



# 艾灸补肾活血法防治股骨头坏死中 CirRNA-miRNA 调控 $\alpha$ -MSH 作用和机制的研究

江斌, 曾继勇, 何华锋

(广州市番禺区中医院 骨伤六科, 广东 广州 511400)

**摘要:** **目的** 探究艾灸补肾活血法防治ONFH中CirRNA-miRNA调控 $\alpha$ -MSH作用和机制。**方法** SD大鼠激素性ONFH动物模型研究正常髋关节骨组织和ONFH骨组织microRNA/CircRNA array 表达差异情况,根据芯片结果,验证表达差异明显的CircRNA,针对 $\alpha$ -MSH进行ceRNA术分析,构建激素性ONFH相关的ceRNA网络图,并对目标CircRNA和miRNA 进行验证。**结果** ONFH骨组织miRNA/CircRNA array的表达水平显著高于正常对照组 ( $P<0.05$ )。ONFH骨组织血清 $\alpha$ -MSH水平显著低于正常对照组 ( $P<0.05$ )。目标miRNA类似物干预ONFH骨组织后,目标CircRNA、目标miRNA、 $\alpha$ -MSH mRNA均发生率明显变化 ( $P<0.05$ )。艾灸补肾活血法干预后,目标CircRNA、目标miRNA、 $\alpha$ -MSH mRNA均发生率明显变化 ( $P<0.05$ )。**结论** 艾灸补肾活血法通过影响CirRNA-miRNA表达,调控 $\alpha$ -MSH来实现对股骨头坏死的防治。

**关键词:** 艾灸; 补肾活血; 股骨头坏死; CirRNA-miRNA;  $\alpha$ -MSH; 作用; 机制

**中图分类号:** R245.81

**文献标识码:** B

**DOI:** 10.3969/j.issn.1671-3141.2022.54.012

## 0 引言

中医典籍中并无股骨头坏死的病名记载,但根据其特点,股骨头坏死应当属于中医学“骨痹”“骨蚀”“骨萎”等范畴<sup>[1]</sup>。中医学认为人体的阴阳之气源于肾,由肾中精气所化生的“元阴、元阳”,推动着机体的阴阳变化,是机体功能活动的原动力,通过补肾的方法可使肾精得到充养,在改善自身的同时亦能使后代拥有更好的体质,表明肾虽为先天之本,但亦可被后天影响<sup>[2]</sup>。近年来研究发现表观遗传学在ONFH的进展中扮演了重要角色,所以深入理解表观遗传学在ONFH种的调控机制具有重要意义。本研究通过芯片检测构建大鼠激素性ONFH模型髋关节骨组织相关的CircRNA-miRNA网络图并验证目的CircRNA/miRNA调控 $\alpha$ -MSH在ONFH发病中的保护作用,并探讨在分离的ONFH骨

组织细胞中,“命门”“血海”艾灸血清是否通过调控CircRNA/miRNA调控 $\alpha$ -MSH防治ONFH,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 大鼠激素致ONFH模型建立

选取30只SD大鼠,8周龄,健康,雌性,经尾部标记法标记处理,分别放置10只不同的笼子,每个笼子平均3只,采用标准动物房饲养。腹腔注射 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 脂多糖,连续注射两次,两次之间的间隔时间为24 h,第二次注射之后,双侧臀部肌肉交替注射 $40 \text{mg}/\text{kg}$ 甲强龙,连续注射3次,每次间隔24 h,第三次注射24 h后每日相同的时间点给予等量生理盐水灌胃,连续灌胃4周。4周时间到后,采用 $50 \text{mg}/\text{kg}$ 戊巴比妥钠(2%)行腹腔麻醉,成功后,取腹主动脉血,离心处理后分离上层血

**基金项目:** 本文系广州番禺区科技计划项目“艾灸补肾活血法防治股骨头坏死中 CirRNA-miRNA 调控  $\alpha$ -MSH 作用和机制的研究”(项目编号: 2020-Z04-045)

**作者简介:** 江斌(1982-),男,汉族,湖北,硕士,主治医师,研究方向:骨关节。

清, 及时送检。于双侧髋关节后行外侧入路, 逐层将皮肤及其皮下组织依次切开, 将髋关节周围肌肉予以分离处理, 同时将关节囊切开, 以充分将股骨头暴露, 与股骨颈基底部截断, 顺利取出股骨头。

