

☆ XXXX ☆

基于JAK2/STAT3信号通路探讨电针抑制星形胶质细胞活化减轻缺血性脑卒中大鼠神经炎症反应的作用机制

华文龙^{1,2}, 周政^{1,2}, 李斯亮^{1,2}, 兰巍^{1,2}, 蒋雨晴^{1,2}, 乔峰³, 孙梦洁^{1,2},
李慧⁴, 唐巍^{1,2,5}

(¹安徽中医药大学针灸推拿学院, 合肥 230012; ²经脉脏腑相关安徽省重点实验室, 合肥 230012; ³安徽中医药大学中医学学院, 合肥 230012; ⁴中国中医科学院, 北京 100700; ⁵新安医学教育部重点实验室, 安徽中医药大学, 合肥 230038)

【摘要】目的:基于Janus激酶2/信号转导和转录激活因子3(JAK2/STAT3)信号通路,探讨电针是否通过调控星形胶质细胞活化减轻缺血性脑卒中大鼠的神经炎症反应。方法:雄性SD大鼠随机选取45只作为假手术组,其余采用Zea Longa改良线栓法制备大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,将90只造模成功大鼠随机分为模型组与电针组,并按干预时间1、3、7 d分为亚组,每亚组15只大鼠。电针组于造模后2 h取“百会”“大椎”行电针20 min,每日治疗1次,各亚组分别连续治疗1、3、7 d。采用改良神经功能缺损评分(mNSS)评估神经功能缺损体征;TTC染色法检测脑梗死体积;HE染色法观察缺血侧皮层病理变化;Western blot法检测缺血侧脑组织胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、JAK2、STAT3、磷酸化(p)-JAK2、p-STAT3、补体成分3(C3)、S100钙结合蛋白A10(S100A10)的蛋白表达;ELISA法检测缺血侧脑组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6水平;实时荧光定量PCR法检测缺血侧脑组织GFAP、JAK2、STAT3 mRNA表达;免疫荧光染色法检测缺血侧脑组织GFAP及STAT3双染免疫荧光强度。结果:与假手术组相比,模型组各时点mNSS升高($P<0.01$);脑梗死体积增加($P<0.01$);缺血侧皮层区神经元结构严重受损,轴突排列紊乱并伴有空泡化改变;缺血侧脑组织GFAP、JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3、C3蛋白表达升高($P<0.01$),S100A10蛋白表达下降($P<0.01$);缺血侧脑组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量及GFAP、JAK2、STAT3 mRNA表达升高($P<0.01$);GFAP与STAT3荧光表达强度升高($P<0.01$)。与模型组相比,各时点电针组干预后,上述指标均得到逆转($P<0.05$, $P<0.01$)。与1 d电针组比较,7 d电针组GFAP、C3、S100A10蛋白表达及TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量降低($P<0.01$),3 d电针组S100A10蛋白表达升高($P<0.05$)。结论:电针可能通过抑制JAK2/STAT3信号通路的激活,减轻星形胶质细胞过度活化介导的神经炎症反应,从而发挥神经保护作用,且该效应具有时间依赖性。

【关键词】缺血性脑卒中;电针;星形胶质细胞;Janus激酶2/信号转导和转录激活因子3信号通路;神经炎症反应

Electroacupuncture inhibits astrocyte activation and alleviates neuroinflammation in rats with ischemic stroke based on JAK2/STAT3 signaling pathway

Hua Wenlong^{1,2}, Zhou Zheng^{1,2}, Li Siliang^{1,2}, Lan Wei^{1,2}, Jiang Yuqing^{1,2}, Qiao Feng³, Sun Mengjie^{1,2}, Li Hui⁴, Tang Wei^{1,2,5}
(¹School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; ²Anhui Provincial Key Laboratory of Meridian and Visceral Correlation, Hefei 230012; ³School of Traditional Chinese Medicine,

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251130

引用格式:华文龙,周政,李斯亮,等.基于JAK2/STAT3信号通路探讨电针抑制星形胶质细胞活化减轻缺血性脑卒中大鼠神经炎症反应的作用机制[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-10.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82474617);安徽省高等学校科学研究项目(No.2024AH040151);安徽省新时代育人质量工程项目(No.2024cxcsj130);安徽中医药大学校级探索性科研项目(No.AHUCM2024TS018, AHUCM2024TS025, AHUCM2024TS026)

通信作者:唐巍, E-mail: tangwei2633@163.com

Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; ⁴China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; ⁵Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the effect of electroacupuncture (EA) intervention on neuroinflammatory response in rats with ischemic stroke by modulating astrocyte activation, based on the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway. **Methods** Forty-five male SD rats were randomly selected as the sham-operation group. The ischemic stroke model was established by occlusion of the middle cerebral artery by referring to the modified Zea Longa's suture-occlusion method. Ninety successfully modeled rats were randomly assigned to model group and EA group which were further divided into subgroups based on the intervention time points (1, 3 and 7 d). For rats of the EA group, EA (2 Hz/10 Hz, 1.5 mA) was applied to "Baihui" (GV20) and "Dazhui" (GV14) for 20 min (starting 2 hours post-modeling), once daily for 1, 3 or 7 days. The modified neurological severity score (mNSS) was used to assess neurological deficits, and 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining employed to measure the cerebral infarction volume. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining was used to observe histopathological changes in the ischemic cortex. The protein expression levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP), JAK2, STAT3, phosphorylated-JAK2 (p-JAK2), p-STAT3, complement component 3 (C3), and S100 calcium-binding protein A10 (S100A10) in the ischemic brain tissue were detected using Western blot. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6 in the ischemic brain tissue were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of GFAP, JAK2, and STAT3 mRNAs in the ischemic brain tissue were detected by using reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). The double-staining immunofluorescence intensity of GFAP and STAT3 of the ischemic brain tissue was determined using immunofluorescence staining. **Results** Compared with the sham operation group, the model group showed a significant increase in cerebral infarction volume ($P<0.01$), and mNSS, protein expression levels of GFAP, JAK2, STAT3, p-JAK2, p-STAT3, and C3, contents of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 and mRNA expression levels of GFAP, JAK2 and STAT3 at the 1st, 3rd and 7th day ($P<0.01$), and the immunofluorescence intensity of GFAP and STAT3 co-staining ($P<0.01$), and a significant reduction in the expression of S100A10 at the 1st, 3rd and 7th day ($P<0.01$). The ischemic cortex exhibited severe neuronal structural damage, characterized by obvious nuclear pyknosis, cellular swelling and rupture, disordered axonal arrangement and vacuolar changes. After EA intervention, all the increased and decreased levels of the indexes mentioned above were reversed ($P<0.05$, $P<0.01$), including obvious improvement of morphology of neurons in the ischemic cortex, characterized by more regular cell arrangement and clearer cellular nucleus. **Conclusion** EA can improve neurological deficits and reduce cerebral ischemic volume in ischemic stroke rats, which may be related to its functions in inhibiting the activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway, mitigating neuroinflammation response mediated by excessive astrocyte activation, and the effects are time-dependent.

