

IL-10/STAT1轴调控小胶质细胞/巨噬细胞极化介导手十二井穴刺络法对颅脑损伤小鼠神经功能的保护作用

苗诗雨^{1,2}, 张朝阳^{1,2}, 骆雨^{1,2}, 杨元祯^{1,2}, 赵佳玥^{1,2}, 彭亚君^{1,2}, 孙甘露^{1,2}, 郭义^{1,2,3,4},
秦思茹^{1,2}, 徐枝芳^{3,4,5}

(¹天津中医药大学实验针灸学研究中心, 天津 301617; ²天津中医药大学针灸推拿学院, 天津 301617; ³国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300193; ⁴天津市现代中医理论创新转化重点实验室, 天津 301617; ⁵天津中医药大学中医学院, 天津 301617)

【摘要】目的:观察手十二井穴刺络法(简称井穴刺络)干预能否经由白细胞介素10(IL-10)/信号转导与转录激活因子1(STAT1)途径,调控小胶质细胞与巨噬细胞表型极化,抑制过度神经炎症反应及神经元凋亡,进而改善颅脑损伤引起的神经功能缺损。**方法:**本研究采用雄性C57BL/6小鼠,实验共包含3项子实验。采用电子控制性脑皮质撞击仪行皮层撞击,制备创伤性颅脑损伤(TBI)模型。实验一随机选取12只健康小鼠做为假手术组,造模成功的24只小鼠随机均分为模型组、井穴刺络组;实验二采用STAT1激动剂2-NP激活STAT1,验证STAT1是否参与井穴刺络抗炎效应,将造模成功的小鼠随机分为模型组、井穴刺络组、井穴刺络+2-NP组,每组12只;实验三观察IL-10在井穴刺络抗炎中的作用,将造模成功的小鼠随机分为模型组、井穴刺络组、井穴刺络+IL-10拮抗组,每组10只。井穴刺络组、井穴刺络+2-NP组、井穴刺络+IL-10拮抗组小鼠在造模后即刻、24、48 h各进行1次井穴刺络放血治疗;井穴刺络+2-NP组于造模前及井穴刺络前1 h腹腔注射2-NP,井穴刺络+IL-10拮抗组于井穴刺络后1 h于受损皮层对侧脑室注射IL-10中和抗体以拮抗内源性IL-10。采用改良神经功能缺损(mNSS)评分、旷场实验评估神经功能及运动功能,免疫荧光法检测受损皮层凋亡神经元(NeuN⁺TUNEL⁺)、离子钙结合衔接分子1阳性小胶质细胞数量,液相芯片检测法测定受损皮层炎症因子水平,Western blot法检测STAT1、磷酸化(p)-STAT1蛋白表达,流式细胞术检测受损皮层M1型小胶质细胞、外周巨噬细胞比例。**结果:**与假手术组比较,模型组小鼠mNSS评分升高($P<0.01$),总移动距离减少($P<0.01$, $P<0.05$),运动皮层M1/M2区域的凋亡神经元占比、受损皮层小胶质细胞占比升高($P<0.05$, $P<0.01$),受损皮层中p-STAT1/STAT1比值、IL-10、白细胞介素2(IL-2)水平升高($P<0.01$)。与模型组比较,井穴刺络组小鼠mNSS神经功能缺损评分在造模后6、48 h降低($P<0.01$, $P<0.05$),48 h时的总移动距离增加($P<0.01$),凋亡神经元数量、受损皮层小胶质细胞占比下降($P<0.05$, $P<0.01$),受损皮层中抗炎因子IL-10水平升高($P<0.01$),IL-2水平和STAT1磷酸化水平下降($P<0.05$)。与井穴刺络组比较,井穴刺络+2-NP组小鼠mNSS评分、M1型小胶质细胞占比升高($P<0.01$);井穴刺络+IL-10拮抗组mNSS评分、p-STAT1/STAT1比值升高($P<0.05$, $P<0.01$),M1型巨噬细胞、M1型小胶质细胞占比升高($P<0.05$)。**结论:**井穴刺络法可通过IL-10/STAT1途径抑制小胶质细胞/巨噬细胞M1型极化,减少受损皮层炎症反应及神经元凋亡,改善神经功能缺损。

【关键词】 创伤性颅脑损伤;井穴刺络;大脑皮层;小胶质细胞;巨噬细胞;神经炎症反应;信号转导与转录激活因子1;白细胞介素10

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260560

引用格式:苗诗雨,张朝阳,骆雨,等.IL-10/STAT1轴调控小胶质细胞/巨噬细胞极化介导手十二井穴刺络法对颅脑损伤小鼠神经功能的保护作用[J].针刺研究,2026,51(10):1-13.

项目来源:天津市教科科研计划项目(No. 2024KJ018)

通信作者:徐枝芳, E-mail: xuzhifangmsn@hotmail.com

Protective effect of bloodletting at twelve Well-points of hand on neurological function by regulating cortical microglia/macrophage polarization through the IL-10/STAT1 pathway in mice with traumatic brain injury

Miao Shiyu^{1,2}, Zhang Chaoyang^{1,2}, Luo Yu^{1,2}, Yang Yuanzhen^{1,2}, Zhao Jiayue^{1,2}, Peng Yajun^{1,2}, Sun Ganlu^{1,2}, Guo Yi^{1,2,3,4}, Qin Siru^{1,2}, Xu Zhifang^{3,4,5} (¹Research Center of Experimental Acupuncture Science, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; ²College of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; ³National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300193; ⁴Tianjin Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Theory of Innovation and Application, Tianjin 301617; ⁵College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

[ABSTRACT] Objective To observe whether pricking blood therapy at the twelve Well points of the hand (Well-point bloodletting) can regulate the cortical phenotypic polarization of microglia and macrophages *via* the interleukin-10 (IL-10)/signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) pathway, suppress excessive neuroinflammation and neuronal apoptosis, and thereby alleviate neurological deficits induced by traumatic brain injury (TBI) in mice.

Methods Male C57BL/6 mice were used in the present study which is composed of 3 experiments. The TBI model was established by using an electronically controlled cortical impact device to perform cortical impact. Experiment 1: twelve mice randomly selected were used as the sham-operation group. Twenty-four TBI mice were randomly and equally divided into a model and a Well-point bloodletting group. Mice in the Well-point bloodletting group received interventions at 6 h, 24 h and 48 h after TBI respectively. The modified neurological severity score (mNSS) and open field test were used to assess the mouse's neurological deficits and locomotor function. Immunofluorescence staining was used to detect the apoptotic neurons (NeuN⁺TUNEL⁺) and the number of microglia (IBA1⁺) in the injured cerebral cortex tissues. Liquid chip assay was performed to measure the levels of inflammatory factors in the injured cortical tissues, and Western blot was used to detect the expression of cortical STAT1 protein. Experiment 2: The STAT1 agonist 2-NP was applied to activate STAT1 to verify whether STAT1 mediates the anti-inflammatory effect of Well-point bloodletting. Thirty-six TBI mice were randomly and equally divided into model, Well-point bloodletting and Well-point bloodletting+2-NP groups. Mice in the Well-point bloodletting+2-NP group received intraperitoneal injection of 2-NP 1 h before modeling and each bloodletting intervention. The mNSS was used to assess the neurological function, and flow cytometry was utilized to quantify the proportions of M1 microglia and macrophage in the injured cerebral cortex. Experiment 3: this part of the study is conducted to clarify the pivotal role of IL-10 in the anti-inflammatory effect of Well-point bloodletting. The successfully modeled TBI mice were randomly allocated to the model, Well-point bloodletting and Well-point bloodletting+IL-10 antagonist groups, with 10 mice in each group. Mice in the IL-10 antagonist group received injection of IL-10 neutralizing antibody into the lateral ventricle on the contralateral side of the injured cortex 1 h after each bloodletting intervention to block the endogenous IL-10. The neurological deficits were evaluated using mNSS. Western blot was used to detect STAT1 phosphorylation in the brain tissues, and the flow cytometry was applied to measure the proportions of M1 microglia and macrophage in the injured cerebral cortex tissues. **Results** Well-point bloodletting significantly reduced the mNSS scores at 6 h and 48 h ($P<0.01$, $P<0.05$) after TBI, down-regulated the proportions of apoptotic neurons and microglia ($P<0.05$, $P<0.01$), STAT1 phosphorylation ($P<0.05$) and IL-2 content ($P<0.05$), and increased the total travel distance 48 h after TBI ($P<0.01$) and IL-10 content ($P<0.01$). Well-point bloodletting+2-NP administration eliminated the effects of bloodletting in down-regulating the mNSS score after TBI ($P<0.01$) and the proportion of M1 microglia ($P<0.01$). Well-point bloodletting+IL-10 antagonist administration abolished the effects of Well-point bloodletting in lowering the mNSS score at 6, 24 and 48 h after TBI ($P<0.05$, $P<0.01$), suppressing STAT1 phosphorylation ($P<0.05$) and in reducing the proportions of M1 microglia and M1 macrophage in the injured cerebral cortex ($P<0.05$). **Conclusion** Well-point bloodletting can improve the neurological deficits and motor function in TBI mice, which may be related to its functions in inhibiting M1 polarization of microglia and macrophage through the IL-10/STAT1 pathway, and mitigating cortical neuroinflammation and neuronal apoptosis.

