

电针调控 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路和葡萄糖转运蛋白缓解脑卒中后认知障碍大鼠学习记忆损伤的作用机制

万俊^{1,2}, 肖雨倩², 孙可心², 陈淑颖², 陈丽敏², 王岩¹, 白艳杰¹, 冯慧利¹, 李彦杰³
(¹河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450046; ²河南中医药大学康复医学院, 郑州 450000;
³河南省中医院, 郑州 450046)

【摘要】 目的:观察电针对脑缺血再灌注损伤后学习记忆障碍大鼠海马中胰岛素受体底物(IRS)-1/磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路和葡萄糖转运蛋白(GLUTs)的影响,探究电针对脑卒中后认知障碍大鼠学习记忆损伤的作用机制。方法:从 100 只 SD 雄性大鼠中随机选出 15 只作为假手术组,另外 85 只大鼠采用线栓法制备大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)模型。造模成功后的的大鼠分为模型组、电针组、抑制剂组、电针+抑制剂组、多奈哌齐组,每组 15 只,其中抑制剂组和电针+抑制剂组大鼠在造模前 30 min 给予左侧侧脑室注射通路抑制剂 LY294002(10 mmol/L, 10 μ L)。电针组和电针+抑制剂组进行电针“神庭”“百会”干预,30 min/次,多奈哌齐组大鼠给予多奈哌齐(0.92 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,均 1 次/d,连续治疗 14 d。Zea-Longa 评分和新物体识别实验检测大鼠神经损伤情况和学习记忆能力;TTC 染色评估大鼠脑梗死体积;HE 染色观察梗死区海马组织病理形态变化;葡萄糖检测试剂盒检测海马组织葡萄糖含量;qPCR 法检测海马中 IRS-1、PI3K、AKT 的 mRNA 表达;Western blot 法检测海马组织 IRS-1、PI3K、磷酸化(p)-PI3K、AKT、p-AKT、GLUT1、GLUT3 的蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠海马组织细胞稀疏、核固缩深染,神经功能缺损评分、对新物体的辨别指数、脑梗死体积增加($P<0.01$),海马组织葡萄糖含量减少($P<0.01$),海马 IRS-1 的蛋白和 mRNA 表达量显著上调($P<0.01$),p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值,PI3K、AKT mRNA 表达,GLUT1、GLUT3 蛋白表达显著下调($P<0.01$)。与模型组比较,电针组和多奈哌齐组大鼠海马组织细胞排列整齐,轮廓清晰,其余指标均逆转($P<0.01$, $P<0.05$)。与电针组比较,电针+抑制剂组大鼠海马神经元数量减少、出现少量空泡和坏死,除神经功能缺损评分外其他指标的电针回调作用均被削弱($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:电针“神庭”“百会”可能通过激活 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路来抑制胰岛素抵抗,提高神经元葡萄糖转运能力,从而改善 MCAO/R 大鼠的学习记忆功能。

【关键词】 脑卒中;认知障碍;电针;胰岛素受体底物-1/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路;葡萄糖转运蛋白;胰岛素抵抗

Mechanism of electroacupuncture in alleviating learning and memory impairment in rats with post-stroke cognitive impairment by regulating the IRS-1/PI3K/AKT signaling pathway and glucose transporters

WAN Jun^{1,2}, XIAO Yu-qian², SUN Ke-xin², CHEN Shu-ying², CHEN Li-min², WANG Yan¹, BAI Yan-jie¹, FENG Hui-li¹, LI Yan-jie³ (¹The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; ²School of Rehabilitation Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000; ³Henan Hospital of Traditional Chinese

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250123

引用格式:万俊,肖雨倩,孙可心,等.电针调控 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路和葡萄糖转运蛋白缓解脑卒中后认知障碍大鼠学习记忆损伤的作用机制[J].针刺研究,2026,51(4):415-424.

项目来源:河南省中医药传承与创新人才工程(仲景工程)中医药学科拔尖人才项目(No.CZ0237-08);河南省卫健委国家中医临床研究基地科研专项(No.2022JDZX005);河南省中医药拔尖人才培养项目专项课题(No.2022ZYBJ07);河南省中医药科学研究专项(No.2019JDZX2016)

通信作者:白艳杰,E-mail:baiyj66@126.com

Medicine, Zhengzhou 450046)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) on the insulin receptor substrate (IRS)-1/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway and glucose transporters (GLUTs) in the hippocampus of rats with learning and memory impairment after cerebral ischemia-reperfusion injury, so as to explore the mechanism of EA in improving learning and memory impairment in rats with post-stroke cognitive impairment. **Methods** Fifteen rats were randomly selected from 100 male Sprague-Dawley (SD) rats as the sham operation group, and the remaining 85 rats were subjected to middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) modeling using the suture method. Successfully modeled rats were divided into the model, EA, inhibitor, EA+inhibitor, and donepezil groups, with 15 rats in each group, in which, rats in the inhibitor group and EA+inhibitor group were given an intracerebroventricular injection of the pathway inhibitor LY294002 (10 mmol/L, 10 μ L) into the left lateral ventricle 30 min before modeling. Rats in the EA group and EA+inhibitor group received EA intervention at “Shenting” (GV24) and “Baihui” (GV20) acupoints, 30 min per session, once a day. Rats in the donepezil group were given donepezil by gavage at a dose of 0.92 mg·kg⁻¹·d⁻¹, once a day. Rats in the treatment group were given continuous intervention for 14 d. Zea-Longa scoring and novel object recognition test were used to evaluate neurological damage and learning and memory ability; TTC staining was used to assess cerebral infarct volume; HE staining was used to observe the pathological morphology changes of hippocampal tissue in the infarcted area; a glucose detection kit was used to measure hippocampal glucose content; qPCR was used to detect the mRNA expressions of IRS-1, PI3K, and AKT in the hippocampus; Western blot was used to detect the protein expressions of IRS-1, PI3K, phosphorylated (p)-PI3K, AKT, p-AKT, GLUT1, and GLUT3 in the hippocampus. **Results** Compared with the sham operation group, the model group showed sparse hippocampal cells with pyknosis and hyperchromatism, increased neurological deficit score, cerebral infarct volume, and recognition index to novel objects ($P<0.01$), decreased glucose content ($P<0.01$), significantly up-regulated protein and mRNA expressions of IRS-1 in the hippocampus ($P<0.01$), and significantly down-regulated p-PI3K/PI3K ratio, p-AKT/AKT ratio, mRNA expressions of PI3K and AKT, and protein expressions of GLUT1 and GLUT3 ($P<0.01$). Compared with the model group, the EA group and donepezil group showed neatly arranged hippocampal cells with clear outlines, and the other indicators were reversed ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with the EA group, the EA+inhibitor group showed a reduction in the number of neurons with a small amount of vacuolation and necrosis, and the reversal effects of EA on all indicators except the neurological deficit score were weakened ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** EA at GV24 and GV20 may improve the learning and memory function of MCAO/R rats by activating the IRS-1/PI3K/AKT signaling pathway to inhibit insulin resistance and enhance the glucose transport capacity of neurons.

