

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.02.012

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

罗敷¹, 封蔚彬¹, 刘丹妮¹, 孙光华¹, 周桂娟¹, 谭金曲¹,
黄夏荣¹, 尹林伟¹, 刘红雅¹, 周君^{1,2}✉

1. 南华大学衡阳医学院附属第一医院, 湖南省衡阳市石鼓区船山路 69 号, 421001; 2. 四川大学华西医院

[摘要] **目的** 探讨电针“百会”“人中”穴治疗脑缺血再灌注损伤(CIRI)的疗效及可能作用机制。**方法** 36只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组和电针组,每组12只。除假手术组外其余大鼠采用大脑中动脉线栓阻断法制备CIRI大鼠模型。造模24 h后对电针组大鼠行电针干预,穴取“百会”“人中”,频率15 Hz、强度为1 mA的连续波,每天1次,每次20 min,共5天。用Longa法评定各组大鼠神经功能损伤程度;TTC染色法测定大鼠脑梗死体积,HE染色观察脑组织病理形态改变;ELISA法检测脑脊液白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素18(IL-18)水平;逆转录聚合酶链反应和Western blotting法分别检测皮质缺血区脑组织 Gasdermin D (GSDMD) mRNA 和 Gasdermin D 蛋白的氮端(GSDMD-N)蛋白表达。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠神经功能评分明显上升、脑梗死体积明显增加,脑脊液IL-1 β 、IL-6和IL-18含量明显增加,皮质缺血区脑组织 GSDMD mRNA 及 GSDMD-N 蛋白表达水平明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);HE染色结果显示,模型组大鼠脑组织神经元排列紊乱,部分神经细胞消失,胞核固缩,结构不完整。与模型组比较,电针组大鼠神经功能评分下降、脑梗死体积减小,脑脊液IL-6和IL-18含量明显减少,GSDMD mRNA 及 GSDMD-N 蛋白表达水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);大鼠大脑皮质神经元变性神经细胞数量丢失程度均较模型组有所减轻。**结论** 电针“百会”“人中”穴能使CIRI模型大鼠脑梗死体积减小,改善大鼠神经功能,其机制可能与下调脑脊液炎症因子和皮质缺血区脑组织细胞焦亡底物蛋白 GSDMD 表达有关。

[关键词] 脑缺血再灌注损伤;电针;百会;人中;炎症因子;细胞焦亡底物蛋白

脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)是指脑组织缺血一段时间后,当血流再次恢复时,缺血区脑组织的神经细胞损害和脑功能障碍进一步加重的病理现象。CIRI可归属于中医学“中风”范畴,大部分患者因CIRI遗留不同程度的功能障碍,给社会及家庭带来沉重负担^[1]。研究显示,电针可能通过减少炎症介质的释放而发挥抗CIRI的作用^[2]。CIRI是一个复杂的炎症级联反应病理过程,细胞焦亡是一种典型依赖于炎症反应的程序性细胞死亡方式,在CIRI发生发展的过程中扮演着重要角色^[3]。细胞焦亡底物蛋白

Gasdermin D (GSDMD)的氮端(GSDMD-N)是炎症小体激活和细胞焦亡的可靠标志物^[4]。基于此,本研究观察电针“百会”“人中”穴对CIRI模型大鼠神经炎症反应及GSDMD蛋白表达的影响,为电针防治CIRI的临床应用提供理论依据。本研究经南华大学衡阳医学院附属第一医院伦理委员会批准(批准号201907040135)。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康雄性SD大鼠36只,3月龄,体重350~450g,购于湖南省斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2019-0004。将大鼠饲养于室温(24 $\pm$ 2)℃、湿度(55 $\pm$ 5)%、12 h黑暗/光照循环交替环境中,大鼠自由

基金项目:国家自然科学基金(81973917);湖南省自然科学基金(2020JJ5508);湖南省卫健委2020年度科研立项课题(20200474)

