

· 基础研究 ·

针刺“百会”透“曲鬓”对大鼠脑出血后
小胶质细胞 M1/M2 型极化的影响李丹¹ 朱曦¹ 王中鹏¹ 李龙¹ 万思琦² 赵永厚³

摘要 目的 探讨针刺“百会”透“曲鬓”对大鼠脑出血 (ICH) 后炎症反应程度影响的作用机制。
方法 90 只 SD 大鼠按随机数表法分为假手术组、模型组、针刺组、针刺+激动剂阴性对照组、针刺+miR-34a-5p 激动剂组, 每组按 1、3、7 天 3 个时间点分为 3 个亚组, 每组 6 只。针刺+激动剂阴性对照组、针刺+miR-34a-5p 激动剂组于建模前 3 天侧脑室注射 miR-34a-5p 激动剂阴性对照物或 miR-34a-5p 激动剂, 造模时假手术组颅内注入生理盐水, 其余 4 组采用自体血注入尾壳核制备 ICH 大鼠模型。建模 12 h 后针刺干预, 针刺“百会”透“曲鬓”。分别采用 Western Blot (1、7 天)、Real-time PCR (1、3、7 天) 检测针刺对诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素 4 (IL-4)、精氨酸酶 1 (Arg-1) 蛋白及 mRNA 表达的影响。**结果** 在 1、7 天时, 与假手术组同期比较, 模型组同期 iNOS、IFN- γ 、IL-4 及 Arg-1 蛋白表达水平升高 ($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组同期比较, 针刺组 iNOS、IFN- γ 蛋白表达水平降低, Arg-1、IL-4 蛋白表达水平升高 ($P<0.01$); 与针刺+激动剂阴性对照组同期比较, 针刺+miR-34a-5p 激动剂组 iNOS、IFN- γ 蛋白表达水平升高, Arg-1、IL-4 蛋白表达水平降低 ($P<0.01$)。在 1、3、7 天时, 与假手术组同期比较, 模型组 iNOS、IFN- γ 、Arg-1、IL-4 mRNA 表达水平升高 ($P<0.01$); 与模型组同期比较, 针刺组 iNOS、IFN- γ mRNA 表达水平降低, Arg-1、IL-4 mRNA 表达水平升高 ($P<0.01$); 与针刺+激动剂阴性对照组同期比较, 针刺+miR-34a-5p 激动剂组 iNOS、IFN- γ mRNA 表达水平升高, Arg-1、IL-4 mRNA 表达水平降低 ($P<0.01$)。**结论** 针刺“百会”透“曲鬓”减轻大鼠 ICH 后炎症反应程度影响可能的机制是降低 ICH 后炎症因子表达, 提高抗炎因子表达, 抑制小胶质细胞向 M1 型极化, 促进其向 M2 型极化。

关键词 脑出血; 针刺; 小胶质细胞; 百会; 曲鬓; 中医

Effect of Acupuncture of Baihui (DU20) Penetrating Qubin (GB7) on M1 /M2 Polarization of Microglia in Intracerebral Hemorrhage Model Rats LI Dan¹, ZHU Xi¹, WANG Zhong-peng¹, LI Long¹, WAN Si-q², and ZHAO Yong-hou³ 1 Department of Acupuncture, Beijing University of Chinese Medicine Third affiliated Hospital, Beijing (100029); 2 Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education, Dongzhimen Hospital Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100700); 3 Department of Psychiatry, Heilongjiang Mental Hospital, Harbin (150036)

ABSTRACT Objective To explore the effect and mechanism of acupuncture at Baihui (DU20) penetrating Qubin (GB7) on the level of inflammatory response in intracerebral hemorrhage (ICH) model rats.
Methods Totally 90 SD rats were divided into the sham-operation group, the ICH group, the acupuncture group, the acupuncture + agomir-NC group, and the acupuncture + miR-34a-5p agomir group by random digit table, each group was subdivided into 3 subgroups according to day 1, 3, and 7, 6 in each group. The acupuncture +

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (No. 82174514); 中国博士后科学基金资助项目 (No. 2020M670940); 黑龙江省博士后面资助项目 (No. LBH-Z19034)

作者单位: 1. 北京中医药大学第三附属医院针灸科 (北京 100029); 2. 北京中医药大学东直门医院重点实验室 (北京 100700); 3. 黑龙江神志医院神志病科 (哈尔滨 150036)

