

☆ 机制探讨 ☆

针刺提高大脑中动脉闭塞大鼠患侧软脑膜侧支
代偿效能减轻皮层M5区神经元损伤淡晓芸¹, 李一阳¹, 席锦泽¹, 刘倩倩¹, 李辰蒙¹, 谢小男², 倪光夏^{1,3}

(¹南京中医药大学针灸推拿学院·养生康复学院, 南京 210023; ²南京中医药大学附属南京中医院, 南京 210022; ³南京中医药大学针药结合教育部重点实验室, 南京 210023)

【摘要】目的:观察右侧大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠患侧软脑膜侧支(LMC)循环的动态代偿特征,并基于此探讨针刺干预对患侧LMC代偿效能与皮层M5区神经元功能的影响;通过探究患侧LMC代偿的时序性规律,进一步明确针刺调节患侧LMC代偿效能对皮层M5区神经元产生的神经保护作用。方法:本研究分为2个部分。第1部分:随机选取4只SD雄性大鼠,采用改良Longa线栓法制备右侧MCAO模型,造模成功后采用激光散斑血流成像仪监测缺血前、缺血即刻、缺血3h、缺血12h患侧LMC与皮层M5区血流灌注量;第2部分:将90只大鼠随机分为假手术组、模型组、假针刺组、针刺组、丁苯酞组,每组18只。采用改良Longa线栓法制备右侧MCAO模型。针刺组予双侧“内关”和“水沟”针刺1次,留针30min;假针刺组予非穴针刺1次,留针30min;丁苯酞组经尾静脉注射丁苯酞注射液(2.25mg/kg)1次。激光散斑血流成像仪监测缺血前、缺血即刻、缺血12h患侧LMC、皮层M5区血流灌注量及LMC血管直径变化;改良神经功能缺损评分(mNSS)评定神经功能;大鼠抓力测试仪检测大鼠左侧上肢抓力;TTC染色法检测脑梗死体积百分比;透射电子显微镜观察患侧皮层M5区神经元和线粒体超微结构;免疫荧光染色法检测患侧皮层M5区神经核蛋白(NeuN)阳性表达;比色法检测患侧皮层三磷酸腺苷(ATP)含量。结果:与缺血前比较,缺血即刻大鼠患侧LMC及皮层M5区血流灌注量降低($P<0.01$);与缺血即刻比较,缺血3h患侧LMC及皮层M5区血流灌注量均升高($P<0.01$, $P<0.05$)。在缺血即刻,与假手术组比较,各组大鼠患侧LMC、皮层M5区血流灌注量与基线的比值降低($P<0.01$)。在缺血12h,与假手术组比较,模型组大鼠患侧LMC、皮层M5区血流灌注量与基线的比值降低($P<0.01$),mNSS升高($P<0.01$),左侧上肢抓力降低($P<0.01$),脑梗死体积百分比升高($P<0.01$),患侧皮层M5区神经元和线粒体超微结构损伤程度较重,患侧皮层M5区NeuN阳性表达和ATP含量下降($P<0.01$);与模型组比较,针刺组和丁苯酞组大鼠患侧LMC和皮层M5区血流灌注量与基线的比值升高($P<0.01$),患侧LMC管径增大($P<0.01$),mNSS评分降低($P<0.01$),左侧上肢抓力升高($P<0.01$),脑梗死体积百分比降低($P<0.05$),患侧皮层M5区神经元和线粒体超微结构损伤程度较轻,患侧皮层M5区NeuN阳性表达和ATP含量升高($P<0.01$);与假针刺组比较,针刺组大鼠患侧皮层M5区血流灌注量比值升高($P<0.01$),患侧LMC管径增大($P<0.01$),mNSS降低($P<0.01$),左侧上肢抓力升高($P<0.01$),患侧皮层M5区神经元和线粒体超微结构损伤程度较轻,患侧皮层M5区NeuN阳性表达和ATP含量升高($P<0.01$)。结论:MCAO大鼠患侧LMC代偿效能于缺血3h通过血流再分配增强,于缺血12h代偿效能衰减;针刺可通过提高患侧LMC代偿效能,改善皮层M5区血流灌注量,优化神经元线粒体结构与功能稳态,从而实现神经保护作用。

【关键词】 急性缺血性脑卒中;针刺;软脑膜侧支;神经元

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250342

引用格式:淡晓芸,李一阳,席锦泽,等.针刺提高大脑中动脉闭塞大鼠患侧软脑膜侧支代偿效能减轻皮层M5区神经元损伤[J].针刺研究,2026,51(4):405-414.

项目来源:国家自然科学基金面上项目(No.82274639,82474624)

共同通信作者:倪光夏,E-mail:xgn66@163.com

李一阳,E-mail:YiyangLi@njucm.edu.cn

Acupuncture improves leptomeningeal collateral compensatory efficiency in the affected hemisphere and reduces neuronal damage in cortical M5 region in rats with middle cerebral artery occlusion

DAN Xiao-yun¹, LI Yi-yang¹, XI Jin-ze¹, LIU Qian-qian¹, LI Chen-meng¹, XIE Xiao-nan², NI Guang-xia^{1,3} (¹College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, College of Health and Rehabilitation, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; ²Nanjing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210022; ³Key Laboratory of Acupuncture and Medicine of Ministry of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

