

电针干预脑缺血再灌注模型大鼠的神经保护机制

吴海洋¹, 段 冕², 李成龙³, 张君宇¹, 计海生¹, 王海涛¹, 茅 伟⁴, 王 颖¹<https://doi.org/10.12307/2025.653>

投稿日期: 2024-05-08

采用日期: 2024-07-26

修回日期: 2024-08-31

在线日期: 2024-09-13

中图分类号:

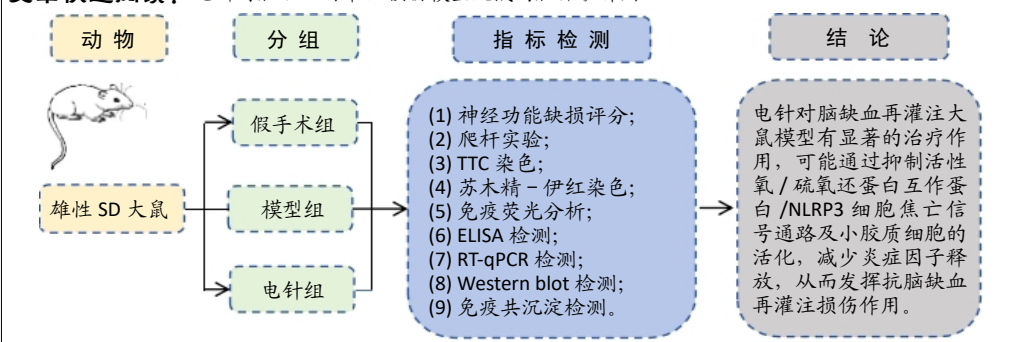
R459.9; R318; R245.31

文章编号:

2095-4344(2025)18-03811-08

文献标识码: B

文章快速阅读: 电针对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑保护作用



文题释义:

脑缺血再灌注损伤: 作为急性脑卒中溶栓治疗后的病理环节不可避免地加重神经功能损伤, 以脑损伤和神经功能障碍为主要特征。研究发现, 脑组织血流再灌注后会出现局部组织水肿甚至出血的现象, 细胞中钙超载、氧化应激、线粒体损伤和兴奋性氨基酸毒性均参与到再灌注损伤中, 可激活凋亡、程序性死亡、自噬、焦亡、铁死亡、坏死等多种细胞死亡途径。

细胞焦亡: 是一种典型依赖于炎症反应的程序性细胞死亡方式, 以质膜快速破裂、随后释放细胞内容和促炎递质为特征, 其中经典焦亡途径依赖于Caspase-1激活后诱导的炎症反应。NLRP3炎症小体作为脑缺血后中枢神经系统无菌性炎症反应的始动因子, 在中枢神经系统中诱导细胞焦亡和一系列炎症反应, 导致神经细胞损伤, 在中枢神经系统细胞焦亡中发挥关键作用。

摘要

背景: 前期研究表明, 针刺督脉治疗缺血性脑卒中的疗效确切, 可通过减轻细胞焦亡改善脑缺血再灌注损伤, 但上游调控机制尚不完全明确。

目的: 分析电针对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑保护作用机制。

方法: 采用随机数字表法将27只SD大鼠随机分为假手术组、模型组和电针组, 每组9只。取模型组和电针组大鼠, 采用改良线栓法建立脑缺血再灌注损伤模型, 验证造模成功后, 对电针组大鼠施予电针干预, 选取百会、风府、大椎3个穴位, 1次/d, 20 min/次, 连续干预7 d。电针干预结束后, 利用神经功能缺损评分、爬杆实验评估大鼠行为学改变, TTC染色评估大鼠脑梗死体积, 苏木精-伊红染色观察大鼠梗死侧脑皮质组织形态学变化, 免疫荧光染色分析梗死侧脑皮质中Iba-1及活性氧表达, ELISA法检测梗死侧脑皮质组织中白细胞介素1 β 、白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 水平, RT-qPCR及Western blot检测大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素1 β 的mRNA和蛋白表达, 免疫共沉淀法分析大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白与NLRP3的相互作用。

结果与结论: ①与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损评分、爬杆实验评分及脑梗死体积均升高($P < 0.05$), Iba-1、活性氧免疫荧光表达增强($P < 0.05$), 白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 水平均升高($P < 0.05$), 硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素1 β 的mRNA和蛋白表达均升高($P < 0.05$), 苏木精-伊红染色显示模型组大鼠梗死侧脑皮质神经元变性坏死, 细胞核出现碎裂溶解及细胞空泡现象; ②与模型组比较, 电针组大鼠神经功能缺损评分、爬杆实验评分及脑梗死体积均降低($P < 0.05$), Iba-1、活性氧免疫荧光表达减弱($P < 0.05$), 白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 水平均降低($P < 0.05$), 硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素1 β 的mRNA和蛋白表达均降低($P < 0.05$), 苏木精-伊红染色显示电针组大鼠梗死侧脑皮质神经元病理学损伤明显减轻, 细胞坏死及空泡现象明显减少; ③免疫共沉淀检测显示, 模型组大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白与NLRP3存在相互作用; ④结果表明, 电针干预可能通过抑制活性氧/硫氧还蛋白互作蛋白/NLRP3细胞焦亡信号通路及小胶质细胞的活化来减少炎症因子释放, 进而发挥抗脑缺血再灌注损伤作用。

关键词: 脑缺血再灌注损伤; 电针; NLRP3; 活性氧; 硫氧还蛋白互作蛋白; 小胶质细胞

¹ 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽省合肥市 230001; ² 合肥市第二人民医院, 安徽省合肥市 230001; ³ 安徽中医药大学研究生院, 安徽省合肥市 230000; ⁴ 广州医科大学附属脑科医院中医科, 广东省广州市 510370

第一作者: 吴海洋, 男, 1986年生, 安徽省合肥市人, 汉族, 2014年安徽中医药大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事针灸防治脑病的临床及机理研究。

通讯作者: 王颖, 博士, 主任医师, 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽省合肥市 230001

<https://orcid.org/0009-0003-8986-1578> (吴海洋)

基金资助: 安徽省高等学校科学研究项目 (2022AH050503), 项目负责人: 吴海洋; 安徽省高等学校科学研究项目 (2023AH040111), 项目负责人: 王颖; 安徽省高等学校科学研究项目 (2023AH050816), 项目负责人: 计海生; 安徽省高等学校科学研究项目 (2023AH050739), 项目负责人: 张君宇; 安徽省卫生健康委科研项目 (AHWJ2023A20030), 项目负责人: 吴海洋; 安徽省名中医王颖工作室建设项目 (中发展 [2022]5号), 项目负责人: 王颖; 安徽省临床医学研究转化专项项目 (202304295107020103), 项目负责人: 王颖; 安徽中医药大学临床科研项目 (2021efylc11), 项目负责人: 吴海洋

引用本文: 吴海洋, 段冕, 李成龙, 张君宇, 计海生, 王海涛, 茅伟, 王颖. 电针干预脑缺血再灌注模型大鼠的神经保护机制 [J].