通讯作者: 李丹, Tel: 010-52075415, E-mail: 3509437@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230511.048

agomir-NC group and the acupuncture + miR-34a-5p agomir group were given a lateral ventricular injection of either the negative control of the miR-34a-5p activator or the miR-34a-5p activator for 3 days before modeling. The sham-operation group was given an intracranial injection of saline. The ICH rat models were established in all groups except the sham-operation group using intracerebral injecting of autologous blood into the caudate nucleus. Rats were intervened by needling Baihui (DU20) Penetrating Qubin (GB7) 12 hours after modeling. The protein and mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4), and arginase-1 (Arg-1) were detected by Western Blot (day 1 and 7) and Real-time PCR (day 1, 3 and 7). **Results** At day 1 and 7, compared with the sham-operation group, the expression levels of iNOS, IFN- γ , IL-4, and Arg-1 protein increased in the ICH group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the ICH group, the expression levels of iNOS and IFN- γ protein reduced, while the expression levels of Arg-1 and IL-4 protein increased in the acupuncture group ($P < 0.01$). Compared with the acupuncture + agomir-NC group, the expression levels of iNOS and IFN- γ protein increased, while the expression levels of Arg-1 and IL-4 protein decreased in the acupuncture + miR-34a-5p agomir group ($P < 0.01$). At day 1, 3, and 7, compared with the sham-operation group, the expression levels of iNOS, IFN- γ , Arg-1, and IL-4 mRNA increased in the ICH group ($P < 0.01$). Compared with the ICH group, the expression levels of iNOS and IFN- γ mRNA reduced, while the expression levels of Arg-1 and IL-4 mRNA increased in the acupuncture group ($P < 0.01$). Compared with the acupuncture + agomir-NC group, the expression levels of iNOS and IFN- γ mRNA increased, while the expression levels of Arg-1 and IL-4 mRNA decreased in the acupuncture + miR-34a-5p agomir group ($P < 0.01$). **Conclusions** Baihui (DU20) penetrating Qubin (GB7) could alleviate the degree of inflammatory response in ICH rats. And its mechanism might be related to reducing the expression of inflammatory cytokines, increasing the expression of anti-inflammatory cytokines, inhibiting microglia polarization towards the M1 phenotype, and promoting their polarization towards the M2 phenotype.

KEYWORDS intracerebral hemorrhage; acupuncture; microglia; Baihui (DU20); Qubin (GB7); Chinese medicine

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 在我国发病率、病死率、致残率高, 发病后多数患者难以恢复正常生活^[1]。ICH 的损伤分为原发性和继发性两种, 继发性损伤对于病情及预后的影响更为深远, 在继发性损伤中, 炎症反应占主导地位^[2]。ICH 后血液进入脑实质引起炎症反应, 它能够加重脑损伤, 导致血脑屏障破坏、脑组织损伤甚至神经细胞死亡等严重后果^[3]。

小胶质细胞是 ICH 后炎症反应中最先被激活的免疫调节细胞, 在不同的情况下极化为 M1、M2 两种表型^[4]。miRNA 长度在 18~25 个核苷酸, 是一种小型非编码 RNA^[5]。miR-34a-5p 是一种与脑卒中后认知障碍有关的 miRNA, 也是该疾病的一种独立危险因素^[6]。研究表明, miRNA 的表达情况可调控小胶质细胞向不同表型极化, 调节炎症反应, 影响 ICH 后神经功能缺损的程度^[7]。针灸能借助多种途径调节 miRNA 的信号传导通路及 miRNA 表达, 以此来调控靶向基因的表达情况, 可用于精准治疗、保护脑组织并改善 ICH 的预后^[8]。miRNA 参与 ICH 继发性损伤中的众多环节, 如调控凋亡基因保护脑细胞、减轻兴奋性毒性及氧化损伤, 调控炎症因子的相关表达, 以减轻炎症反应、改善脑水肿程度等, 对于 ICH 的预后具有重大意义^[9]。

现有研究发现, M1 型小胶质细胞在 ICH 后为促炎作用, M2 型小胶质细胞则为抗炎作用^[10]。其促炎与抗炎作用与小胶质细胞激活为不同表型后产生的细胞因子不同相关, 激活为 M1 型的小胶质细胞常可表达干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 等, 激活为 M2 表型的小胶质细胞则表达白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、IL-10、精氨酸酶 1 (argininase-1, Arg-1) 等^[11, 12]。笔者推测, 针刺可通过调控 ICH 大鼠小胶质细胞极化减轻炎症反应程度, 而 miRNA-34a-5p 则对这一调控有一定影响。小胶质细胞作为脑组织中重要的细胞组成, 但上述细胞因子也可能由其他细胞表达, 因而每个表型选用两种不同标志物进行实验, 避免单一指标带来疑惑。本实验选择促炎因子、M1 型小胶质细胞标志物 iNOS、IFN- γ , 抗炎因子、M2 型小胶质细胞标志物 IL-4、Arg-1 作为观察指标, 以验证这一假设。

材料与方法

1 动物 选用 90 只清洁级健康雄性 SD 大

鼠, 3 月龄, 体重约 250~300 g, 实验动物由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 使用许可证号: SCXK(京)2019-0008。大鼠全部采用分笼饲养于温度(25±1)℃, 湿度 45%~55%, 明暗周期 12 h/12 h 循环环境下, 分笼饲养, 自由饮食。本实验经过北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会审批(No. BUCM-4-2021122002-4106)。