【KEYWORDS】 Stroke; Cognitive impairment; Electroacupuncture; IRS-1/PI3K/AKT signaling pathway; Glucose transporters; Insulin resistance

脑卒中后认知障碍(PSCI)是一种临床综合征,通常表现为一个或多个核心认知领域的持续性损伤,是全球脑卒中后高死亡率的主要影响因素^[1-2]。目前,临床上治疗PSCI的药物主要参照阿尔兹海默症的治疗策略,应用较广泛的有胆碱酶抑制剂和其他溶栓药物等,但是仍然不能满足当前的临床治疗需求^[3]。随着大众对健康生活的要求不断提高,针刺、艾灸等传统中医技术逐渐受到青睐。已有研究证明电针可以通过调控小胶质细胞极化减轻海马神经元炎症反应及促进海马体的突触可塑性,进而改善脑卒中患者的认知功能^[4-5],但其作用机制仍需深入探讨。

葡萄糖转运蛋白(GLUTs)在调节葡萄糖转运和维持机体能量代谢中发挥重要作用^[6]。脑缺血再

灌注损伤早期, GLUTs减少和葡萄糖代谢降低进一步损害脑功能,并影响认知能力^[7]。此外,脑内胰岛素不仅可以直接调控中枢神经系统,还可以通过复杂的串扰机制调控机体葡萄糖代谢^[8]。在正常情况下,胰岛素受体底物(IRS)-1磷酸化(p)后可调控下游磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路,促进神经元GLUTs的表达和移位。然而,在缺血缺氧状态下,神经元易出现胰岛素抵抗,抑制IRS/PI3K/AKT通路的激活,导致下游GLUTs的细胞膜易位功能被阻碍,进一步引发葡萄糖代谢障碍,影响认知功能^[9]。此外研究显示,阿尔兹海默症动物模型的海马组织中IRS蛋白表达上调,而PI3K和AKT蛋白表达下调,同时GLUTs摄取量显著减少^[10]。因此,靶向IRS-1/PI3K/AKT信

号通路或 GLUTs 可能是治疗 PSCI 的有效策略。本实验建立大脑中动脉阻塞再灌注(MCAO/R)大鼠模型,以脑葡萄糖转运为切入点,基于 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路探讨电针“神庭”“百会”对 PSCI 的神经保护作用机制,以期对 PSCI 的预防及中医治疗提供新的靶点和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

100 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 230~280 g,购自济南朋悦实验动物养殖有限公司,动物生产许可证:SCXK(鲁)2022-0006。将大鼠饲养在河南中医药大学动物中心,12 h/12 h 明暗交替,室温 23~25 °C,允许其自由获取食物和水。所有实验方案都符合相关伦理学规定^[11],并得到河南中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号:IACUC-202310009。

将大鼠在适宜环境下喂养 1 周后,随机选取 15 只作为假手术组。在余下的 85 只大鼠中随机抽取 51 只采用线栓法建立 MCAO/R 模型,剩余 34 只大鼠在造模前 30 min 通过脑立体定位注射通路抑制剂 LY294002 后再进行线栓法造模。待所有造模大鼠清醒后,均采用 Zea-Longa 评分法对其进行神经功能缺损评分^[12],最终筛选出造模成功大鼠 75 只,其中未注射抑制剂的随机分为模型组、电针组、多奈哌齐组,注射抑制剂的随机分为抑制剂组、电针+抑制剂组,每组 15 只。

1.2 主要试剂与仪器

多奈哌齐(重庆锐恩),TTC 染液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、HE 染色试剂盒(北京索莱宝),MCAO 线栓(北京西浓),超敏 ECL 化学发光检测试剂盒、 β -actin 抗体、HRP 标记的二抗、GLUT1 抗体、GLUT3 抗体(武汉三鹰),SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(上海雅酶),RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(武汉赛维尔),葡萄糖测定试剂盒(南京建成),PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002(美国 GpBio),PI3K 抗体、p-PI3K 抗体、AKT 抗体、p-AKT 抗体(美国 GeneTex),IRS-1 抗体(美国 Cell Signaling)。

脑立体定位注射仪、行为学分析软件(深圳瑞沃德),华佗牌电针仪、0.35 mm×13 mm 针灸针(苏州医疗用品厂),显微镜(日本尼康),实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche),生物组织脱水机、轮转式切片机(深圳达科为),石蜡包埋机(常州普瑞斯星),酶

标仪(美国 Thermo),电泳仪、多功能成像系统、半干转印系统(美国 Bio-Rad)。

1.3 MCAO/R 模型制备及评价

采用线栓法^[13]造模:实验大鼠在造模前 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。麻醉后大鼠仰卧位固定于鼠板上,备皮消毒。沿颈部正中中线作切口,分离颈部筋膜和肌肉,暴露左侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA)并分离。随后用动脉夹分别夹闭左侧 CCA 和 ECA 近心端、ICA 远心端。在 CCA 近分叉处剪一小切口,将准备好的线栓从切口处插入,松开动脉夹,经颈动脉分叉处进入 ICA,进入约 2 cm 感到有轻微阻力时即可停止,结扎 ICA 近心端。最后缝合伤口。缝合时留 1 cm 线栓在皮肤外,缺血 2 h 后将线栓小心退出约 1 cm,以实现再灌注。假手术组大鼠仅切开颈部皮肤并分离相关血管,然后缝合切口。所有实验大鼠在造模后均腹腔注射庆大霉素 1 500 U/只,连续注射 3 d,以预防感染。术后将大鼠放在干净的垫料上进行单笼饲养,正常进食进水。

