

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20241119007

头皮机械刺激促进野生型小鼠脑淋巴途径中 AQP4 和 LYVE-1 蛋白表达

尹鹤蓀^{1,2}, 白瑞彤³, 戚雯雯⁴, 常珂馨⁵, 张佳妮¹, 梁承邦¹, 于 芮¹, 师 誉¹, 彭甜甜¹, 程望湜¹, 王 旭⁴, 谭 琰¹

1. 北京中医药大学生命科学院(北京 100029); 2. 北京中医药大学岐黄学院(北京 100029); 3. 北京中医药大学第二临床医学院(北京 100029); 4. 北京中医药大学中医学院(北京 100029); 5. 北京中医药大学针灸推拿学院(北京 100029)

【摘要】 目的 探讨头皮机械刺激(SMS)对野生型小鼠脑淋巴途径中水通道蛋白4(AQP4)和淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)表达的影响。**方法** 将雄性 C57BL/6 小鼠随机分为干预1 d组、干预7 d组和对照组,每组3只。在干预1 d组和干预7 d组中,使用自主研发的智能梳子以0.1~0.2 N的力度和70~90次/min的频率,每天进行3 min SMS;对照组每天同等条件下抓取3 min后回笼饲养。干预前后评估小鼠的头皮温度;通过免疫荧光染色检测脑膜中 LYVE-1 和海马区 AQP4 蛋白的表达情况,计数新生淋巴管芽和淋巴管环;使用 ImageJ 软件计算硬脑膜淋巴管的直径。**结果** 与对照组相比,两干预组脑膜 LYVE-1 蛋白表达、硬脑膜淋巴管直径、新生淋巴管芽和淋巴管环均增加,其中干预1 d组脑膜 LYVE-1 蛋白表达显著增加($P<0.05$),干预7 d组新生淋巴管环显著增加($P<0.05$)。两干预组海马区 AQP4 蛋白表达均显著高于对照组($P<0.05$),干预1 d组主要作用于中部($P<0.05$),干预7 d组可作用于前部和中部($P<0.05$)。**结论** SMS 可对中枢淋巴系统产生影响,且这种影响与干预天数相关。具体而言,干预1 d倾向作用于硬脑膜淋巴系统,干预7 d倾向作用于类淋巴系统。这表明 SMS 可能通过促进硬脑膜淋巴管的新生和增加 AQP4 蛋白表达来增强中枢淋巴系统的循环。

【关键词】 头皮机械刺激;中枢淋巴系统;脑保护;失眠;焦虑;高血压;中医;经络

Scalp mechanical stimulation promotes expression of AQP4 and LYVE-1 proteins in cerebral lymphatic pathway of wild-type mice

YIN Hechun^{1,2}, BAI Ruitong³, QI Wenwen⁴, CHANG Kexin⁵, ZHANG Jiani¹, LIANG Chengbang¹, YU Rui¹, SHI Yu¹, PENG Tiantian¹, CHENG Junshi¹, WANG Xu⁴, TAN Yan¹

1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Qihuang College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Second Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 4. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 5. School of Acupuncture and Moxibustion, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To explore the effects of scalp mechanical stimulation (SMS) on aquaporin 4 (AQP4) and lymphatic vessel endothelial receptor-1 (LYVE-1) expression in the cerebral lymphatic pathway of wild-type mice. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomized into 1 d-SMS, 7 d-SMS and control group, with 3 mice in each group. Intervention groups received daily 3-min SMS using a customized intelligent comb (0.1~0.2 N, 70~90 strokes/min). Controls underwent identical handling without stimulation. Scalp temperatures was assessed before and after the intervention. The expression of LYVE-1 in meninges and AQP4 in hippocampus was detected by immunofluorescence staining. Lymphangiogenesis buds and rings were counted. The diameter of dural lymphatic vessels was calculated by ImageJ. **Results** Both intervention groups showed elevated meningeal LYVE-1 expression, increased dural lymphatic diameter, and greater lymphangiogenic buds and rings compared to controls. Notably, 1 d-SMS induced significant LYVE-1 upregulation ($P<0.05$) while 7 d-SMS increased lymphatic loops ($P<0.05$). Hippocampal AQP4 expression increased in both intervention groups ($P<0.05$). The 1 d-SMS mainly affected the middle part ($P<0.05$), while the 7 d-SMS effected both the anterior and middle parts ($P<0.05$). **Conclusions**

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82304915,82374175)

[作者简介] 尹鹤蓀,女,本科生,主要从事中西医结合治疗脑病的研究工作

[通信作者] 谭琰,副研究员,硕士研究生导师;E-mail: yantan@bucm.edu.cn. 王旭,高级实验师;E-mail: xuwang@bucm.edu.cn

SMS exhibits duration-dependent modulation of central lymphatic systems: short-term (1 d) primarily enhances dural lymphatics, while prolonged (7 d) stimulation engages glymphatic components. This suggests that SMS may enhance the circulation of the central lymphatic system by promoting neogenesis of dural lymphatic vessels and increasing the expression of AQP4.

Keywords: scalp mechanical stimulation; central lymphatic system; cerebral protection; insomnia; anxiety; hypertension; traditional Chinese medicine; meridian

头皮机械刺激 (scalp mechanical stimulation, SMS), 俗称“梳头”或“头部经络梳理”, 是一种简便、有效的医疗行为, 在中国已有近千年的应用历史。《养生论》曰: “春三月, 每朝梳头一二百下, 寿自高。”^[1]《修龄要指》也有“发宜多梳”之言^[2]。现代研究^[3-8]表明 SMS 能够缓解焦虑、失眠患者症状, 辅助治疗高血压、脑卒中后遗症等, 但其作用机制尚不明确。本团队前期研究^[9]表明, 生理状态下 SMS 能够改善人类和小鼠颅内、外血液循环。在双颈动脉闭塞造模的脑缺血大鼠中 SMS 能够通过减轻脑水肿, 保护大脑功能, 在此过程中脑类淋巴系统指标海马区水通道蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4) 表达发生变化^[10]。

