

文章编号: 1005-0957 (2024) 05-0561-08

• 动物实验 •

针刺百会透曲鬓对脑内出血大鼠脑组织 CD32、CD206 蛋白表达水平的影响

李龙, 李丹, 朱曦, 邓晓丰

(北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029)

【摘要】 目的 观察针刺百会透曲鬓对脑内出血(intracerebral hemorrhage, ICH)大鼠 CD32、CD206 蛋白表达水平的影响,探讨其作用机制。**方法** 将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为 A 组(假手术组)、B 组(模型组)、C 组(治疗 1 组)、D 组(治疗 2 组)和 E 组(治疗 3 组),每组 12 只。每组再随机分造模后 1 d 和 7 d 两个亚组,每组 6 只。采用自体血注入尾壳核法制取 ICH 模型。造模 12 h 后,C 组采用针刺百会透曲鬓治疗;D 组在造模前 3 d 注射 miR-34a-5p agomir-NC,造模 12 h 后采用针刺百会透曲鬓治疗;E 组在造模前 3 d 注射 miR-34a-5p agomir,造模 12 h 后采用针刺百会透曲鬓治疗。1 d 亚组疗程为 1 d,7 d 亚组疗程为 7 d。于相应时间点进行神经功能评分,处死大鼠后收集血肿周围脑组织,使用蛋白质印迹分析和免疫荧光双染检测血肿周围脑组织中 CD32、CD206 蛋白表达水平、CD32+/Iba-1+和 CD206+/Iba-1+双阳性细胞计数变化。**结果** 造模后 7 d 时,与 B 组比较,C 组 ICH 大鼠 Longa 评分降低($P<0.01$);与 C 组比较,E 组 ICH 大鼠 Longa 评分升高($P<0.05$)。造模后 1 d、7 d 两个时间点,与 A 组比较,B 组 ICH 大鼠 CD32、CD206 蛋白表达水平及 CD32+/Iba-1+、CD206+/Iba-1+双阳性细胞数量均升高($P<0.01$);与 B 组比较,C 组 ICH 大鼠 CD32 蛋白表达水平及 CD32+/Iba-1+双阳性细胞数量均降低,CD206 蛋白表达水平升高,差异均具有统计学意义($P<0.01$);与 C 组和 D 组比较,E 组 ICH 大鼠 CD32 蛋白表达水平及 CD32+/Iba-1+双阳性细胞数量均升高,CD206 蛋白表达水平均降低,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。造模后 7 d 时,与 B 组比较,C 组 ICH 大鼠 CD206+/Iba-1+双阳性细胞数量升高($P<0.01$);与 C 组和 D 组比较,E 组 ICH 大鼠 CD206+/Iba-1+双阳性细胞数量均降低,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 针刺百会透曲鬓能抑制 ICH 大鼠脑组织 CD32 的蛋白表达,并促进 CD206 的蛋白表达,可减轻炎症反应,提高机体抗炎能力,缓解神经损伤。

【关键词】 针刺疗法;脑内出血;炎症反应;CD32;CD206;大鼠

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2024.05.0561

Effects of needling Baihui (GV20) toward Qubin (GB7) on the protein expression of CD32 and CD206 in the brain tissue of cerebral hemorrhage rats LI Long, LI Dan, ZHU Xi, DENG Xiaofeng. *Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China*

[Abstract] Objective To discuss the effects of needling Baihui (GV20) toward Qubin (GB7) on the protein expression of CD32 and CD206 in the brain tissue of intracerebral hemorrhage (ICH) rats and discuss the mechanism.

Method Sixty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomized into group A (sham operation group), group B (model group), group C (treatment group 1), group D (treatment group 2), and group E (treatment group 3), with 12 rats in each group. Each group was then further randomized into post-modeling 1 d and 7 d subgroups, each consisting of 6

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82174514);中国博士后科学基金项目(2020M670940);黑龙江省博士后面项目(LBH-Z19034)

