

基于神经血管单元稳态探讨巨刺法改善大脑中动脉闭塞大鼠运动功能机制的研究*

胡梦艺¹ 石丽红⁴ 杨珊莉^{2,3} 饶婷^{1,2} 游咏梅^{2,3} 江一静^{2,3,5}

摘要

目的:基于神经血管单元稳态探讨巨刺法改善大脑中动脉闭塞模型(MCAO)大鼠运动功能的机制。

方法:将48只雄性SD大鼠随机分为假手术组(IS组)、模型组(IC组)、巨刺组(ON组)、非穴组(FON组)(各12只)。其中IC组、ON组及FON组大鼠制备MCAO模型,成模后ON组接受电针健侧“曲池”和“足三里”,FON组取穴位置的旁开5mm处电针干预7天,IS组和IC组不进行电针干预,仅进行模拟抓取。使用改良神经功能缺损评分(mNSS)评测各组大鼠神经功能;应用CatWalk步态分析对比各组大鼠运动功能;应用小动物磁共振成像系统行弥散张量成像(diffusion tensor imaging,DTI)扫描,使用DTI衍生参数测量运动皮质、纹状体神经传导束各向异性分数比值(ratio fractional anisotropy,rFA);应用TTC染色观察脑梗死体积,应用免疫荧光法检测脑缺血侧运动皮质神经元核蛋白(neuronal nuclei,NeuN)的表达变化;应用免疫组织化学法检测血小板-内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1,PECAM-1/CD31)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)、钙结合蛋白(ionized calcium binding adapter molecule 1,Iba1)表达变化;应用Western Blot法检测闭锁连接蛋白-1(zonula occludens 1,ZO-1)及闭合蛋白(Occludin)的表达变化。

结果:干预7天后,与IC组相比,ON组大鼠神经功能评分、mNSS评分降低($P<0.05$);与IC组、FON组相比,ON组的平均运动速度加快、足印最大接触面积增加($P<0.05$);与IC组、FON组相比,ON组的梗死体积减少、rFA值相对增加($P<0.05$);与IC组、FON组相比,ON组的NeuN阳性细胞表达明显升高($P<0.05$);与IC组、FON组相比,ON组的CD31表达显著升高、GFAP和Iba1的表达显著降低($P<0.05$);与IC组、FON组相比,ON组的ZO-1、Occludin蛋白表达均显著升高($P<0.05$)。CatWalk步态参数、免疫荧光、免疫组化与Western Blot检测结果改善有一致性。

结论:巨刺法改善MCAO大鼠运动功能,其机制可能与修复神经血管单元稳态有关。

关键词 卒中;巨刺;运动功能;神经血管单元;阳明经穴

中图分类号:R743.3,R245,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-08-1009-09

The mechanism of "opposing needling" on improving motor function in MCAO rats based on the steady state of neurovascular units/HU Mengyi,SHI Lihong,YANG Shanli, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2022,37(8):1009—1017

Abstract

Objective: The aim of present study was to explore the mechanism of the giant puncture in improving the motor function of the middle cerebral artery occlusion model(MCAO) rats based on the integrity of neurovascular unit.

Method: Totally 48 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group (IS group), model group (IC group), giant spur group (ON group), non-acupoint group (FON group) (12 rats in each group). MCAO models were produced for rats in the IC group, ON group, and FON group. After the

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.08.001

*基金项目:国家自然科学基金项目(81904268);福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目(2019-ZQN-81);福建省自然科学基金面上项目(2020J1763)

1 福建中医药大学,福建省福州市,350122; 2 福建中医药大学附属康复医院; 3 福建省康复技术重点实验室; 4 成都中医药大学; 5 通讯作者

第一作者简介:胡梦艺,女,硕士研究生; 收稿日期:2022-02-19

modeling, the ON group received electroacupuncture at the contralateral side "Quchi" and "Zusanli", and the FON group received electroacupuncture at a 5mm side of the acupoint selection position. After 7 days of intervention, the IS group and IC group did not perform electroacupuncture intervention, only simulated grabbing. The modified neurological deficit score(mNSS) was used to detect the neurological function of each group of rats; CatWalk gait analysis was used to compare the motor function of each group; small animal magnetic resonance imaging system was used to perform diffusion tensor imaging(DTI) scan and DTI-derived parameters measured the ratio fractional anisotropy(rFA) of motor cortex and striatum nerve conduction bundles; TTC staining was used to observe cerebral infarction volume, immunofluorescence method was used to detect neuronal nuclei in the motor cortex on the cerebral ischemic side, NeuN expression changes; immunohistochemical method was used to detect platelet endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM-1/CD31), glial fibrillary acidic protein (GFAP), calcium Binding protein (ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1) expression changes; Western Blot method was used to detect the expression changes of zonula occludens 1,ZO-1 and Occludin.

Result: After 7 days of intervention, compared with the IC group, the neurological function score and mNSS score of the ON group decreased ($P<0.05$); compared with the IC group and the FON group, the ON group had faster average movement speed and maximum foot print contact area increased ($P<0.05$); compared with the IC group and FON group, the infarct volume of the ON group was reduced, and the rFA value relatively increased ($P<0.05$); compared with the IC group and FON, the expression of NeuN positive cells in the ON group obviously increased ($P<0.05$); compared with the IC group and FON group, the CD31 expression in the ON group significantly increased, and the expression of GFAP and Iba1 significantly was reduced ($P<0.05$); compared with the IC group and the FON group, the ON group the expression of ZO-1 and Occludin protein significantly increased ($P<0.05$). The improvements of catwalk gait parameters, immunofluorescence, immunohistochemistry and Western Blot detection results had consistent results.

