基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003784

电针调控PPARγ-CD36信号通路降低Hba-a1、Hbb-bt表达减轻脊髓损伤后细胞凋亡的研究

李明娇，唐成林，杨祝歆，赵鸿娣，王嘉培，邢珂晗，黄思琴
（重庆医科大学中医药学院中医防治代谢性疾病重庆市重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：本研究旨在建立脊髓损伤小鼠模型探讨电针（electroacupuncture，EA）干预小鼠急性脊髓损伤（spinal cord injury，SCI）后细胞凋亡的作用和机制。**方法**：采用雌性C 57 BL/6小鼠进行SCI造模，造模成功后使用随机法分为：脊髓损伤组（SCI组）、Electroacupuncture组（EA组）、Rosiglitazone组（R组），另设立假手术组（Sham组）。造模成功后对EA组小鼠取双侧“夹脊穴”和“足三里穴”进行电针，每日1次，连续治疗14 d；R组腹腔注射过氧化物酶体增殖物激活受体γ（peroxisome proliferator activated receptor γ，PPARγ）激动剂：Rosiglitazone（5 mg/kg），Sham及SCI组不予特殊干预。采用小鼠后肢运动功能评分系统（basso mouse scale，BMS）评分评价运动功能，HE染色法、免疫荧光法检测脊髓损伤后的病理改变，转录组测序（RNA sequencing，RNA-Seq）、定量蛋白质组学（tandem mass tag/isobaric tags for relative and absolute quantification，TMT/iTRAQ）技术检测电针作用的靶点及机制，Western blot法检测PPARγ、分化簇36（cluster of differentiation 36，CD36）、血红蛋白亚基α1（hemoglobin alpha，adult chain 1，Hba-a1）、血红蛋白β亚基（hemoglobin，beta adult t chain，Hbb-bt）、胱氨酸蛋白酶-3（Caspase-3，CASP3）蛋白表达水平。**结果**：与SCI组相比，EA组和R组的后肢运动功能、组织结构和残存细胞数量均有改善。EA组和R组Caspase-3表达降低，PPARγ和CD36表达增加，EA组Hba-a1和Hbb-bt表达降低。此外，RNA-Seq、TMT/iTRAQ技术结果分析、韦恩分析及双组学联合分析确定了Hba-a1和Hbb-bt为电针作用的靶基因。KEGG通路富集分析表明电针被证明对PPAR信号通路有明显影响。**结论**：电针可以通过调控PPARγ-CD36信号通路促进SCI后Hba-a1、Hbb-bt的清除，降低Caspase-3表达水平，减少细胞凋亡的发生，促进脊髓神经功能的恢复。

【关键词】电针；脊髓损伤；凋亡；转录组测序；定量蛋白质组学
【中图分类号】R651.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2024-05-22

Electroacupuncture reduces the expression of Hba-a1 and Hbb-bt and alleviates cell apoptosis after spinal cord injury by regulating the PPARγ-CD36 signaling pathway

Li Mingjiao，Tang Chenglin，Yang Zhuxin，Zhao Hongdi，Wang Jiapei，Xing Kehan，Huang Siqin
（*Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Metabolic Disorders，College of Traditional Chinese Medicine，Chongqing Medical University*）

【**Abstract**】***Objective***：To establish a mouse model of spinal cord injury（SCI），and to investigate the effect of electroacupuncture（EA）intervention on cell apoptosis after acute SCI and its mechanism. ***Methods***：Female C57BL/6 mice were used to establish a model of SCI，and after successful modeling，the mice were randomly divided into SCI group，EA group，and Rosiglitazone group（R group）；a sham-operation group（Sham group）was also established. After successful modeling，the mice in the EA group were given EA at bilateral Jiaji points and Zusanli once a day for 14 days，those in the R group were given intraperitoneal injection of the PPARγ agonist Rosiglitazone（5 mg/kg），and those in the Sham group and the SCI group were not given any specific treatment. BMS score was used to assess motor function；HE staining and immunofluorescence assay were used to observe pathological changes after SCI；RNA-Seq and TMT/iTRAQ techniques were used to identify the targets and mechanisms of EA；Western blot was used to measure the protein expression levels of PPARγ，CD36，Hba-a1，Hbb-bt，and caspase-3. ***Results***：Compared with the SCI group，the EA group and the R group had improvements in hindlimb motor function，tissue struc-

作者介绍：李明娇，Email：1819602769@qq.com，
研究方向：脊髓损伤的电针疗法及机制。
通信作者：黄思琴，Email：huangsiqin@cqmu.edu.cn。
基金项目：国家青年科学基金资助项目（编号：81403466）；重庆市科委资助项目（编号：cstc2017jcyjAX0363）；重庆市基础研究与前沿探索资助项目（编号：cstc2018jcyjAX0036）；2020年重庆市科委卫计委资助项目（编号：2021ZY023890）；2021年重庆市科技局资助项目（编号：cstc2021jcyj-msxmX0203）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250303.1203.002（2025-03-04）

ture, and the number of surviving cells. The EA group and the R group had a significant reduction in the expression of caspase-3 and significant increases in the expression of PPARγ and CD36, and the EA group had significant reductions in the expression of Hba-a1 and Hbb-bt. In addition, RNA-Seq and TMT/iTRAQ techniques, significant analysis, Venn analysis, and dual-omics analysis identified Hba-a1 and Hbb-bt as the target genes of EA. The KEGG pathway enrichment analysis showed that EA had a significant effect on the PPAR signaling pathway. ***Conclusion***: By regulating the PPARγ-CD36 signaling pathway, EA can promote the clearance of Hba-a1 and Hbb-bt after SCI, reduce the expression level of caspase-3, alleviate cell apoptosis, and facilitate the recovery of spinal cord nerve function.

【Key words】electroacupuncture; spinal cord injury; apoptosis; RNA-Seq; TMT/iTRAQ

脊髓损伤（spinal cord injury，SCI）是外力直接作用于脊髓导致的组织及神经受损，损伤部位以下力量、感觉和神经功能器质性或功能性障碍的疾病，给个人和家庭带来严重的精神和经济负担[1-2]，因此围绕SCI的机制、治疗和康复研究是生物医学领域的重要课题。

SCI后，严重的创伤不仅会引起失血性休克，还可导致大量血红蛋白释放，分解为血红蛋白亚基α1（hemoglobin alpha, adult chain 1, Hba-a1）、血红蛋白β亚基（hemoglobin, beta adult t chain, Hbb-bt），形成血栓[3-5]，诱发严重的炎性及氧化应激反应，激活胱氨酸蛋白酶-3（Caspase-3, CASP3），诱导神经细胞凋亡[6]，导致严重的神经功能障碍[7]。研究表明，在脑出血大鼠模型中，脑组织α珠蛋白及β珠蛋白mRNA表达量明显上调[8-9]。过氧化物酶体增殖物激活受体γ（peroxisome proliferator activated receptor γ, PPARγ）通过调控分化簇36（cluster of differentiation 36, CD36）可以清除Hba-a1、Hbb-bt[10]，抑制炎性介质的生成[11-12]，起到抗炎、抗凋亡作用，促进神经功能的恢复[13]。

研究发现，电针在干预SCI后细胞凋亡方面具有良好的治疗作用[14]。研究表明，针刺夹脊穴、背腧穴、骨骼肌关键点及肢体远端穴位等特定穴位可明显提高SCI患者的治疗效果[15]。电刺激夹脊穴、足三里穴可影响分子水平的变化，降低Caspase-3水平，减轻细胞凋亡[16]。然而，确切的调控靶点和机制尚不清楚。电针是否可以通过调控PPARγ-CD36信号通路，促进SCI后Hba-a1、Hbb-bt清除，降低Caspase-3水平，减轻神经细胞凋亡，目前相关研究较少，需要进一步的探索。

本研究旨在探讨电针治疗SCI的生物学机制，拟通过建立SCI小鼠模型，采用转录组测序（RNA sequencing, RNA-Seq）[17]及定量蛋白质组学（tandem mass tag/isobaric tags for relative and absolute quantification, TMT/iTRAQ）[18]技术筛选出SCI后表达变化一致的相关基因和蛋白，检测SCI过程中电针治疗的靶点和机制，研究电针能否通过调控PPARγ-CD36信号通路减轻损伤部位细胞凋亡，促进SCI后神经修复的机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及试剂仪器

