

基于缺氧诱导因子-1 α /丙酮酸脱氢酶激酶1通路 探讨通督醒神针刺法调控糖酵解改善脑卒中后 认知障碍的作用机制

孙可心^{1,2}, 白艳杰^{1,3}, 王岩^{1,3}, 肖雨倩², 万俊², 冯慧利^{1,3}, 粟文静², 刘安², 张航耀², 李彦杰⁴

(¹河南中医药大学第一附属医院康复中心, 郑州450000; ²河南中医药大学康复医学院, 郑州450046; ³中西医防治重大疾病河南省协同创新中心, 郑州450000; ⁴河南省中医院, 郑州450002)

【摘要】 目的:观察通督醒神针刺对脑缺血再灌注大鼠缺氧诱导因子-1 α /丙酮酸脱氢酶激酶1(HIF-1 α /PDK1)信号通路和海马组织糖酵解水平的影响,探讨通督醒神针刺治疗大脑中动脉阻塞/再灌注(MCAO/R)大鼠学习记忆障碍的作用机制。方法:SD大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组和电针+抑制剂组,每组12只。采用线栓法复制MCAO/R大鼠模型,电针+抑制剂组在造模前30 min腹腔注射HIF-1 α 抑制剂2ME2(5 mg/kg),电针组和电针+抑制剂组电针“神庭”“百会”,每次30 min,每日1次,连续干预14 d。旷场实验、新物体识别实验观察大鼠学习记忆功能;TTC染色检测脑梗死体积;HE染色观察大鼠海马组织病理变化;比色法检测大鼠海马组织乳酸及三磷酸腺苷(ATP)含量;Western blot法和实时荧光定量PCR法分别检测缺血侧海马组织HIF-1 α 、PDK1、己糖激酶2(HK2)、磷酸果糖激酶1(PFK1)、丙酮酸激酶M2(PKM2)的蛋白和mRNA表达量。结果:与假手术组相比,模型组大鼠学习记忆功能出现明显障碍,中央路程占比、跨格次数、认知指数降低($P<0.01$),脑梗死体积百分比增高($P<0.01$),海马组织细胞排列紊乱,形态异常,可见明显的细胞核破裂、核固缩,海马组织中乳酸含量增高($P<0.01$),ATP含量降低($P<0.01$),缺血侧海马组织HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1、PKM2蛋白和mRNA表达量增高($P<0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠中央路程占比、跨格次数、认知指数升高($P<0.01$),海马组织病理学损伤减轻,脑梗死体积百分比减小($P<0.01$),海马组织中乳酸含量减少($P<0.01$),ATP含量增多($P<0.01$),缺血侧海马组织HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1、PKM2的蛋白和mRNA表达量下降($P<0.01$)。与电针组相比,电针+抑制剂组能增强电针的上述作用,变化更加显著($P<0.01, P<0.05$)。结论:通督醒神针刺可通过下调HIF-1 α /PDK1信号通路的表达,抑制海马组织无氧糖酵解,减少乳酸积累,增加ATP的生成,促进MCAO/R大鼠的认知功能恢复。

【关键词】 脑卒中后认知障碍;电针;糖酵解;缺氧诱导因子-1 α /丙酮酸脱氢酶激酶1信号通路

Tongdu Xingshen needling improves post-stroke cognitive impairment by regulating glycolysis in rats based on the HIF-1 α /PDK1 pathway

SUN Ke-xin^{1,2}, BAI Yan-jie^{1,3}, WANG Yan^{1,3}, XIAO Yu-qian², WAN Jun², FENG Hui-li^{1,3}, LI Wen-jing², LIU An², ZHANG Hang-yao², LI Yan-jie⁴ (¹Rehabilitation Centre, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; ²School of Rehabilitation Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; ³Collaborative Innovation Center of Prevention and Treatment of Major Diseases by Chinese and Western Medicine in Henan Province, Zhengzhou 450000; ⁴Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002)

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20241154

引用格式:孙可心,白艳杰,王岩,等.基于缺氧诱导因子-1 α /丙酮酸脱氢酶激酶1通路探讨通督醒神针刺法调控糖酵解改善脑卒中后认知障碍的作用机制[J].针刺研究,2025,50(12):1387-1395.

项目来源:河南省高等学校重点科研项目(No. 25A360018);河南省中医药传承与创新人才工程(仲景工程)中医药拔尖人才项目(No. CZ0237-08);河南省中医药拔尖人才专项(No. 2022ZYBJ07);河南省卫健委国家中医临床研究基地科研专项(No. 2022JDZX005);河南省中医药科学研究专项(No. 2019JDZX2016);河南省中医药科学研究专项重点课题项目(No. 20-21ZY1009)