✉ 通讯作者:zhoujun8005@163.com

饮水摄食, 适应性饲养 1 周。

1.2 主要试剂与仪器

2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC, 上海齐源生物科技有限公司, 批号 T8170); 苏木精-伊红 (HE) 染色剂 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 C0105S); GSDMD-N 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 ab215203); β -actin 抗体 (批号 66009-1-Ig)、白细胞介素 1 β (IL-1 β , 批号 D08035329)、白细胞介素 6 (IL-6, 批号 B23031504)、白细胞介素 18 (IL-18, 批号 D09035330) Elisa 试剂盒, 美国 Proteintech 公司; Trizol 试剂 (美国 Thermo 公司, 批号 15596018); 10% 水合氯醛 (上海酶联生物科技有限公司, 批号 ML7018); cDNA (北京康为世纪生物科技有限公司, 批号 CW0632); SuperECL Plus 超敏发光液 (美国 Advansta 公司, 批号 K-12045-D50)。

华佗牌电子针疗仪 (苏州医疗用品有限公司, 型号 SDZ-V); 0.35 mm $\times$ 25 mm 汉医牌无菌针灸针 (北京汉医医疗器械有限责任公司, 批号 HY210203); 台式冷冻离心机 (中国湖南湘仪公司, 型号 H1650R); 光学显微镜 (日本奥林巴斯株式会社, 型号 BA210T); 切片机 (德国 Leica 公司, 型号 YD-315); 荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 仪 (型号 MB-530)、荧光 PCR 板 (型号 PW-812), 美国 Thermo 公司; 数码相机 (佳能公司, 型号 5000D); 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司, 型号 DYY-6C)。

1.3 分组及造模

采用随机数字表法将 36 只大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组, 每组 12 只。模型组和电针组大鼠参照文献 [5] 中线栓法阻断大脑中动脉建立 CIRI 大鼠模型: 腹腔注射 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 麻醉后, 仰卧位固定于自制的手术台上。颈部正中剃毛消毒, 剪开皮肤, 钝性分离肌肉, 分离右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉, 将颈外动脉远心端剪个“V”型口, 将磨圆滑的鱼线从颈外动脉插入颈内动脉约 1.8~2.2 cm, 然后将鱼线和颈外动脉一起结扎。2 h 后将鱼线拔出, 缝合皮肤。假手术组手术方式同模型组, 但仅暴露出右侧的颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉, 不做栓塞, 然后逐层缝合。

1.4 干预方法

电针组: 造模后 24 h 用鼠板固定大鼠四肢。参照《实验针灸学》^[6], 结合模拟人体经穴并比较解剖学方法取穴, “人中”: 唇裂鼻尖下 1 mm 正中处;

“百会”: 顶骨正中。将“百会”“人中”对应部位剃毛, 用 0.35 mm $\times$ 25 mm 的华佗牌一次性无菌针灸针刺入, “百会”向前斜刺 2 mm, “人中”向鼻中隔斜刺 1 mm。进针后, 针柄接华佗牌电针仪, 波形为连续波, 频率 15 Hz, 强度以局部肌肉轻微收缩为度 (1 mA), 每天 1 次, 每次 20 min。共干预 5 天。

假手术组与模型组: 针刺位置用胶布固定无菌针灸针, 连接电针仪但不开机, 干预 5 天。

1.5 观察指标及方法

各组大鼠按照随机数字表选取 6 只进行全脑 TTC 染色, 测量脑梗死体积, 剩余 6 只大鼠进行其他指标检测。

1.5.1 脑梗死体积 干预完成后, 断头取脑, 脑组织用生理盐水冲洗后, 将其直接放入 -20℃ 冰箱 15 min。解冻后, 用切片机沿冠状面连续切成 5 片厚约 2 mm 的脑组织, 将之置于预热好的孵育液中, 37℃ 恒温孵育 30 min。每间隔 15 min 轻轻摇动组织, 使其均匀染色。观察染色结果, 非梗死区为红色, 梗死区为白色。用数码相机在同样光性条件下进行图像采集, 用 Image J 1.8.0 软件计算脑梗死体积并进行统计学分析。