1.1.1 动物准备 研究调查采用85只雌性C57BL/6小鼠，均健康状况良好，8周龄，体质量18~21 g。由重庆医科大学实验动物中心提供[清洁级，许可证号：SCXK（渝）2012-0002]。代养于重庆医科大学实验动物中心SPF级动物房，分笼饲养，室温20~24 ℃，相对湿度45%~55%，明暗12 h交替，垫料每日更换，自由摄食、饮水。整个实验过程中对动物处置符合重庆医科大学伦理委员会标准（批准编号：IACUC-CQMU-2023-0431）。

1.1.2 主要试剂和仪器 抗PPARγ抗体（Abcam，货号：ab209350）、抗CD36抗体（AiFang biological，货号：AF07027）、抗Hba-a1抗体（AiFang biological，货号：AF09922）、抗Hbb-bt抗体（AiFang biological，货号：AF10073）、抗Caspase-3抗体（AiFang biological，货号：AF06646）、β-actin（Immunoway，货号：YM3028）、Goat Anti-Rabbit IgG（Biomiky，货号：MK103A）、Goat Anti-Mouse IgG（Biomiky，货号：MK102A）、CY3 Goat Anti-Rabbit IgG（AiFang biological，货号：AFSA006）、488Goat Anti-Mouse IgG（AiFang biological，货号：AFSA002）。Rosiglitazone（美国MCE公司，货号：BRL49653），青霉素、氯化钠注射液（太极西南药业股份有限公司），细胞组织快速裂解液（Radio Immunoprecipitation Assay，RIPA）、蛋白酶磷酸酶抑制剂，BCA蛋白浓度测定试剂盒（中国上海碧云天生物技术有限公司），WB试剂盒（上海雅酶生物医药科技有限公司），HE染色试剂盒及免疫荧光试剂盒（湖南艾方生物科技有限公司），Oligo（dT）磁珠（上海华雅思创生物科技有限公司）。华龙牌无菌针灸针0.17 mm×7 mm（北京大名科技有限公

司），华佗牌SDZ-型电子针疗仪（苏州医疗用品厂有限公司），1-14 K低温高速离心机（美国Sigma），T-10匀浆机（德国IKA公司），蛋白电泳及转印系统（美国Bio-Rad公司），切片机（德国Leica），激光共聚焦显微镜（日本尼康公司），酶标仪（美国Thermo Fisher公司），基因及蛋白测序试剂及仪器（上海美吉生物医药科技有限公司）。

1.1.3 小鼠SCI模型的制备及分组 采用钳夹法制备**SCI**小鼠模型：首先，用1%戊巴比妥钠（0.08 mL/10 g）腹腔注射法麻醉小鼠后，俯卧位固定。碘伏消毒后于脊柱后正中线做纵向切口，使用弯剪钝性剥离肌肉及组织，充分暴露出棘突、椎板和横突，行第1腰椎（L_1）椎板切除术，充分暴露L1节段对应的脊髓。然后，采用血管夹钳夹住该段脊髓15 s，造成该段脊髓不完全性损伤。接着用0.9%氯化钠溶液冲洗清除伤口，伤口处敷青霉素溶液30 s后逐层缝合，最后伤口处碘伏消毒，将小鼠放置在电热毯上复温。以小鼠双后肢瘫痪，大小便失禁，尾巴瘫软，小鼠后肢运动功能评分系统（basso mouse scale，BMS）评分为0分，作为造模成功的标准。术后每日帮助小鼠排尿，每天2次，并做好抗感染工作。Sham组小鼠行椎板切除术，不损伤脊髓。

设立Sham组（25只），另外，对60只小鼠进行SCI造模，造模成功后使用随机数字表法分为SCI组（脊髓损伤组，25只）、EA组（Electroacupuncture：电针组，25只）、R组（PPARγ激动剂：Rosiglitazone组，10只）。

1.1.4 治疗干预方法 EA组：造模后3 h，将小鼠俯卧位胶带固定，根据小鼠常用针灸穴位选取双侧“夹脊穴”和“足三里穴”进行电针治疗，直刺3~5 mm，连接同侧电针仪的1对正负电极，疏密波（1.5 Hz/7.5 Hz，疏波5 s，密波10 s），强度以小鼠后肢轻微震颤，穴位敏化为度（约1.0 mA），每日1次，每次10 min，连续治疗7 d为1个周期，共治疗2个周期[19]。R组：于造模后3 h，小鼠苏醒后给予Rosiglitazone腹腔注射（5 mg/kg）治疗20 d，胶带固定，10 min/d。罗格列酮的使用剂量根据罗格列酮治疗糖尿病神经系统病变的剂量而定[20-21]。Sham组和SCI组：仅采用相同方法固定，10 min/d。

1.1.5 取材 小鼠通过腹腔注射戊巴比妥钠（0.08 mL/10 g）来实施麻醉。待受麻醉小鼠意识丧失处于安静状态后无痛化取材。小鼠仰卧位固定，解剖充分暴露心脏，用PBS灌注心尖并引流血液，直到肝脏变白，对脊髓组织进行排血，避免实验误差。然后迅速剪下脊髓损伤部位上下1 cm的脊柱，冰上剥离脊髓组织，收集于冻存管并保存在液氮中，组织样本保存在-80 ℃的冰箱中待进一步检测。每组取6只鼠待PBS灌注至肝掌变白后用4%多聚甲醛进行灌注，待小鼠尾部抽搐僵直，剪下脊髓损伤部位上下1 cm的脊柱，小心剥离骨性组织后用4%多聚甲醛溶液固定标本12 h后，常规脱水，石蜡包埋，使用切片机连续横向切片，厚度6 μm，室温保存用于HE及免疫荧光染色。

1.2 *实验方法及步骤*

1.2.1 行为学评分 于造模后每2 d对各组小鼠采用BMS进行行为学评分[22]。于造模前、造模当天、造模2 d后，后每隔3 d观察小鼠后肢及关节的活动度、协调性、脚爪姿态、躯干稳定性和尾巴姿态。评分为0~9分，评分越低运动功能障碍越重。评分由2名熟悉评分标准但非本课题组人员独立进行，每只小鼠观察5 min，取两者平均数作为被测小鼠的最终得分。

1.2.2 组织形态学检测 为观察脊髓组织的完整性及局部细胞的肿胀、破裂和存活的程度，每组各取3只小鼠损伤区域的脊髓组织切片进行HE染色。石蜡切片烤片后用二甲苯、无水乙醇脱蜡至水，使用苏木素染色、伊红染色后脱水封片，光学显微镜下，NIKON DS-U3成像系统采集图像。

1.2.3 组织内细胞凋亡情况及PPARγ、CD36阳性表达检测 使用免疫荧光染色法检测Caspase-3表达水平观察神经细胞的凋亡情况以及PPARγ、CD36的阳性共表达情况。每组各取3只小鼠损伤区域脊髓组织切片，烤片。先将石蜡切片二甲苯、无水乙醇脱蜡至水，抗原修复，然后用5%山羊血清覆盖样本，按照1∶200的稀释比例，使用Caspase-3，PPARγ和CD36抗体进行一抗孵育，4 ℃过夜，复温、洗涤。使用对应荧光二抗IgG，室温下孵育1 h，Dapi染液复染细胞核。PBS冲洗后加抗荧光淬灭剂封片，荧光显微镜400倍下采图，每张切片选取3~4个视野，Image J计算Caspase-3、PPARγ、CD36细胞阳性表达面积（平均荧光强度=该区域荧光强度总和/该区域面积）。

1.2.4 基因及蛋白检测 为研究电针对脊髓损伤模型小鼠的作用靶点和信号通路，将快速取材后存放在液氮罐中的组织Sham组、SCI组、EA组，每组取3个样本量，每个样本包含4只鼠，每组共12只鼠。为保证实验结果的准确性，将样本送至上海美吉生物医学技术有限公司进行基因及蛋白检测。

