

☆ XXXX ☆

基于RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路介导的程序性坏死探讨针刺提高缺血性卒中溶栓安全性的机制

宋扬扬¹, 李珊珊¹, 赵艺¹, 黄正¹, 常思琦¹, 董华^{1,2}, 乐毅¹, 倪光夏^{1,3}(¹南京中医药大学针灸推拿学院·养生康复学院, 南京 210023; ²南京中医药大学常州附属医院, 江苏常州 213003; ³南京中医药大学针药结合教育部重点实验室, 南京 210023)

【摘要】 目的:在明确针刺可提高缺血性卒中模型大鼠超时间窗溶栓安全性效应的基础上,揭示针刺通过抑制受体相互作用蛋白激酶1(RIPK1)/受体相互作用蛋白激酶3(RIPK3)/底物混合谱系激酶样蛋白(MLKL)信号通路介导的程序性坏死提高溶栓安全性的机制。方法:随机选取33只SD大鼠作为假手术组,将造模成功的99只SD大鼠按随机数字表法分为模型组、6h溶栓组、针刺+6h溶栓组,每组33只。除假手术组外,其余各组大鼠均采用自体血栓栓塞法建立缺血性卒中模型。6h溶栓组在模型制备成功后6h予重组组织型纤溶酶原激活剂静脉溶栓治疗;针刺+6h溶栓组在6h溶栓的同时加用针刺,穴位为双侧“内关”“水沟”,留针20min。采用Bederson评分检测大鼠神经功能,2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色法观察脑梗死体积,伊文思蓝渗透法检测血脑屏障(BBB)的通透性,体积比重法检测脑含水量,分光光度法检测缺血区脑组织的血红蛋白浓度,Western blot法检测缺血半暗带区RIPK1、RIPK3、磷酸化(p)-MLKL蛋白表达,实时荧光定量PCR法检测RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA表达,双重免疫荧光染色法检测p-MLKL与内皮细胞共定位情况。结果:造模后大鼠血流量明显降低,模型制备成功后2h大鼠神经行为学评分升高($P<0.01$)。造模后24h,与假手术组比较,模型组的神经行为学评分、梗死体积百分比和BBB通透性增加($P<0.01$);缺血半暗带RIPK1蛋白表达水平升高($P<0.05$),RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA表达水平增加($P<0.01$, $P<0.05$);缺血半暗带p-MLKL与内皮细胞共定位阳性细胞百分比增加($P<0.01$)。与模型组比较,6h溶栓组BBB通透性、脑含水量和脑血红蛋白浓度进一步增加($P<0.01$, $P<0.05$);缺血半暗带RIPK3、p-MLKL蛋白表达水平升高($P<0.05$),RIPK3、MLKL mRNA表达水平升高($P<0.05$);缺血半暗带p-MLKL与内皮细胞共定位阳性细胞百分增加($P<0.01$)。与模型组比较,针刺+6h溶栓组神经行为学评分、脑梗死体积百分比、BBB通透性和脑含水量降低($P<0.01$, $P<0.05$);缺血半暗带RIPK1蛋白和mRNA表达水平降低($P<0.05$);缺血半暗带p-MLKL与内皮细胞共定位阳性细胞百分比减少($P<0.05$)。与6h溶栓组比较,针刺+6h溶栓组神经行为学评分、梗死体积百分比、BBB通透性、脑含水量降低和脑血红蛋白浓度降低($P<0.01$);缺血半暗带RIPK1、RIPK3和p-MLKL蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),RIPK1和RIPK3、MLKL mRNA表达水平降低($P<0.01$, $P<0.05$);缺血半暗带p-MLKL与内皮细胞共定位阳性细胞百分比减少($P<0.01$)。结论:针刺及时干预可改善缺血性卒中大鼠溶栓后的神经功能,减小脑梗死体积,降低BBB通透性,减少溶栓并发症的发生,进而提高溶栓安全性;其机制可能与针刺抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路介导的内皮细胞程序性坏死有关。

【关键词】 针刺;缺血性卒中;程序性坏死;溶栓安全性

Mechanism of acupuncture improving thrombolysis safety in ischemic stroke based on necroptosis mediated by RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway

Song Yangyang¹, Li Shanshan¹, Zhao Yi¹, Huang Zheng¹, Chang Siqi¹, Dong Hua^{1,2}, Yue Yi¹, Ni Guangxia^{1,3} (¹College of

[DOI] 10.13702/j.1000-0607.20251216

引用格式:宋扬扬,李珊珊,赵艺,等.基于RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路介导的程序性坏死探讨针刺提高缺血性卒中溶栓安全性的机制[J].针刺研究,XXXX,XX(XX):1-10.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82074525);江苏省自然科学基金青年基金项目(No.BK20250768);江苏省中医药科技发展计划项目(No.QN202204);江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究面上项目(No.24KTB360006)

