

徐琼,刘建浩,王天磊,等. 电针对脑缺血大鼠突触可塑性及小胶质细胞极化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 48-55.

Xu Q, Liu JH, Wang TL, et al. Effects of electroacupuncture on synaptic plasticity and microglial polarization in rats with cerebral ischemia [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 48-55.

doi: 10. 3969/ j. issn. 1671-7856. 2021. 06. 008

电针对脑缺血大鼠突触可塑性及小胶质细胞极化的影响

徐 琼,刘建浩*,王天磊,谭春风

(三亚市中医院针灸科,海南 三亚 572000)

【摘要】 目的 探究电针对局灶性脑缺血大鼠突触可塑性及小胶质细胞极化,并检测 miR-21/信号转导和转录激活因子 3(STAT3)通路表达情况。**方法** 颈外动脉远端用细线双重结扎 60 min 构建局灶性脑缺血大鼠模型,神经功能缺损评分评价模型制备情况,模型成功大鼠分为模型组、电针组、尼莫地平组,同时假手术组对照处理。治疗 3 周结束后神经功能缺损评分评估各组大鼠脑损伤程度;2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色测定各组大鼠脑梗死体积;电镜观察脑皮层突触超微结构并行形态计量学分析;免疫荧光染色观察脑皮层小胶质细胞极化情况;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法测定各组大鼠脑皮层中 miR-21 水平;蛋白印迹法测定各组大鼠脑皮层中 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(JAK2)、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 水平。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠神经功能缺损评分、梗死体积、脑皮层区 M1 型小胶质细胞数量、miR-21、p-STAT3、p-JAK2 水平显著升高($P<0.05$),脑皮层区 M2 型小胶质细胞数量、突触面数密度(N_v)、突触体密度(V_v)、突触连接带面密度(S_v)、突触后致密物质(PSD)、突触界面曲面率、突触间隙宽度明显降低($P<0.05$);与模型组相比,电针组和尼莫地平组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积、M1 型小胶质细胞数量、miR-21、p-STAT3、p-JAK2 水平显著降低($P<0.05$),M2 型小胶质细胞数量、 N_v 、 V_v 、 S_v 、PSD、突触界面曲面率、突触间隙宽度显著升高($P<0.05$)。**结论** 电针可促进局灶性脑缺血大鼠突触重建,诱导小胶质细胞由 M1 向 M2 型极化。

【关键词】 miR-21;信号转导和转录激活因子 3;电针;局灶性脑缺血

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 06-0048-08

Effects of electroacupuncture on synaptic plasticity and microglial polarization in rats with cerebral ischemia

XU Qiong, LIU Jianhao*, WANG Tianlei, TAN Chunfeng

(Department of Acupuncture and Moxibustion, Sanya Hospital of Traditional Chinese Medicine, Sanya 572000)

【Abstract】 Objective To explore the effects of electroacupuncture on synaptic plasticity and microglial polarization and detect the expression of miR-21/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway in rats with cerebral ischemia. **Methods** The distal end of the external carotid artery was double-ligated with a thin wire for 60 minutes to establish a rat model of focal cerebral ischemia. The neurological deficit score was used to evaluate the model preparation. The successful model rats were divided into a model group, electroacupuncture group, and nimodipine group.

[基金项目] 海南自然科学基金面上项目(817399)。

[作者简介] 徐琼(1982—)女,本科,主治医师,从事针灸学与神经疾病研究。E-mail: xuweizhong1224@163.com

[通信作者] 刘建浩(1974—),博士,主任医师,从事针灸学与神经疾病研究。E-mail: liujianhao168@163.com

The control group comprised rats treated by a sham operation. After 3 weeks of treatment, the cerebral infarction volume was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining, the synapse ultrastructure was observed by electron microscopy and analyzed by morphometry, and the microglial polarization was assessed by immunofluorescence staining. Additionally, the level of miR-21 in the cerebral cortex of rats in each group was measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, and western blotting was used to detect the levels of Janus kinase 2 (JAK2), p-JAK2, STAT3, and p-STAT3 in the cerebral cortex of rats in each group. **Results** The neurological deficit score, cerebral infarction volume, number of M1 microglia, and levels of miR-21, p-STAT3, and p-JAK2 were significantly higher and the number of M2 microglia, numerical density of synapsis (N_v), volume density of synapsis (V_v), surface density of synapsis (S_v), postsynaptic density (PSD), synaptic curvature, and width of the synaptic cleft were significantly lower in the model group than in the control group ($P < 0.05$). The neurological deficit score, cerebral infarction volume, number of M1 microglia, and levels of miR-21, p-STAT3, and p-JAK2 were significantly lower and the number of M2 microglia, N_v , V_v , S_v , PSD, synaptic curvature, and width of the synaptic cleft were significantly higher in the electroacupuncture group and nimodipine group than in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Electroacupuncture can promote synaptic remodeling and induce microglial polarization from M1 to M2 in rats with focal cerebral ischemia.