作者简介: 李龙(1998—),男,2021 级硕士生,Email:735145034@qq.com

通信作者: 李丹(1980—),女,副主任医师,主要从事针刺治疗脑血管疾病的临床与实验研究,Email:3509437@qq.com

rats. The ICH model was prepared by autologous blood injection into the caudate putamen. Group C began to receive needling Baihui toward Qubin 12 h after modeling; group D received the injection of miR-34a-5p agomir-NC 3 d before modeling and received needling from Baihui toward Qubin 12 h after modeling; group E received the injection of miR-34a-5p agomir 3 d before modeling and received needling from Baihui toward Qubin 12 h after modeling. The intervention lasted 1 d in the 1 d subgroups, and the intervention lasted 7 d in the 7 d subgroups. The neurologic function was scored at the corresponding time points. The brain tissues around the hematoma were collected after the sacrifice of rats. Western blot analysis and double Immunofluorescence staining were used to detect the protein expression of CD32 and CD206 and double positive cell counts of CD32 + /Iba-1 + and CD206 + /Iba-1 + in the brain tissue around the hematoma. **Result** Seven days after modeling, compared with group B, rats in group C had a lower Longa score ($P < 0.01$); compared with group C, group E had a higher Longa score ($P < 0.05$). At the two time points after modeling, 1 d and 7 d, compared with group A, rats in group B had higher expression levels of CD32 and CD206 proteins and larger double positive cell counts of CD32 + /Iba-1 + and CD206 + /Iba-1 + ($P < 0.01$); compared with group B, rats in group C had a lower protein expression level of CD32, smaller double positive cell counts of CD32 + /Iba-1 +, and an increased CD206 protein expression level, all showing statistical significance ($P < 0.01$); compared with groups C and D, the protein expression of CD32 and double positive cell counts of CD32 + /Iba-1 + increased, and the protein expression level of CD206 dropped in group E, presenting statistical significance ($P < 0.01$). Seven days after modeling, compared with group B, the double positive cell counts of CD206 + /Iba-1 + increased in group C ($P < 0.01$); compared with groups C and D, the double positive cell counts of CD206 + /Iba-1 + decreased in group E, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Needling from Baihui toward Qubin can inhibit the protein expression of CD32 and promote the protein expression of CD206 in the brain tissue, reduce inflammatory responses, enhance anti-inflammation function, and mitigate neurologic injuries in ICH rats.

[Key words] Acupuncture therapy; Intracerebral hemorrhage; Inflammatory responses; CD32; CD206; Rats

脑内出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是一种具有高发病、高致残、高死亡率特点的疾病,其发病率占全球脑卒中病例的 10%~30%,1 年生存率约 40%^[1-2]。ICH 患者的复发风险极高,并会增加患者发生血管病变、癫痫、痴呆的风险^[3]。目前尚无应对 ICH 这一疾病统一、规范的治疗方法,因此这一疾病严重危害人们的生命健康。ICH 对神经的损害可分为原发和继发损害两类。研究发现,在继发损害中,可以通过调节小胶质细胞极化,减轻小胶质细胞介导的炎性反应及继发损伤^[4]。小胶质细胞在炎性反应中起到双向调节的作用,既可以分泌促炎因子介导炎性反应,也可以通过吞噬作用清除坏死组织、血肿等病理产物^[5]。而炎性反应则是加重脑组织损伤、破坏血脑屏障,甚至引起脑部神经死亡等严重后果的重要原因^[6]。CD32 和 CD206 分别为 M1 型促炎小胶质细胞和 M2 型抗炎小胶质细胞的常用表面标志物,二者相互拮抗,能较好地反应出 ICH 后小胶质细胞的极化状态,进一步反应 ICH 后炎性反应及抗炎反应的强度变化^[7]。现有研究^[8]发现,

有众多 miRNA 参与到调控小胶质细胞调控炎性反应的过程中,是脑卒中后神经功能损害的独立危险因素之一。本课题组前期研究发现,miR-34a-5p 能够调节小胶质细胞极化,参与炎性反应^[9-12]。针刺百会透曲鬓疗法对改善 ICH 预后的作用已得到许多实验的证实^[13-14],但其改善 ICH 预后的机理尚不明确。因此,本研究通过 Longa 评分评估 ICH 大鼠神经功能损伤情况^[12];通过选取炎性因子 CD32 与抗炎因子 CD206,并分析针刺百会透曲鬓疗法和 miR-34a-5p 含量对 CD32、CD206 蛋白表达水平与 CD32+/Iba-1+、CD206+/Iba-1+ 双阳性细胞数量的影响,探讨针刺百会透曲鬓对 ICH 治疗的作用机理及影响机制,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 60 只清洁级健康雄性 SD 大鼠,体质量 250~300 g,3 月龄。大鼠分笼饲养,自由饮食。用随机数字表法将大鼠随机分为 A 组(假手术组)、B 组(模型组)、

C 组(治疗 1 组)、D 组(治疗 2 组)和 E 组(治疗 3 组), 每组 12 只。每组再随机分 1 d 和 7 d 两个亚组, 每组 6 只。本实验经北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分会审批通过(伦理编号 BUCM-4-2021122002-4016)。

1.2 主要仪器及试剂

DH36001B 型电热恒温培养箱(天津泰斯特)、NW10LVF 型超纯水系统(中国 Heal Force)、BX53 型显微镜(日本 OLUMPUS)、DP73 型显微镜拍照系统(日本 OLUMPUS)、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)、Proline 型微量移液器(苏州 BIOHIT)、H-2050R 型超速冷冻离心机(湖南湘仪)、ELX-800 型酶标仪(美国 BIOTEK)、Iba-1 antibody(ab178847, 英国 Abcam)、CD32 antibody(sc-166711, 美国 Santa)、DAPI(D106471-5mg, 中国阿拉丁)、山羊血清(SL038, 中国 Solarbio)、抗荧光淬灭剂(S2100, 中国 Solarbio)、FITC 标记山羊抗兔 IgG(绿光)(A0562 中国 Beyotime)、Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(红光)(A0521, 中国 Beyotime)、RIPA 裂解液(强)(P0013B, 中国 Beyotime)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0009, 中国 Beyotime)、30% Acr-Bis(29:1)(ST003, 中国 Beyotime)、PMSF(ST506, 中国 Beyotime)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(P0015, 中国 Beyotime)、ECL 发光液(E003, 中国 7 Sea biotech)、预染蛋白分子量标准(26616, 加拿大 Fermentas)、PVDF 膜(LC2005, 美国 Thermo Fisher Scientific)、BSA(BS043, 中国 Biosharp)、CD206 antibody(60143-1-Ig, 中国 Proteintech)、羊抗兔 IgG(SA00001-2, 中国 Proteintech)、羊抗小鼠 IgG(SA00001-1, 中国 Proteintech)、内参抗体 β -actin(60008-1-Ig, 中国 Proteintech)、miR-34a-5p agomir-NC(苏州吉玛基因)、miR-34a-5p agomir(苏州吉玛基因)。

