

电针干预脑缺血再灌注损伤模型大鼠核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3/半胱天冬氨酸蛋白酶1表达的变化

<https://doi.org/10.12307/2022.122>董苗苗^{1,2}, 赖涵², 李曼玲¹, 许秀洪², 罗梦², 王文豪^{1,2}, 周国平^{1,2}

投稿日期: 2021-03-29

送审日期: 2021-04-02

采用日期: 2021-05-07

在线日期: 2021-07-16

中图分类号:

R459.9; R318; R651

文章编号:

2095-4344(2022)05-00749-07

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点—

△炎症反应是脑缺血再灌注损伤过程中的重要病理因素;

△电针通过下调核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3/半胱天冬氨酸蛋白酶1(NLRP3/Caspase-1)表达,发挥神经保护作用。

假手术组
模型组
电针组
Caspase-1
抑制剂组(1) 神经功能缺损评分;
(2) 脑梗死体积;
(3) 小胶质细胞活化;
(4) 神经元焦亡;
(5) NLRP3 和 Caspase-1 水平;
(6) 白细胞介素 1 β 、白细胞介素 18 和肿瘤坏死因子 α 水平。

文题释义:

脑缺血再灌注损伤: 脑组织对缺血缺氧较为敏感, 缺血后出现神经功能受损, 然而缺血一定时间恢复血流再灌注供应后, 反而出现继发性组织损伤, 较缺血时加重, 脑缺血再灌注损伤的过程由多种病理因素参与并相互作用, 最终造成多系统功能障碍。**核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3/半胱天冬氨酸蛋白酶1:** 炎症反应是参与脑缺血再灌注损伤过程的病理因素之一, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3炎症小体在缺血再灌注诱导的脑损伤中被组装激活, 继而活化半胱天冬氨酸蛋白酶1蛋白酶, 切割炎症分子前体, 诱导炎症级联反应, 造成脑缺血再灌注后细胞焦亡, 加重脑缺血再灌注损伤。

摘要

背景: 对于脑缺血/再灌注损伤目前尚无有效的治疗方法, 缓解脑缺血/再灌注损伤级联损伤对于治疗方法的探索至关重要。电针基于传统针灸和电疗法, 可有效缓解缺血性脑卒中导致的神经功能损伤症状。**目的:** 基于核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3/半胱天冬氨酸蛋白酶1通路, 探讨电针对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用。**方法:** 48只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组、抑制剂组, 每组12只, 后3组应用线栓法制备脑缺血再灌注模型。半胱天冬氨酸蛋白酶1抑制剂用Z-YVAD-FMK干预, 穴位选取“合谷”“尺泽”“三阴交”“足三里”。采用神经行为学评分评定神经功能症状, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑染色法观察脑组织梗死情况, 电镜观察神经元焦亡, 荧光定量PCR和蛋白质印迹检测核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3及半胱天冬氨酸蛋白酶1表达, 免疫荧光染色观察小胶质细胞水平, 酶联免疫吸附实验检测白细胞介素1 β 、白细胞介素18及肿瘤坏死因子 α 表达水平。**结果与结论:** ①与模型组比较, 电针组和抑制剂组的神经功能缺损评分、脑组织梗死体积减少(P 均 < 0.05); ②与模型组比较, 电针组和抑制剂组的神经元焦亡减轻; ③与模型组比较, 电针组和抑制剂组的小胶质细胞减少, 白细胞介素1 β 、白细胞介素18、肿瘤坏死因子 α 表达水平降低(P 均 < 0.05); ④与模型组比较, 电针组和抑制剂组核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3及半胱天冬氨酸蛋白酶1表达水平降低(P 均 < 0.05); ⑤表明电针可通过减少小胶质细胞水平、减少炎症反应、下调核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3/半胱天冬氨酸蛋白酶1表达、减轻脑缺血再灌注损伤大鼠的神经元焦亡, 发挥神经保护作用。**关键词:** 电针; 脑缺血再灌注损伤; 小胶质细胞; 细胞焦亡; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3; 半胱天冬氨酸蛋白酶1**缩略语:** 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白: nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing proteins, NLRP; 半胱天冬氨酸蛋白酶: cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase; 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑: 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC

Effect of electroacupuncture on expression of nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3/cysteinyl aspartate specific proteinase 1 in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury

Dong Miaomiao^{1,2}, Lai Han², Li Manling¹, Xu Xiuhong², Luo Meng², Wang Wenhao^{1,2}, Zhou Guoping^{1,2}¹School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; ²Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510315, Guangdong Province, China

Dong Miaomiao, Master, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510315, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhou Guoping, MD, Professor, Chief physician, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510315, Guangdong Province, China¹南方医科大学中医药学院, 广东省广州市 510515; ²南方医科大学中西医结合医院, 广东省广州市 510315

第一作者: 董苗苗, 女, 1994年生, 2019年南方医科大学毕业, 硕士, 主要从事中风病的基础及临床研究。

通讯作者: 周国平, 博士, 教授, 主任医师, 南方医科大学中医药学院, 广东省广州市 510515; 南方医科大学中西医结合医院, 广东省广州市 510315

<https://orcid.org/0000-0002-4613-4384> (周国平)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(81674048), 项目负责人: 周国平

引用本文: 董苗苗, 赖涵, 李曼玲, 许秀洪, 罗梦, 王文豪, 周国平. 电针干预脑缺血再灌注损伤模型大鼠核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3/半胱天冬氨酸蛋白酶1表达的变化[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(5):749-755.



Abstract

BACKGROUND: There is currently no effective treatment for cerebral ischemia/reperfusion injury, and for the exploration of treatments, it is crucial to mitigate cerebral ischemia/reperfusion injury cascade damage. Electroacupuncture can alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury.

OBJECTIVE: To explore the neuroprotective effect of electroacupuncture on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats based on nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3)/cysteine-specific proteinase 1 (Caspase-1) pathway.