中国组织工程研究, 2025, 29(18):3811-3818.



Neuroprotective mechanism of electroacupuncture in cerebral ischemia-reperfusion model rats

Wu Haiyang¹, Duan Mian², Li Chenglong³, Zhang Junyu¹, Ji Haisheng¹, Wang Haitao¹, Mao Wei⁴, Wang Ying¹

¹The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230001, Anhui Province, China; ²Hefei Second People's Hospital, Hefei 230001, Anhui Province, China; ³School of Graduate, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, Anhui Province, China; ⁴Department of TCM, Affiliated Brain Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510370, Guangdong Province, China

Wu Haiyang, Master, Associate chief physician, The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230001, Anhui Province, China

Corresponding author: Wang Ying, MD, Chief physician, The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230001, Anhui Province, China

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have demonstrated that acupuncture at the governor meridian has precise efficacy in the treatment of ischemic stroke and can improve cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating pyroptosis, but the upstream regulatory mechanisms are not yet fully clarified.

OBJECTIVE: To observe the neuroprotective effect of electroacupuncture in model rats of cerebral ischemia-reperfusion injury.

METHODS: Twenty-seven Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham surgery, model, and electroacupuncture groups, with nine rats in each group. Modified suture method was used to establish cerebral ischemia-reperfusion model rats in the model and electroacupuncture groups. The electroacupuncture group was subjected to electroacupuncture at “Baihui,” “Fengfu,” and “Dazhui” acupoints, 20 minutes each, once a day, for 7 consecutive days. After treatment, neurological deficit scoring and pole test were performed to assess behavioral changes. Tri-phenyl tetrazolium chloride staining was used to assess cerebral infarction size in rats. Hematoxylin-eosin staining was performed to observe morphological changes in cerebral cortex tissue on the infarcted side of rats. Immunofluorescence analysis was used to determine Iba-1 and reactive oxygen species levels in cerebral cortex tissue on the infarcted side of rats, ELISA method was used for measuring interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor α levels in cerebral cortex tissue on the infarcted side of rats. Real-time fluorescence quantitative PCR and western blot were used to detect mRNA and protein expression levels of thioredoxin interaction protein, nod-like receptor associated protein 3 (NLRP3), Caspase-1 and interleukin-1 β in cerebral cortex tissue on the infarcted side of rats respectively, and the interaction between thioredoxin interaction protein and NLRP3 was analyzed by immunoprecipitation.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the sham surgery group, rats in the model group showed an increase in neurological deficit score, pole test score, cerebral infarction volume ($P < 0.05$), the immunofluorescence expression of Iba-1 and reactive oxygen species ($P < 0.05$), the levels of interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor α ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expression of thioredoxin interaction protein, NLRP3, Caspase-1 and interleukin-1 β in cerebral cortex tissue ($P < 0.05$). Hematoxylin-eosin staining in the model group showed neuronal degeneration and necrosis, with fragmented and dissolved nuclei and cellular vacuoles. (2) Compared with the model group, rats in the electroacupuncture group showed a reduction in neurological deficit score, pole climbing test score, cerebral infarction volume ($P < 0.05$), the immunofluorescence expression of Iba-1 and reactive oxygen species ($P < 0.05$), the levels of interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor α ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expression of thioredoxin interaction protein, NLRP3, Caspase-1 and interleukin-1 β in cerebral cortex tissue ($P < 0.05$). Hematoxylin-eosin staining showed that the pathological damage of neurons in cerebral cortex tissue on the infarcted side of rats in the electroacupuncture group was significantly attenuated, with significantly reduced cell necrosis and vacuolation. (3) Immunoprecipitation assay showed an interaction between thioredoxin interaction proteins and NLRP3 in the cerebral cortical tissues on the infarcted side of rats in the model group. To conclude, electroacupuncture has a significant therapeutic effect against cerebral ischemia-reperfusion injury, possibly by inhibiting the reactive oxygen species/thioredoxin interaction protein/NLRP3 cell pyroptosis signaling pathway and activation of microglia to reduce the release of inflammatory factors.

Key words: cerebral ischemia-reperfusion injury; electroacupuncture; NLRP3; reactive oxygen species; thioredoxin interaction protein; microglia

Funding: Scientific Research Project of Higher Education Institutions in Anhui Province, Nos. 2022AH050503 (to WHY), 2023AH040111 (to WY), 2023AH050816 (to JHS), and 2023AH050739 (to ZJY); Scientific Research Project of Anhui Provincial Health Care Commission, No. AHWJ2023A20030 (to WHY); Construction Project of Wang Ying Studio of Famous Chinese Medicine Practitioners in Anhui Province, No. [2022]5 (to WY); Special Project of Clinical Medical Research Translation in Anhui Province, No. 202304295107020103 (to WY); Clinical Research Project of Anhui University of Chinese Medicine, No. 2021efylc11 (to WHY)

How to cite this article: WU HY, DUAN M, LI CL, ZHANG JY, JI HS, WANG HT, MAO W, WANG Y. Neuroprotective mechanism of electroacupuncture in cerebral ischemia-reperfusion model rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(18):3811-3818.

0 引言 Introduction

缺血性脑卒中是中枢神经系统最常见的疾病之一^[1], 通常由脑内动脉栓塞造成局部供血障碍引起, 可导致脑细胞坏死凋亡等^[2], 最佳治疗方法是尽快恢复缺血区血液再灌注, 但缺血后血流再通可导致脑缺血再灌注损伤^[3], 是致残率较高的临床重症之一。因此, 亟需探索有效安全的治疗方法来减轻脑缺血再灌注损伤。

细胞焦亡作为一种促炎性调控细胞死亡方式, 是导致脑缺血再灌注损伤的重要因素之一^[4]。当脑缺血再灌注损伤发生后, 小胶质细胞过度活化后大量释放炎症因子、蛋白及其他生物活性分子来介导神经炎症反应, 引起继发性脑损伤^[5-6]。抑制焦亡通路的激活及小胶质细胞过度活化能减轻脑缺血再灌注损伤下游炎症反应的发生, 进而降低神经功能损伤程度^[7-8]。硫氧还蛋白互作蛋白作为一种内源性的硫氧还蛋白负性调节剂, 在维持细胞氧化还原平衡中发挥重要作用: 硫氧还蛋白互作蛋白能与过量活性氧相互作用刺激炎症反应, 同时能够直接结合 NLRP3