1.3 模型制作

ICH 模型运用自体血注入尾壳核法制取^[15], 于禁食 12 h 和禁水 6 h 后造模。本研究使用自体血注射, 依照大鼠立体定位图谱, 向大鼠腹腔注射 60 mg/kg 戊巴比妥钠。将麻醉大鼠俯卧位固定在立体定位仪上, 在大鼠两侧骨性外耳道中插入耳杆, 并使得大鼠门齿在门齿孔上定位。调整高度保证大鼠的前囟点和人字点位于水平位置。以两耳尖连线中点为标志, 进行备

皮、消毒、切口, 钝性分离皮下骨膜后, 充分暴露前囟点及冠状缝, 使用立体定位仪定位坐标(前囟点为中心, 右侧 3.5 mm, 后侧 0.2 mm)。用 1.0 mm 直径的钻头钻孔至硬脑膜表面, 以落空感停止为度, 但要注意避免穿孔过深, 从而损伤脑组织。在对鼠尾进行消毒后, 由实验人员在距尾端 3 cm 处剪断, 这时采血 50 μ L, 将大鼠重新固定在立体定位仪上, 以 20 μ L/min 注入自体血, 针头刺入深度 6 mm, 留针 5 min 后缓慢出针。最后为大鼠断尾处消毒包扎, 用青霉素抗菌处理, 将颅骨钻孔用牙科水泥密封, 使用碘伏消毒, 缝合伤口, 防止感染。

1.4 干预方法

1.4.1 A 组

开皮、钻孔、注射生理盐水、缝合, 对大鼠进行与 C 组相同的捆绑。每日 1 次, 每次 30 min。

1.4.2 B 组

复制 ICH 模型, 造模 12 h 后对大鼠进行与 C 组相同的捆绑。每日 1 次, 每次 30 min。

1.4.3 C 组

ICH 造模后 12 h 给予针刺治疗。参照《实验动物穴位图谱》进行针刺部位选择, 取大鼠百会(顶骨正中)及患侧曲鬓(眶外缘与外耳口连线的后 2/3)。局部常规消毒后, 采用 0.25 mm $\times$ 13 mm 毫针由百会向曲鬓透刺, 施以快速捻转手法(200 r/min)5 min, 后每隔 5 min 操作 1 次, 共留针 30 min。每 24 h 针刺 1 次。

1.4.4 D 组

将购买的 miR-34a-5p agomir-NC 稀释后取 5 μ L 联合 12.5 μ L 转染试剂于造模前 3 d 行侧脑室(前囟后 0.8 mm, 中缝右 1.5 mm, 头骨表面以下 4.5 mm 深)注射。造模后 12 h 给予针刺治疗, 取穴、操作方法同 C 组。

1.4.5 E 组

将购买的 miR-34a-5p agomir 稀释后取 5 μ L 联合 12.5 μ L 转染试剂于造模前 3 d 行侧脑室注射。造模后 12 h 给予针刺治疗, 取穴、操作方法同 C 组。

1.5 观察指标

1.5.1 神经功能缺损评分^[12]

于造模后 1 d、7 d 对大鼠进行神经功能测评, 用 Zea Longa 神经功能评分方法对各组大鼠进行神经功能缺损评分^[16]。0 分为大鼠活动正常; 1 分为大鼠离地时前爪伸展障碍; 2 分为大鼠爬行时向左转圈; 3 分为大鼠爬行时向左倾倒; 4 分为大鼠不能自发行走。

1.5.2 包埋切片

大鼠处死后,将其全脑进行分离,距注血点前后各2 mm 冠状面切下,此4 mm 脑组织为血肿周围组织。将取出的血肿周围脑组织放入由低到高浓度的乙醇中脱水,移入二甲苯+石蜡中进行透蜡,制成标本蜡块。将标本蜡块切成5 μm 薄片,放入温水中展开。在载玻片上放置展开完毕的组织切片,60℃温箱烘干切片,完成切片制作。

1.5.3 免疫荧光双染检测 CD32+/Iba-1+、CD206+/Iba-1+双阳性细胞数量

使用山羊血清将上述血肿周围脑组织切片封闭15 min,弃封闭液。滴加一抗(Iba1 1:300、CD32 1:50、CD206 1:200),4℃培养过夜。在PBS中浸泡后滴加荧光二抗(FITC 标记山羊抗兔 IgG 1:200、Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG 1:200),室温下孵育90 min。再次在PBS浸泡后,使用DAPI复染核。在400倍放大的荧光显微镜下随机选取3个视野拍照。通过共染细胞计数进行定量。