2 主要仪器及试剂 主要试剂: Iba1 抗体[批号: GR322956589, 艾博抗(上海)贸易有限公司], 羊抗兔 IgG(批号: 10010628)、羊抗小鼠 IgG(批号: 10020730)、内参抗体 β -actin(批号: 10040577) 均购自武汉三鹰生物科技有限公司, iNOS 抗体(批号: 5500009469)、Arg-1 抗体(批号: 5500003362) 均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, IFN- γ 抗体(武汉博士德生物工程有限公司, 批号: 9G122B), IL-4 抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司, 批号: 4000000110), SYBR Green(北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20200128)。

主要仪器: WD-9405B 型水平摇床、DYY-7C 型电泳仪、DYCZ-40D 型转移槽、DYCZ-24DN 型双垂直蛋白电泳仪、WD-9413B 型凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司)、NW10LVF 型超纯水系统[力新仪器(上海)有限公司]、Proline 型微量移液器[百得实验室仪器(中国)有限公司]、H-2050R 型超速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、ELX-800 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)、DH36001B 型电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司)、DZF-6050 型真空干燥箱(上海希斯百瑞仪器有限公司)、NANO 2000 型紫外分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司)、Exicycler 96 型荧光定量 PCR 仪[韩国 BIONEER(百奥尼)公司]等。

3 动物分组及模型制备 90 只清洁级健康雄性 SD 大鼠按体重由轻到重将大鼠编号, 按随机数表法分为 5 组, 即假手术组、模型组、针刺组、针刺+激动剂阴性对照组、针刺+miR-34a-5p 激动剂组, 每组 18 只。每组再随机分为 1、3、7 天 3 个亚组, 每组 6 只。针刺+激动剂阴性对照组、针刺+miR-34a-5p 激动剂组于建模前 3 天侧脑室注射 miR34a-5p 激动剂阴性对照物或 miR34a-5p 激动剂。造模时假手术组颅内注入生理盐水, 其余 4 组采用自体血注入尾壳核制备 ICH 大鼠模型^[13]。造模前禁食 12 h, 禁水 6 h。依据大鼠立体定位图谱和自体血注射的方法制备 ICH 大鼠模型, 麻醉采用 60 mg/kg 戊巴比妥钠进行大鼠腹腔注射, 以仰卧位固定于立体定位上, 将定

位仪两侧耳杆插入大鼠骨性外耳道, 确保颅骨与对耳线处于水平位置; 把大鼠门齿固定在前端的门齿孔内, 调整高度确保大鼠前凶点和人字点处于同一水平。取两耳尖连线中点备皮、消毒、切口, 钝性分离皮下骨膜, 使前凶点及冠状缝得到充分暴露, 使用立体定位仪定位坐标点(前凶点为中心, 右侧 3.5 mm, 后侧 0.2 mm), 用 1.0 mm 直径钻头钻孔至硬脑膜表面, 以钻下落空感为度, 避免穿孔过深损伤脑组织。鼠尾消毒后于距尾端 3 cm 处剪断, 用微量注射器取血 50 μ L 后将其固定于立体定位仪上, 并沿钻孔垂直缓慢进针 6 mm, 以 20 μ L/min 的注血速度, 将自体血注入, 留针 5 min 后缓慢出针。断尾处消毒包扎, 术后头部局部喷洒青霉素并用牙科水泥密封颅骨钻孔, 眼科缝合针缝合头皮并以碘酚消毒创口皮肤, 以防感染。假手术组在同一位置开孔, 注射等体积生理盐水。造模完成后依照 Zea-Longa 标准对大鼠进行评分^[14], 0 分: 未见神经病学征象, 无神经功能缺损症状; 1 分: 大鼠被提尾倒悬时, 病灶右侧前肢呈屈曲、抬高状态, 不能伸展右侧前爪; 2 分: 有向瘫痪侧旋转的征象, 即行走右侧转圈; 3 分: 有向病灶对侧跌倒的征象, 即行走困难并向右侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识水平呈下降状态。达到 1、2、3 分为造模成功^[15], 同时对进行假手术的大鼠病理切片 HE 染色示细胞形态结构完整, 排列整齐, 未发生水肿或炎性细胞浸润, 进行 ICH 造模的细胞出现明显肿胀, 细胞间隙增大, 部分细胞坏死消失为造模成功标准^[16]。采用差额补充的方法以保证每组的实验动物例数。共使用 87 只大鼠进行造模, 9 只死亡, 6 只造模失败, 成功率为 82.8%。造模后模型组造模失败 2 只, 针刺组造模失败 1 只, 针刺+激动剂阴性对照组造模失败 2 只, 针刺+miR-34a-5p 激动剂组造模失败 1 只, 造模失败原因均为 Zea-Longa 评分为 0 分或 4 分。术中模型组死亡 4 只, 针刺组死亡 1 只, 针刺+激动剂阴性对照组死亡 2 只、针刺+miR-34a-5p 激动剂组死亡 2 只, 死亡原因均为注血后血肿压迫, 其后无大鼠死亡。根据实验中动物死亡及造模失败情况再次造模补齐各组数量。

