

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20240208

针刺研究

基于p62/Keap1/NRF2信号通路探讨针刺对脑出血后脑组织铁死亡调控作用

戴晓红^{1,2}, 张宏伟³, 于薇薇², 赵永厚^{1✉}

(1. 黑龙江神志医院, 黑龙江 哈尔滨 150036; 2. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 东北林业大学医院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

【摘要】目的:观察针刺治疗对脑出血大鼠神经功能状态的影响,并基于p62/Keap1/NRF2信号通路研究针刺对脑出血后脑组织铁死亡的调控作用。方法:选用健康正常的雄性SD大鼠33只,随机分为假手术组、模型组和针刺组,每组再分为1 d、3 d和7 d的3个亚组,其中假手术组每个亚组1只大鼠,模型组和针刺组每个亚组5只大鼠。除假手术组外,采用大鼠自体血注射的方式建立脑出血大鼠模型;假手术组、针刺组中大鼠脑组织可选择采用由百会穴刺向曲鬓穴的刺灸方法,采用Ludmila Belayev神经功能评分来评估模型各组中大鼠神经功能系统的功能缺损程度情况;采用Western blot检测脑组织中System Xc⁻、GPX4蛋白的表达;用透射电镜观测到了各组大鼠脑组织的神经细胞线粒体形态;酶联免疫吸附方法检测脑组织中MDA、GSH、GPX4含量的变化。结果:由百会穴开始向曲鬓穴进行的针刺方法可以降低脑出血大鼠体内的Ludmila Belayev神经功能的评分,从而缓解了脑出血大鼠神经肌肉传导缺损症;不同时间点相比较,大鼠System Xc⁻相对表达量在3 d和7 d均高于1 d,假手术组和针刺组整体表现为随着时间增加System Xc⁻蛋白量不断增加。与假手术组比较,模型组大鼠的MDA水平明显升高($P < 0.05$);GSH、GPX4水平均明显降低($P < 0.05$);在同一时间点与模型组相比较,针刺组大鼠MDA水平均明显降低($P < 0.05$);GSH、GPX4水平均明显升高($P < 0.05$)。模型组和针刺组大鼠在3 d MDA水平达到高峰,7 d MDA水平下降。GSH、GPX4水平则不断升高。结论:针刺可改善急性脑出血大鼠神经肌肉损伤神经功能,通过降低MDA、升高System Xc⁻、GSH、GPX4蛋白表达水平抑制脑出血大鼠神经细胞铁死亡,在脑出血治疗中发挥脑保护作用。

【关键词】脑出血;针刺疗法;神经功能损伤;蛋白表达;铁死亡

【引用格式】

戴晓红,张宏伟,于薇薇,等. 基于p62/Keap1/NRF2信号通路探讨针刺对脑出血后脑组织铁死亡调控作用[J]. 中医药信息, 2024, 41(2): 44-50.

DAI X H, ZHANG H W, YU W W, et al. Exploration on the regulatory effect of acupuncture on ferroptosis in brain tissue after cerebral hemorrhage based on p62/Keap1/NRF2 signaling pathway[J]. Information on TCM, 2024, 41(2):44-50.

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是指脑内血管破裂造成血液聚积于脑实质内的神经系统损伤,特点是病情凶险、病死率高^[1]。高血压、脑动脉硬化和颅

内血管畸形等都是引起脑出血的危险因素。ICH的发生常由用力和情绪激动引起,大多数患者表现为在活动过程中突然发作^[2]。至今尚缺乏有效的治疗方法和

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82074540);黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z20088)

第一作者简介:戴晓红(1979-),女,副主任医师,主要研究方向:中西医结合治疗神经系统疾病。

✉通信作者简介:赵永厚(1964-),男,主任医师,主要研究方向:中医神志病证治规律。

药物。阐明脑出血损伤的机制,探究其有效的治疗方案,是目前需解决的关键问题。

研究表明,脑出血可引起神经元的凋亡并可使脑损伤加剧^[3]。脑出血与铁死亡也有密切关系,有研究发现脑出血后神经细胞死亡的重要方式是铁死亡^[4]。脑出血后从血肿中释放出的铁离子会在脑中积累,引起神经毒性并加速神经变性^[5-6],从而导致铁超载,铁离子在脑出血引起的脑损伤中具有关键作用,脑铁含量的增加会导致脑水肿、氧化损伤和脑萎缩。