[Keywords] miR-21; signal transducer and activator of transcription 3; electroacupuncture; focal cerebral ischemia

随着社会老龄化进程,脑血管疾病发病率呈逐年攀升态势,其中缺血性脑血管疾病发病率约占 75%^[1]。针灸是治疗脑血管疾病的有效手段,可体现中药的优势和特色,其疗效得到临床认可,研究发现,针刺神庭、百会两穴后可改善缺血再灌注损伤大鼠神经功能、改善记忆和学习能力^[2-3]。突触可塑性指大脑神经元损伤后,突触功能和形态上的改变,是脑神经元可塑性的基础^[4]。在正常生理条件下,小胶质细胞 M1、M2 亚型极化维持动态平衡,以维护神经系统正常功能,但受外界刺激后,小胶质细胞偏向 M1 型极化,从而促进 TNF- α 、IL-1 β 表达,加重中枢神经损伤^[5]。随着 miRNA 的研究,研究发现电针能够激活 miR-21 的表达并影响脑缺血损伤^[6],电针调控 miR-21 可能是其机制之一。转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路是脑缺血引起损伤的重要途径,在脑缺血模型大鼠脑组织中被激活,抑制 STAT3 活性可缓解大鼠脑损伤症状^[7],且电针能影响 STAT3 的表达。因此本研究构建局灶性脑缺血大鼠模型,观察电针对大鼠突触可塑性、小胶质细胞极化的影响,并探讨影响机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 128 只大鼠均购自广州中医药大学实验动物中心[SCXK(粤)2018-0034],在广州中医药大学实验[SYXK(粤)2018-0001],均 7 周龄,体重 220 ~ 250 g,于广州中医药大学实验室饲养,自由饮食饮水,光照周期为 12 h,本研究经三亚

市中医院伦理委员会批准(SYLL-2017-12),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

miR-21 和内参 U6 引物(苏州泓迅生物科技股份有限公司);尼莫地平片(天津市中央药业有限公司,规格:每片 20 mg,国药准字 119004);兔抗鼠 STAT3、兔抗鼠 p-STAT3、兔抗鼠 JAK2、兔抗鼠 p-JAK2、兔抗鼠内参 β -Actin、羊抗兔 IgG-HRP 二抗(上海恒斐生物科技有限公司,货号分别为 K002382P、bs-3429R-1、K001746P、K006248P、K006153P、SE134);Dylight 405 标记山羊抗兔 IgG (H+L)(北京百奥莱博科技有限公司,货号为 YT868);G-6805 型电针仪(上海华谊医用仪器有限公司);无菌针灸针(0.3 mm $\times$ 25 mm)(苏州华佗苏州华佗医疗器械有限公司);HM525 型冷冻切片机(德国 MICROM 公司);ZF-388 型全自动凝胶成像分析系统(深圳三利化学制品有限公司);BSF-30 型荧光显微镜(上海巴拓仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型构建

采用大脑中动脉阻塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)构建大脑中动脉致局灶性脑缺血模型^[8],大鼠用 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,右侧卧位固定,用消毒后的手术剪沿大鼠耳眼连线中点剪开皮肤,分离右侧颈动脉、迷走神经、颈外动脉和颈内动脉,颈外动脉远端用细线双重结扎离断,并在舌和上颌动脉分支近端切断,小切口缝合线插入颈外动脉和颈内动脉残端。通过激光多普勒血流计监控脑血流,当出现至少 70%脑血流减少时纳入

研究对象,闭塞 60 min 建立局灶性脑缺血模型,假手术组只暴露大脑中动脉,不行凝闭。分别模型建立后和治疗 3 周结束后参照 Longa 评分^[9]标准评价大鼠情况;手提大鼠尾巴悬空,无神经功能损伤,两前肢向地面伸直(0 分);轻微神经功能缺损,病灶对侧前肢肘曲,抬高,肘关节伸直,肩内收(1 分);中度局灶性神经功能缺损,伴有瘫痪侧转现象(2 分);重度局灶性神经功能缺损,伴有向病灶对侧跌倒现象(3 分);无自发活动和认知水平下降(4 分)。剔除无症状(0 分)或症状过重(4 分)大鼠,1~3 分说明模型构建成功。0 分说明假手术组大鼠构建成功。

