

针刺治疗脑缺血再灌注损伤相关信号通路的机制研究进展

张勇

(联勤保障部队第九四〇医院, 兰州 730000)

【摘要】脑缺血再灌注损伤(CIRI)是指缺血脑组织在梗死相关血管开通后, 可能导致比血管闭塞时更严重的急性损伤。针刺干预 CIRI 具有良好疗效。该文就基础研究中针刺可减轻 CIRI 中炎症反应、钙离子超载及相关信号通路的 CIRI 治疗机制进行综述, 以期 CIRI 中神经保护的进一步研究指明可能的方向。

【关键词】 针刺疗法; 脑缺血; 再灌注损伤; 炎症反应; 氧化应激损伤; 钙离子超载; 综述

【中图分类号】 R246.6 **【文献标志码】** A

DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2020.13.1107

在中医学中, 脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI) 的记载最早见于《内经》中, 又名“卒中”“薄厥”等, 属于“中风病”范畴。西医学的 CIRI 是指脑缺血一定时间, 在梗死相关血管开通恢复血液供应后, 却出现了比血管闭塞时更加严重的急性脑功能障碍。世界上每年约有 1500 多万患者遭受缺血性脑血管病的折磨, 中国每年约有 200 多万人罹患脑血管疾病, 且本病每年还在呈增多趋势发展, 严重影响人们的健康^[1-2]。CIRI 的病理生理机制包括能量代谢紊乱、兴奋性毒性、自由基损伤、钙超载、炎症反应、细胞凋亡等^[3-4]。本病治愈率极低, 致残率和高死亡率极高, 预后极差, 越来越多的研究关注于非药物治疗, 尤其是传统中医学疗法。目前有大量研究表明, 针灸对于 CIRI 有着良好的治疗效果^[5-6]。其中, 针刺疗法是针灸治疗中最常应用的一种方法, 该方法主要通过疏通经络、行气活血来达到调理人体机能的作用。近年来, 针刺疗法在治疗 CIRI 方面疗效显著, 因具有适应证广、操作方便、经济安全、不良反应小等优点, 深受患者的欢迎。笔者通过总结近年来针刺对 CIRI 的最新治疗机制研究进展, 以期 CIRI 的中医学临床治疗提供参考, 现报道如下。

1 针刺治疗与细胞因子

细胞因子是由免疫细胞受损伤后释放出的分子,

包括促炎因子和抗炎因子两种。缺血性损伤导致的局部炎症反应会引起细胞因子的大量释放。促炎细胞因子主要包括肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白介素-6 (IL-6) 等, 这些促炎细胞因子可诱导白细胞迁移至缺血脑组织区域, 这些聚集的白细胞进一步释放更多的促炎细胞因子, 加重脑组织的缺血损伤^[7]。直接靶向抑制这类促炎细胞因子和促进抗炎因子的释放可有效改善和治疗 CIRI^[8]。针刺治疗可动态调控各类炎症因子, 包括白介素 (IL)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、细胞间黏附分子 (inter cellular adhesion molecule, ICAM)、干扰素 (interferon, IFN) 等, 同时减缓细胞毒性、减少细胞凋亡、保护血脑屏障。

TNF- α 是一种具有致炎作用的细胞因子, 可诱导机体内其他炎症信号通路的激活, 使机体内的炎症进一步加重和扩散。方晨晨等^[9]采用改良 Longa 线栓法制备右侧大脑中动脉脑缺血大鼠模型, 并于 2 h 后拔出线栓开始再灌注时针刺百会、大椎穴, 结果显示, 大鼠 CIRI 后脑组织中 TNF- α 基因及蛋白表达量较假手术组显著增加, 表明机体受到缺血组织血流再通的二次损伤后, 产生强烈的应激反应, 快速刺激 TNF- α 的大量释放表达, 进一步激活体内其他炎症信号通路, 从而加重体内的炎症反应, 导致炎症扩散, 造成恶性循环; 而针

基金项目: 甘肃省高等学校科研项目 (2018A-042)

作者简介: 张勇 (1974—), 男, 副主任医师, Email: zhangyonglzlzjq@126.com

刺百会、大椎穴后,针刺组 TNF- α 基因及蛋白表达量均较模型组显著降低,推测电针干预通过抑制脑缺血再灌注模型大鼠的促炎因子 TNF- α 的分泌抑制促炎细胞在缺血区的聚集和激活,有效减缓缺血再灌注损伤的炎症反应,改善脑缺血程度,帮助缺血再灌注损伤脑组织神经功能的恢复。许军峰等^[10]也使用线栓法制作大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)型脑缺血大鼠模型,缺血 90 min 后行再灌注时针刺内关、水沟、三阴交 3 个穴位,结果表明,MCAO 模型组脑缺血 6 h 时 TNF- α mRNA 表达较假手术组明显降低,IFN 调节因子(interferon regulation factor, IRF)-7 mRNA 和 IFN- β mRNA 表达则较假手术组明显升高,而 MCAO 模型组脑缺血 5 d 时 TNF- α mRNA 表达和 IRF-7 mRNA 则较模型组明显降低,这种表达差异说明脑缺血再灌注后 6 h 和 5 d 时炎症因子的表达升高与否与炎症因子的启动时间密切相关。而针刺组在脑缺血 6h TNF- α mRNA 表达较模型组明显升高,IRF-7 mRNA 表达则明显降低,IRF-7 mRNA 和 IFN- β mRNA 在脑缺血 5d 时则较模型组明显升高,说明针刺治疗不能抑制 TNF- α mRNA 表达,但能够抑制 IRF-7 mRNA 的表达和促进 IFN- β mRNA 表达,从而极大地改善了 CIRI 模型大鼠的神经功能活动,能够减缓 CIRI 的程度,本实验也说明 CIRI 后至少 5 d 内不宜针刺,因为 5 d 内针刺具有诱发脑水肿和加重脑神经损害的风险。上述的研究结果充分说明,针刺对 CIRI 炎症因子的干预效果取决于很多因素,如穴位的选择、针刺治疗的时间、不同炎症因子的分泌时间等。

