

本文引用: 向静, 江姗姗, 唐红, 汪红娟, 李展富, 王瑶, 谢灿明, 田浩梅, 陈楚淘. 针刺调控脑缺血再灌注损伤大鼠海马区环状RNA\_009775表达的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1838-1845.

## 针刺调控脑缺血再灌注损伤大鼠海马区环状RNA\_009775表达的研究

向静, 江姗姗, 唐红, 汪红娟, 李展富, 王瑶, 谢灿明, 田浩梅, 陈楚淘\*

湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南长沙 410208

**[摘要]** 目的 研究针刺对脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)大鼠海马区环状RNA\_009775表达的影响,探索针刺对CIRI可能的作用机制。方法 将39只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、针刺组,每组13只。除假手术组外,其余两组均采用线栓法制备CIRI模型。造模后,针刺组大鼠捆绑固定行针刺干预,间隔12 h进行1次,共7次;假手术组与模型组大鼠仅捆绑不针刺。Garcia评分法、TTC染色法评估针刺疗效;基因芯片技术筛选针刺组/模型组/假手术组核心共同差异表达circRNA;qRT-PCR法对芯片筛选结果进行验证;TargetScan软件预测核心circRNA的下游miRNA及mRNA,构建核心circRNA的调控网络,并对mRNA进行基因本体功能富集分析;Western blot法验证神经元核抗原抗体(neuron specific nuclear protein, NEUN)表达量。结果 干预后,与假手术组相比,模型组大鼠Garcia评分、NEUN和circRNA\_009775表达量显著降低( $P<0.01$ ),脑梗死面积比显著升高( $P<0.01$ );与模型组相比,针刺组脑梗死面积比显著降低( $P<0.01$ ),Garcia评分、NEUN和circRNA\_009775表达量显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。芯片筛选核心共同差异表达circRNA,经qRT-PCR验证circRNA\_009775表达趋势与芯片结果一致,结合靶关系预测,构建了含有1个circRNA、12个miRNA、31个mRNA的调控网络。基因本体功能富集分析显示mRNA主要涉及神经系统发育、神经元生成等生物过程。结论 针刺具有改善CIRI大鼠神经功能缺损、降低脑梗死面积、部分减轻海马区神经元损伤的作用,其机制可能与调控circRNA\_009775介导的潜在调控网络、促进神经系统发育、神经元生成等生物过程有关。

**[关键词]** 脑缺血再灌注损伤;针刺;海马区;环状RNA;基因芯片;神经元;督脉

**[中图分类号]**R245.9

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.013

## Acupuncture regulating the expression of circRNA\_009775 in hippocampus of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

XIANG Jing, JIANG Shanshan, TANG Hong, WANG Hongjuan, LI Zhanfu, WANG Yao,

XIE Canming, TIAN Haomei, CHEN Chutao\*

School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of acupuncture on the expression of circRNA\_009775 in hippocampus of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI), and to explore the possible mechanism of action of acupuncture on CIRI. **Methods** A total of 39 SD rats were randomly assigned into sham-operated, model, and acupuncture groups, with 13 rats in each group. Except for the sham-operated group, CIRI model was established using the modified Zea Longa method in the other two groups. After

**[收稿日期]**2023-06-13

**[基金项目]**国家自然科学基金项目(82274662);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30490);长沙市科技局自然科学基金项目(kq2014094);湖南省研究生科研创新项目(2022CX103)。

**[第一作者]**向静,女,硕士研究生,研究方向:针灸推拿临床应用及机制研究。

**[通信作者]**\*陈楚淘,男,博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:314587702@qq.com。

modeling, the rats in acupuncture group were bundled for acupuncture intervention, once every 12 hours, 7 times in total; the rats in sham-operated group and model group were only bundled without acupuncture. Garcia scoring and TTC staining were used to evaluate the efficacy of acupuncture; gene chip microarray analysis was used to screen the core common differentially expressed circRNAs (co-DEcircRNAs) in acupuncture/model and model/sham-operated groups; qRT-PCR was used to validate the microarray results; TargetScan software was applied to predicting the downstream miRNAs and mRNAs of the core co-DEcircRNAs and constructing ceRNA network, and gene ontology function enrichment analysis was performed for the target mRNAs; Western blot was performed to verify the expression level of neuron specific nuclear protein (NeuN). **Results** After the intervention, compared with sham-operated group, the Garcia score and expression levels of NeuN and circRNA\_009775 of rats in model group significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the ratio of cerebral infarction area significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with model group, the ratio of cerebral infarction area of rats in acupuncture group was significantly reduced ( $P<0.01$ ), and the Garcia score and expression levels of NeuN and circRNA\_009775 were significantly elevated ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The core co-DEcircRNAs were screened out by gene chip microarray analysis, and the expression trend of circRNA\_009775 verified by qRT-PCR was consistent with the gene microarray results. Based on the target relation prediction, a ceRNA network containing 1 circRNA, 12 miRNAs, and 31 mRNAs was constructed. Gene ontology functional enrichment analysis showed that the target mRNAs were mainly involved in biological processes such as neurological development and neuron generation. **Conclusion** Acupuncture has the effects of improving neurological deficits, reducing the area of cerebral infarction, and partially alleviating neuronal damage in hippocampus of CIRI rats, the mechanism of which may be related to regulating circRNA\_009775-mediated potential ceRNA network to promote biological processes such as neurological development and neuron generation.