Conclusion: The opposing needling improves the motor function of MCAO rats, and its mechanism may be related to the repair of neurovascular unit homeostasis.

Author's address Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122

Key word stroke; opposing needling; motor function; neurovascular unit; Yangming meridian points

脑卒中是导致50岁以上人群死亡、残疾的主要原因,其中缺血性脑梗死是脑卒中的主要类型^[1],约70%—80%的幸存者留有后遗症^[2],给家庭、社会带来沉重的负担^[3]。《中国脑卒中康复治疗指南》指出,传统针刺疗法可改善脑卒中瘫痪患者的运动功能^[4]。巨刺法是一种取穴于健侧而不在患侧取穴、左右交叉取穴的传统针刺疗法,课题组前期临床研究与动物实验均表明巨刺法干预后有益于康复进程^[5-7],但作用机制尚未完全明确。

脑白质体积接近人脑体积的50%,由大量神经纤维聚集而成,纤维束完整性是脑组织灰质与白质连接的生理基础。有研究显示脑白质对缺血缺氧的敏感性远高于灰质,白质纤维损伤被视为脑缺血诊断的重要病理指标,增加脑白质的纤维束数量,恢复灰质与白质之间的联系完整性是改善急性脑梗死后脑功能缺损的重要方向^[8-9]。神经血管单元(neuro-

vascular unit, NVU)通过反馈神经元供应需求保证脑血管舒缩过程中必需物质处于稳定水平,是脑功能活动有序运作的重要基础^[10-11]。研究表明,缺血性脑卒中发生后,NVU稳态遭到破坏,组织缺血缺氧以及NVU各种成分间的相互作用,共同引起血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性增加、神经元功能障碍、神经传导束功能破坏,最终表现包括运动、认知、言语等功能障碍的神经功能缺损症状,阻碍缺血性脑卒中患者的康复进程^[12],由此维持NVU稳态是改善脑卒中后功能障碍的重要靶点。因此我们提出设想:巨刺法改善大脑中动脉闭塞(the middle cerebral artery occlusion model, MCAO)大鼠运动功能的作用机制是否可以通过修复NVU稳态,减轻脑组织灰质与白质损伤进行桥接?为了验证这一假说,我们进行了本研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: SPF级雄性的健康SD大鼠(180—220g),购自浙江省医学科学院(许可证号:SCXK(沪)2018-0004),饲养于福建中医药大学实验动物中心SPF级动物房。动物实验经福建中医药大学伦理委员会批准并同意(备案编号:2020035)。饲养条件:室温下自由饮食水,模拟日夜系统,湿度30%—50%,温度21—23℃。

1.1.2 试剂与仪器。

名称	厂家
7.0 T小动物磁共振仪	德国布鲁克公司
Anti-PECAM1/CD31 antibody (PB9094)	武汉博士德生物公司
Anti-NeuN antibody(ab177487)	Abcam
GFAP Rabbit Polyclonal antibody1(6825-1-AP)	Proteintech
IBA1Rabbit Polyclonal antibody (BM5765)	Proteintech
Occludin Mouse Monoclonal antibody(66378-1-Ig)	Proteintech
ZO-1 Rabbit Polyclonal antibody (21773-1-AP)	Proteintech
华佗牌电子针疗仪(SDZ-III)	苏州医疗用品厂有限公司
华佗牌针灸针(0.3mm×13mm)	苏州医疗用品厂有限公司
CatWalk步态分析系统(CatWalk XT 10.0)	Noldus信息技术有限公司
研究级生物显微镜(DM4000B)	Leica

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备: 48只健康雄性SD大鼠(180—220g),随机数字表法将大鼠分为IS组(n=12),IC组(n=12),ON组(n=12),FON组(n=12)。

参照Zea Longa^[13]线栓法并加以改良建立左侧MCAO模型。大鼠麻醉充分(角膜反射消失)后颈前区备皮消毒。沿颈部正中间做以一垂直切口,钝性分离直至暴露左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。使用4—0的缝合线结扎CCA近心端及ECA分叉处,微动脉夹将ICA夹闭且靠近远心端,在距离CCA结扎处远端约5mm处,做一“V”形切口并将MCAO线栓从CCA插入ICA近端,松解ICA微动脉夹,缓慢推动线栓至感轻微阻力,固定线栓,缝合消毒。将大鼠保温,90min后恢复再灌注。IS组仅分

离血管不进行结扎和线栓插入,余操作相同。

1.2.2 干预方法: 术后第2日开始进行干预,模拟抓取IS组及IC组大鼠,频率为1次/日;ON组在健侧电针曲池穴及足三里穴(取穴方法参照李忠仁主编《实验针灸学》^[14]);FON组在健侧曲池穴和足三里穴位分别向外平开5mm处取穴^[15],直刺3mm,提插捻转,连接上华佗牌多通道电针仪,每个通道包含一个正极夹和一个负极夹,正极夹曲池穴上的针灸针柄,负极夹足三里穴上的针灸针柄,疏密波,频率4—6Hz,电压峰值为6V,以大鼠局部肌肉节律性收缩为度,30min/次,1次/日,共7天。

1.2.3 检测指标与方法。

神经行为学评分: 分别测试4组大鼠术后24h以及干预7d的神经行为学评分,具体分组情况对评估者施盲。参考Zea Longa^[13]5级4分制法的评分标准评定神经功能,1—3分纳入实验,0分及4分不符合纳入标准则剔除;进行大鼠神经功能验证程度评分(modified neurological severity score, mNSS)共计18个小项,总分18分^[16]。

