

本文引用: 黄慧源, 易丽贞, 黄麟苻, 陈瑞雪, 绽 晟, 岳增辉. 电针调控小胶质细胞极化抑制脑卒中肢体痉挛大鼠脑皮质炎症反应的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2256-2263.

电针调控小胶质细胞极化抑制脑卒中肢体痉挛 大鼠脑皮质炎症反应的研究

黄慧源, 易丽贞, 黄麟苻, 陈瑞雪, 绽 晟, 岳增辉*

湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南 长沙 410208

〔摘要〕 目的 观察电针阳陵泉、曲池对脑卒中肢体痉挛(post-stroke spasticity, PSS)大鼠脑皮质中小胶质细胞极化及炎症因子的影响,探讨电针缓解PSS的可能机制。方法 采用改良大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)线栓法+内囊注射N-甲基-D-天冬氨酸(N-Methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体法制备PSS模型。随机抽取10只大鼠作为假手术组,剩余大鼠造模成功后选20只再随机分为模型组和电针组,每组10只。电针组干预患侧阳陵泉、曲池,每天治疗1次,每次30 min,连续治疗7 d;假手术组和模型组仅进行同条件固定,不作其他干预。通过神经功能缺损评分、电生理描记法评估电针对PSS大鼠的治疗效果;免疫荧光染色法观察大鼠缺血侧脑皮质小胶质细胞标志物离子钙结合衔接分子-1(ionized calcium binding adapter molecule-1, Iba-1)、M1型标志物白细胞分化抗原16(cluster of differentiation 16, CD16)、M2型标志物白细胞分化抗原206(cluster of differentiation 206, CD206)的阳性表达;ELISA法和qPCR法检测大鼠缺血侧脑皮质中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的含量和mRNA表达情况。结果 与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分明显升高($P<0.01$),间接肌张力明显下降($P<0.01$),Iba-1和CD16阳性荧光强度表达显著增加($P<0.01$),CD206阳性荧光强度表达显著下降($P<0.01$),IL-6、IL-1 β 含量及mRNA表达明显上升($P<0.01$),TGF- β 含量和mRNA表达明显下降($P<0.01$)。治疗后与模型组比较,电针组大鼠神经功能缺损评分降低($P<0.05$),间接肌张力明显上升($P<0.01$),Iba-1阳性荧光强度表达减少($P<0.05$),CD16阳性荧光强度表达明显下降($P<0.01$),CD206阳性荧光强度表达显著上升($P<0.01$),IL-6含量及mRNA的表达下降($P<0.05$),IL-1 β 含量及mRNA表达明显下降($P<0.01$),TGF- β 含量和mRNA表达明显上升($P<0.01$)。结论 电针阳陵泉、曲池能够有效改善PSS大鼠神经功能损伤、降低肌张力、缓解痉挛症状,其机制可能与抑制小胶质细胞激活、调控小胶质细胞由M1向M2极化、缓解神经炎症有关。

〔关键词〕 脑卒中; 肢体痉挛; 电针; 阳陵泉; 曲池; 小胶质细胞; 炎症反应

〔中图分类号〕R245

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.12.016

Electroacupuncture regulates microglia polarization to inhibit inflammatory response in cerebral cortex of rats with post-stroke spasticity

HUANG Huiyuan, YI Lizhen, HUANG Linxing, CHEN Ruixue, ZHAN Sheng, YUE Zenghui*

School of Acupuncture-moxibustion, Tuina, and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine,

Changsha, Hunan 410208, China

〔收稿日期〕2023-09-11

〔基金项目〕国家自然科学基金面上项目(81673886);湖南省自然科学基金面上项目(2023JJ30462);湖南省研究生科研创新项目(CX20220797);湖南中医药大学研究生科研创新项目(2022CX19, 2022CX110, 2023CX78)。