[**Keywords**] cerebral ischemia-reperfusion injury; acupuncture; hippocampus; circRNA; gene chips; neuron; the Du meridian

缺血性脑卒中是因脑动脉阻塞引发脑组织受损或死亡,造成相应功能障碍的一类临床常见疾病。高发病率、高致死率、高致残率是此病的主要特征<sup>[1]</sup>,对家庭及社会造成了沉重的医疗负担。恢复局部血供是治疗缺血性脑卒中最有效的手段,然而过程中存在再灌注引发局部损伤及中枢神经系统功能障碍加重的风险<sup>[2]</sup>。血流的再通导致脑组织功能不可逆损伤的现象,被称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)<sup>[3]</sup>,减轻 CIRI 是缺血性脑卒中整体治疗方案的重要组成部分。针刺对 CIRI 的疗效已逐步被世界范围内的临床及基础研究证实<sup>[4-6]</sup>,其机制与抑制炎症级联反应、减轻过度氧化损伤、调节细胞自噬等方面密切相关<sup>[7]</sup>,但其微观层面的机制仍有待进一步挖掘。

随着新一代测序技术的发展,非编码 RNA 对基因及蛋白质表达水平的关键调控作用引起人们的重视<sup>[8]</sup>。环状 RNA(circularRNA, circRNA)具有区别于其他非编码 RNA 的闭环结构,该结构可抵抗 RNA 外切核酸酶,相较于线性 RNA 更稳定、更难以被降解。此外, circRNA 可充当 miRNA 结合位点的竞争性内源 RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA),间接影响 miRNA 与下游 mRNA 的结合,在调节基因表达中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。最近研究表明,相较于其他

器官, circRNA 在大脑中高度富集<sup>[10]</sup>,可通过介导血管生成、神经炎症、小胶质细胞活化和氧化应激等多种生物学途径,参与中枢神经系统疾病的发生与进展<sup>[11-12]</sup>,提示 circRNA 有望成为治疗 CIRI 的新靶点。本研究拟采用基因芯片检测技术,从 circRNA 角度阐释针刺抗 CIRI 可能的作用机制,为治疗 CIRI 提供新的参考依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物与分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 39 只,体质量(230±20) g,由湖南中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004。所有大鼠饲养于 SPF 级实验动物室,室温 24~26 °C,湿度 40%~60%,通风,实验期间自由摄水、进食,适应性饲养 1 周。依照随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、针刺组,每组 13 只。实验已通过湖南中医药大学实验动物福利和伦理委员会审查,批准编号:LL2022030912。

### 1.2 主要试剂与仪器

8×15 K 规格 circRNAs 芯片(美国 Arraystar 公司,批号:R312-01); circRNA 芯片标记试剂盒(美国 Arraystar 公司,批号:Human CircRNA Array V2); (0.32±0.2) mm 线栓(北京西浓科技有限公司,批号:

2432-100);0.25 mm×13 mm 针灸针(苏州医疗用品厂有限公司,批号:210501);2%TTC 染液、4%多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司,批号:G3005、P1110);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量检测试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G2026)。扫描仪(美国 Agilent 公司,型号:G250-5C);恒温水浴箱(常州金坛恒丰仪器制造有限公司,型号:HH-W600)。

## 2 方法

### 2.1 模型制备

模型组与针刺组采用改良版线栓法<sup>[13]</sup>制备 CIRI 模型。大鼠术前禁食 12 h,2%戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉。以仰卧位固定大鼠于鼠板,局部消毒备皮,取颈正中偏左侧 3 mm 行长约 10 mm 的纵向切口,钝性剥离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)、颈外动脉与迷走神经;将线栓经 CCA 缓送入 ICA 以阻断血流,当线栓黑色标记点处于 CCA 分叉时固定线栓,消毒缝合切口,对留于切口外的线栓进行固定和标记。完成上述操作 2 h 后,将线栓向外抽拉 10 mm,实现缺血侧的再灌注。假手术组不插入线栓,其余操作与上述步骤相同。大鼠清醒后,采用 Longa 5 分制评分法<sup>[13]</sup>对其进行评定,评分 1~3 分者纳入后续实验,并对各组缺失大鼠以相同模型制备方法进行数量补齐。

