

☆ XXXX ☆

眼针通过调控 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体介导的胆碱能抗炎通路改善大脑中动脉缺血再灌注大鼠的学习和记忆功能

王雪婷¹, 王鹏琴²

(¹辽宁中医药大学附属第二医院康平内二科, 沈阳110034; ²辽宁中医药大学附属医院脑病康复二科, 沈阳110032)

【摘要】目的:评价眼针对大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)大鼠认知的影响,验证其是否通过调控 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR)介导的胆碱能抗炎通路,发挥神经保护作用。**方法:**SD大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、眼针组和眼针+拮抗剂组。采用改良Longa线栓法制备MCAO/R大鼠模型。造模后24 h,眼针组针刺大鼠眼周双侧“肝区”“肾区”“上焦区”“下焦区”,留针30 min,每日1次,连续7 d;眼针+拮抗剂组在针刺前30 min腹腔注射 $\alpha 7$ nAChR拮抗剂甲基牛扁亭柠檬酸盐(1 mg/kg)。采用Morris水迷宫评估空间学习记忆能力;TTC染色评估脑梗死体积;HE染色评估海马组织病理改变;ELISA检测血清及海马组织肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6含量;qPCR和Western blot法检测海马组织 $\alpha 7$ nAChR、胆碱乙酰转移酶(ChAT)、乙酰胆碱酯酶(AChE)及核因子(NF)- κ B mRNA和蛋白表达。**结果:**与假手术组相比,模型组大鼠Morris水迷宫测试中逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少($P<0.01$),大鼠脑组织梗死体积百分比增加($P<0.01$),海马区神经元排列紊乱,部分神经元核胞体缩小、细胞核固缩,细胞间隙增宽,可见散在的空泡样透明区;血清及海马组织中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量升高($P<0.01$),海马组织中 $\alpha 7$ nAChR和ChAT mRNA和蛋白表达下调、AChE mRNA和蛋白表达上调,NF- κ B磷酸化增强($P<0.01$)。与模型组相比,眼针组大鼠上述指标均发生逆转($P<0.05$, $P<0.01$)。在眼针干预的基础上给予抑制剂后,上述眼针的作用效果减弱($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**眼针可显著改善MCAO/R大鼠的学习和记忆功能,减轻脑组织损伤和海马神经元病理改变,其作用与调控 $\alpha 7$ nAChR相关的胆碱能抗炎通路、抑制NF- κ B相关炎症反应有关,具有神经保护和抗炎作用,为眼针治疗PSCI提供实验依据,也进一步支持 $\alpha 7$ nAChR介导的胆碱能抗炎通路在PSCI中的关键作用。

【关键词】卒中后认知障碍;眼针;大脑中动脉缺血再灌注;胆碱能抗炎通路;核转录因子- κ B; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体

Eye acupuncture improves learning and memory in middle cerebral artery occlusion/reperfusion rats by modulating the $\alpha 7$ nAChR-mediated cholinergic anti-inflammatory pathway

WANG Xue-ting¹, WANG Peng-qin² (¹Kangping Internal Medicine Department II, the Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China; ²Department of Encephalopathy Rehabilitation II, the Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032)

【ABSTRACT】 Objective To evaluate the cognitive benefits of eye acupuncture in a Middle Cerebral Artery Occlusion/Reperfusion (MCAO/R) rat model and to determine whether its neuroprotective effects involve modulation of

[DOI] 10.13702/j.1000-0607.20251435

引用格式:王雪婷,王鹏琴.眼针通过调控 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体介导的胆碱能抗炎通路改善大脑中动脉缺血再灌注大鼠的学习和记忆功能[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-11.

项目来源:国家中医药管理局辽宁彭氏眼针学术流派传承工作室建设项目(第二轮)(No.LPGZS2012-07);辽宁省中央引导地方科技发展专项项目(No.2023JH6/100200005);辽宁省教育厅基本科研项目(No.LJKMZ20221337);沈阳市科学技术计划项目(No.21-174-9-13)

通信作者:王鹏琴,E-mail: 23318199@163.com

the $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR)-mediated cholinergic anti-inflammatory pathway. **Methods** Fifty male SD rats were randomly assigned to a normal group, a sham-operated group, a model group, an eye acupuncture group, and an eye acupuncture with antagonist group. The MCAO/R rat model was induced by the modified Longa suture method. At 24 h after modeling, rats in the eye acupuncture group received bilateral periocular acupuncture at the “Liver area” “Kidney area”, “Upper Jiao area” and “Lower Jiao area”, with needles retained for 30 min once daily for 7 consecutive days. In the eye acupuncture with antagonist group, methyllycaconitine citrate (1 mg/kg), an $\alpha 7$ nAChR antagonist, was administered intraperitoneally at 30 min before acupuncture; other procedures were identical to those in the eye acupuncture group. Spatial learning and memory were assessed using the Morris water maze. Infarct volume was evaluated by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, and hippocampal histopathological changes were examined by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6 in serum and hippocampal tissue were measured by ELISA. The mRNA and protein expression levels of $\alpha 7$ nAChR, choline acetyltransferase (ChAT), acetylcholinesterase (AChE) in hippocampal tissue were assessed by qRT-PCR and Western blotting. The protein level of nuclear factor (NF)- κ B-related markers was detected by Western blotting, and the expression ratio of p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 protein was calculated. **Results** Compared with the sham-operated group, the model group exhibited prolonged escape latency and reduced platform crossings in the Morris water maze ($P < 0.01$), increased relative infarct volume ($P < 0.01$), and hippocampal histopathological changes including disorganized neuronal arrangement, shrunken neuronal somata, pyknotic nuclei, widened intercellular spaces, and scattered transparent vacuolar areas. Additionally, the model group showed elevated levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in serum and hippocampal tissue ($P < 0.01$); the mRNA and protein expression levels of $\alpha 7$ nAChR and ChAT in the hippocampal tissue were downregulated, while the mRNA and protein expression of AChE was upregulated, and the phosphorylation of NF- κ B was enhanced ($P < 0.01$). Compared with the model group, the eye acupuncture group significantly reversed all the above abnormalities ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After administering the inhibitor on the basis of the eye acupuncture intervention, the effect of the eye acupuncture was weakened ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** Eye acupuncture significantly improves learning and memory in MCAO/R rats and mitigates brain injury and hippocampal neuronal histopathology. These effects are associated with modulation of the $\alpha 7$ nAChR-related cholinergic anti-inflammatory signaling pathway and inhibition of NF- κ B-related inflammatory responses, supporting both neuroprotective and anti-inflammatory actions. The findings provide preclinical experimental evidence supporting eye acupuncture for post-stroke cognitive impairment (PSCI) and further support a pivotal role of the $\alpha 7$ nAChR-mediated cholinergic anti-inflammatory pathway in PSCI.