【KEYWORDS】 Ischemic stroke; Electroacupuncture; Astrocyte; Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway; Neuroinflammation

缺血性脑卒中(IS)是脑卒中的最主要亚型,约占病例总数的80%^[1],是全球范围内致残和致死的主要原因。2023年我国40岁及以上人群脑卒中患者高达1 242万例,IS的发病率呈上升趋势^[2],IS的防治成为当前重大的公共卫生挑战。组织型纤溶酶原激活剂(tPA)是目前临床治疗IS唯一有效的药物,但其应用受限于狭窄的治疗时间窗和出血转化风险^[3],因此开发替代疗法势在必行。

神经炎性反应是IS的核心病理机制之一,其特征包括外周炎性细胞的浸润、星形胶质细胞(AS)活化及大量炎性介质的释放。其中,AS作为中枢神经系统的关键免疫细胞,在脑缺血后被迅速激活并大量增殖,过度活化的AS可进一步促进小胶质细

胞激活,导致大量炎性因子释放,从而加剧炎性级联反应^[4]。Janus激酶2/信号转导和转录激活因子3(JAK2/STAT3)是调控炎性反应的关键途径,由多种细胞因子激活。研究表明,该通路的过度激活可诱导活化的星形胶质细胞向神经毒性表型转化,进而促进促炎因子释放,加重IS后的神经炎性反应^[5]。

既往临床研究^[6]与基础研究^[7-8]均证实,电针治疗能够通过其抗炎效应促进神经功能恢复。尽管JAK2/STAT3通路在针灸治疗神经疾病中已有报道^[9-10],但其在IS中调控AS活化的机制尚不明确。目前,关于电针是否通过调控JAK2/STAT3通路抑制AS过度活化,进而减轻IS后神经炎性反应的研究仍较为缺乏。因此,本研究以大脑中动脉闭塞

(MCAO)模型大鼠为研究对象,旨在探讨电针“百会”“大椎”是否通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活,减少 AS 过度活化及相关炎性因子表达,从而为电针的神经保护机制提供新证据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

11 周健康雄性 SPF 级的 SD 大鼠,体质量为 280~320 g,购自河南斯贝克生物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(豫)2020-0005。所有大鼠 3 只一笼饲养于安徽中医药大学针灸经络研究所的实验动物房内,光照条件为 12 h/12 h 的光/暗循环交替,环境温度控制在 23~27 ℃,相对湿度 45%~55%,自由摄食饮水。适应性饲养 1 周后,于造模前 12 h 禁食不禁水。本研究经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准,伦理批准号:AHUCM-rats-2023150。

采用随机数字表法,将 45 只大鼠纳入假手术组,其余动物用于造模。在模型建立过程中,排除未能成功建模及死亡个体后,最终获得 90 只造模成功大鼠。将造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组与电针组,每组 45 只。为进一步观察时间效应,将各组大鼠按治疗时长分为 1、3、7 d 3 个亚组,每个亚组 15 只大鼠。

1.2 主要试剂及仪器

主要试剂:异氟烷(深圳瑞沃德),Trizol(美国 Life technologies),PVDF 膜(美国 Millipore),Novostart SYBR qPCR SuperMix Plus qPCR 预混试剂盒(苏州 Novoprotein),PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(日本 TaKaRa),引物合成(上海 Sangon Biotech),预染蛋白 Marker(美国 Thermo),快速转膜液、抗荧光淬灭封片剂(上海碧云天),胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、Janus 激酶 2(JAK2)、信号转导和转录激活因子 3(STAT3)一抗(北京 Bioss),磷酸化 Janus 激酶 2(p-JAK2)一抗(英国 Abcam),磷酸化信号转导和转录激活因子 3(p-STAT3)一抗(江苏 Affinity),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗、山羊抗鼠 IgG 二抗、山羊抗兔 IgG 二抗(北京中杉金桥),白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒(武汉基因美),Triton X-100(安徽欣乐),双标三色多重免疫荧光试剂盒(苏州中抗生物),ECL 超敏发光试剂盒(海门 Biosharp),无水乙醇(上海广诺),二甲苯(天津凯通),苏木精染液、醇溶伊红染

液(珠海贝索),中性树脂(无锡江原),2,3,5-氯化三苯基四氮唑染液(TTC)染液(北京索莱宝)。

主要仪器:微孔板迷你离心机(杭州奥盛),漩涡混合器、低速迷你离心机、水平摇床(海门其林贝尔),电热恒温水槽(上海三发),华佗牌电针仪(苏州医疗用品厂),超微量分光光度计(南京五义),高速冷冻离心机(安徽嘉文),一次性无菌针灸针(0.25 mm \times 25 mm,苏州天协),电泳仪、转膜仪、电泳槽(上海天能),小动物吸入式麻醉机(深圳瑞沃德),自动曝光仪(上海培清),数字切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH),徕卡切片机(德国 Leica),普通 PCR 仪(杭州晶格),荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Scientific),酶标仪(深圳雷杜),光学显微镜、激光共聚焦显微镜(日本 Olympus)。