通信作者:白艳杰, E-mail: baiyj66@126.com

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of Tongdu Xingshen (unblocking the Governor Vessel and refreshing the spirit) needling on hypoxia-induced factor-1 α /pyruvate dehydrogenase kinase 1 (HIF-1 α /PDK1) pathway and hippocampal glycolysis level in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI), so as to explore its mechanisms underlying improvement of learning and memory ability. **Methods** SD rats were randomly divided into sham operation, model, acupuncture and acupuncture + inhibitor groups ($n=12$ in each group). The CIRI model was established by middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R). EA (1 Hz/20 Hz) was applied to “Shenting” (GV24) and “Baihui” (GV20) for 30 min, once daily for 14 consecutive days. In the acupuncture + inhibitor group, 2ME2 (5 mg/kg) was injected intraperitoneally 30 min before modeling. Learning and memory ability were evaluated by using open field test and new object recognition experiment. TTC staining was used to detect cerebral infarction volume. The pathological changes of hippocampus were observed by HE staining. The contents of lactic acid and ATP in hippocampal tissue were detected by colorimetric assay kit. The protein and mRNA expression levels of HIF-1 α , PDK1, hexokinase 2 (HK2), phosphofructokinase 1 (PFK1) and pyruvate kinase M2 (PKM2) in hippocampal tissues on the ischemic side were detected by Western blot and qPCR, respectively. **Results** Compared with the sham operation group, the rats in the model group had a significant decrease in the proportion of central distance, the number of crossing platform and the new object preference index ($P<0.01$), and a significant increase in percentage of cerebral infarction volume ($P<0.01$). The content of lactic acid in hippocampus, the protein and mRNA expression of HIF-1 α , PDK1, HK2, PFK1 and PKM2 were increased significantly ($P<0.01$), while the content of ATP was decreased ($P<0.01$) in the model group compared with those in the sham operation group. Following the interventions, modeling induced increase and decrease of the indexes mentioned above were all reversed in the acupuncture group ($P<0.01$), and the therapeutic effects of acupuncture + inhibitor were better than those of acupuncture alone ($P<0.01$, $P<0.05$). H.E. staining showed disordered cell arrangement, abnormal morphology, and evident nuclear rupture and nuclear pyknosis in the hippocampus tissue in the model group, which was relatively milder in the two intervention groups. **Conclusion** Tongdu Xingshen needling can improve the learning and memory function of CIRI rats, which may be associated with its function in down-regulating the expression of HIF-1 α /PDK1 signaling pathway, inhibiting anaerobic glycolysis in the hippocampus, reducing lactic acid accumulation and increasing ATP production.

【KEYWORDS】 Post-stroke cognitive impairment; Electroacupuncture; Glycolysis; HIF-1 α /PDK1 signaling pathway

脑卒中后认知障碍(PSCI)是脑卒中后的主要并发症之一,调查显示,超过70%的卒中患者存在认知缺陷,严重者可引起痴呆,临床主要表现为注意力障碍、学习记忆障碍和执行功能障碍等^[1]。PSCI发生的病理变化复杂,主要涉及氧化应激、神经炎症反应、神经元死亡、血脑屏障破坏及能量代谢紊乱等^[2]。作为糖代谢的主要途径之一,糖酵解异常被认为是许多神经系统疾病的始动或促进因素。

当缺血性脑卒中发生时,无氧糖酵解的增加导致乳酸堆积,引起细胞内酸中毒将进一步加重线粒体损伤,从而形成恶性循环,导致神经元损伤加重^[3-4]。已有研究证明,缺氧诱导因子-1 α /丙酮酸脱氢酶激酶1(HIF-1 α /PDK1)通路在糖代谢过程中发挥重要作用,使糖代谢方式从有氧氧化转变为无氧糖酵解^[5]。由此推测,通过调控HIF-1 α /PDK1通路抑制糖酵解发生可能是改善PSCI的有效策略。

研究显示,针灸在改善PSCI患者认知功能方面优于常规药物治疗法^[6]。前期临床研究证明,通督

醒神针刺法能有效改善脑卒中患者认知功能和精神行为状态,提高患者日常生活能力^[7],但作用机制尚不明确。因此,本实验以大脑中动脉阻塞/再灌注(MCAO/R)大鼠为模型,探讨通督醒神针刺改善认知障碍的作用机制是否与调控HIF-1 α /PDK1通路从而抑制糖酵解有关,以期针刺治疗PSCI提供新的作用靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用60只8周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量240~280 g。购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,生产许可证号:SCXK(鲁)2022-0006。分笼饲养于河南中医药大学实验动物中心,室温22~26℃,湿度35%~55%,12 h/12 h明暗周期。大鼠造模前适应性饲养约1周,期间自由进食、饮水。本研究已通过河南中医药大学实验动物福利伦理委员会批准(审批号:IACUC-202310009)。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(德国默克),4%多聚甲醛通用型

组织固定液(北京 Biosharp), HIF-1 α 抑制剂 2ME2(美国 Glpbio), TTC 染液、HE 染色试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝), PDK1 抗体(美国 CST), HIF-1 α 抗体、己糖激酶 2(HK2) 抗体(美国 GeneTex), 磷酸果糖激酶(PFK)1 抗体、丙酮酸激酶 M2(PKM2) 抗体、 β -actin 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(武汉三鹰), 三磷酸腺苷(ATP) 含量检测试剂盒、乳酸含量测定试剂盒(武汉伊莱瑞特)。

MCAO 线栓(北京西浓), 一次性无菌针灸针(苏州医疗用品厂), 旷场系统、新物体识别系统(上海欣软), 石蜡包埋机(武汉俊杰), 病理切片机(上海徠卡), 正置白光摄影显微镜(日本尼康), 高速组织研磨仪(武汉赛维尔), 垂直电泳仪、电泳转印仪、实时荧光定量 PCR 仪(美国 BioRad), 酶标仪(美国 Thermo)。

1.3 模型制备与分组方法

从 60 只大鼠中随机选出 12 只作为假手术组, 仅进行颈部皮肤切开, 分离颈部血管, 然后消毒切口、缝合。剩余 48 只大鼠随机分为模型组、电针组和电针+抑制剂组, 每组 16 只。其中电针+抑制剂组需在造模前 30 min 腹腔注射 HIF-1 α 抑制剂 2ME2(5 mg/kg)^[8]。造模方式如下^[9]: 术前 12 h 禁食不禁水, 用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠。大鼠仰卧位固定于手术台上, 备皮, 消毒。于颈部正中中线稍左作切口, 分离颈部组织, 暴露并分离左侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA)。用动脉夹夹闭 ICA 近心端, 于靠近分叉处结扎 ECA, 并在 CCA 上打一活结。用纤维剪刀在 CCA 近分叉处剪一小切口, 将线栓从切口处缓慢插入, 经颈动脉分叉处进入 ICA, 线栓上黑色标记至分叉处(进入约 18~20 mm 稍感有阻力)时即可停止, 结扎 CCA 上的活结, 记录进栓时间, 消毒并缝合伤口。缝合时将线栓末端暴露于皮肤外并用记号笔标记, 进栓 2 h 后用镊子将线栓小心拔出约 1 cm 并剪掉, 以实现再灌注。术后将大鼠置于干净垫料中分笼饲养, 注意保暖并保持呼吸道畅通。造模后腹腔注射庆大霉素 2 万 U/只, 连续注射 3 d, 以预防感染。

