

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20251226.002

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20251226.1418.004>

基于 Keap1/Nrf2/HO-1 信号轴探讨“治神调髓”针刺改善缺血性脑卒中大鼠氧化应激损伤的作用机制

李玲玲, 徐银凤, 谢珊珊, 智 勇✉

(新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的:**探讨“治神调髓”针刺通过 Keap1/Nrf2/HO-1 信号轴,改善缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)大鼠氧化应激损伤的作用机制。**方法:**选用 90 只 SPF 级 6~8 周龄(180~220 g)雄性 SD 大鼠,设立假手术组、模型组、普通针刺组、“治神调髓”针刺组、西药组(依达拉奉右莰醇组),采用改良线栓法建立大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,采用 Zea-longa 神经功能评分方法评估神经功能缺损, TTC 检测脑梗死面积, H&E 染色观察脑组织病理损伤, 尼氏染色检测脑组织病理改变, 透射电镜观察缺血脑组织神经元超微结构及线粒体形态, ELISA 检测血清中总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量, Western blot 检测脑组织 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平。**结果:**与模型组相比,“治神调髓”针刺组大鼠神经功能明显改善,梗死面积减少;神经元损伤减轻;尼氏体数量增多,超微结构改善;血清中 T-SOD、GSH-PX 升高($P<0.01$), MDA、ROS 含量降低($P<0.01$), 脑组织 Keap1 蛋白表达水平降低($P<0.01$), Nrf2、HO-1 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。**结论:**“治神调髓”针刺可能通过 Keap1/Nrf2/HO-1 信号轴,有效减轻 IS 大鼠的氧化应激损伤,治疗效果与依达拉奉右莰醇相当,明显优于普通针刺,为临床提供了一种非药物的有效替代方案。

[关键词] 针刺;缺血性脑卒中;氧化应激;治神调髓

[中图分类号] R245 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)05-0345-10

Mechanism of "Zhishen Tiaosui" acupuncture on improving oxidative stress injury in rats with ischemic stroke based on the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling axis

LI Lingling, XU Yinfeng, XIE Shanshan, ZHI Yong✉

(College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (82560970, 82060894); Xinjiang Uygur Autonomous Region Regional Collaborative Innovation Project (2022E01043)

[Author]: LI Lingling, E-mail: 1259410506@qq.com.

[Correspondence to]: ZHI Yong, Ph.D., Associate Professor, Master's Supervisor, E-mail: 623946518@qq.com.

Received: 2025-08-26

Revised: 2025-12-02

JHMu, 2026;32(5):345-354

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of "Zhishen Tiaosui" acupuncture improving oxidative stress injury in rats with ischemic stroke (IS) through the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling axis. **Methods:** A total of 90 SPF male SD rats aged 6-8 weeks (180-220 g) were selected and divided into the sham operation group, the model group, the conventional acupuncture group, the "Zhishen Tiaosui" acupuncture group, and the Western medicine group (edaravone dexborneol group), the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model by modified suture method were established, the neurological deficit score was evaluated by Zea-Longa neurological deficit score method, the cerebral infarction area was detected by TTC, the pathological damages of brain tissue were observed by H&E staining, the pathological changes of brain tissue were detected by Nissl staining, and the ultrastructure of isch-

[基金项目] 国家自然科学基金(82560970,82060894);新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(2022E01043)

[作者简介] 李玲玲, E-mail: 1259410506@qq.com。

[通讯作者] 智勇, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: 623946518@qq.com。

[收稿日期] 2025-08-26

[修回日期] 2025-12-02

网络出版时间: 2025-12-26 17:35:20

emic brain tissue neurons, including mitochondrial morphology, was observed by transmission electron microscopy. The contents of total superoxide dismutase (T-SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-PX), and reactive oxygen species (ROS) in serum were detected by ELISA. The protein expression levels of Keap1, Nrf2, and HO-1 in brain tissue were detected by Western blot. **Results:** Compared to the model group, the neurological function of the rats in the "Zhishen Tiaosui" acupuncture group were significantly improved, and the infarct area was reduced. Neuronal damage was alleviated, the number of Nissl bodies was increased, and the ultrastructure was improved. The levels of T-SOD and GSH-PX in serum were increased ($P < 0.01$), the contents of MDA and ROS were decreased ($P < 0.01$), the expression level of Keap1 protein in brain tissue was decreased ($P < 0.01$), and the expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins were increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The "Zhishen Tiaosui" acupuncture may effectively reduce the oxidative stress injury of IS rats through the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling axis. The therapeutic effect is comparable to that of edaravone dexborneol and is significantly better than that of conventional acupuncture. It provides a non-drug effective alternative for clinical practice.

[Key words] Acupuncture; Ischemic stroke; Oxidative stress; Zhishen Tiaosui

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS),又称中风,是一种常见的急性脑血管事件,是脑卒中的主要类型,占比约87%^[1],主要是由于大脑中动脉阻塞或狭窄,导致脑部缺血、缺氧性坏死的疾病^[2]。大部分卒中幸存者存在肢体偏瘫、认知损伤、运动功能低下、语言和口头交流障碍等神经损伤症状,严重影响其生活质量^[3],且近年来发病年龄逐渐呈现出年轻化趋势^[4]。现阶段的治疗方式主要有:(1)恢复缺血区血流,如机械取栓、静脉溶栓等;(2)抑制缺血损伤引起的病理生理瀑布式损伤,如神经保护剂治疗^[5]。但是静脉溶栓和手术取栓治疗时间窗短,且存在严重并发症,而神经保护剂治疗临床有效性仍需更多研究支持。针刺作为一种有效的传统中医治疗方式,可以从多方面改变IS造成的损伤,包括促进神经修复与再生、抑制细胞程序性死亡、改善脑循环、调节神经递质活动、抑制炎症反应、减少氧化应激^[6]等。