1.3 模型制备方法

参照 Zea Longa 改良线栓法^[11]制备 MCAO 大鼠模型。将大鼠置于 5% 异氟烷麻醉诱导箱中进行诱导麻醉。待大鼠其进入稳定麻醉状态且自主呼吸平稳后,迅速取出,仰卧位固定于动物手术板上。通过面罩持续吸入 2.5%~3% 异氟烷维持麻醉。四肢固定后,对颈部区域进行碘伏常规消毒,沿颈正中线纵向切开皮肤约 2 cm,钝性分离浅筋膜及肌肉组织,充分暴露右侧颈三角。先找到颈总动脉,用弯镊分离干净,直至充分暴露右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),结扎 ECA 远端,并采用电凝器凝断远端结扎处。于 ECA 与 ICA 分叉处预置松结,以血管夹临时阻断 ECA 与 CCA 近心端。用镊子将 ECA 与 CCA 牵拉成直线,于 ECA 处剪一“V”形切口,将 3 cm 长的尼龙线栓自切口轻柔插入 1.8 cm,遇轻微阻力时停止推进并结扎固定。撤除血管夹,缝合皮肤。术后肌内注射青霉素 0.5 mL/只以预防感染,随后将大鼠单独放置于清洁笼中恢复,密切观察其状态。在造模结束 2 h 后,待大鼠进入苏醒期并恢复意识,立即依据 Zea-Longa 法^[11]对其神经功能缺损体征进行系统评估,以评分 1~3 分为造模成功的大鼠并纳入后续实验。假手术组大鼠接受相同手术操作,但不插入线栓。

1.4 干预方法

电针组于造模后 2 h,选取“百会”“大椎”进行电针干预,穴位定位参考《实验动物常用穴位名称与定位 第 2 部分:大鼠》^[12]。使用 2.5%~3% 异氟烷维持麻醉,并固定大鼠。采用 0.25 mm \times 25 mm 毫针斜刺“百会”2 mm,直刺“大椎”3~5 mm,连接电针

仪(“百会”接正极,“大椎”接负极),频率2 Hz/10 Hz,强度1.5 mA,每次20 min,每日治疗1次,各治疗亚组分别连续治疗1、3、7 d。

1.5 观察指标及检测方法

改良神经功能缺损评分(mNSS)评估神经功能缺损情况:于造模后1、3、7 d各组随机选取6只大鼠进行mNSS评估。该评分综合考查运动、感觉、平衡及反射4项功能,单项正常计0分,缺损计1分。总分为0~18分,分数越高表明神经功能损伤越重。

TTC染色检测大鼠脑梗死体积:全部干预结束后,各组随机取3只大鼠经麻醉后取材,脑组织于-20℃速冻20 min后进行2 mm的冠状切片。脑片在恒温37℃、避光条件下经2% TTC溶液染色30 min,在暗室中随时观察染色状态,并采用4%多聚甲醛固定。正常脑组织呈现红色而梗死灶呈现灰白色。拍照后利用Image J软件分析图像,计算梗死体积及其占脑组织总体积的百分比。脑梗死体积百分比(%)=(总脑梗死体积÷总脑组织体积)×100%。

HE染色法观察缺血侧皮层病理学变化:干预结束后,各组随机选取3只大鼠麻醉后取出脑组织置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h后,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后石蜡包埋,并制备4 μm厚切片,60℃烘片2 h。二甲苯脱蜡10 min×2次,梯度乙醇复水至蒸馏水后,按标准程序进行苏木精与伊红染色,最后经脱水、透明并用中性树胶封片,于光学显微镜下观察缺血皮层的形态学改变。

ELISA法检测缺血侧脑组织TNF-α、IL-1β和IL-6含量:干预后结束后,各组随机取6只大鼠于冰下分离缺血侧脑组织后迅速置于冻存管,放至-80℃冰箱中保存用于后续ELISA、Western blot、RT-qPCR检测。每只大鼠取100 mg缺血侧脑组织制备成10%的匀浆液,离心10 min,并取上清液。使用ELISA检测试剂盒,严格按照试剂盒说明书的要求进行操作,酶标仪在450 nm波长下测定单个孔吸光度值,绘制标准品曲线后得到回归方程,并根据回归方程计算TNF-α、IL-1β和IL-6含量。

Western blot法检测缺血侧脑组织GFAP、JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3、C3、S100A10的蛋白表达:每只鼠取100 mg缺血侧脑组织使用RIPA裂解液进行充分裂解,离心后收集上清液用于蛋白样本制备。将提取的蛋白样品与适量上样缓冲液混合,并在沸水浴中加热,使蛋白发生充分变性。取等量变性蛋白(每孔5~10 μL)进行SDS-

PAGE凝胶电泳分析。电泳过程分为两步:首先在浓缩胶阶段施加80 V恒定电压,持续30 min;随后在分离胶阶段将电压提升至120 V,继续电泳90 min。待电泳完毕,采用湿式转印技术将凝胶中的蛋白条带转移至PVDF膜上。随后使用5%脱脂牛奶室温摇床上封闭1 h,依次在4℃条件下分别孵育GFAP(1:2 000)、JAK2(1:1 000)、STAT3(1:1 000)、C3(1:2 000)、S100A10(1:1 500)及p-JAK2(1:2 000)、p-STAT3(1:2 000)一抗4℃过夜。室温下孵育二抗1 h,每次抗体孵育前后均使用TBST缓冲液充分洗涤膜3次。最后使用ECL化学发光显影,Image J分析条带灰度值。以目的蛋白条带灰度值与内参条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

RT-qPCR法检测缺血侧脑组织GFAP、JAK2、STAT3 mRNA表达:每只鼠取50 mg缺血侧脑组织样本,于液氮中速冻并进行研磨,采用TRIzol法(按1 mL/100 mg组织比例添加)提取总RNA。测定OD260/OD280比值≥1.8后,用PrimeScript RT试剂盒进行反转录。PCR体系(10 μL):2×SYBR Green mixture 5 μL, Forward primer(10 μmol/L) 1 μL, Reverse primer(10 μmol/L) 1 μL, cDNA 1 μL, RNase Free water 2 μL。qPCR仪运行程序:95℃预变性1 min;95℃ 20 s、60℃ 1 min,共40次循环。以β-actin作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表1。