### 2.2 分组及干预

待所有入组大鼠生命体征平稳(约模型制备后 2 h),对其进行捆绑固定。针刺组取穴参考大鼠穴位图谱<sup>[14]</sup>,选取大椎、百会、水沟穴,大椎直刺 3 mm,百会向后平刺 2 mm,水沟朝鼻中隔方向斜刺 2 mm,行平补平泻捻转手法 1 min,频率为 90 次/min,间隔 15 min 行针 1 次,留针 30 min;假手术组与模型组仅捆绑不针刺。每 12 h 干预 1 次,共 7 次。

### 2.3 神经功能缺损评估

分别于首次干预前、末次干预后,对 3 组大鼠采用改良 Garcia 评分法<sup>[15]</sup>综合评估大鼠健侧、患侧比对运动、感觉及自主活动,总分 18 分,分值愈低则提示神经功能缺损愈重。

### 2.4 TTC 染色法

结束末次 Garcia 评分后,从每组随机选取 5 只大鼠取脑组织,经冷冻 30 min 后制成约 2 mm 厚的

均匀切片,取相邻 5 个冠状脑切片浸泡于 2%TTC 染液的烧杯中,37 °C 恒温水浴箱遮光孵育 30 min,使其染色均匀。完成染色后,将切片放入 4%多聚甲醛固定 24 h,观察脑组织梗死情况,通过 Image J 软件量化脑梗死面积比。

### 2.5 筛选核心共同差异表达 circRNA

从各组余下大鼠中,随机选取 3 只大鼠海马组织,应用 Nano Drop 测定评估所提取 RNA 的纯度和浓度,使用 RNaseR 富集 circRNA;随机引物扩增并转录,样本标记并杂交至微阵列载玻片,经孵育、洗涤、固定后,借助 G2505C 扫描仪扫描分析切片。通过 Feature Extraction 软件提取芯片数据,Gene Spring 软件将数据标准化,参照差异倍数(fold change, FC) >1.25、 $P < 0.05$  的标准,筛出差异表达 circRNA;而后进行韦恩交集分析,选取针刺组/模型组、模型组/假手术组共同差异表达 circRNA (common differentially expressed circRNA, co-DEcircRNA)。

根据基因芯片表达谱及生物信息学分析结果,以  $FC > 1.25$  和基因本体功能富集条目计数前 2 为标准,筛选出核心 co-DEcircRNA。

### 2.6 qRT-PCR 验证

对基因芯片检测后余下样本进行核心 co-DE-circRNA 表达水平验证。实验过程严格按照试剂盒说明操作,选择  $\beta$ -actin 作为内参基因,通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算其表达量,各引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

名称	双向引物序列(5'-3')	引物长度/bp
$\beta$ -actin	正向:5'AGAGGGAATTCGTGCGTGA3'	144
	反向:5'CATTTGCCGATAGTGATGACCT3'	
circ_006893	正向:5'CTGAAACGAACTGAAAGTTTCCT3'	54
	反向:5'GGGAGCCATTCTCTTATTGAAGGA3'	
circ_009775	正向:5'CCTAACTGTCAAAGTGATATCGGG3'	56
	反向:5'CCGATATCACCTTTGACAGTTAGGT3'	

### 2.7 构建 circRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络

使用 TargetScan 结合 miRanda 软件,以 Seq Mirna Coverage > 0.3、CeMirna Coverage > 0.3、 $P < 0.05$  为标准,预测与核心 co-DEcircRNA 可能结合的 miRNA 及其下游靶基因 mRNA,构建 ceRNA 网络,通过 Cytoscape 3.10 软件将网络可视化呈现。

### 2.8 靶基因本体功能富集分析

利用在线数据库 (<http://www.geneontology.org>)

对 circRNA-miRNA-mRNA 网络中的下游靶基因 mRNA 进行本体功能富集分析。

## 2.9 Western blot 法

通过 Western blot 法检测海马区神经元生物标记物神经元核抗原抗体(neuron specific nuclear protein, NEUN)相对表达量。各组余下的5只大鼠海马组织加入蛋白提取液,匀浆及冰浴 30 s/次,组织裂解后取上清液,BCA 蛋白定量检测试剂盒进行目标蛋白定量。将同等浓度的蛋白上样,凝胶电泳使蛋白与样本分离,并转移至 PVDF 膜,而后加一抗 4 ℃ 孵育过夜,次日清洗后加二抗室温下孵育 1 h,使用化学发光检测试剂盒进行可视化。Image J 软件分析各条带灰度值,以 GAPDH 作为参照计算 NEUN 相对表达量。