4 动物干预方法 假手术组: 开皮、钻孔、注射生理盐水、缝合, 每天对大鼠进行一次与针刺组相同的捆绑, 每次 30 min。模型组: 复制 ICH 模型, 建模 12 h 后每天对大鼠进行一次与针刺组相同的捆绑, 每次 30 min。针刺组: 在 ICH 造模后 12 h 对大鼠进行针刺干预, 每 24 h 针刺 1 次。参照《实验动物穴位图谱》^[15] 进行针刺部位的选择, 选取大鼠百会穴

(顶骨正中)、患侧曲鬓穴(眶外缘与外耳口连线的后 2/3)。采取由百会向曲鬓穴透刺的方法, 针灸针快速刺入向曲鬓穴透刺, 使用捻转速度为 200 r/min 的快速捻转手法, 持续捻转 5 min 后间隔 5 min, 反复操作, 共留针 30 min。针刺干预后于 ICH 造模后 1、3、7 天 3 个时间点分别取材。针刺 + 激动剂阴性对照组: 将 miR-34a-5p 激动剂阴性对照物稀释后取 5 μL 联合 12.5 μL 转染试剂于建模前 3 天行侧脑室(前卤后 0.8 mm, 中缝右 1.5 mm, 头骨表面以下 4.5 mm 深)注射。复制 ICH 模型, 建模 12 h 后给予针刺干预, 每 24 h 针刺 1 次, 具体操作方法同针刺组保持一致。针刺 + miR-34a-5p 激动剂: 将 miR-34a-5p 激动剂稀释后取 5 μL 联合 12.5 μL 转染试剂于建模前 3 天行侧脑室(前卤后 0.8 mm, 中缝右 1.5 mm, 头骨表面以下 4.5 mm)注射。复制 ICH 模型, 建模 12 h 后给予针刺干预, 每 24 h 针刺 1 次, 具体操作方法同针刺组保持一致。

5 检测指标及方法

5.1 Western Blot 检测 iNOS、Arg-1、IL-4、IFN-γ 蛋白表达 分别于 1、7 天时间点检测。对大鼠腹腔注射 200 mg/kg 过量戊巴比妥钠处死后, 取出脑组织, 肉眼可见出血的位置, 冻存组织取血肿周围半影区进行液氮速冻, 病理的将脑组织固定于甲醛溶液中, 镜下寻找血肿周围, 使用 RIPA 裂解缓冲液提取大鼠脑内血肿周围中的总蛋白, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行定量。进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶电泳, 调整电流至最大, 电压 80 V, 恒压电泳 2.5 h。进行转印, 封闭, 孵育一抗(iNOS 抗体 1:500、IFN-γ 抗体 1:400、Arg-1 抗体 1:500、IL-4 抗体 1:1 000)、二抗(羊抗兔 IgG-HRP 1:10 000)在 37 °C 下放置 45 min。使用 ECL 化学发光液进行可视化处理, 在暗室进行曝光。将胶片进行扫描, 用凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的光密度值。

5.2 Real Time-PCR 检测 iNOS、Arg-1、IL-4、IFN-γ mRNA 表达 分别于 1、3、7 天时间点检测。对大鼠腹腔注射 200 mg/kg 过量戊巴比妥钠处死后取脑组织, 肉眼可见出血部位, 取血肿周围组织用于后续实验, 病理固定整个脑组织, 镜下寻找血肿周围, 用高纯度总 RNA 快速提取试剂盒提取小鼠脑部血肿周围中的总 RNA。使用紫外分光光度计 NANO 2000 测定各样本中 RNA 的浓度后, 将 RNA 样本进行反转录, 以 β-actin 作为内参, 以得到对应的 cDNA,

反应条件: 94 °C 进行预变性 5 min, 94 °C 进行变性 10 s, 60 °C 进行退火 20 s, 循环 40 次。用韩国 BIONEER 公司生产的 Exicycler™ 96 荧光定量仪进行实时荧光定量分析, 使用 2^{-ΔΔCT} 法进行数据统计。见表 1。

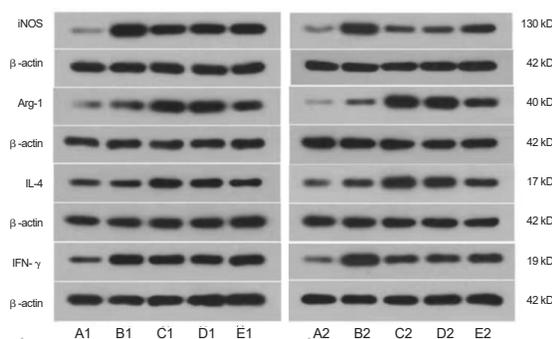
表 1 iNOS、Arg-1、IFN-γ、IL-4 及 β-actin 引物序列