1.3.2 分组及治疗方法

模型制备成功大鼠分为模型组、电针组、尼莫地平组,每组 32 只,假手术组 32 只。模型建立后 2 h 电针组选取神庭、百会两穴,用 0.3 mm×25 mm 的 1 寸毫针直刺神庭穴 0.5 寸,斜刺百会穴 0.5 寸,以 5~10 次/s,强度 3~5 V 的疏密波,时间 30 min 行电针治疗,每天一次;尼莫地平组每天灌胃给药一次(20 mg/kg,2 mL)^[10];假手术组、模型组灌胃给药等体积的生理盐水,连续治疗 3 周。

1.3.3 TTC 染色大鼠脑组织检测大鼠梗死情况

治疗 3 周结束后,各组随机选取 8 只大鼠用 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,手术开胸,暴露心脏,用 37℃生理盐水灌注心脏,手术取经上述操作大鼠脑组织,置于-20℃冰箱中冷冻 0.5 h 后取出,切片(2 mm),避光条件下置于 37℃ 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(TTC)中染色 0.5 h。可见染色后脑未梗死区域呈红色,梗死区域呈白色,用 Image Pro Plus 软件计算每个脑组织的梗死体积。

1.3.4 透射电镜观察脑皮层区突触超微并对形态学计量

治疗结束后,各组随机选取 8 只大鼠用 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,立刻手术开胸,暴露心脏,行左心室主动脉插管,灌入 100 mL 37℃生理盐水,随后用 PBS(含有 2.5%戊二醛和 4%多聚甲醛)灌流 0.5 h。手术取经上述操作大鼠左侧缺血脑皮层(见图 1),部分脑皮层放入 PBS(含有 2%戊二醛和 2%多聚甲醛)溶液中固定 3 h,固定结束后用 PBS 清洗 3 次,4℃条件下用 1%锇酸固定 1 h, PBS 清洗 3 次,梯度乙醇洗脱,丙酮脱水,在含有丙酮的包埋液中渗透 2 h,纯 Epon812 包埋液中渗透 3 h,渗透结束后置于 60℃烘箱中过夜,超薄切片(约 60 nm),将切片至于铜网上(300 目),经柠檬酸铅和

醋酸铀染色,电镜观察突触超微结构并根据 Bertoni-Freddari 等^[11]方格点计数法定量分析面数密度(N_v)、突触体密度(V_v)、突触连接带面密度(S_v)、突触后致密物质(PSD),用生物图像分析仪定量分析突触间隙宽度和突触界面曲面率。

1.3.5 免疫荧光检测脑皮层区小胶质细胞极化情况

部分脑皮层随后将切片平铺至多聚赖氨酸处理后的载玻片上, PBS 清洗 3 次, 60℃烘箱烤片 0.5 h, PBS 清洗 3 次, 室温下在 3%过氧化氢溶液中孵育 10 min, 转移至 5%胎牛血清的湿盒中孵育 0.5 h, 孵育结束后加入兔抗鼠 Iba1、iNOS、Arg1 一抗(1:200), 4℃湿盒内孵育过夜, 滴加 Dylight 405 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(1:200), 37℃孵育 2 h, 使用 DAPI 染核, 封片, 荧光显微镜拍照, 使用 Image J 软件计数阳性细胞数。

1.3.6 qRT-PCR 法检测脑皮层区 miR-21 水平

治疗结束后, 剩余 8 只大鼠脱颈处死, 立刻手术取出脑皮层, 取部分 TRIzol 法提总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书操作行反转录为 cDNA。用 qRT-PCR 仪测定 miR-21 水平, miR-21 上游引物: 5'-GAAATGCCTCACAGCTATCGT-3'; 下游引物: 5'-CCTCCACAAAGAGCCACC-3'。内参 U6 上游引物 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3'; 下游引物: 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'。反应体系(20 μL): 上下游引物各 0.5 μL, 2×Mix 10 μL, cDNA 模板 1 μL, H₂O 8 μL。反应条件设定为: 95℃预变性 5 min, 95℃ 10 s, 62℃ 30 s, 78℃ 30 s, 45 个循环, 72℃延伸 5 min。2^{-ΔΔCT}法对各组 miR-21 水平定量分析。



