·基础研究·

电针早期干预对肌萎缩侧索硬化症小鼠大脑皮层TDP-43及HMGB1/RhoA信号通路的影响*

卢苑蓉[1] 刘隽阳[2] 郭 婕[1] 李 华[2] 王 渊[2,3] 赵颖倩[2,3] 李 杰[2,3] 王 强[2,3,4]

摘要

目的：观察电针早期干预对肌萎缩侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis，ALS）小鼠大脑皮层TARDNA结合蛋白43（TARDNA binding protein，TDP-43）及HMGB1/RhoA信号通路表达的影响，探究电针早期干预改善ALS小鼠运动功能的潜在机制。

方法：符合SOD1^{G93A}基因表型小鼠按随机数字表法分为模型组（SOD1^{G93A}）、针刺干预组（electroacupuncture，EA）、利鲁唑组（Riluzole），同窝SOD1^{G93A}阴性小鼠为空白对照组（control），每组15只。电针组针刺干预百会穴、双侧天柱穴、双侧天枢穴，5次/7d，7d为一个疗程，共治疗4个疗程。利鲁唑组予利鲁唑30mg/（kg·d）灌胃治疗，1次/d，5次/周，持续2周。采用后肢功能神经学评分和转棒疲劳实验评估各组小鼠运动功能，免疫荧光法观察大脑皮层TDP-43阳性细胞率；Western Blot法检测大脑皮质离子钙结合接头分子1（Iba-1）、HMGB1、RhoA蛋白相对表达量；Elisa法检测血清TNF-α及MCP-1的含量；透射电镜观察大脑皮层神经元形态变化。

结果：与对照组比较，模型组转棒潜伏期时间减少和神经学评分增高（P<0.01），血清MCP-1、TNF-α含量和大脑皮层Iba-1、HMGB1、RhoA蛋白表达以及TDP-43阳性细胞率均升高（P<0.01）。与模型组比较，电针组和利鲁唑组转棒潜伏期时间增加和神经学评分降低（P<0.01，P<0.05），血清MCP-1、TNF-α含量和大脑皮质Iba-1、HMGB1、RhoA蛋白表达以及TDP-43阳性细胞率均降低（P<0.01，P<0.05）。电镜结果显示，对照组小鼠皮层神经元细胞结构正常，模型组小鼠神经细胞有明显病理变化，电针组和利鲁唑组神经细胞损伤减轻，结构较完整，可见部分正常细胞器。

结论：电针干预可改善ALS模型小鼠的运动功能，其机制可能与抑制HMGB1/RhoA信号通路进而减轻小胶质细胞诱导的神经炎症有关，并推测其对于减少ALS病理底物TDP-43的沉积具有正相关作用。

关键词 肌萎缩侧索硬化症；电针；神经炎症；单核细胞趋化蛋白-1；Ras同源基因家族成员A；TARDNA 结合蛋白- 43

中图分类号：R454.1，R245 **文献标识码**：A **文章编号**：1001-1242(2024)-03-0312-08

Effects of early electroacupuncture intervention on TDP-43 and HMGB1/RhoA signaling pathway in cerebral cortex of mice with amyotrophic lateral sclerosis model/LU Yuanrong，LIU Junyang，GUO Jie，et al.// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine，2024，39(3)：312—319

Abstract

Objective：To observe the effect of early electroacupuncture intervention on the expression of TARDNA binding protein 43（TDP-43）and HMGB1/RhoA signaling pathway in the cerebral cortex of amyotrophic lateral sclerosis（ALS）mice，and to explore the potential mechanism of early electroacupuncture intervention in improving motor function in ALS mice.

Method：SOD1^{G93A} gene phenotype mice were randomly divided into model group（SOD1^{G93A}），acupuncture intervention group（EA），riluzole group（Riluzole），and SOD1^{G93A} negative mice in the same litter were blank control group（Control），with 15 mice in each group. The electroacupuncture group was given acupuncture of Baihui point，bilateral Tianzhu point，bilateral Tianshu point，5 times/7 days，7 days for a course of treat-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2024.03.002

*基金项目：国家自然科学基金项目（82074555）；陕西省教育厅项目（21JS022）

1 陕西中医药大学第二临床医学院，陕西省咸阳市，712046；2 陕西中医药大学针灸推拿学院；3 陕西省针药结合重点实验室；4 通讯作者

第一作者简介：卢苑蓉，女，硕士研究生； 收稿日期：2023-04-18

ment, a total of 4 courses of treatment. The riluzole group was treated with riluzole 30 mg/(kg·d) by gavage, once a day, five times a week for two weeks. The motor function of mice in each group was evaluated by hind limb functional neurological score and rotarod fatigue test, and the rate of TDP-43 positive cells in cerebral cortex was observed by immunofluorescence. The relative expression of Iba-1, HMGB1 or RhoA protein in cerebral cortex was detected by Western Blot. The levels of serum TNF-α and MCP-1 were detected by Elisa. The morphological changes of cerebral cortical neurons were observed by transmission electron microscopy.

