁移和成骨分化^[26];又如Ca²⁺作为细胞凋亡的重要调节

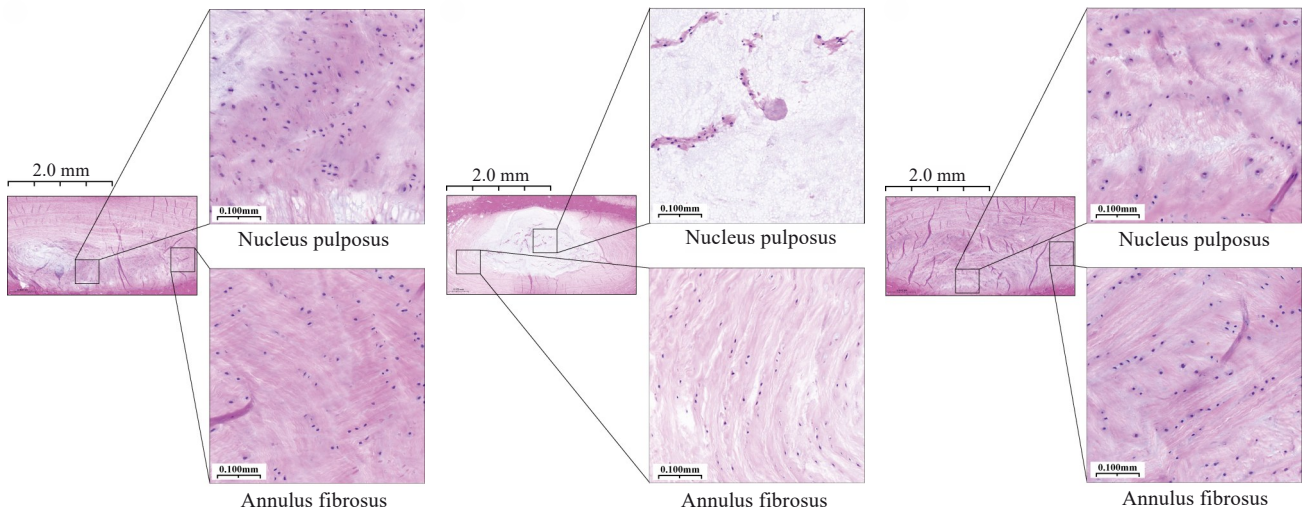


图6 各组兔颈椎间盘HE染色图
Fig.6 HE staining of cervical intervertebral discs of the rabbits in each group. A: Control group. B: CS group. C: Acupotomy group.

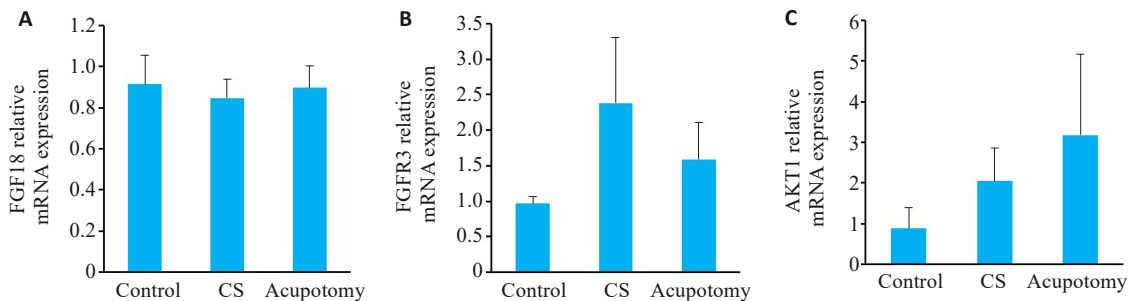


图7 各组兔颈椎间盘FGF18、FGFR3、Akt1的mRNA表达情况
Fig.7 FGF18, FGFR3, and Akt1 mRNA expressions in the cervical intervertebral discs of the rabbits in each group. n=6.