图 1 大鼠脑皮层
Figure 1 Cerebral cortex of rats

1.3.7 蛋白印迹法测定脑皮层区 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白水平

部分脑皮层区置于含 200 μL 蛋白裂解液的研钵中,充分研磨,离心取上清液,根据 BCA 试剂盒说明书测定总蛋白含量,上样行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 80 V、30 min,分离胶 120 V、60 min 电泳),湿法转膜,室温下 5% BSA 封闭位点 1 h,分别加入兔抗鼠 JAK2、兔抗鼠 p-JAK2、兔抗鼠 STAT3、兔抗鼠 p-STAT3、兔抗鼠内参 β-Actin 抗体(1:1000),4 ℃ 孵育过夜,加入羊抗兔 IgG-HRP 二抗(1:1000),37 ℃ 条件下孵育 1 h 后,ECL 显影、曝光、凝胶成像仪拍照观察并根据灰度值分析蛋白水平。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 22.0 版软件对数据进行统计分析。数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,多组比较行单因素方差分析,任意两组相比行 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 说明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠治疗后神经功能缺损评分

与假手术组相比,模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高(*P*<0.05);与模型组相比,电针组和尼莫地平组大鼠神经功能缺损评分明显降低(*P*<0.05);电针组与尼莫地平组大鼠神经功能缺损评分差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 1。

2.2 各组大鼠脑梗死体积比较

与假手术组相比,模型组大鼠脑梗死体积显著升高(*P*<0.05);与模型组相比,电针组和尼莫地平组大鼠脑梗死体积明显降低(*P*<0.05);电针组与尼莫地平组大鼠脑梗死体积差异无统计学意义(*P*>0.05)。见图 2 和表 2。

2.3 各组大鼠脑皮层区突触超微结构观察和形态学计量分析

模型组突触数目明显减少,神经突起中细胞骨架结构散乱,突触间隙变窄,连接带变短,伴有巨大空泡样,轴浆涨大;电针组可见突触数量增多,神经突起中细胞骨架结构清晰,突触间隙变宽,连接带变长,伴有少量空泡样;尼莫地平组突触超微结构与电针组类似,见图 3。与假手术组相比,模型组大鼠突触 N_v 、 V_v 、 S_v 、PSD、突触界面曲面率、突触间隙宽度明显降低(*P*<0.05);与模型组相比,电针组、尼莫地平组大鼠突触 N_v 、 V_v 、 S_v 、PSD、突触界面曲面率、突触间隙宽度显著升高(*P*<0.05);电针组与尼

莫地平组大鼠突触 N_v 、 V_v 、 S_v 、PSD、突触界面曲面率、突触间隙宽度差异无统计学意义(*P*>0.05),见图 3 和表 3。

2.4 各组大鼠脑皮层区小胶质细胞极化情况比较

与假手术组相比,模型组大鼠脑皮层 M1 小胶质细胞(iNOS)数量显著升高(*P*<0.05),M2 型小胶质细胞(Arg1)数量明显降低(*P*<0.05);与模型组相比,电针组和尼莫地平组 M1 型小胶质细胞数量明显降低(*P*<0.05),M2 型小胶质细胞数量显著升高(*P*<0.05);电针组与尼莫地平组 M1 型小胶质细胞和 M2 型小胶质细胞数量差异无统计学意义(*P*>0.05),见图 4 和表 4。

2.5 各组大鼠脑皮层区 miR-21、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 水平

各组大鼠脑皮层区 STAT3、JAK2 水平无明显变化(*P*>0.05)。与假手术组相比,模型组大鼠脑皮层区 miR-21、p-STAT3、p-JAK2 水平显著升高(*P*<0.05);与模型组相比,电针组和尼莫地平组大鼠脑皮层区 miR-21、p-STAT3、p-JAK2 水平明显降低(*P*<0.05);电针组与尼莫地平组大鼠脑皮层区 miR-21、p-STAT3、p-JAK2 水平差异无统计学意义(*P*>0.05)。见图 5 和表 5。

3 讨论

脑缺血中医论证与虚(气虚、阴虚)、风(外风、肝风)、气(气逆)、火(心火、肝火)、血(血瘀)、痰(湿痰、风痰)六端相关^[12]。针灸作为脑缺血的治疗手段,神庭位于人中心之处,神庭“神处其中则灵,灵则应,应则保身”,可调控人神经系统^[13]。百会为百脉之宗,各经脉之气汇聚之地,可贯达全身,连贯全身周穴,调控机体阴阳平衡^[14]。本研究为选择神庭、百会穴行电针治疗,探究电针对局灶性脑缺血大鼠的影响,MCAO 法构建大脑中动脉致局灶性脑缺血模型,与假手术组相比,模型组大鼠神经

表 1 各组大鼠治疗后神经功能缺损评分($\bar{x} \pm s$, *n* = 32)
Table 1 Score of nerve function defect after treatment in each group

组别 Groups	神经功能缺损评分 Neurological deficit score
假手术组 Sham operation group	0.00±0.00
模型组 Model group	2.35±0.13 ^a
电针组 Electroacupuncture group	1.72±0.10 ^{ab}
尼莫地平组 Nimodipine group	1.73±0.11 ^{ab}

注:与假手术组相比,^a*P*<0.05;与模型组相比,^b*P*<0.05。
Note. Compared with the sham group,^a*P* < 0.05. Compared with the model group,^b*P* < 0.05.



