

针刺对缺血性脑卒中 ICAM-5/ERM/PI3K/AKT 信号通路及神经细胞凋亡的影响

李晶 董飞 孙文梅 聂清

【摘要】 目的 分析针刺对缺血性脑卒中大鼠梗死病灶组织细胞间黏附分子-5(Intercellular adhesion molecule-5, ICAM-5)/埃兹蛋白-根蛋白-膜突蛋白(Ezrin-radixin-moesin, ERM)/磷脂酰肌醇-3-激酶((Phosphoinositide 3-kinases, PI3K)/蛋白激酶 B(Protein kinase B, AKT)信号通路表达水平及神经细胞凋亡的影响。**方法** 选取 40 只无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)级 SD 雄性大鼠,随机分为正常组、假手术组、模型组、针刺组,每组各 10 只;正常组不进行任何的干预;假手术组仅切开皮肤寻找神经血管并进行剥离,但不埋入线栓;模型组埋入线栓,制备大脑中动脉栓塞(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型;针刺组同模型组制备 MCAO 模型并给予针刺治疗;干预后评估 4 组大鼠的神经功能;采用 Western blot 法检测 ICAM-5/ERM/PI3K/AKT 在大鼠中的表达水平;采用原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick and labeling, TUNEL)检测神经细胞凋亡。**结果** 模型组、针刺组第 1、7、14 d 神经功能缺损评分低于正常组($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组第 7、14 d 神经功能评分显著较高($P < 0.05$);模型组、针刺组 ICAM-5, ERM, PI3K 及 AKT 蛋白表达水平低于正常组($P < 0.05$);假手术组与正常组比较,ICAM-5, ERM, PI3K 及 AKT 蛋白表达水平均无明显差异($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组 ICAM-5, ERM, PI3K 及 AKT 水平较低($P < 0.05$),针刺组 ICAM-5 水平较低,但 ERM, PI3K 及 AKT 水平较高($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组 ICAM-5, ERM, PI3K 及 AKT 水平均较高($P < 0.05$)。正常组及假手术组均有少量凋亡细胞出现,但 2 组比较细胞凋亡的数目无明显差异($P > 0.05$);与正常组及假手术组比较,模型组凋亡细胞数目明显增多($P < 0.05$);针刺治疗后细胞凋亡的数目明显少于模型组($P < 0.05$)。**结论** 针灸能够上调缺血性脑卒中 ICAM-5, ERM, PI3K 和 AKT 等蛋白的表达水平,并通过 ICAM-5/ERM/PI3K/AKT 激活来降低炎症反应,提高神经功能,改善神经细胞凋亡情况。

【关键词】 缺血性脑卒中 针刺 细胞间黏附分子-5/埃兹蛋白-根蛋白-膜突蛋白/磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶信号通路 神经细胞

【中图分类号】 R743.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2025)01-0060-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2025.01.010

脑卒中具有较高的致残率、致死率和发病率,已成为世界上第二位致残的疾病^[1]。脑卒中可分为两种类型,一种是缺血性脑卒中;另一种是出血性脑卒中。在全世界所有的脑卒中病例中缺血性脑卒中约占 62.4%。目前临床上对缺血性脑卒中的治疗以静脉溶栓为主,但因其有限的治疗时间窗和易发生脑缺血再灌注损伤(Cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI),故寻找新的治疗手段具有重要意义^[2]。针刺是中医的重要组成部分,具有多层次、多环节、多靶点、多系统的特点,在临床上已得到广泛的运

用;有研究证实其对缺血性脑卒中具有良好的疗效^[3]。缺血性脑卒中是一种由能量缺乏、细胞凋亡、氧化应激及缺血再灌注损伤等多因素所致的复杂疾病,这些因素会加重脑损伤^[1]。有研究表明,ICAM-5, ERM, PI3K, PI3K, AKT 等多种信号途径参与调控,从而发挥对脑缺血再灌注的保护作用。基于此,本研究分析针刺对缺血性脑卒中大鼠梗死病灶组织 ICAM-5/ERM/PI3K/AKT 信号通路表达水平及神经细胞凋亡的影响,为针刺防治缺血性脑卒中的作用机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究动物与分组