【KEYWORDS】 Post-stroke cognitive impairment; Eye acupuncture; Middle Cerebral Artery Occlusion/Reperfusion; Cholinergic anti-inflammatory pathway; Nuclear factor- κ B; $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor

卒中后认知障碍(PSCI)是卒中后的常见并发症之一,在卒中后的2~6个月约44%的患者可出现多个认知领域功能受损,在卒中后的第一年患病率高达60%^[1]。目前,PSCI的病理机制尚未明确,卒中后的病变位置、血管损伤和神经炎性反应等被认为是关键因素^[2]。胆碱能系统不仅与学习记忆密切相关,在脑卒中后的认知功能、感觉知觉、运动控制等方面也具有关键作用,也在卒中的急性和慢性阶段参与调控神经免疫反应^[3-4]。一项研究提示,中枢神经系统中存在“胆碱能抗炎通路”,脑内胆碱能信号可能通过 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR)靶点调控神经炎性反应^[5]。卒中后迷走神经被激活可通过调节乙酰胆碱(ACh)、 $\alpha 7$ nAChR等靶点,动态调控神经炎性反应,也是PSCI的病理机制之一,参与认知功能的恢复^[6-7]。

卒中康复指南强调危险因素控制、认知康复训练和综合管理在PSCI诊疗中的重要性,但对药物或神经调控等特异性干预的循证依据有限,缺乏高质量的证据支持。药物(如胆碱酯酶抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂等)多针对胆碱能系统或神经递质的调节,疗效不一致且不良反应明显^[1,8]。眼针通过对眼周特定穴位的刺激可以改善卒中后的运动障碍、认知障碍和感觉障碍等,已具有规范的操作标准,并已广泛应用于临床^[9-10]。神经解剖学研究发现,眼周与三叉神经眼支存在部分重叠,“三叉-迷走反射”学说提示眼周刺激可能通过三叉神经触发,并增强迷走神经相关的自主神经输出^[11-12],是可解释的神经环路基础。提示眼针可能作为一种外周神经调控手段,通过特定的解剖通路调控胆碱能抗炎通路,从而发挥神经保护作用。此外,药理

学研究表明,靶向激活 $\alpha 7$ nAChR可以抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)信号传导,并减少促炎细胞因子的产生,而阻断 $\alpha 7$ nAChR则会消除这些抑制作用,与PSCI的认知功能恢复密切相关^[13-14]。

然而,目前关于眼针治疗PSCI的证据多集中于临床观察,其作用机制是否与神经炎性反应、胆碱能系统等有关,是否通过 $\alpha 7$ nAChR靶点调控胆碱能抗炎通路,尚缺乏实验依据。基于此,本研究采用大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)诱导卒中后认知损害大鼠模型,通过行为学、组织病理学及分子生物学3个层面验证评估眼针效应,并加入 $\alpha 7$ nAChR拮抗剂干预以验证其关键靶点,为眼针治疗PSCI的作用机制及潜在分子靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用SD雄性大鼠50只,体质量220~240 g,购于辽宁长生科技公司,生产许可证号:SCXK(辽)2025-0001。动物饲养于辽宁中医药大学附属第二医院实验动物中心,使用许可证号:SYXK(辽)2023-0004,造模前适应性喂养1周。饲养期间环境温度保持在 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $(50\pm 10)\%$,明暗12 h交替循环管理,给予标准饲料和饮水自由摄取,并保持垫料干净。本研究已获得辽宁中医药大学附属第二医院动物伦理委员会批准(批准号:LZYY250911),实验过程严格遵循动物实验伦理规范和ARRIVE 2.0指南要求。本研究在样本量与分组设计上参考ARRIVE 2.0指南的建议,并结合既往同类实验^[15-17]综合确定。采用随机数字表法,将大鼠分为空白组9只、假手术组9只、模型组10只、眼针组11只、眼针+拮抗剂组11只。

1.2 主要试剂和仪器

WMT-200 Morris水迷宫及行为分析系统(成都泰盟),华佗牌一次性针灸针($0.25\text{mm}\times 13\text{mm}$,苏州医疗用品厂),SpectraMax iD3酶标仪(上海美谷分子),QuantStudio3荧光定量PCR仪,ST16R冰冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific),Leica RM2016石蜡切片机(德国徕卡),BGZ140电热恒温鼓风干燥箱(上海博迅),DYY-7C电泳仪、DYCZ-40D转膜槽(北京六一),BX46显微镜(日本 Olympus),Image J图像分析系统(美国 NIH)。

甲基牛扁亭柠檬酸盐(MLA,美国 MedChem Express),TTC染液、苏木精-伊红(HE)染色液、

SYBR Green及IL-6、IL-1 β 、TNF- α ELISA检测试剂盒(北京索莱宝),TRIzol、HRP标记山羊抗兔IgG(美国 Thermo Fisher Scientific),Super M-MLV反转录酶、RNase inhibitor、 $2\times$ Power Taq PCR MasterMix(北京百泰克),RIPA裂解液、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、30% Acr-Bis(29:1)、ECL发光液(上海碧云天),预染蛋白Marker(武汉塞维尔),PVDF膜(美国 Millipore),抗体乙酰胆碱酯酶(AChE)、胆碱乙酰转移酶(ChAT)、 $\alpha 7$ nAChR(武汉三鹰),NF- κ B p65(美国 Cell Signaling Technology),磷酸化(p)-NF- κ B p65(武汉 Abclonal),GAPDH(美国 Abcam)。

1.3 动物模型制备

采用改良Longa线栓法制备大鼠大脑MCAO/R模型^[18-19]。3%戊巴比妥钠腹腔注射(40mg/kg)对大鼠进行麻醉后,仰卧固定于手术板,备皮后颈部碘伏消毒。在颈部正中切开皮肤和浅筋膜,钝性剥离筋膜及肌肉组织,充分暴露并游离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA)。结扎ECA远心端和CCA近心端,动脉夹夹闭ICA,在ECA结扎点前剪一“V”形小切口,插入线栓,沿ICA向大脑中动脉方向推送深度约18~22 mm,感觉到轻微阻力时停止,在靠近CCA、ICA和ECA分叉处用活结结扎。2 h后缓慢拔出线栓,以实现缺血再灌注。假手术组仅游离右侧CCA、ICA和ECA,不予线栓插入。在MCAO/R后2 h采用Zea-Longa神经功能评分评估神经功能缺损,纳入评分1~3分的大鼠进入后续实验。

1.4 干预方法

空白组不予任何处理,常规饲养。假手术组仅行颈部血管暴露手术,不插入线栓,术后常规饲养。模型组在造模后常规饲养。眼针组造模后24 h接受眼针干预,依据彭氏眼针八区十三穴取穴法及《大鼠眼针八区十三穴分区定位和刺法标准化研究》^[20]及《针灸技术操作规范·第15部分:眼针》^[21],选择双侧肝区、肾区、上焦区和下焦区,使用特殊针具眼针沿大鼠眼眶周围1~2 mm区域进行皮下平刺,留针30 min,每日1次,连续干预7 d。眼针+拮抗剂组在眼针干预基础上,于针刺前30 min腹腔注射 $\alpha 7$ nAChR特异性拮抗剂MLA(1mg/kg)^[22],其余操作同眼针组。为减少偏倚,给药及针刺操作由同一实验人员执行,行为学测试及指标检测由另一名未知分组信息的研究员完成,数据录入及统计分