名称	序列	产物长度 (bp)
iNOS	上游: 5'-TTGGAGCGAGTTGTGGATTG-3'	125
	下游: 5'-GTGAGGGCTTGCCCTGAGTGA-3'	
IFN-γ	上游: 5'-TTTGCAGCTCTGCCTCAT-3'	169
	下游: 5'-TTTCGTGTTACCGTCCTT-3'	
Arg-1	上游: 5'-AGACAGGGCTACTTTCAGGAC-3'	111
	下游: 5'-AAGACAAGGTCAACGCCACT-3'	
IL-4	上游: 5'-TGATGTACCTCCGTGCTTG-3'	167
	下游: 5'-TCCCTCGTAGGATGCTTTT-3'	
β-actin	上游: 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC-3'	155
	下游: 5'-GGCCGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3'	

6 统计学方法 利用 SPSS 19.0 统计软件包对实验数据进行归纳整理, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 多组之间比较采用单因素方差分析, 组内比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠炎症因子 iNOS、Arg-1、IFN-γ、IL-4 蛋白表达水平比较(图 1, 表 2) 1、7 天两个时间点, 与假手术组同期比较, 模型组 iNOS、IFN-γ、IL-4、Arg-1 蛋白表达水平升高 (*P* < 0.01, *P* < 0.05); 与模型组同期比较, 针刺组 iNOS、IFN-γ 蛋白表达水平降低 (*P* < 0.01), Arg-1、IL-4 蛋白表达水平升高 (*P* < 0.01); 与针刺组同期比较, 针刺 + miR-34a-5p 激动剂组 iNOS、IFN-γ 蛋白表达水平升高 (*P* < 0.01),



注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为针刺组; D 为针刺 + 激动剂阴性对照组; E 为针刺 + miR-34a-5p 激动剂组; A1~E1 为第 1 天; A2~E2 为第 7 天

图 1 各组大鼠 1、7 天炎症因子 iNOS、Arg-1、IL-4、IFN-γ 蛋白表达

表 2 各组大鼠 1、7 天炎症因子 iNOS、Arg-1、IFN- γ 、IL-4 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	iNOS	Arg-1	IFN- γ	IL-4
假手术	6	1 天	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
		7 天	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
模型	6	1 天	7.31 \pm 1.11**	1.69 \pm 0.32*	2.94 \pm 0.36**	1.30 \pm 0.33**
		7 天	4.12 \pm 0.79**	2.14 \pm 0.42**	5.96 \pm 0.76**	1.71 \pm 0.27**
针刺	6	1 天	5.24 \pm 0.89 Δ	4.14 \pm 0.67 Δ	2.12 \pm 0.48 Δ	2.72 \pm 0.46 Δ
		7 天	1.82 \pm 0.45 Δ	9.04 \pm 0.77 Δ	2.64 \pm 0.39 Δ	2.63 \pm 0.33 Δ
针刺 + 激动剂阴性对照	6	1 天	5.53 \pm 0.90	4.19 \pm 0.63	2.08 \pm 0.50	2.43 \pm 0.37
		7 天	1.89 \pm 0.36	9.04 \pm 0.51	2.79 \pm 0.40	2.49 \pm 0.41
针刺 + miR-34a-5p 激动剂	6	1 天	6.82 \pm 0.64 Δ°	2.02 \pm 0.42 Δ°	2.61 \pm 0.42 Δ°	1.77 \pm 0.32 Δ°
		7 天	3.37 \pm 0.63 Δ°	5.52 \pm 0.79 Δ°	4.62 \pm 0.66 Δ°	2.04 \pm 0.36 Δ°

注: 与假手术组同期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同期比较, $\Delta P < 0.01$; 与针刺组同期比较, $\Delta P < 0.01$; 与针刺 + 激动剂阴性对照组同期比较, $\circ P < 0.01$

表 3 各组大鼠炎症因子 iNOS、Arg-1、IFN- γ 、IL-4 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	iNOS	Arg-1	IFN- γ	IL-4
假手术	6	1 天	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
		3 天	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
		7 天	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
模型	6	1 天	5.00 \pm 0.15*	1.95 \pm 0.11*	5.56 \pm 0.17*	1.98 \pm 0.12*
		3 天	4.46 \pm 0.50*	2.04 \pm 0.09*	4.17 \pm 0.15*	1.92 \pm 0.02*
		7 天	3.69 \pm 0.13*	2.01 \pm 0.12*	3.01 \pm 0.05*	2.00 \pm 0.13*
针刺	6	1 天	4.01 \pm 0.10 Δ	2.37 \pm 0.13 Δ	4.90 \pm 0.30 Δ	2.58 \pm 0.13 Δ
		3 天	2.30 \pm 0.08 Δ	3.26 \pm 0.06 Δ	2.38 \pm 0.10 Δ	3.23 \pm 0.18 Δ
		7 天	1.71 \pm 0.04 Δ	4.88 \pm 0.17 Δ	1.55 \pm 0.04 Δ	4.47 \pm 0.35 Δ
针刺 + 激动剂阴性对照	6	1 天	4.04 \pm 0.17	2.32 \pm 0.13	4.86 \pm 0.23	2.54 \pm 0.12
		3 天	2.26 \pm 0.10	3.25 \pm 0.12	2.34 \pm 0.05	3.23 \pm 0.04
		7 天	1.73 \pm 0.08	5.09 \pm 0.32	1.47 \pm 0.06	4.45 \pm 0.26
针刺 + miR-34a-5p 激动剂	6	1 天	4.99 \pm 0.26 Δ°	2.02 \pm 0.11 Δ°	5.37 \pm 0.19 Δ°	1.94 \pm 0.04 Δ°
		3 天	3.03 \pm 0.18 Δ°	2.44 \pm 0.09 Δ°	3.40 \pm 0.22 Δ°	2.54 \pm 0.09 Δ°
		7 天	2.19 \pm 0.12 Δ°	3.31 \pm 0.11 Δ°	2.32 \pm 0.09 Δ°	3.22 \pm 0.10 Δ°