〔第一作者〕黄慧源,女,硕士研究生,研究方向:针灸治病临床与机制研究。

〔通信作者〕*岳增辉,男,博士,教授,博士研究生导师, E-mail:624755064@qq.com。

[Abstract] Objective To observe the effects of electroacupuncture at "Yanglingquan" (GB34) and "Quchi" (LI11) on microglia polarization and inflammatory factors in the cerebral cortex of rats with post-stroke spasticity (PSS), so as to explore the possible mechanism of electroacupuncture in alleviating PSS. **Methods** A PSS model was prepared by the modified middle cerebral artery occlusion (MCAO) suture method + internal capsule injection of N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor. Ten rats were randomly selected as the sham-operated group. After successful modeling, 20 rats were selected and randomly subdivided into model group and electroacupuncture group, with 10 rats in each group. The electroacupuncture group was intervened with electroacupuncture at "Yanglingquan" (GB34) and "Quchi" (LI11) on the affected side, once a day, 30 min each time, for 7 consecutive days, while the sham-operated group and the model group were only fixed under the same conditions without any other intervention. The therapeutic effects of electroacupuncture on PSS rats were evaluated through neurological deficit score and electrophysiological tracing; immunofluorescence staining was used to observe the positive expressions of microglia marker ionized calcium binding adapter molecule-1 (Iba-1), M1 phenotype marker cluster of differentiation 16 (CD16), and M2 phenotype marker cluster of differentiation 206 (CD206) in ischemic cerebral cortex of rats; ELISA and qPCR were used to determine the content and mRNA expressions of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), and transforming growth factor- β (TGF- β) in the ischemic cerebral cortex of rats. **Results** Compared with the sham-operated group, the neurological deficit score of the model group significantly increased ($P<0.01$), the indirect muscle tone markedly decreased ($P<0.01$), the expressions of Iba-1 and CD16 positive fluorescence intensity significantly elevated ($P<0.01$), the expression of CD206 positive fluorescence intensity significantly declined ($P<0.01$), the content and mRNA expressions of IL-6 and IL-1 β were significantly higher ($P<0.01$), and the content and mRNA expression of TGF- β were obviously lower ($P<0.01$). After treatment, compared with the model group, the neurological deficit score of electroacupuncture group decreased ($P<0.05$), the indirect muscle tone significantly increased ($P<0.01$), Iba-1 positive fluorescence intensity expression declined ($P<0.05$), CD16 positive fluorescence intensity expression was obviously lower ($P<0.01$), CD206 positive fluorescence intensity expression markedly elevated ($P<0.01$), the content and mRNA expressions of IL-6 and IL-1 β decreased ($P<0.05$), TGF- β content and mRNA expression increased obviously ($P<0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture at "Yanglingquan" (GB34) and "Quchi" (LI11) can effectively reduce neurological impairment, decrease muscle tone, and alleviate spastic symptoms in PSS rats. The mechanism may be related to inhibiting the activation of microglia, regulating microglia polarization from M1 to M2, and alleviating neuroinflammation.

[Keywords] stroke; limb spasticity; electroacupuncture; "Yanglingquan" (GB34); "Quchi" (LI11); microglia; inflammatory response

脑卒中肢体痉挛(post-stroke spasticity, PSS)是脑卒中后最常见的并发症之一。研究显示,脑卒中发生3周后肢体痉挛的发生率可达40%以上,主要表现为肌张力增高、肢体疼痛、僵硬、干扰正常运动模式等^[1]。PSS是中风患者致残的重要原因之一,不仅增加患者家庭的医疗支出,更影响患者重返社会的活动质量,已成为亟待解决的社会问题^[2]。现代医学认为,脑卒中发生后,伴随脑血流量和供氧量的不足,可引发脑缺血级联反应,释放大量炎症因子,进而损伤神经功能,导致PSS发生^[3-4]。课题组前期研究证明,电针治疗脑卒中后肢体痉挛疗效确切,能够有效改善神经功能损伤、降低肌张力、促进运动功能恢复^[5-6]。相关研究显示,针刺能通过下调肿瘤坏死

因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和C反应蛋白(C-reaction protein, CRP)等炎症因子来缓解卒中后痉挛状态,说明抑制炎症反应是针刺缓解PSS的重要机制之一^[7-8]。但这些研究仅局限于针刺对炎症因子表达的调控,缺乏明确的作用靶标。因此,电针抑制炎症反应来缓解PSS的机制仍需进一步探索。

研究发现,炎症反应存在于缺血性中风的几乎所有阶段,小胶质细胞(microglia, MG)介导的神经炎症是缺血性中风的典型病理标志^[9]。当缺血性脑损伤发生后,脑内静息的MG依靠精细侧枝感知到微环境变化,被迅速激活,形态上变为胞体较大、突起变短、细胞呈圆形或杆状的“阿米巴状”^[10]。离子钙结合

衔接分子-1(ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba-1)表达于所有分型的 MG,可作为 MG 的直接标志物,用于检测和定位小胶质细胞的存在。在脑缺血、缺氧的刺激下,激活的 MG 被极化形成 M1、M2 两种表型;促炎 M1 型不仅会释放 IL-6、TNF- α 、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等促炎因子,还会改变血脑屏障通透性、诱导兴奋性神经毒性,进而造成中枢神经系统损伤;而抗炎 M2 型则通过释放白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等抗炎因子和神经营养因子,发挥抑制炎症、保护神经元的积极作用^[11-12]。因此,如何通过对 MG 的调控作用,抑制 MG 的激活,促进 MG 由 M1 型向 M2 型极化来减轻炎症反应,成为缓解 PSS 的重要方向。

本实验通过观察电针对 PSS 大鼠 MG 标志物 Iba-1、M1 型标志物白细胞分化抗原 16(cluster of differentiation 16, CD16)、M2 型标志物白细胞分化抗原 206(cluster of differentiation 206, CD206)阳性荧光强度的影响,以及炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TGF- β 含量和 mRNA 的表达变化,探讨电针缓解 PSS 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