析亦在盲态条件下进行。

1.5 观察指标及检测方法

Morris水迷宫实验评估行为学:在干预结束后次日开始 Morris 水迷宫实验,分为适应性训练、定位航行实验和空间探索实验3个阶段。实验第1天为适应性训练,将大鼠放入水池中自由游泳60 s,并引导其找到平台的位置以熟悉环境^[23]。第2~6天开始定位航行实验,从池壁不同象限中随机放入大鼠进行训练游泳,记录大鼠找到平台的所用时间(逃避潜伏期)和游泳路径,每日4次。若大鼠在90 s内找到平台并停留超过10 s,则视为成功,记录逃避潜伏期。若大鼠90 s内未找到平台,则引导其至平台停留10 s,并记录该次逃避潜伏期为90 s,每次测试间隔15~20 min。第7天进行空间探索实验,移除平台,将大鼠从与目标象限相对的固定点放入水池中自由探索游泳60 s,记录其在原逃生平台停留时间及穿越次数。

TTC染色测定脑梗死体积:在行为学实验后次日处死大鼠,迅速取脑置于-20℃冷冻20 min后,进行冠状切片(厚度2 mm)。将切片置于2%TTC磷酸盐缓冲液中,37℃避光孵育20~30 min,脑组织梗死区域呈灰白色、未梗死区域呈红色。染色结束后,将切片转入4%多聚甲醛中固定,双面拍照,采用ImageJ软件计算梗死体积,并计算脑梗死体积百分比,脑梗死体积百分比(%)=所有切片脑梗死体积和÷大脑总体积×100%。

HE染色观察缺血侧大脑海马组织病理变化:取缺血侧大脑海马组织,放入4%多聚甲醛中进行固定,脱水后常规石蜡包埋、切片(厚度4~5 μm)。HE染色后,脱水、透明、封片,于光学显微镜下观察海马组织病理变化。

ELISA法测定缺血侧海马组织与血清TNF-α、IL-6、IL-1β含量:取缺血侧海马组织与血清,按质量与PBS比例配制匀浆,于4℃下离心10 min后取上清。按照试剂盒说明检测TNF-α、IL-6、IL-1β含量。采用酶标仪测量各孔的吸光度值,以标准曲线计算样品中含量。

实时定量PCR法检测缺血侧海马组织α7nAChR、ChAT、AChE mRNA表达:取每组3只大鼠缺血侧海马组织50 mg提取总RNA,参照TRIzol试剂盒说明,测定纯度与浓度,按照反转录试剂盒说明书反转录合成cDNA。以GAPDH为内参,采用SYBR Green荧光染料和2×Power Taq PCR MasterMix配置反应体系,在实时荧光定量

PCR仪上扩增,靶基因为α7nAChR、ChAT、AChE,引物序列见表1。扩增条件:95℃预变性30s,循环40个周期(95℃5 s、60℃30 s)。结束后绘制熔解曲线用于特异性验证,相对表达量按2^{-ΔΔC_t}方法计算。引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
α7nAChR	上游 ACATGTCTGAGTACCCCGGA	96
	下游 AGCGCTCATCAGCACTGTTA	
ChAT	上游 AGTGCATGCAGCATCTGGTA	154
	下游 AGCCAGTATTCAGAGACCCAAT	
AChE	上游 ACGTGAGCCTGAACCTGAAG	116
	下游 CTCGTCCAGCGTGTCTGTG	
GAPDH	上游 CACCATCTTCCAGGAGCGAG	174
	下游 CTCGTGGTTACACCCATCA	

注:α7nAChR为α7烟碱型乙酰胆碱受体,ChAT为胆碱乙酰转移酶,AChE为乙酰胆碱酯酶。

Western blot法检测缺血侧海马组织α7nAChR、ChAT、NF-κB p65、p-NF-κB p65、AChE蛋白表达:取缺血侧海马组织,按照组织质量加入含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,于冰上研磨匀浆,于4℃下离心10 min后取上清,BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白SDS-PAGE凝胶电泳分离后,转膜至PVDF。于5% BSA封闭1~2 h,加入稀释后的一抗(NF-κB p65和ChAT稀释比例为1:2 000,α7nAChR、p-NF-κB p65和AChE稀释比例为1:1 000),4℃孵育过夜。次日TBST洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比例为1:10 000),室温孵育1 h。再次洗膜后,加入ECL化学发光试剂显影,ImageJ软件进行条带灰度分析,并以GAPDH作为内参标准化。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。

1.6 统计学分析

采用SPSS26.0软件进行统计分析,计量数据先通过Shapiro-Wilk检验评估正态性,Levene检验评估方差齐性,若满足正态性和方差齐性的数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。Morris水迷宫定位航行实验逃避潜伏期采用重复测量方差分析,其余组间比较采用单因素方差分析,事后多重比较采用Tukey校正。若数据不满足正态性或方差齐性,则

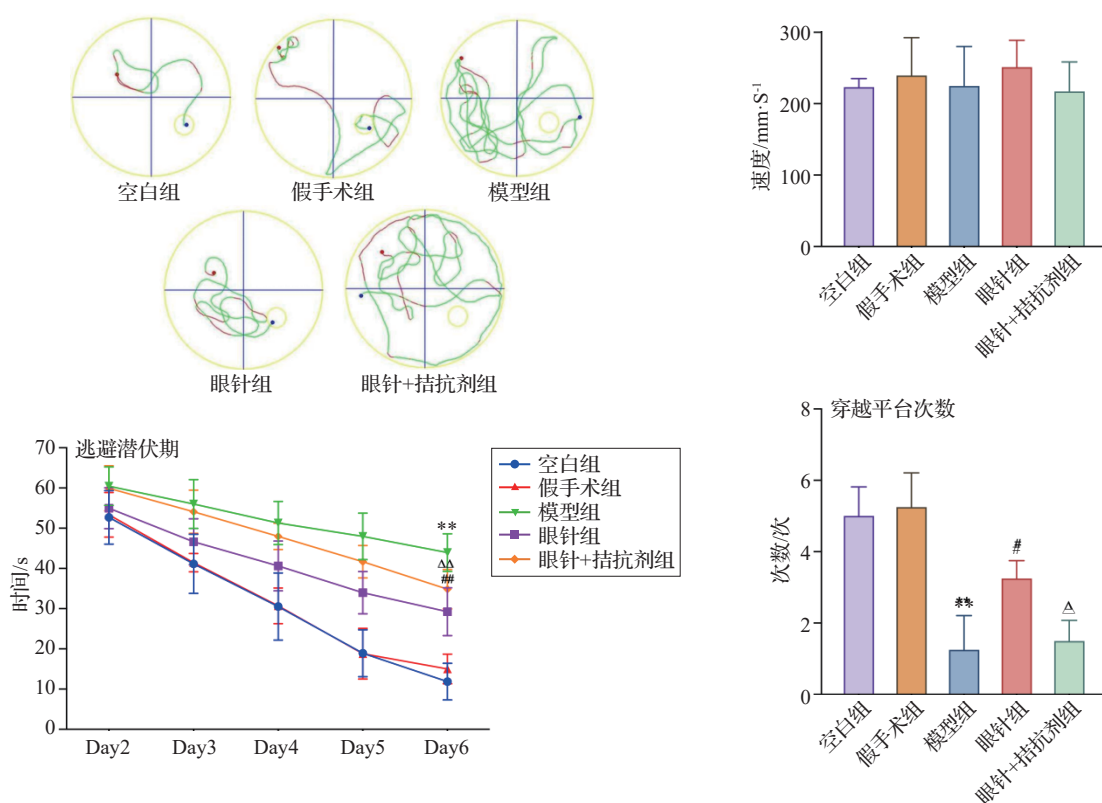
采用非参数检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠学习和记忆功能的比较