[ABSTRACT] Objective To observe the dynamic compensatory characteristics of the leptomeningeal collateral (LMC) circulation in the affected hemisphere of rats with right middle cerebral artery occlusion (MCAO), and to investigate the effects of acupuncture on LMC compensatory efficiency and neuronal function in the cortical M5 region. Additionally, to elucidate the neuroprotective mechanism of acupuncture by exploring the temporal pattern of LMC compensation. **Methods** This study was divided into 2 parts. Part 1: 4 male SD rats were randomly selected for monitoring blood perfusion in the affected LMC and cortical M5 region before ischemia, immediately after ischemia, 3 h and 12 h post-ischemia using laser speckle contrast imaging. Part 2: 90 male SD rats were randomly divided into sham operation, model, sham acupuncture, acupuncture, and butylphthalide groups, with 18 rats in each group. Three hours after modeling, acupuncture was applied to bilateral “Neiguan” (PC6) and “Shuigou” (GV26) or non-acupoints (3 mm below the starting point of bilateral axillary midline and 3 mm beside the apex of coccyx) for 30 min. In the butylphthalide group, butylphthalide injection (2.25 mg/kg) was injected into the tail vein once 3 h after successful modeling. Laser speckle blood flow imaging was used to monitor the changes of blood flow perfusion and LMC vascular diameter in LMC and cortical M5 region at different time points before ischemia, immediately after ischemia and 12 h after ischemia. The percentage of cerebral infarction volume was detected by TTC staining. Modified neuropathy symptom score (mNSS) was used to evaluate neurological function. The grip strength of the contralateral upper limb of the rat was detected by the rat grip tester. The ultrastructure of neurons and mitochondria in the M5 region of the affected cortex was observed by transmission electron microscopy. The positive expression of neuronal nuclear protein (NeuN) in the M5 region of the affected cortex was detected by immunofluorescence staining. The content of adenosine triphosphate (ATP) in the cortex of the affected side was detected by colorimetry. **Results** Compared with the pre-ischemia state, the blood perfusion in the affected LMC and cortical M5 region were decreased immediately after ischemia ($P<0.01$). Compared with the immediate ischemia state, the blood perfusion was increased at 3 h post-ischemia ($P<0.01$, $P<0.05$). Immediately after ischemia, compared with the sham operation group, the ratio of blood perfusion compared to the baseline level of LMC and cortical M5 in all groups was decreased ($P<0.01$). At 12 h post-ischemia, the ratio of blood perfusion compared to the baseline level in the LMC and M5 region, and the grip strength of the contralateral upper limb were decreased ($P<0.01$) in the model group, while the mNSS score and the percentage of cerebral infarction volume were increased ($P<0.01$). The ultrastructure of neurons and mitochondria in the M5 region of the affected cortex was seriously damaged, and the positive expression of NeuN and the content of ATP in the M5 region were decreased ($P<0.01$). At 12 h post-ischemia and compared with the model group, the LMC and M5 perfusion ratio, grip strength and the NeuN positive expression and ATP content in the M5 region were significantly increased ($P<0.01$) in the acupuncture and butylphthalide groups, rather than in the sham acupuncture group, whereas the mNSS score and the percentage of cerebral infarction volume were decreased ($P<0.01$, $P<0.05$) in the acupuncture and butylphthalide groups, rather than in the sham acupuncture group. Meanwhile, the ultrastructural damage of neurons and mitochondria was milder in both acupuncture and butylphthalide groups. **Conclusion** The compensatory efficacy of the affected LMC in MCAO rats increases through blood flow redistribution at 3 h after ischemia, but declines at 12 h. Acupuncture can enhance the LMC compensatory efficiency, improve cortical M5 blood perfusion, and optimize mitochondrial structure and functional homeostasis, thereby exerting neuroprotective effects.

[KEYWORDS] Acute ischemic stroke; Acupuncture; Leptomeningeal collateral; Neuron

急性缺血性脑卒中(AIS)是脑卒中最常见的类型,占全部脑卒中的80%以上^[1-2]。当AIS发生后,

脑动脉系统通过激活内源性侧支代偿机制以维持脑组织灌注。其中,大脑动脉环(Willis环)主要通

过前交通动脉和后交通动脉介导脑底部血流代偿,但其对大脑皮层微循环的维持作用有限^[3]。而新生血管驱动的侧支循环通常需在缺血后3~7 d才能形成,其临床代偿效能仍存争议^[4]。相比之下,软脑膜侧支(LMC)作为连接大脑中动脉(MCA)末端分支与大脑前动脉(ACA)末端分支的吻合血管,通过血管舒张和跨血管压力梯度募集ACA血流,并向MCA末端M5段血管流域内的脑皮层区(皮层M5区)逆向灌注,实现对皮层M5区的动态代偿^[5-7]。研究显示,区域软脑膜侧支评分较低的AIS患者接受血管内治疗的成功再灌注率较低,更易出现梗死核心区扩大、神经功能恢复不良等状况^[8-9]。这表明LMC的循环状态是决定AIS患者临床预后的主要因素。因此,LMC被认为是改善AIS患者侧支循环代偿的潜在治疗靶点^[10]。

针刺可促进AIS患者的神经功能恢复,其通过增加脑组织的血液供应、减轻炎症反应、抑制铁死亡、保护血脑屏障等多途径发挥脑保护作用^[11-13]。但针刺是否通过调控患侧LMC的代偿效能发挥神经保护作用仍需进一步证实。基于此,本研究通过针刺干预大脑中动脉闭塞(MCAO)模型大鼠,基于LMC的代偿效能探讨针刺治疗AIS的作用机制,为针刺治疗AIS提供新的研究基础和依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康雄性SPF级SD大鼠94只,体质量230~270 g,由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(浙)2024-0001。大鼠饲养于南京中医药大学实验动物中心,12 h/12 h明暗交替环境,温度20~22℃,相对湿度40%~50%,自由摄食饮水,适应性喂养3 d。随机挑选4只大鼠用于模型建立后观察LMC与皮层M5区血流灌注量的变化。其余90只大鼠随机分为假手术组、模型组、假针刺组、针刺组、丁苯酞组,每组18只。实验通过南京中医药大学实验动物伦理委员会审查(伦理批号:202502A070)。

1.2 主要仪器与试剂

华佗牌一次性无菌针灸针(0.18 mm×13 mm,苏州医疗用品厂),电子天平(上海菁海),-80℃超低温冰箱(青岛海尔),高速冷冻离心机(德国Eppendorf),多通道小动物麻醉机、激光散斑血流成像仪(深圳瑞沃德),全自动组织包埋装置(日本Sakura),多功能酶标仪(美国Biotek),大鼠抓力测

试仪(上海欣软),冷冻切片机,SP8激光共聚焦显微镜(德国Leica),透射电子显微镜(日本JEOL),Image J图像分析软件(美国NIH)。氯化三苯基四氮唑(TTC,美国Sigma),丁苯酞氯化钠注射液(石药集团),异氟烷(深圳沃瑞德),比色法三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒(上海碧云天),神经元核蛋白(NeuN)一抗、荧光素标记的二抗(英国Abcam)。

1.3 模型复制方法

采用改良Longa线栓法制备右侧MCAO模型^[14]。造模大鼠吸入5%异氟烷诱导麻醉,3%维持麻醉后仰卧位固定备皮,常规消毒。颈部作正中切口,分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉。于颈外动脉远心端穿两条细线并打结,于两结中间剪断颈外动脉,夹闭颈内动脉、颈总动脉。在颈外动脉残端剪一小口,将直径为0.26 mm线栓插入颈外动脉,调整角度使线栓沿颈内动脉至大脑中动脉,插入深度约为2 cm,缝合切口。造模成功标准:造模结束即刻(缺血即刻)采用激光散斑血流成像仪监测各组大鼠右侧大脑皮层血流灌注量。进栓后脑血流灌注量骤降基线(缺血前)的30%以上提示模型制备成功^[12,15]。见图1。假手术组:只暴露颈部动脉,结扎颈外动脉,不予插入线栓。