IL-1 β 在 CIRI 后,由浸润到局部脑组织的单核-巨噬细胞、活化的星形胶质细胞和少突胶质细胞分泌^[11],对炎症反应的调节机制如下,①IL-1 β 促进内皮细胞表达黏附分子、募集白细胞和刺激单核-巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-6 等细胞因子而加重局部炎症反应;②IL-1 β 能够促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的表达,进而破坏血脑屏障,促使缺血局部脑组织的炎症反应,通过血流活化外周免疫系统中的炎症细胞,进一步募集外周炎症细胞回流至缺血局部脑组织,加重炎症反应;Paredes SD 等^[12]通过建立 Wistar 雄性大鼠大脑中动脉阻塞的模型,发现随着时间的延长,IL-1 β 会逐渐增加,加重炎症反应及细胞凋亡,而通过抑制 IL-1 β 能达到保护神经功能的作用。IL-6 是重要的炎症介质,可导致脑炎

性损伤,主要在脑缺血急性期表达急剧升高^[13],其水平是反应脑缺血损伤早期的灵敏性指标。有研究^[14]报道,MCAO 模型中 IL-6 在外周 2 h 即开始上升,早于脑组织 24 h 开始上升。葛建彬等^[15]采用颈总动脉栓线法和缺血 2 h 后拔出栓线造成短暂性大脑中动脉阻塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)小鼠模型,结果发现,脑缺血再灌注后 24 h, CIRI 模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平较假手术组明显升高, NF- κ B p65 蛋白表达也显著升高,而枸杞多糖干预后,则可以使 CIRI 模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平明显降低, NF- κ B p65 蛋白表达也显著降低。这一结果说明,脑缺血可以激活 NF- κ B 等转录因子,进一步活化缺血脑组织中的单核巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞等炎症细胞,从而大量分泌 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β 等炎症细胞因子,从而促进胞外氧自由基、细胞因子、溶酶体酶等炎症介质的释放进一步加重脑组织损伤,引起 CIRI^[16]。陈人豪等^[17]用改良 Longa 法制备 CIRI 大鼠模型后研究结果也发现, CIRI 大鼠模型脑组织 SOD、GSH-Px 活性较假手术组显著降低, MDA、IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 水平则较假手术组显著升高,而给予刺五加干预后,则使 CIRI 大鼠模型脑组织 SOD、GSH-Px 活性显著升高, MDA、IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 水平显著降低。这一结果则说明 CIRI 中,氧化应激决定着炎症细胞因子的分泌状态,氧化应激会促进活性氧和促炎细胞因子 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的分泌,同时也会促进炎症细胞因子 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的产生,进一步加重 CIRI 程度。王博等^[18]采用改良的 MCAO 线栓法缺血 2 h 后行再灌注 3 h 复制右侧局灶性 CIRI 大鼠模型后进行针刺百会、肾俞、三阴交等穴位电针预处理后,结果发现针刺治疗组海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量和 NF- κ B 的蛋白表达均较模型组显著降低,提示标本配穴电针预处理可能抑制 NF- κ B 表达,从而抑制 NF- κ B 下游炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分泌而减轻炎症反应,从而保护 CIRI 大鼠模型的神经元。陈素辉等^[19]研究也发现,针刺 CIRI 模型大鼠的督脉百会穴、足三里穴后,在患侧缺血脑区的 IL-6 表达水平在 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 和 144 h 等时间点均显著降低。还有研究^[20-21]发现,电针治疗能显著减少脑缺血/再灌注模型大鼠 TNF- α 和 IL-6 的含量。同样,电针能同时抑制大脑中动脉闭塞再灌注区脑组织和血清中 TNF- α 、IL-1 β 和

IL-6 的水平,从而改善大脑中动脉闭塞再灌注大鼠的脑梗死面积以及其运动能力^[22]。抗炎因子白介素-10(IL-10)在调节先天免疫反应的负反馈途径中发挥重要作用,可抑制多种促炎细胞因子的产生^[23]。王涛等^[24]通过线栓法夹闭颈内、颈总动脉血管缺血 2 h 后拔出尼龙线复制 CIRI 大鼠模型,结果发现,模型组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 含量明显高于假手术组,IL-10 含量明显低于假手术组,七氟烷预处理则可以促使 TNF- α 、IL-1 β 含量降低,IL-10 含量升高。说明 CIRI 中抗炎因子的分泌减少,使其对炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的调控作用减弱,从而极大地促进了促炎因子的分泌,加重了 CIRI 的程度,加重了其神经损伤。叶涛等^[25]采用改良 Longa 线栓法制备脑缺血再灌注大鼠模型,结果发现,再灌注 12 h,电针预处理组血清 TNF- α 含量较模型组降低,血清 IL-10 含量则较模型组显著增加较高;再灌注 24 h,电针预处理组血清 TNF- α 和 IL-10 含量均较模型组降低,说明电针可能通过调节脑缺血再灌注急性期外周循环血中促炎因子 TNF- α 与抗炎因子 IL-10 间动态平衡,从而对抗其炎症反应的加剧,缓解其神经损伤。而 WANG P 等^[26]则发现脑缺血再灌注 6 h 模型鼠的血清 IL-10 含量是升高的,但电针干预不能调节血清 IL-10 水平的下降。这一结果说明,IL-10 等细胞因子的表达受到很多因素调控,比如外源性条件(实验环境、电针穴位选取、干预时间),内源性环境(CIRI 的造模方法、再灌注时间、再灌注损伤程度)。Dai X 等^[27]研究则发现这些炎症因子还能激活体内凋亡信号通路,使细胞发生凋亡,加重脑缺血的神经损伤。因此,针刺治疗 CIRI 的机制可能是通过抑制炎症因子的表达和促进抗炎因子的表达来抑制缺血性脑组织梗死区的炎性细胞浸润和防止血脑屏障的破坏,或者是通过抑制氧化应激反应来抑制促炎因子的产生和分泌,进一步减少缺血性脑组织梗死区的炎性细胞浸润,有效减缓神经损伤,还可能通过抑制 NF- κ B 表达,从而抑制其下游促炎因子的表达,进而抑制体内凋亡信号通路,有效缓解脑缺血对梗死区的神经损伤,从而发挥对缺血性脑组织神经细胞的保护效应,改善其神经功能。