CatWalk步态分析: 为使实验动物充分熟悉跑道环境,于实验前对SD大鼠行CatWalk适应性训练3天,造模24h后、电针干预7天结束后接受CatWalk行为学测试。实验过程于暗室环境进行,每只实验对象采集≥3次合格数据。系统识别后对数据进行预处理(标记、核对每个脚印),产生相应的步态参数,记为1次。

小动物磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI): 干预后7d,使用7.0 T MRI(Bruker,德国)扫描仪进行扫描。扫描前吸入麻醉。扫描图像包括定位图,T2加权成像(T2-weighted image, T2WI)图及DTI图。T2WI使用弛豫增强快速采集序列(TR为4200ms,TE为35ms,层厚为1mm)。弥散敏感梯度为非共面且非共线的30个梯度方向的DTI图像(TR=7500ms,TE=45ms,5个b值为0及b=1000s/mm²)。DTI原始数据传入软件FSL 5.0.8中FMRIB'S Diffusion Toolbox软件包dtifit计算扩散张量,结合大鼠脑图谱^[17],确定感兴趣区(region of interest, ROI)为纹状体及运动皮质并分别提取各ROI平均FA值,rFA是通过对比健侧相同脑区的FA计算所得。

TTC染色:干预7d后,各组随机取5只实验对象,将取材的脑组织-20℃冰冻5min,沿冠状切以脑腹侧视交叉为中点切成2mm厚的脑片。将脑片置于1% 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC)磷酸缓冲液中,避光37℃烤箱内20min,4%多聚甲醛固定1h,并采用Image J 1.36b软件计算大鼠缺血侧脑梗死体积的百分比。每组取一只具有代表性的脑组织切片拍照展示,见图1。

免疫荧光检测:各组大鼠造模7d后,深度麻醉后分别用0.9% NaCl溶液和4℃预冷4%多聚甲醛充分灌流固定,石蜡包埋后制成5μm组织切片。脱蜡至水、修复抗原,经0.01M磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)漂洗,封闭120min,一抗(NeuN 1:300)4℃孵育过夜。滴加荧光素标记的二抗(山羊抗兔浓度为1:300),避光37℃孵育1h,封片。荧光显微镜下观察缺血侧脑皮质。图像分析:Leica荧光显微镜观察。随机选缺血侧运动皮质3—5个视野。采用Image J统计分析各视野内的阳性细胞数目。

免疫组织化学检测:石蜡块同样制成5μm厚的切片,脱蜡至水,滴加3% H₂O₂室温孵育,抗原修复液,封闭;分别加一抗GFAP、Iba1、CD31,4℃孵育8h以上;滴加山羊抗小鼠/兔IgG,37℃孵育;加链霉亲和素-过氧化物酶复合物,37℃孵育后PBS漂洗;DAB显色后PBS漂洗,苏木素复染、返蓝、脱水、透明、中性树脂封片。切片置于400倍视野下Leica显微镜观察脑缺血侧运动皮质及纹状体区,棕黄色免疫阳性细胞。随机选缺血侧运动皮质及纹状体区3—5个视野。采用Image J统计分析各视野内的阳性细胞数目。

Western Blot检测:部分大鼠断颈取缺血侧运动皮质加入裂解液,4℃离心取上清。测定蛋白浓度,加蛋白上样缓冲液(5倍稀释),震荡离心、煮沸变性。恒压电泳,参数为20V 15min,60V 30min,100V 50min。100V恒压转膜,转膜时间设置:β-actin、Occludin为65 min;ZO-1为230min。PVDF膜封闭。一抗孵育:PVDF膜漂洗后,分别加入一抗(稀释浓度分别为:β-actin: 1:20000; ZO-1: 1:10000; Occludin: 1:3000),4℃孵育过夜。二抗孵育:分别配置与一抗种属来源相同的二抗(浓度均为1:5000)。采用ECL化学发光法显影。数据分析:

使用Image J软件分析条带。

1.3 统计学分析

SPSS 26.0软件进行实验数据统计分析,结局统计由本研究不知情者完成。计数资料采用均数±标准差来表示,服从正态分布则组内比较采用配对t检验,多重组间比较采用单因素方差分析,方差齐者两两比较采用LSD法,方差不齐者选用Games-Howell法进行比较;不服从正态分布则采用非参数检验。 $P<0.05$ 视为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 动物情况

本实验将48只正常雄性SD大鼠按随机数字表分为12只假手术组,36只MCAO大鼠模型组,4组大鼠体重无显著性差异($P>0.05$),见表1。模型制作成功32只,死亡4只(术中死亡1只,术后24h时死亡3只),模型成功率为88%。干预至留取标本时,各组缺失的样本均再次制作模型补充至12只每组。

表1 各组大鼠造模前体重 ($\bar{x}\pm s, g$)

组别	例数	体重
IS组	12	275.67±8.20
IC组	12	275.58±9.18
ON组	12	275.58±9.27
FON组	12	76.92±8.43

2.2 TTC染色结果

假手术大鼠TTC染色均匀,呈红色,无梗死;MCAO大鼠左侧大脑出现明显白色梗死灶,说明模型制备成功。TTC染色结果如图1,表2所示。

2.3 mNSS神经功能评定结果

干预7d后,与IS组相比,IC组与FON组得分较高,有显著性差异($P<0.05$);与IC组、FON组相比,ON组的mNSS评分降低,存在显著性差异($P<0.05$),巨刺非穴组与模型组之间的无显著性差异($P>0.05$)。见表3。

2.4 CatWalk系统评分

干预7d后,与IC组、FON组比较,ON组大鼠步行速度增加、右前爪和右后爪的最大接触面积明显升高,有显著性差异($P<0.05$),FON组与IC组之间无显著性差异($P>0.05$)。见表4。