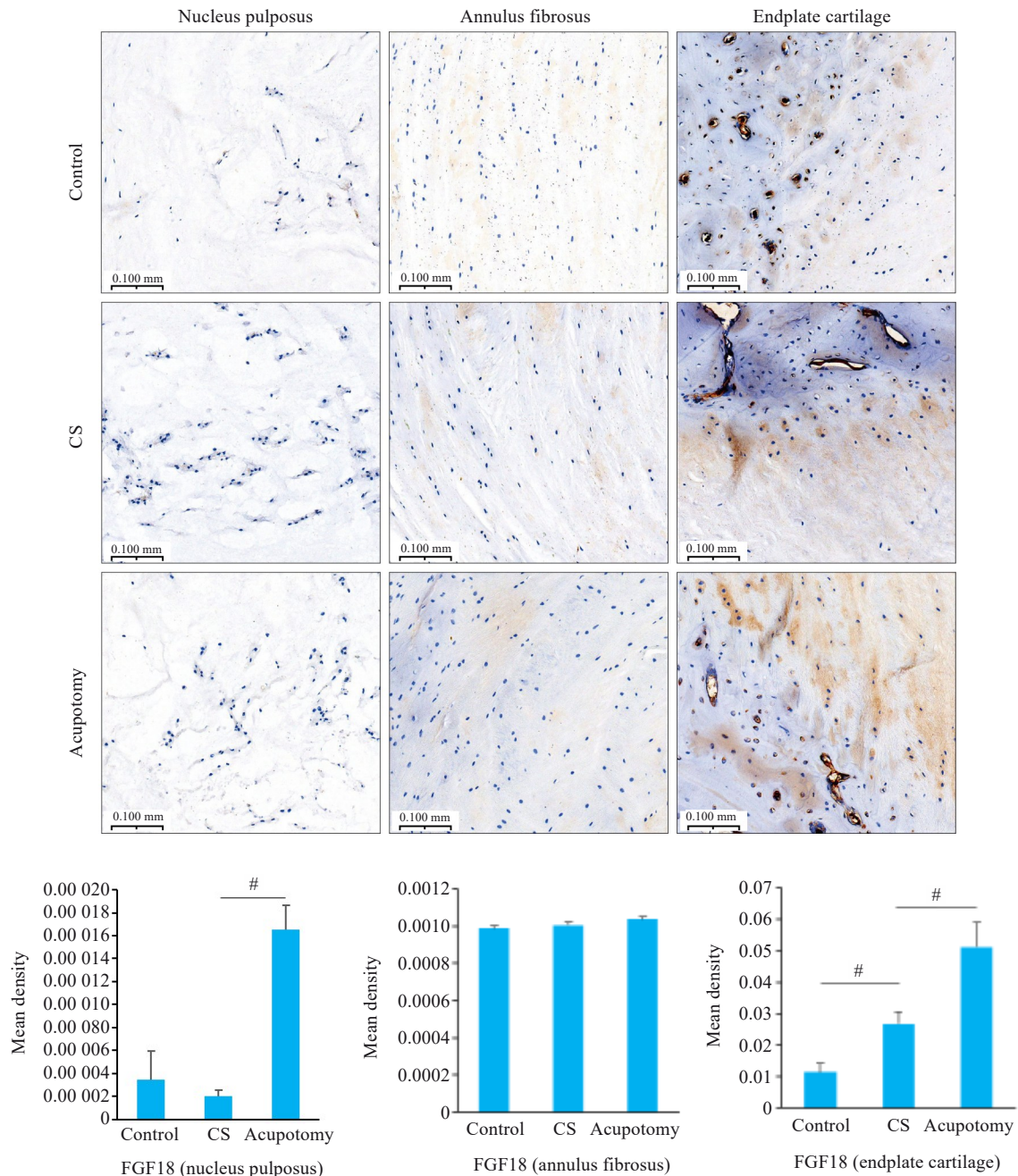


图8 FGF18蛋白在各组兔颈椎间盘髓核、纤维环、终板软骨的表达情况

Fig.8 Expression of FGF18 protein in the nucleus pulposus, annulus fibrosus, and endplate cartilage of the cervical intervertebral discs of the rabbits in each group. $n=6$, $^{\#}P<0.05$.

