

“夹脊”电针通过调控NLRP3炎性小体活化改善肌萎缩侧索硬化症小鼠肢体功能障碍

王仕林^{1,2}, 何 龙¹, 杨 静¹, 张 娜¹, 孙远征², 刘关平²

(¹黑龙江中医药大学针灸推拿学院, 哈尔滨 150040; ²黑龙江中医药大学附属第二医院, 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的:观察“夹脊”电针对肌萎缩侧索硬化症(ALS)小鼠腰段脊髓NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎性小体的调控作用,探究“夹脊”电针治疗ALS肢体功能障碍的作用机制。**方法:**将54只携带人超氧化物歧化酶1 G93A(hSOD1^{G93A})基因的小鼠随机分为模型组、夹脊电针组和抑制剂组,18只/组,将18只不携带hSOD1^{G93A}基因的小鼠作为野生组。在各组小鼠60日龄时,夹脊电针组给予电针腰(L)1~L2、L5~L6“夹脊”(连续波,1 mA,2 Hz,20 min/次,2次/周),抑制剂组给予小鼠腹腔注射NLRP3抑制剂(10 mg/kg,2次/周),各组均连续干预4周。观察并比较各组小鼠生存期差异;转棒式疲劳实验评估小鼠运动协调能力及肢体运动功能;HE染色法观察小鼠腓肠肌形态变化、腓肠肌肌纤维横截面面积以评估肌肉萎缩程度;Nissl染色法观察脊髓前角运动神经元数量;Western blot法检测脊髓NLRP3、半胱天冬酶1(Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素18(IL-18)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白表达;实时荧光定量PCR法检测脊髓NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α mRNA表达。**结果:**与野生组比较,模型组小鼠生存期缩短($P<0.01$);13周龄起转棒时间缩短($P<0.05$);腓肠肌肌纤维明显缩短、呈幼圆形,肌纤维间隙增大,见细胞核内移或外漏,腓肠肌肌纤维横截面面积减小($P<0.01$);脊髓前角运动神经元数量减少($P<0.01$);脊髓NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 蛋白及mRNA表达增加($P<0.01$)。与模型组比较,抑制剂组和夹脊电针组小鼠生存期延长($P<0.01$);13周龄起转棒时间延长($P<0.05$);腓肠肌肌纤维边缘更规整、形态更大,肌纤维间隙缩小,幼圆形肌纤维数量降低,细胞核内移和外漏现象改善,腓肠肌肌纤维横截面面积增大($P<0.01$);脊髓前角运动神经元数量增多($P<0.01$);脊髓NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 蛋白及mRNA表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与抑制剂组比较,夹脊电针组小鼠17周龄起转棒时间延长($P<0.05$);腓肠肌肌纤维横截面面积增大($P<0.05$);脊髓NLRP3、Caspase-1、IL-18蛋白及mRNA表达增加($P<0.05$, $P<0.01$),TNF- α 蛋白及mRNA表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**“夹脊”电针可以改善ALS小鼠肢体功能障碍,延长其生存期,内在机制可能与抑制脊髓NLRP3炎性小体激活从而减轻神经炎症反应有关。

【关键词】 “夹脊”电针;肌萎缩侧索硬化症;NLRP3炎性小体;腓肠肌;神经炎症反应

“Jiaji” (EX-B2) electroacupuncture modulates NLRP3 inflammasome activation to improve limb dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis mice

WANG Shi-lin^{1,2}, HE Long¹, YANG Jing¹, ZHANG Na¹, SUN Yuan-zheng², LIU Guan-ping² (¹College of Acupuncture-Moxibustion and Massage, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; ²The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the regulatory effect of “Jiaji” (EX-B2) electroacupuncture (EA) on the NOD-like receptor thermal protein domain-associated protein 3 (NLRP3) inflammasome in the lumbar spinal cord and to

【DOI】 10.13702/j.1000-0607.20251237

引用格式:王仕林,何龙,杨静,等.“夹脊”电针通过调控NLRP3炎性小体活化改善肌萎缩侧索硬化症小鼠肢体功能障碍[J].针刺研究,2026,51(8):1044-1052.

项目来源:国家青年科学基金项目(C类,No.82505779);2023年黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(No.2023jyscx004);国家中医药管理局全国老中医药专家传承工作室建设项目(No.国中医药人教发[2014]20号)

通信作者:刘关平, E-mail:736773462@qq.com

explore its mechanism in improving limb dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice. **Methods** Fifty-four mice carrying the human superoxide dismutase 1 G93A (hSOD1^{G93A}) gene were randomly divided into model, Jiaji EA, and inhibitor groups, with 18 mice per group. Eighteen mice not carrying the hSOD1^{G93A} gene served as wild group. At 60 d of age, the Jiaji EA group was given EA at L1—L2 and L5—L6 EX-B2 points with continuous wave, 1 mA, 2 Hz. The needles retained for 20 min, twice every week. The inhibitor group received intraperitoneal injection of the NLRP3 inhibitor (10 mg/kg, twice every week). All treatments were administered for 4 consecutive weeks. The survival period of mice in each group was observed to assess disease progression; the rotarod test was conducted to evaluate motor coordination and limb motor function; HE staining was used to observe pathological changes in the gastrocnemius, and muscle atrophy was assessed by measuring the cross-sectional area of the gastrocnemius fiber; Nissl staining was performed to evaluate the number of motor neurons in the lumbar spinal cord anterior horns; the protein expressions of NLRP3, Caspase-1, apoptosis-associated speck-like protein (ASC), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the lumbar spinal cord were detected by Western blot; the mRNA expressions of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , IL-18, and TNF- α were detected by real-time quantitative PCR. **Results** Compared with the wild group, mice in the model group exhibited shortened survival time ($P<0.01$); reduced time spent on the rotating rod starting from the 13th week of age ($P<0.05$); significantly shorter and rounded gastrocnemius fibers with enlarged inter-fiber spaces, nuclear translocation and leakage. The cross-sectional area of the gastrocnemius fibers was reduced ($P<0.01$); the number of motor neurons in the spinal anterior horns was decreased ($P<0.01$); protein and mRNA expressions of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , IL-18, and TNF- α were increased in the lumbar spinal cord ($P<0.01$). Compared with the model group, survival time was prolonged in the Jiaji EA and inhibitor groups ($P<0.01$); rotarod time was prolonged starting from the 13th week of age ($P<0.05$); gastrocnemius fibers exhibited more regular margins and larger morphology, with reduced inter-fiber spaces, and reduced number of rounded fibers and improvement in nuclear translocation and leakage; cross-sectional areas of gastrocnemius fiber were increased ($P<0.01$); the numbers of motor neurons in the spinal anterior horns were increased ($P<0.01$); protein and mRNA expressions of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , IL-18, and TNF- α decreased in the lumbar spinal cord ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the inhibitor group, mice in the Jiaji EA group exhibited prolonged rotarod time from the 17th week of age ($P<0.05$); the cross-sectional area of the gastrocnemius fiber increased ($P<0.05$); protein and mRNA expressions of NLRP3, Caspase-1 and IL-18 in the lumbar spinal cord were higher ($P<0.05$, $P<0.01$), while protein and mRNA expressions of TNF- α were lower ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** EX-B2 EA improves limb function and prolongs survival in ALS mice, with its underlying mechanism potentially involving the alleviation of neuroinflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome activation.