注: 与假手术组同期比较, * $P < 0.01$; 与模型组同期比较, $\Delta P < 0.01$; 与针刺组同期比较, $\Delta P < 0.01$; 与针刺 + 激动剂阴性对照组同期比较, $\circ P < 0.01$

Arg-1、IL-4 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$); 与针刺 + 激动剂阴性对照组同期比较, 针刺 + miR-34a-5p 激动剂组 iNOS、IFN- γ 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$), Arg-1、IL-4 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。

2 各组大鼠炎症因子 iNOS、Arg-1、IFN- γ 、IL-4 mRNA 表达水平比较 (表 3) 1、3、7 天 3 个时间点, 与假手术组同期比较, 模型组 iNOS、IFN- γ 、Arg-1、IL-4 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$)。与模型组同期比较, 针刺组 iNOS、IFN- γ mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$), Arg-1、IL-4 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$); 与针刺组同期比较, 针刺 + miR-34a-5p 激动剂组 iNOS、IFN- γ mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$), Arg-1、IL-4 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$); 与针刺 + 激动剂阴性对照组同期比较, 针刺 + miR-34a-5p 激动剂组 iNOS、IFN- γ mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$),

Arg-1、IL-4 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$)。

讨 论

在 ICH 的发生发展过程中, 由小胶质细胞介导的炎性反应是引起脑组织损伤的重要因素, 对于 ICH 的损伤的严重程度、治疗效果及疾病发展的预后情况有十分重要的意义^[16]。

有研究表明, 针灸对 ICH 的治疗效果得到广泛的肯定^[17], 且“百会”透“曲鬓”疗法的效果已经得到实验研究的证实^[18, 19], 针刺治疗能够调节 ICH 后炎症因子表达, 降低对脑组织的损害, 还可对脑组织及血脑屏障修复起到积极作用^[20]。针刺治疗 ICH 的机制可能与改善 ICH 后脑水肿程度^[21], 减轻炎症反应相关^[22]。本课题组在前期研究中发现, 针刺对于促进组织修复与抑制细胞凋亡具有积极意义^[23],

其机制与调控脑组织内碱性成纤维细胞生长因子^[24]，神经细胞生长因子及巢蛋白等相关^[25]，在本课题组的前期临床试验中，“百会”透“曲鬓”疗法对患者日常生活的活动质量、生活依赖性均有改善，其愈显率为 58.33%，总有效率为 91.67%^[26]。

为了进一步在动物水平观察本研究采用的针刺干预对 ICH 的疗效，笔者前期对针刺干预 ICH 模型大鼠 1、3、7 天时进行 Zea-Longa 评分，结果显示干预 1 天时 Zea-Longa 评分无明显变化，而 3、7 天时均降低^[27, 28]；因为炎症反应为 ICH 的主要病理变化，所以还对干预 1、3、7 天时大鼠脑组织进行 HE 染色观察炎症反应，结果显示干预 1、3、7 天时，脑组织炎性细胞浸润均明显减轻，且有时间依赖性，即干预 7 天时炎症反应缓解最为明显^[22, 28]。可见针刺干预对 ICH 模型大鼠的疗效较好，尤其是针对炎症反应。此外，还发现 miR-34a-5p 激动剂可逆转针刺对 ICH 的 Zea-Longa 评分和炎症反应的调节作用。有研究发现 miR-34a-5p 不仅能通过促进线粒体自噬的蛋白表达，加速线粒体自噬引起的神经损伤相关^[25]，还能引起神经细胞发育不良、神经细胞分裂受损^[28]，此外，还可以抑制小胶质细胞向 M2 型极化^[29]。而小胶质细胞是神经系统中重要的免疫细胞，在炎症反应中起到至关重要的作用。研究表明，小胶质细胞能根据大脑环境变化而选择极化为 M1 或 M2 型，M1 型释放促炎因子，加重脑的继发性损伤，是 ICH 后损伤的重要因素，而 M2 型释放抗炎因子，减轻炎症，促进脑组织修复^[30]。基于此，推测针刺能够干预 ICH 的其中一种机制是通过调节小胶质细胞从 M1 型向 M2 型极化，降低炎症反应，减轻神经细胞损害；miR-34a-5p 是调节小胶质细胞极化的一个基因靶点，miR-34a-5p 的过表达可能会抑制小胶质细胞从 M1 向 M2 型转化。

