

☆ XXXX ☆

“醒脑开窍”针刺通过Epac1/Rap1信号通路调控 内皮细胞骨架重排修复血脑屏障

席锦泽^{1,2}, 黄正^{1,2}, 淡晓芸^{1,2}, 徐文韬^{1,2}, 倪光夏^{1,2}(¹南京中医药大学针灸推拿学院·养生康复学院, 南京 210023; ²南京中医药大学针药结合教育部重点实验室, 南京 210023)

【摘要】 目的:观察“醒脑开窍”针刺法对大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)大鼠大脑皮层缺血半暗带(IP)区环磷酸腺苷调节鸟嘌呤核苷酸交换因子1(Epac1)/大鼠肉瘤蛋白相关蛋白1(Rap1)信号通路的影响,探讨该针刺法通过修复血脑屏障(BBB)减轻脑缺血再灌注损伤(CIRI)的分子途径。方法:将84只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、针刺组、针刺+ESI-09(Epac1抑制剂)组,每组21只。除假手术组外,其余组采用改良Longa线栓法建立右侧MCAO/R模型。针刺组取“水沟”及双侧“内关”行“醒脑开窍”针刺法,针刺+ESI-09组再灌注后腹腔注射ESI-09(10 mg/kg)并同法针刺。激光散斑血流成像仪监测脑血流(缺血前、缺血2 h、缺血2 h再灌注后);改良Bederson评分评估神经功能缺损情况(再灌注24 h);氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测脑梗死体积百分比;干湿质量法测定右脑含水量;伊文思蓝(EB)染色法评估右脑皮层BBB通透性;Western blot及实时荧光定量PCR法检测右脑皮层IP区Epac1、Rap1蛋白及mRNA表达;免疫荧光染色法检测右脑皮层IP区F-肌动蛋白(F-actin)与血小板内皮细胞黏附分子(CD31,内皮细胞标志物)荧光共定位面积占比;透射电子显微镜观察右脑皮层IP区BBB超微结构。结果:除假手术组外,各组缺血后脑血流量下降至基线的70%以下,2 h再灌注后恢复至基线的70%以上,模型成功。再灌注后24 h,与假手术组相比,模型组神经功能评分、梗死体积百分比、脑含水量及EB含量均升高($P<0.01$),右脑皮层IP区Epac1、Rap1蛋白及mRNA表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),F-actin与CD31共定位面积占比升高($P<0.01$),BBB基底膜模糊、断续,紧密连接(TJ)局部溶解甚至缺失。与模型组相比,针刺组大鼠上述损伤指标均改善($P<0.01$),右脑皮层IP区Epac1、Rap1蛋白及mRNA表达升高($P<0.01$),F-actin与CD31共定位面积占比降低($P<0.01$),BBB基底膜连续,TJ结构致密。与针刺组相比,针刺+ESI-09组损伤指标回调($P<0.01$),右脑皮层IP区Epac1、Rap1蛋白及mRNA表达降低($P<0.01$),F-actin与CD31荧光共定位面积占比升高($P<0.01$),BBB基底膜仍模糊,TJ区域溶解。结论:“醒脑开窍”针刺法通过调控大脑皮层IP区Epac1/Rap1通路诱导内皮细胞骨架重排,缓解CIRI后BBB损伤。

【关键词】 针刺;Epac1/Rap1信号通路;血脑屏障;脑缺血再灌注损伤;内皮细胞骨架重排

“Xingnao Kaiqiao” acupuncture repairs the blood-brain barrier by regulating endothelial cell cytoskeleton rearrangement through the Epac1/Rap1 signaling pathway

XI Jin-ze^{1,2}, HUANG Zheng^{1,2}, DAN Xiao-yun^{1,2}, XU Wen-tao^{1,2}, NI Guang-xia^{1,2} (¹College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, College of Health and Rehabilitation, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; ²Key Laboratory of Acupuncture and Medicine of Ministry of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of the “Xingnao Kaiqiao” (regaining consciousness and opening orifice) acupuncture method on the exchange protein directly activated by exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1)/Ras-associated protein 1 (Rap1) signaling pathway in the ischemic penumbra (IP) region of the cerebral cortex in a middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) rat model, and to explore the molecular pathway by

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251233

引用格式:席锦泽,黄正,淡晓芸,等.“醒脑开窍”针刺通过Epac1/Rap1信号通路调控内皮细胞骨架重排修复血脑屏障[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-9.

项目来源:国家自然科学基金资助项目(No.82274639,82474624,82104993)