因子,其可通过Akt途径介导软骨细胞凋亡^[27]。为进一步探究CS中PI3K-Akt信号通路、Rap1信号通路及Calcium信号通路间的联系,本研究对这些通路的共有基因进行研究,结果发现与软骨细胞损伤修复密切相关的FGF18基因均富集于这3条信号通路,可能是调控激活PI3K-Akt信号通路的关键上游信号。

FGF18属FGF成员家族中具有代表性的因子之一,过表达FGF18可促进软骨合成,抑制软骨分解代谢,延缓椎间盘退变^[24]。本研究发现CS椎间盘终板软骨

FGF18的表达升高,针刀可进一步提高CS椎间盘终板软骨和髓核FGF18的表达,提示FGF18可能是针刀的治疗靶点。FGF18/Akt轴是实现软骨损伤修复的重要生物学途径,FGF18可通过特异性结合细胞膜FGFR3受体,使Akt磷酸化发挥抗细胞凋亡水解,促进软骨细胞增殖^[28, 29]。FGF18已被认为是治疗软骨损伤相关疾病的潜在靶点,且处于相关临床试验阶段^[30],研究人员通过脂质体纳米粒、外泌体等包裹递送FGF18提高其疗效,并证实FGF18可通过PI3K-Akt通路促进软骨基

