

引用:陈雪妮,张茜,武扬,秦杰,赵保东,张捷.通督醒脑针刺法对脑缺血再灌注后学习记忆障碍大鼠的影响及机制研究[J].中医导报,2026,32(5):13-19.

通督醒脑针刺法对脑缺血再灌注后学习记忆障碍大鼠的影响及机制研究*

陈雪妮¹,张茜¹,武扬²,秦杰¹,赵保东²,张捷²

(1.山西中医药大学,山西太原 030619;

2.山西省中医院,山西太原 030010)

[摘要] 目的:观察通督醒脑针刺法对脑缺血再灌注(CIR)大鼠认知功能的影响,并进一步探讨其可能机制。方法:从65只雄性Sprague-Dawley大鼠中随机抽取15只设为空白组,另抽15只作为假手术组(仅对血管实施钝性分离操作),其余35只大鼠借助线栓法构建右侧大脑中动脉缺血再灌注损伤模型,实验过程中,2只造模不成功、3只死亡,随后将剩余大鼠随机划分为电针组及模型组,两组均为15只。通过观察神经功能缺损评分、Morris水迷宫、TTC染色、海马CA1区神经元尼氏染色、海马组织病理HE染色、海马组织中SOD、MDA及ROS表达水平、血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、大脑缺血区海马组织中Beclin-1及LC3蛋白表达,探讨通督醒脑针刺法对CIR大鼠认知功能的影响。结果:与空白组及假手术组比较,模型组神经功能缺损评分显著升高($P<0.01$),逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越原平台次数显著减少($P<0.01$),脑梗死体积明显增大($P<0.01$),海马CA1区神经元形态不完整并且数量变少,海马CA1区组织细胞核减少且排列紊乱,胶质细胞核增多,形态结构异常,炎症细胞激增,存在空泡结构,血清IL-1 β 、IL-6及TNF- α 表达水平增高($P<0.05$),大鼠海马组织中ROS及MDA表达水平上升,SOD表达下降($P<0.05$),海马区Beclin-1、LC3蛋白表达水平升高($P<0.05$);与模型组比较,电针组神经功能缺损评分显著降低($P<0.01$),逃避潜伏期显著缩短($P<0.01$),穿越原平台次数显著增加($P<0.01$),脑梗死体积明显减小($P<0.01$),海马CA1区神经元形态改善并且数量变多,海马CA1区组织细胞核排列变整齐,形态结构改善,血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低($P<0.05$),海马组织ROS、MDA表达降低,SOD活性升高($P<0.05$),海马区Beclin-1、LC3蛋白表达水平进一步升高($P<0.05$)。结论:通督醒脑针刺法可以上调CIR大鼠海马组织中Beclin-1及LC3的表达,改善炎症与氧化应激指标,提高学习记忆能力,减轻神经元细胞损伤,这可能与调节自噬网络系统相关。

[关键词] 脑缺血再灌注;电针;苜蓿素1;微管相关蛋白轻链3;学习记忆;认知功能;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2026)05-0013-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.05.003

Effects and Mechanism of Tongdu Xingnao Acupuncture on Learning and Memory Deficits in Rats with Cerebral Ischemia-Reperfusion

CHEN Xue'ni¹, ZHANG Xi¹, WU Yang², QIN Jie¹, ZHAO Baodong², ZHANG Jie²

(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan Shanxi 030619, China;

2. Shanxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan Shanxi 030010, China)

[Abstract] Objective: To observe the effects of Tongdu Xingnao acupuncture on cognitive function in rats with cerebral ischemia and reperfusion (CIR), and to explore the possible mechanisms. Methods: Among 65 male Sprague-Dawley rats, 15 were randomly selected as the blank group, and another 15 were selected as the sham operation group. In this group of rats, only the blood vessels were subjected to a temporary separation operation, while the remaining 35 rats were used to construct the right middle cerebral artery ischemia-reperfusion

*基金项目:山西省自然科学基金项目(202403021221325);张捷省级名中医传承工作室建设项目(SXSMZYGZS130);山西省中医药科研专项(2024ZYY2B007、2024ZYY2B008)