通信作者:倪光夏, E-mail: xgn66@njucm.edu.cn

which this acupuncture method alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) through repairing the blood-brain barrier (BBB). **Methods** Eighty-four male SD rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, an acupuncture group, and an acupuncture + ESI-09 (Epac1 inhibitor) group, with 21 rats in each group. Except for the sham operation group, the other groups underwent a modified Longa thread embolization method to establish a right MCAO/R model. The acupuncture group received “Xingnao Kaiqiao” acupuncture at “Shuigou” (GV26) and bilateral “Neiguan” (PC6); the acupuncture + ESI-09 group received intraperitoneal injection of ESI-09 (10 mg/kg) after reperfusion and underwent acupuncture in the same manner. Laser speckle flowmetry was used to monitor cerebral blood flow (before ischemia, at 2 h of ischemia, and after 2 h of reperfusion); the modified Bederson scale was used to assess neurological deficits (24 h after reperfusion); the percentage of cerebral infarction volume was measured using the triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining method; the water content of the right brain was measured using the dry-wet weight method; Evans blue (EB) staining was used to assess the permeability of the BBB in the right brain cortex; Western blot and real-time quantitative PCR were used to detect the expressions of Epac1 and Rap1 proteins and mRNAs in the IP region of the right cerebral cortex; immunofluorescence staining was used to detect the proportion of F-actin and platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31) co-localization area in the IP region of the right cerebral cortex; transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of the BBB in the IP region of the right cerebral cortex. **Results** Except for the sham operation group, cerebral blood flow decreased to less than 70% of baseline after ischemia and recovered to more than 70% of baseline after 2 h of reperfusion in all groups, indicating successful modeling. Twenty-four hours after reperfusion, compared with the sham operation group, the model group exhibited increased neurological function scores, infarct volume percentage, brain water content, and EB content ($P < 0.01$), as well as decreased Epac1 and Rap1 protein and mRNA expression levels in the IP region of the right cerebral cortex ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the proportion of F-actin and CD31 co-localization area increased ($P < 0.01$), and the BBB basement membrane became blurred and intermittent, with local dissolution or even loss of tight junctions (TJs). Compared with the model group, the acupuncture group showed improvements in all of the above indicators ($P < 0.01$). Compared with the acupuncture group, the acupuncture + ESI-09 group showed reversal of neurological function score, infarct volume percentage, brain water content, and EB content ($P < 0.01$), with decreased Epac1 and Rap1 protein and mRNA expression levels in the IP region of the right cerebral cortex ($P < 0.01$), an increased proportion of F-actin and CD31 co-localization area ($P < 0.01$), and a still blurred BBB basement membrane with TJs area dissolution. **Conclusion** “Xingnao Kaiqiao” acupuncture induces endothelial cytoskeleton rearrangement by regulating the Epac1/Rap1 pathway in the cerebral cortex IP region, thereby alleviating BBB damage after CIRI.

【KEYWORDS】 Acupuncture; Epac1/Rap1 signaling pathway; Blood-brain barrier; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Endothelial cytoskeleton rearrangement

急性缺血性脑卒中(AIS)是一种由脑部血流供应受阻引发的急性脑血管疾病,可导致严重的脑组织损伤^[1-3]。当前临床治疗AIS的核心策略是尽早恢复缺血脑组织的血流灌注,然而这一过程涉及一系列复杂的级联反应,极易造成脑缺血再灌注损伤(CIRI),导致神经功能损害进一步恶化^[4]。

血脑屏障(BBB)的破坏是CIRI发生的关键起始环节和核心病理特征^[5]。保护并修复受损BBB、维持中枢神经系统微环境稳态,是减轻CIRI、改善AIS预后的关键^[6]。近年来的研究显示,环磷酸腺苷调节鸟嘌呤核苷酸交换因子1(Epac1)/大鼠肉瘤蛋白相关蛋白1(Rap1)信号通路在BBB保护中发挥关键作用,已成为干预CIRI的潜在靶点^[7]。其中,Epac1特异性激活小三磷酸鸟苷结合蛋白Rap1,促

进内皮细胞F-肌动蛋白(F-actin)的解聚,通过调节内皮细胞骨架动态重排,增强内皮细胞间紧密连接(TJ)结构的稳定性,逆转CIRI诱导的BBB破坏^[7-8]。

课题组前期研究^[9]已证实,“醒脑开窍”针刺法可通过基质金属蛋白酶网络保护BBB完整性,发挥对CIRI的治疗作用。但该针刺法是否通过影响内皮细胞骨架维持BBB完整性,及其与Epac1/Rap1信号通路的关联尚未明确。本研究旨在探讨“醒脑开窍”针刺法对BBB的保护效应是否通过调控Epac1/Rap1通路实现,为针刺干预CIRI提供新的理论依据与作用靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康SPF级SD雄性大鼠84只,体质量为

220~250 g,购自上海斯莱克有限公司[生产许可证号:SCXK(京)2021-0011]。动物饲养于南京中医药大学动物中心,环境条件设定为室温(23 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 10)%。本实验方案已通过南京中医药大学动物伦理委员会审批(伦理审批号:202504A055),实验流程严格遵循《实验动物福利伦理审查清单》^[10]。

将动物随机分为假手术组、模型组、针刺组、针刺+ESI-09(Epac1抑制剂)组,每组21只。

1.2 主要试剂与仪器

Epac1抑制剂(ESI-09,美国MCE),氯化三苯基氮唑(TTC,美国Sigma),Epac1抗体(美国CST),Rap1、 β -actin抗体(武汉三鹰),F-actin抗体(成都正能生物),HRP标记的山羊抗兔IgG、HRP标记的山羊抗鼠IgG(上海翌圣),血小板内皮细胞黏附分子(CD31,内皮细胞标志物)抗体(美国Thermo Fisher),Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG、Alexa Fluor 647标记的山羊抗鼠IgG(英国Abcam),伊文思蓝(EB,美国Sigma)。

华佗牌针灸针(0.18 mm \times 13 mm,苏州医疗用品厂),小动物气麻机、激光散斑血流成像仪(深圳瑞沃德),超声波细胞破碎仪(南京先欧),高速冷冻离心机(德国Eppendorf),冰冻切片机(德国Leica),垂直电泳系统及转膜系统(美国Bio-Rad),透射电子显微镜(日本Jeol),多功能酶标仪(美国Biotek),化学发光显影仪(法国Vilber),Image J图像分析系统(美国国立卫生研究院),电子天平(上海菁海),实时荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher),正置荧光显微镜(日本Nikon)。