本实验选取江苏华创信诺医药科技有限公司提供的 40 只无特定病原体动物(Animal without spe-

基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(编号为 2022173)

作者单位:073000 定州市人民医院(李晶);石家庄市中医院[董飞(通信作者)];衡水市第八人民医院(故城县医院)(孙文梅 聂清)

cific pathogens,SPF)级 SD 雄性大鼠[合格证书为 SCXK(苏)2020-0011],平均体重 200~250 g,大鼠室温生长,单笼喂养,模仿 12 h 昼夜交替,在常温下进行适应性喂养 2 周,按照《实验动物管理条例》规定进行实验;大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、针刺组,每组各 10 只。

1.2 实验材料

光学显微镜(型号为 CX-60,日本 OLYMPUS 公司);扫描电子显微镜(型号为 JCM-6000,东莞市协美电子有限公司);全自动生化分析仪(型号为 BS-350S,南京贝登有限公司);一抗:β-肌动蛋白(β-Actin)内参蛋白(BM0627),ICAM-5/ERM 抗体(A01809-2),PI3K 抗体(PB0351),AKT1 抗体(A00024)均选购上海联迈生物工程有限公司;辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗兔(BA1054),辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗小鼠(BA1050)、二喹啉甲酸(Bicin-choninic acid,BCA)蛋白定量试剂盒(AR0146),十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)制备试剂盒(AR0138),Western blot 一抗及二抗稀释液(AR1017)均选购北京博尔西科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 建模

本研究拟通过改进的 Zea-Long 方法^[4]构建大鼠模型,在术前 12 h 以 6 mL/kg 的三溴醇对大鼠脑缺血再灌注损伤模型进行腹腔注射麻醉;麻醉结束后大鼠被固定于固定台上,仰卧位;大鼠常规消毒,备皮后从颈中线开始,用钝钳将筋膜脂肪分离,并将左颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉、深部分支翼腭动脉全部暴露出来;采用 4-0 医用结扎线将颈外动脉、颈总动脉结扎,然后用动脉血管夹夹住远端翼腭动脉和颈内动脉;采用显微剪沿颈总动脉分叉部位作 1.0 mm 小口,将线栓由切口缓缓插入,经颈内动脉进入大脑中动脉,将颈内动脉进行结扎、固定线栓、消毒缝合;手术后即刻腹腔内注射 0.2 mL 青霉素钠,防止感染;手术后第 2 h 将线栓慢慢移至颈总动脉分叉,使大脑中动脉重新恢复血流灌注;实验结束后将大鼠移入铺有敷料的笼内,使其温度维持在(37±0.5)℃,直至其完全苏醒,重新开始活动。假手术组仅游离同一血管,不加线栓及结扎器,缝合皮肤。按照 Zea-Longa^[4]的标准,以神经功能缺损评

分 1~3 分的即为建模成功。评定标准见表 1。

表 1 神经功能缺损评定标准

分值	症状
0 分	正常,无神经功能缺损
1 分	提尾时右前肢内收,无法完全伸展
2 分	自发行走时向右侧转圈
3 分	无法站立,身体向右侧倾倒
4 分	无法自发行走,有意识丧失

1.3.2 治疗

选择百会、风池、合谷、足三里、阳陵泉、三阴交等穴位;以上腧穴均为华兴邦等^[5]人所编的《常用动物腧穴图谱》^[5];针刺由受过专业训练的针刺师实施;采用 0.40 mm×13 mm 的针刺针,由苏州医药器材有限公司生产;执行标准:GB2024-1994;操作:针刺针消毒,斜刺百会穴 2 mm、直刺风池穴 2 mm、三阴交 4 mm、合谷 1 mm、足三里、阳陵泉 6 mm,平补平泻针法 1 次/d,0.5 h/次;1 个疗程为 5 d;在治疗完成后休息 2 d,继续做下 1 个疗程,连续治疗 2 个疗程。

