

引用:贺涟漪,陈青,王晓倩,张月娟.温和艾灸通过上调MALAT1抑制miR-125b改善缺血再灌注小鼠的脑损伤和神经细胞凋亡[J].中医药导报,2025,31(6):67-72.

温和艾灸通过上调MALAT1抑制miR-125b改善缺血再灌注小鼠的脑损伤和神经细胞凋亡*

贺涟漪,陈青,王晓倩,张月娟

(湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] 目的:探讨温和艾灸对于脑梗死的治疗效果,并基于MALAT1与miR-125b揭示其作用机制。方法:将70只小鼠随机分为Sham组、Model组、Model+温和艾灸组、Model+温和艾灸+sh-NC组、Model+温和艾灸+sh-MALAT1组、Model+温和艾灸+sh-MALAT1+inhibitor-NC组、Model+温和艾灸+sh-MALAT1+miR-125b-inhibitor组,每组10只,除Sham组外,其余各组均构建大脑动脉闭塞(MCAO)模型。采用改良神经功能评分(mNSS评分)、TUNEL染色与TTC染色判断造模是否成功;Western blotting检测cleaved Caspase-3、Bax和Bcl-2的表达;ELISA检测IL-6和TNF- α 的水平;RT-qPCR检测MALAT1和miRNA-125b的表达。在细胞实验中,通过双荧光素酶报告基因实验评估MALAT1与miR-125b的结合关系。结果:建立MCAO模型后,mNSS评分升高、cleaved Caspase-3、Bax和miRNA-125b表达升高($P<0.05$),IL-6和TNF- α 水平增加($P<0.05$),而Bcl-2和MALAT1表达降低($P<0.05$)。温和艾灸治疗后,mNSS评分降低,并显著降低了cleaved Caspase-3、Bax和miRNA-125b的表达以及IL-6和TNF- α 的水平($P<0.05$),但可上调Bcl-2和MALAT1的表达($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验表明MALAT1可以靶向抑制miR-125b。同时,敲低MALAT1可以显著逆转温和艾灸的治疗作用,进一步抑制miR-125b表达阻断了MALAT1敲低的不利作用。结论:温和艾灸可通过上调MALAT1靶向抑制miR-125b,从而改善缺血再灌注小鼠的脑损伤和神经细胞凋亡。

[关键词] 脑梗死;艾灸;温和灸;大脑动脉闭塞;MALAT1;miR-125b

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)06-0067-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.06.012

Mild Moxibustion Ameliorates Brain Injury and Neuronal Apoptosis in Ischemia-Reperfusion Mice by Inhibiting miR-125b through Up-Regulation of MALAT1

HE Lianyi, CHEN Qing, WANG Xiaoqian, ZHANG Yuejuan

(The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China)

[Abstract] Objective: To investigate the therapeutic effect of mild moxibustion on cerebral infarction and to reveal its mechanism of action based on MALAT1 and miR-125b. Methods: Totally 70 rats were randomly divided into Sham group, Model group, Model+mild moxibustion group, Model+mild moxibustion+sh-NC group, Model+mild moxibustion+sh-MALAT1 group, Model+mild moxibustion+sh-MALAT1+inhibitor-NC group, and Model+mild moxibustion+sh-MALAT1+miR-125b-inhibitor group, 10 rats in each group. Except for the Sham group, the MCAO mouse model was constructed. Modified neurological severity score (mNSS score), TUNEL staining and TTC staining were used to determine the success of modeling. Western blotting was used to detect the expression of cleaved Caspase-3, Bax and Bcl-2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of IL-6 and TNF- α . RT-qPCR was used to detect the expression of MALAT1 and miRNA-125b. In cell experiments, the binding relationship between MALAT1 and miR-125b was assessed by a dual luciferase reporter gene assay. Results: Establishment of the MCAO model was associated with elevated mNSS scores, elevated cleaved Caspase-3, Bax, and miRNA-125b expression ($P<0.05$), and increased

*基金项目:湖南中医药大学2024年度校院联合基金项目(2024XYLH009);2023年湖南省教育厅科学研究项目(23B0349)

levels of IL-6 and TNF- α ($P<0.05$), whereas Bcl-2 and MALAT1 expression were decreased ($P<0.05$). Mild moxibustion treatment decreased mNSS scores and reduced the expression of cleaved Caspase-3, Bax, and miRNA-125b as well as the levels of IL-6 and TNF- α ($P<0.05$), while it upregulated the expression of Bcl-2 and MALAT1 ($P<0.05$). Dual luciferase reporter gene experiments demonstrated that MALAT1 could target and inhibit miR-125b. Meanwhile, knockdown of MALAT1 significantly reversed the therapeutic effect of mild moxibustion, and further inhibition of miR-125b expression blocked the detrimental effect of MALAT1 knockdown. Conclusion: Mild moxibustion can ameliorate brain injury and neuronal apoptosis in ischaemia-reperfusion mice by up-regulating MALAT1-targeted inhibition of miR-125b.