由湖南中医药大学动物实验中心提供的 SPF 级健康成年雄性大鼠共计 48 只,体质量(280 \pm 20) g,动物许可证号 SCXK(湘)2019-0004。大鼠适应性喂养 7 d,室温(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度 50% \pm 10%,自由进食、饮水,规律更换垫料及笼具消毒。随机抽取 10 只大鼠作为假手术组,剩余大鼠进行造模,最终造模成功大鼠 20 只,再随机分为模型组和电针组,每组 10 只。本实验通过了湖南中医药大学动物实验伦理审查(批号:LL2022031601)。

1.2 主要试剂与仪器

Triton X-100(北京索莱宝科技有限公司,批号:T8200);DAPI 染液(武汉皮诺飞生物科技有限公司,货号:PN0015);Iba-1 抗体、CD16 抗体、CD206 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:10904-1-AP、16559-1-AP、18704-1-AP);IL-6、IL-1 β 、TGF- β ELISA 试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司,货号:YD-30219, YD-30206, YD-31072);TRIZOL(美

国 Invitrogen 公司,货号:10296028);NMDA 受体(美国 sigma 公司,型号:M3262);戊巴比妥钠(Merck KGaA 默克公司,货号:P3761);MACO 线栓(北京西浓科技有限公司,货号:A43040)。

大鼠脑立体定位仪(上海玉研科学仪器有限公司,型号:SA-150);牙科钻(南京金恒川电子有限公司,型号:MF4G);华佗牌一次性无菌针灸针、电针仪(苏州医疗用品厂,型号:0.25 mm \times 25 mm、SDZ-V);分光光度计(美国 THERMO 公司,型号:Nanodrop lite);荧光定量 PCR 仪(美国 Applied biosystems 公司,型号:StepOne Software)。

1.3 造模方法及成模标准

参考课题组前期研究的造模方法^[13],应用改良大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)线栓法+内囊注射 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)受体法制备脑卒中肢体痉挛大鼠模型。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g)麻醉大鼠,仰卧位固定,备皮。颈部触及甲状软骨,在其稍偏右侧切开 2 cm,暴露大鼠右侧颈总动脉(right common carotid artery, RCCA)、颈内动脉(right internal carotid artery, RICA)、颈外动脉(right external carotid artery, RECA)视野并钝性分离,将 RCCA 远心端、RECA 近心端进行结扎,动脉夹夹闭 RICA。在 RCCA 上用眼科剪在距离 RCCA 分叉膨大 5 mm 处剪一小口,从此口插入线栓至 RICA 内,松开动脉夹,插入深度 18~20 mm,在感到稍有阻力后不再继续插入。随后在 RCCA 下穿线备用,结扎固定线栓与血管。常规缝合、消毒,术后腹腔注射速尿(0.1 mg/kg),避免脑水肿。第 2 天对 MCAO 大鼠进行 Zea Longa 神经功能缺损评分,1~3 分大鼠行内囊注射 NMDA 受体法^[14]。麻醉 MCAO 大鼠,俯卧位固定于大鼠脑立体定位仪,消毒备皮,于颅顶矢状缝纵行切口 2 cm,止血钳两侧拉开,暴露前囟、右侧顶骨和额骨交界骨缝视野。内囊定位参考《大鼠立体定位图谱》^[15],在前囟后 1.4 mm、矢状缝右侧 2.4 mm 做一标记,此处用牙科钻钻 2 mm 小孔,微量注射器垂直插入 7 mm,在 5 min 内缓慢注射 5 μ L NMDA。注射完成后等待 5 min 再取出注射器,压迫止血、常规缝合、聚维酮碘消毒。术后注射速尿,防止脑水肿。予葡萄糖水及饲料,灯照保暖。大鼠苏醒后,Zea Longa 评分为 1~3 分,电生理描记张