针刺疗法目前广泛用于脑出血的治疗,通过针刺对脑出血患者穴位的刺激可促进出血的吸收,提高出血脑组织中的超氧化物歧化酶活性,进而缩小脑部血肿,减轻其症状^[7]。针刺同样可使脑部自由基的释放减少,从而对内皮素的产生达到抑制的作用,增强对脑细胞的保护。脑出血发生后的不同时间不但神经行为学评分会有不同变化,脑组织病理学同样也会出现不同的改变。研究表明针刺可明显改善动物ICH后的神经行为学功能及病理组织学^[8]。

Kelch样ECH相关蛋白-1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核因子E2相关因子2(Nrf2)通路是细胞内维持氧化还原稳态、清除氧自由基的关键通路^[9-10]。p62可调控氧化应激和自噬的发生,有研究表明,在短暂局灶性脑缺血大鼠中,p62可通过调控Keap1/Nrf2/ARE信号通路抑制氧化损伤。Nrf2可介导谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)和其他参与谷胱甘肽(GSH)生物合成的关键铁死亡蛋白的表达。GPX4通过把脂质过氧化物转变成无毒脂质来抵抗铁和氧依赖性脂质过氧化^[11]。一般来说,脂肪酸氢过氧化物可以通过GPX4介导转化成脂肪酸醇。当GPX4失活时,累积的脂肪酸氢过氧化物催化为脂质过氧自由基,直接驱动因System Xc⁻抑制而介导的铁死亡^[12]。研究表明,萆薢酰胺作用于胃癌细胞HGC-27,可使丙二醛(MDA)的表达水平显著升高,System Xc⁻、GPX4降低,可促进铁死亡^[13]。

本研究针刺对大鼠脑出血模型中神经功能和组织病理学变化的影响,并通过分析脑出血大鼠的MDA、System Xc⁻、GSH、GPX4表达水平和线粒体形态的变化,探究基于p62/Keap1/NRF2信号通路研究针刺对脑出血后脑组织铁死亡调控作用,以期为临床治疗脑出血提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康雄性SD大鼠由哈尔滨医科大学第二附属医院

提供,体质量200~220 g,许可证号:SYXK(黑)2019-001,共33只。将33只大鼠随机分为假手术组、模型组和针刺组。假手术组3只,随机分为1 d、3 d和7 d 3个亚组,每个亚组1只;模型组15只,随机分为1 d、3 d和7 d 3个亚组,每个亚组5只;针刺组15只,随机分为1 d、3 d和7 d 3个亚组,每个亚组5只。动物的日常饲养委托哈尔滨纳川生物实验动物平台负责,给予动物适合的饲养条件。环境温度控制在25℃左右,湿度70%左右,自动通风器保持室内通风;每天给予生长维持饲料约10 g/只,提供自由饮水。观察大鼠精神状态、进食及大、小便情况;患病动物给予对症治疗,必要时剔除。在实验前适应性喂养1周,实验过程中的一切处理符合动物伦理要求,在造模前令大鼠禁食12 h,并禁水6 h。

1.2 主要试剂和仪器

电泳仪(北京六一仪器厂,型号:DYY-12);针灸针(华佗牌,型号:0.35 mm×40 mm);透射电子显微镜(HITACHI,型号:H-7650);台式牙钻机(中国上海齿科医械厂,型号:307-6型);Real-time检测仪(ABI,型号:ABI-7300)。

System Xc⁻抗体(abcam,货号:ab175186);GPX4抗体(Abcclonal,货号:A13309);BCA蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime,货号:P0010);谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)检测试剂盒(云克隆,货号:SEC995Hu);丙二醛(MDA)检测试剂盒(云克隆,货号:CEA597Ge);谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(云克隆,货号:CEA294Ge);亚铁离子比色法测试盒(Elabscience,货号:E-BC-K773-M)。

1.3 动物脑出血模型的制备

根据大鼠立体定向图谱,采用自体血注射结合的方式建立脑出血大鼠模型。常规麻醉,注射60 mg/kg戊巴比妥钠进入大鼠腹腔,剪毛备皮后,采用俯卧位固定在立体定位仪上。将定位仪二侧耳杆伸入大鼠骨的外耳道,以确保头骨和内耳线保持同一平面定位;将大鼠门牙定于前端的门牙孔内以控制位置,并保证前囟点与人字位在同一位置。取大鼠两耳尖连线的中点,消毒后行切口暴露前囟点及冠状缝,定位坐标点(前囟点为中心,右侧3.5 mm,后侧0.2 mm),用1.0 mm直径牙钻头钻孔至硬脑膜表面,鼠尾进行消毒后在剪切应力下,距尾端3 cm处用微量注射仪取静脉血50 μL后将其定位在立体定位仪上,垂直进针6 mm左右,注血速率约为20 μL/min,用自体血进行注射,留针5 min。出针后,钻孔用牙科水泥封堵后进行缝合。