通信作者:倪光夏,E-mail:270010@njucm.edu.cn

Acupuncture-moxibustion and Tuina, College of Health and Rehabilitation, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; ²Changzhou Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Changzhou 213003, Jiangsu Province; ³Key Laboratory of Acupuncture and Medicine of Ministry of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of acupuncture on inhibiting necroptosis mediated by the receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1)/receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3)/mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) signaling pathway in rat model of ischemic stroke, so as to reveal the mechanism underlying the improvement of ultra-time-window thrombolysis safety by acupuncture. **Methods** Ninety-nine male successful modeling SD rats were randomly divided into the model, 6 h thrombolysis, and acupuncture+6 h thrombolysis groups, with 33 rats in each group. In addition, 33 SD rats were randomly selected as the sham-operation group. Except for the sham-operation group, rats in the other groups were subjected to the autologous thromboembolism method to establish the ischemic stroke model. Rats in the 6 h thrombolysis group were treated with intravenous thrombolysis using recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) at 6 h after the successful modeling. Rats in the acupuncture+6 h thrombolysis group were additionally treated with acupuncture at bilateral “Neiguan” (PC6) and “Shuigou” (GV26) for 20 min after the thrombolysis. Neurological function was evaluated by Bederson score. The cerebral infarction volume was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. Blood-brain barrier (BBB) permeability was detected by Evans blue permeability assay. Brain water content was measured by the volume specific gravity method. Hemoglobin concentration was detected by spectrophotometry. The protein expressions of RIPK1, RIPK3, and p-MLKL were detected by Western blot. The mRNA expressions of RIPK1, RIPK3, and MLKL were detected by real-time PCR. The co-localization of p-MLKL and endothelial cells was detected by double immunofluorescence staining. **Results** After modeling, the cerebral blood flow of rats significantly decreased, and the neurobehavioral scores increased ($P<0.01$). At 24 h after successful modeling, compared with the sham-operation group, the model group had a significant increase in neurobehavioral scores, percentage of infarct volume, and BBB permeability ($P<0.01$), as well as an elevation in the protein expression level of RIPK1 ($P<0.05$), and the mRNA expression levels of RIPK1, RIPK3, and MLKL in the ischemic penumbra (IP, $P<0.01$, $P<0.05$); increased percentage of MLKL-expressing endothelial cells in the IP ($P<0.01$). Following intervention and compared with the model group, the 6 h thrombolysis group had a further increase in BBB permeability, brain water content, and cerebral hemoglobin concentration ($P<0.01$, $P<0.05$); elevated protein expression levels of RIPK3 and p-MLKL in the IP ($P<0.05$); increased mRNA expression levels of RIPK3 and MLKL in the IP ($P<0.05$); and an increased percentage of MLKL-expressing endothelial cells in the IP ($P<0.01$). Compared with the model group, the acupuncture+6 h thrombolysis group showed decreased neurobehavioral scores, percentage of infarct volume, BBB permeability, and brain water content ($P<0.01$, $P<0.05$); decreased protein and mRNA expression levels of RIPK1 in the IP ($P<0.05$); and a reduced percentage of MLKL-expressing endothelial cells in the IP ($P<0.05$). Compared with the 6 h thrombolysis group, the acupuncture+6 h thrombolysis group demonstrated a significant decrease in all the aforementioned indicators ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** Timely intervention with acupuncture can improve neurological function, reduce cerebral infarct volume, lower BBB permeability, and decrease the incidence of thrombolytic complications in rats with ischemic stroke after thrombolysis, thereby improving the safety of thrombolysis. Its mechanism may be related to the inhibition of endothelial cell necroptosis mediated by the RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway.

【KEYWORDS】 Acupuncture; Ischemic stroke; Necroptosis; Thrombolysis safety

全球疾病负担研究 2021 数据显示,卒中是全球非传染性疾病的第二大死亡原因,仅 2021 年,我国新发缺血性脑卒中病例即达 277 万例,约占全部新发脑卒中的 67.73%^[1]。缺血性脑卒中不仅严重损害居民身心健康,还加重社会经济负担,其防治工作任重而道远。

在缺血性卒中患者发病 4.5 h 内,予重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)静脉溶栓治疗可有效提高

患者的生存质量^[2]。但随着发病时间延长,rt-PA 溶栓干预间隔时间延长,rt-PA 所致血脑屏障(BBB)破坏程度逐渐严重^[3],引起脑水肿、脑内出血等并发症的发生率增加,导致卒中后癫痫、死亡等风险上升,降低溶栓安全性^[4]。在溶栓时间窗(<4.5 h)太短且存在溶栓并发症这一背景下,我国溶栓药物的使用率仅有 5.64%^[5],因而中国卒中学会指出提高缺血性卒中再灌注的比例和质量是我国当前最迫

切的任务^[6]。

已有临床研究提示针刺可提高缺血性卒中患者时间窗内 rt-PA 静脉溶栓的疗效和安全性,降低远期致残率^[7-8]。课题组前期研究发现,针刺在缺血性卒中模型大鼠 6 h 溶栓时介入可减少缺血半暗带(IP)区神经元死亡,降低 BBB 通透性,达到提高溶栓安全性的目标,提示针刺可能为更多缺血性卒中患者赢得溶栓救治机会^[9-10]。但上述研究重点关注的是 IP 区神经元死亡与 BBB 损伤之间的关系,以及针刺对其过程的调节作用。随着研究的深入,学者们认识到脑微血管内皮细胞是 BBB 的基本组成之一,受体相互作用蛋白激酶 1(RIPK1)/受体相互作用蛋白激酶 3(RIPK3)/底物混合谱系激酶样蛋白(MLKL)信号通路介导的内皮细胞程序性坏死是引起 BBB 通透性增加的关键^[11]。有研究提出程序性坏死与气滞痰结、血瘀毒聚有关^[12],而针刺具有化瘀降浊、疏通气血的作用^[13-15]。基于上述理论,本研究在观察针刺对缺血性卒中大鼠 6 h 溶栓安全性影响的基础上,从 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路介导的内皮细胞程序性坏死角度探讨针刺提高缺血性卒中超时间窗溶栓安全性的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 153 只,体质量为(300±20)g,由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供,动物生产许可证号为 SCXK(北京)2021-0011。将所有大鼠在南京中医药大学实验动物中心饲养,12 h 昼夜循环,自由摄食及饮水,室温保持在 20~22℃,湿度维持在 40%~50%,适应性喂养 3 d。随机选取 33 只作为假手术组,将造模成功的 99 只大鼠按随机数字表法分为模型组、6 h 溶栓组、针刺+6 h 溶栓组,每组 33 只。本研究已获得南京中医药大学动物伦理委员会的批准(批准编号为 No.202210A075),实验流程严格遵循《实验动物福利伦理审查清单》^[16]。

