

针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质 细胞焦亡的影响*

欧阳昕¹, 廖可欣¹, 宋渺渺², 肖移生^{2**}, 肖爱娇^{2**}

(1. 江西中医药大学研究生院 南昌 330004; 2. 江西中医药大学中医学院 南昌 330004)

摘要:目的 观察针刺对脑缺血再灌注损伤(CIRI)大鼠大脑皮质形态结构、NLRP3表达、caspase-1蛋白表达及活性和血清白介素-1 β (IL-1 β)含量的影响,以阐明针刺减轻CIRI的作用机制。方法 将100只雄性SD大鼠随机分为假手术组(Sham组)、模型组(IR组)和针刺组(ACU组)。采用线栓法栓塞大脑中动脉,并于2 h后再灌注以制备CIRI模型,针刺组给予针刺“百会”“大椎”“足三里”穴治疗,每日1次,20 min/次,共4次(即再灌注后2 h、24 h、48 h、72 h);HE染色法观察大脑皮质形态结构;Western blot技术检测大脑皮质NLRP3和caspase-1表达;比色法检测大脑皮质caspase-1活性;放射免疫分析法测定血清IL-1 β 含量。结果 与Sham组相比,IR组大鼠脑梗死灶增大,大脑皮质细胞排列疏松,可见大量炎细胞浸润,NLRP3和caspase-1蛋白表达显著增多($P<0.05$),大脑皮质caspase-1活性升高($P<0.05$),血清IL-1 β 含量增加($P<0.05$);与IR组相比,ACU组大鼠脑梗死灶减小,大脑皮质细胞排列较致密,炎细胞浸润较少,NLRP3和caspase-1($P<0.05$)蛋白表达减少,大脑皮质caspase-1活性降低($P<0.05$),血清IL-1 β 含量减少($P<0.05$)。结论 针刺可能通过降低大脑皮质NLRP3和caspase-1蛋白表达、降低caspase-1活性和减少IL-1 β 含量,减少大鼠大脑皮质细胞焦亡,从而减轻脑缺血再灌注损伤。

关键词: 针刺 脑缺血再灌注损伤 大鼠 细胞焦亡 NLRP3 caspase-1 IL-1 β

doi: 10.11842/wst.20210719001 中图分类号: R245.3 文献标识码: A

缺血性脑卒中为临床上的常见病,涉及的群体很大,在我国占全部脑卒中的69.6%^[1]。缺血性卒中的发生大多是由大脑中动脉阻塞而引起急性血流障碍,进而会导致突发性局灶性脑功能障碍,引起感觉、运动功能丧失,严重者甚至死亡。针对该病的治疗,西医主要采用溶栓治疗,它要求在发病3 h内使用组织型纤维酶原激活物(tPA)^[2]以恢复组织血液灌注。然而,在进行脑缺血再灌注的过程中,有时也可加重脑组织的功能障碍和结构损伤,形成脑缺血再灌注损伤

(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)^[3]。如果要减轻或削弱这种损伤,那么必须选择一种切实可行的方法,以达到干预的目的。因此,加强研究干预CIRI的方法具有重要的意义。

目前,针刺治疗CIRI已取得新进展,有研究报道,针刺干预CIRI疗效显著^[4-5]。最新的动物实验也证实,针刺可减轻CIRI^[6-8],但其具体的作用机制仍需进一步探索。相关的研究成果显示,细胞焦亡(pyroptosis)是造成CIRI发生的重要机制之一^[9-10]。细胞焦亡与炎性

收稿日期:2021-07-19

修回日期:2022-02-17

* 国家自然科学基金委员会地区基金项目(81660819):热敏灸调控线粒体凋亡信号通路减轻新生小鼠缺氧缺血性脑损伤的效应机制研究,负责人:陈明人、肖爱娇;江西省科学技术厅重点研发计划项目(20161BBH80053):针刺调节线粒体凋亡信号通路对新生儿缺氧缺血性脑损伤模型修复的评价及作用机制,负责人:肖爱娇;江西省教育厅科学技术研究重点项目(GJJ201208):基于NF- κ B信号通路研究针刺减轻新生小鼠缺氧缺血性脑损伤的抗炎作用,负责人:肖爱娇。

