

DOI:10.13350/j.cjpb.231204

• 论著 •

# 头穴丛刺结合康复训练对脑缺血再灌注大鼠肠道菌群及 CaM/CaMK II 信号通路的影响\*

张金朋<sup>1,2</sup>, 王亚楠<sup>1,2</sup>, 李保龙<sup>1,2</sup>, 朱路文<sup>1,2</sup>, 关莹<sup>1,2</sup>, 师帅<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学针灸推拿学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院康复科)

**【摘要】** 目的 观察头穴丛刺结合康复训练对脑缺血再灌注大鼠肠道菌群及 CaM/CaMK II 信号通路的影响。 方法

将大鼠随机分为假手术组(sham组)、脑缺血再灌注损伤模型组(CIRI组)、头穴丛刺组(SCA组)(头穴丛刺干预,1次/日,连续14d)、康复训练组(RT组)(跑台训练,30min/次/日,连续14d)和头穴丛刺联合康复训练组(SCA+RT组)(头穴丛刺干预,同时进行跑台训练),每组12只。分别于造模成功后3、7、14d对大鼠进行神经功能评分;干预14d后采用TTC染色检测脑梗死面积,ELISA检测脑组织中COX2、NOS2水平,16S-rDNA测序检测结肠内容物肠道菌群变化,Western blot检测脑组织中CaM、CaMK II蛋白表达情况。 结果 CIRI组大鼠神经功能评分,脑梗死面积,脑组织中COX2、NOS2含量,CaM、CaMK II蛋白水平及OUT水平的Simpson指数均显著高于sham组,OUT水平的Shannon指数、Ace指数、Chao指数均显著低于sham组(均 $P<0.05$ );与CIRI组相比,SCA组、RT组和SCA+RT组大鼠神经功能评分,脑梗死面积,脑组织中COX2、NOS2含量,CaM、CaMK II蛋白相对表达量,以及OUT水平的Simpson指数均显著降低,OUT水平的Shannon指数、Ace指数、Chao指数均显著升高(均 $P<0.05$ ),且以SCA+RT组变化更显著。与sham组相比,CIRI组拟杆菌门、放线杆菌门、脱硫弧菌门、厚壁菌门、双歧杆菌属、*norank-f-Muribaculaceae*、杜氏杆菌属、拟普雷沃菌属、红螯菌属\_UCG-002、普雷沃菌属菌落相对丰度显著降低,变形菌门菌落、贺菌群属菌落对丰度显著升高(均 $P<0.05$ );与CIRI组相比,SCA组、RT组和SCA+RT组拟杆菌门、放线杆菌门、脱硫弧菌门、厚壁菌门、双歧杆菌属、*norank-f-Muribaculaceae*、杜氏杆菌属、拟普雷沃菌属、红螯菌属\_UCG-002、普雷沃菌属菌落相对丰度显著升高,变形菌门菌落、贺菌群属相对丰度显著降低(均 $P<0.05$ ),且以SCA+RT组变化更显著。 结论 头穴丛刺结合康复训练可改善脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能,调节肠道菌群失调,抑制CaM/CaMK II信号通路的活化,从而对脑组织发挥保护作用。

**【关键词】** 头穴丛刺法;康复训练;脑缺血再灌注损伤;肠道菌群;CaM/CaMK II信号通路

**【中图分类号】** R378

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)12-1381-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Dec;18(12):1381-1387.]

## Effects of scalp clustering acupuncture combined with rehabilitation training on gut microbiota and CaM/CaMK II signaling pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion

ZHANG Jinpeng<sup>1,2</sup>, WANG Yanan<sup>1,2</sup>, LI Baolong<sup>1,2</sup>, ZHU Luwen<sup>1,2</sup>, GUAN Ying<sup>1,2</sup>, SHI Shuai<sup>1,2</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Department of Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of scalp cluster acupuncture on intestinal flora and CaM/CaMK II signaling pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** Rats were randomly divided into a sham operation group (Sham group), a cerebral ischemia-reperfusion injury model group (CIRI group), a head acupoint cluster acupuncture group (SCA group) (head acupoint cluster acupuncture intervention, 1 time/day, continuous for 14 days), a rehabilitation training group (RT group) (treadmill training, 30 minutes/time/day, continuous for 14 days), and a head acupoint cluster acupuncture combined rehabilitation training group (SCA + RT group) (head acupoint cluster acupuncture intervention, simultaneous treadmill training), with 12 rats in each group. Neurological function scores were performed on rats 3, 7, and 14 days after successful modeling; After 14 days of intervention, the area of cerebral infarction was detected using TTC staining, the levels of COX2 and NOS2 in brain tissue were detected using ELISA, changes in gut

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82174477);黑龙江省自然科学基金联合引导项目(No. LH2022H080);黑龙江省应用技术研究  
与开放计划项目(No. GA19C110);孙申田青年人才基金项目(No. 2021KY-10)。