1.2 主要仪器与试剂

华佗牌一次性无菌针灸针(0.18 mm×13 mm,苏州医疗用品厂有限公司),多通道小动物麻醉机、激光散斑血流成像仪(深圳瑞沃德公司),电子天平(上海菁海仪器有限公司),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf),毛细玻璃管(0.5 mm×100 mm,华西医科大学仪器厂),CM1900 型冷冻切片机(德国 Leica),荧光显微镜(日本 Olympus),实时荧光定量

PCR 仪(美国 Mx3000P Stratagene),电泳、转膜装置(美国 Bio-Rad),图像分析系统(美国 NIH),多功能酶标仪(美国 BioTek),分光光度计(美国 Biochrom)。

凝血酶(北京索莱宝科技有限公司)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,美国 Sigma),注射用 rt-PA(德国 Boehringer Ingelheim,50 mg/支),异氟烷(深圳沃瑞德),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天), β -tubulin 抗体、GAPDH 抗体、Trizol、反转录及实时荧光定量 PCR 试剂盒(上海翌圣),RIPK1 抗体(美国 Proteintech),RIPK3 抗体(美国 CST),p-MLKL 抗体、Trizol(美国 Thermo Fisher Scientific),CD31 抗体(美国 Thermo Fisher Scientific),Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG、Alexa Fluor 647 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(英国 Abcam),HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(上海翌圣生物技术有限公司),实时荧光定量 PCR 引物(上海捷瑞),TritonX-100(北京 Biosharp)。

1.3 造模方法

假手术组:大鼠麻醉后固定,分离右颈总动脉(RCCA)、右颈外动脉(RECA)、右颈内动脉(RICA)后,消毒并缝合伤口。

模型组:采用改良大鼠自体血栓栓塞法制备缺血性卒中大鼠模型^[17]。(1)栓子制备:大鼠麻醉并固定,用充满凝血酶的毛细玻璃管进行内眦静脉采血,然后水平静置 2 h,4℃保存 22 h 后,将在毛细玻璃管中凝固的血栓用注射器转移至 PE-50 导管中。(2)模型制备:大鼠麻醉并固定,颈部脱毛、消毒,切开颈部正中皮肤,分离颈部动脉。RECA 远心端结扎的同时近心端打活结,用动脉夹夹闭 RCCA 和 RICA。在 RECA 管壁行横行切口,将 PE-50 导管的尖端插入 RECA 管腔,拉紧活结固定导管,松开 RICA 的动脉夹,将导管从 RECA 向 RICA 推进 19~22 mm,有阻力感时表示导管尖端到达大脑中动脉(MCA)的起始处,将血栓注入 MCA 中,5 min 后拔出导管并结扎 RECA,松开 RCCA 的动脉夹,无渗血后,消毒并缝合切口。(3)模型制备成功标准:手术结束后立即用激光散斑血流成像仪监测大脑皮层血流量,当血流量降至初始值的 20%,说明模型制备成功^[18]。在模型制备成功的 2 h 参照 Bederson 评分^[19],将 2~4 分的大鼠纳入研究。

1.4 干预方法

假手术组、模型组:在手术后 6 h 采用异氟烷吸入麻醉,按 1 mg/100 g 予尾静脉注射 0.9% 氯化钠溶液。

6 h溶栓组:在模型制备成功的6 h异氟烷吸入麻醉,将10%的rt-PA按1 mg/100 g经尾静脉缓慢注射给药。

针刺+6 h溶栓组:在模型制备成功的6 h给予同样麻醉,采用rt-PA尾静脉注射,注射后即刻予以针刺干预,穴位为双侧“内关”“水沟”,定位参照中国针灸学会制定的大鼠穴位图谱^[20]。方法:使用0.18 mm×13 mm一次性无菌针灸针,先直刺“内关”2~3 mm,行提插捻转泻法1 min;继而针刺“水沟”,在鼻中隔下部向上斜刺1~3 mm,施雀啄手法10次。每隔10 min行针1次,留针20 min。

1.5 观察指标及检测方法

激光散斑血流成像仪监测脑血流量:沿正中矢状线剪开大鼠头部皮肤,用0.9%氯化钠溶液清洁创面,将头部置于激光散斑血流成像仪下,调整焦距,在相同的伪彩值和曝光条件下,用高速荧光相机和定制软件采集图像。