模型评价标准:待造模大鼠苏醒 2 h 后采用 Zea-Longa 评分法^[12]对其进行神经功能缺损评分,筛选出造模成功的大鼠。0分:无神经功能缺损;1分:右前肢伸展不全;2分:向右旋转;3分:向偏瘫侧跌倒;4分:不能独立行走。1~3分视为造模成功。

1.4 干预方法

电针+抑制剂组和抑制剂组大鼠手术前 12 h 禁食不禁水,用 2% 异氟烷麻醉。之后将大鼠固定在脑立体定位仪上,充分暴露头顶部皮肤,备皮消毒。沿颅顶正中位置作切口,根据 Bregma 点,在左侧侧脑室进行定位:鼻侧 1.5 mm,鼻甲外侧 0.8 mm,颅骨深度 4.5 mm,注射 10 μ L 通路抑制剂 LY294002 (10 mmol/L,注射速度 2 μ L/min),注射完成后留针 5 min,随后将针缓慢移出,进行缝合消毒^[14]。待大鼠醒后 30 min 进行 MCAO/R 造模,造模方法及术后处理同上述方法。

电针组和电针+抑制剂组在造模成功后次日进行电针干预,穴位定位参照《实验动物常用穴位名称与定位 第 2 部分:大鼠》^[15],选取“神庭”(位于颅前正中,额骨顶骨缝交界线前方)、“百会”(位于顶骨正中,两耳尖连线处)电针治疗。选穴标准依据前期研究确定^[16]。将大鼠固定后,在进针部位进行消毒,用 0.35 mm×13 mm 针灸针 15°斜刺进针 2 mm,连接电针仪(正极接“百会”,负极接“神庭”)。

调节电针为疏密波,频率1~20 Hz,强度1~3 mA,以针体轻轻抖动为宜,每次30 min,1次/d,连续治疗14 d。

多奈哌齐组在造模成功后次日给予多奈哌齐(0.92 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,1次/d,连续治疗14 d。

假手术组、模型组和抑制剂组大鼠造模后每日仅进行抓取固定,不做其他干预。

1.5 检测指标及方法

新物体识别实验检测大鼠对新物体的识别能力:共分为3个阶段。(1)适应训练阶段:待干预结束后次日将每组大鼠依次放入新物体识别箱中适应5 min。(2)熟悉训练阶段:将两个相同的物体放入实验箱中,依次将大鼠背对物体放入箱中,自由探索5 min。(3)测试阶段:将其中一个物体换成一个新物体,再次用同样的方式将大鼠放入实验箱中自由探索5 min,用行为软件记录其探索新旧物体的潜伏期N1、N2。计算大鼠的辨别指数,辨别指数(%)=N2÷(N1+N2)×100%。

TTC染色检测大鼠脑梗死体积:各组随机取3只大鼠,用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,快速取出完整脑组织,-20℃冷冻20 min,用组织刀片沿冠状切面切5片,每片厚约2 mm,放于提前预备好的TTC染液中于37℃避光孵育30 min,每隔15 min翻动1次。染色完成后将脑片按顺序依次排列,拍照。最后用Image J分析软件计算脑梗死体积百分比,脑梗死体积百分比(%)=(脑梗死灶体积之和÷全脑总体积)×100%。

HE染色观察大鼠海马CA1区病理损伤情况:各组随机取3只大鼠,用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后仰卧位固定于鼠板上,沿腹部切开,充分暴露心脏。从心尖处进针,剪开右心耳,灌注0.9%氯化钠溶液至四肢发白,随后立即灌注4%多聚甲醛至四肢僵硬。断头取出完整海马组织,放入固定液中固定组织,用石蜡包埋并切片,切片的厚度为3 μm。将石蜡切片依次放入二甲苯I、II中各10 min,梯度乙醇中各3 min脱蜡。苏木精染色11 min,伊红染色30 s。脱水、中性树脂胶封片。光学显微镜下观察大鼠海马CA1区组织形态变化。

葡萄糖检测试剂盒检测大鼠海马组织中葡萄糖含量:将剩余大鼠用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后断头取脑,迅速取出左侧海马组织,放入无菌无酶冻存管中置于-80℃冰箱保存。检测时每组随机取3只大鼠20 mg海马组织至EP管中,加入9倍体积的0.9%氯化钠溶液于冰水浴中

机械匀浆,4℃离心15 min后取上清液,根据葡萄糖检测试剂盒操作说明检测。(1)在96孔板中加入纯水或待测样本或葡萄糖标准品及工作液;(2)轻轻震荡孔板,37℃条件下孵育10 min;(3)于酶标仪505 nm波长下测定各孔吸光度值。根据公式计算各组大鼠海马组织葡萄糖含量。

qPCR法检测大鼠梗死侧海马组织中IRS-1、PI3K、AKT的mRNA表达:从-80℃冰箱中随机称取每组3只大鼠海马组织50 mg置于EP管中,加入1 mL RNA提取液,在冰浴条件下进行充分研磨,4℃离心后提取总RNA,测定RNA浓度和纯度后进行反转录(条件:25℃ 5 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min)。PCR扩增程序设置:95℃预变性5 min;95℃变性10 s,60℃退火34 s,72℃延伸30 s,共40个循环。采用2^{-ΔΔCt}法计算各组大鼠海马组织中IRS-1、PI3K、AKT的mRNA相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
IRS-1	上游 TACCGCAACTGCCGAAGATT	98
	下游 GGGGATGTGTGACGCTAGAC	
PI3K	上游 ATCGACCTACACTTGGGGGA	97
	下游 CAATATCTTCTGGCCGGGCT	
AKT	上游 AGGAGGTCATCGTTGCCAAG	117
	下游 GGTCGTGGGTCTGGAATGAG	
GAPDH	上游 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	下游 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	

注:IRS-1为胰岛素受体底物-1,PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,AKT为蛋白激酶B。

Western blot法检测大鼠海马组织中IRS-1、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、GLUT1、GLUT3的蛋白表达:从-80℃冰箱中随机称取各组3只大鼠海马组织50 mg置于EP管中,加入RIPA组织裂解液进行机械研磨,4℃离心后取上清液。以BCA蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量,剩余样本以1:4比例加入Loading Buffer后在100℃沸水中变性10 min。配置SDS-PAGE凝胶,上样后在150 V条件下电泳1 h,并转膜至PVDF膜,用5%脱脂奶粉摇床封闭2 h,TBST洗膜10 min后放入一抗(β-actin 1:10 000,IRS-1 1:1 000,PI3K 1:1 000,p-PI3K 1:1 000,AKT 1:2 000,p-AKT 1:2 000,GLUT1 1:4 000,

