

· 基础研究 ·

针刺联合亚低温对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织相关 miRNA 功能表达的影响

陈楚洵 陈文 林亚平 杨茜芸 刘琴 肖姮 田浩梅

摘要 目的 观察针刺联合亚低温疗法对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 miRNA 功能表达的影响。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、针刺组、亚低温组、针刺联合亚低温组(联合组), 每组 10 只。采用 Zea Longa 线栓法复制改良大脑中动脉缺血模型,造模成功后 3 h 进行干预。假手术组、模型组只捆绑;针刺组针刺人中、百会、大椎穴,每次留针 30 min,12 h/次,共治疗 7 次;亚低温组置于冰盒内,肛温(33 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、鼓膜温度(31 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 保持 72 h;联合组接受针刺及亚低温治疗 72 h。治疗前后进行大鼠神经功能缺损评分,测量治疗后脑梗死面积比,采用基因微阵列技术筛选差异表达 miRNA。**结果** 与空白组及假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分及脑梗死面积比增加($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组、亚低温组、联合组神经功能缺损评分及脑梗死面积比降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),但三组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,空白组、假手术组、针刺组、亚低温组和联合组差异 miRNA 表达数量分别为 4、5、16、7、23 个,且差异表达 miRNA 功能不同。**结论** 针刺联合亚低温疗法可改善缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损,减少脑梗死面积,作用机制可能与调节 miRNAs 表达有关。

关键词 针刺;亚低温;脑缺血再灌注损伤;miRNA

Effect of Acupuncture Combined with Mild Hypothermia on Functional Expression of miRNA in Brain Tissue of Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury CHEN Chu-tao, CHEN Wen, LIN Ya-ping, YANG Qian-yun, LIU Qin, XIAO Heng, and TIAN Hao-mei *Acupuncture and Massage College of Hunan University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Zang Fu and Acupoints Related to Hunan traditional Chinese Medicine Administration, Changsha (410208)*

ABSTRACT Objective To investigate the effect of acupuncture combined with mild hypothermia therapy on functional expression of miRNA in cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) rats. **Methods** Totally 60 healthy Sprague - Dawley (SD) rats were randomly divided into 6 groups: the blank group, the sham group, the model group, the acupuncture group, the mild hypothermia group, and the acupuncture combined with mild hypothermia group (combined group), 10 in each group. Focal cerebral ischemia model was prepared with modified Zea Longas suture method. Three hours after modeling, the intervention was proceed. The sham group and the model group were bound only. Rats in the acupuncture group received acupuncture treatment at the acupoints of Dazhui (GV 14), Baihui (GV 20) and Renzhong (GV 25), with the time of needle retaining of 30 min each time and 7 times at intervals of 12 hours; rats in the mild hypothermia group were put into the ice box, keeping the rectal temperature at (33 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ and the tympanic temperature at (31 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ persisting for 72 hours; rats in the combined group were treated with acupuncture and mild hypothermia treatment for 72 hours. The neurological function deficit score was compared pre-and post-treatment; infarct size was detected after the treatment. The DNA microarray technology was used to screen the differentially expressed miRNAs. **Results** Compared with the blank

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81303051); 湖南省中医药科研计划项目(No. 201471)

作者单位: 湖南中医药管理局脏腑与经穴相关重点研究室, 湖南中医药大学针灸推拿学院(长沙 410208)

通讯作者: 田浩梅, Tel: 0731-88458187, E-mail: 451358104@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180124.164

group and sham group, the neurological function deficit score and infarct area in the model group were significantly increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the neurological function deficit score and infarct area of the acupuncture group, the mild hypothermia group and the combined group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); but the differences among the three groups was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with the model group, the number of miRNA expression in the blank group, the sham operation group, the acupuncture group, the mild hypothermia group and the combined group was 4, 5, 16, 7, 23 respectively, and the functions of differentially expressed miRNA were different. Conclusions Acupuncture combined with mild hypothermia therapy can improve the nerve function defect, reduce the area of cerebral infarction in CIRI rats. The mechanism of action may be related to the regulation of miRNAs expression.