Zhao R 等^[31] 研究中发现，iNOS、IFN- γ 与 IL-4、Arg-1 不仅分别为 M1、M2 型小胶质细胞的极化标志物，这些蛋白的表达情况同时与炎症反应的强度相关，iNOS、IFN- γ 等 M1 型极化标志物表达上调会引起炎症反应增强，而 IL-4、Arg-1 等 M2 型极化标志物则可以降低炎症反应的强度。

为了验证这一假设，本实验选用了 M1 型小胶质细胞标记物 iNOS、IFN- γ 和 M2 型小胶质细胞标记物 IL-4、Arg-1 作为标志物^[11, 28]，通过 RT-PCR 分析及 Western Blot 检测大鼠造模后 1、3 天^[28]、7 天血清中小胶质细胞 M1/M2 型标志物及炎症因子的 mRNA 及蛋白表达水平。通过建立假手术组以模拟手术与干预过程，不进行建模与干预处理，可排除

手术及干预操作对动物的影响。建立针刺 + 激动剂阴性对照组使用 miR-34a-5p 激动剂的阴性对照物处理动物，用于排除激动剂处理过程对动物的影响。将其与针刺 + miR-34a-5p 激动剂组进行对照，观察针刺干预 ICH 过程中 miR-34a-5p 的作用。研究结果显示：大鼠在 ICH 造模后，血液中炎症因子 iNOS、Arg-1、IFN- γ 、IL-4 mRNA 及蛋白表达水平均有升高，炎症反应在 ICH 后即刻发生，小胶质细胞被激活，同时向 M1、M2 型极化，参与炎症反应。在接受针刺干预后，ICH 大鼠血清中 M1 型细胞标志物 iNOS 及 IFN- γ mRNA 及蛋白表达水平均明显低于 ICH 组，M2 型细胞标志物 Arg-1 和 IL-4 mRNA 及蛋白表达水平则明显高于 ICH 组。说明针刺“百会”透“曲鬓”疗法能抑制小胶质细胞向 M1 型极化，促进小胶质细胞向 M2 型极化，减轻 ICH 后炎症反应，保护脑组织，改善疾病预后。而人为向脑组织中增加 miR-34a-5p 后，抗炎因子的表达降低，促炎因子的表达升高，说明过表达的 miR-34a-5p 可能会加重 ICH 大鼠抑制小胶质细胞向 M2 型极化，加重炎症反应与继发性损伤，抑制针刺的疗效。

综上所述，本研究通过自体血脑内注射建立大鼠 ICH 模型，检测“百会”透“曲鬓”针刺疗法对大鼠 ICH 后炎症因子表达水平，发现针刺能够降低 ICH 后炎症因子表达水平，提高抗炎因子表达水平，抑制小胶质细胞向 M1 型极化，促进小胶质细胞向 M2 型极化，减轻 ICH 后炎症反应，过表达的 miRNA-34a-5p 则对针刺起到的疗效有抑制作用。

利益冲突：所有作者声明无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会神经病学分会，中华医学会神经病学分会脑血管病学组．中国脑出血诊治指南（2019）[J]．中华神经科杂志，2019，52（12）：994-1005．
- [2] 张锐毅，张艳，刘扬，等．脑出血中的神经炎症与药物治疗前景[J]．中华脑血管病杂志（电子版），2021，15（2）：70-76．
- [3] Zhu H, Wang Z, Yu J, et al. Role and mechanisms of cytokines in the secondary brain injury after intracerebral hemorrhage[J]. Prog Neurobiol, 2019, 178: 101610.
- [4] 陈勇安，梁洪生，王森，等．脑出血后病理生理机制的研究进展[J]．解剖科学进展，2021，27（3）：381-384．
- [5] 张亮，张凤岐，郑贵超，等．血清 miRNA 的表达对急性脑出血患者神经功能重建的指导价值[J]．临床血液