各组大鼠在定位航行实验中逃避潜伏期随训练天数增加呈下降趋势。空白组与假手术组大鼠在空间学习和记忆能力方面差异无统计学意义;与假手术组相比,模型组大鼠空间学习和记忆能力受

损,表现为逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少($P < 0.01$),提示MCAO/R模型大鼠存在空间学习记忆能力受损。与模型组相比,眼针组大鼠干预后逃避潜伏期缩短、穿越平台次数增加($P < 0.01, P < 0.05$),提示眼针干预可改善卒中后的认知功能障碍;在加入 $\alpha 7nAChR$ 拮抗剂后,眼针对上述行为学指标的改善作用被显著抑制($P < 0.01, P < 0.05$)。各组大鼠游泳速度差异无统计学意义。见图1。



注:与假手术组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与眼针组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图1 各组大鼠的平均游泳速度、逃避潜伏期、穿越平台次数比较($\bar{x} \pm s$, 9只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of mean swimming speed, escaping latency, number of platform crossings of rats in the 5 groups ($\bar{x} \pm s$, 9 rats/group)

2.2 各组大鼠脑梗死体积的比较

空白组与假手术组大鼠未见明显梗死区域;与假手术组相比,模型组大鼠脑梗死体积百分比增加($P < 0.01$)。与模型组相比,眼针组大鼠脑梗死体积百分比减少($P < 0.01$);与眼针组相比,眼针+拮抗剂组大鼠脑梗死体积百分比增加($P < 0.01$)。见图2。

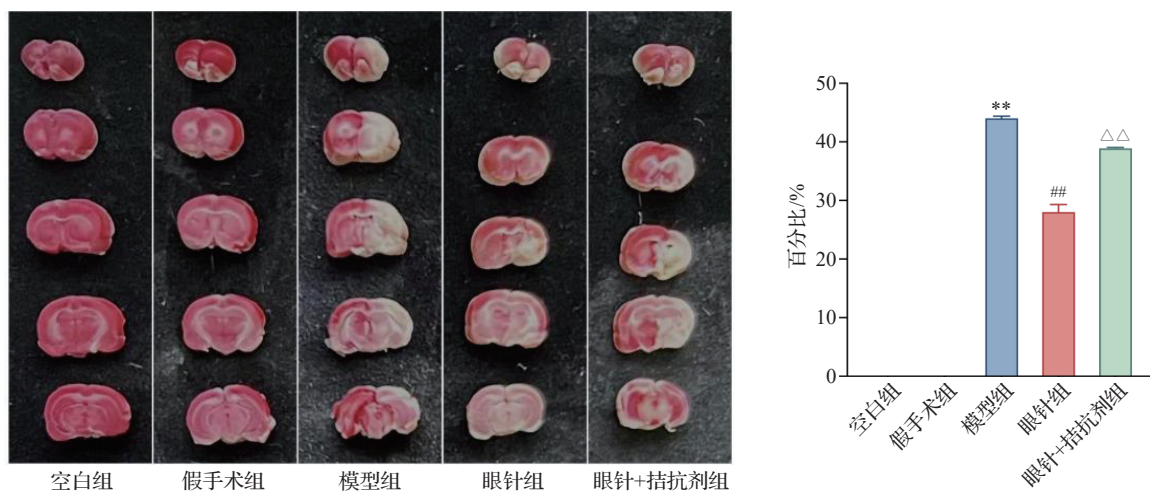
2.3 各组大鼠海马组织病理形态学的比较

空白组与假手术组大鼠大脑海马结构完整,神经元形态规则,排列整齐;模型组大鼠海马区出现病理损伤,表现为神经元排列紊乱,部分神经元胞

体缩小、胞质嗜酸性变、细胞核固缩,细胞间隙增宽,可见散在的空泡样透明区;与模型组相比,眼针干预后上述病理损伤减轻,在联合拮抗剂后损伤程度较眼针组加重。见图3。

2.4 各组大鼠血清及海马组织中炎性细胞因子水平的影响

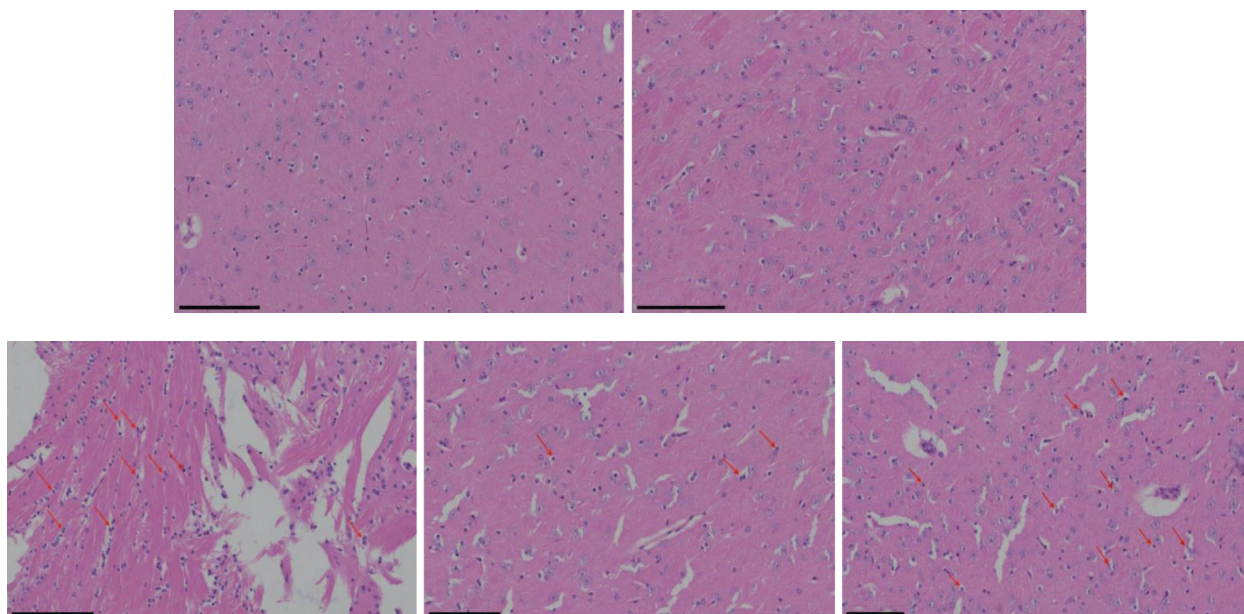
空白组与假手术组大鼠血清及海马组织中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量差异无统计学意义;与假手术组相比,模型组大鼠血清及海马组织中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量升高($P < 0.01$)。与模型组相比,眼针组上述炎性因子含量降低($P < 0.01$);与眼针组相