METHODS: Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham group, a model group, an electroacupuncture group and an inhibitor group, with 12 rats in each group. Animal models of cerebral ischemia/reperfusion injury were made in the latter three groups using the suture-occluded method. Caspase-1 inhibitor was intervened with Z-YVAD-FMK, and acupoints were selected as "Hegu," "Chize," "Sanyinjiao" and "Zusanli." Zea longa method was used to evaluate the neurological symptoms. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride staining was used to observe the condition of cerebral infarction. Electron microscope was used to observe the pyroptosis of neurons. Fluorescence quantitative PCR and western blot were used to detect the expression of NLRP3 and Caspase-1. Immunofluorescence staining was used to observe the level of microglia. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the levels of interleukin-1 β , interleukin-18 and tumor necrosis factor- α .

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the model group, the neurological deficit score and infarct volume of brain tissue were decreased in the electroacupuncture group and inhibitor group (all $P < 0.05$). (2) Compared with the model group, pyroptosis of the cells was reduced in the electroacupuncture group and inhibitor group. (3) Compared with the model group, the number of microglia and the expression of interleukin-1 β , interleukin-18 and tumor necrosis factor- α were decreased in the electroacupuncture group and inhibitor group (all $P < 0.05$). (4) Compared with the model group, the expression levels of NLRP3 and Caspase-1 were decreased in the electroacupuncture group and inhibitor group (all $P < 0.05$). In conclusion, electroacupuncture can reduce the level of microglia, reduce inflammatory reactions, and down-regulate the expression of NLRP3/Caspase-1, so as to reduce neuronal pyroptosis and exert a neuroprotective effect in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury.

Key words: electroacupuncture; cerebral ischemia/reperfusion injury; microglia; pyroptosis; nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3; cysteinyl aspartate specific proteinase 1

Funding: the National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 81674048 (to ZGP)

How to cite this article: DONG MM, LAI H, LI ML, XU XH, LUO M, WANG WH, ZHOU GP. Effect of electroacupuncture on expression of nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3/cysteine-specific proteinase 1 in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(5):749-755.

0 引言 Introduction

脑卒中是全球范围内死亡和致残的主要病因之一^[1], 缺血性脑卒中占脑卒中的 87%, 其发病率呈持续上升趋势^[2], 因其高发病率、高致残率、高死亡率、高复发率的特点, 给患者的家庭和社会带来严重的社会和经济负担^[3]。目前有效的治疗方法是尽快恢复血流灌注, 随后血管修复和组织复氧。而脑缺血一定时间后快速再灌注时出现的氧化应激、线粒体失调、白细胞浸润、血脑屏障破坏等消除了血流恢复的有利作用, 引起神经炎症和神经元丢失, 最终导致组织损伤加重^[4], 此过程称为脑缺血/再灌注损伤^[5]。

研究表明, 细胞焦亡在脑缺血/再灌注损伤病理过程中充当重要角色^[6], 并与上述机制相互作用, 导致组织损伤加重。目前研究显示细胞焦亡参与了脑缺血再灌注后神经细胞损伤, 海马区是脑缺血再灌注后细胞焦亡和炎症反应诱发继发性神经损伤的主要部位^[7]。细胞焦亡是由 Gasdermin 介导的细胞程序性死亡, 主要是 Gasdermin E 等在内的 Gasdermin 家族成员被多种 Caspase 剪切成片段, 进而使细胞膜穿孔, 破坏细胞完整性^[8]。细胞焦亡的特点是细胞质膜迅速肿胀破裂, 炎症小体形成, 大量促炎症因子释放^[9], 引发炎症反应。

核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing proteins, NLRP) 家族中的 NLRP3 炎症小体是包含多种蛋白质的炎性复合体^[10], 缺血再灌注诱导脑损伤后被激活, 进一步活化半胱天冬氨酸蛋白酶 (cysteine-specific proteinase, Caspase) 家族中 Caspase-1 蛋白酶及多种炎症分子, 加剧炎症反应, 引起细胞焦亡, 加重脑缺血再灌注损伤^[11]。此外, 炎症细胞因子如白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 的表达升高^[12], 导致白细胞和其他激活的炎症细胞浸润脑实质, 诱导小胶质细胞活化, 促炎细胞因子分泌增加, 加剧氧化应激和血脑屏障损

伤, 造成严重脑损伤^[13-14]。

对于脑缺血/再灌注损伤目前尚无有效的治疗方法, 缓解脑缺血/再灌注损伤级联损伤对于治疗方法的探索至关重要。电针基于传统针灸和电疗法, 目前被用作脑卒中防治的有效工具, 可有效缓解缺血性脑卒中导致的神经功能损伤症状。研究显示, 电针傍刺经筋结点与常规针刺治疗都可以改善缺血性卒中急性期上肢瘫痪^[15], 头针联合电针可明显改善缺血性卒中后失语症患者的语言理解、表达及沟通能力^[16]。基于电针对缺血性脑卒中的有效干预, 以及细胞焦亡和小胶质细胞水平在脑缺血/再灌注损伤的重要作用, 此次研究从神经炎症出发, 对电针是否调节小胶质细胞水平, 缓解神经元焦亡发挥缺血性脑卒中后脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用进行探讨。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验, 单因素方差分析 (One-Way ANOVA)、非参数检验 Mann-Whitney 检验及 Kruskal-Wallis 检验。

1.2 时间及地点 于 2017 年 8 月至 2019 年 4 月在南方医科大学实验动物中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠由南方医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2016-0041, 体质量 (250 \pm 10) g。饲以大鼠标准育成饲料, 自由饮水, 控制室内温度 20-24 $^{\circ}$ C, 相对湿度 65%-80%, 12 h 光-暗循环光照。实验方案经南方医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: L2017216。