1.3 模型制备方法

改良Longa线栓法^[11]建立右侧大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)模型。将大鼠以5%异氟烷(氧流量2 L/min)吸入诱导麻醉后转用2.5%异氟烷维持,仰卧位固定,颈部作纵行切口,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)及颈内动脉(ICA)。于ECA近心端2 mm处剪一小口,插入线栓,缓慢推进ICA内闭塞2 h,激光散斑血流成像系统显示右脑血流灌注量下降至基线值的70%以下,轻提线栓至ECA切口处实现再灌注,此时右脑血流恢复至基线值的70%以上判定为模型制备成功^[12]。假手术组仅行ECA结扎处理,不实施线栓插入及血管阻断操作。

1.4 干预方法

针刺组:再灌注成功后即刻予“醒脑开窍”针刺

法主穴进行干预,主穴取“水沟”(鼻唇沟上1/3与中1/3交界处)及双侧“内关”(前臂掌侧腕横纹上3 mm,桡侧腕屈肌腱与掌长肌腱之间),定位标准参照《实验动物常用穴位名称与定位第2部分:大鼠》^[13],见图1。选用0.18 mm \times 13 mm无菌针灸针,首先直刺“内关”3 mm,施以提插捻转泻法(提插深度 ± 1 mm,捻转角度 180°),持续1 min;继而斜刺“水沟”穴,针体与鼻中隔呈 45° 角进针2~3 mm,行雀啄手法(深度1~2 mm),持续1 min。留针30 min,干预1次。

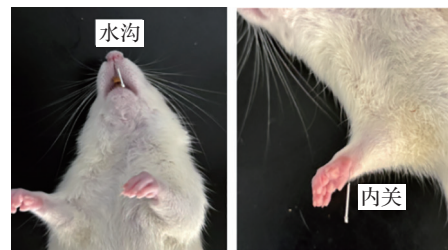


图1 大鼠“水沟”、“内关”穴位标注

Fig. 1 Marking of the “Shuigou” (GV26) and “Neiguan” (PC6) of rats

针刺+ESI-09组:再灌注后即刻腹腔注射ESI-09(10 mg/kg,浓度1.3 mg/mL)^[14],随后立即进行针刺干预,干预方法同针刺组。

1.5 观察指标及检测方法

脑血流量监测确定入组标准:沿矢状缝切开大鼠颅顶皮肤,暴露右侧顶骨,距前凶后侧2 mm、中线右侧2 mm处制备矩形骨窗,保留硬脑膜完整。在缺血前、缺血2 h和缺血2 h再灌注后采集数据,采用激光散斑血流成像系统监测大脑中动脉供血区脑血流量变化。

改良Bederson评分^[15]评估大鼠神经功能缺损情况:再灌注后24 h进行评估。0分:自主活动对称,无神经功能缺损体征;1分:左侧前肢轻度屈曲内收,伸展功能受限;2分:提尾时左侧前肢呈胸壁贴附状态;3分:拉尾时向左侧转圈;4分,自主活动时向左侧倾倒;5分:意识丧失或自主呼吸停止。

TTC染色法测定大鼠脑梗死体积百分比:再灌注后24 h断头取全脑放于 -20°C 冰箱冻存30 min,自额极后连续切取6片厚度为(2.0 \pm 0.1) mm的冠状位脑切片,浸入染液中避光孵育8 min后拍照,通过Image J软件进行定量分析。分别计算全脑总体积与梗死区体积,脑梗死体积百分比(%)=(梗死区体积 \div 全脑总体积) $\times 100\%$ 。

干湿质量法测定大鼠右脑含水量:再灌注后24

h断头取全脑,去除嗅球、小脑及脑干,沿矢状缝将大脑半球剖分,滤纸吸干表面液体后,称量右半球湿重。将样本干燥至恒重,记录此时重量为干重。按公式计算脑含水量:脑含水量(%)=[(湿重-干重)÷湿重]×100%。

EB染色法评估大鼠右脑皮层BBB通透性:取材前2h尾静脉注射2%EB溶液(0.4 mL/100 g),经左心室灌注0.9%的氯化钠溶液至右心房流出液澄清。取大脑右半球,滤纸吸除表面液体称重后浸入甲酰胺溶液中,匀浆后避光孵育24 h。取上清液使用酶标仪于620 nm波长测定吸光度值,通过EB标准曲线计算脑组织EB含量。

Western Blot检测大鼠右脑皮层缺血半暗带(IP)区Epac1和Rap1蛋白相对表达:取右脑皮层IP区组织100 mg,加入RIPA裂解液,匀浆离心后获取上清。将蛋白定量制备成相同体积的储备液,随后上样、电泳、转膜、封闭后加入一抗(Epac1 1:1 000、Rap1 1:5 000、β-actin 1:10 000),4℃摇床过夜,洗膜后加入二抗,孵育2 h,再次洗膜后显影。采用Image J软件处理图片,分析各指标灰度值,用目的蛋白和内参蛋白的比值做为相对表达量并与假手术组比较,进行归一化分析。