** 通讯作者:肖移生,副教授,硕士研究生导师,主要研究方向:中医药防治神经疾病的机制研究;肖爱娇,教授,博士研究生导师,主要研究方向:中医药防治神经精神疾病的机制研究。

小体等有非常密切的关系,其中 NLRP3 (NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3) 为典型的炎性小体,其主要功能是激活 procaspase-1 形成 caspase-1,活化的 caspase-1 剪切 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 形成 IL-1 β 、IL-18,可导致机体发生一系列炎症反应,从而导致 CIRI 形成^[11]。然而,目前有关针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠皮质细胞焦亡的研究甚少。为此,本研究参照文献[12-15]制备脑缺血再灌注损伤大鼠模型,主要观察针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质炎细胞浸润及细胞焦亡激活相关蛋白 NLRP3、caspase-1 表达和血清 IL-1 β 含量的影响,以探讨针刺减轻脑缺血再灌注损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

清洁级、成年、雄性 SD 大鼠 100 只,体质量 235 $\pm$ 15 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司(SCXK(鲁)20190003)。喂养 1 周后,用随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、模型组(IR 组)和针刺组(ACU 组)。Sham 组仅行颈部手术,不做栓塞;IR 组行左侧大脑中动脉栓塞(MCAO),并于缺血 2 h 后进行再灌注;ACU 组同 IR 组,并于再灌注后 2 h 行针刺治疗。

模型组和针刺组纳入标准为:评分为 1-3 分且再灌注 72 h 后依旧存活的大鼠,共 66 只(造模成功率为 57%)。即 Sham 组 21 只、IR 组 22 只和 ACU 组 23 只。

1.2 主要试剂与仪器

A5652 兔抗大鼠 NLRP3 和 A18646 兔抗大鼠 caspase-1 (武汉爱博泰克生物科技有限公司),KGAA35 羊抗兔 IgG (江苏凯基生物技术股份有限公司),HY-10851 caspase-1 酶联免疫试剂盒, HY-H0001 IL-1 β 放射免疫分析试剂盒(北京华英生物技术有限公司),Leica 2000 显微镜及图像分析软件(德国 Leica 公司),XH-6020 全自动放免计数仪(西安核仪器厂),化学发光剂(美国 PerkinElmer 公司)等。

1.3 实验步骤

1.3.1 脑缺血再灌注模型的制备

参照 Longa 等^[16]的颈内动脉线栓法。其具体操作过程为:将大鼠称重后用 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)行腹腔注射麻醉,然后固定于鼠板上。紧接着用碘伏、酒精消毒后,沿颈正中中线偏左 2 mm 处切开皮肤,并分离出 3 条动脉,分别为左侧颈总动脉、颈内动脉和

颈外动脉,接着用手术线分别在颈总动脉近心端、颈外动脉分叉处结扎,在颈总动脉远心端靠近颈总分叉处用手术线打一活结,用微动脉夹夹闭颈内动脉,然后用眼科剪在颈总动脉上剪一 V 形切口,用镊子夹住栓线,将蘸有石蜡的一头从 V 形切口朝大鼠头部方向插入血管,轻轻推至颈总动脉分叉处,此时将活结适度扎紧,轻缓取下微动脉夹,再继续将栓线沿颈内动脉向大脑中动脉方向推进,栓线插入的长度一般为距离颈总动脉分叉处 20 $\pm$ 2 mm。缺血 2 h 后进行再灌注处理,即将栓线适度向外拔出 1 cm 左右使血液再通。Sham 组仅分离左颈总动脉,不给予栓塞处理。

1.3.2 治疗方法

针刺组施以针刺疗法:大鼠固定后常规消毒,用华佗牌针灸针毫针斜刺“百会”穴 2 mm,斜刺“大椎”穴 5 mm,直刺双侧“足三里”穴 7 mm,膻穴定位参照文献^[17]。于再灌注后 2 h、1 天、2 天和 3 天时进行治疗,20 min/次,共治疗 4 次。

1.3.3 HE 染色观察大脑皮质病理改变

于术后 3 天,各组取 3 只大鼠,麻醉后迅速取脑,相机拍照,随后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,分离左侧大脑皮质,然后参照文献^[18],依次经脱水 $\rightarrow$ 透明 $\rightarrow$ 浸蜡 $\rightarrow$ 包埋 $\rightarrow$ 切片 $\rightarrow$ 贴片 $\rightarrow$ 烤片 $\rightarrow$ 脱蜡 $\rightarrow$ 水化 $\rightarrow$ 苏木素-伊红(HE)染色 $\rightarrow$ 封片 $\rightarrow$ 拍照并观察各组大鼠大脑皮质形态结构。