力信号数值为 0~1 g,则视为造模成功。假手术组仅进行钝性分离,不结扎不插线栓,第 2 天内囊注射 0.9%氯化钠溶液。

1.4 干预方法

从造模成功后的第 1 天开始,选择患侧(左侧肢体)的阳陵泉和曲池进行电针治疗,穴位定位参考《实验动物常用穴位名称与定位》^[16]。阳陵泉位于大鼠腓骨小头下侧距离足三里外侧 5 mm 处,直径约 3 mm。曲池位于大鼠桡骨近端关节外侧前方的凹陷中,直径约 3 mm。治疗时将大鼠固定在实验台上,使用华佗牌 0.25 mm×25 mm 毫针对大鼠患侧阳陵泉、曲池进行针刺,随后进行 1 min 的行针手法刺激(左右捻转 180°,平补平泻,频率 80 次/min)。再使用电针仪将两个穴位上的针灸针连接同一组电极,正极接在患侧阳陵泉穴毫针针柄,负极接在同侧曲池穴毫针针柄,设置频率为 80 Hz、电压为 30 V,治疗强度以大鼠肢体轻微抖动为度。每次治疗时长为 30 min,每天 1 次,连续治疗 7 d。假手术组和模型组在同等条件下仅进行抓取固定,不进行电针干预。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 Zea Longa 神经功能缺损评分 分别于治疗前后对大鼠进行 Zea Longa 神经功能缺损评分^[17]。提尾双上肢自然伸展,计 0 分(无神经损伤);提尾对侧前肢内收屈曲,计 1 分(轻度神经损伤);爬行时向对侧旋转,计 2 分(中度神经损伤);站立或爬行时向对侧倾倒,计 3 分(重度神经损伤);无自主活动无意识,计 4 分。评分与动物神经缺损程度成正相关。

1.5.2 电生理描记法检测大鼠患侧间接肌张力 分别于治疗前后使用 BL-420F 生物机能系统检测大鼠间接肌张力。每组随机选取 6 只大鼠轻度麻醉,两根电极分别插入大鼠患侧(左后肢)股四头肌和尾部,一根棉线系在大鼠左后肢下端,棉线另一端经过张力传感器与 BL-420F 生物机能系统相连,给予 0.5 g 后负荷,刺激量为 3 mA,持续时间 30 s。通过 BL-420F 左后肢股四头肌产生的电信号,可以反映大鼠间接肌张力,描记数值大小与大鼠肌张力成反相关。

1.5.3 免疫荧光染色法检测大鼠缺血侧脑皮质小胶质细胞的表达 运用免疫荧光染色法检测大鼠缺血侧脑皮质内 MG 标记物(Iba-1)、M1 标记物(CD16)、

M2 标记物(CD206)的表达。大鼠治疗第 7 天,电生理检测结束后腹腔麻醉处死大鼠。每组随机选取 3 只大鼠,心脏灌注生理盐水和 4%多聚甲醛各 250 mL,在冰台上断头取脑,分离缺血侧皮质,常规固定、脱水、包埋,5 μm 厚度切片。取冰冻组织切片,置室温冷却干燥,PBS 洗涤 5 min×3 次;3%过氧化氢溶液封闭 10 min,PBS 洗涤 5 min×3 次;加入 0.5% Triton X-100 通透液室温放置 10 min,PBS 漂洗;滴加山羊血清室温封闭 30 min;在 37 °C 条件下加入一抗 Iba-1 (1:500)、CD16(1:300)、CD206(1:300)孵育 2 h、加入荧光二抗孵育 1 h、加入 TSA-570 孵育 30 min,PBS 洗涤 5 min×3 次;避光加入 DAPI 核染 5 min,PBS 洗涤 5 min×3 次,封片,4 °C 避光保存。使用荧光显微镜进行观察拍照,每只大鼠随机观察 3 张切片,每张切片随机观察 3 个视野(×400 倍),用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析各视野面荧光平均密度值。

1.5.4 ELISA 法检测大鼠缺血侧脑皮质炎症因子含量 运用 ELISA 法检测大鼠缺血侧脑皮质炎症因子 IL-6、IL-1β、TGF-β 的含量。大鼠治疗第 7 天电生理检测结束后,麻醉后断头处死各组剩余大鼠,在冰台上快速取出大脑,分离缺血侧皮质,分装于冻存管内,在-80 °C 冰箱保存。取 50 mg 冻存皮质组织匀浆,严格按照试剂盒说明书操作,采用酶标仪在 450 nm 波长处测量样本的吸光度值。

1.5.5 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠缺血侧皮质区炎症因子的 mRNA 表达 每组随机挑选 3 只大鼠取适量皮质组织研磨粉碎,加入裂解液,按照试剂盒说明分离纯化总 RNA,逆转录为 cDNA 后使用荧光定量 PCR 仪进行实时 PCR 扩增。循环后以 β-actin 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 IL-6、IL-1β、TGF-β 的 mRNA 相对表达量。引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成,引物序列详见表 1。

表 1 各基因 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'~3')	长度/bp
IL-6	正向: TGAGAAAAGACTTGTGCAAT	127
	反向: TTGTTTTCTGACAGTGCAT	
IL-1β	正向: TGAAATAGCAGCTTTCGACAGT	119
	反向: AGATTGAAGCTGGATGCTCT	
TGF-β	正向: ACTACGCCAAAGAAGTCACC	132
	反向: ACTGCTTCCCGAATGTCTG	
β-actin	正向: CTGAACGTGAAATTGTCGGAGA	148
	反向: TTGCCAATGGTGATGACCTG	