1.2.4.1 RNA-Seq Technology进行基因检测 首先，提取样品total RNA。用Nanodrop 2000对所提RNA进行浓度及纯度检测后琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性Agilent2100测定RIN值。用带有Oligo（dT）的磁珠与ployA进行A-T碱基配对，从总RNA中分离出mRNA，用于分析转录组信息。然后加入fragmentation buffer，将mRNA随机断裂，通过磁珠筛选分离出300 bp左右的小片段。在逆转录酶的作用下，加入六碱基随机引物，以mRNA为模板反转合成一链cDNA，随后进行二链合成，形成稳定的双链结构。加入End Repair Mix将其补成平末端，随后在3’末端加上一“A”碱基，用于连接Y字形的接头。采用Illumina将测序图像信号经CASAVA碱基识别转换成文字信号，以fastq格式储存起来作为原始数据。根据index序列区分各个样本的数据，以便进行后续分析。

使用TopHat2软件进行序列比对分析；使用RSEM软件，获得每个样本基因/转录本的Read Counts。进行转录本定量（Transcripts Per Million reads，TPM）转换，对基因/转录本长度和测序深度进行均一化，进而得到标准化的基因/转录本表达水平。然后，使用DESeq2软件进行样本间基因/转录本

的表达差异分析鉴定，研究差异表达基因/转录本的功能。采用R语言编写脚本对基因集中的基因/转录本进行KEGG PATHWAY富集分析，默认当P<0.05时，认为此KEGG通路存在显著富集情况。分析使用P-adjust<0.05和|log2FC|≥1的过滤条件来识别组间表达至少有两倍差异的基因（表1）。

1.2.4.2 TMT/iTRAQ技术进行蛋白检测 首先，对组织进行称重，依次加入RIPA裂解液、苯甲磺酰氟（Phenyl methane sulfonyl fluoride,PMSF)及蛋白酶抑制剂，超声裂解匀浆，4 ℃下12 000 r/min离心30 min，取上清，提取总蛋。BCA试剂盒测定蛋白浓度，用含尿素的PBS将蛋白浓度调至1 mg/mL，依次加入二硫苏糖醇（终浓度5 mmol/L）、碘乙酰胺（终浓度12.5 mmol/L），向样品中注入5倍PBS，按蛋白：胰蛋白酶（100∶1）加入胰蛋白酶，3 000 r/min离心10 min，取上清。Sep-Pak除盐，肽段洗脱并收集，用50 μL 100 mmol/L TEAB复溶加入适量TMT，5%羟胺终止，高压液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）进行蛋白质分离，质谱分析。

将本次鉴定到的全部蛋白以及蛋白序列与五大数据库（Uniprot、GO、KEGG、EggNOG、Pfam）进行比对，获得蛋白的注释信息，进行统计。运用统计学方法，对高分辨质谱所检测的结果进行统计和质控，经过搜库鉴定和波峰分析，获得同一蛋白在不同样本中的表达丰度。进行样本间蛋白的差异表达分析，挖掘和筛选出样本间差异表达蛋白，分析差异蛋白的生物学功能，最后锁定目标蛋白。TMT/iTRAQ分析，采用P-adjust<0.05和上调蛋白FC>1.2，下调蛋白FC<0.83的过滤条件，识别组间差异表达蛋白（表2）。

通过RNA-Seq及TMT/iTRAQ数据关联，利用生信比对计算，进一步挖掘关键分子，揭示相关机理。

1.2.5 Western blot法 取-80 ℃冰箱中保存的脊髓组织进行称重，PE管中加入Oligo（dT）磁珠，依次加入RIPA裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂，研磨匀浆，4 ℃下12 000 r/min离心3 min，取上清，提取总蛋，使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。然后用10% PAGE凝胶快速制备试剂盒制胶，将样品加入SDS-Tricine凝胶中进行电泳，恒压80 V，marker跑出红线转恒压120 V，溴酚蓝即将跑出胶板，转膜：恒电流200 mA，100 min，并转移到PVDF膜上，5 %脱脂牛奶在室温下封闭膜1 h，并用TBST洗涤。加入PPARγ、CD36、Hba-a1、Hbb-bt和Caspase-3一抗，按1∶1 000比例稀释，β-actin按1∶5 000比例稀释后进行一抗孵育，TBST洗涤。加入对应二抗按1∶10 000比例进行稀释后室温下孵育1 h，暗室内滴加ECL化学发光液，曝光约1 min。IMAGE STUDIO成像系统采集图像，Image J分析并计算相对表达量（相对表达量＝目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值）。

1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism 8.0对数据进行统计学分析。实验数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。组间比较采用单因素方差分析（ANOVA），Bonferroni多重检测校正用于转录组测序和蛋白质组学分析。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 EA及Rosiglitazone治疗后各组小鼠行为学检测评分比较

与Sham组比，SCI组、EA组及R组第1天BMS评分显示造模成功（P=0.001，P=0.001）；与SCI比，EA组及R组神经功能评分增加（P=0.001，P=0.001）（图1A）；随着治疗时间延长，EA组及R组与SCI组相比评分较好且稳定（图1B）。

2.2 各组病理形态学染色结果比较

HE染色显示Sham组小鼠脊髓组织结构完整，细胞形态正常、均匀分布。SCI组细胞肿胀明显，细胞核固缩、变形、核仁消失，形态正常细胞数量减少；与SCI组相比，EA组、R组小鼠脊髓内的细胞肿胀、细胞核固缩减轻，形态正常的细胞数目较多（图2）。

2.3 EA和Rosiglitazone治疗对各组小鼠脊髓中Caspase-3的抑制作用

与Sham组比，SCI组Dapi阳性标记的细胞数量减少（图3A），平均荧光强度下降（图3B），Caspase-3阳性表达细胞数量明显增多（图3A箭头所示），Caspase-3阳性表达面积增加（P=0.001）（图3C）；与SCI组相比较，EA组和R组Dapi阳性标记的细胞数量增加（图3A），平均荧光强度上升（图3B），Caspase-3阳性细胞数量明显减少（图3A箭头所示），Caspase-3阳性表达面积减少（P=0.001，P=0.001）（图3C）。

2.4 Sham组、SCI组及EA组RNA-Seq及TMT/iTRAQ技术统计学分析

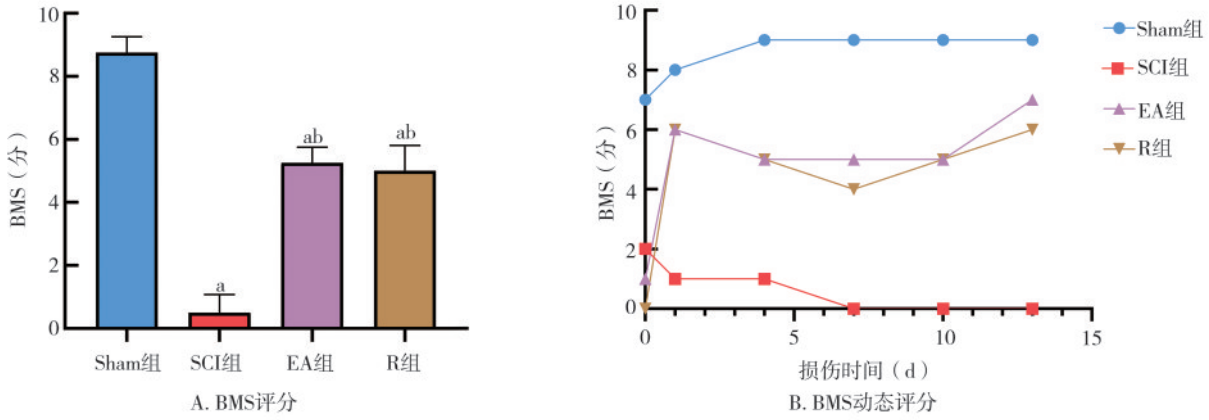
对Sham组、SCI组、EA组测序结果进行两两分析，RNA-

表1 转录组测序技术差异显著性分析（SCI组 vs. EA组）

基因编码	基因名称	FC	Log2FC	显著性	趋势
ENSMUSG00000069919	*Hba-a1*	0.489	−1.033	是	下调
ENSMUSG00000073940	*Hbb-bt*	0.465	−1.104	是	下调