【KEYWORDS】 Jiaji electroacupuncture; Amyotrophic lateral sclerosis; NLRP3 inflammasome; Gastrocnemius; Neuroinflammation

肌萎缩侧索硬化症(ALS)是一种致命性的神经退行性疾病,以上、下运动神经元变性丢失为基本病理特征^[1],患者确诊后平均预期寿命为3~5年^[2]。目前,美国食品药品监督管理局批准的3种有效治疗药物也仅能延长ALS患者一定的生存时间,难以改变其疾病自然史^[3-4]。因此,当前ALS的相关治疗手段有限,迫切需要有效的防治方案来改善患者生存现状,加快ALS治疗领域的发展。

研究^[5-8]发现,ALS患者及动物模型中的突变型人超氧化物歧化酶1(hSOD1)会发生错位折叠并形成聚集物,该聚集物可作为损伤相关分子模式,独立激活NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎性小体^[9]。激活后的NLRP3炎性小体会诱导下游炎性级联反应的发生和白细胞介素1 β

(IL-1 β)、白细胞介素18(IL-18)等炎症因子的大量释放,引发神经炎性病理改变,导致神经元变性、死亡,加剧ALS病理进程及致死性结局的发生。课题组前期研究^[10-11]虽已证实“夹脊”电针能够减轻hSOD1^{G93A}小鼠腰段脊髓(简称腰髓)神经炎性病理改变,延缓病情进展,但其在腰髓节段的抗炎机制及其对相关因子的作用机制仍不明确。本研究旨在通过观察“夹脊”电针对hSOD1^{G93A}小鼠腰髓NLRP3炎性小体的调控作用,探究“夹脊”电针改善hSOD1^{G93A}小鼠肢体功能障碍的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源

4只hSOD1-G93A-1Gur/J转基因雄性小鼠和

20只C57BL/6J Nifdc雌性小鼠,SPF级,28~34日龄,体质量12~17 g,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。将雄、雌鼠按照1:5比例合笼饲养于黑龙江中医药大学安全评价中心动物实验室,使用许可证号:SYXK(黑)2021-010,恒温22~27℃,相对恒湿(40%~50%),12 h/12 h明暗交替,自由摄食饮水,期间给予灭菌水及颗粒型无菌鼠类饲料,合笼生产的子代鼠经基因鉴定后纳入后续分组实验。本实验各项操作均遵循科技部《关于善待实验动物的指导性意见》进行,并通过黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会审批(伦理审批号:2023121401)。

1.2 主要试剂与仪器

MCC950抑制剂、总蛋白提取试剂盒(德国Sigma-Aldrich),戊巴比妥钠(四川维克奇生物科技),核酸染料(北京天根生化),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京兰杰柯),4%多聚甲醛、Nissl染色试剂盒(北京索莱宝),NLRP3、半胱天冬酶1(Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、IL-1 β 、IL-18、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、GAPDH抗体(美国Affinity Biosciences),BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒、Western blot溶液套装、山羊血清、彩色预染蛋白质分子量标准(10~180 kDa)均由上海碧云天生物提供,RNA微量提取试剂盒、RevertAid RT反转录试剂盒、DNA快速提取试剂盒(美国赛默飞)。

一次性使用针灸针(0.14 mm $\times$ 7 mm,北京珞亚山川),神经电刺激仪(HANS-100A,南京济生),电泳仪(上海伯乐生命),梯度PCR扩增仪(广东立诺),微孔板扫描酶标仪(上海安婷),生物显微镜及成像系统(日本尼康),高灵敏化学发光成像系统(上海木森),超微量核酸蛋白测定仪(美国Thermo),实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad),MINI凝胶自动成像仪(以色列DNR)。

1.3 基因鉴定及分组

在子代鼠30~35日龄时,取小鼠足小趾用于PCR基因鉴定。随机选取经PCR鉴定后的携带hSOD1^{G93A}基因的ALS-hSOD1^{G93A}转基因阳性小鼠54只,采用随机数字表法将其分为模型组、夹脊电针组和抑制剂组,每组18只。同时随机选取经PCR鉴定后不携带hSOD1^{G93A}基因的小鼠18只,作为野生组。

1.4 干预方法

在各组小鼠60日龄时,夹脊电针组使用医用胶

带将小鼠固定在无菌操作台,小鼠呈俯卧位,四肢伸展,背部充分暴露且脊柱无偏移。腧穴定位参考《实验针灸学》中“夹脊”定位^[12],采用一次性无菌针灸针直刺小鼠双侧腰(L)1~L2、L5~L6“夹脊”2~4 mm,HANS-100A神经电刺激仪正负极连接小鼠脊柱同侧两针柄,采用连续波,1 mA,2 Hz,留针20 min,2次/周(周一、周四各1次)。抑制剂组给予小鼠腹腔注射NLRP3抑制剂(MCC950,浓度10 mg/mL,注射剂量10 mg/kg)^[13],2次/周。模型组、抑制剂组和野生组给予与电针组相同的抓握及固定方式。各组均连续干预4周。