\*\* **【通讯作者】** 师帅, E-mail: ss18955386@163.com

**【作者简介】** 张金朋(1987-)男,吉林磐石人,博士研究生在读,主治医师。主要研究方向:针灸康复治疗神经系统疾病。  
E-mail: zhangjinpeng198706@126.com

microbiota of colon contents were detected using 16S rDNA sequencing, and the expression of CaM and CaMK II proteins in brain tissue was detected using Western blot. **Results** The neurological function score, cerebral infarction area, COX2, NOS2 content in brain tissue, CaM, CaMK II protein levels, and the Simpson index of OUT levels in the CIRI group were significantly higher than those in the sham group. The Shannon index, Ace index, and Chao index of OUT levels were significantly lower than those in the sham group (all  $P < 0.05$ ); Compared with the CIRI group, the neurological function score, cerebral infarction area, COX2 and NOS2 content in brain tissue, relative expression of CaM and CaMK II proteins, and Simpson index of OUT level were significantly reduced in the SCA group, RT group, and SCA + RT group. The Shannon index, Ace index, and Chao index of OUT level were significantly increased (all  $P < 0.05$ ), and the changes were more significant in the SCA + RT group. Compared with the Sham group, the CIRI group includes Bacteroidetes, Actinobacteria, Desulfovibrio, Firmicutes, Bifidobacteria, norank-f-Muribaculaceae, Durobacillus, Prevotella, and Red Stigma. The relative abundance of UCG-002 and Prevotella colonies was significantly reduced, while the abundance of Proteobacteria and Shigella colonies was significantly increased (all  $P < 0.05$ ); Compared with the CIRI group, the SCA group, RT group, and SCA + RT group have Bacteroidetes, Actinobacteria, Desulfovibrio, Firmicutes, Bifidobacteria, norank-f-Muribaculaceae, Durobacillus, Prevotella, and Rhodotobacter genera. The relative abundance of UCG-002 and Prevotella colonies significantly increased, while the relative abundance of Proteobacteria colonies and Shigella groups significantly decreased (all  $P < 0.05$ ), and the changes were more significant in the SCA + RT group.

**Conclusion** The combination of scalp acupuncture and rehabilitation training can improve the neural function of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury, regulate intestinal microbiota imbalance, inhibit the activation of CaM/CaMK II signaling pathway, and thus exert a protective effect on brain tissue.

**【Key words】** Scalp clustering acupuncture; Rehabilitation training; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Intestinal microbiota; CaM/CaMK II signaling pathway

脑缺血再灌注 (cerebral ischemia-reperfusion, CIRI) 是临床常见的神经系统疾病之一, 是指由于脑血管阻塞导致脑组织缺血缺氧的情况, 随后再恢复正常血流供应时发生的再灌注损伤<sup>[1-2]</sup>。CIRI 发病率较高, 即使经抢救后幸存患者也可能存在偏瘫、失语等运动及感觉功能障碍等神经后遗症, 对患者的生命健康造成严重影响<sup>[3-4]</sup>。近年来, 肠道菌群在神经系统疾病中的作用引起了广泛关注<sup>[5]</sup>。肠道菌群与脑肠轴的相互作用对于维持正常的神经功能和免疫平衡至关重要<sup>[6-7]</sup>。然而, CIRI 会导致肠道菌群失调, 使有益菌数量减少、有害菌增多, 从而加剧炎症反应和神经损伤<sup>[8-9]</sup>。因此, 调节肠道菌群的平衡可能成为 CIRI 治疗的重要策略。同时,  $Ca^{2+}$ /calmodulin 依赖性蛋白激酶 II (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaM/CaMK II) 信号通路在神经元存活和功能恢复过程中起重要的调节作用<sup>[10]</sup>。CaM/CaMK II 信号通路参与细胞内钙离子平衡及突触可塑性等神经递质的调节, 而 CIRI 会导致该信号通路的异常激活和功能障碍<sup>[11]</sup>。因此, 探究 CaM/CaMK II 信号通路在 CIRI 中的调节机制, 有助于深入理解病理生理过程并寻找新的治疗方法。头穴丛刺 (scalp clustering acupuncture, SCA) 作为传统中医疗法广泛应用于神经系统康复训练中, 能通过刺激头皮上的穴位来调节神经系统的功能, 从而促进神经再生和恢复<sup>[12]</sup>。然而, 关于 SCA 对 CIRI 大鼠肠道菌群及 CaM/CaMK II 信号通路的影响尚不明确。本研究旨在探究 SCA

结合康复训练对 CIRI 大鼠对肠道菌群以及 CaM/CaMK II 信号通路的调节效应。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 实验动物** 6 周龄雄性 SD 大鼠 75 只, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2019-0010。大鼠均为 SPF 级, 体质量为 180~200 g, 于恒定温度 22~25 °C、相对湿度 50%~60% 条件下饲养。室内光照 12 h/12 h 昼夜交替, 自由饮水摄食, 适应性喂养 1 周。

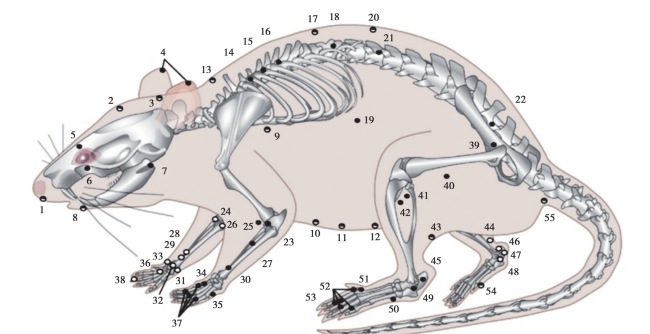
**1.2 主要试剂和仪器** 尼龙线栓购于北京西浓科技有限公司; CaM 和 CaMK II 抗体为英国 Abcam 公司产品; ELISA 试剂盒购于上海信帆生物科技有限公司; DAB 显色试剂盒购于北京中杉有限公司; 测序试剂盒为美国 Illumina 公司产品。高速台式冷冻离心机 (型号 H2500R), 购于湖南湘仪仪器开发有限公司; Illumina Miseq 测序仪为美国 Illumina 公司生产; 动物跑步机 (型号 FT-200), 购于成都泰盟软件公司。