GLUT3 1:2 000), 4 °C 孵育过夜。次日取出 PVDF 膜用 1×TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 随后放于兔二抗 (1:10 000) 室温下摇床孵育 1 h, 1×TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 曝光显影。采用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值。以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量, 并计算 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值。

1.6 统计分析

所有数据采用 SPSS26.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组数据先进行正态性检验, 若符合正态性则采用单因素方差检验, 若方差齐, 两组比较采用 LSD 检验, 反之则用 Dunnett's *t*3 法。神经功能缺损评分采用非参数检验进行分析, 以中位数 (上下四分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较

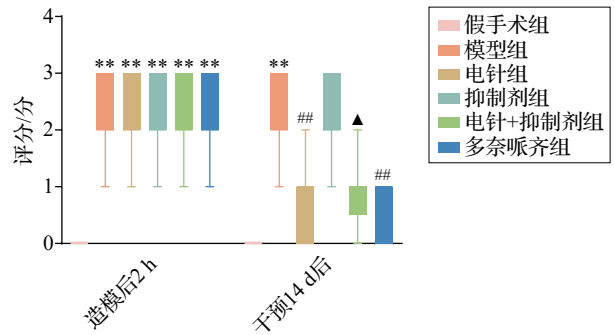
造模结束待各组大鼠清醒后, 对其进行神经功能缺损评分。分数越高, 表明神经损伤越严重。造模 2 h 后, 与假手术组比较, 其他各组实验大鼠神经功能缺损评分均显著增高 ($P < 0.01$); 但除假手术组外, 其他各组之间差异均无统计学意义。经过电针干预 14 d 后, 对其神经功能损伤程度重新评估: 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损评分明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 电针组和多奈哌齐组大鼠神经功能缺损评分明显降低 ($P < 0.01$); 与抑制剂组比较, 电针+抑制剂组大鼠神经功能缺损评分明显降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 各组大鼠新物体辨别指数比较

与假手术组比较, 模型组和抑制剂组大鼠新物体辨别指数升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 电针组和多奈哌齐组大鼠新物体辨别指数降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 抑制剂组大鼠新物体辨别指数升高 ($P < 0.05$)。与电针组比较, 电针+抑制剂组大鼠新物体辨别指数升高 ($P < 0.05$)。与抑制剂组比较, 电针+抑制剂组大鼠新物体辨别指数降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组大鼠脑梗死体积比较

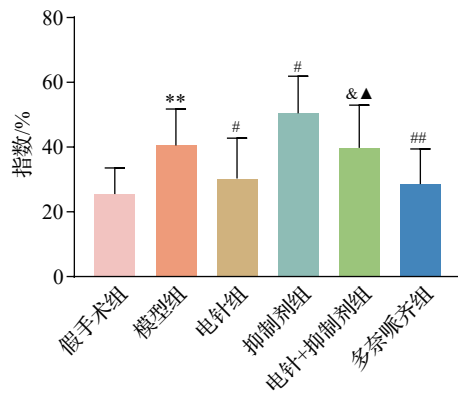
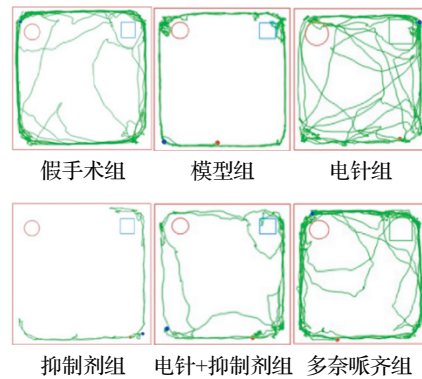
TTC 染色后, 假手术组大鼠脑组织呈均匀红色, 未出现梗死灶。与假手术组比较, 模型组大鼠脑梗死体积百分比增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 电针组和多奈哌齐组脑梗死体积百分比显著减少 ($P < 0.01$); 抑制剂组大鼠的梗死体积百分比增加



注: 与同时时间点假手术组比较, $**P < 0.01$; 与同时时间点模型组比较, $^{\#}P < 0.01$; 与同时时间点抑制剂组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。假手术组 15 只鼠, 模型组 14 只鼠, 电针组 13 只鼠, 抑制剂组 12 只鼠, 电针+抑制剂组 13 只鼠, 多奈哌齐组 14 只鼠。

图 1 各组大鼠不同时间点神经功能缺损评分比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

Fig. 1 Comparison of neurological deficit scores of rats in the 6 groups at different time points ($M[P_{25}, P_{75}]$)



注: 与假手术组比较, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#}P < 0.01$; 与电针组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与抑制剂组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。假手术组 15 只鼠, 模型组 14 只鼠, 电针组 13 只鼠, 抑制剂组 12 只鼠, 电针+抑制剂组 13 只鼠, 多奈哌齐组 14 只鼠。

图 2 各组大鼠新物体辨别指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Comparison of new objects recognition index of rats in the 6 groups ($\bar{x} \pm s$)

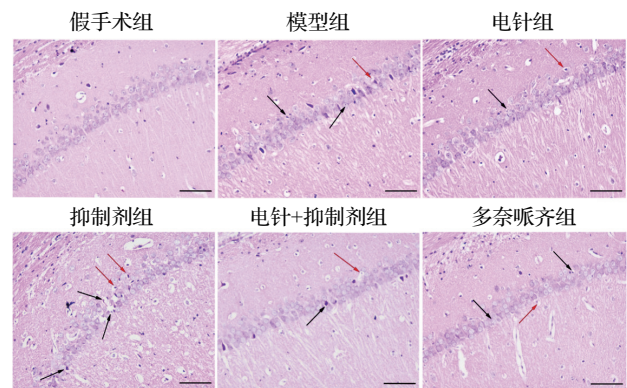
($P < 0.05$)。与电针组比较, 电针+抑制剂组大鼠脑梗死体积百分比显著增加 ($P < 0.05$)。与抑制剂组比较, 电针+抑制剂组大鼠脑梗死体积百分比减少