[Keywords] cerebral infarction; moxibustion; mild moxibustion; MCAO; MALAT1; miR-125b

脑卒中是全球导致死亡和致残的主要疾病之一,缺血性脑卒中占绝大多数^[1]。该病由脑部血液供应不足引起,可导致脑组织缺氧、营养缺乏,进而引发神经细胞凋亡^[2]。尽管现代医学在脑卒中治疗和康复上取得了一定进展,但现有手段仍存在局限性^[3]。因此,探索新的治疗策略以减轻神经损伤并改善预后,具有重要临床意义和研究价值。

近年来,艾灸作为传统医学疗法,在脑卒中康复中的应用受到越来越多关注。艾灸通过温热刺激特定穴位,可促进气血循环并调节脏腑功能^[4]。温和艾灸因其不易灼伤皮肤^[5],被认为是一种更安全有效的治疗方式。它保持2~3 cm距离进行熏烤,避免高温直接接触皮肤^[6],尤其适用于儿童、老年人、体弱者或对热敏感的人群^[7]。由于温度较低,温和艾灸通常需要较长时间才能达到预期效果。研究^[8]表明,温和艾灸在改善脑缺血再灌注损伤和促进神经功能恢复方面具有显著作用,但其具体分子机制仍不完全清楚,需要进一步研究。

在分子生物学层面,长链非编码RNA(LncRNA)^[9]和微小RNA(miRNA)^[10]在神经细胞的生长、分化和凋亡中具有重要作用^[11]。转移相关肺腺癌转录本1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)是一种高度保守的LncRNA,广泛表达于中枢神经系统,可调节神经元的存活和凋亡过程^[12]。研究^[13]发现,MALAT1与神经细胞凋亡密切相关^[13],在中枢神经系统损伤后的表达水平显著变化。miRNA-125b(miR-125b)在多种神经系统疾病中发挥关键作用^[14-15],其异常表达与神经细胞凋亡密切相关,尤其在缺血性脑卒中的病理过程中^[16]。miR-125b可通过靶向多个凋亡相关基因,调控神经细胞的存活和凋亡^[17]。

本研究旨在探讨温和艾灸在脑卒中模型小鼠中通过调控MALAT1和miR-125b对缺血再灌注脑损伤和神经细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒 小鼠HT22神经细胞(CL-0697)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;Ad-sh-MALAT1和Ad-miR-125b-Inhibitor腺病毒购自上海吉满生物科技有限公司。

1.2 药物与试剂 2% TTC染色液(批号:BCCK2932)、4%多聚甲醛(批号:SDBB0489)、RIPA裂解液(批号:0000351352)、cleaved Caspase-3抗体(批号:0000424104)、Bax抗体(批号:034M4774)、Bcl-2抗体(批号:424170774)、TRIzol试剂(批号:MKCQ9520)、反转录试剂盒(批号:66239571)、qPCR试剂盒(批号:SLCQ4219)均购自西格玛-奥德里奇公司;GAPDH抗体

(赛默飞世尔科技公司,批号:SLCQ5888);白介素-6(interleukin-6, IL-6)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:09152500 1208840915)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA试剂盒(批号:091525001208840915)均购自上海江莱生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因试剂盒(批号:RG027)、TUNEL染色试剂盒(批号:C1086)均购自碧云天生物技术公司。

1.3 主要仪器 石蜡包埋机(金华市华速科技有限公司,型号:ES-300);石蜡切片机(金华市益迪医疗设备有限公司,型号:YD-335);酶标仪(美国BIO-RAD伯乐公司,型号:168-1130);化学发光成像系统(上海亿达生物,型号:EI600C);荧光定量PCR仪[罗氏诊断公司(Roche Diagnostics GmbH),型号:LightCycler 480 II];蛋白电泳槽(韦克斯科技(北京)有限公司,型号:WIX-miniPRO4];光学显微镜(上海炳宇光学仪器有限公司,型号:XDS-30)。

1.4 实验动物 70只雄性ICR小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,8周龄,体质量(38 ± 3)g。动物生产许可证号:SCXK(湘)2024-0009;动物质量合格证号:430727231102931876。所有小鼠分笼(5只/笼)饲养于湖南中医药大学第一附属医院动物中心实验室,饲养温度控制在(24 ± 1) $^{\circ}$ C,湿度控制在(60 ± 5)%,昼夜明暗交替时间为12 h/12 h。所有小鼠均提供标准饲料,并且保证自由饮水,适应性饲养2周。本研究已获得湖南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会的批准(伦理批号:ZYFY20231102)。