1.4 干预方法

假手术组,不予造模,予以针刺组相同的针刺疗法;模型组,于脑出血造模成功后1、3、7 d内单独取材;针刺组,于脑出血造模成功后12 h内进行针刺疗法,频次为每24 h进行1次针刺治疗,针刺方法采用百会向曲鬓穴的透刺方法,选穴参照《实验针灸学》^[14],针灸规格为0.35×40 mm,由百会穴向右侧曲鬓穴进行透刺,深度35 mm左右,留针30 min,取材时间点分别为治疗后或脑出血造模后。

1.5 脑组织处理

各组大鼠常规腹腔注射麻醉,麻醉后迅速断头取脑组织,在冰面上把出血周围脑组织修剪成小块组织,而后置于EP管中,迅速投入液氮中急冻,随后转入-80℃冰箱保存。取脑组织血肿灶周边组织(以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为脑出血造模位置),2.5%戊二醛固定用于做透射电镜。

1.6 指标检测

1.6.1 大鼠神经功能缺损评价方法

造模后,采用Ludmila Belayev等设计的神经功能评分方法,对3组大鼠的中枢神经系统功能进行评估。姿势反射试验:出现明显神经功能缺失计0分;出现心肌梗死对侧肢体屈曲计1分;出现心肌梗死对侧肢体外伸展计2分。肢体放置试验:出现肢体放置反应速度正常计0分;出现身体放置反应速度滞后,但未超出2 s计1分;出现肢体放置反应延迟超2 s计2分。

1.6.2 Western blot检测脑组织中System Xc⁻、GPX4蛋白的表达

蛋白质经磨碎后冰上裂解30 min,用超声波捣碎并添加DNA酶;4℃离心机中12 000 r/min离心15 min,配制成10%、15% SDS-PAGE分离胶和5%浓缩胶,待测蛋白在每孔上样20 μg。电泳过程:在Tris-甘氨酸电泳缓冲液中电泳,设置浓缩胶电压为80 V,染料前沿到分离胶后再加电压到100 V,然后持续电泳直到溴酚蓝到分散胶底面为止。转膜、将膜置入溶液适量稀释后(脱脂奶粉稀释)的一抗中,4℃密封过夜,使用TBST洗膜,加适量稀释的二抗(脱脂奶粉稀释),然后在室内湿度孵1 h,使用TBST洗膜,加入ECL显色底物,曝光显色,凝胶成像分析系统测量条带,目的条带与内参条带的强度比值代表该目的蛋白的相对表达量。

1.6.3 透射电镜观察线粒体形态

通过透射电镜可以看到急性脑出血的血肿灶及周围血管组织的线粒体超微结构改变。抽取出大鼠尾状核组织后立即放进带有电子显微镜固定液的组织培养

器腔中,在组织培养器的显微固定液中取出进行组织切割而成的0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm大小的小组织块。将已剪切好的小组织块放入带有新的电镜固化液的离心管内,进行进一步固化,经过乙醇脱水处理、树脂包埋法、超小巧切片、最后用铅铀染色,经蒸馏水洗净晾干后读片。

1.6.4 酶联免疫吸附法检测脑组织中MDA、GSH、GPX4含量的变化

提取大鼠脑组织中蛋白,通过ELISA试剂盒对大鼠心肌组织中MDA、GSH、GPX4含量进行测定。具体实验方法参照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学方法

采用SPSS 16.0进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点神经功能缺损评分比较

大鼠手术苏醒后开始观察并记录3组大鼠的神经功能体征评分。假手术组没有神经系统功能缺陷的症状,计0分。与假手术组比较,模型组大鼠在1 d时出现明显的神经缺失情况($P < 0.05$),3 d时神经细胞缺损情况最严重($P < 0.05$),在7 d时神经缺失情况稍有改善($P < 0.05$)。与模型组比较,针刺组大鼠中枢神经系统在1 d和3 d有所改善,但在7 d后变化并不明显($P > 0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠不同时间点神经功能 Ludmila Belayev
评分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	<i>n</i>	1 d	3 d	7 d
假手术组	3	0	0	0
模型组	15	7.4 ± 0.49 [*]	7.6 ± 0.49 [*]	6.8 ± 1.17 [*]
针刺组	15	6.8 ± 1.47	7.0 ± 1.10	6.8 ± 1.17