1.4 干预方法

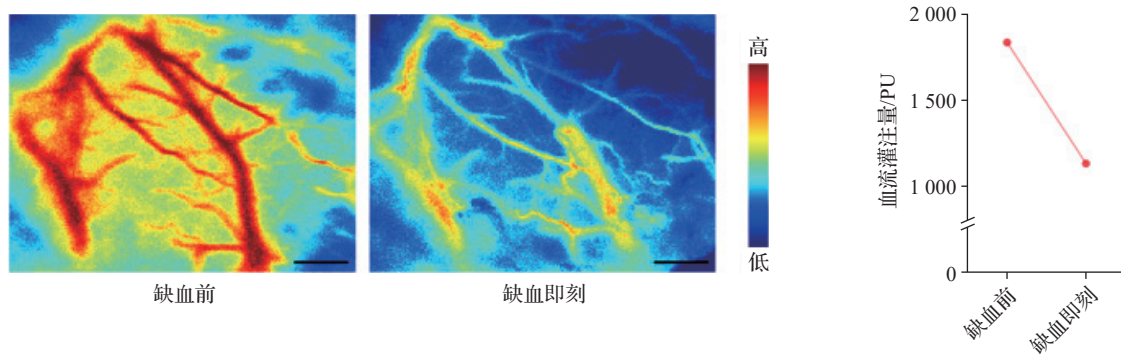
假针刺组:造模成功后3 h给予假针刺。根据课题组前期研究,选取非穴点(双侧腋中线起点下3 mm处及尾骨尖旁开3 mm处)针刺^[16]。大鼠吸入5%异氟烷诱导麻醉,3%维持麻醉后仰卧位固定,于非穴点常规消毒。选用华佗牌针灸针(0.18 mm×13 mm)进行1次针刺。3个针刺点均直刺约3 mm,行提插、捻转泻法各1 min,留针30 min。

针刺组:造模成功后3 h给予针刺。选取“醒脑开窍”针刺法的主穴“内关”(双侧)及“水沟”,根据文献^[17]定位。大鼠吸入5%异氟烷诱导麻醉,3%维持麻醉后仰卧位固定,穴位常规消毒,选用华佗牌针灸针(0.18 mm×13 mm)行针刺1次。“水沟”向鼻中隔方向斜刺2~3 mm,采用雀啄手法行针1 min,留针30 min;“内关”直刺3 mm,行提插、捻转泻法各1 min,留针30 min。

丁苯酞组:造模成功后3 h经尾静脉注射丁苯酞注射液(2.25 mg/kg)^[18]1次,30 min内推注完毕。其余组注射等量0.9%氯化钠溶液。

1.5 观察指标及检测方法

采用激光散斑血流成像仪监测大鼠患侧LMC与皮层M5区血流灌注量:每组取4只大鼠吸入5%



注:标尺=1 mm。

图1 造模大鼠缺血前与缺血即刻右脑皮层血流灌注量比较(激光散斑血流成像)

Fig. 1 Comparison of the changes in blood perfusion volume of the right cerebral cortex before and immediately after ischemia in model rats (laser speckle blood flow imaging)

异氟烷诱导麻醉,3%浓度维持麻醉后俯卧位固定备皮,常规消毒后头部作正中切开暴露颅骨。在距矢状缝右侧旁开1 mm、冠状缝下旁开1 mm处用颅钻打磨出12 mm×6 mm的颅窗。以颅窗中线中点旁开1 mm处作一短轴约2 mm、长轴约4 mm的椭圆形感兴趣区域(ROI),在此区域内测量皮层M5区血流灌注量。根据LMC的定位作长方形ROI测量其血流灌注量与管径。将镜头对准术部颅窗,调整焦距,在相同伪彩值和固定ROI面积下观察。模型组内比较选取缺血前、缺血即刻、缺血3 h、缺血12 h为观察时间点;各组间比较选取缺血前、缺血即刻、缺血12 h为观察时间点。每只大鼠选取两支LMC进行统计。组间比较时,以缺血前的血流灌注量、管径值作为基线,通过比较缺血12 h的血流灌注量、管径值与其基线的比值观察疗效。

参照改良神经功能缺损评分(mNSS)^[19]对缺血12 h的大鼠神经功能进行评定:每组8只大鼠于缺血12 h后进行提尾实验(0~3分)、行走测试(0~3分)、感觉测试(0~2分)、平衡木实验(0~6分)、反射缺失测试(0~4分)。将以上各项评分相加得到总评分,0分表示无神经功能损伤,1~6分表示轻度神经功能损伤,7~12分表示中度神经功能损伤,13~18分表示重度神经功能损伤。

采用大鼠抓力测试仪检测大鼠左侧上肢抓力:每组4只大鼠放置于抓力板上,待大鼠用力抓住抓力板时,握住其尾部匀速加力后拉,获取相应的抓力数值。于缺血12 h后对大鼠进行抓力测定,每只测量3次,计算平均值,即为该大鼠的抓力。

TTC染色法检测大鼠脑梗死体积:每组3只大鼠于缺血12 h后,采用2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)腹腔注射麻醉后断头取全脑,将大脑放入

-20℃冰箱冰冻15 min取出,自额极后2 mm处向后连续等距切取6张冠状切片,片厚2 mm。切片置于2% TTC溶液中37℃孵育6 min后进行拍照统计。白色区域为梗死组织,红色区域为正常脑组织。拍照后应用Image J图像分析软件计算脑梗死体积。脑梗死体积百分比(%)=梗死体积÷全脑体积×100%。

透射电镜观察大鼠患侧皮层M5区神经元和线粒体超微结构:于缺血12 h后麻醉大鼠,用4%多聚甲醛心脏灌注,断头取脑。取下右脑中线中点旁开2 mm处的皮层组织,快速置入2.5%戊二醛中固定,经丙酮脱水及渗透后包埋于618环氧树脂,使用超薄切片机制备60~90 nm切片,醋酸铀酰、柠檬酸铅依次染色,最后于透射电子显微镜下观察神经元和线粒体的超微结构。

免疫荧光染色法检测大鼠患侧皮层M5区NeuN阳性表达:每组3只大鼠于缺血12 h后深度麻醉,用4%多聚甲醛心脏灌注,断头取脑,4%多聚甲醛固定48 h后脱水、OTC包埋、切片(厚度8 μm)。用含山羊血清、0.3% TritonX-100的PBS溶液封闭1 h,然后加入NeuN一抗(稀释比例1:400)4℃孵育过夜。用PBST洗涤后加入二抗(1:500)孵育2 h, PBST洗片后滴加含抗荧光淬灭剂的DAPI染核,封片。用Leica SP8激光共聚焦显微镜观察并采集图像,以Image J软件分析图片,计算NeuN阳性细胞百分比。NeuN阳性细胞百分比(%)=NeuN阳性细胞数÷DAPI阳性细胞数×100%。