1.3.4 Western Blot 技术检测大脑皮质 NLRP3 和 caspase-1 蛋白表达

于造模后 3 天,各组取 4 只鼠,在大鼠麻醉后,于冰上取脑,并分离大脑皮质,参见文献^[14]采用 WB 技术检测大脑皮质 NLRP3 和 caspase-1 蛋白表达。主要实验步骤如下:①提取组织总蛋白,测定大致含量。将收集的大脑皮质,加 1 mL RIPA 裂解液,置冰浴中超声匀浆,12000 r $\cdot$ min⁻¹,4 $^{\circ}$ C,离心 10 min,收集上清液用 BCA 法测定蛋白浓度。②电泳:蛋白质样品加热变性后,取 30 μ g 样品、采用 10% 凝胶浓度进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。③转膜:电泳结束后,将凝胶上的蛋白质转移至 PVDF 膜上。④封闭:将上述 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中,室温下封闭 2 h。⑤加入抗体:将封闭后的 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中,分别加入兔抗大鼠 GAPDH (1:5000)、NLRP3 (1:1000) 和 caspase-1 (1:1000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;洗膜;加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:5000),室温下孵育 2 h;洗膜。⑥条带分析:将

化学发光试剂A液和B液按1:1比例配制,均匀涂在印迹膜。显色2 min后,用保鲜膜包裹PVDF膜,在暗室中压X光片,洗片,用Image J软件测定蛋白条带光密度,计算蛋白的相对表达量。

1.3.5 比色法检测大鼠皮质 caspase-1 活性

于造模后3天,各组分别取11、12、13只大鼠。腹腔注射麻醉后,在冰上取脑,分离出左侧大脑皮质,根据大脑皮质质量加入生理盐水(大脑皮质:生理盐水=1:9),然后超声波匀浆、离心($2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),收集上清液。参照文献^[15]检测大鼠皮质 caspase-1 活性。同时测定组织蛋白浓度。

1.3.6 放射免疫分析法测定血清 IL-1 β 含量

于造模后3天,各组取10只大鼠。动物麻醉后行腹主动脉取血,待血液凝固后离心($2\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min),收集血清。参见文献^[13]采用放射免疫分析法测定血清 IL-1 β 水平。

1.4 统计学方法

统计分析用Graphprism 5.01软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质形态结构的影响

2.1.1 总体观察

Sham组大鼠皮质未出现梗死现象,脑组织红润,脑沟及脑回清晰;IR组左侧大脑皮质可见大面积梗死灶,局部脑组织肿胀,脑沟、脑回消失;ACU组左侧大脑皮质可见小面梗死灶,脑沟变浅、脑回变宽(图1)。