2.5 弥散张量成像各项异性分数检测结果

图1 大鼠脑组织TTC染色结果

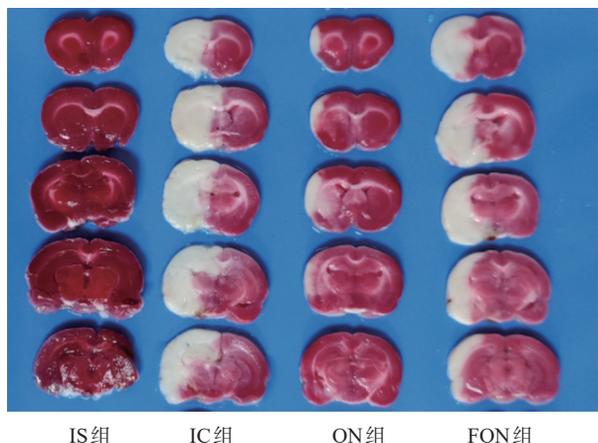


表2 各组大鼠梗死情况 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	梗死体积(%)
IS组	12	0
IC组	12	15.43±3.12
ON组	12	8.21±2.27 ^{①②}
FON组	12	14.53±3.43

注:与IC组比较:① $P<0.05$,与FON组比较:② $P<0.05$ 。

表3 各组大鼠mNSS评分结果比较 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	例数	治疗前	治疗后
IS组	9	0.00±0.00	0.00±0.00
IC组	9	10.00±1.936	6.33±2.550
ON组	9	9.00±1.414	3.56±1.236 ^{①②}
FON组	9	10.33±2.000	5.78±1.922

注:与模型组比较:① $P<0.05$,与电针非穴组比较:② $P<0.05$ 。

表4 各组大鼠运动速度干预前后均值差、右前爪及右后爪最大接触面积干预前后均值差

组别	例数	运动速度	右前爪最大接触面积($\bar{x}\pm s$,mm/s)	右后爪最大接触面积($\bar{x}\pm s$,mm ²)
IS组	9	11.494±21.645	7.344±7.186	1.164±12.252
IC组	9	-9.515±13.655	4.371±5.277	8.633±6.035
ON组	9	50.274±15.612 ^{①②}	16.725±5.614 ^{①②}	16.646±10.849 ^{①②}
FON组	9	3.951±15.704	-0.142±10.350	5.964±6.866

注:与IC组比较:① $P<0.05$,与FON组比较:② $P<0.05$ 。

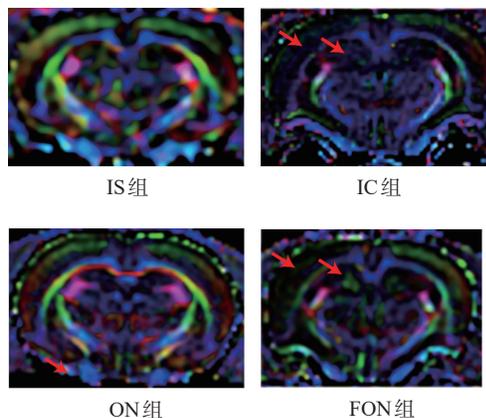
IC组纹状体及运动皮质rFA较IS组明显下降($P<0.05$),ON组纹状体及运动皮质rFA均较IC组、FON组增高($P<0.05$)。见图2、表5。

2.6 免疫荧光检测结果

干预7d后,与IC组、FON组相比,ON组的NeuN阳性表达均增强,有显著性差异($P<0.05$);FON组NeuN阳性细胞数目较模型组比较无差异($P>0.05$)。见图3。

2.7 免疫组织化学检测

图2 各组大鼠FA值图



注:红色箭头区域FA值下降。

表5 各组大鼠纹状体区rFA及NeuN阳性细胞数结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	纹状体rFA	运动皮质rFA	NeuN(个)
IS组	3	1.03±0.02	1.03±0.03	86.556±1.072
IC组	3	0.63±0.23	0.65±0.43	61.639±2.055
ON组	3	1.04±0.03 ^{①②}	1.03±0.01 ^{①②}	71.711±3.044 ^{①②}
FON组	3	0.75±0.14	0.77±0.08	58.861±4.460

注:与IC组比较:① $P<0.05$,与FON组比较:② $P<0.05$ 。

干预7d后,与IS组相比,IC组运动皮质区CD31阳性细胞均增加,差异具有显著性意义($P<0.05$)。与IC组、FON组相比,ON组CD31阳性表达明显增加,差异有显著性意义($P<0.05$);模型组与巨刺非穴组之间无显著差异($P>0.05$)。见图4。

IS组GFAP阳性细胞在缺血侧运动皮质区分布较少。干预7d后,与IS组相比,IC组运动皮质区GFAP阳性细胞均显著增加,有显著性差异($P<0.05$)。与IC组、FON组相比,ON组GFAP阳性细胞数明显降低,有显著性差异($P<0.05$),IC组与FON组之间无差异($P>0.05$)。见图5。