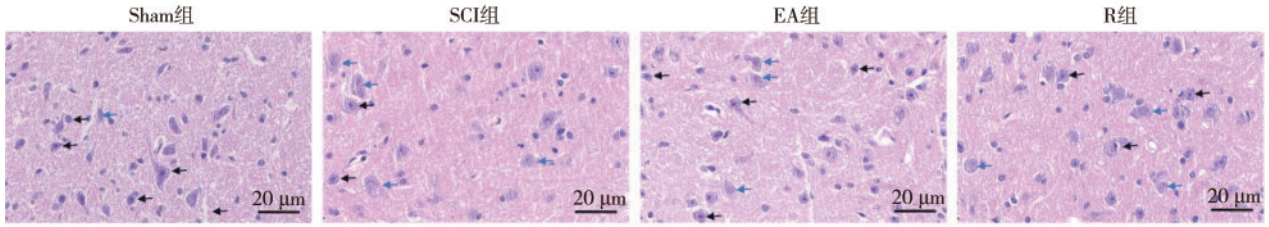
表2 定量蛋白质组学技术差异显著性分析（SCI组 vs. EA组）

蛋白质编码	基因信息	FC	Log2FC	显著性	趋势
ENSMUSP00000095794	*Hba-a1*	2.987	1.579	是	下调
ENSMUSP00000090897	*Hbb-bt*	3.639	1.864	是	下调



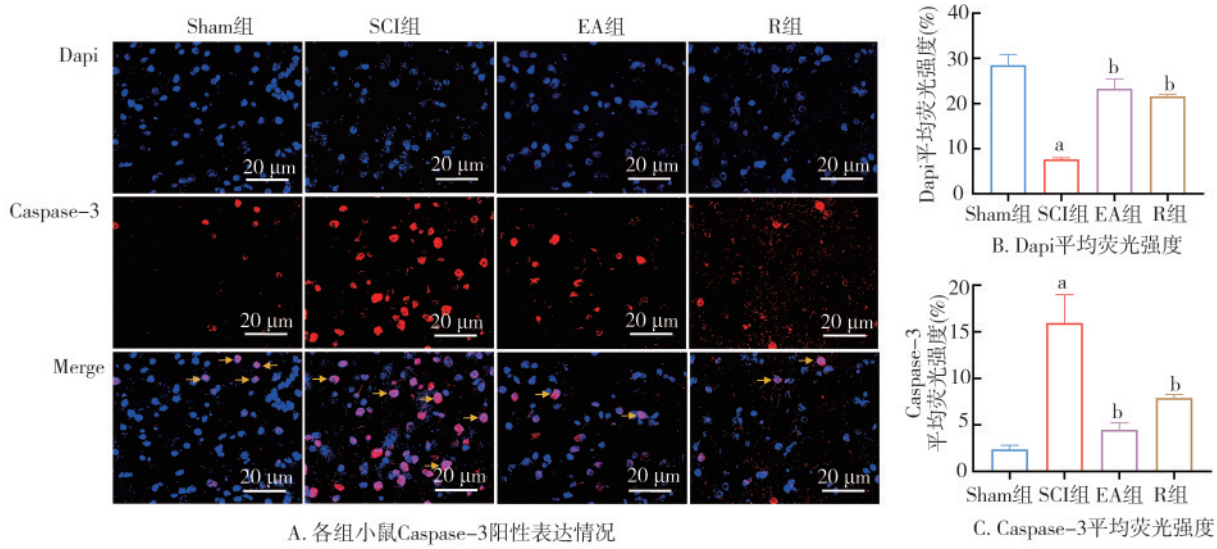
注：a，与Sham组比较，$P<0.05$；b，与SCI组比较，$P<0.05$

图1　BMS评分



注：黑色箭头所示为形态正常的细胞，蓝色箭头所示为肿胀破裂的细胞

图2　各组损伤区病理形态比较



注：蓝色为Dapi，红色为Caspase-3；箭头所指为Merge情况；a，与Sham组比较，$P<0.05$；b，与SCI组比较，$P<0.05$

图3　脊髓组织内Caspase-3阳性表达情况

Seq分析基于P-adjust<0.05 & |log2FC|≥1，上下调差异倍数为2的筛选条件获得组间表达差异基因；TMT/iTRAQ基于P-adjust<0.05&上调蛋白FC>1.2，下调蛋白FC<0.83的筛选条件获得组间表达差异蛋白。

在SCI组vs Sham组的差异基因中，共筛选出44个差异基因，其中5个上调，39个下调；在SCI组vs. EA组的差异基因中，共筛选出11个差异基因，其中1个上调，10个下调；在SCI组vs. Sham组的差异蛋白中，共筛选出349个差异基因，其中289个上调，60个下调；在SCI组vs. EA组的差异蛋白中，共筛选出32个差异蛋白，其中17个上调，15个下调（图4）。

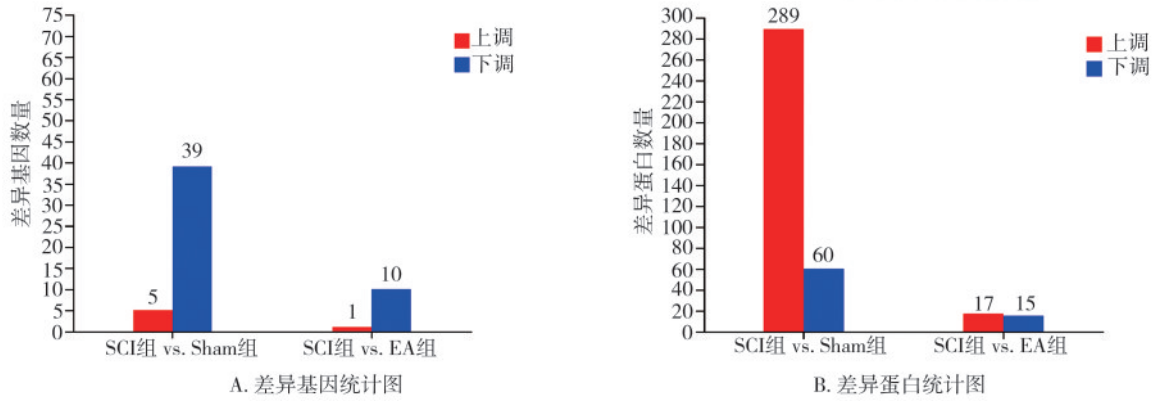
对RNA-Seq及TMT/iTRAQ技术结果用美吉生信云分析平台将转录组与蛋白组的数据进行韦恩关联分析及九象限关联分析结果表明，SCI组 vs. Sham组无交集基因及蛋白

（图 5、6、7A、8A）；SCI 组 vs. EA 组 Hba-a1、Hbb-bt 基因及蛋白测序结果存在显著差异，表明电针在 Hba-a1、Hbb-bt 两个基因是电针作用的靶点（表 1、2，图 5、6、7B、8B）。

2.5　基因 KEGG 功能富集分析

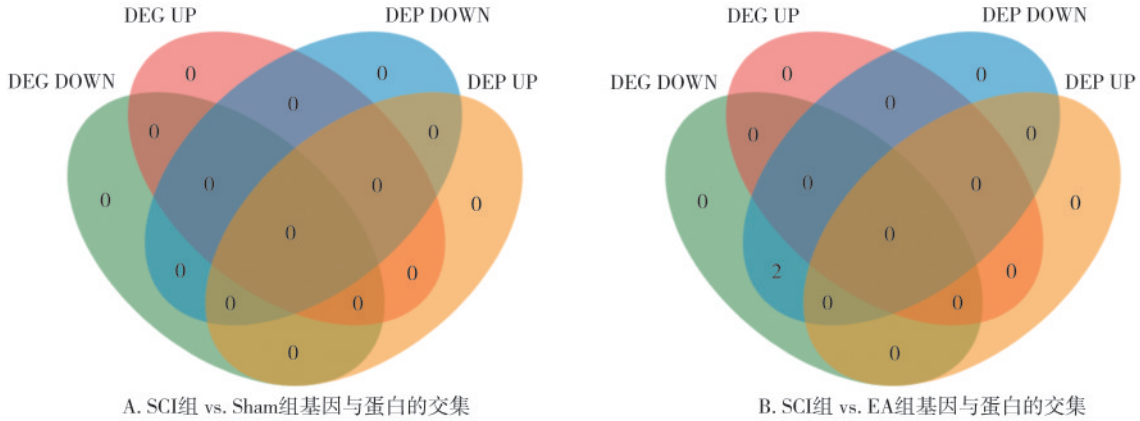
将基因测序结果进行功能富集分析（KEGG Pathway）进行两两比较，显示电针作用信号通路及基因富集在 PPAR 信号通路（图 9）。