通信作者:武扬,男,主治医师,研究方向为慢性病的康复治疗

injury model by the suture method. During the experiment, 2 rats failed to model successfully and 3 rats died. Subsequently, the remaining rats were randomly divided into the electroacupuncture group and the model group, with 15 rats in each group. The effects of Tongdu Xingnao acupuncture on the cognitive function of CIR rats were evaluated through neurological deficit scores, Morris water maze tests, TTC staining, Nissl staining of neurons in the CA1 region of the hippocampus, HE staining of hippocampal tissue pathology, expression levels of SOD, MDA, and ROS in hippocampal tissue, serum levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , and the expression levels of Beclin-1 and LC3 proteins in the ischemic hippocampal tissue. Results: Compared to the blank group and sham operation group, the model group showed a significant improvement in neurological deficit scores ($P<0.01$), a significantly prolonged escape latency ($P<0.01$), a marked decrease in the number of crossings over the original platform ($P<0.01$), and a significant increase in cerebral infarction volume ($P<0.01$). The neurons in the CA1 region of the hippocampus in the model group exhibited incomplete morphology and a reduction in number, with fewer and disordered cell nuclei, an increase in glial cell nuclei, abnormal morphology and structure, a surge in inflammatory cells, and vacuolar structures. Serum levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were elevated in the model group ($P<0.05$). In the rat hippocampal tissue, the levels of ROS and MDA increased, while SOD levels decreased in the model group ($P<0.05$). The expression levels of Beclin-1 and LC3 proteins in the hippocampal region also increased in the model group ($P<0.05$). Compared to the model group, the electroacupuncture group showed a significant decrease in neurological deficit scores ($P<0.01$), a significantly shortened escape latency ($P<0.01$), a significant increase in crossings over the original platform ($P<0.01$), and a significant reduction in cerebral infarction volume ($P<0.01$). The neurons in the CA1 region of the hippocampus showed improved morphology and an increase in number in the electroacupuncture group, with more organized cell nuclei and improved morphology and structure. Serum levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α decreased in the electroacupuncture group ($P<0.05$). The levels of ROS and MDA in the hippocampal tissue decreased, while the SOD levels increased in the electroacupuncture group ($P<0.05$). The expression levels of Beclin-1 and LC3 proteins in the hippocampal region further increased in the electroacupuncture group ($P<0.05$). Conclusion: Tongdu Xingnao acupuncture can increase the expression of Beclin-1 and LC3 in hippocampal tissue of CIR rats, improve inflammation and oxidative stress indicators, improve learning and memory ability, and reduce neuronal cell damage, which may be related to the regulation of autophagy network system.

[Keywords] cerebral ischemia-reperfusion; electroacupuncture; Beclin-1; LC3; learning and memory; cognitive function; rat

卒中后认知障碍(post-stroke cognitive impairment, PSCI)是指在患者卒中发病后产生的(时间为发病后半年内),表现为一系列的认知功能受损症状^[1],这些症状,如注意力及记忆障碍、性格情绪改变甚至精神行为异常,很大程度上是受卒中的影响。PSCI进一步增加了卒中患者的功能依赖、死亡率及其家属的照护负担。根据疾病发生病灶,可以将其分为梗死发生在关键部位、梗死发生在皮质下以及脑出血等卒中事件导致的认知功能损伤^[2]。

前期临床研究表明,对脑卒中患者施以电针可有效改善其认知功能^[3],但其中的具体作用机制尚不明确。真核细胞对于自己本身的蛋白质和一些已经衰老的细胞器进行分解和代谢,然后通过消化,实现重新利用的过程被称为自噬(autophagy)^[4]。已有研究发现,当器官正在遭受缺血再灌注损伤时,机体会呈现一种自我保护状态,这种状态与自噬密切相关,机体会通过上调自噬水平,保护大脑神经元细胞,减少缺血再灌注造成的神经功能损伤^[5]。因此,本研究利用线栓法进行大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusive, MCAO)模型构建,并在缺血2 h后进行再灌注处理,完成脑缺血再灌

注(cerebral ischemia reperfusion, CIR)模型大鼠的造模,并对CIR大鼠施以通督醒脑电针针刺,观察该疗法对大鼠学习记忆能力及Beclin-1、LC3表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 65只体重(260 \pm 20)g的SPF级雄性Sprague-Dawley大鼠,购于北京斯贝福生物技术有限公司。生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。质量合格证号:110324241101097248。以5只一笼的规格安置于山西中医药大学SPF级动物房内,保持笼具及实验室的通风,给予大鼠自由充足的饮食,动物房内的温度和湿度分别维持在(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、(50 \pm 5)%的水平,室内明暗交替时间各半,适应性饲养7 d。整个实验完全以国际动物保护和使用指南为标准,严格遵守规定进行操作。山西中医药大学动物实验伦理审查委员会对本实验进行了严格全面的审核,伦理批准编号:AWE202407353。

1.2 试剂 MCAO线栓(北京西液科技有限公司,批号:M8509);戊巴比妥(上海试一化学试剂有限公司,批号:820219);2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(Triphenyltetrazolium Chloride, TTC)染液(批号:G3005-100)、BCA蛋白定量试剂盒(批号:BB-

CAPCK500)、RIPA裂解液(批号:WB9201)、SDS-PAGE快速电泳缓冲液(批号:PW9226)、快速转膜缓冲液(批号:PW9227)均购自Bioswamp公司;Beclin-1抗体(CST,批号:3738S);LC3抗体(GeneTex公司,批号:GTX127375);GAPDH抗体(Proteintech公司,批号:60004-1-Ig);TNF- α 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:E-EL-M3063)、IL-1 β ELISA试剂盒(批号:E-EL-M0037c)、IL-6 ELISA试剂盒(批号:E-EL-M0044c)均购自Elabscience公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号:C1300-1);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号:AC10100-100T/48S)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号:AC10072-100T/96S)均购自上海吉至生化科技有限公司。

1.3 主要仪器 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY600C);Morris水迷宫(广州瑟焯生物科技有限公司,型号:XW003);电针仪(山西宸波物贸有限公司,型号:CB1594);0.5寸毫针(苏州医疗用品厂有限公司,型号:IP0006-9-2)。