比色法检测大鼠患侧皮层M5区ATP含量:每组3只大鼠于缺血12 h后麻醉,断头取脑,在右脑中点旁开2 mm处取50 mg皮层组织。使用电动研磨仪研磨组织,按照说明书进行离心,取上清

液待测。按照说明书步骤配置ATP检测试剂,并加入待测样本。使用多功能酶标仪测定吸光度值,再根据ATP标准曲线计算样本ATP含量。

1.6 统计学处理

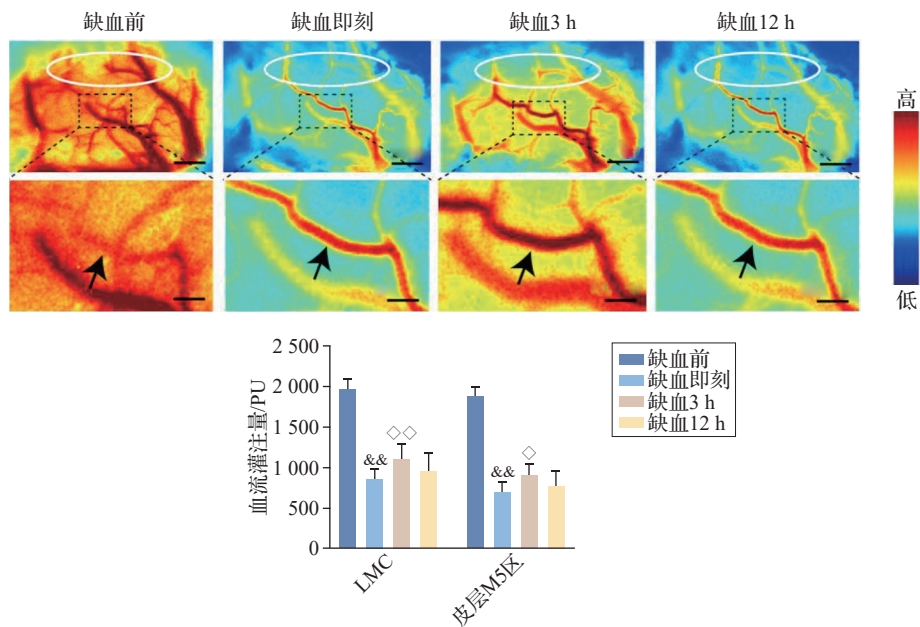
使用SPSS23.0软件进行数据分析,采用GraphPad Prism 9进行统计图绘制。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较使用配对样本 t 检验,组间比较使用单因素方差分析,进一步两两比较使用Bonferroni检验,若方差不齐则用Games-Howell检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的

标准。

2 结果

2.1 各时间点造模大鼠患侧LMC和皮层M5区血流灌注量比较

与缺血前比较,缺血即刻患侧LMC和皮层M5区血流灌注量均骤降($P < 0.01$);与缺血即刻比较,缺血3h患侧LMC和皮层M5区血流灌注量均升高($P < 0.01, P < 0.05$),而缺血12h患侧LMC和皮层M5区血流灌注量差异无统计学意义。见图2。



注:LMC为软脑膜侧支。下排图片为上排图片框选处放大图,上排标尺=1 mm,下排标尺=0.5 mm。白色椭圆框选区域为皮层M5区,黑色箭头示LMC。与缺血前比较, $\&\&P < 0.01$;与缺血即刻比较, $\diamond P < 0.05, \diamond P < 0.01$ 。

图2 各时间点造模大鼠患侧LMC和皮层M5区血流灌注量比较(激光散斑血流成像, $\bar{x} \pm s, 4$ 只鼠)

Fig. 2 Comparison of blood perfusion volumes in the affected LMC and cortical M5 region of modeling rats at different time points (laser speckle blood flow imaging, $\bar{x} \pm s, 4$ rats)

