

本文引用:李展富,江姗姗,唐红,汪红娟,田浩梅. 针刺调控脑缺血再灌注损伤大鼠海马区 circRNAs 表达的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(3): 519-527.

针刺调控脑缺血再灌注损伤大鼠海马区 circRNAs 表达的研究

李展富,江姗姗,唐红,汪红娟,田浩梅*
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** 探讨针刺调控脑缺血再灌注损伤大鼠缺血侧海马区 circRNAs 的表达,为针灸临床治疗脑缺血提供一定的实验理论依据。**方法** 24 只健康成年雄性 SD 大鼠随机分为针刺组、模型组、假手术组,每组 8 只。使用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞再灌注模型(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R),针刺组大鼠捆绑后,选取大椎、百会、人中穴进行针刺处理,每隔 15 min 行针 1 次,留针 30 min,每间隔 12 h 进行 1 次,连续进行 7 次;模型组、假手术组只捆绑,不做其余处理。干预前及干预 72 h 后,行 Garcia 神经功能评分;干预 72 h 后,行脑 TTC 染色观察脑梗死面积比,采用 circRNAs 基因芯片检测缺血侧海马区 circRNAs 表达谱。**结果** (1)干预前:与假手术组比较,针刺组、模型组大鼠神经功能缺损评分显著下降($P<0.01$)。干预后:与假手术组比较,针刺组、模型组大鼠神经功能缺损评分显著下降、脑梗死面积比增加($P<0.01$);与模型组比较,针刺组大鼠神经功能缺损评分升高、脑梗死面积比减少($P<0.05$)。(2)circRNA 芯片分析:模型组与假手术组比较,共有 603 个差异基因,其中下调 circRNAs 315 个、上调 circRNAs 288 个;针刺组与模型组比较,共有 51 个差异基因,其中下调 circRNAs 18 个、上调 circRNAs 33 个;共同调控的 circRNAs 有 23 个。模型组与假手术组比较,差异表达 circRNAs 功用表现为神经元间突触、细胞形态改变等方面的改变,通路主要归属于 ErbB 信号通路、MAPK 信号通路、cAMP 信号通路等;针刺组与模型组比较,差异表达 circRNAs 功用表现为神经营养素结合、H3 组蛋白乙酰转移酶复合物、逆行轴突运输等方面的改变,通路主要归属于 MAPK 信号通路、神经营养素信号通路、Hippo 信号通路等。共同调控功用有神经元投射、蛋白质结合、神经系统发育等,共同调控的信号通路有 MAPK 信号通路。**结论** 针刺大椎、百会、人中穴能改善脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损评分,减少脑梗死面积比,其机制可能与调控多个 circRNAs 表达、激活多种功用和多条信号通路有关。

[关键词] 针刺;脑缺血再灌注损伤;circRNAs;大椎;百会;人中

[中图分类号]R245 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.03.021

Effects of acupuncture on circRNAs expression in hippocampus of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

LI Zhanfu, JIANG Shanshan, TANG Hong, WANG Hongjuan, TIAN Haomei*

College of Acupuncture & Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To explore the regulation of acupuncture on the expression of circRNAs in the ischemic hippocampus of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury, so as to provide experimental theoretical basis for the treatment of cerebral ischemia with acupuncture. **Methods** Twenty four healthy adult male SD rats were randomized into acupuncture group, model group and sham-operated group, with 8 rats in each group. The middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model of rats was

[收稿日期]2022-07-18

[基金项目]国家自然科学基金项目(81874508);国家自然科学基金项目(82274662);长沙市科技局自然科学基金项目(kq2014094);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30490)。

[第一作者]李展富,男,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]*田浩梅,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:451358104@qq.com。

established by thread embolism. After the rats in the acupuncture group were bound, the points of Dazhui (GV14), Baihui (GV20) and Renzhong (GV26) were selected for acupuncture. The needles were manipulated every 15 min and were retained for 30 min. The treatment was performed every 12 h, 7 times in a row. The model group and the sham-operated group were only bound without any treatment. The neurological function was assessed by Garcia score before and 72 h after intervention. At 72 h after intervention, the area ratio of cerebral infarction was observed by TTC staining, and the expression profile of circRNAs in the ischemic hippocampus was detected by circRNAs gene chip. **Results** (1) Before intervention: Compared with the sham-operated group, the score of neurological function impairment in the acupuncture group and the model group dropped significantly ($P<0.01$). After intervention: Compared with sham-operated group, the score of neurological function impairment in the acupuncture group and the model group decreased significantly, whereas the area ratio of cerebral infarction increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the score of neurological function impairment in the acupuncture group went up while the area ratio of cerebral infarction went down ($P<0.05$). (2) CircRNA chip analysis: Compared with the sham-operated group, there were 603 differential genes in the model group, including 315 down-regulated circRNAs and 288 up-regulated circRNAs. Compared with the model group, there were 51 differential genes in the acupuncture group, including 18 down-regulated circRNAs and 33 up-regulated circRNAs. There were 23 circRNAs under co-regulation. Compared with the sham-operated group, the function of the differentially expressed circRNAs showed changes in synapses between neurons and cell morphology, which were mainly attributed to ErbB signaling pathway, MAPK signaling pathway, cAMP signaling pathway, etc. Compared with the model group, the function of the differentially expressed circRNAs in the acupuncture group showed changes in neurotrophin binding, H3 histone acetyltransferase complex, and retrograde axonal transport, which were mainly involved in MAPK signaling pathway, neurotrophin signaling pathway, Hippo signaling pathway, etc. The functions of co-regulation include neuron projection, protein binding, nervous system development, etc. The signaling pathway of co-regulation includes MAPK signaling pathway. **Conclusion** Acupuncture at Dazhui (GV14), Baihui (GV20) and Renzhong (GV26) can improve the score of neurological function impairment and reduce the area ratio of cerebral infarction in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. The mechanism may be related to regulating the expression of multiple circRNAs, activating multiple functions and multiple signaling pathways.