Result: Compared with the control group, the rotarod latency time was decreased and the neurological score was increased in the model group (P<0.01). The contents of serum MCP-1 and TNF-α, the expression of Iba-1, HMGB1 and RhoA protein in cerebral cortex and the rate of TDP-43 positive cells were increased in the model group (P<0.01). Compared with the model group, the rotarod latency time of the electroacupuncture group and the riluzole group increased and the neurological score decreased (P<0.01, P<0.05), the serum MCP-1, TNF-α content and the cerebral cortex Iba-1, HMGB1, RhoA protein expression and TDP-43 positive cell rate decreased (P<0.01, P<0.05). The results of electron microscopy showed that the structure of cortical neurons in the control group was normal, and the nerve cells in the model group exhibited obvious pathological changes. The damage of nerve cells in the electroacupuncture group and the riluzole group was reduced, the structure was relatively complete, and some normal organelles were detected.

Conclusion: Electroacupuncture intervention can improve the motor function of ALS model mice. The mechanism may be related to the inhibition of HMGB1/RhoA signaling pathway and the reduction of microglia-induced neuroinflammation, and it is speculated that it has a positive effect on the reduction of ALS pathological substrate TDP-43 deposition.

Author's address The Second School of Clinical Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, 712046

Key word amyotrophic lateral sclerosis; electroacupuncture; neuroinflammation; monocyte chemotactic protein 1; Ras homolog family member A; TARDNA binding protein

肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis,ALS)是累及大脑、脊柱和周围神经肌肉系统的上、下运动神经元异常的神经退行性疾病[1],典型的临床表现为手臂或腿部无力,随后出现进行性瘫痪[2—3]。一旦出现ALS症状,从症状出现到死亡的典型时间为2—3年,肌肉麻痹、呼吸衰竭和生命功能丧失是常见的死亡原因[4—5]。ALS是具有多种病理特征的神经退行性疾病,尤其是存在细胞内蛋白包涵体,许多研究表明病理底物TARDNA结合蛋白43(TARDNA binding protein,TDP-43)以泛素化、磷酸化和生物化学不溶性等形式在神经元细胞质中的积累导致神经变性[6—8]。导致ALS神经变性的致病机制有很多,越来越多的证据表明神经炎症在ALS发病机制中起着重要作用,其主要特点是由反应性胶质细胞介导激活[9—10],炎症反应伴随炎症因子释放,例如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor alpha,TNF-α)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1,MCP-1)等。驱动这种神经胶质反应的生物过程很复杂,研究表明高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1 protein,HMGB1)是高迁移率组的成员,在调节先天性和适应性免疫反应中显示出至关重要的作用[11]。Ras同源基因家族成员A(Ras homolog family member A,RHOA)可被炎症反应和氧化应激激活,调节促炎和抗炎介质的基因表达[12—13]。根据ALS的症状特点,中医学把肌无力、肌肉萎缩、四肢活动困难统称为“痿病”,其中“痿,谓痿弱无力以运动”[14]。而电针治疗是我国常用治疗疾病的辅助治疗,广泛用于解决肌肉骨骼问题,特别是慢性疼痛和神经退行性疾病[15]。本研究拟通过电针早期干预对ALS模型小鼠大脑皮质HMGB1/RhoA信号通路、TDP-43及神经元形态的影响,探讨针刺对ALS模型小鼠神经炎症作用机制,为电针疗法干预ALS提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

hSOD1^{G93A}小鼠（SPF级）获自The Jackson Laboratory，使用从尾部活组织检查中提取的DNA通过PCR对小鼠进行基因分型。PCR技术鉴定子代鼠，符合SOD1^{G93A}基因表型的小鼠按随机数字表法分为模型组（SOD1^{G93A}）、针刺干预组（EA）、利鲁唑组（Riluzole），同窝SOD1^{G93A}阴性小鼠为空白对照组（Control），每组各15只。小鼠饲养于陕西中医药大学国医大师研究实验动物中心，为无特定病原菌环境，室温（22±2）℃，相对湿度40%—70%，12h明暗交替，实验期间自由饮水，摄食灭菌后的标准颗粒饲料，实验动物许可证编号：SCXK（陕）2020-001。动物在实验前适应性饲养1周，实验中对动物的处理严格遵循《关于善待实验动物的指导性意见》。该方案已获陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 主要试剂和仪器

酶标仪（Molecular Devices，美国），组织切片机（Leica，德国），电泳仪、转膜仪、化学发光凝胶成像系统（Bio-Rad，美国），荧光显微镜（Olympus，日本），SDZ-II型电针仪、华佗牌无菌针灸针（苏州医疗用品厂有限公司），透射电镜（Hitachi，日本）。封闭山羊血清、抗荧光衰减封片剂（含DAPI，北京 Solarbio），β-Actin、Iba-1、HMGB1、RhoA抗体和HRP标记的山羊抗兔IgG、荧光山羊抗兔IgG（Abcam，英国），TDP-43（Thermo Scientific，美国）、小鼠TNF-α酶联免疫分析试剂盒、小鼠MCP-1酶联免疫分析试剂盒（Boster，中国）。