### 2 方法

**2.1 动物分组与模型制备** 将 75 只大鼠随机分为假手术组 (sham 组)、CIRI 损伤模型组 (CIRI 组)、头穴丛刺组 (SCA 组)、康复训练组 (RT 组) 和头穴丛刺联合康复训练组 (SCA+RT 组), 每组 15 只。采用颈内动脉线栓法<sup>[13]</sup>制备 CIRI 模型。大鼠用 3% 异氟醚麻醉后将头部和四肢固定, 切开颈部正中中线处皮肤, 分

别分离颈总、颈内和颈外动脉,并将颈总动脉的近心端和颈外动脉的分叉处结扎,用手术线在颈总动脉远心端靠近颈总动脉分叉处打一个活结,将颈内动脉夹闭,在颈总动脉上用眼科剪剪一V形小口,用镊子将蘸有石蜡的线栓插入颈总动脉,直至有轻微阻力时停止插入。将颈总动脉远心端靠近颈总动脉分叉处全部结扎,缝合大鼠颈部皮肤,碘伏消毒后置于28℃温室中苏醒,待缺血2h后拔出线栓形成再灌注。sham组除不插入线栓外,其余步骤和其它各组相同。各组于再灌注1.5h后对大鼠进行神经功能缺损评分,1~3分为模型制备成功。在造模过程中,CIRI组死亡3只,SCA组和RT组分别造模失败1只和2只,予以剔除。为保证每组大鼠数量一致,每组均剔除3只大鼠,每组各剩余12只。

**2.2 头穴丛刺和康复训练干预** 造模成功24h后,SCA组大鼠参照大鼠穴位图谱(图1)<sup>[14]</sup>,取大鼠百会穴及左右旁开2mm,常规消毒后采用0.25mm×13mm毫针对鼻尖方向平刺5~8mm,捻转速度200r/min,每次捻转1min,留针2h,每日1次,连续治疗14d。RT组大鼠进行跑台训练,坡度为0°,第1~3d跑台训练速度为8m/min,第4~7d为12m/min,7d后15m/min,每次30min,每日1次,连续治疗14d。SCA+RT组大鼠在进行头穴丛刺干预的同时进行跑台训练。sham组和CIRI组不进行任何干预。



- 注: 1/2/3等穴位编号仅作为本图谱的标注,发挥示意图作用。  
●表示在外侧面 ○表示在背腹/四肢中线 ◯表示在内侧面
- |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |        |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 水沟 | 2 百会 | 3 风府 | 4 耳尖 | 5 阳白 | 6 四白 | 7 颊车 | 8 承浆 | 9 膻中 | 10 中脘 | 11 神阙 | 12 关元 | 13 大椎 | 14 肺俞 | 15 心俞 | 16 膈俞 | 17 脊中 | 18 脾俞 | 19 京门 | 20 命门 | 21 肾俞 | 22 次髎 | 23 曲池 | 24 曲泽 | 25 尺泽 | 26 少海 | 27 手三里 | 28 间使 | 29 内关 | 30 外关 | 31 神门 | 32 大陵 | 33 太渊 | 34 合谷 | 35 后溪 | 36 劳宫 | 37 八邪 | 38 中冲 | 39 环跳 | 40 伏兔 | 41 阳陵泉 | 42 足三里 | 43 承山 | 44 三阴交 | 45 昆仑 | 46 太溪 | 47 大钟 | 48 照海 | 49 申脉 | 50 京骨 | 51 太冲 | 52 八风 | 53 内庭 | 54 涌泉 | 55 长强 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|

图1 大鼠穴位图谱  
Fig.1 Rat Acupoint Atlas

**2.3 神经功能评分** 分别于造模成功后3、7、14d采用Zeo Longa的5分评定法对各组大鼠进行神经功能评分。评分标准:无神经损伤记0分;对侧前爪不能完

全伸展记1分;提尾向对侧转圈记2分;行走向对侧倾倒记3分;丧失意识且不能自发行走记4分。

**2.4 TTC染色检查** 神经功能评分结束后,将各组部分大鼠麻醉,取出完整大脑,冷冻后脑组织沿冠状面切片,厚度为2mm。将预热的2%TTC溶液加入到脑组织切片中,于37℃孵育箱中孵育30min。为使组织切片充分染色,每10min翻动一次。将TTC染色的组织切片放入4%多聚甲醛溶液中进行固定,24h后计算脑梗死面积占切片总面积的百分比。