通过采用 Zea Longa 神经功能评分(0 分: 肢体活动正常, 无神经功能缺损; 1 分: 偏瘫侧前肢不能正常伸展, 轻度神经功能缺损; 2 分: 行走时向偏瘫侧旋转, 中度神经功能缺损; 3 分: 行走时向偏瘫侧倾倒, 重度神经功能缺损; 4 分: 不能自主行走, 意识

障碍)筛选出 1~3 分的大鼠, 最终每组剩余 12 只大鼠纳入后续实验。

1.4 干预方法

术后第 2 天电针组和电针+抑制剂组参照既往研究^[10]进行通督醒神针刺干预。大鼠穴位定位参考《实验针灸学》^[11]取“神庭”“百会”, 使用 0.30 mm \times 25 mm 一次性无菌针灸针, 斜刺 5 mm 后连接电针仪, 电压峰值 6 V, 以针体轻轻抖动为度, 疏密波, 频率 1 Hz/20 Hz, 每次 30 min, 每日 1 次, 治疗 14 d。其余组大鼠只给予电针组同等条件抓取, 不予其他干预。

1.5 观察指标与检测方法

旷场实验: 各组随机选取 10 只大鼠于干预 14 d 后进行旷场实验。将大鼠从中央轻放进黑色敞箱(100 cm \times 100 cm \times 40 cm)中, 让其在敞箱内自由探索, 保持周围环境安静, 使用摄像头记录大鼠 5 min 内探索路径。每只大鼠实验结束时, 使用 75% 乙醇擦拭箱体以保持清洁和防止气味干扰。最后使用行为学软件分析大鼠跨格次数和中央路程占比。

新物体识别实验: 各组随机选取 10 只大鼠于干预 14 d 后进行新物体识别实验。在黑色敞箱一侧两端放入两个相同物体, 两个物体距离箱壁等距, 将大鼠背朝物体从物体相对侧处放入敞箱, 使其在箱中自由探索 5 min 熟悉两个物体。每次放大鼠前使用 75% 乙醇擦拭箱体及物体。1 h 后取出一个物体, 更换为不同颜色和形状的新物体, 位置不变, 使大鼠再次探索 5 min, 使用摄像头记录 5 min 内探索情况, 使用行为学软件记录大鼠探索新物体和旧物体的时间并计算认知指数。认知指数(%) = 新物体探索时间 \div (新物体探索时间+旧物体探索时间) \times 100%。

TTC 染色测定脑梗死体积: 行为学检测结束后, 每组随机选取 3 只大鼠, 麻醉后快速剥离全脑, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻 20 min, 将大脑沿冠状面切 5 片 2 mm 厚的脑片, 置于 2% TTC 溶液中, 在 37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 20 min, 期间不时翻动脑片, 使其充分染色。染色后取出脑片置于 4% 多聚甲醛中固定, 摆放整齐后观察并拍照。正常组织呈红色, 梗死灶呈白色。使用 Image J 软件测量和分析脑梗死体积百分比。脑梗死体积百分比(%) = 梗死体积 \div 全脑体积 \times 100%。

HE 染色观察大鼠海马组织形态学变化: 每组随机选取 3 只大鼠心脏灌注 0.9% 氯化钠溶液后取脑, 用 4% 多聚甲醛固定脑组织后, 进行脱水、石蜡

包埋、切片(片厚 5 μm)。石蜡切片经脱蜡处理后依次进行苏木精、伊红染色,最后脱水封片。在光学显微镜下观察海马 CA1 区病理组织形态学变化。

比色法检测大鼠缺血侧海马组织乳酸含量:各组剩余大鼠麻醉后于冰上迅速取海马组织放入液氮中,随后转移至-80℃冰箱冷冻保存。每组取 3 只大鼠海马组织 20~50 mg,常规匀浆处理,4℃、10 000×g 离心 10 min,取上清待测,留取部分上清用于蛋白表达测定。严格按照试剂盒说明书步骤操作,酶标仪 530 nm 处测定各孔吸光度(OD)值,根据 OD 值及待测样本蛋白浓度计算各组大鼠海马组织中乳酸含量。

比色法检测大鼠缺血侧海马组织 ATP 生成量:每组取冻存的 3 只大鼠海马组织 20~50 mg,按试剂盒说明书加入试剂一提取液,组织匀浆处理后沸水浴 2 min 并流水冷却,4℃、10 000×g 离心 10 min,取上清置于冰上,按照试剂盒说明书进行酶促反应和显色反应,最后于酶标仪 636 nm 处测定各孔 OD 值,计算各组海马组织中 ATP 含量。

Western blot 法检测大鼠缺血侧海马组织糖酵解及通路相关蛋白表达:每组取冻存的 3 只大鼠海马组织 50 mg 加入 RIPA 和 PMSF 充分研磨、裂解、离心后取上清,用 BCA 法进行蛋白定量。取蛋白样品上样、电泳、转膜、封闭后,分别加入配制好的 HIF-1α(1:1 000)、PDK1(1:1 000)、HK2(1:1 000)、PFK1(1:1 000)、PKM2(1:1 000)、β-actin(1:5 000)一抗 4℃孵育过夜,次日加入对应的二抗(1:5 000)室温摇床孵育 1 h,1×TBST 清洗二抗,加显影液后使用化学发光成像系统曝光,最后使用 Image J 软件计算各条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

qPCR 法检测缺血侧海马组织糖酵解及通路相关蛋白 mRNA 水平:每组取冻存的 3 只大鼠海马组织 50 mg,以 Trizol 法提取 RNA,测定 RNA 浓度确定稀释倍数,根据反转录试剂盒确定 20 μL 反应体系,使用荧光定量 PCR 仪进行反转录得到 cDNA。最后使用实时荧光定量 PCR 仪进行检测,设置反应程序:预变性 95℃ 30 s;变性 95℃ 15 s,退火及延伸 69℃ 30 s,共循环 40 个周期。记录每个样本的 Ct 值,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算每个样本 mRNA 的相对表达量。引物由苏州金唯智生物科技有限公司提供,引物序列见表 1。