氧化应激是脑缺血发病机制的中心过程^[7],Keap1/Nrf2/HO-1信号轴作为氧化应激的一条经典通路,是细胞抵御氧化应激损伤的核心防御机制,可调控多种抗氧化酶的表达。Nrf2是IS损伤对抗氧化应激的关键,可通过调控下游多种信号通路发挥神经保护作用^[8]。据报道,Nrf2基因敲除大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型脑损伤更大,梗死面积和神经损伤更为严重^[9],这表明Nrf2激活在IS后氧化应激方面起着至关重要的作用。HO-1作为Nrf2的下游靶基因,对脑缺血导致的神经损伤和自由基介导的神经元凋亡有保护作用^[10],当HO-1分解血红素时,产生的抗炎化合物一氧化碳(carbon monoxide, CO)可以治疗IS^[11],Nrf2/HO-1通路可以增强IS对氧化应激损伤的耐受性^[12]。因此,通过干预Keap1/Nrf2/HO-1信号通路来减轻IS的氧化应激损伤,是防治IS的重要思路。

“治神调髓”针刺是刘智艳教授根据多年临床经验提出的以安神定智、调养心神、益精填髓为治疗原则的组穴针刺方案,该方案经过课题组多年研究证明对于治疗IS疗效明显,可提高脑卒中单侧空间忽略患者对单侧空间忽略的认知,改善患侧忽略程度及偏瘫肢体运动功能^[13]、生活质量^[14,15];可以通过降低皮质酮(corticosterone, CORT)和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)水平,有效改善卒中后抑郁患者神经功能^[16]。本研究在前期研究基础上,聚焦IS关键病理环节,探索“治神调髓”针刺通过Keap1/Nrf2/HO-1信号轴改善IS大鼠氧化应激损伤的作用机制,为其临床推广提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验药品及试剂

依达拉奉右莰醇注射用浓溶液(货号:H20200007,先声药业有限公司);苯巴比妥钠(5 g/瓶,Merck公司);TTC染色液(2%)(货号:DK00055,北京雷根生物技术有限公司);尼氏染色液(货号:G1436,北京索莱宝科技有限公司);戊二醛固定液(货号:G916054,上海麦克林生化科技股份有限公司);4% PFA固定液(货号:BL539A,白鲨生物科技有限公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(货号:BC0025,北京索莱宝科技有限公司);总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)试剂盒(货号:A001-1-2, A005-1-2,南京建成生物);活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(货号:YX-181519R,上海优选生物科技有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒、高效RIPA组织/细胞快速裂解液(货号:PC0020, R0010,北京索莱宝科技有限公司);Keap1抗体(货号:TA5266F,艾比玛特);Nrf2抗体(货号:A11159,爱博泰克);HO-1抗体(货号:ab189491, Abcam公司)。

1.2 实验仪器

3-18KS 型台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); JXFSTPRP-24 全自动样品快速研磨仪(上海净信); 酶标仪 Multiskan GO 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司); Jess 全自动蛋白质表达定量分析系统(美国 Protein Simple 公司); 310088 型高倍显微镜(日本 Nikon 公司); DHP-9162 型电热恒温培养箱(上海乔欣科学仪器有限公司)。

1.3 实验动物

选取 90 只健康 SPF 级 6~8 周龄雄性 SD 大鼠, 体重 180~220 g, 购自新疆医科大学动物实验中心, 动物合格证书: SCXK(新)2018-0002, 饲养温度 19~25 °C, 相对湿度 40%~55%, 光照/黑暗周期 12 h/12 h 交替, 经新疆医科大学动物实验中心伦理审查, 伦理审批号: IACUC-20200331-128。

1.4 动物分组、干预及造模

1.4.1 分组及干预 大鼠适应性饲养 1 周后分为假手术组、模型组、普通针刺组、“治神调髓”针刺组、西药组(依达拉奉右莰醇组)。假手术组麻醉后常规备皮消毒, 暴露左侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉后即可缝合; 模型组、普通针刺组、“治神调髓”针刺组、西药组(依达拉奉右莰醇组)参照改良 Longa 线栓法制备 MCAO 大鼠, 术后大鼠完全清醒后采用 Zea-longa 神经功能评分方法对模型的神经功能缺损进行评分, 以判断是否造模成功; 模型组不做任何干预; 普通针刺组每日针刺曲池、合谷、环跳、足三里、丰隆、太冲(取穴参照 2021 年中国中医药出版社出版的《实验针灸学实验指导》), 每日 1 次, 每次 20 min, 连续 7 d; “治神调髓”针刺组每日针刺百会、肾俞、四神聪、悬钟, 三阴交、内关, 每日 1 次, 每次 20 min, 连续 7 d; 西药组腹腔注射依达拉奉右莰醇注射液 0.33 mL/100 g(根据说明书用于大鼠模型的等效剂量换算), 每日 1 次, 连续 7 d。

1.4.2 造模方法 参照改良 Longa 线栓法制备 MCAO 大鼠^[17], 大鼠术前禁食不禁水 12 h, 麻醉后取仰卧位, 固定四肢及头部, 充分暴露颈部, 备皮消毒后于颈中线作切口, 充分暴露左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉, 然后结扎颈外动脉及颈总动脉近心端, 临时用夹住颈内动脉的近端, 在颈总动脉远端打一活结, 于活结下方用眼科剪做一个小切口, 将线栓从切口处轻轻插入颈内动脉, 遇到阻力后, 略拉紧活结, 取下颈内动脉上的夹子, 将线栓继续向内推, 直到大脑中动脉的起源被阻断, 线栓长度约为 18~20 mm, 拉紧活结, 扎紧线栓, 剪去线栓多余部分, 然后缝合皮肤。大鼠术后完全清醒生命

