

电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆及中枢炎性反应的影响

吕 转¹, 陈玉龙², 王亚敏³, 刘瑞东¹, 苏凯奇¹, 张 铭¹, 李瑞青¹, 印 帅¹, 冯晓东¹
(¹河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; ²河南中医药大学仲景学院, 郑州 450046;
³河南中医药大学康复医学院, 郑州 450046)

【摘要】 目的:观察电针对脑缺血再灌注(MCAO/R)模型大鼠学习记忆功能及中枢炎性反应的影响,探讨其可能机制。方法:88只SD大鼠随机抽取14只为空白组、14只为假手术组,其余60只大鼠通过线栓法制备MCAO/R模型,将造模成功的大鼠随机分为模型组与电针组,每组14只。电针组于“神庭”“百会”进行电针,30 min/次,1次/d,连续14 d。干预结束后以Zea-Longa法和Morris水迷宫法评估大鼠神经功能和学习记忆功能,TTC染色法评估大鼠脑梗死情况,尼氏染色法观察大鼠神经元损伤情况,免疫荧光法检测大鼠海马CA1区离子钙结合适配器分子1(Iba1)蛋白的阳性表达,ELISA法检测血清中促炎因子白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及血脑屏障相关因子S100 β 的含量,Western blot法检测海马组织中Iba1、炎性因子及紧密连接蛋白闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、Occludin、Claudin5蛋白表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分升高($P<0.01$),逃避潜伏期延长($P<0.01$),穿越原平台次数减少($P<0.01$),脑梗死体积增加($P<0.001$),海马神经元形态异常,Iba1标记的小胶质细胞数量增多($P<0.01$),海马组织中Iba1、Toll样受体4(TLR4)、核转录因子(NF)- κ B、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 表达水平升高($P<0.01$),紧密连接蛋白ZO-1、Occludin及Claudin5蛋白表达水平降低($P<0.01$),血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及S100 β 含量均升高($P<0.01$)。与模型组比较,电针组大鼠神经功能缺损评分下降($P<0.01$),逃避潜伏期缩短($P<0.01$),穿越原平台次数增加($P<0.01$),脑梗死体积缩小($P<0.01$),神经元形态较规则,Iba1标记的小胶质细胞数量减少($P<0.01$),海马组织中Iba1、TLR4、NF- κ B、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 表达水平降低($P<0.01$, $P<0.05$),紧密连接蛋白ZO-1、Occludin、及Claudin5蛋白表达水平升高($P<0.01$, $P<0.05$),血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及S100 β 含量均下降($P<0.01$)。结论:电针“神庭”“百会”可改善MCAO/R大鼠学习记忆功能,其机制可能与修复中枢血脑屏障、降低促炎因子水平,进而抑制小胶质细胞的活化及中枢神经炎性反应密切相关。

【关键词】 电针;脑缺血再灌注;学习记忆障碍;小胶质细胞;中枢炎性反应

Effects of electroacupuncture on learning memory and central inflammatory response in rats with cerebral ischemia-reperfusion

LÜ Zhuan¹, CHEN Yu-long², WANG Ya-min³, LIU Rui-dong¹, SU Kai-qi¹, ZHANG Ming¹, LI Rui-qing¹, YIN Shuai¹, FENG Xiao-dong¹ (¹The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; ²Zhongjing College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; ³College of Rehabilitation Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【ABSTRACT】 **Objective** To observe the effects of electroacupuncture (EA) on learning memory and central inflammatory response in rats with middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R), and to explore its potential mechanisms. **Methods** A total of 88 SD rats were randomly divided into a blank group (14 rats), a sham operation group (14 rats), and the remaining 60 rats were used to establish the MCAO/R model using the suture-occlusion

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20240966

引用格式:吕转,陈玉龙,王亚敏,等.电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆及中枢炎性反应的影响[J].针刺研究,2026,51(1):21-30.

项目来源:国家自然科学基金面上项目(No. 82174473);河南省自然科学基金项目(No. 242300421524);河南省中医药科学研究专项课题(No. 2022JDZX028)

通信作者:冯晓东, E-mail:fxd0502@163.com

method. The successfully modeled rats were randomly divided into a model group and an EA group, with 14 rats in each group. Rats of the EA group received EA at “Shenting” (GV24) and “Baihui” (GV20) for 30 min, once daily for 14 consecutive days. After intervention, neurological function and learning memory were evaluated using the Zea-Longa score and Morris water maze test. The brain infarction volume was assessed using TTC staining. Neuronal damage was observed using Nissl staining. Immunofluorescence was used to detect the positive expression of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) in the hippocampal CA1 region. ELISA was used to measure the levels of pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , and the blood-brain barrier-related factor S100 β in serum. Western blot was used to detect the relative expression levels of Iba1, inflammatory factors, and tight junction proteins zonula occludens-1 (ZO-1), Occludin, and Claudin5 in the hippocampal tissue. **Results** Compared with the sham operation group, rats of the model group showed increased neurological function scores ($P < 0.01$), prolonged escape latency ($P < 0.01$), reduced times of crossings over the original platform ($P < 0.01$), increased brain infarction volume ($P < 0.001$), abnormal hippocampal neuronal morphology, increased number of Iba1-labeled microglia ($P < 0.01$), elevated relative expression level of Iba1 protein ($P < 0.01$), increased protein expression levels of Toll-like receptor 4 (TLR4), Nuclear factor-kappa B (NF- κ B), IL-6, IL-1 β and TNF- α in the hippocampus ($P < 0.01$), decreased protein expression levels of ZO-1, Occludin and Claudin5 ($P < 0.01$), and increased contents of IL-6, IL-1 β , TNF- α and S100 β in serum ($P < 0.01$). After EA intervention, compared with those of the model group, rats of the EA group showed decreased neurological function scores ($P < 0.01$), shortened escape latency ($P < 0.01$), increased times of crossings over the original platform ($P < 0.01$), reduced brain infarction volume ($P < 0.01$), more regular neuronal morphology, decreased number of Iba1-labeled microglia ($P < 0.01$), decreased protein expression levels of TLR4, NF- κ B, Iba1, IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the hippocampal tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$), increased protein expression levels of ZO-1, Occludin, and Claudin5 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and decreased contents of IL-6, IL-1 β , TNF- α and S100 β in serum ($P < 0.01$). **Conclusion** EA at GV24 and GV20 can improve learning memory function in MCAO/R rats, and its mechanism may be related to the repair of the central blood-brain barrier, reduction of pro-inflammatory cytokine levels, and inhibition of microglial activation and central neuroinflammation.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Cerebral ischemia-reperfusion; Learning memory impairment; Microglia; Central inflammatory response