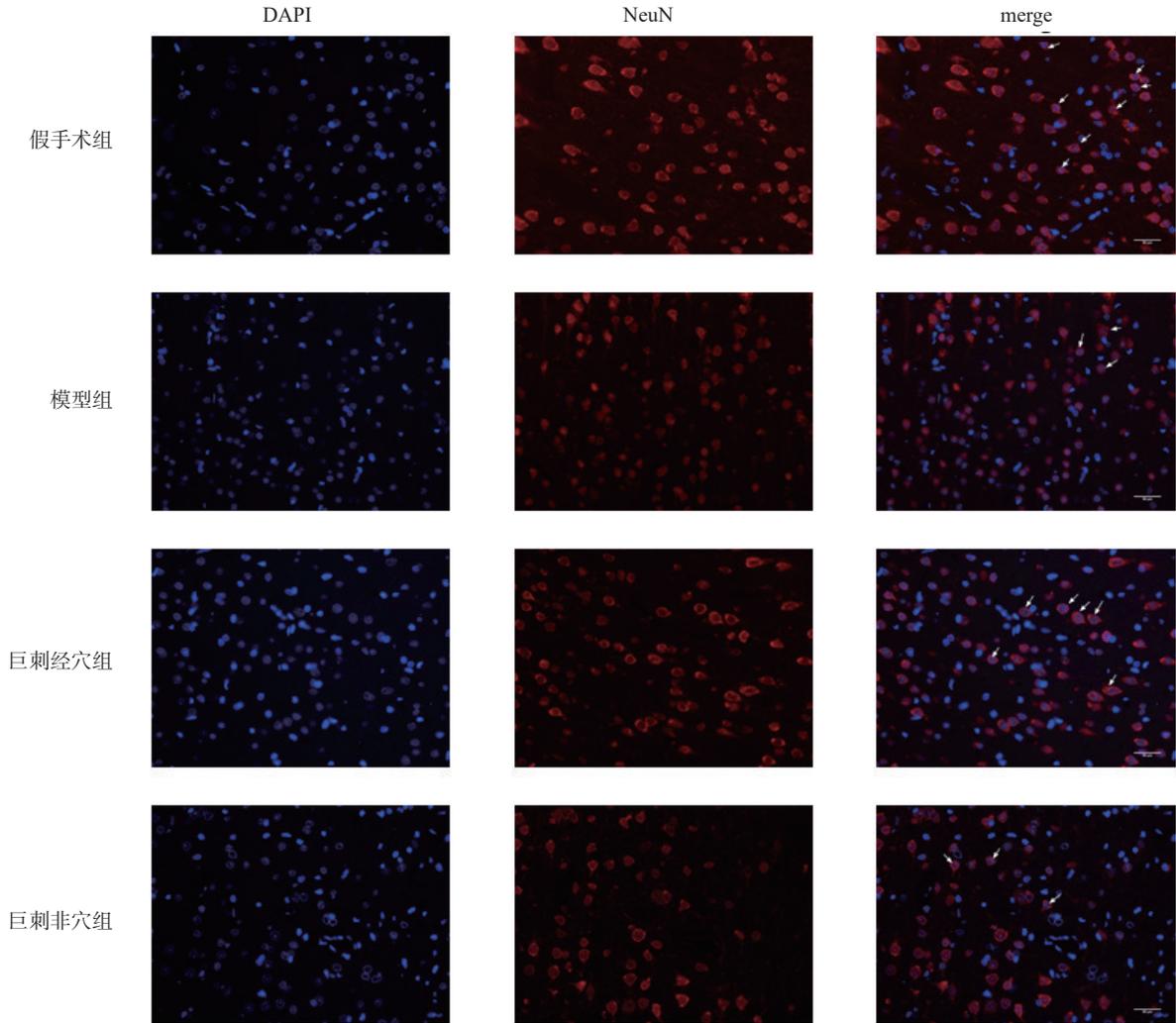
IS组Iba1蛋白阳性细胞少量分布在缺血侧运动皮质区。与IS组相比,IC组运动皮质区Iba1蛋白阳性细胞均增加,差异具有显著性意义($P<0.05$)。与IC组、FON组相比,ON组Iba1阳性细胞数目明显降低,有显著性差异($P<0.05$),IC组与FON组之间无差异($P>0.05$)。见图6,表6。

2.8 Western Blot检测结果

干预7天后,与IS组相比,IC组缺血侧运动皮质Occludin和ZO-1蛋白的表达水平均明显降低,有显著性差异($P<0.05$)。与IC组、FON组相比,ON组

图3 各组大鼠缺血侧运动皮质区 NeuN 阳性细胞表达情况

(×400, n=3)



注:白色箭头所示为 NeuN 阳性细胞。

Occludin 和 ZO-1 蛋白表达含量均明显升高,有显著性差异 ($P<0.05$); FON 组与 IC 组之间 Occludin 和 ZO-1 蛋白的表达差异均无显著性意义 ($P>0.05$)。见图 7。

表6 各组大鼠缺血侧运动皮质 CD31、GFAP、Iba1 阳性细胞数结果比较 ($\bar{x}\pm s$, 个)

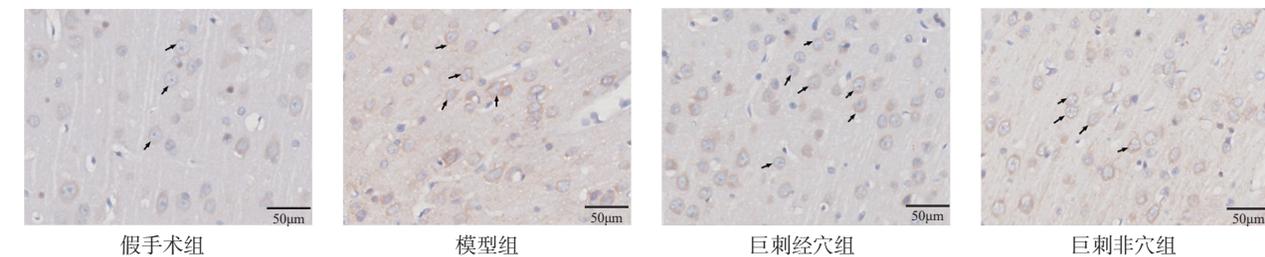
组别	例数	CD31	GFAP	Iba1
IS组	3	22.889±2.835	10.833±1.590	4.789±0.517
IC组	3	31.764±3.580	19.328±1.875	9.178±1.888
ON组	3	52.607±4.247 ^{①②}	12.181±0.450 ^{①②}	6.294±1.362 ^{①②}
FON组	3	31.726±2.887	16.869±1.726	9.556±0.509