富集在 PPAR 信号通路的相同基因共 4 个，信息如下，其中 CD36 与免疫识别、炎症反应和细胞凋亡之间的关系密切相关（表 3）。



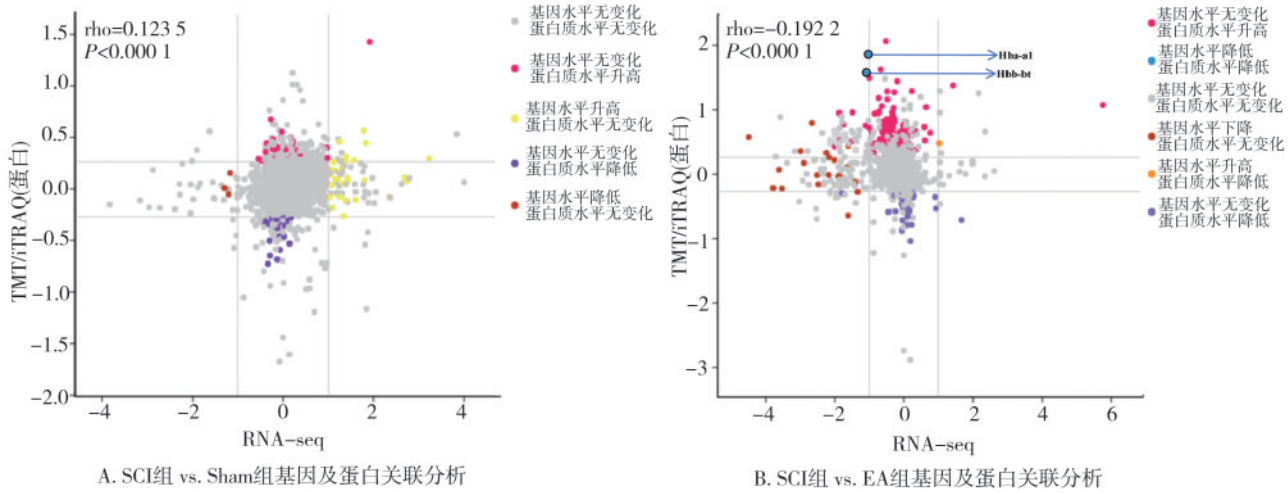
A. 差异基因统计图　　B. 差异蛋白统计图

图 4　差异基因及差异蛋白统计图



A. SCI组 vs. Sham组基因与蛋白的交集　　B. SCI组 vs. EA组基因与蛋白的交集

图 5　差异表达基因（DEG）和差异表达蛋白（DEP）交集韦恩分析



A. SCI组 vs. Sham组基因及蛋白关联分析　　B. SCI组 vs. EA组基因及蛋白关联分析

图 6　基因及蛋白关联九象限图

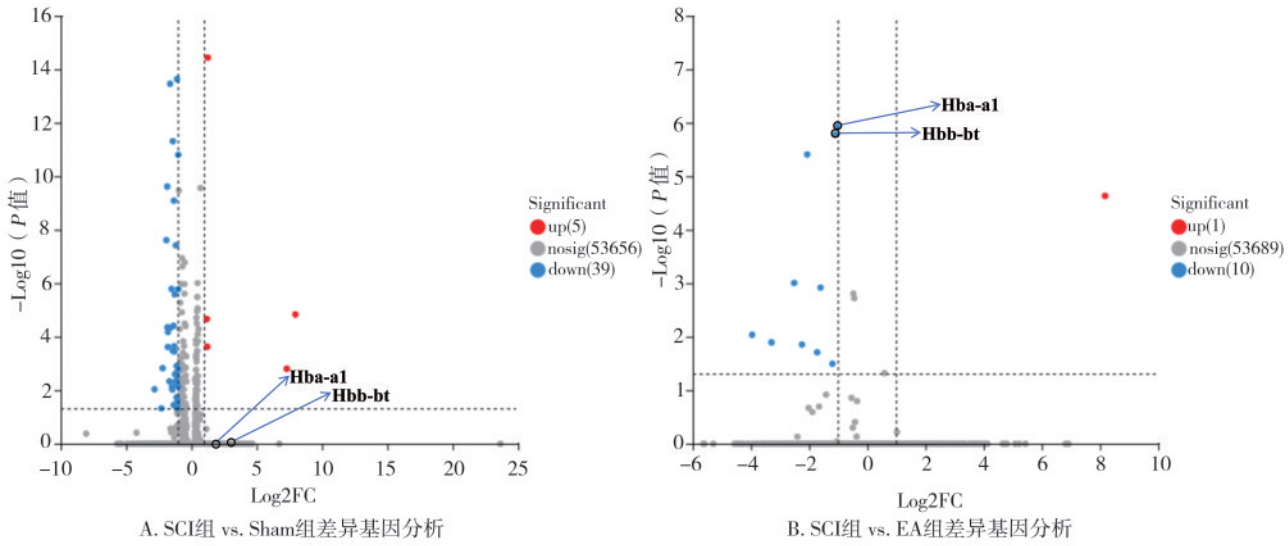


图7　Hba–a1、Hbb–bt基因差异火山图

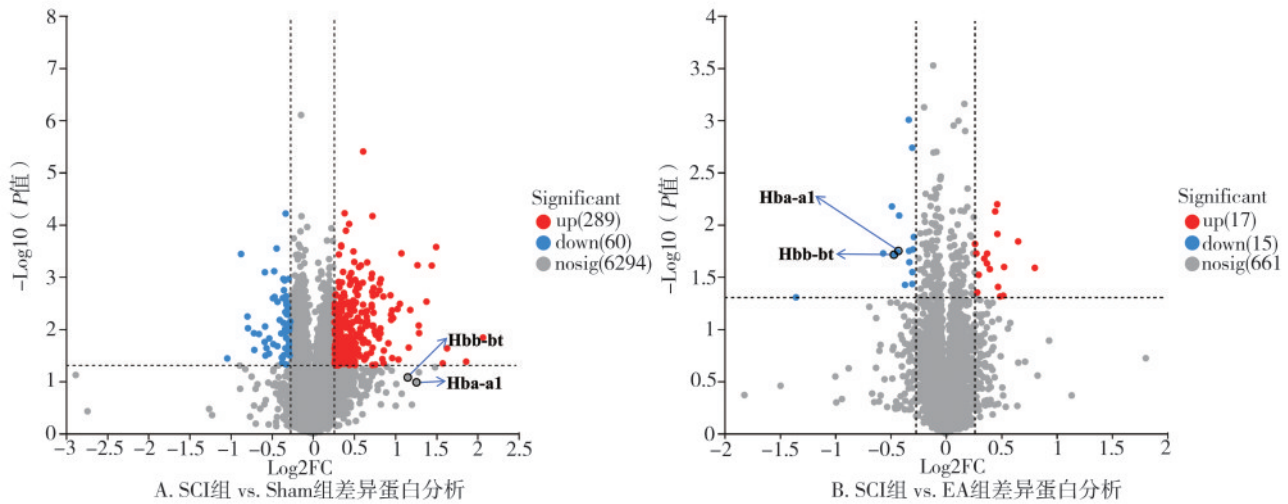


图8　Hba–a1、Hbb–bt蛋白差异火山图

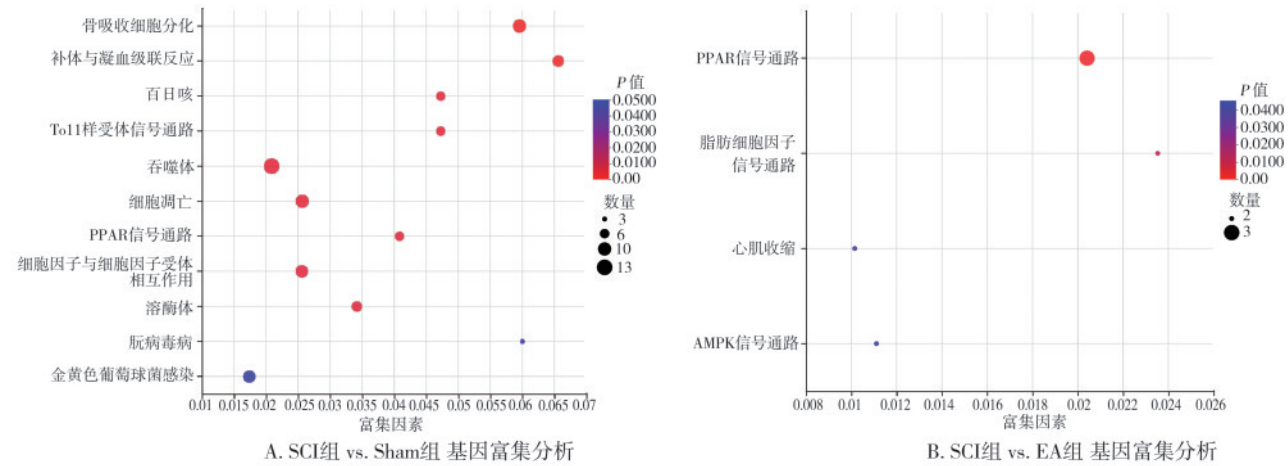


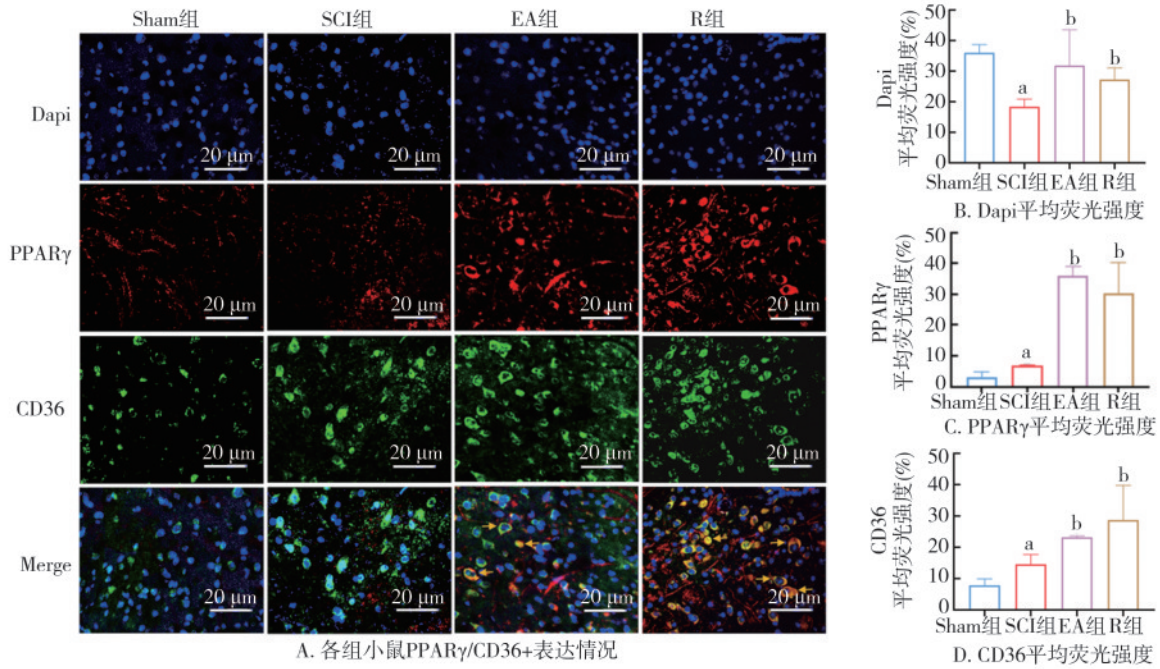
图9　基因富集通路统计分析

2.6　EA 及 Rosiglitazone 治疗对小鼠脊髓中 PPARγ、CD36 的激动作用

使用免疫荧光法检测结果显示与 Sham 组比，SCI 组 PPARγ、CD36 阳性表达面积增加（P=0.049，P=0.037）；与 SCI 组比，EA 组、R 组 PPARγ 阳性表达面积增加（P=0.000，P=0.002），CD36 阳性表达面积增加（P=0.009，P=0.048）（图 10）；使用 Western blot 法分析结果表明与 Sham 组比，SCI 组 PPARγ（P=0.01）蛋白相对表达量上升；CD36 表达上升（P=0.049）；与 SCI 组比，EA 组及 R 组 PPARγ（P=0.047、P=0.003）表达上升、CD36 表达上升（P=0.022、P=0.000）（图 11）。

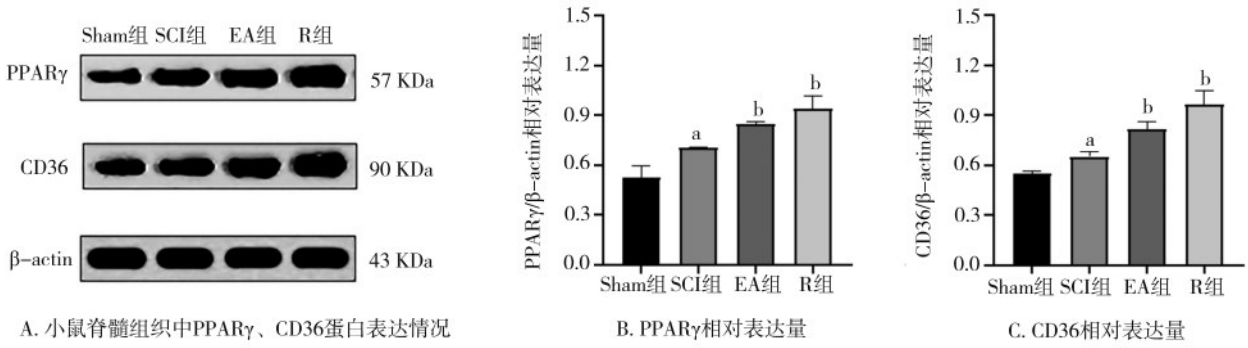