1.6 统计学分析

采用 SPSS25.0 软件进行统计分析。计量资料

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
HIF-1α	上游 AAGTCTAGGGATGCAGCACG	101
	下游 AGATGGGAGCTCACGTTGTG	
PDK1	上游 GTCGGAGAGCGGCGTT	144
	下游 ACAGGCAACTCTTGTCGAAGAA	
HK2	上游 CGAATCAAAGAGAACAAGGG	85
	下游 CAAAATGGGGATGTTTCTTG	
PFK1	上游 ACCAAGATGGGTGCTAAGGC	188
	下游 TCTTTGGGGATTTCGGTGCTC	
PKM2	上游 ACATTGACTCCGCACCCATC	130
	下游 GAGAAATTCAGCCGAGCCAC	
β-actin	上游 ACCCGCGAGTACAACCTTCTT	74
	下游 TCGTCATCCATGGCGAACTGG	

注:HIF-1α为缺氧诱导因子-1α,PDK1为丙酮酸脱氢酶激酶 1, HK2 为己糖激酶 2, PFK1 为磷酸果糖激酶 1, PKM2 为丙酮酸激酶 M2。

均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,所有数据服从或近似服从正态分布,组间比较采用单因素方差分析,两两比较时,若方差齐使用 LSD-*t* 检验,若方差不齐则使用 Tamhane's *t*2 检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆能力比较

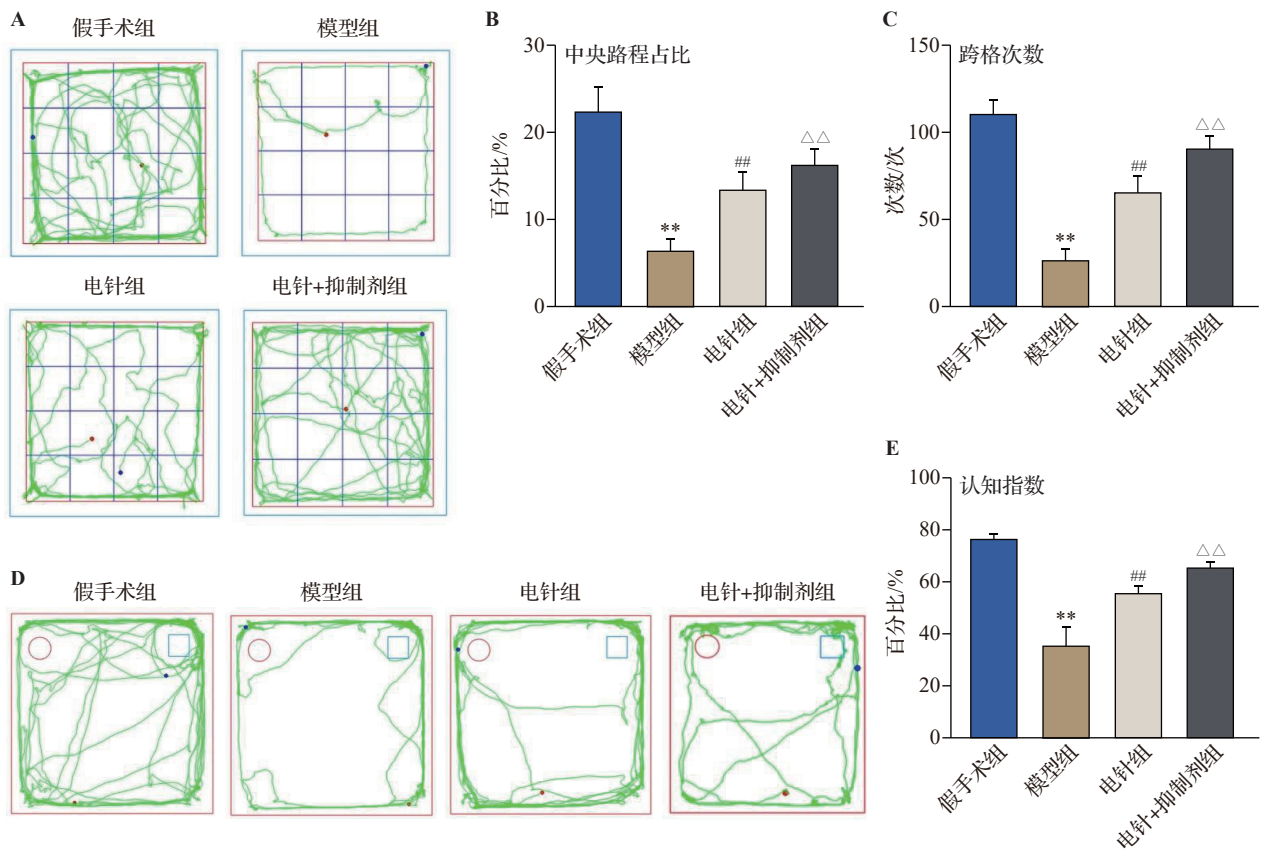
与假手术组相比,模型组大鼠中央路程占比、跨格次数、认知指数均降低($P<0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠中央路程占比、跨格次数、认知指数均增高($P<0.01$)。与电针组相比,电针+抑制剂组大鼠中央路程占比、跨格次数、认知指数均增高($P<0.01$)。见图 1。

2.2 各组大鼠脑梗死体积比较

TTC 染色结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠脑梗死体积百分比增高($P<0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠脑梗死体积百分比降低($P<0.01$)。与电针组相比,电针+抑制剂组大鼠脑梗死体积百分比降低($P<0.05$)。见图 2。