注:与 IC 组比较:① $P<0.05$,与 FON 组比较:② $P<0.05$ 。

3 讨论

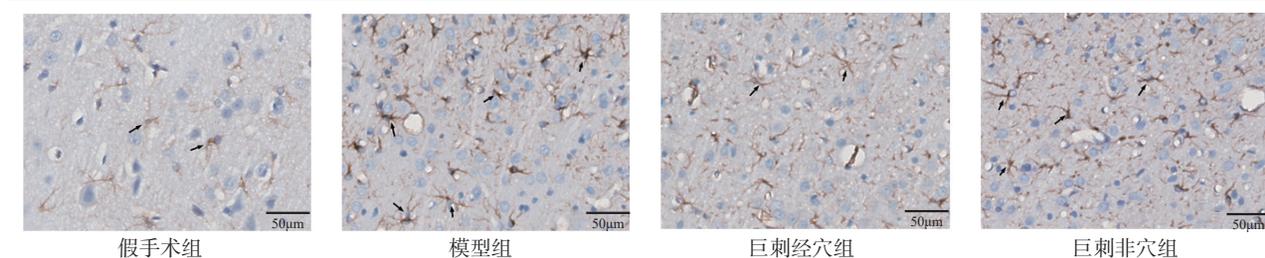
“巨刺”首见于《灵枢·官针》，作为古老的针刺方法,常被用于脑卒中偏瘫的治疗。王国瑞的《扁鹊神应针灸玉龙经》中阐述:“中风半身不遂,左瘫右痪,先于无病手足针;次针其有病手足”。《针灸大成·治症总要》曰:“阳症,中风不语,手足瘫痪者,……先针无病手足,后针有病手足。阴症,中风,半身不遂、拘急、手足拘挛,此是阴症也,……先针无病手足”。《针灸逢源卷五·中风门》有云:“半身不遂,此由气血不周,一名偏枯是也,或但手不举,口不能言,而无他症者,……绝骨、足三里,以上穴先针无病手足,后针有

图4 各组大鼠缺血侧 CD31 阳性细胞的分布与表达 (×400)



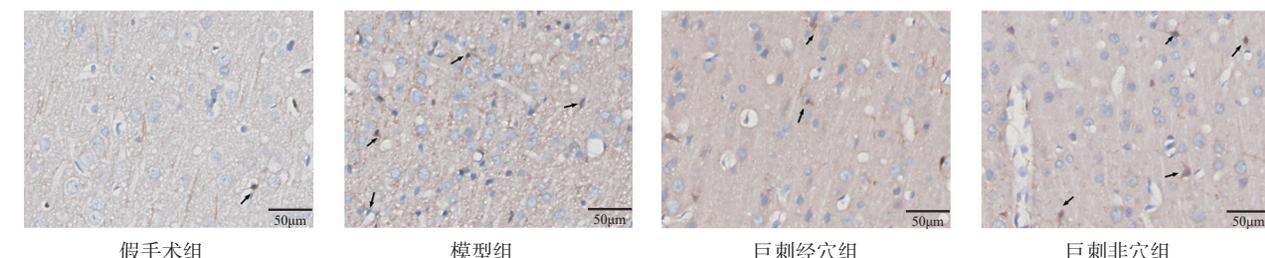
注:黑色箭头所示为CD31 阳性细胞。

图5 各组大鼠缺血侧 GFAP 阳性细胞的分布与表达 (×400)



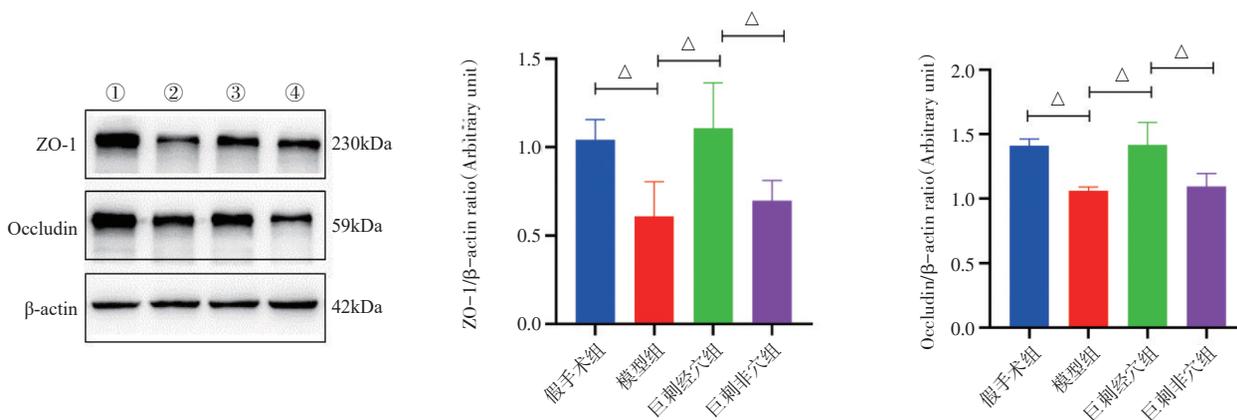
注:黑色箭头所示为GFAP 阳性细胞。

图6 各组大鼠缺血侧 Iba1 阳性细胞的分布与表达 (×400)