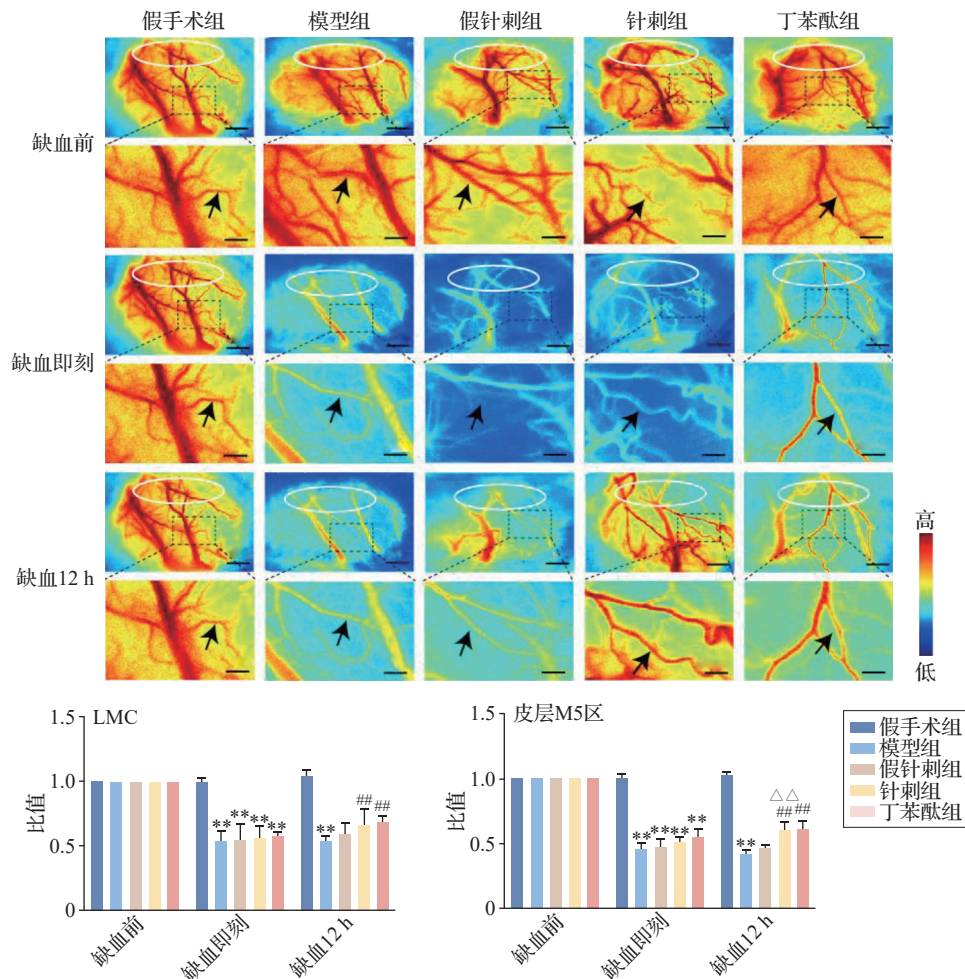
2.2 各组大鼠各时间点患侧LMC与皮层M5区血流灌注量比较

根据上述结果,本研究选择LMC代偿功能显著衰减的缺血12h作为各组对比观察的时间点。在缺血即刻,与假手术组比较,各组大鼠患侧LMC、皮层M5区血流灌注量与基线的比值均降低($P < 0.01$)。在缺血12h,与假手术组比较,模型组大鼠患侧LMC、皮层M5区血流灌注量与基线的比值均降低($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组和丁苯酞组大鼠患侧LMC、皮层M5区血流灌注量与基线的比值均升高($P < 0.01$),假针刺组大鼠患侧LMC、皮层M5区血流灌注量与基线的比值差异均无统计学意义;与假针刺组比较,针刺组大鼠患侧

皮层M5区血流灌注量与基线的比值升高($P < 0.01$);针刺组与丁苯酞组比较差异无统计学意义。见图3。

2.3 各组大鼠患侧LMC管径比较

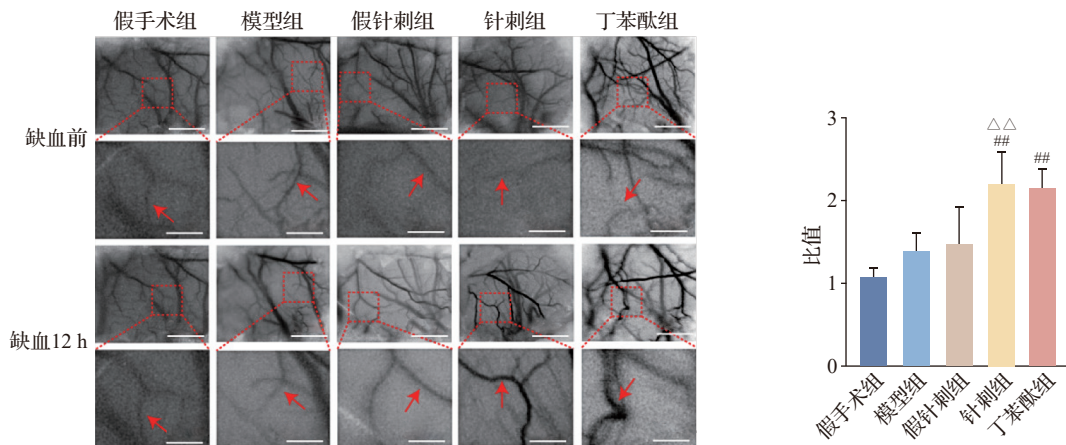
与假手术组比较,模型组大鼠患侧LMC缺血12h管径与基线(缺血前管径)的比值差异无统计学意义;与模型组比较,针刺组和丁苯酞组大鼠患侧LMC缺血12h管径与基线的比值均升高($P < 0.01$),假针刺组大鼠患侧LMC缺血12h管径与基线的比值差异无统计学意义;与假针刺组比较,针刺组大鼠患侧LMC缺血12h管径与基线的比值升高($P < 0.01$);针刺组与丁苯酞组比较差异无统计学意义。见图4。



注:LMC为软脑膜侧支。下排图片为上排图片框选处放大图,上排标尺=1 mm,下排标尺=0.5 mm。白色椭圆框选区域为皮质M5区,黑色箭头示 LMC。与同时点假手术组比较, ** $P < 0.01$;与同时点模型组比较, ## $P < 0.01$;与同时点假针刺组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠各时点患侧 LMC 和皮质 M5 区血流灌注量比较(激光散斑血流成像, $\bar{x} \pm s$, 4 只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of blood perfusion volume in the affected LMC and cortical M5 area at different time points of rats in the 5 groups (laser speckle blood flow imaging, $\bar{x} \pm s$, 4 rats/group)



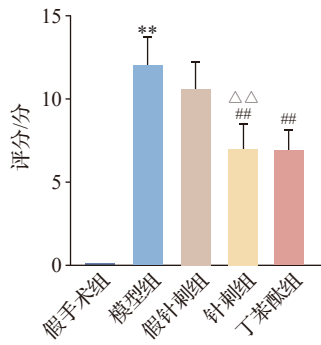
注:LMC为软脑膜侧支。下排图片为上排图片框选处放大图,上排标尺=2 mm,下排标尺=0.5 mm。红色箭头示 LMC。与模型组比较, ## $P < 0.01$;与假针刺组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠患侧 LMC 管径比较(激光散斑血流成像, $\bar{x} \pm s$, 4 只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of LMC diameters on the affected side of rats in the 5 groups (laser speckle blood flow imaging, $\bar{x} \pm s$, 4 rats/group)

2.4 各组大鼠mNSS比较

与假手术组比较,模型组 mNSS 升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组和丁苯酞组 mNSS 均降低 ($P < 0.01$),假针刺组差异无统计学意义;与假针刺组比较,针刺组 mNSS 降低 ($P < 0.01$);针刺组与丁苯酞组比较差异无统计学意义。见图5。



注:mNSS为神经功能缺损评分。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,### $P < 0.01$;与假针刺组比较,ΔΔ $P < 0.01$ 。

图5 各组大鼠mNSS比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

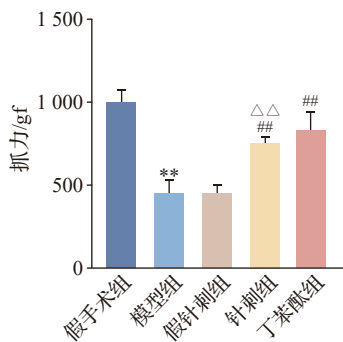
Fig. 5 Comparison of mNSS of rats in the 5 groups ($\bar{x} \pm s$, 8 rats/group)

2.5 各组大鼠左侧上肢抓力比较

与假手术组比较,模型组大鼠左侧上肢抓力降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组和丁苯酞组大鼠左侧上肢抓力均提高 ($P < 0.01$),假针刺组大鼠左侧上肢抓力差异无统计学意义;与假针刺组比较,针刺组大鼠左侧上肢抓力提高 ($P < 0.01$);针刺组与丁苯酞组比较差异无统计学意义。见图6。