1.5.4 蛋白质印迹分析检测 CD32、CD206 蛋白表达

RIPA 裂解缓冲液提取大鼠血肿周围脑组织中的总蛋白,BCA 试剂盒进行蛋白质定量分析。电流最大,电压80 V条件下进行SDS-PAGE,恒压电泳2.5 h,转印,封闭。在夜间4℃环境下,加入一抗(CD32 1:500、CD206 1:1 000)孵育过夜;在37℃的环境,加入二抗(羊抗小鼠 IgG-HRP 1:10000、羊抗兔 IgG-HRP 1:1 0000)孵育40 min。完成后进行ECL底物发光,在Gel-Pro分析系统中运用荧光试剂盒进行可视化展示。以 β -肌动蛋白(1:2 000)作为内参照物。

1.6 统计学方法

采用SPSS19.0统计软件对本实验数据进行归纳

整理。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析;组间两两比较时,方差齐采用LSD检验,方差不齐则采用Games Howell 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 针刺百会透曲鬓对 ICH 大鼠 Longa 评分的影响^[12]

A 组大鼠 Longa 评分为0分。与A组比较,B组 ICH 大鼠 Longa 评分升高($P<0.01$),表明造模成功。造模后7 d时,与B组比较,C组 ICH 大鼠 Longa 评分降低($P<0.01$);与C组比较,E组 ICH 大鼠 Longa 评分升高($P<0.05$)。

2.2 针刺百会透曲鬓对 ICH 大鼠血肿周围脑组织 CD32 蛋白表达水平的影响

由表1、图1所示,造模后1 d、7 d两个时间点,与A组比较,B组 ICH 大鼠 CD32 蛋白表达水平升高($P<0.01$);与B组比较,C组 ICH 大鼠 CD32 蛋白表达水平降低($P<0.01$);与C组比较,E组 ICH 大鼠 CD32 蛋白表达水平升高($P<0.01$);与D组比较,E组 ICH 大鼠 CD32 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。

表1 各组 ICH 大鼠血肿周围脑组织 CD32 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	造模后 1 d	造模后 7 d
A 组	6	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
B 组	6	5.26 $\pm$ 0.69 ¹⁾	4.85 $\pm$ 0.42 ¹⁾
C 组	6	3.64 $\pm$ 0.37 ²⁾	1.54 $\pm$ 0.31 ²⁾
D 组	6	3.82 $\pm$ 0.51	1.54 $\pm$ 0.27
E 组	6	4.97 $\pm$ 0.58 ³⁾⁴⁾	2.23 $\pm$ 0.30 ³⁾⁴⁾

注:与A组比较¹⁾ $P<0.01$;与B组比较²⁾ $P<0.01$;与C组比较³⁾ $P<0.01$;与D组比较⁴⁾ $P<0.01$ 。

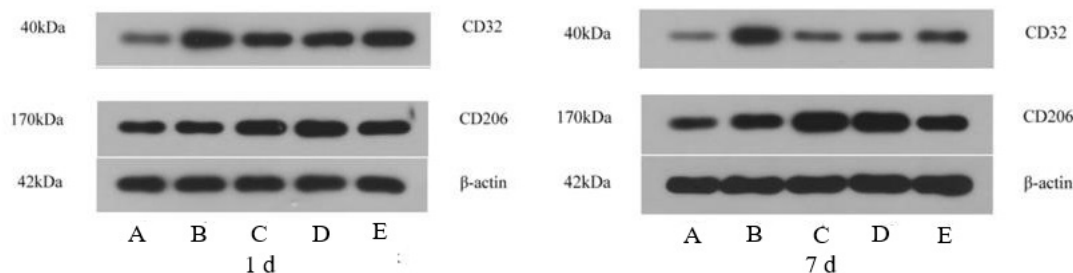


图1 造模后1 d、7 d时 ICH 大鼠血肿周围脑组织 CD32、CD206 蛋白质灰度分析

2.3 针刺百会透曲鬓对 ICH 大鼠血肿周围脑组织 CD206 蛋白表达水平的影响

由表2、图1所示,造模后1 d、7 d两个时间点,

与A组比较,B组 ICH 大鼠 CD206 蛋白表达水平升高($P<0.01$);与B组比较,C组 ICH 大鼠 CD206 蛋白表达水平升高($P<0.01$);与C组比较,E组 ICH 大鼠 CD206

蛋白表达水平降低($P<0.01$);与 D 组比较, E 组 ICH 大鼠 CD206 蛋白表达水平降低($P<0.01$)。

表 2 各组 ICH 大鼠血肿周围脑组织 CD206 蛋白水平比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	造模后 1 d	造模后 7 d
A 组	6	1.00±0.00	1.00±0.00
B 组	6	1.15±0.43 ¹⁾	1.98±0.42 ¹⁾
C 组	6	1.86±0.46 ²⁾	4.22±0.58 ²⁾
D 组	6	2.22±0.40	3.73±0.52
E 组	6	1.58±0.26 ³⁾⁴⁾	2.02±0.41 ³⁾⁴⁾