缺血性脑卒中(IS)后认知障碍是指在缺血性脑卒中发生后6个月内出现的学习、记忆、执行、思维判断等高级脑功能的综合性认知障碍,在每年新增的IS患者中存在认知障碍者占53.1%,其中学习记忆障碍作为认知障碍的一个重要领域,不仅直接影响患者的生活质量、日常生活能力、心理健康状况,还严重影响患者总体功能康复,是目前临床康复研究的热点和难点^[1]。海马属于大脑的边缘系统,与学习记忆、情绪等大脑高级活动密切相关,作为海马中主要细胞类型之一的小胶质细胞是大脑内的天然免疫细胞,当其被激活时可释放多种细胞因子诱发中枢神经免疫炎症反应,与海马神经元损伤引起的学习记忆功能障碍密切相关^[2-3]。针刺具有疏通经络、调和气血、调理脏腑、恢复稳态的作用,其在IS及其相关功能障碍的治疗中发挥至关重要的作用^[4]。研究显示,电针神庭、百会可有效改善IS后认知功能障碍,提高患者日常生活自理能力,同时其可抑制IS后认知障碍患者的全身系统性炎症反应^[5-6]。另有研究证实针刺可通过调控大脑中

动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型大鼠相关炎症信号通路,改善海马神经元损伤情况,抑制脑组织缺氧并提高脑血流量,促进脑功能恢复以改善学习记忆障碍^[7]。然而目前关于电针神庭、百会改善IS学习记忆障碍与中枢及全身系统炎症反应的相关性尚不明晰。本研究通过构建MCAO/R学习记忆障碍大鼠模型,观察其学习记忆能力、血脑屏障、全身炎症反应、小胶质细胞活化及炎症反应的变化,探讨电针改善MCAO/R学习记忆能力的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

88只雄性SPF级健康SD大鼠,体质量200~250g,由济南朋悦繁育实验动物技术有限公司提供。大鼠饲养于河南中医药大学第一附属医院中心实验室,保持室温在(25±2)°C,湿度在50%~70%,饲养环境固定在光暗交替周期12h/12h循环中,动物使用许可证号:SYXK(鲁)20190003。本实验通过河南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(编号:YFYDW2021030),对动物的

处理严格参照河南中医药大学第一附属医院实验动物研究指南进行。

1.2 主要仪器与试剂

高速组织研磨仪(武汉赛维尔),离心机、-80℃超低温冰箱、酶标仪(美国 Thermo),电泳仪、凝胶成像系统、转膜仪(美国 Bio-Rad),烤片机(德国赛利),水迷宫装置(上海欣软),病理切片机(德国徕卡),荧光显微镜(日本 Olympus),华佗牌电子针疗仪、不锈钢毫针(苏州医疗用品厂有限公司),Image J 软件(美国 NIH)。

白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) S100 β ELISA 试剂盒(伊莱瑞特),RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝),PVDF 膜(德国 Millipore),IL-6 抗体、IL-1 β 抗体、TNF- α 抗体、离子钙结合适配器分子1(Iba1)抗体、Toll 样受体4(TLR4)抗体、核转录因子 κ B(NF- κ B) 抗体、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)抗体、Occludin 抗体、Claudin5 抗体、 β -actin 抗体、荧光素及 HRP 标记的二抗(武汉三鹰)。

1.3 造模方法与分组

按照随机数字表法随机取14只作为空白组、14只作为假手术组,剩余60只大鼠制备MCAO/R学习记忆障碍模型^[8]。腹腔注射3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉大鼠,仰卧位固定,颈部备皮消毒,行正中切口,钝性分离浅筋膜和肌肉,暴露颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA)。结扎左侧ECA近心端,夹闭CCA近心端、远心端及ICA,于CCA近心端、远心端之间做一“V”形小口,插入线栓,经左侧ICA将线栓送入颅内,遇阻力而止,插入线栓深度约为18 mm,结扎线栓,缺血2 h后再缓慢抽出线栓约0.5 cm,剪去遗留体外的线栓。造模后24 h,采用Zea-Longa法^[9]评估大鼠神经功能缺损评分,1~3分为模型复制成功,纳入后续实验,并采用Morris水迷宫行为学实验检验纳入的大鼠是否存在学习记忆障碍^[10]。最终将造模成功的存活大鼠按随机数字表法分为模型组14只和电针组14只。

1.4 干预方法

造模成功后24 h开始干预。电针组选取大鼠“神庭”“百会”,穴位定位参照《实验动物常用穴位名称与定位 第2部分:大鼠》^[11]。用自制固定器固定大鼠,使其保持俯卧位,在大鼠头部前正中线上,额顶骨缝交界线前方的“神庭”和大鼠两耳连线与顶正中交叉处的“百会”,选用一次性华佗牌无菌

针灸针(0.35 mm \times 13 mm),以45°角斜刺进针约1 cm,连接电子针疗仪的一对电极,疏密波,频率2 Hz/10 Hz,电流强度1~3 mA,电针干预时间为30 min,每天干预1次,连续干预14 d。空白组、假手术组及模型组均在同等条件下给予同样抓取刺激30 min,不予其他干预。

1.5 观察指标及检测方法

Zea-Longa 评分法评估大鼠神经功能缺损程度:在造模后2 h和干预第7、14天分别对各组大鼠进行Zea-Longa评分。具体评分标准为:0分为无神经功能缺损指征;1分为提尾时对侧前肢屈曲且不能完全伸展;2分为不能直线行走,向对侧追尾式旋转;3分为行走时向对侧倾倒;4分为意识丧失,不能自发活动。分值越高代表神经功能损伤越严重。