[KEYWORDS] Traumatic brain injury; Well-point bloodletting; Cerebral cortex; Microglia; Macrophage; Neuroinflammation; STAT1; IL-10

创伤性颅脑损伤(TBI)是指由于外界剧烈冲击力直接作用于脑部导致的脑组织损害,其已成为当

前全球范围内主要致死致伤的原因之一^[1]。TBI后继发性损伤是在原发性损伤基础上,由多种因素介导的脑组织进行性损害^[2]。其中,神经炎性反应是介导TBI继发性损伤的核心病理机制。TBI超急性期快速启动脑内炎性级联反应:小胶质细胞活化、外周免疫细胞浸润诱发神经炎性反应,大量肿瘤坏死因子 α 、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体释放,激活外源性凋亡通路,诱导神经元凋亡并造成永久性神经功能损伤^[3]。

目前,糖皮质激素与非甾体抗炎药等药物仍是临床治疗TBI后神经炎性反应的主流药物^[4]。但长期、大剂量使用该类药物易诱发胃肠道损伤、机体免疫功能抑制等多种不良反应,极大限制了其长期临床应用与治疗安全,亟需探索不良反应更低的替代或协同治疗方案。手十二井穴刺络放血疗法(简称井穴刺络)是中医传统特色急救疗法,历来被广泛应用于各类脑病急症的抢救与干预,在急性颅脑损伤的应急救治及预后改善中具备独特优势。临床研究证实井穴刺络能够有效改善颅脑创伤患者意识障碍,促进肢体运动功能缺损恢复^[5]。M1/M2运动皮层为执行运动输出的重要脑区,其受损会显著影响小鼠平衡能力及肢体力量^[6]。前期研究显示,井穴刺络可减少TBI小鼠运动皮层M1型小胶质细胞数量并降低受损脑组织中炎性因子、凋亡等相关基因的异常表达,通过抑制过度炎症反应进而促进神经元存活^[7],然而其抗炎效应的分子机制尚未阐明。信号转导与转录激活因子1(STAT1)的磷酸化激活在TBI后神经炎性反应发展中发挥关键调控作用,多项研究报告脑外伤后脑组织中STAT1被显著激活^[8-9]。激活后的STAT1可入核并介导小胶质细胞、巨噬细胞向促炎M1型极化,加剧脑内炎性损伤级联反应,敲除STAT1基因可显著抑制TBI后过度炎症反应,有效促进机体长期神经功能修复^[10-11]。由此可见,调控STAT1活性、抑制过度神经炎性反应,是改善TBI后神经功能损伤及优化患者预后的潜在关键治疗策略。已有研究表明,白细胞介素10(IL-10)作为单核/巨噬细胞分泌的核心抗炎因子可通过与其受体结合激活Janus激酶1/酪氨酸激酶2(JAK1/TYK2)通路抑制STAT1磷酸化,阻断免疫细胞的促炎转录程序,调节免疫细胞功能表型进而减轻炎症反应^[12-13]。然而,目前尚无研究系统探讨井穴刺络对受损皮层中IL-10水平的调控作用,以及其是否通过调控IL-10/STAT1信号轴来抑制TBI后神经炎性反应。

基于上述研究背景,本研究以井穴刺络的抗炎神经保护效应为切入点,构建TBI小鼠模型,系统检测井穴刺络干预后脑组织免疫细胞极化状态、IL-10表达水平及STAT1活性变化,并结合STAT1激活及IL-10中和等通路调控实验,阐明井穴刺络放血疗法通过IL-10/STAT1信号轴抑制过度神经炎性反应,改善TBI后神经功能损伤的作用机制,为该中医特色疗法的临床应用提供实验依据与理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选用SPF级C57BL/6雄性小鼠120只,鼠龄为8周,小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证编号:SCXK(京)2026-0008。于天津中医药大学动物中心进行饲养管理,每笼5只,环境温度控制在22~25℃,湿度保持50%~60%,光照周期为12 h光照/12 h黑暗交替,自由摄食饮水,适应性饲养1周。本实验方案经天津中医药大学实验动物伦理审查委员会批准实施(批准号:TCM-LAEC2023209y1556)。

1.2 主要试剂与仪器

神经无核抗原(NeuN)抗体(英国Abcam)、离子钙结合衔接分子1(IBA1)抗体(日本Wako),Luminex® Assay试剂盒(美国R&D Systems),STAT1、磷酸化(p)-STAT1抗体、GAPDH(美国CST),驴抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG(天津优抗),ECL超敏发光液(上海碧云天),抗体稀释液(上海七纯),TUNEL染色试剂盒、RIPA裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂(武汉赛维尔),BCA蛋白定量试剂盒(武汉博士德),彩色蛋白预染marker、CD86、CD45、CD11b流式抗体(美国Thermo Fisher),胶原酶IV、DNA酶、Percoll分选液、红细胞裂解液、1640培养液、蛋白上样缓冲液、电转液、TWEEN-80、DMSO、PEG300(北京索莱宝),2-NP(美国Glpbio),IL-10中和抗体(美国BioXCell)。

一次性针灸针(华佗牌,0.45 mm×40 mm,苏州医疗用品厂),电子控制性脑皮质撞击仪(美国Custom&Design),冰冻切片机、荧光显微镜(德国徕卡),Luminex® 200™液相芯片检测系统(美国R&D System),超速离心机、细胞破碎仪、酶标仪、稳压稳流电泳仪、垂直电泳槽、湿转电转印仪(美国Bio-Rad),流式细胞仪(美国Thermo Fisher),全自动脑立体定位仪(深圳市瑞沃德),旷场实验系统

(荷兰诺达思), ImageJ 软件(美国 NIH)。

1.3 造模方法

假手术组仅行麻醉、备皮、消毒、头皮切开, 不给予皮层撞击处理, 不进行井穴刺络放血, 其余组均进行造模处理。造模方法: 参照本课题组既往方法建立小鼠重型 TBI 模型^[14]。小鼠术前 12 h 禁食不禁水, 次日称重、麻醉备皮后俯卧固定于脑立体定位仪; 头皮正中切开 1.5 cm 纵行切口, 双氧水消毒后剥离右顶骨骨膜, 以前囟与人字缝尖连线中点偏右 2 mm 为圆心, 牙科磨钻磨出直径 4 mm 圆形颅窗, 磨薄颅骨且不损伤硬脑膜, 待夹尾反射消失后采用电子控制性脑皮质撞击仪行皮层撞击。撞击参数: 打击臂倾角 20°、停留时间 120 ms、撞击速度 4.5 m/s、撞击深度 2.0 mm。撞击后待生命体征平稳后逐层缝合。撞击后, 小鼠出现短暂呼吸暂停, 受损皮层肿起, 后肢轻微抽搐即视为造模成功。

1.4 分组及干预方式

实验一: 随机选取 12 只健康小鼠作为假手术组, 其余小鼠进行造模, 选取造模成功的小鼠随机分为模型组、井穴刺络组, 每组 12 只。实验二: 另选取造模成功的小鼠随机分为模型组、井穴刺络组、井穴刺络+2-NP 组, 每组 12 只。实验三: 另选取造模成功的小鼠并随机分为模型组、井穴刺络组、井穴刺络+IL-10 拮抗组, 每组 10 只。井穴刺络组、井穴刺络+2-NP 组及井穴刺络+IL-10 拮抗组在造模后即刻、24 h 及 48 h 各进行 1 次井穴刺络放血治疗。操作步骤: 在小鼠双侧前肢十二井穴处, 用 26 号直径 0.45 mm 的毫针刺入皮肤 1 mm, 每个穴位点刺 1~2 下, 出血量为每穴每次 2~3 μ L, 干预总时长约为 5 min。穴位的定位应参考人体相应穴位的解剖标志, 结合比较解剖学, 在小鼠双侧前肢的相应部位选取每侧 6 个穴位的手十二井穴(少商、商阳、中冲、关冲、少冲、少泽), 模型组小鼠给予相同时间束缚, 但不进行针刺操作。

药物注射: 为排除麻醉药物干扰并保障动物存活率, 井穴刺络+2-NP 组于造模及井穴刺络前 1 h 经腹腔给予 2-NP, 给药剂量参照本团队既往研究设置为 5 mg/kg^[15]; 模型组与井穴刺络组同步注射对照溶剂。为充分拮抗内源性升高的 IL-10, 井穴刺络+IL-10 拮抗组共注射两次 IL-10 中和抗体, 分别于第 1、2 次井穴刺络后 1 h 于损伤皮层对侧脑室注射 IL-10 中和抗体, 药液浓度为 6 mg/mL, 单鼠注射体积 1 μ L; 模型组与井穴刺络组小鼠同步注射等体积的无菌 PBS 溶液。