注:黑色箭头所示为Iba1 阳性细胞。

图7 缺血侧运动皮质区 Western Blot 结果



注:两组比较:ΔP<0.05。①②③④分别为IS组、IC组、ON组、FON组(n=4),每组一只具有代表性的蛋白条带图。

病手足”。因此“巨刺”是以“左取右,右取左”,健侧取穴的一种针刺方法。由于经脉之气“阴阳相贯,如环无端”(《灵枢·营卫生会》),不仅互相交会循行,且左右两侧同名经脉经过脏腑、任脉、督脉、带脉等横向连接沟通,故有《素问·阴阳印象大论》:“善用针者,从阴引阳,从阳引阴……”,其在治疗脑卒中后诸症的历史渊远流长,如晋代《针灸甲乙经》中提到“偏枯,身偏不用而痛,言不变,智不乱,病在分腠之间,巨刺取之”。神经解剖学也为巨刺法提供理论依据:在运动传导径路中不交叉部分纤维以及脊髓、脑干网状结构、丘脑非特异投射系统的作用及大脑皮质是巨刺法产生作用的重要结构基础。临床试验中缺血性脑卒中患者的改良 Ashworth 肌张力、Fugl-Meyer 量表、改良 Barthel 指数的量表评估显示针刺疗法可改善脑卒中患者运动功能^[18-19]。本课题组前期通过文献梳理及多中心、大样本研究发现巨刺法对缺血性脑卒中后运动障碍有明确疗效,可改善其肢体的运动功能、日常生活活动能力及平衡功能^[20-22],动物实验结果同样显示巨刺“曲池、足三里”可明显降低 MCAO/R 大鼠神经行为学评分及 H 反射潜伏期,增加 H 反射波幅^[23-24]。

本实验在课题组前期研究基础上,通过 TTC 染色观察可对比 IC 组和 FON 组,巨刺“曲池、足三里”治疗的 MCAO/R 大鼠梗死灶体积更小,同时神经行为学测试和 mNSS 评分结果同样显示,巨刺法治疗后,MCAO/R 大鼠的神经功能缺损情况得到改善,而 IC 组和 FON 组的改善情况不如 ON 组。通过动物行为学 CatWalk 步态分析结果显示,ON 组动态参数运动速度较快与静态参数偏瘫侧肢体的脚印接触面积增加,表明进行巨刺法干预后的 MCAO/R 大鼠的肢体运动功能和能力确实得到提高,与 IC 组和 FON 组对比,疗效确切,该结果与以往研究结果类似,提示巨刺法能够有效改善 MCAO/R 大鼠运动功能。

现代学术认为,NVU 稳态对缺血损伤后神经元功能和连接发挥作用具有重要作用^[25]。脑缺血后 NVU 稳态破坏,神经传导束受影响进而导致缺血区神经元功能与连接下降^[26]。另一方面,NVU 细胞产生的营养因子减少,增加神经元和神经胶质面对缺血损伤时的脆弱性^[27]。研究发现,通过促进 MCAO 大鼠脑梗死区神经元和血管内皮细胞功能恢复,抑

制胶质细胞活化,多途径保护 NVU,可改善大鼠的神经功能缺损症状以及促进运动功能的恢复^[28],一些基于 NVU 稳态的治疗已被证明对缺血性损伤具有保护作用^[29]。近年来白质损伤在缺血性脑病中获得关注。脑组织缺血导致的功能障碍与白质纤维连接破坏和重塑密切相关^[8]。白质主要包含有髓鞘轴突与无髓鞘轴突延长成的纤维束及周围的神经胶质细胞和血管,且随年龄增长白质纤维对缺血更敏感^[30]。有研究利用 DTI 观察针刺治疗后缺血性脑卒中患者在梗死区及梗死周围白质纤维束结构完整性相较于对照组有改善^[31]。祖国针刺疗法具有多成分、多靶点、多途径调节机制,益于缺血性脑卒中后功能障碍的恢复。那么,巨刺法对 MCAO/R 大鼠运动功能的治疗作用是否可以介导运动相关皮质的 NVU 稳态及神经纤维束结构完整性?

NVU 由微血管、胶质细胞、神经元、轴突和其他辅助细胞组成^[32-33]。本实验为研究 NVU 微观结构变化,选用与 NVU 各成员密切相关的标志物,利用小动物磁共振 DTI 中基于 ROI 的分析法以运动皮质及纹状体的 FA 值作为观察指标,发现造模后 MCAO/R 大鼠缺血侧运动皮质 CD31(血管内皮细胞标记)表达相对增加,内管内皮细胞因缺血代偿性增生;NeuN(神经元标记)、ZO-1、Occludin(神经血管单元紧密连接结构标记)表达相对较少,神经元损伤与神经血管单元紧密连接结构受损;GFAP、Iba1(胶质细胞标记)表达增加,星形胶质细胞与小胶质细胞被活化,阻碍了神经细胞之间的信号转导并产生炎症因子;同时缺血侧运动皮质及纹状体区 rFA 值下降,FA 值是 DTI 扫描中对白质纤维完整性的最敏感的参数之一,该数值越大则表明 ROI 平均神经传导能力越强,能够反映髓鞘完整性、神经纤维致密性^[34]。而巨刺“曲池、足三里”干预 7 天后大鼠缺血侧运动皮质、纹状体区 rFA 值升高,伴随增加的血管内皮新生、神经元损伤减少、神经血管单元紧密结构的破坏程度降低、胶质细胞活化增生得到抑制。这说明巨刺法可以修复缺血后 NVU 稳态及神经纤维束结构完整性,促进神经纤维传导。

综合以上研究结果,“巨刺法”改善 MCAO 大鼠的运动功能障碍可能与修复 MCAO/R 大鼠的 NVU 稳态、改善运动相关脑区的神经传导能力有关。本

文从脑白质神经血管单元完整性的角度探讨巨刺法对脑卒中后白质的影响,为临床中应用巨刺法改善缺血性脑卒中提供对应的实验依据,可为针刺干预防治脑卒中后运动障碍提供研究思路。

