

☆ 机制探讨 ☆

针刺对大鼠脑缺血后小胶质细胞极化和炎症反应的影响

张慧宇¹, 赵一锦¹, 章培军¹, 郭敏芳¹, 于婧文¹, 柴智², 马存根^{1,2,3}, 宋丽娟^{2,3}, 尉杰忠^{1,4}
(¹山西大同大学脑科学研究所, 山西大同 037009; ²山西中医药大学国家中医药管理局多发性硬化益气活血重点研究室/神经生物学研究中心, 山西晋中 030619; ³山西医科大学生理学系/第一临床医学院, 太原 030001; ⁴大同市第四人民医院神经科, 山西大同 037008)

【摘要】 目的:观察针刺对脑缺血再灌注(I/R)损伤大鼠小胶质细胞极化和炎症反应的影响,探讨其潜在的作用机制。方法:雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、针刺组,每组10只。采用大脑中动脉栓塞法制备大鼠脑I/R损伤模型。针刺组大鼠在造模后于“大椎”“百会”“水沟”及双侧“足三里”“风池”进行针刺,20 min/次,1次/d,连续7 d。采用神经功能评分法评估各组大鼠神经功能;尼氏染色法观察脑梗死侧皮质区神经元损伤情况;免疫荧光染色法检测缺血侧皮质区神经元特异性核蛋白(NeuN)、离子钙结合蛋白1(Iba-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶1(Arg1)、脑源性神经营养因子(BDNF)和胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)的表达;ELISA法检测缺血脑组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6和IL-10的含量;Western blot法检测缺血脑组织中BDNF、GDNF、Toll样受体4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)和核因子 κ B(NF- κ B)的表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能评分升高($P < 0.01$),脑缺血侧皮质区神经元数量及尼氏体减少,NeuN阳性细胞数、Arg1阳性表达减少($P < 0.01$),Iba-1、iNOS阳性表达增加($P < 0.01$),BDNF、GDNF阳性表达和蛋白表达水平及IL-10含量降低($P < 0.01$),TNF- α 、IL-6含量升高($P < 0.01$),TLR4、MyD88和NF- κ B蛋白表达水平升高($P < 0.01$)。与模型组比较,针刺组大鼠神经功能评分降低($P < 0.01$),缺血侧皮质区神经元数量及尼氏体增多,NeuN阳性细胞数、Arg1阳性表达增多($P < 0.05$),Iba-1、iNOS阳性表达减少($P < 0.01$),BDNF、GDNF阳性表达和蛋白表达水平及IL-10含量升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),TNF- α 、IL-6含量降低($P < 0.01$),TLR4、MyD88和NF- κ B蛋白表达水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:针刺干预可以通过调节脑I/R后小胶质细胞极化、减轻炎症反应和增加神经营养因子的分泌,对I/R后脑组织起神经保护作用,其机制可能与抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路有关。

【关键词】 针刺;缺血再灌注;小胶质细胞极化;神经炎症反应;神经营养因子;炎症信号通路

【中图分类号】 R245.31⁺1 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.13702/j.1000-0607.20210988

Acupuncture ameliorates neurological function by suppressing microglia polarization and inflammatory response after cerebral ischemia in rats

ZHANG Hui-yu¹, ZHAO Yi-jin¹, ZHANG Pei-jun¹, GUO Min-fang¹, YU Jing-wen¹, CHAI Zhi², MA Cun-gen^{1,2,3}, SONG Li-juan^{2,3}, YU Jie-zhong^{1,4} (¹Institute of Brain Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi Province, China; ²Key Laboratory of Benefiting Qi to Activate Blood Circulation for Treating Multiple Sclerosis, State Administration of Traditional Chinese Medicine/Research Center of Neurobiology, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi Province; ³Department of Physiology/The First Clinical Medical School, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; ⁴Department of Neurology, Datong Fourth People's Hospital, Datong 037008, Shanxi Province)

【ABSTRACT】 **Objective** To observe the effect of acupuncture on microglia polarization and inflammatory reaction in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI), so as to explore its mechanisms underlying improvement of CIRI. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into sham operation, model, and acupuncture groups, with 10 rats in each group. The

项目来源:山西省平台基地专项项目(No. 201805D131005, 201805D111009);中国博士后科学基金项目(No. 2020M680912);山西省“四个一批”科技兴医创新计划(No. 2020TD05);山西省重点实验室项目(No. 202105D121011);山西中医药大学青年科学家培育项目(No. 2021-PY-QN-09)