## 2.10 统计学分析

数据通过 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组内比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析,方差齐者采用 LSD 法,方差不齐者使用 Tamhane's *T2* 法。不符合正态性分布则以“*M(Q)*”进行描述,组内比较使用配对秩和检验,组间比较采用非参数检验。均以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠干预前后 Garcia 评分比较

干预前,与假手术组相比,模型组和针刺组 Garcia 评分明显降低( $P<0.01$ )。干预后,与假手术组相比,模型组评分明显降低( $P<0.01$ );与模型组相比,针刺组评分显著升高( $P<0.01$ )。干预后,针刺组 Garcia 评分较干预前显著升高( $P<0.01$ )。详见表 2。

表 2 各组大鼠干预前后 Garcia 评分比较(分,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	干预前	干预后
假手术组	13	18.00±0.00	18.00±0.00
模型组	13	9.85±1.95**	9.92±1.19**
针刺组	13	11.54±1.66**	13.62±1.50 <sup>###</sup>

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与干预前比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

### 3.2 各组大鼠缺血侧梗死面积比比较

TTC 染色结果如图 1 所示,假手术组未见梗死区域;模型组、针刺组切片均呈现不同程度的梗死区域。通过 Image J 软件与 Swanson 法量化脑梗死面

积比,相较于假手术组,其余两组脑梗死面积比显著升高( $P<0.01$ );相较于模型组,针刺组脑梗死面积比显著降低( $P<0.01$ )。详见表 3。



图 1 各组大鼠脑组织 TTC 染色

注:正常脑组织切片均呈鲜红色,梗死灶呈灰白色。

表 3 各组大鼠缺血侧梗死面积比(% ,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	脑梗死面积比
假手术组	5	0
模型组	5	24.14±4.97**
针刺组	5	15.01±2.50 <sup>###</sup>

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

### 3.3 各组大鼠缺血侧海马组织 circRNA 差异表达谱及差异表达 circRNA 数量

基于基因芯片检测结果,根据  $FC>1.25$ 、 $P<0.05$  的标准筛选组间差异表达 circRNA,差异表达谱详见图 2。模型组与假手术组比较,差异表达 circRNA 为 603 个;针刺组与模型组比较,差异表达 circRNA 为 51 个。模型组/假手术组、针刺组/模型组 co-DEcircRNA 为 23 个,在模型组中上调、针刺组下调的 co-DEcircRNA 为 7 个,在模型组中下调、针刺组上调的 co-DEcircRNA 为 16 个。详见图 3。

### 3.4 核心 co-DEcircRNA 的筛选

以  $P<0.05$ 、 $FC>1.25$  为标准,对 co-DEcircRNA 基因本体功能富集的条目进行计数,经筛选,circ\_009775 确定为核心 co-DEcircRNA。详见表 4。

### 3.5 qRT-PCR 验证核心 co-DEcircRNA 表达水平

与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧海马区 circ\_009775 表达量明显降低( $P<0.01$ );与模型组比较,针刺组 circ\_009775 表达量显著上升( $P<0.01$ )。详见表 5。