**2.5 ELISA检测脑组织中COX2、NOS2水平** 取各组大鼠部分缺血侧脑组织,用预冷的生理盐水冲洗,然后用裂解液将脑组织裂解,制成10%组织匀浆,离心,收集上清液,按照试剂盒说明书方法测定脑组织中COX2、NOS2水平。

**2.6 16S-rDNA肠道菌群测序** 使用磁珠法土壤和粪便基因组DNA提取试剂盒提取各组大鼠粪便DNA,电泳质检、定量后以338F(5'-ACTCCTACGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')为引物对16S rRNA基因V3-V4可变区进行扩增。扩增条件:95℃预变性3min;95℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s,共27个循环。构建PCR产物测定文库,用Illumina MiSeq平台测序并分析数据。使用QIIME程序对扩增产物序列进行生物信息学分析,运用uPares软件对有效数据在97%水平的操作分类单元(OTU)行聚类分析;使用得到的OTU序列数据进行α多样性、β多样性和群落组成分析,观察不同组大鼠肠道细菌群落的变化情况并进行组间比较分析。

**2.7 Western bolt检测脑组织中的CaM、CaMK II蛋白** 取各组大鼠脑组织,用BCA法测定组织中总蛋白浓度。取50μg蛋白与上样缓冲液充分混匀,煮沸变性后进行SDS-PAGE分离并转移到PVDF膜上,用5%的脱脂牛奶封闭1h,用含1mL/L吐温的Tris缓冲盐溶液(TBST)洗膜;分别加入CaM(1:2000)、CaMK II(1:2000)溶液,4℃下孵育过夜,洗膜;加入二抗(1:5000稀释),室温孵育2h,洗膜;加入ECL发光液显影曝光,使用Image Lab软件对条带的灰度值进行分析。

**2.8 统计学分析** 实验数据使用Graphpad priam 8.0软件进行统计学分析。计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,组间两两比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 各组大鼠神经功能评分比较

造模后 3、7、14 d 大鼠神经功能评分如表 1, 5 组比较差异均有统计学意义 ( $F = 371.40, 444.80, 414.70$ , 均  $P < 0.01$ )。组间两两比较, CIRI 组大鼠各时间点神经功能评分均显著高于 sham 组 ( $t_{3d} = 37.5601, t_{7d} = 40.7000, t_{14d} = 37.1502$ , 均  $P < 0.01$ ); SCA 组、RT 组和 SCA+RT 组均显著低于 CIRI 组, 且 SCA+RT 组显著低于 SCA 组和 RT 组 ( $F_{3d} = 54.3901, F_{7d} = 123.6011, F_{14d} = 156.7001$ , 均  $P < 0.01$ ); SCA 组与 RT 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

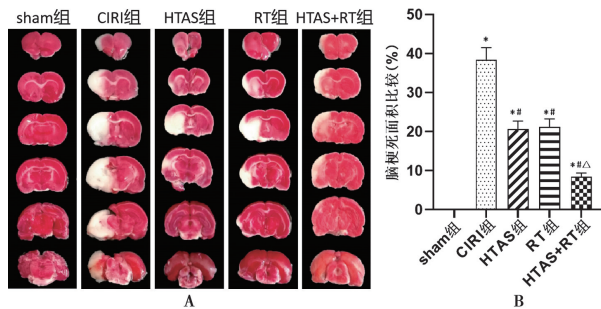
表 1 大鼠造模后 3、7、14 d 时神经功能评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Comparison of neurological function scores at 3, 7, and 14 days after rat modeling ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 (n=12) Group (n=12)	造模后 3 d 3 days after modeling	造模后 7 d 7 days after modeling	造模后 14 d 14 days after modeling
Sham 组	0	0	0
CIRI 组	4.12 ± 0.38 <sup>a</sup>	3.76 ± 0.32 <sup>a</sup>	3.11 ± 0.29 <sup>a</sup>
SCA 组	3.28 ± 0.31 <sup>a,b</sup>	2.43 ± 0.24 <sup>a,b</sup>	2.12 ± 0.22 <sup>a,b</sup>
RT 组	3.30 ± 0.32 <sup>a,b</sup>	2.45 ± 0.25 <sup>a,b</sup>	2.15 ± 0.23 <sup>a,b</sup>
SCA+RT 组	2.46 ± 0.25 <sup>a,b,c</sup>	1.86 ± 0.17 <sup>a,b,c</sup>	1.12 ± 0.13 <sup>a,b,c</sup>

注: a 与 sham 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 CIRI 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与 SCA 组比较,  $P < 0.05$ 。

## 2 各组大鼠脑梗死面积比较

大鼠脑梗死面积如图 2。与 sham 组相比, CIRI 组大鼠脑梗死面积显著增加 ( $t = 42.7003, P < 0.01$ ); 与 CIRI 组相比, SCA 组、RT 组和 SCA+RT 组大鼠脑梗死面积显著减少, 且 SCA+RT 组较 SCA 组和 RT 组显著减少 ( $F = 376.2014, F = 192.2005$ , 均  $P < 0.01$ ); SCA 组与 RT 组比较差异无统计学意义 ( $t = 0.6532, P = 0.5204$ )。



A 脑组织 TTC 染色 B 脑梗死面积比较。a 与 sham 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 CIRI 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与 SCA 组比较,  $P < 0.05$ 。

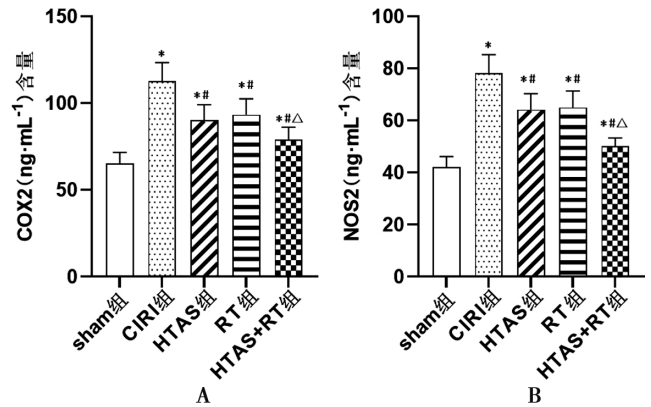
图 2 各组大鼠脑梗死面积比较

A TTC staining of brain tissue B Comparison of cerebral infarction area. Compared with sham group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the CIRI group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the SCA group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Cerebral infarction area of rats in each group