体征平稳后, 采用 Zea-longa 神经功能评分方法评估模型的神经功能缺损评分^[18]。评分范围 0~4 分, 0 分是无神经功能缺损, 1 分是不能完全伸展对侧前爪, 2 分是行走时向外侧转圈, 提示中度神经功能缺损, 3 分是行走时向对侧倾倒, 提示重度神经功能缺损, 4 分是不能自主行走, 并且意识水平较低。分值为 1~3 分说明 MCAO 造模成功, 4 分为死亡。将评分在 1~3 分的大鼠纳入实验研究中, 剔除 0 分和 4 分, 得分越高, 则大鼠神经功能缺损越严重。最终每组纳入 12 只大鼠。

1.5 实验方法

1.5.1 神经功能评分 大鼠术后完全清醒后, 采用 Zea-longa 神经功能评分方法评估模型的神经功能缺损评分(参照“1.4.2”项评分方法)。

1.5.2 TTC 染色 将大鼠麻醉后取出完整大脑组织, 置于载玻片上, 放入 -20 °C 冰箱 20~30 min, 然后将组织切成厚度约为 2 mm 的冠状切片, 放入 2% TTC 溶液中, 用锡纸包住避光, 放入 37 °C 恒温箱中 30 min, 注意期间不时翻动脑片, 让脑片与 2% TTC 溶液充分接触, 最后将脑片放入 4% 多聚甲醛溶液中放入 4 °C 冰箱过夜保存固定, 拍摄图像后用 ImageJ 软件进行图像分析, 计算梗死面积百分比。

1.5.3 H&E 染色 大鼠麻醉后取脑缺血区组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋后切片, 烤片(60 °C 左右)后二甲苯 I、二甲苯 II 各浸泡 15 min, 梯度酒精 100% I、100% II、95%、90%、85%、70% 各 5 min, 随后, 用苏木精核染, 分化, 伊红染液复染, 再过梯度乙醇, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 晒干后在显微镜下观察各组大鼠病理结构。

1.5.4 尼氏染色 大鼠麻醉后取脑缺血区组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋后切片, 烤片(60 °C 左右)后二甲苯 I、二甲苯 II 各浸泡 15 min, 梯度酒精 100% I、100% II、95%、90%、85%、70% 各 5 min, 于切片上滴加 2% 尼氏染色液避光 20 min, 再过梯度乙醇, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 晒干, 在显微镜下观察各组大鼠神经元形态。

1.5.5 透射电镜 大鼠麻醉后取脑缺血区组织, 切成约 1 mm³ 的正方体小块后放入 2.5% 戊二醛固定液中固定 2 h 以上后用 0.1 mol/L 磷酸漂洗液漂洗 3 次, 每次 15 min, 接着使用 1% 锇酸固定液进行固定 2~3 h 后再用 0.1 mol/L 磷酸漂洗液漂洗 3 次,

每次 15 min, 再进行脱水、包埋、切片(70 nm), 用 3% 醋酸铀和枸橼酸铅进行双染色, 在透射电镜下观察神经元超微结构和线粒体形态, 并摄片。

1.5.6 ELISA 检测 大鼠麻醉后腹主动脉取血, 静置 30 min~2 h, 离心取血清, 严格按照说明书步骤, 检测各组大鼠血清中 MDA、T-SOD、GSH-PX、ROS 含量。使用酶标仪测量各孔的吸光度值(OD 值), 并根据标准曲线计算 MDA、T-SOD、GSH-PX、ROS 的含量。

1.5.7 Western blot 检测 取缺血区脑组织 50 mg, 加入 RIPA 裂解液和 PMSF(每 10 mg 加 100 μL RIPA 裂解液, RIPA 裂解液:PMSF=100:1) 充分研磨、均浆, 低温离心(4 °C、12 000 r/min) 10 min, 取上清液, 按照 BCA 法测定各蛋白浓度。依据说明书, 用 Jess 全自动蛋白质表达定量分析系统检测各组 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平, ImageJ 对条带灰度值进行分析。以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理

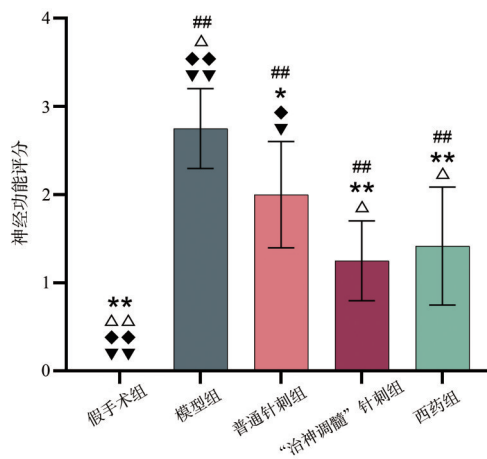
采用 ImageJ 及 GraphPad 10.1.2 统计软件对实验数据结果进行处理和分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个组间比较采用单因素进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分

大鼠 MCAO 模型建立完成后, 治疗 7 d 采用 Zea-longa 神经功能评分方法对大鼠的神经功能缺损进行评分。结果显示, 与假手术组相比, 模型组神经功能评分明显升高($P < 0.01$); 与模型组相比, 普通针刺组神经功能评分降低($P < 0.05$), “治神调髓”针刺组和西药组神经功能评分明显降低($P < 0.01$);

与普通针刺组相比, “治神调髓”针刺组和西药组神经功能评分降低($P < 0.05$); “治神调髓”针刺组和西药组之间神经功能评分差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 1。