($P < 0.01$)。见图3。

2.4 各组大鼠海马CA1区病理损伤比较

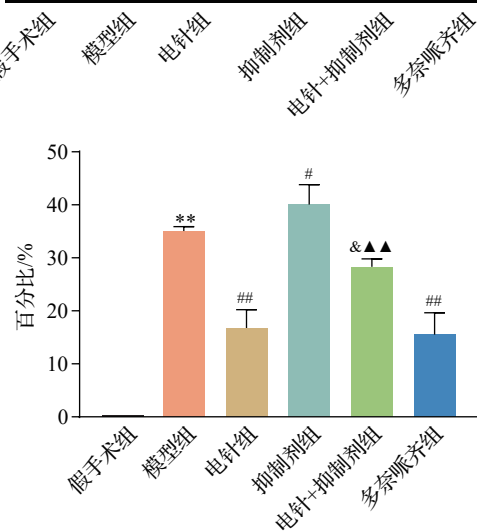
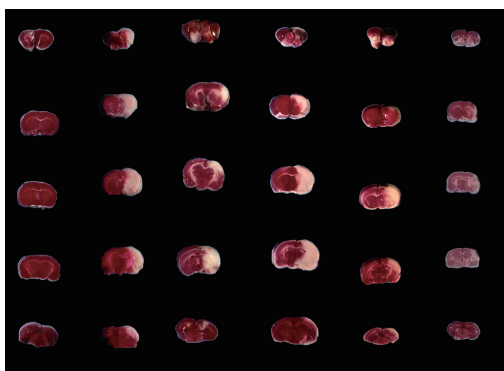
HE染色结果显示,假手术组大鼠海马CA1区神经元形态结构完整,排列紧密,边缘清晰可见;细胞核明显。与假手术组比较,模型组大鼠海马CA1区神经元排列不规则;细胞稀疏,数量减少,出现大量空泡,细胞结构模糊不清;细胞核萎缩深染,并可见大量坏死细胞。抑制剂组大鼠脑组织水肿严重,神经元排列紊乱且出现变性坏死;细胞大小不一、核仁深染。通过治疗后,电针组和多奈哌齐组病理损伤状态有所改善:细胞数量相对增加,排列较为紧密,轮廓逐渐清晰;细胞核染色较为均匀,仅有少数深染,胞质较为丰富;细胞形状大多呈规则的圆形,细胞水肿及坏死有所减轻,神经元细胞病理损伤情况得到改善。与抑制剂组比较,电针+抑制剂

组大鼠部分神经元排列稀疏,但细胞数量和轮廓均得到一定程度改善,细胞形状较少出现多边形或梭形;细胞核深染不明显,大多染色均一;细胞空泡变性减少,细胞水肿或坏死状态有所缓解。见图4。



注:黑色箭头表示核破裂,红色箭头表示组织空泡,标尺=100 μm。
图4 各组大鼠梗死侧海马CA1区病理形态比较(HE染色)

Fig. 4 Comparison of pathological morphology of hippocampal CA1 region on infarct side of rats in the 6 groups (HE staining)



注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,
$P < 0.01$;与电针组比较,& $P < 0.05$;与抑制剂组比较,
▲▲ $P < 0.01$ 。

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

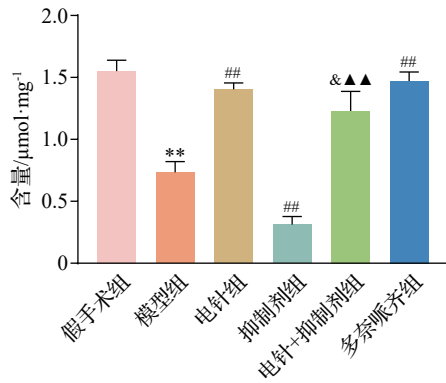
Fig. 3 Comparison of the percentage of cerebral infarction volume of rats in the 6 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

2.5 各组大鼠海马组织中葡萄糖含量比较

与假手术组比较,模型组大鼠梗死侧海马组织的葡萄糖含量显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,电针组和多奈哌齐组大鼠海马组织中葡萄糖含量明显升高($P < 0.01$);抑制剂组葡萄糖含量降低($P < 0.01$)。与电针组比较,电针+抑制剂组大鼠海马组织中葡萄糖含量降低($P < 0.05$)。与抑制剂组比较,电针+抑制剂组大鼠梗死侧海马组织葡萄糖含量升高($P < 0.01$)。见图5。

2.6 各组大鼠海马组织中IRS-1/PI3K/AKT信号通路基因及蛋白表达比较

qPCR结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠海马组织中IRS-1的mRNA相对表达量显著上调($P < 0.01$),而PI3K、AKT的mRNA相对表达量显著下调($P < 0.01$)。与模型组比较,电针组和多奈哌齐组大鼠IRS-1的mRNA表达量显著下调($P < 0.01$),而PI3K、AKT的mRNA表达量显著上调($P < 0.01, P < 0.05$);抑制剂组IRS-1的mRNA表达量显著上调($P < 0.05$),而PI3K、AKT的mRNA表达量显著下调($P < 0.01, P < 0.05$)。与电针组比较,电针+抑制剂组IRS-1的mRNA表达量显著上调($P < 0.05$),而PI3K、AKT的mRNA表达量显著下调($P < 0.05$)。与抑制剂组比较,电针+抑制剂组大鼠海马组织中IRS-1的mRNA表达量显著下调($P < 0.01$),而PI3K、AKT的mRNA表达量显著上



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, & $P<0.05$;与抑制剂组比较,▲▲ $P<0.01$ 。

图5 各组大鼠梗死侧海马组织葡萄糖含量比较 ($\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of glucose content in hippocampus on the infarction side of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

调($P<0.01, P<0.05$)。见图6。

Western blot结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠海马组织中IRS-1的蛋白表达显著升高($P<0.01$),p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT的蛋白表达比值显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,电针组和多奈哌齐组大鼠IRS-1的蛋白表达显著降低($P<0.05$),p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT的蛋白表达比值显著升高($P<0.01, P<0.05$);抑制剂组IRS-1的蛋白表达升高($P<0.05$),p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT的蛋白表达比值降低($P<0.01, P<0.05$)。与电针组比较,电针+抑制剂组大鼠海马组织中IRS-1的蛋白表达升高($P<0.05$),而p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT的蛋白表达比值降低($P<0.05$)。与抑制剂组比较,电针+抑制剂组大鼠IRS-1的蛋