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠System Xc⁻和GPX4相对表达量比较

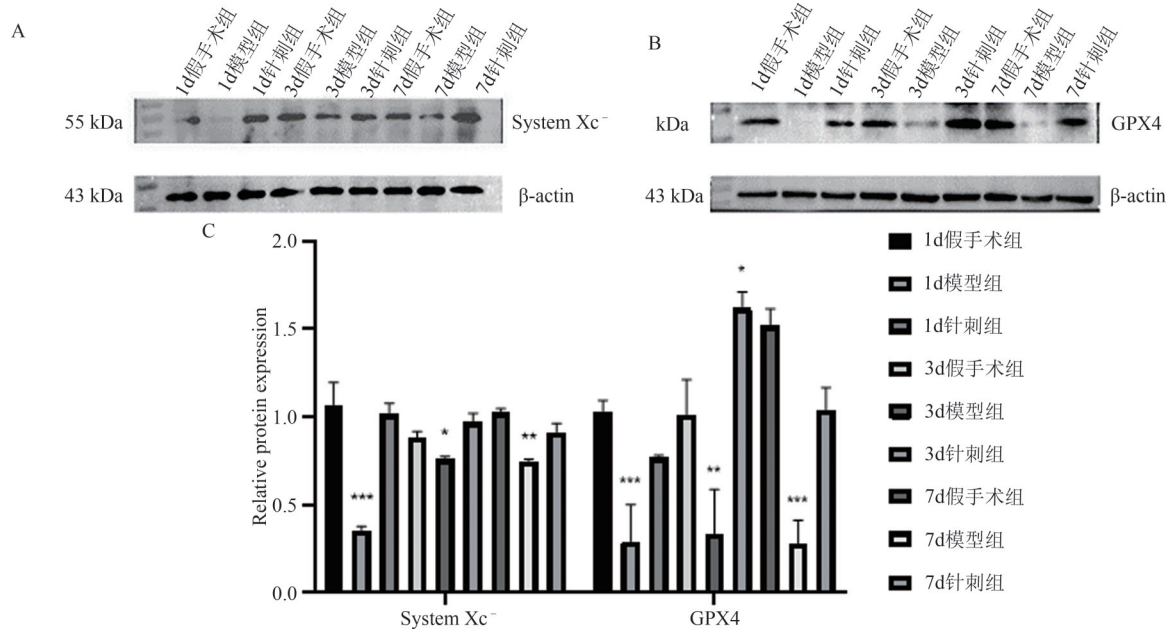
不同时间点相比较,3组大鼠System Xc⁻相对表达量在3 d和7 d均高于1 d;模型组System Xc⁻蛋白含量在3 d和7 d显著上升,模型组在3 d时达到顶峰之后开始下降,针刺组在7 d达到最大值,假手术组和针刺组整体表现为随着时间增加System Xc⁻蛋白量不断增加的趋势;模型组和针刺组的GPX4相对表达量在3 d时达到顶峰,随后下降;且在同一时间点模型组大鼠GPX4水平较假手术组大鼠明显降低,针刺组大鼠GPX4水平较模型组大鼠明显升高。见图1。

2.3 各组大鼠不同时间点神经细胞线粒体形态比较

透射电镜观测结果表明,模型组大鼠在1 d时线粒

体体积明显减少,线粒体嵴缩短明显,线粒体的外膜结构出现断裂。部分细胞器已遭到了严重的破坏,在 3 d 大鼠线粒体嵴几乎全部消失,线粒体断裂,并且引起神

经元细胞凋亡,但 7 d 大鼠神经元细胞体发育中的线粒体形态有所恢复。与模型组比较,针刺组在每个时间点上的线粒体形态的改变程度均比较轻微。见图 2~4。



注:A为System Xc⁻相对表达量;B为GPX4相对表达量;C为蛋白表达统计图。

图1 各组大鼠脑中System Xc⁻、GPX4表达情况图

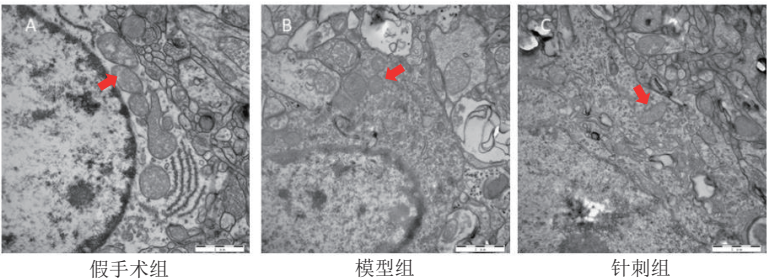


图2 各组大鼠脑组织1 d线粒体超微结构(标尺=1 μ m)