注:A:假手术组;B:模型组;C:电针组;D:尼莫地平组。

图 2 各组大鼠脑梗死情况

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, Electroacupuncture group. D, Nimodipine group.

Figure 2 Cerebral infarction of rats in each group

表 2 各组大鼠脑梗死体积比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Comparison of cerebral infarction volume of rats in each group

组别 Groups	脑梗死体积 (mm ³) Cerebral infarction volume
假手术组 Sham operation group	0.00±0.00
模型组 Model group	65.19±6.83 ^a
电针组 Electroacupuncture group	20.15±3.17 ^{ab}
尼莫地平组 Nimodipine group	19.74±3.91 ^{ab}

注:与假手术组相比,^a*P*<0.05;与模型组相比,^b*P*<0.05。

Note. Compared with the sham group, ^a*P*<0.05. Compared with the model group, ^b*P*<0.05.

表 3 各组大鼠突触形态学计量分析($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Morphological and quantitative analysis of synapses in rats of each group

组别 Groups	面数密度 N _v (piece/μm ³)	突触体密度 V _v (μm ² /μm ³)	突触连接带 面密度 S _v (μm ² /μm ³)	突触后致密 物质 PSD (nm)	突触界面曲面率 Surface rate of synaptic interface	突触间隙宽度 (nm) Width of synaptic space
假手术组 Sham operation group	2.15±0.18	0.12±0.03	0.14±0.02	49.57±3.06	1.25±0.06	25.78±1.29
模型组 Model group	0.48±0.06 ^a	0.04±0.01 ^a	0.04±0.02 ^a	32.18±2.29 ^a	1.06±0.04 ^a	13.57±1.18 ^a
电针组 Electroacupuncture group	1.29±0.14 ^{ab}	0.08±0.02 ^{ab}	0.07±0.03 ^{ab}	39.01±3.18 ^{ab}	1.12±0.03 ^{ab}	18.70±1.24 ^{ab}
尼莫地平组 Nimodipine group	1.26±0.15 ^{ab}	0.08±0.03 ^{ab}	0.07±0.02 ^{ab}	40.02±3.37 ^{ab}	1.13±0.05 ^{ab}	17.69±1.36 ^{ab}

注:与假手术组相比,^a*P*<0.05;与模型组相比,^b*P*<0.05。

Note. Compared with the sham group, ^a*P*<0.05. Compared with the model group, ^b*P*<0.05.

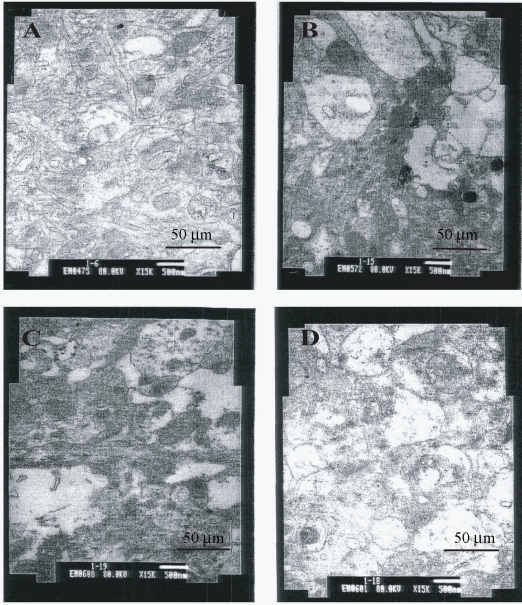
表 4 各组大鼠小胶质细胞数($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Number of microglia in each rat group

组别 Groups	M1 型小胶质细胞 (个/视野) M1 type small keratinocytes (piece/field of vision)	M2 型小胶质细胞 (个/视野) M2 type small keratinocytes (piece/field of vision)
假手术组 Sham operation group	52.74±7.28	150.46±15.73
模型组 Model group	98.48±10.76 ^a	12.06±2.71 ^a
电针组 Electroacupuncture group	22.29±5.14 ^{ab}	50.84±6.22 ^{ab}
尼莫地平组 Nimodipine group	18.25±7.10 ^{ab}	51.49±7.53 ^{ab}

注:与假手术组相比,^a*P*<0.05;与模型组相比,^b*P*<0.05。

Note. Compared with the sham operation group, ^a*P*<0.05. Compared with the model group, ^b*P*<0.05.