1.3 干预方法

电针组：于SOD1小鼠出生后60d开始针刺干预，动物气雾麻醉后置于小动物实验台。根据《常用实验动物针灸穴位图谱及穴位》[16]取百会、双侧天柱、双侧天枢穴。百会穴：顶骨正中；天柱穴：颈部斜方肌外缘，正中线旁开3mm；天枢穴：脐旁开5mm。电针方法：百会穴刺入2mm，天柱穴刺入2mm，天枢穴刺入2mm，电针仪两极分别连接百会穴和单侧天枢穴，刺激10min。刺激参数：连续波，频率为2Hz，强度为1mA。疗程：5次/7d，7d为1个疗程，共进行4个疗程，共4周。

利鲁唑组：于电针组干预2周后进行。利鲁唑溶于生理盐水，按30mg/（kg·d）的剂量进行灌胃治疗，1次/d，5次/周，持续2周[17]。模型组：正常饲养，实验期间有4只小鼠死亡。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 行为学检测方法：转棒疲劳实验评估各组小鼠运动功能：将各组小鼠放置转棒上，转棒速度为15RPM，记录小鼠在内首次掉下来的时间，记录为转棒潜伏期，超过3min按照180s记录。每个测试日进行3轮测试，3轮中取表现最佳的1轮记为结果。实验前进入实验环境适应1h，保持不同测试日的测试时间一致。各组小鼠于120d龄时正式行为学检测。正式检测前3 d对小鼠进行适应性训练，训练结束后每只小鼠连续测3d，计算3天测量数据的平均值并分析。

悬尾实验进行后肢功能神经学评分：于小鼠120日龄时进行，存活组中的每只小鼠都完成了尾巴悬吊测试。检测前进入实验环境适应1h，快速将其尾巴固定好，避免应激状态，检测时，小鼠尾巴根部被固定在其笼子的金属丝顶部上方约3cm处（不一致）一段时间。尾部悬吊试验连续重复3次，之后对其后肢分别进行评分。如果后肢在正常张开时完全伸展，则得分为“0”。如果后肢显示异常张开、紧握、向外侧中线轻微塌陷或即使后肢完全伸展也表现出震颤，则得分为“1”。如果后肢向外侧中线显示中度塌陷和部分瘫痪，则记为“2”分；如果后肢出现完全瘫痪，则记为“3”分。

1.4.2 免疫荧光法观察小鼠大脑TDP-43阳性细胞的表达：行为学评分及转棒实验结束后，每组取5只小鼠，3%戊巴比妥钠（50mg/kg）腹腔注射麻醉小鼠后取全脑，放入4%多聚甲醛保存备用。取固定后脑组织进行冰冻切片（厚度8μm），山羊血清封闭30min，滴加一抗TDP-43（1∶100），4 ℃冰箱孵育过夜，PBS冲洗，滴加荧光二抗，室温条件下避光孵育1h，避光条件下滴加含DAPI抗荧光衰减封片剂封片，显微镜观察。使用Image J图像软件计算TDP-43阳性细胞率。

1.4.3 Western Blot法检测小鼠大脑皮质Iba-1、HMGB1、RhoA表达量：行为学评分及转棒实验结束后，每组另取5只小鼠，3%戊巴比妥钠（50mg/kg）腹腔注射麻醉小鼠后于冰上取大脑皮质，置液氮冷冻，后转存－80℃冰箱备用。取10mg冻存后大脑皮质组织，进行蛋白浓度测定并制备好蛋白样本。电泳、转膜、封闭，一抗β-actin（1∶2000）、Iba-1（1∶1000）、HMGB1（1∶2000）、RhoA（1∶2000），4 ℃冰箱

摇床孵育过夜，TBST洗，相应二抗（1∶10000）室温摇床孵育2 h，TBST洗。避光条件下配置ECL化学发光液进行曝光显影，Image J软件分析带灰度值。

1.4.4 ELISA法检测小鼠血清炎症因子TNF-α及MCP-1的浓度：行为学评分及转棒实验结束后，各组取5只小鼠3%戊巴比妥钠（50mg/kg）腹腔注射麻醉，取心脏血液1ml，冷冻离心机4℃，2000r/min离心20min，收集上清液，-80°C储存。将离心后的小鼠血液上清经解冻后，严格按照ELISA试剂盒说明书进行检测，实验完毕后将酶标仪调至450nm吸光度值，基于标准曲线计算相应TNF-α及MCP-1的浓度。

1.4.5 透射电镜观察小鼠大脑皮层神经元超微结构：行为学评分及转棒实验结束后，每组剩余5只小鼠，3%戊巴比妥钠（50mg/kg）腹腔注射麻醉小鼠后立即取大脑皮质组织约1mm×1mm×1mm。置于电镜固定液4℃固定2h，组织低速离心，1%琼脂糖包裹，磷酸缓冲液漂洗3次，每次15min，室温固定2h。漂洗后酒精、丙酮脱水，渗透包埋5—8h，超薄切片机切片60—80nm超薄切片，双染色后切片室温干燥过夜。透射电子显微镜下观察，采集图像并分析。