1.5.2 神经功能损伤评分 干预完成后, 参考 Longa 法^[7]对大鼠进行评分, 评分方法: 无神经损伤症状: 0 分; 不能完全伸展对侧前爪: 1 分; 向对侧转圈: 2 分; 向对侧倾倒: 3 分; 意识丧失, 不能自发行走: 4 分。分值越高, 说明损伤程度越严重。

1.5.3 脑脊液炎症因子的分泌情况 神经功能损伤评分完成后, 采用 10% 水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射进行大鼠麻醉, 提起大鼠, 使其颈部与身体呈 135°角。在枕骨棘下缘约 0.5 cm 的肌肉间隙处进针, 进针方向与大鼠身体平行, 进针至有落空感后, 慢慢回抽。每只大鼠取脑脊液 0.08~0.1 ml, 放入 -80℃ 冰箱中保存。炎症因子检测采用 Elisa 法, 严格按照试剂说明书操作, 测定脑脊液中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 含量。

1.5.4 脑组织病理形态 脑脊液采集完成后, 大鼠断头取脑, 取缺血区大脑皮质组织, 于 -196℃ 液氮中保存。采用 HE 染色, 取备用的石蜡切片, 脱蜡脱水, 依次用苏木精、伊红进行染色, 中性树胶封片, 显微镜观察缺血区大脑皮质组织病理形态。

1.5.5 皮质缺血区脑组织 GSDMD mRNA 表达 采用 RT-PCR 法, EP 管中备用脑组织标本, 按 Trizol

法提取各样本的总 RNA 后按 cDNA 合成试剂盒说明书操作, 以 β -actin 为内参。用荧光定量 PCR 仪进行定量分析, 结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 GSDMD 的相对表达量。引物由上海生工合成引物, GSDMD: 上游 TTAGTCTGCTTGCCGTACTCC, 下游 GTCCTGTAA AATCCTCCCCGATG, 产物长度 197 bp; β -actin: 上游 ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC, 下游 TACTC CTGCTTGCTGATCCAC, 产物长度: 223 bp。

1.5.6 皮质缺血区脑组织 GSDMD-N 蛋白表达采用 Western blotting 法, 剪取皮质缺血区脑组织 0.025 g, 用冰预冷 PBS 洗组织, 提取蛋白, 制胶 (12% 的 SDS-PAGE)。电泳后, 切胶, 蛋白转印。5% 脱脂奶粉室温封闭 60 min, 4℃ 过夜, 次日室温放置 30 min。加入一抗 (β -actin 1:5000, GSDMD-N 1:1000), 加入一抗稀释液, 4℃ 孵育 90 min, 加入二抗 (羊抗小鼠 IgG 1:5000, 羊抗兔 IgG 1:6000) 后 37℃ 孵育 90 min, 使用 ECL 发光试剂盒来检测蛋白。使用 Image J 1.8.0 软件分析条带的灰度值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件统计实验数据, 本研究计量数据均满足正态分布及且方差齐, 用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 各组间差异比较采用单因素方差分析, 并采用 LSD 法进行两两比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能损伤评分及脑梗死体积比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能评分明显上升, 脑梗死体积明显增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 电针组大鼠神经功能评分下降及脑梗死体积减小 ($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠神经功能损伤评分、脑梗死体积比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	神经功能评分/分	脑梗死体积/mm ²
假手术组	6	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	6	1.00 $\pm$ 0.63 ^{a)}	0.33 $\pm$ 0.11 ^{a)}
电针组	6	0.33 $\pm$ 0.52 ^{b)}	0.12 $\pm$ 0.09 ^{b)}

注: a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠脑脊液 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 含量比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑脊液 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 含量明显增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 电针组大鼠脑脊液 IL-6 和 IL-18 含量均低于模型组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), IL-1 β 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠脑脊液炎症因子水平比较 (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β	IL-6	IL-18
假手术组	6	171.60 $\pm$ 39.15	6.14 $\pm$ 2.06	0.93 $\pm$ 0.22
模型组	6	268.14 $\pm$ 88.08 ^{a)}	11.45 $\pm$ 3.55 ^{a)}	2.45 $\pm$ 0.49 ^{b)}
电针组	6	188.65 $\pm$ 60.85	7.76 $\pm$ 2.35 ^{c)}	1.40 $\pm$ 0.36 ^{d)}