[**Keywords**] acupuncture; cerebral ischemia-reperfusion injury; circRNAs; Dazhui (GV14); Baihui (GV20); Renzhong (GV26)

脑卒中是临床最常见的脑血管疾病之一^[1],具有高发病率、高死亡率、高致残率等特点^[2]。在我国,缺血性脑卒中占比高达 70%左右^[3]。目前,在时间窗内使用药物进行静脉溶栓,重新恢复大脑血流循环,是临床上治疗缺血性脑卒中的有效手段^[4]。但血液的再灌注,可导致大脑发生更严重的病理损害,此即脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)^[5]。

有研究表明,环状 RNA (circular RNAs, circRNAs) 在哺乳动物的脑中高度富集,且在神经元分化、神经细胞修复、脑血管内皮细胞损伤等过程中扮演重要角色,有望成为 CIRI 研究与治疗的重要方向^[6]。有研究发现,在慢性低灌注脑缺血大鼠模型中共检测出 4109 个 circRNAs,其中包括 1 个上调及 18 个下调的 circRNAs,表明 circRNAs 在低氧低灌注脑缺血大鼠模型中发挥了一定作用^[7];还有研究发现, circRNAs 通过激活相关信号通路对 CIRI 产生作用,可见 CIRI 损伤是一个多种 circRNAs 参与的过程^[8]。circRNAs 基因芯片技术具有高通量、快速、

低误差、用途广泛等特点,是一项广泛应用于基因组功能研究的技术,可以全面、整体地反映 CIRI 后 circRNAs 整体变化情况。

近年来,针灸对 CIRI 的治疗也逐渐被肯定,在改善脑血液循环^[9]、抗细胞凋亡^[10]、减轻炎症反应^[11]、清除自由基^[12]等方面,均有深入研究。针刺能否通过调控 circRNAs 来影响 CIRI 的研究报道尚不多。课题组前期研究证明,针刺治疗与依达拉奉对 CIRI 大鼠效应相当,均能明显降低神经功能缺损评分,减少脑梗死面积^[13]。本研究以针刺调控 circRNA 抗 CIRI 为着眼点,探讨针刺调控 CIRI 相关的 circRNAs 的表达及其功用、通路,为 CIRI 的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 24 只,体质量 200~230 g,由湖南中医药大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(湘)2020-0004。正常饲养于 SPF 级实验

动物房,自由摄食饮水,温度 22~26 ℃,湿度 40%~60%。本实验所有动物实验均经湖南中医药大学实验伦理委员会批准(编号:LL2022030912)。

1.2 动物分组

24 只实验大鼠适应性喂养 7 d 后,采用随机数字表法分为针刺组(8 只)、模型组(8 只)、假手术组(8 只)。课题组预实验死亡率约为 25%,造模后,如果动物死亡导致大鼠数量不足,则补齐对应的实验大鼠。

1.3 主要试剂及仪器

2,3,5-苯氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 溶液(美国 Sigma 公司,批号:G3004); 4%多聚甲醛溶液(中国医药集团有限公司,货号:10010061);circRNA 芯片标记试剂盒(美国 Arraystar 公司,货号:Human circRNA Array V2);规格 8×15 K circRNAs 芯片(美国 Arraystar 公司,批号:R312-01);0.32±0.2 mm MCAO 线栓(北京西浓科技有限公司,货号:2432-100);0.25 mm×13 mm 无菌毫针(苏州天一针器械有限公司,批号:210501);安捷伦 G2505C 扫描仪(美国 Agilent 公司,型号:G250-5C);立体定位仪(成都泰盟科技有限公司,型号:DW-5)水浴箱(常州金坛恒丰仪器制造有限公司,型号:HH-W600)。

1.4 模型制备及评定标准

采用线栓法^[14]并改良^[15]大鼠大脑中动脉栓塞模型(middle cerebral artery occlusion/reper-fusion, MCAO/R)。造模前 24 h 停止喂食,仅喂水。造模大鼠腹腔注射麻醉剂,待麻醉后,在颈部备皮、消毒,沿颈正中作一条约 10 mm 纵行切口,分离出颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(inner carotid artery, ICA)和颈外动脉(extra carotid artery, ECA),在近心端处结扎 CCA 和 ECA,沿 CCA 结扎处上方剪一小口,从切口处缓缓插入并微有阻力时停止(线栓黑色标记约在分叉口处),永久性结扎右侧 ICA,青霉素消毒后缝合,且标记线栓。于缺血后 2 h,取出栓线约 10 mm^[16],从而制备出 CIRI 模型。假手术组仅分离血管,青霉素消毒后缝合。待大鼠生命体征平稳后采用 Zea Longa 评分法评定^[17],1~3 分者入选实验。

1.5 干预方法

大鼠生命体征稳定后(约再灌注后 2 h),进行各组干预。针刺组选取大椎、百会、人中穴(穴位取穴参考《实验动物图谱》^[18]《实验针灸学》^[19])。每隔

15 min 行针 1 次,留针 30 min,每间隔 12 h 进行 1 次,连续进行 7 次。模型组和假手术组不针刺,仅捆绑 30 min,每隔 12 h 进行 1 次,连续进行 7 次。

1.6 指标检测及方法

1.6.1 神经功能缺损评分 采用 Garcia 评分法^[20]分别在治疗前和治疗 72 h 后对各组进行评分,评分内容包括:自主运动、体态对称性、前肢伸展运动、抓持和攀爬能力、两侧身体触觉反射、两侧胡须触碰反应。总分 18 分,得分越低,表示神经功能缺损越严重。