表 3　PPAR 信号通路基因富集情况

基因编码	基因名称	功能注释
ENSMUSG00000027513	*Pck1*	磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶 1 是糖异生的关键调控因子，受到各种因素的影响，包括胰岛素、糖皮质激素、胰高血糖素、cAMP 和饮食[23]。
ENSMUSG00000002944	*Cd36*	CD36 分子是一种具有多个翻译后修饰位点的清道夫受体，可以与不同的配体结合，并参与调节凋亡细胞清除、脂质摄取、免疫识别、炎症和分子黏附[24]。
ENSMUSG00000022878	*Adipoq*	脂联素、C1Q 和胶原蛋白结构域包含的基因。这些被编码的蛋白质在血浆中循环，并参与了新陈代谢和激素的生成过程[25]。
ENSMUSG00000062515	*Fabp4*	脂肪酸结合蛋白 4，在细胞内长链脂肪酸的摄取、运输和代谢调节中起着至关重要的作用[26]。



注：蓝色为 Dapi，红色为 PPARγ，绿色为 CD36，箭头所指为 Merge 情况；a，与 Sham 组比较，P<0.05；b，与 SCI 组比较，P<0.05

图 10　脊髓组织 PPARγ、CD36 阳性表达情况



注：a，与 Sham 组比较，P<0.05；b，与 SCI 组比较，P<0.05

图 11　Western blot 结果

2.7 脊髓损伤后 Hba-a1、Hbb-bt 因子及凋亡关键蛋白 Caspase-3 的表达

RNA-Seq 及 TMT/iTRAQ 定量分析结果表明，与 Sham 组比，SCI 组的 Hba-a1、Hbb-bt 表达上升。与 SCI 组比，EA 组的 Hba-a1、Hbb-bt 的表达下降（图 12、13）；使用 Western blot 法检测结果分析表明与 Sham 组比，SCI 组的 Hba-a1（P=0.000）、Hbb-bt（P=0.000）、Caspase-3（P=0.000），差异有统计学意义；与 SCI 组比，EA 组 Hba-a1（P=0.000）、Hbb-bt（P=0.012）、Caspase-3（P=0.000）表达下降（图 14）。