2.3 各组大鼠缺血侧海马 CA1 区神经元病理学改变比较

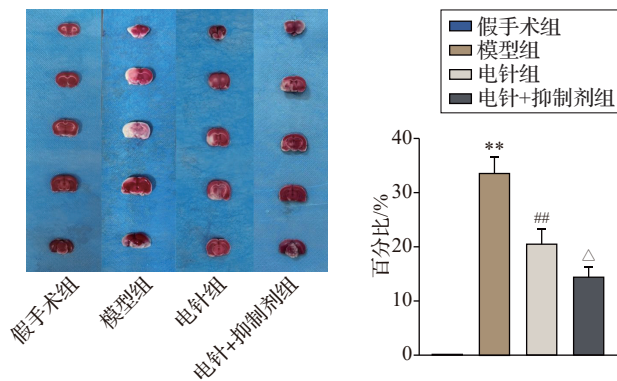
HE 染色结果显示,假手术组大鼠缺血侧海马



注:A为各组大鼠在旷场中的活动轨迹图;B为各组大鼠中央路程占比的比较;C为各组大鼠跨格次数的比较;D为各组大鼠在新物体识别实验中的活动轨迹图;E为各组大鼠认知指数的比较。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与电针组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图1 各组大鼠行为学结果的比较($\bar{x} \pm s$, 10只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of behavioral outcomes of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 10 rats/group)



注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与电针组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图2 各组大鼠脑梗死体积百分比比较(TTC染色, $\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of the percentage of cerebral infarct volume of rats in the 4 groups (TTC staining, $\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

CA1区神经元排列整齐,间隙正常,细胞形态规则完整,核仁居中且清晰。模型组大鼠缺血侧海马CA1区神经元排列紊乱,间隙增宽,细胞形状不规

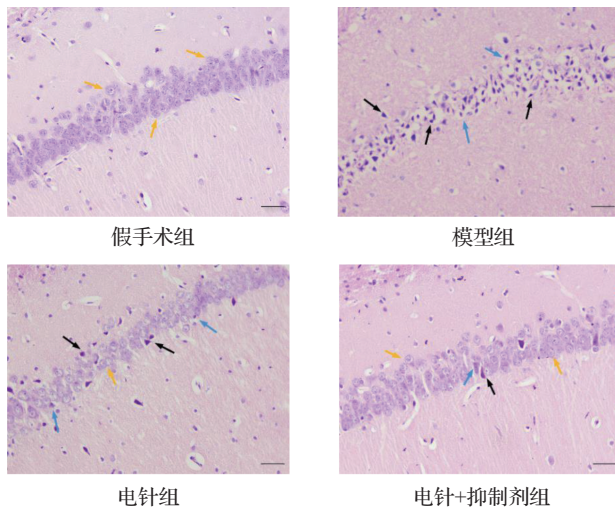
则,可见明显的细胞核破裂、核固缩。电针组大鼠缺血侧海马CA1区神经元排列紊乱程度有所改善,间隙变窄,细胞形状不规则、核破裂、核固缩等现象明显减轻。电针+抑制剂组大鼠缺血侧海马CA1区神经元排列相对紧密,数量增多,细胞形状大小较正常,未见明显的核破裂和固缩现象。见图3。

2.4 各组大鼠缺血侧海马组织乳酸含量比较

与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧海马组织乳酸含量增高($P < 0.01$)。与模型组大鼠相比,电针组大鼠缺血侧海马组织乳酸含量降低($P < 0.01$)。与电针组相比,电针+抑制剂组大鼠缺血侧海马组织乳酸含量降低($P < 0.01$)。见图4。

2.5 各组大鼠缺血侧海马组织ATP生成量比较

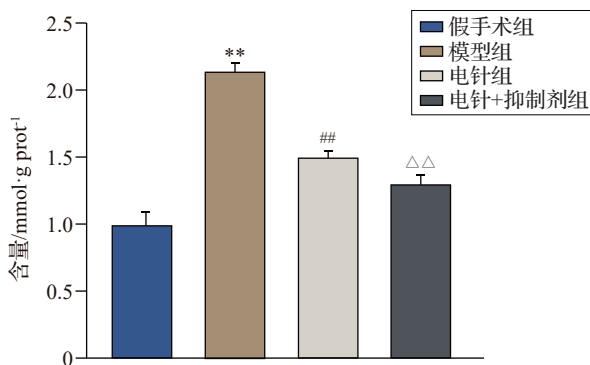
与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧海马组织ATP生成量降低($P < 0.01$)。与模型组大鼠相比,电针组大鼠缺血侧海马组织ATP生成量增高($P < 0.01$)。与电针组相比,电针+抑制剂组大鼠



注:黄色箭头示正常神经元,黑色箭头示核固缩、破裂的细胞,蓝色箭头示形态异常的神经元。标尺=100 μm。

图3 各组大鼠缺血侧海马CA1区病理形态比较(HE染色)

Fig. 3 Comparison of pathological morphology of hippocampal CA1 region on the ischemic side of rats in the 4 groups(HE staining)



注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与电针组比较,△△ $P<0.01$ 。

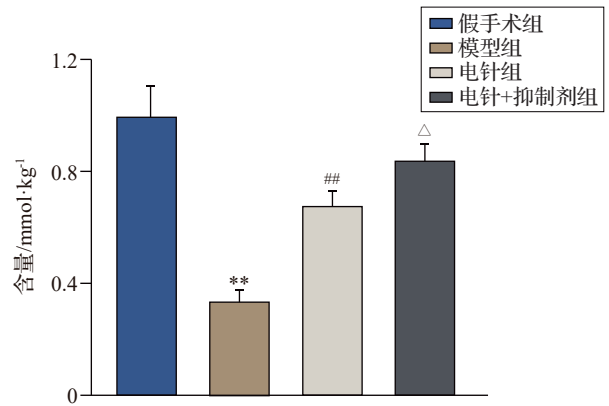
图4 各组大鼠缺血侧海马组织乳酸含量比较 ($\bar{x}\pm s, 3$ 只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of lactate content in hippocampal tissues on the ischemic side of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s, 3$ rats/group)