1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行分析处理。所有数据进行正态性和方差齐性检验,符合正态性分布的数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,不符合正态分布的资料用“M(QR)”来描述。组间比较满足正态性者,采用单因素方差分析,方差齐时选择 LSD 法,方差不齐采用 Tamhane's T2 法,非正态分布采用秩和检验。均以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 Zea Longa 神经功能缺损评分比较

治疗前,假手术组大鼠正常活动,未出现神经功能缺损情况;与假手术组比较,另外两组大鼠 Zea Longa 评分均升高($P<0.01$),提示造模成功;且模型组与电针组大鼠之间评分差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后,与假手术组相比,模型组大鼠 Zea Longa 评分仍升高明显($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠神经功能缺损评分降低($P<0.05$);且电针组评分治疗后较治疗前显著降低($P<0.01$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠治疗前后 Zea Longa 神经功能缺损评分比较[M(QR), $n=10$, 分]

组别	治疗前	治疗后
假手术组	0(0)	0(0)
模型组	3.0(1)**	2.5(1)**
电针组	3.0(1)**	1.0(1) ^{#△△}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与治疗前比较,^{△△} $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠间接肌张力比较

治疗前,与假手术组对比,其余两组电生理所测的间接肌张力数值明显降低($P<0.01$),证明模型制备成功;且模型组与电针组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后,模型组间接肌张力数值相比假手术组仍下降明显($P<0.01$);但电针组间接肌张力数值较模型组明显升高($P<0.01$);且电针组治疗后数值比治疗前显著升高($P<0.01$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠治疗前后间接肌张力比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$, g)

组别	治疗前	治疗后
假手术组	2.612±0.595	2.713±0.559
模型组	0.427±0.163**	0.517±0.085**
电针组	0.342±0.142**	1.122±0.228 ^{#△△}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与治疗前比较,^{△△} $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠缺血侧脑皮质 Iba-1、CD16、CD206 阳性表达比较

与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧大脑皮质中 Iba-1、CD16 平均荧光强度表达上升($P<0.01$),CD206 平均荧光强度表达下降($P<0.01$)。与模型组相比,电针组大鼠缺血侧大脑皮质中 Iba-1、CD16 平均荧光强度表达下降($P<0.05$, $P<0.01$),CD206 平均荧光强度表达上升($P<0.01$)。详见图 1。

2.4 各组大鼠缺血侧脑皮质炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TGF- β 含量及 mRNA 比较

与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧大脑皮质中 IL-6、IL-1 β 含量及 mRNA 表达显著上升($P<0.01$),TGF- β 含量及 mRNA 表达显著下降($P<0.01$);与模型组相比,电针组大鼠缺血侧大脑皮质中 IL-6、IL-1 β 含量及 mRNA 表达显著下降($P<0.05$, $P<0.01$),TGF- β 含量及 mRNA 表达显著上升($P<0.01$)。详见表 4—5。

表 4 各组大鼠缺血侧脑皮质 IL-6、IL-1 β 、TGF- β 含量比较($\bar{x}\pm s$, $n=7$, pg/g)

组别	IL-6	IL-1 β	TGF- β
假手术组	549.31±31.74	263.61±32.43	4 018.93±137.03
模型组	1414.40±96.69**	621.47±18.83**	2 366.11±175.03**
电针组	925.47±47.61 [#]	430.11±9.58 [#]	3 095.76±119.40 [#]

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

表 5 各组大鼠大脑皮质 IL-6、IL-1 β 、TGF- β 的 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	IL-6	IL-1 β	TGF- β
假手术组	1.061±0.053	1.001±0.040	1.000±0.008
模型组	4.012±0.684**	1.963±0.183**	0.516±0.058**
电针组	2.944±0.126 [#]	1.369±0.048 [#]	0.787±0.016 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

3 讨论

脑卒中肢体痉挛,属于中医学“筋病”“痉病”“偏枯”范畴,病位在经筋,为脑源性神经系统病变之一。《针灸聚英·百症赋》中记载:“半身不遂,阳陵泉远达曲池。”^[18]当代国医大师吕景山提出“对穴”理论,认为阳陵泉、曲池二穴配伍能有效促进中风后肢体功能恢复^[19]。阳陵泉和曲池分别为手阳明大肠经和足少阳胆经的合穴,“合主逆气而泄”,针刺曲池能够摄纳阳明气血,发挥行气活血通络之效,针刺筋会之阳