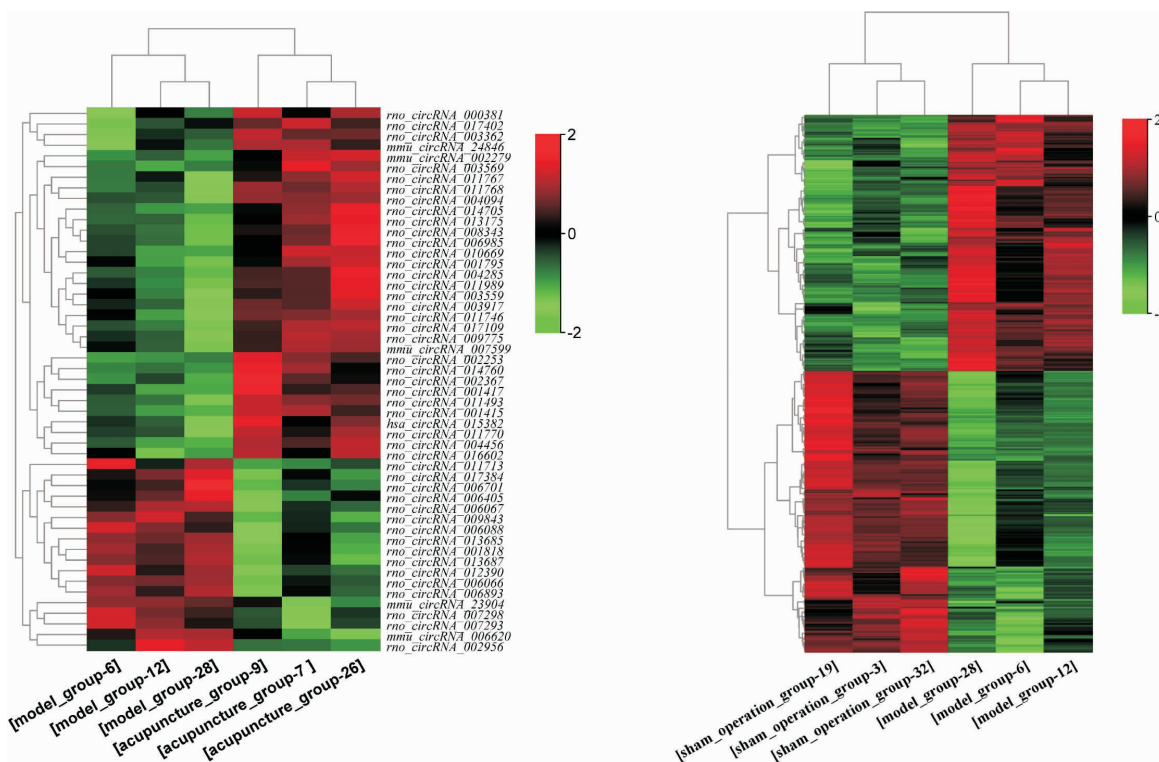


图 2 各组大鼠 circRNA 差异表达谱

注:横坐标为各组样本;纵坐标为差异 circRNA;红色为高表达,绿色为低表达。

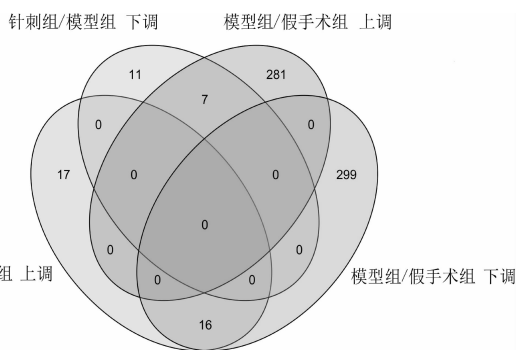


图 3 各组大鼠缺血侧海马组织差异表达 circRNA 韦恩图

注:图中数字表示差异表达 circRNA 数量。

### 3.6 构建 circRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络

采用 TargetScan 与 miRanda 软件,预测与 circ\_009775 可结合的 miRNA 以及下游靶基因 mRNA,使用 Cytoscape 3.10 软件绘制构建了含有 1 个 circRNA、12 个 miRNA、31 个 mRNA 的三元转录网络。详见图 4。

### 3.7 靶基因 GO 功能富集分析

以  $P < 0.05$  为标准,对 31 个靶基因进行 GO 功能富集分析,发现富集的生物进程主要为神经系统发育、神经元生成等;细胞成分主要为细胞质、细胞器、突触等;分子功能主要为蛋白质结合、微管结合、酶结合等。详见图 5。

### 3.8 各组大鼠缺血侧海马区 NEUN 表达比较

与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧海马组织 NEUN 表达水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,针刺组 NEUN 表达水平上调( $P < 0.05$ )。详见表 6、图 6。

## 4 讨论

在全球范围内,缺血性脑卒中占比脑卒中发病率的 87%左右<sup>[1]</sup>,CIRI 通常继发于缺血性脑卒中,是引起脑组织损伤与功能障碍进一步恶化的关键环节。尽管药物与介入治疗取得了一定成效,但仍存在治疗窗口狭窄、增加出血风险性等局限性<sup>[16-17]</sup>。这促使我们深入了解 CIRI 的发生发展机制,寻找有效、安全的治疗策略。中医学将 CIRI 归于“中风”范畴,多因风、火、痰、瘀等病邪上扰清窍,导致脑络痹阻、神失其用,病位在脑。针刺作为治疗“中风”的主要手段之一,已有数千年历史。“病变在脑,首取督脉”,脑为元神之府,督脉入络脑,大椎、百会、水沟皆属督脉,三穴合用可调神导气以醒脑开窍,是治疗缺血性脑卒中的常用腧穴<sup>[18]</sup>。课题组前期研究表明,针刺大椎、百会、水沟穴可缓减神经元超微结构的病理改变,促进神经元的修复,激活血管内皮生长因子,诱导血管新生,从而在一定程度上减轻 CIRI<sup>[19]</sup>。本研