1.3.2 主要试剂及仪器 戊巴比妥钠、2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染液 (雷根生物技术有限公司); caspase-1 inhibitor Z-YVAD-FMK、HRP 标记山羊抗兔、HRP 标记驴抗山羊、ELISA 试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 离子钙结合衔接分子 1 抗体

(Servicebio 公司); 一次性无菌针灸针 (中国苏州医疗器械厂); 英迪 kwd-808i 全能脉冲电针仪 (苏州天协针灸器械有限公司); 大鼠大脑立体定位仪 (淮北正华生物仪器设备有限公司); Lightcycler 480II 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); Nanodrop 2000 核酸蛋白测定仪 (赛默飞世尔中国公司); 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); 透射电子显微镜 (FEI 公司); TI-SR 倒置荧光显微镜 (日本尼康公司)。

1.4 方法

1.4.1 分组与处理 将 48 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法随机分为假手术组、模型组、电针组、Caspase-1 抑制剂组, 每组 12 只。Caspase-1 抑制剂组在模型制备前 30 min 于大鼠侧脑室注射 10 μL Caspase-1 抑制剂 Z-YVAD-FMK(溶于 DMSO)。

1.4.2 模型制备 采用大脑中动脉闭塞法制作大鼠脑缺血再灌注模型。方法如下: 将 SD 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉固定, 备皮消毒, 颈前行纵向切口, 暴露分离左侧颈总、颈外及颈内动脉, 结扎颈外动脉, 血管夹暂时夹闭颈总及颈内动脉, 在颈外动脉分叉处剪约 45° 斜向切口, 将线栓从颈外动脉送至颈内动脉颅内段, 遇到阻力时停止 (18-20 mm), 固定线栓并去除血管夹。逐层缝合切口, 栓塞 2 h 后, 拔出线栓至颈外动脉处, 进行缺血后再灌注。造模后 SD 大鼠单独饲养观察。

组织工程实验动物造模相关问题

造模目的	基于 NLRP3/Caspase-1 探讨电针对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用
研究问题借鉴已有标准动物模型造模	采用大脑中动脉闭塞法制作大鼠脑缺血再灌注模型
选择动物的条件	清洁级雄性 SD 大鼠
模型与所研究疾病的关系	制作大鼠脑缺血再灌注模型, 探讨电针对脑缺血再灌注损伤的作用
动物来源及品系	SD 大鼠购于南方医科大学实验动物中心
造模技术描述	大鼠麻醉固定, 备皮消毒, 颈前行纵向切口, 暴露分离左侧颈总、颈外及颈内动脉, 将线栓从颈外动脉送至颈内动脉颅内段, 固定线栓, 缝合切口, 栓塞 2 h 后, 拔出线栓至颈外动脉处, 进行缺血后再灌注
造模后实验观察指标	神经功能缺损评分
造模过程中动物死亡原因	线栓损伤致血管破裂及蛛网膜下腔出血
如何补充造模过程中缺失的动物	随机补充缺失动物进行造模或干预
造模后动物处理	麻醉后心脏灌注取脑, 检测相关指标
伦理委员会批准	实验方案经南方医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: L2017216

1.4.3 电针干预 电针组在再灌注 2 h 后进行电针干预, 取患侧 (右侧) 合谷、尺泽、三阴交、足三里进行电针干预^[17-18]。采用一次性无菌针灸针针刺穴位后, 连接电针仪, 波型选择疏密波, 频率 5-10 Hz, 以穴位周围组织轻微抖动为度, 电压 3-5 V, 干预时间 20 min。假手术组和模型组统一进行固定, 不针刺。干预 1 次, 在再灌注 24 h 后取材。

1.4.4 神经行为学评分 大鼠清醒且生命体征平稳后, 参照 Zea Longa 法评价神经功能缺损程度, 具体评定标准见表 1, 其中 1-3 分纳入实验组。

表 1 | 神经功能缺损评分标准
Table 1 | Neurological deficit scoring

评分	描述
0 分	无神经功能缺损, 活动正常
1 分	轻微神经功能缺损, 不能完全伸展患侧前爪
2 分	中度神经功能缺损, 向患侧转圈
3 分	重度神经功能缺损, 向患侧倾斜
4 分	不能自行行走, 意识水平下降, 甚至意识丧失

1.4.5 TTC 染色 每组取 3 只大鼠全脑组织制备冷冻切片 (2 mm), 置于 2%TTC 染液中, 37 °C 恒温避光染色 30 min, 不时翻动切片使之均匀染色, 30 min 后取出切片, 置于 40 g/L 多聚甲醛 PBS 中固定过夜, 固定好的脑片取出晾干, 脑梗死区显示白色, 正常脑组织显示红色。采用 Image J 软件分析每层脑片梗死区面积, 梗死区体积 = 梗死区面积之和 × 脑片厚度 (2 mm), 计算各组梗死区体积百分比。梗死体积百分比 (%) = 梗死区体积 / 大脑半球体积 × 100%。

1.4.6 钼铅双染色 每组取 3 只大鼠缺血侧海马区, 置于 2.5% 戊二醛缓冲液中, 4 °C 固定 2-4 h, PBS 漂洗, 置于 1% 的锇酸中, 室温固定 2 h, PBS 漂洗, 脱水, 渗透包埋, 切片, 用钼铅双染色, 室温干燥过夜。将切片置于透射电镜下观察海马区神经元, 采集图像分析。

1.4.7 荧光定量 PCR 每组取 3 只大鼠缺血侧半球脑组织, 分别用于荧光定量 PCR, 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 和酶联免疫吸附实验 (ELISA)。用于荧光定量 PCR 的组织样本中加入 Trizol, 反复吹打至无明显沉淀, 离心取上清液, 加入氯仿后混匀离心, 吸取上层清液, 加入等体积异丙醇混匀离心, 离心后的白色沉淀即为总 RNA, 加入 DEPC 水溶解, 使用紫外分光光度仪检测 RNA 浓度及纯度。溶解后的 RNA 样品继续反转录, 反转录后的 cDNA 进行荧光定量 PCR 反应。配置 PCR 反应体系, 加入 PCR 引物, 进行 PCR 扩增。结果以 Ct 值显示, 采用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法计算 mRNA 相对表达量, 以 β-actin 为内参。其中引物序列信息见表 2。