## 3 各组大鼠脑组织中 COX2、NOS2 水平比较

大鼠脑组织中 COX2、NOS2 含量如图 3。与 sham 组相比, CIRI 组大鼠脑组织中 COX2、NOS2 含量均显著增高 ( $t_{COX2} = 13.0302, t_{NOS2} = 15.3903$ , 均  $P < 0.01$ ); 与 CIRI 组相比, SCA 组、RT 组和 SCA+RT 组大鼠脑组织中 COX2、NOS2 含量均显著降低, 且 SCA+RT 组显著低于 SCA 组和 RT 组 ( $F_{COX2} = 27.9705, F_{COX2} = 9.4250; F_{NOS2} = 16.0901, F_{NOS2} = 28.5812$ , 均  $P < 0.01$ ); SCA 组与 RT 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



A 脑组织中 COX2 含量比较 B 脑组织中 NOS2 含量比较。a 与 sham 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 CIRI 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与 SCA 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠脑组织中 COX2、NOS2 水平比较

A Comparison of COX2 content in brain tissue B Comparison of NOS2 content in brain tissue. Compared with sham group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the CIRI group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the SCA group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Comparison of COX2 and NOS2 levels in brain tissues of rats in each group

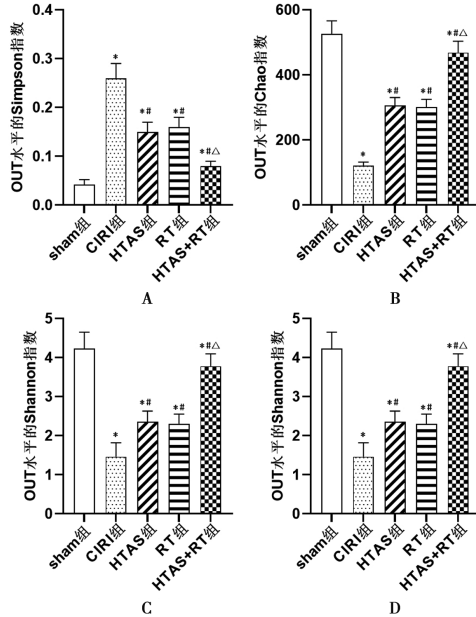
## 4 各组大鼠 α 多样性指数比较

大鼠 α 多样性指数如图 4。与 sham 组相比, CIRI 组大鼠 OUT 水平的 Shannon、Ace 及 Chao 指数均显著降低, Simpson 指数显著升高 ( $t_{Shannon} = 17.3500, t_{Ace} = 29.7210, t_{Chao} = 33.8112, t_{Simpson} = 23.8801$ , 均  $P < 0.01$ ); 与 CIRI 组相比, SCA 组、RT 组和 SCA+RT 组大鼠 OUT 水平的 Shannon、Ace、Chao 指数均显著升高, Simpson 指数显著降低, 且以 SCA+RT 组变化更显著 ( $F_{Shannon} = 139.8102, F_{Ace} = 231.9100, F_{Chao} = 416.2004, F_{Simpson} = 146.4050$ , 均  $P < 0.05$ ); SCA 组与 RT 组比较大鼠 OUT 水平的 Shannon、Ace、Chao、Simpson 指数差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

## 5 各组大鼠肠道菌群群落结构比较

在门水平, 大鼠肠道菌群优势菌群主要有 3 大菌门, 即厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*), 各组大鼠肠道菌群在门水平不同的群落丰度差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。CIRI 组拟杆菌门、放线杆菌门 (*Actinobacteria*)、脱硫弧菌门 (*Desulfobacterota*) 和

厚壁菌门菌落相对丰度均显著低于 sham 组,变形菌门菌落相对丰度显著高于 sham 组(均  $P < 0.05$ );与 CIRI 组相比,SCA 组、RT 组和 SCA+RT 组拟杆菌门、放线杆菌门、脱硫弧菌门和厚壁菌门菌落相对丰度均显著升高,形菌门菌落相对丰度显著降低,且以 SCA+RT 组变化更显著(均  $P < 0.05$ );SCA 组与 RT 组比较门水平上肠道菌群菌落相对丰度差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 5A)。



A OUT 水平的 Shannon 指数比较 B OUT 水平的 Simpson 指数比较 C OTU 水平的 Ace 指数比较 D OUT 水平的 Chao 指数比较。a 与 sham 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 CIRI 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与 SCA 组比较,  $P < 0.05$ 。