注:与假手术组相比:** $P<0.01$;与模型组相比:## $P<0.01$;与眼针组相比:△△ $P<0.01$ 。

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

Fig. 2 Comparison of the percentage of cerebral infarction volume of rats in the 5 groups(TTC staining, $\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)



注:标尺=100 μm 。

图3 各组大鼠海马组织病理形态学的比较(HE染色)

Fig. 3 Comparison of the histopathological morphology of the hippocampal tissues of rats in the 5 groups(HE staining)

比,在加入 $\alpha 7\text{nAChR}$ 拮抗剂后,上述炎症因子水平升高($P<0.01$)。见图4。

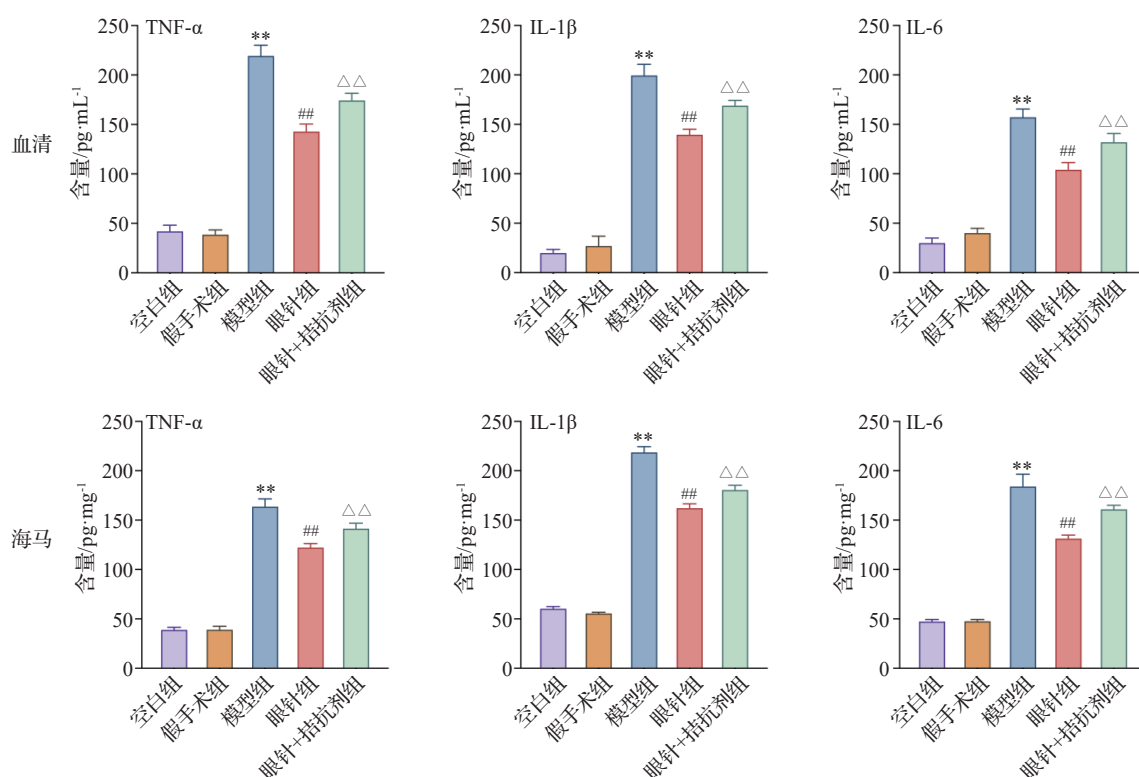
2.5 各组大鼠海马组织 $\alpha 7\text{nAChR}$ 、ChAT、AChE mRNA 表达的比较

空白组与假手术组大鼠海马组织中 $\alpha 7\text{nAChR}$ 、ChAT、AChE mRNA 相对表达量差异无统计学意义;与假手术组相比,模型组大鼠海马组织中 $\alpha 7\text{nAChR}$ 、ChAT mRNA 相对表达量下调,AChE mRNA 相对表达量上调($P<0.01$)。与模型组相比,眼针组大鼠海马组织中 $\alpha 7\text{nAChR}$ 、ChAT

mRNA 相对表达量上调($P<0.01$),AChE mRNA 相对表达量下调($P<0.01$);与眼针组相比,眼针+拮抗剂组大鼠海马组织中 $\alpha 7\text{nAChR}$ 、ChAT mRNA 相对表达量下调,AChE mRNA 相对表达量上调($P<0.01$)。见图5。

2.6 各组大鼠海马组织中 $\alpha 7\text{nAChR}$ 、ChAT、NF- κB p65、p-NF- κB p65、AChE 蛋白表达的比较

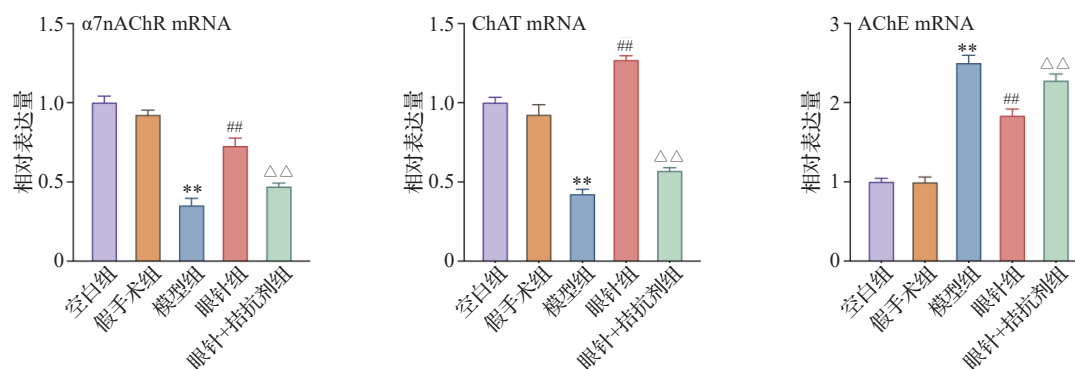
空白组与假手术组大鼠海马组织中 $\alpha 7\text{nAChR}$ 、ChAT、NF- κB p65、p-NF- κB p65、AChE 蛋白的相对表达量差异无统计学意义;与假手术组相比,模