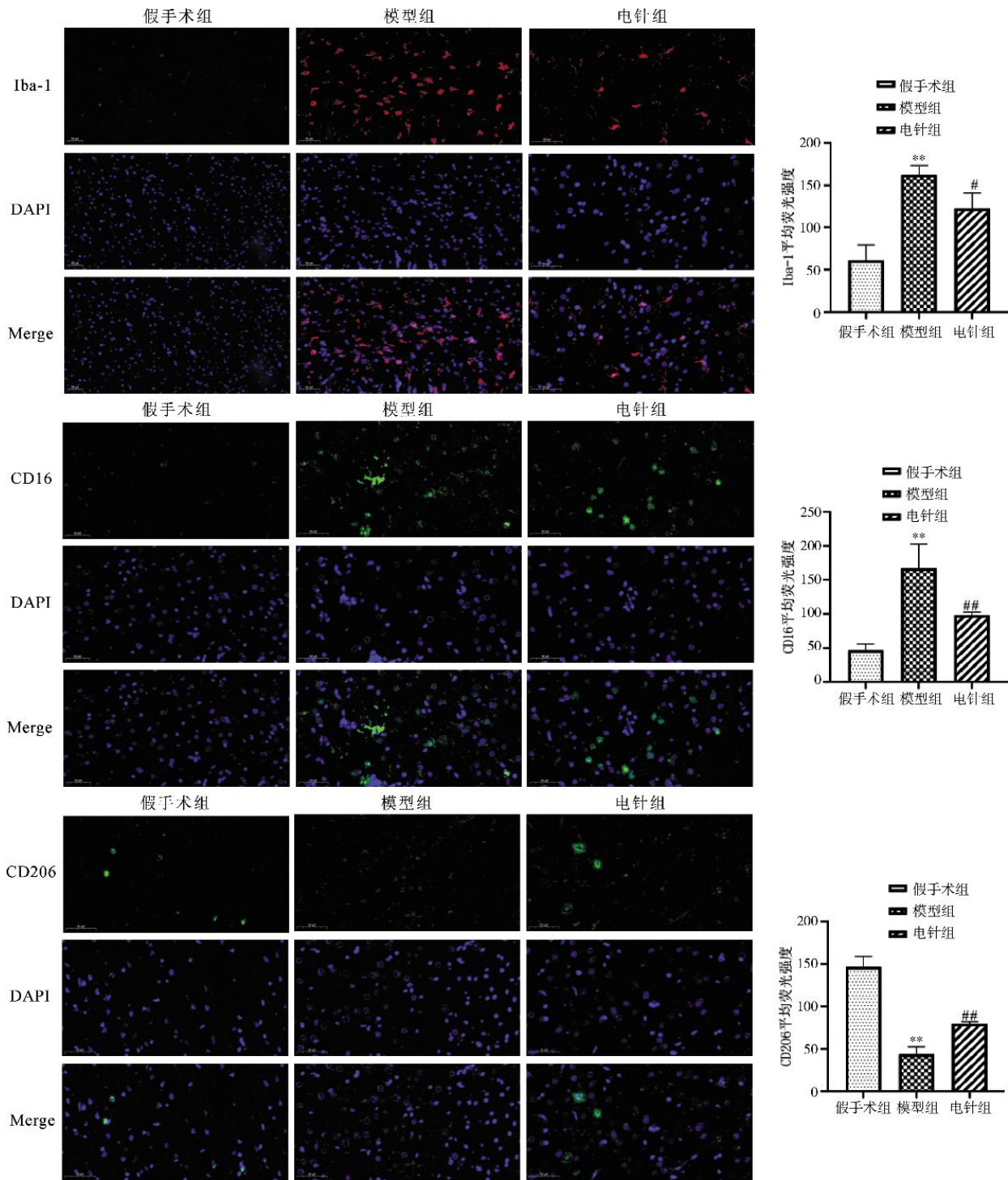


图1 各组大鼠缺血侧皮质区小胶质细胞 Iba-1、CD16、CD206 表达比较(免疫荧光,标尺=50 μm, $\bar{x} \pm s, n=3$)

注:红色为小胶质细胞标记物 Iba-1 的阳性表达染色,绿色是 M1 型小胶质细胞标记物 CD16、M2 型小胶质细胞标记物 CD206 的阳性表达染色,蓝色为细胞核染色。与假手术组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, * $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

陵泉能够平抑肝阳、舒筋活络,是治疗全身筋病、手足拘挛的重要穴位。两穴上下相配为用,共奏平肝潜阳、舒筋利节之功。课题组前期研究已证明,电针此两穴对缓解卒中后痉挛状态效果明显^[20-21]。针刺作为一种外周神经刺激疗法,在镇痛、抗炎、免疫调节等方面发挥重要作用;电针集电生理刺激和针刺效应为一体,可通过减轻炎症反应来改善神经功能

损伤和运动障碍^[22-23]。相关研究显示,对炎症模型小鼠的阳陵泉和曲池进行针刺,能够明显下调 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子,减轻炎症反应,这可能与这两个穴位附近的感受器和自由神经末梢敏感点十分丰富有关,针灸通过对其机械刺激,发挥免疫抑制作用^[24]。在缺血性脑卒中发生后,中断的脑血流消耗大脑的氧气和葡萄糖,会引发上位运动神经元炎症,最终导