1.5 动物分组及处理

1.5.1 分组 小鼠适应性饲养2周后,随机分为Sham组、Model组、Model+温和艾灸组(在Model组基础上,选取相应穴位,予以温和艾灸操作,1次/d)、Model+温和艾灸+sh-NC组、Model+温和艾灸+sh-MALAT1组(对MALAT1进行沉默处理)、Model+温和艾灸+sh-MALAT1+inhibitor-NC组、Model+温和艾灸+sh-MALAT1+miR-125b-inhibitor(miR-125b-inhibitor抑制miR-125b)组,每组10只小鼠。

1.5.2 大脑动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)小鼠模型的构建 参照文献[18],采用大脑中动脉线栓法构建MCAO小鼠模型,具体方法如下。动物禁食禁水24 h后,小鼠通过面罩吸入异氟醚和纯氧的混合气体(1:49, 1.5 L/min)麻醉。切开颈部腹侧皮肤,分离右侧颈部肌肉,暴露并分离颈动脉。结扎颈总动脉和颈外动脉,在颈总动脉分叉处下方剪一小孔,插入专用线栓至颈内动脉末端,阻塞大脑中动脉起始

部。2 h后拔出线栓,形成局灶性缺血再灌注模型。术中保持小鼠肛温约37℃,术后缝合并涂抹青霉素。动物清醒2 h后,采用ZeaLonga评分法判断造模是否成功^[19]。评分标准如下:0分,活动正常,无神经功能缺损;1分,不能完全伸展对侧前肢;2分,出现偏瘫并向对侧转圈;3分,行走时身体向偏瘫侧倾倒;4分,不能自主行走,意识丧失。评分为1~3分的动物视为造模成功。造模过程中,小鼠的存活率约为80%。

1.5.3 取穴定位 参照《实验针灸学》^[20]及华兴邦动物穴位图谱,选取神阙、关元、气海、天枢(双)。于造模的第1天同时施加灸法治疗。将小鼠固定在专用固定架上,轻柔地用医用胶带固定小鼠的四肢和尾部,确保其静止且舒适。固定过程中,避免施加过大压力,以减少应激反应。取穴定位后,将艾条燃着的一端与施灸部位的皮肤保持2.5 cm左右距离,注意温度,不要灼烫皮肤,1次/d,连续治疗1周。

1.5.4 脑室内注射 对于小鼠的基因干预,将小鼠置于立体定向框架上,MCAO建模前30 min,将3 μL的Ad-sh-MALAT1和Ad-miR-125b-Inhibitor注射到小鼠右侧脑室,坐标如下:前囟向后0.1 mm,中线外侧0.7 mm,硬脑膜腹侧2.2 mm。

1.6 改良神经功能评分(modified neurological severity score, mNSS评分) 根据mNSS评分标准,对MCAO小鼠神经功能损伤进行评估,包括运动和感觉系统、反射和平衡,按0~18的数字等级进行分级(最大mNSS评分为18分,表示最大神经损伤;最小mNSS为0分,表示无损伤)。

1.7 氯化二苯基四氮唑(Triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色评估脑梗死体积 将脑组织用冷盐水冲洗后,放置在-20℃的冰箱中10 min。当脑组织稍微变硬后,切成2 mm厚的冠状切片,随后将其浸泡在2% TTC染色液中,并在37℃避光环境中孵育30 min,之后使用4%多聚甲醛固定。通过Image J软件分析未染色区域来评估梗死体积。梗死百分比的计算公式为:(对侧半球面积-同侧半球未损伤区域面积)/(对侧半球面积×2)×100%。

1.8 末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-Mediated dUTP Nick-End Labeling, TUNEL)染色评估细胞凋亡 将脑组织在4%多聚甲醛中固定过夜,然后包埋在石蜡中。将样品切成5 μm切片,在二甲苯中脱蜡,并用分级乙醇系列再水化。根据制造商的说明,使用TUNEL染色试剂盒检测凋亡情况。

1.9 蛋白质印迹法(Western blotting, WB)检测脑组织cleaved Caspase-3、Bax和Bcl-2的蛋白表达 使用RIPA裂解液提取总蛋白,采用BCA法检测蛋白浓度。蛋白经变性、电泳后,在室温下转膜,脱脂牛奶封闭,随后加入一抗cleaved Caspase-3(1:5 000)、Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)和GAPDH(1:1 000)在4℃孵育过夜。再经洗膜和HRP标记山羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育1 h后,加入ECL化学发光液显影,GAPDH为内参对照,使用化学发光成像系统分析目的蛋白相对表达量,使用Image J软件处理图像,并进行半定量分析。

