

☆ XXXX ☆

“调神通络”电针经 Nrf2/TREM2 通路调控脑缺血再灌注损伤学习记忆障碍大鼠小胶质细胞极化的机制

石蓉¹, 马铁明^{1,2}, 孙世婧¹, 江静¹, 李佳欣¹, 吴琼³, 周子茜¹, 张家玮¹, 杨蕊睿¹,
赵曦彤⁴, 马俊杰^{1,2}, 张小卿^{1,2}, 陈怡然^{1,2}

(¹辽宁中医药大学针灸推拿学院, 沈阳 110847; ²辽宁省教育厅针灸生物学重点实验室, 沈阳 110847; ³中国人民解放军北部战区总医院神经内科, 沈阳 110000; ⁴辽宁中医药大学附属医院 脑病康复二科, 沈阳 110032)

【摘要】 目的:探讨“调神通络”电针对脑缺血再灌注损伤(CIRI)学习记忆障碍大鼠海马中核因子红细胞 2 相关因子(Nrf2)/髓细胞触发受体 2(TREM2)信号通路的影响及对海马小胶质细胞极化的调控作用。方法:SD 大鼠随机分为 7 d 假手术组(10 只)、14 d 假手术组(10 只)和造模组,造模组参照 Koizumi 线栓法制备大脑中动脉闭塞/再灌注模型,结合 Morris 水迷宫实验筛选出满足学习记忆障碍的大鼠。将造模成功的大鼠随机分为 7 d 模型组、7 d 电针组、14 d 模型组、14 d 电针组,每组 10 只。电针组予以“调神通络”电针治疗,10 min/次,1 次/d,分别连续干预 7 d、14 d。采用改良神经功能缺损评分(mNSS)评估大鼠神经功能损伤情况, Morris 水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力, HE 染色观察海马 CA1 区组织病理形态, 尼氏染色观察神经元形态和尼氏小体, 免疫荧光双染观察海马区巨噬细胞抗原(CD68)/离子化钙结合适配分子 1(Iba1)、甘露糖受体(CD206)/Iba1 阳性细胞占比, Western blot 法检测海马中 Nrf2、TREM2、衔接蛋白 DNAX 激活蛋白 12(DAP12)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)的蛋白相对表达量。结果:与同一时间假手术组比较, 7 d 模型组和 14 d 模型组 mNSS 评分升高($P < 0.01$), 海马 CA1 区神经元排列松散, 尼氏小体减少, 海马中 Nrf2、TREM2、DAP12 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 14 d 模型组逃避潜伏期延长($P < 0.01$), 穿越原平台次数减少及目标象限停留时间缩短($P < 0.01$), 海马区 M1 型 CD68⁺/Iba1⁺计数增加($P < 0.05$), TNF- α 蛋白表达增多($P < 0.01$)。与同一时间模型组比较, 7 d 电针组和 14 d 电针组 mNSS 评分降低($P < 0.01$), 海马 CA1 区神经元间质松散缓解, 尼氏小体增多, 海马中 TNF- α 蛋白表达减少($P < 0.05$, $P < 0.01$), Nrf2、TREM2 蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 14 d 电针组逃避潜伏期缩短($P < 0.01$), 穿越原平台次数及目标象限停留时间增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), 海马区 M1 型 CD68⁺/Iba1⁺计数减少($P < 0.01$), 海马区 M2 型 CD206⁺/Iba1⁺计数、DAP12 和 TGF- β 蛋白表达均升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与 7 d 电针组比较, 14 d 电针组 mNSS 评分降低($P < 0.05$), 海马 CA1 区神经细胞排列致密, 形态接近正常, 海马中 TREM2 蛋白表达升高($P < 0.05$)。结论:“调神通络”电针可改善 CIRI 学习记忆障碍大鼠学习记忆功能, 其机制可能与激活海马中 Nrf2/TREM2 信号通路, 抑制小胶质细胞向 M1 型极化, 并促进其向 M2 型极化有关, 其中电针干预 14 d 效果更显著。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤; 学习记忆障碍; “调神通络”电针; 小胶质细胞极化; Nrf2/TREM2 信号通路

【DOI】 10.13702/j.1000-0607.20251014

引用格式:石蓉, 马铁明, 孙世婧, 等.“调神通络”电针经 Nrf2/TREM2 通路调控脑缺血再灌注损伤学习记忆障碍大鼠小胶质细胞极化的机制[J]. 针刺研究, XXXX, XX(X):1-11.

项目来源:国家自然科学基金青年项目(No.82305391); 辽宁省科技厅联合基金项目(No.2023-MSLH-197); 辽宁省科技厅自然科学基金面上项目(No.2024-MSLH-305); 辽宁省教育厅高校基本科研项目储备项目(No.2024-JYTCB-067); 辽宁省教育厅针灸生物学重点实验室建设项目(No.LJ232410162029)

通信作者:陈怡然, E-mail: cyrlnutcm@163.com

“Tiaoshen Tongluo” electroacupuncture improves learning-memory ability by regulating microglial polarization via the Nrf2/TREM2 signaling pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

SHI Rong¹, MA Tie-ming^{1,2}, SUN Shi-jing¹, JIANG Jing¹, LI Jia-xin¹, WU Qiong³, ZHOU Zi-xi¹, ZHANG Jia-wei¹, YANG Rui-rui¹, ZHAO Xi-tong⁴, MA Jun-jie^{1,2}, ZHANG Xiao-qing^{1,2}, CHEN Yi-ran^{1,2} (¹College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; ²Key Laboratory of Acupuncture Biology, Liaoning Provincial Education Department, Shenyang 110847; ³Department of Neurology, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110000; ⁴Second Department of Encephalopathy Rehabilitation, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032)