1.6.2 脑梗死面积比 干预 72 h 后,大鼠经麻醉,迅速断头后取脑,放入低温冰箱冷冻 20 min,去除嗅球、小脑和低位脑干,沿冠状位连续切成等分 5 片,每片厚度约 2 mm,放置于 2% TTC 溶液烧杯中,并放入 37 ℃恒温水浴箱中充分反应 10~15 min,注意避光,每隔 5 min 翻转 1 次脑切片以便充分反应。染色结束后,将脑切片放入 4%多聚甲醛溶液固定 24 h,用数码相机拍摄完整清晰图案并上传电脑,使用图像分析软件 Image-Pro Plus(6.0 版本)测定脑梗死面积百分比(IS),计算公式参考 Swanson 法^[21],即 $IS = (S1 - Sr) / 2S1 \times 100\%$ (S1:健侧总面积, Sr:患侧非梗死区面积)。

1.6.3 circRNAs 基因芯片检测 干预 72 h 后,大鼠经麻醉,迅速断头取脑,然后于冰袋上分离出患侧海马组织,用 ND-1000 纳米滴定法对每个样本的总 RNA 数进行定量, RNA 的完整性则通过变性琼脂糖凝胶上电泳评估、样本标记和阵列杂交,制备成 circRNAs 基因表达芯片,最后使用扫描仪扫描图像并分析数据。

1.6.4 差异基因分析方法 使用 Agilent Feature Extraction 软件对获得的阵列图像进行分析。使用 R 软件 limma 软件包进行分位数归一化等数据处理,以 $P < 0.05$ 和 $|\log_2 FCI| \geq 1.25$ 为标准。通过火山图筛选,确定两组间差异表达有统计学意义的 circRNAs;通过折叠变化筛选来识别两个样本之间差异表达的 circRNAs;采用层次聚类的方法显示样本间可区分的 circRNAs 表达模式。

1.6.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析。所有数据进行正态性检验,服从正态性检验的计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,若方差齐者采用单因素方差分析;不满足正态性则采用非参数检验。均以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分

干预前:与假手术组比,针刺组、模型组神经功能缺损评分下降($P < 0.01$);针刺组、模型组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。干预后:与假手术组比,针刺组、模型组大鼠神经功能缺损评分下降($P < 0.01$);与模型组比,针刺组大鼠神经功能缺损评分上升($P < 0.05$)。组内比较:假手术组、模型组大鼠干预前后神经功能缺损评分差异无统计学意义($P > 0.05$);针刺组大鼠干预后较干预前神经功能缺损评分上升($P < 0.05$)。详见图 1。

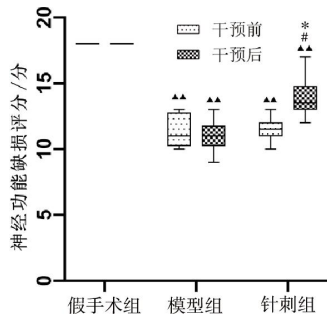


图 1 各组大鼠神经功能缺损评分比较[M(Q), n=8]

注:与假手术组比较,▲▲ $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$;与干预前比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠脑梗死面积比较

假手术组未观察到缺血梗死灶。与假手术组对比,针刺组、模型组均观察到大小不等的缺血梗死灶($P < 0.01$);与模型组对比,针刺组的缺血梗死灶面积比明显减少($P < 0.05$)。详见图 2—3。

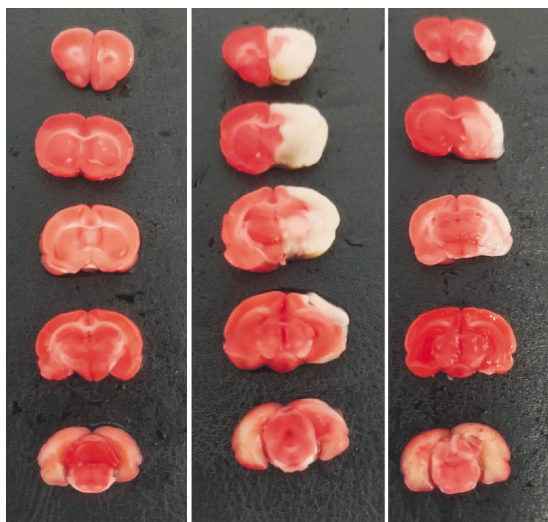


图 2 各组大鼠梗死面积(TTC 染色)

注:红色部分为正常大脑组织,白色区域为缺血梗死灶。

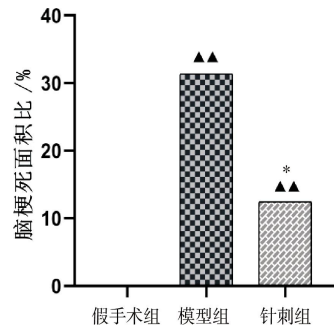


图 3 各组大鼠脑梗死面积比($\bar{x} \pm s$, n=8)

注:与假手术组对比,▲▲ $P < 0.01$;与模型组对比,* $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠缺血侧组织 circRNAs 差异表达

模型组与假手术组比较,共有 603 个差异基因,其中下调 circRNAs 315 个、上调 circRNAs 288 个;针刺组与模型组比较,共有 51 个差异基因,其中下调 circRNAs 18 个、上调 circRNAs 33 个。共同调控的 circRNAs 有 23 个。详见图 4—6。