表 2 | 引物序列
Table 2 | Primer sequences

基因		引物序列
GAPDH	forward	TTC CTA CCC CCA ATG TAT CCG
	reverse	CAT GAG GTC CAC CAC CCT GTT
核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3	forward	GCT TCA GTC CCA CAC ACA GA
	reverse	CAT GAG TGC TGC TTC GAC AT
半胱天冬氨酸蛋白酶 1	forward	GAA GTG CCC AAG CTT GAA AGA C
	reverse	CCA AGT CAC AAG ACC AGG CAT A

1.4.8 蛋白质印迹 每组取 3 只大鼠缺血侧脑组织研磨后, 以蛋白裂解离心取上清液。参照 BCA 试剂盒说明书测定蛋白质浓度, 变性蛋白备用, 配胶, 加样, 湿转法转膜, PVDF 膜置于封闭液中室温封闭 1 h。加入一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗, 加入二抗, 室温下孵育 1 h, TBST 漂洗。避光等

体积混合 ECL A 和 B 试剂, 加入混匀的 ECL 溶液浸润 PVDF 膜反应, 置于曝光仪中进行曝光, 仪器扫描记录蛋白条带图像, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.4.9 免疫荧光染色 每组取 3 只大鼠缺血侧脑组织, 固定, 制备石蜡切片, 脱蜡水化, 去除内源性酶, 置于 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中进行抗原修复, 封闭后, 加入 IBA 一抗 4 ℃ 孵育过夜, PBS 冲洗, 加入荧光标记的二抗, 室温下避光孵育 1 h, 冲洗, 用 DAPI 染色, 室温下避光孵育 10 min。冲洗, 抗荧光猝灭剂封固, 切片置于荧光显微镜观察杏仁核染色情况, 采用 Image J 软件分析相对免疫荧光强度。

1.4.10 酶联免疫吸附试验 每组取 3 只大鼠缺血侧脑组织, 研磨匀浆, 离心取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作分别检测白细胞介素 1β、白细胞介素 18、肿瘤坏死因子 α 水平。

1.5 主要观察指标 ①神经功能缺损评分; ②脑梗死体积; ③神经元焦亡形态; ④小胶质细胞水平; ⑤ NLRP3、Caspase-1 及 mRNA 水平; ⑥白细胞介素 1β、白细胞介素 18、肿瘤坏死因子 α 水平。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 各种实验结果数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据符合正态分布, 则使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。进行方差齐性检验, 若方差齐, 则采用 LSD 分析; 若方差不齐, 则采用 Dunnett's T3 进行多重比较。对不符合正态分布的数据, 采用非参数检验 Mann-Whitney 检验两两比较, Kruskal-Wallis 检验多重比较。P < 0.05 认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 48 只 SD 大鼠随机分组, 操作过程中若大鼠死亡, 随机补充缺失大鼠进行造模或干预, 共 48 只大鼠进入结果分析。

2.2 各组大鼠神经功能缺损评分 脑缺血再灌注后, 大鼠表现出不同程度的神经功能缺损行为表现。与假手术组比较, 模型组神经功能缺损评分升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 电针组和抑制剂组神经功能缺损评分降低, 差异有显著性意义 (P < 0.05), 见图 1。

2.3 各组大鼠脑梗死体积 大鼠脑缺血再灌注后, 经 TTC 染色, 梗死区脑组织呈现白色。与假手术组比较, 模型组大鼠脑梗死体积增加 (P < 0.05); 与模型组比较, 电针组和抑制剂组 SD 大鼠脑梗死体积减少 (P < 0.05), 差异有显著性意义, 见图 2。

2.4 各组大鼠小胶质细胞变化 与假手术组比较, 模型组离子钙结合衔接分子 1 相对免疫荧光强度升高, 离子钙结合衔接分子 1 表达水平升高, 提示小胶质细胞增多 (P < 0.05); 与模型组比较, 电针组离子钙结合衔接分子 1 相对免疫荧光强度降低, 离子钙结合衔接分子 1 表达水平降低, 提示小胶质细胞减少 (P < 0.05), 差异有显著性意义, 见图 3。

2.5 各组大鼠细胞焦亡变化 电镜下观察各组大鼠海马区神经元形态变化, 假手术组的细胞形态结构正常; 在模型组中, 细胞超微结构形态发生改变, 细胞膜完整性丧失, 胞内存在

大面积水肿区, 细胞核局部核膜凹陷模糊, 异染色质固缩增多, 分布不均匀并聚集核膜周围; 胞质内细胞器减少, 线粒体及粗面内质网有明显扩张; 电针组和抑制剂组细胞形态特征较模型组改善, 核膜仍存在轻微凹陷, 但染色质固缩减少, 肿胀扩张的细胞器如线粒体、粗面内质网等数量减少, 见图 4。

2.6 各组大鼠 NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 表达 与假手术组比较, 模型组 NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 的表达水平升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 电针组和抑制剂组的 NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 表达水平降低, 差异有显著性意义 (P < 0.05), 见图 5。

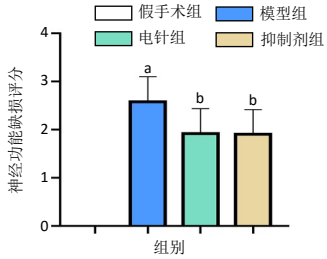
2.7 各组大鼠 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达 与假手术组比较, 模型组 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平升高 (P < 0.05); 而在电针组和抑制剂组中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平低于模型组 (P < 0.05), 见图 6。