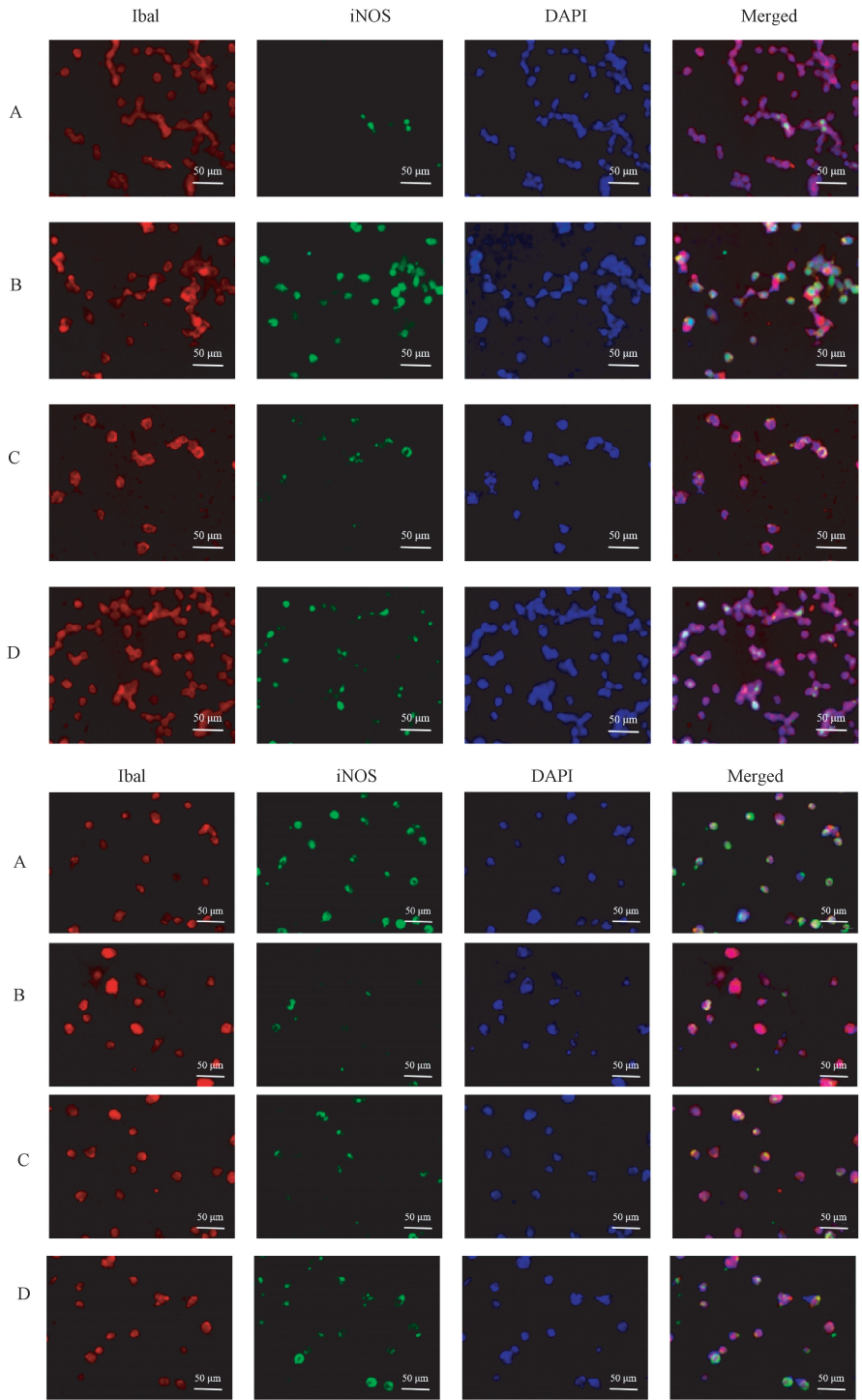


注:A:假手术组;B:模型组;C:电针组;D:尼莫地平组。

图 3 各组大鼠脑皮层区突触超微结构

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, Electroacupuncture group. D, Nimodipine group.

Figure 3 Synaptic ultrastructure of cerebral cortex of rats in each group



注:A:假手术组;B:模型组;C:电针组;D:尼莫地平组。箭头表示阳性细胞。

图 4 各组大鼠脑皮层区小胶质细胞数

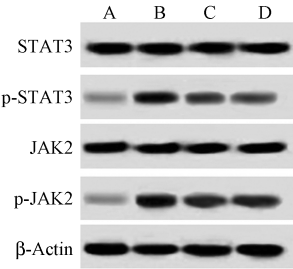
Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, Electroacupuncture group. D, Nimodipine group. Arrows indicate positive cells.