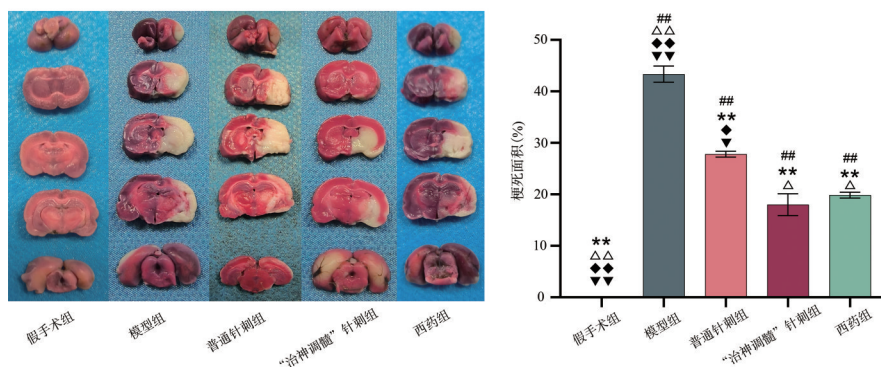
与假手术组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与普通针刺组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与“治神调髓”针刺组比较, $^{\blacklozenge}P < 0.05$, $^{\blacklozenge\blacklozenge}P < 0.01$; 与西药组比较, $^{\blacktriangledown}P < 0.05$, $^{\blacktriangledown\blacktriangledown}P < 0.01$

图 1 各组大鼠神经功能评分

Fig 1 Neurological function score of rats in each group

2.2 TTC 染色观察脑梗死面积

大鼠 MCAO 模型建立完成治疗 7 d 后, 采用 TTC 染色法检测脑梗死面积。结果显示, 与假手术组相比, 模型组脑梗死面积明显增多($P < 0.01$); 与模型组相比, 普通针刺组、“治神调髓”针刺组和西药组大鼠脑梗死面积明显减少($P < 0.01$); 与普通针刺组相比, “治神调髓”针刺组和西药组大鼠脑梗死面积减少($P < 0.05$); “治神调髓”针刺组和西药组之间大鼠脑梗死面积差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 2。



与假手术组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$; 与普通针刺组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与“治神调髓”针刺组比较, $^{\blacklozenge}P < 0.05$, $^{\blacklozenge\blacklozenge}P < 0.01$; 与西药组比较, $^{\blacktriangledown}P < 0.05$, $^{\blacktriangledown\blacktriangledown}P < 0.01$

图 2 各组大鼠脑梗死面积比较(TTC 染色)

Fig 2 Comparison of cerebral infarction area of rats in each group (TTC staining)

2.3 H&E染色观察脑组织病理损伤

大鼠MCAO模型建立完成治疗7d后,进行H&E染色观察各组大鼠脑缺血区病理损伤。假手术组神经元形态完整,分布均匀,边界清晰,与假手术组相比,模型组神经元受到严重损伤,大部分形

态改变,核固缩深染,与模型组相比,普通针刺组神经元损伤减轻,但仍有部分细胞出现核固缩深染现象,“治神调髓”针刺组和西药组神经元损伤大幅减轻,细胞数量明显增加,细胞核固缩深染少,且明显优于普通针刺组,见图3。

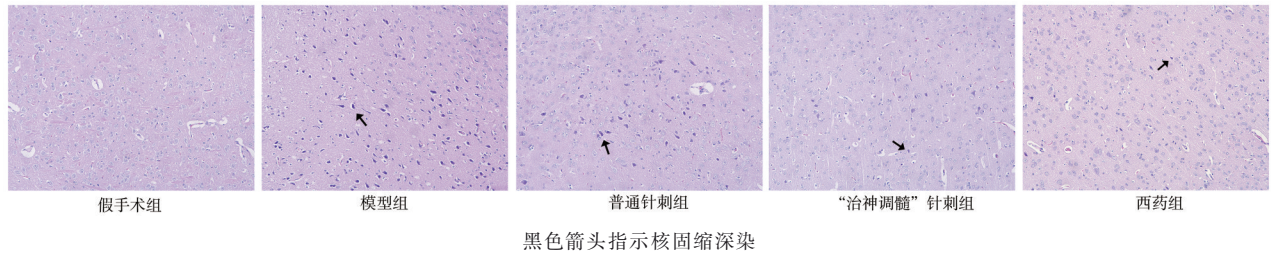


图3 各组大鼠H&E染色(×200 μm)

Fig 3 H&E staining of rats in each group(×200 μm)

2.4 尼氏染色观察神经元

大鼠MCAO模型建立完成治疗7d后,进行尼氏染色观察各组大鼠神经元形态。假手术组神经元形态完整,可见细胞内尼氏小体,模型组则神经元受到严重损伤,细胞固缩,核碎裂溶解,尼氏小体

消失,与模型组相比,普通针刺组神经元损伤减轻,部分细胞形态恢复,“治神调髓”针刺组和西药组神经元损伤大幅减轻,细胞数量明显增加,尼氏小体也大幅增多,见图4。

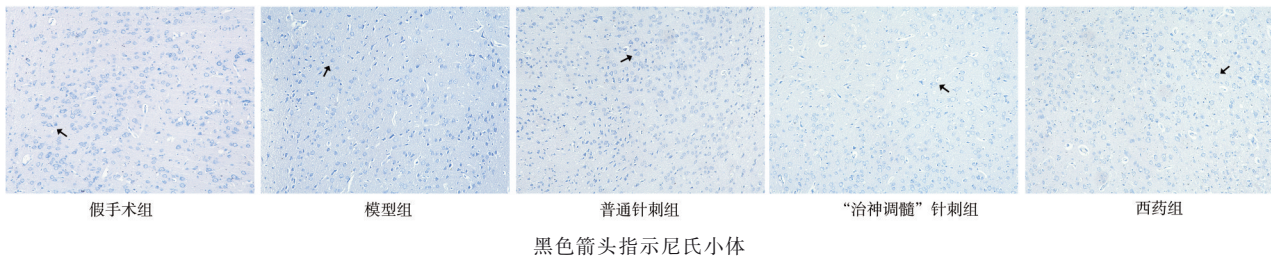


图4 各组大鼠尼氏染色(×200 μm)

Fig 4 Nissl staining of rats in each group(×200 μm)