2.8 各组大鼠白细胞介素 1β、白细胞介素 18 和肿瘤坏死因子 α 表达 与假手术组比较, 模型组白细胞介素 1β、白细胞介素 18 和肿瘤坏死因子 α 的表达水平升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 电针组和抑制剂组的白细胞介素 1β、白细胞介素 18 和肿瘤坏死因子 α 表达水平降低, 差异有显著性意义 (P < 0.05), 见图 7。

3 讨论 Discussion

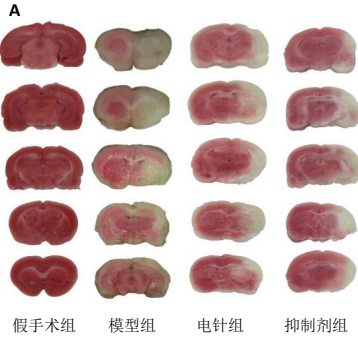
缺血性脑卒中后脑内代谢供需失衡导致组织出现严重缺氧和微血管功能障碍, 血流恢复再灌注供应后, 脑组织损伤程度继发性加重^[19], 此过程为脑缺血再灌注损伤。脑缺血再灌注损伤的机制复杂, 目前研究主要涉及钙离子超载^[20]、兴奋性氨基酸毒性^[21]、自由基生成^[22]、一氧化氮损伤^[23]、细胞凋亡等^[24-25]。作者前期研究证实, 电针通过调控 MAPK 通路减少细胞凋亡, 减轻脑缺血再灌注损伤, 从而发挥脑保护作用^[26-28]。电针对缺血性脑卒中的临床干预疗效显著^[29-30], 其机制目前尚未明确, 此次研究以脑缺血再灌注损伤 SD 大鼠为模型, 继续探讨电针对脑缺血再灌注损伤的作用及机制。

中医认为, 缺血性脑卒中的发病机制主要在于阴阳失调、气血逆乱、经脉痹阻, 导致脏腑的功能发生紊乱^[31]。基于《素问·阴阳别论篇》提出“三阳三阴发病, 为偏枯痿易, 四肢不举”。《素问·阴阳应象大论》中指出“故善用针者, 从阴引阳, 从阳引阴”, 根据经脉阴阳表里关系进行配穴治疗中风。阳明经为多气多血之经, “合谷”为手阳明大肠经穴, 是大肠经气血汇聚的地方, 故选用此穴以疏风开窍, 宣通气血。与相表里的手太阴肺经合穴“尺泽”相配, 共同调节阴阳气血。“足三里”是足阳明胃经的合穴, 经气充盈, 能通经活络。与联络足三阴经气血的“三阴交”相配, 共同调和阴阳, 行气活血。因而此次研究穴位选择为“合谷、尺泽”“足三里、三阴交”两组配穴, 选穴同时也结合导师周国平教授所创的“全经针刺法”, “全经针刺法”是综合陈玉老中医、王哲天教授及严洁教授治疗中风偏瘫的经验, 结合针灸学理论、经脉气血多少理论及现代康复学原理所创立的一种专用于治疗中风偏瘫的针刺方法, 以阴阳表里相配为依据选穴^[32]。



图注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$
图 1 | 各组大鼠神经功能缺损评分

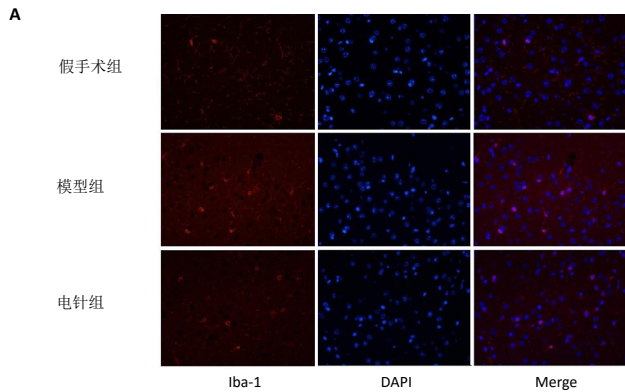
Figure 1 | Neurological deficit scores of rats in each group



图注: 图 A 为各组大鼠 2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色图, 图 B 示各组大鼠脑梗死体积 (%). 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图 2 | 各组大鼠脑梗死体积比较

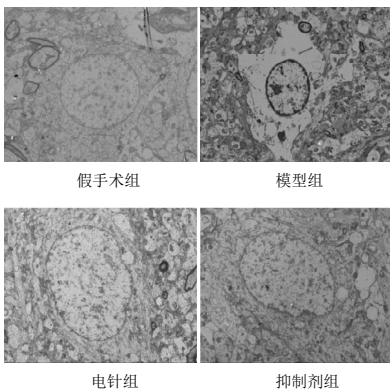
Figure 2 | The cerebral infarction volume of rats



图注: 图 A 为各组大鼠脑组织免疫荧光染色 ($\times 400$), 图 B 为各组大鼠离子钙结合衔接分子 1(Iba-1) 相对免疫荧光强度。与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图 3 | 各组大鼠小胶质细胞变化

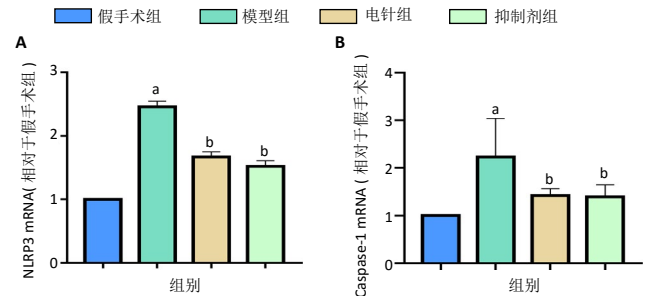
Figure 3 | Changes of microglia in rats



图注: 与模型组比较, 电针组和抑制剂组的神经元焦亡减轻

图 4 | 各组大鼠的神经元焦亡电镜图 ($\times 2500$)