1.5 组织样本采集

在各组小鼠120日龄时(模型组疾病中末期),各组随机选取12只小鼠取脊髓L1~L6全节段和腓肠肌组织,剩余6只继续观察其肢体功能和生存期。予0.3%戊巴比妥钠(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉,麻醉后剪开小鼠胸腔,充分暴露心脏,分别使用0.9%氯化钠溶液、4%多聚甲醛溶液进行心脏灌注。灌注后固定小鼠,剥离小鼠背部肌肉,打开椎管,暴露脊髓,截取脊髓组织;同时剥除小鼠下肢表皮,用镊子剥离其腓肠肌。6只经0.9%氯化钠溶液灌注后剥离的脊髓组织放置冻存管内于-80℃冰箱保存,用于后续的Western blot和实时荧光定量PCR检测;6只经4%多聚甲醛溶液灌注后剥离的脊髓和腓肠肌组织放置于4%多聚甲醛溶液内固定24 h,流水冲洗12 h后石蜡包埋,切片切片(厚度为4 μ m),37℃电热恒温干燥箱内过夜干燥,用于后续HE染色及Nissl染色。

1.6 观察指标及检测方法

生存期统计:参照美国ALS治疗发展研究所(ALSTDI)神经功能评分标准^[14]判定小鼠生存期。当小鼠后肢完全瘫痪,肌肉明显萎缩,无法前行,侧倒后双侧均无法在10 s内翻身即为终点事件,该终点事件的日龄作为小鼠生存期。从各组小鼠60日龄起,实验人员每2 d对小鼠进行1次ALSTDI神经功能评分,直至终点事件的发生。

转棒式疲劳实验评估小鼠运动协调能力及肢体运动功能^[15]:于各组小鼠53日龄时进行1周的适应性转棒式疲劳实验,每日1次,每次3轮转棒运动。适应性转棒期间,第1天设置转速为10 r/min,每日转速增加1 r/min,转速达到15 r/min时稳定适应2 d;于小鼠60日龄开始进行正式的转棒实验,记录小鼠在转棒仪上持续运动而不掉落的时间。设置转速15 r/min,时长180 s,各组小鼠每日进行1次

转棒式疲劳实验,每次3轮。当小鼠每轮转棒时长为180 s及以上时则记为180 s,若不足180 s则记录小鼠实际运动时长,3轮中取时间最长的1轮作为当日转棒式疲劳实验结果记录。每周进行2次转棒式疲劳实验测试,取2次均值作为周结果进行统计分析。

HE染色观察小鼠腓肠肌形态并测量腓肠肌肌纤维横截面面积:将腓肠肌组织切片置于二甲苯、梯度乙醇中脱蜡,随后于苏木精染液中浸泡10 min,经分化、返蓝后于0.5%伊红染液中浸泡7 min,经脱水、透明后树脂封片,200倍镜下观察小鼠腓肠肌形态。每张切片选取3个视野进行摄片,使用Image J(V1.8.0)图像处理软件计算腓肠肌肌纤维横截面面积,取3个视野面积的均值作为该切片腓肠肌肌纤维横截面面积。

Nissl染色观察小鼠腰髓前角运动神经元数量:腰髓组织切片依次经二甲苯脱蜡、逐级乙醇脱苯、1%甲苯胺蓝浸泡1 h进行细胞着色、分化、脱水,二甲苯透明10 min后中性树脂封片,200倍镜下观察腰髓前角运动神经元数量。按每只小鼠取连续3张切片,每张切片取1个标准化视野计数,取3张切片计数均值作为该动物腰髓前角运动神经元数量。

Western blot法检测小鼠腰髓NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 蛋白表达:称取小鼠腰髓组织25 mg,总蛋白提取试剂盒提取蛋白;BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,加入SDS上样缓冲液,震荡后于沸水中煮10 min变性,冷却后上样,经电泳、转膜、封闭后行抗体孵育;加入NLRP3(1:1 000)、ASC(1:500)、Caspase-1(1:10 000)、IL-1 β (1:1 000)、IL-18(1:1 000)、TNF- α (1:1 600)、GAPDH(1:5 000)一抗,室温孵育1.5 h后TBST清洗3次,加入二抗(山羊抗兔IgG 1:1 000),室温孵育45 min后TBST清洗3次。滴加ECL化学发光液于化学发光成像系统设备中曝光5~10 s显影成像,用Image J软件对条带灰度值进行定量分析,以GAPDH为内参进行目标蛋白相对表达量计算(目标蛋白条带灰度值/GAPDH条带灰度值),并将野生组蛋白相对表达量均值设为1对各组蛋白的相对表达量进行归一化处理。

实时荧光定量PCR法检测腰髓NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α mRNA的相对表达量:取小鼠腰髓组织15 mg,按照RNA提取试剂盒操作步骤提取总RNA并测定浓度和纯度后,使用反转录试剂盒以组织总RNA为模板,反转录为cDNA,配置PCR反应体系进行扩增。反应条

件:预变性(95 $^{\circ}$ C)300 s,变性(95 $^{\circ}$ C)20 s,退火(55 $^{\circ}$ C)20 s,延伸(72 $^{\circ}$ C)20 s,其中变性、退火和延伸为40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量算法计算靶基因mRNA相对表达量,以野生组数据为1对各组进行归一化处理。引物信息见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
NLRP3	上游 TCACAACCTCGCCCAAGGAGGAA	147
	下游 AAGAGACCACGGCAGAAGCTAG	
Caspase-1	上游 GGCACATTTCCAGGACTGACTG	125
	下游 CTGCTCAGAGTACAGCCAGAAC	
ASC	上游 CTGCTCAGAGTACAGCCAGAAC	125
	下游 CTGTCCTTCAGTCAGCACACTG	
IL-1 β	上游 TGGACCTTCCAGGATGAGGACA	148
	下游 GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	
IL-18	上游 GACAGCCTGTGTTCGAGGATATG	159
	下游 TGTTCCTTACAGGAGAGGGTAGAC	
TNF- α	上游 GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	139
	下游 GCCATAGAAGTATGAGAGGGAG	
GAPDH	上游 GGTGTCTCCTGCGACTTCA	183
	下游 TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	