KEYWORDS acupuncture; mild hypothermia; cerebral ischemia reperfusion injury; miRNA

脑卒中是危害人类身心健康的主要疾病之一。国外研究显示人均卒中风险约为 8% ~ 10%^[1], 其中缺血性脑卒中为 60% ~ 70%^[2], 且有高发病率、高致残率和高死亡率的特点。缺血性脑卒中存在“缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)”机制^[3], 研究显示, 在脑缺血再灌注后, miRNA 发生了变化^[4,5], 而且各个 miRNAs 相关性不同^[6]。针刺及亚低温疗法治疗脑 CIRI 疗效确切^[7,8], 以往大多单独应用, 本研究观察针刺联合亚低温治疗脑 CIRI 大鼠脑组织 miRNA 的表达谱变化, 为临床治疗提供新的思路。

材料与方法

1 动物 3 月龄健康雄性 SD 大鼠 60 只, 清洁级, 体重 (265 ± 15) 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) 2013 - 0004。实验通过湖南中医药大学伦理审批。

2 试剂与仪器 miRNA 芯片 (杭州联川生物有限公司); 10% 水合氯醛 (天津市科密欧化学试剂有限公司)、磷酸盐缓冲液 (PBS, WB1001, 长沙维尔生物科技有限公司)、1.5% 2,3,5-苯氯化四氮唑 (TTC) 溶液 (C₁₉H₁₅, 长沙维尔生物科技有限公司)、4% 多聚甲醛 (WB0401, 长沙维尔生物科技有限公司)。Array-Pro 图像分析软件 (Media Cybernetics, America); 激光扫描仪 (GenePix 4000B Molecular Device, America); Shandon325 型石蜡切片机 (英国 Shandon 公司); MIAS 医学图象分析系统 (北京北航公司); LEICA DM LB₂ 型双目显微镜 (德国 LEICA 公司); 双极电凝器 (上海医用激光仪器); HHS-2 电子恒温不锈钢水浴锅 (上海南阳仪器有限公司); 数位温度表 (TES 1310 TYPE-K, 台湾泰仕电子工业股份有限公司); 大鼠肛温温度计 (JNT, 北京冀诺泰科技发展有限公司); 微循环泵 (Atactic Tech-

nologies, 美国)。

3 分组及造模 60 只大鼠按随机数字表法分为空白组、假手术组、模型组、针刺组、亚低温组、针刺联合亚低温组 (简称联合组), 每组 10 只。空白组不予造模。模型制备参照 Zea Longa 线栓法^[9]复制大脑中动脉缺血模型并加以改良, 以 10% 水合氯醛 0.3 mL/kg 腹腔麻醉, 颈正中切口, 暴露颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 及颈内动脉 (ICA), 结扎 ECA 后电凝, 动脉夹夹闭 CCA 与 ICA, 在颈外剪一斜形小口, 将 0.28 mm 单丝尼龙鱼线头端 5 mm 用石蜡包被, 并于 18 mm 长度处标记, 从切口处插入, 栓线长度自 CCA 分叉处约 18 ~ 20 mm (根据动物体重而定), 栓塞右侧大脑中动脉, 局部喷洒青霉素注射液防止感染, 然后缝合皮肤, 栓线尾端部分固定于皮肤上。缺血 2 h 后抽出栓线, 形成再灌注模型。各组大鼠于缺血再灌注 2 h 神经功能缺损评分^[9]: 0 分, 无神经功能损伤症状; 1 分, 提尾时栓塞动脉对侧前肢不能伸直; 2 分, 行走时向栓塞动脉对侧旋转; 3 分, 行走时向栓塞动脉对侧倾倒; 4 分, 不能自发行走, 意识丧失。剔除评分为 0 分和 4 分的大鼠, 评分 1 ~ 3 分者为造模成功。最终模型组、针刺组、亚低温组、联合组全部大鼠造模成功。假手术组仅插入尼龙鱼线约 10 mm, 不栓塞。

4 干预方法 空白组不做处理, 其余各组造模后 3 h 待大鼠呼吸、心跳等生命体征稳定后进行干预。假手术组、模型组只捆绑不针刺。针刺组针刺相应穴位后捻转 1 min, 15 min 后捻转 1 次, 留针 30 min, 12 h/次, 共治疗 7 次, 取穴标准参照《实验针灸学》^[10] 及华兴邦制定的大鼠穴位图谱^[11], 并模拟人体腧穴骨度分寸法量取: 人中: 唇裂鼻尖下 1 mm 正中处, 直刺 1 ~ 2 mm; 百会: 顶骨正中, 平刺 2 mm; 大椎: 第 7 颈椎与第 1 胸椎间, 背部正中, 直刺 3 mm。亚低温组置于冰盒内, 30 min 肛温降至 (33 ± 1) °C 并保持, 鼓膜

温度降至 $(31 \pm 1)^\circ\text{C}$ 并保持, 监测肛温与鼓膜温度 1 h/次, 维持亚低温 72 h。联合组在针刺组基础上加用亚低温治疗 72 h。