2.5 透射电镜

大鼠MCAO模型建立完成治疗7d后,在透射电镜下对各组观察。与模型组相比,假手术组细胞和细胞核形态规则,双核膜结构清晰,核周隙未见明显增宽,染色质分布均匀;普通针刺组和西药组细胞和细胞核形态不规则,胞质电子密度增高,细

胞核凹凸不平,核周隙增宽,大量线粒体肿胀,嵴结构模糊或减少,基质电子密度降低,内质网扩张;“治神调髓”针刺组细胞核形态较规则,双核膜结构清晰,核周隙未见明显增宽,染色质分布均匀,少量线粒体肿胀,嵴结构模糊或减少,基质电子密度降低,内质网结构清晰,未见明显异常,见图5。

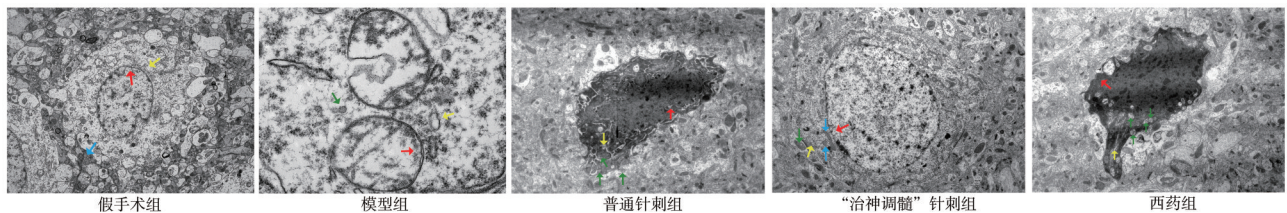


图5 各组大鼠神经元形态(透射电镜,标尺=2 μm)

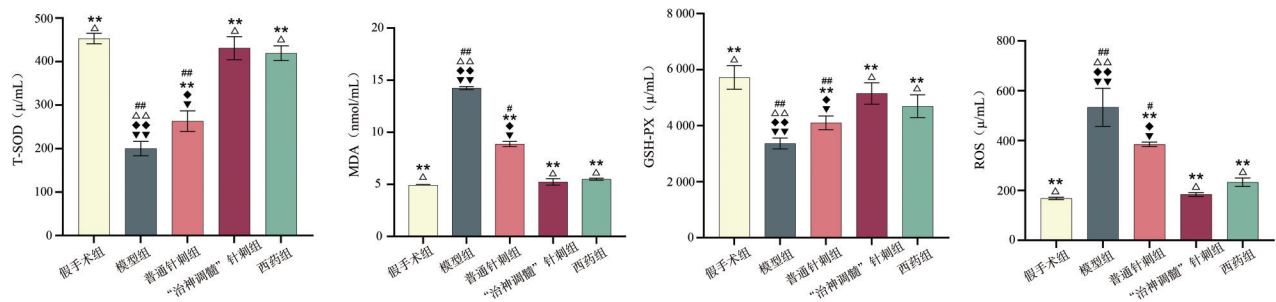
Fig 5 Neuronal morphology of rats in each group (transmission electron microscope, scale bar=2 μm)

Fig 5 Neuronal morphology of rats in each group (transmission electron microscope, scale bar=2 μm)

2.6 ELISA 检测各组血清 T-SOD、MDA、GSH-PX、ROS 含量

大鼠 MCAO 模型建立完成治疗 7 d 后, 对各组大鼠血清中 T-SOD、MDA、GSH-PX、ROS 含量进行检测。结果显示, 与假手术组相比, 模型组血清中 T-SOD、GSH-PX 含量明显降低 ($P < 0.01$), MDA、ROS 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 普通针刺组、“治神调髓”针刺组和西药组血清

中 T-SOD、GSH-PX 含量明显升高 ($P < 0.01$), MDA、ROS 含量明显降低 ($P < 0.01$); 与普通针刺组相比, “治神调髓”针刺组和西药组血清中 T-SOD、GSH-PX 含量升高 ($P < 0.05$), MDA、ROS 含量明显降低 ($P < 0.05$); “治神调髓”针刺组和西药组血清中 T-SOD、GSH-PX、MDA、ROS 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 6。



与假手术组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$; 与普通针刺组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与“治神调髓”针刺组比较, $^{\blacklozenge}P < 0.05$, $^{\blacklozenge\blacklozenge}P < 0.01$; 与西药组比较, $^{\blacktriangledown}P < 0.05$, $^{\blacktriangledown\blacktriangledown}P < 0.01$

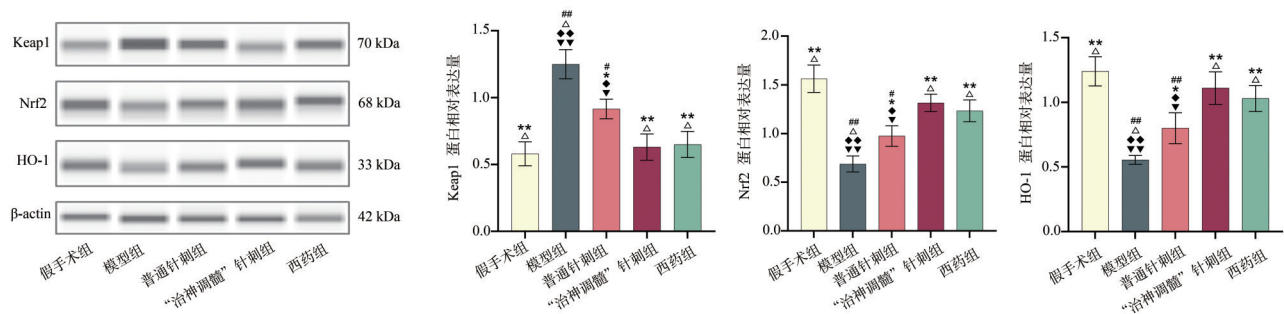
图 6 各组大鼠血清 T-SOD、MDA、GSH-PX、ROS 含量

Fig 6 Levels of T-SOD, MDA, GSH-PX, and ROS in serum of rats in each group

2.7 Western blot 检测各组 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平

大鼠 MCAO 模型建立完成治疗 7 d 后, 用 Western blot 检测 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平。结果显示, 与假手术组相比, 模型组 Keap1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 普通针刺组 Keap1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), Nrf2 和