中枢淋巴系统主要由类淋巴系统和硬脑膜淋巴系统组成, 在大脑物质交换、免疫及水液代谢平衡中扮演重要角色, 在神经退行性疾病、中枢神经系统感染性疾病等多种神经系统疾病的病发过程中发挥作用^[11-12]。因此, 中枢淋巴系统保护是脑保护的关键环节^[13]。研究^[14-16]表明, 电针刺激、高频经颅磁刺激及光刺激等多种头部物理干预措施可显著促进中枢淋巴系统循环, 增强其清除功能, 减少病理性代谢产物沉积。然而, 关于 SMS 对脑健康影响的研究仍处于起步阶段, 尤其是其与中枢淋巴系统的关系, 更是鲜有报道。本研究以 C57BL/6 小鼠为研究对象, 采用淋巴管内皮细胞特异性标志物淋巴管内皮透明质酸受体-1 (lymphatic endothelial hyaluronan receptor 1, LYVE-1) 标记硬脑膜淋巴管, 并以海马区 AQP4 表达水平反映类淋巴系统功能, 探讨 SMS 对 C57BL/6 小鼠硬脑膜淋巴系统及类淋巴系统的影响, 旨在揭示 SMS 在中枢淋巴系统调节及脑保护中的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年雄性 C57BL/6 小鼠 9 只, 8 周龄, 体质量 22~24 g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供。实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2024-0001。实验动物使用许可证号: SYXK (京) 2024-0010。实验于北京中医药大学实验室进行, 饲养在温度 23~25 ℃、湿度 60%~70% 的房间中, 自由摄食, 正常喂水, 维持 12 h 光/12 h 暗循环。所有动物均在相同的饲养条件下饲养。

所有程序均符合北京中医药大学动物实验管理的规定。适应性喂养 3 d 后进行实验。本研究通过北京中医药大学动物实验伦理委员会批准 (伦理批号: BUCM-4-2019011004-1086)。

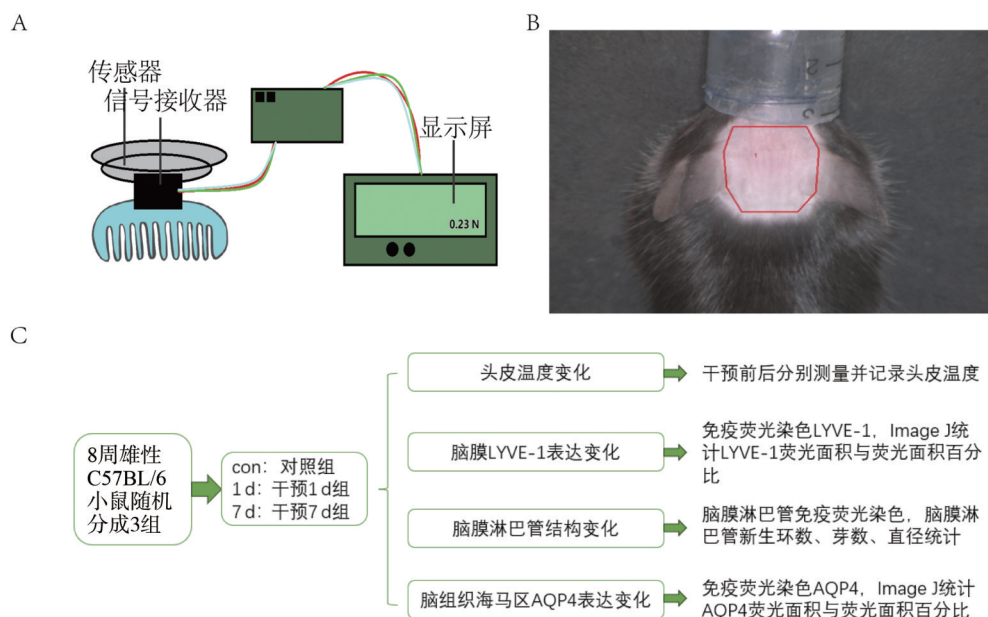
1.1.2 药物与试剂 异氟烷 (批号: R510-22-10), 深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司; 小鼠抗 LYVE-1 抗体 (批号: 67538S), 美国 Cell Signaling Technology 公司; Donkey anti-Rabbit IgG Alexa Fluor™ 488 二抗 (批号: A-21206), 美国 Invitrogen 公司; 抗 AQP4 抗体 (批号: 59678S), 美国 Bio-Techne 公司。

1.1.3 主要仪器 小型动物麻醉机 (型号: R500), 深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司; 红外热像仪 (型号: Testo865), 德国 Testo 公司; 冷冻切片机 (型号: CM1950), 德国 Leica 公司; 多光子共聚焦显微镜 (型号: IX71), 日本 Olympus 公司。

1.1.4 智能梳子介绍 本实验使用了一种自主研发智能梳子, 见图 1A。将 SMS 干预的强度应用于梳状传感器, 信号接收器实时接收数据, 并在监视器上显示该干预的强度。强度计算公式如下: $1\ 000\ g=9.8\ N$ 。

1.2 分组与干预方法 9 只小鼠按照随机数表法分为对照组 3 只、实验组 6 只; 实验组再采用随机数表法分为干预 1 d 组、干预 7 d 组。使用小型动物麻醉机吸入 3% 异氟烷 3 min 进行麻醉, 去除头部被毛, 实验者用红外热像仪进行头皮温度的测量, 后采用自主研发智能梳子从前到后进行 SMS, 干预强度在 0.1~0.2 N 的范围内, 以 70~90 次/min 的频率进行 SMS。SMS 范围从眉骨至后枕部, 涉及经络包括足少阳胆经、足太阳膀胱经及督脉, 见图 1B。每次梳理 3 min, 每日 1 次, 干预后再次测量头皮温度, 干预 1 d 组、干预 7 d 组分别干预 1 d 及 7 d; 对照组同等条件下饲养, 每天同等条件下抓取 3 min 后回笼饲养。实验流程见图 1C。