2.1.2 镜下观察

Sham组左侧大脑皮质细胞排列致密,脑细胞未见无明显脱落;IR组患侧大脑皮质细胞排列疏松,脑细

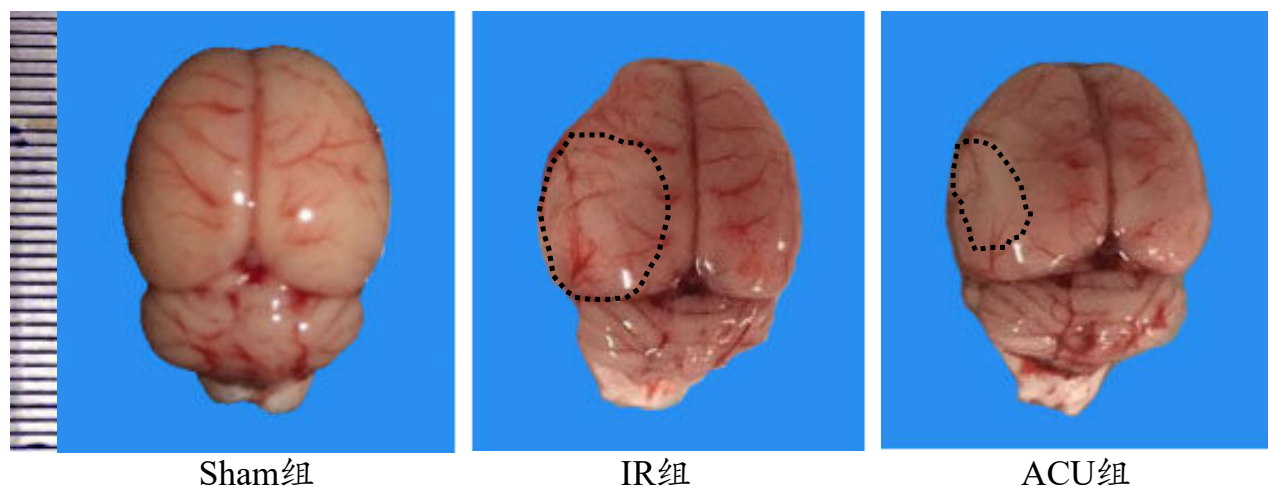


图1 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠脑大体形态的影响

注:虚线框内为梗死灶。

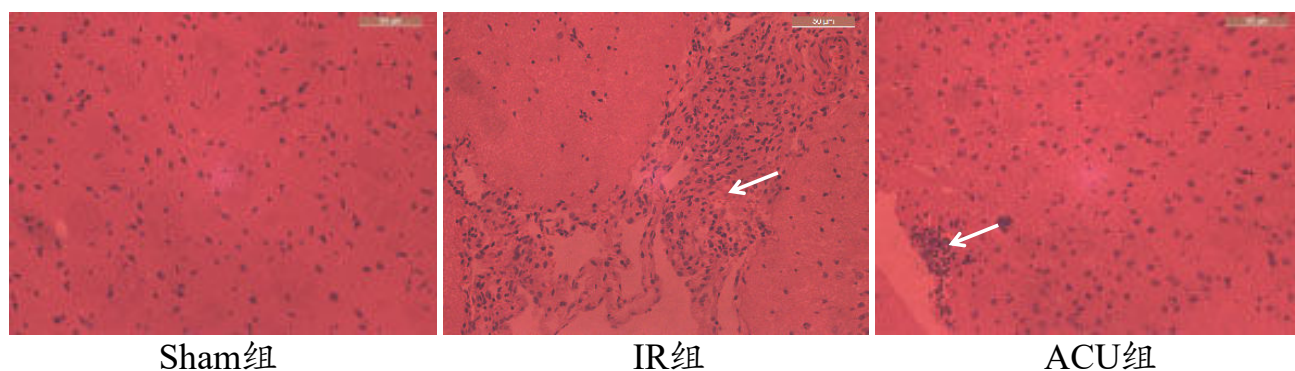


图2 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质病理形态结构和炎细胞浸润的影响(HE, $\times 200$)

注:箭头所指为炎细胞浸润。

表1 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质 NLRP3 和 caspase-1 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	NLRP3/GAPDH	caspase-1/GAPDH
Sham 组	0.192±0.063	0.056±0.006
IR 组	0.351±0.038*	0.301±0.026*
ACU 组	0.291±0.053	0.160±0.067* [△]

注: Western blot 检测法; 与假手术组相比, *表示 $P < 0.05$; 与模型组相比, [△]表示 $P < 0.05$ 。

表2 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质 caspase-1 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	caspase-1 (U·mg ⁻¹)
Sham 组	11	5.768±0.510
IR 组	12	8.540±1.130*
ACU 组	13	5.849±0.903 [△]

注: 比色法; 与假手术组相比, *表示 $P < 0.05$; 与模型组相比, [△]表示 $P < 0.05$ 。

表3 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠血清 IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	IL-1 β (pg·mL ⁻¹)
Sham 组	26.99±3.64
IR 组	43.50±8.58*
ACU 组	17.50±5.21* [△]

注: 放射免疫分析法; 与假手术组相比, *表示 $P < 0.05$; 与模型组相比, [△]表示 $P < 0.05$ 。

胞脱落甚多, 细胞间隙变大, 并可见大量炎细胞浸润; ACU 组患侧大脑皮质细胞排列较致密, 脑细胞脱落较少, 可见少量炎细胞浸润(图2)。

2.2 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质 NLRP3、caspase-1 蛋白表达的影响

NLRP3、caspase-1 和 GAPDH 分别在 111 kDa、45 kDa 和 37 kDa 处见到清晰的条带(图3)。经统计分析, IR 组大脑皮质 NLRP3、caspase-1 表达明显多于 Sham 组($P < 0.05$); ACU 组大脑皮质 NLRP3、caspase-1 表达少于 IR 组(表1)。