注:NLRP3为NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3,Caspase-1为半胱天冬酶1,ASC为凋亡相关斑点样蛋白,IL-1 β 为白细胞介素1 β ,IL-18为白细胞介素18,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。

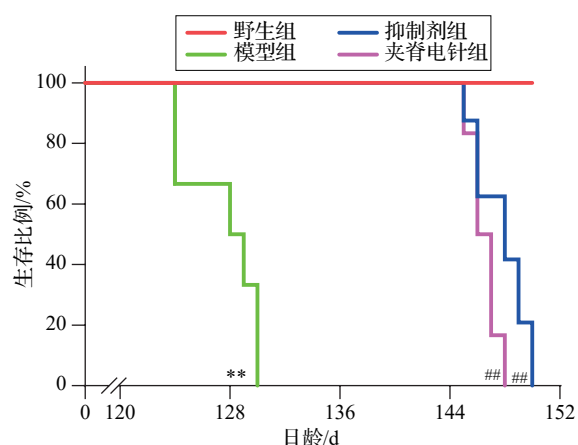
1.7 统计学处理

采用SPSS25.0统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,生存期以百分比(%)表示。若数据满足方差齐性则多组间独立样本比较采用单因素方差分析,用LSD法两两比较;若不满足方差齐性,组间比较则采用非参数检验;多时点组间比较采用Two-way ANOVA检验;生存期采用Log-rank检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组小鼠生存期比较

野生组小鼠未发病,其余各组小鼠均相继出现终点事件;与野生组比较,模型组小鼠生存期显著缩短($P<0.01$);与模型组比较,抑制剂组和夹脊电针组小鼠生存期均延长($P<0.01$)。见图1。



注:与野生组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图1 各组小鼠生存期比较(6只鼠/组)

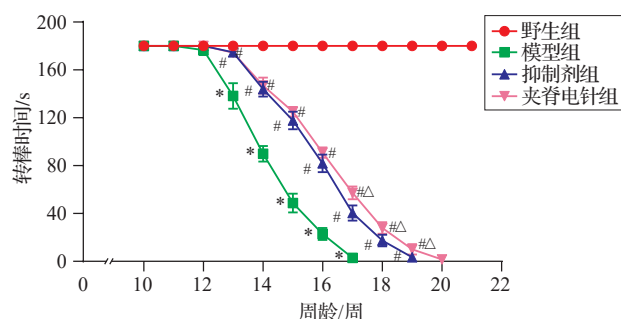
Fig. 1 Comparison of survival time of mice in the 4 groups (6 mice/group)

2.2 各组小鼠转棒式疲劳实验结果比较

野生组小鼠不发病,转棒时间一直为180 s;与野生组比较,模型组自13周龄起,转棒时间显著缩短($P<0.05$);与模型组比较,抑制剂组和夹脊电针组小鼠自13周龄起,转棒时间均显著延长($P<0.05$);与抑制剂组比较,夹脊电针组小鼠自17周龄起转棒时间延长($P<0.05$)。见图2。

2.3 各组小鼠腓肠肌形态比较

野生组小鼠腓肠肌肌纤维结构清晰、形态饱满、呈不规则多边形,各肌纤维之间分布紧密,染色均匀,未见明显病理改变;模型组小鼠腓肠肌肌纤维明显缩小、呈幼态圆形,各肌纤维之间间隙变大,



注:与野生组同时时间点比较,* $P<0.05$;与模型组同时时间点比较,## $P<0.05$;与抑制剂组同时时间点比较,△ $P<0.05$ 。

图2 各组小鼠各时点转棒时间比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

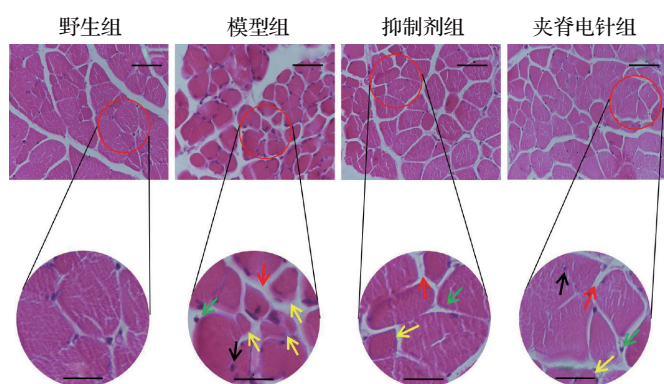
Fig. 2 Comparison of rotarod time at different time points of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

见细胞核内移及外漏现象;与模型组比较,抑制剂组和夹脊电针组小鼠腓肠肌肌纤维边缘更规整、形态更大,肌纤维间隙变小,幼圆形肌纤维数量、细胞核内移和外漏现象减少,病理损伤改善。见图3。

与野生组比较,模型组小鼠腓肠肌肌纤维横截面面积减小($P<0.01$);与模型组比较,抑制剂组和夹脊电针组小鼠腓肠肌肌纤维横截面面积增大($P<0.01$);与抑制剂组比较,夹脊电针组小鼠腓肠肌肌纤维横截面面积增大($P<0.05$)。见图3。

2.4 各组小鼠腰髓前角运动神经元数量比较

与野生组比较,模型组小鼠腰髓前角运动神经元数量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,抑制剂组和夹脊电针组小鼠腰髓前角运动神经元的数量均显著增加($P<0.01$)。见图4。