1.5 统计学分析

使用SPSS 26.0软件进行统计分析。对于符合方差正态分布或近似正态分布的计量资料以均数±标准差表示。多样本均数比较用单因素方差分析，进一步两两比较用LSD检验。$P<0.05$为差异均具有显著性意义。

2 结果

2.1 各组小鼠行为学和神经学评分比较

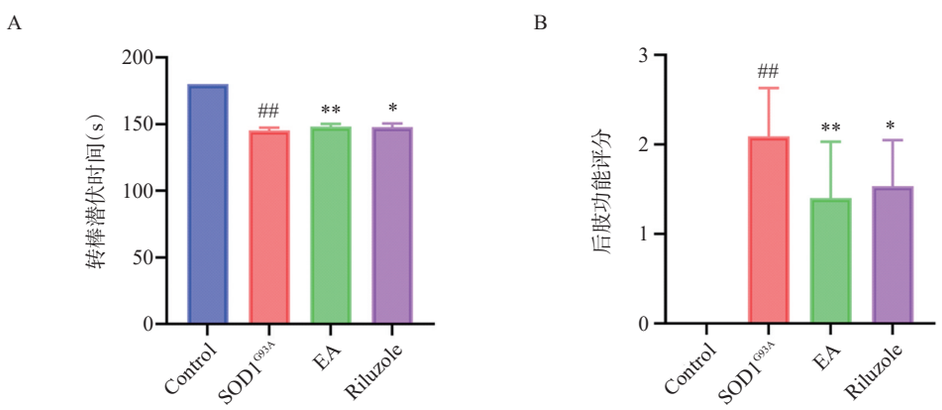
2.1.1 转棒疲劳实验：小鼠在转棒仪器上停留时间为潜伏期，时间越长说明小鼠协调能力和肌力越强，时间越短说明协调能力和肌力较差。与空白对照组相比，模型组保持旋转杆上的潜伏期时间缩短（$P<0.01$）。与模型组相比，电针组和利鲁唑组的转棒潜伏期时间延长（$P<0.01$，$P<0.05$）。电针组和利鲁唑组转棒潜伏期时间比较，差异无显著性意义（$P>0.05$）。见图1A。

2.1.2 后肢功能神经学评分：每组小鼠于60日龄观察发现空白对照组与模型组体重正常，精神状态良好，后肢运动神经学评分无明显差异（$P>0.05$）。于120日龄观察发现，模型组小鼠表现为后肢不能完全伸展且偏离中线，一侧肢体屈曲或震颤。与空白组相比，模型组评分明显增高（$P<0.01$）；与模型组比较，电针组和利鲁唑组评分明显低于模型组（$P<0.01$，$P<0.05$），说明电针改善小鼠后肢运动功能。电针组和利鲁唑组后肢功能神经学评分比较，差异无显著性意义（$P>0.05$）。见图1B。

2.2 各组小鼠血清炎症因子MCP-1、TNF-α浓度比较

与空白组比较，模型组血清中MCP-1、TNF-α浓度显著升高（$P<0.01$）；与模型组相比，电针组和利鲁唑组血清中MCP-1、TNF-α浓度降低（$P<0.01$，$P<0.05$），说明针刺治疗干预后小鼠血清炎症因子表达下调，缓解神经炎症。电针组和利鲁唑组比较，上述指标差异均无显著性意义（$P>0.05$）。见图2。

图1 各组小鼠行为学和神经学评分比较



注：空白组、EA组、Riluzole组n=15，模型组n=11，与空白对照组比较：##$P<0.01$；与模型组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$。

2.3 各组小鼠大脑皮层Iba-1蛋白含量比较

与空白组相比，模型组大脑皮层中Iba-1蛋白表达升高（$P<0.01$）；与模型组相比，电针组和利鲁唑组大脑皮层中Iba-1蛋白表达降低（$P<0.05$）。电针组和利鲁唑组比较差异无显著性意义（$P>0.05$）。见图3。

2.4 各组小鼠大脑皮层HMGB1、RhoA蛋白含量比较

与空白组相比，模型组大脑皮质中HMGB1、RhoA蛋白含量表达升高（$P<0.01$，$P<0.05$）；与模型组相比，电针组和利鲁唑组小鼠大脑皮质HMGB1、RhoA蛋白表达降低（$P<0.01$，$P<0.05$）。电针组和利鲁唑组比较，上述指标差异均无显著性意义（$P>0.05$）。见图4。

2.5 各组小鼠大脑皮质TDP-43阳性细胞率比较

与空白组比较，模型组大脑皮质TDP-43阳性细胞率明显升高（$P<0.01$）；与模型组相比，电针组和利鲁唑组大脑皮质TDP-43阳性细胞率降低（$P<0.01$，$P<0.05$），说明电针干预后大脑皮层异常沉积的TDP-43减少。电针组和利鲁唑组大脑皮质TDP-43阳性细胞率比较，差异无显著性意义（$P>0.05$）。见图5。