[ABSTRACT] Objective To observe the effect of “Tiaoshen Tongluo” (mind regulation and meridian-collateral dredging) electroacupuncture (EA) on the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) signaling pathway and hippocampal microglial polarization in rats with learning-memory impairment induced by cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI), so as to explore its mechanisms underlying improvement of learning-memory ability after CIRI. **Methods** Male SD rats were randomly divided into 7 d sham group ($n=10$), 14 d sham group ($n=10$), and CIRI model group. The CIRI model was established by middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R). Rats meeting the criteria of learning-memory impairment due to CIRI, identified by the Morris water maze tests, were randomly assigned to 7 d model, 7 d EA, 14 d model and 14 d EA groups, with 10 rats in each group. Rats of the EA groups received “Tiaoshen Tongluo” EA stimulation at “Baihui” (GV20), “Yintang” (GV24^{*}), and bilateral “Taichong” (LR3) and “Hegu” (LI4) for 10 min per session, once daily, for 7 or 14 consecutive days. The modified neurological severity score (mNSS) was used to assess the neurological deficits before and after the intervention. Morris water maze test was conducted to evaluate learning and memory abilities. Hematoxylin-eosin (H. E.) staining was used to observe histopathological changes in the hippocampal CA1 region, and Nissl staining was applied to examine neuronal morphology and Nissl bodies. Immunofluorescence double staining was employed to determine the proportions of CD68⁺/Iba1⁺ (M1 type) and CD206⁺/Iba1⁺ (M2 type) positive cells in the hippocampus tissue. Western blot was used to measure the relative protein expression levels of Nrf2, TREM2, DNAX activator protein 12 (DAP12), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor- β (TGF- β) in the hippocampus tissue. **Results** Compared with the 7 d and 14 d sham groups, the 7 d and 14 d model groups had a significant increase in the mNSS scores ($P<0.01$), and an obvious down-regulation in expression levels of hippocampal Nrf2, TREM2, and DAP12 proteins ($P<0.05$, $P<0.01$), and loose arrangement of neurons and reduction in the number of Nissl bodies in the hippocampal CA1 region. In contrast to the 14 d sham group, the 14 d model group had a notable increase in the escape latency, the number of CD68⁺/Iba1⁺ dual labeled cells, and the expression level of TNF- α in the hippocampus ($P<0.05$, $P<0.01$), and a striking decrease in the number of original platform crossings and time spent in the target quadrant ($P<0.01$). Compared with the 7 d and 14 d model groups, the 7 d and 14 d EA groups exhibited reduction of mNSS scores and TNF- α expressions ($P<0.01$, $P<0.05$), up-regulation of expression levels of Nrf2, and TREM2 proteins ($P<0.05$, $P<0.01$), alleviated arrangement of CA1 neurons, and increased Nissl bodies. Compared with the 14 d model group, the 14 d EA group showed a decrease in the escape latency and the number of CD68⁺/Iba1⁺ dual labeled cells ($P<0.01$), and an increase in the number of original platform crossings and time spent in the target quadrant, number of CD206⁺/Iba1⁺ dual labeled cells, and the expression of DAP12 and TGF- β proteins ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the 7 d EA group, the 14 d EA group showed a further reduction in mNSS score ($P<0.05$), and a further up-regulation of expression of TREM2 protein ($P<0.05$), a more compact neuronal arrangement in the CA1 region with the morphological structure being close to the normal. **Conclusion** “Tiaoshen Tongluo” EA can improve learning-memory ability in CIRI rats, which may be associated with its functions in activating the Nrf2/TREM2 signaling pathway, inhibiting microglial M1 polarization and promoting M2 polarization. In addition, the therapeutic effect of 14 d EA is better than that of 7 d EA.

[KEYWORDS] Cerebral ischemia-reperfusion injury; Learning-memory impairment; “Tiaoshen Tongluo” electroacupuncture; Microglial polarization; Nrf2/TREM2 signaling pathway

脑卒中中以缺血性为主要类型^[1],其中约60%伴 脑卒中后认知障碍(PSCI),严重影响患者的生活自

理能力^[2]。PSCI发生于卒中后6个月以内,是指由于海马、丘脑和皮质等重要功能区梗死而引发的综合征,临床表现为学习记忆障碍、注意力下降、视空间能力障碍和执行功能障碍等^[3-4]。海马主要参与记忆的编码、存储和检索过程,是主导学习和记忆功能的脑区^[5]。小胶质细胞作为中枢神经系统(CNS)的固有免疫细胞,具有对缺血缺氧引发的神经炎症反应快速增殖和反应的能力,从静息态激活分化为“经典活化”M1表型和“选择活化”M2表型;前者具有促炎、吞噬及介导神经毒性作用^[6],后者则发挥抗炎、损伤修复及免疫调节功能。目前认为小胶质细胞极化为M1型可诱导神经炎症反应,损伤海马神经元功能,引发学习记忆障碍^[7]。核因子红细胞2相关因子(Nrf2)是一种主要在神经胶质细胞中表达的转录因子,其介导的信号通路在脑缺血再灌注损伤(CIRI)中起到抑制炎症反应、减轻氧化应激及调节能量代谢等作用^[8]。敲低小胶质细胞髓细胞触发受体2(TREM2)会诱导小鼠出现抑郁样行为,而激活Nrf2可调节TREM2基因转录影响蛋白表达,从而改善抑郁状态^[9]。针刺可通过上调Nrf2相关信号通路,减少细胞凋亡,对血管性认知功能障碍发挥神经保护作用^[10]。研究^[11]表明,以百会、印堂等头部穴位为主的“调神”针刺法可有效改善PSCI患者的认知功能;此外,合谷、太冲作为“四关穴”,具有调和气血、疏通经络之效。

小胶质细胞M1/M2极化在CIRI后不同时期的动态变化对损伤后神经免疫激活和修复过程意义重大,本研究以大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)学习记忆障碍大鼠为模型,探讨“调神通络”电针经Nrf2/TREM2信号通路调控海马小胶质细胞极化,从而改善CIRI大鼠学习记忆障碍的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

SPF级成年雄性大鼠,体质量280~320 g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供,生产许可证号SCXK(辽)2020-0001。于辽宁中医药大学实验动物中心饲养,温度23~25℃,湿度50%~60%,自然光线,适应性饲养7 d。将76只大鼠随机分为7 d假手术组(10只)、14 d假手术组(10只)和造模组(56只),造模组建立CIRI大鼠模型后,再结合Zea Longa神经功能缺损评分和Morris水迷宫实验筛选出符合学习记忆障碍模型标准的大鼠纳入后续实验。按照随机数字表法将造模成功的大鼠分为7 d

模型组(10只)、7 d电针组(10只)、14 d模型组(10只)、14 d电针组(10只)。本研究遵循相关的伦理规定^[12],经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号:21000042024016)。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:PBS 磷酸盐缓冲液、BSA、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝),BCA蛋白检测试剂盒、RIPA裂解液、尼氏染色液(上海碧云天),兔抗Nrf2、GAPDH一抗(武汉三鹰),兔抗TREM2一抗(北京博奥森),兔抗衔接蛋白DNAX激活蛋白12一抗(DAP12,武汉爱博泰克),兔抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、离子化钙结合适配分子1(Iba1)、巨噬细胞抗原(CD68)、甘露糖受体(CD206)抗体及山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor 488)、山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor 594)、DAPI染色试剂(英国Abcam),无蛋白快速封闭液(上海雅酶),鼠抗转化生长因子- β (TGF- β ,美国Cell Signaling Technology),HRP标记的山羊抗兔IgG二抗、HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗(成都正能)。

主要仪器:一次性无菌针灸针(规格:0.16×25 mm,苏州华佗),6805-A型电针仪(汕头达佳),MCAO栓线(货号:2838A4,北京西浓),HP-ZJP-1型大鼠针灸固定器(郑州豪湃),HS6型玻片扫描仪、DMi8M型荧光显微镜(德国Leica),T10型高速组织研磨仪(德国IKA),TGL-16型高速台式冷冻离心机(湖南湘仪),SPectraMax-M2型多功能酶标仪(美国Molecular Devices),Ethovision XT 11.5型动物运动轨迹跟踪系统、Ethovision XT 11.5型Morris水迷宫实验系统(上海欣软),FluorChem E型化学发光凝胶成像仪(美国Alpha Innotech),Eclipse E200型光学显微镜(日本NIKON),ESP600型电泳仪(上海天能)。