Morris水迷宫行为学实验评估大鼠学习记忆功能:该实验分为定位航行实验和空间探索实验。定位航行实验于第9~13天干预结束后进行。将大鼠从平台对侧放至水池中,记录大鼠从入水到爬上平台所需时间,若在规定的90 s内找到平台并停留3 s以上,则认为其成功找到平台;而未在规定时间内找到平台,则由实验人员将大鼠引导至平台上,使其在平台上停留10~30 s,逃避潜伏期计为90 s。随后于第14天干预后进行空间探索实验,撤掉平台,将大鼠头朝池壁投放入水池内任一象限内,分别记录其在规定的90 s内穿过原平台有效区域的次数,最终取4个象限入水后穿越原平台有效区域次数的平均值。

标本采集:完成Morris水迷宫行为学实验后,每组随机选取3只大鼠,麻醉后断头处死,取全脑组织置于-20℃冰箱中快速冷冻变硬,用于TTC染色;每组随机取8只大鼠,麻醉后打开腹腔,腹主动脉采血,用于ELISA检测,随后每组取6只大鼠处死后于冰上取海马组织放入固定液中固定,平均分为2份,分别用于尼氏染色、免疫荧光染色检测;每组随机取3只大鼠,断头处死后于冰上取出海马组织,将其用冻存管标记后放置于-80℃冰箱中,用于Western blot检测。

TTC染色法检测大鼠脑梗死体积:取出脑组织,切成5个连续的冠状切面,切片厚度约为2 mm,浸泡于2% TTC溶液中,然后在37℃恒温箱中孵育染色30 min,取出后拍照,用Image J软件进行分析,计算各组大鼠的脑梗死体积。脑梗死体积百分比(%)=梗死体积 \div 全脑体积 \times 100%。

尼氏染色法观察大鼠海马区神经元病理形态

变化:将多聚甲醛固定的大鼠脑组织脱水、包埋、切片(厚度约为10 μm)、烤片后依次梯度脱水,于尼氏染液中浸泡10 min,纯水洗涤,尼氏分化液中分化,梯度乙醇脱水,最后二甲苯透明,中性树胶固定封片,光学显微镜拍照,观察各组神经元的损伤情况。

免疫荧光染色法检测大鼠海马CA1区Iba1阳性细胞表达:将固定的大鼠脑组织脱水、包埋切片(厚度约为4 μm)、微波热修复、洗涤后,在37℃下封闭2 h,滴加Iba1抗体(1:500),4℃孵育过夜,洗涤后加入FITC标记的二抗(1:500),孵育、洗涤后滴加DAPI染液进行细胞核染色,于室温下避光孵育10 min,PBS洗涤后封片。使用激光共聚焦显微镜拍摄荧光图像,以Image J软件进行分析,计算Iba1阳性细胞的数量。

ELISA法检测大鼠血清中促炎因子IL-1β、TNF-α、IL-6和血脑屏障功能破坏相关因子S100β的含量:大鼠腹主动脉采血4 mL,4℃离心10 min后提取血清300 μL,按照ELISA试剂盒步骤,依次在每孔加入血清样本100 μL,37℃恒温箱避光孵育90 min后弃液;随后每孔加入100 μL生物素化抗体工作液,37℃避光孵育60 min后弃液;洗板后每孔加入100 μL HRP结合物工作液,37℃避光孵育30 min后弃液;洗板后每孔加入90 μL底物溶液,37℃避光孵育15 min后加终止液50 μL。于酶标仪450 nm波长下测定各孔吸光度值,并根据标准曲线和方程式计算大鼠血清中IL-1β、TNF-α、IL-6、S100β的含量。

Western blot法检测海马组织中Iba1、TLR4、NF-κB、IL-6、IL-1β、TNF-α、ZO-1、Occludin及Claudin5蛋白表达:取出冻存的海马组织50 mg放置于EP管中,加入RIPA裂解缓冲液,匀浆机研磨后提取组织液,于低温高速离心机中4℃离心20 min,吸取上清液至新的EP管中,并采用BCA法测定蛋白浓度。随后进行SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳,制备10%的分离胶和5%的浓缩胶,放入电泳槽中上样、电泳。转膜,封闭,分别加入一抗(TLR4稀释比例为1:2 000,Iba1、NF-κB、IL-6、IL-1β、TNF-α、ZO-1、Occludin、Claudin5及β-actin为1:1 000)4℃孵育过夜,洗膜后加入二抗(1:5 000),于室温孵育后洗涤3次,加入ECL发光工作液,置于曝光仪器中自动曝光成像。以Image J软件分析条带的灰度值,以目的蛋白与内参β-actin条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

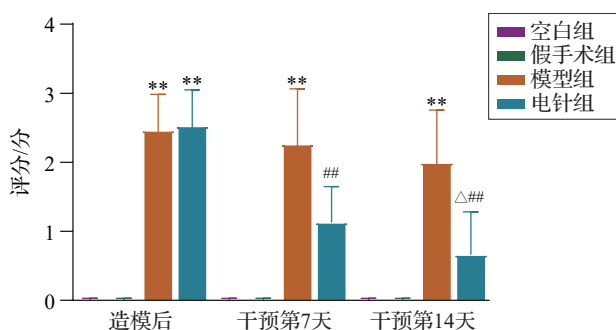
1.6 统计学处理

所有数据使用SPSS26.0软件进行统计学分析。计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较,方差齐则采用F检验,方差不齐则采用Kruskal-Wallis检验;平均逃避潜伏期数据采用重复测量方差分析,进一步两两比较,方差齐采用LSD检验,方差不齐采用Dunnett's *t*3检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能评分比较

空白组与假手术组均未出现神经功能缺损情况,评分均为0。与同时点假手术组比较,造模后模型组、电针组大鼠神经功能缺损评分升高($P < 0.01$),干预第7、14天模型组大鼠神经功能缺损评分仍升高($P < 0.01$);与同时点模型组比较,干预第7、14天电针组大鼠神经功能缺损评分下降($P < 0.01$)。与本组干预第7天比较,电针组干预第14天神经功能缺损评分更低($P < 0.05$)。见图1。