2 针刺治疗与自由基

自由基,又名游离基,是机体活动代谢的中间产物,包括超氧阴离子(superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)、一氧化氮

(nitric oxide, NO)、脂质过氧化物(lipid peroxides, LPO)以及羟自由基(hydroxyl free radicals, OH^{\cdot})等。当脑组织缺血时,机体增多的自由基和自由基清除能力的下降破坏了其氧化与抗氧化作用的动态平衡,使机体发生氧化应激损伤,这可能是导致 CIRI 的重要因素^[28]。机体在缺血情况下,产生大量高活性分子如活性氧自由基和氮自由基,引起炎性细胞入侵,抑制超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性和促进丙二醛(malondialdehyde, MDA)等脂质过氧化物分泌增多,产生氧化中间产物,造成组织细胞损伤^[29]。邰东梅等^[30]在眼针(眼针取穴采用自制大鼠眼针穴区定位器进行穴区定位,标记好肝区、上焦区、下焦区和肾区)与体针(取大鼠曲池穴直刺 5 mm,足三里穴向右侧刺入 1 cm)对 CIRI 24 h 大鼠氧自由基和细胞间黏附分子表达的差异研究中发现, CIRI 模型组大鼠血清中 SOD 活性明显低于正常组,MDA 含量及 ICAM-1 蛋白和基因表达明显高于正常组,给予眼针与体针治疗后,干预组大鼠血清中 SOD 活性较模型组明显升高,血清 MDA 含量和脑组织 ICAM-1 蛋白及基因表达均较模型组明显下降,眼针组与体针组之间 SOD 活性、MDA 含量和 ICAM-1 蛋白及基因表达差异均无统计学意义。这一结果说明,眼针与体针通过提高 SOD 的活性和抑制 MDA 的含量来维持 CIRI 模型大鼠的氧化和抗氧化之间的动态平衡,还通过抑制 ICAM-1 的表达抑制炎症细胞在 CIRI 模型大鼠脑缺血区的大量聚集,从而减轻其炎症反应和神经损伤。李丹等^[31]研究也发现,标本配穴组(百会、肾俞、三阴交)和常规配穴组(百会、大椎、水沟)MDA 含量均较模型组显著降低, SOD 活性和 GSH-Px 活性均较模型组显著升高;标本配穴组 MDA 含量显著低于常规配穴组, SOD 活性及 GSH-Px 活性均显著高于常规配穴组。说明“标本配穴”电针的治疗机制可能是通过提高自由基清除酶的活性来清除体内自由基的蓄积,从而减轻自由基对 CIRI 模型鼠神经元的氧化应激损伤,达到治疗作用。在针刺百会、四神聪对 CIRI 模型大鼠抗氧化作用实验研究中^[32],针刺组大鼠给予百会、四神聪穴针刺,每间隔 8 h 干预 1 次,至 72 h 结束,非穴区对照组大鼠分别于百会、四神聪穴区周边 5 mm 处进行针刺,每间隔 8h 进行 1 次,至 72 h 结束。结果发现,针刺组大鼠缺血半暗带组织中 SOD、GSH-Px 含量和 Nrf2、p-Nrf2 表达水平较非穴区对照组显著升高,进一步说明针刺治疗可能是通过激活

Nrf2 信号通路来提高脑缺血再灌注模型大鼠缺血半暗带脑组织中的抗氧化酶活性,从而减轻其氧化应激损伤,发挥治疗作用。黄玉栋等^[33]在颅针对 CIRI 大鼠氧化应激的影响实验中,颅针组采用 0.35 mm×13 mm 毫针沿各颅骨缝头皮线成 15° 角针刺,针刺后施以电针(电流 0.3 mA,疏密波,疏波频率 20 Hz,密波频率 100 Hz),以大鼠出现头部轻度抖动为度,留针 30 min,每日 1 次,共治疗 7 d。结果发现,颅针治疗组血浆 SOD 活性较模型组显著升高,MDA 和 NO 含量较模型组显著降低,进一步说明针刺治疗的作用机制是通过调节氧化应激途径实现其保护作用的。总之,针刺治疗 CIRI 的另一机制可能是通过提高机体的抗氧化酶活性来清除机体自由基的蓄积和抑制机体氧化产物的产生,从而维持机体氧化和抗氧化之间的动态平衡,从而减轻缺血脑组织的氧化应激损伤,或者是通过激活机体的氧化应激反应信号通路 Nrf2 信号通路来提高机体的抗氧化酶活性,维持机体氧化和抗氧化之间的动态平衡,也能够减轻缺血脑组织的氧化应激损伤,进一步改善神经细胞功能,从而发挥治疗作用。