1.5 观察指标及检测方法

改良型神经功能缺损评分(mNSS): 采用 mNSS 量表对各组小鼠进行评分, 评分时间为造模后 6、24、48 h。为避免井穴刺络对评分造成影响, 井穴刺络组首次评分为造模后 6 h, 后续于第 2、3 次井穴刺络后 2 h 进行评分。评分研究人员为经过培训合格后的非本实验研究人员, 实施实验分组盲法对小鼠运动、感觉、平衡和反射等 4 个方面进行行为学评价, 记录各项评分和总分, 总得分为 0~18 分, 0 分表示小鼠神经功能正常, 18 分表示实验小鼠意识丧失(昏迷)或死亡。

旷场实验评估神经功能缺损及运动功能: 小鼠提前适应环境 1 h, 以 75% 乙醇清洁旷场并晾干, 调试摄像设备。将小鼠靠墙置于旷场中央, 记录 6 min 自发活动。每只小鼠测试后及时用乙醇擦拭、晾干装置再进行下一只。实验结束后用 Smart3.0 软件分析运动轨迹、总移动距离, 评价小鼠运动功能。

免疫荧光法检测受损皮层凋亡神经元(NeuN⁺TUNEL⁺)、小胶质细胞(IBA1⁺)数量: 干预结束后, 采用 1.25% 三溴乙醇对小鼠进行腹腔注射麻醉, 给药剂量按小鼠体质量计算(0.12 mL/g)。经心脏灌流后取材, 剥离完整脑组织后多聚甲醛固定 20 h, 按照 20%、30%、30% 浓度配制蔗糖溶液并进行梯度脱水, 冰冻包埋, 使用冰冻切片机制作 10 μ m 脑组织切片。染色前将切片置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱复温 5 min, PBS 漂洗 3 次; 滴加适量 BSA 溶液室温封闭 1 h, 随后加入一抗稀释液 IBA1(1:800)、NeuN(1:600), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日取出切片, PBS 漂洗 3 次, 沥干后滴加荧光二抗(1:400)室温孵育 1 h; 弃去二抗后再次 PBS 漂洗 3 次, 加入 DAPI 染色液孵育染核 10 min, 去除残留染液, PBS 充分漂洗 3 次。常规封片、自然晾干后, 使用荧光显微镜拍摄目标脑区(M1/M2 运动皮层)小胶质细胞图像并利用 ImageJ 软件进行计数。小胶质细胞占比为 IBA1 与 DAPI 双阳性细胞数目占 DAPI 阳性细胞总数的比例。免疫荧光染色结束后, 向 NeuN 染色切片滴加 100 μ L Proteinase K 工作液通透组织 13 min, PBS 漂洗; 再加入 Triton X-100 破膜缓冲液处理 20 min, 弃液后 PBS 漂洗 3 次。每片滴加 50 μ L 平衡缓冲液(Equilibration Buffer)室温平衡 10 min, 吸去多余缓冲液后, 加入 57 μ L TdT 孵育缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h; 反应结束后 PBS 漂洗。切片甩干后经 DAPI 避光染核 10 min, PBS 洗涤、封片后使

用荧光显微镜拍摄目标脑区(M1/M2运动皮层)凋亡神经元并使用ImageJ软件进行计数。TUNEL染色体系中,NeuN标记神经元呈绿色荧光,TMR-5-dUTP特异性标记凋亡细胞核呈红色荧光,DAPI复染所有细胞核呈蓝色荧光。通过NeuN与TUNEL共定位,可精准区分正常神经元与凋亡神经元。凋亡神经元占比为TUNEL与NeuN双阳性细胞数目占NeuN阳性细胞总数的比例。

液相芯片检测受损皮层组织IL-10、白细胞介素2(IL-2)水平:干预结束后,采用1.25%三溴乙醇对小鼠进行腹腔注射麻醉,给药剂量按小鼠体质量计算(0.12 mL/g)。麻醉后进行心脏灌流以排除外周血液影响,分离受损皮层后置入EP管中。向EP管中加入专用蛋白裂解液,经超声破碎处理,超速离心后收集上清液。运用BCA法测定上清液蛋白浓度,并统一调至5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存。选用R&D Systems预包被IL-2、IL-10特异性抗体的液相芯片试剂盒,在Luminex 200检测系统上开展实验,严格遵循配套仪器快速操作规程。实验时将荧光编码微球稀释混匀后加入96孔板,分别加入50 μL 标准品、质控样品与待测样本,室温避光振荡孵育。洗涤后添加生物素标记检测抗体避光孵育,再次洗涤后加入链霉亲和素-藻红蛋白复合物避光反应。洗脱未结合物质,加入读数缓冲液重悬微球,上机采集荧光信号,配套软件拟合标准曲线,定量计算样本中IL-2、IL-10浓度。

Western blot法检测小鼠受损皮层区域STAT、p-STAT1的蛋白表达:干预结束后,采用1.25%三溴乙醇对小鼠进行腹腔注射麻醉,给药剂量按小鼠体质量计算(0.12 mL/g)。取小鼠受损侧皮层,按比例加入RIPA裂解液充分裂解,离心后取上清,利用BCA法测定蛋白浓度并调平至5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。蛋白样本与上样缓冲液混匀后沸水浴变性,取等量待测样品(每孔6 μL)行SDS-PAGE电泳。浓缩胶阶段80 V恒压电泳30 min,分离胶阶段调整为120 V电泳90 min。电泳结束后采用湿式转印法将蛋白转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温摇床封闭1 h。弃封闭液,分别加入一抗p-STAT1(1:300)、STAT1(1:1 000)、GAPDH(1:20 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST缓冲液洗涤后,室温孵育对应二抗(山羊抗兔IgG-HRP,1:10 000;驴抗小鼠IgG-HRP,1:5 000)1 h,抗体孵育前后均以TBST充分漂洗3次。采用ECL化学发光试剂进行条带显影,以GAPDH作为内参蛋白,使用Image J软件分析各蛋

白条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白灰度值比值作为蛋白相对表达量。

流式细胞术检测受损皮层组织M1型小胶质细胞/巨噬细胞数量:干预结束后,采用1.25%三溴乙醇对小鼠进行腹腔注射麻醉,给药剂量按小鼠体质量计算(0.12 mL/g)。经心脏灌流后取受损侧脑皮层,冰浴保存并剪碎,加入胶原酶和DNA酶37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化,HBSS终止消化后离心,经红细胞裂解液裂解红细胞、Percoll分选纯化细胞,得到单细胞悬液;随后加入Fc受体阻断剂孵育,再加入预混表面抗体(CD45,1.5 $\mu\text{L}/\text{样本}$;CD11b,1.5 $\mu\text{L}/\text{样本}$;CD86,2 $\mu\text{L}/\text{样本}$)室温孵育,HBSS洗涤离心;固定破膜液固定破膜,加入胞内抗体孵育,经破膜液洗涤离心后,用流式染色缓冲液重悬,上机检测。

1.6 统计学处理

所有实验数据采用SPSS21.0软件进行统计分析,使用GraphPad Prism 9.0软件进行制图。计量资料先行正态性检验,符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析,进一步组间两两比较用LSD检验。实验数据以均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 TBI小鼠模型验证

两组小鼠全脑组织背侧大体外观显示,对照组小鼠大脑半球形态完整对称,皮层表面光滑平整,脑组织呈均匀淡乳白色,无局部淤血、出血及组织缺损病灶,中线分界清晰,整体未见肉眼可见损伤;模型组小鼠单侧大脑皮层可见局灶性鲜红色出血灶,病灶周边伴随轻度充血泛红,提示造模后出现明确皮层微血管破损、局部出血性脑损伤,脑组织损伤区域与正常皮层组织分界肉眼可辨,提示脑损伤模型构建成功。见图1。