注:与同时点假手术组比较,** $P < 0.01$;与同时点模型组比较,## $P < 0.01$;与本组干预第7天比较,Δ $P < 0.05$ 。

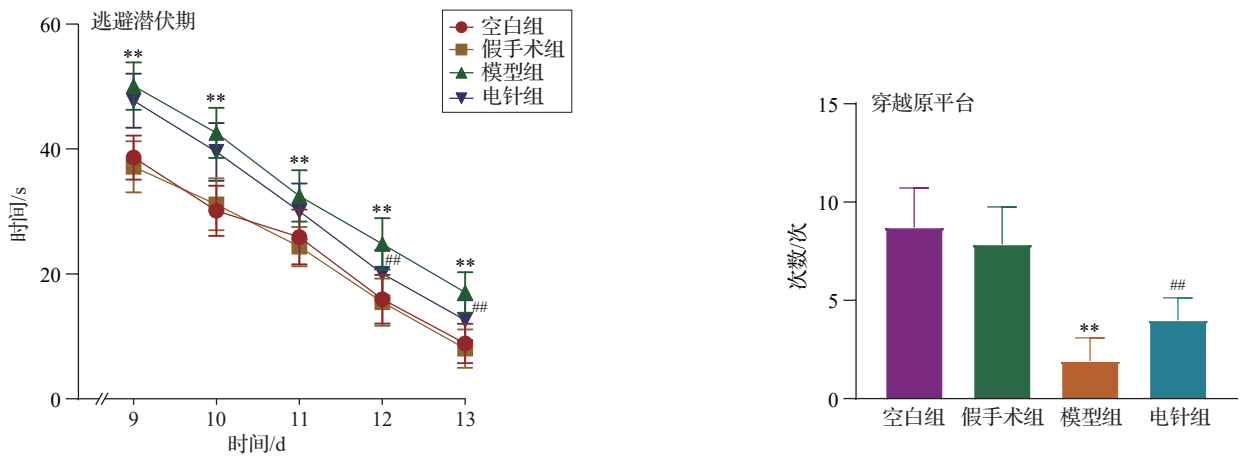
图1 各组大鼠神经功能缺损评分比较($\bar{x} \pm s$, 14只鼠/组)
Fig. 1 Comparison of neural function scores in rats of the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 14 rats/group)

2.2 各组大鼠逃避潜伏期、穿越原平台次数比较

空白组和假手术组大鼠平均逃避潜伏期、穿越原平台次数差异无统计学意义。与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长($P < 0.01$),穿越原平台次数减少($P < 0.01$);与模型组比较,电针组大鼠在第12、13天逃避潜伏期缩短($P < 0.01$),穿越原平台次数增加($P < 0.01$)。见图2。

2.3 各组大鼠海马组织病理形态学比较

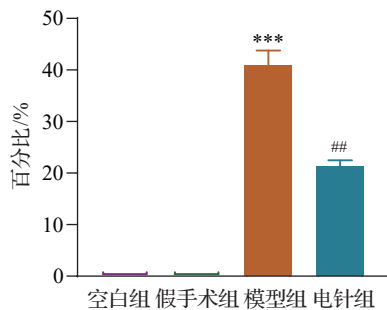
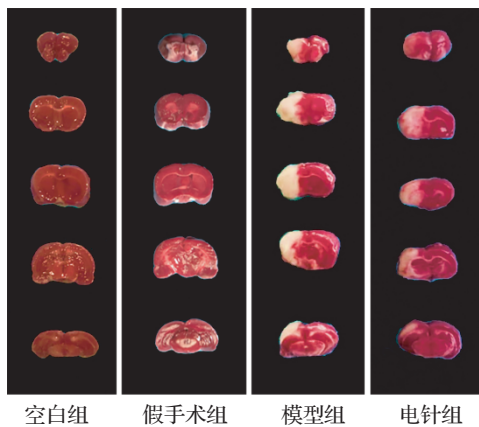
TTC染色结果如图3所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死体积增加($P < 0.001$);与模型组



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

图2 各组大鼠行为学比较($\bar{x} \pm s$, 14只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of behavioral changes among rats of the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 14 rats /group)



注:与假手术组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

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

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

比较,电针组大鼠脑梗死体积缩小($P < 0.01$)。尼氏染色结果如图4所示,空白组和假手术组大鼠海马CA1区神经元形态完整,海马神经元排列规则致密,核仁清晰,胞质内尼氏小体丰富,呈深蓝色,未出现神经元损伤缺失现象;与假手术组比较,模型组大鼠海马神经元形态异常,大部分细胞破裂,排列稀疏紊乱,胞质内尼氏小体数量明显减少或消

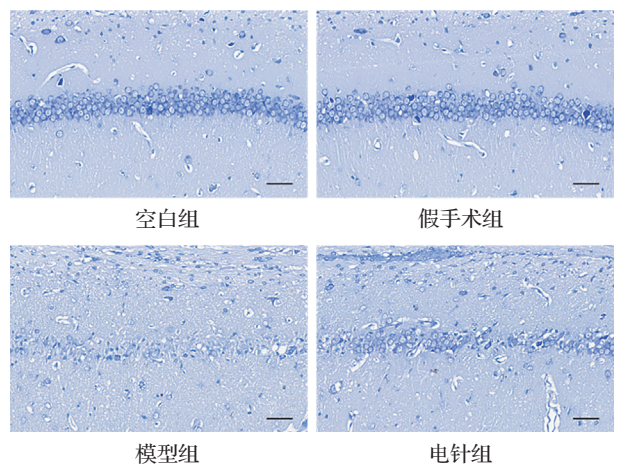
失,提示神经元受损及缺失严重;而与模型组比较,电针组大鼠细胞形态较规则,尼氏小体数量明显增多。

2.4 各组大鼠海马CA1区Iba1蛋白表达比较

空白组和假手术组Iba1标记的荧光小胶质细胞数量较少,小胶质细胞处于静止状态,Iba1蛋白表达水平较低;与假手术组比较,模型组Iba1标记的小胶质细胞数量增多($P < 0.01$),Iba1蛋白表达水平升高($P < 0.01$);与模型组比较,电针组Iba1标记的小胶质细胞数量减少($P < 0.01$),Iba1蛋白表达水平下降($P < 0.01$)。见图5、图6。