HO-1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), “治神调髓”针刺组和西药组 Keap1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与普通针刺组相比, “治神调髓”针刺组和西药组 Keap1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); “治神调髓”针刺组与西药组之间 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 7。



与假手术组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与普通针刺组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与“治神调髓”针刺组比较, $^{\blacklozenge}P < 0.05$, $^{\blacklozenge\blacklozenge}P < 0.01$; 与西药组比较, $^{\blacktriangledown}P < 0.05$, $^{\blacktriangledown\blacktriangledown}P < 0.01$

图 7 各组 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平

Fig 7 Protein expression levels of Keap1, Nrf2, and HO-1 in each group

3 讨论

IS 的发病机制是多方面的,氧化应激与 IS 许多生理和病理过程密切相关,是 IS 损伤的关键原因^[19]。在脑缺血发生时,缺血诱导的功能障碍的线粒体导致 ROS 的大量产生^[20],ROS 的过度产生会导致抗氧化防御系统失衡,从而诱导氧化应激损伤^[21,22]。Keap1 与细胞质中的 Nrf2 结合可抑制 ROS 的过量产生^[23]。在氧化应激条件下,细胞受到过载的 ROS 攻击,Keap1 与 Nrf2 结构域改变,转移到细胞核的 Nrf2 磷酸化并形成形成异二聚体,与抗氧化反应元件结合,激活调控下游的 *HO-1* 等抗氧化基因的表达^[24],因此,Keap1/Nrf2/HO-1 是降低氧化应激的重要信号轴^[25]。研究表明,Nrf2 可以通过清除细胞 ROS 和恢复氧化还原平衡减轻氧化应激损伤^[26],增强 *HO-1*、GSH-PX、T-SOD 等抗氧化剂的抗氧化性能^[27]。本研究首先构建了 MCAO 大鼠模型,发现与假手术组相比,模型组神经功能学评分明显下降,神经元损伤严重,脑梗死面积大,血清中 T-SOD、GSH-PX 明显降低 ($P < 0.01$),MDA、ROS 含量明显升高 ($P < 0.01$),脑组织 Keap1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$),Nrf2、HO-1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$),上述结果表明,IS 能激活 Keap1/Nrf2/HO-1 信号轴,通过调控氧化应激反应影响脑内神经组织的缺血性氧化损伤程度。

IS 在中医学属于“中风”范畴,其病因病机通常被认为是正气不足、饮食情志、劳倦内伤,引起气血逆,风、火、痰、瘀扰上窍,损伤脑络^[28],基本治法是化痰通络、益气活血化瘀、开窍醒脑^[29]。“治神调髓”针刺以百会、肾俞、四神聪、悬钟,三阴交、内关作为针刺点组穴。百会是头部穴位,督脉之会,有开窍醒脑,双向调节气血经络之效^[30],电针百会可以抑制 ROS 的产生,使 MDA 水平下降,改善神经功能,发挥神经保护作用^[31];肾俞是足太阳膀胱经的常用腧穴之一,具有补益肾脏、益精生髓的作用,电针肾俞可以清除 ROS,减少 MCAO 大鼠脑组织氧化应激反应^[32],与百会上下配穴,可达到温通经络,调整阴阳的目的;四神聪位于头部,能安神定志,改善脑部血液循环,与百会配穴,可以通过减少 MDA,增加 SOD、GSH 水平,提高 MCAO 大鼠抗氧化能力,减轻氧化应激损伤^[33];悬钟则能通经活络,调和气血,与百会配穴,可达到濡养脑络,益髓充脑的目的^[34];三阴交为足三阴交会之穴,有研究证明针刺三阴交可以激活并改善脑区功能,能达到醒脑开窍

的目的^[35];内关为八脉交会之穴,研究发现针刺内关可以明显改善 MCAO 大鼠脑梗死面积,恢复神经功缺失症状^[36]。这些穴位相互配合,可能通过调节氧化应激通路,抑制 ROS 的产生,减少 MDA 等氧化物水平,增加 SOD、GSH 等抗氧化物水平,减轻氧化应激损伤,发挥填精益髓,调神醒脑之功,达到治神调髓,显肾脑相济的目的。本研究表明,与模型组对比,“治神调髓”针刺组大鼠脑组织脑梗死面积明显减少 ($P < 0.01$),脑细胞和神经元数量增多,缺血脑组织 Keap1 蛋白表达量减低,Nrf2 及 HO-1 蛋白表达量升高 ($P < 0.01$),同时,血清中 T-SOD、GSH-PX 等抗氧化物水平升高,氧化应激损伤标记物 MDA、ROS 水平降低 ($P < 0.01$),由此可以推测“治神调髓”针刺可以通过激活 Keap1/Nrf2/HO-1 信号轴平衡氧化还原稳态,从而达到减轻氧化应激损伤,治疗 IS 的目的。本研究还进一步发现,在下调血清中 MDA、ROS 含量与缺血脑组织中 Keap1 蛋白表达水平,上调血清中 T-SOD、GSH-PX 含量与缺血脑组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平“治神调髓”针刺组明显优于普通针刺组 ($P < 0.05$),原因可能是针刺百会、肾俞、四神聪等穴位对氧化与氧化的核心机制有调节作用^[37];此外在降低血清中 MDA、ROS 含量及缺血脑组织中 Keap1 蛋白表达水平,同时提升血清中 T-SOD、GSH-PX 含量,缺血脑组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平方面“治神调髓”针刺组与西药组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。西药依达拉奉右莰醇治疗 IS 的机制是清除氧自由基,抑制过氧化物反应及减少炎症因子的释放,调控氧化应激—炎症级联反应,从而达到保护脑细胞,修复神经元,改善神经功能的作用^[38],该药物在临床上治疗优势明显,应用前景广泛,但缺乏足够的临床试验数据,价格较为昂贵,在此背景下,“治神调髓”针刺提供了一种有效的补充选择,其疗效不逊于依达拉奉右莰醇,较之于普通针刺提升明显,而且针刺治疗 IS 历史悠久,已有大量研究支持,副作用小,其价格相比于依达拉奉右莰醇更为经济,作为一种兼具效益与安全性的非药物替代方案,对临床选择具有指导价值。