注:TNF-α为肿瘤坏死因子-α,IL-6为白细胞介素-6,IL-1β为白细胞介素-1β。与假手术组相比,** $P<0.01$;与模型组相比:## $P<0.01$;与眼针组相比,Δ $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠血清及海马组织TNF-α,IL-6,IL-1β含量的比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of TNF-α, IL-6 and IL-1β contents in serum and hippocampal tissues of rats in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)



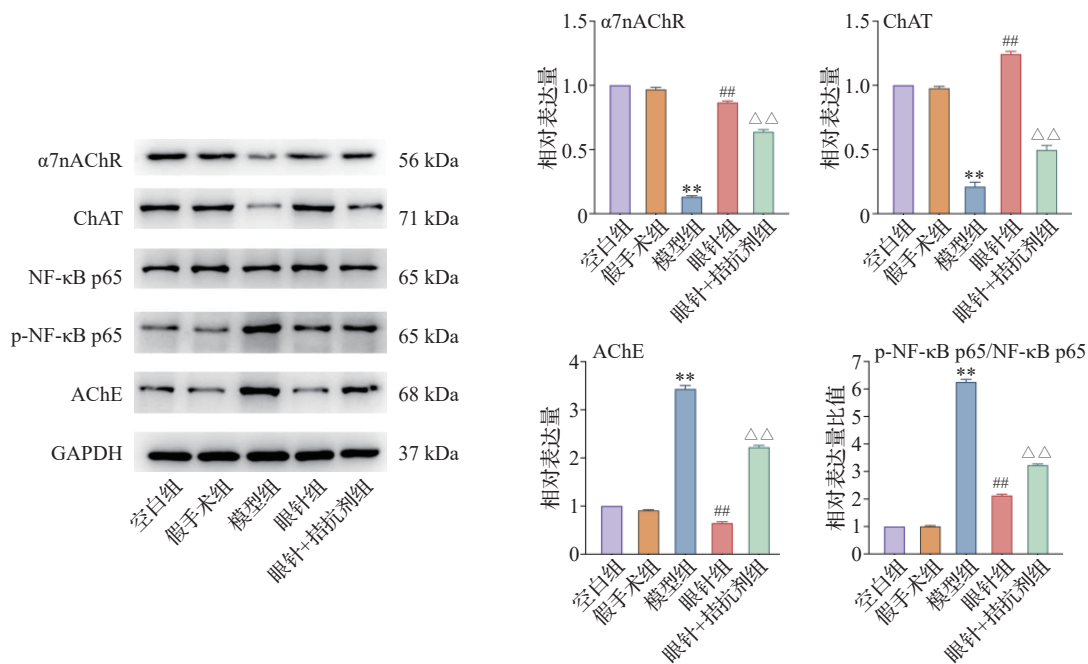
注:α7nAChR为α7烟碱型乙酰胆碱受体,ChAT为胆碱乙酰转移酶、AChE为乙酰胆碱酯酶。与假手术组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$;与眼针组相比,Δ $P<0.01$ 。

图5 各组大鼠大脑海马组织α7nAChR、ChAT、AChE mRNA相对表达量的比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of the relative mRNA expression levels of α7nAChR, ChAT and AChE in hippocampal tissues of rats in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$, 3rats/group)

型组大鼠海马组织中α7nAChR、ChAT蛋白相对表达量下调($P<0.01$),AChE蛋白相对表达量上调($P<0.01$),p-NF-κB p65/NF-κB p65蛋白表达量比值增加($P<0.01$)。与模型组相比,眼针组大鼠海马组织中α7nAChR、ChAT蛋白相对表达量上调($P<0.01$),AChE蛋白相对表达量下调($P<0.01$),

p-NF-κB p65/NF-κB p65蛋白表达量比值下降($P<0.01$);与眼针组相比,眼针+拮抗剂组大鼠海马组织中α7nAChR、ChAT蛋白相对表达量下调($P<0.01$),AChE蛋白相对表达量上调($P<0.01$),p-NF-κB p65/NF-κB p65蛋白表达量比值增加($P<0.01$)。各组NF-κB p65蛋白表达量差异无统计学意义。见图6。



注:α7nAChR为α7烟碱型乙酰胆碱受体,ChAT为胆碱乙酰转移酶,NF-κB p65为核因子-κB p65亚基,p-NF-κB p65为磷酸化核因子-κB p65,AChE为乙酰胆碱酯酶。与假手术组相比:** $P<0.01$;与模型组相比:## $P<0.01$;与眼针组相比:△△ $P<0.01$ 。

图6 各组大鼠脑组织中α7nAChR,ChAT,NF-κB p65,p-NF-κB p65,AChE蛋白的表达水平比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of the expression levels of α7nAChR, ChAT, NF-κB p65, p-NF-κB p65 and AChE proteins in brain tissues of rats in the four groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

3 讨论

本研究旨在评估眼针疗法对卒中后认知障碍及胆碱能抗炎通路的影响。实验结果显示,MCAO/R造模后大鼠出现认知功能下降,眼针干预可显著改善MCAO/R大鼠的学习和记忆能力,减小脑梗死体积,减轻海马神经元病理损伤,具有神经保护作用。进一步研究结果显示眼针对胆碱能抗炎通路具有调控作用。眼针可上调MCAO/R大鼠海马组织ChAT和α7nAChR的表达、下调AChE的表达,同时抑制了NF-κB p65磷酸化,降低血清及海马组织TNF-α、IL-6、IL-1β的水平,具有改善神经炎症反应的作用。此外,在眼针基础上联合α7nAChR拮抗剂MLA后,上述作用效果明显减弱,提示眼针效应可能部分通过α7nAChR介导。

本研究结果与既往关于α7nAChR抗炎信号的机制结论一致:在MCAO/R条件下,α7nAChR的激活可参与调节炎症反应并抑制TNF-α/NF-κB相关通路,并与卒中后的认知功能恢复相关^[14,24]。胆碱能抗炎通路作为连接神经系统和免疫系统的重要“炎症反射”通路,是近年来PSCI病理机制的研究热点,该通路迷走神经活动可通过调节胆碱能信号抑制炎症因子水平,而α7nAChR是与ACh结合的关键受体亚基之一^[25-26],参与调控多条下游信号通

路^[27-29],从而调节炎症因子的释放,改善神经炎症反应,并维持胆碱能系统稳态^[28]。海马体胆碱能回路与学习、记忆功能密切相关,其中ChAT介导合成ACh,AChE介导降解ACh,共同维持胆碱能系统的稳态^[30-32]。研究显示,脑卒中后大脑皮层胆碱能回路受损,ChAT活性下降及AChE活性升高与认知障碍密切相关^[30-31]。胆碱酯酶抑制剂,如多奈哌齐、加兰他敏等药物,可通过抑制AChE的活性来提高ACh的水平,可以改善卒中后的认知功能,但不良反应明显^[1,8,33-34]。