1.4 分组和造模 根据随机数字表法对全部大鼠进行随机赋值3次,抽取15只大鼠设为空白组,15只大鼠设为假手术组,在假手术组中,仅进行了血管的钝性分离,没有进行插线栓和结扎的操作。其余大鼠均在Longa法^[6]的指导下,制备右侧MCAO模型。手术前需要对全部大鼠进行禁食1 d的操作,不禁水。对大鼠称重,按照40 mg/kg给予1%戊巴比妥钠麻醉,麻醉后进行手术操作。具体的操作步骤如下:首先将大鼠颈前部毛发除去,在正中用手术刀慢慢划开小口,对右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)借助圆头镊子实施钝性分离操作,将CCA近心端和ECA远心端分别结扎,预留结扎线,将ICA的远心端用动脉夹夹闭。于CCA分叉处下方1~2 mm处剪开一个小切口,将线栓从切口处插入穿过CCA分叉进入ICA,稍遇阻力时,停止,束紧预先放置在CCA的结扎线。用4-0缝合线缝合伤口并敷上青霉素消毒。在缝合部位的皮肤外预先留出线栓尾部1~2 cm的长度,并在缺血发生2 h后,将线栓重新抽出至颈总动脉的分叉处位置。手术操作中需做好动物的保温工作,关注其反应。

再灌注24 h后,借助LONGAE Z等^[6]评分标准对施术大鼠的神经功能缺损程度进行评分,将评分处于1~3分之间的大鼠纳入后期实验,把0分、4分大鼠排除。结果造模不成功2只、死亡3只,共30只纳入后期实验。30只造模成功大鼠再随机分为电针组及模型组,各15只。

手术完成后第1天,电针组大鼠的神庭穴及百会穴,其中神庭穴均向上针刺,百会穴向前针刺,2个穴位斜进针且深度为2 mm,穴位的定位参考《实验针灸学》^[7]。进针后与电针仪进行连接,以6 V为电压峰值,1~4 mA的电流强度进行电针操作,以大鼠耳朵受电击而轻微抖动为度,采用疏密波,频率为1/20 Hz,大约30 min/次,1次/d,持续14 d。假手术组、空白组与模型组的大鼠则需要每日在同等的条件之下进行抓取,不施加其他干预。

1.5 取材 造模干预及Morris水迷宫实验、神经功能学评分

全部结束之后,对每只大鼠进行称重,根据体重给予1%戊巴比妥钠40mg/kg腹腔注射实施麻醉,麻醉完成后,先收集各组全部大鼠腹主动脉血,用于后续IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的检测。然后从每组中各随机选出3只大鼠,将大鼠断头,并迅速在冰台上分离出脑组织,接着快速将这些脑组织放入-20℃冰箱中进行2 h的速冻,以备用于TTC染色。从各组剩余大鼠中再各随机选出6只大鼠,断头,取出所需脑组织,多聚甲醛固定后,对其进行脱水、包埋、切片(5 μ m),以备于后续尼氏染色及HE染色。每组剩余的6只大鼠,将其断头后,迅速在冰台上剥离出缺血区海马组织,并将其放入液氮罐中进行速冻,然后保存于-80℃的冰箱中,用于后续SOD、MDA、ROS水平及免疫印迹法(Western blotting)检测。

1.6 观察指标与检测方法

1.6.1 神经功能缺损评分 选择课题组中未参与前期造模、治疗的成员基于LONGAE Z等^[6]评分标准,观察全部大鼠的神经功能损伤状态,0分表示没有任何神经功能受损迹象;1分为大鼠不能完全展开其患侧的前爪;2分为大鼠在行走过程中出现向患病一侧转圈的症状;3分为大鼠在行走过程中,身体出现向患病一侧倾倒的症状;4分为大鼠已经没有能力自发走动,甚至失去意识、死亡。分别对手术完成后第1、14天的神经功能缺损评分进行测定,并且比较其变化。

1.6.2 Morris水迷宫实验 定位航行实验:在电针治疗的第9天开始进行,对大鼠进行适应性练习1 d,适应后第2天开始正式实验,2次/d,分上下午,一共持续5 d。具体操作为:从四象限中随机一个象限将大鼠面朝水域投入,大鼠若能够在90 s以内的时间内爬到指定地点,并且能在该平台上停留3 s以上,则大鼠被认定为能够寻找到指定地点平台。若在规定时间内大鼠不能寻找到指定地点平台,可以人为地拖其尾部,引导大鼠到达正确地点,让其熟悉10 s后再次测试,以90 s为潜伏期标准,每隔5 min进行一次训练。空间探索实验:在电针治疗的第14天上午,将原有的指定平台拿走,随机选择一个地方将大鼠投入水中,观察大鼠在90 s内穿过原平台区域的次数并做好记录。

1.6.3 TTC染色观察脑梗死情况 冷冻后大脑切成厚度为2 mm的脑片,借助2%TTC溶液进行染色,在恒定温度为37℃的环境中孵育15~20 min,全程避光操作,然后将脑片依次排列进行拍照,采用Image J软件对每张脑片的脑梗死体积百分比进行分析。