本次实验有几个局限性:此次只简单验证了 Keap1/Nrf2/HO-1 信号轴上的几个标志物的变化,确定了“治神调髓”针刺的抗氧化作用,未深入探究其具体机制,虽然设立了依达拉奉右莰醇对照组,也通过尼氏染色及透射电镜等方法比较,发现“治

神调髓”针刺可以使神经元损伤得到大幅改善,改善神经炎症,但未明确具体靶点,因此,未来可以检测 Nrf2 的核转位、DNA 结合活性;检测下游更多抗氧化酶(如 NQO1)的表达;使用通路抑制剂或激动剂进行反向验证;探讨针刺信号如何从穴位传入并最终影响中枢该通路等方式,进一步深入探索“治神调髓”针刺治疗 IS 如何在此通路上发挥作用。

作者贡献度说明:

李玲玲:实验实施、数据整理、论文撰写;徐银凤:数据整理、结果分析;谢珊珊、智勇:实验设计、论文审校。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Ajoolabady A, Wang S, Kroemer G, et al. Targeting autophagy in ischemic stroke: From molecular mechanisms to clinical therapeutics [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107848.
- 冯亚硕, 吴毅, 王念宏. 针刺影响细胞程序性死亡治疗缺血性脑卒中的研究进展[J]. *针刺研究*, 2023, 48(7): 713-717.
Feng YS, Wu Y, Wang NH. Research progress of the impacts of acupuncture on programmed cell death in treatment of ischemic stroke [J]. *Acupunct Res*, 2023, 48(7): 713-717.
- Tuo QZ, Zhang ST, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications [J]. *Med Res Rev*, 2022, 42(1): 259-305.
- Paul S, Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies [J]. *Exp Neurol*, 2021, 335: 113518.
- 李光硕, 赵性泉.《中国急性缺血性卒中诊治指南 2023》解读[J]. *中国卒中杂志*, 2024, 19(8): 956-961.
Li GS, Zhao XQ. Interpretation of the Chinese Guidelines for Diagnosis and Treatment of Acute Ischemic Stroke 2023 [J]. *Chin J Stroke*, 2024, 19(8): 956-961.
- 姚嘉永, 邹伟. 针刺治疗缺血性脑卒中机制的研究进展 [J]. *针刺研究*, 2022, 47(4): 354-361, 368.
Yao JY, Zou W. Mechanism of acupuncture in treatment of ischemic stroke: A review [J]. *Acupunct Res*, 2022, 47(4): 354-361, 368.
- Crupi R, Cordaro M, Cuzzocrea S, et al. Management of traumatic brain injury: From present to future [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(4): 297.
- Qin C, Yang S, Chu YH, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 215.
- Liu L, Vollmer MK, Fernandez VM, et al. Korean red ginseng pretreatment protects against long-term sensorimotor deficits after ischemic stroke likely through Nrf2 [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 74.
- Kozlov AV, Bahrami S, Redl H, et al. Alterations in nitric oxide homeostasis during traumatic brain injury [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(10 Pt B): 2627-2632.
- Vijayan V, Wagener FA, Immenschuh S. The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 153: 159-167.
- Lu J, Huang Q, Zhang D, et al. The protective effect of Di Dang Tang against AIC13-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells through the activation of SIRT1-mediated Akt/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 466.
- 热西代·多里坤, 李永凯, 郭慧, 等. “治神调髓”组穴针刺治疗脑卒中单侧空间忽略: 随机对照研究 [J]. *中国针灸*, 2019, 39(10): 1041-1045.
Rexide DLK, Li YK, Guo H, et al. Zhishen Tiaosui acupuncture on the unilateral spatial neglect after stroke: A randomized controlled trial [J]. *Chin Acupunct Moxibust*, 2019, 39(10): 1041-1045.
- 李永凯, 刘娟. 治神调髓法针刺结合综合康复治疗脑卒中单侧空间忽略 43 例疗效观察 [J]. *当代临床医刊*, 2019, 32(6): 567, 539.
Li YK, Liu J. Curative effect observation on 43 cases of unilateral spatial neglect after stroke treated by acupuncture for treating the spirit and regulating the spinal canal combined with comprehensive rehabilitation [J]. *Med J Present Clin*, 2019, 32(6): 567, 539.
- 谢辉, 贺小飞, 董伟娜, 等. 治神调髓法针刺脑卒中后单侧空间忽略疗效研究 [J]. *陕西中医*, 2023, 44(11): 1623-1627.
Xie H, He XF, Dong WN, et al. Curative effect study on Zhishen Tiaosui acupuncture on unilateral spatial neglect after stroke [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2023, 44(11): 1623-1627.
- Zhi Y, Huo XH, Li P. Efficacy observation of Zhi Shen Tiao Sui acupuncture method for depression after ischemic stroke [J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2021, 19(3): 180-186.
- Xie S, Zhi Y, Zeng B. Protective effects of catalpol on limb motor function and ultrastructure of hippocampal neurons in rats with cerebral ischemia [J]. *Mol Biotechnol*, 2022, 64(2): 213-219.