3 针刺治疗与钙离子(calcium, Ca²⁺)变化

CIRI 的发生机制与 Ca²⁺ 超载密切相关。Ca²⁺ 超载可触发一系列包括半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶激活、ATP 合成抑制、钙依赖性蛋白酶与核酸内切酶的激活等下游反应,最终导致 CIRI 后神经元的损伤与死亡。相关研究显示,脑缺血时,各种原因如氧化应激损伤可以引起 Ca²⁺ 内流增加,使细胞内 Ca²⁺ 含量增加,引起 Ca²⁺ 超载,导致细胞内 Ca²⁺ 级联反应,引发缺血区脑神经元的细胞凋亡^[34-35]。此外,脑缺血后造成的细胞内 Ca²⁺ 超载,会进一步加重缺血脑组织区的细胞水肿和线粒体膜损伤,促进其缺血脑组织区氧自由基和 CaM 含量增高等,胞内 Ca²⁺ 可以与 CaM 结合形成复合物,后者通过促进神经递质 5-羟色胺和去甲肾上腺素的释放来引起缺血脑组织的血管发生强烈收缩,从而加重脑缺血、缺氧的程度,造成恶性循环^[36]。柳四新等^[37]通过对大鼠 MCAO 模型实验发现, Glu 能够促进 Ca²⁺ 内流,提示 Glu 引起 CIRI 模型鼠 Ca²⁺ 超载机制是通过 L-型钙通道钙内流后激活钙库释放,致 Ca²⁺ 内流增加,最终引起缺血区的脑水肿。墙建军等^[38]对缺血再灌注损伤模型小鼠取百会和太冲穴进行电针预处理,结果发现电针预处理可明显抑制大脑皮质神经细胞 TRPC6 与

Caspase-3 蛋白表达,降低细胞内 Ca²⁺ 浓度,抑制神经细胞凋亡。提示电针预处理可能通过下调 TRPC6 和减少细胞 Ca²⁺ 内流来抑制脑缺血再灌注大鼠的神经凋亡,从而发挥对脑缺血再灌注大鼠脑损伤的保护作用。为此,针刺治疗调控 CIRI 的机制可能是通过抑制机体的各种氧化应激反应来减少细胞内 Ca²⁺ 内流,从而减轻缺血脑组织区的细胞水肿和线粒体膜损伤,延缓缺血脑组织神经细胞凋亡,发挥防治作用,或者是通过抑制 Ca²⁺-CaM 复合物的形成,从而抑制血管收缩剂 5-羟色胺和去甲肾上腺素的释放,缓解脑缺血缺氧,以保护脑组织。

4 针刺治疗与细胞自噬

细胞自噬是广泛存在于真核生物中的对机体生理病理中起重要作用的程序性降解机制,可通过包裹和分解损伤的生物大分子或细胞器而产生新的能量物质,供细胞循环再利用,从而维持细胞自身稳态^[39]。在 CIRI 中,细胞自噬被认为是脑缺血后半暗带内的先于凋亡发生的第三种细胞死亡方式^[40]。已有研究^[41]证实,脑缺血/再灌注损伤通过激活自噬来提高 CIRI 的神经元存活,从而发挥保护作用。石秋艳等^[42]研究也发现,局部脑缺血模型大鼠海马组织 CA1 区 LC3-II 表达是显著增加的,说明自噬的进一步激活可以减轻 CIRI 程度。黄亚光等^[43]对右侧大脑中动脉栓塞缺血(MCAO)大鼠模型于术前 5 d 开始电针刺激百会和双侧曲池、足三里等穴,结果发现电针组大鼠自噬小体较模型组显著减少,皮层缺血区 LC3-II/LC3-I 的比值较模型组显著降低,p62 的蛋白表达较模型组显著上调,说明电针预处理治疗 CIRI 的机制可能通过抑制其过度自噬而发挥对 CIRI 的神经保护作用。而刘仁超等^[44]在电针神庭、百会对脑缺血再灌注后认知障碍大鼠海马区自噬影响的实验中,对左侧大脑中动脉栓塞缺血大鼠模型于手术后 2 h 开始电针神庭穴和百会穴,结果发现电针组神经细胞中细胞器损伤较重,自噬及凋亡发生程度较高,LC3 阳性细胞显著增多及 LC3 蛋白表达显著升高,提示电针神庭、百会等穴位可能通过诱导脑缺血再灌注大鼠梗死灶皮质及海马部位自噬的表达来发挥保护神经细胞的作用。研究^[45]发现电针水沟穴能下调 Beclin1 的表达,且在再灌注 24 h 时下调最为显著。而另一项研究^[46]显示了与之相反的结果,该研究发现,在 CIRI2h 后,电针大鼠神庭、百会穴 10 d,电针治

疗组可以增加 Beclin1 的表达来促进自噬的发生而发挥脑保护作用。说明不同的穴位、干预方法、干预时间及 CIRI 的程度决定了自噬体蛋白 LC3 和 Beclin1 等的表达是上调还是下调,也说明再灌注损伤的不同时段中自噬的作用是不同的,由此可见针刺对自噬具有双向调控作用。因此,对 CIRI 机体可采取不同时间节点进行针刺治疗,通过诱导患者自身的自噬功能来发挥抗 CIRI 作用。

5 针刺治疗与信号通路

5.1 针刺治疗与 Janus 激酶/信号传导和转录激活蛋白(Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 信号通路