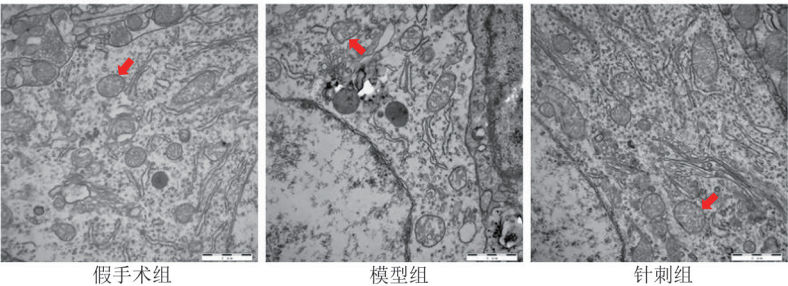


图3 各组大鼠脑组织3 d线粒体超微结构(标尺=1 μ m)

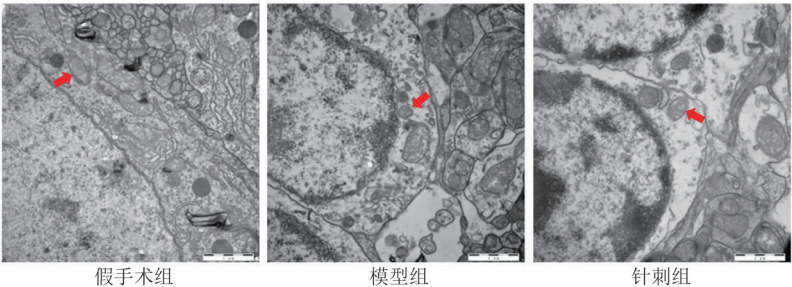


图4 各组大鼠脑组织7 d线粒体超微结构(标尺=1 μ m)

2.4 各组大鼠不同时间点脑组织中MDA、GSH、GPX4水平比较

与假手术组比较,模型组在不同时间点大鼠的MDA水平均明显升高($P < 0.05$);GSH、GPX4水平均明显降低($P < 0.05$);与模型组同一时间点比较,针刺

组大鼠MDA水平均明显降低($P < 0.05$);GSH、GPX4水平均明显升高($P < 0.05$)。模型组和针刺组大鼠在3 d MDA水平达到高峰,7 d MDA水平下降。GSH、GPX4水平则不断升高。见表2。

表2 各组大鼠不同时间点MDA、GSH、GPX4水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA/(ng/mL)			GSH/(μ g/mL)			GPX4/(ng/mL)		
		1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
假手术组	3	5.2 $\pm$ 0.16	4.9 $\pm$ 0.08	4.7 $\pm$ 0.22	7.5 $\pm$ 0.05	7.8 $\pm$ 0.06	7.3 $\pm$ 0.04	10.3 $\pm$ 0.31	10.8 $\pm$ 0.42	10.7 $\pm$ 0.375
模型组	15	6.5 $\pm$ 0.31 [*]	8.1 $\pm$ 0.38 [*]	7.1 $\pm$ 0.43 [*]	6.0 $\pm$ 0.06 [*]	6.1 $\pm$ 0.03 [*]	6.3 $\pm$ 0.04 [*]	0.8 $\pm$ 0.07 [*]	1.0 $\pm$ 0.02 [*]	1.1 $\pm$ 0.04 [*]
针刺组	15	6.2 $\pm$ 0.20 [#]	7.2 $\pm$ 0.09 [#]	6.0 $\pm$ 0.05 [#]	7.0 $\pm$ 0.13 [#]	7.9 $\pm$ 0.04 [#]	8.4 $\pm$ 0.51 [#]	7.7 $\pm$ 0.32 [#]	9.6 $\pm$ 0.91 [#]	12.2 $\pm$ 0.93 [#]

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

3 讨论

脑出血一般是由各种因素造成的脑内小血管破裂而引发。临床研究表明,80%的脑出血患者会出现长期的神经功能缺损和脑萎缩,且多发于高龄人群,发病率随着年龄增大而提升。针刺治疗脑血管疾病历史悠久,是一种无毒副作用的“绿色”安全治疗方法^[15]。研究表明,针刺可以改善血管内皮功能障

碍^[4,16-17],扩大毛细血管循环,改善局部细胞血液,加快身体新陈代谢物,并加快损伤组织的恢复^[18-19]。针刺对于干预脑出血改善神经系统功能缺陷程度和生活质量有较好的疗效。此外,针刺干预时间越早,疗效就越好,针刺不仅能有效改善脑血流,而且有助于吸收脑血肿,减少神经损伤^[20]、缩短病程^[3,21]和减少并发症^[22]。