实时荧光定量PCR法检测大鼠右脑皮层IP区Epac1和Rap1 mRNA相对表达:取右脑皮层IP区组织100 mg,于EP管中加入Trizol、氯仿研磨,取沉淀物,干燥后溶于DEPC水,测定RNA浓度,随后反转录为cDNA。以cDNA为模板配制反应体系并进行PCR扩增,384板点样封口,上机设定相应反应条件:95℃预变性5 min;变性95℃10 s,退火57.5℃20 s,延伸72℃20 s,40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA相对表达。引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Epac1	上游 AAGCAGGACTTCAACCGCAT	73
	下游 CCACTTTGCCGTGTTCTTCC	
Rap1	上游 GATCTGGAAGATGAGCGGGT	73
	下游 AGGCACAGTTACACCACTGTC	
GAPDH	上游 AGAGACAGCCGCATCTTCTT	235
	下游 TTCTCAGCCTTGACTGTGCC	

注:Epac1为环磷酸腺苷调节鸟嘌呤核苷酸交换因子1, Rap1为大鼠肉瘤蛋白相关蛋白1。

免疫荧光染色法检测大鼠右脑皮层IP区F-actin与CD31荧光共定位面积占比:大鼠脑组织经灌注后取出并置于多聚甲醛中固定,蔗糖脱水、包埋后制备冷冻切片(14 μm)。PBST洗涤,封闭,二次洗涤,与抗体F-actin(1:200)、CD31(1:100)孵育18 h。次日,加入Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG(1:500)、Alexa Fluor 647标记的山羊抗鼠IgG(1:500)孵育2 h,洗涤后封片。荧光正置显微镜下采集图像,CD31为红色,F-actin为绿色,使用Image J测量共定位面积与红色面积,F-actin与CD31荧光共定位面积占比=共定位面积/红色面积。

透射电子显微镜观察大鼠右脑皮层IP区BBB超微结构:大鼠脑组织经4%多聚甲醛灌注后,快速切取右脑皮层IP区1 mm×1 mm×1 mm的组织块依次置于2.5%戊二醛电镜固定液、四氧化锇中固定。经丙酮梯度脱水、渗透,于618环氧树脂包埋,用超薄切片机制作厚约60~90 nm包埋切片,经醋酸铀酰、柠檬酸铅中依次染色后,置于透射电子显微镜下观察BBB超微结构。

1.6 统计学分析

用统计软件SPSS27与绘图软件Graphpad Prism 9.5对数据进行分析处理。符合正态分布的资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组内比较采用配对样本t检验,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用Tukey检验;非正态分布资料以中位数(上下四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,采用非参数检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 大鼠造模前、缺血后和再灌注后脑血流量比较

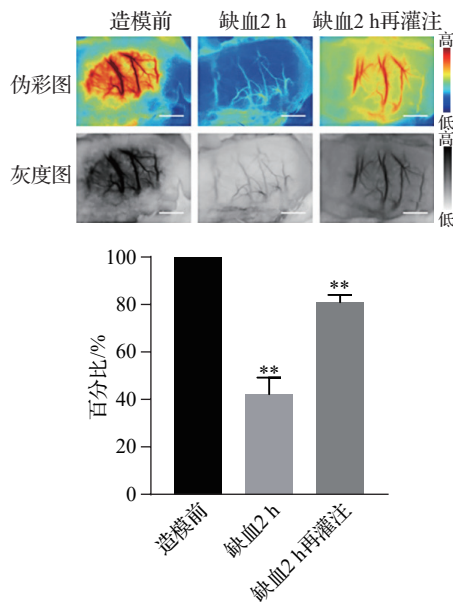
在大鼠造模前监测脑血流量,插入线栓2 h后,脑血流量下降至基线值的70%以下($P<0.01$),缺血2 h再灌注后,脑血流量恢复至基线值的70%以上($P<0.01$),提示模型建立成功。63只大鼠造模成功,成模率为100%。见图2。

2.2 各组大鼠神经功能评分比较

再灌注后24 h,与假手术组大鼠比较,模型组大鼠神经功能缺损评分升高($P<0.01$);与模型组比较,针刺组大鼠神经功能缺损评分降低($P<0.01$);与针刺组比较,针刺+ESI-09组大鼠神经功能缺损评分升高($P<0.05$)。见表2。

2.3 各组大鼠脑梗死体积百分比比较

与假手术组大鼠比较,模型组大鼠脑梗死体积



注:与造模前比较,** $P<0.01$ 。
图2 大鼠脑缺血前后和再灌注后脑血流量变化
(激光散斑血流成像, $\bar{x}\pm s$, 63只鼠)

Fig. 2 Comparison of cerebral blood flow changes before and after ischemia and after reperfusion in rats (laser speckle blood flow imaging, $\bar{x}\pm s$, 63 rats)

表2 各组大鼠神经功能缺损程度比较
[$M(P_{25}, P_{75})$, 21只鼠/组]

Table 2 Comparison of the degree of neurological deficit of rats in the 4 groups [$M(P_{25}, P_{75})$, 21 rats/group]

组别	评分/分	H值	P值 (整体)	对比 组别	调整后 P值
假手术组(A)	0(0,0)			B vs A	0.000
模型组(B)	4(4,4)			C vs B	0.000
针刺组(C)	1(1,2)	78.829	<0.001	D vs C	0.042
针刺+ESI-09组(D)	3(2.5,3)			—	—