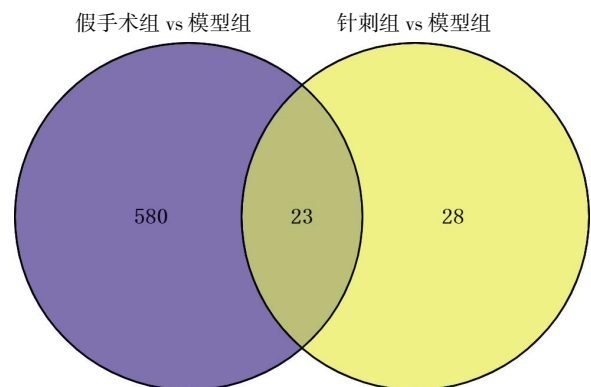


图 4 共同调控 circRNAs 韦恩图

2.4 各组大鼠缺血侧海马组织差异表达 circRNAs 功用分析

根据差异表达 circRNAs 的分子功能(molecular function, MF)、细胞成分(cellular component, CC)、生物过程(biological process, BP)这 3 种 GO_Function 上的差异基因的富集情况,绘制出 GO 富集分析结果的柱状图,详见图 7。依据注释到这 3 种功用层面上的富集倍数(Fold Enrichment),对 Top10 的 GO_Term 由低到高进行排列。纵轴上的 Fold Enrichment 代表实际富集概率/随机富集概率, Fold Enrichment 越大,代表 GO 的富集程度越高。横轴是 GO_Term,是对 GO 途径的注释。

由图 7 可知,模型组与假手术组差异表达 circRNAs 在 MF 层面主要富集于细胞黏附分子结合、磷酸转移酶活性、小 GTPase 结合、激酶活性等;在 CC 层面主要富集于突触前膜、谷氨酸能突触、神经元间