1.4 观察指标

(1)神经功能缺损评分:采用 Garcia 复合评分法^[6]对大鼠针刺的第 1、7、14 d 的神经功能缺损评分进行评估,主要包括 6 个项目:前爪伸展、抓铁丝网的能力、触碰胡须、提尾悬空时四肢活动的对称性、自主运动、身体感觉;满分为 18 分,分值越高,代表大鼠的神经功能情况越好;(2)ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 蛋白的表达水平:应用 Western blot 方法测定大鼠脑梗死后 ICAM-5,ERM,PI3K,AKT 等蛋白的表达水平;用 SDS-PAGE 凝胶电泳对其进行了分离,转染至含 5% 牛血清白蛋白 2 h 的聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride,PVDF)膜,添加一抗,并将其置于 4℃ 摇床温育 12 h;添加一抗后于摇床箱中培养 12 h;Tris 缓冲盐水加吐温(Tris-buffered saline with Tween,TBST)洗涤 10 min,清洗 3 次,二抗均匀稀释后再加入二抗,进行室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次(每次 10 min);最后,按照一定的比例配置电化学发光(Electrochemiluminescence,ECL)工作溶液,在模板上注入 30~60 s;将荧光溶液移除,将印迹薄膜置于分析仪上,对其进行自动成像;(3)神经细胞形态:将大脑组织 4 μm 切片,脱蜡至水,然后按顺序加入二甲苯 I、II,无水乙醇 I、II 和 75% 酒精,每一种溶剂分别浸泡 5 min,然后用自来水清洗,干燥烘干;以苏木精染色 3 min,水洗,盐

酸酒精分化2 s,水洗干燥;先用伊红染色 1 min,再用清水水洗 3 s,再用 100%酒精脱水 2 s;用常规光学显微镜对梗死部位进行观察和照相;(4)神经细胞凋亡:将大鼠断头取脑,分离脑膜、嗅叶、延髓及小脑,取其脑组织,于-18℃标准培养箱中切除 10 μm 厚的皮质组织;用 4% 聚甲醛磷酸盐缓冲液 10 min,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer,PBS)摇匀 5 min,再加入羊血清 2 h;将家兔胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)一抗(稀释为 1:3000)及对应 TUNEL 系列抗体,于 4℃温育 1 h 后加入 0.01 mol/L PBS 震荡 3 次,每次 5 min,将滴加 594 标有荧光的羊 IgG 二抗稀释至 1:500,将切片置于正常羊血清中 2 h,按 UACR 试剂盒中描述的稀释比例进行 TUNEL 染色,37℃培养 1 h 后以 0.01 mol/L PBS 摇匀 5 min,将细胞核复染,用 50%甘油封住,放入荧光显微镜下进行观测。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 专业统计处理软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用方差分析,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以例数、频数(*n*)或百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠神经功能缺损评分比较

模型组、针刺组第 1、7、14 d 神经功能缺损评分低于正常组(*P*<0.05);与模型组比较,针刺组第 7、14 d 神经功能缺损评分显著较高(*P*<0.05)(表 2)。

表 2 4 组大鼠神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)						
组别	例数	神经功能缺损评分			<i>F</i>	<i>P</i>
		第 1 d	第 7 d	第 14 d		
正常组	10	16.65±0.25	16.46±0.35	16.55±0.28	0.842	0.411
假手术组	10	7.26±0.28 [#]	9.88±2.50 ^{*#}	11.67±2.05 ^{*#}	6.740	<0.001
模型组	10	4.40±2.31 [#]	6.32±2.20 [#]	8.36±3.30 [#]	3.109	0.006
针刺组	10	9.48±1.85 [#]	14.10±2.35 ^{*#△}	14.50±2.50 ^{*#△}	5.104	<0.001

注:与第 1 d 比较,**P*<0.05;与正常组比较,[#]*P*<0.05;与模型组比较,△*P*<0.05

2.2 4 组 ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 蛋白的相对表达水平比较

模型组、针刺组 ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 蛋白相对表达水平低于正常组(*P*<0.05);假手术组与正常组比较,ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 蛋白相对表达水平均无明显差异(*P*>0.05);与假手

术组比较,模型组 ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 相对表达水平较低(*P*<0.05),针刺组 ICAM-5 相对表达水平较低,但 ERM、PI3K 及 AKT 相对表达水平较高(*P*<0.05);与模型组比较,针刺组 ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 相对表达水平均较高(*P*<0.05)(表 3、图 1)。