5 观察指标及方法

5.1 神经功能缺损评分 参照文献[9], 各组大鼠于治疗前、后进行神经功能缺损评分。

5.2 梗死面积比测量 治疗后, 每组随机抽取 5 只大鼠, 经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 迅速断头取脑, 用冰生理盐水冲洗后, 迅速放入 -20°C 冰箱内冷冻 15 min。去除嗅球、小脑和低位脑干, 大脑冠状切四刀, 切成五片, 第一刀在脑前极与视交叉连线中点处; 第二刀在视交叉部位; 第三刀在漏斗柄部位; 第四刀在漏斗柄与后叶尾极之间。然后迅速将切片置于 1.5% TTC 溶液 (37°C) 中避光孵育 15 ~ 30 min, 每隔 5 min 翻动 1 次。TTC 染色后, 将其置于 10% 甲醛中固定, 观察各组梗死面积比。

5.3 miRNA 表达谱的检测 治疗 72 h 后, 每组随机抽取 3 只大鼠断头取脑, 于冰上迅速分离缺血侧大脑海马, 置于冻存管内, 于液氮中保存, 基因相关检测微阵列实验由 LC Sciences 公司进行。微阵列实验使用 4 ~ 8 μg 总 RNA 样品。使用 Poly(A) 聚合酶在总 RNA 3' 端加上 Poly(A) 尾巴, 再将一个寡聚核苷酸标记与这个 Poly(A) 尾巴连接 (ligation) 用于后续的荧光标记。杂交反应利用微循环泵的循环作用在 $\mu\text{Parafluo}$ 微流体芯片上过夜进行^[12,13]。在微流体芯片上, 每条检测探针都是由一个化学修饰核苷酸编码段 [与目标 miRNA 互补 (来源于 miRBase, <http://www.mirbase.org/>) 或是与其他 RNA (质控或是客户定制序列) 互补] 和一个由聚乙二醇组成的间隔段 (扩大编码段与基质的间距) 组成。检测探针均使用 PGR 化学法进行原位合成。杂交解链温度是通过化学修饰检测探针进行平衡。杂交使用含有 25% 甲酰胺的 100 μL 6 × SSPE 缓冲液 [0.90 mol/L 氯化钠 (NaCl), 60 mmol/L 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4), 6 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), pH 6.8], 杂交温度为 34°C 。RNA 与探针杂交后, 与标记特异结合的 Cy3 染料在微流体芯片上循环流动进行染色。利用激光扫描仪采集杂交图像并使用 Array-Pro 图像分析软件进行图像数字化转换。数据分析首先是减除背景值, 然后使用 LOWESS 过滤^[14] (局部加权回归) 进行信号归一化, 后进行靶基因预测, 下游基因 GO 和 Pathway 的富集。每组选择三个样本, 利用随机方差模型计算每个 miRNA 的显著性水平 (P 值), 按照 $P < 0.05$ 进行筛选, 获得差异 miRNA。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行正态性、方差齐性检验, 正态分布、方差齐时采用单因素方差分析, LSD 法进行两两比较, 方差不齐采用 TamhaneT2 法, 非正态分布采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组治疗前后大鼠神经功能缺损评分比较 (表 1) 与空白组及假手术组比较, 治疗前及治疗后模型组神经功能缺损评分升高 ($P < 0.05$)。与本组治疗前比较, 治疗后针刺组、亚低温组及联合组神经功能缺损评分降低 ($P < 0.05$), 但各治疗组之间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 针刺组、亚低温组、联合组治疗后神经功能缺损评分降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 各组治疗前后大鼠神经功能缺损评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	神经功能缺损评分	
		治疗前	治疗后
空白	10	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
假手术	10	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
模型	10	1.50 ± 0.53	1.50 ± 0.53
针刺	10	1.40 ± 0.53	0.80 ± 0.42* Δ
亚低温	10	1.50 ± 0.54	0.80 ± 0.42* Δ
联合	10	1.30 ± 0.48	0.40 ± 0.52** Δ

注: 与模型组同期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与本组治疗前比较, Δ $P < 0.05$

2 治疗后大鼠脑梗死面积比比较 空白组、假手术组、模型组、针刺组、亚低温组及联合组梗死面积比分别为 $(0.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(0.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(33.43 \pm 5.64)\%$ 、 $(18.39 \pm 10.86)\%$ 、 $(22.70 \pm 4.91)\%$ 以及 $(9.78 \pm 8.08)\%$ 。与空白组及假手术组比较, 模型组梗死面积比均明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 针刺组、亚低温组及联合组梗死面积比减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与亚低温组比较, 联合组梗死面积比减少 ($P < 0.05$); 余各组之间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 治疗后大鼠缺血侧海马组织差异 miRNA 表达情况 (图 1, 表 2) 与模型组比较, 空白组、假手术组、针刺组、亚低温组及联合组差异 miRNA 表达数量分别为 4、5、16、7、23 个, 且差异表达 miRNA 功能不同。