1.3 造模方法

参照Koizumi线栓法^[1,3-14]建立MCAO/R模型。操作方法:术前禁食不禁水12 h,3%戊巴比妥钠溶液按0.2 mL/100 g剂量腹腔注射麻醉大鼠,将大鼠仰卧位固定备皮,碘伏消毒,颈前正中偏右钝性分离肌层,依次将右侧颈总动脉(CCA)、右侧颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)暴露,结扎CCA近心端,将硅胶线栓从CCA插入,经过分岔进入ICA,推入18~22 mm至有抵触感即可。120 min后将硅胶线栓拔出,逐层缝合。假手术组仅简单分离颈部动脉。

1.4 模型评分和筛选

造模大鼠清醒后,采用Zea Longa评分法^[15]将评分为0分、4分的大鼠剔除实验。造模24 h后对所有大鼠进行水迷宫定位航行实验,以假手术组大鼠的平均逃避潜伏期作为参考,若造模组大鼠逃避潜伏期平均值是假手术组的120%以上^[16],则认为造模成功。

1.5 干预方法

造模成功24 h后,对电针组大鼠行电针干预。具体方法:将大鼠俯卧位固定于软体针灸固定器,参照《实验动物常用穴位名称与定位 第2部分:大鼠》^[17]的穴位定位法,用毫针平刺“百会”“印堂”,直刺双侧“太冲”“合谷”,连接电针仪。“百会”与“印堂”连接一对电极,“合谷”与“太冲”连接另两对电极,即正极连“百会”“合谷”,负极连“印堂”“太冲”,疏密波,频率4 Hz/20 Hz,电流1 mA,此时大鼠轻微抖动,刺激10 min,每日1次,分别持续干预7 d、14 d。假手术组和模型组仅俯卧位固定。

1.6 取材

第19天完成Morris水迷宫实验后,以0.2 mL/100 g剂量腹腔注射3%戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,在冰盒上快速取右侧海马,前1/3放于4%多聚甲醛固定,用于后续HE染色、尼氏染色和免疫荧光染色实验,后2/3放入-80℃冷冻保存,用于Western blot实验。

本实验初始每组纳入10只大鼠,部分大鼠在实验过程中因造模失败、死亡或无法完成行为学测试而被排除。

1.7 观察指标及检测方法

神经功能受损程度评分:采用改良神经功能缺损评分(mNSS)^[18]评价神经功能。mNSS是一项综合测试评估指标,涵盖运动功能、感觉功能、平衡木、反射缺失及异常运动表现,评分范围为0~18分,神经损伤严重程度与分值呈正相关。

Morris水迷宫实验评估大鼠学习和记忆能力:14 d组大鼠从实验开始后14 d(干预第9天)进行定位航行实验。将大鼠按照顺时针方向,依次从第1、2、3、4象限置入水中,测定其90 s内到达平台的时间(即逃避潜伏期),若未能在规定时间找到平台,则引导其至平台停留10 s,逃避潜伏期以90 s记录。每只大鼠每天测试4次,连续5 d。干预14 d后进行空间探索实验,移除平台将大鼠从第1象限原位置入水,记录90 s内穿越原平台次数和在目标象限停留的时间。

HE染色观察海马CA1区组织病理学形态:海马组织在4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋后,切成4 μm厚的切片,经HE染色、脱水、透明及封片后,置于光学显微镜下观察。

尼氏染色观察海马CA1区神经元形态:上述切片用1%甲苯胺蓝溶液染色,乙醇、二甲苯洗涤,封片晾干置于光学显微镜下观察。

免疫荧光双染法检测大鼠海马CA1区CD68⁺/Iba1⁺、CD206⁺/Iba1⁺阳性细胞:上述切片脱蜡、水化及抗原修复,BSA封闭。加入CD68、CD206和Iba1一抗(1:100),4℃孵育过夜。滴加荧光二抗(1:1 000)室温避光孵育1 h,用DAPI染色液染细胞核10 min。漂洗后用抗荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下采集图像并用Image J软件计数阳性细胞。

Western blot法检测海马组织Nrf2、TREM2、DAP12、TNF-α、TGF-β蛋白相对表达量:海马组织称重剪碎,按比例加入蛋白酶、磷酸酶抑制剂、RIPA裂解液,高速匀浆后以4℃、12 000 r/min离心10 min(离心半径6.3 cm),取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度;加上样缓冲液变性蛋白,上样、电泳、转膜;快速封闭液封闭15 min, TBST洗涤,加入Nrf2(1:700)、TREM2(1:1 000)、DAP12(1:1 000)、TNF-α(1:1 000)、TGF-β(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)一抗4℃摇床孵育过夜;TBST溶液洗膜,加二抗(1:1 000)常温孵育1 h;充分洗涤,使用化学发光试剂(ECL)显影成像并拍照。采用Image J软件对条带灰度值进行分析,以目的蛋白灰度值比内参蛋白灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.8 统计学处理

采用GraphPad Prism 8.0软件分析数据,符合正态分布的计量数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,正态性采用Shapiro-Wilk检验;多组均值比较采用单因素方差分析,组间多重比较时,若方差齐,则采用Tukey's检验,若方差不齐,则采用Dunnnett's *t*3检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

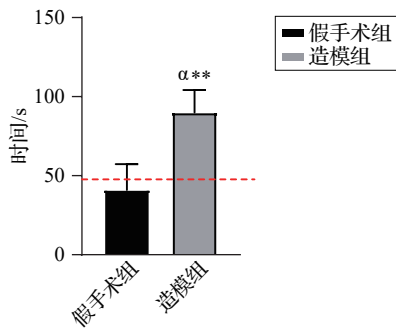
2 结果

2.1 各组大鼠造模后Morris水迷宫实验结果

造模组大鼠逃避潜伏期平均值是假手术组平均值的120%以上($P < 0.01$),提示MCAO/R学习记忆障碍模型造模成功。见图1。

2.2 各组大鼠神经功能缺损评分比较

与同一时间假手术组比较,7 d模型组和14 d模

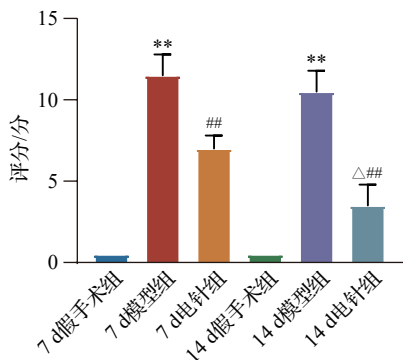


注:红色虚线表示假手术组潜伏期的120%参考线。 α 表示造模组显著高于该阈值,提示造模成功。与假手术组比较,** $P<0.01$ 。

图1 假手术组与造模组大鼠定位航行实验5 d的平均逃避潜伏期($\bar{x}\pm s$,假手术组20只,造模组40只)