注:与 A 组比较 ¹⁾ $P<0.01$;与 B 组比较 ²⁾ $P<0.01$;与 C 组比较 ³⁾ $P<0.01$;与 D 组比较 ⁴⁾ $P<0.01$ 。

2.4 针刺百会透曲鬓对 ICH 大鼠血肿周围脑组织 CD32+/Iba-1+双阳性细胞数量的影响

由表 3、图 2、图 3 所示,造模后 1 d、7 d 两个时间点,与 A 组比较, B 组 ICH 大鼠 CD32+/Iba-1+双阳性

细胞数量升高($P<0.01$);与 B 组比较, C 组 ICH 大鼠 CD32+/Iba-1+双阳性细胞数量降低($P<0.01$);与 C 组相比, E 组 ICH 大鼠 CD32+/Iba-1+双阳性细胞数量升高($P<0.01$);与 D 组相比, E 组 ICH 大鼠 CD32+/Iba-1+双阳性细胞数量升高($P<0.01$)。

表 3 各组 ICH 大鼠血肿周围脑组织 CD32+/Iba-1+双阳性细胞计数比较($\bar{x} \pm s$)单位:个·mm⁻²

组别	<i>n</i>	造模后 1 d	造模后 7 d
A 组	6	0.67±0.82	0.33±0.52
B 组	6	12.67±1.75 ¹⁾	10.17±1.72 ¹⁾
C 组	6	6.83±1.17 ²⁾	2.83±0.75 ²⁾
D 组	6	6.67±1.03	3.00±0.63
E 组	6	9.17±1.33 ³⁾⁴⁾	4.83±0.75 ³⁾⁴⁾

注:与 A 组比较 ¹⁾ $P<0.01$;与 B 组比较 ²⁾ $P<0.01$;与 C 组比较 ³⁾ $P<0.01$;与 D 组比较 ⁴⁾ $P<0.01$ 。

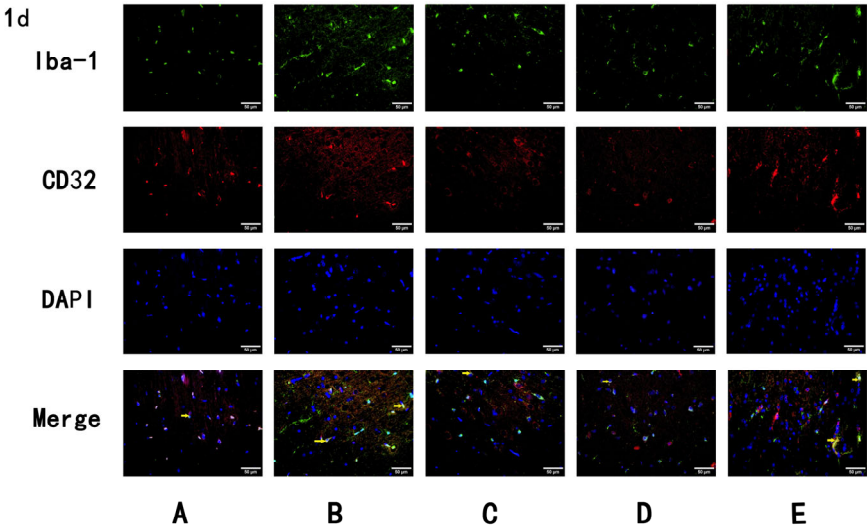


图 2 造模后 1 d 时各组 ICH 大鼠血肿周围脑组织靶向 CD32、Iba-1 荧光染色观察(×400)

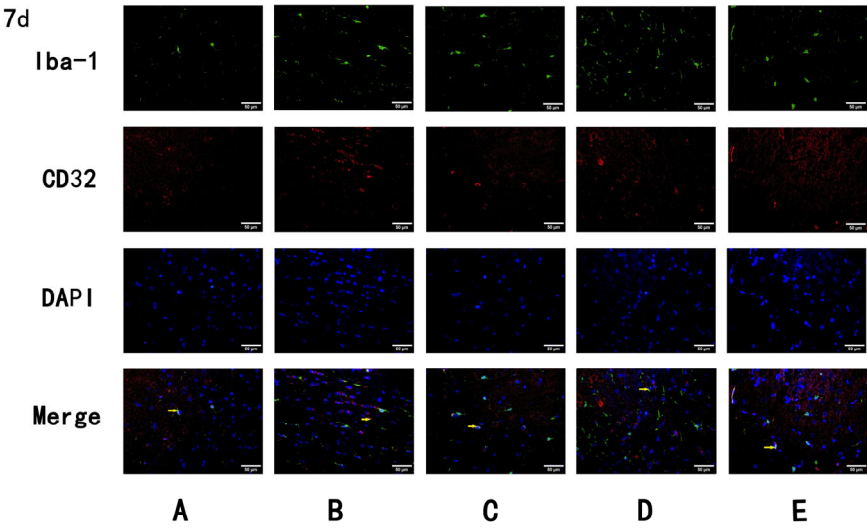


图 3 造模后 7 d 时各组 ICH 大鼠血肿周围脑组织靶向 CD32、Iba-1 荧光染色观察(×400)