表 3 4 组 ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 蛋白的相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	例数	ICAM-5	ERM	PI3K	AKT
正常组	10	1.07±0.08	0.63±0.11	0.98±0.22	0.88±0.08
假手术组	10	0.88±0.01	0.50±0.07	0.74±0.05	0.70±0.05
模型组	10	0.65±0.06 ^{*#}	0.42±0.02 ^{*#}	0.60±0.02 ^{*#}	0.41±0.22 ^{*#}
针刺组	10	0.83±0.02 ^{*#△}	0.54±0.06 ^{*#△}	0.86±0.08 ^{*#△}	0.72±0.03 ^{*#△}

注:与正常组比较,**P*<0.05;与假手术组比较,[#]*P*<0.05;与模型组比较,△*P*<0.05

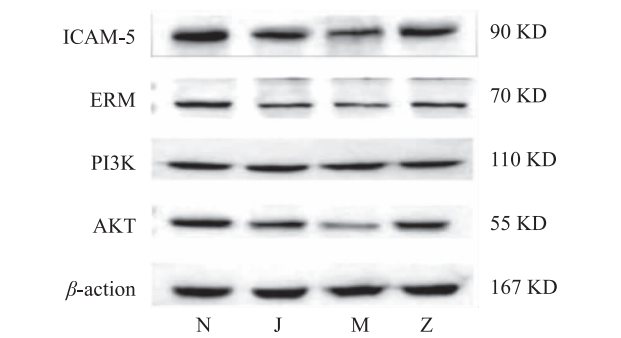


图 1 4 组 ICAM-5、ERM、PI3K 及 AKT 蛋白的表达水平
N 为正常组;J 为假手术组;M 为模型组;Z 为针刺组

2.3 4 组神经细胞形态比较

假手术组与正常组大鼠的大脑结构清楚,细胞排列整齐,细胞形态规整,细胞质丰富,细胞核大且圆,细胞间、核仁及细胞间隙分布均匀;模型组缺血中心边界模糊,缺血细胞形态不规则,扁平,细胞间隙较大,胞质中可见大量变性、坏死的细胞质,核染色加深,核仁消失。针刺组较模型组有较好的病理改变,神经细胞的组织学水平显著增高,细胞退变、坏死的程度也显著减轻;可辨认的正常神经细胞数目显著增多;胞质内有较强的均匀性,细胞核较清楚(图 2)。

2.4 4 组神经细胞凋亡数目比较

采用 TUNEL 法观察脑缺血后神经细胞凋亡情况显示,正常组及假手术组均有少量凋亡细胞出现,但 2 组比较细胞凋亡的数目无明显差异(*P*>0.05);与正常组及假手术组比较,模型组凋亡细胞数目明显增多(*P*<0.05);针刺治疗后细胞凋亡的数目明显少于模型组(*P*<0.05)(图 3、表 4)。