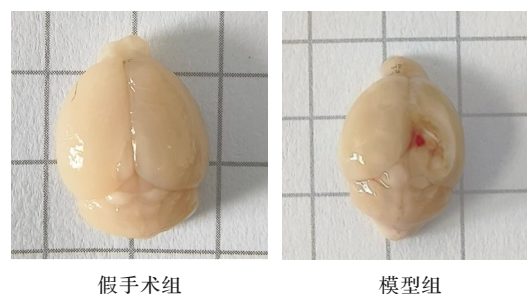


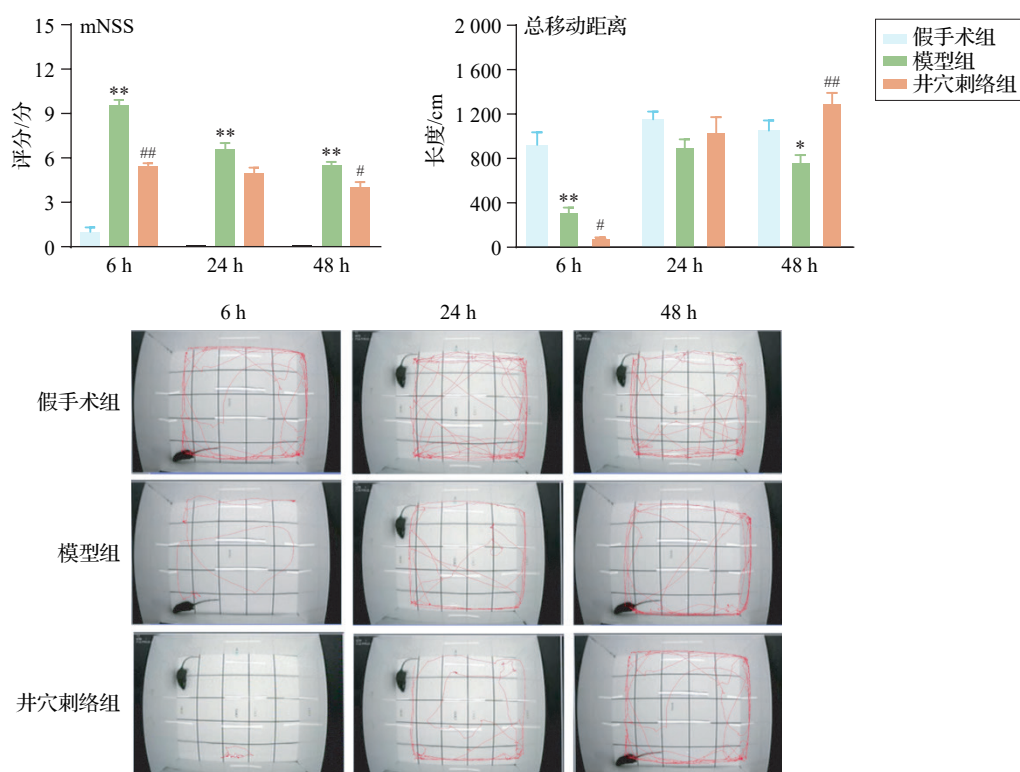
图1 假手术组和模型组小鼠完整脑组织比较

Fig. 1 Comparison of whole brain tissues in mice between model and control groups

2.2 井穴刺络可有效改善TBI小鼠神经功能缺损及运动功能

模型组小鼠造模后6、24、48 h的mNSS评分均高于假手术组($P<0.01$),井穴刺络组6 h和48 h的mNSS评分低于模型组($P<0.01, P<0.05$),24 h井穴刺络组mNSS评分较模型组有下降趋势,但差异无统计学意义。旷场实验结果显示,6 h时模型组小

鼠的总移动距离较假手术组减少($P<0.01$),且出现偏瘫及向患侧转圈表现,始终停留在起始区域,井穴刺络组总移动距离较模型组减少($P<0.05$);24 h时模型组较假手术组有下降趋势但差异无统计学意义,井穴刺络组较模型组差异无统计学意义;48 h时模型组较假手术组减少($P<0.05$),井穴刺络组较模型组增加($P<0.01$)。见图2。



注:mNSS为改良神经功能缺损评分。左上方为小鼠mNSS评分柱状图,右上方为小鼠旷场实验中的总移动距离柱状图,下方图片为小鼠在旷场中的运动轨迹图。与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图2 各组小鼠mNSS评分及旷场实验运动距离比较($\bar{x}\pm s_x$, 12只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of mNSS scores and total travel distances of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s_x$, 12 mice/group)

2.3 井穴刺络可抑制TBI小鼠受损皮层神经元凋亡,减少小胶质细胞数量

与假手术组比较,模型组小鼠运动皮层M1/M2区域的凋亡神经元占比(红色与绿色共染细胞÷绿色细胞)增加($P<0.05$),小胶质细胞占比升高($P<0.01$);与模型组比较,井穴刺络组小鼠凋亡神经元数量减少($P<0.05$),小胶质细胞占比降低($P<0.01$)。见图3、图4。

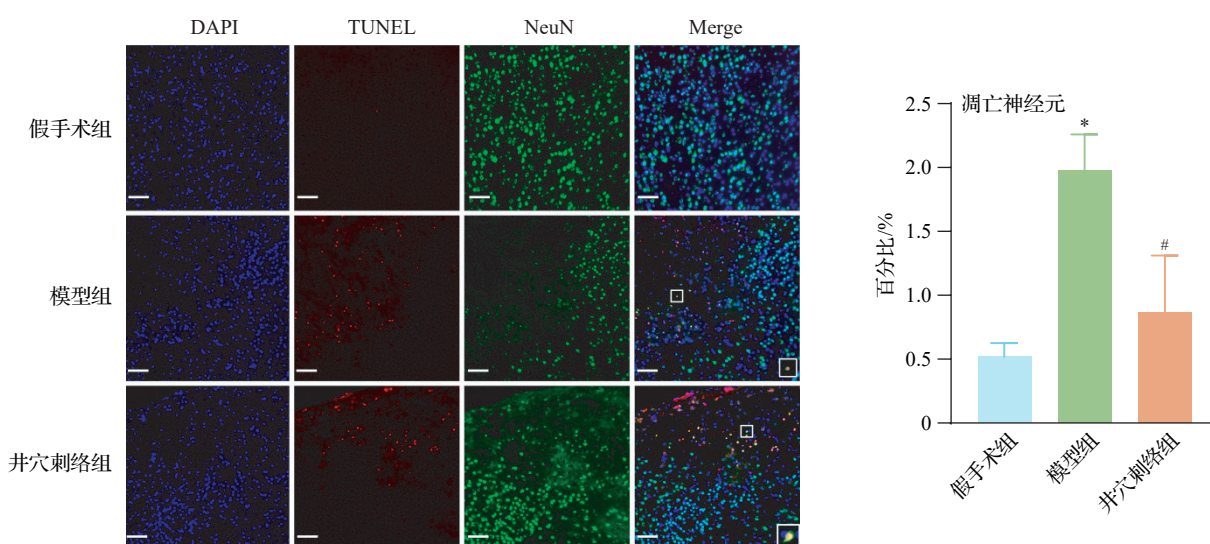
2.4 井穴刺络下调受损皮层STAT1活性并上调IL-10、IL-2水平

与假手术组比较,模型组小鼠受损皮层组织中p-STAT1/STAT1比值升高($P<0.01$),提示TBI后STAT1信号通路明显激活;与模型组比较,井穴

刺络组受损皮层中p-STAT1/STAT1比值降低($P<0.05$),表明井穴刺络能够抑制TBI诱导的STAT1磷酸化活化,见图5。进一步炎症因子IL-10和IL-2水平检测结果显示,假手术组小鼠受损皮层中IL-10及IL-2蛋白表达量均低于检测阈值,未获得有效定量结果;模型组IL-10和IL-2水平升高至可检测水平($P<0.01$)。干预后与模型组比较,井穴刺络组IL-10表达水平升高($P<0.01$),IL-2表达水平降低($P<0.05$)。见图6。

2.5 STAT1通路参与井穴刺络法抑制小胶质细胞/巨噬细胞M1型极化及改善神经功能缺损

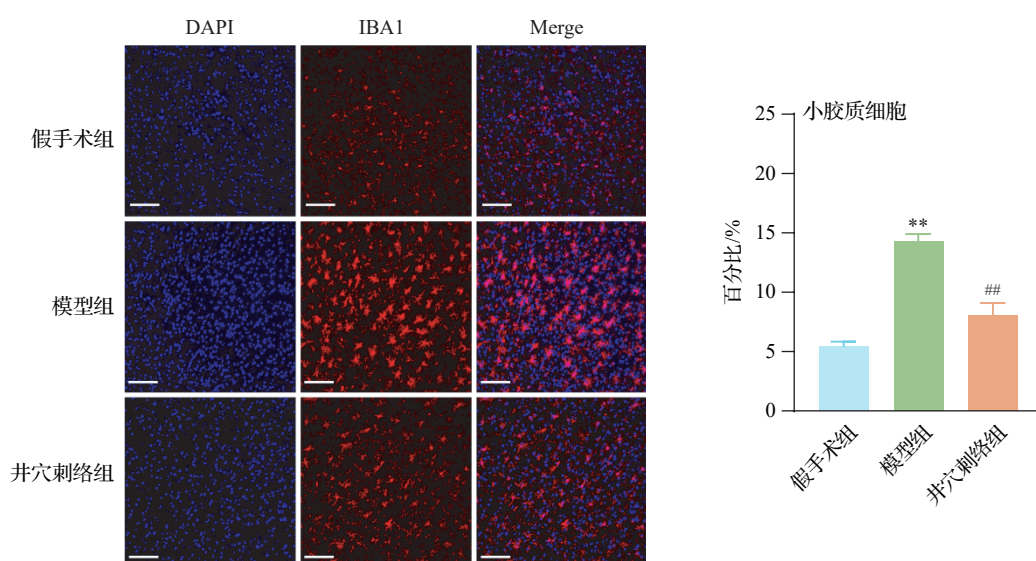
与模型组比较,井穴刺络组mNSS评分在各时间点均降低($P<0.01, P<0.05$);与井穴刺络组比