### 1.2 组织病理学检测股骨头病变情况

大鼠股骨头置于含10%EDTA的甲醛溶液中进行脱钙, 脱钙液约为股骨头体积的30倍, 每3天缓缓震动浸泡股骨头的脱钙液一次, 每周更换脱钙液一次, 5 mL注射器针头可轻松刺入股骨头组织内即为脱钙成功。脱钙成功后, 沿股骨头中心冠状面剖开股骨头, 采用由低到高浓度的乙醇进行梯度脱水, 随后对股骨头进行透明处理, 包埋, 组织切片的厚度为4  $\mu$ m, HE染色按常规步骤进行。股骨头坏死诊断标准: 股骨头骨坏死区骨小梁稀疏、变细, 甚至骨折, 空骨陷窝增多, 脂肪细胞堆积, 血管减少, 血栓形成等。大鼠双侧股骨头至少有一侧发生骨坏死即定义为骨坏死阳性。

### 1.3 Q-PCR验证筛选的miRNA和CircRNA

按照上述造模方法, 将60只ONFH大鼠再次分为正常组和ONFH组, 每组30只, 对表达水平差异为5倍以上(具体差异倍数的阈值根据实验结果而定)的CircRNA和预测的靶miRNA进行Q-PCR验证, 设计相应的引物, 每次测量至少重复操作3次。Q-PCR操作步骤按常规进行。

### 1.4 RNA干预

将下面4组RNA分别转染至培养的大鼠ONFH微血管内皮细胞: ①目标miRNA模拟物(miRNA mimic); ②设计并合成针对目标CircRNA的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA), Q-PCR检测目标CircRNA、目标miRNA、 $\alpha$ -MSH mRNA的水平变化; ③将miRNA mimic和CircRNA的siRNA同时转染至大鼠ONFH微血管内皮细胞中; ④用于阴性对照的不与miRNA片段类似或无CircRNA靶点的scramble RNA(作为阴性对照)。

### 1.5 “命门”“血海”艾灸血清制备

艾灸血清组取大鼠命门和血海穴, 均采用直接灸法, 用精制艾绒制成小艾炷(1.5 mg/壮), 2壮/次, 隔日1次, 连续治疗6次; 正常对照组小鼠除不作艾灸治疗外, 余处理同艾灸血清组。治疗结束后, 次日眼球取血, 血液凝固后, 3000 r/min, 10 min离心, 分离血清, 同组血清混合, 过滤除菌, 56  $^{\circ}$ C, 30分钟水浴灭活后, 无菌冻存管分装, 标记后-70  $^{\circ}$ C冻存储存。各组血清使用前需经培养, 实验证实无微生物污染后方可应用于细胞培养。具体实验时根据不同浓度调整为5%, 15%和20%。

根据前述分为5%艾灸血清(低), 10%艾灸血清(中), 20%艾灸血清(高)以及空白艾灸血清组。设计并合成针对目标CircRNA的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA), 然后转染至大鼠ONFH软微血管内皮细胞中, 在细胞中加入“命门”“血海”艾灸血清(艾灸血清高、中、低剂量以及空白血清组)。Q-PCR检测目标CircRNA、目标miRNA、 $\alpha$ -MSH mRNA的水平变化, TUNEL试验检测微血管内皮细胞凋亡情况, WB检测 $\alpha$ -MSH蛋白。

### 1.6 统计学处理

数据分析使用SPSS21.0统计软件包, 计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用 $t$ 检验, 计数资料采用%表示, 组间比较采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 骨组织miRNA/CircRNA array和 $\alpha$ -MSH表达的比较

ONFH骨组织miRNA/CircRNA array的表达水平显著高于正常对照组( $P < 0.05$ )。ONFH骨组织血清 $\alpha$ -MSH水平显著低于正常对照组( $P < 0.05$ ), 见表1。

**表 1 骨组织 miRNA/CircRNA array 和  $\alpha$ -MSH 表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	例数	miRNA/CircRNA(%)	$\alpha$ -MSH(pg/mL)
ONFH 组	10	1.20 $\pm$ 0.23	13.15 $\pm$ 2.20
正常对照组	10	2.48 $\pm$ 0.31	15.12 $\pm$ 3.01
<i>t</i>	-	8.521	4.312
<i>P</i>	-	0.000	0.021

## 2.2 目标miRNA类似物干预前后相关生物学分子表达的比较

目标miRNA类似物干预ONFH骨组织后，目标CircRNA、目标miRNA、 $\alpha$ -MSH mRNA均发生率明显变化 ( $P < 0.05$ )，见表2。