2.6 各组大鼠脑梗死体积比较

与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死体积百分



注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与假针刺组比较,ΔΔ $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠左侧上肢抓力比较($\bar{x} \pm s$, 4只鼠/组)

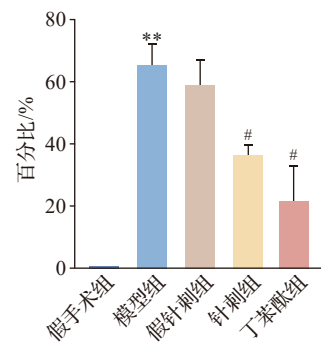
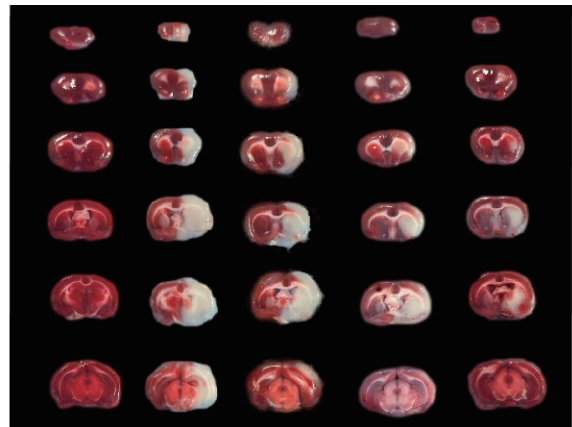
Fig. 6 Comparison of grip strength of the left upper limb of rats in the 5 groups ($\bar{x} \pm s$, 4 rats/group)

比升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组和丁苯酞组大鼠脑梗死体积百分比降低 ($P < 0.05$),假针刺组大鼠脑梗死体积百分比差异无统计学意义;与假针刺组和丁苯酞组比较,针刺组大鼠脑梗死体积百分比差异无统计学意义。见图7。

2.7 各组大鼠患侧皮层M5区神经元和线粒体超微结构比较

假手术组大鼠患侧皮层M5区神经元结构相对正常,膜完整,胞质均匀;细胞核呈圆形,核膜完整,染色质均匀;核仁中央较大,结构致密;神经元内线粒体呈杆状,线粒体膜与嵴结构完整。与假手术相比,模型组神经元损伤相对严重,整体呈坏死、崩解状态,胞膜不完整,胞内基质大面积溶解;细胞核呈不规则形固缩,核膜崩解;神经元内线粒体重度肿胀,嵴基本消失,基质透明化,呈空泡状改变。与模型组相比,针刺组和丁苯酞组神经元轻度损伤,胞膜相对完整,胞内基质略丰富;细胞核呈不规则形,核膜破损;神经元内线粒体轻度肿胀,嵴结构紊乱,部分呈空泡状

假手术组 模型组 假针刺组 针刺组 丁苯酞组



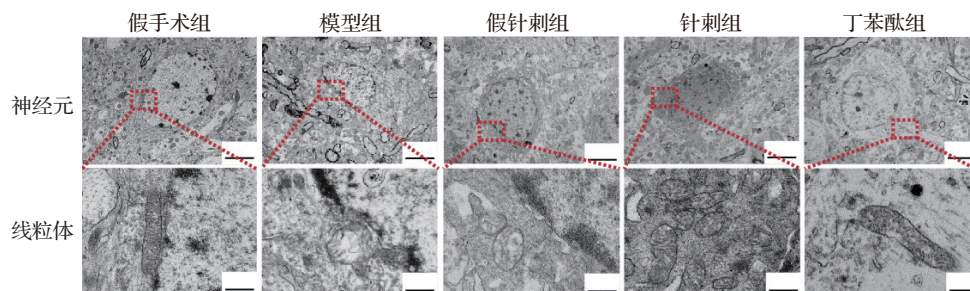
注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

图7 各组大鼠脑梗死体积比较 (TTC染色, $\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of cerebral infarction volume of rats in the 5 groups (TTC staining, $\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

改变。与模型组比较,假针刺组神经元和线粒体结构无明显改善。与假针刺组相比,针刺组

神经元损伤程度较轻,线粒体嵴结构相对致密。见图8。



注:下排图片为上排图片框选处放大图。上排标尺=4 μm,下排标尺=500 nm。
图8 各组大鼠患侧皮层 M5 区神经元和线粒体的超微结构比较(透射电子显微镜)

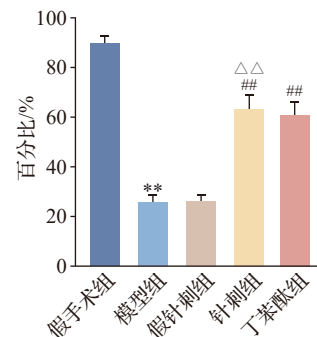
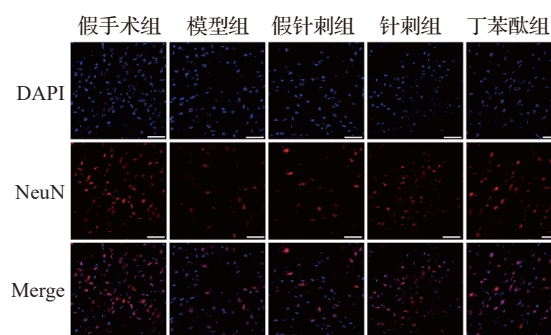
Fig. 8 Comparison of the ultrastructure of neurons and mitochondria in the M5 region of the affected cortex of rats in the 5 groups (transmission electron microscopy)

2.8 各组大鼠患侧皮层 M5 区 NeuN 阳性表达比较

与假手术组比较,模型组大鼠患侧皮层 M5 区 NeuN 阳性细胞百分比降低($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组和丁苯酞组患侧皮层 M5 区 NeuN 阳性细胞百分比均升高($P < 0.01$),假针刺组患侧皮层 M5 区 NeuN 阳性细胞百分比差异无统计学意义;与假针刺组比较,针刺组患侧皮层 M5 区 NeuN 阳性细胞百分比升高($P < 0.01$);针刺组与丁苯酞组比较差异无统计学意义。见图9。

2.9 各组大鼠患侧皮层 M5 区 ATP 含量比较

与假手术组比较,模型组大鼠患侧皮层 M5 区 ATP 含量降低($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组和丁苯酞组患侧皮层 M5 区 ATP 含量均升高($P < 0.01$),假针刺组患侧皮层 M5 区 ATP 含量差异无统计学意义;与假针刺组比较,针刺组患侧皮层 M5 区 ATP 含量升高($P < 0.01$);针刺组与丁苯酞组比较差异无统计学意义。见图10。