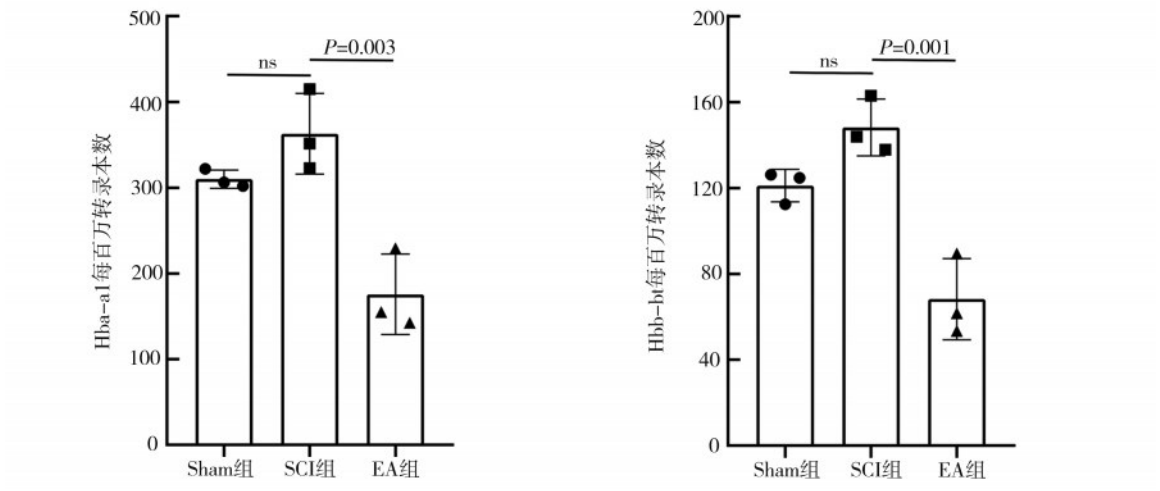


图 12 Hba-a1、Hbb-bt基因表达量统计分析

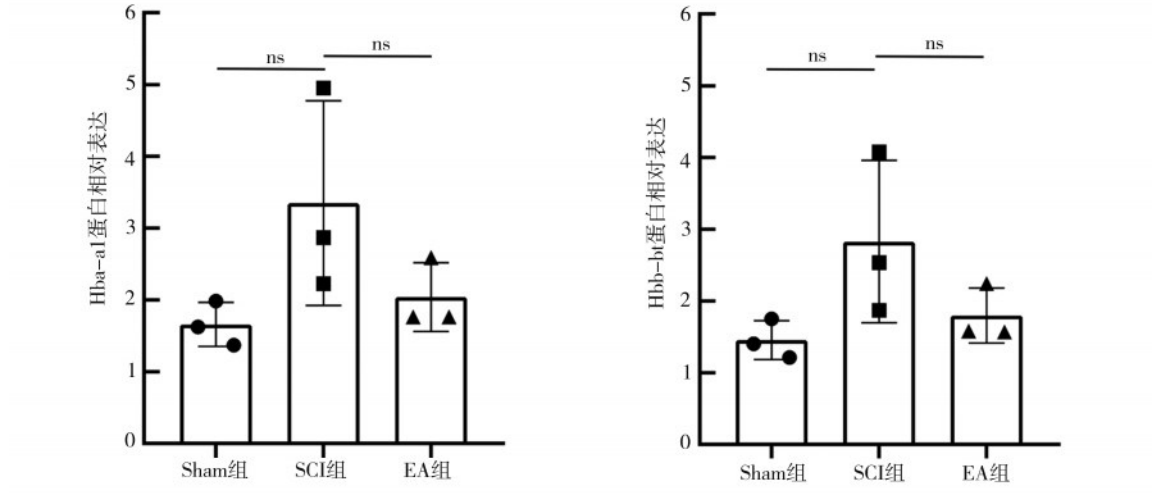
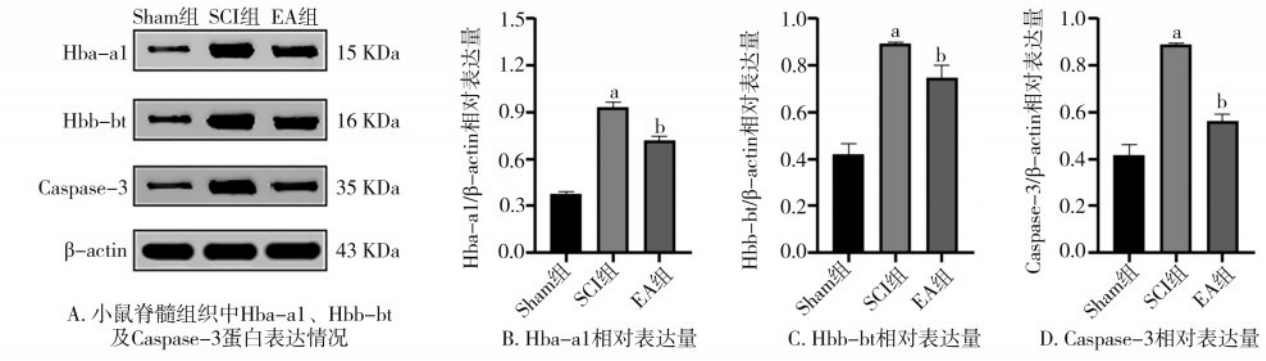


图 13 Hba-a1、Hbb-bt蛋白丰度统计分析



注：a，与Sham组比较，P<0.05；b，与SCI组比较，P<0.05

图 14 Western blot结果

3 讨 论

SCI是严重的中枢神经系统损伤疾病，损伤部位水平以下常伴随的感觉、运动和神经功能缺陷[27]。损伤部位出血程度与脊髓损伤严重程度关系密切[28]，损伤部位血红蛋白破坏会导致Hba-a1和Hbb-bt表达上调，脊髓微环境失衡，通常伴随着细胞炎症、自噬、坏死和凋亡等过程[29-30]。其中细胞凋亡是脊髓损伤后细胞死亡的重要途径，在分子水平上表现为Caspase-3表达的增加[31]。目前脊髓损伤的治疗重点是保护脊髓损伤后的神经细胞和改善微环境[32]。脊髓损伤患者需要长期的保守治疗和康复训练，以维持残余神经功能[33]。

本研究发现：电针及罗格列酮治疗可以明显提高脊髓损伤小鼠的行为学评分，改善脊髓损伤部位细胞肿胀、变形、增加损伤部位细胞存活数量。电针治疗主要针对Hba-a1和Hbb-bt靶点，下调其在脊髓损伤小鼠中的表达。蛋白质组学的变化趋势与转录组学的研究结果相一致。基因KEGG富集分析表明，脊髓损伤后的基因变化与PPAR信号通路密切相关。Pck1、Cd36、Adipoq和Fabp4是PPAR信号通路的潜在关键靶点，其中Cd36与凋亡密切相关[34]。PPARα和PPARβ与脂质代谢相关，而PPARγ参与炎症和细胞代谢[35]。这些因子与CD36共同介导了细胞的凋亡。罗格列酮治疗后PPARγ和CD36的表达水平升高，这些结果表明，PPARγ的激活导致了CD36表达的上调和细胞凋亡的减少，提示了该通路的潜在有效性[36-37]。此外，实验结果显示，与SCI组相比较，在EA治疗组中，PPARγ/CD36+共表达的细胞数量明显增多，PPARγ、CD36蛋白表达水平上升（$P<0.05$）；Hba-a1、Hbb-bt蛋白表达水平下降（$P<0.05$）；Caspase-3阳性表达的细胞数量减少，蛋白表达水平下降（$P<0.05$）。因此，本研究有理由推测，电针可能通过调节PPARγ-CD36信号通路来下调Hba-a1和Hbb-bt基因的表达。这种调节可能会抑制Caspase-3的产生或降低其表达水平，通过减轻凋亡级联反应的发生，达到脊髓损伤后的保护神经功能目的。

综上所述，本研究结果表明，电针可增加脊髓损伤后PPARγ-CD36的蛋白表达水平，降低Hba-a1、Hbb-bt和Caspase-3的蛋白表达水平，消除病理产物，减轻神经细胞凋亡。因此，电针可以促进脊髓损伤后神经功能的恢复。目前，对于脊髓损伤的长期治疗还缺乏既定的标准或指南，电针不良反应最小，可作为一个有价值的参考。此外，该研究还提供了令人信服的证据，表明罗格列酮在促进小鼠脊髓损伤后神经功能恢复具有有益作用，并有着广泛的用药历史，适合长期临床使用。这些结果表明，其可能为治疗脊髓损伤提供一种新的治疗方法。

参 考 文 献

[1] GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. Lancet Neurol, 2019, 18(1): 56-87.