1.10 ELISA检测IL-6、TNF-α水平 使用小鼠IL-6、TNF-α ELISA试剂盒检测脑组织匀浆中IL-6和TNF-α的水平。往预先包被相应抗体的包被微孔中加入10 μL样本,再加相对应

稀释液40 μL;空白孔不加,标准品孔各加不同浓度的标准品50 μL。除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入HRP标记的检测抗体100 μL,用封板膜封住反应孔,37℃恒温箱温育60 min。随后弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静止1 min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板5次。每孔加入底物A、B各50 μL,37℃避光孵育15 min。孵育完成后每孔加入终止液50 μL,15 min内使用酶标仪在450 nm波长处测定各孔OD值。

1.11 逆转录实时定量聚合酶链式反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测MALAT1和miR-125b表达 使用TRIzol法提取脑组织及细胞中的总RNA。随后根据制造商的说明,利用miScript PCR system或反转录试剂盒将miR-125b或MALAT1逆转录为cDNA,使用Hieff qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒,在LightCycler 480上进行qPCR反应。反应条件为:95℃预变性5 min。随后95℃变性10 s,55℃退火20 s,72℃延伸20 s,40个循环。最后72℃延伸5 min。其中,GAPDH为MALAT1的内参基因,U6作为miR-125b的内参基因。引物序列如表1所示。PCR实验重复3次,每次3个复孔,最后用qPCR算法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)计算RNA相对含量。

表1 RT-qPCR实验的引物序列

| 目的基因 | 方向 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|----------|----|-------------------------|-------|
| MALAT1 | 正向 | TGCAGTGTGCCAATGTTTCG | 20 |
| | 反向 | GGCCAGCTGCAAACATTCAA | 20 |
| miR-125b | 正向 | TCCCTGAGACCTAACTTGTGA | 22 |
| | 反向 | AGTCTCAGGGTCCGAGGTATTTC | 22 |
| GAPDH | 正向 | CATCACTGCCACCCAGAAGACTG | 23 |
| | 反向 | ATGCCAGTGTGAGCTCCGTTCA | 23 |
| U6 | 正向 | CTCGCTTCGGCAGCACA | 17 |
| | 反向 | AACGCTTCACGAATTGCGT | 20 |

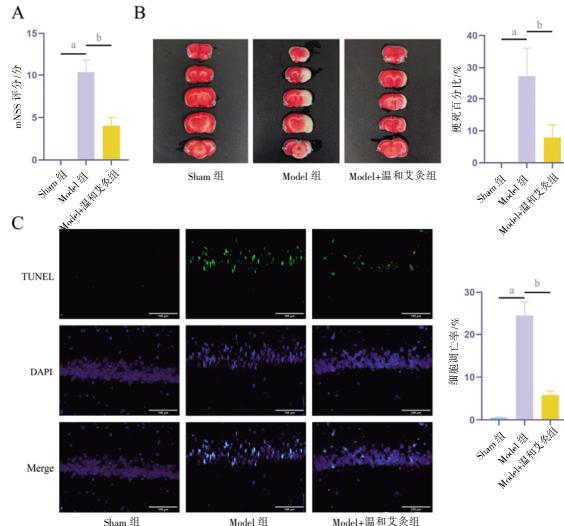
1.12 细胞培养及感染 小鼠HT22神经细胞在添加10%的胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中培养,并在37℃和5%CO₂潮湿环境中孵育。使用Ad-shRNA-MALAT1腺病毒颗粒感染小鼠HT22神经细胞。感染48 h后,利用RT-qPCR检测MALAT1表达水平。

1.13 双荧光素酶报告基因实验(dual luciferase reporter assay)检测MALAT1和miR-125b的结合情况 生信分析MALAT1和miR-125b的结合位点,并构建MALAT1结合位点突变序列。将野生型和结合位点突变的3'UTR序列插入至pmirGLO载体中构建MALAT1荧光素酶质粒。使用Lipofectamine 2000将荧光素酶质粒和miR-125b共转染到HT22神经细胞中。转染48 h后,进行双荧光素酶报告基因测定,通过双荧光素酶报告基因测定系统检测荧光素酶活性。将萤火虫荧光素酶活性进行归一化,以海肾荧光素酶作为内参。

1.14 统计学方法 使用GraphPad Prism 9进行统计分析。计量数据以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。多组比较符合正态分布、方差齐性者采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*法。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