注:NeuN为神经元核蛋白。标尺=50 μm。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与假针刺组比较,ΔΔ $P < 0.01$ 。

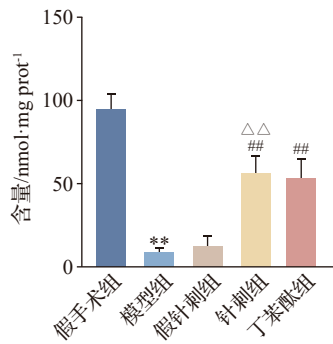
图9 各组大鼠患侧皮层 M5 区 NeuN 阳性表达比较 (免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 9 Comparison of positive expression of NeuN in the M5 region of the affected cortex of rats in the 5 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

3 讨论

侧支循环状态是影响 AIS 患者病理进程及临床预后的主要因素,而 LMC 作为缺血急性期主要的内源性侧支代偿途径,通过维持患侧皮层 M5 区微循环灌注,有效保护了该区神经元活性^[20]。皮层 M5 区主要对应躯体运动与感觉功能分区^[21],因此该区血流动力的重建对 AIS 患者的神经功能恢复具有重要意义。然而,LMC 代偿效能的时序性规律尚未被系统阐明,这限制了针对 LMC 精准干预策略的制定。本研究结果显示,患侧 LMC 与皮层 M5 区血流灌注量具有同步变化趋势,表明皮层 M5 区血

流动力学稳态可能直接受到 LMC 代偿性调控。两者均在缺血后 3 h 呈现代偿性升高,在缺血后 12 h 同步下降至缺血即刻水平,这一现象提示 LMC 代偿效能可能于缺血即刻至缺血 3 h 期间逐渐增强,达到峰值后呈时间依赖性衰减趋势。基于此,本研究选择 LMC 代偿功能显著衰减的缺血 12 h 作为关键



注:ATP为三磷酸腺苷。与假手术组比较,** $P < 0.01$;
与模型组比较,## $P < 0.01$;与假针刺组比较,△△ $P < 0.01$ 。

图 10 各组大鼠患侧皮层 M5 区 ATP 含量比较
($\bar{x} \pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 10 Comparison of ATP content in the M5 region of the affected cortex of rats in the 5 groups
($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

观察节点,以验证针刺对 LMC 代偿功能的增强效应。

丁苯酞是改善侧支循环、治疗 AIS 的临床常用药物^[22-23],但临床应用中需注意其潜在的肝毒性和胃肠黏膜刺激等不良反应^[24]。“醒脑开窍”针刺法的有效性和安全性在临床和机制研究方面已得到广泛认可^[25-27]。因此,本研究将丁苯酞作为阳性对照药物,探讨针刺调控 MCAO 模型大鼠患侧 LMC 代偿效能对皮层 M5 区神经元的保护作用。实验结果显示,针刺干预可显著改善缺血 12 h 患侧 LMC 血流灌注量水平,促进 LMC 血管扩张,并同步观察到患侧皮层 M5 区血流灌注量增加,伴随脑梗死体积缩小,神经功能缺损改善。上述指标中针刺组结果优于假针刺组,提示“醒脑开窍”针刺法是产生神经保护效应的关键因素。而针刺组与丁苯酞组在上述指标中呈现等效性趋势,表明针刺和丁苯酞干预在提高患侧 LMC 代偿效能及改善皮层 M5 区血流灌注量方面具有可比性。上述结果证实,针刺可提高 LMC 代偿效能,改善皮层 M5 区血流灌注量,促进神经功能恢复。

线粒体作为神经元能量代谢的核心细胞器,可通过氧化磷酸化合成 ATP 来维持神经活性^[28]。脑缺血病理进程中,血流无法向脑组织供应充足氧气与营养物质导致 ATP 合成障碍,由于神经元能量代谢需求的高阈值特性,ATP 耗竭会激活坏死性凋亡通路,加剧缺血半暗带区继发性损伤^[29]。本研究结果表明,针刺干预后保护了患侧皮层 M5 区神经元和线粒体超微结构完整性,减少线粒体空泡化改变,同时增加 NeuN 阳性神经元表达,提高 ATP 含量,而假针刺组未观察到此效应,表明“醒脑开窍”

针刺法是产生神经保护效应的关键因素。此外,针刺与丁苯酞治疗在调节患侧皮层 M5 区线粒体结构与功能方面具有等效性趋势。上述结果证实,针刺通过优化患侧皮层 M5 区线粒体结构与功能稳态,从而有效抑制神经元缺血性损伤进程。

综上,针刺通过提高 MCAO 模型大鼠患侧 LMC 代偿效能,改善皮层 M5 区血流灌注量,优化线粒体结构与功能稳态,减轻神经元缺血性损伤。而相较于丁苯酞,针刺治疗具有无药物不良反应、操作安全等优势,可作为潜在的替代疗法。但本研究仅在实验动物层面进行探究,对于临床样本分析及细胞层面实验并未涉及。因此,后续应结合更先进的实验手段,进一步阐明针刺调控 LMC 代偿的细胞特异性靶点及其与神经元的偶联机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] BENJAMIN E J, MUNTNER P, ALONSO A, et al. Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2019, 139(10): e56-e528.
- [2] CAMPBELL B C V, DE SILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 70.
- [3] 史文倩, 石进. 脑动脉侧支循环代偿分型与评价[J]. *内科急危重症杂志*, 2014, 20(3): 148-150.
SHI W Q, SHI J. Classification and evaluation of collateral circulation compensation of cerebral arteries (in Chinese)[J]. *Journal of Critical Care in Internal Medicine*, 2014, 20(3): 148-150.
- [4] 中国卒中学会脑血流与代谢分会. 缺血性卒中脑侧支循环评估与干预中国指南(2017)[J]. *中华内科杂志*, 2017, 56(6): 460-471.
Cerebral Blood Flow and Metabolism Branch of the Chinese Stroke Association. Chinese guidelines for evaluation and intervention of collateral circulation in ischemic stroke (2017) (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 2017, 56(6): 460-471.
- [5] SHUAIB A, BUTCHER K, MOHAMMAD A A, et al. Collateral blood vessels in acute ischaemic stroke: a potential therapeutic target[J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(10): 909-921.
- [6] BINDER N F, EL AMKI M, GLÜCK C, et al. Leptomeningeal collaterals regulate reperfusion in ischemic stroke and rescue the brain from futile recanalization [J]. *Neuron*, 2024, 112(9): 1456-1472.e6.
- [7] SAITO M, ISHIZUKA K, HOSHINO T, et al. Leptomeningeal anastomosis and early ischemic lesions on diffusion-weighted imaging in male murine focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosci Res*, 2019, 97(7): 752-759.
- [8] GARCÍA-TORNEL Á, CIOLLI L, RUBIERA M, et al. Leptomeningeal collateral flow modifies endovascular treatment efficacy on large-vessel occlusion strokes [J]. *Stroke*, 2021, 52(1): 299-303.
- [9] MADELUNG C F, OVESEN C, TRAMPEDACH C, et al. Leptomeningeal collateral status predicts outcome after middle