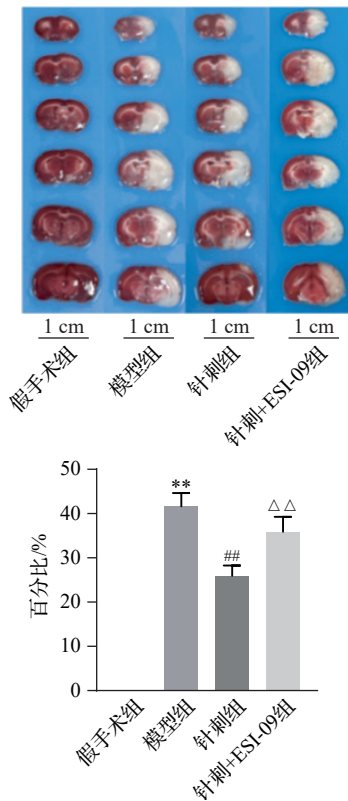
百分比明显升高($P<0.01$);与模型组比较,针刺组大鼠脑梗死体积百分比明显降低($P<0.01$);与针刺组比较,针刺+ESI-09组大鼠脑梗死体积百分比明显升高($P<0.01$)。见图3。

2.4 各组大鼠右脑含水量比较

与假手术组大鼠比较,模型组大鼠右脑含水量明显升高($P<0.01$);与模型组比较,针刺组大鼠右脑含水量明显降低($P<0.01$);与针刺组比较,针刺+ESI-09组大鼠右脑含水量上升($P<0.01$)。见图4。

2.5 各组大鼠右脑EB含量比较

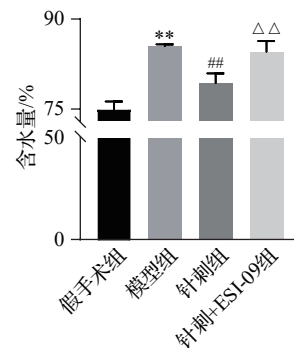
与假手术组大鼠比较,模型组大鼠右脑EB含



注:TTC为氯化三苯基四氮唑。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与针刺组比较,ΔΔ $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠脑梗死体积百分比比较
(TTC染色, $\bar{x}\pm s$, 5只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of cerebral infarction volume percentage of rats in the 4 groups (TTC staining, $\bar{x}\pm s$, 5 rats/group)

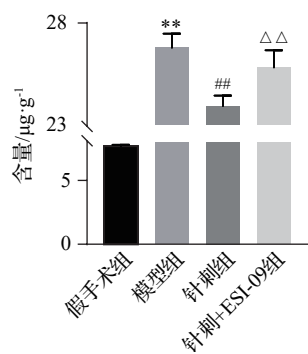


注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与针刺组比较,ΔΔ $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠右脑含水量比较($\bar{x}\pm s$, 4只鼠/组)

Fig.4 Comparison of the water content in right cerebral hemisphere of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 4 rats/group)

量明显升高($P<0.01$);与模型组比较,针刺组大鼠右脑EB含量明显降低($P<0.01$);与针刺组比较,针刺+ESI-09组大鼠右脑EB含量明显升高($P<0.01$)。见图5。



注:EB为伊文思蓝。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与针刺组比较,△△ $P<0.01$ 。

图5 各组大鼠右脑EB含量比较($\bar{x}\pm s$,4只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of the EB content in right cerebral hemisphere of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 4 rats/group)

2.6 各组大鼠右脑皮层IP区Epac1和Rap1蛋白相对表达量比较

与假手术组比较,模型组大鼠右脑皮层IP区Epac1、Rap1蛋白相对表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,针刺组大鼠右脑皮层IP区Epac1、Rap1蛋白相对表达量升高($P<0.01$);与针刺组相比,针刺+ESI-09组大鼠右脑皮层IP区Epac1、Rap1蛋白相对表达量降低($P<0.01$)。见图6。

2.7 各组大鼠右脑皮层IP区Epac1和Rap1 mRNA相对表达量比较

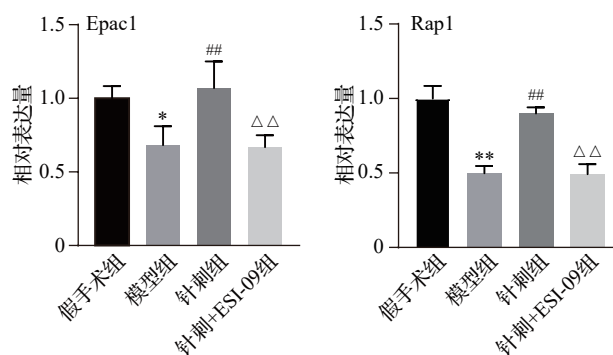
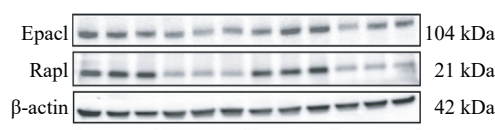
与假手术组比较,模型组大鼠右脑皮层IP区Epac1、Rap1 mRNA相对表达量降低($P<0.01$);与模型组比较,针刺组大鼠右脑皮层IP区Epac1、Rap1 mRNA相对表达量升高($P<0.01$);与针刺组比较,针刺+ESI-09组大鼠右脑皮层IP区Epac1、Rap1 mRNA相对表达量降低($P<0.01$)。见图7。

2.8 各组大鼠右脑皮层IP区F-actin与CD31荧光共定位面积占比比较

与假手术组比较,模型组大鼠右脑皮层IP区F-actin与CD31荧光共定位面积占比升高($P<0.01$);与模型组比较,针刺组右脑皮层IP区F-actin与CD31荧光共定位面积占比降低($P<0.01$);与针刺组比较,针刺+ESI-09组大鼠右脑皮层IP区F-actin与CD31荧光共定位面积占比升高($P<0.01$)。见图8。