第一作者:张慧宇,副教授,研究方向:针刺治疗神经变性疾病。E-mail: snowstom12@163.com

通信作者:尉杰忠,教授,硕士生导师,研究方向:神经变性疾病的基础和临床治疗研究。E-mail: sxdtjyz@qq.com

CIRI model was established by occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) for 1 h, followed by reperfusion. After modeling, rats in the acupuncture group received manual acupuncture stimulation of “Dazhui” (GV14), “Baihui” (GV20), “Shuigou” (GV26), bilateral “Zusanli” (ST36) and “Fengchi” (GB20) by twirling the needles rapidly for 10 s/acupoint every 10 min, with the needles retained for 20 min. The treatment was conducted once daily for successive 7 days. The neurological function was evaluated according to Longa’s method. The state of CIRI was observed after Nissl staining, and the expression levels of Iba-1, iNOS, Arg1, BDNF, GDNF and NeuN in the ischemic cortex tissue were detected by immunofluorescence staining. The contents of TNF- α , IL-6 and IL-10 in the ischemic tissue were assayed by ELISA. The protein expression levels of BDNF, GDNF, TLR4, MyD88 and NF- κ B in the ischemic tissues were detected by Western blot. **Results** The neurological deficit score on the 24 h and 7th day was considerably higher in the model group than in the sham operation group ($P < 0.01$), and evidently lower on the 7th day in the acupuncture group than in the model group ($P < 0.01$). The number of NeuN positive cells, the area of immunofluorescence dual labelling of Arg1, BDNF and GDNF positive staining, IL-10 content, BDNF and GDNF protein expressions were significantly decreased ($P < 0.01$), and the immunofluorescence dual labelling area of Iba-1 and iNOS, TNF- α and IL-6 contents, the protein expression levels of TLR4, MyD88 and NF- κ B considerably increased ($P < 0.01$) in the model group relevant to the sham operation group. In contrast to the model group, the acupuncture group had a significant increase in the number of NeuN positive cells, the immunofluorescence dual labelling area of Arg1, BDNF and GDNF positive staining, IL-10 content, and BDNF and GDNF protein expressions ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and an evident decrease in Iba-1 and iNOS positive staining, contents of TNF- α and IL-6, and the protein expression levels of TLR4, MyD88 and NF- κ B ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Nissl staining showed a marked reduction in the number of neurons, the nucleus pyknosis and nissl bodies and loose arrangement of the neuronal cells in the model group, which was relatively milder in the acupuncture group. **Conclusion** Acupuncture intervention can improve neurological function in CIRI rats, which may be related to its effects in regulating the polarization of microglia, reducing inflammatory reaction and increasing the secretion of neurotrophic factors in the brain, inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway.

【KEYWORDS】 Acupuncture; Ischemia-reperfusion; Microglia polarization; Neuroinflammation; Neurotrophic factor; Inflammatory signaling pathway

中风是全球第二大死因,也是成人致残的主要原因^[1],其中约 87%是由血栓引起的缺血性中风^[2]。缺血性中风的病理机制非常复杂,包括兴奋性毒性、氧化应激、凋亡、神经炎症反应和钙超载等^[3-4]。缺血后的炎症反应可导致神经元的死亡和脑内支持结构的损伤,是脑缺血进展的重要病理生理机制之一^[5]。小胶质细胞是主要的神经免疫细胞,参与炎症反应的发生和发展^[6]。活化的小胶质细胞有 M1(促炎表型)和 M2(抑炎表型)两种表型^[7]。体内和体外研究均表明,抑制 M1 表型小胶质细胞激活和/或使其向 M2 表型转化具有神经保护作用^[8]。因此,解决小胶质细胞激活及其介导的神经炎症反应是治疗脑缺血再灌注(I/R)损伤的关键。Toll 样受体(TLRs)是 I/R 损伤的炎症机制中的重要角色,其中 TLR4 被认为是脑 I/R 损伤病理过程中最重要的介质,抑制 TLR4 信号通路是一种很有前途的减轻脑缺血损伤的治疗策略^[9]。研究^[10]表明,针刺可以通过抑制炎症反应、氧化应激损伤、凋亡、自噬等减轻脑 I/R 损伤。但是,针刺治疗的具体保护机制还有待于进一步阐释。因此,本研究通过大脑中动脉栓塞(MCAO)模拟大鼠脑 I/R 损伤,旨在探讨针刺对 I/R 损伤小胶质细胞及神经炎症反应的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,3~4 月龄,体质量 260~300 g,购自北京维通利华有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。大鼠饲养于山西大同大学脑科学研究所无菌动物中心,12 h/12 h 明暗交替,温度(21±1)℃,相对湿度 40%~50%,自由进食饮水。将大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组和针刺组,每组 10 只。实验过程均遵照科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要仪器和试剂

0.38 mm 线栓(北京西浓科技有限公司),0.25 mm×25 mm 针灸针(苏州医疗用品厂有限公司),激光共聚焦显微镜、IX71 光学显微镜(日本 Olympus),H1M 型全自动酶标仪(美国伯腾),冰冻切片仪(德国 Leica),电泳仪、转膜仪、凝胶成像分析仪、Image Lab 3.0 软件(美国 Bio-Rad),Image-Pro Plus 6.0 软件(美国 Media Cybernetics)。ELISA 试剂盒(美国 PeproTech),RIPA 裂解液、蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物有限公司),尼氏染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),兔抗脑源性神经生长因子(BDNF)及兔抗胶质细胞源性神经生长因子

(GDNF)一抗(美国 Abcam),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、Alex Flour[®] 488 标记的山羊抗小鼠 IgG、Alex Flour[®] 594 标记的山羊抗兔 IgG、小鼠抗神经元特异性核蛋白(NeuN)一抗、小鼠抗离子钙结合蛋白 1(Iba-1)一抗、兔抗诱导型一氧化氮合酶(iNOS)一抗、兔抗精氨酸酶 1(Arg1)一抗、兔抗核因子 κ B(NF- κ B)一抗、兔抗 TLR4 一抗和兔抗髓样分化因子 88(MyD88)一抗(美国 Cell Signaling Technology)。