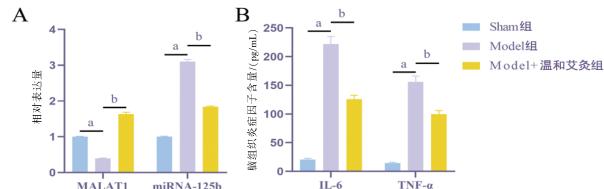
2.1 温和艾灸改善缺血性脑卒中脑损伤 与Sham组比较,Model组小鼠mNSS评分显著上升,神经功能缺陷程度升高(图1A, $P<0.01$),TTC染色及TUNEL染色结果显示脑梗死面积与细胞凋亡程度显著增加(图1B-C, $P<0.01$)。结果表明MCAO小鼠模型构建成功。而使用温和艾灸治疗后发现,小鼠mNSS评分下降,神经功能缺陷改善,脑梗死面积与细胞凋亡程度减少(图1A-C)。以上结果表明,温和艾灸可改善MCAO导致的脑损伤。



注: A. 小鼠mNSS评分; B. TTC染色评估脑梗死程度; C. TUNEL染色检测小鼠大脑海马CA1区的细胞凋亡率。 $n=10$,与Sham组比较,^a $P<0.01$;与Model组比较,^b $P<0.01$ 。

图1 温和艾灸改善缺血性脑卒中脑损伤

2.2 温和艾灸改善炎症反应并调控MALAT1和miRNA-125b的表达 与Sham组比较,Model组小鼠MALAT1表达量降低,miRNA-125b的表达升高($P<0.01$)(图2A),同时IL-6和TNF- α 的含量显著上升($P<0.01$)(图2B)。在使用温和艾灸进行治疗后,MALAT1上调,miRNA-125b的表达下降,IL-6、TNF- α 含量也显著降低(图2A-B)。实验结果显示,温和艾灸可改善脑组织炎症反应,其对脑梗死和炎症反应的改善作用可能与上调MALAT1和下调miRNA-125b表达有关。

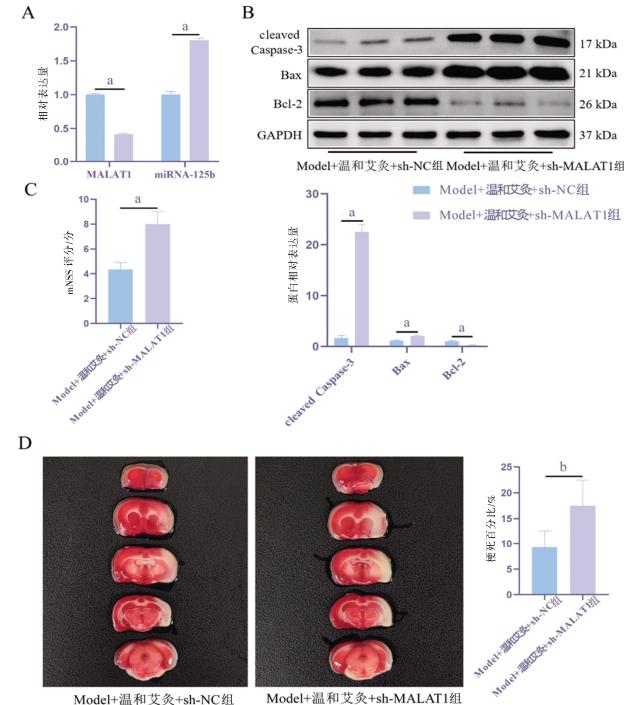


注: A. RT-qPCR检测脑组织中MALAT1和miRNA-125b的表达水平; B. ELISA检测脑组织中IL-6和TNF- α 含量。 $n=10$,与Sham组比较,^a $P<0.01$;与Model组比较,^b $P<0.01$ 。

图2 温和艾灸治疗改善炎症反应并调控 MALAT1 和 miRNA-125b 表达

2.3 敲低MALAT1减弱温和艾灸的治疗作用 敲低MALAT1后,miR-125b表达量升高($P<0.01$)(图3A)。同时sh-MALAT1处理上调cleaved Caspase-3和Bax的表达,但抑制Bcl-2的表达($P<0.01$)(图3B),这表明敲低MALAT1促进细胞凋亡。此外,相较于Model+温和艾灸+sh-NC组,Model+温和艾灸+sh-