参照Bederson评分于模型制备成功的2 h、24 h评定神经功能缺损情况。0分:无明显神经功能缺陷,活动正常;1分:左前肢屈曲;2分:提尾时左前肢握力下降;3分:所有方向上的自发运动受限,提尾时向左侧旋转;4分:自发向左侧旋转;5分:无自发性活动,伴意识障碍或死亡^[19,21]。

TTC染色法检测脑梗死体积:模型制备成功后24 h每组取6只大鼠麻醉,断头后取全脑组织,去除嗅球、小脑及脑干,于-20℃中冷冻20 min后切片(厚度约为2 mm),将脑片迅速浸入TTC溶液中避光孵育8 min,并拍照记录。用Image J软件分析每张脑片的梗死体积及全脑体积,梗死体积百分比(%)=梗死体积÷全脑体积×100%。

伊文思蓝(EB)渗透法检测EB含量以评估BBB通透性:于模型制备成功后22 h每组取6只大鼠麻醉,将2%的EB溶液(0.4 mL/100 g)经尾静脉注射,2 h后将大鼠麻醉并暴露心脏,用4℃0.9%氯化钠溶液进行心脏灌注,直至右心房流出清亮透明液体,且肝脏及四肢颜色变白。断头,取右脑并称量,浸入甲酰胺溶液中,匀浆,孵育,离心,取上清液。在酶标仪620nm波长处测量吸光度值,根据标准曲线计算脑组织EB含量。

体积比重法检测脑含水量以评估脑水肿程度:在模型制备成功的24 h每组取6只大鼠,麻醉后断头取全脑组织,去除嗅球、小脑及脑干,分离左右半球脑组织,机器扫描后用软件测两侧半球的体积。脑含水量(%)=(右半球体积-左半球体积)÷左半

球体积×100%。

分光光度法检测血红蛋白浓度以评估脑内出血程度^[22]:在模型制备成功的24 h每组取6只大鼠麻醉并用0.9%氯化钠溶液灌注心脏,断头,取缺血区脑组织,称重,加PBS,匀浆,离心,取上清液,在96孔板中加样,用分光光度计测400 nm处的吸光度值,根据标准品浓度计算血红蛋白浓度。

Western blot检测IP区RIPK1、RIPK3、p-MLKL蛋白表达水平:每组各取3只大鼠IP区50 mg脑组织,加裂解液,离心,取上清液后测蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳后,快速转膜,BSA封闭2 h,加入一抗(RIPK1为1:1 000, RIPK3为1:1 000, p-MLKL为1:1 000, β-tubulin为1:2 000, GAPDH为1:5 000)孵育过夜,洗膜后加HRP标记的二抗(1:10 000)孵育2 h,洗膜,显影并拍照,使用Image J软件分析蛋白条带的灰度值,以目的蛋白与内参蛋白条带的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

实时荧光定量PCR检测IP区RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA表达水平:每组取3只大鼠IP区的50 mg脑组织,而后在液氮中磨成粉末,用Trizol法提取总RNA,测RNA浓度,加入5 μL反转录试剂,吹打混匀后进行反转录反应,以反转录得到的cDNA为模板进行PCR扩增:预变性95℃5 min;循环扩增(40个循环):变性95℃10 s,退火60℃20 s,延伸72℃20 s。反应结束后,确认扩增曲线和溶解曲线。以GAPDH为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}法分析目标基因mRNA的表达量。引物序列见表1。

免疫荧光染色法检测IP区p-MLKL与内皮细胞的共定位情况:在模型制备成功的24 h,每组取6只大鼠麻醉并用0.9%氯化钠溶液和4%多聚甲醛

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
RIPK1	上游 TATCCTCGTTGACCGTGACTTTC	102
	下游 CTCTGCTTGTGTGTTCCCTCCTTAG	
RIPK3	上游 TAGAGGAAGTGCTGCTGGGGATG	87
	下游 GCAGAACATTGGAGGGCTTGAGG	
MLKL	上游 CAAAGTATTCAACAACCCCAAG	209
	下游 TGTCTCTATCCAGCAGTTCCCTC	
GAPDH	上游 CAAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	123
	下游 ACATACTCAGCACCAGCATCACC	

注:RIPK1为受体相互作用蛋白激酶1,RIPK3为受体相互作用蛋白激酶3,MLKL为底物混合谱系激酶样蛋白。

灌注,灌注完成后取患侧脑组织并置于4%多聚甲醛中固定24 h,在不同浓度的蔗糖溶液中脱水48 h,于OCT凝胶中包埋,切片,烘干。PBS冲洗,封闭,37℃恒温孵育90 min。PBS冲洗,加入一抗p-MLKL(1:200)、CD31(1:100),4℃孵育14~16 h。PBS冲洗,加入Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG二抗(1:500)、Alexa Fluor 647标记的山羊抗鼠IgG二抗(1:500),室温孵育2 h,PBS冲洗。滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片,置于荧光显微镜下观察IP区脑组织。随机选取非重叠视野拍摄,用Image J软件分析各视野中阳性细胞数量。双阳性细胞百分比(%)=双阳性细胞数÷细胞总数×100%。

1.6 统计学分析

使用SPSS23.0版软件分析数据,Graphpad Prism9绘制统计图。计量数据符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较前先进行方差齐性检验,方差齐则采用单因素方差分析,进一步两两比较用LSD检验,方差不齐则用Dunnett's t_3 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠右侧大脑脑血流量变化