2.5 各组大鼠海马组织中促炎因子及紧密连接蛋白表达水平比较

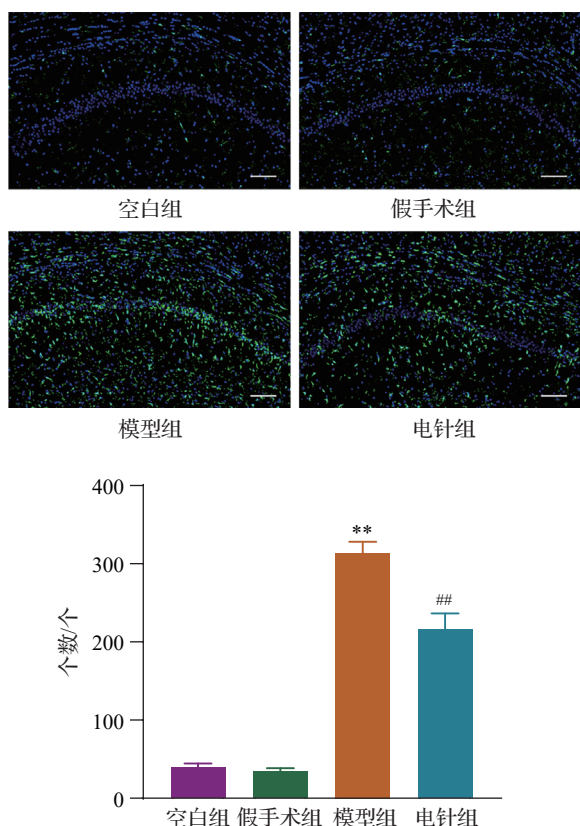
空白组和假手术组大鼠海马组织中促炎因



注:标尺=50 μm。

图4 各组大鼠海马组织神经元损伤情况比较(尼氏染色)

Fig. 4 Comparison of neuronal damage in hippocampal tissue of rats in the 4 groups (Nissl staining)



注: Iba1 为离子钙结合适配器分子 1。Iba1 阳性表达呈绿色荧光, 标尺=100 μm。与假手术组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

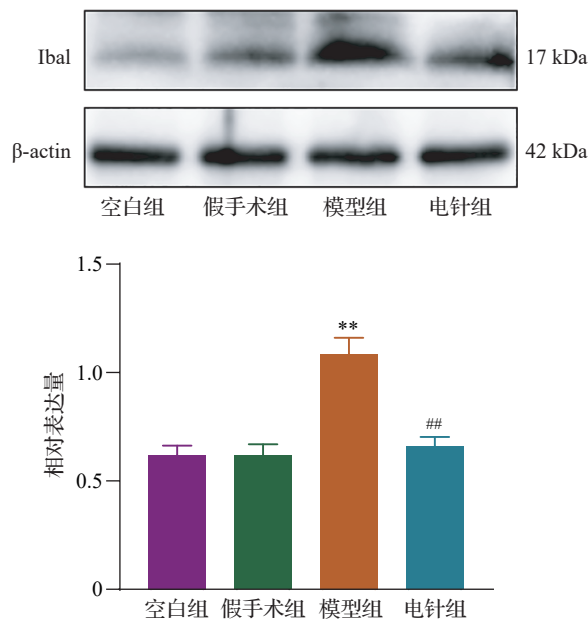
图 5 各组大鼠海马 CA1 区 Iba1 阳性表达比较 (免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of Iba1 positive expression in hippocampal CA1 region in rats of the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

子及中枢屏障相关紧密连接蛋白表达差异无统计学意义; 与假手术组比较, 模型组促炎因子蛋白表达水平升高 ($P<0.01$), 紧密连接蛋白表达水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 电针组促炎因子蛋白表达水平降低 ($P<0.01$, $P<0.05$), 紧密连接蛋白表达水平升高 ($P<0.01$, $P<0.05$)。见图 7。

2.6 各组大鼠血清中促炎因子及血脑屏障相关因子 S100β 含量比较

空白组和假手术组大鼠血清中促炎因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 及血脑屏障功能破坏的重要指标 S100β 含量差异无统计学意义; 与假手术组比较, 模型组 IL-1β、TNF-α、IL-6 及 S100β 含量均升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 电针组大鼠血清中 IL-1β、TNF-α、IL-6 及 S100β 含量均下降 ($P<0.01$)。见图 8。



注: Iba1 为离子钙结合适配器分子 1。与假手术组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

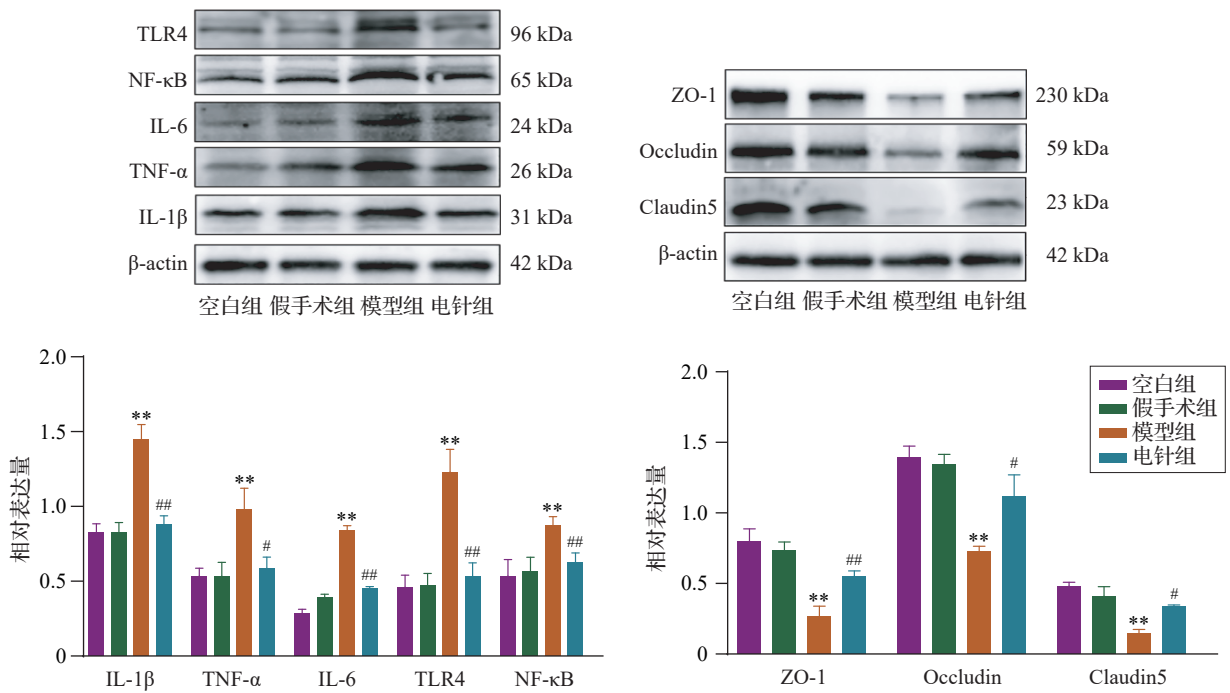
图 6 各组大鼠海马组织中 Iba1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of Iba1 protein expression in hippocampal tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