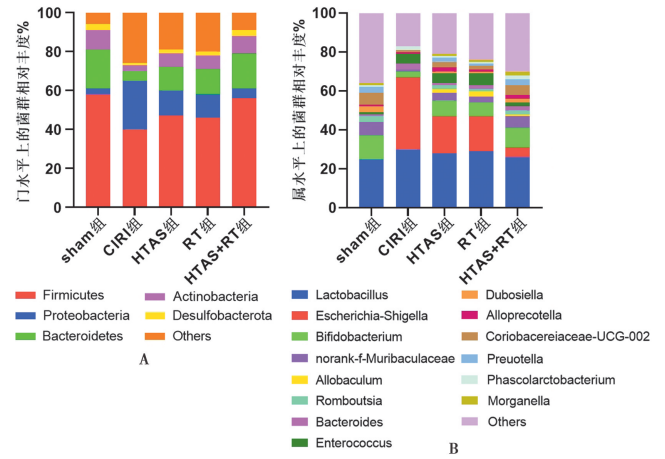
图 4 各组大鼠  $\alpha$  多样性指数比较

A Comparison of Shannon Index at OUT Level B Comparison of Simpson Index at OUT Level C Ace Index Comparison of OTU Levels D Comparison of Chao Index at OUT Level. Compared with sham group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the CIRI group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the SCA group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ .

Fig. 4 Each group of rats  $\alpha$  Diversity Index Comparison

在属水平,大鼠肠道菌群优势菌群主要有 14 种,其中志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、*norank-f-Muribaculaceae*、杜氏杆菌属 (*Dubosiella*)、拟普雷沃菌属 (*Alloprevotella*)、红蝽菌属 \_ UCG-002 (*Coriobacteriaceae* \_ UCG-002)、普雷沃菌属 (*Prevotella*) 群落丰度差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。与 sham 组相比,CIRI 组志贺菌群相对丰度显著升高,双歧杆菌属、*norank-f-Muribaculaceae*、杜氏杆菌属、拟普雷沃菌属、红蝽菌属 \_ UCG-002、普雷沃菌属菌落相对丰度显著降低(均  $P < 0.05$ );与 CIRI 组相比,SCA 组、RT 组和 SCA+RT 组志贺菌群相对丰度显著降低,双歧杆菌属、*norank-f-Muribaculaceae*、杜氏杆菌属、拟普雷沃菌

属、红蝽菌属 \_ UCG-002、普雷沃菌属菌落相对丰度显著升高,且以 SCA+RT 组变化更显著(均  $P < 0.05$ );SCA 组与 RT 组比较属水平肠道菌群菌落相对丰度差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 5B)。



A 大鼠肠道菌群门水平差异分析 B 大鼠肠道菌门属水平差异分析

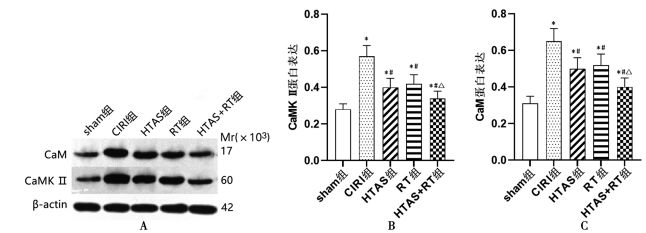
图 5 各组小鼠肠道菌群结构

A Analysis of differences in gut microbiota levels in rats B Analysis of differences in gut microbiota levels in rats

Fig. 5 Structure of gut microbiota in each group of mice

## 6 各组大鼠脑组织中 CaM、CaMK II 蛋白表达比较

大鼠脑组织中 CaM、CaMK II 蛋白水平如图 6。其中 CIRI 组大鼠脑组织中 CaM、CaMK II 蛋白表达水平均显著高于 sham 组 ( $t_{CaM} = 14.61, t_{CaMK II} = 14.98$ , 均  $P < 0.05$ );与 CIRI 组相比,SCA 组、RT 组和 SCA+RT 组大鼠脑组织中 CaM、CaMK II 蛋白表达水平显著降低,且 SCA+RT 组大鼠脑组织中 CaM、CaMK II 蛋白表达水平显著低于 SCA 组和 RT 组 ( $F_{CaM} = 34.7100, F_{CaMK II} = 44.9802$ , 均  $P < 0.05$ );SCA 组与 RT 组比较大鼠脑组织中 CaM、CaMK II 蛋白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



A 脑组织中 CaM、CaMK II 蛋白条带 B 脑组织中 CaM 蛋白表达比较 C 脑组织中 CaMK II 蛋白表达比较。a 与 sham 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 CIRI 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与 SCA 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 6 各组大鼠脑组织中 CaM、CaMK II 蛋白表达比较

A CaM and CaMK II protein bands in brain tissue B Comparison of CaM protein expression in brain tissue C Comparison of CaMK II protein expression in brain tissue. Compared with sham group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the CIRI group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; Compared with the SCA group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ .

Fig. 6 Comparison of CaM and CaMK II protein expression in brain tissues of rats in each group

## 讨 论

头穴丛刺是一种传统的中医疗法,能通过刺激头部的特定穴位来调节和平衡人体的生理和病理状态,以达到治疗和保健的目的<sup>[15-16]</sup>。头穴丛刺法常用的头部穴位包括百会穴、风池穴、太阳穴等,这些穴位与人体的经络相连,通过刺激这些穴位可以调整气血循环、神经功能、内分泌等系统的平衡,从而改善各种疾病和不适。近年来,头穴丛刺法被用于帕金森、癫痫等神经系统疾病的治疗,且在 CIRI 损伤取得了较好的疗效<sup>[17]</sup>。适当的康复锻炼一直是多种疾病康复的重要辅助方法,大量研究证实康复训练可以促进缺血性脑卒中和其他中枢神经系统疾病患者的神经功能,例如运动和感觉<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,头穴丛刺法和康复训练均可减少 CIRI 大鼠神经功能评分和脑梗死面积,且二者联合实施的效果更显著。樊竹等<sup>[20]</sup>研究发现,头穴丛刺法可一定程度促进局灶性脑缺血大鼠突触形成可塑性的作用。陈秋菊等<sup>[21]</sup>报道有氧运动能改善局灶性脑缺血大鼠的运动、平衡和记忆功能。虽然头穴丛刺法和运动训练能在一定程度上改善脑血管疾病,但两法联合使用对 CIRI 大鼠的作用机制尚不明确。