针刺疗法中由百会经向曲鬓穴透刺法,可明显缓解脑出血的继发性病理损害。研究表明,针刺头部穴位可明显提高患者体内SOD活性,减少NO生成,提高认知能力,针刺可以有效发挥抗氧化效果,改善脑供血以及保护营养神经系统,进而减轻脑血管病^[23-24]。本研究中,通过Ludmila Belayev评分对3组大鼠中枢神经系统缺陷的情况进行判断,结果模型组和针刺组在出血后的1 d发生了中枢神经系统缺陷的情况,其中3 d的缺陷情况最为严重,7 d后缺陷情况得到减轻,两组中大鼠的1 d和3 d的中枢神经系统缺陷情况较假手术组稍减轻,且7 d后两组的缺陷情况基本相同,可充分证明,早期的针刺治疗达到更好的疗效。

铁死亡的死亡方式是一种新型细胞程序性死亡^[25]。发生铁死亡的组织细胞内铁离子会积累,并产生GSH耗竭和脂质过氧化病理过程。GSH主要发挥抗氧化、清除自由基作用,System Xc⁻是调节细胞内外GSH平衡状态的主要蛋白,通过调节细胞内外氨基酸水平来影响GSH合成。Nrf2是抗氧化反应的主要调节因子,能使细胞免受铁死亡的损伤,并且还可介导铁代谢蛋白、GPX4等铁死亡相关蛋白的表达。本研究观察了大鼠脑组织中System Xc⁻、MDA、GSH、GPX4的表达,通过Western blot检测发现,模型组大鼠System Xc⁻蛋白在3 d时达到顶峰之后开始下降,假手术组和针刺组整体表现为随着时间增加System Xc⁻蛋白量不断增加的趋势。另外,GPX4和MDA的表达与

铁死亡关系密切。GPX4通过GSH的作用,可将脂质过氧化中的过氧键转化为轻基,降低了铁死亡的风险。MDA是脂质氧化的结果,能够使细胞膜的损伤加剧,还能使线粒体呼吸链复合物和线粒体内关键酶的活性受到影响。因此,MDA的表达水平可以间接反映出机体脂质过氧化及细胞损伤的程度。本研究中,与假手术组比较,模型组大鼠的MDA水平明显升高($P < 0.05$);GSH、GPX4水平均明显降低($P < 0.05$);在同一时间点与模型组相比较,针刺组大鼠MDA水平均明显降低($P < 0.05$);GSH、GPX4水平均明显升高($P < 0.05$)。模型组和针刺组大鼠在3 d MDA水平达到高峰,7 d MDA水平下降。GSH、GPX4水平则不断升高。结果表明针刺可降低脑出血后脑组织中MDA水平的表达、提高GSH、GPX4水平的表达,可促进脑血肿的吸收,减轻神经的损伤,推测针刺可能通过调节MDA、System Xc⁻、GSH、GPX4的表达对脑出血后的脑组织神经细胞铁死亡神经功能修复产生积极作用。

线粒体铁蛋白(FtMt)是一种线粒体铁储存蛋白,在调节细胞铁平衡和维持细胞氧化还原平衡方面起着关键作用^[26-27]。研究表明,铁死亡的发生与线粒体的形态、能量供应和新陈代谢均有关,因此研究针刺治疗脑出血后线粒体的变化至关重要。韩佳炜等^[28]研究针灸对于脑出血大鼠治疗后线粒体形态结构变化影响中表明针刺能明显改善脑出血后周围组织线粒体的损

害。本研究通过Western blot检测发现,模型组大鼠线粒体铁蛋白在3 d时达到顶峰之后开始下降,假手术组和针刺组整体表现为随着时间增加线粒体铁蛋白量不断增加的趋势。另外,GPX4和MDA的表达与

伤。邹伟等^[29]通过实验证明,针刺可使线粒体结构被破坏的相对较轻,突触结构也相对清晰。这与本实验结果一致,模型组大鼠1 d后线粒体数量逐渐减少,线粒体嵴缩短,线粒体完全的断裂,随后神经元细胞逐渐凋亡,7 d后,神经元中的线粒体结构已有所恢复。针刺组与模型组在各时间点线粒体形态变化均不明显,从而可表明针刺治疗脑出血可减少线粒体结构的破坏,抑制神经元铁死亡的发生。

4 结论

针刺治疗脑出血可促进血肿的吸收,减轻神经损伤,抑制线粒体损伤,可推测出针刺可能通过调节MDA、System Xc⁻、GSH、GPX4的表达对出血后脑组织神经细胞铁死亡神经功能修复产生积极作用。