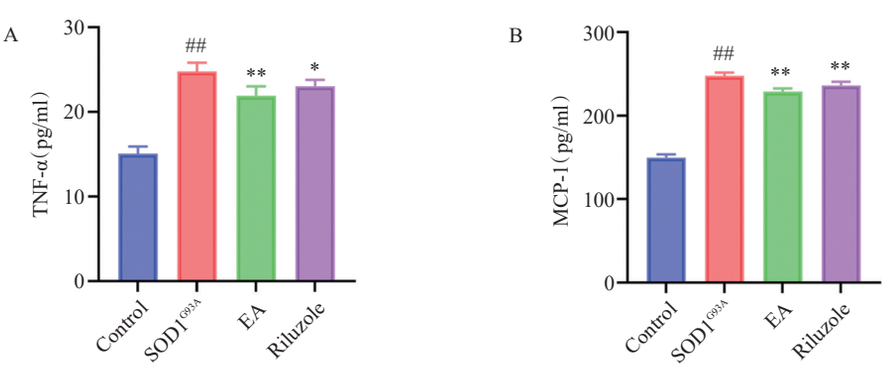
2.6 各组小鼠大脑皮层神经元超微结构

透射电镜可见对照组小鼠的皮层神经细胞结构正常，细胞边界清，核膜完整，核周围的线粒体数量较多，形态大而饱满，模型组小鼠皮层神经细胞胞体萎缩，细胞核裂解、溶解，核膜凹陷变形或部分破裂，异染色质聚集成块；与模型组比较，电针组和利鲁唑组小鼠皮层神经细胞损伤减轻，结构较完整，可见部分正常细胞器。见图6。

3 讨论

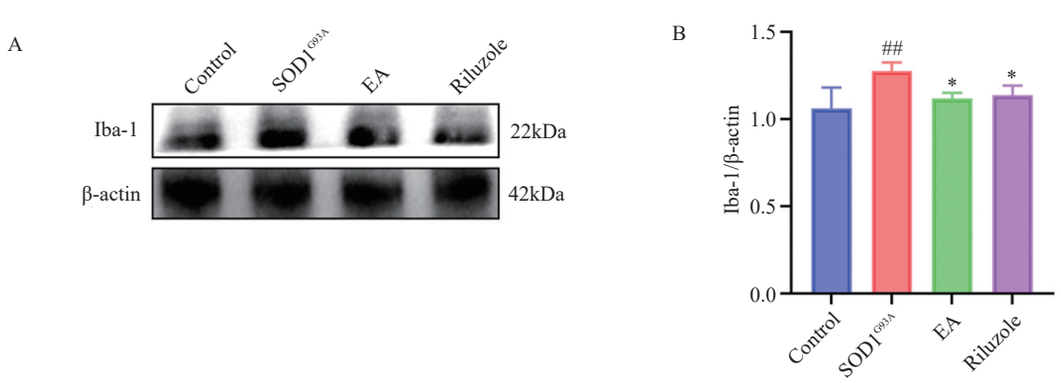
ALS患者主要表现四肢的肌肉肌无力、萎缩，肌束颤动，吞咽不利，饮水咳呛，逐渐瘫痪，最后不能行动。早有《素问·生气通天论》指出：大筋软短，小筋

图2 各组小鼠血清中炎症因子表达水平比较 （n=5）



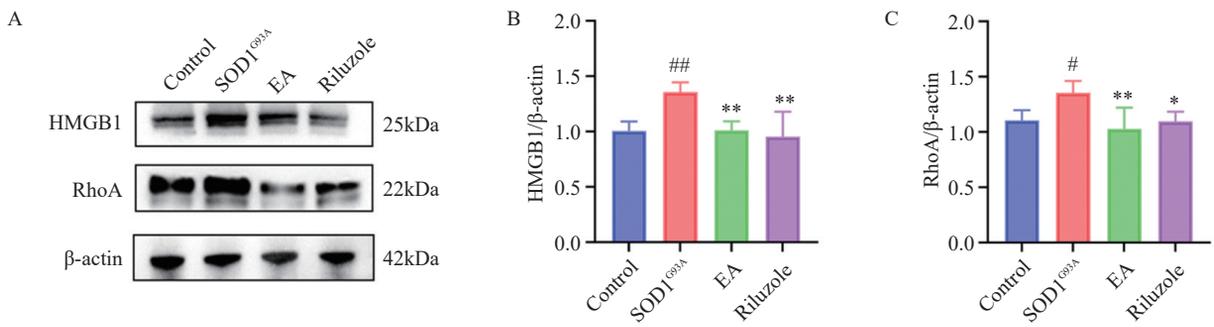
注：与空白对照组比较：##$P<0.01$；与模型组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$。