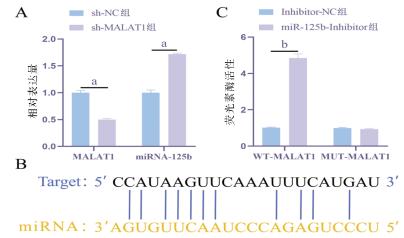
MALAT1组小鼠神经功能缺陷程度加深($P<0.01$)(图3C),脑梗死面积增加($P<0.05$)(图3D),这表明MALAT1敲低显著削弱了温和艾灸的治疗效果。综上所述,温和艾灸可通过上调MALAT1抑制miR-125b来改善脑损伤。



注: A.RT-qPCR检测脑组织中MALAT1和miRNA-125b的表达; B. Western blotting检测脑组织中cleaved Caspase-3、Bax和Bcl-2的表达; C. 小鼠mNSS评分比较; D.TTC染色评估脑梗死程度。 $n=10$,与Model+温和艾灸+sh-NC组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

图3 敲低 MALAT1 减弱温和艾灸的治疗作用

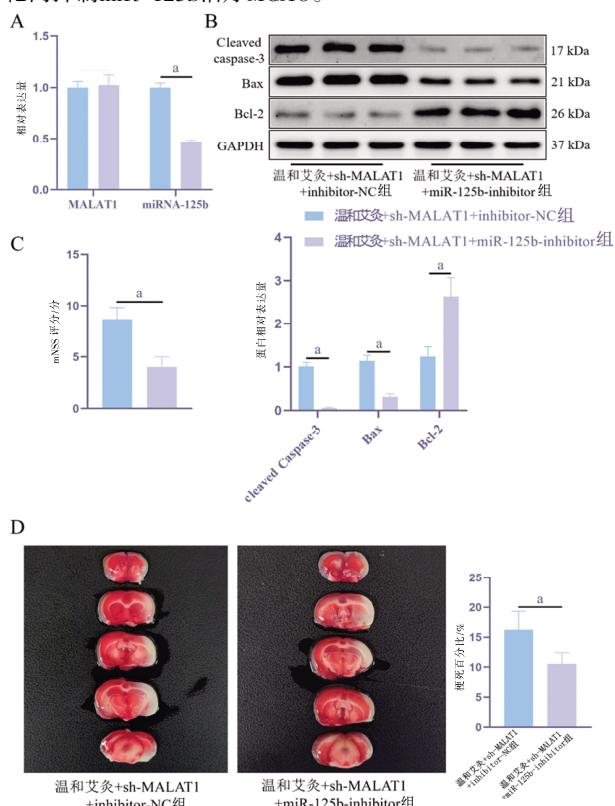
2.4 MALAT1靶向抑制miR-125b 鉴于MALAT1与miR-125b密切相关^[21],且miR-125家族的成员在多种组织中强烈表达,尤其是大脑^[22]。因此,进一步探究了MALAT1调控miR-125b的机制。通过RT-qPCR检测发现:敲低MALAT1可上调miR-125b的表达($P<0.01$)(图4A)。MALAT1与miR-125b的结合位点如图4B所示。双荧光素酶报告基因实验的结果显示,与inhibitor-NC处理组相比,miR-125b-inhibitor处理显著提高了WT-MALAT1组的荧光素酶活性,而MUT-MALAT1组则未见显著变化($P<0.01$)(图4C)。这进一步证实了MALAT1与miR-125b可以直接结合。因此,推测MALAT1在温和艾灸治疗MCAO中可能通过直接靶向抑制miR-125b来发挥其功能。



注: A.RT-qPCR检测细胞中MALAT1和miRNA-125b的表达水平; B. MALAT1与miR-125b的结合位点; C. 双荧光素酶报告基因实验检测MALAT1与miR-125b的相互作用。 $n=3$,与sh-NC组比较,^a $P<0.01$;与Inhibitor-NC组比较,^b $P<0.01$ 。

图4 MALAT1 靶向抑制 miR-125b

2.5 温和艾灸通过MALAT1靶向抑制miR-125b治疗MCAO 为了进一步验证miR-125b在温和艾灸治疗小鼠MCAO模型中的作用,本研究使用miR-125b-inhibitor进行干预。结果显示,抑制miR-125b后,MCAO小鼠脑组织MALAT1表达无显著变化($P>0.05$)(图5A),这进一步证实了miR-125b是MALAT1的下游靶基因。同时,miR-125b-inhibitor处理下调cleaved Caspase-3和Bax的表达,上调Bcl-2表达($P<0.01$)(图5B),表明敲低miR-125b抑制细胞凋亡。此外,miR-125b敲低还改善神经功能损伤($P<0.01$)(图5C),减少脑梗死面积($P<0.01$)(图5D)。这些结果表明,抑制miR-125b逆转sh-MALAT1的作用,显著减轻小鼠脑损伤程度。进一步验证了温和艾灸是通过MALAT1靶向抑制miR-125b治疗MCAO。