使用激光散斑血流成像仪评判缺血性卒中模型是否制备成功,评判标准为血流量降至初始值的20%^[17]。造模后假手术组大鼠右侧大脑皮层血管网络密集且血管充盈,造模组大鼠右侧大脑皮层血管网络稀疏且血管欠充盈,本研究中该模型成功率为86.7%。见图1。

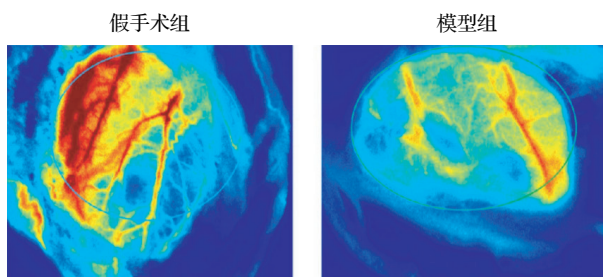


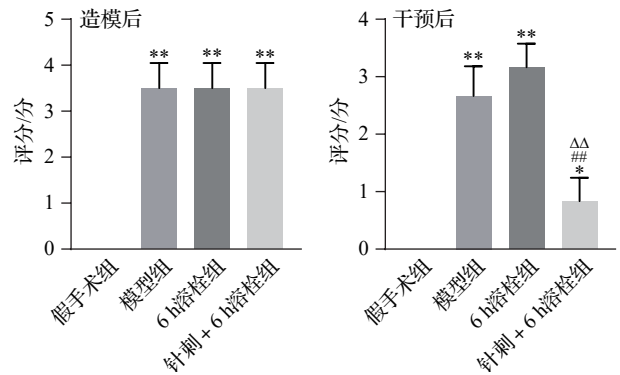
图1 各组大鼠大脑皮层血流灌注的比较

Fig. 1 Comparison of cerebral cortical perfusion in rats between sham-operation and model groups

2.2 各组大鼠神经行为学评分比较

造模2 h后的神经行为学评分结果显示,模型组、6 h溶栓组及针刺+6 h溶栓组的神经行为学评分高于假手术组($P < 0.01$),提示模型制备成功。模

型制备24 h,模型组的神经行为学评分仍然高于假手术组($P < 0.01$);6 h溶栓组与模型组相比差异无统计学意义;针刺+6 h溶栓组评分低于模型组、6 h溶栓组($P < 0.01$),但高于假手术组($P < 0.05$)。见图2。



注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与6 h溶栓组比较,Δ $P < 0.01$ 。

图2 各组大鼠不同时点神经行为学评分比较 ($\bar{x} \pm s$,6只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of neurobehavioral scores of rats in the 4 groups at different time ($\bar{x} \pm s$,6 rats/group)

2.3 各组大鼠脑梗死体积百分比比较

模型组大鼠脑梗死体积百分比高于假手术组($P < 0.01$);6 h溶栓组脑梗死体积与模型组相比,差异无统计学意义;针刺+6 h溶栓组脑梗死体积百分比比较模型组、6 h溶栓组降低($P < 0.01$)。见图3。

2.4 各组大鼠EB含量比较

模型组EB含量高于假手术组($P < 0.01$);6 h溶栓组EB含量高于模型组($P < 0.01$);针刺+6 h溶栓组EB含量低于6 h溶栓组和模型组($P < 0.01$)。见图4。

2.5 各组大鼠脑含水量比较

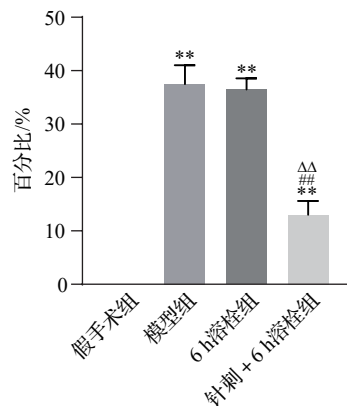
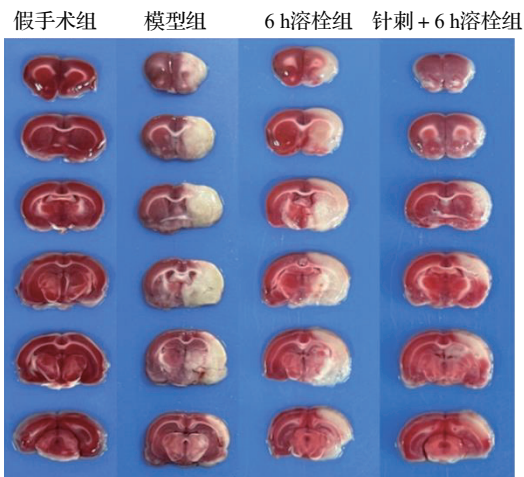
与假手术组相比,模型组大鼠脑含水量差异无统计学意义;6 h溶栓组脑含水量高于模型组($P < 0.05$);针刺+6 h溶栓组脑含水量低于6 h溶栓组和模型组($P < 0.01, P < 0.05$)。见图5。

2.6 各组大鼠脑血红蛋白浓度比较

与假手术组相比,模型组大鼠脑血红蛋白浓度差异无统计学意义;6 h溶栓组脑血红蛋白浓度高于模型组($P < 0.01$);针刺+6 h溶栓组脑血红蛋白浓度低于6 h溶栓组($P < 0.01$)。见图6。