Fig. 1 Average escape latencies of the sham group and the modeling group rats in the positioning navigation test over 5 days ($\bar{x}\pm s$, 20 rats in the sham group, 40 rats in the modeling group)

型组的mNSS评分明显升高($P<0.01$);与同一时间点模型组比较,7 d电针组和14 d电针组的mNSS评分明显降低($P<0.01$);与7 d电针组比较,14 d电针组的mNSS评分有所降低($P<0.05$)。见图2。



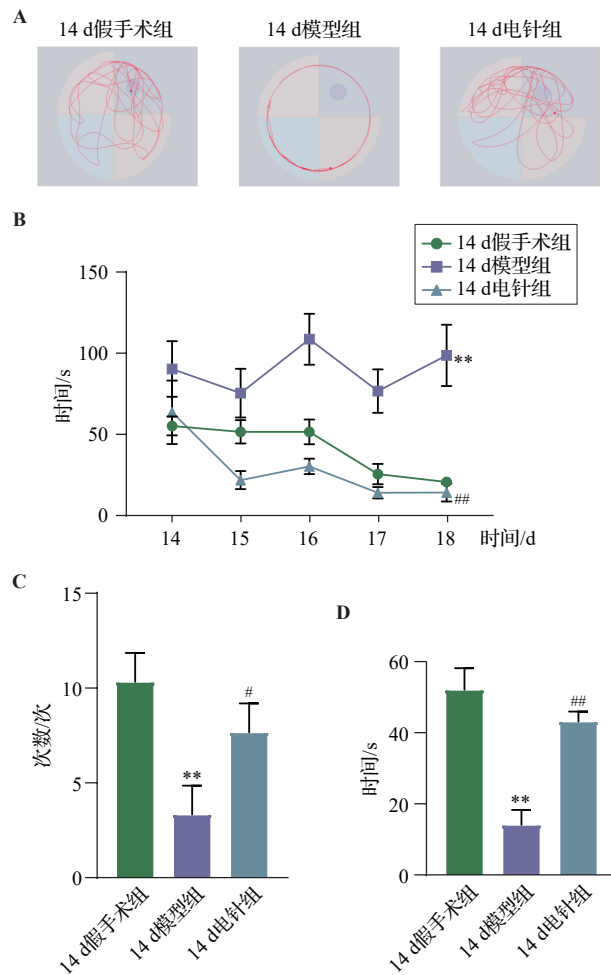
注:与同一时间点假手术组比较,** $P<0.01$;与同一时间点模型组比较,** $P<0.01$;与7 d电针组比较,△ $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠神经功能缺损评分比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of neurological deficit scores in rats of the 6 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

2.3 各组大鼠Morris水迷宫实验结果比较

造模成功后,与14 d假手术组比较,14 d模型组大鼠逃避潜伏期延长($P<0.01$),穿越原平台次数明显减少($P<0.01$),目标象限停留时间显著缩短($P<0.01$);与14 d模型组比较,14 d电针组逃避潜伏期显著缩短($P<0.01$),穿越原平台次数增多($P<0.05$),目标象限停留时间延长($P<0.01$)。见图3。



注:A为各组大鼠运动轨迹,B为各组大鼠的逃避潜伏期,C为各组大鼠穿越原平台的次数,D为各组大鼠目标象限停留的时间。与14 d假手术组比较,** $P<0.01$;与14 d模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

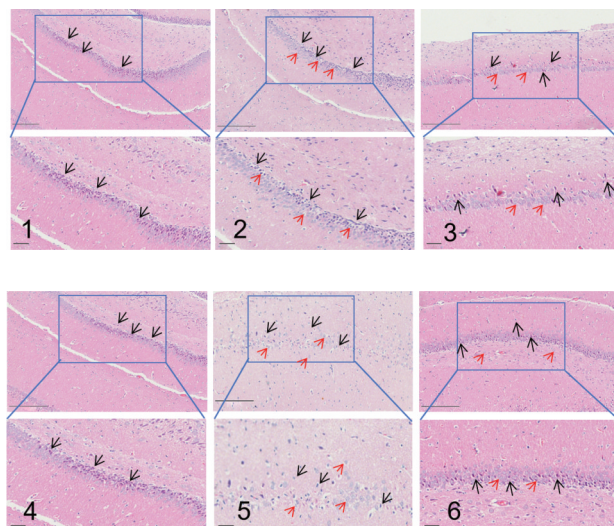
图3 各组大鼠Morris水迷宫实验结果比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of the results of Morris water maze test of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

2.4 HE染色观察各组大鼠海马CA1区组织病理学形态

7 d和14 d假手术组大鼠海马CA1区神经细胞排列致密有序,细胞结构完整性较好,胞质染色均匀清晰;与同一时间假手术组比较,7 d和14 d模型组神经细胞排列松散,胞核固缩,胞质水肿,染色不均,间质松散,出现空泡样变化,存在胶质样增生;与同一时间模型组比较,7 d和14 d电针组细胞核固缩减少,胞质水肿有所改善,间质松散有所缓解,可见少量空泡样变化。与7 d模型组比较,14 d模型组神经细胞排列紊乱程度加重,核固缩严重,少见结构完整的细胞,间质可见大量空泡样变化;与7 d电针组比较,14 d电针组细胞排列致密,细胞损伤程度

较轻,细胞形态结构接近正常。见图4。



注:1~6分别为7 d假手术组、7 d模型组、7 d电针组、14 d假手术组、14 d模型组、14 d电针组。黑色箭头表示细胞质,红色箭头表示空泡;下排图为上排图中方框部位放大图,标尺=200 μm。

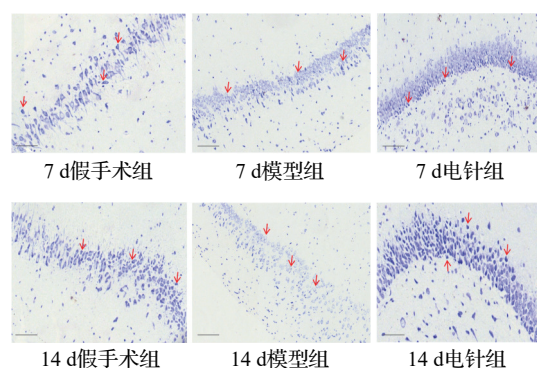
图4 各组大鼠海马CA1区组织形态比较(HE染色)
Fig. 4 Comparison of histomorphology of the hippocampal CA1 region of rats in the 6 groups (HE staining)