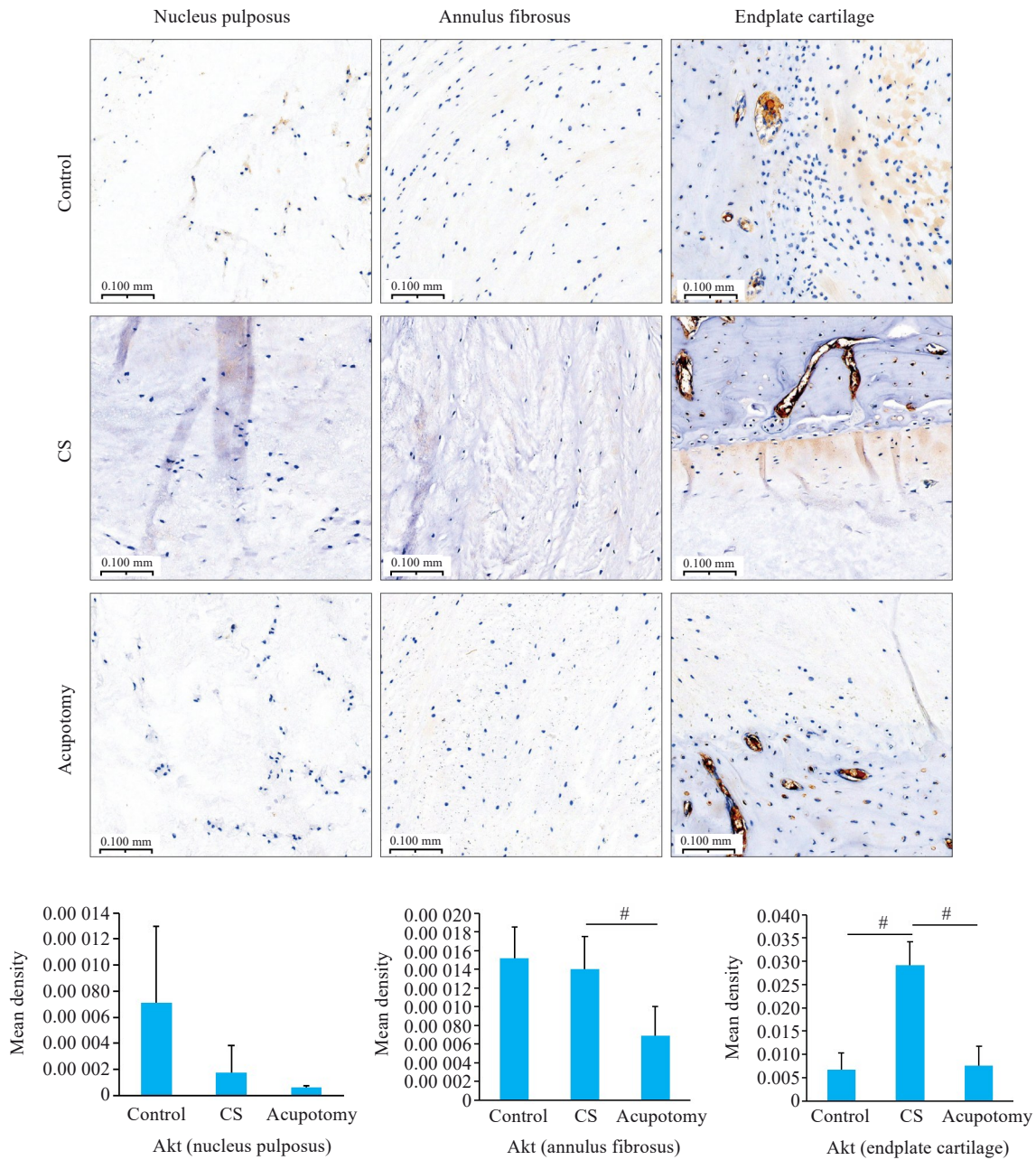


图9 Akt蛋白在各组兔颈椎间盘髓核、纤维环、软骨终板的表达情况

Fig.9 Expression of Akt protein in the nucleus pulposus, annulus fibrosus, and endplate cartilage of the cervical intervertebral discs of rabbits from each group. *n*=6, [#]*P*<0.05.

质分泌,帮助软骨损伤修复^[31,32]。我们通过转录组及动物实验均发现CS椎间盘终板软骨的FGF18的表达虽升高,但Akt未磷酸化是可能是颈椎间盘退行性改变发生的关键,针刀不但可提高椎间盘终板软骨和髓核FGF18的表达,并促进Akt的磷酸化,说明有效激活FGF18/Akt轴可能是针刀延缓椎间盘退行性改变的重要机制。

综上,本研究借助生物信息学发现PI3K-Akt信号通路、Rap1信号通路、Calcium信号通路等被CS差异表达基因显著富集的信号通路可能是CS椎间盘退行性改

变发生的重要机制,激活FGF18/Akt轴可能是针刀治疗CS的关键调控机制,但其中具体的分子调控机制及针刀对其他信号通路的影响有待借助基因敲低、基因过表达等进一步探讨。但本研究存在一定的局限性,因兔椎间盘较小,难以单独分离获得足够的髓核、软骨终板等样本用于相关指标的RNA定量及蛋白定量检测;虽然CS兔模型已被学者公认是CS可靠的造模方法,但因兔子的基因组和人的基因组存在一定的差异,相关结果仍需要进一步借助人来源的细胞进行体外实验验证。