【参考文献】

- [1] 中国脑出血诊治指南(2019)[J]. 中华神经科杂志, 2019, 45(12):994 - 1005.
- [2] ZOU W, CHEN Q X, SUN X W, et al. Acupuncture inhibits Notch1 and Hes1 protein expression in the basal ganglia of rats with cerebral hemorrhage [J]. Neural Regeneration Research, 2015, 10(3):457 - 462.
- [3] LI Z W, ZHENG X N, LI P. Time - effect relationship of acupuncture on histopathology, ultrastructure, and neuroethology in the acute phase of cerebral hemorrhage [J]. Neural Regeneration Research, 2019, 14(1):107 - 113.
- [4] TAN Y Y, WANG Y Y, ZHANG Q. Electroacupuncture of "Quchi" (LI 11) inhibits the elevation of arterial blood pressure and abnormal sympathetic nerve activity in hypertension rats[J]. Acupuncture research, 2016, 41(2):144 - 149.
- [5] ZECCA L, YODIM M B H, RIEDERER P, et al. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2004, 5(11):863 - 873.
- [6] WANG X Y, MORI T, SUMII T, et al. Hemoglobin - induced cytotoxicity in rat cerebral cortical neurons - caspase activation and oxidative stress[J]. Stroke, 2002, 33(7):1882 - 1888.
- [7] 张琳君,周青山. 中医针灸联合减重步行训练对高血压性脑出血后下肢功能恢复的影响研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(7):711 - 713, 769.
- [8] SUN H, TANG Y, LI L, et al. Effects of local hypothermia on neuronal cell apoptosis after intracerebral hemorrhage in rats [J]. Journal of Nutrition Health & Aging, 2015, 19(3):291 - 298.
- [9] YUNOKI T, DEGUCHI K, OMOTE Y, et al. Anti - oxidativenutrient - rich diet protects against acute ischemic brain damage inrats [J]. Brain Res, 2014, 1587:33 - 39.
- [10] HAN Z, LI L, WANG L, et al. Alpha - 7 nicotinic acetylcholinereceptor agonisttreatment reduces neuroinflammation oxidativestress, and brain injury in mice with ischemic stroke and bonefracture[J]. J Neurochem, 2014, 131(4):498 - 508.
- [11] ZHENG J S, CONR AD M. The metabolic underpinnings of ferroptosis [J]. Cell Metab, 2020, 32(6):920 - 937.
- [12] HIRSCHHORN T, STOCKWELL B R. The development of the concept of ferroptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 133:130 - 143.
- [13] 张学松,宋毓飞,康锦钰,等. 苈蓼酰胺导致胃癌细胞铁死亡的作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(10):1280 - 1283.
- [14] 沈洁,沈梅红,张建斌.《实验针灸学》实验教学现状及探索[J]. 中国中医药现代远程教育, 2013, 11(14):58 - 59.
- [15] CHEN Y, LIU B, GONG W, et al. Auricular acupuncture for migraine a protocol for systematic review and meta - analysis [J]. Medicine, 2020, 99(44):e23036.
- [16] PAN P, ZHANG X, QIAN H, et al. Effects of electro - acupuncture on endothelium - derived endothelin - 1 and endothelial nitric oxide synthase of rats with hypoxia - induced pulmonary hypertension [J]. Experimental Biology and Medicine, 2010, 235(5):642 - 648.
- [17] PARK J M, SHIN A S, PARK S U, et al. The acute effect of acupuncture on endothelial dysfunction in patients with hypertension: a pilot, randomized, double - blind, placebo - controlled crossover trial [J]. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2010, 16(8):883 - 888.
- [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性损伤的机制研究[J]. 针刺研究, 2016, 41(5):410 - 416.
- [19] 陈秋欣,朱路文,庞秀明,等. 针刺负调控TLR4/TRIF信号通路关键因子对脑出血大鼠炎性反应表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(2):283 - 287.
- [20] KIM J H, JUNG H J, KIM T H, et al. Auricular acupuncture for pre - hypertension and stage 1 hypertension; study protocol for a pilot multicentre randomised controlled trial [J]. Trials, 2013, 14:303.
- [21] ZHENG G Q, ZHAO Z M, WANG Y, et al. Meta - analysis of scalp acupuncture for acute hypertensive intracerebral hemorrhage [J]. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2011, 17(4):293 - 299.
- [22] HONG S, AHN L, KWON J, et al. Acupuncture for regulating blood pressure of stroke patients: a systematic review and Meta - analysis [J]. Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2020, 26(12):1105 - 1116.
- [23] 张刚,穆敬平,廖恒,等. 通督调神针刺法对脑梗死后血管性痴呆患者的认知、行为能力及抗氧自由基的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(11):3050 - 3053.
- [24] 何秋帆,唐娅妮,崔艺敏,等. 针灸防治血管性痴呆的研究进展[JOL]. 辽宁中医药大学学报:1 - 12(2023 - 09 - 05)[2023 - 09 - 11]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21. 1543. R. 20230905. 1144. 002. html.
- [25] 李跃兵,王焕梅,孙柳青,等. 电针调节功能性消化不良大鼠胃肠动力障碍及对胃窦组织铁死亡相关因子的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(8):1329 - 1334.
- [26] DRYSDALE J, AROSIO P, INVERNIZZI R, et al. Mitochondrial ferritin; a new player in iron metabolism [J]. Blood Cells Molecules and Diseases, 2002, 29(3):376 - 383.
- [27] WU Q, WU W S, SU L, et al. Mitochondrial ferritin is a hypoxia - inducible factor 1 alpha - inducible gene that protects from hypoxia - induced cell death in brain [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2019, 30(2):198 - 212.
- [28] 韩佳伟,李桂平,郑健刚. 针刺“人中、内关”组穴对脑出血后脑红蛋白表达动态变化及线粒体形态结构变化影响实验研究[J]. 辽