JAK/STAT 信号转导通路是一条能够参与细胞增殖、分化、凋亡及氧化应激等多种生物学效应细胞因子信号转导途径,同时介导机体免疫失调、炎症反应以及肿瘤生成等过程^[47]。有学者发现,JAK/STAT 信号转导通路不仅参与神经细胞的生长发育及衰老等生理过程,也同时参与部分神经系统疾病的病理过程,特别是与脑缺血等神经系统疾病的病理过程有着密切的关系^[48]。研究证明 JAK/STAT 信号通路中可以影响神经元、胶质细胞和血管内皮细胞等凋亡、增殖和分化的分子主要有 JAK1、STAT1、STAT3、STAT5^[48-50]。

JAK2/STAT3 信号通路在调控心脑血管疾病的神经细胞的凋亡过程中起着重要作用^[50]。多项研究^[51-53]表明,激活 JAK2/STAT3 信号通路对 CIRI 具有神经保护作用。而另有一些研究^[54-55]结果则表明,在脑缺血动物模型脑组织缺血区域,p-STAT3 呈高表达,向缺血再灌注损伤模型大鼠侧脑室注射 JAK2 特异性抑制剂 AG490 和 STAT3 小分子干扰 RNA 后会显著降低 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达,从而显著降低中枢神经内凋亡细胞数量,从而减轻 CIRI 模型鼠的中枢神经受损程度,发挥保护作用。Zhao JB 等^[56]研究发现 CIRI 后 p-JAK2、p-STAT3 在缺血再灌注损伤半暗带表达明显增强,减少其表达可减轻缺血神经细胞的损伤。梁超等^[57]发现,在缺血再灌注早期使用头针刺刺激顶颞前斜线和顶颞后斜线,可以降低 p-JAK2 含量以调控整合素连接激酶的表达,减轻炎症反应;中后期使用头针会增加 p-JAK2 蛋白含量促进其下游 p-STAT5 蛋白表达,从而改善受损脑皮质的病理形态。苏敏芝等^[58]实验研究认为,电针刺刺激大椎穴、百会穴可下调脑缺血区 STAT3 的表达,

可以改善脑功能。可见,针刺治疗通过抑制 JAK/STAT 信号转导通路的关键蛋白 JAK2、STAT3 等的表达来减轻炎症反应和抑制神经细胞的凋亡,从而减轻 CIRI 的神经细胞损伤,发挥治疗作用。

5.2 针刺治疗与核转录因子 -E2 相关因子 2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE) 信号通路

Nrf2/ARE 信号通路是细胞抵抗各种环境应激和内源性应激防御机制中细胞抗氧化应激反应的重要信号调控通路^[59]。当细胞质内谷胱甘肽(glutathione, GSH)活性降低, O_2^- 浓度升高时,会使细胞质内生理状态下耦合在一起的 Nrf2 与 Kelch 样 ECH 联合蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1)发生解偶联,游离的 Nrf2 发生磷酸化,并移位转入核内,与细胞核内部的 ARE 元件发生结合,ARE 与 Nrf2 在体内相互作用,Nrf2 通过调控 ARE 活化下游血红素加氧酶 -1(hemeoxygenase-1, HO-1) 和 醌氧化还原酶 1[NAD(P) H: quinone oxidoreductase 1, NQO1]等 II 相抗氧化酶抗氧化物质的表达,同时产生大量抗氧化酶,发挥抗氧化作用。在 Nrf2/ARE 通路中,Nrf2 的解偶联和磷酸化为该信号转导通路活化的关键标志。因此,Nrf2/ARE 通路所发挥的调控作用成为了抗氧化药物的关键作用靶点。大量研究^[60-61]发现,Nrf2/ARE 通路在抗脑缺血缺氧氧化应激损伤中发挥着重要作用。赵秋阳等^[62]研究发现,针刺 CIRI 模型大鼠的百会、四神聪穴后,其缺血半暗带组织中 SOD 和 GSH 活性显著升高,而 Nrf2 和 p-Nrf2 蛋白表达水平也显著升高。杜韬等^[63]研究也发现,对脑梗死患者采取眼针八区 8 穴治疗(以上焦区穴及下焦区穴作为主穴,以肾区穴、肝区穴作为配穴),治疗 2 周后,结果发现,眼针治疗组患者的 NQO1、ARE 和 Nrf2 蛋白的表达水平显著提高,Keap1 蛋白的表达水平明显降低。提示针刺干预可通过激活 Nrf2/ARE 通路中的关键蛋白(Nrf2、ARE、SOD 和 GSH 蛋白)的表达发挥抗氧化应激损伤的作用,对 CIRI 模型大鼠的神经组织起到保护作用。

5.3 针刺治疗与 Ca^{2+} /钙调蛋白(calmodulin, CaM)/钙调蛋白激酶 II(calmodulin kinase II, CaMK II) 信号通路

Ca^{2+} /CaM/CaMK II 信号通路是一条体内以 Ca^{2+} 变化来进行调控的信号通路。当体内各种原因(如自由基 O_2^- 和 OH^- 的生成增多,谷氨酸和 NO 的浓度升高)诱发

Ca²⁺ 超载时, 高浓度的 Ca²⁺ 与 CaM 结合, 激活了下游钙相关蛋白酶 CaMK II, 启动细胞死亡信号通路^[64]。因此, CaMK II 及其底物变化参与缺血性神经损伤。抑制 CaMK II 过度激活对缺血早期神经细胞有保护作用^[65], 但过度抑制反而加重细胞损伤^[66], 这提示神经细胞功能保护需要一定量 CaMK II 的活性维持。已有研究^[67-68]表明, 电针能调节脑缺血大鼠脑组织 CaM 及 Ca²⁺ 浓度。但是针刺治疗对 CIRI 机体 CaMK II 的表达是否具有调控作用, 至今未见报道。为此, 针刺治疗对 CIRI Ca²⁺ 超载的调控作用是否通过 Ca²⁺/CaM/CaMK II 信号通路实现, 还有待研究。