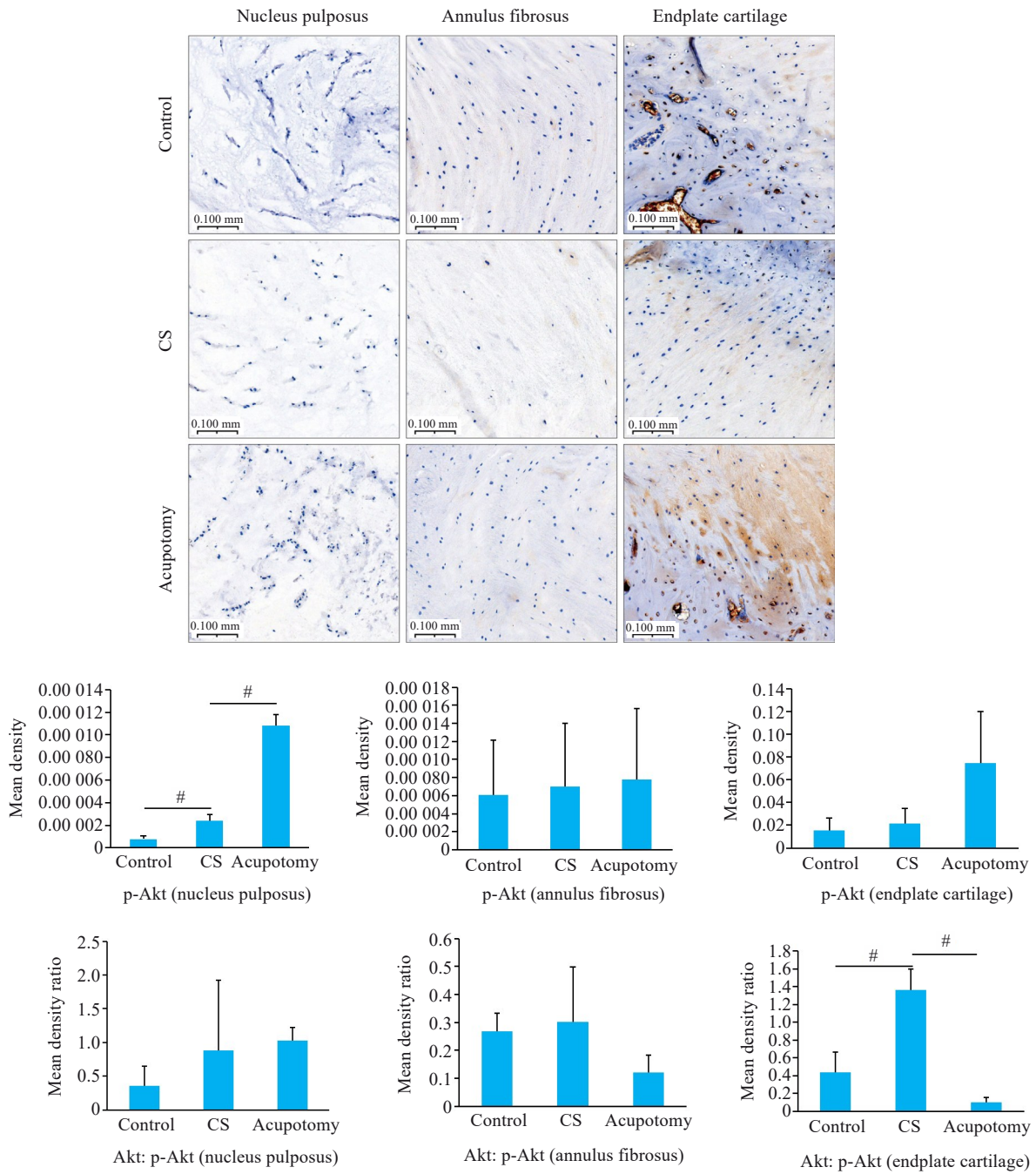


图10 p-Akt蛋白在各组兔颈椎间盘髓核、纤维环、软骨终板的表达情况及Akt与p-Akt比值

Fig.10 Expression of p-Akt protein in the nucleus pulposus, annulus fibrosus, and endplate cartilage and the Akt to p-Akt ratio in the cervical intervertebral discs of the rabbits in each group. $n=6$, $^{\#}P<0.05$.