致严重的神经功能障碍^[25]。相关研究表明,PSS患者体内表现出更高水平的炎症因子,如IL-6、IL-1 β 和TNF- α ,可见PSS与炎症参数水平密切相关^[3]。因此,电针阳陵泉、曲池能够疏风通络、清火散结,通过电针刺激此两穴附近的多态感受器,可发挥免疫抗炎效应,降低机体炎症水平,以促进PSS患者肢体运动功能恢复。

MG是炎症反应的关键调控者,MG作为脑内常驻免疫细胞,是中枢神经系统内的首道免疫防线,在监测和干预神经元水平活动中发挥着重要作用^[26-27]。生理条件下,MG表现为“分枝形”的静息状态,维持中枢神经系统平稳运行;而在脑缺血发生后,受损脑组织开始释放损伤相关模式分子(damage associated molecular patterns, DAMPs),MG被迅速激活,其形态、功能和基因表达上都发生急剧变化,随后被极化为促炎型M1和抗炎型M2两种表型,发挥神经保护和神经损害的“双刃剑”作用^[28]。M1诱导一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IL-6、干扰素(interferon- γ , IFN- γ)等促炎介质加重炎症反应,发挥神经毒性作用加重脑损伤;M2通过释放IL-4、IL-10、TGF- β 等细胞因子抑制炎症反应,促进损伤脑组织的修复,发挥神经保护作用^[13,29]。针刺干预MG效应明显,能够抑制MCAO大鼠缺血半暗带区MG的变性和坏死,通过下调MG标志物Iba-1的表达、降低促炎因子TNF- α 和IL-1 β 分泌来缓解神经炎症^[30];通过对脑缺血再灌注小鼠的“承浆”“水沟”电针干预,除可降低促炎因子分泌水平外,还能促进MG向M2型极化,增加M2标志物精氨酸酶(arginase-1, Arg-1)和抗炎因子的表达,促进神经功能的恢复^[31]。由此可见,MG介导的炎症反应与卒中后的神经功能和运动障碍密切相关,调控MG的激活和极化状态或成为调控神经炎症、缓解痉挛状态的关键靶点。因此,本研究提出电针通过抑制MG的激活水平,促进MG由M1向M2极化来降低炎症反应,进而缓解PSS的假说;从MG标志物Iba-1、M1标志物CD16和M2标志物CD206的表达变化,以及促炎因子IL-6和IL-1 β 、抗炎因子TGF- β 含量和mRNA表达水平,探讨电针缓解PSS的可能机制。

本实验研究结果显示,PSS大鼠经过电针干预

后,Zea Longa神经功能评分以及电生理肌张力数值得到显著改善,表明电针促进神经功能恢复、降低肢体肌张力效果明显。进一步研究发现,PSS大鼠缺血侧脑皮质内MG的直接标志物Iba-1的阳性荧光强度显著提高,提示痉挛发生后小胶质细胞激活;且此时在模型大鼠中,促炎型M1的标志物CD16呈现高表达,同时促炎因子IL-6、IL-1 β 含量和mRNA表达升高,提示PSS大鼠体内炎症反应形成;而经电针干预后,CD16表达减少,但抗炎的M2标志物CD206表达显著增加,且抗炎因子TGF- β 含量和mRNA表达也显示上调,说明电针能够抑制PSS大鼠脑皮质内MG激活,并促进促炎M1表型向抗炎M2表型极化,有效减轻神经炎症。

综上所述,电针阳陵泉、曲池能够发挥对MG的调控作用,抑制PSS大鼠脑皮质内MG的激活状态,限制其M1促炎表型的发展,并促进MG由M1向M2抗炎表型极化来减轻神经炎症,进而促进肢体运动功能恢复、缓解卒中后痉挛状态,为电针治疗PSS的机制研究提供新思路。但本研究存在以下几点不足:(1)没有分时间点检测PSS大鼠脑内MG的激活及极化水平,无法判断最佳调控MG的时间点;(2)仅初步验证了电针通过调控MG介导的神经炎症来缓解痉挛,但其具体的分子信号通路仍不明确,有待今后进一步深入研究。

参考文献

- [1] KATOOZIAN L, TAHAN N, ZOGHI M, et al. The onset and frequency of spasticity after first ever stroke[J]. Journal of the National Medical Association, 2018, 110(6): 547-552.
- [2] LEI J F, ZHANG C D, GAI J L, et al. Deep muscle stimulator in the treatment of post-stroke spasticity: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2023, 102(17): e33602.
- [3] FLORES A E, PASCOTINI E T, KEGLER A, et al. Worst spasticity in patients post-stroke associated with MNSOD ALA16VAL polymorphism and interleukin-1 β [J]. Gene, 2022, 847: 146880.
- [4] 丁 潇, 韩宪伟, 张 虎, 等. 乌头桂枝汤加味方熏洗对脑卒中上肢痉挛患者临床疗效及BDNF、NGF和炎症因子水平影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(11): 141-144.
- [5] 黄麟荇, 蒋海龙, 岳增辉, 等. 电针结合加味芍药汤电针结合加味芍药汤对脑卒中肢体痉挛大鼠海马GABA_A及PSD-95表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(11): 2777-2781.