3 讨论

IS 后认知障碍属于中医“痴呆”“呆病”“多忘”“髓消”等范畴, 其病位在脑, 与虚、瘀、痰等病理因素相关, 痰瘀阻滞、髓海渐空、元神失养、脑气不通即为其病因病机^[12]。针刺可通过疏通经络、调和气血、养髓益脑改善 IS 及其功能障碍。督脉为“阳脉之总纲”“阳脉之海”, 共主一身之阳, 与脑关系密切, 是维持脑主神明功能的重要条件。神庭、百会为督脉要穴, 百会可协调全身之阴阳平衡, 神庭位于督脉与膀胱经交汇之处, 具有安神定志、醒脑开窍的作用^[13-14]。针刺神庭、百会可通过疏通经络、填精益髓、通调督脉改善认知障碍患者髓海不足、神机失用的情况, 对脑卒中后认知障碍疗效肯定^[15]。

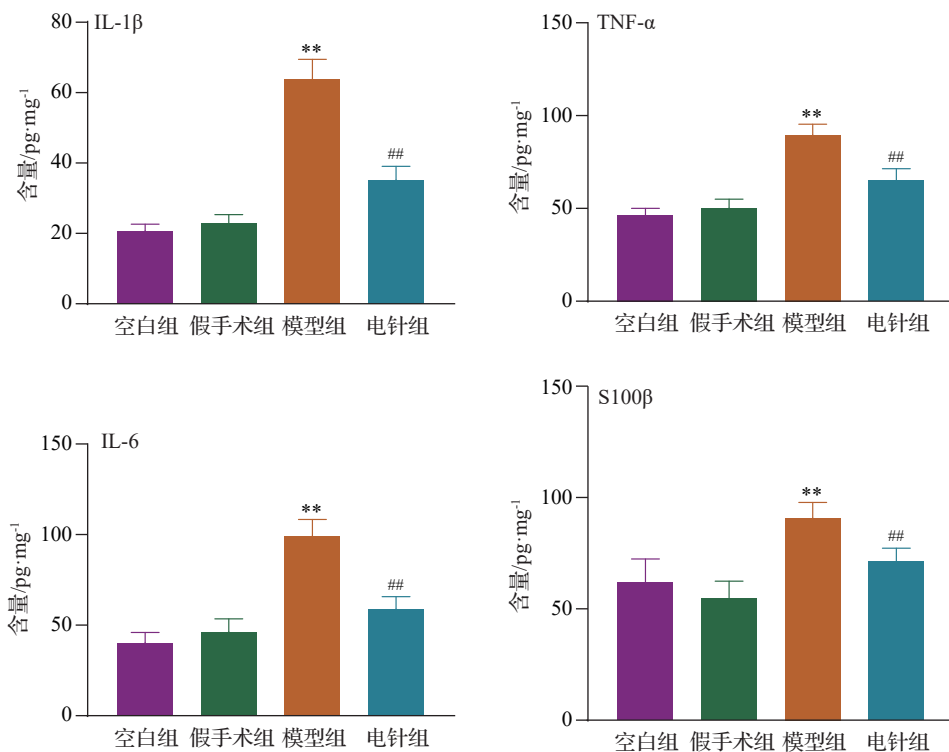
MCAO/R 模型被认为是动物局灶性脑缺血再灌注的标准模型^[8], 而神经功能缺损评分是评价缺血性脑损伤及脑组织功能恢复的重要方法, TTC 染色则能直观地观察脑组织变化, 是评价脑组织缺血损伤的有效指标^[16-17]。尼氏染色是检测神经元损伤的重要方法^[18], Morris 水迷宫实验作为较为常用的行为学实验, 可直观反映模型动物的学习记忆功能变化^[19]。本研究采用上述检测方法观察针刺对 MCAO/R 模型的疗效, 结果显示模型组大鼠神经



注:TLR4为Toll样受体4,NF-κB为核转录因子κB,IL-6为白细胞介素6,IL-1β为白细胞介素1β,TNF-α为肿瘤坏死因子α,ZO-1为紧密连接蛋白闭锁小带蛋白-1。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图7 各组大鼠海马组织中促炎因子及紧密连接蛋白的表达水平比较($\bar{x} \pm s$,3只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of protein expression levels of pro-inflammatory factor and tight junction proteins in hippocampus tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)



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

图8 各组大鼠血清中促炎因子及血脑屏障相关因子S100β含量比较($\bar{x} \pm s$,8只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of serum levels of pro-inflammatory factor and blood-brain barrier-related factor S100β in rats of the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 8 rats/group)

功能缺损评分较高、海马神经元排列不规则、胞质破裂、胞核固缩深染且学习记忆功能较差,而电针治疗能显著降低大鼠神经功能缺损评分,改善海马神经元损伤情况及学习记忆功能。