蛋白, 促进 NLRP3 炎性小体的活化, 发挥介导氧化应激、抑制细胞增殖等作用, 被认为是氧化应激与神经炎症激活之间的关键联系^[9-10]。

针灸作为中医传统疗法被广泛应用于脑血管病的治疗, 相关指南已将针刺列为脑卒中康复的重要手段之一^[11]。针刺干预可通过减轻炎症反应等机制来改善脑缺血再灌注损伤^[12], 能保护神经功能并改善脑缺血再灌注损伤后的运动功能障碍^[13-14], 抑制细胞焦亡^[15]。课题组前期研究证明, 针刺督脉具有良好的临床效果^[16], 针刺治疗可通过抑制自噬相关蛋白核转录因子 κB 表达、下调促炎脂肪因子 Chemerin 水平、降低脑组织肿瘤坏死因子 α 和 C-反应蛋白水平来减轻脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑损伤^[17-18]。此次实验以活性氧/硫氧还蛋白互作蛋白/NLRP3 轴介导的细胞焦亡及小胶质细胞活化为切入点, 进一步阐明电针对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护机制, 为临床电针治疗脑缺血再灌注损伤提供一定的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验, 组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 1–10 月在安徽中医药大学针灸经络研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物与分组 27 只雄性 SD 大鼠, 8 周龄, SPF 级, 体质量 180–220 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可证号: SCXK(辽)2020-0001。所有大鼠术前 1 周进行适应性喂养, 自由进食饮水, 饲养环境湿度 45%–65%, 温度 20–25 °C, 昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h, 室内通风。采用随机数字表法将大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组, 每组 9 只。动物实验方案已通过安徽中医药大学伦理委员会批准 (批号: AHUCM-rats-2022158)。

1.3.2 试剂与仪器 TTC 染色试剂 (北京索莱宝科技有限公司), IBA-1 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 10904-1-AP), 活性氧抗体 (北京索莱宝科技有限公司, D6470), ECL 发光检测试剂盒 (Vigorous, P004), X 射线胶片 (柯达, FF057), Protein A/G agarose beads (Pierce, 20421), TRI Reagent (Biosharp, BS258A), 大鼠白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α ELISA 检测试剂盒 (威奥生物, ER20275M、ER20298M、ER20497M), QPCR 试剂盒 (Biosharp, BL705A), PVDF 膜 (Millipore 公司), Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天公司), 硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、白细胞介素 1 β 抗体 (Affinity, DF7506、DF7438、AF5103), Caspase-1 抗体 (ZENBID, 342947), 一次性无菌针灸针 (苏州天协针灸器械有限公司), 电子针疗仪 (苏州医疗用品厂有限公司), 凝胶成像仪、电泳系统 (Bio-RAD 公司), 微量加样器 (Bio-DL), Real-time PCR 仪 (罗氏), 超微量分光光度计 (IMPLEN), 半干型转膜仪 (Biometra), 酶标仪 (无锡华卫德朗), 移液枪 (Dragon), 恒温箱 (上海精宏), 高速组织研磨仪 (武汉赛维尔), 常温/冷冻离心机 (SCILOGEX), 显微镜 (日本 Olympus)。

1.4 实验方法

1.4.1 模型制备 参照改良线栓法制备大鼠右侧脑缺血再灌注损伤模型^[19]。术前 12 h 大鼠禁食不禁水。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉所有大鼠, 仰卧位固定, 备皮消毒, 在颈部正中作纵向切口, 分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉。先后结扎颈总动脉近心端、颈外动脉近分叉处, 夹闭颈内动脉, 在颈总动脉近分叉处打一松活结后在其下方剪一切口, 将线栓从该处插入颈内动脉, 将松活结稍拉紧以固定线栓, 松开颈内动脉动脉夹, 线栓插至大脑中动脉, 线栓插入深度 18 mm, 另一头置于切口外, 拉紧颈总动脉线结 (结扎、夹闭动脉血管过程

中注意保护迷走神经)。插栓完成, 记录插栓时间, 缝合切口时予腹腔注射硫酸庆大霉素 (2 mL/kg) 抗感染, 2 h 后将线栓轻柔拉出 5 mm, 剪去体外线栓。模型组与电针组大鼠均建立右侧脑缺血再灌注损伤模型, 假手术组分离血管后不插入线栓。

造模后 2 h, 参考 Zea Longa 评分标准进行神经功能缺损评分^[20], 作为检测模型复制成功的标志, 评分 1–3 分视为模型制备成功, 纳入实验。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的 构建脑缺血再灌注模型, 探讨电针干预对模型大鼠的神经保护机制

选择动物 8 周龄, SPF 级, 雄性大鼠, 体质量 180–220 g

的条件

动物来源 SD 大鼠, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司

及品系

造模技术 在颈部正中作纵向切口, 分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉。

描述 先后结扎颈总动脉近心端、颈外动脉近分叉处, 夹闭颈内动脉, 在颈总动脉近分叉处打一松活结后在其下方剪一切口, 将线栓从该处插入颈内动脉, 将松活结稍拉紧以固定线栓, 松开颈内动脉动脉夹, 线栓插至大脑中动脉, 线栓插入深度 18 mm, 另一头置于切口外, 拉紧颈总动脉线结 (结扎、夹闭动脉血管过程中注意保护迷走神经)。插栓完成, 记录插栓时间, 缝合切口时予腹腔注射硫酸庆大霉素 (2 mL/kg) 抗感染, 2 h 后将线栓轻柔拉出 5 mm, 剪去体外线栓

动物数量 采用随机数字表法将大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组, 每组 9 及分组方法 只。模型组与电针组大鼠均建立右侧脑缺血再灌注损伤模型, 假手术组分离血管后不插入线栓

造模成功 造模后 2 h, 参考 Zea Longa 评分标准进行神经功能缺损评分^[20], 作为评价指标 检测模型复制成功的标志, 评分 1–3 分视为模型制备成功, 纳入实验

造模后观察指标 利用神经功能缺损评分、爬杆实验评估大鼠行为学改变, TTC 染色评估大鼠脑梗死体积, 苏木精-伊红染色观察大鼠梗死侧脑皮质组织形态学变化, 免疫荧光染色分析梗死侧脑皮质中 Iba-1 及活性氧表达, ELISA 法检测梗死侧脑皮质组织中白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平, RT-qPCR 及 Western blot 检测大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1 β 的 mRNA 和蛋白表达, 免疫共沉淀法分析大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白与 NLRP3 的相互作用

造模后动物处理 验证造模成功后, 对电针组大鼠施予电针治疗, 1 次/d, 20 min/次, 连续 7 d。电针干预结束后进行大鼠行为学评估, 行为学评估完成后麻醉后处死, 剥离大鼠脑皮质区域, 进行相关检测