免疫荧光染色法检测缺血侧脑组织GFAP与STAT3共表达强度:干预结束后,各组随机选取3只大鼠经麻醉后进行心脏灌注取材,取4%多聚甲

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
GFAP	上游 AGGTCTATTCCTGGTTGC	167
	下游 GGCGATACTCCGTACATG	
JAK2	上游 ATAGATGAGTCAACCAGGCA	182
	下游 CCATGAACAAAATCATGCCG	
STAT3	上游 GCAATACCATTGACCTGCCG	115
	下游 AACGTGAGCGACTCAAAGT	
β-actin	上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游 TTTAATGTCACGCACGATTTC	

注:GFAP为胶质纤维酸性蛋白,JAK2为Janus激酶2,STAT3为信号转导和转录激活因子3。

醛固定 30 min 的脑组织切片, 0.3% Triton X-100 透化 15 min 后, 5% BSA 封闭 1 h。依次孵育兔抗 GFAP (1: 1 500) 与兔抗 STAT3 (1: 200) 混合液 (4 °C 过夜), PBS 漂洗 3 次。避光条件下分别加入对应双二抗混合液, 37 °C 孵育 1 h。DAPI 复染细胞核 10 min, 抗荧光淬灭封片剂封片。采用激光共聚焦显微镜 (63× 油镜) 同步采集三通道荧光图像, 488 nm 和 561 nm 激光分别激发绿色/红色荧光。使用 Image J 软件随机选取 10 个视野, 通过 Coloc2 插件计算 Manders 共定位系数, ROI 区域测量平均荧光强度。

1.6 统计学处理

所有统计分析及图表生成均使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件完成。本研究所获计量数据经 Shapiro-Wilk 检验均符合正态分布, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。进行多组间差异比较, 先进行方差齐性检验, 若方差齐则用单因素方差分析, 并采用 Tukey's test 进行事后比较; 方差不齐则用 Welch's 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

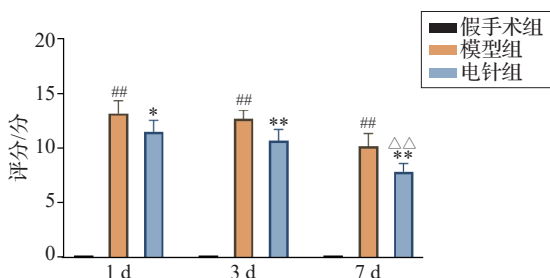
2 结果

2.1 各组大鼠不同时点 mNSS 比较

各时点, 模型组大鼠的 mNSS 均高于同时点假手术组 ($P < 0.01$); 与同时时间点的模型组相比, 电针组 1、3、7 d 时 mNSS 均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 7 d 电针组的评分较 1 d 电针组下降 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 各组大鼠脑梗死体积比较

假手术组大鼠脑组织未观察到梗死区域。相较于假手术组, 模型组的脑梗死体积百分比增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 电针组脑梗死体积百分



注: mNSS 为神经功能缺损评分。与同时点假手术组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与同时点模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与 1 d 电针组比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠不同时点 mNSS 比较 ($\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of mNSS of rats in the 3 groups at different time points ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

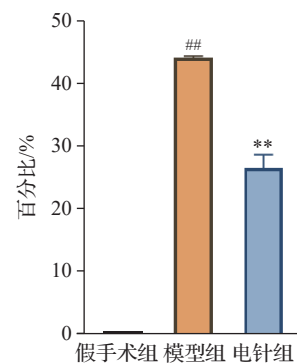
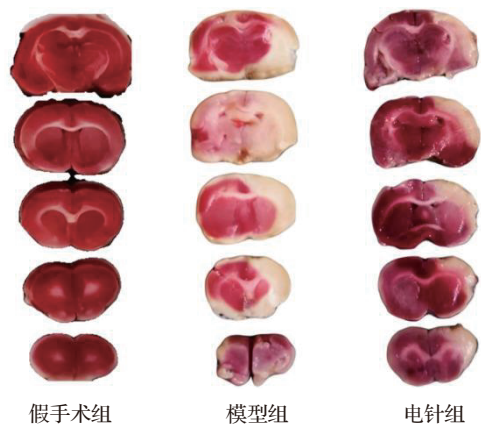
比减小 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 各组大鼠缺血侧脑组织病理形态学变化比较

假手术组缺血侧皮层区神经元形态正常, 细胞轮廓清晰, 核仁结构完整, 层次排列规则。模型组缺血侧皮层区神经元结构严重受损, 表现为明显的核固缩、细胞肿胀与破裂, 轴突排列紊乱并伴有空泡化改变。电针干预后, 其缺血侧皮层区神经元形态较同时点模型组明显改善, 细胞排列较为规整, 细胞核形态较为清晰。电针干预 7 d 时神经元形态良性改变较干预 1 d 时更为显著。见图 3。

2.4 各组大鼠缺血侧脑组织 GFAP、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、C3、S100A10 蛋白表达比较

与假手术组相比, 模型组大鼠各时点缺血侧脑组织 GFAP、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 及 C3 的蛋白表达水平均上调 ($P < 0.01$), S100A10 的表达下调 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 电针组大鼠各时点缺血侧脑组织 GFAP、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 及 C3 的蛋白表达均下调 ($P < 0.01$),