- 18 Wang C, Luo Q, Que H, et al. Integrating network pharmacology and pharmacological evaluation to explore the protective mechanism of Ershiwuwei Zhenzhu pill in ischemic stroke [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115847.
- 19 Wang Y, Niu H, Li L, et al. Anti-CHAC1 exosomes for nose-to-brain delivery of miR-760-3p in cerebral ischemia/reperfusion injury mice inhibiting neuron ferroptosis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 109.
- 20 Wang X, Zhou Y, Gao Q, et al. The role of exosomal microRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3232869.
- 21 Zhang Y, Zhou H, Wu W, et al. Liraglutide protects cardiac microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury through the suppression of the SR-Ca²⁺-XO-ROS axis *via* activation of the GLP-1R/PI3K/Akt/survivin pathways [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 95: 278-292.
- 22 Ying Z, Chen Y. GW27-e1177 Semaglutide protects cardiac microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury through the suppression of the SR-Ca²⁺-XO-ROS axis *via* activation of the GLP-1R/PI3K/Akt/Survivin pathways [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(16S): C43-C43.
- 23 Guo K, Shang Y, Wang Z, et al. BRG1 alleviates microglial activation by promoting the KEAP1-NRF2/HO-1 signaling pathway and minimizing oxidative damage in cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 119: 110201.
- 24 Zhang Q, Liu J, Duan H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis *via* the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43-63.
- 25 Luo R, Zhu L, Zeng Z, et al. D1-butylphthalide inhibits rotenone-induced oxidative stress in microglia *via* regulation of the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(6): 597.
- 26 Dumitrescu L, Popescu-Olaru I, Cozma L, et al. Oxidative stress and the microbiota-gut-brain axis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 2406594.
- 27 Liu X, Li H, Zhang F, et al. Knockdown of ATF3 alleviates ischemic stroke and inhibits ferroptosis *via* activating the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(9): 11224-11237.
- 28 张丹丹, 韩振蕴, 秦绍林, 等. 真实世界中通络化痰胶囊治疗脑梗死恢复期痰瘀阻络证疗效的多因素分析 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(12): 2001-2006.
- 29 Zhang DD, Han ZY, Qin SL, et al. Multivariate analysis of therapeutic effect of Tongluo Huatan Capsules in treatment of cerebral infarction recovery phase with phlegm-stasis obstructing collaterals syndrome: A real-world study [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2022, 28(12): 2001-2006.
- 29 Xing N, Long XT, Zhang HJ, et al. Research progress on effects of traditional Chinese medicine on myocardial ischemia-reperfusion injury: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1055248.
- 30 熊新林, 罗甜, 熊艳平, 等. 中医针灸结合康复治疗治疗中风偏瘫患者的临床效果及其日常生活能力的影响分析 [J]. *内蒙古中医药*, 2024, 43(7): 102-103.
- Xiong XL, Luo T, Xiong YP, et al. Clinical effect of acupuncture and moxibustion combined with rehabilitation therapy in the treatment of stroke patients with hemiplegia and its influence on daily living ability [J]. *Inner Mongolia J Tradit Chin Med*, 2024, 43(7): 102-103.
- 31 Chen L, Chen S, Bai Y, et al. Electroacupuncture improves cognitive impairment after ischemic stroke based on regulation of mitochondrial dynamics through SIRT1/PGC-1 α pathway [J]. *Brain Res*, 2024, 1844: 149139.
- 32 易涛. 电针预处理对MCAO模型大鼠脑内稳态调节及生物学机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
- Yi T. Study on the regulation and biological mechanism of electropuncture pretreatment on cerebral homeostasis in MCAO model rats [D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- 33 蔡娟, 马文, 王观涛, 等. 针刺对脑卒中后抑郁大鼠血清丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽表达的影响 [J]. *吉林中医药*, 2019, 39(5): 642-645.
- Cai W, Ma W, Wang GT, et al. Acupuncture treats post stroke depression rats by regulating serum MDA, SOD and GSH levels [J]. *Jilin J Chin Med*, 2019, 39(5): 642-645.
- 34 徐怡, 宋玉强, 周菁, 等. 基于“玄府-气液-脑络”理论探讨缺血性脑卒中针刺治疗思路 [J]. *中国中医急症*, 2025, 34(6): 1005-1009.
- Xu Y, Song YQ, Zhou J, et al. Exploring the acupuncture treatment strategy for ischemic stroke based on the theory of "Xuanfu-Qiyel-Cerebral Collaterals" [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2020, 34(6): 1005-1009.
- 35 刘辉. 基于 cAMP/PKA-pCREB 信号通路探讨针刺“百会、内关、三阴交”对脑缺血大鼠神经功能的治疗作用及机制 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2020.
- Liu H. Based on cAMP/PKA-pCREB signaling pathway to explore the therapeutic effect and mechanism

- of acupuncture "Baihui, Neiguan, Sanyinjiao" on nerve function in rats with cerebral ischemia [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- 36 赵海军. 针刺对缺血性脑损伤神经血管单元功能的影响及机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.
Zhao HJ. The effects and mechanisms of acupuncture on the function of neurovascular unit in cerebral ischemic injury [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2013.
- 37 张小琴, 赵优琴, 黄莉莉, 等. 基于 Keap-1/Nrf2/ARE 信号通路探讨片仔癀改善 MCAO 大鼠氧化应激损伤的作用[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(11): 6466-6470.
Zhang XQ, Zhao YQ, Huang LL, et al. Effect of Pien Tze Huang on improving oxidative stress damage in MCAO rats based on Keap-1/Nrf2/ARE signaling pathway[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(11): 6466-6470.
- 38 Mohan RD, Kulkarni NV. Recent developments in the design of functional derivatives of edaravone and exploration of their antioxidant activities[J]. Mol Divers, 2025, 29(2): 1895-1910.

[本文编辑] 陈思润