1.3 造模方法

采用 MCAO 法^[11] 制备大鼠脑 I/R 损伤模型:将大鼠麻醉后于颈部剪毛,碘伏消毒。于颈部正中行约 1 cm 左右的切口,止血钳钝性分离肌肉,玻璃分针依次分离并充分暴露右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。结扎颈外动脉远心端,在颈外动脉近心端距离颈动脉分叉约 2 mm 处打一活结;微动脉夹夹闭颈内动脉和颈总动脉,在颈外动脉结扎点和活结之间剪一“V”型的小口;将线栓从小口插入,系紧活结防止线栓脱落和血液流出;剪断颈外动脉,牵拉使其与颈内动脉方向一致;将动脉夹取下,使线栓经过颈动脉分叉进入颈内动脉并到达大脑中动脉,当线栓进入距颈总动脉分叉 18~20 mm 处时可感觉到轻微阻力,此时停止插入线栓。停留 1 h 后,将线栓轻轻拔出恢复血流灌注,缝合大鼠皮肤。术中以加热灯维持大鼠体温在 36.5~37 °C 之间,术后将大鼠放在加热毯上直至苏醒。假手术组大鼠仅进行麻醉及颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉的分离。造模后评定大鼠的神经功能评分,1—3 分者为造模成功,纳入实验。

1.4 干预方法

针刺组在造模后完成神经功能评分后,将大鼠俯卧位捆绑固定于鼠板上,用 0.25 mm×25 mm 针灸针快速直刺“大椎”5 mm,“水沟”向鼻中隔方向斜刺入 2 mm,“百会”斜向前刺入 5 mm,双侧“风池”斜向前刺入 5 mm,双侧“足三里”直刺 3 mm。进针后各穴捻针 10 s,10 min 后再捻针 1 次,共留针 20 min,1 次/d,连续 7 d。假手术组和模型组仅给予同样的固定,不进行针刺干预。

1.5 观察指标及检测方法

造模后和干预后 7 d 根据 Longa 评分法^[11] 对大鼠进行神经功能评分:由对动物分组不知情的研究人员对各组大鼠进行评分。神经功能正常为 0 分;轻度神经功能缺损(不能完全伸展对侧前爪)为 1 分;中度神经功能缺损(行走时向偏瘫侧转圈)为 2 分;重度神经功能缺损(行走时向偏瘫侧倾倒)

为 3 分;无自发行走,意识减退为 4 分。

尼氏染色法观察大鼠脑梗死侧皮质区神经元损伤情况:在干预后待神经功能评分结束,每组随机取 5 只大鼠麻醉,以 0.9%氯化钠溶液进行心脏灌注至肝脏变白,再以 4%多聚甲醛灌注固定。快速分离脑组织并在 4 °C 下用 4%多聚甲醛继续固定 24 h,10%、20%和 30%梯度蔗糖脱水,包埋,冰冻切片(10 μ m),-80 °C 冰箱保存备用。取出冰冻切片,室温干燥 1 h,根据说明书进行尼氏染色。将切片置于焦油紫染色液中,于 56 °C 温箱中浸染 1 h,去离子水冲洗,置于尼氏分化液中分化 1 min,无水乙醇迅速脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,于光学显微镜下观察并拍照。

免疫荧光染色法观察大鼠缺血侧皮质区 NeuN、Iba-1、iNOS、Arg1、BDNF 和 GDNF 的表达:取出上述冰冻切片,室温干燥 1 h,PBS 洗 5 min,用含有 1%BSA 和 0.3%Triton X-100 的 PBS 室温封闭 1 h。分别加入 NeuN(1:1 000)、Iba-1(1:500)、iNOS(1:500)、Arg1(1:500)、BDNF(1:500)、GDNF(1:500)一抗,4 °C 过夜。PBS 清洗 5 min×3 次,加入相应的 Alex Flour[®] 488 标记的山羊抗小鼠及 Alex Flour[®] 594 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000),室温下孵育 2 h。PBS 清洗 5 min×3 次,用含有 DAPI 的封片液封片。于激光共聚焦显微镜下观察缺血侧皮质并拍照,每个标本观察 3 张切片,每张切片任选 5 个不重复的视野(×400 倍),使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定阳性细胞数或荧光面积,并取其平均值。

ELISA 法检测大鼠缺血侧脑组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)和 IL-10 的含量:将各组剩余的 5 只大鼠麻醉,用 0.9%氯化钠溶液进行心脏灌注至肝脏变白,迅速分离缺血侧脑组织,于 -80 °C 保存。RIPA 裂解液裂解提取缺血侧脑组织蛋白,蛋白定量后调整体积使各组蛋白含量相等。操作按照 ELISA 试剂盒说明书进行,检测 450 nm 下吸光度值,根据不同浓度标准品绘制标准曲线,计算各样本的含量。

Western blot 法检测大鼠缺血侧脑组织中 BDNF、GDNF、TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白的相对表达量:将上述各组大鼠脑组织提取的等量蛋白(50 μ g)采用 10%SDS-PAGE 凝胶进行电泳,将蛋白转移至 0.22 μ m 的 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h。分别加入 BDNF(1:500)、GDNF(1:300)、TLR4(1:1 000)、MyD88(1:500)、NF- κ B(1:500)和 GAPDH(1:5 000)一抗,4 °C 过夜。次日 PBST

洗膜 5 min×3 次,加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1 : 2 000),室温孵育 2 h。PBST 洗膜 5 min×3 次,随后加入 ECL 发光液,使用凝胶成像分析仪显影。用 Image Lab 3.0 软件分析条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白 GAPDH 灰度值的比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.6 统计学分析