2.7 各组大鼠IP区RIPK1、RIPK3、p-MLKL蛋白表达比较

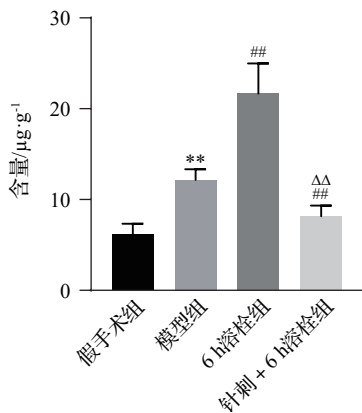
模型组IP区RIPK1蛋白表达水平高于假手术



注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$;与6 h溶栓组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠脑梗死体积百分比比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of cerebral infarction volumes among rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

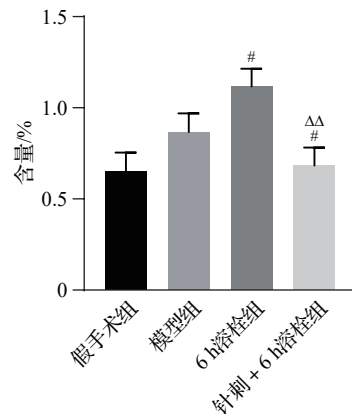


注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$;与6 h溶栓组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠EB含量比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of EB contents among rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

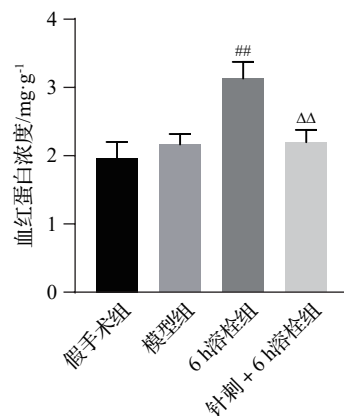
组($P < 0.05$); 6 h溶栓组IP区RIPK3、p-MLKL蛋白表达水平高于模型组($P < 0.05$), 针刺+6 h溶栓组IP区RIPK1蛋白表达水平较模型组降低($P <$



注:与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与6 h溶栓组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

图5 各组大鼠脑含水量比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of cerebral water content among rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)



注:与模型组比较,^{##} $P < 0.01$;与6 h溶栓组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠脑血红蛋白浓度比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of cerebral hemoglobin concentration among rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

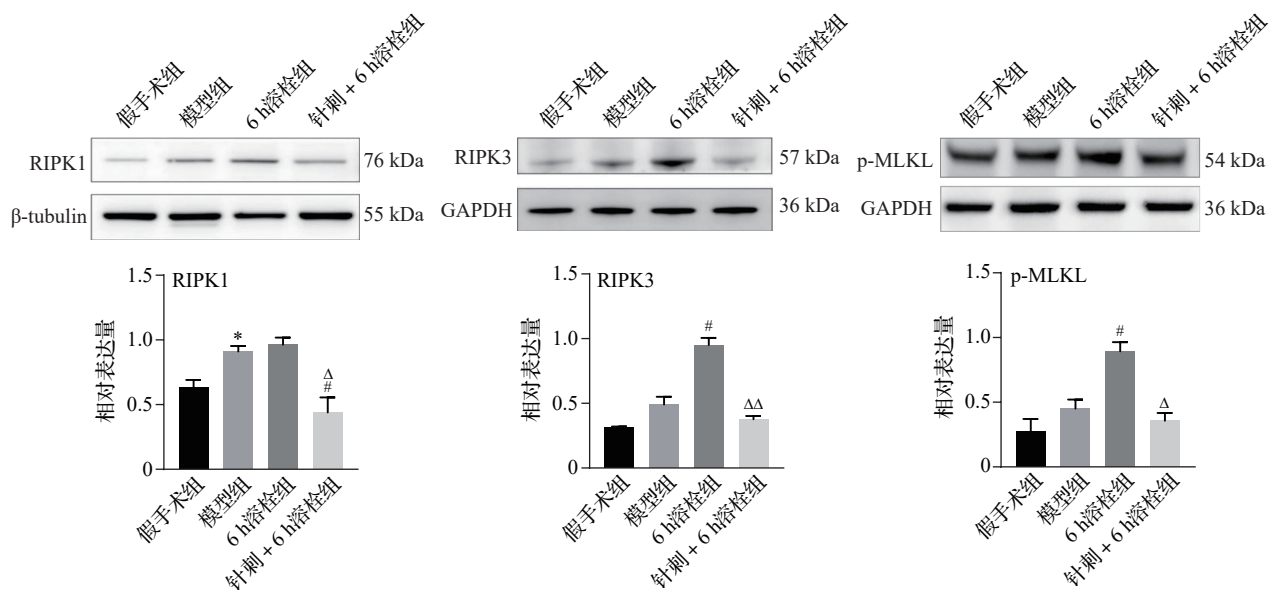
0.05); 针刺+6 h溶栓组IP区RIPK1、RIPK3、p-MLKL蛋白表达水平较6 h溶栓组降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图7。