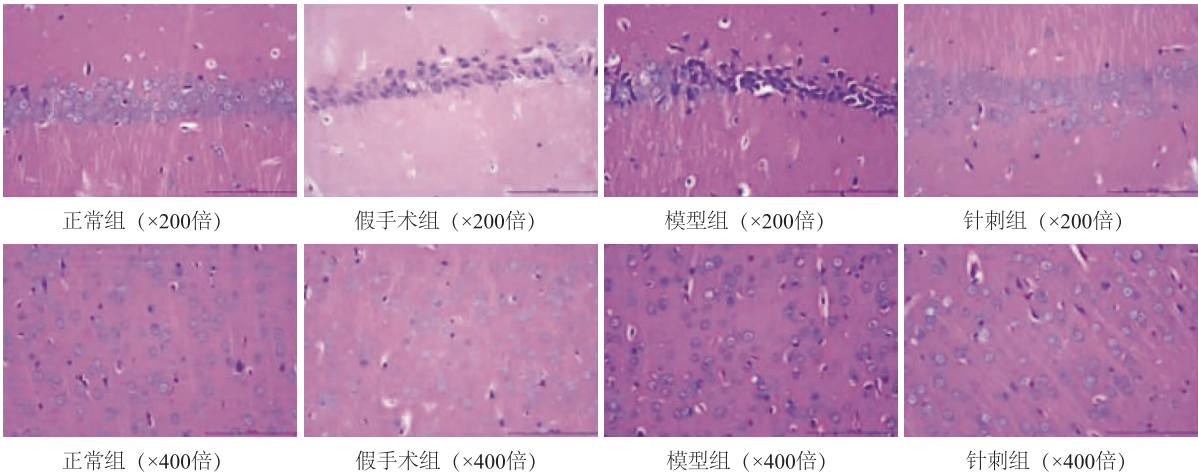


图 2 4 组神经细胞形态变化

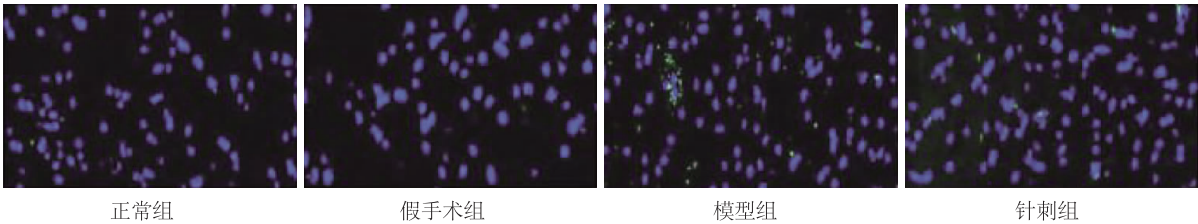


图 3 4 组神经细胞凋亡情况

表 4 4 组神经细胞凋亡数目比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/每 400 倍视野)

组别	例数	神经细胞凋亡数目
正常组	10	112.85 ± 25.50
假手术组	10	120.26 ± 25.68
模型组	10	150.15 ± 26.68 *△
针刺组	10	125.24 ± 20.15 *△#

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与假手术组比较, △ $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$

3 讨论

缺血性脑卒中属中医学“中风”范畴,其病机多为风、火、痰、血瘀阻络,多与阴阳失调,气血逆乱有关。临床表现以突发性晕厥、半身不遂及偏身肢体麻痹为主。通过查阅文献^[7-8],认为百会是治疗缺血性脑卒中最常用的经穴。有研究证实,脑卒中后针刺百会具有“升阳固脱、息风醒脑、开窍”的作用^[9]。百会穴三阳五正穴^[10],是诸阳汇聚之处,沟通阴阳,沟通周身经络,调整体内阴阳。百会^[11]为脑之所居之穴,为补益脑髓之要穴,用于治疗各类脑部疾病。

ICAM-5 作为一类特殊的粘附分子,能抑制炎症因子如肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 的释放,还能促进小胶质细胞的炎症反应。此外,该

蛋白还可通过与其自身的受体淋巴细胞功能相关抗原-1 结合,启动内源性的神经保护机制,起到抗炎的作用。有研究发现,ERM 也参与了神经系统的信号传导,在神经信号级联反应中起着重要的作用^[12]。有研究发现,在神经细胞中 ICAM-5 高表达后 ERM 能通过磷酸化 ERM,活化 PI3K/AKT 等途径,从而发挥抗细胞凋亡的作用。PI3K 和 AKT 是一种重要的细胞内信号分子,同时也是一种抗凋亡信号转导通路,通过调控多种细胞内的信号通路来实现抗炎的功能^[13-15]。针刺可通过活化 PI3K 通路来发挥抗炎效应,同时活化 AKT,进而激活下游的胱天蛋白酶-3 等细胞凋亡相关蛋白酶,降低缺血半暗带神经细胞的凋亡,减轻再灌注对神经细胞的损伤,起到保护作用^[16-18]。另外,针刺可通过调控 PI3K/Akt 信号通路来增加血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达,从而提高治疗缺血性脑卒中的疗效,改善脑缺血的状态^[19-20]。

本研究结果显示,模型组、针刺组第 1、7、14 d 神经功能评分低于正常组 ($P < 0.05$);与模型组比较,针刺组第 7、14 d 神经功能评分显著较高 ($P < 0.05$)。这说明针刺百会、风池、合谷、足三里、阳陵泉、三阴交穴位能减轻大鼠的神经损伤,具有一定的