2.3 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质 caspase-1 活性的影响

从表2可以看到, IR 组大脑皮质 caspase-1 活性高于 Sham 组($P < 0.05$); ACU 组大脑皮质 caspase-1 活性明显低于 IR 组($P < 0.05$)(表2)。

2.4 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠血清 IL-1 β 含量的影响

从表3可以看到, IR 组血清 IL-1 β 含量高于 Sham

组($P < 0.05$); ACU 组血清 IL-1 β 含量明显低于 IR 组($P < 0.05$)(表3)。

3 讨论

缺血性脑卒中为医学上的难治性疾病, 其治疗是一个相对矛盾的过程。这一点, 可以从病理生理研究的成果得到说明, 缺血性脑卒中局部脑缺血由中心坏死区和周围缺血半暗带两部分组成, 前部分因脑缺血异常严重, 脑组织很快出现坏死; 后部分因其动态性, 会产生随着缺血时间的延长而趋向加重发展, 但是如果短时间内恢复血供, 那么该部分脑组织的损伤会呈现可逆的现象。值得说明的是, 尽管恢复血供, 仍有可能导致更严重的脑损伤^[19], 即脑缺血再灌注损伤, 这使得本病在治疗上具有着相对的矛盾性。如目前药物溶栓是西医恢复缺血性脑卒中脑组织血流供应最主要的措施^[20], 在临床上观察到其对缺血性脑卒中的神经系统会产生积极影响, 但是也会存在着一定的局限和不利因素, 在教科书上出现过相关的禁忌证^[19]。

针对西医治疗缺血性脑卒中的局限和不利因素, 采用中医疗法具有一定的优势。中医疗法很多, 如针刺、艾灸、中药等, 每一种疗法都各有自身的特色。从研究上来说, 应根据临床或实验的前期成果选择一种较为妥当的疗法, 才具有可靠性和科学性。在临床上, 已有报道针刺治疗缺血性脑卒中有明显的疗效^[21-22]; 动物研究也发现, 针刺可减少脑缺血再灌注损伤, 改善神经功能^[23-24]。这些都说明针刺对神经系统疾病, 尤其是有关脑缺血方面的病症具有一定的治疗作用。因此, 本课题组选用针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠进行治疗。

脑缺血再灌注损伤病位在脑。关于与脑相连的经脉, 在《内经》《难经》等中医经典著作中有较为详细的论述, 记载了诸如督脉、足阳明经等经脉与脑的密切联系。如《素问·骨空论》中描述道: “督脉者……上额, 交巅上, 入络脑……”; 《难经·二十八难》中叙述道: “督脉者, 起于下极之输, 并于脊里, 上至风府, 入属于脑”; 《灵枢·动输》中讲述道: “胃气上注于肺, 其悍气上冲头者, 循咽, 上走空窍, 循眼系, 入络脑”等等。由此可知, 对于脑病, 可通过针刺督脉、足阳明经穴而起到一定的治疗作用。“百会”、“大椎”为督脉上的要穴, 百会为“诸阳之会”, 具有醒脑、安神、开窍、益髓等作用; 大椎为“手足三阳、督脉之会”, 具有调节手