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

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

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

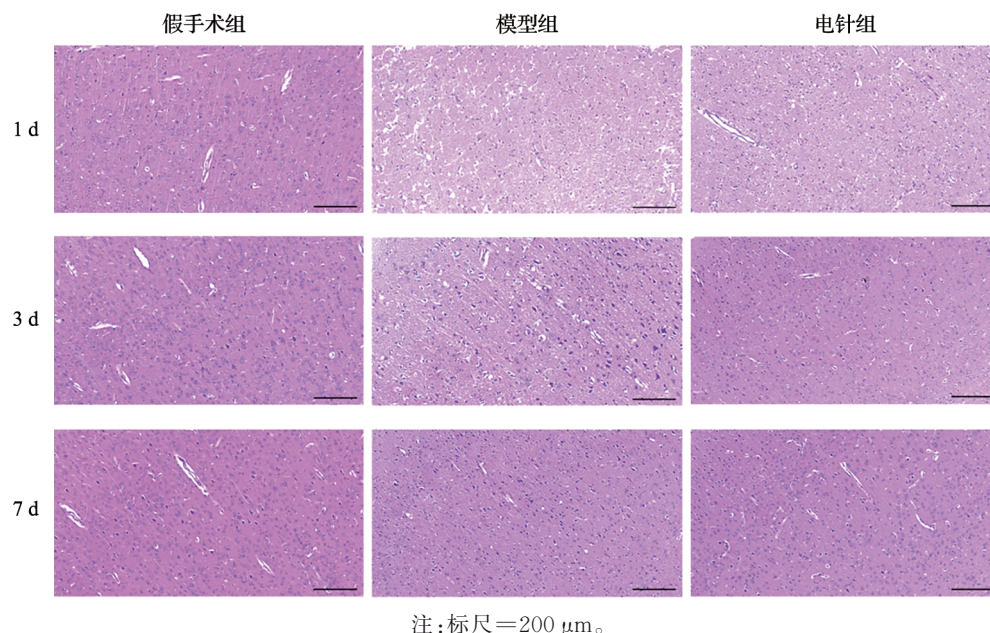


图3 各组大鼠缺血侧脑组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 3 Comparison of pathological morphology of ischemic brain tissue of rats in the 3 groups(HE staining)

S100A10的表达上调($P < 0.01$)。与1 d电针组比较,7 d电针组GFAP、C3、S100A10蛋白表达下调($P < 0.01$);3 d电针组S100A10蛋白表达上调($P < 0.05$)。见图4。

2.5 各组大鼠缺血侧脑组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量比较

与假手术组比较,各时点模型组大鼠缺血侧脑组织TNF- α 、IL-1 β 及IL-6含量升高($P < 0.01$);与模型组比较,各时点电针组的TNF- α 、IL-1 β 和IL-6含量降低($P < 0.01$);7 d电针组TNF- α 、IL-1 β 和IL-6含量低于1 d电针组($P < 0.01$)。见图5。

2.6 各组大鼠缺血侧脑组织GFAP、JAK2、STAT3 mRNA表达比较

与假手术组比较,各时点模型组大鼠缺血侧脑组织的GFAP、JAK2及STAT3 mRNA相对表达量上调($P < 0.01$)。与模型组相比,各时点电针组GFAP、JAK2及STAT3的mRNA相对表达量下调($P < 0.01$)。见图6。

2.7 各组大鼠脑组织GFAP与STAT3共染免疫荧光强度比较

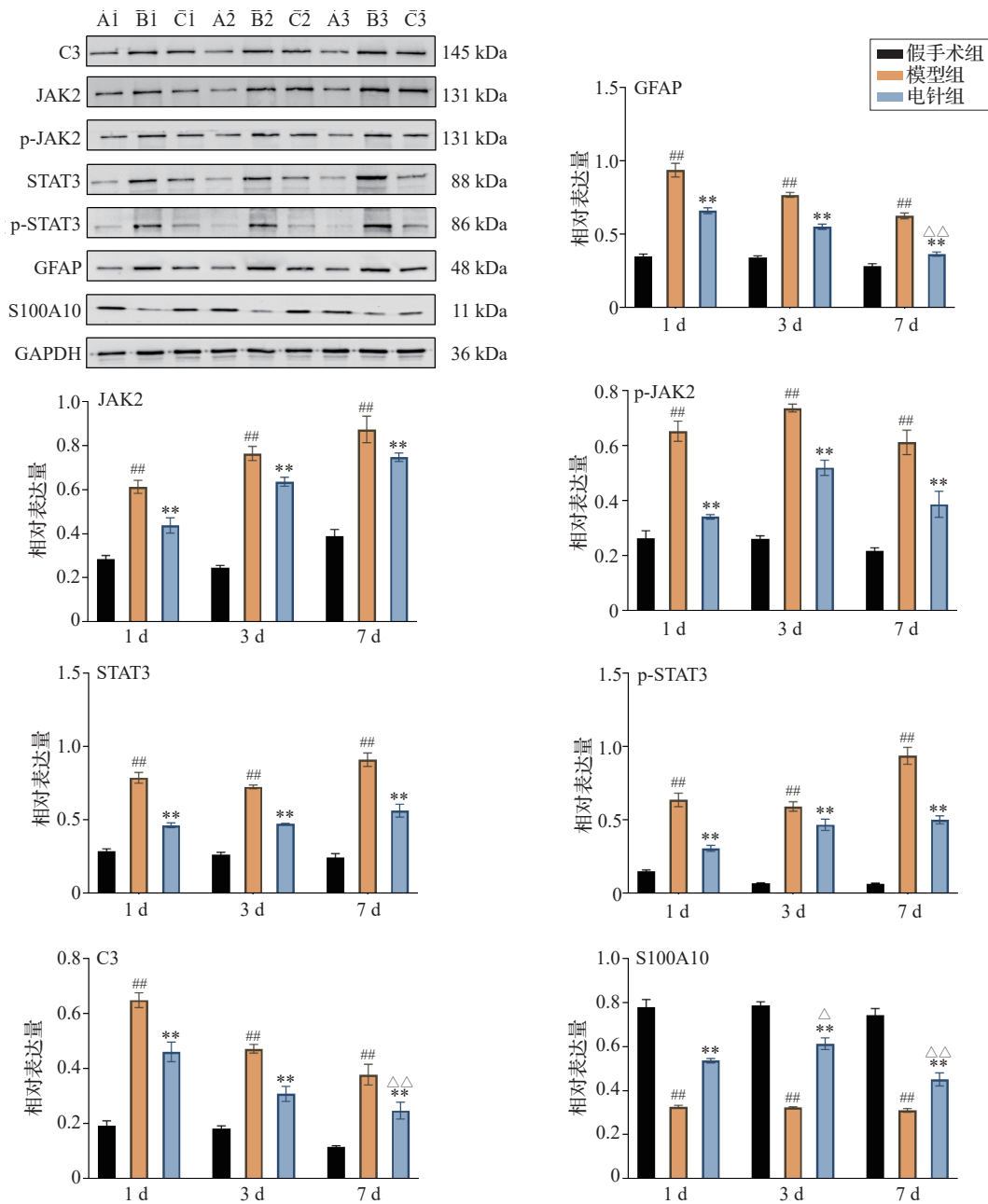
与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中GFAP与STAT3共表达荧光强度均显著增强($P < 0.01$)。电针组GFAP与STAT3共表达荧光强度较模型组降低($P < 0.01$)。见图7。