2.5 针刺百会透曲鬓对 ICH 大鼠血肿周围脑组织 CD206+/Iba-1+双阳性细胞数量的影响

由表 4、图 4、图 5 所示,造模后 1 d、7 d 两个时间点,与 A 组比较,B 组 ICH 大鼠 CD206+/Iba-1+双阳性细胞数量明显升高($P<0.01$)。造模后 7 d 时,与 B 组比较,C 组 ICH 大鼠 CD206+/Iba-1+双阳性细胞数量升高($P<0.01$);与 C 组比较,E 组 ICH 大鼠 CD206+/Iba-1+双阳性细胞数量降低($P<0.01$);与 D 组相比,E 组 ICH 大鼠 CD206+/Iba-1+双阳性细胞数量降低($P<0.01$)。

表 4 各组 ICH 大鼠血肿周围脑组织 CD206+/Iba-1+双阳性细胞计数比较($\bar{x} \pm s$) 单位:个·mm⁻²

组别	<i>n</i>	造模后 1 d	造模后 7 d
A 组	6	1.00±0.89	0.67±0.52
B 组	6	6.83±1.17 ¹⁾	2.50±0.55 ¹⁾
C 组	6	7.83±1.17	4.67±0.82 ²⁾
D 组	6	7.50±1.52	3.83±0.75
E 组	6	6.83±1.17	2.67±0.52 ³⁾⁴⁾

注:与 A 组比较 ¹⁾ $P<0.01$;与 B 组比较 ²⁾ $P<0.01$;与 C 组比较 ³⁾ $P<0.01$;与 D 组比较 ⁴⁾ $P<0.01$ 。

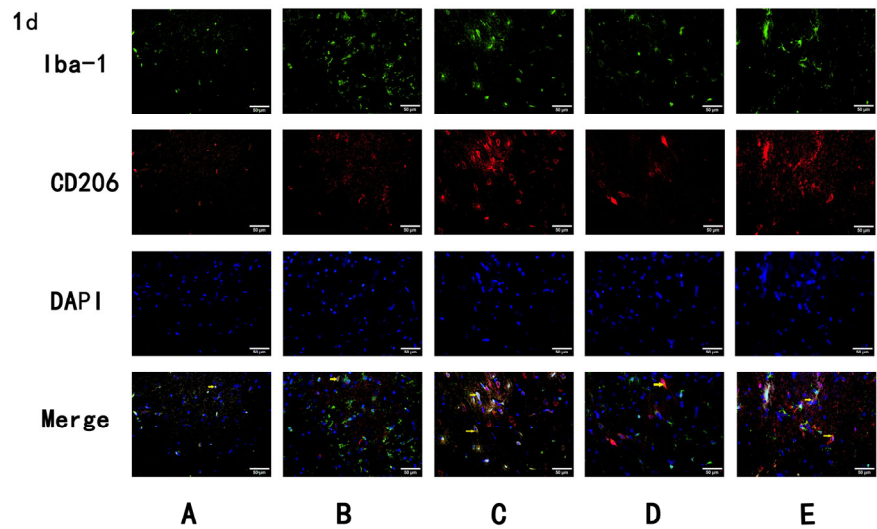


图 4 造模后 1 d 时各组 ICH 大鼠血肿周围脑组织靶向 CD206、Iba-1 荧光染色观察(×400)

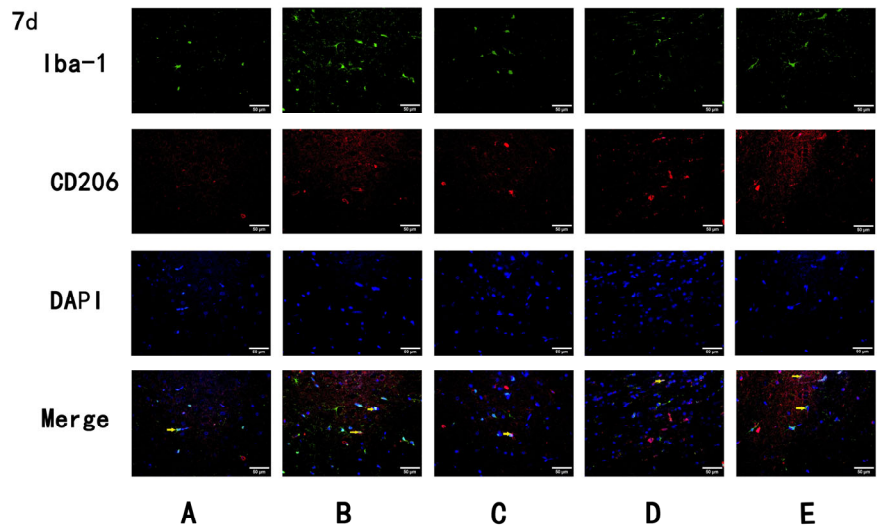


图 5 造模后 7 d 时各组 ICH 大鼠血肿周围脑组织靶向 CD206、Iba-1 荧光染色观察(×400)

3 讨论

在 ICH 的治疗方法中,针刺在长时间的临床运用中表现出疗效稳定、施术便捷、安全性佳的特点^[13-14]。百会透曲鬓穴组又称为顶颞后斜线,是一组自督脉开始,横跨足太阳膀胱经,止于足少阳胆经的穴位。百会