血脑屏障是一种具有高度选择性的生物屏障,可保持大脑内环境的稳定,阻挡有害物质进入大脑,保证神经系统的正常工作^[20]。血管内皮细胞作为血脑屏障最主要的成分,内皮细胞间的紧密连接复合体主要包括跨膜蛋白或膜蛋白,如 Claudin5、ZO-1、Occludin 等,其不仅维持血脑屏障的完整性,还有效限制了血脑屏障的渗透性^[20-21]。当血脑屏障受损,屏障渗透性增加,将直接导致血液中的神经毒性物质进入脑实质,诱发神经炎症反应,引起神经元功能紊乱及认知功能丧失^[21]。研究证实破坏血脑屏障的主要诱因为血液循环系统中异常增加的促炎因子,例如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 可与特殊受体结合,通过破坏血管内皮紧密连接结构及蛋白表达直接破坏血脑屏障的通透性和功能结构,从而诱发神经功能障碍,导致认知障碍^[22]。S100 β 是一种神经系统损伤的特异性血清标志物,主要集中在神经胶质细胞和神经元中,当血脑屏障受损时会通过受损的血脑屏障进入血液循环,从而使血清中 S100 β 浓度明显增高,因而血清中的 S100 β 浓度可作为血脑屏障通透性的重要指标,可反映脑组织的损伤程度^[23]。有研究显示在 MCAO 模型中,第 3 至 21 天内都能检测到动物模型中血脑屏障渗漏^[24],这与本研究结果一致。在本研究的 MCAO/R 模型中,大鼠全身系统性炎症反应水平显著增加,海马组织中紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin、Claudin5 蛋白表达水平均明显降低,血清 S100 β 含量明显升高;而电针治疗可明显升高大鼠海马组织中紧密连接蛋白表达水平,降低海马组织中促炎因子蛋白表达水平及血清促炎因子、S100 β 含量。以上结果表明 MCAO/R 模型大鼠血脑屏障功能严重受损,而电针治疗可显著改善模型大鼠的血脑屏障功能。

小胶质细胞作为中枢神经系统的固有免疫细胞,分布遍及整个中枢神经系统,其特异性标记物为 Iba1^[25]。在 IS 患者中血脑屏障功能受损,血液循环系统中的促炎因子透过血脑屏障进入脑组织,致使小胶质细胞的长期慢性活化,从而产生促炎介质,诱发中枢神经炎症反应,最终导致神经元坏死和认知功能障碍^[26-27]。TLR4 主要在神经元和小胶质细胞上表达,作为 Toll 样受体家族重要的跨膜受体,能感知外源性病原体和内源性损伤信号,从而

激活 NF- κ B,进而引起脑组织中促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平升高,诱发神经炎症反应和神经变性^[28-29]。有研究证实抑制 TLR4/NF- κ B 通路能够改善阿尔茨海默病大鼠的神经炎症反应及学习记忆功能^[30]。另有研究显示,在衰老引起的认知障碍模型大鼠海马组织中小胶质细胞被过度激活,导致神经炎症反应,从而诱发认知功能障碍^[31]。本研究中,MCAO/R 模型大鼠 Iba1 标记的小胶质细胞数量明显增多,海马组织中 TLR4、NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 蛋白表达水平均明显升高。而电针治疗后,Iba1 标记的小胶质细胞数量显著减少,海马组织中的促炎因子表达水平也显著降低,这表明 MCAO/R 模型大鼠海马区小胶质细胞明显激活且诱发神经炎症反应,而电针治疗可抑制模型大鼠小胶质细胞的活化状态并缓解神经炎症反应。

综上,电针可改善 MCAO/R 模型大鼠学习记忆功能,其机制可能与修复中枢血脑屏障、降低血液循环系统促炎因子的表达,进而抑制小胶质细胞的活化及中枢神经炎症反应有关。另外,本研究也存在一定的局限性,关于电针如何通过影响血脑屏障调控中枢神经炎症反应进而改善学习记忆功能的具体机制尚未明晰。因此,后续将在此基础上进一步探究其具体作用机制,为针刺改善 IS 后认知障碍提供更多证据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] PU L Y, WANG L, ZHANG R J, et al. Projected global trends in ischemic stroke incidence, deaths and disability-adjusted life years from 2020 to 2030 [J]. *Stroke*, 2023, 54(5): 1330-1339.
 - [2] LI L, CHENG S Q, SUN Y Q, et al. Resolvin D1 reprograms energy metabolism to promote microglia to phagocytize neutrophils after ischemic stroke [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(6): 112617.
 - [3] XING C L, LV J, ZHU Z H, et al. Regulation of microglia related neuroinflammation contributes to the protective effect of gelsevirine on ischemic stroke [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1164278.
 - [4] 苏凯奇, 高静, 李洁莹, 等. 基于古今医案云平台分析针刺治疗中风后认知障碍选穴规律 [J]. *中国针灸*, 2022, 42(1): 99-103.
- SU K Q, GAO J, LI J Y, et al. Acupoint selection rules of post-stroke cognitive impairment treated with acupuncture based on ancient and modern medical record cloud platform (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2022, 42