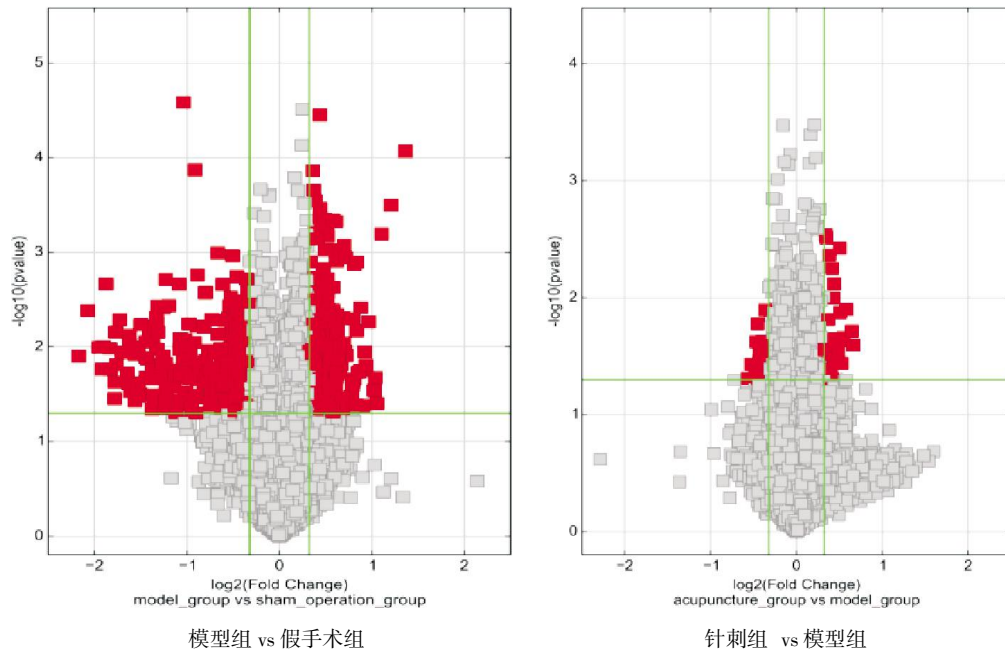


图5 差异表达 circRNAs 火山图

注:红色点表示表达差异有统计学意义的 circRNAs。

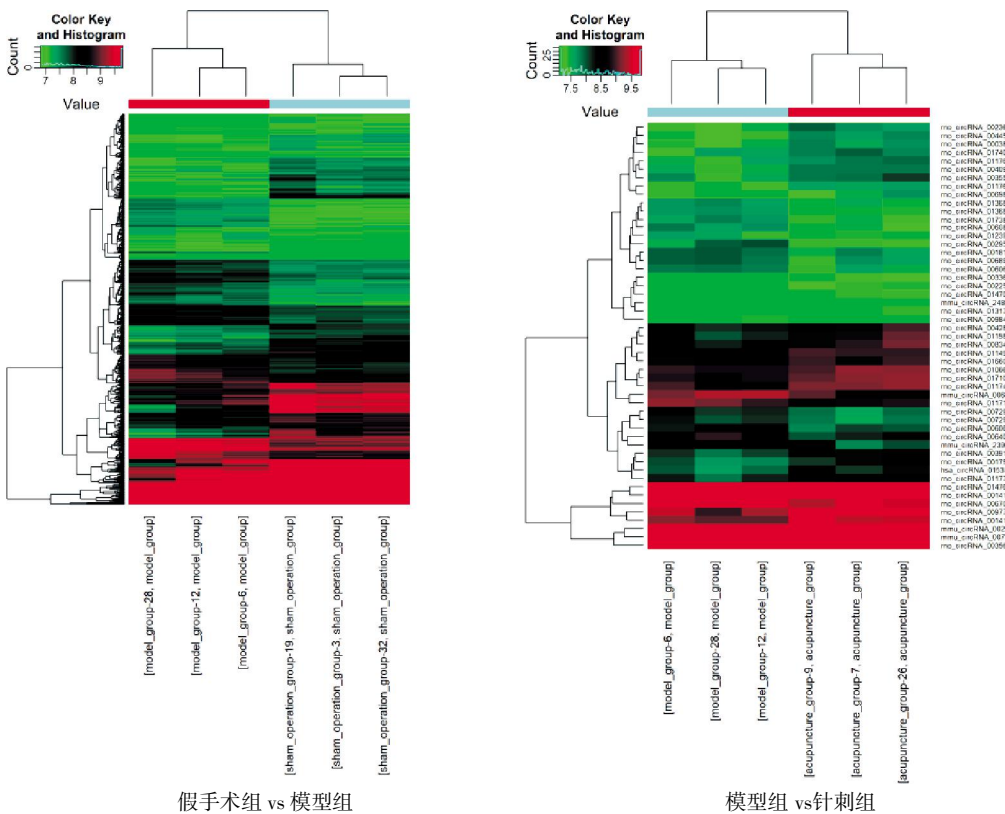


图6 差异表达 circRNAs 热图

注:横轴代表样本,纵轴为筛选出的差异表达基因,红色区域表示高表达基因,绿色区域表示低表达基因。

突触、突触后致密蛋白等;在 BP 层面主要富集于突触组织、细胞连接组织、细胞形态改变、囊泡运输等。由图 8 可知,针刺组与假手术组差异表达 circRNAs 在 MF 层面主要富集于微管末端结合、突触后特化结构、神经营养素结合、wnt 活化受体等;在 CC 层面

主要富集于微管末端结合、微管末端、H3 组蛋白乙酰转移酶复合物、细胞器膜接触位点等;在 BP 层面主要富集于逆行轴突运输、微管解聚、视网膜形态发生、甾醇转运等。共同调控的 GO 分析在 MF 层面主要富集于蛋白结合、蛋白特异结合、激酶结合;在

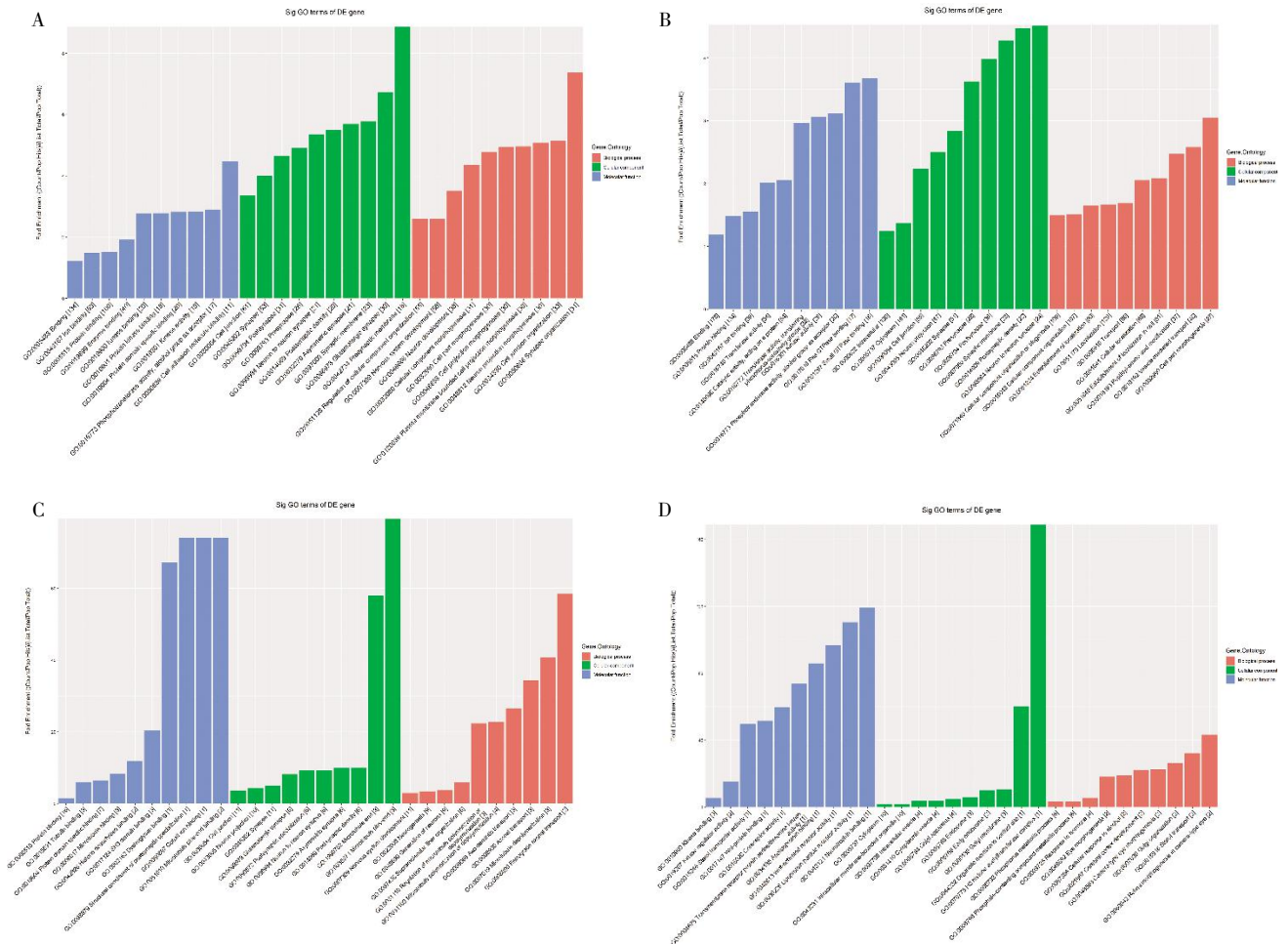


图 7 差异表达 circRNAs 功用富集分析

注:图 Avs 图 B 为模型组 vs 假手术组差异表达 circRNAs 功用富集分析,图 Cvs 图 D 为针刺组 vs 模型组差异表达 circRNAs 功用富集分析;图 A、C 为上调差异表达 circRNAs 功用富集分析,图 B、D 为下调差异表达 circRNAs 功用富集分析。