注: NeuN 为神经元核抗原。标尺=50 μ m。与假手术组比较, * P <0.05; 与模型组比较, # P <0.05。

图3 各组小鼠受损皮层凋亡神经元数量(免疫荧光法/TUNEL染色, $\bar{x} \pm s_x$, 4只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of apoptotic neuron numbers in injured cerebral cortex of mice in the 3 groups (immunofluorescence/TUNEL staining, $\bar{x} \pm s_x$, 4 mice/group)



注: IBA1 为离子钙结合衔接分子1。标尺=50 μ m。与假手术组比较, ** P <0.01; 与模型组比较, ## P <0.01。

图4 各组小鼠受损皮层小胶质细胞数量比较(免疫荧光法, $\bar{x} \pm s_x$, 4只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of microglia numbers in injured cerebral cortex of mice in the 3 groups (immunofluorescence, $\bar{x} \pm s_x$, 4 mice/group)

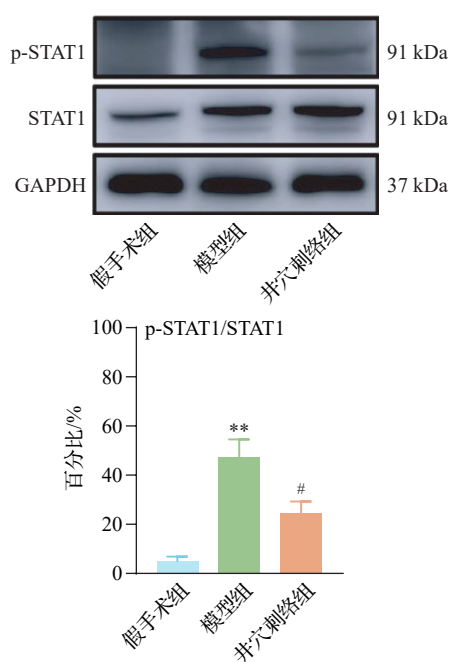
较, 井穴刺络+2-NP组 mNSS评分在各时间点均上升(P <0.01), 提示腹腔注射 2-NP可显著拮抗井穴刺络法的治疗效应。见图7。

进一步利用流式细胞术观察受损皮层中 M1 型巨噬细胞($CD45^{high}CD11b^{+}CD86^{+}$)及 M1 型小胶质细胞($CD45^{low}CD11b^{+}CD86^{+}$)数量, 结果显示, 井穴刺络组小鼠 M1 型小胶质细胞占比较模型组降低(P <0.05), 井穴刺络+2-NP组 M1 型小胶质细胞

占比较井穴刺络组升高(P <0.01)。模型组与井穴刺络组 M1 型巨噬细胞数量差异无统计学意义, 井穴刺络+2-NP组 M1 型巨噬细胞数量较井穴刺络组有上升趋势, 但差异无统计学意义。见图8。

2.6 井穴刺络通过 IL-10/STAT1 途径改善小鼠神经功能缺损及抑制巨噬/小胶质细胞促炎型极化

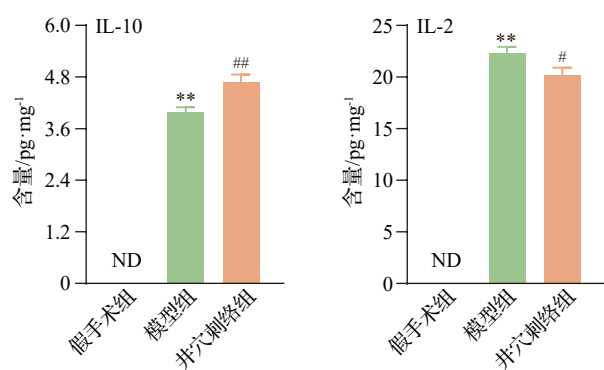
井穴刺络组小鼠 mNSS 评分较模型组降低(P <0.05), 井穴刺络+IL-10拮抗组 mNSS 评分在



注:STAT1为信号转导及转录激活因子1。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图5 各组小鼠受损皮层STAT1蛋白表达水平比较
($\bar{x}\pm s_x$, 4只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of expression levels of STAT1 protein in the injured cerebral cortex of mice in the 3 groups
($\bar{x}\pm s_x$, 4 mice/group)

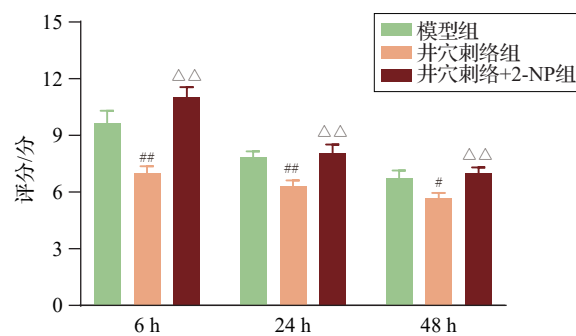


注:IL-10为白细胞介素10,IL-2为白细胞介素2;ND为未检出。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图6 各组小鼠受损皮层区域IL-10及IL-2水平比较
($\bar{x}\pm s_x$, 8只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of IL-10 and IL-2 levels in the injured cerebral cortex of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s_x$, 8 mice/group)

各时点均高于井穴刺络组($P<0.05$, $P<0.01$),提示脑室注射IL-10中和抗体显著拮抗井穴刺络对TBI小鼠神经功能的改善效应,见图9。井穴刺络组p-STAT1/STAT1比值较模型组有下降趋势,但差异无统计学意义;井穴刺络+IL-10拮抗组



注:mNSS为改良神经功能缺损评分。与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与井穴刺络组比较,△△ $P<0.01$ 。

图7 各组小鼠mNSS评分比较($\bar{x}\pm s_x$, 12只鼠/组)

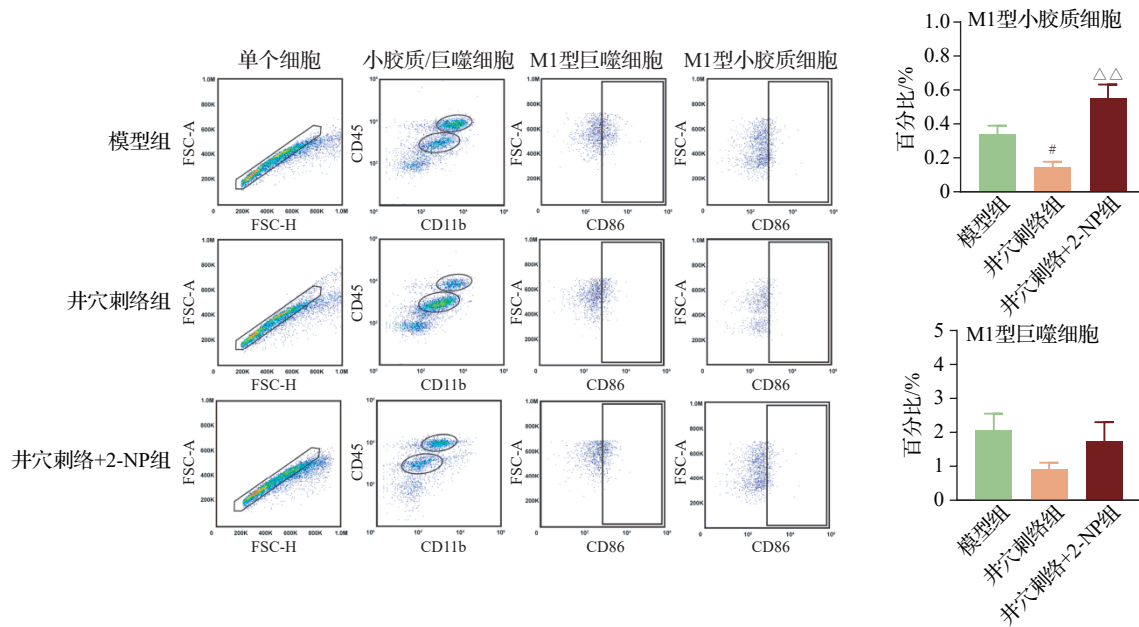
Fig. 7 Comparison of mNSS scores of mice in the 3 groups
($\bar{x}\pm s_x$, 12 mice/group)

p-STAT1/STAT1比值较井穴刺络组升高($P<0.05$)。见图10。

与模型组比较,井穴刺络组小鼠M1型巨噬细胞、M1型小胶质细胞占比下降($P<0.05$);与井穴刺络组比较,井穴刺络+IL-10拮抗组小鼠M1型巨噬细胞、M1型小胶质细胞占比升高($P<0.05$)。见图11。