2.9 各组大鼠右脑皮层IP区BBB中TJ结构比较

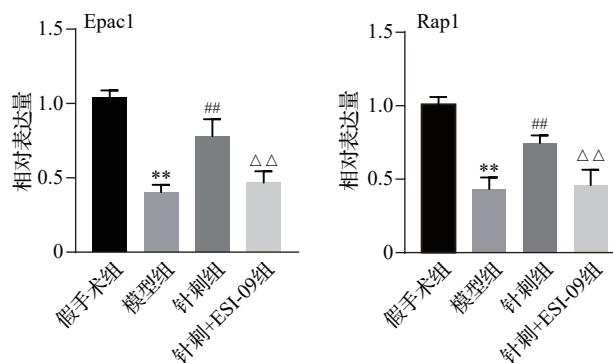
假手术组大鼠右脑皮层IP区BBB超微结构完整,表现为基底膜连续清晰、厚薄均匀,TJ结构致密,血管壁形态正常。模型组大鼠右脑皮层IP区



注:IP为缺血半暗带,Epac1为环磷酸腺苷调节鸟嘌呤核苷酸交换因子1,Rap1为大鼠肉瘤蛋白相关蛋白1。与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与针刺组比较,△△ $P<0.01$ 。

图6 各组大鼠右脑皮层IP区Epac1、Rap1蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$,4只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of relative expression levels of Epac1 and Rap1 proteins in the right cerebral cortex IP region of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 4 rats/group)

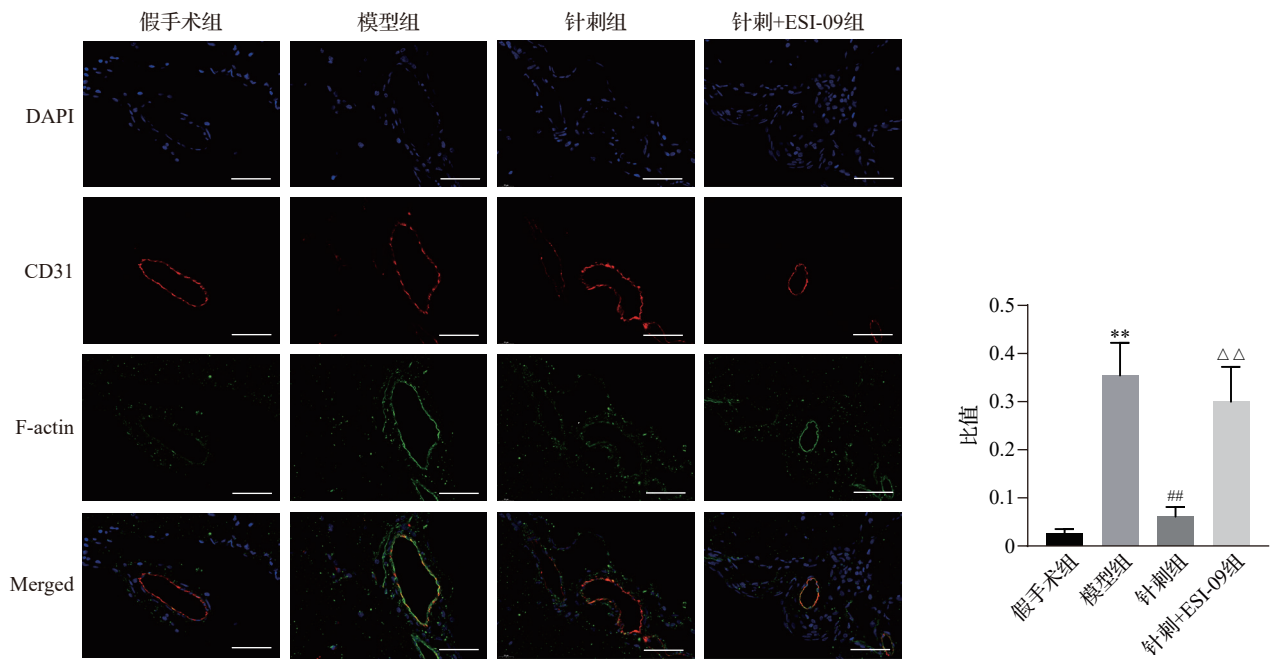


注:IP为缺血半暗带,Epac1为环磷酸腺苷调节鸟嘌呤核苷酸交换因子1,Rap1为大鼠肉瘤蛋白相关蛋白1。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与针刺组比较,△△ $P<0.01$ 。

图7 各组大鼠右脑皮层IP区Epac1、Rap1 mRNA相对表达量比较($\bar{x}\pm s$,4只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of relative expression levels of Epac1 and Rap1 mRNAs of the right cerebral cortex IP region of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 4 rats/group)

BBB则出现明显结构性损伤,表现为基底膜模糊、断续,TJ局部溶解甚至缺失。而针刺组大鼠右脑皮层IP区BBB超微结构损伤明显减轻,基底膜基本



注:IP为缺血半暗带,F-actin为F-肌动蛋白,CD31为血小板内皮细胞黏附分子,标尺=。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与针刺组比较,ΔΔ $P<0.01$ 。

图8 各组大鼠右脑皮层IP区F-actin与CD31荧光共定位面积占比比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$,4只鼠/组)