1.6.4 尼氏染色观察神经元形态 随机在石蜡切片中选3只大鼠的脑组织切片,按照顺序分别浸泡于亚甲蓝溶液、尼氏分化液和钼酸铵溶液中。以恒定温度进行5 min的孵育,用水进行持续2 min的冲洗,使用浓度为90%的乙醇进行分色,然后进行脱水并封片。最后在显微镜下观察神经元形态。

1.6.5 HE染色观察大鼠海马CA1区脑组织的病理学改变 对制备好的剩余3只大鼠的石蜡切片进行脱蜡、分化、返蓝、染色、脱水、封片,最后观察大鼠海马CA1区脑组织的病理学改变。

1.6.6 ELISA法检测血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 静置2 h后的腹主动脉血在4℃下以6 000 r/min的速度离心15 min,得

到上清液,严格遵守ELISA试剂盒说明书进行操作。利用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(OD值),制作标准曲线,计算出实际含量。

1.6.7 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)染色法测定各组大鼠脑组织ROS含量 取出20 mg冻存的海马组织,严格按照试剂盒说明处理,通过DCFH-DA重悬,处理后的细胞沉淀用酶标仪检测荧光值,剩余上清液的蛋白浓度使用BCA法测定,脑组织中ROS的相对表达水平通过荧光值与蛋白浓度之比表示。

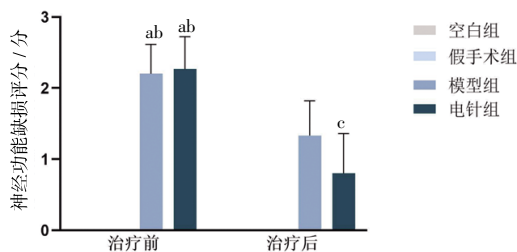
1.6.8 比色法测定脑组织中SOD、MDA水平 取出20 mg冻存的海马组织,使用氯化钠溶液将其制备成10%的组织匀浆,以3 000 r/min的速度离心10 min,得到上清液。借助WST-8法以及TBA法进行检测,依次步骤遵循试剂盒说明书进行操作。在450 nm波长下使用酶标仪测量OD值。将标准曲线公式整理出来,代入OD值,从而得到实际的浓度。

1.6.9 Western blotting检测蛋白表达情况 取出20 mg冻存的海马组织,完全裂解后,从样品中提取出总蛋白并且采用BCA法对蛋白质进行定量。将蛋白借助沸水浴进行变性,电泳后将凝胶取出,转印至PVDF膜上。使用脱脂奶粉封闭,TBS清洗。分别加入一抗(兔Beclin-1、LC3单克隆抗体和内参抗体GAPDH)孵育,稀释比例均为1:4 000,4℃冰箱封闭,过夜,第2天P-BST洗膜,加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG(1:3 000),室温孵育1 h,P-BST洗膜,将印迹膜放置在成像分析仪上进行自动成像,并利用软件Image J对蛋白条带灰度值进行分析处理。

1.7 统计学方法 应用SPSS 27.0软件,计量资料以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较则采用LSD-t检验。水迷宫定位航海实验数据采用重复测量方差分析处理。 $P<0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分 空白组与假手术组大鼠全程神经功能良好,未出现神经功能损伤状态。治疗前,模型组和电针组相较于假手术组及空白组,大鼠神经功能缺损评分明显升高($P<0.01$);模型组与电针组神经功能缺损评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后,电针组神经功能缺损评分较模型组明显改善($P<0.01$)。(见图1)

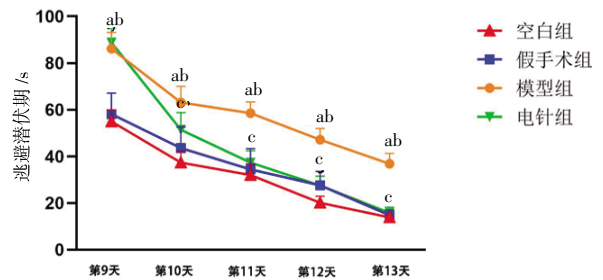


注:与空白组治疗前比较,^a $P<0.01$;与假手术组比较,^b $P<0.01$;与模型组治疗后比较,^c $P<0.01$ 。

图1 各组大鼠神经功能缺损评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

2.2 各组大鼠学习记忆能力比较 假手术组与空白组大鼠逃避潜伏期比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明剥离血管对大鼠学习记忆功能无实际影响;与假手术组及空白组比较,模型组大鼠逃避潜伏期明显增长($P<0.01$),说明模型组大鼠

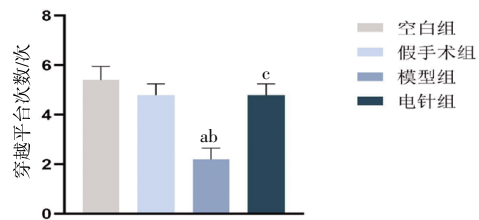
的空间学习记忆功能出现明显损伤;电针组与模型组逃避潜伏期比较,第1天差异无统计学意义($P>0.05$),从第2天起,逃避潜伏期明显减短($P<0.01$)。(见图2)