图3 各组小鼠大脑皮质中Iba-1表达水平比较 （n=5）



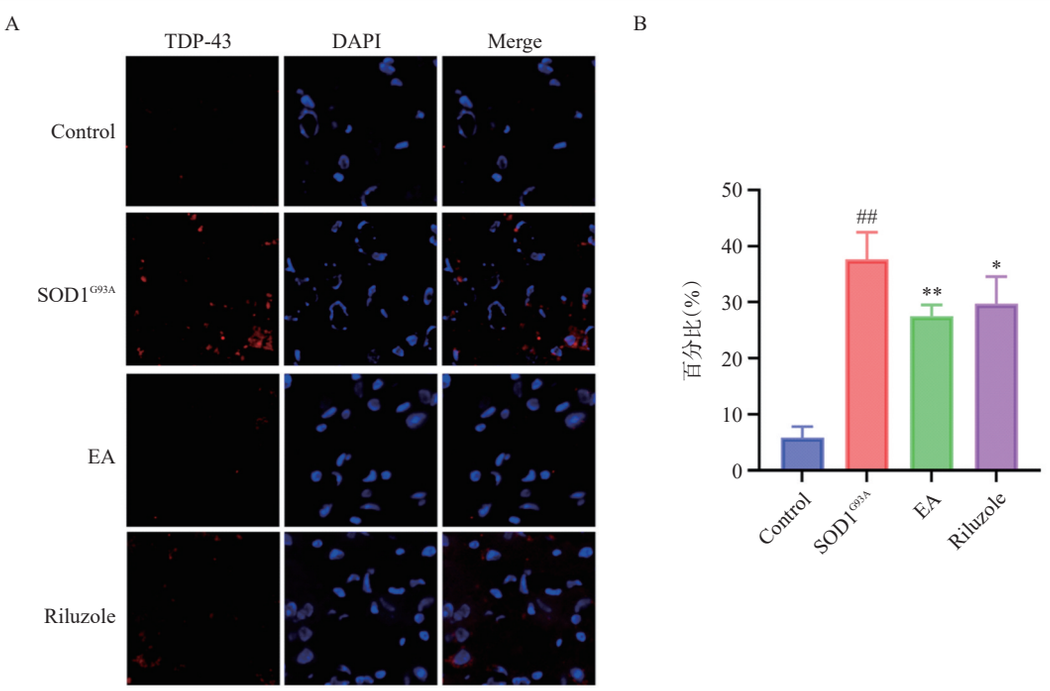
注：A：各组小鼠大脑皮质中Iba-1的Western Blot典型代表图；B：各组小鼠大脑皮质中Iba-1的相对表达量。与空白对照组比较：##$P<0.01$；与模型组比较：*$P<0.05$。

图4 各组小鼠大脑皮质中HMGB1、RhoA表达水平比较 （n=5）



注：A：各组小鼠脑皮质中HMGB1、RhoA的Western Blot典型代表图；B、C：各组小鼠脑皮质中HMGB1、RhoA的相对表达量。与空白对照组比较：#P<0.05，##P<0.01；与模型组比较：*P<0.05，**P<0.01。

图5 各组小鼠大脑皮质TDP-43阳性表达比较 （×400，n=5）

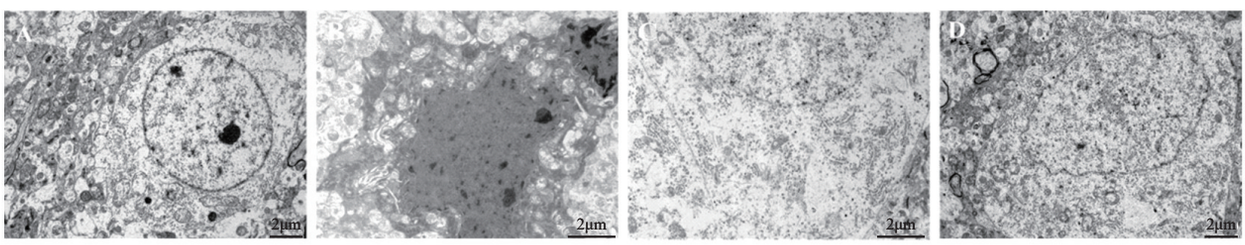


注：A：各组小鼠大脑皮质TDP-43免疫荧光图，红色标记TDP-43，蓝色标记细胞核，merge为二者共标图；B：各组小鼠大脑皮质TDP-43阳性细胞率（占核染细胞数百分比）。与空白对照组比较：##P<0.01；与模型组比较：*P<0.05，**P<0.01。

驰长，软短为拘，驰长为痿，该病的病变部位在肌肉筋脉，如果湿热不能及时排出，就会伤害大小诸筋，出现大筋收缩不能伸展造成拘挛，小筋松软无力造成痿弱[18]。百会是督脉之交会穴，为手三阳与督脉之会，针刺百会可调整脏腑阳气，可起到通经活络的作用[19]，天柱穴属足太阳经，同时借鉴古人提出的“治痿独取阳明”的理论[20]，配伍足阳明胃经的天枢穴，故我们选取百会穴、双侧天柱穴、双侧天枢穴作为早期电针干预穴位。本研究结果显示，早期针刺干预可以延长ALS模型小鼠转棒时间，降低后肢运动功能评分，因此电针干预可以改善ALS模型小鼠运动功能。