有研究表明 CIRI 损伤后大脑中的炎症反应增加,一氧化氮合酶(NOS)的表达增加会导致炎症因子如 NO 的释放增加。环氧化酶 2(COX2)是炎症反应的重要调节酶,在正常情况下表达量很低,但在脑缺血大鼠的脑组织中 COX2 的表达增加表明缺血引起的脑损伤伴随着强烈的炎症反应<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,头穴丛刺法和康复训练均能抑制 CIRI 大鼠脑组织中 NOS2 和 COX2 水平,且头穴丛刺法联合康复训练可通过抑制 CIRI 大鼠脑组织炎症反应发挥神经保护作用。

近年研究发现,肠道菌群与脑卒中、心脑血管疾病和阿尔兹海默病等疾病有密切关系<sup>[23-25]</sup>。肠道菌群与中枢神经系统之间存在一个双向调节轴,被称为“肠-脑”轴。肠道菌群通过这个轴与大脑相互影响,不仅可以调节胃肠道功能,还可通过神经、免疫和内分泌网络的相互作用来协同发挥作用<sup>[26]</sup>。肠道菌群是“菌群-肠-脑”轴的核心,可直接影响中枢神经系统的功能。在正常情况下,肠道菌群与人体保持互利共生的稳定关系,但当正常肠道菌群的组成发生改变时,就会导致机体生理功能的改变甚至引发疾病。肠道菌群中的一些细菌,如拟杆菌、双歧杆菌、消化链球菌、梭菌和瘤胃球菌,可代谢产生短链脂肪酸,这些短链脂肪酸可穿过血脑屏障进入大脑,调节神经元和神经胶质细胞的功能。研究发现,小鼠短链脂肪酸水平和中风严重程度

及预后恢复水平呈正相关<sup>[27]</sup>。本研究结果显示,头穴丛刺法和康复训练能均调节 CIRI 损伤大鼠肠道的优势菌群,增加肠道菌群多样性,纠正肠道菌群紊乱,两法联合使用效果更佳。曾鑫冰等<sup>[28]</sup>研究证实,通过改变大鼠肠道菌群的组成可以恢复“菌群-肠-脑”轴的平衡,并减轻大鼠脑组织的缺血性损伤。

CIRI 发病机制复杂,其中多种致病因素的发生均与  $\text{Ca}^{2+}$  超载有关,最终造成神经细胞不可逆损伤。CaM 是重要的细胞信号传递物质,可与  $\text{Ca}^{2+}$  形成  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 复合物实现细胞内信号转导。研究表明,CIRI 后有大量  $\text{Ca}^{2+}$  流入且浓度不断升高,随之脑组织中 CaM 的含量和活性也增加<sup>[29]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  与 CaM 结合还可激活 Ca 激酶 II (CaMK II),作为一种多功能 CaM 激酶,CaMK II 可在细胞内被激活,广泛分布于机体各组织中。过度活化的  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 复合物会激活 CaMK II,过度表达的 CaM/CaMK II 信号会增加脑组织细胞凋亡,从而导致严重的心脑血管疾病发生<sup>[30]</sup>。有研究表明电针治疗可抑制大鼠 CIRI 后 CaM/CaMK II 信号通路的激活,且能改善神经功能缺损,并提高人体学习及记忆能力<sup>[31-32]</sup>。本研究结果显示,头穴丛刺法联合康复训练可抑制 CIRI 大鼠脑组织中 CaM/CaMK II 信号的活化,发挥神经保护作用。

综上所述,头穴丛刺法结合康复训练可改善 CIRI 损伤大鼠神经功能,减少炎症反应,调节肠道菌群失调,增加肠道菌群多样性,抑制 CaM/CaMK II 信号通路的活化,从而对脑组织发挥保护作用。

### 【参考文献】

- [1] Huang L, Li X, Liu Y, et al. Curcumin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting NLRP1-dependent neuronal pyroptosis[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2021, 18(2): 189-196.
- [2] Liu H, Zhao Z, Yan M, et al. Calycosin decreases cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing ACSL4-dependent ferroptosis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2023, 734: 109488.
- [3] Yao Y, Bade R, Li G, et al. Global-scale profiling of differential expressed lysine-lactylated proteins in the cerebral endothelium of cerebral ischemia-reperfusion injury rats [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(5): 1989-2004.
- [4] Xu S, Huang P, Yang J, et al. Calycosin alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by repressing autophagy via STAT3/FOXO3a signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 115: 154845.
- [5] 赵红霞,刘洪波,胡佳,等. 腹针联合康复训练对缺血性脑卒中患者肠道菌群及炎性因子的影响[J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(10): 1211-1215.
- [6] Chen HD, Jiang MZ, Zhao YY, et al. Effects of breviscapine on cerebral ischemia-reperfusion injury and intestinal flora imbalance by regulating the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling

- pathway in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 300:115691.
- [7] Wang X, Zhang J, Wang S, et al. Berberine modulates gut microbiota to attenuate cerebral ferroptosis induced by ischemia-reperfusion in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 953:175782.
- [8] Feng Y, Zhang D, Zhao Y, et al. Effect of intestinal microbiota transplantation on cerebral ischemia reperfusion injury in aged mice via inhibition of IL-17 [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2022, 34(7):e14313.
- [9] Ding X, Liu Z, Liu Y, et al. Comprehensive evaluation of the mechanism of *Gastrodia elata* Blume in ameliorating cerebral ischemia-reperfusion injury based on integrating fecal metabolomics and 16S rDNA sequencing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:1026627.
- [10] Liu W, Le CC, Wang D, et al. Ca<sup>2+</sup>/CaM/CaMK signaling is involved in cadmium-induced osteoclast differentiation [J]. *Toxicology*, 2020, 441:152520.
- [11] Ling YZ, Zhang XW, Wang X, et al. Changes of CaM-CaMK-CREB signaling pathway and related neuron factors in hippocampus of rats after sevoflurane and propofol administration[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(2):957-967.
- [12] 任婷, 王鸿旭, 李宏玉, 等. 头穴丛刺治疗脑卒中后痉挛性偏瘫的临床效果[J]. *中国医药导报*, 2023, 20(13):122-125, 139.
- [13] Liu X, Zhang M, Liu H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes [J]. *Exp Neurol*, 2021, 341:113700.
- [14] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第2部分:大鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(4):351-352.
- [15] 张金朋, 陈慧杰, 李保龙, 等. 头穴丛刺联合重复经颅磁刺激治疗脑卒中后焦虑障碍临床疗效观察[J]. *中医药学报*, 2023, 51(4):79-83.
- [16] 王亭. 头穴丛刺联合脑反射治疗仪在脑梗死患者中的应用效果[J]. *医疗装备*, 2022, 35(16):73-75.
- [17] 陈雄杰, 来明, 宋学鹏, 等. 头穴丛刺长留针结合作业疗法辅助帕金森病对上肢功能的影响[J]. *实用中医药杂志*, 2022, 38(10):1738-1739.
- [18] Wu WX, Zhou CY, Wang ZW, et al. Effect of early and intensive rehabilitation after ischemic stroke on functional recovery of the lower limbs: A pilot, randomized trial[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(5):104649.
- [19] Wolf TJ, Doherty M, Boone A, et al. Cognitive oriented strategy training augmented rehabilitation (COSTAR) for ischemic stroke: a pilot exploratory randomized controlled study [J]. *Disabil Rehabil*, 2021, 43(2):201-210.
- [20] 樊竹, 孟木琳, 邹光福, 等. 头穴丛刺法对局灶性脑缺血大鼠突触形态可塑性的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2021, 48(2):181-184.
- [21] 陈秋菊, 李瑞春. 有氧运动训练可通过调节脑血管生成及神经炎症反应改善大鼠缺血性脑损伤[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(4):715-719, 726.
- [22] 李艳, 侯梓杰, 阮中繁. 基于 NF- $\kappa$ B iNOS-COX-2 信号通路探究瑞芬太尼对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能的作用机制[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(13):3232-3235.
- [23] Wang J, Zhang H, He J, et al. The Role of the gut microbiota in the development of ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:845243.
- [24] 王颖佳, 王凌霄, 邵宏元. 肠道菌群改善脑卒中后抑郁的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(4):684-688.
- [25] 张雪意, 郭珍立, 陈延, 等. 基于“肠道菌群-肠-脑轴”探讨风痰闭阻型耐药性癫痫患者的肠道菌群特点[J]. *中国微生物学杂志*, 2023, 35(06):630-636, 645.
- [26] Romani-Perez M, Bullich-Vilarrubias C, Lopez-Almela I, et al. The microbiota and the gut-brain axis in controlling food intake and energy homeostasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11):5830.
- [27] Lee J, d'Aigle J, Atadja L, et al. Gut Microbiota-derived short-chain fatty acids promote poststroke recovery in aged mice[J]. *Circ Res*, 2020, 127(4):453-465.
- [28] 曾鑫冰, 唐三, 谢若曦, 等. 化痰通络汤对脑缺血/再灌注损伤大鼠肠道菌群的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(6):982-991.
- [29] Chen X, Zhang J, Wang K. Inhibition of intracellular proton-sensitive Ca<sup>2+</sup>-permeable TRPV3 channels protects against ischemic brain injury[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(5):2330-2347.
- [30] Altobelli GG, Van Noorden S, Cimini D, et al. Calcium/calmodulin-dependent kinases can regulate the TSH expression in the rat pituitary[J]. *J Endocrinol Invest*, 2021, 44(11):2387-2394.
- [31] 韩阳, 张小卿. 电针对脑缺血再灌注大鼠脑缺血组织内 VGLUT1 表达及 CaM/CaMK II 信号通路影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(5):116-120.
- [32] Xu D, Kong T, Shao Z, et al. Orexin-A alleviates astrocytic apoptosis and inflammation via inhibiting OX1R-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(11):166230.

【收稿日期】 2023-07-07 【修回日期】 2023-10-03