2.8 各组大鼠IP区RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA表达比较

模型组IP区RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA表达水平高于假手术组($P < 0.01$, $P < 0.05$); 6 h溶栓组IP区RIPK3、MLKL mRNA表达水平高于模型组($P < 0.05$); 针刺+6 h溶栓组IP区RIPK1 mRNA表达水平较模型组降低($P < 0.05$); 针刺+6 h溶栓组IP区RIPK1、RIPK3、MLKL mRNA较6 h溶栓组降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图8。

2.9 各组大鼠IP区p-MLKL与内皮细胞共定位表达的比较

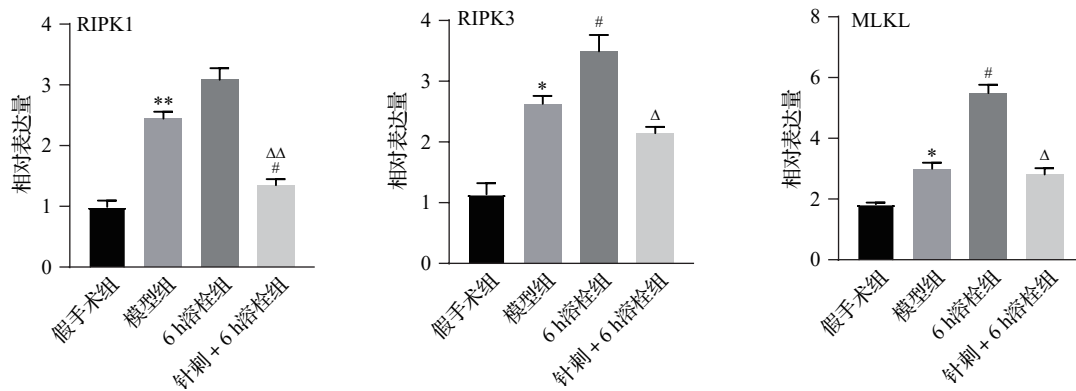
模型组IP区p-MLKL与内皮细胞共定位阳性



注:RIPK1为受体相互作用蛋白激酶1,RIPK3为受体相互作用蛋白激酶3,MLKL为底物混合谱系激酶样蛋白,IP为缺血半暗带。与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与6h溶栓组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

图7 各组大鼠IP区RIPK1、RIPK3、p-MLKL蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of RIPK1, RIPK3 and p-MLKL protein expressions in ischemic penumbra of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rats/group)



注:RIPK1为受体相互作用蛋白激酶1,RIPK3为受体相互作用蛋白激酶3,MLKL为底物混合谱系激酶样蛋白,IP为缺血半暗带。与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与6h溶栓组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

图8 各组大鼠IP区RIPK1、RIPK3、MLKLmRNA表达的比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

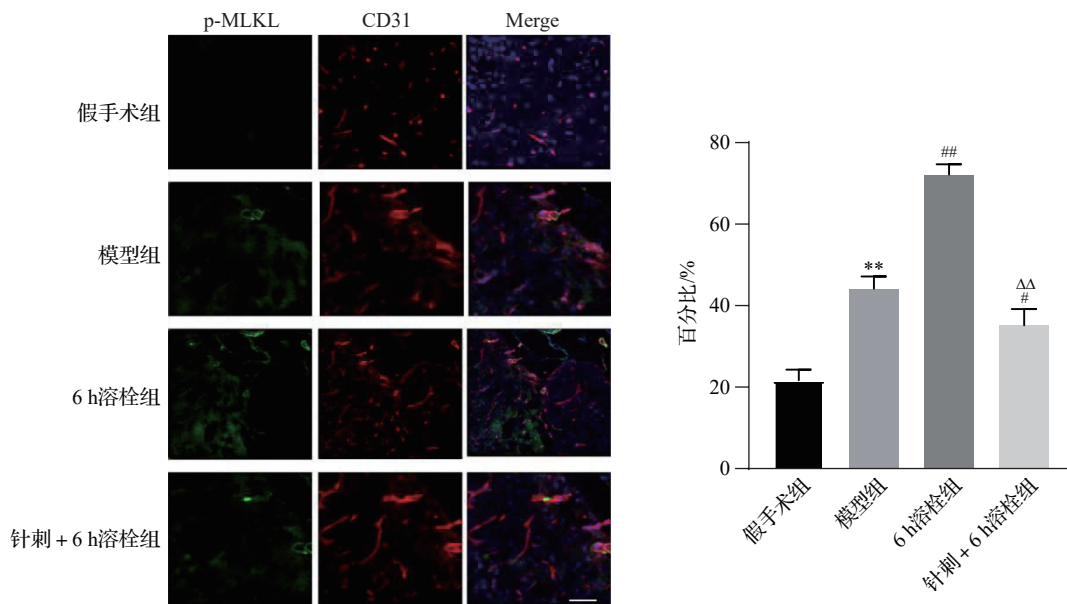
Fig. 8 Comparison of RIPK1, RIPK3 and MLKL mRNA expressions in ischemic penumbra of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rats/group)

细胞百分比高于假手术组($P<0.01$);6h溶栓组IP区共定位阳性细胞百分比较模型组增加($P<0.01$);针刺+6h溶栓组IP区共定位阳性细胞百分比较模型组、6h溶栓组减少($P<0.05$, $P<0.01$)。见图9。

3 讨论

BBB是调节中枢神经系统与外周循环之间分子运输的关键防御屏障,血管内皮细胞是BBB的核心组成部分^[11]。程序性坏死是一种由RIPK1/RIPK3/MLKL通路介导的程序性细胞死亡,伴随