参考文献

- [1] Collaborators GN. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016[J]. *The Lancet Neurology*, 2019,18(5): 459—480.
- [2] Langhorne P, Coupar F, Pollock A. Motor recovery after stroke: a systematic review[J]. *The Lancet Neurology*, 2009, 8(8): 741—754.
- [3] Mehanna R, Jankovic J. Movement disorders in cerebrovascular disease[J]. *The Lancet. Neurology*, 2013,12(6): 597—608.
- [4] 张通. 中国脑卒中康复治疗指南(2011 完全版)[J]. *中国康复理论与实践*, 2012,18(4): 301—318.
- [5] 周小炫, 杨珊莉, 江一静, 等. 艾灸结合巨刺法治疗脑卒中后下肢痉挛性偏瘫临床研究[J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(2): 123—125.
- [6] 卿鹏. 巨刺法结合康复训练对缺血性脑卒中后神经可塑性的影响研究[D]. 广州中医药大学, 2012:3—6.
- [7] 江一静, 林志诚, 游咏梅, 等. 巨刺法对脑缺血再灌注损伤大鼠运动功能、脑影像结构及PI3K/AKT信号通路的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2019,34(9): 1014—1020.
- [8] Wang Y, Liu G, Hong D, et al. White matter injury in ischemic stroke[J]. *Progress in neurobiology*, 2016,141: 45—60.
- [9] Fields RD. Change in the brain's white matter[J]. *Science*, 2010,330(6005): 768—769.
- [10] Muoio V, Persson PB, Sendeski MM. The neurovascular unit: concept review[J]. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 2014,210(4): 790—798.
- [11] Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2003,4(5): 399—415.
- [12] Patabendige A, Singh A, Jenkins S, et al. Astrocyte activation in neurovascular damage and repair following ischaemic stroke[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021,22(8):4280.
- [13] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989,20(1): 84—91.
- [14] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003:564.
- [15] 李佳, 李静, 唐宏图, 等. 电针对类风湿性关节炎大鼠膝关节滑膜组织肿瘤坏死因子- α 转换酶/核转录因子- κ B信号通路的影响[J]. *针刺研究*, 2016,41(3): 6.
- [16] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(11): 2682—2688.
- [17] Valdés-Hernández PA, Sumiyoshi A, Nonaka H, et al. An in vivo MRI template set for morphometry, tissue segmentation, and fMRI localization in rats[J]. *Frontiers in Neuroinformatics*, 2011,5: 26.
- [18] 王丹丹, 赵斯文. 电针疗法联合康复治疗对急性缺血性脑卒中患者运动功能恢复的临床观察[J]. *现代实用医学*, 2019, 31(4): 16—17.
- [19] 叶佳踪, 吴登宠, 金永喜. 电针刺刺激拮抗肌侧腭穴联合康复训练治疗脑卒中后肌张力增高患者的临床观察[J]. *中国中医急症*, 2018,27(12): 2200—2202.
- [20] 高燕玲. 巨刺法结合康复训练治疗软瘫期脑卒中患者的临床研究[D]. 福建中医药大学, 2010:4—5.
- [21] 林奕君. 巨刺法结合康复训练改善脑卒中上肢痉挛的临床研究[D]. 福建中医药大学, 2010:4—5.
- [22] 刘颖, 王光义, 吕明庄, 等. 巨刺法结合中药治疗缺血性中风偏瘫的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(4): 351—353.
- [23] 江一静, 杨珊莉, 陶静, 等. 巨刺法对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制[J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29(7): 605—609.
- [24] 江一静. 从GABAB受体介导cAMP-PKa-CREB信号通路途径探讨巨刺法改善MCAO大鼠运动功能的作用机制[D]. 福建中医药大学, 2015:5—9.
- [25] Wang L, Xiong X, Zhang L, et al. Neurovascular unit: a critical role in ischemic stroke[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2021,27(1): 7—16.
- [26] Oztop-Cakmak O, Solaroglu I, Gursoy-Ozdemir Y. The role of pericytes in neurovascular unit: emphasis on stroke[J]. *Current Drug Targets*, 2017,18(12): 1386—1391.
- [27] Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease[J]. *Neuron*, 2017,96(1): 17—42.
- [28] 石永光. “醒脑开窍”针刺法对MCAO/R大鼠运动、记忆功能影响的精细评价及其机制研究[D]. 安徽中医药大学, 2020:6—8.
- [29] Ozaki T, Nakamura H, Kishima H. Therapeutic strategy against ischemic stroke with the concept of neurovascular unit[J]. *Neurochemistry International*, 2019,126: 246—251.
- [30] Matute C, Ransom BR. Roles of white matter in central nervous system pathophysiology[J]. *ASN Neuro*, 2012, 4(2):e00079.
- [31] Shen Y, Li M, Wei R, et al. Effect of acupuncture therapy for postponing Wallerian degeneration of cerebral infarction as shown by diffusion tensor imaging[J]. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2012,18(12):1154—1160.
- [32] Boeckh-Behrens T, Kleine J, Kaesmacher J. The CD31 molecule: a possible neuroprotective agent in acute ischemic stroke[J]. *Thrombosis Journal*, 2017,15(1):11.
- [33] Liu LR, Liu JC, Bao JS, et al. Interaction of microglia and astrocytes in the neurovascular unit[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020,11: 1024.
- [34] Bergamino M, Walsh RR, Stokes AM. Free-water diffusion tensor imaging improves the accuracy and sensitivity of white matter analysis in Alzheimer's disease[J]. *Scientific Reports*, 2021,11(1): 6990.