- (1): 99-103.
- [5] 苏凯奇, 吕转, 吴明莉, 等. 电针后留针联合认知训练治疗脑卒中后认知功能障碍: 多中心随机对照试验[J]. 中国针灸, 2023, 43(11): 1221-1225.
SU K Q, LV Z, WU M L, et al. Needle retaining after electroacupuncture combined with cognitive training for post-stroke cognitive impairment: a multi-center randomized controlled trial (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2023, 43(11): 1221-1225.
- [6] 薛洋, 孙伟娟, 刘飞来, 等. 电针神庭、百会联合功能康复训练治疗脑卒中后认知障碍42例[J]. 中医研究, 2018, 31(1): 57-60.
XUE Y, SUN W J, LIU F L, et al. 42 cases of cognitive impairment after stroke treated by electroacupuncture at Shenting and Baihui combined with functional rehabilitation training (in Chinese) [J]. Traditional Chinese Medicinal Research, 2018, 31(1): 57-60.
- [7] 蔡娟, 魏溪芳, 李亚娟, 等. 针刺对缺血性脑卒中大鼠神经功能及肠道菌群的影响[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(9): 4342-4345.
CAI W, WEI X F, LI Y J, et al. Effect of acupuncture on nerve function and intestinal microflora in rats with ischemic stroke (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 38(9): 4342-4345.
- [8] 刘波, 李菲, 王丽娜, 等. 改良线栓法制备SD大鼠局灶性脑缺血再灌注模型研究[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(2): 161-163, 166.
LIU B, LI F, WANG L N, et al. Study on modified suture-occluded method for preparing focal cerebral ischemic reperfusion model in SD rat (in Chinese) [J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2016, 32(2): 161-163, 166.
- [9] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] 黎帅, 谭洁, 张泓, 等. 穴位埋线对慢性缺血性认知障碍模型大鼠空间学习记忆能力及海马兴奋性氨基酸毒性相关蛋白的影响[J]. 针刺研究, 2018, 43(6): 347-352.
LI S, TAN J, ZHANG H, et al. Effect of catgut implantation on spatial learning-memory ability, expression of hippocampal protein kinase C interacting protein 1 and GluR 2 and Ca²⁺ content in rats with chronic ischemic cognitive impairment (in Chinese)[J]. Acupuncture Research, 2018, 43(6): 347-352.
- [11] 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 positioning of common acupoints in experimental animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(4): 351-352.
- [12] 谢荃, 李艳青, 陈均莉, 等. 对卒中后认知障碍的中医病机认识[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(10): 1077-1080.
XIE Q, LI Y Q, CHEN J L, et al. Revisiting the TCM pathologic understanding of post-stroke cognitive impairment (in Chinese) [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2022, 45(10): 1077-1080.
- [13] 池奎龙, 温静, 张霞, 等. 电针治疗脑卒中后遗症文献的可视化数据挖掘与分析[J]. 针刺研究, 2023, 48(5): 508-514.
CHI K L, WEN J, ZHANG X, et al. Network visual data mining and analysis of literature on electroacupuncture treatment of post-stroke sequelae (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2023, 48(5): 508-514.
- [14] 刘建梁, 景福权, 韩莹, 等. 督脉隔姜灸结合头皮针对脑卒中恢复期病人认知功能和神经功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(5): 904-907.
LIU J L, JING F Q, HAN Y, et al. The influence of ginger moxibustion combined with scalp acupuncture on cognitive function and neurological function in convalescent stroke patients (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease, 2023, 21(5): 904-907.
- [15] 冯晓东. 电针神庭、百会对脑卒中后认知障碍的临床及机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2013.
FEN X D. Clinical and mechanism study of Shenting and Baihui electroacupuncture on cognitive impairment after stroke (in Chinese) [D]. Fuzhou: Fujian University of Chinese Medicine, 2013.
- [16] 褚晓凡, 饶明俐, 彭健, 等. 大鼠局灶缺血再灌注神经细胞与微循环形态学动态病理变化[J]. 中国临床康复, 2002(13): 1904-1905, 2035.
CHU X F, RAO M L, PENG J, et al. Morphological and pathological changes of nerve cells and microcirculation during focal cerebral ischemia-reperfusion in rats (in Chinese) [J]. Chinese Clinical Rehabilitation, 2002(13): 1904-1905, 2035.
- [17] 张俊清, 孟智宏, 樊小农. 大鼠神经行为缺损评分与脑梗死率相关性研究分析[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(11): 2140-2142.
ZHANG J Q, MENG Z H, FAN X N. Analysis on correlation between rats neurobehavioral scores and cerebral infarction rate (in Chinese) [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 39(11): 2140-2142.
- [18] CARRIEL V, CAMPOS A, ALAMINOS M, et al. Staining methods for normal and regenerative myelin in the nervous system[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1560: 207-218.
- [19] 周娇娇, 阙建宇, 于雯雯, 等. Morris水迷宫检测动物学习记忆水平的方法学[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6274-6277.
ZHOU J J, QUE J Y, YU W W, et al. Methodology of Morris water maze to detect the learning and memory level of animals (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Gerontology,

- 2017, 37(24): 6274-6277.
- [20] HANG Z C, ZHOU L P, XING C C, et al. The blood-brain barrier, a key bridge to treat neurodegenerative diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 91: 102070.
- [21] CONSTANT O, MAARIFI G, BARTHELEMY J, et al. Differential effects of Usutu and West Nile viruses on neuroinflammation, immune cell recruitment and blood-brain barrier integrity [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2023, 12(1): 2156815.
- [22] PREIS L, VILLRINGER K, BROSSERON F, et al. Assessing blood-brain barrier dysfunction and its association with Alzheimer's pathology, cognitive impairment and neuroinflammation [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2024, 16(1): 172.
- [23] 王茸,许军峰.小胶质细胞与缺血性脑卒中的关系及针刺干预研究进展[J].*针刺研究*, 2024,49(12): 1311-1316.
WANG R, XU J F. Development of research on mechanisms of acupuncture intervention on ischemic stroke and its relationship with microglia (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024,49(12): 1311-1316.
- [24] HUANG L L, CHEN Y, LIU R, et al. P-glycoprotein aggravates blood brain barrier dysfunction in experimental ischemic stroke by inhibiting endothelial autophagy[J]. *Aging Dis*, 2022, 13(5): 1546-1561.
- [25] LUO L, LIU M X, FAN Y H, et al. Intermittent Theta-burst stimulation improves motor function by inhibiting neuronal pyroptosis and regulating microglial polarization via TLR4/NFκB/NLRP3 signaling pathway in cerebral ischemic mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 141.
- [26] ZHU H R, GUAN A, LIU J Y, et al. Noteworthy perspectives on microglia in neuropsychiatric disorders [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 223.
- [27] GAO M Z, LI Y, HO W, et al. Targeted mRNA nanoparticles ameliorate blood-brain barrier disruption postischemic stroke by modulating microglia polarization [J]. *ACS Nano*, 2024, 18(4): 3260-3275.
- [28] LIU L, ZHOU L, WANG L L, et al. MUC1 attenuates neutrophilic airway inflammation in asthma by reducing NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis through the inhibition of the TLR4/MyD88/NF-κB pathway [J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 255.
- [29] WEI C, JIANG W, WANG R Y, et al. Brain endothelial GSDMD activation mediates inflammatory BBB breakdown [J]. *Nature*, 2024, 629(8013): 893-900.
- [30] ZHU M X, LIU Y, CHEN C, et al. TLR4/Rac1/NLRP3 pathway mediates amyloid-β-induced neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2024, 99(3): 911-925.
- [31] 何川.“标本配穴”预针刺调控肠道菌群-LPS-神经炎性反应对衰老模型大鼠学习记忆认知功能障碍的机制研究[D].武汉:湖北中医药大学, 2021.
HE C. Study on the mechanism of pre acupuncture of “Biaoben acupoints combination” regulating intestinal flora-LPS-neuroinflammatory response on learning and memory cognitive dysfunction in aging model rats (in Chinese) [D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2021.

收稿日期:2024-09-23 修回日期:2024-12-04

网络首发:2025-02-20

编辑:徐晖