1.3 取材与切片制备 干预 1 d 组、干预 7 d 组小鼠于完成干预后取材, 对照组取材时间同干预 7 d 组。小鼠予阿弗丁 (0.2 mL/10 g) 腹腔麻醉后, 灌流取材, 完整取出小鼠脑组织及脑壳, 置于 4 ℃ 4% 多聚甲醛中, 4 h 后取下脑膜, 置于 4 ℃ 质量分数为 30% 的蔗糖溶液中, 24 h 后将脑组织换液至 4 ℃ 质量分数为 30% 的蔗糖溶液中。提前预冷冰冻切片机, 设置温度为 -20 ℃。切片前调整冰冻切片机温度为箱体 -20 ℃, 冷冻头 -20 ℃。



注:A为智能梳子示意图,B为小鼠头部干预区域示意图,C为实验流程图。LYVE-1为淋巴管内皮透明质酸受体-1,AQP4为水通道蛋白4。

图1 材料与方法展示图

用无尘纸将组织擦干,在待切组织上垂直滴加最适切割温度的包埋胶,均匀包埋好后置于冰冻切片机冷冻箱中,等待组织完全冻好后开始切片,对每只小鼠的脑组织采取连续矢状切片。设置组织厚度为40 μm /片,切片后将片子置于 -20°C 冰箱储存,用于后续免疫荧光试验。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 测量干预前后头皮温度 在干预前后分别使用红外热像仪测量小鼠的头皮温度并记录,并计算出干预前后头皮温度变化量。

1.4.2 免疫荧光染色法检测脑膜LYVE-1的表达 小鼠脑膜在质量分数为30%的蔗糖溶液中固定。将脑膜进行封闭,封闭条件:室温,摇床120 r/min,1 h;加入小鼠LYVE-1抗体(1:1 000),条件: 4°C ,摇床120 r/min,12 h;磷酸盐缓冲液(PBS)洗片,3次,条件:室温,摇床120 r/min,10 min/次;加入Donkey anti-Rabbit IgG Alexa Fluor™488二抗(1:1 000),条件:室温避光,摇床120 r/min,孵育1 h;PBS洗片,3次,条件:室温避光,摇床120 r/min,10 min/次;用1:200的4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)试剂染色,条件:室温,摇床120 r/min,10 min;PBS洗片,1次,条件:室温避光,摇床120 r/min,10 min。封片剂封片,避光,室温晾干, -20°C 冰箱储存,使用多光子共聚焦显微镜进行观察拍摄。在 $\times 10$ 共聚焦显微镜下分别对脑膜淋巴管的窦汇、横窦、矢状窦拍照留存,使用ImageJ软件计算LYVE-1的荧光面积和荧光面积百分比,计数新生的淋巴管环、芽。不同区域的数据独立纳入统计。

测量淋巴管直径,提取每个样本的近上矢状窦和横窦视野的图像,采用单盲法计算,即实验者计数时并不被告知组别差异。用ImageJ软件计算横窦淋巴管40个测量值的平均值、上矢状窦30个测量值的平均值为淋巴管的直径。

1.4.3 免疫荧光染色法检测脑组织海马区AQP4的表达 小鼠脑组织在质量分数为30%的蔗糖溶液中固定。将制备好的脑片进行封闭,封闭条件:室温,摇床120 r/min,1 h;加入AQP4抗体(1:1 000),条件: 4°C ,摇床120 r/min,12 h;PBS洗片,3次,条件:室温,摇床120 r/min,10 min/次;加入Donkey anti-Rabbit IgG Alexa Fluor™488二抗(1:1 000),条件:室温避光,摇床120 r/min,孵育1 h;PBS洗片,3次,条件:室温,摇床120 r/min,10 min/次;用1:200 DAPI试剂染色,条件:室温,摇床120 r/min,10 min;PBS洗片,1次,条件:室温,摇床120 r/min,10 min。封片剂封片,避光,室温晾干,在 $\times 1.25$ 多光子共聚焦显微镜下观察海马区并拍照。用ImageJ软件统计每张切片的AQP4荧光面积与荧光面积百分比,同一小鼠的所有切片数据均独立纳入分析。

1.5 统计学方法 采用SPSS Statistics 20.0软件进行统计分析,计量资料首先进行正态性检验和方差齐性检验,若符合正态分布且方差齐,则以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差异法检验;方差不齐者进行Dunnett's检验。非正态分布数据用中位数和四分位间距 $[M(Q)]$ 表示,采用独立样本的非参数检验,两两比较采用曼-惠特尼U检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠干预后头皮温度变化情况 与对照组相比,干预1 d组小鼠头皮温度增加2.1%,干预7 d组小鼠头皮温度增加6.9%;干预7 d组小鼠头皮温度较干预1 d组增加了4.7%。见图2。

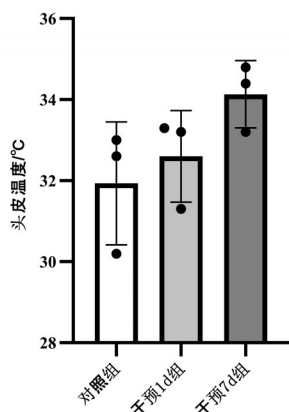


图2 各组小鼠干预后头皮温度变化情况($n=3, \bar{x} \pm s$)

2.2 各组小鼠干预后脑膜淋巴管变化情况

2.2.1 各组小鼠脑膜LYVE-1的表达情况比较 小鼠脑膜LYVE-1呈绿色,见图3A、图3B。与对照组相比,干预1 d组小鼠脑膜LYVE-1荧光面积增多($P<0.05$)、LYVE-1荧光面积百分比增多($P<0.05$),干预7 d组小鼠脑膜LYVE-1荧光面积增多了27.4%、LYVE-1荧光面积百分比增多了29.3%。干预1 d组较干预7 d组小鼠脑膜LYVE-1荧光面积增多44.9%、LYVE-1荧光面积百分比增多45.6%。见图3C、图3D。