讨 论

针刺是治疗 CIRI 的有效手段之一, 其对缺血性中风的保护、修复作用以及内在的调节机制一直是研究

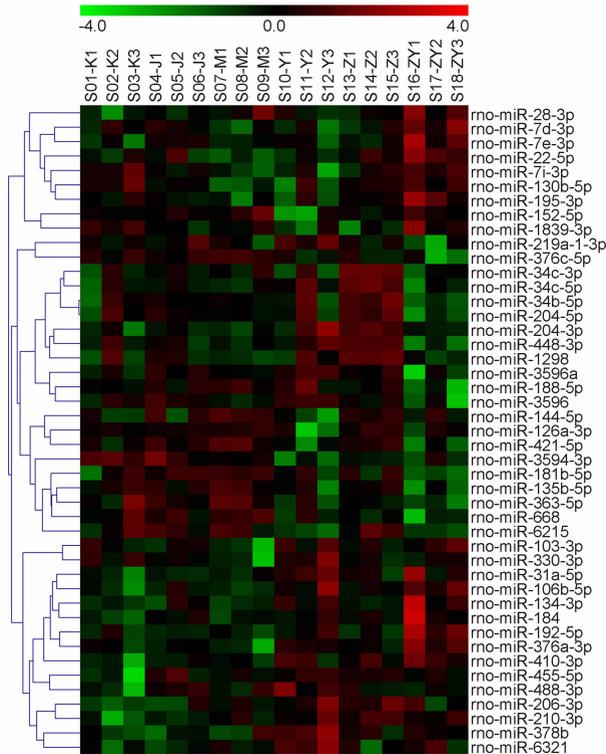


图 1 差异 miRNA 聚类分析图

表 2 各组与模型组间差异 miRNA 表达功能情况 (个)

组别	n	miRNA 功能					
		细胞增殖调节	基因表达调控	细胞凋亡调控	神经元分化调控	轴突延伸调控	炎症因子调控
空白	4	2	0	3	0	0	0
假手术	5	3	1	3	1	1	0
针刺	16	12	5	11	3	3	6
亚低温	7	3	2	3	3	1	2
联合	23	12	11	13	8	7	12

的重点并具有重要的临床意义。目前循证医学已将针刺列为治疗缺血性脑卒中的方法之一^[15]。其作用机理主要体现在以下方面^[16,17]:改善缺血脑组织能量代谢;使缺血脑组织血流加快及血管扩张;减少细胞聚集及炎症介质,减轻水肿;抑制钙超载,纠正电解质紊乱;减少自由基、NO 等神经递质产生,降低受体活性;激活或抑制某些细胞信号转导通路;减少凋亡及凋亡相关因子的产生等。

研究认为,亚低温治疗 CIRI 具有较好的疗效^[18]。亚低温可以在多方面保护 CIRI 中的神经细胞,具体机制包括^[19,20]:降低脑组织耗氧量,减少脑组织乳酸堆积;抑制自由基的生成;减少细胞内钙超载,阻断钙对神经元的毒性作用;保护血脑屏障,减轻脑水肿;减少脑细胞结构蛋白破坏,促进脑细胞结构和功能修复;抑制兴奋性氨基酸的合成与释放;抑制脑缺血再灌注后

的炎症反应;抑制神经元凋亡的发生;此外,抑制高糖血症,减轻继发性脑损伤、减轻弥漫性轴索损伤、防止缺血诱使的 G1uR2 mRNA 的表达,从而延长缺血后救援海马趾 CA1 神经元的时程、影响早期基因表达等也可能是其机制之一。

miRNAs 是一类非编码小 RNA,miRNAs 能结合到靶基因 mRNA 的 3'非翻译区诱导转录退化和(或)抑制翻译。miRNA 在 CIRI 过程中发挥着重要的作用。CIRI 后 miRNA 的表达随 CIRI 程度、时间及细胞(如神经元、胶质细胞等)的不同而有不同的表达^[21,22]。