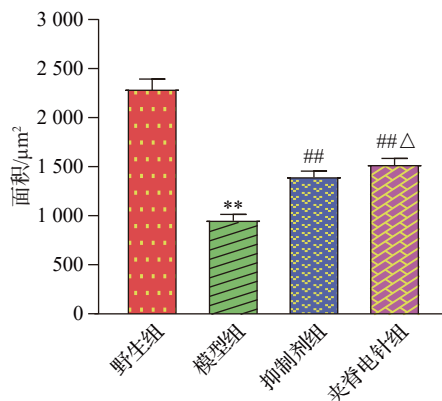


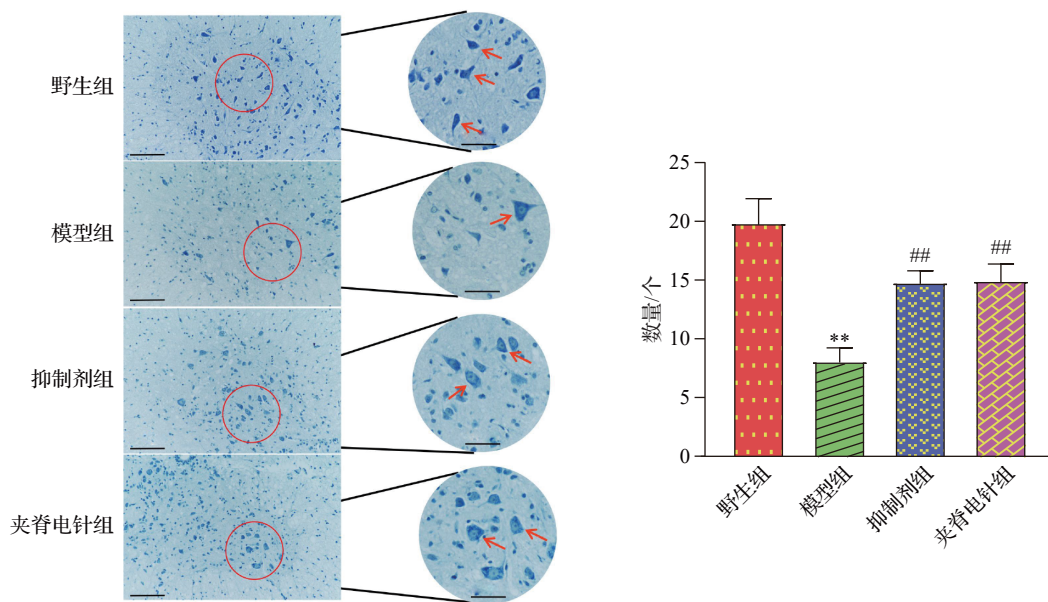
注:左侧方图标尺=100 μm ,圆形为方图框选区域放大图(标尺=50 μm);红色箭头示肌纤维间隙,黑色箭头示核内移,绿色箭头示核外漏,黄色箭头示幼圆形细胞。右图各组腓肠肌肌纤维横截面面积统计图。与野生组比较,** $P<0.01$;

与模型组比较,## $P<0.01$;与抑制剂组比较,△ $P<0.05$ 。

图3 各组小鼠腓肠肌形态及肌纤维横截面面积比较(HE染色, $\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of morphology and muscle fiber cross-sectional area of the gastrocnemius of mice in the 4 groups (HE staining, $\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)





注:左侧方图标尺=100 μm ,圆形为方图框选区域放大图(标尺=50 μm);红色箭头示运动神经元。右图为小鼠腰髓前角运动神经元计数统计图。与野生组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

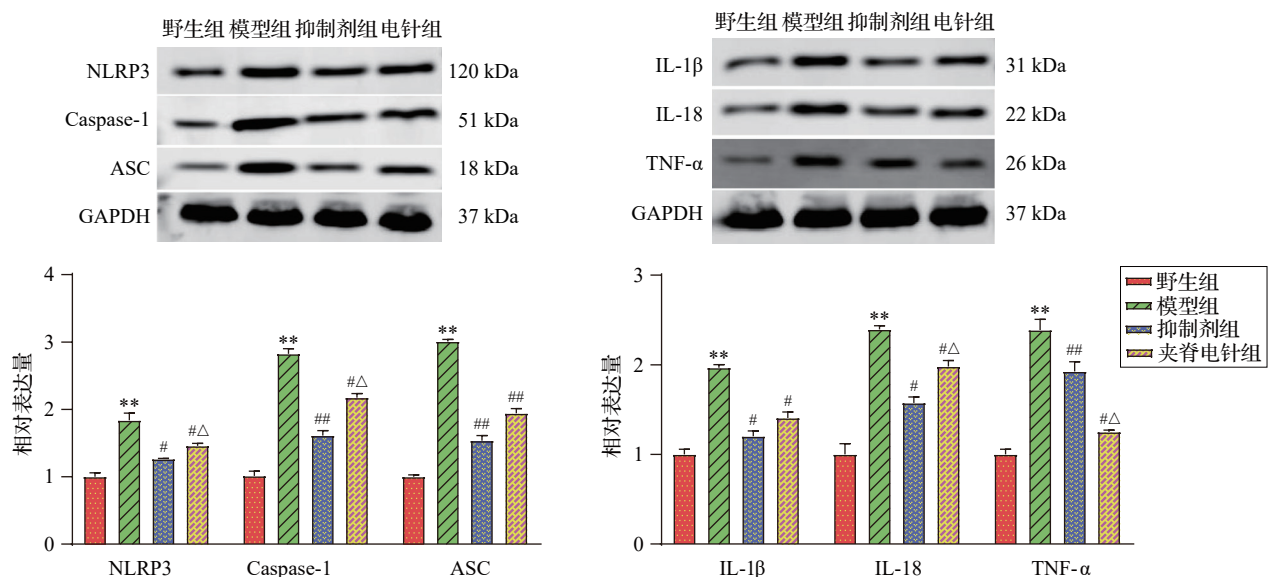
图4 各组小鼠腰段脊髓前角运动神经元细胞数比较(Nissl染色, $\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of the numbers of motor neurons in the lumbar spinal anterior horns of mice in the 4 groups (Nissl staining, $\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