- [6] 刘未艾, 岳增辉, 谢志强, 等. 针灸结合对脑卒中肢体痉挛大鼠大脑皮质 BDNF、TrkB、GABA_A 受体表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(6): 954–958, 977.
- [7] 李团结, 孙培养. 电针联合康复治疗对急性脑卒中后恢复期患者肌肉痉挛、神经功能及 ADL 评分的影响[J]. 四川中医, 2021, 39(11): 203–207.
- [8] 陶然, 尹洪娜, 刘双岭, 等. 恢刺治疗脑卒中后痉挛期膝过伸的疗效及对神经生化标志物和炎性因子的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(9): 1569–1572.
- [9] RODRÍGUEZ-GÓMEZ J A, KAVANAGH E, ENGSKOG-VLACHOS P, et al. Microglia: Agents of the CNS pro-inflammatory response[J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1717.
- [10] JOLIVEL V, BICKER F, BINAMÉ F, et al. Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra[J]. *Acta Neuropathologica*, 2015, 129(2): 279–295.
- [11] WANG L X, REN W, WU Q J, et al. NLRP3 inflammasome activation: A therapeutic target for cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2022, 15: 847440.
- [12] LUO Y J, REIS C, CHEN S. NLRP3 inflammasome in the pathophysiology of hemorrhagic stroke: A review[J]. *Current Neuropharmacology*, 2019, 17(7): 582–589.
- [13] 谢志强, 谢莉娜, 郭斌, 等. 脑卒中后肢体痉挛大鼠模型制备方法[J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(5): 103–105.
- [14] 刘鸿燕. 大鼠内囊电毁损痉挛模型的构建及电针干预作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(10): 251–253.
- [15] PAXINOS G. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 3版.北京:人民卫生出版社, 2005.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 李成文, 潘思安, 卢享君, 等. 《百症赋》的针灸学术思想探源[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(3): 1–3.
- [19] 刘来明, 凡艳艳, 丁霞霞. 吕景山对穴对中风后遗症患者肢体功能的影响[J]. 中医临床研究, 2021, 13(22): 54–57.
- [20] 郭斌, 王彭汉, 黄麟苻, 等. 电针曲池-阳陵泉缓解脑卒中大鼠痉挛状态脑突触结构可塑性的实验研究[J]. 中国康复医学杂志, 2020, 35(7): 787–793.
- [21] 郭斌, 王彭汉, 黄麟苻, 等. 电针曲池-阳陵泉对脑卒中痉挛大鼠的解痉作用[J]. 康复学报, 2020, 30(1): 52–57, 63.
- [22] CAO D, ZHANG X L, LIU M J, et al. Efficacy and safety of manual acupuncture for the treatment of upper limb motor dysfunction after stroke: Protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2021, 16(11): e0258921.
- [23] XIN Y Y, WANG J X, XU A J. Electroacupuncture ameliorates neuroinflammation in animal models[J]. *Acupuncture in Medicine*, 2022, 40(5): 474–483.
- [24] COELHO I A, CERUTTI M L, ARRUDA G, et al. Acupuncture and laserpuncture as a therapeutic approach for nociception and inflammation: An experimental study in mice[J]. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 2023, 95(suppl 1): e20230104.
- [25] OWOLABI M O, THRIFT A G, MAHAL A, et al. Primary stroke prevention worldwide: Translating evidence into action[J]. *The Lancet Public Health*, 2022, 7(1): e74–e85.
- [26] KETTENMANN H, KIRCHHOFF F, VERKHRATSKY A. Microglia: New roles for the synaptic stripper[J]. *Neuron*, 2013, 77(1): 10–18.
- [27] LI L Z, HUANG Y Y, YANG Z H, et al. Potential microglia-based interventions for stroke[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2020, 26(3): 288–296.
- [28] THAWKAR B S, KAUR G. Inhibitors of NF- κ B and P2X7/NLRP3/Caspase 1 pathway in microglia: Novel therapeutic opportunities in neuroinflammation induced early-stage Alzheimer's disease[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2019, 326: 62–74.
- [29] 张可, 胡利民, 王少峡. 小胶质细胞在脑缺血病理进展中的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(16): 2517–2520.
- [30] LIU R, XU N G, YI W, et al. Electroacupuncture attenuates inflammation after ischemic stroke by inhibiting NF- κ B-mediated activation of microglia[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 2020: 8163052.
- [31] ZOU J, HUANG G F, XIA Q, et al. Electroacupuncture promotes microglial M2 polarization in ischemic stroke via annexin A1[J]. *Acupuncture in Medicine*, 2022, 40(3): 258–267.

(本文编辑 匡静之)