**表 2 目标 miRNA 类似物干预前后相关生物学分子表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

时间	CircRNA(%)	miRNA(%)	$\alpha$ -MSH mRNA(%)
干预前	45.62 $\pm$ 3.61	52.36 $\pm$ 4.85	12.05 $\pm$ 2.10
干预后	48.70 $\pm$ 4.72	70.94 $\pm$ 6.63	14.78 $\pm$ 3.52
<i>t</i>	5.130	12.306	4.120
<i>P</i>	0.001	0.001	0.017

## 2.3 艾灸干预前后相关生物学分子表达的比较

艾灸补肾活血法干预后，目标CircRNA、目标miRNA、 $\alpha$ -MSH mRNA均发生率明显变化 ( $P < 0.05$ )，见表3。

**表 3 艾灸干预前后相关生物学分子表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

时间	CircRNA(%)	miRNA(%)	$\alpha$ -MSH mRNA(%)
干预前	45.62 $\pm$ 3.61	52.36 $\pm$ 4.85	12.05 $\pm$ 2.10
干预后	60.39 $\pm$ 4.17	84.56 $\pm$ 7.45	21.05 $\pm$ 3.62
<i>t</i>	7.054	16.320	7.120
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001

## 3 讨论

中医典籍中并无股骨头坏死的病名记载，但根据其特点，股骨头坏死应当属于中医学“骨痹”“骨蚀”“骨萎”等范畴<sup>[3-4]</sup>。祖国医学认为肾虚血瘀是激素性股骨头坏死的发病基础<sup>[5]</sup>。近年来研究发现表观遗传学在ONFH的进展中扮演了重要角色，所以深入理解表观遗传学在ONFH种的调控机制具有重要意义<sup>[6]</sup>。环状RNA (CircRNA) 广泛存在于人体的各种

细胞中，有时甚至超过它们线性异构体的10倍之多，其分子呈封闭环状结构，不易被核酸外切酶RNase降解，比线性RNA更稳定，具有高度保守性<sup>[7-9]</sup>。 $\alpha$ -MSH大部分由下丘脑垂体和多种外周组织细胞分泌，是一种天然的内源性肽类激素，它归属于黑皮质素家族，是在前体激素转换酶调控下促黑皮质素原释放出的13个氨基酸残基<sup>[10-11]</sup>。

艾灸疗法起源于我国，源远流长，是针灸医学的重要组成部分也是中医防病治病的一个重要手段<sup>[12-13]</sup>。中医学认为，艾灸具有温经散寒、消瘀散结等多种作用<sup>[14]</sup>。正如《本草纲目》云：“艾叶，生则微苦太辛，熟则微辛太苦。生温熟热，纯阳也<sup>[15]</sup>。可以取太阳真火，可以回垂绝元阳……灸之则透诸经而治百种病邪，起沉痾之人为康泰，其功亦大矣”。艾灸通过对经络穴位的温热刺激，起到行气化瘀通络作用。艾灸的温热刺激不仅涉及肌肤表层，也涉及深层组织，使局部组织充血，局部的血液循环与淋巴循环及组织代谢能力增强，缓解和消除平滑肌痉挛，从而使经络得通、组织得养促使机体自我修复而焕发生机，疼痛自止<sup>[16-18]</sup>。研究表明<sup>[19-20]</sup>，艾灸对于股骨头坏死具有良好的作用，艾灸股骨头缺血性坏死患者的患髋周围可以增加局部血液供应，改善患部缺血状态，从而修复坏死组织、改善症状。然而艾灸防治ONFH的机制目前仍未完全明确。本研究结果显示，ONFH骨组织miRNA/CircRNA array的表达水平显著高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。ONFH骨组织血清 $\alpha$ -MSH水平显著低于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。目标miRNA类似物干预ONFH骨组织后，目标CircRNA、目标miRNA、 $\alpha$ -MSH mRNA均发生率明显变化 ( $P < 0.05$ )。艾灸补肾活血法干预后，目标CircRNA、目标miRNA、 $\alpha$ -MSH mRNA均发生率明显变化 ( $P < 0.05$ )，提示了艾灸补肾活血法通过影响CircRNA-miRNA表达，调控