CC 层面主要富集于细胞连接、神经元投射、神经元间突触等;在 BP 层面主要富集于神经系统发育。

2.5 各组大鼠缺血侧海马组织差异表达 circRNAs 信号通路分析

模型组与假手术组比较:上调的差异表达 circRNAs 主要富集于轴突导向信号通路、ErbB 信号通路、磷脂酶 D 信号通路、MAPK 信号通路等;下调的差异表达 circRNAs 主要富集于 cAMP 信号通路、ErbB 信号通路、B 细胞受体信号通路等。针刺组与模型组比较:上调的差异表达 circRNAs 主要富集于神经营养素信号通路、Hippo 信号通路等;下调的差异表达 circRNAs 主要富集于 MAPK 信号通路;共同调控的信号通路为 MAPK 信号通路。详见图 8。

3 讨论

缺血性脑卒中血流循环恢复后导致的 CIRI 属于中医学“中风”范畴。现代研究表明,针灸对于“中

风”患者,可以调节其脑血循环,降低炎症反应,改善神经功能缺损症状^[9]。课题组前期研究发现,针刺大椎、百会、人中穴,可有效改善 MCAO 大鼠神经功能缺损症状,改善细胞超微结构,改善缺血脑血流量,从而减少脑梗死面积,恢复神经功能^[15,22-24]。大椎、百会、人中穴均属督脉,督脉络于脑,《灵枢·邪气脏腑病形》曰:“病变在脑,首取督脉”,当“脑脉闭阻”引起“脑髓损伤”时,多取督脉穴^[25]。大椎穴为“三阳督脉之会”,为全身交会经脉最多的一个交会穴;百会穴位于头部巅顶,又称三阳五会,为百脉聚会处;人中穴为督脉和手足阳明经的交会穴,为一身阳脉之纲领,督任二脉气血相通。故针刺大椎、百会、人中穴可有效改善 CIRI 而起到脑保护作用。

circRNAs 在人类大脑中高度丰富,与 CIRI 关系密切^[26]。研究发现,circRNAs 不仅在大脑神经元分化过程中表现上调,还参与了脑微血管内皮细胞损伤过程,同时,还通过其他信号通路参与了细胞凋亡过

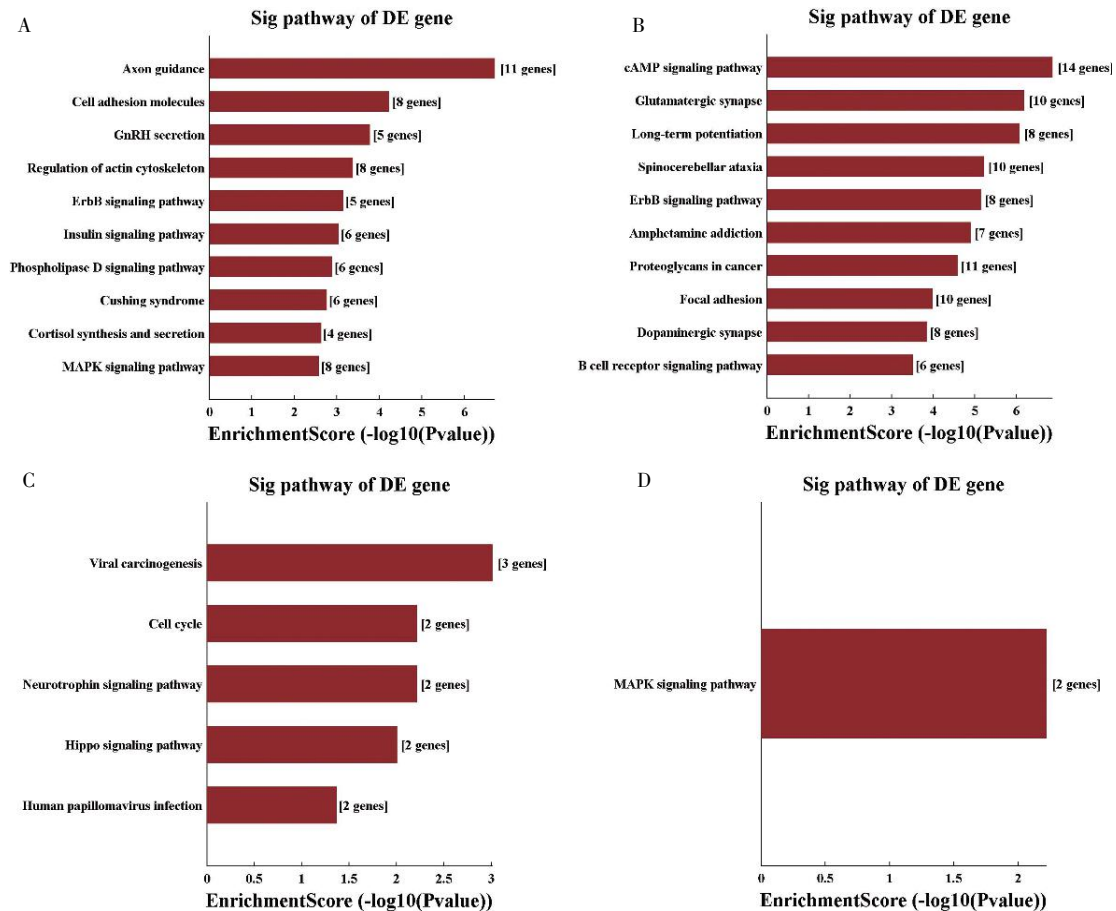


图8 差异表达 circRNAs 通路分析

注: 图 A、B 为模型组 vs 假手术组差异表达 circRNAs 通路分析, 图 C、D 为针刺组 vs 模型组差异表达 circRNAs 通路分析; 图 A、C 为上调差异表达 circRNAs 通路分析, 图 B、D 为下调差异表达 circRNAs 通路分析。