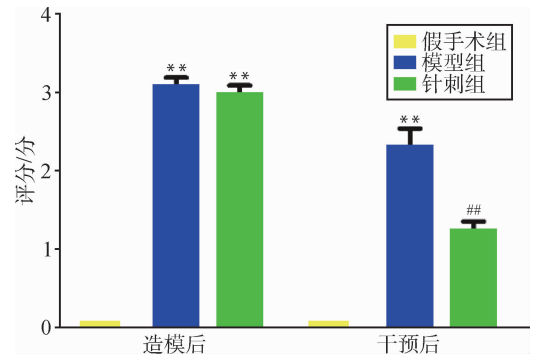
使用 Graphpad Prism 5.0 软件对所有数据进行处理。数据符合正态分布且方差齐,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 Dunnett-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能评分的比较

造模 24 h 后,与假手术组比较,模型组和针刺组大鼠出现活动减少、眨眼反应消失、前肢屈曲、转圈、侧倾、反应性降低等表现,神经功能评分均明显升高($P < 0.01$),说明造模成功。干预 7 d 后,与假手术组比较,模型组大鼠神经功能评分仍较高($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组神经功能评分明显降

低($P < 0.01$)。见图 1。



注:与同时点假手术组比较,** $P < 0.01$;与同时点模型组比较,** $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠神经功能评分比较($\bar{x} \pm s$, 10 只鼠/组)

2.2 各组大鼠缺血侧皮质区神经元损伤情况比较

假手术组大鼠缺血侧皮质区神经元数量多,细胞排列紧密,形态结构完整,尼氏体丰富,细胞核饱满且染色较浅;模型组神经元数量明显减少,细胞排列疏松,细胞核固缩,尼氏体明显减少;针刺组较模型组神经元数量增多且细胞状态明显好转,尼氏体增多,染色较深。见图 2。

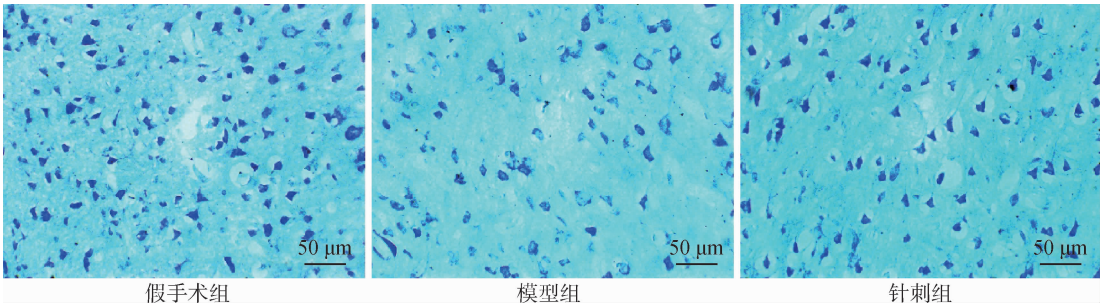


图 2 各组大鼠缺血侧皮质区神经元损伤情况比较(尼氏染色)

2.3 各组大鼠缺血侧皮质区 NeuN、Iba-1、iNOS、Arg1 阳性表达的比较

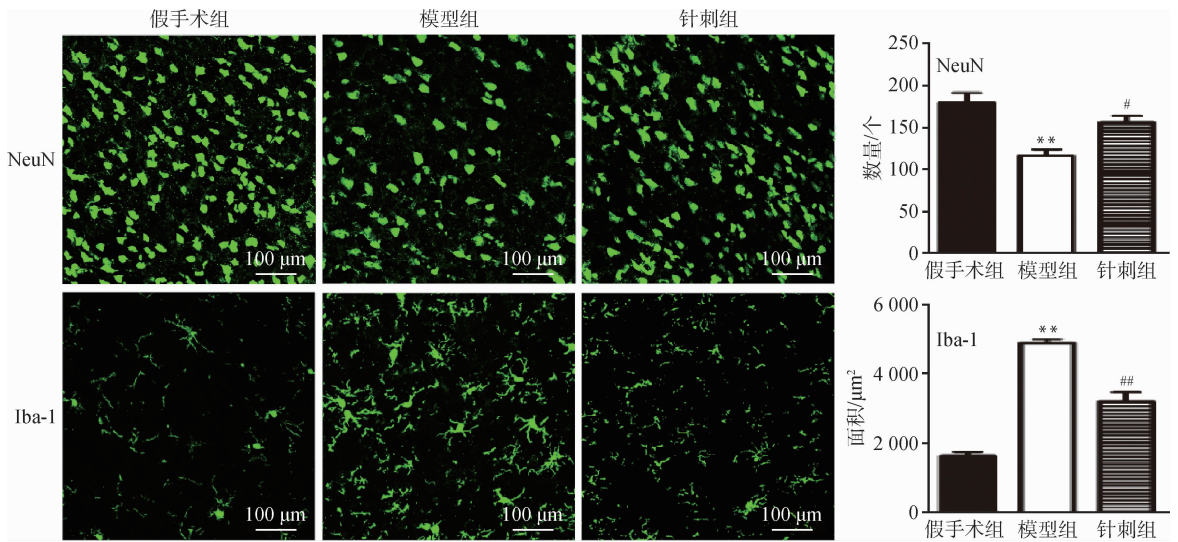
与假手术组比较,模型组大鼠神经元数量明显减少,小胶质细胞数量增加、胞体变大、突起增多增粗,NeuN 阳性细胞数减少($P < 0.01$),Iba-1 阳性表达面积增大($P < 0.01$),Iba-1 和 iNOS 双阳性荧光面积增大($P < 0.01$),Iba-1 和 Arg1 双阳性荧光面积缩小($P < 0.01$)。与模型组比较,针刺组神经元的丢失明显改善,小胶质细胞数量减少,NeuN 阳性细胞数增多($P < 0.05$),Iba-1 阳性表达面积缩小($P < 0.01$),Iba-1 和 iNOS 双阳性荧光面积缩小($P < 0.01$),Iba-1 和 Arg1 双阳性荧光面积增大($P < 0.05$)。见图 3、图 4。