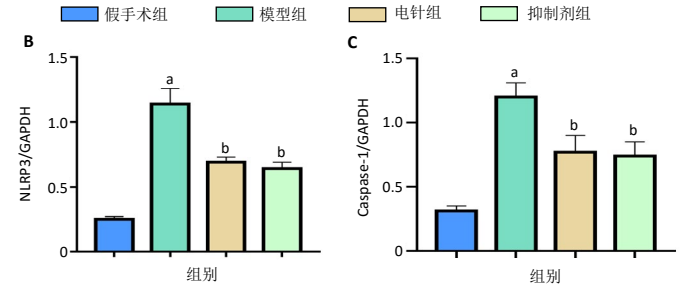
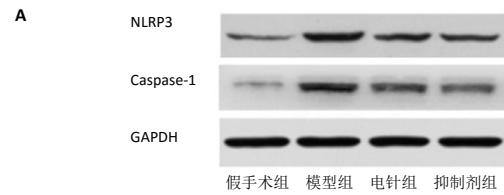
Figure 4 | Observation of neuronal pyroptosis in rats under electron microscope ($\times 2500$)



图注: 图 A 为各组大鼠核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3) mRNA 水平, 图 B 为各组大鼠半胱天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)mRNA 水平。与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图 5 | 各组大鼠 NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 表达

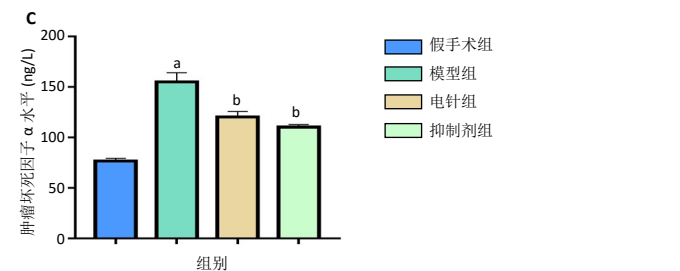
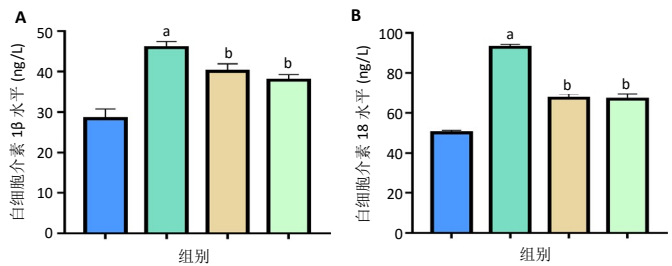
Figure 5 | Expression of NLRP3 mRNA and Caspase-1 mRNA in rats



图注: 图 A 为蛋白免疫印迹结果, 图 B 为核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3) 蛋白水平, 图 C 为半胱天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1) 蛋白水平。与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图 6 | 各组大鼠 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达

Figure 6 | Protein expression of NLRP3 and Caspase-1 in rats



图注: 图 A 为各组大鼠白细胞介素 1β 水平, 图 B 为各组大鼠白细胞介素 18 水平, 图 C 为各组大鼠肿瘤坏死因子 α 水平。与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图 7 | 各组大鼠白细胞介素 1β、白细胞介素 18 和肿瘤坏死因子 α 表达

Figure 7 | Expression of interleukin-1β, interleukin-18 and tumor necrosis factor-α in rats

此次研究以电针干预脑缺血再灌注损伤大鼠合谷、尺泽、三阴交、足三里,采用 Zea Longa 法进行神经功能缺损评定,结果显示电针可减轻 SD 大鼠脑缺血再灌注造成神经功能缺损症状。TTC 是一种对光比较敏感的脂溶性复合物,可与正常组织中的琥珀酸脱氢酶结合发生反应,从而使正常组织呈现红色或粉红色,由于在缺血缺氧情况下,组织中脱氢酶的活性会下降,所以缺血组织不能与 TTC 结合反应,故而呈现出白色。此次研究采用 TTC 染色法检测电针对脑缺血再灌注损伤 SD 大鼠梗死体积影响,结果显示,电针干预后脑缺血再灌注损伤 SD 大鼠脑梗死体积百分比降低。以上结果表明,电针可减少脑缺血再灌注损伤 SD 大鼠梗死体积,有效缓解脑缺血再灌注损伤 SD 大鼠神经缺损症状。

新近研究显示,细胞焦亡与脑缺血再灌注损伤病理损伤及后期神经缺损症状形成密切相关^[33],经典的细胞焦亡信号通路通过活化 Caspase-1 介导^[34]。在脑缺血发生损伤后,NLRP3 炎症小体被组装激活,Caspase-1 前体分裂成活性片段,裂解的 Caspase-1 诱导成熟的促炎细胞因子白细胞介素 1 β 和白细胞介素 18 释放,启动或放大不同的下游信号通路,诱导细胞发生肿胀和渗透溶解,加剧炎症反应,加重脑缺血再灌注损伤^[35]。此次研究采用透射电镜观察海马神经元超微结构变化,显示脑缺血再灌注后部分细胞内水肿,细胞肿胀破裂,胞膜完整性丧失,细胞器明显扩张,异染色质固缩增多。经电针和 Caspase-1 抑制剂干预后,神经元焦亡现象得到了改善。炎症小体是细胞内模式识别受体参与组装的多种蛋白组成的大分子复合体,它在调节机体炎症、维持固有免疫应答中具有重要作用,其中 NLRP3 炎症小体是分布最为广泛,能被多种刺激物活化的炎症小体亚型^[36],一些分子和细胞效应被认为是 NLRP3 炎症小体激活的触发剂,包括 K⁺ 外流、Ca²⁺ 信号、活性氧、线粒体功能失调和溶酶体破裂^[37]。炎症小体可以激活炎性胱天蛋白酶并激活白细胞介素 1 家族细胞因子,Caspase-1 是与炎症小体相关的最主要的炎性半胱天冬氨酸蛋白酶之一。研究显示,活化的 Caspase-1 具有剪切细胞焦亡效应蛋白消皮素 D 的功能,使消皮素 D 的 N 末端结构域释放。N-消皮素 D 通过与细胞膜上内页的磷脂酰丝氨酸和磷酸肌醇结合,在细胞膜上打孔,同时该通道造成胞外 Na⁺、Ca²⁺ 内流,使细胞肿胀,在打孔处形成大泡,细胞内容物释放到细胞外,引起炎症反应^[38]。Caspase 除了剪切消皮素 D,还可以剪切白细胞介素 1 β 前体和白细胞介素 18 前体,促进其成熟,细胞死亡后白细胞介素 1 β 和白细胞介素 18 会释放到细胞外^[39]。此次研究采用荧光定量 PCR 和蛋白质印迹检测 Caspase-1 和 NLRP3 的表达,结果显示以电针和 Caspase-1 抑制剂干预后,Caspase-1 和 NLRP3 的表达水平较模型组下降,表明电针可以下调 NLRP3/Caspase-1 表达,减少神经元焦亡,发挥神经保护作用。此次研究以 Caspase-1 抑制剂干预后,NLRP3 的 mRNA 和蛋白表达均有下降趋势,考虑可能为 Caspase-1 的不可逆抑制,减少了细胞焦亡发生,减轻细胞外 Na⁺、Ca²⁺