2.5 各组小鼠腰髓NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 蛋白表达比较

与野生组比较,模型组小鼠腰髓NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 蛋白表达量显著增加($P<0.01$);与模型组比较,抑制剂组和夹

脊电针组小鼠腰髓NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α 蛋白表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$);与抑制剂组比较,夹脊电针组小鼠腰髓NLRP3、Caspase-1、IL-18蛋白表达量增加($P<0.05$), TNF- α 蛋白表达量降低($P<0.05$)。见图5。



注:NLRP3为NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3,Caspase-1为半胱天冬酶1,ASC为凋亡相关斑点样蛋白,IL-1 β 为白细胞介素1 β ,IL-18为白细胞介素18,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。与野生组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与抑制剂组比较,△ $P<0.05$ 。

图5 各组小鼠腰段脊髓NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18和TNF- α 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , IL-18, and TNF- α protein expression levels in the lumbar spinal cord of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 mice/group)

2.6 各组小鼠腰髓 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α mRNA 表达比较

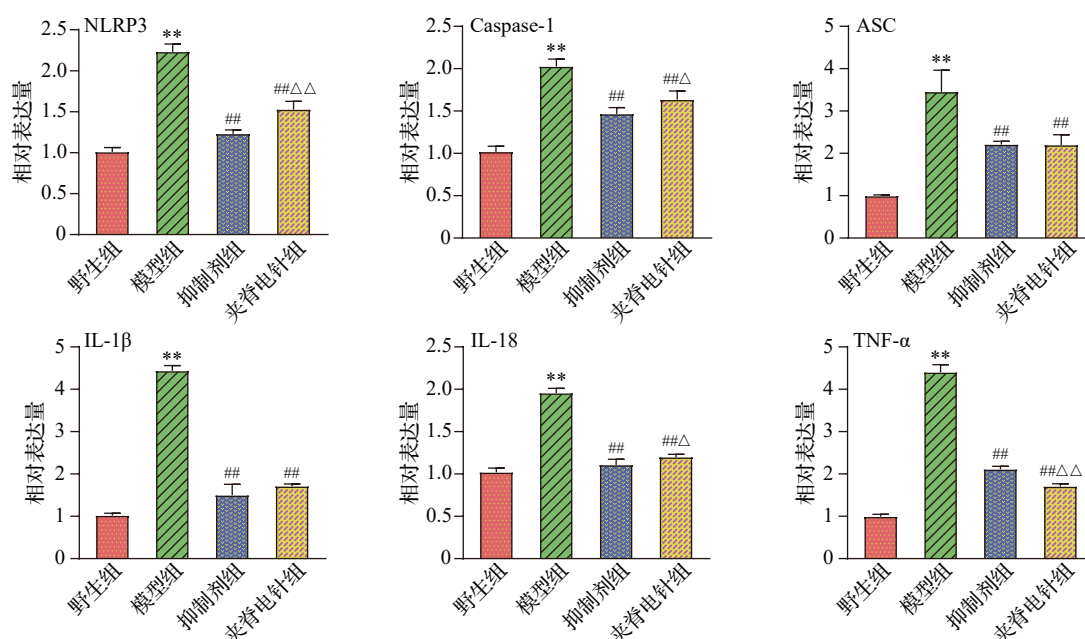
与野生组比较,模型组小鼠腰髓 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、TNF- α mRNA 表达增加($P<0.01$);与模型组比较,抑制剂组和夹脊电针组小鼠腰髓 NLRP3、Caspase-1、ASC、TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达降低($P<0.01$);与抑制剂组比较,夹脊电针组小鼠腰髓 NLRP3、Caspase-1、IL-18 mRNA 表达增加($P<0.01$, $P<0.05$),TNF- α mRNA 表达降低($P<0.01$)。见图 6。

3 讨论

ALS 作为临床罕见的神经退行性疾病,其发病后病情进展迅猛,严重危及患者生命。肢体功能障碍是 ALS 患者发病初期最具特征性的临床症状,随着病情进展,该症状会严重影响患者生存质量及日常活动能力^[16-17]。本研究所采用的 hSOD1^{G93A} 模型最早由贝克曼研究所建立^[18],因其与 ALS 存在相似的病理变化和临床症状特征而被认可并广泛应用于 ALS 的基础研究中。本研究结果显示,模型组小鼠呈现出生存期缩短、转棒时间下降、肌肉萎缩,同时伴腰髓运动神经元变性坏死等典型表现。hSOD1^{G93A} 模型鼠发病后以双侧后肢进行性无力、

肌萎缩及瘫痪为主要表型,故本研究将腰段“夹脊”作为针刺核心腧穴,并将疗效评估聚焦于后肢功能及肌肉萎缩相关指标。针刺 L1~L2 与 L5~L6 双侧“夹脊”,并通过上下两端连接电针,既能让腰膨大及支配后肢的关键节段区域均处于电针的电场内,又可同时将针感传递到脊髓中枢神经、脊神经分支、后肢周围神经及交感神经干,通过跨节段的节段性刺激影响局部神经环路与炎症反应微环境^[19-20],从而为改善小鼠肢体运动功能提供解剖与生理学基础。

从中医理论探析,ALS 的典型临床表现可归属于“痿证”范畴,其发病涉及多脏腑功能失调及邪气阻滞,治疗时应强调“调节脏腑气血”。而夹脊位于脊柱两侧,居“督脉之别”布散之处,又借督脉经别“别走太阳”与太阳经相连接,是与经络脏腑直接相互传输流注气血的腧穴。因此,针刺夹脊可一针通两经,振奋一身之阳,扶正固本。此外,夹脊毗邻背俞穴,针刺后经气借助背俞穴与脏腑的对应关系,输注精气传达脏腑功能信号,发挥沟通内外、通达气血、调节脏腑功能的作用^[21]。研究结果提示,“夹脊”电针不仅可以延长小鼠生存时间,还能减轻其肢体肌肉萎缩,提高肢体运动功能,与团队前期研究结果一致^[10]。