2.5 尼氏染色观察大鼠海马CA1区神经元形态变化

7 d假手术组和14 d假手术组大鼠海马CA1区内神经元致密有序,尼氏小体数量丰富,形态饱满,少见病理特征,同时可见多层椎体细胞排列;与同一时间假手术组比较,7 d和14 d模型组均出现明显神经元损伤、排列稀疏,尼氏小体发生溶解,呈透明状,数量显著减少,且染色深浅不一,椎体细胞基本消失,异常形态细胞增多;与同一时间模型组比较,7 d电针组和14 d电针组神经元损伤有所改善,其中14 d电针组神经元排列紧密,两组尼氏小体数量均显著增多,染色较为均匀,椎体细胞数量有所恢复,其中14 d电针组可见较多椎体细胞。与7 d模型组比较,14 d模型组神经元损伤更为严重,且分布不均,尼氏小体溶解明显;与7 d电针组比较,14 d电针组神经元形态有所恢复,且分布均匀,视野内异常细胞少见。见图5。

2.6 各组大鼠海马CA1区CD68⁺/Iba1⁺、CD206⁺/Iba1⁺阳性细胞计数比较

以CD68⁺/Iba1⁺阳性细胞表示M1型小胶质细胞计数。与同一时间假手术组比较,7 d模型组阳性



注:红色箭头表示尼氏小体,标尺=200 μm。

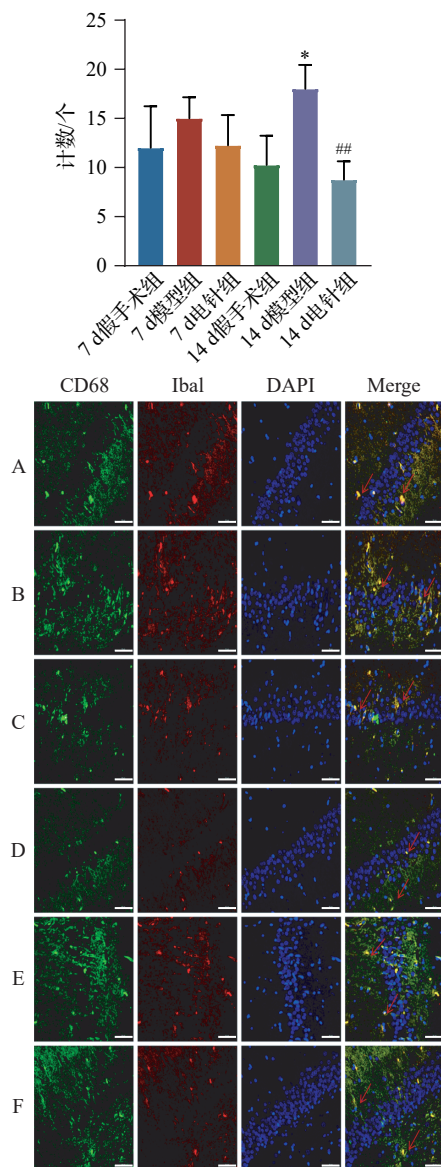
图5 各组大鼠海马CA1区神经元形态比较(尼氏染色)
Fig. 5 Comparison of morphological changes of neurons in the hippocampal CA1 region of rats in the 6 groups (Nissl staining)

细胞计数差异无统计学意义,14 d模型组阳性细胞计数增多($P < 0.05$);与同一时间模型组比较,7 d电针组阳性细胞计数差异无统计学意义,14 d电针组阳性细胞计数减少($P < 0.01$)。与7 d电针组比较,14 d电针组阳性细胞计数差异无统计学意义。见图6。

以CD206⁺/Iba1⁺阳性细胞表示M2型小胶质细胞计数。与同一时间假手术组比较,7 d和14 d模型组阳性细胞计数差异无统计学意义;与同一时间模型组比较,7 d电针组阳性细胞计数差异无统计学意义,14 d电针组阳性细胞计数增多($P < 0.01$)。与7 d电针组比较,14 d电针组阳性细胞计数差异无统计学意义。见图7。

2.7 各组大鼠海马组织中Nrf2、TREM2、DAP12、TNF-α、TGF-β的蛋白相对表达量比较

Western blot结果显示,与同一时间假手术组比较,7 d和14 d模型组的Nrf2、TREM2、DAP12蛋白相对表达量均减少($P < 0.05, P < 0.01$);与同一时间模型组比较,7 d电针组的Nrf2、TREM2蛋白相对表达量有所增加($P < 0.05$),14 d电针组的Nrf2、TREM2、DAP12蛋白相对表达量均增加($P < 0.01$);与7 d电针组比较,14 d电针组TREM2蛋白相对表达量增加($P < 0.05$)。与同一时间假手术组比较,14 d模型组TNF-α蛋白相对表达量显著增加($P < 0.01$);与同一时间模型组比较,7 d电针组和14 d电针组TNF-α蛋白相对表达量均有所降低($P < 0.05, P < 0.01$),14 d电针组的TGF-β蛋白相对表达量增加($P < 0.05$)。见图8。



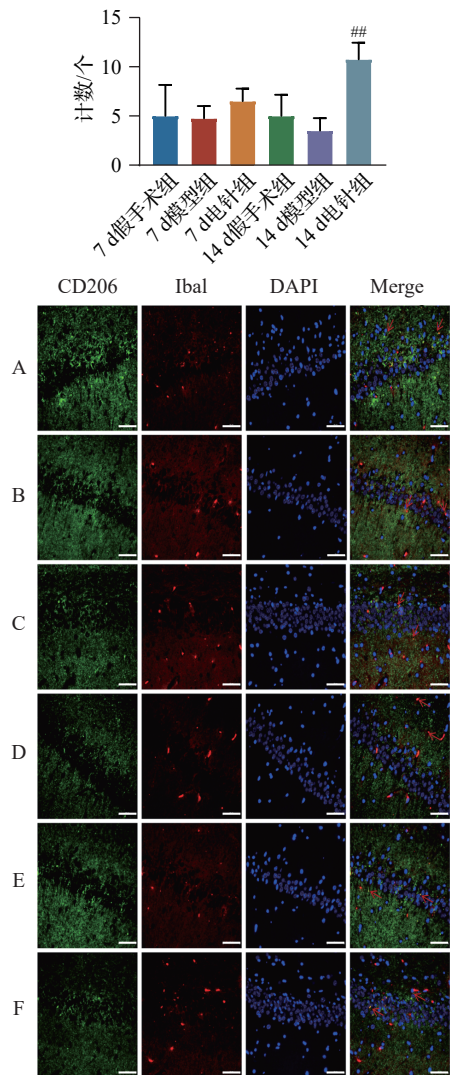
注:CD68为巨噬细胞抗原,Iba1为离子化钙结合适配分子1。A~F分别为7 d假手术组、7 d模型组、7 d电针组、14 d假手术组、14 d模型组、14 d电针组。红色箭头表示CD68⁺/Iba1⁺阳性细胞,标尺=50 μm。与同一时间点假手术组比较,**P*<0.05;与同一时间点模型组比较,##*P*<0.01。