$\alpha$ -MSH来实现对股骨头坏死的防治。当然,由于相关报道至今少见,本研究所获取到的数据结果,仍有待深入探究并考证。

综上所述,艾灸补肾活血法通过影响CirRNA-miRNA表达,调控 $\alpha$ -MSH来实现对股骨头坏死的防治。

#### 参考文献

- [1] Cohen-Rosenblum A, Cui Q. Osteonecrosis of the Femoral Head. *Orthop Clin North Am.* 2019;50(2):139-149.
- [2] 刘铁钢,陈卫衡.非创伤性股骨头坏死的流行病学研究进展[J].当代医学,2009,14(17):2637-2639.
- [3] 崔立强.中国大陆地区股骨头坏死病因学调查及危险因素初步分析[D].北京:北京协和医学院,2014.
- [4] Fukushima W, Fujioka M, Kubo T, et al. Nationwide epidemiologic survey of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(10):2715-24.
- [5] 邢冰琪,孙洪胜,傅春升,等.补肾活血法治疗激素性股骨头坏死的研究进展[J].中国药业,2013,22(24):15-17.
- [6] 张文信,秦亚梅,党少平,等.补肾活血法治疗激素性股骨头坏死理论探析[J].新中医,2012(8):193-194.
- [7] Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrine Reviews.* 2006;27:736-749.
- [8] Catania A, Airaghi L, Colombo G, et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. *Trends Endocrinol Metab.* 2000,11(8):304-8.
- [9] 张文军,孙升云.从表观遗传学探讨中医“肾为先天之本、脾为后天之本”理论.广州中医药大学学报,2015,1(3):559-561.
- [10] Zhao J, Ma XL, Ma JX, et al. TET3 Mediates Alterations in the Epigenetic Marker 5hmC and Akt pathway in Steroid-Associated Osteonecrosis. *J Bone Miner Res.* 2017;32(2):319-332.
- [11] Szabo L, Salzman J. Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges. *Nat Rev Genet.* 2016. 17(11):679-692.
- [12] Kulcheski FR, Christoff AP, Margis R. Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker. *J Biotechnol.* 2016. 20(238):42-51.
- [13] 黄凯裕,梁爽,胡光勇,等.局部热刺激的生物学效应与艾灸温通原理[J].针刺研究,2015,40(6):504-509.
- [14] 杨华元,刘堂义.艾炙疗法的生物物理机制初探[J].中国针灸,1996,16(10):17-18.
- [15] 涂国卿,邹来勇.敏感穴位热灸法对兔股骨头缺血性坏死修复的病理观察[J].时珍国医国药,2014(6):1524-1525.
- [16] 杨声强.艾灸配合针刺治疗股骨头缺血性坏死11例[J].中国针灸,2014,34(2):176.
- [17] 孙双历,汪洋,宋秀娟,等.艾灸血清对背根神经节神经突起影响的体外观察[J].上海针灸杂志.2003.22(7):19-22.
- [18] 黄筠,魏莉,熊一向.艾灸血清对人肺腺癌细胞株A549体外生长的影响[J].中国中医基础医学杂志.2010(12):1160-1161.
- [19] 赵英侠,王静,秦逸人,等.针灸血清作用的研究概况.上海针灸杂志,2005,24(12):40-42.
- [20] Okazaki S, Nagoya S, Matsumoto H, et al. TLR4 stimulation and corticosteroid interactively induce osteonecrosis of the femoral head in rat. *J Orthop Res.* 2016(34):342-345.
- [11] 田瑞雪,路晓淼,赵莉莉,等.Forsus矫治器和SGTB矫治器治疗青少年安氏Ⅱ类错牙合畸形的临床疗效对比[J].临床医学工程,2020,27(1):5-6.
- [12] 董杰,陈向飒,魏莉莉.MRC矫治器在儿童安氏Ⅱ类错颌畸形早期矫治中应用观察[J].临床医学工程,2019,26(7):873-874.
- [13] 朱亚玲,吴佩佩,杨政尧,等.MRC矫治器对口呼吸所致安氏Ⅱ类1分类错颌的疗效分析[J].西北国防医学杂志,2018,39(12):807-811.
- [14] 吴红.MRC矫治器结合肌功能训练对安氏Ⅱ类错牙合畸形伴不良习惯的矫治效果[J].中国当代医药,2020,27(26):125-127.

(上接第27页)

- [9] 王仙芳.儿童口腔不良习惯导致错颌畸形的临床疗效观察[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(68):2.
- [10] 刘晓莉,谭广有.直丝弓矫治器和Begg矫治器治疗安氏Ⅱ类1分类错牙合畸形疗效比较[J].中国美容医学,2020,29(2):119-122.