伦理委员会批准 实验方案已通过安徽中医药大学伦理委员会批准 (批号: AHUCM-rats-2022158)

1.4.2 干预方法 假手术组、模型组大鼠观察期间自由活动, 给予同样抓取、固定, 无任何干预措施。

电针组: 造模后 2 h 依次进行神经功能缺损评分、爬杆实验, 爬杆实验完成后即刻开始电针治疗。参照《实验动物常用穴位名称与定位 第 2 部分: 大鼠》^[21], 取“百会、风府、大椎”3 穴, 使用黄色透明橡皮筋俯卧位将大鼠的四肢及门牙固定在固定台上, 将大鼠俯卧位固定于大鼠固定器 (中号), 用天协牌 0.25 mm $\times$ 25 mm 针灸针, 操作: “百会”平刺, “风府”向下 45° 斜刺, “大椎”直刺, 均进针 3 mm。“百会、大椎”连接电子针疗仪 (图 1),

疏密波，频率 2 Hz/5 Hz，电流强度 1.0–2.0 mA，以大鼠肌肉轻微颤动为宜。1 次/d，20 min/次，连续 7 d。

1.4.3 大鼠神经功能缺损评分 造模后 2 h 及电针干预结束后，由不知情的专业研究人员采用 Zea Longa 评分标准对大鼠进行神经功能缺损评分。正常活动无损伤，记 0 分；不能完全伸展对侧前爪，记 1 分；向对侧转圈，记 2 分；向对侧倾倒，记 3 分；不能自发行走，意识水平下降或丧失，记 4 分。评分越高说明脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能损伤越严重。

1.4.4 爬杆实验 实验之前对各组大鼠训练 3 d，每天训练 3 次，使大鼠熟悉测试装置，训练下杆。造模后 2 h 及电针干预结束后，进行爬杆实验，评价大鼠行为学改变。将一直径 1 cm、高 100 cm 的不锈钢光滑杆垂直竖立于有孔圆盘，将杆底部固定牢固；杆表面均匀缠绕麻绳，防止大鼠在爬行过程中打滑；使大鼠头朝下由杆顶部沿杆自然爬下，观察其行为并评分^[22]。若大鼠四肢并用，一次顺利从杆上爬下，记 0 分；螺旋向下爬行兼后肢滑行，记 0.5 分；停顿数次后爬下但可抱紧金属，杆记 1 分；滑行后滑落伴轻微震颤，记 1.5 分；频繁震颤不能抓杆，直接掉落，记 2 分；连续震颤，四肢麻痹，不能活动或死亡，记 2.5 分。各组大鼠测试 3 次，取平均值。

1.4.5 取材 末次爬杆实验结束后，麻醉后处死所有大鼠，取全脑，其中 3 只用于全脑 TTC 染色，3 只用于梗死侧脑皮质神经元病理形态观察（一部分用于免疫荧光染色，另一部分用于苏木精–伊红染色），剩余 3 只用于梗死侧脑皮质 ELISA、RT-qPCR 与 Western Blot 检测。

1.4.6 大鼠脑梗死体积百分比测定 取出冷冻 20 min 的大鼠全脑，切成 5 个 2 mm 厚度的连续冠状切片，置于 2%TTC 染液中避光孵育 30 min，用 40 g/L 多聚甲醛固定 24 h 后拍照。使用 Image J 软件计算梗死体积。脑梗死体积(%)=(切片梗死面积×厚度)/(切片整体面积×厚度)×100%。

1.4.7 大鼠梗死侧脑皮质神经元病理形态观察 将大鼠脑组织标本置于 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 24 h，脱水、包埋后制备连续冠状切片，进行苏木精–伊红染色，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，树胶封固，置于显微镜下观察并拍片。

1.4.8 免疫荧光双标染色 采用免疫荧光染色观察大鼠梗死侧脑皮质组织 Iba-1、活性氧表达。将大鼠脑组织标本置于 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 24 h，脱水、包埋后制备连续冠状切片，滴加山羊血清封闭液孵育 30 min，用 PBS 冲洗，滴加 Iba-1、活性氧一抗（稀释比 1：200）孵育过夜，次日用 PBS 冲洗，滴加免疫荧光二抗（稀释比 1：400）避光孵育 30 min，冲洗、封固后置于荧光显微镜下观察并拍片。使用 Image J 软件分析计算 Iba-1、活性氧平均荧光强度。

1.4.9 ELISA 法检测大鼠梗死侧脑皮质组织相关炎症因子水平 取大鼠梗死侧脑皮质组织 100 mg，置于 -80 °C 冰箱保存，按照 ELISA 试剂盒说明书标准流程测定各组大鼠梗死侧脑皮质组织中炎症因子水平。用预冷的 PBS 冲洗大鼠梗死侧脑皮质组织，加入适量的蛋白酶抑制剂，将组织与 PBS 按 1 mg：10 μL 加入高速组织研磨仪（60 Hz、180 s）中研磨充分；将匀浆液 5 000 r/min 离心 5–10 min，取上清液，用酶标仪于 450 nm 波长处测量吸光度值。根据吸光度值和标准品浓度绘制标准曲线，计算大鼠梗死侧脑皮质组织白细胞介素 1β、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 水平。

1.4.10 RT-qPCR 检测 采用 RT-qPCR 检测大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白、Caspase-1、白细胞介素 1β、NLRP3 的 mRNA 表达。称取 30–90 mg 梗死侧脑皮质组织，研磨后加入 3 mL TRI Reagent 试剂，12 000 r/min 离心 10 min 后提取总 RNA，反转录为 cDNA，进行荧光定量 PCR 反应，步骤为：95 °C 3 min；95 °C 15 s，60 °C 30 s，40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 | RT-qPCR 检测引物序列
Table 1 | Primer sequences detected using RT-qPCR

基因	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
β-actin	F: CTT CCT GGG TAT GGA ATC CT R: TCT TTA CGG ATG TCA ACG TC	81
硫氧还蛋白互作蛋白	F: CAG CAT GGC TAG CCG GAC AA R: TAG CAA GGT GGA GCT TCT GGG	134
Caspase-1	F: AGA AAC GCC ATG GCT GAC AA R: ACA TGA TCG CAC AGG TCT CGT	202
白细胞介素 1β	F: AGC AGC TTT CGA CAG TGA GGA R: TGG ACA GCC CAA GTC AAG GG	134
NLRP3	F: CTG GTG GAG CTG GAC CTC AG R: ACA GCA GCT GAC CAA CCA GA	141