注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与假手术组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠逃避潜伏期比较 ($\bar{x}\pm s$)

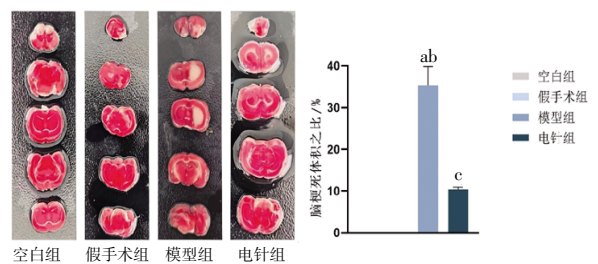
借助空间探索实验对大鼠治疗第14天的穿越原逃生平台次数进行观察记录。结果显示:假手术组与空白组,在穿越平台次数上差异无统计学意义($P>0.05$);模型组相较于空白组及假手术组,穿越平台次数显著减少($P<0.01$);电针组相较于模型组,穿越平台次数显著增加($P<0.01$)。(见图3)



注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与假手术组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠穿越原平台次数比较 ($\bar{x}\pm s$)

2.3 TTC染色观察各组大鼠脑梗死情况 假手术组和空白组大鼠大脑染色均匀,没有出现梗死区域。其余两组均观察到不同程度的白色梗死区域。与空白组及假手术组比较,模型组脑梗死体积显著增大($P<0.01$);与模型组比较,电针组脑梗死体积显著减小($P<0.01$)。(见图4)



注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与假手术组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠TTC染色代表图及脑梗死体积 ($\bar{x}\pm s$)

2.4 各组大鼠海马CA1区神经元形态比较 空白组与假手术组大鼠海马神经元整齐排列有序,形态结构正常,尼氏小体数目众多且分布较为均匀,未观察到明显的丢失。模型组大鼠海马CA1区神经元无序排列紊乱,形态结构呈现异常不规则现象,少数神经元可见明显肿胀,胞核出现皱缩,细胞界限不清晰,尼氏小体数目较少,存在溶解现象。电针组大鼠神经元排列较为整齐,较均匀分布,尼氏小体数目相对模型组

增多。(见图5)

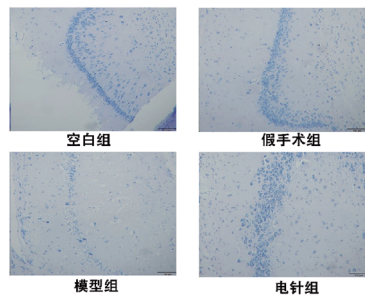


图5 各组大鼠海马CA1区神经元形态比较 (尼氏染色, ×100)

2.5 各组大鼠海马细胞形态比较 空白组与假手术组大鼠并未观察到明显的病理改变,神经元细胞排列规整,形态结构正常;模型组可观察到显著的病理改变,神经元细胞排列紊乱且稀疏,胞质染色不匀称,出现核皱缩,核仁深染,大量空泡结构,细胞周围的间隙增宽;电针组神经元细胞排列相对来说较整齐,胞体变形减少,细胞周围间隙较为正常,较模型组有明显改善。(见图6)

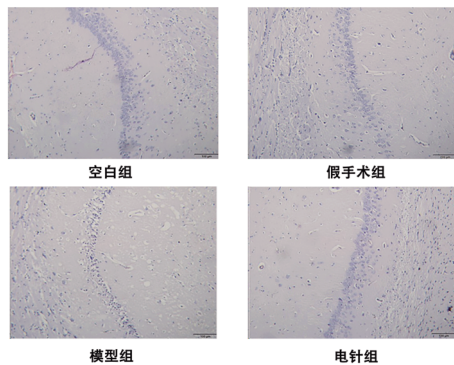
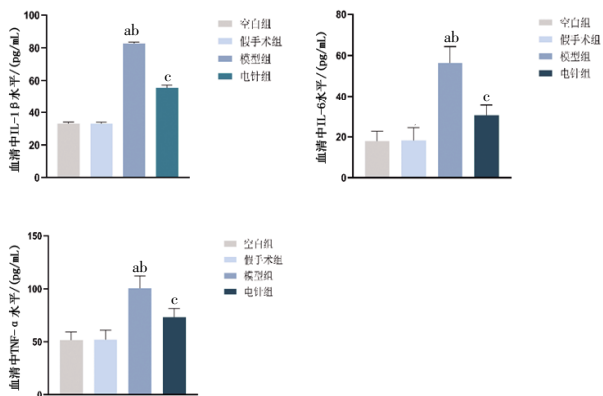


图6 各组大鼠海马HE染色结果比较 (×100)

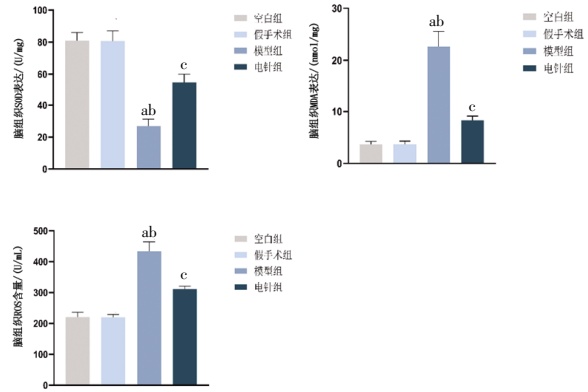
2.6 各组大鼠血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较 假手术组与空白组大鼠血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与空白组及假手术组比较,模型组大鼠血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,电针组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平明显降低($P<0.05$)。(见图7)