缺血侧海马组织ATP生成量增高($P<0.05$)。见图5。

2.6 各组大鼠缺血侧海马组织中HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1、PKM2蛋白表达水平比较

与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧海马组织HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1和PKM2蛋白表达水平上调($P<0.01$)。与模型组大鼠相比,电针组大鼠缺血侧海马组织HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1和PKM2蛋白表达水平下调($P<0.01$)。与电针组相比,电针+抑制剂组大鼠缺血侧海马



注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与电针组比较,△ $P<0.05$ 。

图5 各组大鼠缺血侧海马组织ATP生成量比较 ($\bar{x}\pm s, 3$ 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of ATP production in hippocampal tissues on the ischemic side of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s, 3$ rats/group)

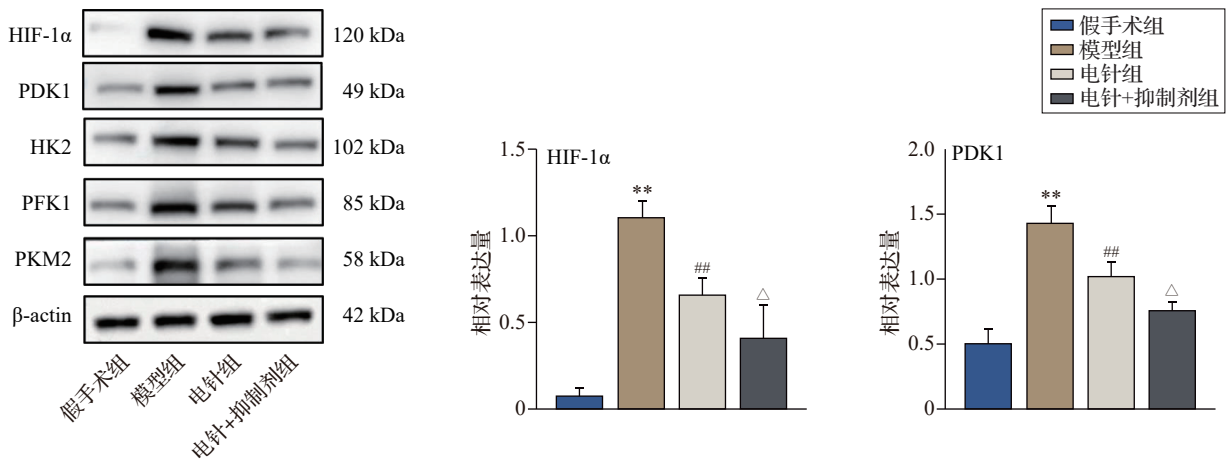
组织HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1和PKM2蛋白表达水平下调($P<0.05, P<0.01$)。见图6。

2.7 各组大鼠海马组织中HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1、PKM2 mRNA表达水平比较

与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧海马组织HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1和PKM2 mRNA表达上调($P<0.01$)。与模型组大鼠相比,电针组大鼠缺血侧海马组织HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1和PKM2 mRNA表达下调($P<0.01$)。与电针组相比,电针+抑制剂组大鼠缺血侧海马组织HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1和PKM2 mRNA表达下调($P<0.05, P<0.01$)。见图7。

3 讨论

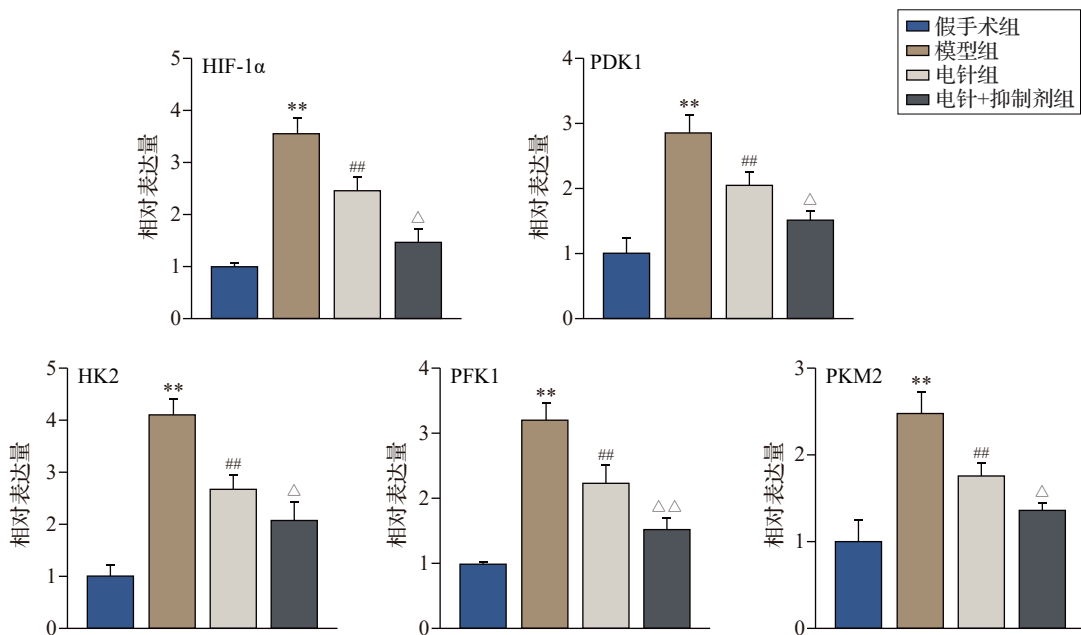
依据PSCI的临床表现,可将其归属为中医学“痴呆”“善忘”等范畴,PSCI病位在脑,病机为髓海空虚、神机失用,其病理性质属本虚标实之候。基于此,益精填髓、开窍醒神当为本病的治疗关键。督脉乃人体“阳脉之海”,有“总督诸阳”的作用,督脉通畅是维持脑主神明功能的重要条件,督脉既属于脑又络于脑,是治疗脑病的首选经脉。神庭,神之居所也,为督脉、足太阳经、足阳明经之会,主治神志方面的疾病。百会为头部阳经与督脉的汇聚之所,位居巅顶,乃阳气会聚之所,是调节大脑功能的要穴。石学敏院士认为,百会、神庭为督脉穴位,督脉循行络于脑,入脑上巅,针刺起到通调元神、健脑补髓之效^[12]。因此,本实验选用督脉穴位“神庭”