1.4.11 Western blot 检测 采用 Western blot 检测大鼠梗死侧脑皮质组织硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1β 的蛋白表达。称取 100 mg 梗死侧脑皮质组织样本，裂解、研磨后 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液测定蛋白浓度，电泳、转膜、封闭后，加入一抗硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1β、β-actin（稀释比均为 1：1 000），用 TBST 漂洗 3 遍；加入二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG（稀释比均为 1：5 000）孵育 2 h，用 TBST 漂洗 3 遍；ECL 显色曝光。使用 Image J 软件分析目标蛋白相对表达灰度值。

1.4.12 免疫共沉淀检测 采用免疫共沉淀检测模型组大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白与 NLRP3 的相互作用。称取 100 mg 大鼠梗死侧脑皮质组织，加入组织裂解液后置于摇床上摇动 30 min；4 °C 条件下

12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 取 20 μ L 上清液作为阳性对照组。再对 500 μ L 裂解液预处理, 均分后分别加入 2 μ g 硫氧还蛋白互作蛋白抗体和 IgG 抗体, 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜, 分别作为实验组和阴性对照组; 加入 50 μ L 稀释的蛋白 G 琼脂糖凝胶悬浮液, 12 000 r/min 离心 20 min 后弃上清液, 收沉淀; 加入 50 μ L 甘氨酸溶液悬浮颗粒, 5 000 r/min 离心 1 min 后收集上清液, 重复 1 次所得样品中和后再加蛋白酶抑制剂混匀, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 使用 NLRP3 抗体进行 Western blot 定性分析。

1.5 主要观察指标 各组大鼠行为学改变、脑梗死体积, 各组大鼠梗死侧脑皮质组织形态学变化, 各组大鼠梗死侧脑皮质组织 Iba-1 及活性氧表达, 各组大鼠梗死侧脑皮质组织中白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平, 各组大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1 β 的 mRNA 和蛋白表达, 各组大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白与 NLRP3 的相互作用。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 26.0 软件行统计分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经安徽中医药大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 27 只 SD 大鼠全部进入结果分析。

2.2 各组大鼠神经功能缺损程度及脑梗死体积比较 假手术组大鼠无神经功能缺损表现, 大鼠脑组织切片 TTC 染色未见白色梗死区; 与假手术组比较, 模型组、电针组造模后 2 h 的大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积升高 ($P < 0.001$, $P < 0.01$), 提示大鼠神经功能受损、脑梗死体积增加; 与模型组比较, 电针干预结束后电针组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 见图 2, 3。

2.3 各组大鼠爬杆实验评分比较 与假手术组比较, 模型组、电针组大鼠造模后 2 h 的爬杆实验评分明显升高 ($P < 0.001$); 电针干预结束后, 与假手术组比较, 模型组大鼠爬杆实验评分高于假手术组、电针组 ($P < 0.001$, $P < 0.05$), 见图 4。

2.4 各组大鼠梗死侧大脑皮质神经元病理形态比较 电针干预结束后苏木精-伊红染色结果显示, 假手术组大鼠脑皮质神经元、胶质细胞形态正常、结构完整、核仁完整; 模型组大鼠梗死侧大脑皮质神经元变性坏死, 细胞核出现碎裂、溶解、细胞空泡现象, 有较多炎性细胞浸润; 与模型组比较, 电针组大鼠梗死侧大脑皮质神经元病理损伤明显改善, 组织结构清晰, 变性神经元减少, 见图 5。

2.5 各组大鼠梗死侧脑皮质组织中 Iba-1、活性氧蛋白表达比较 电针干预结束后免疫荧光染色结果显示, 与假手术组比较, 模型组 Iba-1、活性氧荧光表达增强 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 电针组 Iba-1、活性氧荧光表达减弱 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 见图 6。

2.6 各组大鼠梗死侧大脑皮质组织中炎症因子水平比较 电针干预结束后, 与假手术组比较, 模型组白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平均升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 电针组白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平均降低 ($P < 0.001$), 见图 7。

2.7 各组大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1 β 表达比较 电针干预结束后 RT-qPCR 检测结果显示, 与假手术组比较, 模型组硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1 β mRNA 表达均升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 与模型组比较, 电针组硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1 β mRNA 表达均降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 见图 8。

电针干预结束后 Western blot 检测结果显示, 与假手术组比较, 模型组硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1 β 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 与模型组比较, 电针组硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1 β 蛋白表达均降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 见图 9。

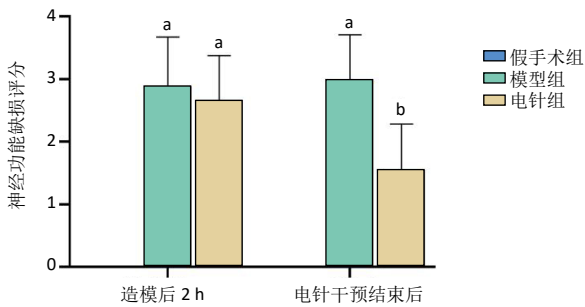
2.8 模型组大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白与 NLRP3 蛋白的相互作用 通过 Western blot 可以检测到硫氧还蛋白互作蛋白抗体进行免疫共沉淀实验下拉的免疫复合物中含有 NLRP3 蛋白条带, 而阴性对照组下拉的蛋白中未见任何蛋白条带, 见图 10。免疫共沉淀结果证明硫氧还蛋白互作蛋白与 NLRP3 存在相互作用, 说明二者可直接结合。

3 讨论 Discussion

目前, 缺血性脑卒中的主要治疗是通过溶栓或介入取栓术及时恢复血流供应, 但此过程可能引起缺血再灌注损伤, 从而加剧神经元坏死, 导致神经功能受损^[23-24]。电针疗法是将传统针刺与脉冲电流相结合的一种新兴治疗技术, 是目前治疗缺血性脑卒中的重要手段, 因疗效显著已被广泛应用于临床^[25]。此次实验参照改良线栓法制备大鼠右侧脑缺血再灌注模型, 再灌注后大鼠神经功能缺损评分及爬杆实验评分升高, 说明模型制备成功。通过电针“百会、风府、大椎”3 穴干预脑缺血再灌注模型大鼠, 大鼠神经功能缺损评分及爬杆实验评分均升高, 大鼠脑梗死体积明显减少, 与既往研究结果一致^[18, 26], 表明电针干预可降低大鼠脑组织损伤, 发挥脑缺血再灌注损伤的保护作用。



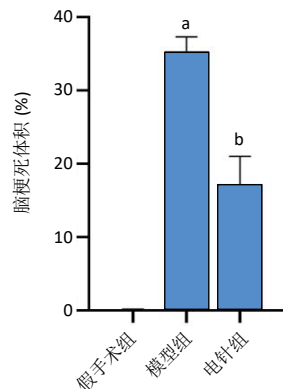
图1 | 对脑缺血再灌注模型大鼠进行电针干预
Figure 1 | Electroacupuncture intervention on the cerebral ischemia-reperfusion rat model