神经炎症过程被证明与许多神经退行性疾病的进展有关，是ALS患者的一个突出病理特征。小胶质细胞响应炎症刺激而迅速激活，并经历大量形态和功能变化，伴有快速克隆增殖[21]。活化的小胶质细胞释放的细胞毒性分子会进一步诱导神经元的坏死，比如促炎介质[22—23]。多项研究表明，ALS患者血液检测炎性细胞因子和趋化因子水平升高，例如

图6　各组小鼠大脑皮层神经元超微结构　（×15000）



Control　　SOD1^{G93A}　　EA　　Riluzole

TNF-α和MCP-1等[24—25]。MCP-1，也称为趋化因子配体2，被认为是一种促炎趋化因子并通过在炎症过程中激活趋化因子受体2发挥有害作用[26]。TNF-α是主要的促炎细胞因子之一，在免疫和炎症的启动和协调中起着核心作用，研究表明ALS患者的血液和脑脊液中的TNF-α水平升高[27]。我们的研究结果显示，电针治疗后小鼠血清中炎症因子MCP-1、TNF-α浓度明显降低。

HMGB1是损伤后最早释放的促炎因子之一，被释放到细胞外液响应各种刺激，表现出免疫活性并作为内源性损伤相关分子发挥作用以引发炎症，是神经炎症的“总开关”[28]。一般情况下，HMGB1主要位于细胞核内，但是ALS患者的细胞质HMGB1显著增加，可能是HMGB1主动分泌以响应感染性或其他炎症刺激[29—30]。炎症触发细胞内信号级联反应，聚集在特定转录因子上，调节促炎和抗炎介质的基因表达，这种信号传输主要受磷酸化下游靶标的细胞内激酶调节，例如Rho激酶已知可作为调节许多重要细胞功能的分子开关[31]。RhoA是小GTP酶Rho家族的细胞内信号转导蛋白，大量证据表明RhoA可在多种神经元模型中引起神经细胞凋亡[32—33]。我们的研究结果表明，电针治疗后小鼠大脑皮质HMGB1/RhoA通路蛋白含量表达降低。同时表明，在这种ALS小鼠模型中，HMGBI/RhoA通路的激活与促炎因子的减少有关，证明HMGBI/RhoA信号通路的激活在调控神经炎症中起着关键作用。

上运动神经元兴奋性的改变是临床上最早在ALS中检测到的现象之一，研究发现兴奋性改变后由各种机制介导运动神经元变性[34]，绝大部分是由于TDP-43蛋白在上运动神经元和下运动神经元异常沉积[35]，TDP-43聚集是在ALS患者大脑中观察到的病理学标志。研究表明TDP-43可以通过自我调节机制维持稳态水平[36]，因此TDP-43失调被认为是ALS中神经元改变的潜在驱动因素。小胶质细胞是中枢神经系统中唯一的内源性免疫细胞[37]，研究表明小胶质细胞被认为在神经退行性疾病中发挥神经保护作用，通过感知周围环境，通过吞噬作用清除损伤刺激，保持神经元健康[38]，其活化标志物为离子钙结合接头分子1。TDP-43异常聚集启动小胶质细胞免疫反应，与胶质细胞表面的受体相互作用从而诱导细胞的活化，最终启动炎症级联反应[39]。本研究结果也显示电针干预减少大脑皮层TDP-43聚集，小胶质细胞活化标志物Iba-1蛋白表达减少，皮层神经元变性现象改善，揭示了针刺治疗皮层神经元的保护作用。

参考文献

[1] Shefner JM, Al-Chalabi A, Baker MR, et al. A proposal for new diagnostic criteria for ALS[J]. Clin Neurophysiol, 2020, 131(8):1975—1978.

[2] Hardiman O, Van den berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis[J]. Nat Rev Neurol, 2011, 7(11):639—649.

[3] Huynh W, Ahmed R, Mahoney CJ, et al. The impact of cognitive and behavioral impairment in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Expert Rev Neurother, 2020, 20(3): 281—293.

[4] Spencer KR, Foster ZW, Rauf NA, et al. Neuropathological profile of long-duration amyotrophic lateral sclerosis in military Veterans[J]. Brain Pathol, 2020, 30(6):1028—1040.

[5] Huisman MHB, De Jong SW, Van Doormaal PTC, et al. Population based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis using capture-recapture methodology[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011, 82(10):1165—1170.

[6] Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, et al. Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Front Mol Neurosci, 2019,12:25.