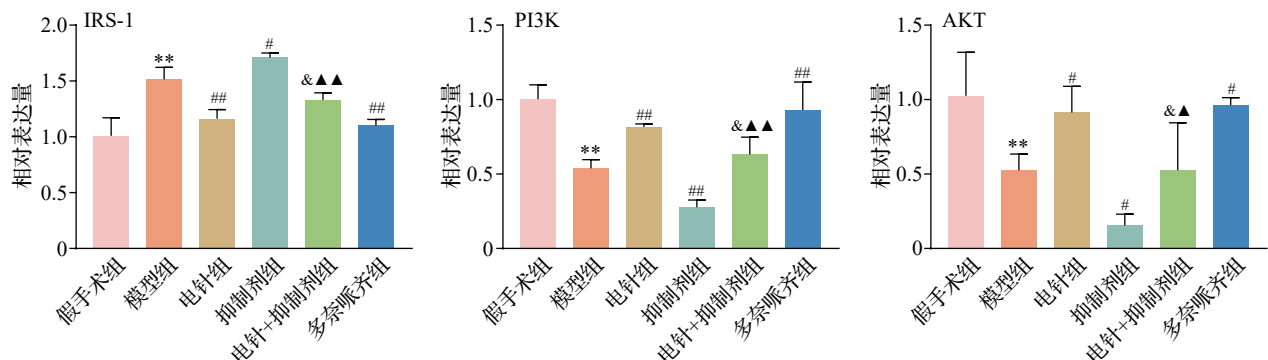
白表达显著降低($P<0.05$),p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT的蛋白表达比值显著升高($P<0.01, P<0.05$)。见图7。

2.7 各组大鼠海马中GLUT1和GLUT3表达比较

Western blot结果显示, GLUT1和GLUT3蛋白在正常大鼠海马组织中均表达。与假手术组比较,模型组大鼠梗死侧海马组织中GLUT1和GLUT3的蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,电针组和多奈哌齐组大鼠海马组织中GLUT1、GLUT3的蛋白表达显著上调($P<0.01$);注射通路抑制剂LY294002后,抑制剂组大鼠海马组织中GLUT1、GLUT3的蛋白表达下调更为显著($P<0.05$)。与电针组比较,电针+抑制剂组大鼠海马组织中GLUT1、GLUT3的蛋白表达下调($P<0.05, P<0.01$)。与抑制剂组比较,电针+抑制剂组大鼠海马组织中GLUT1、GLUT3蛋白的表达量上调($P<0.01$)。见图8。

3 讨论

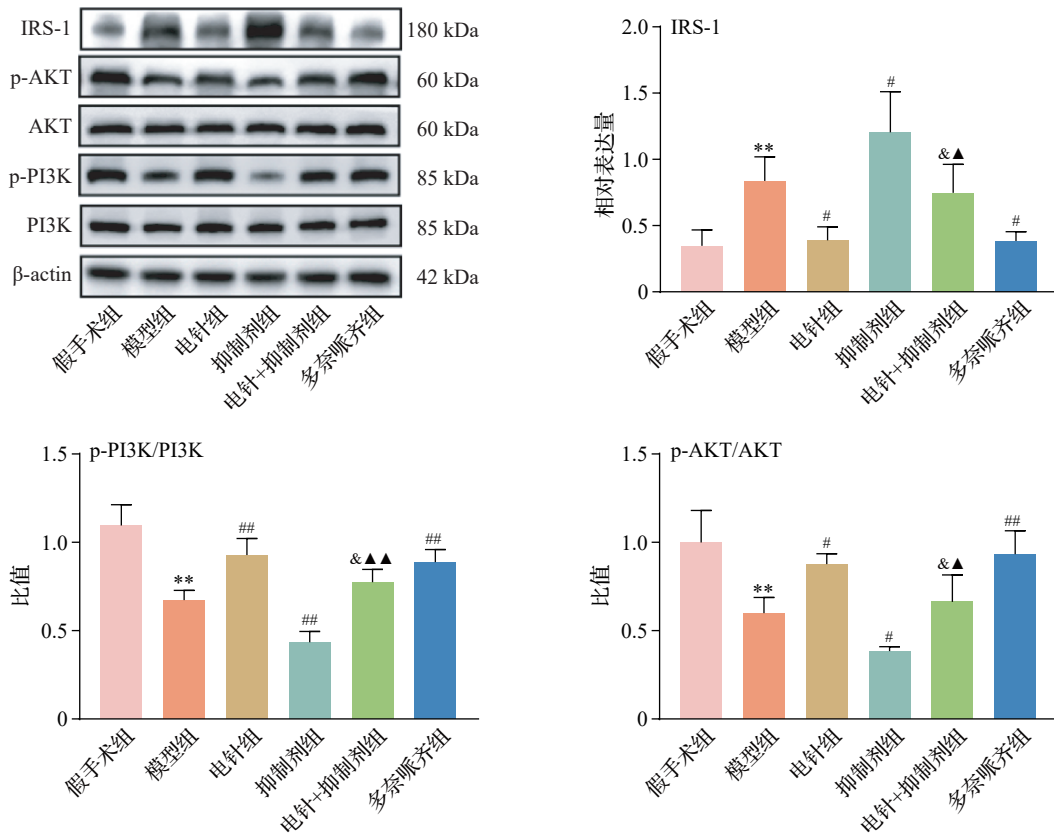
PSCI患者主要表现为执行功能受损及记忆力、注意力下降等,依据临床表现将其归为中医“健忘”“痴呆”的范畴,病位在脑^[17]。神庭属督脉,有清脑散风、镇静安神之功效^[18]。百会位于头顶正中,为诸阳之会,是所有经络和穴位的汇聚点,属督脉,有息风醒脑、升阳固脱的功效^[19]。神庭与百会并用可补中益气、安神定志、调节阴阳。此外,团队在前期的临床和动物研究中也证实,针刺神庭、百会可减轻大脑神经炎性损伤,并有效改善患者的精神状态,提高学习记忆能力^[16, 20]。依据以上研究,本实验采取“神庭”“百会”作为主穴,探讨电针改善MCAO/R



注:IRS-1为胰岛素受体底物-1,PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,AKT为蛋白激酶B。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;与电针组比较, & $P<0.05$;与抑制剂组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