Figure 4 Number of microglia in the cortex of rats in each group

表 5 各组大鼠脑皮层区 miR-21、STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 水平($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Table 5 miR-21, STAT3, p-STAT3, JAK2, and p-JAK2 levels in the cerebral cortex of rats in each group

组别 Groups	miR-21/U6	p-STAT3/STAT3	p-JAK2/JAK2
假手术组 Sham operation group	1.06±0.17	0.24±0.04	0.27±0.04
模型组 Model group	2.46±0.25 ^a	1.25±0.18 ^a	1.30±0.14 ^a
电针组 Electroacupuncture group	1.71±0.19 ^{ab}	0.81±0.09 ^{ab}	0.76±0.09 ^{ab}
尼莫地平组 Nimodipine group	1.72±0.21 ^{ab}	0.77±0.08 ^{ab}	0.77±0.08 ^{ab}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。
Note. Compared with the sham group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$.



注:A:假手术组;B:模型组;C:电针组;D:尼莫地平组。
图 5 各组大鼠脑皮层区 STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 水平
Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, Electroacupuncture group. D, Nimodipine group.
Figure 5 STAT3, p-STAT3, JAK2 and p-Jak2 levels in the cerebral cortex of rats in each group

功能缺损评分、脑梗死体积显著升高,提示模型构建后神经功能损伤严重。与模型组相比,经电针后,大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积明显降低,说明电针能够缓解局灶性脑缺血大鼠脑损伤,具有一定临床应用价值。

大脑皮层神经网络作为自组织、信息处理、行为适应的复杂系统由大量的神经元组成,正常情况下神经元的兴奋性和抑制性突触可塑性处于平衡状态,维持大脑信息生成和传递效率,但在脑缺血后出现兴奋性氨基酸毒性作用,导致突触可塑性发生改变^[15-16]。本研究发现,与假手术组相比,模型组大鼠脑组织突触数目明显减少、间隙变窄、连接带变短,神经突起中细胞骨架结构散乱,伴有巨大空泡样,轴浆涨大, N_v 、 V_v 、 S_v 、PSD、突触界面曲面率、突触间隙宽度明显降低,说明模型组大鼠突触形态和结构改变。经电针治疗后,大鼠脑组织突触数量增多、间隙变宽、连接带变长,神经突起中细胞骨架结构清晰,突触 N_v 、 V_v 、 S_v 、PSD、突触界面曲面率、突触间隙宽度显著升高,说明电针治疗可保护突触可塑性,恢复突触界面曲面率,可能对于自组织、信息处理、行为适应有缓解作用。小胶质细胞对于促进突触发育、维持突触正常功能和突触可塑性具有调节作用,脑缺血后会导致小胶质极化,小

胶质与神经元接触时间延长,导致部分突触结构消失,缺血早期梗死区向 M2 型极化;随着病情的严重向 M1 型极化,而 M1 型主导炎症反应,从而过表达 CD86、MHC II、iNOS、Fc γ 受体,可分泌炎症介质以加重中枢神经细胞炎症反应,导致脑组织受损^[17]。本研究发现,与假手术组相比,模型组大鼠海马区 M1 型小胶质细胞数量显著升高, M2 型小胶质细胞数量明显降低,提示该研究中脑缺血已处于严重时期,小胶质细胞向 M1 型极化严重,而 M1 型主导炎症反应,加重脑损伤。经治疗后小胶质细胞可向 M2 亚型极化,从而过表达 CD206、Arg1 以分泌保护因子清除参与中枢神经免疫、修复,同时可清除中枢代谢废物,实现对神经的保护^[18]。本研究同样证明,经电针治疗后,大鼠 M1 型小胶质细胞数量明显降低, M2 型小胶质细胞数量显著升高,说明电针可改善小胶质细胞极化失衡,恢复神经功能。但是电针通过何种信号通路以保护突触可塑性和维持胶质细胞极化平衡有待进一步研究。

本研究发现,与假手术组相比,miR-21 水平和 STAT3、JAK2 磷酸化水平显著升高,说明脑缺血大鼠脑皮层区 miR-21/JAK2/STAT3 通路被激活。在脑缺血大鼠脑皮层区 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)高度活化可诱导 JAK2 磷酸化,从而促使 STAT3 磷酸化参与调节破坏突触可塑性^[19]。miR-21 可能调控多基因、多环路表达紊乱,可影响一系列调控失常的精神分裂结构网络,STAT3 可参与神经细胞炎症反应,以加重中枢神经损伤;miR-21 其中通过别的通路调控 STAT3 信号通路在精神分裂症大鼠脑组织中处于激活状态影响疾病^[20]。经电针治疗后,大鼠脑皮层区 miR-21 水平和 STAT3、JAK2 磷酸化水平明显降低,说明电针可抑制 miR-21/JAK2/STAT3 通路活性。