注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与假手术组比较,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.05$ 。

图7 各组大鼠血清炎症因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

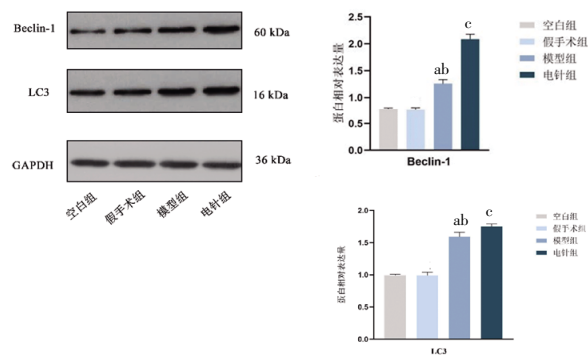
2.7 各组大鼠海马组织中氧化应激相关指标水平比较 假手术组与空白组比较,大鼠海马组织中ROS、SOD、MDA表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$);与空白组及假手术组比较,模型组大鼠海马组织中ROS、MDA表达水平明显升高,SOD表达显著下降($P<0.05$);与模型组比较,电针组大鼠海马组织中ROS、MDA表达水平明显降低,SOD表达显著升高($P<0.05$)。(见图8)



注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与假手术组比较,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.05$ 。

图8 各组大鼠海马组织中氧化应激指标水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

2.8 各组大鼠海马组织中Beclin-1、LC3蛋白表达水平比较 假手术组与空白组比较,海马区Beclin-1、LC3蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);与空白组及假手术组比较,模型组海马区Beclin-1、LC3蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,电针组海马区Beclin-1、LC3蛋白表达水平进一步升高($P<0.05$)。(见图9)



注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与假手术组比较,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.05$ 。

图9 各组大鼠海马组织中相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

3 讨论

自噬与氧化应激之间存在密切的相互作用。自噬是机体内细胞的一种“自我清理”和“回收再利用”的过程。氧化应激反应是机体内氧化与抗氧化平衡被打破并且更偏向于氧化的一种病理状态。两者呈现一种双向调节作用,一方面,通过对损伤细胞器及自身蛋白质进行消除的自噬过程可以缓解氧化应激给机体带来的损伤;另一方面,氧化应激也可以通过调控自噬相关通路,影响自噬的活性^[8]。在自噬反应过程中,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶在

受损后被代谢分解,进一步促进了新的抗氧化酶的合成,从而保护了细胞的抗氧化能力^[9]。自噬可以通过调控核因子 κ B(NF- κ B)、核因子-E2相关因子2(Nrf2)等氧化应激相关信号通路,减轻氧化应激对细胞造成的损伤。此外,自噬在氧化应激中的作用具有双重性,既可能发挥保护作用,也可能参与病理过程,自噬过度或不足均可能导致氧化应激加剧,引发细胞损伤和疾病。例如,自噬缺陷可能导致活性氧(ROS)积累,引发神经元死亡和神经退行性疾病^[10-11]。自噬与炎症反应之间也存在着密切的联系,适度的自噬会减轻机体炎症反应起到保护效应,过度自噬则会刺激炎症因子的释放,使得炎症反应加剧,对机体造成更大损伤^[12]。

苯氯素1(Beclin1)是磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)复合物(Class III PI3K)的核心组分,通过与VPS34(PI3K的催化亚基)结合,促进磷脂酰肌醇-3-磷酸(PI3P)的生成,进而启动自噬体的形成^[13-15]。Beclin-1是自噬过程中的关键调控蛋白,在自噬体的形成和成熟中起核心作用。它能够通过招集微管相关蛋白轻链3(LC3),促使LC3-I加工形成LC3-II,从而形成自噬体,通过与多种蛋白质相互作用,调控自噬的启动和进程^[16]。LC3也是自噬过程中的关键标志物,在自噬体的形成和成熟中起重要作用,其功能异常与卒中后认知障碍有紧密的联系。通过调控LC3的功能,可能为缺血性脑卒中的治疗提供新的策略^[17-18]。

氧化应激与PSCI之间存在密切的关联^[19-20]。脑卒中发生后,脑组织缺血再灌注损伤导致ROS的生成过量,引发氧化应激,进而导致神经元损伤和认知功能下降^[21-22]。ROS会直接损伤神经元膜脂质、蛋白质和DNA,导致神经元死亡。SOD、MDA是机体内反应氧化应激程度的重要指标,MDA反应的是机体受自由基侵害的程度,SOD反应的是机体对自由基的清除能力。ROS还与机体内的炎症反应有密切的联系,其过量产生会激活小胶质细胞和星形胶质细胞,释放IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子,促进多种炎症介质的分泌,导致慢性神经炎症的发生,进一步对神经元造成损伤^[23-24]。