2.2.2 各组小鼠脑膜新生淋巴管环、芽的数量比较 与对照组相比,干预1 d组小鼠脑膜新生淋巴管环的平均数量增加了0.33、新生淋巴管芽的平均数量增加了0.10,干预7 d组小鼠脑膜新生淋巴管环的数量显著增加($P<0.05$)、新生淋巴管芽的平均数量增加了0.46。干预7 d组较干预1 d组小鼠脑膜新生淋巴管环的平均数量增加了0.94、新生淋巴管芽的平均数量增加了0.37。见图3E、图3F。

2.2.3 各组小鼠脑膜淋巴管直径的比较 与对照组相比,干预1 d组小鼠脑膜淋巴管直径增粗6.5%,干预7 d组小鼠脑膜淋巴管直径增粗9.8%。与干预1 d组相比,干预7 d组小鼠脑膜淋巴管直径增粗3.1%。见图3G。

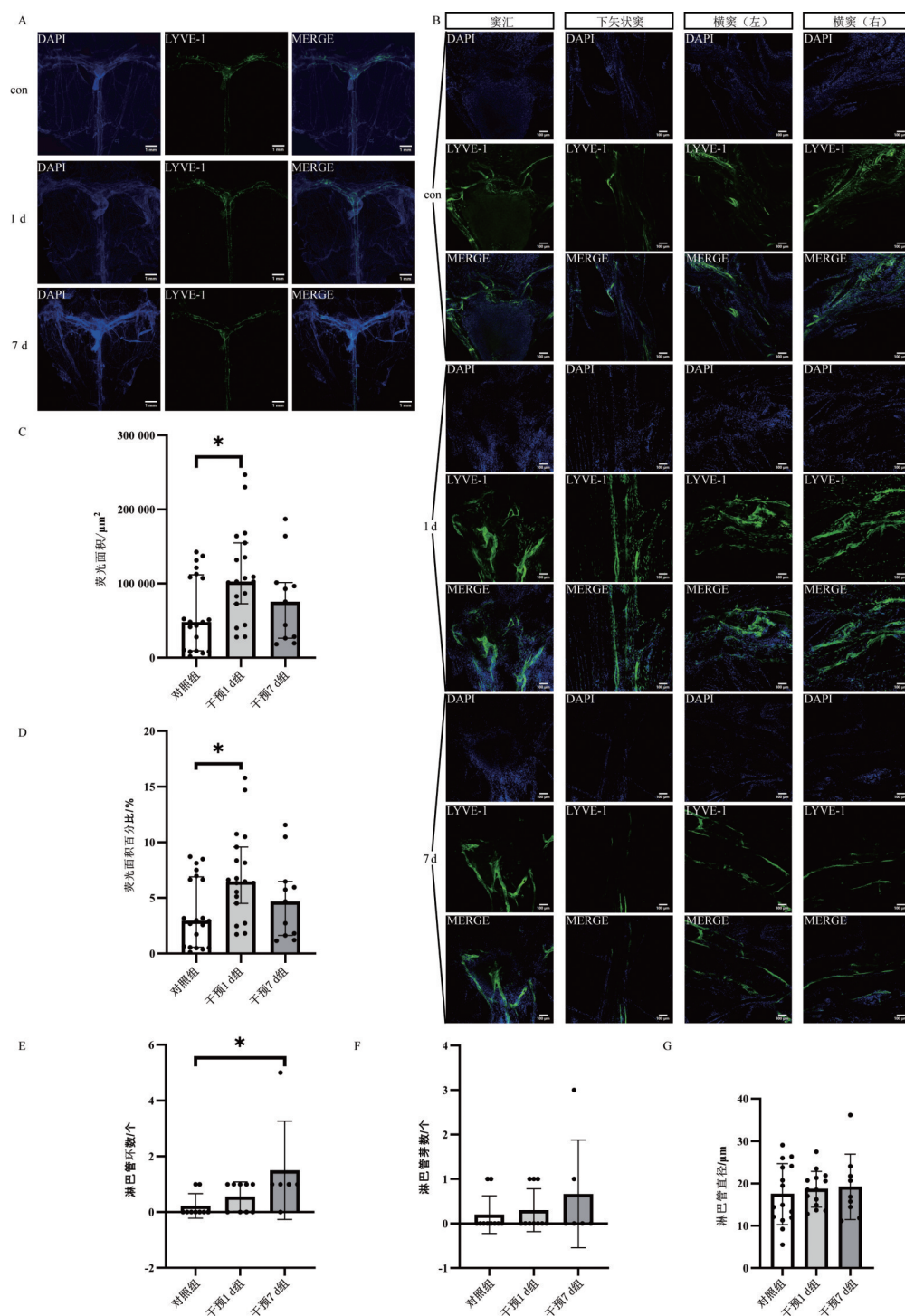
2.3 各组小鼠干预后脑组织海马区AQP4的表达情况 实验将脑组织海马区根据位置分为前、中、后三个部分,中部是典型的海马体区域,见图4A。小鼠脑组织海马区AQP4呈绿色,见图4B。与对照组相比,干预1 d组与干预7 d组小鼠脑组织海马区AQP4荧光面积与AQP4荧光面积百分比均增多($P<0.05$)。与干预1 d组

相比,干预7 d组小鼠脑组织海马区AQP4荧光面积增多22.6%、AQP4荧光面积百分比增多24.3%,见图4C、图4D。对中部海马区而言,与对照组相比,干预1 d组与干预7 d组小鼠脑组织海马区中部AQP4荧光面积与AQP4荧光面积百分比均增多($P<0.05$)。与干预1 d组相比,干预7 d组小鼠脑组织海马区中部AQP4荧光面积增多10.3%、AQP4荧光面积百分比增多11.6%,见图4E、图4F。此外,在前部海马区,与对照组相比,干预7 d组小鼠脑组织海马区前部AQP4荧光面积与AQP4荧光面积百分比均明显增多($P<0.05$)。研究结果表明,SMS干预1 d与干预7 d均可使海马区AQP4表达增多($P<0.05$),干预1 d仅对海马区中部有显著效应,而干预7 d对海马区前部及中部均有显著效应,故干预1 d组可主要作用于中部($P<0.05$),干预7 d组可作用于前部及中部($P<0.05$),提示干预7 d对类淋巴系统作用更强。