3 讨论

《中医临床诊疗术语·疾病部分》^[13]将IS归属于

“缺血性中风”的范畴,其病位在脑,多属阴阳失调、气虚血瘀之证,核心病机在于气血逆乱、脑脉痹阻,这一观点与现代医学中“脑局部血液循环障碍导致神经功能缺损”的定义高度契合。研究表明,脑血管病是针灸治疗的优势病种,具有良好的疗效^[14]。《素问·骨空论》载“督脉者……入络脑”,又《难经·二十八难》载“督脉……入属于脑”,进一步确立了督脉与脑的密切联系。同时督脉为“阳脉之海”,统领诸阳经,可用于治疗阴阳失调引起的各类病症。在缺血性中风的治疗中,常选用督脉要穴百会与大椎^[15]。百会为督脉与足太阳膀胱经、手少阳三焦经、足少阳胆经之交会穴,深部为髓所在。《针灸聚英》载其可“主脑疾,升提阳气,开窍醒神”。大椎乃三阳经与督脉交会之所,《针灸甲乙经》载其“主伤寒热盛,烦呕,脊强”,功擅疏通三阳经气、散寒逐瘀。百会与大椎两穴相配,共奏通调督脉、醒脑开窍、活血化瘀之效。本研究结果显示,电针干预后,模型大鼠的mNSS降低,脑梗死体积明显缩小,缺血皮层区的神经元形态结构得到明显改善,表明电针“百会”“大椎”对脑缺血损伤具有明确的神经保护作用。

继发性脑损伤是影响IS预后的关键因素,其中神经炎症反应是核心环节^[16]。AS的异常活化是启动和放大炎症级联反应的关键^[4]。脑缺血后,AS被大量损伤相关分子模式迅速激活^[17]。异常活化的AS通过释放TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子,一方面直



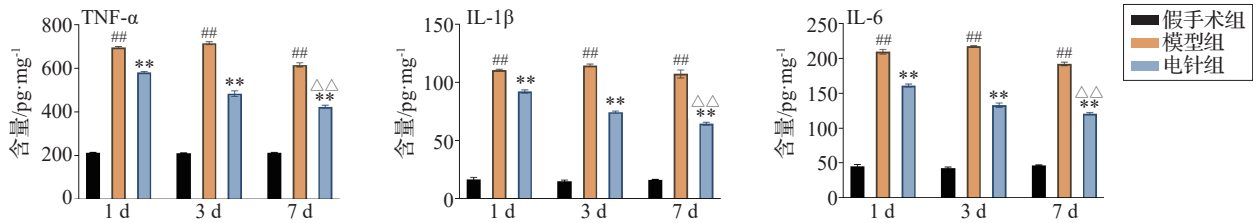
注: A1、B1、C1为1 d假手术组、模型组、电针组, A2、B2、C2为3 d假手术组、模型组、电针组, A3、B3、C3为7 d假手术组、模型组、电针组。GFAP为胶质纤维酸性蛋白, JAK2为Janus激酶2, p-JAK2为磷酸化Janus激酶2, STAT3为信号转导与转录激活因子3, p-STAT3为磷酸化信号转导与转录激活因子3, C3为补体成分3, S100A10为S100钙结合蛋白A10。与同时点假手术组比较, ## $P < 0.01$; 与同时点模型组比较, ** $P < 0.01$; 与1 d电针组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠缺血侧脑组织GFAP、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、C3、S100A10蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of GFAP, JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, C3 and S100A10 protein expression in ischemic brain tissue of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

接损害神经元并增加血脑屏障通透性,另一方面招募外周免疫细胞穿过受损的血脑屏障,浸润至缺血病灶^[18]。浸润的免疫细胞进一步释放炎症介质,反过来促进AS持续活化,由此构成神经炎性正反馈的恶性循环,加重继发性脑损伤。研究表明,抑制AS活化可有效减轻缺血后的神经炎性反应与脑组

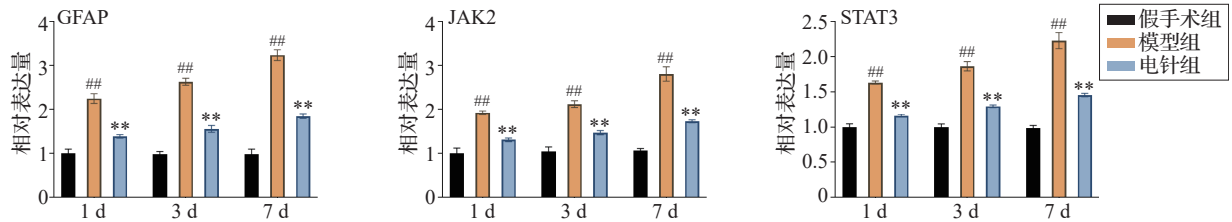
织损伤,进而促进神经功能恢复^[19-20]。本研究结果显示,模型大鼠缺血脑组织中AS活化标志物GFAP的蛋白与mRNA表达、神经毒性A1型表型标志物C3蛋白表达均显著上调,而神经保护性A2型表型标志物S100A10蛋白表达下调,同时炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6含量升高,表明诱导了神经炎



注: TNF-α为肿瘤坏死因子α, IL-1β为白细胞介素1β, IL-6为白细胞介素6。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1d电针组比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

图5 各组大鼠缺血侧脑组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)

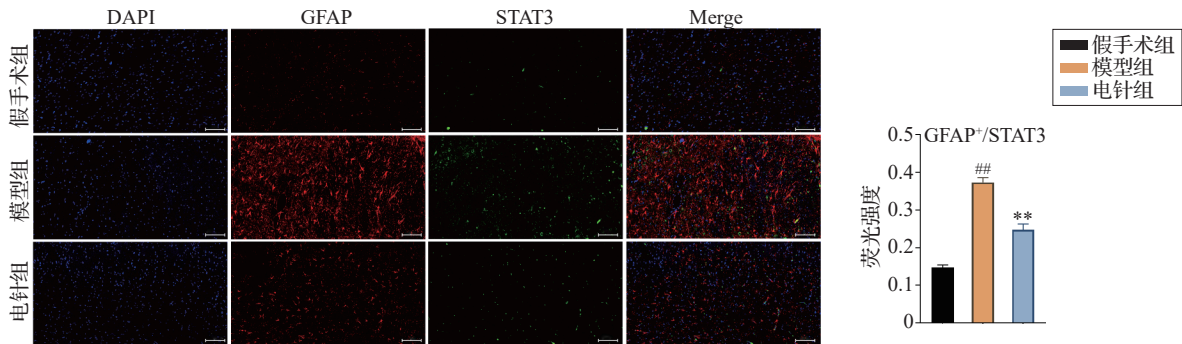
Fig. 5 Comparison of the contents of TNF-α, IL-1β and IL-6 in ischemic brain tissue of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)