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-6, 白细胞介素-6; IL-18, 白细胞介素-18。

a) 与假手术组比较, $P<0.05$; b) 与假手术组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠脑组织 HE 染色结果

HE 染色 ($\times 100$) 结果显示, 假手术组大鼠脑组织神经元排列整齐, 神经元胞浆丰富, 淡染, 胞核居中, 核仁清楚。模型组大鼠脑组织神经元排列紊乱, 部分神经细胞消失, 胞核固缩, 结构不完整。电针干组大鼠大脑皮质神经元变性、神经细胞数量丢失程度均较模型组有所减轻, 提示电针可以减轻脑缺血再灌注后大鼠大脑皮质神经元损伤。

2.4 各组大鼠皮质缺血区脑组织 GSDMD mRNA 及 GSDMD-N 蛋白表达比较

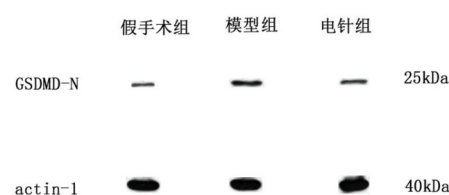
表 3 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠皮质缺血区脑组织 GSDMD mRNA 及 GSDMD-N 蛋白表达明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 电针组 GSDMD mRNA 及 GSDMD-N 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$)。各组大鼠脑组织 GSDMD-N 蛋白表达电泳图见图 1。

表 3 各组大鼠皮质缺血区脑组织 GSDMD mRNA 及 GSDMD-N 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GSDMD mRNA/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$	GSDMD-N 蛋白/ 灰度值
假手术组	6	1.42 $\pm$ 0.43	21.61 $\pm$ 7.12
模型组	6	5.93 $\pm$ 1.99 ^{a)}	52.37 $\pm$ 5.55 ^{a)}
电针组	6	2.3 $\pm$ 0.49 ^{b)}	29.55 $\pm$ 4.77 ^{c)}

注: GSDMD, Gasdermin D 蛋白; GSDMD-N, Gasdermin D 蛋白的氮端。

a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$ 。



注: GSDMD-N, Gasdermin D 蛋白的氮端。

图 1 各组大鼠皮质缺血区脑组织 GSDMD-N 蛋白表达电泳图

3 讨论

中医学认为, CIRI 由多种原因导致气血逆乱, 产生风、火、痰、瘀, 痹阻脑脉, 治疗当以镇肝熄风、活血通络为主。人中、百会均为督脉腧穴, 分布于头面部, 从病位上看, 属于近端取穴治疗^[8]。《肘后方·救卒中恶死方》中记载人中穴醒脑开窍的作用尤其明显, 并广泛应用于急救中。百会为百脉之会, 百病所主, 为临床脑中风常用穴之一。因此, 人中、百会是治疗 CIRI 的重要穴位。临床研究^[9-10]证实, 电针能改善患者肢体的神经功能, 改善日常生活能力, 提高生存质量, 降低再发脑中风风险, 从临床应用角度显示出电针能不同程度地减轻 CIRI。本研究结果显示, 模型组大鼠大脑出现大面积梗死灶, 并表现出明显运动功能障碍, 大鼠脑组织神经细胞结构遭到破坏。而电针“百会”“人中”穴后, 大鼠神经功能缺损程度减轻, 脑梗死体积减小。