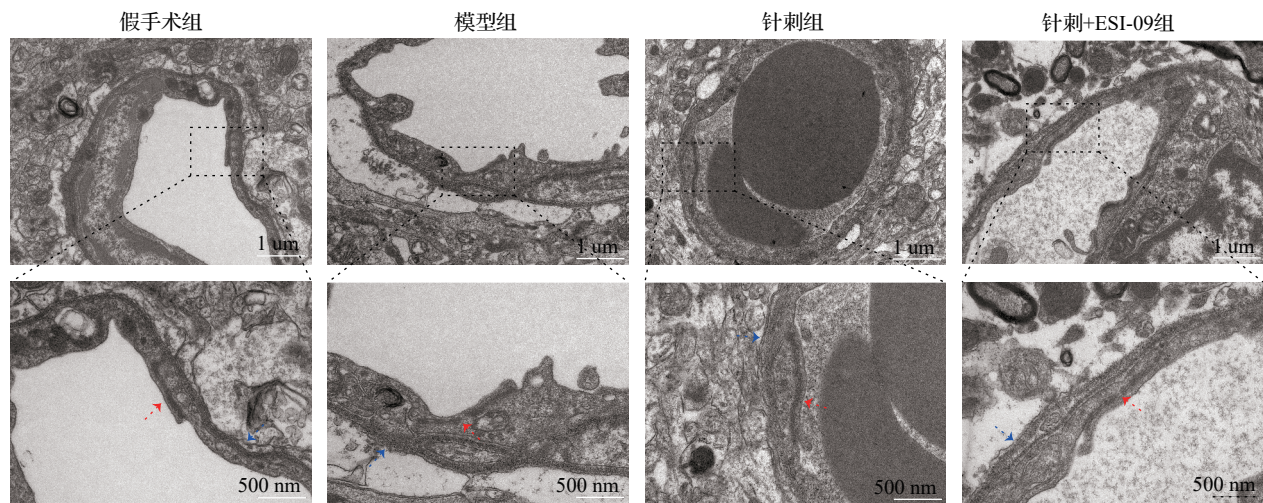
Fig. 8 Comparison of the proportion of F-actin and CD31 co-localization area in the right cerebral cortex IP region of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 4 rats/group)

连续,TJ结构较为致密。针刺+ESI-09组显示针刺的保护作用被部分逆转,BBB超微结构损伤程度加重,表现为基底膜再度模糊、TJ结构溶解。见图9。

3 讨论

“醒脑开窍”针刺法是由国医大师石学敏院士创立的主要针对中风病的独具特色、疗效卓著的针

灸治疗方法,其核心治疗思路是“通督调神、开窍启闭”。其中主穴水沟穴有调和督脉气血、通关启闭、开窍醒神之功;内关穴具益气行血、化瘀通络、调摄元神之效。该针刺法被广泛应用于中风病的救治与康复^[16]。本研究结果显示,该针刺法可有效改善MCAO/R大鼠的神经功能缺损情况和脑梗死体积百分比,减轻CIRI。



注:下图为上图框选处的放大图,红色箭头示紧密连接(TJ)结构,蓝色箭头示基底膜。IP为缺血半暗带,BBB为血脑屏障。

图9 各组大鼠右脑皮层IP区BBB中TJ结构比较(透射电子显微镜)

Fig. 9 Comparison of TJ structure in BBB of the right cerebral cortex IP region of rats in the 4 groups

BBB破坏是CIRI的核心病理环节,其结构与功能完整性的丧失直接导致血管源性脑水肿、炎症细胞浸润及神经毒性物质入脑^[17]。而TJ作为BBB的物理屏障基础,其稳定性受到内皮细胞骨架动态重排的精密调控^[18-19]。F-actin作为内皮细胞骨架的核心标志物,在生理状态下,其以网络结构形式存在,经闭锁小带蛋白锚定于TJ跨膜蛋白,CIRI后内皮细胞F-actin发生异常聚合,形成张力纤维并产生强烈收缩力,致使TJ结构被机械性破坏,最终导致BBB通透性升高^[14,20]。本研究结果与既往研究结果一致,显示CIRI后F-actin与内皮标志物CD31的共定位面积占比显著增强,说明内皮细胞肌动蛋白骨架发生异常聚合与重构,进而牵拉TJ结构,破坏屏障完整性。而针刺干预后,F-actin与CD31的共定位面积占比下降,TJ结构得到保护,BBB通透性降低,提示“醒脑开窍”针刺可能通过调节内皮细胞骨架的重排过程,增强TJ稳定性,从而减轻BBB损伤。

Epac1/Rap1信号通路在维持BBB功能中扮演关键角色^[21]。生理状态下,Epac1被环磷酸腺苷激活后特异性活化Rap1,促进内皮细胞F-actin解聚并抑制收缩纤维形成,增强内皮细胞间TJ结构的稳定性^[7,22]。本研究的结果显示,CIRI后IP区Epac1/Rap1表达下调,内皮细胞骨架发生重排,BBB被破坏;而针刺可上调该通路关键蛋白及基因表达,且该效应可被Epac1抑制剂ESI-09逆转。这表明“醒脑开窍”针刺可能通过激活Epac1/Rap1通路,调控下游肌动蛋白动力学,进而稳定TJ、修复BBB。这一结果为阐释针刺保护BBB的作用机制提供了分子路径,也提示Epac1/Rap1通路可作为针灸治疗CIRI的潜在靶标。