注: NLRP3 为 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3, Caspase-1 为半胱天冬酶 1, ASC 为凋亡相关斑点样蛋白, IL-1 β 为白细胞介素 1 β , IL-18 为白细胞介素 18, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。与野生组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$; 与抑制剂组比较, Δ $P<0.05$, ΔΔ $P<0.01$ 。

图 6 各组小鼠腰段脊髓 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of mRNA expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , IL-18, and TNF- α in lumbar spinal cord of mice in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

hSOD1^{G93A}模型小鼠下肢功能障碍的主要原因

为腰髓运动神经元变性丢失导致的肌肉萎缩,这一过程与神经炎性反应的异常调控密切相关。Weydt等^[22]认为,在检测hSOD1^{G93A}模型鼠的临床表型中,对神经肌肉的异常进行客观可靠的量化检测是最为重要的。本研究从小鼠腓肠肌病理形态和腓肠肌肌纤维横截面面积两个客观指标评估各组小鼠肌肉萎缩程度,结果显示,模型组小鼠腓肠肌肌束病理改变最严重,而抑制剂组和夹脊电针组的肌纤维萎缩程度得到了改善。骨骼肌是肢体协调运动的直接控制者,骨骼肌的萎缩程度直接影响肢体的运动功能,因此,本研究通过转棒实验评估各组小鼠的肢体运动功能。结果表明,“夹脊”电针能够延长hSOD1^{G93A}小鼠的转棒时间,这与小鼠肌肉萎缩改善的结果相一致,该结果可能与“夹脊”电针抑制腰髓神经炎性改变有关。

研究^[23-25]证实,神经炎性反应是导致ALS小鼠神经退行性改变的主要病理因素,持续性的慢性炎性反应促使神经元长期处于炎性浸润状态,诱导神经元变性、坏死。有研究指出,在ALS患者及动物模型的中枢及外周组织中可观察到NLRP3-ASC-Caspase-1轴相关分子上调及活化信号,并发现NLRP3是介导SOD1诱导小胶质细胞分泌IL-1 β 的关键炎性小体复合物^[26-27]。这些结果为本研究聚焦“腰髓NLRP3炎性小体-神经炎性反应-运动功能障碍”提供了前期依据。NLRP3炎性小体作为先天免疫系统中重要的多蛋白复合物,由NLRP3蛋白、ASC接头蛋白和Caspase-1组成,其主要功能是识别病原体或在多种信号刺激下组装激活,启动下游炎性级联反应诱发神经炎性反应^[8]。过表达的NLRP3蛋白因炎性反应等特异性激活信号触发自身构象变化,发生寡聚化招募适配体ASC,形成较大的朊蛋白样寡聚体^[28]。随后,ASC招募效应蛋白Caspase-1,ASC的胱天蛋白酶募集结构域与Caspase-1相互作用为Caspase-1的二聚化、自催化加工和生成提供支架^[29],自此,NLRP3炎性小体被组装激活,启动下游促炎信号转导。此时,效应蛋白Caspase-1会招募和激活促炎性反应蛋白酶,并切割pro-IL-1 β 和pro-IL-18,随后大量释放IL-1 β 、IL-18等炎性因子^[26,30],加剧ALS病情进展。然而,本研究发现“夹脊”电针能够下调hSOD1^{G93A}小鼠腰髓IL-1 β 、IL-18、TNF- α 蛋白及mRNA表达量,减轻小鼠腰髓前角运动神经元变性丢失。为进一步探究NLRP3炎性小体的激活在ALS疾病进展中的作用,以及

“夹脊”电针的作用机制,我们检测了NLRP3、Caspase-1、ASC蛋白和基因转录表达。结果发现,模型组小鼠腰髓NLRP3、Caspase-1、ASC蛋白和基因转录显著增加,而抑制剂组和夹脊电针组小鼠腰髓相应指标均降低。这提示hSOD1^{G93A}模型小鼠发病后脊髓组织确实存在NLRP3炎性小体的组装和启动,“夹脊”电针能够发挥类似NLRP3抑制剂的作用效果,抑制NLRP3炎性小体活化,减轻神经炎性反应。

值得注意的是,与抑制剂组相比,夹脊电针组在终末期腰髓NLRP3、Caspase-1、IL-18蛋白及mRNA表达相对更高,但TNF- α 蛋白及mRNA表达更低且运动功能改善更明显,这提示“夹脊”电针的作用并非局限于NLRP3单一末端环节,我们推测其可能通过多通路协同实现更为全面的神经保护作用。一方面,“夹脊”电针作为节段性刺激,可能经脊髓局部神经调控去甲肾上腺素、乙酰胆碱等神经递质水平及胶质细胞炎性反应表型,从而影响炎性小体“启动-激活”全过程,涉及核因子- κ B相关启动信号及氧化应激/线粒体稳态等“第二信号”,进而减弱下游炎性级联反应;另一方面,电针刺激亦可能通过迷走神经-免疫轴(胆碱能抗炎通路)或交感-免疫调节降低全身炎性反应负荷,间接减轻中枢炎性反应微环境。与此同时,单靶点抑制剂在“多炎性小体/多通路”炎性反应网络中可能存在代偿与旁路激活的局限。

综上所述,“夹脊”电针改善hSOD1^{G93A}小鼠肢体运动障碍的作用可能与抑制NLRP3炎性小体组装激活,减轻神经炎性反应,进而恢复腰髓运动神经元数量和结构功能密切相关。然而,本研究对于“夹脊”电针的起效机制仅做了初步探究,未深入探讨“夹脊”电针对NLRP3蛋白修饰作用及神经变性的具体机制。因此,课题组接下来的研究将重点关注“夹脊”电针对NLRP3泛素化及神经焦亡的具体调控机制,我们也将通过递质检测、神经阻断及更精准的基因干扰和质粒转染等方法,进一步明确并验证“夹脊”电针调节NLRP3炎性小体在神经保护中的具体机制,为临床应用提供更加精准的靶向治疗策略。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] FELDMAN E L, GOUTMAN S A, PETRI S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis[J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1363-1380.
- [2] GOUTMAN S A, SAVELIEFF M G, JANG D G, et al.