2.4 各组大鼠缺血侧皮质区 BDNF 和 GDNF 阳性表达的比较

与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧皮质区 BDNF 和 GDNF 阳性表达明显减少($P < 0.01$)。与模型组比较,针刺组缺血侧皮质区 BDNF 和 GDNF 阳性表达明显增多($P < 0.01$)。见图 5。

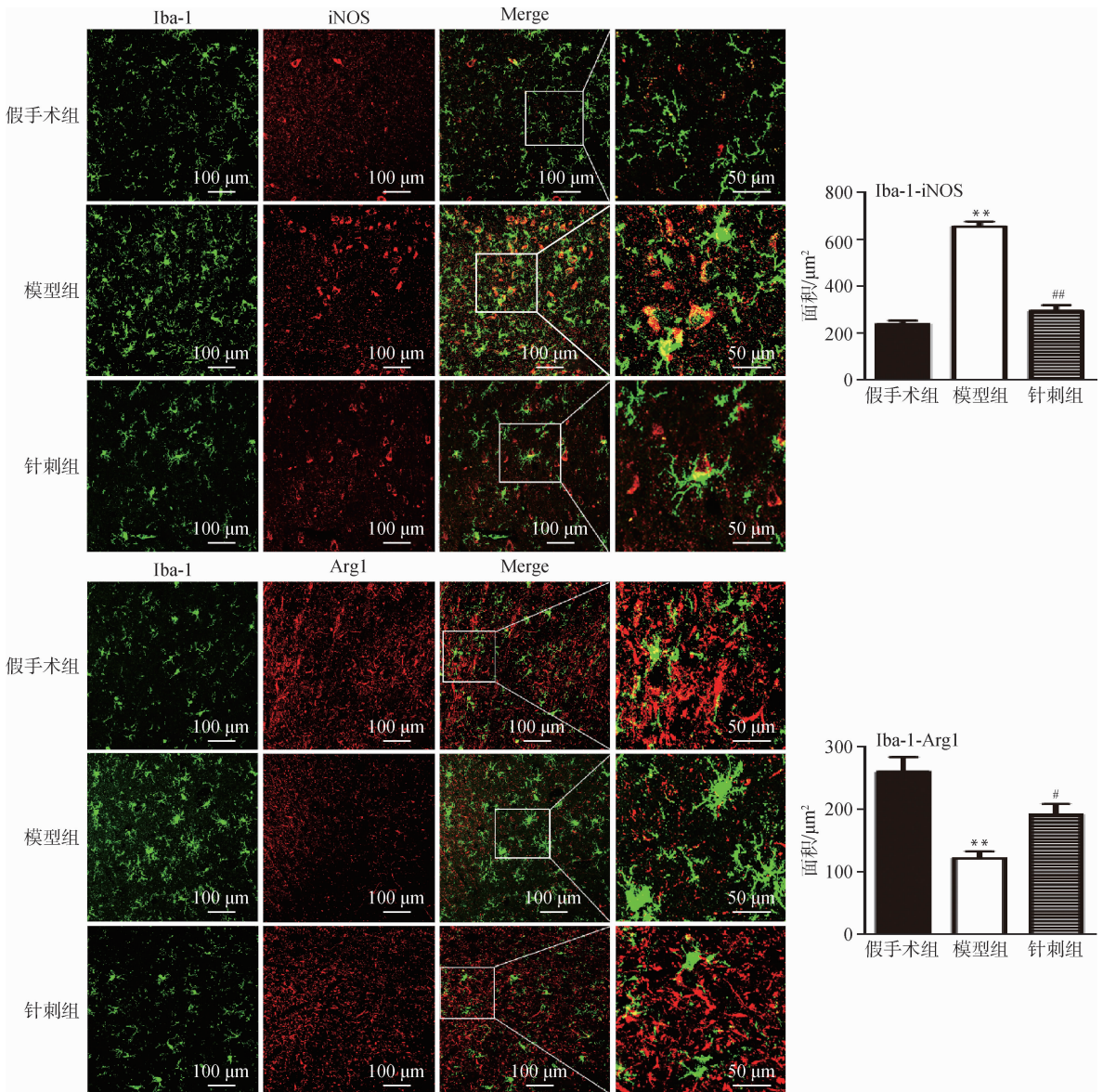
2.5 各组大鼠缺血侧脑组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量的比较

与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧脑组织中 TNF- α 、IL-6 含量明显升高($P < 0.01$),IL-10 含量明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,针刺组缺血侧脑组织中 TNF- α 、IL-6 含量明显降低($P < 0.01$),IL-10 含量明显升高($P < 0.01$)。见图 6。