5.4 针刺治疗与腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)/UNC51 样自噬激活激酶 1 (UNC51-like autophagy activating kinase 1, ULK1) 信号通路

AMPK 是调控自噬起始阶段的关键蛋白。CIRI 会引发脑细胞的缺血、缺氧, 进一步引起脑细胞内 ATP 含量明显下降, 导致 AMP/ATP 比例增高, 从而激活 AMPK 信号通路, 活化的 AMPK 通过激活 TSC1/2 复合物形成进而抑制 mTOR 的活性, 失活的 mTOR 进一步抑制其下游 ULK1 的磷酸化, 从而促进自噬的发生^[69]。AMPK 还可以通过直接磷酸化 Raptor 蛋白来抑制 mTOR 的活性, 促进自噬的发生^[70]。有研究^[71]发现, 对双侧颈总动脉阻闭模型小鼠在手术前给予针刺百会穴的干预, 结果发现针刺预处理可以促进 CIRI 模型小鼠 AMPK α 蛋白的表达, 进而通过抑制 CIRI 模型小鼠脑组织缺血区的细胞凋亡来缓解 CIRI 的神经损伤。Liu W 等^[72]的研究进一步发现, 对 CIRI 鼠再灌注 24 h 时采用电针刺刺激曲池、足三里穴, 能促进 CIRI 小鼠 mTOR 的蛋白表达, 抑制其 ULK1 及 Beclin1 的蛋白表达。上述结果说明, 针刺预处理或者直接干预, 能够通过激活 CIRI 小鼠 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路, 从而抑制自噬蛋白 Beclin1 的表达, 进而抑制 CIRI 小鼠脑细胞的自噬反应改善其神经运动功能障碍, 发挥脑保护效应。

6 讨论

脑卒中是导致人类致残和致死的主要疾病之一, 其中约 87% 为缺血性脑卒中。近年随着人民生活方式转变和人口老龄化加剧, 缺血性脑卒中的发病率逐年升高并呈年轻化趋势。重建血流或增强缺血区血流供

应是修复缺血性脑组织损伤的关键。但血流再灌注后脑组织损伤却进一步加重, 其病理机制包括炎症反应、自由基损伤、钙超载等, 当前无较好的治疗方法。因此, 如何有效减轻 CIRI 已成为缺血性脑卒中治疗的关键。

针刺作为一种有效的治疗手段, 在临床中发挥着重要的作用, 对于其疗效以及机理的研究和探讨具有重要的意义。本研究通过总结发现, 针刺对于 CIRI 具有良好的治疗效果, 其可能机制是通过抑制 JAK/STAT 信号通路中的关键蛋白 JAK2、STAT3 等的表达来减轻炎症反应和抑制神经细胞的凋亡, 从而减轻 CIRI 的神经细胞损伤, 发挥治疗作用; 还可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路中的关键蛋白 HO-1 和 NQO1 来发挥抗氧化作用, 减轻 CIRI 神经细胞的氧化应激损伤, 促进神经功能的恢复; 也可能是通过降低机体的 Ca²⁺ 与 CaM 的含量来减缓 CIRI 的 Ca²⁺ 超载, 进一步减轻氧化应激损伤, 发挥治疗作用; 还可能通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 来促进 mTOR 和抑制 ULK1 的表达, 最终抑制自噬蛋白 Beclin1 和 LC3 的表达进而抑制 CIRI 鼠脑细胞的自噬反应来改善其神经运动功能障碍, 发挥脑保护效应。但是, 针刺治疗对 CIRI Ca²⁺ 超载的调控作用是否通过 Ca²⁺/CaM/CaMK II 信号通路实现, 还有待深入研究。

参考文献

- [1] 牟善茂, 隋晓琳, 高磊, 等. 亚低温对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(2): 118-122, 146.
- [2] 闵冬雨, 李红岩, 关乐, 等. 脑心清对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护机制 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(2): 215-222.
- [3] 陈梅, 王立新. 中药联合干细胞疗法治疗缺血性脑卒中的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 218-226.
- [4] 王晓平, 倪京满. 脑缺血再灌注损伤的研究及药物治疗进展 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(6): 659-663.
- [5] 龙漫, 郑洲, 陈泽斌. 电针预处理防治大鼠脑缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中国临床研究, 2020, 33(1): 124-126.
- [6] 郑仕平, 韩为, 储浩然, 等. 通督调神针灸预处理对脑缺血再灌注大鼠相关微小 RNA 调控机制的研究 [J]. 针刺研究, 2015, 40(2): 99-103.