注: A. RT-qPCR检测脑组织中MALAT1和miRNA-125b的表达水平; B. Western Blotting检测脑组织中cleaved Caspase-3、Bax和Bcl-2的表达; C. 小鼠mNSS评分比较; D. TTC染色评估脑梗死程度。 $n=10$,与温和艾灸+sh-MALAT1+Inhibitor-NC组比较,^a $P<0.01$ 。

图5 温和艾灸通过 MALAT1 靶向抑制 miR-125b 治疗 MCAO

3 讨 论

在当前关于缺血性脑卒中治疗的研究中,常规疗法存在着时间窗限制、并发症风险、长期康复效果不理想等困境^[23],而分子机制的探索与创新疗法的开发是学术界关注的焦点。尽管现代医学在脑卒中的治疗和康复方面取得了一定的进展,但有效的治疗手段仍然有限^[24]。因此,寻找新的治疗策略以减轻缺血再灌注诱导的脑损伤和神经细胞凋亡,改善患者的预后,具有重要的临床意义。

近年来,艾灸作为一种传统医学疗法,在脑卒中康复中的应用受到了越来越多的关注。艾灸可通过温热刺激特定的

穴位来促进气血循环,调节脏腑功能,从而发挥其治疗效果^[25]。其中,温和艾灸因其温和、不易灼伤皮肤的特性,被认为是一种更为安全有效的艾灸方式。研究^[26-27]表明,艾灸能改善脑缺血再灌注损伤,促进神经功能恢复。本研究结果表明,温和艾灸能抑制缺血再灌注小鼠神经细胞凋亡,改善神经炎症,降低脑组织cleaved Caspase-3和Bax表达,升高Bcl-2表达,降低脑组织IL-6和TNF- α 水平降低,促进神经功能缺陷恢复。

研究^[28-29]表明,非编码RNA,尤其是长链非编码RNA(LncRNA)和微小RNA(miRNA),在神经系统疾病的发生和发展中发挥着重要作用。MALAT1是一种高度保守的长链非编码RNA,广泛表达于中枢神经系统^[30],参与调节神经元的存活和凋亡过程。研究^[31]发现,MALAT1在中枢神经系统损伤后的表达水平显著变化,与神经细胞的凋亡密切相关。本研究表明,温和艾灸可能通过上调MALAT1的表达,进而抑制miR-125b的功能,减少神经细胞的凋亡。这一作用机制与MALAT1在调控神经元存活和凋亡中的关键角色相吻合^[31]。此外,miR-125b是一种在多种神经系统疾病中具有重要调控作用的miRNA^[32],其异常表达与缺血性脑卒中的神经细胞凋亡密切相关。miR-125b可通过靶向多个凋亡相关基因影响神经细胞的存活,而温和艾灸可能通过调控这一miRNA的表达来改善缺血性脑卒中的病理过程。

在分子机制层面,我们通过荧光素酶报告基因检测进一步发现,MALAT1与miR-125b之间存在结合位点,上调MALAT1会抑制miR-125b的表达。这一发现进一步深化了对温和艾灸调控机制的理解。MALAT1可通过调控miR-125b,阻碍后者对下游凋亡相关基因的负调控,从而在分子水平上发挥显著的抗凋亡作用。温和艾灸可通过上调MALAT1的表达来靶向抑制miR-125b的表达,这一调控机制揭示了温和艾灸在减轻缺血再灌注小鼠脑损伤和神经细胞凋亡中的关键作用。

参考文献

- [1] SOMMER C J. Ischemic stroke: Experimental models and reality[J]. Acta Neuropathol, 2017, 133(2):245-261.
- [2] PATEL D, WAIRKAR S. Biotechnology-based therapeutics for management of cerebral stroke[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 913:174638.
- [3] CHIDAMBARAM S B, RATHIPRIYA A G, MAHALAKSHMI A M, et al. The influence of gut dysbiosis in the pathogenesis and management of ischemic stroke [J]. Cells, 2022, 11(7):1239.
- [4] 韦伟,王进军.隔物温和灸联合电针治疗膝骨关节炎临床观察[J].中西医结合研究,2024,16(2):92-95.
- [5] 马金丹,赵琛,朱笑吉,等.温和灸对IBS小鼠结肠Trp-kyn/5-HT代谢的调控机制研究[J].吉林中医药,2024,44(3):328-333.
- [6] 王强梅,高明,李少雄,等.艾条温和灸与红外线温和灸对外关穴皮肤血流灌注量的影响[J].中国针灸,2023,43(11):1269-1274.
- [7] 刘莹莹,李珍,张红,等.艾灸对老年患者抗衰老的临床研

究[J].河北医学,2009,15(4):431-433.