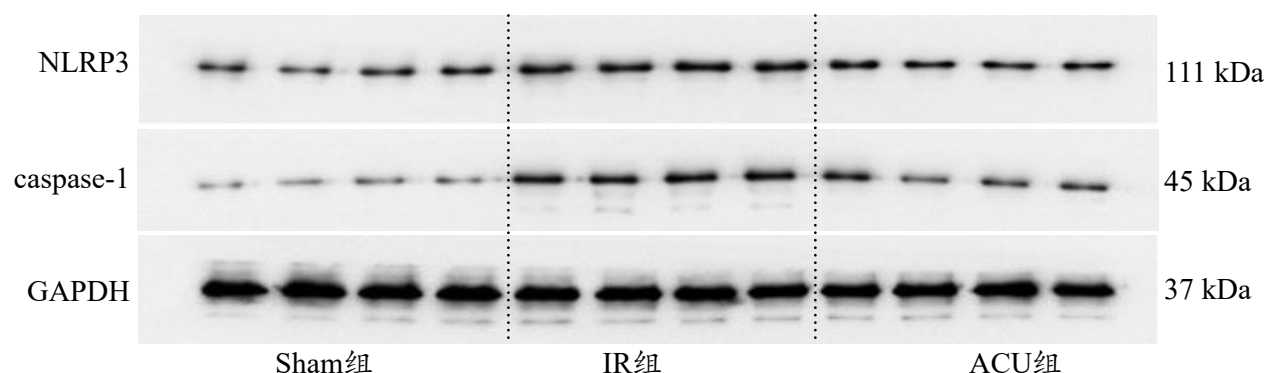


图3 Western blot检测各组大鼠大脑皮质NLRP3和caspase-1蛋白表达

足阳经气血和补益脑髓等作用;足三里为足阳明胃经的要穴,且阳明为多气多血之经、胃为水谷之海,故该穴能够发挥扶正气、培元气、补虚等作用。此外,实验研究可说明“百会”“大椎”及“足三里”能够改善大鼠缺血再灌注损伤。如最新的动物实验^[25]证实电针“百会”能使CIRI模型大鼠脑梗死体积减小,改善脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能。贺平^[26]通过实验发现:针刺“大椎”“百会”可以改善脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能和线粒体超微结构损伤,减少细胞凋亡进而起到保护脑组织的作用。杨杨^[27]在实验研究中得出针刺“百会”“足三里”可挽救缺血半暗带区的脑组织,改善脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能和抑郁情绪。这些实验研究为“百会”“大椎”“足三里”改善大鼠缺血再灌注损伤提供了重要的参考价值。因此,本课题选取位于督脉上的“百会”和“大椎”配伍足阳明胃经上的“足三里”对脑缺血再灌注损伤大鼠进行针刺治疗。结果发现:脑缺血再灌注损伤模型大鼠大脑皮质有大量炎细胞浸润,出现大量细胞坏死脱落,而针刺可减少大鼠大脑皮质炎细胞浸润、减轻大脑皮质损伤。这一实验结果说明了针刺可以有效减轻脑缺血再灌注损伤。然而,针刺如何减轻脑缺血再灌注损伤的具体作用机理尚不明确。关于针刺治疗CIRI的作用机制,长期以来相关研究主要集中于抗凋亡^[23-24]、抗炎^[28-29]、抗氧化^[6,30-31]等机制,而对于针刺抗焦亡作用报道较少,问题一直处于搁置状态。如果不解决针刺治疗CIRI具体的作用机理,那么针刺对脑缺血再灌注损伤的有效性就难以取得令人信服的依据。为了深化这一研究,深入探索其中的机理就显得势在必行,于是本次实验进行了有针对性的研究。

细胞焦亡,是一种强烈炎症反应引起的程序性死亡方式。其与炎性小体、caspases、gasdermin蛋白家族

有非常密切的关系。炎性小体是机体受到各种刺激后形成的一种胞质内的大分子多蛋白复合物,包括典型炎性小体和非典型炎性小体。典型的NLRP3炎性小体是一种位于细胞内的蛋白质复合物,由NLRP3、ASC和procaspase-1三部分组成,其主要功能是使procaspase-1激活形成caspase-1,后者切割GSDMD使其N-末端部分在细胞膜寡聚而形成孔道,引起细胞膜破裂,从而导致炎症因子IL-1 β 等大量释放,进一步造成周围细胞炎性死亡,加重脑组织损伤^[11]。Zhang等^[9]研究发现,CIRI大鼠焦亡相关蛋白GSDMD明显升高。此外,刘海颖等^[32]研究报道,CIRI大鼠脑梗面积增大,caspase-1、GSDMD及细胞炎性因子IL-1 β 、IL-18的表达水平明显增加。上述结果表明在大鼠脑缺血再灌注后发生了细胞焦亡,从而引起脑缺血再灌注损伤。因此,如能抑制细胞焦亡,则可能成为治疗CIRI的新方法^[33]。如许秀洪等^[7]研究观察到针刺治疗CIRI的疗效,即电针降低大鼠海马区中caspase-1的mRNA及蛋白水平,减少细胞焦亡,减轻脑缺血再灌注损伤。不过在该研究中,也存在指标较少的缺陷,其说服力不能令人信服,达不到理想的效果。