3 讨论

SMS是一种非侵入性的头部刺激手段。基于中医经络理论,SMS(即梳头)能够刺激头部经络和穴位,达到行气活血、调整脏腑及平衡阴阳的效果。目前针对SMS的研究,主要将其作为一种辅助治疗手段应用于焦虑、失眠、高血压、脑卒中康复及围术期护理等领域,已取得积极成果^[3-8]。例如,彭静等^[4]针对56例心血管疾病合并高血压患者的研究显示,常规疗法联合SMS能有效降低患者的血压及心率。许媛等^[5]将120例脑卒中康复期眩晕患者随机分为实验组与对照组,对照组实施常规护理,实验组在此基础上增加热敏灸联合SMS,结果表明,辅助热敏灸及SMS可显著提升卒中康复期眩晕患者的机体平衡性,提高生活质量,缓解眩晕症状,并降低不良反应发生率。

本团队的前期研究^[9]探讨了SMS对体温调节和血脑屏障通透性的影响,研究发现,SMS能显著减缓麻醉引起的小鼠体温下降,促进耳部毛细血管扩张,并增强小分子物质通过血脑屏障的能力。基于此,团队进一步研究了SMS对脑低灌注大鼠的脑保护作用,研究表明SMS干预能显著增加改良颈动脉双侧血管闭塞模型大鼠的脑血流量,降低脑含水量,并下调AQP4的表达^[10]。AQP4是分布于动静脉血管周围的星形胶质细胞终足,是类淋巴系统的重要组成成分。研究^[17]表明,AQP4基因敲除的动物表现出脑脊液(CSF)内流减慢,间质溶质清除率降低约70%。AQP4作为一种水通道蛋白,可高效转运水分子,为脑间质内代谢物质的清除提供低阻力途径。研究^[18]表明,SMS能够增加血脑屏障通透性并减少AQP4的表达,这有助于缓解大鼠脑水肿。



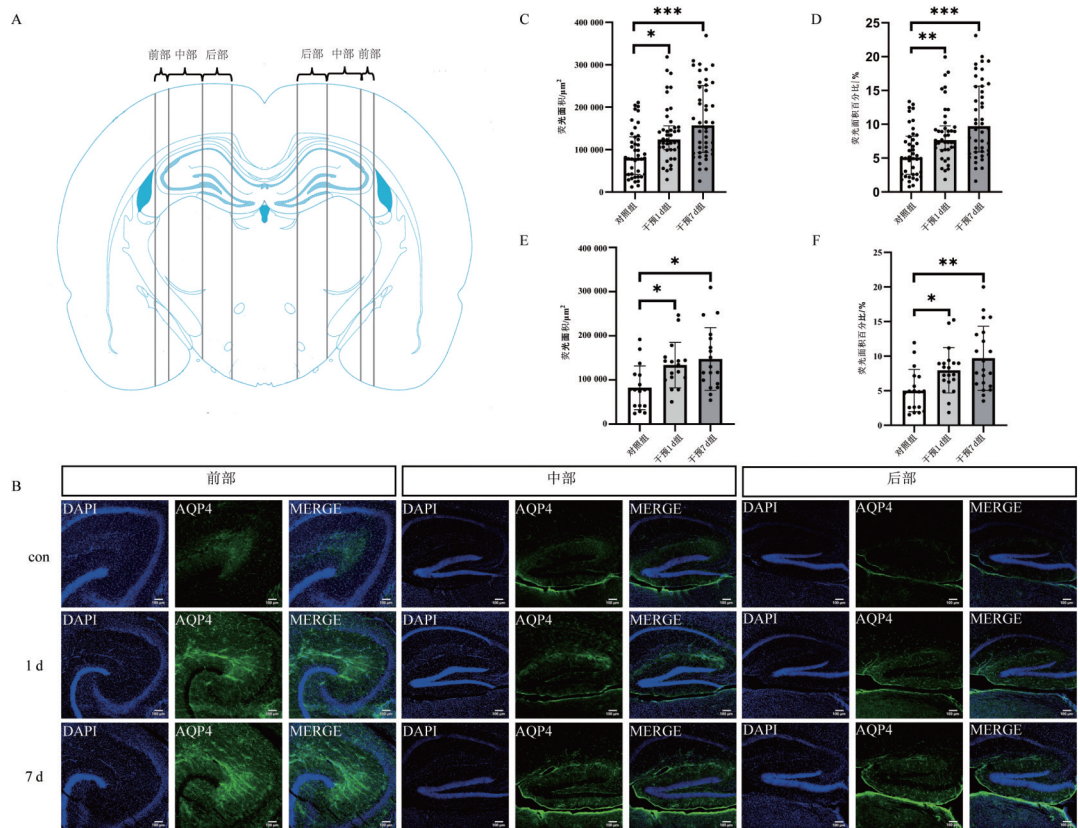
注:con为对照组,1 d为干预1 d组,7 d为干预7 d组,DAPI为4',6-二脒基-2-苯基咪唑,LYVE-1为淋巴管内皮透明质酸受体-1。A为不同干预天数下的脑膜淋巴管荧光成像(DAPI,蓝色;LYVE-1,绿色; $\times 1.25$),标尺:1 mm。B为各组脑膜窦汇、下矢状窦、左侧横窦、右侧横窦淋巴管的成像, $\times 10$,标尺:100 μm 。C为不同干预天数下LYVE-1的荧光面积,数据以 $M(Q)$ 显示。D为不同干预天数下LYVE-1的荧光面积百分比,数据以 $M(Q)$ 显示。E为不同干预天数下淋巴管的环数。F为不同干预天数下淋巴管的芽数。G为不同干预天数下淋巴管的直径。与对照组比较,* $P < 0.05$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