[8] 何媛.基于“阳明多气多血”理论运用温和灸足阳明经颈部穴位治疗急性脑梗死的临床疗效观察[D].成都:成都中医药大学,2023.

[9] BRIDGES M C, DAULAGALA A C, KOURTIDIS A. LNCcation: LncRNA localization and function[J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(2):e202009045.

[10] FERRAGUT CARDOSO A P, BANERJEE M, NAIL A N, et al. miRNA dysregulation is an emerging modulator of genomic instability[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 76:120-131.

[11] HERMAN A B, TSITSIPATIS D, GOROSPE M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12):2252-2266.

[12] WANG L P, LI S J, STONE S S, et al. The role of the lncRNA MALAT1 in neuroprotection against hypoxic/ischemic injury[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(1):146.

[13] MALISSOVAS N, NINOU E, MICHAIL A, et al. Targeting long non-coding RNAs in nervous system cancers: New insights in prognosis, diagnosis and therapy[J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(30):5649-5663.

[14] GOYAL B, YADAV S R M, AWASTHEE N, et al. Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of long non-coding RNA MALAT1 in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer*, 2021, 1875(2):188502.

[15] ZAJDEL M, RYMKIEWICZ G, SROMEK M, et al. Tumor and cerebrospinal fluid microRNAs in primary central nervous system lymphomas[J]. *Cancers*, 2019, 11(11):1647.

[16] LATTANZI A, GENTNER B, CORNO D, et al. Dynamic activity of miR-125b and miR-93 during murine neural stem cell differentiation in vitro and in the subventricular zone neurogenic niche[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e67411.

[17] MEHTA S L, CHOKKALLA A K, VEMUGANTI R. Noncoding RNA crosstalk in brain health and diseases[J]. *Neurochem Int*, 2021, 149:105139.

[18] 李侍显,张梅奎,李敏,等.活血利水方对MCAO大鼠模型海马组织EGFR和AKT表达的影响[J].解放军医学院学报,2019,40(11):1068-1073,1078.

[19] 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.

[20] 郭义.实验针灸学[M].4版.北京:中国中医药出版社,2016.

[21] LIU P, JIA S B, SHI J M, et al. LncRNA-MALAT1 promotes neovascularization in diabetic retinopathy through regulating miR-125b/VE-cadherin axis[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5):BSR20181469.

[22] YUAN M, DA SILVA A C A L, ARNOLD A, et al. microRNA (miR) 125b regulates cell growth and invasion in pediatric low grade glioma[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):12506.

[23] 王俊波,武彦霞,郭丹丹,等.血清sCD40L和Galectin-3对急性缺血性脑卒中患者治疗效果及预后的预测价值[J].检验医学与临床,2024,21(16):2422-2426.

[24] 袁苏苏,贾锋.缺血性脑卒中后神经炎症的研究进展[J].同济大学学报(医学版),2024,45(4):591-599.

[25] HU X M, DU L X, LIU S B, et al. A TRPV4-dependent neuroimmune axis in the spinal cord promotes neuropathic pain [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133 (5):e161507.

[26] ZHANG J R, CAI W, WEI X F, et al. Moxibustion ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating ferroptosis in rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2023, 50(10):779-788.

[27] DI Z, GUO Q, ZHANG Q A. Neuroprotective effect of moxibustion on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by downregulating NR2B expression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:5370214.

[28] GAO X Y, CAO Z L, TAN H F, et al. LncRNA, an emerging approach for neurological diseases treatment by regulating microglia polarization[J]. *Front Neurosci*, 2022, 16:903472.

[29] JUŽWIK C A, S DRAKE S, ZHANG Y, et al. microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review[J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 182:101664.

[30] ABDULLE L E, HAO J L, PANT O P, et al. MALAT1 as a diagnostic and therapeutic target in diabetes-related complications: A promising long-non-coding RNA[J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(4):548-555.

[31] KHOSHNAM S E, MOALEMNIA A, ANBIYAAE O, et al. LncRNA MALAT1 and ischemic stroke: Pathogenesis and opportunities[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(7):4369-4380.

[32] DASH S, BALASUBRAMANIAM M, MARTÍNEZ-RIVERA F J, et al. Cocaine-regulated microRNA miR-124 controls poly (ADP-ribose) polymerase-1 expression in neuronal cells[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):11197.

(收稿日期:2024-11-06 编辑:罗英姣)