综上所述,局灶性脑缺血大鼠行神庭、百会穴电针治疗可保护突触可塑性和维持胶质细胞极化平衡,可能与抑制 miR-21/JAK2/STAT3 通路活性相关。但是具体调控机制还有待深入研究。

参考文献:

- [1] 王平平, 高利, 罗玉敏, 等. 缺血性脑血管病复发风险生物学指标的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(8): 1176-1179.
- [2] 高静, 赖名殷, 秦玮珣, 等. 针刺对宫内窘迫缺血缺氧脑损伤新生大鼠行为学及海马神经元自噬的影响 [J]. 针刺研究, 2020, 45(4): 275-280, 324.
- [3] 黄金, 李瑞青, 吴明莉, 等. 电针神庭、百会穴对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及自噬相关蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(4): 838-841, 1041.
- [4] Niu HM, Ma DL, Wang MY, et al. Epimedium flavonoids protect neurons and synapses in the brain via activating NRG1/ErbB4 and BDNF/Fyn signaling pathways in a chronic cerebral hypoperfusion rat model [J]. Brain Res Bull, 2020, 162: 132-140.
- [5] Drummond RA, Swamydas M, Oikonomou V, et al. CARD9⁺ microglia promote antifungal immunity via IL-1 β and CXCL1-mediated neutrophil recruitment [J]. Nat Immunol, 2019, 20(5): 559-570.
- [6] 于涛, 钱鑫, 赵家莹, 等. 电针对 miR-21 阻滞剂介入的局灶性脑缺血模型大鼠海马细胞凋亡及 Bel-2、c-fos 水平的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(2): 263-266, 383.
- [7] Cao Y, Wang L, Lin LT, et al. Acupuncture attenuates cognitive deficits through α 7nAChR mediated anti-inflammatory pathway in chronic cerebral hypoperfusion rats [J]. Life Sci, 2021, 266(1): 118732.
- [8] 褚冬, 马艳梅, 郭永真, 等. 高血糖对大鼠局灶性脑缺血再灌注时小胶质细胞活化的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2017, 42(12): 1066-1071.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle artery occlusion without craniectomy [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] 李艳, 宋亚刚, 苗明三, 等. 月季花总黄酮对局灶性脑缺血再灌注模型大鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 64-70.
- [11] Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, et al. Morphological alterations of synaptic mitochondria during aging [J]. Ann N Y Acad Sci, 1994, 717: 137-149.
- [12] 中国中西医结合学会急救医学专业委员会. 中国急性缺血性脑卒中西医结合急诊诊治专家共识 [J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30(3): 193-197.
- [13] 吴威, 刘娜, 崔艳. 头颈部穴位针灸治疗对短暂性脑缺血发作患者 MRI FLAIR 序列高信号血管征及预后的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(7): 760-763.
- [14] 金昊, 柳维林, 林冰冰, 等. 电针百会、神庭穴对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及海马 5-羟色胺 1A 受体表达的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(10): 1145-1151.
- [15] Hurst K, Badgley C, Ellsworth T, et al. A putative lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates hippocampal synaptic plasticity [J]. Hippocampus, 2017, 27(9): 985-998.
- [16] 宋加兴, 张清秀, 何磊, 等. 美金刚通过调节 ERK、CREB 信号通路及突触可塑性保护脑缺血再灌注小鼠的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 1-7.
- [17] Segawa R, Shigeeda K, Hatayama T, et al. EGFR transactivation is involved in TNF- α -induced expression of thymic stromal lymphopoietin in human keratinocyte cell line [J]. J Dermatol Sci, 2018, 89(3): 290-298.
- [18] 谢璐霜, 吴巧凤, 唐勇, 等. 电针对阿尔兹海默病大鼠海马区 M2 型小胶质细胞极化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 1816-1820.
- [19] Yuan J, Zeng L, Sun Y, et al. SH2B1 protects against OGD/R-induced apoptosis in PC12 cells via activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. 2018, 18(3): 2613-2620.
- [20] 张守亮, 杨廷桐. miR-21/stat3 信号通路表达异常在大鼠精神分裂症发生中的意义 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(6): 475-477.

[收稿日期] 2020-08-26