表4 各组大鼠缺血侧海马区 co-DEcircRNAs 情况

组别	circRNA	$P < 0.05$	$FC > 1.25$	富集条目计数/个	
模型组下调	rno_circRNA_009775	0.025 4	1.579 7	97	
针刺组上调	rno_circRNA_011989	0.019 3	1.565 0	46	
	rno_circRNA_003569	0.012 6	1.495 8	55	
	mmu_circRNA_002279	0.022 0	1.459 3	0	
	rno_circRNA_008343	0.023 1	1.458 4	58	
	rno_circRNA_004285	0.013 5	1.421 2	4	
	rno_circRNA_011770	0.028 2	1.404 1	36	
	rno_circRNA_017109	0.007 6	1.359 2	84	
	rno_circRNA_001795	0.035 0	1.357 1	0	
	rno_circRNA_004094	0.010 0	1.346 2	24	
	rno_circRNA_011768	0.005 6	1.336 1	36	
	rno_circRNA_003559	0.047 7	1.327 1	18	
	rno_circRNA_006985	0.040 4	1.325 3	67	
	rno_circRNA_013175	0.026 2	1.317 6	0	
	rno_circRNA_003917	0.026 2	1.287 1	8	
	rno_circRNA_011767	0.029 4	1.250 2	36	
	模型组上调	mmu_circRNA_23904	0.048 9	1.483 8	45
	针刺组下调	mmu_circRNA_006620	0.037 2	1.442 9	27
rno_circRNA_006405		0.047 6	1.395 9	24	
rno_circRNA_012390		0.016 7	1.369 7	0	
rno_circRNA_006701		0.049 5	1.364 3	37	
rno_circRNA_007293		0.029 0	1.329 5	19	
rno_circRNA_006893		0.037 3	1.286 9	118	

表5 各组大鼠缺血侧海马组织 circ\_009775 表达水平的比较[M(Q)]

组别	n	circ_009775
假手术组	5	1.86(7.77)
模型组	5	0.30(0.24)**
针刺组	5	2.40(3.20)##

注:与假手术组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

究结果提示,针刺可改善 CIRI 大鼠 Garcia 神经功能评分、降低缺血侧的脑梗死面积、促进神经元发育,这与先前研究报道一致<sup>[20]</sup>。

近年来研究发现,circRNA 在 CIRI 发生与进展中均有异常表达,常通过 ceRNA 机制途径影响 CIRI 进程<sup>[21]</sup>。CHEN 等<sup>[22]</sup>研究表明,circSHOC2 在体外氧-糖剥夺缺血模型与大脑中动脉闭塞小鼠模型中的过表达,可通过海绵 miR-7670-3p 促进去乙酰化酶 1 的表达,进而减轻缺血诱导的神经元凋亡。此外,BAI 等<sup>[23]</sup>通过基础与临床研究发现,circDLGAP4 作为内源性 miR-143 海绵抑制其活性,调节 HECT-E3 型泛素连接酶的表达水平,以减轻 CIRI 对血脑屏障的损伤。本研究中,通过芯片检测技术发现 3 组大

鼠海马区 circRNA 表达的改变,其中 23 个 circRNA 共同在模型组/假手术组、针刺组/模型组中发生了改变,提示针刺对 CIRI 的治疗机制可能与这类基因的表达变化相关。而后 qRT-PCR 法对筛选出的核心 co-DEcircRNA 验证结果显示,circ\_009775 的表达趋势与芯片结果一致,提示针刺对 circ\_009775 的上调涉及抗 CIRI 过程,是可能的治疗靶点之一。为明确 circ\_009775 潜在的分子调控机制,本研究预测并构建了 circRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络,对下游 mRNA 的 GO 功能富集结果显示其与神经系统发育、神经元生成等生物进程密切相关。良好的神经元发育是 CIRI 后神经功能恢复的必要条件,本研究中对神经元生物标记物的检测显示,针刺组 NEUN 表达水平明显高于模型组,说明针刺具有一定的神经元保护作用,与上述 GO 功能富集分析有一致的部分。

综上所述,本研究从 circRNA 的角度阐释了针刺抗 CIRI 的另一潜在效应机制,可能与激发多种 circRNA 的改变有关,通过介导以 circ\_009775 为中心的 circRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络,调控