注: HIF-1α为缺氧诱导因子-1α, PDK1为丙酮酸脱氢酶激酶1, HK2为己糖激酶2, PFK1为磷酸果糖激酶1, PKM2为丙酮酸激酶M2。与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; 与电针组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠缺血侧海马组织中 HIF-1α、PDK1、HK2、PFK1、PKM2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of protein expression levels of HIF-1α, PDK1, HK2, PFK1 and PKM2 in hippocampal tissues on the ischemic side of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)



注: HIF-1α为缺氧诱导因子-1α, PDK1为丙酮酸脱氢酶激酶1, HK2为己糖激酶2, PFK1为磷酸果糖激酶1, PKM2为丙酮酸激酶M2。与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; 与电针组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ 。

图7 各组大鼠海马组织中 HIF-1α、PDK1、HK2、PFK1和 PKM2 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of mRNA expression levels of HIF-1α, PDK1, HK2, PFK1 and PKM2 in hippocampal tissues of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

“百会”进行通督醒神针刺,结果表明,通督醒神针刺可以有效减轻大鼠海马组织损伤,改善卒中大鼠的学习记忆障碍及神经行为状态。

糖酵解是葡萄糖在细胞质中经过一系列酶促反应被分解成为丙酮酸的过程,期间每分解一分子葡萄糖产生两分子丙酮酸及两分子ATP,其过程中包括3种关键的限速酶:HK2、PFK1、PKM2^[13]。在有氧条件下,丙酮酸氧化脱羧产生乙酰辅酶A,后通过三羧酸循环(TCA)降解为二氧化碳和水,同时产生ATP释放大量能量,而在缺氧条件下,丙酮酸则被进一步还原为乳酸^[14]。缺血性卒中发生后,由于供氧不足,大脑迅速将其主要代谢方式转变为高糖酵解,成为大脑中产生ATP的主要代谢模式,以满足缺血性大脑的高能量需求^[15]。尽管如此,无氧糖酵解的ATP生成速率远低于TCA,这种低速率会导致细胞能量缺乏,从而影响细胞的正常功能。同时,由于脑组织糖代谢机制被破坏,糖酵解途径产生的乳酸无法通过氧化磷酸化途径重新转化成丙酮酸生成ATP,从而导致乳酸在脑细胞中堆积,破坏细胞内外环境酸碱平衡,加剧炎症反应,进而引发神经细胞损伤和死亡^[16-17]。不同大脑区域对缺氧表现出不同的敏感性,其中海马是最敏感的,并且与学习记忆功能密切相关^[18]。因此,本研究对大鼠海马组织的乳酸含量、ATP生成量及3个关键限速酶HK2、PFK1和PKM2的表达量进行检测,结果显示,模型组大鼠海马组织中乳酸含量及HK2、PFK1和PKM2的蛋白及mRNA表达量升高,ATP生成量减少,并且表现出严重的学习记忆功能障碍,通督醒神针刺治疗后可以逆转上述效应。由此可见,通督醒神针刺治疗可以通过抑制糖酵解改善MCAO/R大鼠的学习记忆功能。

HIF-1是一种由HIF-1 α 和HIF-1 β 共同构成的同源二聚体,其中HIF-1 α 是其发挥功能的主要部分。HIF-1 α 在低氧条件下被诱导表达,促进炎性小体形成、引起线粒体功能障碍和细胞死亡,并损伤个体的认知功能^[19]。已有研究表明,HIF-1 α 在氧糖剥夺复氧的小鼠海马细胞模型中表达上调,HIF-1 α 敲低可以减轻细胞毒性及炎症反应,起到神经保护作用,并且在体内实验中得到再次验证^[20]。此外,在蛛网膜下腔出血模型中观察到,电针干预可以下调HIF-1 α 的表达,恢复脑血流灌注并加速认知功能障碍的改善^[21]。本实验研究结果与上述结果一致,通过通督醒神针刺治疗可以抑制HIF-1 α 的表达,减轻MCAO/R大鼠海马组织病理损伤,改善认知功能。

PDK1是HIF-1 α 的直接靶基因,在严重缺氧的条件下,HIF-1 α 可以诱导PDK1转录,有效抑制丙酮酸脱氢酶(PDH)的活性,进而阻止丙酮酸转化为乙酰辅酶A,导致葡萄糖的有氧氧化减少,糖酵解速率增加^[5,22]。最近研究表明,在多种疾病中均观察到HIF-1 α /PDK1通路在调控糖酵解中发挥着重要作用^[23-24]。研究证明,抑制HIF-1 α /PDK1信号通路可以改善缺血再灌注后的线粒体能量代谢,并显著提高ATP含量^[25]。因此,HIF-1 α /PDK1信号通路对糖酵解途径重要的调节作用,有望成为治疗脑卒中后学习记忆障碍的新靶点。在本实验中,我们探讨了通督醒神针刺法是否可以通过抑制HIF-1 α /PDK1信号通路调控糖酵解来改善MCAO/R大鼠的学习记忆功能,结果证明,与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧海马神经元受损,海马组织乳酸含量增加而ATP生成量减少,HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1和PKM2蛋白及mRNA表达上调,通督醒神针刺干预后大鼠缺血侧海马神经元形态、排列等病理表现均有所好转,脑梗死程度减轻,糖酵解产物乳酸含量减少、ATP生成量增多,HIF-1 α 、PDK1、HK2、PFK1和PKM2蛋白及mRNA表达下调,改善了MCAO/R大鼠的学习记忆功能,证明通督醒神针刺抑制了相关信号通路的表达及葡萄糖有氧氧化向糖酵解的转换。并且在注射抑制剂的基础上使用电针治疗,其作用效果更为显著,加强了通督醒神针刺通过抑制HIF-1 α /PDK1通路进而抑制糖酵解水平来发挥对缺血脑组织的保护作用。