注: GFAP为胶质纤维酸性蛋白, JAK2为Janus激酶2, STAT3为信号转导和转录激活因子3。与同时点假手术组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与同时点模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠缺血侧脑组织 GFAP、JAK2、STAT3 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of GFAP, JAK2 and STAT3 mRNA expression in ischemic brain tissue of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)



注: 蓝色为DAPI特异性染色细胞核, 红色为GFAP表达, 绿色为STAT3表达。与假手术组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

图7 各组大鼠脑组织 GFAP与STAT3共标荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of immunofluorescence intensity for GFAP and STAT3 co-localization in the rat brain tissue of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

性反应。电针干预后, 以上指标均得到逆转, 表明电针的抗炎与神经保护作用与其抑制AS过度活化并促进其向神经保护性A2表型转化密切相关, 与既往研究^[21]结论一致。

JAK2/STAT3信号转导通路在细胞生长调控、分化过程、存活维持及病原体抵抗等多种生物学功能中扮演关键角色^[22]。该信号通路由非受体酪氨酸激酶JAK2与转录因子STAT3两个核心组件构成。JAK2分子包含FERM结构域、类SH2结构域

及激酶结构域等重要功能区域, 借助这些结构实现与细胞因子受体(例如gp130)的特异性识别与结合, 并在配体激活后发生自身磷酸化, 进而激活下游的信号转导途径^[23]; 另一方面, STAT3通过其SH2结构域与磷酸化修饰的JAK2相结合, 继而在Tyr705位点发生磷酸化, 形成二聚体构象后转移至细胞核内, 对包括GFAP、脂质运载蛋白2等一系列靶基因的转录活性进行调控^[24]。在IS的病理状态下, JAK2/STAT3信号通路常呈现过度激活状态,

进而诱导促炎因子 IL-6、TNF- α 的释放,诱导神经元凋亡,加剧脑组织损伤^[25]。同时本实验证实电针可显著下调 MCAO 模型大鼠 JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3 的蛋白表达,从而抑制 JAK2/STAT3 信号通路的过度激活。研究表明,脑缺血后给予 JAK2 抑制剂 AG490 或敲低 STAT3 基因,均可有效抑制 AS 活化,并减轻后续的神损伤,证实了该通路是导致 AS 活化的重要途径^[26]。JAK2/STAT3 通路既经 STAT3 核转位直接转录激活 GFAP 表达^[27],也能介导 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的信号,协同增强 GFAP 表达,从而多层面调控 AS 活化^[28]。本研究结果显示,与模型组相比,电针组 GFAP、JAK2 及 STAT3 的 mRNA 表达水平降低,GFAP 与 STAT3 共染荧光强度亦下降,从分子层面表明,电针的脑保护效应可能源于对 JAK2/STAT3 通路及其下游 AS 过度活化的抑制。

电针的干预效应具有时间依赖性,延长治疗时间至 7 d,在降低 mNSS 评分、减少梗死体积、抑制 GFAP 和 C3 表达以及降低炎症因子水平等方面,均展现出优于干预 1 d 的效果,提示在脑缺血后的急性期,给予一定疗程的电针治疗,对于持续抑制炎症级联反应、维持最大化神经保护效益至关重要,具有重要的临床转化启示。其中 3 d 电针组 S100A10 蛋白表达升高,7 d 电针组 S100A10 蛋白表达降低,提示在脑缺血急性期,促进 S100A10 的表达可能与增强内源性修复能力有关,但该蛋白在急性期不同时点发挥作用的规律及具体机制有待进一步深入研究。本研究尚存以下局限性:尽管证实电针可调控 JAK2/STAT3 通路,但未通过使用通路激动剂或抑制剂进行反向验证,以明确电针作用机制;此外,研究尚未探讨电针对小胶质细胞等其他免疫细胞的影响。因此,电针发挥神经保护作用的具体靶点与相关的信号通路网络,仍有待未来研究进一步阐明。