内流,减少了炎症递质释放和炎症反应,从而影响了 NLRP3 的激活和表达。

小胶质细胞是大脑中先天免疫系统的常驻吞噬细胞,其激活触发先天和适应性免疫反应,包括促炎因子的释放,对中枢神经系统炎症反应至关重要^[40]。研究显示,脑缺血再灌注损伤后小胶质细胞被激活,炎症递质的分泌和最终导致继发性脑损伤的炎症级联反应,包括神经元坏死、血脑屏障破坏、脑水肿和氧化应激反应,加剧脑缺血再灌注损伤^[41]。离子钙结合衔接分子 1 是小胶质细胞/巨噬细胞特异性蛋白,在小胶质细胞和巨噬细胞的活化过程中表达升高^[42]。此次研究采用离子钙结合衔接分子 1 标记小胶质细胞进行免疫荧光染色,结果提示电针干预后,模型组离子钙结合衔接分子 1 水平增加,这与以往的研究结果一致^[43]。电针组离子钙结合衔接分子 1 水平较模型组降低,提示电针可调节小胶质细胞水平,在脑缺血再灌注损伤模型中发挥神经保护作用。同时,此次研究采用酶联免疫吸附试验检测脑内炎症因子水平,结果显示电针干预可以下调白细胞介素 1 β 、白细胞介素 18 和肿瘤坏死因子 α 的表达,表明电针可减少脑缺血再灌注后炎症反应发生。

基于以上,此次研究得出结论,电针可缓解脑缺血再灌注损伤 SD 大鼠的神经缺损症状和脑梗死体积,减轻神经元焦亡和神经炎症从而发挥神经保护作用,其机制可能与下调 NLRP3/Caspase-1 相关。此次研究的不足之处在于使用的标记物没有区分小胶质细胞表型,促进向抗炎表型的转换可能是未来重要的研究方向。