CIRI 机制涉及炎症因子反应、脑血流量供应、氧化应激、血管内皮细胞活性、细胞自噬等^[11]。实验研究^[12-13]显示, 电针可调控血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶、核因子 κ B 等基因及其相关蛋白的表达, 促进卒中后神经血管再生, 减轻脑水肿, 抑制炎症反应, 可能通过调控炎症相关途径, 保护缺血再灌注后的神经组织, 从而改善卒中后神经功能^[14]。另有研究^[3]发现, 细胞焦亡可能参与 CIRI 过程。细胞焦亡是一种新发现的炎症细胞程序性死亡方式, 主要通过炎症小体介导包含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (Caspase-1) 在内的多种 Caspase 的激活^[15], 活化的 Caspase-1 切割 GSDMD, 形成 GSDMD-N 和 Gasdermin D 蛋白的碳端 (GSDMD-C), GSDMD-N 和磷脂蛋白结合, 造成细胞穿孔, 进而引起细胞死亡, 并伴随着大量促炎症因子的释放^[16]。IL-1 β 可引起组织的炎症反应、血管扩张和免疫细胞的外渗, 在适应性免疫应答中起到一定的作用^[17]。IL-6 参与免疫反应和炎症, 在慢性炎症性疾病中发挥重要作用^[18]。IL-18 具有增强局部炎症反应的作用^[19]。研究^[20]发现, 许多神经系统疾病的发生与发展, 如 CIRI、阿尔茨海默病、帕金森综合征和肌萎缩侧索硬化症等, 均伴随着炎症反应和细胞焦亡的发生, 同时 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 含量增加。

本研究结果表明, 在脑缺血再灌注的环境下, 脑脊液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 含量显著上

升, 皮质缺血区脑组织中 GSDMD mRNA 及 GSDMD-N 蛋白表达水平上调, 提示 CIRI 机制涉及炎症反应, 可能与 GSDMD 介导的细胞焦亡有关。电针干预“百会”“人中”后, 大鼠脑脊液中炎症因子 IL-6 和 IL-18 含量明显下降, 说明电针治疗可有效减少炎症因子分泌; 皮质缺血区脑组织 GSDMD mRNA 及 GSDMD-N 蛋白表达水平下调明显, 表明电针“百会”“人中”对脑的保护作用可能涉及其对细胞焦亡底物蛋白 GSDMD 的下调。但电针是否通过调控细胞焦亡的机制缓解 CIRI, 以及怎样调节下游转录因子, 仍需结合相关蛋白的抑制剂或激动剂, 或基因沉默/敲除技术进一步研究。

参考文献

- [1] LU LQ, TIAN J, LUO XJ, et al. Targeting the pathways of regulated necrosis: a potential strategy for alleviation of cardio-cerebrovascular injury [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(1): 63-78.
- [2] JIANG T, WU M, ZHANG Z, et al. Electroacupuncture attenuated cerebral ischemic injury and neuroinflammation through α 7nAChR-mediated inhibition of NLRP3 inflammasome in stroke rats [J]. *Mol Med*, 2019, 25(1): 1-13.
- [3] 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]. *J Neurosci Res*, 2019, 97(6): 645-660.
- [4] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [5] 马贤德, 孙宏伟, 柴纪严, 等. 线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型的方法研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(6): 1200-1201.
- [6] 张露芬. 实验针灸学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 91-93.
- [7] WICHA P, TOCHARUS J, JANYOU A, et al. Hexahydrocurcumin alleviated blood-brain barrier dysfunction in cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(3): 659-671.
- [8] 王启才. 针灸治疗学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 60.
- [9] 孙光华, 周君, 周桂娟, 等. 580 例脑卒中运动障碍患者针刺配合物理治疗的回顾性研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(10): 2039-2042.
- [10] 李孟汉, 鲁海, 杜元灏, 等. 针刀结合醒脑开窍针刺法治疗脑梗死恢复期感觉障碍: 随机对照研究 [J]. *中国针灸*, 2021, 41(1): 9-12.
- [11] 夏强, 钱令波. 心脑缺血再灌注损伤的机制及防治策略研究进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2010, 39