- cerebral artery occlusion[J]. *Acta Neurol Scand*, 2018, 137(1): 125-132.
- [10] IWASAWA E, ICHIJO M, ISHIBASHI S, et al. Acute development of collateral circulation and therapeutic prospects in ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(3): 368-371.
- [11] 陈真圆. 针刺对脑梗死后脑血流量的干预效应及机制研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
CHEN Z Y. Research on the intervention effect and mechanism of acupuncture on cerebral blood flow after cerebral infarction (in Chinese) [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [12] 刘倩倩, 李一阳, 淡晓芸, 等. 基于线粒体动力学平衡探讨“醒脑开窍”针刺法改善脑缺血再灌注损伤的机制[J/OL]. *中国针灸*, 2025-04-03. <https://doi.org/10.13703/j.0255-2930.20241218-k0004>.
LIU Q Q, LI Y Y, DAN X Y, et al. Exploring the mechanism of “Xingnao Kaiqiao” needling in ameliorating cerebral ischemia-reperfusion injury based on mitochondrial dynamics homeostasis (in Chinese) [J/OL]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2025-04-03. <https://doi.org/10.13703/j.0255-2930.20241218-k0004>.
- [13] 王琪, 刘瑶瑶, 侯子文. “醒脑开窍”针刺法对脑缺血再灌注损伤大鼠铁死亡相关因子表达的影响[J]. *针刺研究*, 2024, 49(10): 1019-1029.
WANG Q, LIU Y Y, HOU Z W. Effect of “Xingnao Kaiqiao” needling on expression of ferroptosis-related factors in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(10): 1019-1029.
- [14] LIU M X, LUO L, FU J H, et al. Exercise-induced neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury is mediated via alleviating inflammasome-induced pyroptosis[J]. *Exp Neurol*, 2022, 349: 113952.
- [15] LI P C, LIU L F, JOU M J, et al. The GLP-1 receptor agonists exendin-4 and liraglutide alleviate oxidative stress and cognitive and micturition deficits induced by middle cerebral artery occlusion in diabetic mice[J]. *BMC Neurosci*, 2016, 17(1): 37.
- [16] 倪光夏, 石学敏, 王占奎, 等. 针刺对缺血再灌注大鼠脑组织炎症反应相关蛋白表达的影响[J]. *江苏中医药*, 2012, 44(12): 73-75.
NI G X, SHI X M, WANG Z K, et al. The effect of acupuncture on the expression of inflammatory response-related proteins in brain tissue of ischemia-reperfusion rats (in Chinese) [J]. *Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 44(12): 73-75.
- [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 Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [18] LIU R Z, FAN C X, ZHANG Z L, et al. Effects of dl-3-n-butylphthalide on cerebral ischemia infarction in rat model by mass spectrometry imaging[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2451.
- [19] 刘彪, 郑慧军, 杜康, 等. 基于NF- κ B/ICAM-1通路探讨大黄酚对重型颅脑损伤大鼠神经功能的作用[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2024, 53(6): 759-764.
LIU B, ZHENG H J, DU K, et al. Effect of chrysophanol on neurological function in severe traumatic brain injury rats based on the NF- κ B/ICAM-1 pathway (in Chinese) [J]. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*, 2024, 53(6): 759-764.
- [20] LUO C M, LIANG F Y, REN H X, et al. Collateral blood flow in different cerebrovascular hierarchy provides endogenous protection in cerebral ischemia[J]. *Brain Pathol*, 2017, 27(6): 809-821.
- [21] KHAZIPOV R, ZAYNUTDINOVA D, OGIEVETSKY E, et al. Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates[J]. *Front Neuroanat*, 2015, 9: 161.
- [22] GUO Z N, YUE B H, FAN L, et al. Effectiveness of butylphthalide on cerebral autoregulation in ischemic stroke patients with large artery atherosclerosis (EBCAS study): a randomized, controlled, multicenter trial[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2023, 43(10): 1702-1712.
- [23] WANG A X, JIA B X, ZHANG X L, et al. Efficacy and safety of butylphthalide in patients with acute ischemic stroke: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Neurol*, 2023, 80(8): 851-859.
- [24] XUE Y R, REN X L, ZHU Z D, et al. Site-specific protein modification by 3-n-butylphthalide in primary hepatocytes: covalent protein adducts diminished by glutathione and N-acetylcysteine[J]. *Life Sci*, 2021, 287: 120125.
- [25] 蔡笋韵, 张新昌, 刘芙蓉, 等. 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠HIF-1 α /NLRP3炎症信号的影响[J]. *中国针灸*, 2023, 43(9): 1056-1061.
CAI Z Y, ZHANG X C, LIU F R, et al. Effect of acupuncture on HIF-1 α /NLRP3 inflammatory signaling pathway in the rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2023, 43(9): 1056-1061.
- [26] 赵艺, 宋扬扬, 常思琦, 等. 针刺抑制铜死亡延长脑梗死大鼠溶栓时间窗的实验研究[J]. *针刺研究*, 2025, 50(7): 754-762.
ZHAO Y, SONG Y Y, CHANG S Q, et al. Acupuncture inhibits cuproptosis to prolong the time window of thrombolysis by downregulating cerebral FDX1 and DLAT in rats with cerebral infarction (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(7): 754-762.
- [27] 刘欣雨, 张新昌, 黄正, 等. “醒脑开窍”针刺法对脑缺血再灌注损伤大鼠皮质区m6A甲基化修饰的影响[J]. *中国针灸*, 2025, 45(5): 670-677.
LIU X Y, ZHANG X C, HUANG Z, et al. Effect of Xingnao Kaiqiao acupuncture technique on m6A methylation modification in cortical area of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2025, 45(5): 670-677.
- [28] KAUR M M, SHARMA D S. Mitochondrial repair as potential pharmacological target in cerebral ischemia [J]. *Mitochondrion*, 2022, 63: 23-31.
- [29] ZHAO C M, FU X J, YANG Z Y, et al. ATP-sensitive potassium channel opener, Nicorandil, inhibits NF- κ B/AIM2/GSDMD pathway activation to protect against neuroinflammation in ischemic stroke [J]. *Neurochem Int*, 2024, 179: 105810.