为了进一步证实针刺通过抗细胞焦亡达到减轻CIRI,本研究以CIRI大鼠为研究对象,采用针刺为干预手段,进行了大量的动物实验,开展了多方面的研究工作,一是将所有大鼠分为三组,分别是Sham组、IR组和ACU组;二是制备脑CIRI大鼠模型;三是对ACU组进行针刺治疗;四是对以上三组大鼠的大脑皮质形态结构和炎细胞浸润进行对比观察,找出三者之间的不同之处,从而观察到针刺能够减轻大鼠大脑皮质炎症反应和脑缺血再灌注损伤;五是对以上三组大鼠的大脑皮质NLRP3、caspase-1蛋白表达和caspase-1活性,以及血清IL-1 β 含量进行对比观察,找出三者

之间的不同之处,从而观察到针刺确实能够下调脑组织中 NLRP3、caspase-1 蛋白表达,降低 caspase-1 活性,减少血清 IL-1 β 的含量。

综上所述,针刺可能通过下调大脑皮质中 NLRP3、caspase-1 蛋白表达,降低 caspase-1 活性,减

少血清 IL-1 β 的含量,抑制细胞焦亡,从而达到减轻大鼠 CIRI。这一研究成果不仅进一步证实了针刺——抗焦亡——疗效这一针刺作用途径在治疗 CIRI 中的正确性,而且对促进临床使用针刺治疗 CIRI 具有重要而深远的意义。

参考文献

- 孙海欣,王文志.中国60万人群脑血管病流行病学抽样调查报告.中国现代神经疾病杂志,2018,18(2):83-88.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke r-tPA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 1995, 333:1581.
- Simao F, Ustunkaya T, Clermont A C, et al. Plasma kallikrein mediates brain hemorrhage and edema caused by tissue plasminogen activator therapy in mice after stroke. *Blood*, 2017, 129(16):2280-2290.
- 李超然,刘德柱,蒋希成.近10年针刺干预脑缺血再灌注损伤分子机制研究概况.中华中医药杂志,2018,33(8):3526-3528.
- 姚书琦,易玮,刘荣,等.近5年电针预处理及电针治疗脑缺血大鼠的机制研究进展.针刺研究,2019,44(5):383-387.
- Chen C H, Hsieh C L. Effect of acupuncture on oxidative stress induced by cerebral ischemia-reperfusion injury. *Antioxidants*, 2020, 9(3):248-262.
- 许秀洪,周国平,董苗苗,等.电针对脑缺血再灌注损伤大鼠海马区细胞焦亡相关蛋白酶Caspase-1的影响.世界科学技术-中医药现代化,2020,22(2):446-451.
- 赖涵,王娇,董苗苗,等.电针干预大鼠脑中动脉栓塞缺血再灌注模型丝裂原活化蛋白激酶通路的变化.中国组织工程研究,2022,26(2):233-239.
- Zhang D, Qian J, Zhang P, et al. Gasdermin D serves as a key executioner of pyroptosis in experimental cerebral ischemia and reperfusion model both in vivo and in vitro. *J Neurosci Res*, 2019, 97(6):645-660.
- 余颜,胡雨琴,张荆,等.细胞焦亡参与脑缺血再灌注损伤的初步研究.中国病理生理杂志,2019,35(8):1379-1386.
- Wang J, Guo M, Ma R, et al. Tetrandrine alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation via Sirt-1. *PeerJ*, 2020, 8:e9042.
- Xiao A J, He L, Ouyang X, et al. Comparison of the anti-apoptotic effects of 15- and 35-minute suspended moxibustion after focal cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res*, 2018, 13(2):257-264.
- Xiao A J, Chen R X, Kang M F, et al. Heat-sensitive moxibustion attenuates the inflammation after focal cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res*, 2012, 7(33):2600-2606.
- 肖爱娇,罗小泉.艾灸对脑缺血再灌注损伤模型大鼠大脑皮质NF- κ B p65蛋白表达的影响.中华中医药杂志,2013,28(12):3532-3535.
- 肖爱娇,陈日新,康明非,等.热敏灸对脑缺血再灌注损伤模型大鼠SOD、MDA的影响.天津医药,2014,42(1):51-53.
- Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- 余曙光,徐斌.实验针灸学(第2版).北京:人民卫生出版社,2016:287-290.
- 肖爱娇,肖移生,欧阳昕,等.艾灸对缺氧缺血性脑病新生小鼠脑组织炎症细胞浸润和CD11b表达的影响.天津医药,2019,47(1):19-22,114.
- 贾建平,陈生弟.神经病学(第8版).北京:人民卫生出版社,2018:202.
- 倪伟.内科学(第4版).北京:中国中医药出版社,2016:375-382.
- Cao N, Nguyen B, Li S, et al. An overview of acupuncture in stroke recovery: A narrative review. *J Int Soc Phys Rehabilitation Med*, 2020, 3(3):80-86.
- 高品操,杨立,唐芳,等.靳三针疗法联合运动再学习技术对缺血性卒中患者上肢运动功能的影响.针刺研究,2021,46(3):235-239.
- 贺琳.针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织细胞凋亡的影响.南昌:江西中医药大学硕士研究生学位论文,2020.
- 郑梦雨.针刺对脑缺血再灌注大鼠GAP-43和Caspase-3表达水平的影响.沈阳:辽宁中医药大学硕士研究生学位论文,2020.
- 罗敷,封蔚彬,刘丹妮,等.电针“百会”“人中”对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑脊液炎症因子及皮质缺血区脑组织GSDMD表达的影响.中医杂志,2022,63(2):164-168.
- 贺平.针刺大椎、人中、百会穴对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织线粒体超微结构的影响.长沙:湖南中医药大学硕士研究生学位论文,2018.
- 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.北京:北京协和医学院博士研究生学位论文,2016.
- 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.中国针灸,2017,37(10):1093-1098.
- 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 蛋白及mRNA表达的影响.时珍国医国药,2018,29(7):1767-1770.
- 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.上海针灸杂志,2016,35(12):1473-1476.
- 曾超,刘文兵,梁康,等.电针对脑缺血再灌注损伤小鼠脑组织氧化应激的影响.中华内分泌外科杂志,2020,14(6):471-475.
- 刘海颖,冯子人,孙辉,等.大鼠脑缺血再灌注早期过氧化物酶体增