图3 各组小鼠干预后脑膜淋巴管变化情况

中枢神经系统的液体循环始于脉络丛产生CSF,CSF流经各脑室进入蛛网膜下腔,在蛛网膜下腔中通过类淋巴系统与脑间质液进行物质交换,最终通过硬脑膜淋巴管、蛛网膜颗粒等途径返回外周循环。其中,硬脑膜淋巴循环是中枢神经系统液体循环的关键环节^[19]。

头皮温度的变化是评估SMS有效性的重要生理指

标。低温对中枢神经系统有显著影响,体温每下降1 $^{\circ}\text{C}$,脑血流量将减少6%~7%,并通过影响血管周围间隙的扩张,进而影响脑淋巴的流动。因此,维持头部温度有助于维持中枢淋巴系统的正常功能。本研究发现,SMS干预组的头皮温度较对照组更高,据此推测SMS可能通过扩张血管周围间隙加速淋巴回流,促进



注:con 为对照组,1 d 为干预 1 d 组,7 d 为干预 7 d 组,DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶,AQP4 为水通道蛋白 4。A 为海马区分部示意图。B 为不同干预天数下的脑组织海马区成像示意图(DAPI,蓝色;AQP4,绿色; $\times 10$),标尺:100 μm 。C 为不同干预天数下脑组织海马区 AQP4 的荧光面积,数据以 $M(Q)$ 显示。D 为不同干预天数下脑组织海马区 AQP4 的荧光面积百分比,数据以 $M(Q)$ 显示。E 为不同干预天数下脑组织海马区中部 AQP4 的荧光面积。F 为不同干预天数下脑组织海马区中部 AQP4 的荧光面积百分比。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图 4 各组小鼠干预后脑组织海马区 AQP4 的表达情况

硬脑膜淋巴循环。

LYVE-1 由 Banerji 等^[20]于 1999 年发现,是一种细胞外基质黏多糖 HA 受体,免疫组化技术证实其特异性地表达于淋巴管内皮细胞质内,是最具特异性的淋巴管标志物。Louveau 等^[21]探讨了脑膜淋巴管在中枢神经系统中的作用,特别是其在 CSF 和免疫细胞排出中的功能。研究发现,脑膜淋巴管能将液体和免疫细胞从 CSF 运输至颈深淋巴结,强调了脑膜淋巴管在免疫细胞循环中的作用,并揭示了其对神经免疫学、神经炎症性及神经退行性疾病研究的潜在价值。

AQP4 在调节中枢神经系统水液代谢平衡中发挥着核心作用。研究^[22]表明,在细胞毒性脑水肿模型中,AQP4 缺失小鼠的脑水肿程度减轻,表明 AQP4 表达的降低有助于减轻细胞毒性脑水肿。而在血管源性水肿模型中,AQP4 缺失小鼠的脑水肿和临床预后较差,说明 AQP4 表达增加对减轻血管源性水肿具有积极作用。这表明 AQP4 的表达增加不仅与脑水肿的形成有关,还在水肿吸收过程中发挥关键作用,展现出双向调节作用。

AQP4 主要位于海马区的星形胶质细胞中,在认知过程中起关键作用。研究^[23]表明,AQP4 基因敲除的小

鼠表现出学习和记忆及突触可塑性的缺陷,而在记忆训练后,观察到海马中的 AQP4 免疫染色增加。神经发生在海马记忆的获取和储存中起着关键作用,且 AQP4 可通过神经营养因子分泌调节海马中的成年神经发生^[24]。这进一步证实了 AQP4 参与神经信号传递及其可塑性调节,对维持长期海马依赖性记忆的正常巩固至关重要。与此同时,AQP4 在大脑 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 的代谢与清除过程中同样扮演重要角色。低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (LRP1) 表达于星形胶质细胞和脑微血管内皮细胞的血管周末梢。AQP4 基因敲除的小鼠可通过抑制 LRP1 的表达来减少神经元等对 $A\beta$ 的摄取^[25]。海马区的 AQP4 可通过类淋巴系统清除 $A\beta$ 等代谢废物,有助于维持该区域的正常神经功能。研究^[26]表明,星形胶质细胞中缺乏 AQP4 的动物大脑中 $A\beta$ 积累增加,加剧了突触蛋白损失、星形胶质细胞萎缩和认知功能障碍。因此,AQP4 的表达有利于认知功能的维持,在病理情况下,阿尔茨海默病患者的 AQP4 表达会代偿性增加^[27]。

鉴于 AQP4 在类淋巴系统中起关键作用,进一步探索 SMS 对中枢淋巴系统的影响显得尤为重要。因此,

基于团队的前期研究,本研究旨在探讨 SMS 对于中枢淋巴系统的作用机制。研究采用智能梳子对小鼠头部的特定区域进行梳理,监测头皮温度变化,并观察小鼠脑膜 LYVE-1 以及脑组织海马区 AQP4 的表达情况。

本研究发现, SMS 干预组小鼠脑膜 LYVE-1 的表达显著增加、淋巴管直径增粗并出现芽状及环状增生。其中,干预 1 d 即可显著增加小鼠脑膜 LYVE-1 的表达。LYVE-1 表达的增加直接反映了淋巴管内皮细胞的增殖和淋巴管密度的增加,这有利于淋巴管的生成与维持,能够增强淋巴管的引流功能,对于维持脑组织的稳态、预防和治疗与脑淋巴引流障碍相关的疾病具有潜在的临床意义。淋巴管的直径直接影响淋巴液的流动速度和流量,较大的淋巴管直径有利于淋巴液的快速流动,从而加速 CSF 的循环和代谢废物的清除。淋巴增生所产生的淋巴芽是淋巴系统中淋巴管生长和分化的初始结构^[28]。在脑淋巴回流中,淋巴芽的形成和发育对于建立和维护脑部淋巴回流路径至关重要。这表明短期 SMS 干预能有效促进脑膜淋巴管的生成和维持,增强脑部淋巴引流功能,具有潜在的临床转化价值。除此之外,脑膜淋巴管是大脑免疫和液体代谢的关键组成部分,其功能的增强也有助于改善大脑微环境。