3 讨论

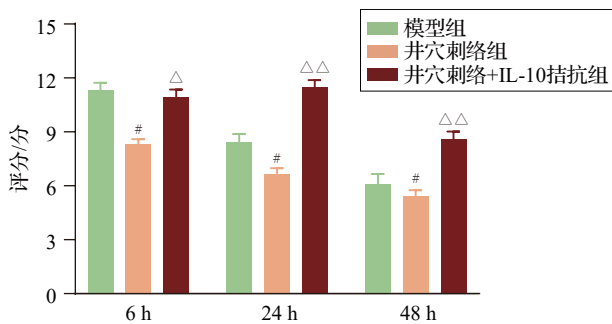
在中医传统理论中,TBI又被称为“巅顶骨折”“头部内伤”,其主要病机被明确为“堕坠而恶血留内”。本病病位专属在脑,具有起病骤急、病势凶险、病情危重、致残率及后遗症发生率高临床特征。井穴刺络法是极具中医特色的急救疗法,井穴居于四肢末端,为十二经脉经气始发之处,刺络放血的独特操作顺应“菟陈则除之”的治疗原则,对应TBI“瘀血阻滞脑窍”的病机。古典医籍记载井穴可主治各类急性脑病,《医宗金鉴》将其誉为起死回生之妙穴。团队基于既往井穴理论、临床、基础及转化相关研究提出“井-脑相关”理论^[16]。其中,临床研究井穴刺络联合薏苡仁鼻饲可快速改善重型TBI患者的意识水平^[5],有效促进中风患者神经功能恢复^[17]。恢复期应用井穴刺络联合康复训练能够有效促进患者运动功能恢复,改善脑卒中后肩手综合征^[18-19]。现有基础研究则提示井穴刺络可通过逆转TBI小鼠低凝状态改善局部脑血流、抑制凋亡、促进细胞增殖等方式改善神经功能缺损^[9,12-13]。与既往研究一致,本研究结果显示,TBI后小鼠出现明显神经功能缺损,井穴刺络可降低TBI小鼠6h及48h的mNSS评分,增加井穴刺络组小鼠48h的旷场内总移动距离。需要注意的是,24h mNSS干预组与



注:与模型组比较,[#] $P<0.05$;与井穴刺络组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图8 各组小鼠受损皮层M1型小胶质/巨噬细胞的流式结果分析($\bar{x}\pm s_x$, 6只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of flow cytometric analysis of M1-type microglia/macrophages in the injured cerebral cortex of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s_x$, 6 mice/group)

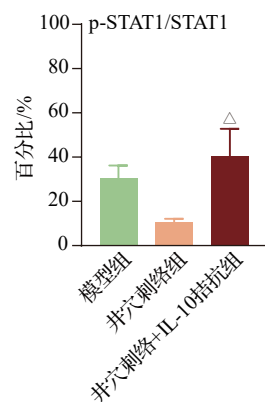
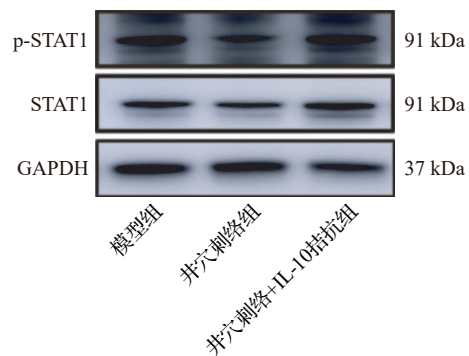


注:mNSS为改良神经功能缺损评分。与模型组比较,[#] $P<0.05$;与井穴刺络组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图9 各组小鼠mNSS评分比较($\bar{x}\pm s_x$, 10只鼠/组)

Fig. 9 Comparison of mNSS scores of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s_x$, 10 mice/group)

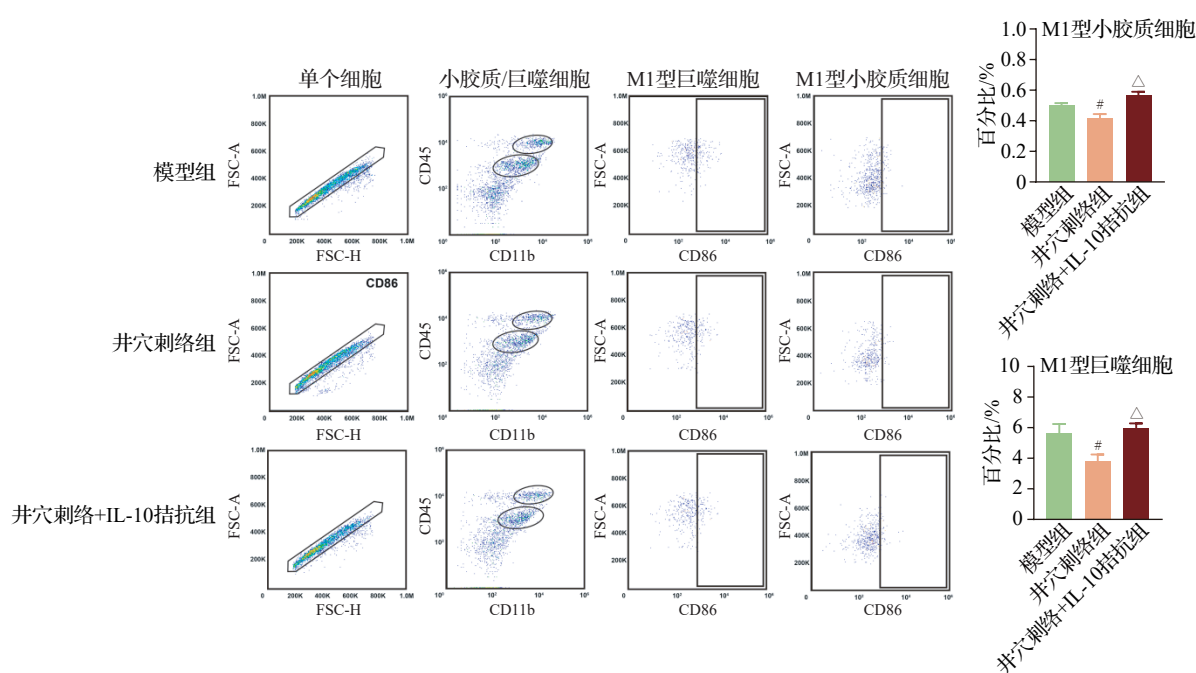
模型组相比有明显下降趋势,同时点旷场总移动距离两组差异无统计学意义,而治疗即刻(6 h)与干预后期(48 h)两组指标均存在显著差异。分析认为,该疗法的即刻效应主要依赖神经调节发挥即时调节效应,干预后24 h机体体液及免疫调控通路初步激活,相关效应分子表达水平偏低,mNSS评分与运动能力的改善尚不突出,至48 h时,干预产生的保护效应逐步累积,井穴刺络组小鼠神经功能出现显著改善,但介导该时序性疗效差异的内在分子机制仍有待深入探究。另一方面,井穴刺络干预6 h后,小鼠旷场实验总移动距离较模型组显著降低。推



注:STAT1为信号转导及转录激活因子1。与井穴刺络组比较, $\Delta P<0.05$ 。

图10 各组小鼠受损皮层STAT1蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s_x$, 4只鼠/组)

Fig. 10 Comparison of expression levels of STAT1 protein in the injured cerebral cortex of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s_x$, 4 mice/group)



注:IL-10为白细胞介素10。与模型组比较,[#] $P<0.05$;与井穴刺络组比较,^Δ $P<0.05$ 。

图11 各组小鼠受损皮层M1型小胶质/巨噬细胞数量比较(流式细胞术, $\bar{x}\pm s_x$,6只鼠/组)

Fig. 11 Comparison of counts of M1-type microglia/macrophages in the injured cerebral cortex of mice in the 3 groups (flow cytometry, $\bar{x}\pm s_x$, 6 mice/group)

测其潜在机制为:TBI急性期脑组织大量释放谷氨酸,介导运动神经元过度兴奋^[20],而急性伤害性刺激(井穴刺络)可驱动皮层 γ -氨基丁酸(GABA)能抑制神经元^[21],可能抑制运动神经元的异常过度活化。尽管两组小鼠均因脑创伤存在显著运动功能受损,但TBI模型组谷氨酸能通路过度激活,使其自发运动与探索行为更强。据此推测,井穴刺络产生的伤害性传入信号可激活运动皮层GABA能抑制环路,降低运动皮层整体神经兴奋性,减弱小鼠自主运动意愿。该组间行为差异对应的具体分子调控通路,仍有待后续实验进一步佐证。目前,TBI后继发性损伤的核心病理机制主要涵盖神经炎症反应、兴奋性毒性、氧化应激、线粒体功能障碍等多个维度^[3-4,22]。其中,神经炎症反应的发生与TBI后中枢及外周免疫细胞的过度活化密切相关。免疫细胞活化在TBI预后进程中常呈现双向调节效应,即适度的免疫应答可有效降低脑组织继发感染风险,及时清除损伤凋亡神经元及组织碎片,参与损伤微环境的修复调控。然而免疫细胞的过度活化则会诱导促炎因子瀑布式释放,触发神经元异常凋亡,进一步加剧脑组织损伤与神经功能缺损^[23]。因此,抑制TBI后过度失控的炎症反应、重建脑内免疫微环境稳态已成为干预TBI后继发性脑损伤、改善神经