位于巅顶,总络一身气机,可通达阴阳,调理升降;曲鬓则为足少阳、足太阳经络交会穴,可以调畅气血经络,采用此组穴位,能够调节周身气机,使经络气血通畅,达到治疗中风所致四肢痿痹、偏枯喎斜之功。

在 ICH 后引发神经损伤的过程中,引起损伤的主

要机制分为两种,其一为原发性损伤,即出血后由血肿引起的占位、压迫等直接机械性损伤;其二为继发性损伤,即血液凝固、降解后释放的多种降解产物引起炎症反应、周围组织水肿等,继发性损伤可进一步加重,引起神经元死亡等严重后果^[15-17]。炎症反应可导致多种炎症因子如白介素、肿瘤坏死因子等释放,是引起神经损伤的重要因素,而神经细胞的死亡又能引起新一轮炎症因子的释放,此种恶性循环使继发性损伤的严重程度远大于原发性损伤^[18]。因此,尽早降低炎症反应程度,减轻或极力避免继发损伤恶性循环的发生,是减轻 ICH 后损伤的一条可行的道路。

CD32 是一种低亲和力的 IgG 受体^[19],是 Fc γ R 家族的一员,其在巨噬细胞上高表达,在单核细胞上低表达。近期的研究发现,CD32 在哮喘、慢性阻塞性肺疾病、乳腺浸润性导管癌中的表达增加,且与致病、疾病发展、复发相关^[20];在肾脏疾病中可以诱导白介素-6 等多种炎症因子的生成,强化炎症反应,引起损害,且其表达与 C 反应蛋白具有相关性^[21]。CD32 在中风、癫痫等脑部疾病发生后表达增加,其与免疫球蛋白 G 结合后,可强化巨噬细胞的吞噬能力,加重炎症反应^[22]。

巨噬细胞甘露糖受体 CD206 常作为 M2 型小胶质细胞或 N2 型中性粒细胞的标记物^[23],CD206+ 阳性细胞在 ICH 后表达增加^[24],BAI XJ 等^[25]研究表明,CD206+ 阳性细胞是 CX3VL1 发挥保护脑卒中后损伤的目标细胞,其细胞数量增加说明了脑组织中炎症反应降低,神经细胞得到保护。以上说明 CD206 的表达增加与组织抗炎修复作用相关。因此,笔者推测通过调节 ICH 后炎症反应的程度、降低炎症反应强度、提高抗炎反应强度是针刺治疗改善 ICH 预后的途径之一。

在本课题组的前期研究中,笔者发现 miR-34a-5p 参与到小胶质细胞极化的调控过程中,与炎症反应的增强成正相关^[9-12]。同时,现有研究还发现,miR-34a-5p 可以通过加快线粒体自噬,引起神经损伤^[26]。Iba-1 作为小胶质细胞的标志物,能特异性观察小胶质细胞的激活状态。为了验证假设,实验用 Longa 评分评估 ICH 大鼠神经损伤情况,通过 CD32 蛋白表达水平及 CD32+/Iba-1+ 双阳性细胞的表达情况反应炎症反应程度,用 CD206 蛋白表达水平及 CD206+/Iba-1+ 双阳性细胞的表达情况反应抗炎反应程度,以了解炎症反应强度及抗炎反应强度的变化。并通过人工使 miR-34a-5p 过表达验证该 miRNA 对 CD32、CD206 表达水平及

CD32+/Iba-1+ 双阳性细胞、CD206+/Iba-1+ 双阳性细胞数量的影响及针刺百会透曲髌疗法治疗 ICH 的作用机制。

本实验结果显示,ICH 造模后 Longa 评分升高,说明造模成功。C 组 ICH 大鼠相较于 B 组,Longa 评分降低,提示百会透曲髌针刺治疗能缓解 ICH 后神经损伤。D 组相较于 C 组评分无明显差异,证明二次注射对实验无明显影响。E 组相较于 C 组,Longa 评分升高,表明过表达 miR-34a-5p 会加重 ICH 神经损伤^[12]。在 ICH 造模后,CD32、CD206 蛋白表达水平均有上升,且 CD32+/Iba-1+ 双阳性细胞、CD206+/Iba-1+ 双阳性细胞数量快速增加,说明炎症反应即刻发生,同时抗炎反应也开始发生。此时神经损伤便已经出现,表明 ICH 后,虽然炎症反应及抗炎反应同时发生,但炎症反应占据主导地位,对神经造成损伤。在接受百会透曲髌针刺治疗后,ICH 大鼠脑组织中 CD32 蛋白表达水平、CD32+/Iba-1+ 双阳性细胞和 CD206+/Iba-1+ 双阳性细胞数量降低、CD206 蛋白表达水平上升。从时间来看,B 组在造模后 7 d 时 CD32 水平仍高,表明大鼠 ICH 后 7 d 内 M1 型介导的炎症反应很强,不能自愈,反而越来越严重,C 组造模后 7 d 时 CD32 水平则显著低于 B 组,表明针刺能有效减轻炎症反应。由此可见,ICH 大鼠经过针刺后,炎症反应强度降低,而抗炎反应强度升高,对神经损伤起到缓解效果,并使机体对神经的保护作用加强。此外,E 组相较于 C 组或 D 组,其 CD32 蛋白表达水平和 CD32+/Iba-1+ 双阳性细胞数量升高,CD206 蛋白表达水平和 CD206+/Iba-1+ 双阳性细胞数量降低,表明 miR-34a-5p 过表达会促进 ICH 大鼠小胶质细胞 M1 型极化,抑制其 M2 型极化,并降低针刺疗效,推测针刺疗法是通过调节小胶质细胞极化来影响 CD32、CD206 蛋白的表达水平。