图6 各组大鼠海马CA1区CD68⁺/Iba1⁺阳性细胞计数比较(免疫荧光双染色, $\bar{x} \pm s$, 4只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of number of CD68⁺/Iba1⁺ positive cells in the hippocampal CA1 region of rats in the 6 groups (immunofluorescence double staining, $\bar{x} \pm s$, 4 rats/group)

3 讨论

脑卒中后学习记忆障碍属于中医“痴呆”“脑髓消”范畴,脑髓空虚是记忆力减退、思维和反应迟钝的主要原因,故本病病位在脑,病机为“脑髓空虚,神机失用”。“神机”是生命活动的物质之“形”和功能之“神”结合而成的内在力量,“形”是“神”存在的

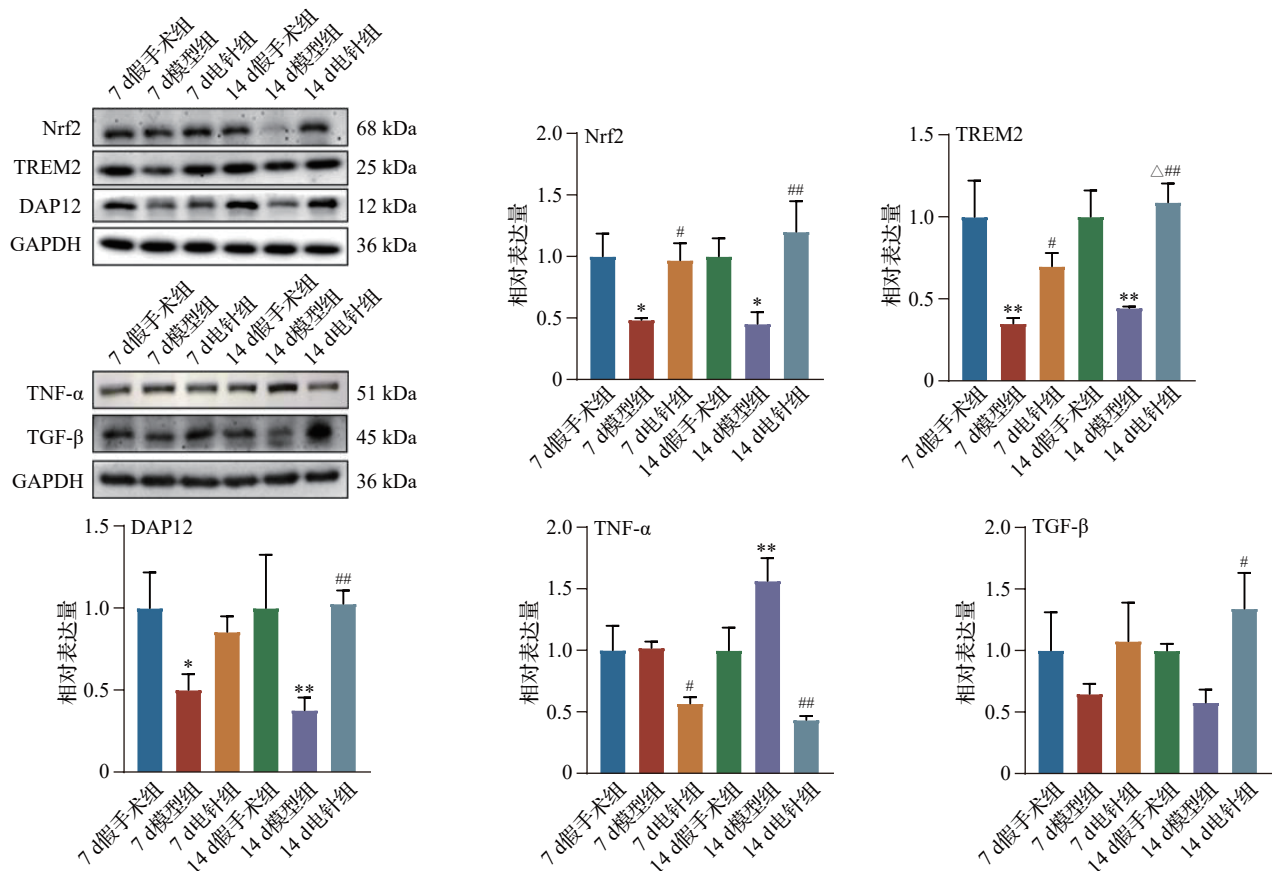


注:CD206为甘露糖受体,Iba1为离子化钙结合适配分子1。A~F分别为7 d假手术组、7 d模型组、7 d电针组、14 d假手术组、14 d模型组、14 d电针组。红色箭头表示CD206⁺/Iba1⁺阳性细胞,标尺=50 μm。与同一时间点模型组比较,##*P*<0.01。

图7 各组大鼠海马CA1区CD206⁺/Iba1⁺阳性细胞计数比较(免疫荧光双染色, $\bar{x} \pm s$, 4只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of number of CD206⁺/Iba1⁺ positive cells in the hippocampal CA1 region of rats in the 6 groups (immunofluorescence double staining, $\bar{x} \pm s$, 4 rats/group)

载体,“神”是“形”的生命体现,神机失用日久则神失内守,形乃大伤^[19]。《类经·针刺类》中强调“无神则形不可活”,认为诊治疾病当候“神”察“形”,形神同调^[19]。“调神通络”针法秉形神同调之精髓,强调益髓以“调神”,导气以“通络”,使髓海得养,神机运转,气血畅调,经络复通^[20]。本研究聚焦脑缺血再灌注后长期神经修复效应,基于前期文献结果^[16],学习记忆障碍的稳定评估需至再灌注后14 d,此时海马神



注: Nrf2为核因子红细胞2相关因子, TREM2为髓细胞触发受体2, DAP12为衔接蛋白DNAX激活蛋白12, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , TGF- β 为转化生长因子- β 。与同一时间点假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同一时间点模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与7 d电针组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图8 各组大鼠海马组织中 Nrf2、TREM2、DAP12、TNF- α 、TGF- β 的蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of relative expression levels of Nrf2, TREM2, DAP12, TNF- α , and TGF- β proteins in the hippocampal tissues of rats in the 6 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

经元重塑与小胶质细胞极化趋于稳定,可客观反映电针的持续干预效果,故选取再灌注后14 d评估认知功能。结果显示,“调神通络”电针干预可明显缩短MACO/R学习记忆障碍模型大鼠的逃避潜伏期,同时增加穿越原平台次数及目标象限停留时间,提示“调神通络”电针对缺血缺氧性脑损伤大鼠的学习记忆能力有改善效果。

海马主宰机体的学习、记忆、空间导航和情绪调节等功能,其中CA1区神经元对缺血缺氧特别敏感,一旦损伤即导致学习记忆障碍^[5]。本研究采用HE染色和尼氏染色观察了海马CA1区神经元结构和尼氏小体形态,发现CIRI发生后该区域神经元受损严重;而电针干预对神经元结构、尼氏小体及锥体细胞的结构和数量均有改善,认为“调神通络”电针促进了海马CA1区神经元修复,从而有效改善PSCI大鼠的神经功能。