图注：与假手术组比较，^a $P < 0.001$ ；与模型组比较，^b $P < 0.01$ 。

图2 | 各组大鼠神经功能缺损评分比较

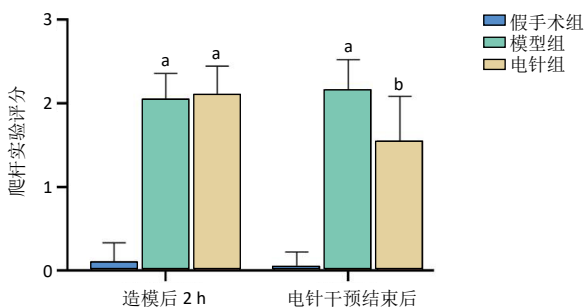
Figure 2 | Comparison of neurological deficits scores among different groups of rats



图注：与假手术组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ 。

图3 | 各组大鼠脑梗死体积比较

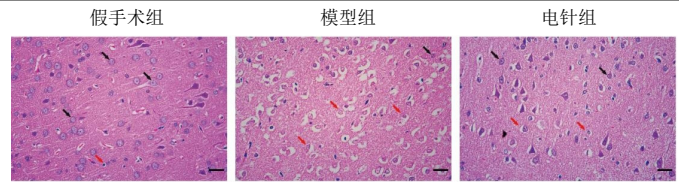
Figure 3 | Comparison of cerebral infarct volume among different groups of rats



图注：与假手术组比较，^a $P < 0.001$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ 。

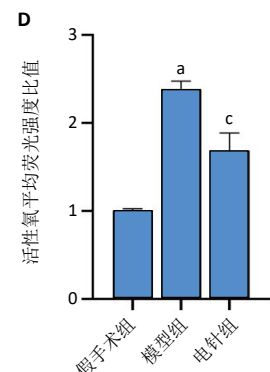
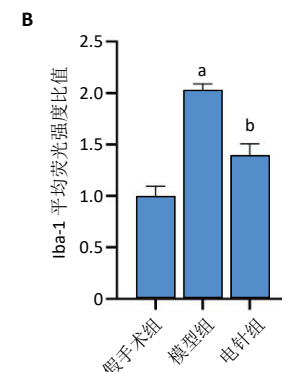
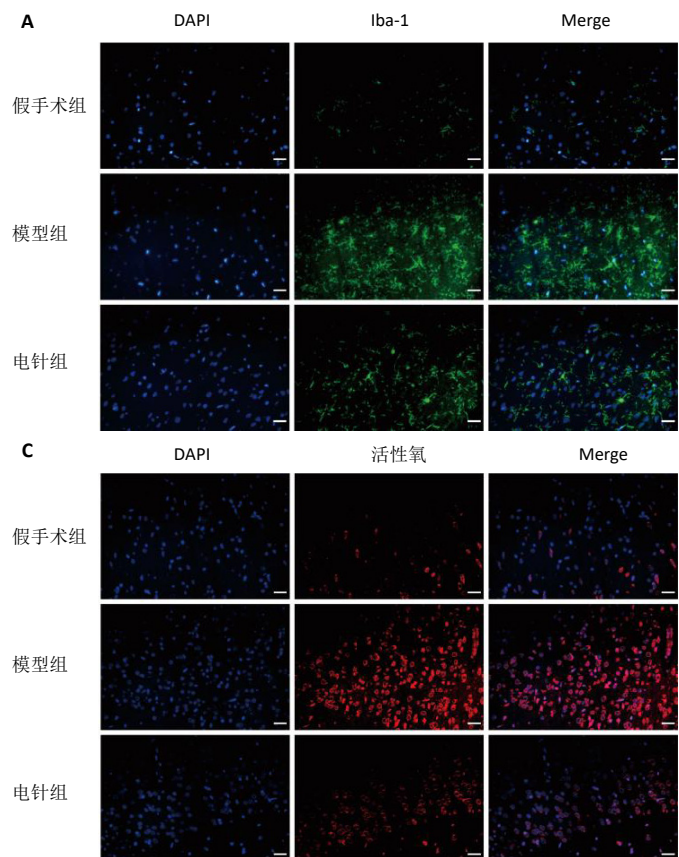
图4 | 各组大鼠爬杆实验评分比较

Figure 4 | Comparison of pole test scores among different groups of rats



图注：苏木精-伊红染色显示，模型组大鼠梗死侧大脑皮质神经元变性坏死，细胞核出现碎裂、溶解、细胞空泡现象，有较多炎性细胞浸润；与模型组比较，电针组大鼠梗死侧大脑皮质神经元病理损伤明显改善，组织结构清晰，变性神经元减少。黑色箭头表示正常细胞，红色箭头表示坏死细胞及细胞空泡，标尺=50 μm 。

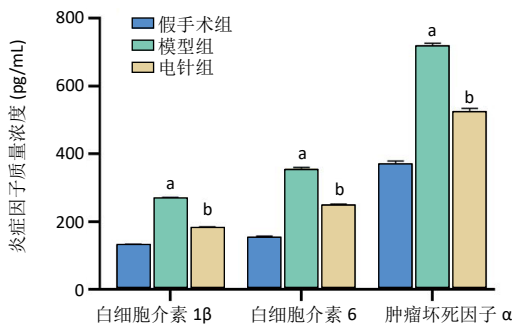
图5 | 各组大鼠梗死侧脑皮质神经元病理形态改变 (苏木精-伊红染色)
Figure 5 | Changes in the pathological morphology of cortical neurons in the infarcted area of rats in each group (hematoxylin-eosin staining)



图注：A, B 为 Iba-1 免疫荧光染色与免疫荧光染色定量分析；C, D 为活性氧免疫荧光染色与免疫荧光染色定量分析。标尺=50 μm 。与假手术组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.01$ ，^c $P < 0.05$ 。

图6 | 各组大鼠梗死侧脑皮质组织中 Iba-1、活性氧蛋白表达比较

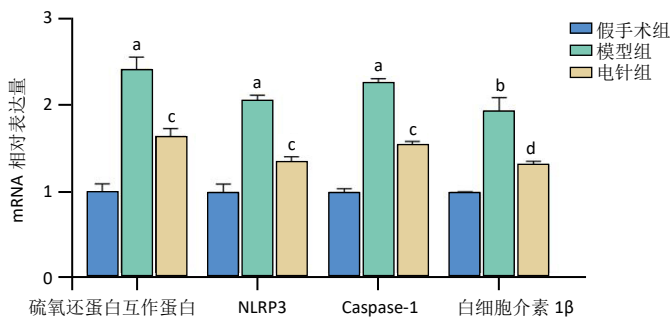
Figure 6 | Comparison of Iba-1 and reactive oxygen species protein expression in the infarcted cortical tissue of rats among groups