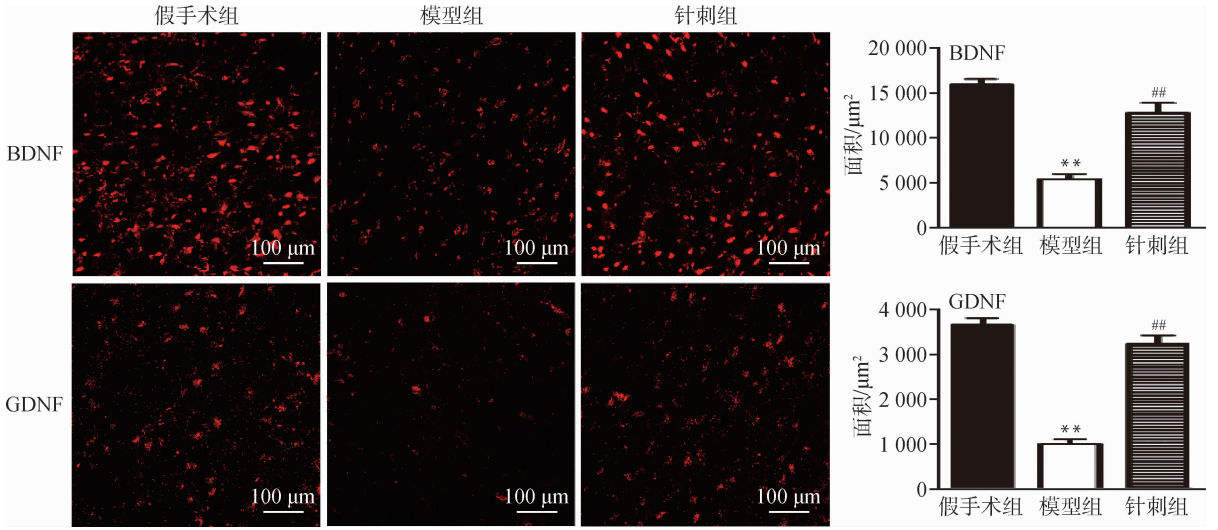
注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠缺血侧皮质区 NeuN、Iba-1 阳性表达的比较(免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s$, 5 只鼠/组)



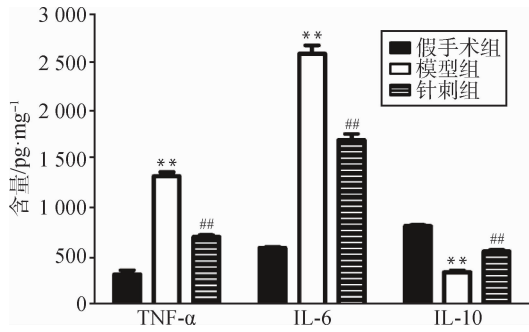
注:最右列图为 Merge 列方框处的放大图。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠缺血侧皮质区小胶质细胞和 iNOS、Arg1 共表达的比较(免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s$, 5 只鼠/组)



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

图5 各组大鼠缺血侧皮质区 BDNF 和 GDNF 阳性表达的比较(免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s$,5 只鼠/组)

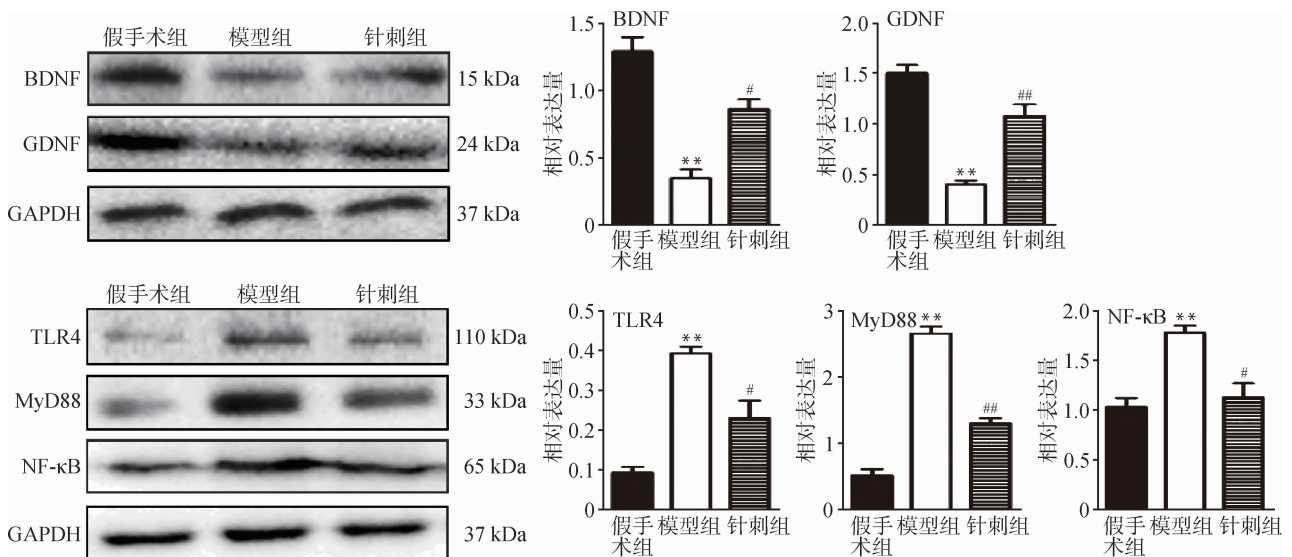


注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠缺血侧脑组织 TNF-α、IL-6 和 IL-10 含量比较($\bar{x} \pm s$,5 只鼠/组)