小胶质细胞是机体固有免疫的核心效应细胞,

在CNS的炎症反应、免疫和退行性疾病中均发挥重要作用^[21-22]。生理状态下,小胶质细胞具有免疫监视、神经元维持、因子分泌和吞噬及CNS内环境稳态的维持功能^[22-23]。Iba1是由活化的单核细胞和小胶质细胞产生的钙结合肽,在激活时表达量远高于静息状态,被认为是小胶质细胞极化的特异性标志物^[24-25]。病理状态下,大脑血流中断后导致的细胞损伤和死亡会释放损伤相关分子模式使小胶质细胞活化,表现为促炎的M1型和抗炎和M2型,二者相互拮抗。活化后的M1型小胶质细胞分泌CD68、TNF- α 等促炎因子,加重局部炎症反应,进一步加重神经元损伤,引发学习记忆障碍^[26-27];活化后的M2型小胶质细胞则分泌CD206、TGF- β 等抗炎因子减轻炎症反应,促进神经元修复和功能恢复^[28]。研究^[29]表明中药复方能够改善MCAO/R模型大鼠的学习记忆能力并发挥神经保护作用,其机制可能与影响小胶质细胞极化有关。Hu等^[30]的研究显示,

脑缺血后7 d为炎症反应峰值期,14 d进入神经修复期,故本研究选择MCAO/R后7 d和14 d两个时间点进行观察。结果显示,在MCAO/R学习记忆障碍模型大鼠中,海马M1型小胶质细胞CD68⁺/Iba1⁺阳性细胞计数及其分泌的促炎因子TNF- α 蛋白相对表达量均增加,电针干预后有所减少;海马M2型小胶质细胞CD206⁺/Iba1⁺阳性细胞计数及其分泌的TGF- β 蛋白相对表达量未发生明显变化,电针干预后则有所升高。由此推测“调神通络”电针可能通过抑制M1型小胶质细胞极化,促进M2型小胶质细胞极化,抑制局部炎症反应水平,从而减轻神经元损伤程度,改善学习记忆障碍。

Nrf2是一种调节内源性抗氧化转录因子,通过抗氧化和抗炎功能保护细胞免受氧化应激损伤^[31]。上调Nrf2可促进小胶质细胞向M2型极化,抑制氧化应激和神经炎症反应,从而改善MCAO/R模型大鼠的学习记忆障碍^[32]。TREM2是一种单向跨膜免疫反应受体,包含免疫球蛋白感应结构域、跨膜结构域和短胞质尾区,主要在小胶质细胞中表达,参与调控小胶质细胞功能状态的转换^[33]。DAP12是一种跨膜适配器,引发多种信号介质的蛋白酪氨酸磷酸化,可接受上游免疫受体TREM2的信号被激活,介导下游Syk-Pyk2信号通路,该通路可促进 β -catenin的转录和翻译,推动细胞的增殖与存活,最终激活小胶质细胞向M2型极化^[34]。有研究^[35]表明在MCAO/R大鼠模型中,TREM2信号通路的激活可介导小胶质细胞向M2型极化,抑制神经炎症级联反应,促进神经功能修复。Nrf2通过调控TREM2的基因表达,影响小胶质细胞的表型激活^[9]。因此可以推断Nrf2可能通过启动TREM2转录和翻译,激活下游信号分子DAP12,并触发信号级联反应从而调控小胶质细胞表型,进而影响小胶质细胞功能和炎症反应。多项研究^[36-37]表明,激活Nrf2/TREM2通路可抑制促炎因子生成和促进抗炎因子释放,调节局部炎症反应,缓解神经元凋亡,这可能是该通路影响MCAO/R后学习记忆障碍的原因之一。本研究通过Western blot实验证明电针能够升高CIRI后海马组织中下调的Nrf2、TREM2、DAP12蛋白表达,同时抑制神经炎症反应,结合对大鼠学习记忆功能改善的效果,可以推断“调神通络”电针可改善MCAO/R学习记忆障碍大鼠的学习记忆功能,其机制可能与激活海马Nrf2/TREM2信号通路有关。

本研究结果表明,CIRI使PSCI大鼠海马中

Nrf2、TREM2、DAP12、TGF- β 蛋白表达降低,而电针干预可以上调上述蛋白表达,说明“调神通络”电针可调控炎症反应。其中7 d电针升高海马Nrf2、TREM2蛋白表达量,而下调代表M1型极化的CD68⁺/Iba1⁺及促炎因子TNF- α 水平,但尚未显著上调代表M2型极化的CD206⁺/Iba1⁺。表明此时电针作用的核心机制为激活Nrf2介导的抗氧化应激,缓解急性期炎症损伤。14 d电针组显著上调海马Nrf2、TREM2、DAP12蛋白表达,其中TREM2水平较7 d电针组进一步提高,并伴随DAP12同步上调,同时诱导小胶质细胞向M2型极化及促进TGF- β 等修复因子分泌,从而主导神经修复,加速神经元结构重建及认知功能恢复,此时电针作用的核心机制为TREM2-DAP12轴的持续激活。因此,“调神通络”电针疗效的发挥依赖于刺激时间的累积效应,提示干预周期与针刺神经保护效应间存在正相关关系,故建议在临床治疗中可将干预周期适当延长至2~3周,以使神经功能修复效果更优。

综上所述,本研究以MCAO/R后学习记忆障碍大鼠海马小胶质细胞极化为切入点,以海马Nrf2/TREM2信号通路为研究方向,探讨“调神通络”电针干预该模型在不同时间点调控小胶质细胞极化的作用机制。研究结果表明,电针通过时序性激活海马Nrf2/TREM2信号通路,在MCAO/R后不同阶段动态调控小胶质极化,从而有效改善CIRI引起的学习记忆障碍。本研究的局限性:(1)未使用Nrf2抑制剂验证该通路在电针发挥作用中的必要性,未检测DAP12磷酸化等下游信号,未来可结合基因敲除模型深化机制研究;(2)仅聚焦“调神通络”的机制探索,未设普通电针对照组,故无法直接比较其与常规取穴的优劣,在未来的研究中可在参数统一前提下验证不同配穴的效应差异;(3)本研究中Morris水迷宫实验的样本量较小,虽获得了统计学差异,但结果可能存在偏倚,后续研究需扩大样本量以增强结论的可靠性。

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] 中国血管性认知障碍学会. 卒中后认知障碍管理专家共识2021[J]. *中国卒中杂志*, 2021, 16(4): 376-389. Chinese Society of Vascular Cognitive Impairment. Experts consensus on post-stroke cognitive impairment management 2021 (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Stroke*, 2021, 16