- [7] Amantea D, Nappi G, Bernardi G, *et al.* Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators[J]. *FEBS J*, 2009, 276(1):13-26.
- [8] Minhas G, Sharma J, Khan N. Cellular stress response and immune signaling in retinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Immunol*, 2016, 7:444.
- [9] 方晨晨, 范茜茜, 金晓露, 等. 电针对脑缺血再灌注损伤大鼠 IL-4、TNF- α 蛋白 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7):1767-1770.
- [10] 许军峰, 张浪, 田蹇, 等. 针刺对脑缺血再灌注大鼠梗死灶边缘区顶叶皮质 TLR9、TNF- α 、IRF7 和 IFN- β 的 mRNA 表达的影响 [J]. 天津中医药, 2018, 35(4):286-288.
- [11] Yang B, Zhao H, Bin X, *et al.* Influence of interleukin-1 beta gene poly-morphisms on the risk of myocardial infarction and ischemic stroke in young age in vivo and in vitro[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11):13806-13813.
- [12] Paredes SD, Rancan L, Kireev R, *et al.* Melatonin counteracts at a transcriptional level the inflammatory and apoptotic response secondary to ischemic brain injury induced by middle cerebral artery blockade in aging rats[J]. *Bioresearch Open Access*, 2015, 4(1):407-416.
- [13] Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(3):464-479.
- [14] Chapman KZ, Dale VQ, Denes A, *et al.* A rapid and transient peripheral inflammatory response precedes brain inflammation after experimental stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(11):1764-1768.
- [15] 葛建彬, 卢红建, 宋新建, 等. 枸杞多糖对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其抑制 NF- κ B, TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 表达的机制 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2):326-331.
- [16] Tu XK, Yang WZ, Chen JP, *et al.* Curcumin inhibits TLR2/4-NF- κ B signaling pathway and attenuates brain damage in permanent focal cerebral ischemia in rats[J]. *Inflammation*, 2014, 37(5):1544.
- [17] 陈人豪, 王琦, 李俊, 等. 刺五加提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(1):37-42.
- [18] 王博, 张晓明, 吴松, 等. 标本配穴电针预处理抗脑缺血再灌注大鼠炎症损伤的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(1):172-175.
- [19] 陈素辉, 孙华, 徐虹, 等. 针刺百会和足三里穴对脑缺血再灌注损伤大鼠双侧脑组织白细胞介素-6 表达的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2014, 30(1):42-45.
- [20] 杜明华, 罗红敏, 赵增凯, 等. 电针足三里穴对肠缺血/再灌注大肠通透性的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(2):117-121.
- [21] Geng Y, Chen D, Zhou J, *et al.* Synergistic effects of electroacupuncture and mesenchymal stem cells on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Inflammation*, 2016, 139(4):1414-1420.
- [22] Liu W, Wang X, Yang S, *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.
- [23] 赵培, 朱金墙, 梁钰彬, 等. 肿瘤坏死因子- α 在脑缺血再灌注炎症损伤中的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(14):3628-3630.
- [24] 王涛, 郑洪洪, 徐志新. 七氟烷预处理对缺血再灌注损伤大鼠神经功能及血清 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 水平的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(11):2753-2755.
- [25] 叶涛, 朱路文, 唐强, 等. 电针预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积及血清 TNF- α 、IL-10 含量的影响 [J]. 中国针灸, 2017, 37(10):1093-1097.
- [26] Wang P, Mu YY, Cheng J, *et al.* Electroacupuncture on serum interleukin level in rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2015, 13(1):9-14.
- [27] Dai X, Zhang J, Arfuso F, *et al.* Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(6):760.
- [28] 孔祥溢, 关键, 王任直. 氧化应激在急性脑缺血病程中的分子生物学作用 [J]. 中国医学科学院学报, 2016, 38(2):222-227.
- [29] 杨杨. 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠行为学及神经血管再生机制的研究 [D]. 北京:北京协和医学院中国医学科学院, 2016.

- [30] 邵东梅, 马贤德, 潘茜, 等. 眼针与体针对脑缺血再灌注损伤 24 h 大鼠氧自由基和细胞间黏附分子表达的差异研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8):1876-1880.
- [31] 李丹, 陈泽斌, 殷妮娜, 等. “标本配穴”电针预处理抗脑缺血再灌注损伤的效应研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2019, 21(1):14-18.
- [32] 赵秋阳, 贤德. 针刺百会、四神聪对 CI/RI 模型大鼠抗氧化作用实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8):66-69.
- [33] 黄玉栋, 聂焱, 王志强, 等. 颅针对脑缺血再灌注损伤大鼠氧化应激的影响[J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(12):1473-1476.
- [34] Diaz de Barboza G, Guizzardi S, Moine L, et al. Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(16):2841-2853.
- [35] 冯喜莲, 沈梅红. 针刺防治脑缺血再灌注损伤的分子机制研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(17):5003-5005.
- [36] 魏彦珍, 刘轲, 张怀亮, 等. 针药结合治疗脑梗死机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(2):217-219.
- [37] 柳四新, 何丹, 余孝君, 等. 谷氨酸致脑缺血再灌注损伤中钙超载的信号转导机制[J]. 中国医药导报, 2016, 13(7):20-23.
- [38] 墙建军, 王林华. 电针预处理对脑缺血再灌注大鼠皮质神经元 TRPC6 表达的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2017, 19(2):8-12.
- [39] Nakamura S, Yoshimori T. Autophagy and longevity[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(1):65-72.
- [40] 彭拥军, 徐疏影, 李忠仁, 等. 电针抗脑缺血再灌注损伤的机制研究进展[J]. 中医药导报, 2019, 16(19):51-53, 65.
- [41] Li XC, Hu QK, Chen L, et al. HSPB8 promotes the fusion of autophagosome and lysosome during autophagy in diabetic neurons[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(13):1335-1341.
- [42] 石秋艳, 杨斌, 孙原, 等. Beclin-1、LC3-II 在缺血后处理大鼠再灌注中的表达及意义[J]. 中风与神经疾病杂志, 2014, 8(31):687-690.
- [43] 黄亚光, 杨松柏, 杜利鹏, 等. 电针预处理通过调控皮层区自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 针刺研究, 2019, 44(12):869-872.
- [44] 刘仁超, 黄金, 刘仁飞, 等. 电针神庭百会对脑缺血再灌注后认知障碍大鼠海马区自噬的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6):1345-1348.
- [45] Shu S, Li CM, You YL, et al. Electroacupuncture ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by regulation of autophagy and apoptosis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016:7297425.
- [46] 冯晓东, 高玲莉, 李瑞青, 等. 电针对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织 Beclin-1 蛋白及基因表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31(12):1307-1310.
- [47] Koppikar P, Bhagwat N, Kilpivaara O, et al. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy[J]. *Nature*, 2012, 489(7414):155.
- [48] 郭鹏, 关立克. JAK1 信号通路在心脑血管疾病中的意义[J]. 吉林医学, 2017, 38(1):175-178.
- [49] 张青, 张琳琪. JAK/STAT 信号通路在细胞凋亡中的研究进展及中药干预研究[J]. 中医临床研究, 2016, 8(26):142-145.
- [50] 盛明, 刘慧霞, 梅露露, 等. 红景天苷通过调控 JAK2/STAT3 信号通路活性保护脑缺血再灌注大鼠受损神经研究[J]. 新中医, 2020, 52(2):1-4.
- [51] Liu X, Zhang X, Zhang J, et al. Diosmin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through activating JAK2/STAT3 signal pathway in mice[J]. *Neuroscience*, 2014, (268):318-327.
- [52] Zhu H, Zou L, Tian J, et al. SMND-309, a novel derivative of salvianolic acid B, protects rat brains ischemia and reperfusion injury by targeting the JAK2/STAT3 pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714(1-3):23-31.
- [53] Dong W, Xian Y, Yuan W, et al. Catalpol stimulates VEGF production via the JAK2 /STAT3 pathway to improve angiogenesis in rats' stroke model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, (191):169-179.
- [54] Wan D, Zhou Y, Wang K, et al. Resveratrol provides neuro-protection by inhibiting phosphodiesterases and regulating the cAMP/AMPK/SIRT1 Pathway after stroke in rats[J]. *Brain Research Bulletin*, 2016, 121:255-262.