综上所述,通督醒神针刺法可能通过下调HIF-1 α /PDK1通路抑制糖酵解水平,减轻海马组织病理损伤,缓解海马神经元细胞酸中毒,增加能量释放,进而改善大鼠的学习记忆功能。但通督醒神针刺是否还可以通过其他通路调控糖酵解尚不清楚,仍需进一步探索。此外,葡萄糖代谢还与线粒体功能密切相关,本研究中未涉及线粒体功能的检测,未来的研究应逐步补充完善。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] ROST N S, BRODTMANN A, PASE M P, et al. Post-stroke cognitive impairment and dementia [J]. *Circ Res*, 2022, 130(8): 1252-1271.
- [2] KALARIA R N, AKINYEMI R, IHARA M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(5): 915-925.
- [3] JIN W L, ZHAO J X, YANG E Y, et al. Neuronal STAT3/HIF-1 α /PTRF axis-mediated bioenergetic disturbance

- exacerbates cerebral ischemia-reperfusion injury via PLA2G4A [J]. *Theranostics*, 2022, 12(7): 3196-3216.
- [4] LIU M R, ZHOU X Y, LI Y, et al. TIGAR alleviates oxidative stress in brain with extended ischemia via a pentose phosphate pathway-independent manner [J]. *Redox Biol*, 2022, 53: 102323.
- [5] SEMBA H, TAKEDA N, ISAGAWA T, et al. HIF-1 α -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11635.
- [6] LUO Z Y, LI W X, JIANG J T, et al. Effect of acupuncture on cognitive function in patients with post-stroke cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis [J]. *Brain Behav*, 2024, 14(10): e70075.
- [7] 王岩, 白艳杰, 张铭, 等. 通督醒神针刺法对卒中后轻度认知障碍患者认知功能及精神行为症状的改善效果研究 [J]. *中国全科医学*, 2021, 24(33): 4223-4228.
- WANG Y, BAI Y J, ZHANG M, et al. Tongduxingshen acupuncture improves the cognitive function and psycho-behavioral symptoms in patients with post-stroke mild cognitive impairment (in Chinese) [J]. *Chinese General Practice*, 2021, 24(33): 4223-4228.
- [8] XIN X Y, PAN J, WANG X Q, et al. 2-methoxyestradiol attenuates autophagy activation after global ischemia [J]. *Can J Neurol Sci*, 2011, 38(4): 631-638.
- [9] 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.
- [10] CHEN L M, CHEN S Y, BAI Y J, et al. Electroacupuncture improves cognitive impairment after ischemic stroke based on regulation of mitochondrial dynamics through SIRT1/PGC-1 α pathway [J]. *Brain Res*, 2024, 1844: 149139.
- [11] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 257.
- LI Z R. *Experimental Acupuncture* (in Chinese) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007: 257.
- [12] 余亮, 樊小农. 对“醒脑开窍”针刺体系中神-脑-窍的认识 [J]. *中国针灸*, 2019, 39(8): 883-886.
- YU L, FAN X N. Idea of Shen-brain-orifice in the acupuncture system of Xingnao Kaiqiao (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2019, 39(8): 883-886.
- [13] CHANDEL N S. Glycolysis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2021, 13(5): a040535.
- [14] BELL S M, BURGESS T, LEE J, et al. Peripheral glycolysis in neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 8924.
- [15] GUO S C, WEHBE A, SYED S, et al. Cerebral glucose metabolism and potential effects on endoplasmic reticulum stress in stroke [J]. *Aging Dis*, 2023, 14(2): 450-467.
- [16] GUAN X, WEI D S, LIANG Z Z, et al. FDCA attenuates neuroinflammation and brain injury after cerebral ischemic stroke [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(20): 3839-3854.
- [17] PU J, HAN J, YANG J H, et al. Anaerobic glycolysis and ischemic stroke: from mechanisms and signaling pathways to natural product therapy [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2024, 15(17): 3090-3105.
- [18] MAITI P, SINGH S B, SHARMA A K, et al. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain [J]. *Neurochem Int*, 2006, 49(8): 709-716.
- [19] CHOI Y K. Detrimental roles of hypoxia-inducible factor-1 α in severe hypoxic brain diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(8): 4465.
- [20] CHEN G, WANG X, JIN Z, et al. HIF-1 α knockdown attenuates inflammation and oxidative stress in ischemic stroke male rats via CXCR4/NF- κ B pathway [J]. *Brain Behav*, 2024, 14(9): e70039.
- [21] WANG Y W, CHEN Y, LI Z, et al. Electroacupuncture enhances cerebral blood perfusion by inhibiting HIF-1 α in rat subarachnoid hemorrhage [J]. *Brain Res*, 2024, 1839: 149010.
- [22] CHEN M Y, LIU M Z, LUO Y, et al. Celastrol protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice by inhibiting glycolysis through targeting HIF-1 α /PDK1 axis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7420507.
- [23] LIN Z J, DONG X, HE H, et al. A simplified herbal decoction attenuates myocardial infarction by regulating macrophage metabolic reprogramming and phenotypic differentiation via modulation of the HIF-1 α /PDK1 axis [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 75.
- [24] LIU Z C, ZHENG J C, DING T, et al. HIF-1 α protects nucleus pulposus cells from oxidative stress-induced mitochondrial impairment through PDK-1 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 224: 39-49.
- [25] ZENG M L, SHAO C Y, ZHOU H F, et al. Protocatechuedehyde improves mitochondrial energy metabolism through the HIF1 α /PDK1 signaling pathway to mitigate ischemic stroke-elicited internal capsule injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 277: 114232.

收稿日期:2024-11-09 修回日期:2025-03-15
网络首发:2025-07-09 编辑:刘婉宁