脑缺血再灌注损伤(CIRI)发生之后,氧化应激、炎症反应是其病理机制中的重要组成部分。本研究中,大鼠造模后,脑组织内产生了大量ROS,引起了病理性的氧化应激反应及炎症反应,使得脑组织中MDA含量上升,SOD活性下降,血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 促炎因子表达增加。同时,过量的ROS激活了自噬作用,模型组大鼠脑组织中Beclin-1、LC3蛋白表达水平升高,使得机体处于一种自我保护状态,帮助将氧化的脂质和蛋白质进行分解并消除,防止过度累积氧化产物,阻止炎症反应的进一步加重。而施以通督醒脑针刺法进行干预后,进一步提高了大鼠脑组织中Beclin-1、LC3蛋白的表达,上调了大鼠海马自噬作用,从而进一步缓解氧化应激损伤,降低ROS、MDA含量,提高SOD活性,减轻炎症反应,减少IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达,进一步对机体发挥保护作用,从而改善CIR大鼠的学习记忆能力。

督脉为阳脉之海,主一身之元阳,与脊髓、脑有着紧密的联系。孔莹等^[25]研究发现,对于阿尔茨海默病(AD)大鼠的百会穴进行针刺可以提高其LC3 II和Beclin-1的表达,从而改善

其学习记忆能力。通过前期临床观察^[26]及本研究发现,通督醒脑针刺法可以改善卒中后认知障碍患者及卒中后认知障碍大鼠的学习记忆能力,并且上调Beclin-1和LC3的表达,诱发大鼠海马自噬,抑制脑缺血再灌注后大鼠的氧化应激以及炎症反应,促进海马CA1区神经元修复,改善大鼠海马细胞结构,缩小脑梗死体积百分比。

综上,通督醒脑针刺法可改善CIR大鼠学习记忆障碍,这种作用可能与电针上调Beclin-1和LC3的表达,启动自噬网络系统有关,本研究还存在一定的局限性,只检测了自噬相关蛋白,未观察上游信号传导通路及相关基因表达,有待于进一步观察和研究。

参考文献

- [1] 程静,杨一涵,陈进城,等.基于BDNF/TrkB通路探讨电针对脑缺血再灌注损伤大鼠学习记忆功能及突触可塑性的影响[J].中国针灸,2024,44(9):1037-1045.
- [2] 田金州,韩明向,涂晋文,等.血管性痴呆诊断、辨证及疗效评定标准(研究用)[J].中国老年学杂志,2002,22(5):329-331.
- [3] 龚志斌,梁晓君,张捷.张捷针药结合治疗卒中后认知障碍的临床经验[J].中医临床研究,2023,15(13):108-111.
- [4] MARCUCCI F, BELLONE M, CASERTAC A, et al. Pushing tumor cells towards a malignant phenotype: Stimuli from the microenvironment, intercellular communications and alternative roads[J]. Int J Cancer,2014,135(6):1265-1276.
- [5] 诺明,陶慧,哈森塔娜,等.舒芬太尼对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡及Bcl-2、LC3 II、Beclin-1表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(1):50-54.
- [6] LONGAE Z, WEINSTEIN R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [7] 李忠仁.实验针灸学[M].2版.北京:中国中医药出版社,2007:360.
- [8] 惠倩倩,靖媛,欧阳思洁,等.艾灸“关元”穴对皮肤光老化模型大鼠皮肤组织氧化应激及自噬相关基因表达的影响[J].中医杂志,2025,66(6):621-628.
- [9] 周丽,陈祎洲,李松,等.基于线粒体自噬与凋亡探讨中医药治疗缺血性脑卒中机制[J].中医学报,2024,39(10):2046-2051.
- [10] 张润琛,马雅婧,刘博涵,等.艾灸预处理防治缺血性卒中作用机制的研究进展[J].辽宁中医杂志,2025,52(1):203-208.
- [11] 李婷婷,王钦鹏,刘晓庆,等.线粒体自噬对缺血性脑卒中的作用及其机制研究进展[J].中风与神经疾病杂志,2024,41(1):41-46.
- [12] 贾茗桉,梁瀛今,井芾祯,等.清肺解毒化痰方调控mTOR/Beclin1/LC3信号轴改善小鼠肺泡巨噬细胞重型炎症模型自噬[J].中药药理与临床,2026,42(3):18-26.