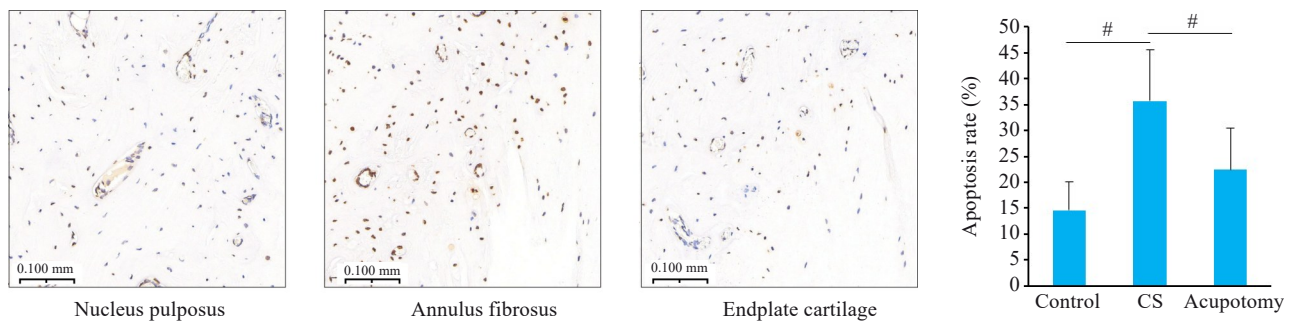


图11 各组兔颈椎间盘终板软骨细胞凋亡情况

Fig.11 Apoptosis of endplate cartilage cells in the cervical intervertebral discs of the rabbits in each group. $n=3$, $^{\#}P<0.05$.