综上所述,本研究结果表明,电针“百会”“大椎”可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路的激活,进而遏制 AS 的异常活化及伴随的神经炎症反应,最终发挥神经保护作用。这为电针治疗 IS 提供了重要的实验依据,并提示 JAK2/STAT3 信号通路可作为针刺干预的潜在新靶点。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Hu W B, Li W L, Mangal R, et al. Normobaric hyperoxia (NBHO): an adjunctive therapy to cerebrovascular recanalization in ischemic stroke [J]. *Aging Dis*, 2023, 14(5): 1483-1487.
- [2] 《中国脑卒中防治报告》编写组,王陇德.《中国脑卒中防治报告 2021》概要[J]. *中国脑血管病杂志*, 2023, 20(11): 783-792.
《中国脑卒中防治报告》编写组, Wang L D. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2021 (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Cerebrovascular Diseases*, 2023, 20(11): 783-792.
- [3] Venkat P, Shen Y, Chopp M, et al. Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B): 310-322.
- [4] Liang Z, Lou Y Y, Hao Y L, et al. The relationship of astrocytes and microglia with different stages of ischemic stroke [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2023, 21(12): 2465-2480.
- [5] Xie H F, Xu R X, Wei J P, et al. JAK2/STAT3/HIF-1 α signaling pathway in cerebral stroke: dual roles and therapeutic potential [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, 30(5): e14562.
- [6] 王天磊,刘建浩,徐琼,等.电针联合补阳还五汤对缺血性脑卒中后遗症患者血清炎症因子水平及肢体运动功能的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(6): 164-166.
Wang T L, Liu J H, Xu Q, et al. Effect of electroacupuncture combined with Buyanghuanwu decoction on serum inflammatory factors and limb motor function in patients with sequela of ischemic stroke (in Chinese) [J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 47(6): 164-166.
- [7] Wang Y, Xue M, Xia Y Y, et al. Electroacupuncture treatment upregulates α 7nAChR and inhibits JAK2/STAT3 in dorsal root ganglion of rat with spared nerve injury [J]. *J Pain Res*, 2019, 12: 1947-1955.
- [8] Yan S, Xie L Y, Duan X X, et al. Electroacupuncture improves apoptosis of nucleus pulposus cells *via* the IL-22/JAK2-STAT3 signaling pathway in a rat model of cervical intervertebral disk degeneration [J]. *Acupunct Med*, 2024, 42(3): 146-154.
- [9] 蒋焕莹,张东旭,孙忠人,等.基于 JAK2/STAT3 通路探讨“夹脊”电针治疗脊髓损伤大鼠的神经元凋亡作用机制[J]. *针刺研究*, 2025, 50(6): 633-640.
Jiang H Y, Zhang D X, Sun Z R, et al. Exploration of the mechanism of electroacupuncture at “Jiaji” (EX-B2) in treating neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury based on the JAK2/STAT3 pathway (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(6): 633-640.
- [10] 刘静,杜艳军,周清莲,等.针加灸对阿尔茨海默病大鼠海马区蛋白酪氨酸激酶-2/信号转导和转录激活因子-3 信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2019, 44(2): 79-84.
Liu J, Du Y J, Zhou Q L, et al. Acupuncture plus moxibustion intervention improves learning-memory ability by suppressing hippocampal JAK2/STAT3 signaling in Alzheimer's rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2019, 44(2): 79-84.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 中医临床诊疗术语 第1部分: 疾病: GB/T 16751.1—2023[S]. 北京: 中国标准出版社.
State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Clinic terminology of traditional Chinese medical diagnosis and treatment: Part 1: Diseases: GB/T 16751.1—2023 (in Chinese)[S]. Beijing: Standards Press of China.
- [14] 樊同涛, 樊小农, 李改改, 等. 16410例针灸会诊患者病例特征分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2024, 44(3): 303-308.
Fan T T, Fan X N, Li G G, et al. Case characteristics analysis of 16410 patients with acupuncture consultation (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2024, 44(3): 303-308.
- [15] 邵田娱, 丁敏芮, 周秀, 等. 基于数据挖掘探究针刺督脉治疗急性缺血性中风的腧穴应用规律[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 1118-1121.
Shao T Y, Ding M R, Zhou X, et al. Analysis of acupoints rules in treating acute ischemic stroke with governor channel acupuncture based on data mining (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2021, 36(2): 1118-1121.
- [16] Zhang H M, Luo D, Chen R, et al. Research progress on acupuncture treatment in central nervous system diseases based on NLRP3 inflammasome in animal models[J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1118508.
- [17] Kim S W, Lee J K. Role of HMGB1 in the interplay between NETosis and thrombosis in ischemic stroke: a review [J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1794.
- [18] Wu S L, Tabassum S, Payne C T, et al. Updates of the role of B-cells in ischemic stroke[J]. *Front Cell Neurosci*, 2024, 18: 1340756.
- [19] He X S, Liu Y Q, Lin X H, et al. Netrin-1 attenuates brain injury after middle cerebral artery occlusion *via* downregulation of astrocyte activation in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 268.
- [20] Sui Y, Bian L G, Ai Q L, et al. Gastrodin inhibits inflammasome through the STAT3 signal pathways in TNA2 astrocytes and reactive astrocytes in experimentally induced cerebral ischemia in rats[J]. *Neuromolecular Med*, 2019, 21(3): 275-286.
- [21] 孙世婧, 张小卿, 马贤德, 等. 基于 FGF2/FGFR1/p-ERK 通路研究不同时间点电针对脑缺血再灌注大鼠反应性星形胶质细胞极化的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(6): 183-188.
Sun S J, Zhang X Q, Ma X D, et al. Effects of electroacupuncture at different time points on polarization of reactive astrocytes in middle cerebral artery occlusion-reperfusion rats based on FGF2/FGFR1/p-ERK pathway (in Chinese) [J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2025, 52(6): 183-188.
- [22] Justicia C, Gabriel C, Planas A M. Activation of the Jak/Stat pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes[J]. *Glia*, 2000, 30(3): 253-270.
- [23] Cheng X, Yeung P K K, Zhong K, et al. Astrocytic endothelin-1 overexpression promotes neural progenitor cells proliferation and differentiation into astrocytes *via* the Jak2/Stat3 pathway after stroke[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 227.
- [24] 刘可心, 宋丽娟, 吴艺舸, 等. 羟基红花黄色素 A 干预脑缺血再灌注损伤后星形胶质细胞脂质运载蛋白 2 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(7): 1063-1069.
Liu K X, Song L J, Wu Y G, et al. Hydroxysafflor yellow A intervenes astrocyte lipocalin 2 expression after cerebral ischemia/reperfusion injury (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2024, 28(7): 1063-1069.
- [25] Huang L P, Li S, Dai Q X, et al. Astrocytic Yes-associated protein attenuates cerebral ischemia-induced brain injury by regulating signal transducer and activator of transcription 3 signaling[J]. *Exp Neurol*, 2020, 333: 113431.
- [26] Raible D J, Frey L C, Brooks-Kayal A R. Effects of JAK2-STAT3 signaling after cerebral insults [J]. *JAKSTAT*, 2014, 3(2): e29510.
- [27] Liu M, Cheng X F, Yan H, et al. miR-135-5p alleviates bone cancer pain by regulating astrocyte-mediated neuroinflammation in spinal cord through JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(10): 4802-4815.
- [28] 马玲, 吴超, 姜山. 基于 GFAP/STAT3 通路探讨夹脊电针对脊髓损伤修复的作用[J]. 中国医科大学学报, 2024, 53(10): 900-906.
Ma L, Wu C, Jiang S. Effect of Jiaji electroacupuncture on spinal cord injury repair based on the GFAP/STAT3 pathway (in Chinese) [J]. *Journal of China Medical University*, 2024, 53(10): 900-906.

收稿日期: 2025-10-19 修回日期: 2025-12-08