综上所述,针刺百会透曲髌能通过调节小胶质细胞极化方向,抑制 ICH 大鼠脑组织中 CD32 的蛋白表达,并促进其 CD206 的蛋白表达,减轻大鼠 ICH 后引发的炎症反应,提高机体抗炎能力,缓解神经损伤,加强机体对神经的保护作用。

参考文献

- [1] WANG P, WU F, WANG Y, *et al.* Computed tomography and clinical parameters predict intracerebral hemorrhage expansion[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101 (9): E28912.

- [2] GROSS BA, JANKOWITZ BT, FRIEDLANDER RM. Cerebral Intraparenchymal Hemorrhage: A Review[J]. *JAMA*, 2019, 321(13):1295-1303.
- [3] THABET AM, KOTTAPALLY M, HEMPHILL JC 3RD. Management of intracerebral hemorrhage[J]. *Handb Clin Neurol*, 2017, 140:177-194.
- [4] 马志海, 张祎年. 炎症反应在脑出血后继发性脑损伤中作用机制的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2020, 25(2):124-126.
- [5] 王宁宁, 王丽琨, 伍国锋. 小胶质细胞在脑出血后继发性脑损害中的双重作用[J]. 中国脑血管病杂志, 2020, 17(8):491-496.
- [6] 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.
- [7] 吴燕平, 李浩, 尤洁. 小胶质细胞极化在脑出血中的研究进展[J]. 四川医学, 2022, 43(12):1246-1249.
- [8] 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.
- [9] 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]. *Experimental animals*, 2021, 70(4):469-478.
- [10] 李丹, 李龙, 刘梦玉, 等. 针刺“百会”透“曲鬓”对大鼠脑出血后脑水肿及炎症反应影响的研究[J]. 中医药学报, 2023, 51(2):56-61.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 武云云. 百会透曲鬓穴针法联合尤瑞克林对急性脑梗死患者的疗效[J]. 河南医学研究, 2020, 29(17):3198-3199.
- [14] 于学平, 程英龙, 刘昊, 等. 头穴透刺法治疗急性脑梗死临床疗效动态观察[J]. 针灸临床杂志, 2016, 32(1):1-4.
- [15] ZOU W, CHEN QX, SUN XW, *et al.* Acupuncture inhibits Notch1 and Hes1 protein expression in the basal ganglia of rats with cerebral hemorrhage[J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(3):457-62.
- [16] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [17] 姚嘉永, 邹伟. 针刺治疗脑出血机制的研究进展[J]. 针刺研究, 2022, 47(1):88-94.
- [18] TSCHOE C, BUSHNELL CD, DUNCAN PW, *et al.* Neuro- inflammation after Intracerebral Hemorrhage and Potential Therapeutic Targets[J]. *J Stroke*, 2020, 22(1):29-46.
- [19] ANANIA JC, CHENOWETH AM, WINES BD, *et al.* The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:464.
- [20] 吴久纯, 耿诗洋, 谷芳秋, 等. 血液嗜碱性粒细胞 CD16 和 CD32 在慢性气道炎症性疾病中的表达及其临床意义[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(12):1213-1219.
- [21] 张之燕, 黄志敏, 江旖旎, 等. 三七注射液对阿霉素诱导的肾纤维化大鼠 FcγRIIa (CD32a) 蛋白及 C 反应蛋白的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(10):44-47, 267-268.
- [22] RUHNAU J, TENNIGKEIT J, CEESAY S, *et al.* Immune Alterations Following Neurological Disorders: A Comparison of Stroke and Seizures[J]. *Front Neurol*, 2020, 11:425.
- [23] CAI W, LIU S, HU M, *et al.* Functional Dynamics of Neutrophils After Ischemic Stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(1):108-121.
- [24] 武翠梅, 王改青, 要振佳. 小鼠脑出血后不同时间点小胶质细胞极化状态的实验研究[J]. 中国卒中杂志, 2020, 15(10):1094-1100.
- [25] BAI XJ, HAO L, GUO YE, *et al.* Bone marrow stromal cells reverse the microglia type from pro- inflammatory tumour necrosis factor a microglia to anti-inflammatory CD206 microglia of middle cerebral artery occlusion rats through triggering secretion of CX3CL1[J]. *Folia Neuropathol*, 2021, 59(1):20-31.
- [26] TAI Y, PU M, YUAN LY, *et al.* miR-34a-5p regulates PINK1-mediated mitophagy via multiple modes[J]. *Life Sci*, 2021, 276:119415.