NF-κB是经典信号通路的关键转录因子,其p50和p65亚基的激活和核转位在脑卒中后的神经炎症反应中具有关键作用^[35]。有研究表明脑卒中后NF-κB的激活是PSCI的病理特征之一,靶向NF-κB信号可以改善认知功能,如实验研究发现甾体生物碱tomatidine可以下调PSCI小鼠海马区M1型小胶质细胞和炎症介质的表达,抑制NF-κB的磷酸化和核转位,减轻海马CA1/CA3区神经元退行性改变,从而改善空间记忆障碍^[36]。此外,电针可通过抑制TLR4/NF-κB/NLRP3信号通路,减少小胶质细胞活化,降低促炎因子水平,改善PSCI大鼠的学习记忆能力和海马病理形态^[37]。

眼针疗法核心思想是“眼为脑之外候、上通于

脑、下连脏腑”，然而由于其操作所需的针具、手法和理论特殊，应用受到限制^[9-10]。有研究纳入了195篇有关眼针治疗脑卒中的临床文献，涉及15 466例患者，结果显示眼针在脑卒中的急性期和恢复期均能有效改善神经功能缺损和日常生活能力，可作为脑卒中后辅助康复疗法^[38]。在基础研究方面，眼针可改善脑缺血再灌注损伤，与血脑屏障、细胞自噬、神经炎性等机制相关，可通过多靶点、多通路发挥神经保护作用^[39]。眼针疗法的穴位是位于眼眶外缘2 mm处，其刺激区域在解剖学上与三叉神经眼支(V1)部分、上颌支(V2)的感觉支配部分重叠^[12]。由眼眶或眼周刺激而触发的三叉-迷走反射，亦称眼—心反射，其反射弧由三叉神经传入与迷走神经传出共同构成，提示眼周可能是神经网络调控的潜在区域^[11,40]。因此，眼针的解剖学意义可能是一个非侵入、可重复、安全的迷走神经刺激手段，通过激活胆碱能抗炎通路，抑制炎症反应。综上，本研究将 $\alpha 7$ nAChR作为眼针干预的核心分子靶点，通过观察胆碱能系统相关分子的表达，评估眼针对胆碱能抗炎通路的调控作用，并抑制下游NF- κ B介导的炎症反应，以改善PSCI的认知功能结局。

本研究的意义不仅在于为眼针治疗PSCI提供实验依据，也进一步验证 $\alpha 7$ nAChR相关的胆碱能抗炎通路在PSCI中的关键作用。本研究亦存在局限性，首先本研究采用的是MCAO/R雄性大鼠构建PSCI模型，无法代表PSCI的病理异质性，未来需要在不同年龄、性别、合并代谢综合征等共病模型中重复验证。其次，本研究主要通过对 $\alpha 7$ nAChR/ChAT/AChE表达水平来评价胆碱能系统，通过NF- κ B磷酸化水平及促炎因子水平来评价炎症反应，未直接测定海马ACh含量及其动态变化，也未区分神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞等不同细胞类型在胆碱能抗炎通路中的作用。研究可以支持眼针与 $\alpha 7$ nAChR相关的胆碱能抗炎通路的调控作用，但无法阐明其是否通过上游神经环路介导，无法验证其与三叉-迷走反射学说是否有关。未来需进一步探析眼针在调控胆碱能抗炎通路中的信号网络和细胞靶点，为临床诊疗提供依据。此外，本研究仅以游泳速度作为游泳能力指标以评估潜在运动混杂的因素，但游泳速度不足以完全排除卒中后残余的运动缺损对水迷宫结果的影响，后续研究可在现有轨迹数据基础上补充路径长度与搜索效率的比值指标，并结合神经功能评分进行分层或敏感性分析，以进一步提高因果解释的严谨性^[41]。

本研究结果表明，眼针可改善MCAO/R大鼠的学习和记忆功能，减轻脑梗死体积和海马神经元病理损伤，对 $\alpha 7$ nAChR相关的胆碱能抗炎通路具有调控作用。具体表现为眼针可上调海马组织 $\alpha 7$ nAChR和ChAT、下调AChE的表达，并抑制NF- κ B介导的炎症反应，降低TNF- α 、IL-1 β 及IL-6的释放，具有抗炎和神经保护的作用， $\alpha 7$ nAChR拮抗剂可部分削弱上述效应。本研究为PSCI的治疗提供了新的理论依据和治疗靶点，也为其他神经调控手段在PSCI中的应用提供了实验基础。眼针作为一种安全、经济且易于与其他常规康复训练联合的中医特色疗法，值得进一步研究并推广。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] El Husseini N, Katzan I L, Rost N S, et al. Cognitive impairment after ischemic and hemorrhagic stroke: a scientific statement from the American heart association/American stroke association[J]. *Stroke*, 2023, 54(6): e272-e291.
- [2] Guo X F, Phan C, Batarseh S, et al. Risk factors and predictive markers of post-stroke cognitive decline-a mini review[J]. *Front Aging Neurosci*, 2024, 16: 1359792.
- [3] Halder N, Yadav S, Lal G. Neuroimmune communication of the cholinergic system in gut inflammation and autoimmunity [J]. *Autoimmun Rev*, 2024, 23(12): 103678.
- [4] O' Sullivan M J, Oestreich L K L, Wright P, et al. Cholinergic and hippocampal systems facilitate cross-domain cognitive recovery after stroke [J]. *Brain*, 2022, 145(5): 1698-1710.
- [5] Czura C J, Tracey K J. Autonomic neural regulation of immunity[J]. *J Intern Med*, 2005, 257(2): 156-166.
- [6] Duris K, Lipkova J, Jurajda M. Cholinergic anti-inflammatory pathway and stroke [J]. *Curr Drug Deliv*, 2017, 14(4): 449-457.
- [7] Echeverria V, Mendoza C, Iarkov A. Nicotinic acetylcholine receptors and learning and memory deficits in Neuroinflammatory diseases [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1179611.
- [8] Kim J O, Lee S J, Pyo J S. Effect of acetylcholinesterase inhibitors on post-stroke cognitive impairment and vascular dementia: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0227820.
- [9] Shao Y, Wang P Q, Wang Q, et al. Eye-acupuncture with rehabilitation therapy for stroke [J]. *Medicine*, 2020, 99(18): e20096.