- 学杂志, 2020, 33 (12): 835-839.
- [6] 朱艳玲, 孙强, 郝文莉, 等. 外周血 miR-34a、SIRT1 水平与脑梗死后认知功能障碍的关系 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19 (16): 2721-2726.
- [7] 向成明, 周桂银, 侯小红, 等. microRNAs 在中枢神经系统疾病神经炎症中的研究进展 [J]. 山西医科大学学报, 2021, 52 (2): 235-239.
- [8] 班维固, 滕秀英, 齐辉. 针灸疗法调控 microRNA 在基础实验中应用的研究进展 [J]. 中医药导报, 2021, 27 (7): 138-142, 147.
- [9] 杨奇, 史清海, 牛莉莉, 等. 脑出血疾病患者脑脊液中 NSE、S100 β 及 miR-124-3p、miR-146a-5p 检测的临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40 (11): 1302-1307.
- [10] 李传鸿, 俞兴, 杨永栋, 等. 脊髓损伤中的小胶质细胞:M1/M2 表型极化发挥神经毒性/神经保护作用 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26 (14): 2265-2272.
- [11] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration[J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35: 441-468.
- [12] 米茹麟, 薛国芳. 小胶质细胞介导的神经炎症在缺血性脑卒中的双相作用 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2020, 28 (9): 591-594.
- [13] Chen H, Xiao H, Gan H, et al. HIF-2 α promotes angiogenesis via VEGF/Notch1 pathway and exerts neuroprotective effects after intracerebral haemorrhage injury[J]. *Neuroscience*, 2020, 448: 206-218.
- [14] Ma J, Bao L, Xia X, et al. miR-128b promotes cerebral infarction by regulating the expressions of BCL-2 and CAPASE3[J]. *World Neurosurg*, 2019, 123: e245-e251.
- [15] 华兴邦, 李辞荣, 周浩良, 等. 大鼠穴位图谱的研制 [J]. 实验动物与动物实验, 1991, (1): 1-5.
- [16] 胡晓萍, 高海华, 郑兴媛, 等. 不同时间出现的 CT 脑灌注“点征”预测自发性脑内出血患者预后的临床研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21 (19): 221-222.
- [17] 孙庆钰, 张素梅. 针刺对脑出血术后患者神经功能及自理能力的影响 [J]. 光明中医, 2021, 36 (6): 966-968.
- [18] 陈秋欣, 邹伟, 孙晓伟, 等. 针刺“百会”透“曲鬓”穴拮抗急性脑出血大鼠炎症损伤的机制研究 [J]. 针刺研究, 2016, 41 (5): 410-416.
- [19] 包宇, 邹伟. 针刺“百会”透“曲鬓”对脑出血急性期大鼠 PI3K 和 p-AKT 表达的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2016, 32 (9): 86-88.
- [20] 陈秋欣, 孔莹, 于婷婷, 等. 针刺“百会”透“曲鬓”穴对急性脑出血大鼠血肿及 CD36、HO-1 表达的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2021, 37 (8): 59-63.
- [21] 刘晓莹, 邹伟, 于学平. 针刺“百会”透“曲鬓”对 ICH 大鼠脑水含量及 IL-1 β mRNA 表达的影响 [J]. 中医药信息, 2018, 35 (2): 79-82.
- [22] 李丹, 万思琦, 殷岳杉, 等. 针刺对大鼠脑出血神经细胞凋亡变性的影响及机制探究 [J]. 针灸临床杂志, 2021, 37 (11): 56-62.
- [23] Zhang B, Dai XH, Yu XP, et al. Baihui (DU20) - penetrating-Qubin (GB7) acupuncture inhibits apoptosis in the perihemorrhagic penumbra[J]. *Neural Regene Res*, 2018, 13 (9): 1602-1608.
- [24] 李丹, 邹伟, 王珑, 等. 针刺对实验性脑出血大鼠脑组织 GDNF 和 nestin 表达的影响 [J]. 中医药学报, 2013, 41 (4): 55-57.
- [25] 李丹, 邹伟, 王珑, 等. 针刺对实验性脑出血大鼠脑组织 bFGF 表达的影响 [J]. 中医药信息, 2012, 29 (4): 127-128.
- [26] 邹伟, 李丹, 于学平, 等. 针刺治疗急性期高血压脑出血的临床研究 [J]. 中医药信息, 2009, 26 (5): 104-105.
- [27] 李丹, 朱曦, 邓晓丰, 等. 针刺“百会”透“曲鬓”通过 miR-34a-5p/KLF4 信号通路治疗脑出血大鼠的机制研究 [J]. 针灸临床杂志, 2022, 38 (12): 65-71.
- [28] Li D, Zhao Y, Bai P, et al. Baihui (DU20) - penetrating-Qubin (GB7) acupuncture regulates microglia polarization through miR-34a-5p/Klf4 signaling in intracerebral hemorrhage rats[J]. *Exp Anim*, 2021, 70 (4): 469-478.
- [29] Tai Y, Pu M, Yuan L, et al. miR-34a-5p regulates PINK1-mediated mitophagy via multiple modes[J]. *Life Sci*, 2021, 276: 119415.
- [30] Wang H, Ma Z, Shen H, et al. Early life irradiation-induced hypoplasia and impairment of neurogenesis in the dentate gyrus and adult depression are mediated by microRNA-34a-5p/T-cell intracytoplasmic antigen-1 pathway[J]. *Cells*, 2021, 10 (9): 2476.
- [31] Zhao R, Ying M, Gu S, et al. Cysteinyl leukotriene receptor 2 is involved in inflammation and neuronal damage by mediating microglia M1/M2 polarization through NF- κ B pathway[J]. *Neuroscience*, 2019, 422: 99-118.

(收稿: 2021-12-28 在线: 2023-08-25)

责任编辑: 白霞