图6 各组大鼠梗死侧海马组织中IRS-1、PI3K、AKT mRNA表达水平比较($\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

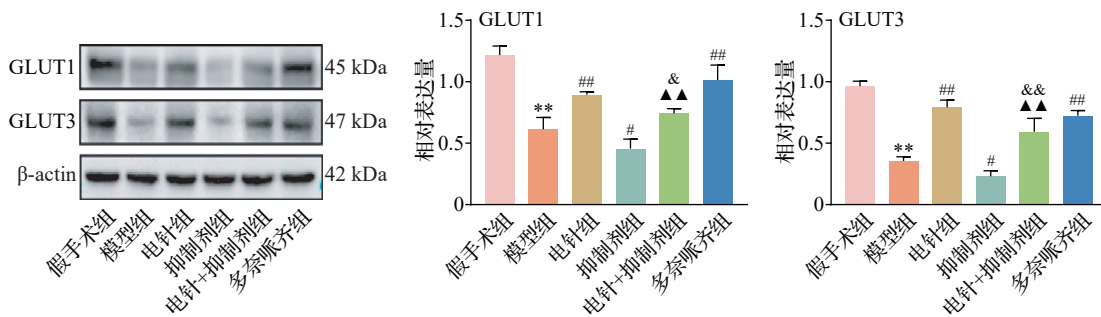
Fig. 6 Comparison of mRNA expression levels of IRS-1, PI3K and AKT in infarcted hippocampal tissue of rats in the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)



注:IRS-1为胰岛素受体底物-1,PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,AKT为蛋白激酶B,p为磷酸化。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与电针组比较,& $P < 0.05$;与抑制剂组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。

图7 各组大鼠梗死侧海马组织中IRS-1、PI3K、AKT蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$,3只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of protein expression levels of IRS-1, PI3K and AKT in infarcted hippocampal tissue of rats in the 6 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)



注:GLUT1为葡萄糖转运蛋白1,GLUT3为葡萄糖转运蛋白3。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与电针组比较,& $P < 0.05$,&▲ $P < 0.01$;与抑制剂组比较,▲▲ $P < 0.01$ 。

图8 各组大鼠梗死侧海马组织中GLUT1、GLUT3蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$,3只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of protein expression levels of GLUT1 and GLUT3 in infarcted hippocampal tissue of rats in the 6 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

大鼠学习记忆障碍的作用机制。

胰岛素受体在中枢神经系统中广泛表达,其参与大脑能量代谢、机体稳态的控制、神经元损伤修复及高级神经功能调控过程^[21]。在脑组织中,胰岛素抵抗是缺血性卒中的独立危险因素,这一状态的关键特征并非IRS-1缺失,而是其功能丧失。研究

表明,在脑缺血等应激下,IRS-1的总蛋白表达可能上调,但其功能因丝氨酸位点(如Ser307)发生抑制性磷酸化而受损。这种功能失调的IRS-1无法有效激活下游PI3K/AKT信号通路,从而导致该通路被抑制,进而影响糖原合成酶激酶-3β和雷帕霉素靶蛋白的表达,促进血栓形成,加重病理损伤^[22-23]。此

外,IRS-1的蛋白表达上调可能是脑缺血再灌注损伤后的适应性反应,但其功能失调才是加剧脑组织损伤的核心机制^[10,24]。在本研究中,我们建立了MCAO/R大鼠模型,观察到在脑缺血损伤后,IRS-1蛋白在缺血侧半球表达增加,同时伴随p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值的下降,符合脑内胰岛素抵抗的典型特征。经过电针治疗后,IRS-1的mRNA和蛋白水平均显著下调,接近正常水平。与此同时,p-PI3K和p-AKT的蛋白表达上调,大鼠的神经功能得到改善。这表明电针并非简单地抑制IRS-1,而是逆转了其病理性的过度表达,并恢复了其正常功能与下游通路的活性。为了探讨电针是否通过调节PI3K/AKT信号通路对MCAO/R大鼠产生神经保护作用,我们在MCAO/R大鼠造模前给予该通路抑制剂LY294002。结果显示,电针下调MCAO/R大鼠的脑梗死体积、改善认知障碍、上调p-PI3K和p-AKT的蛋白表达等作用被回调,提示电针“神庭”“百会”对认知障碍和脑梗死的干预作用是通过减轻胰岛素抵抗状态、恢复IRS-1/PI3K/AKT信号通路的正常功能来实现的。

葡萄糖是大脑必不可少的能量基质,需依赖GLUTs穿过血脑屏障运输至神经元和神经胶质细胞,从而维持大脑的能量供应和正常功能^[25]。在脑损伤后的急性期,由于脑血流阻塞、血脑屏障功能损伤,脑葡萄糖转运功能下降,可能无法满足大脑代谢需求,进一步影响认知功能^[26]。研究表明,海马组织内IRS-1/PI3K/AKT信号通路及其下游效应分子GLUTs对维持葡萄糖稳态至关重要。然而,在脑缺血再灌注损伤期间,该通路的活性及其调控的葡萄糖代谢过程均受到显著抑制^[27-28]。在正常生理状态下,胰岛素信号通路的正常激活是调控葡萄糖代谢的关键。IRS-1的酪氨酸磷酸化可招募并激活PI3K,进而触发AKT的磷酸化。活化的AKT通过磷酸化其下游底物,促进GLUTs囊泡从胞内向细胞膜易位,最终促进组织对葡萄糖的摄取^[29-30]。本实验结果表明,在缺血条件下,大鼠海马组织中GLUT1和GLUT3的mRNA和蛋白表达水平均降低,电针治疗提高了GLUT1和GLUT3的mRNA和蛋白表达。注射通路抑制剂后,不仅阻断了电针诱导的p-PI3K和p-AKT水平的上调,也同时削弱了电针对GLUT1和GLUT3蛋白表达的提升作用。这证明在脑卒中发病早期,胰岛素分泌不足易引起胰岛素抵抗,进而抑制IRS-1/PI3K/AKT信号通路的激活,从而阻碍神经元对GLUTs的摄取,最终出

现大脑海马组织葡萄糖代谢异常,影响认知功能。电针“神庭”“百会”可以有效逆转上述情况,通过激活IRS-1/PI3K/AKT信号通路,促进神经元对GLUTs的摄取,提高海马组织中葡萄糖的代谢能力,改善神经元病理形态,从而减轻MCAO/R大鼠学习记忆障碍。