修复作用。模型组、针刺组 ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 蛋白表达水平低于正常组 ($P<0.05$);假手术组与正常组比较,ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 蛋白表达水平均无明显差异 ($P>0.05$);与假手术组比较,模型组 ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 水平较低 ($P<0.05$),针刺组 ICAM-5 水平较低,但 ERM,PI3K 及 AKT 水平较高 ($P<0.05$);与模型组比较,针刺组 ICAM-5,ERM,PI3K 及 AKT 水平均较高 ($P<0.05$)。正常组及假手术组均有少量凋亡细胞出现;与之比较,模型组凋亡细胞数目明显增多;针刺治疗后细胞凋亡的数目明显少于模型组。这些结果表明,针刺对大鼠缺血再灌注损伤具有显著的治疗作用,能促进组织修复,改善细胞的形态。本研究推测,针刺百会、风池、合谷、足三里、阳陵泉、三阴交等穴能够减少缺血后的神经功能缺损评分,改善血液循环,减少细胞凋亡,从而减轻缺血再灌注损伤。

综上所述,针灸能够上调缺血性脑卒中 ICAM-5,ERM,PI3K 和 AKT 等蛋白的表达水平,并通过 ICAM-5/ERM/PI3K/AKT 激活来降低炎症反应,提高神经功能,改善神经细胞凋亡情况,能为临床针刺治疗缺血性脑卒中的机制提供重要的参考依据。

参 考 文 献

[1] Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. Heart disease and stroke statistics-2023 update; a report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2023, 147(8): e93-e621.

[2] Tsivgoulis G, Katsanos AH, Sandset EC, et al. Thrombolysis for acute ischaemic stroke: current status and future perspectives[J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(5): 418-429.

[3] 谢西梅,陈波,王明威,等. 体外模拟动态力学刺激对 SD 幼鼠前脂肪细胞增殖及凋亡的影响研究[J]. *重庆医学*, 2020, 49(18): 3026-3028, 3032.

[4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[5] 华兴邦,周浩良. 大鼠穴位图谱的研制[J]. *实验动物与动物实验*, 1991, 卷(1): 1-5.

[6] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and

extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634; discussion 635.

[7] 邵田娣,丁敏芮,周秀,等. 基于数据挖掘探究针刺督脉治疗急性缺血性中风的腧穴应用规律[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 1118-1121.

[8] 张卓,朱利霞,徐振华. 古籍针灸治疗中风-中脏腑选穴规律[J]. *按摩与康复医学*, 2023, 14(10): 80-84.

[9] 王强,王玥. 电针内关、百会通过 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路干预局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠的作用研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(8): 1335-1340.

[10] 王一鹤,张小卿. 从督论治脑血的理论探讨与针法创新[J]. *中国民间疗法*, 2022, 30(8): 103-107.

[11] 王宇,汪节. 百会穴久留针治疗脑卒中后遗症研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2022, 34(8): 1559-1563.

[12] Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(49): 34507-34510.

[13] 杨和平. ICAM-5 通过 ERM/PI3K/Akt 信号途径减轻 A β 诱导的神经变性[D]. 长沙:中南大学, 2009.

[14] Clucas J, Valderrama F. ERM proteins in cancer progression [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 2): 267-275.

[15] Neisch AL, Fehon RG. Ezrin, radixin and moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(4): 377-382.

[16] Bavarsad K, Farbood Y, Mard SA, et al. Effects of gallic acid on memory deficits and electrophysiological impairments induced by cerebral ischemia/reperfusion in rats following exposure to ambient dust storm[J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(9): 2911-2923.

[17] Corbett D, Giles T, Evans S, et al. Dynamic changes in CA1 dendritic spines associated with ischemic tolerance [J]. *Exp Neurol*, 2006, 202(1): 133-138.

[18] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(12): 861-872.

[19] 刘禹,邵海宇,王琦. 三七总皂苷结合针灸干预对急性缺血性脑卒中大鼠血脑屏障的保护作用及对 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(4): 649-652, 661.

[20] Hou YY, Wang K, Wan WJ, et al. Resveratrol provides neuro-protection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats[J]. *Genes Dis*, 2018, 5(3): 245-255.

(2024-07-07 收稿)