与干预 1 d 相比,干预 7 d 小鼠的 LYVE-1 表达增加幅度较小。由此推断, LYVE-1 的表达与外界干预之间并非简单的线性关系,而是受到多层面调控的动态生物学过程,反映了淋巴系统对外部刺激的动态适应。一方面,短期干预可能诱导局部炎症反应,导致淋巴管内皮细胞的活化和增殖,从而上调 LYVE-1 表达,使其在短期内达到峰值;另一方面,随着干预时间的延长,淋巴系统逐渐适应外界干预,机体启动负反馈调节机制以抑制过度的炎症反应,导致 LYVE-1 表达逐渐下降并最终趋于稳定。

同时,研究发现 SMS 干预可增加脑组织海马区 AQP4 的表达,有助于调节中枢神经系统内的水液代谢平衡,促进代谢产物的清除,从而增强小鼠的认知功能,发挥脑保护作用。

《黄帝内经》云:“头者精明之府。”^[29]脑健康对于人体至关重要。综合 LYVE-1 与 AQP4 表达的结果可知,短期干预主要影响硬脑膜淋巴系统,而长期干预则更多地影响类淋巴系统以及大脑深层的水液代谢。这证明了 SMS 具有改善脑功能的潜在作用。

本研究仍存在诸多可深入探索的方向。首先,关于顺逆经脉方向梳理的影响。本研究中头部经络刺激涉及的经脉包括督脉、足太阳膀胱经、手少阳三焦经、足少阳胆经,尤以督脉与足少阳胆经为主。梳理方向为自上而下,顺应经络循行方向进行刺激。《灵枢·终始》有言:“泻者迎之,补者随之,知迎知随,气可令

和”^[30]。本研究通过 SMS 调节头部气血运行,以达到气血调和的目的。其次,特定经脉或穴位的作用值得探究。SMS 涉及的具体头部穴位十分丰富。现代研究^[31-32]表明,推拿与穴位刺激均可影响痴呆程度及 A β 蛋白生成情况。推拿过程中对头部的挤压作用可使淋巴管被动放松,进而提升淋巴回流的流速。未来可在淋巴回流的基础上,进一步探究不同经络及特殊腧穴的梳理对脑淋巴回流的调控作用。最后,未来研究可朝精细化、长周期及临床试验方向深入,可进一步探究 SMS 干预的长期效果,研究不同强度、频率和持续时间的经络梳理干预对脑膜淋巴系统的影响,以确定最佳治疗方案,并进行临床试验以评估该方法在人体中的有效性和安全性。

参考文献:

- [1] 邓一齐. 嵇康《养生论》诠释及拾遗[M]. 北京:中国中医药出版社, 2022: 39-40.
- [2] 冷谦. 修龄要指[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016: 6.
- [3] 龚根秀, 李伟, 刘丽, 等. 头部经络梳理联合穴位按摩对于减轻术后患者疼痛的效果分析[J]. 黑龙江医药, 2023, 36(4): 819-822.
- [4] 彭静, 陈静薇, 唐聪, 等. “晨梳头, 夜沐足”疗法在心血管疾病合并高血压患者的临床研究[J]. 按摩与康复医学, 2019, 10(21): 43-44, 47.
- [5] 许媛, 侯静, 杨瑞, 等. 热敏灸联合头部经络梳理对脑卒中康复期患者眩晕的临床护理效果观察[J]. 中国医学创新, 2022, 19(23): 113-116.
- [6] 郭菲. 五行音乐联合头部经络梳理在中风后不寐患者中的应用效果[J]. 中国当代医药, 2023, 30(27): 192-196.
- [7] 张明霞, 何丽, 张祥华, 等. 头部经络梳理加穴位按摩用于骨科围术期患者焦虑失眠的临床研究[J]. 临床医药实践, 2021, 30(7): 537-539.
- [8] 陶南娟, 王志姝, 胡燕玲. 头部经络梳理改善女性围绝经期失眠的临床研究[J]. 临床护理杂志, 2021, 20(2): 40-42.
- [9] TAN Y, HE F, ZHANG C, et al. Mechanical stimulation of the scalp improves the extra- and intracranial blood circulation in humans and mice [J]. J Tradit Chin Med Sci, 2020, 7(4): 366-374.
- [10] TAN Y, ZHANG H, ZHANG C, et al. Scalp mechanical stimulation alleviates cerebral hypoperfusion in rats with 2-VO by controlling cerebral edema [J]. J Tradit Chin Med Sci, 2023, 10(4): 440-447, 523.
- [11] 汪雪, 高胜青, 周梦良. 中枢神经系统液体循环研究进展[J]. 创伤外科杂志, 2023, 25(7): 539-545.
- [12] 刘周靓, 罗传铭. 脑膜淋巴系统在神经疾病中的作用及机制的研究进展[J]. 神经疾病与精神卫生, 2023, 23(4): 287-292.
- [13] 何侠. 神经精神病学辞典[M]. 北京:中国中医药出版社, 1998: 258.
- [14] LIN Y, JIN J, LV R, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation increases the brain's drainage efficiency in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Acta Neuropathol Commun, 2021, 9(1): 102.
- [15] OXANA S G, ALEXANDER S, INNA B, et al. Mechanisms of phototherapy of Alzheimer's disease during sleep and wakefulness:

- the role of the meningeal lymphatics[J]. *Front Optoelectron*, 2023, 16(1): 22.
- [16] LIANG P Z, LI L, ZHANG Y N, et al. Electroacupuncture improves clearance of amyloid- β through the glymphatic system in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neural Plast*, 2021, 2021: 9960304.
- [17] ILIFF J J, WANG M, LIAO Y, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(147): 147ra111.
- [18] 李晓宾, 董瑞国. AQP4与脑水肿研究进展[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2005, 5(1): 77-79.
- [19] 汪雪, 高胜青, 周梦良. 中枢神经系统液体循环研究进展[J]. *创伤外科杂志*, 2023, 25(7): 539-545.
- [20] BANERJI S, NI J, WANG S X, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan[J]. *J Cell Biol*, 1999, 144(4): 789-801.
- [21] LOUVEAU A, SMIRNOV I, KEYES T J, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels[J]. *Nature*, 2015, 523(7560): 337-341.
- [22] VERKMAN A S, BINDER D K, BLOCH O, et al. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(8): 1085-1093.
- [23] FAN Y, LIU M, WU X, et al. Aquaporin-4 promotes memory consolidation in Morris water maze[J]. *Brain Struct Funct*, 2013, 218(1): 39-50.
- [24] KONG H, ZENG X N, FAN Y, et al. Aquaporin-4 knockout exacerbates corticosterone-induced depression by inhibiting astrocyte function and hippocampal neurogenesis[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(5): 391-402.
- [25] 张爽, 黄晓雪, 闫露露, 等. 水通道蛋白 4 与阿尔茨海默病的关系研究进展[J]. *中华神经医学杂志*, 2021, 20(4): 406-411.
- [26] XU Z, XIAO N, CHEN Y, et al. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A β accumulation and memory deficits[J]. *Mol Neurodegener*, 2015, 10: 58.
- [27] SILVA I, SILVA J, FERREIRA R, et al. Glymphatic system, AQP4, and their implications in Alzheimer's disease[J]. *Neurol Res Pract*, 2021, 3(1): 5.
- [28] ALITALO K, CARMELIET P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease[J]. *Cancer Cell*, 2002, 1(3): 219-227.
- [29] 南京中医学院. 黄帝内经[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2018: 229.
- [30] 纪立金. 黄帝内经全鉴[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2020: 126.
- [31] RODRÍGUEZ-MANSILLA J, GONZÁLEZ LÓPEZ-ARZA M V, VARELA-DONOSO E, et al. The effects of ear acupressure, massage therapy and no therapy on symptoms of dementia: a randomized controlled trial[J]. *Clin Rehabil*, 2015, 29(7): 683-693.
- [32] HOSSAIN S R, KAREM H, JAFARI Z, et al. Early tactile stimulation influences the development of Alzheimer's disease in gestationally stressed APP (NL-G-F) adult offspring (NL-G-F/NL-G-F) mice[J]. *Exp Neurol*, 2023, 368: 114498.

编辑: 岳 备

收稿日期: 2024-11-19

(上接第 71 页)

参考文献:

- [1] 顾瑜蓉, 李华斌.《中国变应性鼻炎诊断和治疗指南(2022 年, 修订版)》解读[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2022, 22(2): 209-211.
- [2] ZHANG Y, ZHANG L. Increasing prevalence of allergic rhinitis in China[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2019, 11(2): 156-169.
- [3] SADEGHI A, PAZHOOHAN S, HAJIHASHEMI S, et al. Anxiety-like behavior induced by allergen is associated with decreased irregularity of breathing pattern in rats[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2022, 298: 103847.
- [4] WU E L, HARRIS W C, BABCOCK C M, et al. Epistaxis risk associated with intranasal corticosteroid sprays: A systematic review and meta-analysis[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2019, 161(1): 18-27.
- [5] 刘莉莉, 刘大新, 刘锦峰, 等. 中医药临床优势病种探讨——变应性鼻炎[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(2): 203-211.
- [6] 刘翠芳, 卫东锋, 杨伟, 等. 中医教材在变应性鼻炎中医诊疗指南制定中的证据价值探讨[J]. *中医杂志*, 2024, 65(4): 368-375.
- [7] 刘慧霞, 肖志贤, 吴跃, 等. 变应性鼻炎(鼻渊)中医辨证分型的研究进展[J]. *四川中医*, 2021, 39(3): 219-223.
- [8] 刘泽, 秘智彤, 谭松, 等. 侯爱画治湿六法概要[J]. *上海中医药杂志*, 2023, 57(12): 59-63.
- [9] 王翰飞, 潘孜文, 朱向东, 等. 全小林从异病同治辨治“女性三联征”的思路和经验探讨[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(3): 63-66.
- [10] 付莹坤, 王欢, 房玉涛, 等. 中医治疗过敏性鼻炎临床证法轨[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(2): 213-215.
- [11] 周东浩, 周明爱. 营卫倾移论[J]. *山东中医药大学学报*, 2005, 29(2): 109-111.
- [12] 周东浩, 侯沉. 基于营卫倾移的证解释模型的构建[J]. *中华中医药杂志*, 2007, 22(3): 139-143.
- [13] 李奕, 张传龙, 庞博, 等. 基于《黄帝内经》“营卫倾移”理论探讨妇科癥瘕的辨治[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(1): 134-137.
- [14] 干祖望. 过敏性鼻炎的辨证施治[J]. *江苏医药*, 1976, 2(5): 47.
- [15] 王卓, 薛珊珊, 吴拥军. 干祖望“宽猛相济”治疗变应性鼻炎经验探骊[J]. *湖北中医药大学学报*, 2022, 24(5): 119-121.
- [16] 奥晓静, 董秋梅, 黄娟. 基于开阖理论研究朱宗元教授治疗变应性鼻炎的临床经验[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(4): 47-49.
- [17] 王盼盼, 刘洋, 张勤修. 小青龙汤治疗变应性鼻炎的研究动态概述[J]. *四川中医*, 2016, 34(4): 221-223.
- [18] 张琳婧, 赵莹莹, 刘莉莉, 等. 中医药治疗变应性鼻炎临床研究评述[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(9): 268-273.
- [19] 张治军, 滕磊, 施陈燕, 等. 张重华治疗变应性鼻炎经验[J]. *河南中医*, 2021, 41(1): 57-60.
- [20] 李林蔓, 彭桂原, 陈本澍, 等. 浅析升阳祛湿法治疗岭南地区变应性鼻炎[J]. *环球中医药*, 2023, 16(2): 262-265.
- [21] 刘泽, 秘智彤, 刘伟, 等. 经典名方中应用下瘀血法方剂探析[J]. *上海中医药杂志*, 2023, 57(5): 46-50.
- [22] 李可. 李可老中医急危重症疑难病经验专辑[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2004: 282-283.

编辑: 马丽亚

收稿日期: 2024-08-21