2.6 各组大鼠缺血侧脑组织中 BDNF、GDNF、TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平的比较

与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧脑组织中 BDNF 和 GDNF 蛋白表达水平降低($P < 0.01$), TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平升高($P < 0.01$)。与模型组比较,针刺组缺血侧脑组织中 BDNF 和 GDNF 蛋白表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 7。



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

图7 各组大鼠缺血侧脑组织 BDNF、GDNF、TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$,5 只鼠/组)

3 讨论

缺血性中风是一种严重危害人类健康的脑血管疾病。据统计,2016年全球约有270万人死于该病,并逐年增加^[12],且致残率很高。针刺和电针都是修复脑损伤和改善急性缺血性中风后功能预后的较佳治疗方法^[13-14],其临床疗效肯定,且具有安全、经济等优势。大椎、水沟、百会、足三里和风池在缺血性脑卒中治疗中疗效肯定^[15-16]。本研究选择上述穴位进行针刺,结果显示可明显改善脑 I/R 大鼠的神经功能,减轻神经元损伤。

小胶质细胞是中枢神经系统中的固有免疫细胞,可分为 M1 型和 M2 型。M1 型是典型的活化小胶质细胞,脑损伤时可被诱导活化,且表达 CD86、CD16 和 CD32 等分子,并倾向于释放损伤性介质,如 TNF- α 、iNOS、IL-1 β 、IL-6 和一氧化氮等。相反, M2 型小胶质细胞表达 Arg1、Ym1/2、CD206 等分子,并产生保护性介质,如 IL-4、IL-10、转化生长因子 β 等^[17]。研究^[18]表明小胶质细胞和浸润的巨噬细胞在中风后最初向 M2 抗炎表型分化,但逐渐转变为有害的 M1 促炎表型。脑 I/R 损伤的炎性特征是小胶质细胞的迅速激活和炎性细胞的浸润^[19]。小胶质细胞在生理状态下处于静止状态,形态学上表现为具有长突起的小细胞体。当大脑遭受炎症反应、感染、创伤或其他神经损伤时,小胶质细胞迅速激活并发挥吞噬作用^[6]。小胶质细胞活化最显著的特征是胞体增大、突起缩短。本研究通过免疫荧光和激光共聚焦技术观察到,在假手术组大鼠的大脑皮层中,Iba-1 阳性的小胶质细胞表现出细胞体小、突起少而细长的典型形态学特征。而 I/R 后第 7 天,模型组大鼠缺血侧皮质区小胶质细胞胞体变大,突起增多增粗,且 Iba-1 表达显著增加,说明小胶质细胞处于激活状态,并且 M1 型小胶质细胞标志物 iNOS 的表达显著增加,同时脑组织中促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的含量增加,证实脑 I/R 损伤可诱导小胶质细胞激活并向 M1 型极化,进而促发神经炎性反应。而针刺治疗后,大鼠缺血侧皮质区 Iba-1、iNOS 表达减少, M2 型小胶质细胞标志物 Arg1 的表达显著增加,促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的含量下调,抑炎细胞因子 IL-10 的含量上调,说明针刺治疗可抑制脑 I/R 后小胶质细胞向 M1 型的极化,并促进其向 M2 型极化,从而缓解脑内炎性反应。

BDNF 属于神经营养素家族的成员,是一种分泌性多肽,分布于中枢神经系统和其他器官,参与许多细胞过程^[20]。BDNF 可以通过阻断 Caspase-3 的

激活,改善 I/R 诱导的脑损伤,并且可以支持胆碱能神经元的存活,抑制脑缺血缺氧引起的脑损伤,改善空间学习和记忆障碍^[21]。BDNF 还可通过外源性供应减少脑缺血后梗死面积,改善神经预后^[22]。GDNF 是有效的神经营养蛋白,能够促进神经元的存活,并调节其增殖分化和突触功能^[23]。将含有 GDNF 基因和 GDNF 蛋白的病毒载体注射到缺血后的大鼠脑内,可以显著缩小梗死面积^[24]。M2 型小胶质细胞除了分泌抑炎细胞因子外,还可以分泌 BDNF 和 GDNF 而发挥神经保护作用,促进神经元存活^[25-26]。本实验中免疫荧光染色和 Western blot 的结果均显示针刺治疗可以上调脑 I/R 损伤大鼠脑组织中 BDNF 和 GDNF 的表达,改善神经细胞的损伤,这也进一步证实了针刺治疗可以促使脑 I/R 后小胶质细胞向 M2 型极化。

TLR4 在启动免疫反应中发挥着重要作用^[27]。TLR4 在脑内各类神经细胞中表达,识别脂多糖并激活。TLR4 激活后,迅速募集 MyD88,进而激活 NF- κ B 信号,这是神经炎性反应的核心。过度活化的 NF- κ B 导致大量促炎细胞因子的释放,并进一步触发炎性反应,激活小胶质细胞和星形胶质细胞,从而促进炎性反应的放大^[28]。在缺血性中风发病后的最初几个小时内,NF- κ B 表达增加,并在数天内持续升高^[29]。本实验中,模型组 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 表达增加,表明脑 I/R 发生后,TLR4 炎性信号通路被激活,而针刺治疗可通过抑制 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 的表达,抑制 TLR4 信号通路的激活。