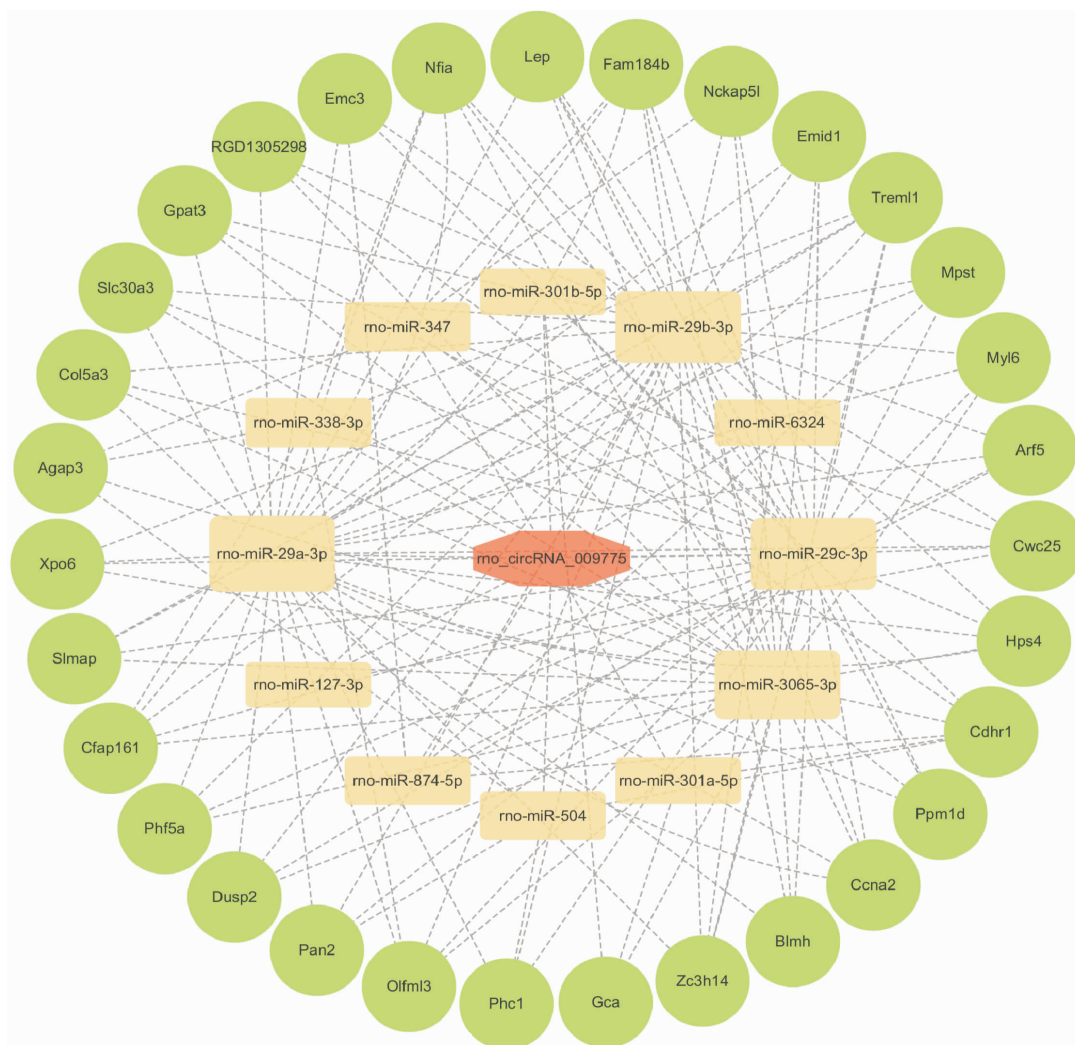


图 4 circRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络

注:红色代表 circRNA;黄色代表 miRNA;绿色代表 mRNA。

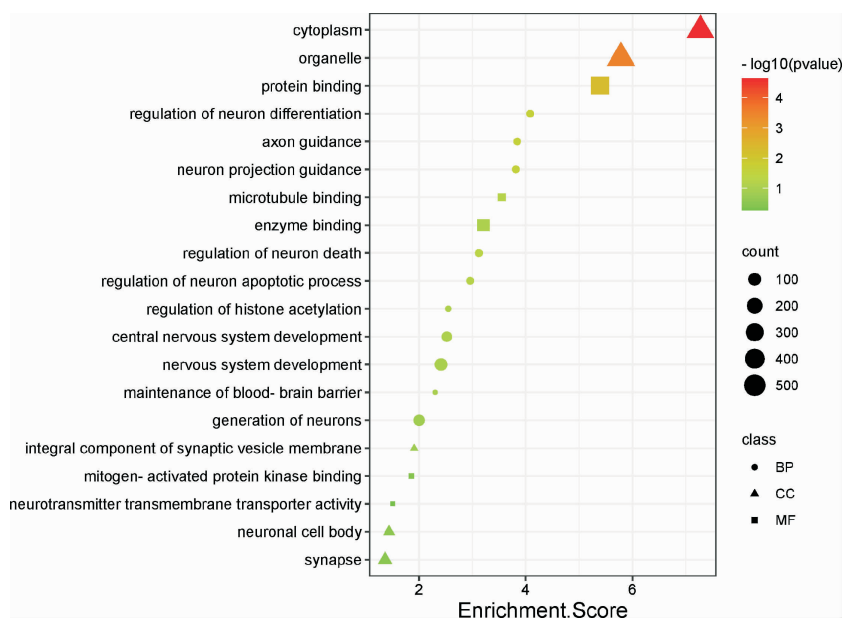


图 5 靶基因 GO 功能富集分析

注:BP.生物进程;CC.细胞成分;MF.分子功能。

表6 各组大鼠缺血侧海马区 NEUN 相对表达量的比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	NEUN/GAPDH
假手术组	5	0.66±0.10
模型组	5	0.31±0.19**
针刺组	5	0.55±0.21 <sup>#</sup>