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] CHAU J P C, LO S H S, ZHAO J, et al. Prevalence of post-stroke cognitive impairment and associated risk factors in Chinese stroke survivors [J]. *J Neurol Sci*, 2023, 455: 122805.
- [3] GALLUCCI L, SPERBER C, GUGGISBERG A G, et al. Post-stroke cognitive impairment remains highly prevalent and disabling despite state-of-the-art stroke treatment [J]. *Int J Stroke*, 2024, 19(8): 888-897.
- [4] LIN B B, WANG M X, CHEN X C, et al. Involvement of P2X7R-mediated microglia polarization and neuroinflammation in the response to electroacupuncture on post-stroke memory impairment [J]. *Brain Res Bull*, 2024, 212: 110967.
- [5] ZHANG J, GUI Y R, LENG C L, et al. Electroacupuncture at “Baihui, Yintang and Shuigou” acupoints improves post-stroke cognitive impairment in mice [J]. *Stud Health Technol Inform*, 2023, 308: 723-732.
- [6] CAMANDOLA S, MATTSON M P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration [J]. *EMBO J*, 2017, 36(11): 1474-1492.
- [7] D'APOLITO E, SISALLI M J, TUFANO M, et al. Oxidative metabolism in brain ischemia and preconditioning: two sides of the same coin [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(5): 547.
- [8] KULLMANN S, KLEINRIDDER A, SMALL D M, et al. Central nervous pathways of insulin action in the control of metabolism and food intake [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8(6): 524-534.
- [9] YAN F, LIU J, CHEN M X, et al. Icaritin ameliorates memory deficits through regulating brain insulin signaling and glucose transporters in 3 × Tg-AD mice [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(1): 183-188.
- [10] CHEN F, HE Y K, WANG P W, et al. Banxia Xiexin decoction ameliorated cognition via the regulation of insulin pathways and glucose transporters in the hippocampus of APP^{swe}/PS1^{dE9} mice [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2018, 32: 2058738418780066.
- [11] 《针刺研究》编辑部.《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(2): 220.

Editorial Board of Acupuncture Research. Review list of

- welfare ethics of experimental animals in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(2): 220.
- [12] 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.
- [13] YANG Y Q, WANG F, FANG M X, et al. Tamarixetin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via suppressing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2/nucleotide-binding oligomerization domain like receptor family pyrin domain-containing 3 inflammasome activation [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(8): 4286-4306.
- [14] DING Z M, GAO J, FENG Y X, et al. Electroacupuncture ameliorates depression-like behaviors in post-stroke rats via activating AMPK-mediated mitochondrial function [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2023, 19: 2657-2671.
- [15] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第2部分: 大鼠 [J]. *针刺研究*, 2021, 46(4): 351-352.
China Association of Acupuncture and Moxibustion. Nomenclature and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [16] 李晓晓, 白艳杰, 张铭, 等. 通督醒神针刺法对血管性痴呆大鼠 p38MAPK 磷酸化及炎症反应的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(10): 2429-2434.
LI X X, BAI Y J, ZHANG M, et al. Effect of Tongdu Xingshen acupuncture method on p38MAPK phosphorylation and inflammatory response in vascular dementia rats (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2024, 44(10): 2429-2434.
- [17] 林志诚, 薛偕华, 江一静, 等. 中医康复临床实践指南·脑卒中 [J]. *康复学报*, 2019, 29(6): 6-9, 15.
LIN Z C, XUE X H, JIANG Y J, et al. Clinical practice guidelines for stroke of Chinese medicine rehabilitation (in Chinese) [J]. *Rehabilitation Medicine*, 2019, 29(6): 6-9, 15.
- [18] 孙远征, 徐先鹏, 郭颖. 头穴针刺治疗带状疱疹后遗神经痛伴焦虑抑郁 [J]. *长春中医药大学学报*, 2019, 35(6): 1114-1117.
SUN Y Z, XU X P, GUO Y. Scalp acupuncture in the treatment of postherpetic neuralgia with anxiety and depression (in Chinese) [J]. *Journal of Changchun University of Chinese Medicine*, 2019, 35(6): 1114-1117.
- [19] 李昱乔. 督脉在中医脑病治疗中的地位和作用 [J]. *影像研究与医学应用*, 2018, 2(12): 234-235.
LI Y Q. The position and function of Du meridian in the treatment of encephalopathy in traditional Chinese medicine (in Chinese) [J]. *Journal of Imaging Research and Medical Applications*, 2018, 2(12): 234-235.
- [20] 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.
- [21] SOTO M, CAI W K, KONISHI M, et al. Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(13): 6379-6384.
- [22] LANGLAIS P, YI Z, FINLAYSON J, et al. Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance [J]. *Diabetologia*, 2011, 54(11): 2878-2889.
- [23] DING P F, ZHANG H S, WANG J, et al. Insulin resistance in ischemic stroke: mechanisms and therapeutic approaches [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1092431.
- [24] AMTUL Z, HILL D J, ARANY E J, et al. Altered insulin/insulin-like growth factor signaling in a comorbid rat model of ischemia and β -amyloid toxicity [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 5136.
- [25] KOEPEL H. Glucose transporters in brain in health and disease [J]. *Pflugers Arch*, 2020, 472(9): 1299-1343.
- [26] PLOURDE G, ROUMES H, SUISSA L, et al. Neuroprotective effects of lactate and ketone bodies in acute brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2024, 44(7): 1078-1088.
- [27] SHARMA V, SINGH T G, MANNAN A S. Therapeutic implications of glucose transporters (GLUT) in cerebral ischemia [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(8): 2173-2186.
- [28] RAE C D, BAUR J A, BORGES K, et al. Brain energy metabolism: a roadmap for future research [J]. *J Neurochem*, 2024, 168(5): 910-954.
- [29] MACKENZIE R W, ELLIOTT B T. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014, 7: 55-64.
- [30] GRIFFITH C M, MACKLIN L N, CAI Y, et al. Impaired glucose tolerance and reduced plasma insulin precede decreased AKT phosphorylation and GLUT3 translocation in the hippocampus of old 3xTg-AD mice [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2019, 68: 809-837.

收稿日期: 2025-02-11 修回日期: 2025-04-01
网络首发: 2025-12-26 编辑: 秦田雨