功能预后的重要研究方向。现有研究表明,小胶质细胞在脑损伤后数分钟内即可被活化,活化状态可维持数天甚至数月,其可能直接释放炎症因子介导神经元死亡或退行性病变进而引起神经功能缺损^[24]。此外,活化的小胶质细胞还可通过分泌趋化因子招募外周免疫细胞向脑实质浸润,进一步放大炎症级联反应,最终加重脑组织病理性损伤与神经功能缺损^[25]。前期基础研究表明,井穴刺络放血可有效调控小胶质细胞极化表型失衡,抑制小胶质细胞向促炎M1型过度活化、促进其向抗炎M2型表型偏移,减少脑干及受损皮层局部炎症因子水平^[26-27]。此外,在脑卒中大鼠模型中应用井穴刺络同样可有效减少血清中的炎症因子^[28]。本研究结果显示,TBI发生后小鼠受损皮层中小胶质细胞明显增多且呈现明显活化状态(突起减少胞体增大),井穴刺络组小鼠小胶质细胞数量显著少于模型组,且形态更接近于静息态,提示井穴刺络放血疗法可能抑制局部免疫反应;同时,井穴刺络法可有效减少TBI凋亡神经元数量,促进神经元存活。

STAT1是细胞内关键的转录因子,是调控免疫细胞功能的关键靶点^[11,29]。既往研究观察到脑损伤患者及小鼠脑组织中STAT1水平及活化程度均明显升高^[10],有研究指出多种类型的细胞因子可能

通过 JAK/STAT 途径调控小胶质细胞/巨噬细胞极化方向^[30-32]。本研究观察到 TBI 后小鼠受损皮层中 STAT1 被显著激活,而井穴刺络法能够降低其活化水平;进一步检测受损皮层组织中炎性细胞因子 IL-10 和 IL-2 的表达变化,结果显示,假手术组未能获得 IL-10 及 IL-2 的有效定量结果,分析其原因可能由于假手术组小鼠仅接受麻醉、备皮,并未造成明显脑组织损伤,处于基础生理状态。在生理条件下,中枢神经系统维持相对稳定的免疫稳态,炎性细胞因子通常处于低表达水平,部分因子可能低于检测平台的灵敏度范围,因此难以实现准确量化分析。本研究中,TBI 发生后,受损皮层中 IL-10 和 IL-2 表达水平均升高至可检测范围,提示 TBI 可诱导局部炎性微环境重塑,并伴随促炎与抗炎免疫因子的同步激活,反映损伤过程中机体启动了复杂的免疫调节应答;井穴刺络法干预可显著提高受损皮层组织中 IL-10 水平,同时降低 IL-2 表达,提示该疗法通过调控炎性因子稳态平衡,改善 TBI 后继发性炎性损伤微环境,发挥脑保护作用。IL-10 作为重要的抗炎细胞因子,在神经炎性反应调控过程中发挥关键作用,可通过影响巨噬细胞及小胶质细胞极化状态,抑制过度炎性反应。已有研究表明,IL-10 缺失可促进小胶质细胞和巨噬细胞向 M1 型促炎表型转化,而 IL-10 能够通过抑制 STAT1 蛋白磷酸化,阻断 M1 型极化过程,从而发挥神经保护作用^[13,33]。IL-2 主要由活化 T 细胞产生,可通过 JAK/STAT 信号通路促进免疫细胞活化,并增强小胶质细胞促炎反应及 M1 型极化,加剧神经炎性损伤^[32]。因此,本研究结果提示,井穴刺络法可能通过调节 IL-10/IL-2 介导的炎性因子失衡状态,增强内源性抗炎免疫调控能力,抑制过度的小胶质细胞炎性激活,从而减轻 TBI 后的神经炎性反应并发挥神经保护作用。

为进一步明确 STAT1 在井穴刺络抗炎机制中的核心作用,本研究采用 2-NP 特异性激活 STAT1。研究结果显示,特异性激活 STAT1 可显著逆转井穴刺络的干预疗效:与单纯井穴刺络组相比,2-NP 联合干预组小鼠 mNSS 显著升高,同时脑内 M1 型小胶质细胞比例显著增加。上述结果证实,STAT1 过度活化是介导 TBI 后神经炎性反应加重、神经功能缺损恶化的重要因素,且 STAT1 是井穴刺络抑制免疫细胞促炎极化、改善 TBI 神经损伤的关键靶点。

前述实验证实,井穴刺络可显著上调 TBI 小鼠

受损皮层的 IL-10 表达。现有文献报道,IL-10 能够通过促进 SOCS1、SOCS3 表达,进而抑制 STAT1 磷酸化^[13]。为阐明 IL-10 与 STAT1 在该疗法中的调控关系,本研究采用脑室注射 IL-10 中和抗体阻断脑内 IL-10 功能。结果显示中和 IL-10 能够拮抗井穴刺络法对 TBI 小鼠神经功能缺损的改善作用。同时,相较于单纯井穴刺络处理,中和 IL-10 后 TBI 小鼠受损皮层中的 STAT1 磷酸化水平明显升高,M1 型小胶质细胞及巨噬细胞数量回升,提示 IL-10/STAT1 途径是井穴刺络改善 TBI 小鼠神经炎性反应及神经功能的重要途径。

既往研究多聚焦于小胶质细胞在 TBI 继发性神经炎性反应启动与发展中的主导作用,但越来越多的实验研究证实,外周来源的浸润免疫细胞同样参与并推动了神经炎性反应的进行性加重过程。已有研究显示,TBI 后外周血及脑组织中巨噬细胞数量显著升高^[34]。TBI 模型小鼠的巨噬细胞数量较正常假手术组增加约 20 倍,且其吞噬活性可在损伤后 30 d 内持续维持^[35-36]。基于上述研究背景,本研究通过表面标志物(小胶质细胞为 CD45^{low}CD11b⁺),外周浸润巨噬细胞为 CD45^{high}CD11b⁺)精准区分两种细胞亚群,旨在探究井穴刺络对中枢及外周免疫细胞的调控效应。本研究结果提示,井穴刺络法可能经 IL-10/STAT1 途径减少 M1 型小胶质细胞数量及 M1 型巨噬细胞数量,表明其可能通过外周-中枢双重途径减轻神经炎性反应。

综上所述,TBI 后 IL-10 水平降低进而抑制 STAT1 蛋白磷酸化作用被削弱,形成 IL-10 低表达-STAT1 过度活化-神经炎性反应放大的恶性循环,这也是 TBI 后继发性炎性反应持续进展、神经损伤进行性加重的核心分子诱因。井穴刺络法改善 TBI 小鼠的神经功能缺损及运动功能异常,其作用途径可能为通过提升抗炎因子 IL-10 水平抑制 STAT1 磷酸化,抑制小胶质细胞与巨噬细胞的 M1 型极化,最终减轻受损皮层神经元凋亡,进而发挥神经保护作用。然而,本研究尚未进一步探究井穴刺络促进 IL-10 水平升高的潜在机制。团队相关研究显示,井穴刺络可显著上调外周 IL-10⁺单核细胞及脑组织内 M2 型巨噬细胞占比,我们推测外周浸润的 IL-10⁺单核细胞与脑内 M2 型小胶质细胞/巨噬细胞或为井穴刺络干预后 TBI 损伤皮层 IL-10 表达上调的主要细胞来源。因此,后续研究仍需进一步验证井穴刺络对 M2 型巨噬细胞极化的调控效应,并借助流式细胞术明确 IL-10 升高的优