图注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.001$; 与模型组比较, ^b $P < 0.001$ 。

图 7 | 各组大鼠梗死侧脑皮质组织中炎症因子水平比较

Figure 7 | Comparison of inflammatory factor levels in the infarcted cortical tissue of rats among groups



图注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^c $P < 0.001$, ^d $P < 0.01$ 。

图 8 | 各组大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1β mRNA 表达比较

Figure 8 | Comparison of the mRNA expression of thioredoxin interaction protein, NLRP3, Caspase-1 and interleukin-1β in the cerebral cortex on the infarcted side of rats among groups

相关研究证实, 抑制脑缺血再灌注损伤后的氧化应激及炎症反应能够减轻脑水肿、神经元损伤等病理过程, 可能是治疗缺血性脑损伤的重要靶点^[27]。脑缺血再灌注损伤常伴有活性氧增多, 过量的活性氧将引起脂质过氧化、蛋白质失活等^[28]。此次实验免疫荧光分析结果显示, 电针干预可显著抑制脑缺血再灌注损伤模型大鼠梗死侧脑皮质组织活性氧表达水平, 有效缓解氧化应激反应。活性氧是 NLRP3 炎症小体活化的主要因素, 脑缺血再灌注损伤后, 活性氧过量形成和氧化应激反应可通过激活 NLRP3 导致 Caspase-1 和凋亡相关微粒蛋白 (ASC) 在内的低聚蛋白复合物形成, 组成 NLRP3 炎症小体, 使 Caspase-1 活化并释放至胞外, 促进白细胞介素 1β 等炎症因子的成熟和释放, 介导组织炎症和免疫反应, 导致神经元受损、加重脑损伤^[29]。此次实验结果显示, 电针干预可显著降低脑缺血再灌注损伤模型大鼠梗死侧脑皮质组织中白细胞介素 1β、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 水平, 减轻脑缺血再灌注损伤引发的炎症反应。NLRP3 炎症复合体不仅促进多种炎症因子的释放, 还会诱导细胞焦亡这一具有炎症特性的细胞死亡方式^[30]。细胞焦亡是由炎症小体介导的 Caspase-1 激活诱导程序性细胞死亡的促

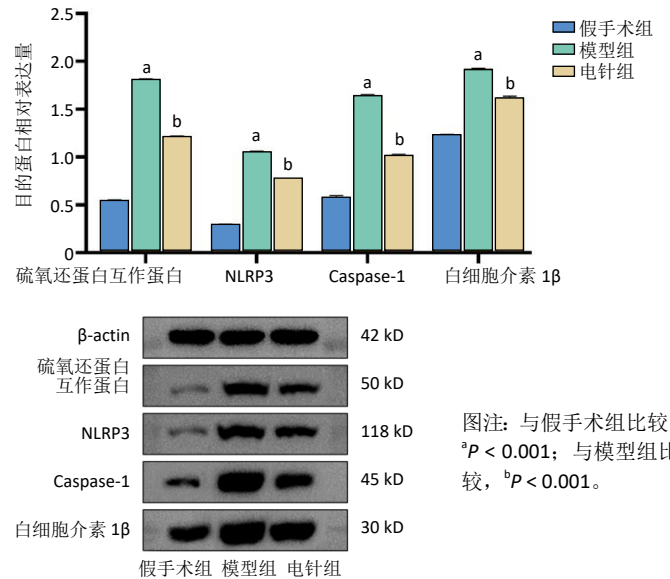
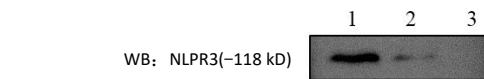


图 9 | 各组大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1β 蛋白表达比较

Figure 9 | Comparison of the protein expression levels of thioredoxin interaction protein, NLRP3, Caspase-1 and interleukin-1β in the cerebral cortex on the infarcted side of rats among groups



图注: 1 代表阳性对照组, 2 代表实验组 (模型组大鼠梗死侧脑皮质组织硫氧还蛋白互作蛋白免疫共沉淀所得蛋白), 3 代表阴性对照组。Western Blot 检测结果显示, 实验组硫氧还蛋白互作蛋白免疫共沉淀实验下拉的免疫复合物中含有 NLRP3 蛋白条带。

图 10 | 模型组大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白与 NLRP3 蛋白的相互作用

Figure 10 | Interaction between thioredoxin interaction protein and NLRP3 protein in the cerebral cortex on the infarcted side of rats

炎形式, 是脑缺血再灌注损伤的主要形式之一^[31]。此次实验结果显示, 电针干预可降低脑缺血再灌注损伤模型大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白、NLRP3、Caspase-1、白细胞介素 1β 的 mRNA 与蛋白表达, 提示电针能抑制 NLRP3 等炎症小体活化, 抑制组织细胞焦亡及下游白细胞介素 1β 等炎症因子的成熟和释放, 从而减轻组织炎症及神经元损伤。

小胶质细胞作为首个对各种急性脑损伤作出反应的细胞^[32], 在中枢神经系统稳态的维持中起着重要作用。脑缺血再灌注损伤发生后的早期, 病变周围原本高度分枝状的小胶质细胞明显活化, 其形态变大、突起变粗, Iba-1 (小胶质细胞的特异性标志物) 表达上调^[33], 活化的小胶质细胞通常被作为神经炎症的标志, 其持续活化会引发炎症级联反应, 加重神经损伤, 及早抑制小胶质细胞活化已被认为是减轻脑缺血再灌注损伤的治疗方向^[34]。此次实验结果显示, 电针组大鼠梗死侧脑皮质组织中 Iba-1 表达减弱, 说明电针干预可抑制小胶质细胞的活化, 减轻炎症因子的释放。此次实验结果显示, 脑缺血再灌注

损伤模型大鼠梗死侧脑皮质组织中硫氧还蛋白互作蛋白与 NLRP3 存在相互作用,二者可直接结合。

综上所述,电针干预可能通过抑制活性氧/硫氧还蛋白互作蛋白/NLRP3 信号通路及小胶质细胞的活化抑制氧化应激指标及炎症因子的释放,减轻神经炎症反应和脑组织细胞的焦亡,使脑组织损伤及异常神经功能得到明显改善,最终发挥对脑缺血灌注损伤的保护作用。

作者贡献: 吴海洋负责实验设计,段冕、茅伟负责实验实施,李成龙、张君宇负责实验评估,计海生、王海涛负责指标的测定,王颖负责审核。

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中不存在利益冲突。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了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。