- (4): 376-389.
- [3] LI H Q, KE X H, FENG B Y, et al. Research progress on the mechanism and markers of metabolic disorders in the occurrence and development of cognitive dysfunction after ischemic stroke[J]. *Front Endocrinol*, 2025, 16: 1500650.
- [4] KERNAN W N, VIERA A J, BILLINGER S A, et al. Primary care of adult patients after stroke: a scientific statement from the American heart association/American stroke association[J]. *Stroke*, 2021, 52(9): DOI:10.1161/STR.0000000000000382.
- [5] ANAND K S, DHIKAV V. Hippocampus in health and disease: an overview[J]. *Ann Indian Acad Neurol*, 2012, 15(4): 239-246.
- [6] 安阳, 苏刚, 陈玮, 等. 小胶质细胞外泌体对中枢神经系统损伤的保护作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2025, 47(4): 927-934.
- AN Y, SU G, CHEN W, et al. The neuroprotective effects of microglial exosomes on central nervous system injury (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2025, 47(4): 927-934.
- [7] CAI L, FAN Q Y, PANG R, et al. Microglia programmed cell death in neurodegenerative diseases and CNS injury [J]. *Apoptosis*, 2025, 30(1): 446-465.
- [8] 武思晴, 王军, 苗明三, 等. 中药调控 Nrf2 信号通路防治脑缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(13): 286-295.
- WU S Q, WANG J, MIAO M S, et al. Traditional Chinese medicine prevents and treats cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating Nrf2 signaling pathway: a review (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2025, 31(13): 286-295.
- [9] HE L J, ZHENG Y, HUANG L X, et al. Nrf2 regulates the arginase 1 (+) microglia phenotype through the initiation of TREM2 transcription, ameliorating depression-like behavior in mice[J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 459.
- [10] 刘慧慧. 基于 Nrf2-ARE 信号通路研究针刺对血管性认知功能障碍大鼠的神经保护作用机制[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2021.
- LIU H H. Study on the neuroprotective mechanism of acupuncture on rats with vascular cognitive dysfunction based on Nrf2-ARE signal pathway (in Chinese) [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2021.
- [11] 刘翠, 李蕊, 甄巧霞, 等. “通督调神”针刺联合经颅直流电刺激对脑卒中后认知障碍患者神经损伤标志物和事件相关电位 P300 的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24(7): 1244-1247, 1215.
- LIU C, LI R, ZHEN Q X, et al. Effects of “Tongdu Tiaoshen” acupuncture combined with transcranial direct current stimulation on nerve injury markers and event-related potential P300 in patients with post-stroke cognitive impairment (in Chinese) [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2024, 24(7): 1244-1247, 1215.
- [12] 《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.
- [13] MORRIS G P, WRIGHT A L, TAN R P, et al. A comparative study of variables influencing ischemic injury in the longa and Koizumi methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148503.
- [14] ONUFRIEV M V, MOISEEVA Y V, ZHANINA M Y, et al. A comparative study of Koizumi and Longa methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in rats: early corticosterone and inflammatory response in the hippocampus and frontal cortex [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13544.
- [15] 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.
- [16] SHI G, FENG J, JIAN L Y, et al. DNA hypomethylation promotes learning and memory recovery in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(4): 863-868.
- [17] 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 Acupuncture and Moxibustion Society. Nomenclature and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [18] CHEN J, SANBERG P R, LI Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(11): 2682-2688.
- [19] 王雅惠, 王丽平, 陆梦馨, 等. 基于“形神同调”理论浅析手足十二针在中风病治疗中的临床应用 [J]. *中医杂志*, 2022, 63(4): 327-331.
- WANG Y H, WANG L P, LU M X, et al. Clinical application of hand-foot twelve needles in the treatment of stroke based on the theory of “harmonizing of body and spirit” (in Chinese) [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 63(4): 327-331.
- [20] 李凯煜, 陈怡然, 马铁明, 等. “调神通络”针法治疗急性缺血性脑卒中肢体运动功能障碍理论探析 [J]. *中医药学报*, 2023, 51(10): 54-57.
- LI K Y, CHEN Y R, MA T M, et al. Theoretical analysis of spirit-regulating and collateral-unblocking acupuncture method in the treatment of limb motor dysfunction in acute ischemic stroke (in Chinese) [J]. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2023, 51(10): 54-57.
- [21] GINHOUX F, LIM S, HOEFFEL G, et al. Origin and differentiation of microglia [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 45.
- [22] LONG Y, LI X Q, DENG J, et al. Modulating the

- polarization phenotype of microglia - a valuable strategy for central nervous system diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 93: 102160.
- [23] SALTER M W, STEVENS B. Microglia emerge as central players in brain disease [J]. *Nat Med*, 2017, 23(9): 1018-1027.
- [24] SASAKI Y, OHSAWA K, KANAZAWA H, et al. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286(2): 292-297.
- [25] ZHENG X Y, HU F, CHEN X Y, et al. Role of microglia polarization induced by glucose metabolism disorder in the cognitive impairment of mice from PM2.5 exposure [J]. *Sci Total Environ*, 2024, 954: 176603.
- [26] TIAN L, TANG P Y, LIU J N, et al. Microglial gp91phox-mediated neuroinflammation and ferroptosis contributes to learning and memory deficits in rotenone-treated mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 220: 56-66.
- [27] KAUR M, SHARMA S. Molecular mechanisms of cognitive impairment associated with stroke [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(2): 279-287.
- [28] GUO S R, WANG H, YIN Y F. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 815347.
- [29] 刘吉勇, 张文丽, 廖君, 等. 脑泰方对脑缺血再灌注损伤小胶质细胞极化及胶质瘢痕的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(4): 989-999.
- LIU J Y, ZHANG W L, LIAO J, et al. Effect of Naotai Fang on microglial polarization and glial scar following cerebral ischemia reperfusion injury (in Chinese) [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2024, 49(4): 989-999.
- [30] HU X M, LI P Y, GUO Y L, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2012, 43(11): 3063-3070.
- [31] GAO L W, GUO X, LIU S, et al. DL-3-n-butylphthalide imparts neuroprotection via Nrf2/SIRT3 pathway in a mouse model of vascular dementia [J]. *Brain Res*, 2022, 1779: 147785.
- [32] 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.
- [33] AZZOLINI F, GILIO L, PAVONE L, et al. Neuroinflammation is associated with GFAP and sTREM2 levels in multiple sclerosis [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 222.
- [34] ZHENG J Y, PANG R K, YE J H, et al. Huang-Lian-Jie-Du decoction alleviates cognitive impairment in high-fat diet-induced obese mice via Trem2/Dap12/Syk pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156248.
- [35] MA W Y, WANG S S, WU Q L, et al. The versatile role of TREM2 in regulating of microglia fate in the ischemic stroke [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 109: 108733.
- [36] YANG S, QIN C, CHEN M, et al. TREM2-IGF1 mediated glucometabolic enhancement underlies microglial neuroprotective properties during ischemic stroke [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(10): 2305614.
- [37] WANG H X, MA J L, LI X L, et al. FDA compound library screening Baicalin upregulates TREM2 for the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 969: 176427.

收稿日期:2025-06-16 修回日期:2025-09-10