- [10] Wang Q, Ma N T, Wang P Q, et al. Effects of eye-acupuncture combined with rehabilitation training for poststroke dyskinesia: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine*, 2021, 100(10): e25036.
- [11] Yoo J J, Gishen K E, Thaller S R. The oculocardiac reflex: its evolution and management[J]. *J Craniofac Surg*, 2021, 32(1): e80-e83.
- [12] ten Tusscher M P, Klooster J, van der Want J J, et al. The allocation of nerve fibres to the anterior eye segment and peripheral ganglia of rats. I. The sensory innervation[J]. *Brain Res*, 1989, 494(1): 95-104.
- [13] Tan Z Y, Zheng X C, Dai L N, et al. Ethyl 4- (4-bromophenyl) -2-diazo-4- (formyloxy) butanoate exerts anti-inflammatory effects on RAW 264.7 cells and zebrafish through the activation of $\alpha 7$ nAChR [J]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 997: 177463.
- [14] Nguyen D T, Mendoza K, Hall C, et al. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor contributes to long-term cognitive recovery following ischemic stroke [J]. *Exp Neurol*, 2026, 397: 115562.
- [15] Zhang Y, Gao S Q, Lin L, et al. Electroacupuncture therapy improves cognitive dysfunction after ischemic stroke in Sprague-Dawley rats by adjusting the lncRNA-MEG3/miR-4640-3p axis[J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2025, 87(9): 5512-5521.
- [16] Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0[J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(7): e3000411.
- [17] Liu J, Li C Y, Peng H W, et al. Electroacupuncture attenuates learning and memory impairment *via* activation of $\alpha 7$ nAChR-mediated anti-inflammatory activity in focal cerebral ischemia/reperfusion injured rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2): 939-946.
- [18] Chu X F, Qi C J, Zou L Y, et al. Intraluminal suture occlusion and ligation of the distal branch of internal carotid artery: an improved rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 168(1): 1-7.
- [19] Belayev L, Alonso O F, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model[J]. *Stroke*, 1996, 27(9): 1616-1622.
- [20] 王艳杰, 柴纪严, 任平, 等. 大鼠眼针八区十三穴分区定位和刺法标准化研究[J]. *中华中医药杂志*, 2013(6): 1695-1698.
- Wang Y J, Chai J Y, Ren P, et al. Standardization study of rat eye-acupuncture on region-dividing location and needling method of eight regions-thirteen acupoints (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2013(6): 1695-1698.
- [21] 辽宁中医药大学附属医院. 针灸技术操作规范, 第15部分: 眼针 [Z]. 国家市场监督管理总局; 国家标准化管理委员会. 2021: 16.
- Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine. Technical Operation Specifications for Acupuncture and Moxibustion—Part 15: Eye Acupuncture. In: State Administration for Market Regulation; Standardization Administration of the People's Republic of China, 2021: 16.
- [22] Kempster F E, Pratt J A. Mecamylamine but not the $\alpha 7$ receptor antagonist α -bungarotoxin blocks sensitization to the locomotor stimulant effects of nicotine [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 131(5): 997-1003.
- [23] Vorhees C V, Williams M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-858.
- [24] Hasan M Y, Roslan A H M, Azmi N, et al. $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor activation modulates BV2 microglial plasticity *via* miR-21/TNF- α /NF κ B in oxygen - glucose deprivation/reoxygenation [J]. *J Mol Neurosci*, 2024, 75(1): 2.
- [25] Gao F Y, Du W H, Guo C, et al. $\alpha 7$ nACh receptor, a promising target to reduce BBB damage by regulating inflammation and autophagy after ischemic stroke [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 179: 117337.
- [26] Namgung U, Kim K J, Jo B G, et al. Vagus nerve stimulation modulates hippocampal inflammation caused by continuous stress in rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 33.
- [27] Ablat N, Liu R Z, Ablimit M, et al. Preventive effects of a standardized flavonoid extract of safflower in rotenone-induced Parkinson's disease rat model [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 217: 109209.
- [28] 陈采益, 蒯远全, 王张颖, 等. 不同强度电针与手针“上巨虚”干预急性炎性内脏痛大鼠的效应及与 $\alpha 7$ nAChR/PI3K/AKT通路的关系[J]. *针刺研究*, 2025, 50(12): 1365-1375.
- Chen C Y, Lin Y Q, Wang Z Y, et al. Effects of different intensities of electroacupuncture and manual acupuncture at “Shangjuxu” (ST37) on acute inflammatory visceral pain and their relationship with $\alpha 7$ nAChR/PI3K/AKT signaling pathway (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(12): 1365-1375.
- [29] Ni H J, Liu M Q, Cao M D, et al. Sinomenine regulates the cholinergic anti-inflammatory pathway to inhibit TLR4/NF- κ B pathway and protect the homeostasis in brain and gut in

- scopolamine-induced Alzheimer's disease mice [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 171: 116190.
- [30] Liu Z H, Shi X J, Xu X Y, et al. DHYZ modulates hippocampal cholinergic pathway acetylation to ameliorate cognitive deficits post-ischemic stroke in rats [J]. Brain Res, 2025, 1866: 149926.
- [31] Qi Y Q, Wang Y Y, Ni M Y, et al. Safflower yellow alleviates cognitive impairment in mice by modulating cholinergic system function, oxidative stress, and CREB/BDNF/TrkB signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 340: 118986.
- [32] Tarnawski L, Shavva V S, Kort E J, et al. Cholinergic regulation of vascular endothelial function by human ChAT⁺ T cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120 (14) : e2212476120.
- [33] Dammavalam V, Rupert D, Lanio M, et al. Dementia after ischemic stroke, from molecular biomarkers to therapeutic options[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(14): 7772.
- [34] Eapen B C, Tran J, Ballard-Hernandez J, et al. Stroke rehabilitation: synopsis of the 2024 U. S. department of veterans affairs and U. S. department of defense clinical practice guidelines [J]. Ann Intern Med, 2025, 178 (2) : 249-268.
- [35] Crack P J, Taylor J M, Ali U, et al. Potential contribution of NF-kappaB in neuronal cell death in the glutathione peroxidase-1 knockout mouse in response to ischemia-reperfusion injury[J]. Stroke, 2006, 37(6): 1533-1538.
- [36] Kita A, Kawade Y, Murakami H, et al. Tomatidine attenuates post-stroke cognitive impairment by reducing neuroinflammation through prevention of M1 microglial polarization *via* NF-κB signaling [J]. J Pharmacol Sci, 2025, 158(4): 294-302.
- [37] Bian J, Liu C X, Li X, et al. Electroacupuncture improves the learning and memory abilities of rats with PSCI by attenuating the TLR4/NF-κB/NLRP3 signaling pathway on the hippocampal microglia [J]. Neuroreport, 2024, 35 (12) : 780-789.
- [38] Shao Y, Wang M, Liu B T, et al. Eye-acupuncture as adjuvant therapy for stroke: a bibliometric analysis of clinical studies[J]. J Tradit Chin Med Sci, 2019, 6(3): 263-269.
- [39] 王宇, 包烨华, 王哲, 等. 眼针干预脑缺血再灌注损伤的分子机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(8): 245-249.
- Wang Y, Bao Y H, Wang Z, et al. Mechanism of eye acupuncture against cerebral ischemia/reperfusion injury: a review (in Chinese) [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 50(8): 245-249.
- [40] Schaller B, Cornelius J F, Prabhakar H, et al. The trigemino-cardiac reflex: an update of the current knowledge [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2009, 21(3): 187-195.
- [41] Bingham D, Martin S J, MacRae I M, et al. Watermaze performance after middle cerebral artery occlusion in the rat: the role of sensorimotor versus memory impairments [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(6): 989-999.

收稿日期:2025-12-30 修回日期:2026-04-08