[7] Tziortzouda P, Van Den Bosch L, Hirth F. Triad of TDP43

control in neurodegeneration: autoregulation, localization and aggregation[J]. Nat Rev Neurosci, 2021, 22(4): 197—208.
[8] Keating SS, San Gil R, Swanson MEV, et al. TDP-43 pathology: From noxious assembly to therapeutic removal[J]. Progress In Neurobiology, 2022, 211:102229.
[9] Liu J, Wang F. Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: cellular mechanisms and therapeutic implications[J]. Front Immunol, 2017, 8:1005.
[10] Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(3):253—263.
[11] Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection[J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29:139—62.
[12] Inoue M, Rashid MH, Fujita R, et al. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling [J]. Nat Med, 2004, 10(7):712—718.
[13] Tatsumi E, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. RhoA/ROCK pathway mediates p38 MAPK activation and morphological changes downstream of P2Y12/13 receptors in spinal microglia in neuropathic pain[J]. Glia, 2015, 63(2):216—228.
[14] 裘昌林. 肌萎缩侧索硬化病名病机治疗思路探讨[J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(3): 187—190+194.
[15] Ding YY, Xu F, Wang YF, et al. Electroacupuncture alleviates postoperative pain through inhibiting neuroinflammation via stimulator of interferon genes/type-1 interferon pathway[J]. J Integr Med, 2023, 21: 496—508.
[16] 实验动物常用穴位名称与定位第3部分:小鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(5): 445—446.
[17] Yang T, Wei Q, Li C, et al. Spatial-temporal pattern of propagation in amyotrophic lateral sclerosis and effect on survival: A cohort study[J]. Eur J Neurol, 2022, 29(11):3177—3186.
[18] 范鹏, 赵铎. 肌萎缩侧索硬化的中西医诊治进展[J]. 医药论坛杂志, 2019, 40(11):171—174.
[19] 王艳. 腹针疗法治疗肌萎缩侧索硬化症一则[J]. 实用中医药杂志, 2022, 38(3):503—504.
[20] 刘玥, 张允岭. 浅论“治痿独取阳明”[J]. 环球中医药. 2014, 7(9):713—715.
[21] Balbi M, Bonanno G, Bonifacino T, et al. The physiopathological role of group I metabotropic glutamate receptors expressed by microglia in health and disease with a focus on amyotrophic lateral sclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6):5240.
[22] Kano O, Beers DR, Henkel JS, et al. Peripheral nerve inflammation in ALS mice: cause or consequence[J]. Neurology, 2012, 78(11):833—835.
[23] Murdock BJ, Bender DE, Segal BM, et al. The dual roles of immunity in ALS: injury overrides protection[J]. Neurobiol Dis, 2015, 77:1—12..
[24] Lu CH, Allen K, Oei F, et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2016, 3(4):e244.
[25] Baron P, Bussini S, Cardin V, et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Muscle & nerve, 2005, 32(4):541—544.
[26] Delaye JB, Lanznaster D, Veyrat-Durebex C, et al. Behavioral, hormonal, inflammatory, and metabolic effects associated with FGF21-pathway activation in an ALS mouse model[J]. Neurotherapeutics, 2021, 18(1): 297—308.
[27] Tortarolo M, Lo Coco D, Veglianese P, et al.Amyotrophic Lateral Sclerosis, a Multisystem Pathology: Insights into the Role of TNFα[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 2985051.
[28] Paudel YN, Shaikh MF, Chakraborti A, et al. HMGB1: A common biomarker and potential target for TBI, neuroinflammation, epilepsy, and cognitive dysfunction[J]. Front Neurosci, 2018, 12:628.
[29] Casula M, Iyer AM, Spliet WGM, et al. Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue[J]. Neuroscience, 2011, 179:233—43.
[30] Nowicka N, Szymańska K, Juranek J, et al. The involvement of RAGE and its ligands during progression of ALS in SOD1 G93A transgenic mice[J].Int J Mol Sci, 2022, 23(4):2184.
[31] Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, et al. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells[J]. Nat Med, 1999, 5(2):221—225.
[32] Dubreuil CI, Marklund N, Deschamps K, et al. Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats [J]. Experimental Neurology, 2006, 198(2):361—369.
[33] Guiler W, Koehler A, Boykin C, et al. Pharmacological modulators of small GTPases of Rho family in neurodegenerative diseases[J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15:661612.
[34] Geevasinga N, Menon P, Özdinler PH, et al. Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS[J]. Nature Reviews Neurology, 2016, 12(11):651—661.
[35] Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, et al. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis [J]. Lancet Neurol, 2008, 7(5):409—416.
[36] Lépine S, Castellanos-Montiel MJ, Durcan TM. TDP-43 dysregulation and neuromuscular junction disruption in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Transl Neurodegener, 2022, 11(1):56.
[37] Prinz M, Priller J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease[J]. Nat Neurosci, 2017, 20(2):136—44.
[38] Van Schoor E, Ospitalieri S, Moonen S, et al. Increased pyroptosis activation in white matter microglia is associated with neuronal loss in ALS motor cortex[J]. Acta Neuropathol, 2022, 144(3):393—411.
[39] Rifai OM, Longden J, O'shaughnessy J, et al. Random forest modelling demonstrates microglial and protein misfolding features to be key phenotypic markers in C9orf72-ALS[J]. J Pathol, 2022, 258(4):366—381.