[2] Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, et al. Traumatic spinal cord injury[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17018.

[3] Sugeno A, Piao WH, Yamazaki M, et al. Cortical transcriptome analysis after spinal cord injury reveals the regenerative mechanism of central nervous system in CRMP2 knock-in mice[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(7): 1258-1265.

[4] Ding H, Yu J, Chang WJ, et al. Searching for differentially expressed proteins in spinal cord injury based on the proteomics analysis [J]. Life Sci, 2020, 242: 117235.

[5] Morton AP, Hadley JB, Ghasabyan A, et al. The α-globin chain of hemoglobin potentiates tissue plasminogen activator induced hyperfibrinolysis *in vitro*[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2022, 92(1): 159-166.

[6] Sun Q, Wu W, Hu YC, et al. Early release of high-mobility group box 1 (HMGB1) from neurons in experimental subarachnoid hemorrhage *in vivo* and *in vitro*[J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 106.

[7] 姚媛媛，张 鑫，赵丽明，等. 高原相关高血压研究现状与展望[J]. 四川大学学报(医学版)，2024，55(6)：1454-1459.
Yao YY, Zhang X, Zhao LL, et al. Research Status and Prospects of Plateau-Related Hypertension[J]. Journal of Sichuan University (Medical Edition), 2024, 55(6): 1454-1459.

[8] Rainer TH, Wong LKS, Lam W, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke[J]. Clin Chem, 2003, 49(4): 562-569.

[9] He YD, Hua Y, Keep RF, et al. Hemoglobin expression in neurons and glia after intracerebral hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111: 133-137.

[10] Huang CC, Chou CA, Chen WY, et al. Empagliflozin ameliorates free fatty acid induced-lipotoxicity in renal proximal tubular cells via the PPARγ/CD36 pathway in obese mice[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12408.

[11] Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake[J]. Nat Med, 2001, 7(1): 41-47.

[12] Shibuya-Fujiwara N, Hirayama F, Ogata Y, et al. Phagocytosis *in*

vitro of polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin by human peripheral blood monocytes plus macrophages through scavenger receptors[J]. Life Sci，2001，70(3)：291-300.

[13] Shi ZJ，Yuan SY，Shi LL，et al. Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy[J]. Cell Prolif，2021，54(3)：e12992.

[14] Liu J，Wu YC. Electro-acupuncture-modulated miR-214 prevents neuronal apoptosis by targeting Bax and inhibits sodium channel Nav1.3 expression in rats after spinal cord injury[J]. Biomed Pharmacother，2017，89：1125-1135.

[15] Xin YY，Wang JX，Xu AJ. Electroacupuncture ameliorates neuroinflammation in animal models[J]. Acupunct Med，2022，40(5)：474-483.

[16] 刘筱蔼，罗友根. MiRNA 调控脑缺血/再灌注诱导的自噬信号通路研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版)，2024，45(1)：21-27.
Liu XA，Luo YG. Research progress on MiRNA regulation of autophagy signaling pathway induced by cerebral ischemia/reperfusion[J]. Journal of Sun Yat sen University(Medical Science Edition)，2024，45(1)：21-27.

[17] Conesa A，Madrigal P，Tarazona S，et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis[J]. Genome Biol，2016，17：13.

[18] Liu S，Kang Y，Zhang C，et al. Isobaric tagging for relative and absolute protein quantification (iTRAQ)-based quantitative proteomics analysis of differentially expressed proteins 1 week after spinal cord injury in a rat model[J]. Med Sci Monit，2020，26：e924266.

[19] 程 觅，张 雪，史阳琳，等. 实验大鼠和小鼠穴位定位的研究概况[J]. 上海针灸杂志，2021，40(5)：640-646.
Cheng M，Zhang X，Shi YL，et al. A survey of acupoint location in experimental rats and mice[J]. Shanghai J Acupunct Moxibustion，2021，40(5)：640-646.

[20] Liu H，Rose ME，Culver S，et al. Rosiglitazone attenuates inflammation and CA3 neuronal loss following traumatic brain injury in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun，2016，472(4)：648-655.

[21] Li HP，Zhang Q，Yang XH，et al. PPAR-γ agonist rosiglitazone reduces autophagy and promotes functional recovery in experimental traumaticspinal cord injury[J]. Neurosci Lett，2017，650：89-96.

[22] Basso DM，Fisher LC，Anderson AJ，et al. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains[J]. J Neurotrauma，2006，23(5)：635-659.

[23] Rojas BE，Hartman MD，Figueroa CM，et al. Proteolytic cleavage of *Arabidopsis thaliana* phosphoenolpyruvate carboxykinase-1 modifies its allosteric regulation[J]. J Exp Bot，2021，72(7)：2514-2524.

[24] Lisanti MP，Scherer PE，Vidugiriene J，et al. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source：implications for human disease[J]. J Cell Biol，1994，126(1)：111-126.

[25] Vasseur F，Helbecque N，Lobbens S，et al. Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (*ACDC*) gene promoter variants in morbid obesity：evidence for a role of *ACDC* in diabesity[J]. Diabetologia，2005，48(5)：892-899.

[26] Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins(FABPs)：function，structure and polymorphism[J]. J Appl Genet，2006，47(1)：39-48.

[27] Tran AP，Warren PM，Silver J. The biology of regeneration failure and success after spinal cord injury[J]. Physiol Rev，2018，98(2)：881-917.

[28] Turtle JD，Henwood MK，Strain MM，et al. Engaging pain fibers after a spinal cord injury fosters hemorrhage and expands the area of secondary injury[J]. Exp Neurol，2019，311：115-124.

[29] Jiang T，Qin T，Gao P，et al. SIRT1 attenuates blood-spinal cord barrier disruption after spinal cord injury by deacetylating p66Shc[J]. Redox Biol，2023，60：102615.

[30] de Campos Guerra JC，Mourão MA，França CN，et al. Impact of coagulation in the development of thromboembolic events in patients with spinal cord injury[J]. Spinal Cord，2014，52(4)：327-332.

[31] Wang JL，Luo X，Liu L. Targeting CARD6 attenuates spinal cord injury(SCI) in mice through inhibiting apoptosis，inflammation and oxidative stress associated ROS production[J]. Aging，2019，11(24)：12213-12235.

[32] Fraussen J，Beckers L，van Laake-Geelen CCM，et al. Altered circulating immune cell distribution in traumatic spinal cord injury patients in relation to clinical parameters[J]. Front Immunol，2022，13：873315.

[33] Li C，Wu ZR，Zhou LQ，et al. Temporal and spatial cellular and molecular pathological alterations with single-cell resolution in the adult spinal cord after injury[J]. Sig Transduct Target Ther，2022，7：65.

[34] Viñals M，Bermúdez I，Llaverias G，et al. Aspirin increases CD36，SR-BI，and ABCA1 expression in human THP-1 macrophages[J]. Cardiovasc Res，2005，66(1)：141-149.

[35] Shao GC，Cao Y，Chen ZL，et al. How to use open-pFind in deep proteomics data analysis?—a protocol for rigorous identification and quantitation of peptides and proteins from mass spectrometry data[J]. Biophys Rep，2021，7(3)：207-226.

[36] Krishna S，Cheng BK，Sharma DR，et al. PPAR-γ activation enhances myelination and neurological recovery in premature rabbits with intraventricular hemorrhage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2021，118(36)：e2103084118.

[37] Miao YM，Zhang CL，Yang L，et al. The activation of PPARγ enhances Treg responses through up-regulating CD36/CPT1-mediated fatty acid oxidation and subsequent N-glycan branching of TβRII/IL-2Rα[J]. Cell Commun Signal，2022，20(1)：48.

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：

李明娇，唐成林，杨祝歆，等. 电针调控 PPARγ-CD36 信号通路降低 Hba-a1、Hbb-bt 表达减轻脊髓损伤后细胞凋亡的研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(3)：311-321.