- (6):551-558.
- [12] SUN J, SHI J, HOU J, et al. Electroacupuncture protects rats from ischemic brain injury via cofilin in mice [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1):43-48.
- [13] 印婷, 陈海萍, 汪文, 等. 电针预处理对急性脑梗死大鼠神经功能损伤及大脑皮层 Cx43 蛋白表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2019, 44(7):497-500.
- [14] 冯刚, 封蔚彬, 青云, 等. 电针预处理通过抑制 AMPK-Beclin1/Vps34 通路介导的细胞自噬减轻脑缺血再灌注损伤 [J]. *重庆医科大学学报*, 2020, 45(12):1762-1769.
- [15] FRANKE M, BIEBER M, KRAFT P, et al. The NLRP3 inflammasome drives inflammation in ischemia/reperfusion injury after transient middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 92:223-233. doi: 10.1016/j.bbi.2020.12.009.
- [16] RÜHL S, BROZ P. The gasdermin-D pore: executor of pyroptotic cell death [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(36):57481-57482.
- [17] MAN SM, KARKI R, KANNEGANTI TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277(1):61-75.
- [18] HIRANO T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer [J]. *Int Immunol*, 2021, 33(3):127-148.
- [19] VECCHIÉ A, BONAVENTURA A, TOLDO S, et al. IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies? [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(3):1638-1657.
- [20] LAHOOTI B, CHHIBBER T, BAGCHI S, et al. Therapeutic role of inflammasome inhibitors in neurodegenerative disorders [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 91:771-783. Doi:10.1016/j.bbi.2020.11.004.

Effect of Electroacupuncture at “Baihui” (DU20) and “Renzhong” (DU 26) on Inflammatory Factors in Cerebrospinal Fluid and Gasdermin D Expression in Cerebral Tissue in Cortex Ischemia Area in Cerebral Ischemia Reperfusion Injury Model Rats

LUO Fu¹, FENG Weibin¹, LIU Danni¹, SUN Guanghua¹, ZHOU Guijuan¹, TAN Jinqu¹, HUANG Xiarong¹, YIN Linwei¹, LIU Hongya¹, ZHOU Jun^{1,2}

1. The First Affiliated Hospital of Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, 421001; 2. West China Hospital, Sichuan University

ABSTRACT Objective To explore the effect of electroacupuncture (EA) at Baihui (DU 20) and Renzhong (DU 26) on cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) and the possible mechanism. **Methods** A total of 36 male SD rats were randomized into sham-operation group (n=12), model group (n=12) and EA group (n=12). Suture middle cerebral artery occlusion was used to develop the CIRI model in all groups but the sham-operation group. Twenty-four hours after modeling, the rats in the EA group were performed for EA at Renzhong and Baihui, acupoints with a continuous wave with intensity of 1 mA and frequency of 15 Hz, once daily, 20 min each time, for 5 days. The Longa method was used to evaluate the degree of neurological function injury in the rats; TTC staining was used to measure the cerebral infarct volume of rats; HE staining was used to observe the pathological and morphological changes in brain tissue; ELISA method was used to detect the levels of interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 18 (IL-18) in cerebrospinal fluid; reverse transcription polymerase chain reaction and Western blotting were performed to determine the expressions of Gasdermin D (GSDMD) mRNA and the N-terminal fragment of GSDMD (GSDMD-N) protein in brain tissue. **Results** Compared to the sham-operation group, the model group had higher neurological function score and cerebral infarct volume, increased levels of IL-1 β , IL-6 and IL-18 in the cerebrospinal fluid, as well as increased expressions of GSDMD mRNA and GSDMD-N protein ($P<0.05$ or $P<0.01$). HE staining showed that the neuron arrangement in the brain tissue of the model group was disordered; some of the nerve cells disappeared; and the nucleus was constricted with incomplete structure. Compared to the model group, the EA group had significantly decreased neurological function score, cerebral infarct volume, levels of IL-6 and IL-18 in the cerebrospinal fluid, and expression levels of GSDMD mRNA and GSDMD-N protein ($P<0.05$ or $P<0.01$); and the neurons degeneration in the cerebral cortex and the loss of the number of nerve cells were reduced. **Conclusion** EA at Baihui and Renzhong can reduce the cerebral infarct volume and improve the neurological function in CIRI model rats, which is likely related to the down-regulation of cerebrospinal fluid inflammatory factors and expression of GSDMD in cortical ischemic brain tissue.

Keywords cerebral ischemia reperfusion injury; electroacupuncture; Baihui (DU 20); Renzhong (DU 26); inflammatory factors; Gasdermin D

(收稿日期: 2021-07-17; 修回日期: 2021-10-26)

[编辑: 焦 爽]