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

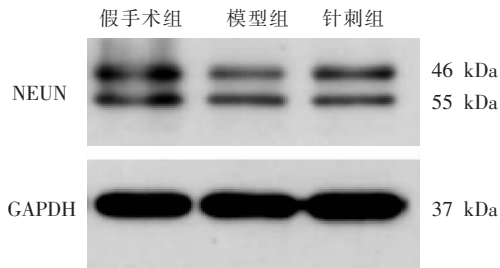


图6 各组大鼠缺血侧海马区 NEUN 蛋白电泳图

神经系统发育、神经元生成过程发挥其治疗效应,从而改善 CIRI 大鼠的神经功能缺损、缩小脑梗死面积、促进 CIRI 海马区的神经元修复,为揭示针刺多靶点、多途径治疗 CIRI 的作用机制提供了理论依据。

## 参考文献

- [1] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics—2022 update: A report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2022, 145(8): e153–e639.
- [2] SIMONSEN C Z, LESLIE-MAZWI T M, THOMALLA G. Which imaging approach should be used for stroke of unknown time of onset?[J]. *Stroke*, 2021, 52(1): 373–380.
- [3] MA Z Q, XIN Z L, DI W C, et al. Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(21): 3989–3998.
- [4] QIN S R, ZHANG Z C, ZHAO Y D, et al. The impact of acupuncture on neuroplasticity after ischemic stroke: A literature review and perspectives[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2022, 16: 817732.
- [5] LI Y B, CUI R Y, FAN F C, et al. The efficacy and safety of ischemic stroke therapies: An umbrella review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 924747.
- [6] XU M M, LI D, ZHANG S H. Acupuncture for acute stroke[J]. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018, 3(3): CD003317.
- [7] 杨 杨, 孙 华. 近 10 年针刺治疗脑缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中国针灸*, 2015, 35(7): 749–752.
- [8] ENCODE PROJECT CONSORTIUM. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome[J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 57–74.
- [9] HENTZE M W, PREISS T. Circular RNAs: Splicing's enigma variations[J]. *The EMBO Journal*, 2013, 32(7): 923–925.
- [10] SIRACUSA C, SABATINO J, LEO I, et al. Circular RNAs in ischemic stroke: Biological role and experimental models[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(2): 214.
- [11] HAN B, ZHANG Y, ZHANG Y H, et al. Novel insight into circular RNA HECTD1 in astrocyte activation via autophagy by targeting MIR142–TIPARP: Implications for cerebral ischemic stroke[J]. *Autophagy*, 2018, 14(7): 1164–1184.
- [12] HUANG R R, ZHANG Y, HAN B, et al. Circular RNA HIPK2 regulates astrocyte activation via cooperation of autophagy and ER stress by targeting MIR124–2HG[J]. *Autophagy*, 2017, 13(10): 1722–1741.
- [13] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.
- [14] 华兴邦, 周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991(1): 1–5.
- [15] 卢小叶, 吕倩忆, 李棋龙, 等. Zea–longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(9): 1356–1360.
- [16] SUN J C, LAM C, CHRISTIE L, et al. Risk factors of hemorrhagic transformation in acute ischaemic stroke: A systematic review and meta-analysis[J]. *Frontiers in Neurology*, 2023, 14: 1079205.
- [17] SAVER J L. Time is brain: Quantified[J]. *Stroke*, 2006, 37(1): 263–266.
- [18] CHAVEZ L M, HUANG S S, MACDONALD I, et al. Mechanisms of acupuncture therapy in ischemic stroke rehabilitation: A literature review of basic studies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(11): 2270.
- [19] 何灏龙, 郑慧娥, 高音来, 等. 针刺加亚低温对 MCAO 大鼠缺血侧海马组织 miRNA 归属通路及 mir–34c–5p 表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(5): 42–47.
- [20] WANG W W, XIE C L, LU L, et al. A systematic review and meta-analysis of Baihui (GV20)-based scalp acupuncture in experimental ischemic stroke[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 3981.
- [21] LIU Z Y, ZHOU Y H, XIA J. CircRNAs: Key molecules in the prevention and treatment of ischemic stroke[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 156: 113845.
- [22] CHEN W H, WANG H, ZHU Z H, et al. Exosome-shuttled circ-SHOC2 from IPASs regulates neuronal autophagy and ameliorates ischemic brain injury via the miR–7670–3p/SIRT1 axis[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2020, 22: 657–672.
- [23] BAI Y, ZHANG Y, HAN B, et al. Circular RNA DLGAP4 ameliorates ischemic stroke outcomes by targeting miR–143 to regulate endothelial–mesenchymal transition associated with blood–brain barrier integrity[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2018, 38(1): 32–50.

(本文编辑 匡静之)