程^[27]。如 WU 等^[28]研究发现,局灶性 CIRI 小鼠的脑内, circTLK1 水平显著上升,参与诱导 ADP 核糖聚合酶途径加重了 CIRI,敲除了 circTLK1 后,神经功能缺损则显著减少。LIU 等^[29]也在大鼠脑微血管内皮细胞的氧糖剥夺/富氧模型中,成功验证了 8 个差异表达最明显的 circRNAs。circRNAs 在 CIRI 过程参与范围广、程度深,但针灸对与 circRNAs 的研究还处于初始阶段,有部分研究者已经关注到针刺对一些疾病 circRNAs 的调控作用,如: 针灸在治疗不孕过程中调控相关 circRNAs 的表达^[30]; 针灸在抑制吗啡成瘾过程中,调控相关 circRNAs 以发挥针灸机制效应等^[31]。

circRNAs 芯片技术具有高通量、快速、低误差、用途广泛等特点,主要应用于疾病分子生物学、实验检测等。组织芯片可以用来在蛋白水平检测相应靶, RNA 芯片则可以在 RNA 水平筛选相应的靶,并且可以与临床信息相结合,从而实现基因及其表达产物水平与预后相结合的目的,因此,基因芯片技

术被广泛应用于疾病的病理机制研究中^[32]。有研究发现,基因芯片技术分析能够提示多种 circRNAs 的表达变化与食管鳞癌的发生发展相关,其利用高通量的基因芯片技术和生物信息学分析从食管鳞癌与附近组织间筛选了大量差异表达的 circRNAs^[33]。

本研究大鼠造模后,出现明显神经功能缺损表现, TTC 染色也证明了大鼠 MCAO/R 模型造模成功。干预过程中,针刺组能减轻大鼠神经功能缺损症状,减少脑梗死面积,说明针刺有效。假手术组与模型组对比,共有 603 个差异表达 circRNAs,其中下调 circRNAs 288 个、上调 circRNAs 315 个; 针刺组与模型组对比,共有 315 个差异表达 circRNAs,其中下调 circRNAs 33 个、上调 circRNAs 18 个; 共同调控的 circRNAs 有 23 个。上述结果提示,针刺、大椎、百会、人中穴能调控脑缺血再灌注损伤后多种 circRNAs 表达。

对本实验差异表达 circRNAs 功用分析发现,大鼠造模成功后,与假手术组比较,差异表达 circR-

NAs 主要功用富集于神经元投射、小 GTPase 结合、激酶活性、突触前膜、神经元间突触、突触后致密蛋白、突触组织、细胞连接组织等。有研究发现,在缺血性脑损伤疾病中,新生神经元可以分化成熟并与原有神经建立新的突触联系,新生的神经元能够形成长投射到皮质及纹状体^[34]。在对 MCAO/R 大鼠进行针刺干预后,与未进行干预的模型组比较,差异表达 circRNAs 的主要功用发生了改变,主要富集于神经元投射、微管末端结合、突触后特化结构、神经营养素结合、逆行轴突运输等。在相关研究中,进行针刺干预后,在慢性缺血缺氧性脑损伤中,脑缺血诱导的新生神经元可以长时间存活并投射到相关区域,促进神经元的发育,减轻脑缺血引起的脑损伤^[35]。由此可见,在大鼠脑缺血损伤过程中,大脑神经元投射功能被抑制,在针刺干预 MCAO/R 大鼠后,调控了相关 circRNAs,促进了神经元投射的发生。由此说明,针刺确实可以通过调控相关 circRNAs 的功用,逆转导致病变的功用,以达到缓解脑缺血损伤的功能。除神经元投射外,共同调控的差异表达 circRNAs 功用分析还包括蛋白结合、蛋白特异结合、激酶结合、细胞连接、神经元间突触、神经系统发育等。

对本实验中差异表达 circRNAs 进行信号通路分析后发现,大鼠造模成功后,与假手术组比较,差异表达基因主要富集于丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、轴突导向信号通路、ErbB 信号通路、磷脂酶 D 信号通路、cAMP 信号通路、ErbB 信号通路、B 细胞受体信号通路等。在相关研究中发现,在 CIRI 小鼠造模成功后,大脑缺血侧海马区 MAPK 阳性细胞明显增多,MAPK 信号通路被激活^[36]。针刺干预 MCAO/R 大鼠后,与模型组比较,差异表达基因则主要富集在 MAPK 信号通路、神经营养素信号通路、Hippo 信号通路。共同调控的信号通路只有 MAPK 信号通路。在相关研究中发现,MAPK 可通过 NF- κ B 通路来调节炎症因子的表达,从而介导炎症反应,参与脑卒中的形成^[37]。通过抑制 MAPK 信号通路能够有效抑制炎症反应,减少神经细胞凋亡,从而减轻缺血性脑卒中引起的神经损伤。由此可见,MAPK 信号通路不仅参与了缺血性脑损伤的形成,在针刺干预过程中也参与了脑损伤的修复过程,说明针刺干预可有效逆转导致病变的信号通路,抑制病变信号通路过程,从而

缓解脑损伤。

由此可知,针刺大椎、百会、人中穴确实可以改善 CIRI,其有多种 circRNAs 参与,且参与多种功用和多条信号通路的激活。后续可继续采用 RNA-seq 技术,进一步验证涉及的 circRNAs 以及相关信号传导通路。