- [55] Satriotomo I, Bowen KK, Vemuganti R. JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia[J]. *J Neurochem*, 2006, 98(5):1353-1368.
- [56] Zhao JB, Zhang Y, Li GZ, *et al.* Activation of JAK2/STAT pathway in cerebral cortex after experimental traumatic brain injury of rats[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 498:147.
- [57] 梁超, 陈邦国, 王静芝, 等. 不同时间头针对 MCAO 大鼠脑皮质 JAK2/STAT5 信号通路的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(8):1084-1087.
- [58] 苏敏芝, 易玮, 黄康柏, 等. 电针对脑缺血大鼠缺血灶区信号转导与转录激活 3 表达的影响[J]. 针刺研究, 2012, 37(2):108-113.
- [59] Guo H, Li MJ, Liu QQ, *et al.* Danhong injection attenuates ischemia/reperfusion-induced brain damage which is associating with Nrf2 levels in vivo and in vitro[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(9):1817-1824.
- [60] Wang AL, Niu Q, Shi N, *et al.* Glutamine ameliorates intestinal ischemia-reperfusion injury in rats by activating the Nrf2 /are signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(7):7896-7904.
- [61] Han J, Wang M, Jing X, *et al.* Epigallocatechin gallate protects against cerebral ischemia-induced oxidative stress via Nrf2/ARE signaling[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(7):1292-1299.
- [62] 赵秋阳, 马贤德. 针刺百会、四神聪对 CI/RI 模型大鼠抗氧化作用实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8):66-69.
- [63] 杜韬, 张威. 眼针八区八穴对急性脑梗死 Keap1-Nrf2/ARE 信号传导通路的影响[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(8):1837-1840.
- [64] 裴蕾, 王燕, 凡波, 等. 大豆异黄酮对大鼠缺血再灌注脑组织 CaMK II 表达的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2017, 42(9):1153-1155, 1159.
- [65] Chopra AS, Wong N, Ziegler CP, *et al.* Systematic review and meta-analysis of hemodynamic-directed feedback during cardiopulmonary resuscitation in cardiac arrest[J]. *Resuscitation*, 2016, 101:102-107.
- [66] 李琦, 吕静, 杨妹琴, 等. 丁苯酞联合血栓通治疗缺血性脑卒中患者神经功能的效果[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(6):107.
- [67] 金智秀, 郝晋东, 卢峻, 等. 不同时间窗电针对急性局灶性脑缺血模型大鼠脑组织活性钙调素含量影响的研究[J]. 针刺研究, 2003, 28(3):178-181.
- [68] 姚凯, 郭义, 胡利民, 等. 针刺对大鼠脑缺血超早期脑细胞内外游离钙离子浓度的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(5):303-305.
- [69] Dinardo A, Wertz MH, Kwiatowski E, *et al.* Neuronal TSC1/2complex controls autophagy through AMPK-dependent regulation of ULK1[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(14):3865-3874.
- [70] Wong P, Puente C, Ganley IG, *et al.* The ULK1-complex[J]. *Autophagy*, 2014, 9(2):124-137.
- [71] 李园园, 王明山, 时飞, 等. 电针预处理对小鼠脑缺血再灌注时海马神经元 AMPK 活性的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(1):44-47.
- [72] Liu W, Shang G, Yang S, *et al.* Electroacupuncture protects against ischemic stroke by reducing autophagosome formation and inhibiting autophagy through the mTORC1-ULK1 complex-Beclin1 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(2):309-318.

收稿日期2020-09-12