本研究虽初步明确了针刺通过Epac1/Rap1通路调控骨架重排发挥BBB保护作用,但其上游调控机制仍有待深入探讨。未来研究可进一步结合细胞模型、基因编辑及多组学技术,揭示针刺调控Epac1/Rap1通路的更上游信号通路变化及其网络整合机制;还可进一步开展临床研究,结合影像学、生物标志物等手段,验证该针法在急性缺血性脑卒中患者中的BBB保护效应。

综上,本研究从新的视角初步提示“醒脑开窍”针刺法可通过Epac1/Rap1信号通路调控内皮细胞骨架重排,修复BBB,减轻CIRI。未来可进一步深化针刺对该通路的上下游调控网络研究,并推动基础研究成果向临床实践转化,充分发挥针灸在急性

脑卒中防治中的特色优势,以与近期发布的《针灸科学研究行动计划》中所倡导的核心理念契合^[23]。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] JANG H, PARK S, KIM M S, et al. Global, regional and national burden of alopecia areata and its associated diseases, 1990—2019: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Eur J Clin Invest*, 2023, 53 (6) : e13958.
- [2] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2022, 145 (8) : e153 - e639.
- [3] 《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, 封3.
The editorial team of “China Stroke Prevention and Treatment Report”, 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, 封3.
- [4] HILKENS N A, CASOLLA B, LEUNG T W, et al. Stroke [J]. *Lancet*, 2024, 403(10446): 2820-2836.
- [5] FAN S W, DU H Y, YAO Y X, et al. Protection against stroke-induced blood-brain barrier disruption by Guanxinning injection and its active-component combination via TLR4/NF- κ B/MMP9-mediated neuroinflammation [J]. *Phytomedicine*, 2025, 147: 157162.
- [6] HUANG W T, CHEN X J, LIN Y K, et al. FGF17 protects cerebral ischemia reperfusion-induced blood-brain barrier disruption via FGF receptor 3-mediated PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 971: 176521.
- [7] SUN X M, WANG Y N, ZHAO Y C, et al. Activation of the Epac/Rap1 signaling pathway alleviates blood-brain barrier disruption and brain damage following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 117: 110014.
- [8] SEHRAWAT S, CULLERE X, PATEL S, et al. Role of Epac1, an exchange factor for Rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(3): 1261-1270.
- [9] 宋扬扬,张新昌,徐文韬,等.醒脑开窍针刺法对脑梗死大鼠血脑屏障保护作用的实验研究[C]. 2024中国针灸学会年会论文集, 2024:1021-1026.
SONG Y Y, ZHANG X C, XU W T, et al. Experimental study on the protective effect of Xingnao Kaiqiao acupuncture on blood-brain barrier in rats with cerebral infarction (in Chinese) [C]. *Proceedings of the 2024 Annual Meeting of the Chinese Acupuncture and Moxibustion Society*, 2024 : 1021-1026.
- [10] 《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 Office of Acupuncture Research. Review list of welfare ethics of experimental animals in *Acupuncture Research* (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(2): 220.
- [11] LI Y Y, ZHANG J J. Animal models of stroke [J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(3): 204-219.
- [12] ZHU L, HUANG R, FENG J R, et al. Shexiang Tongxin Dropping Pills attenuate ischemic microvascular dysfunction via suppressing P66Shc-mediated mitochondrial respiration deficits[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 346: 119664.
- [13] 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 commonly used acupoints in experimental animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [14] CHU W, SUN X M, ZHU X X, et al. Blockade of platelet glycoprotein receptor Ib ameliorates blood-brain barrier disruption following ischemic stroke via Epac pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 111698.
- [15] BIEBER M, GRONWOLD J, SCHARF A C, et al. Validity and reliability of neurological scores in mice exposed to middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 2019, 50(10): 2875-2882.
- [16] 石学敏. “醒脑开窍”针刺法治疗中风病9005例临床研究 [J]. 湖南中医药导报, 2005(1): 3-5.
SHI X M. Clinical research on the treatment of 9005 cases of apoplexy with the acupuncture method of sharpening mind and inducing consciousness (in Chinese) [J]. *Hunan Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology*, 2005(1): 3-5.
- [17] ZONG P Y, FENG J L, LI C X, et al. Activation of endothelial TRPM2 exacerbates blood-brain barrier degradation in ischemic stroke[J]. *Cardiovasc Res*, 2024, 120(2): 188-202.
- [18] KIM Y E, KIM M, KIM S, et al. Endothelial SHANK3 regulates tight junctions in the neonatal mouse blood-brain barrier through β -Catenin signaling[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 1407.
- [19] BAYIR E, SENDEMIR A. Role of intermediate filaments in blood-brain barrier in health and disease [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1400.
- [20] LARIONOV A, FILGUEIRA L, HAMMER C M. Endothelial cell transition: preliminary data on cross-organ shift from brain to liver[J]. *Cells*, 2025, 14(19): 1538.
- [21] GARCÍA-PONCE A, SCHUSTER K, DØSKELAND S O, et al. Epac1 is crucial for maintenance of endothelial barrier function through a mechanism partly independent of Rac1[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2170.
- [22] RAMOS C J, LIN C M, LIU X W, et al. The EPAC-Rap1 pathway prevents and reverses cytokine-induced retinal vascular permeability [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(2): 717-730.
- [23] 针灸科学研究联盟. 针灸科学研究行动计划 [J]. 针刺研究, 2025, 50(1): 1-2.
Acupuncture Scientific Research Alliance. A plan for acupuncture-moxibustion scientific research (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(1): 1-2.

收稿日期:2025-11-14 修回日期:2026-02-05