本研究发现,造模成功后大鼠神经功能缺损评分及梗死面积比明显增加,而针刺、亚低温以及针刺联合亚低温疗法均能改善 CIRI 大鼠神经功能缺损、降低脑梗死面积。治疗后各组大鼠 miRNA 差异表达数目各异,提示造模后,部分差异表达 miRNA 参与脑缺血再灌注的过程,而各种干预措施亦能激活多种 miRNA 的表达,其中以联合组最为突出,联合组的差异基因数恰好是单处理方式数量的总和,但与单处理方式重叠的基因数只有 5 个,可见联合组并不是针刺和亚低温疗法简单的相加。且差异表达的 miRNA 功能主要集中在细胞增殖、细胞凋亡功能的改变。与模型组比较,针刺、亚低温以及联合组差异 miRNA 功能涉及细胞增殖调节、细胞凋亡调控、基因表达调控、神经元分化调控、轴突延伸调控、炎症因子调控多个方面,且不同组差异 miRNA 数量不同,以联合组差异 miRNA 数最多,有一定的优势。可见针刺、亚低温、针刺联合亚低温疗法均能改善 CIRI 大鼠神经功能缺损、降低脑梗死面积。与亚低温组比较,联合组梗死面积比明显减少;神经功能评分三组虽无明显差异,但联合组有优于针刺组及亚低温组的趋势。可见联合组差异 miRNA 数目及抗损伤效应高于单独的针刺组或亚低温组,针刺联合亚低温疗效有一定优势。其对 CIRI 的保护作用可能是通过影响相应 miRNAs 来实现的。本实验只做了一个广泛的筛选,各 miRNA 具体功能、响应及调控脑缺血损伤的具体方式、各 miRNA 的具体调控靶蛋白及其涉及的精准调控机制、相互之间的关联等还需进一步研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

[1] Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, et al. The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study[J]. Stroke, 2006, 37(2): 345-350.

- [2] Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics—2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee [J]. *Circulation*, 2008, 117(4): e25 – e146.
- [3] Simard JM, Kent TA, Chen M, et al. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications [J]. *Lancet Neurology*, 2007, 6(3): 258 – 268.
- [4] Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 2008, 39(3): 959 – 966.
- [5] Ziu M, Fletcher L, Rana S, et al. Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e14724.
- [6] Xiao S, Ma Y, Zhu H, et al. miRNA functional synergistic network analysis of mice with ischemic stroke [J]. *Neurol Sci*, 2015, 36(1): 143 – 148.
- [7] Lin YP, Liu Q, Chen CT, et al. Effect of acupuncture plus mild hypothermia on MAPK/ERK pathway of brain tissues in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2016, 14(5): 311 – 319.
- [8] 田浩梅, 颜虹, 张娟, 等. 基于蛋白芯片技术探讨针刺对脑缺血大鼠脑组织相关磷酸化蛋白的影响 [J]. *针刺研究*, 2016, 41(6): 479 – 485.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84 – 91.
- [10] 李忠仁主编. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 327.
- [11] 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, 2(1): 1 – 5.
- [12] Gao X, Gulari E, Zhou X. In situ synthesis of oligonucleotide microarrays [J]. *Biopolymers*, 2004, 73(5): 579 – 596.
- [13] Zhu Q, Hong A, Sheng N, et al. microParaflo biochip for nucleic acid and protein analysis [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 382: 287 – 312.
- [14] Bolstad BM, Irizarry RA, Astrandand, et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(2): 185 – 193.
- [15] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010 [J]. *中华神经科杂志*, 2010, 43(2): 16 – 19.
- [16] 孙洁, 闫明茹, 郑宇, 等. “醒脑开窍”针刺法早期介入对脑缺血再灌注大鼠 SOD 及 MDA 的影响 [J]. *中国中医药杂志*, 2012, 27(5): 1397 – 1400.
- [17] 罗文舒, 吴永刚, 徐绍刚, 等. 针刺督脉对脑缺血再灌注大鼠 FADD-Cxspcsc-8 通路的影响 [J]. *中国医药指南*, 2012, 10(8): 319 – 321.
- [18] Seo JW, Kim JH, Kim JH, et al. Time-dependent effects of hypothermia on microglial activation and migration [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 164.
- [19] 刘俊伟, 张慧玲, 李斌. 人参皂苷 Rb1 联合亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2014, 23(10): 1793 – 1795.
- [20] Tang JX, Baranov D, Hammond M, et al. Human alzheimer and inflammation biomarkers after anesthesia and surgery [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115(4): 727 – 732.
- [21] Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. microRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 2008, 39(3): 959 – 966.
- [22] Di Y, Lei Y, Yu F et al. microRNAs Expression and function in cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 53(2): 242 – 250
(收稿: 2016-01-19 在线: 2018-05-02)
责任编辑: 邱禹