- [13] 崔怡娴,孙亚萍,石瑞,等.益气活血化浊解毒方对脑缺血再灌注损伤模型大鼠自噬相关蛋白Beclin-1、LC3-II、mTOR表达的影响[J].四川中医,2025,43(2):98-104.
- [14] 唐桂华,胡雪梅,唐中生,等.穴位埋线改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力与海马自噬相关蛋白的影响[J].时珍国医国药,2023,34(11):2801-2803.
- [15] 唐红,吕倩忆,汪红娟,等.针刺激活Ⅲ型PI3K/Beclin-1通路调控脑缺血再灌注损伤大鼠缺血侧海马区细胞自噬[J].针刺研究,2023,48(5):423-430.
- [16] 信征,庞贺香,李昆,等.LC3-II、Beclin-1水平与脑卒中患者抑郁关联性及其交互作用研究[J].中国实验诊断学,2025,29(1):7-11.
- [17] 邓敏贞,钟晓琴,高志杰,等.益脑康胶囊对缺血再灌注模型小鼠自噬相关因子Beclin-1、LC3B和p62的影响[J].西部中医药,2023,36(9):10-14.
- [18] 张方,李文杰,董永书,等.白杨素抑制大鼠脑缺血/再灌注损伤后氧化应激和过度自噬的机制研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2023,21(23):4334-4339.
- [19] 张苗苗,胡利明,周全,等.人参皂苷Ro对氧糖剥夺/复糖复氧诱导SH-SY5Y细胞损伤的保护作用及机制[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2025,32(1):35-41.
- [20] 刘若静,赵雪,朱毅祯,等.人参皂苷Rb1调控小胶质细胞极化减轻小鼠脑缺血损伤[J].中国组织工程研究,2025,29(29):6219-6227.
- [21] 张晗,王宇,钟晓琴,等.定志小丸对卒中后认知障碍模型小鼠PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α 通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2025,31(5):1-11.
- [22] 陈玲玲,李良,肖伟,等.银杏内酯B配伍右莰醇对大鼠缺血性脑卒中的保护作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2025,56(4):1277-1286.
- [23] 王晓丽,朱艳丽.天麻钩藤饮及其单味药防治脑卒中的现代临床运用和作用机制研究进展[J].中医研究,2025,38(1):89-94, F0003, F0004.
- [24] 桂腾敏,何影,任欢欢,等.有氧运动调控铁死亡的相关机制及其与脑卒中关联的研究进展[J].中国康复医学杂志,2025,40(1):153-159.
- [25] 孔莹,高伟,林春盛,等.针刺百会穴对阿尔茨海默病模型大鼠自噬相关蛋白Beclin-1和LC3-II的影响[J].中医药导报,2020,26(5):31-34.
- [26] 武扬,赵保东,张捷.通督解郁针法配合康复训练治疗卒中后认知功能障碍的临床研究[J].上海针灸杂志,2024,43(9):958-962.

(收稿日期:2025-06-08 编辑:罗英姣)

(上接第6页)

- [36] 中国针灸学会.中国针灸学会2021年国际学术活动计划[J].中国针灸,2021,41(4):428.
- [37] 郭天玲.北京中医学会史略[J].北京中医,2004,23(5):304-307.
- [38] 王晶.首都医科大学附属北京中医医院中医药国际交流的回顾与展望[J].北京中医药,2016,35(4):350-352.
- [39] 王金龙,王立立,宋渝丹,等.“一带一路”倡议下加强公共卫生国际合作的探讨[J].中国公共卫生管理,2021,37(1):110-114.
- [40] 黄涛.针灸铜人的源流考证[J].中国针灸,2018,38(8):891-894.
- [41] 亘火,唐军.苏加诺总统请中医治病:外交档案解密中国援外医疗队印尼之行[J].档案春秋,2010(9):4-8.
- [42] 刘清国.不皎不昧大医精诚:记当代中国针灸名家杨甲三教授[J].中国针灸,2008,28(4):297-301.
- [43] 刘立安,赵百孝,王磊,等.耳医学:从临证疗法到医学体系[J].北京中医药大学学报,2024,47(7):903-909.
- [44] 王莹莹,杨金生,程凯.国医大师程莘农三才针法精要[J].中国中医基础医学杂志,2013,19(9):1068-1070.
- [45] 陆永辉,张汝蓉,王克键,等.阎润茗针刺手法和取穴特点探究[J].针灸临床杂志,2014,30(5):65-66.
- [46] 陶莎,田丛豁,王寅.田从豁老师针灸治疗荨麻疹浅析[J].现代中西医结合杂志,2008,17(3):348-349.
- [47] MILLER D W, ROSEEN E J, STONE J A M, et al. Incorporating acupuncture into American healthcare: Initiating a discussion on implementation science, the status of the field, and stakeholder considerations [J]. Glob Adv Health Med, 2021, 10: 21649561211042574.
- [48] 杨星月,许安萍,张宇沁,等.虚拟仿真技术在经络腧穴学教学中的应用 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(12): 18-20.
- [49] FILSHIE J, WHITE A, CUMMINGS M.西方医学针刺:基于西方科学的方法[M].杜元灏,译.北京:人民卫生出版社,2020.
- [50] 龚倩倩,蒋辰雪.译作传心融通中外:访中医学家文树德教授[J].南京中医药大学学报(社会科学版),2025,26(3):171-174.
- [51] 聂敏里.当代中国哲学的国际化与主体意识的确立[J].中国社会科学评价,2019(1):35-37.
- [52] 李包庚,吴艺瑾.全球化视域下的文化殖民主义批判[J].宁波大学学报(人文科学版),2024,37(1):9-17.
- [53] 刘立安,孟月,汤立新,等.参合古兵学文献的奇经八脉理论考证与解构[J].中医杂志,2020,61(1):10-12.
- [54] 冯凯睿.博物馆数字藏品的传播效果研究:基于鲸探受众评论的分析[J].中国民族博览,2024(23):237-240.

(收稿日期:2025-07-16 编辑:刘国华)