4 参考文献 References

- [1] CHEN KH, CHAI HT, CHEN CH, et al. Synergic effect of combined cyclosporin and melatonin protects the brain against acute ischemic reperfusion injury. *Biomed Pharmacother*. 2021;136:111266.
- [2] ZANG M, ZHAO Y, GAO L, et al. The circadian nuclear receptor RORalpha negatively regulates cerebral ischemia-reperfusion injury and mediates the neuroprotective effects of melatonin. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(11):165890.
- [3] 魏思灿,林天来,黄玲,等. 槲皮素通过 PINK1/parkin 通路激活线粒体自噬减轻大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020,36(12):2251-2257.
- [4] CAI L, YAO Z Y, YANG L, et al. Mechanism of Electroacupuncture Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: Reducing Inflammatory Response and Cell Pyroptosis by Inhibiting NLRP3 and Caspase-1. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:822088.
- [5] DOS SI, DIAS M, GOMES-LEAL W. Microglial activation and adult neurogenesis after brain stroke. *Neural Regen Res*. 2021;16(3):456-459.
- [6] FU CY, ZHONG CR, YANG YT, et al. Sirt1 activator SRT2104 protects against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury via regulating microglia polarization by modulating Sirt1/NF-kappaB pathway. *Brain Res*. 2021;1753:147236.
- [7] BARRINGTON J, LEMARCHAND E, ALLAN SM. A brain in flame; do inflammasomes and pyroptosis influence stroke pathology? *Brain Pathol*. 2017;27(2):205-212.
- [8] 陈丽莹,蒋佩萱,徐婷婷,等. 小胶质细胞活化介导的 MMP-9 信号通路在电针预处理对 MCAO 大鼠的脑保护效应中的作用 [J]. *上海针灸杂志*, 2020,39(1):90-97.
- [9] JIA Y, CUI R, WANG C, et al. Metformin protects against intestinal ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via TXNIP-NLRP3-GSDMD pathway. *Redox Biol*. 2020;32:101534.
- [10] SONG MY, YI F, XIAO H, et al. Energy restriction induced SIRT6 inhibits microglia activation and promotes angiogenesis in cerebral ischemia via transcriptional inhibition of TXNIP. *Cell Death Dis*. 2022;13(5):449.
- [11] 章薇,姜必丹,李金香,等. 中医康复临床实践指南·缺血性脑卒中(脑梗死)[J]. *康复学报*, 2021,31(6):437-447.
- [12] ZHU W, YE Y, LIU Y, et al. Mechanisms of Acupuncture Therapy for Cerebral Ischemia: an Evidence-Based Review of Clinical and Animal Studies on Cerebral Ischemia. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017;12(4):575-592.
- [13] 罗敷,舒象忠,刘丹妮,等. 电针对脑缺血再灌注损伤大鼠 Toll 样受体 4/核因子 kappaB 信号通路的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(14):2186-2190.
- [14] 刘丹妮,孙光华,周桂娟,等. 电针水沟、百会穴对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质神经元凋亡的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2022,26(35):5620-5625.
- [15] 严年文,阮甦,王芳,等. 电针调控褪黑素-核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 炎症小体抑制细胞焦亡减轻脑缺血大鼠脑缺血损伤 [J]. *针刺研究*, 2023,48(3):233-239.
- [16] 吴海洋,王颖,韩为. 通督调神针刺联合小续命汤加减治疗气虚血瘀型中风临床研究 [J]. *山东中医杂志*, 2022,41(2):181-185.
- [17] 吴海洋,王颖,韩为. 通督调神针刺对脑缺血再灌注大鼠脑组织肿瘤坏死因子-alpha 和 C 反应蛋白的动态影响 [J]. *针刺研究*, 2015, 40(3):215-218.
- [18] 吴海洋,王颖. 小续命汤联合超早期针刺督脉对于脑缺血再灌注模型大鼠自噬相关蛋白 NF-kB p65 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020,26(18):30-35.
- [19] 包新杰,赵浩,魏俊吉,等. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血模型的改进 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2011,8(5):248-252.
- [20] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91.
- [21] 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.
- [22] 赵筱汐,李征松,王玥. 小鼠局灶性脑缺血模型中行为学测试方法的比较 [J]. *中国康复医学杂志*, 2016,31(7):821-824.
- [23] 钟迪,张舒婷,吴波. 《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018》解读 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2019,19(11):897-901.
- [24] LIM S, KIM TJ, KIM YJ, et al. Senolytic Therapy for Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11967.
- [25] WANG H, XU X, WANG Z, et al. Mechanism Research of Electroacupuncture Stimulation at Baihui and Zusanli in Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Using RNA-Sequencing. *Clin Complement Med Pharmacol*. 2023(2). doi: 10.1016/J.CCMP.2023.100086
- [26] 唐红,郑慧娥,汪红娟,等. 针刺对脑缺血再灌注损伤模型大鼠海马细胞凋亡的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2023,39(3):326-332.
- [27] KANG T, QIN X, LEI Q, et al. BRAP silencing protects against neuronal inflammation, oxidative stress and apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury by promoting PON1 expression. *Environ Toxicol*. 2023;38(11):2645-2655.
- [28] 岳萌,孙世辉,张紫晶,等. 活性氧通过影响线粒体膜电位参与小鼠高血糖加重脑缺血性损伤 [J]. *神经解剖学杂志*, 2019,35(1):35-40.
- [29] 补娟,纪国庆,叶勒丹·马汉,等. 刺槐素通过自噬调控 ROS/NLRP3 信号通路对脑缺血再灌注损伤发挥保护作用 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2023,40(2):99-102.
- [30] XU S, CHEN H, NI H, et al. Targeting HDAC6 attenuates nicotine-induced macrophage pyroptosis via NF-kappaB/NLRP3 pathway. *Atherosclerosis*. 2021;317:1-9.
- [31] CAI L, YAO Z Y, YANG L, et al. Mechanism of Electroacupuncture Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: Reducing Inflammatory Response and Cell Pyroptosis by Inhibiting NLRP3 and Caspase-1. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:822088.
- [32] GUO Y, DAI W, ZHENG Y, et al. Mechanism and Regulation of Microglia Polarization in Intracerebral Hemorrhage. *Molecules*. 2022;27(20):7080.
- [33] ZHANG D, FENG Y, PAN H, et al. 9-Methylfascaplysin exerts anti-ischemic stroke neuroprotective effects via the inhibition of neuroinflammation and oxidative stress in rats. *Int Immunopharmacol*. 2021;97:107656.
- [34] YAO Z, LIU N, ZHU X, et al. Subanesthetic isoflurane abates ROS-activated MAPK/NF-kappaB signaling to repress ischemia-induced microglia inflammation and brain injury. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12(24):26121-26139.

(责任编辑: GW, ZN, WL, ZLJ)