宁中医药大学学报, 2019, 21(4): 170 – 173.

形态学影响的实验研究[J]. 针灸临床杂志, 2007, 11: 41 – 44, 62.

[29] 邹伟, 张国威, 刘芳, 等. 针刺百会透曲鬓穴对脑出血大鼠脑组织

(收稿日期: 2023 – 09 – 18)

Exploration on the Regulatory Effect of Acupuncture on Ferroptosis in Brain Tissue after Cerebral Hemorrhage Based on p62/Keap1/NRF2 Signaling Pathway

DAI Xiaohong^{1,2}, ZHANG Hongwei³, YU Weiwei², ZHAO Yonghou^{1✉}

(1. Heilongjiang Mental Hospital, Harbin 150036, China; 2. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. Hospital of Northeast Forestry University, Harbin 150090, China)

【Abstract】 Objective: To observe the effect of acupuncture treatment on the neurological function of rats with cerebral hemorrhage, and to explore the regulatory effect of acupuncture on ferroptosis in brain tissue after cerebral hemorrhage based on the p62/Keap1/NRF2 signaling pathway. Method: A total of 33 healthy and normal male SD rats were selected and randomly divided into sham surgery group, model group, and acupuncture group. Each group was further divided into three subgroups: subgroups on day 1, day 3, and day 7, with one rat in each subgroup of the sham surgery group, and five rats in each subgroup of the model group and acupuncture group. Except for the sham surgery group, all other groups used autologous blood injection to establish a rat model of cerebral hemorrhage. The brain tissue of rats in sham operation group and acupuncture group was stimulated by inserting a needle from Baihui point to Qubin point and Ludmila Belayev neural function score was used to evaluate the degree of functional impairment of rat neural function system in each model group. The expressions of System Xc – and GPX4 proteins in brain tissue were detected by Western blot. The mitochondrial morphology of nerve cells in the brain tissues of rats in each group was observed using transmission electron microscopy. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect changes in MDA, GSH, and GPX4 levels in brain tissue. Result: The acupuncture method of inserting a needle from Baihui point to Qubin point could reduce the Ludmila Bellayev neural function score in rats with cerebral hemorrhage, thereby alleviating neuromuscular conduction defects in rats with cerebral hemorrhage. The relative expression level of System Xc – protein in rats was higher on day 3 and day 7 than on day 1, and the amount of System Xc – protein increased with time in the groups of sham surgery and acupuncture groups. Compared with the sham surgery group, the MDA levels of the model group rats significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of GSH and GPX4 significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group at the same time point, MDA levels in acupuncture group significantly decreased ($P < 0.05$), while, GSH and GPX4 levels significantly increased ($P < 0.05$). The MDA levels of the model group and acupuncture group reached their peak on day 3, started to decrease on day 7, while, the levels of GSH and GPX4 continue to rise. Conclusion: Acupuncture can improve neuromuscular injury and neurological function in rats with acute cerebral hemorrhage. It can inhibit neuronal cell ferroptosis by reducing MDA, increasing the expression levels of System Xc –, GSH, and GPX4 proteins, and play a neuroprotective role in the treatment of cerebral hemorrhage.

【Key words】 Cerebral haemorrhage; Acupuncture treatment; Neurological impairment; Protein expression; Ferroptosis