势细胞来源,这对完整阐释井穴刺络介导IL-10上调的分子机制具有重要价值。未来研究可以此为切入点,基于谱系追踪等方式探索井穴刺络对外周免疫细胞的调控作用,进一步开展相关机制探究与溯源分析。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。作者郭义为本刊编委,但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] Kolias A G, Rubiano A M, Figaji A, et al. Traumatic brain injury: global collaboration for a global challenge[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(2): 136-137.
- [2] Loane D J, Faden A I. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(12): 596-604.
- [3] Akamatsu Y, Hanafy K A. Cell death and recovery in traumatic brain injury[J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(2): 446-456.
- [4] Kalra S, Malik R, Singh G, et al. Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(4): 1153-1166.
- [5] 张静莎, 郭义, 耿连岐. 手十二井穴刺络放血、薏苡仁鼻饲联合亚低温对重型颅脑创伤影响的临床疗效评价的初步研究[J]. *世界中医药*, 2016, 11(3): 510-514, 518.
Zhang J S, Guo Y, Geng L Q. Clinical evaluation of treating severe traumatic brain injury by pricking blood on 12 hand well acupoints and nasal feeding Coix seed with mild hypothermia (in Chinese) [J]. *World Chinese Medicine*, 2016, 11(3): 510-514, 518.
- [6] 杨坤, 郑苏, 柏中喜. 电针调节RhoA/ROCK通路对脑卒中偏瘫痉挛大鼠血清BDNF/TrkB水平及神经行为学的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2026, 21(3): 477-482.
Yang K, Zheng S, Bai Z X. Effects of electroacupuncture on serum BDNF/TrkB level and neuroethology in rats with hemiplegic spasm after stroke by regulating RhoA/ROCK pathway (in Chinese) [J]. *World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2026, 21(3): 477-482.
- [7] 李博, 李宛蓉. 手十二井穴刺络放血对急性创伤性脑损伤小鼠神经功能及坏死性凋亡相关蛋白表达的影响研究[J]. *陕西中医*, 2020, 41(11): 1529-1533.
Li B, Li W R. Experimental study on inhibition of necrotizing apoptosis and improvement of pathological injury and inflammatory reaction in TBI mice by blood-letting puncture of hand twelve-well points (in Chinese) [J]. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 41(11): 1529-1533.
- [8] Wu H J, Zheng J W, Xu S B, et al. Mer regulates microglial/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neuroinflammation following traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 2.
- [9] Sen T, Saha P, Gupta R, et al. Aberrant ER stress induced neuronal-IFN β elicits white matter injury due to microglial activation and T-cell infiltration after TBI [J]. *J Neurosci*, 2020, 40(2): 424-446.
- [10] Zhao Y F, Ma C, Chen C X, et al. STAT1 contributes to microglial/macrophage inflammation and neurological dysfunction in a mouse model of traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 2022, 42(39): 7466-7481.
- [11] Li T, Li L, Peng R L, et al. Abrocitinib attenuates microglia-mediated neuroinflammation after traumatic brain injury via inhibiting the JAK1/STAT1/NF- κ B pathway [J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3588.
- [12] Patik I, Redhu N S, Eran A, et al. The IL-10 receptor inhibits cell extrinsic signals necessary for STAT1-dependent macrophage accumulation during colitis [J]. *Mucosal Immunol*, 2023, 16(3): 233-249.
- [13] Gao Y, Lu J W, Zeng C X, et al. IL-10 suppresses IFN- γ -mediated signaling in lung adenocarcinoma [J]. *Clin Exp Med*, 2020, 20(3): 449-459.
- [14] 张紫辰. vPAG区多巴胺能神经元-下丘脑外侧区食欲素能神经元环路介导井穴刺络法促醒的机制研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
Zhang Z C. Study on the mechanism of acupuncture at hand twelve Jing-well points promotes awakening via ventral periaqueductal gray dopaminergic neuron-lateral hypothalamic orexinergic neuron circuit (in Chinese) [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [15] 杨霖. STAT1介导电针预处理抗脓毒症全身炎症和肺损伤的机制研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
Yang L. STAT1 mediates electroacupuncture preconditioning against systemic inflammation and lung injury in sepsis (in Chinese) [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [16] Luo Y, Zhu Z, Gao F F, et al. Research framework for scientific innovation and translational application of original acupuncture theories: a review based on Hand Twelve Jing Well Points stimulation therapy [J]. *Acupuncture and Herbal Medicine*, 2026, 6(1): 42-55.
- [17] 程浩, 皮兴文, 洪茂林. 井穴放血对中风72小时内患者临床症状的影响[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2013, 11(12): 46-48.
Cheng H, Pi X W, Hong M L. Effect of bloodletting at Well-point on clinical symptoms of patients with stroke within 72 hours (in Chinese) [J]. *Chinese Medicine Modern Distance Education of China*, 2013, 11(12): 46-48.
- [18] 钟伟华, 陈秋萍. 十二井穴刺络放血疗法配合康复训练对脑卒中后肩手综合征患者功能恢复及血液流变学的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(25): 2819-2822.
Zhong W H, Chen Q P. Effect of combined bloodletting at twelve Well-points with rehabilitation training on functional recovery and hemorheology in patients with shoulder-hand syndrome following stroke (in Chinese) [J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2018, 27(25): 2819-2822.

- [19] 王宏君, 陈玺龙, 郑佳仪, 等. 井穴刺络放血配合巨刺法治疗脑卒中恢复期上肢痉挛疗效及对患者肌肉、运动功能的影响[J]. 陕西中医, 2021, 42(5): 654-658.
- Wang H J, Chen X L, Zheng J Y, et al. Curative effect of bloodletting puncture at Jing points combined with opposing needling on upper limb spasm during stroke recovery and the influence on muscle and motor function (in Chinese) [J]. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 42(5): 654-658.
- [20] Gao Y, Liu N, Chen J, et al. Neuropharmacological insight into preventive intervention in posttraumatic epilepsy based on regulating glutamate homeostasis [J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(9): 2430-2444.
- [21] Zhu Y C, Sun H J, Xiao S Q, et al. Electroacupuncture inhibited carrageenan-induced pain aversion by activating GABAergic neurons in the ACC [J]. Mol Brain, 2024, 17(1): 69.
- [22] 石力文, 路志红. 线粒体在针刺治疗脑卒中后认知功能障碍中的作用研究进展[J]. 世界中医药, 2024, 19(2): 285-290.
- Shi L W, Lu Z H. Mitochondrial mechanism in the treatment of post-stroke cognitive dysfunction by acupuncture: an update (in Chinese) [J]. World Chinese Medicine, 2024, 19(2): 285-290.
- [23] Simon D W, McGeachy M J, Bayır H, et al. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury[J]. Nat Rev Neurol, 2017, 13(3): 171-191.
- [24] Huang S, Lu Y X, Fang W Z, et al. Neurodegenerative diseases and neuroinflammation-induced apoptosis [J]. Open Life Sci, 2025, 20: 20221051.
- [25] Shi Z S, Yu P, Lin W J, et al. Microglia drive transient insult-induced brain injury by chemotactic recruitment of CD8⁺ T lymphocytes[J]. Neuron, 2023, 111(5): 696-710.
- [26] 陈海霞. 基于STAT1调控巨噬细胞极化探讨手十二井穴刺络放血疗法改善颅脑创伤大鼠神经功能缺损的机制研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2024.
- Chen H X. Mechanism of hand twelve Jing-well points bloodletting therapy in improving neurological deficits in rats with traumatic brain injury based on STAT1 regulation of macrophage polarization. (in Chinese) [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2024.
- [27] 秦思茹. 手十二井穴刺络放血改善重型颅脑创伤大鼠神经功能缺损的作用及炎症调控机制研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.
- Qin S R. Effect of acupuncture at hand twelve Jing-well points on neurological deficits through inflammatory regulation in rats with severe traumatic brain injury (in Chinese) [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine. 2021.
- [28] 蓝相洲, 李铃佳, 李叶舟, 等. 井穴刺络放血调控Nrf2/ARE通路改善脑卒中大鼠认知功能的机制研究[J]. 中医药导报, 2025, 31(9): 9-16, 31.
- Lan X Z, Li L J, Li Y Z, et al. Mechanistic study on the improvement of cognitive function in stroke rats by Jing-well points acupuncture through modulation of the Nrf2/ARE pathway (in Chinese) [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2025, 31(9): 9-16, 31.
- [29] Liu N, Li Y D, Jiang Y H, et al. Establishment and application of a novel in vitro model of microglial activation in traumatic brain injury[J]. J Neurosci, 2023, 43(2): 319-332.
- [30] Butturini E, Boriero D, Carcereri de Prati A, et al. STAT1 drives M1 microglia activation and neuroinflammation under hypoxia[J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 669: 22-30.
- [31] He H L, Zhang X M, He H, et al. Microglial priming by IFN- γ involves STAT1-mediated activation of the NLRP3 inflammasome [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(10): e70061.
- [32] Zuppe H, Reed E. Common cytokine receptor gamma chain family cytokines activate MAPK, PI3K, and JAK/STAT pathways in microglia to influence Alzheimer's disease [J]. Front Mol Neurosci, 2024, 17: 1441691.
- [33] Jiang J H, Jia T H, Gong W M, et al. Macrophage polarization in IL-10 treatment of particle-induced inflammation and osteolysis[J]. Am J Pathol, 2016, 186(1): 57-66.
- [34] Li Z Q, Xiao J, Xu X Y, et al. M-CSF, IL-6, and TGF- β promote generation of a new subset of tissue repair macrophage for traumatic brain injury recovery [J]. Sci Adv, 2021, 7(11): eabb6260.
- [35] Hsieh C L, Kim C C, Ryba B E, et al. Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain[J]. Eur J Immunol, 2013, 43(8): 2010-2022.
- [36] Paladini M S, Yang B A, Torkenczy K A, et al. Fate mapping of peripherally-derived macrophages after traumatic brain injury in mice reveals a long-lasting population with a distinct transcriptomic signature[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 8898.

收稿日期: 2026-05-09 修回日期: 2026-07-26