作者贡献: 实验设计为周国平和董苗苗,实验实施为董苗苗、赖涵、李曼玲和王文豪,实验评估为许秀洪和罗梦,文章审校为周国平。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金面上项目(81674048)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经南方医科大学动物实验伦理委员会批准,批准号: L2017216。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经通过南方医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 孙海欣, 王文志. 中国 60 万人群脑血管病流行病学抽样调查报告 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2018,18(2):83-88.
- [2] 《中国脑卒中防治报告》编写组. 《中国脑卒中防治报告 2019》概要 [J]. 中国脑血管病杂志, 2020,17(5):272-281.
- [3] XIE W, ZHOU P, SUN Y, et al. Protective Effects and Target Network Analysis of Ginsenoside Rg1 in Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury: A Comprehensive Overview of Experimental Studies. *Cells*. 2018;7(12):270.
- [4] L L, X W, Z Y. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*. 2016;5(4):213.
- [5] PATEL A, APAIAJAI N, CHATTIPAKORN N, et al. The Protective and Reparative Role of Colony Stimulating Factors in the Brain with Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Neuroendocrinology*. 2020. doi: 10.1159/000512367.
- [6] 袁钰萍, 蒋霞, 刘璐, 等. 二甲双胍调节细胞自噬和焦亡发挥脑缺血再灌注损伤保护作用的机制研究 [J]. 中国药理学杂志, 2021,56(5):359-367.
- [7] 余颜, 胡雨琴, 张荆, 等. 细胞焦亡参与脑缺血再灌注损伤的初步研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2019,35(8):1379-1386.
- [8] TAN G, HUANG C, CHEN J, et al. HMGB1 released from GSDME-mediated pyroptotic epithelial cells participates in the tumorigenesis of colitis-associated colorectal cancer through the ERK1/2 pathway. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1): 149.
- [9] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):128.
- [10] XIANG H, GUO F, TAO X, et al. Pancreatic ductal deletion of S100A9 alleviates acute pancreatitis by targeting VNN1-mediated ROS release to inhibit NLRP3 activation. *Theranostics*. 2021;11(9):4467-4482.
- [11] CASE CL. Regulating caspase-1 during infection: roles of NLRs, AIM2, and ASC. *Yale J Biol Med*. 2011;84(4):333-343.
- [12] PULLI B, CHEN JW. Imaging Neuroinflammation - from Bench to Bedside. *J Clin Cell Immunol*. 2014;5:226.
- [13] SIDOROV E, SANGHERA DK, VANAMALA J. Biomarker for Ischemic Stroke Using Metabolome: A Clinician Perspective. *J Stroke*. 2019;21(1):31-41.
- [14] ZHANG H, PARK JH, MAHARJAN S, et al. Sac-1004, a vascular leakage blocker, reduces cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing blood-brain barrier disruption and inflammation. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):122.
- [15] 刘刚, 刘再然, 刘佳, 等. 电针傍刺经筋结点治疗缺血性脑卒中急性期上肢偏瘫的临床研究 [J]. 中国中医急症, 2020,29(2):249-252.
- [16] 宋兆瑛, 刘俊双, 刘婉, 等. 头针联合电针治疗缺血性脑卒中后失语症临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018,25(7):21-24.
- [17] 华兴邦, 周浩良. 大鼠穴位图谱的研制 [J]. 实验动物与动物实验, 1991,2(1):1-5.
- [18] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [19] JIA Y, YI L, LI Q, et al. LncRNA MALAT1 aggravates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal endoplasmic reticulum stress and apoptosis via the miR-195a-5p/HMGA1 axis. *Biol Res*. 2021; 54(1):8.
- [20] WANG J, WEN CY, CUI CC, et al. Effect of activation of the Ca(2+)-permeable acid-sensing ion channel 1a on focal cerebral ischemia in diabetic rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):13255-13260.
- [21] ZHANG LN, HAO L, GUO YS, et al. Are glutamate transporters neuroprotective or neurodegenerative during cerebral ischemia? *J Mol Med (Berl)*. 2019;97(3):281-289.
- [22] WU X, LIU X, HUANG H, et al. Effects of major ozonated autohemotherapy on functional recovery, ischemic brain tissue apoptosis and oxygen free radical damage in the rat model of cerebral ischemia. *J Cell Biochem*. 2019;120(4):6772-6780.
- [23] ZHENG L, DING J, WANG J, et al. Effects and Mechanism of Action of Inducible Nitric Oxide Synthase on Apoptosis in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Anat Rec (Hoboken)*. 2016;299(2):246-255.
- [24] WU C, LI C, ZHOU G, et al. Effects of electroacupuncture on the cortical extracellular signal regulated kinase pathway in rats with cerebral ischaemia/reperfusion. *Acupunct Med*. 2017;35(6):430-436.
- [25] WANG HL, LIU FL, LI RQ, et al. Electroacupuncture improves learning and memory functions in a rat cerebral ischemia/reperfusion injury model through PI3K/Akt signaling pathway activation. *Neural Regen Res*. 2021;16(6):1011-1016.
- [26] 许秀洪, 周国平, 李春, 等. 表里经配穴法对脑缺血再灌注损伤大鼠海马细胞凋亡及 JNK 信号通路的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2015,32(1):76-80.
- [27] WU C, WANG J, LI C, et al. Effect of Electroacupuncture on Cell Apoptosis and ERK Signal Pathway in the Hippocampus of Adult Rats with Cerebral Ischemia-Reperfusion. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:414965.
- [28] LAN X, ZHANG X, ZHOU GP, et al. Electroacupuncture reduces apoptotic index and inhibits p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the hippocampus of rats with cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res*. 2017;12(3):409-416.
- [29] 龙漫, 郑洲, 陈泽斌. 电针预处理防治大鼠脑缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中国临床研究, 2020,33(1):124-126.
- [30] 李丹, 陈泽斌, 殷妮娜, 等. “标本配穴”电针预处理抗脑缺血再灌注损伤的效应研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2019,21(1):14-18.
- [31] 杨小钰, 杨仁义, 黄海红, 等. 基于阴阳理论与生物信息学方法探讨抗脑缺血再灌注损伤后炎症反应的思路与方法 [J]. 中医药学报, 2020,48(12):1-6.
- [32] 奚马利. 全经针刺法配合刺络拔罐治疗脑卒中恢复期上肢痉挛的临床观察 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [33] WANG LQ, ZHENG YY, ZHOU HJ, et al. LncRNA-Fendrr protects against the ubiquitination and degradation of NLRP3 protein through HERC2 to regulate the pyroptosis of microglia. *Mol Med*. 2021;27(1):39.
- [34] HE Y, AMER AO. Microbial modulation of host apoptosis and pyroptosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:83.
- [35] WANG Y, MENG C, ZHANG J, et al. Inhibition of GSK-3beta alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by suppressing NLRP3 inflammasome activation through autophagy. *Int Immunopharmacol*. 2019;68:234-241.
- [36] 王艳丽. NLRP3 炎症小体活化对肺腺癌细胞 A549 增殖、迁移、侵袭的影响及其作用机制 [D]. 南京: 南京医科大学, 2015.
- [37] 丁杨, 胡容. NLRP3 炎症小体激活及调节机制的研究进展 [J]. 药学进展, 2018,42(4):294-302.
- [38] 卓萃, 刘永娟, 李小民. 脓毒症中细胞焦亡的相关研究进展 [J]. 中华急诊医学杂志, 2019,28(11):1449-1450.
- [39] WANG Y, GAO W, SHI X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*. 2017;547(7661):99-103.
- [40] O'LOUGHLIN E, MADORE C, LASSMANN H, et al. Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(2):a28993.
- [41] ZHANG L, CAI Q, LIN S, et al. Qingda granule exerts neuroprotective effects against ischemia/reperfusion-induced cerebral injury via lncRNA GASS/miR-137 signaling pathway. *Int J Med Sci*. 2021;18(7):1687-1698.
- [42] BARCA C, WIESMANN M, CALAHORRA J, et al. Impact of hydroxytyrosol on stroke: tracking therapy response on neuroinflammation and cerebrovascular parameters using PET-MR imaging and on functional outcomes. *Theranostics*. 2021;11(9):4030-4049.
- [43] 申婷, 肖纯, 向彬, 等. 脑缺血再灌注损伤后小胶质细胞异常活化的生物标志物研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2017,38(7):85-87.

(责任编辑: GD, ZN, SX)