参考文献

- [1] CAMPBELL B C V, DESILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2019, 5(1): 70.
- [2] 孙海欣,王文志.中国 60 万人群脑血管病流行病学抽样调查报告[J].*中国现代神经疾病杂志*,2018,18(2):83-88.
- [3] 于洗河,高尚,贾欢欢,等.1999 年、2009 年、2019 年我国与全球脑卒中疾病负担研究[J].*中国卫生经济*,2021,40(6): 58-61.
- [4] SCHREGEL K, BEHME D, TSOVKAS I, et al. Optimized management of endovascular treatment for acute ischemic stroke[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(131): 56397.
- [5] SHEN L A, GAN Q Y, YANG Y C, et al. Mitophagy in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injury[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2021, 13: 687246.
- [6] 黄超,陈怀龙,王明山.环状 RNA 在缺血/再灌注损伤中的作用研究进展[J].*国际麻醉学与复苏杂志*,2022,43(1):109-112.
- [7] LI W X, WEI D, LIANG J Y, et al. Comprehensive evaluation of white matter damage and neuron death and whole-transcriptome analysis of rats with chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019, 13: 310.
- [8] ZHANG Z H, WANG Y R, LI F, et al. Circ-camk4 involved in cerebral ischemia/reperfusion induced neuronal injury[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 7012.
- [9] 李凌燕,刘洪军,李金霞,等.针推结合康复训练治疗急性缺血性脑卒中临床观察[J].*湖北中医药大学学报*,2020,22(5):81-83.
- [10] 郑婉群,曹奕,王玉影,等.针灸通督法对缺血性脑卒中患者 Caspase-3、Caspase-9 水平影响的临床研究[J].*浙江中医药大学学报*,2014,38(9):1106-1110.
- [11] 邓容.电针任督脉对脑缺血再灌注大鼠炎症反应的影响[D].广州:广州中医药大学,2016.
- [12] 舒兆瑞.针刺对急性缺血性脑卒中患者血浆自由基水平的影响[D].南京:南京中医药大学,2014.
- [13] 武姿含,蒋素容,陈芯仪,等.针刺大椎、百会、人中穴对大鼠脑缺血再灌注损伤后 ES 蛋白表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*, 2019, 39(4): 507-510.
- [14] 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.
- [15] 卢小叶,何灏龙,吕倩忆,等.针刺介导 miR-34c-5p 调控脑缺血再

- 灌注损伤大鼠海马神经细胞自噬的研究[J]. 针刺研究, 2022, 47(5): 415-421.
- [16] XU X J, LONG J B, JIN K Y, et al. Danshen-Chuanxiongqin Injection attenuates cerebral ischemic stroke by inhibiting neuroinflammation via the TLR2/TLR4-MyD88-NF- κ B Pathway in tMCAO mice[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2021, 19(10): 772-783.
- [17] PHANIENDRA A, JESTADI D B, PERIYASAMY L. Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases[J]. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2015, 30(1): 11-26.
- [18] 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.
- [19] 李忠仁, 郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 314.
- [20] 乔琳, 胡彬, 常明则, 等. 两种神经功能评分评价大鼠局灶性脑缺血模型的初步研究[J]. 山西医科大学学报, 2012, 43(12): 893-895.
- [21] SWANSON R A, MORTON M T, TSAO-WU G, et al. A semi-automated method for measuring brain infarct volume[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1990, 10(2): 290-293.
- [22] 贺平, 颜虹, 蒋素容, 等. 针刺大椎、人中、百会穴对脑缺血再灌注损伤大鼠脑线粒体超微结构的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(1): 55-58.
- [23] 何灏龙, 郑慧娥, 高音来, 等. 针刺调控脑缺血再灌注损伤大鼠缺血侧海马差异 miRNA 信号归属通路及 miR-34c-3p 表达的研究[J]. 中国康复医学杂志, 2020, 35(11): 1290-1295.
- [24] 郑慧娥, 何灏龙, 陈芯仪, 等. 针刺对 CIRI 大鼠缺血侧海马区 miRNA 表达及 miR-20a-5p 和 miR-22-5p 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(10): 1226-1231.
- [25] 黄浏姣, 陈邦国, 洪亚群. 电针对脑缺血再灌注大鼠神经功能及脑组织微血管密度影响的研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2013, 15(1): 9-11.
- [26] RYBAK-WOLF A, STOTTMEISTER C, GLAŽAR P, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. Molecular Cell, 2015, 58(5): 870-885.
- [27] 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.
- [28] WU F F, HAN B, WU S S, et al. Circular RNA TLK1 aggravates neuronal injury and neurological deficits after ischemic stroke via miR-335-3p/TIPARP[J]. The Journal of Neuroscience, 2019, 39(37): 7369-7393.
- [29] LIU W, JIA C, LUO L, et al. Novel circular RNAs expressed in brain microvascular endothelial cells after oxygen-glucose deprivation/recovery[J]. Neural Regeneration Research, 2019, 14(12): 2104-2111.
- [30] SHEN J, CHEN L, CHENG J, et al. Circular RNA sequencing reveals the molecular mechanism of the effects of acupuncture and moxibustion on endometrial receptivity in patients undergoing infertility treatment[J]. Molecular Medicine Reports, 2019, 20(2): 1959-1965.
- [31] ZHANG H, WANG Q, WANG Q S, et al. Circular RNA expression profiling in the nucleus accumbens: Effects of electroacupuncture treatment on morphine-induced conditioned place preference[J]. Addiction Biology, 2020, 25(4): e12794.
- [32] OHUCHIDA K, MIZUMOTO K, ISHIKAWA N, et al. The role of S100A6 in pancreatic cancer development and its clinical implication as a diagnostic marker and therapeutic target[J]. Clinical Cancer Research, 2005, 11(21): 7785-7793.
- [33] 陈昊. 基因芯片分析提示多种环状 RNA 的表达变化与食管鳞癌的发生发展相关[D]. 福州: 福建医科大学, 2017.
- [34] 张秋婉. 脑卒中大鼠纹状体及皮层投射神经元新生及分子机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [35] 林瑶. 艾灸对快速老化小鼠海马神经元突触可塑性的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [36] 冯毅慧. 电针对 JNK 基因敲除小鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡与 MAPK 信号通路影响的实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [37] 张富慧, 郝静峰, 张自艳, 等. 菊苷酸调控 p38 MAPK/NF- κ B/NLRP3 信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元凋亡及炎症反应的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2022, 39(8): 694-698.

(本文编辑 匡静之)