- The amyotrophic lateral sclerosis exposome: recent advances and future directions [J]. *Nat Rev Neurol*, 2023, 19(10): 617-634.
- [3] WEI Y Q, ZHONG S, YANG H J, et al. Current therapy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a review on past and future therapeutic strategies [J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 272: 116496.
- [4] ILIEVA H, VULLAGANTI M, KWAN J. Advances in molecular pathology, diagnosis, and treatment of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *BMJ*, 2023, 383: e075037.
- [5] BAKAVAYEV S, STAVSKY A, ARGUETI-OSTROVSKY S, et al. Blocking an epitope of misfolded SOD1 ameliorates disease phenotype in a model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Brain*, 2023, 146(11): 4594-4607.
- [6] TRIST B G, GENOUD S, ROUDEAU S, et al. Altered SOD1 maturation and post-translational modification in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord [J]. *Brain*, 2022, 145(9): 3108-3130.
- [7] XU J, SU X Y, BURLEY S K, et al. Nuclear SOD1 in growth control, oxidative stress response, amyotrophic lateral sclerosis, and cancer [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 427.
- [8] SINGH J, HABEAM M L, PANICKER N. Inflammasome assembly in neurodegenerative diseases [J]. *Trends Neurosci*, 2023, 46(10): 814-831.
- [9] HOLBROOK J A, JAROSZ-GRIFFITHS H H, CASELEY E, et al. Neurodegenerative disease and the NLRP3 inflammasome [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 643254.
- [10] 王仕林, 孙远征, 于天洋, 等. “夹脊”电针早期干预调控脊髓 Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路缓解肌萎缩侧索硬化症小鼠疾病进展 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(3): 287-293.
- WANG S L, SUN Y Z, YU T Y, et al. Early electroacupuncture intervention delays progression of disease in mice with amyotrophic lateral sclerosis by down-regulating TLR4/NF- κ B signaling (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(3): 287-293.
- [11] 孙远征, 于天洋, 赵广然, 等. 夹脊电针对肌萎缩侧索硬化 hSOD1^{G93A} 转基因小鼠脊髓 AEG-1 及 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(10): 5282-5286.
- SUN Y Z, YU T Y, ZHAO G R, et al. Effects of Jiaji (EX-B2) electro-acupuncture on AEG-1 and PI3K/Akt signaling pathway in lumbar spinal cord of ALS hSOD1^{G93A} transgenic mice (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2020, 35(10): 5282-5286.
- [12] 郭义. 实验针灸学 [M]. 5 版. 北京: 中国中医药出版社, 2021.
- GUO Y. Experimental acupuncturology (in Chinese) [M]. 5th edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [13] COLL R C, ROBERTSON A A B, CHAE J J, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 248-255.
- [14] HATZIPETROS T, KIDD J D, MORENO A J, et al. A quick phenotypic neurological scoring system for evaluating disease progression in the SOD1-G93A mouse model of ALS [J]. *J Vis Exp*, 2015(104): e53257.
- [15] MIANA-MENA F J, MUÑOZ M J, YAGÜE G, et al. Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS [J]. *Amyotroph Lateral Scler*, 2005, 6(1): 55-62.
- [16] MORESI V. Amyotrophic lateral sclerosis as a systemic disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7083.
- [17] MARCUS R. What is amyotrophic lateral sclerosis? [J]. *JAMA*, 2022, 328(24): 2466.
- [18] MARX J. Mouse model found for ALS [J]. *Science*, 1994, 264(5166): 1663-1664.
- [19] 王宇, 周鸿飞. 从脊神经节段理论论夹脊穴的解剖特点和临床应用 [J]. *中医药导报*, 2020, 26(10): 90-93.
- WANG Y, ZHOU H F. Anatomical characteristics and clinical application of Jiaji point from the theory of spinal ganglion segment (in Chinese) [J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2020, 26(10): 90-93.
- [20] 周新宇, 崔杨, 孙忠人, 等. “夹脊”电针调控 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路抑制脊髓损伤大鼠炎症反应的机制研究 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(11): 1129-1137.
- ZHOU X Y, CUI Y, SUN Z R, et al. Electroacupuncture of “Jiaji” (EX-B2) inhibits inflammatory response by regulating HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway in rats with spinal cord injury (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(11): 1129-1137.
- [21] 吴昊晨, 朱超, 苏航, 等. 华佗夹脊穴理论构建的认识与启示 [J]. *中国针灸*, 2024, 44(7): 851-855.
- WU H S, ZHU C, SU H, et al. Understanding and enlightenment of theoretical construction of Huatuo Jiaji (EX-B2) (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2024, 44(7): 851-855.
- [22] WEYDT P, HONG S Y, KLIOT M, et al. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS [J]. *NeuroReport*, 2003, 14(7): 1051-1054.
- [23] GAO C, JIANG J W, TAN Y Y, et al. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 359.
- [24] ZHANG C T, WANG H Y, LIANG W W, et al. Diphenyl diselenide protects motor neurons through inhibition of microglia-mediated inflammatory injury in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 165: 105457.
- [25] GROTTIELLI S, MEZZASOMA L, SCARPELLI P, et al. Cyclo (His-Pro) inhibits NLRP3 inflammasome cascade in ALS microglial cells [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2019, 94: 23-31.
- [26] CIHANKAYA H, BADER V, WINKLHOFFER K F, et al. Elevated NLRP3 inflammasome activation is associated with motor neuron degeneration in ALS [J]. *Cells*, 2024, 13(12): 995.
- [27] DEZFOULI M A, SHALILAHMADI D, SHAMSAEI G, et al. Circulating miR-223/NLRP3 axis and IL-1 β level in functional disease progression of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Acta Neurol Belg*, 2025, 125(3): 783-791.
- [28] HUANG Y, XU W, ZHOU R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [29] FU J N, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [30] VOET S, SRINIVASAN S, LAMKANFI M, et al. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(6): e10248.

收稿日期: 2025-11-16 修回日期: 2026-01-28