植物激活受体 γ 活化与细胞焦亡的关系. 天津医药, 2020, 48(1): 34-37.

33 Lv Y, Sun B, Lu X X, *et al.* The role of microglia mediated pyroptosis

in neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(4):933-938.

Anti-pyrototic Effect of Acupuncture Reducing Cerebral Ischemic Reperfusion Injury in a Rat Model

Ouyang Xin¹, Liao Kexin¹, Song Miaomiao², Xiao Yisheng², Xiao Aijiao²

(1. Graduate School, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: Objective To observe the effects of acupuncture on the expression of NLRP3 and caspase-1, the activity of caspase-1, and the content of interleukin-1 β (IL-1 β) in a rat model of cerebral ischemic reperfusion injury, and to explore its mechanism. Methods 100 male SD rats were randomly divided into sham group, model (IR) group and acupuncture-treated (ACU) group. The focal cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) model was induced by middle cerebral artery occlusion for 2 h followed by reperfusion. The ACU group was given acupuncture at Baihui (DU20), Dazhui (DU14) and Zusanli (ST36), once a day, 20 min/time, 4 times in total (i.e., 2 h, 24 h, 48 h, and 72 h after reperfusion). The morphological structure of cerebral cortex was examined by HE staining. The expressions of NLRP3 and caspase-1 were detected by western blot. The activity of caspase-1 was determined with colorimetry, and the content of IL-1 β was determined using radioimmunoassay. Results Compared with the sham group, rats in the IR group showed more inflammatory cell infiltration, higher expression of NLRP3 ($P<0.05$) and caspase-1 ($P<0.05$), higher activity of caspase-1 ($P<0.05$) in the cerebral cortices, and higher level of IL-1 β ($P<0.05$) in the serum. Compared with the IR group, rats in the ACU group exhibited less inflammatory cell infiltration, lower expression of NLRP3 and caspase-1 ($P<0.05$), lower activity of caspase-1 ($P<0.05$) in the cerebral cortices, and lower level of IL-1 β ($P<0.05$) in the serum. Conclusion Acupuncture attenuated cerebral ischemic reperfusion injury, which may be related to reducing pyroptosis through decreasing the expression of NLRP3 and caspase-1, the activity of caspase-1 in the cerebral cortices, and the content of IL-1 β in the serum.

Keywords: Acupuncture, Cerebral ischemic reperfusion injury, Rat, Pyroptosis, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β

(责任编辑: 周阿剑、李青, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)