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] 章 薇, 李金香, 姜必丹, 等. 中医康复临床实践指南·项痹(颈椎病)[J]. 康复学报, 2020, 30(5): 337-42.
- [2] Theodore N. Degenerative cervical spondylosis[J]. N Engl J Med, 2020, 383(2): 159-68.
- [3] 崔学军, 姚 敏. 颈椎病中西医结合诊疗专家共识[J]. 世界中医药, 2023, 18(7): 918-22.
- [4] Lv YW, Tian W, Chen DF, et al. The prevalence and associated factors of symptomatic cervical Spondylosis in Chinese adults: a community-based cross-sectional study[J]. BMC Musculoskeletal Disord, 2018, 19(1): 325.
- [5] Li SY, Liu TY, Yang Q, et al. Knowledge, attitude, and practice toward cervical spondylosis among the healthy general population [J]. BMC Public Health, 2025, 25(1): 1014.
- [6] Chen W, Chen H, Zheng DD, et al. Gene-hydrogel micro-environment regulates extracellular matrix metabolism balance in nucleus pulposus[J]. Adv Sci (Weinh), 2019, 7(1): 1902099.
- [7] Tsuchiya K, Okano I, Guven AE, et al. Quantitative assessment of cervical disc degeneration using disc signal intensity index[J]. Spine J, 2025, 25(5): 903-10.
- [8] 刘福水, 金玉立, 谢洪武, 等. 针刀干预对颈椎病兔软骨终板基质金属蛋白酶13、聚集蛋白聚糖、II型胶原的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 3146-50.
- [9] 胡万春, 刘 通, 张畅畅, 等. 针刀疗法适应证及优势病种分析[J]. 天津中医药大学学报, 2025, 44(4): 342-8.
- [10] 刘福水, 方 婷, 洪 滔, 等. 针刀干预对颈椎病兔颈后伸肌细胞PI3K/Akt信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(2): 918-22.
- [11] 李沅骋, 李开平, 宋子琪, 等. 针刀疗法对兔退变颈椎间盘组织中p38MAPK蛋白与IL-1表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 250-4, 296-298.
- [12] 余家阔, 吴毅文, 戴先进, 等. 颈椎病生物力学发病机制实验研究[J]. 安徽医科大学学报, 1990, 25(1): 47-51.
- [13] 郭长青, 刘福水, 马惠芳, 等. 针刀干预对颈椎病兔颈肌细胞凋亡的影响[J]. 针刺研究, 2014, 39(1): 68-72.
- [14] 游建宇, 刘福水, 陈明人. 基于筋骨理论探讨针刀在颈椎病防治中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(2): 753-5.
- [15] 张怡瑾, 李 辉, 陈子颖, 等. 基于“筋出槽, 骨错缝”病机探析推拿治疗颈椎病的调衡作用[J]. 中医杂志, 2025, 66(13): 1326.
- [16] 陈 斌, 刘 洪, 张良志, 等. 可视化针刀抑制髓核细胞凋亡从而改善颈椎病兔的椎间盘退变[J]. 针刺研究, 2022, 47(11): 1005-11.
- [17] 李浩林, 陈 平, 王海东, 等. 基于PI3K/AKT/NFATc1通路探讨针刀疏筋解结抑制类风湿关节炎大鼠骨破坏的作用及机制[J]. 针刺研究, 2025, 50(2): 131-40.
- [18] 贾小飞, 冉 丽, 马小双, 等. 针刀调控软骨细胞自噬维持骨关节炎软骨细胞的稳态[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(34): 5452-7.
- [19] Zhang GZ, Li L, Yang ZL, et al. TMT-based proteomics analysis of senescent nucleus pulposus from patients with intervertebral disc degeneration[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13236.
- [20] Peng FS, Sun MT, Jing XZ, et al. Piezo1 promotes intervertebral disc degeneration through the Ca²⁺/F-actin/Yap signaling axis[J]. Mol Med, 2025, 31(1): 90.
- [21] 胡斌涵, 陈 灿, 黄茂畅, 等. 超声引导针刀松解椎间孔内口对兔软骨终板基质稳态的影响[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(18): 3758-66.
- [22] 邵欣欣, 李鑫茹, 潘丽婕, 等. 基于Piezo1/p38MAPK/ERK5力敏感通路探讨针刀干预膝关节骨关节炎兔膝关节软骨退化的作用机制[J/OL]. 中国针灸, 2025: 1-15. doi/10.13703/j.0255-2930.20241023-k0004.
- [23] Yang QH, Feng JF, Xu HY, et al. TRIM29 alleviates intervertebral disc degeneration through the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 24797.
- [24] Li HZ, Zhang JL, Yuan DL, et al. Role of signaling pathways in age-related orthopedic diseases: focus on the fibroblast growth factor family[J]. Mil Med Res, 2024, 11(1): 40.
- [25] Chen TQ, Peng Y, Hu WJ, et al. Irisin enhances chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells via Rap1/PI3K/AKT axis[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 392.
- [26] Wen ZH, Li SY, Liu Y, et al. An engineered M2 macrophage-derived exosomes-loaded electrospun biomimetic periosteum promotes cell recruitment, immunoregulation, and angiogenesis in bone regeneration[J]. Bioact Mater, 2025, 50: 95-115.
- [27] Wei YL, Jin ZF, Zhang H, et al. The transient receptor potential channel, vanilloid 5, induces chondrocyte apoptosis via Ca²⁺ CaMKII-dependent MAPK and Akt/mTOR pathways in a rat osteoarthritis model[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(5): 2309-23.
- [28] Yao XD, Zhang JM, Jing XZ, et al. Fibroblast growth factor 18 exerts anti-osteoarthritic effects through PI3K-AKT signaling and mitochondrial fusion and fission[J]. Pharmacol Res, 2019, 139: 314-24.
- [29] Sun KQ, Sun JY, Yan C, et al. Sympathetic neurotransmitter, VIP, delays intervertebral disc degeneration via FGF18/FGFR2-mediated activation of Akt signaling pathway[J]. Adv Biol (Weinh), 2024, 8(3): e2300250.
- [30] Ng JQ, Jafarov TH, Little CB, et al. Loss of Greml1-lineage chondrogenic progenitor cells causes osteoarthritis[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 6909.
- [31] Chen MY, Lu Y, Liu YH, et al. Injectable microgels with hybrid exosomes of chondrocyte-targeted FGF18 gene-editing and self-renewable lubrication for osteoarthritis therapy[J]. Adv Mater, 2024, 36(16): e2312559.
- [32] Kong KY, Li BX, Chang YY, et al. Delivery of FGF18 using mRNA-LNP protects the cartilage against degeneration via alleviating chondrocyte senescence[J]. J Nanobiotechnology, 2025, 23(1): 34.

(编辑:郎 朗)