综上所述,本研究结果显示,针刺能减轻脑 I/R 后小胶质细胞的过度活化,抑制小胶质细胞向 M1 型极化,促进其向 M2 型极化,并能下调 IL-6 和 TNF- α 的含量,上调 IL-10 的含量,改善神经炎性反应,促进 BDNF 和 GDNF 的表达,其作用机制可能与针刺抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 炎性信号通路的激活有关。

参考文献

- [1] KATAN M, LUFT A. Global burden of stroke[J]. *Semin Neurol*, 2018, 38(2): 208-211.
- [2] KURIAKOSE D, XIAO Z C. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7609.
- [3] CHEN H S, HE Y C, CHEN S, et al. Therapeutic targets of oxidative/nitrosative stress and neuroinflammation in ischemic stroke: applications for natural product efficacy with omics and systemic biology [J]. *Pharmacol Res*, 2020,

- 158; 104877.
- [4] LI W T, YE A Q, AO L Y, et al. Protective mechanism and treatment of neurogenesis in cerebral ischemia[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(10): 2258-2277.
- [5] LAMBERTSEN K L, BIBER K, FINSEN B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(9): 1677-1698.
- [6] CIANCIULLI A, PORRO C, CALVELLO R, et al. Microglia mediated neuroinflammation: focus on PI3K modulation [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 137.
- [7] JIANG C T, WU W F, DENG Y H, et al. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(5): 2006-2018.
- [8] MA S, FAN L L, LI J C, et al. Resveratrol promoted the M2 polarization of microglia and reduced neuroinflammation after cerebral ischemia by inhibiting miR-155[J]. *Int J Neurosci*, 2020, 130(8): 817-825.
- [9] FAMA KIN B M, VEMUGANTI R. Toll-like receptor 4 signaling in focal cerebral ischemia: a focus on the neurovascular unit[J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(6): 2690-2701.
- [10] 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]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2017, 12(4): 575-592.
- [11] 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.
- [12] SAINI V, GUADA L, YAVAGAL D R. Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions [J]. *Neurology*, 2021, 97(20 Suppl 2): S6-S16.
- [13] CHANG Q Y, LIN Y W, HSIEH C L. Acupuncture and neuroregeneration in ischemic stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(4): 573-583.
- [14] 田亮, 杜小正, 王金海, 等. 手针与电针治疗急性缺血性脑卒中偏瘫的对比研究 [J]. *中国针灸*, 2016, 36(11): 1121-1125.
- [15] TIAN H M, ZHANG H, ZHU J B, et al. Acupuncture activates signal transduction pathways related to brain-tissue restoration after ischemic injury[J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(24): 1866-1872.
- [16] 孙其斌, 高敬辉, 李彦龙, 等. 头清胶囊联合针刺风池和百会穴治疗急性缺血性脑卒中临床疗效[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(6): 2236-2238.
- [17] LYU J X, XIE D, BHATIA T N, et al. Microglial/macrophage polarization and function in brain injury and repair after stroke[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(5): 515-527.
- [18] HU X M, LI P Y, GUO Y L, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2012, 43(11): 3063-3070.
- [19] MO Y, SUN Y Y, LIU K Y. Autophagy and inflammation in ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(8): 1388-1396.
- [20] DI CARLO P, PUNZI G, URSINI G. Brain-derived neurotrophic factor and schizophrenia[J]. *Psychiatr Genet*, 2019, 29(5): 200-210.
- [21] KALINICHENKO S G, MATVEEVA N Y, KOROBTSOV A V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a regulator of apoptosis under conditions of focal experimental stroke [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2020, 169(5): 701-706.
- [22] SCHÄBITZ W R, STEIGLEDER T, COOPER-KUHN C M, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis[J]. *Stroke*, 2007, 38(7): 2165-2172.
- [23] ALLEN S J, WATSON J J, SHOEMARK D K, et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(2): 155-175.
- [24] YAMASHITA T, ABE K. Recent progress in therapeutic strategies for ischemic stroke[J]. *Cell Transplant*, 2016, 25(5): 893-898.
- [25] KATSURAGI S, IKEDA T, DATE I, et al. Grafting of glial cell line-derived neurotrophic factor secreting cells for hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(4): 1137-1145.
- [26] ZHOU D D, JI L, CHEN Y G. TSPO modulates IL-4-induced microglia/macrophage M2 polarization via PPAR- γ pathway[J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(4): 542-549.
- [27] LIU B Z, GU Y, PEI S S, et al. Interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK)-M-mediated type 2 microglia polarization ameliorates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [J]. *J Autoimmun*, 2019, 102: 77-88.
- [28] KUMAR V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation[J]. *J Neuroimmunol*, 2019, 332: 16-30.
- [29] LIU W L, WANG X, YANG S L, et al. Electroacupuncture improves motor impairment via inhibition of microglia-mediated neuroinflammation in the sensorimotor cortex after ischemic stroke[J]. *Life Sci*, 2016, 151: 313-322.

收稿日期:2021-09-22 修回日期:2022-02-01

网络首发:2022-10-14 编辑:徐晖