肿胀、质膜破裂等改变^[23-24]。有研究显示,缺血性卒中再灌注后,IP区内皮细胞RIPK1/RIPK3/MLKL通路介导的程序性坏死是引起BBB通透性增加的主导因素^[11]。其机制为:脑缺血再灌注加剧内皮细胞RIPK3的磷酸化和活化,同时RIPK1与RIPK3相互作用形成坏死小体;随后,活化的RIPK3激活MLKL蛋白并诱导MLKL磷酸化,MLKL蛋白在细胞质内聚集,而p-MLKL易位到细胞核,最终定位至细胞膜,引起膜破裂,使得细胞内容物外泄,内皮细胞坏死,造成BBB通透性增加^[11,23-24]。目前临床



注:p-MLKL为磷酸化底物混合谱系激酶样蛋白,IP为缺血半暗带。p-MLKL阳性表达呈现绿色荧光,CD31阳性表达呈现红色荧光,DAPI呈现蓝色荧光。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与6 h溶栓组比较,ΔΔ $P<0.01$ 。

图9 各组大鼠IP区p-MLKL与内皮细胞比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 9 Comparison of the percentage of positive endothelial cells with co-localization of p-MLKL in ischemic penumbra of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$,6 rats/group)

缺乏安全、有效阻断内皮细胞程序性坏死以降低缺血再灌注后BBB通透性增加的药物^[23,25]。

在缺血性卒中的不同分期、不同证候采用合理的穴位配伍和适宜的针刺手法治疗已成为专家共识^[26]。本研究选用在操作手法标准化及临床疗效等维度更有优势的“醒脑开窍”针法^[27],其中,内关是手厥阴心包经的络穴,为八脉交会穴,通阴维脉,“阴维者,维络于身,溢蓄不能环流灌溉诸经者”,先刺之以宁心安神、疏通气血。水沟为督脉腧穴,“督脉入络脑”,继刺之可开脑窍醒脑神;又为任督二脉在头面部的相交部位,是连接内外、调和阴阳的关键节点,继刺之还可调节全身阴阳气血^[14-15]。另外,有关联和聚类分析指出,水沟-内关是治疗缺血性卒中的常用配伍^[15]。

本研究发现,脑缺血6 h时予溶栓干预在改善模型大鼠神经功能以及减小脑梗死体积方面不甚明显,但引起BBB通透性增加,导致脑水肿和脑内出血程度增加。而在溶栓的同时予“醒脑开窍”针法干预可显著改善模型大鼠的神经功能,减小梗死体积,降低BBB通透性,进而发挥减轻溶栓并发症以提高溶栓安全性的作用,将有可能在临床为大量患者赢得溶栓疗法的救治机会。

课题组前期转录组学分析显示,RIPK3异常引起缺血性卒中6 h溶栓BBB通透性增加^[10]。本研究

结果显示,6 h溶栓大鼠IP区RIPK3、p-MLKL蛋白和RIPK3、MLKL mRNA表达增加;p-MLKL与CD31(内皮细胞标志物)共定位的变化趋势与Western blot检测结果一致,同时也与既往研究报道相符^[23],说明溶栓后内皮细胞发生了程序性坏死。可见,RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路介导的内皮细胞程序性坏死是引起6 h溶栓后BBB通透性增加的重要机制。另外,本研究中,在6 h溶栓的同时予“醒脑开窍”针法干预可有效降低上述指标,表明针刺可通过有效下调RIPK3的寡聚水平来抑制MLKL蛋白合成,继而减少p-MLKL的表达及其在内皮细胞中的易位,减少内皮细胞坏死。总结以上研究可知,“醒脑开窍”针法可通过抑制超时间窗溶栓诱导的内皮细胞程序性坏死,降低BBB通透性,减轻溶栓并发症。

本研究主要探讨了“醒脑开窍”针法可通过抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路介导的程序性坏死提高缺血性卒中超时间窗溶栓安全性,为临床提供了一定的客观依据。但本研究仅在实验动物层面进行探究,尚未涉及临床样本分析。因此,未来将设计严谨的临床试验,挖掘临床数据,以期在临床推广应用。

利益冲突 作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] GBD 2021 Stroke Risk Factor Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. *Lancet Neurol*, 2024, 23(10): 973-1003.
- [2] Grotta J C. Intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke [J]. *Continuum (Minneapolis)*, 2023, 29(2): 425-442.
- [3] Kong L L, Gao L, Wang K X, et al. Pinocembrin attenuates hemorrhagic transformation after delayed t-PA treatment in thromboembolic stroke rats by regulating endogenous metabolites [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(8): 1223-1234.
- [4] He J F, Fu F W, Zhang W Y, et al. Prognostic significance of the clinical and radiological haemorrhagic transformation subtypes in acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Neurol*, 2022, 29(11): 3449-3459.
- [5] Ye Q, Zhai F F, Chao B H, et al. Rates of intravenous thrombolysis and endovascular therapy for acute ischaemic stroke in China between 2019 and 2020 [J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2022, 21: 100406.
- [6] 中国卒中学会. 缺血性卒中再灌注治疗时代的海口宣言 [J]. *中国卒中杂志*, 2023, 18(12): 1465-1466.
Chinese stroke association. CSA declaration of next-generation reperfusion therapy for ischemic stroke (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Stroke*, 2023, 18(12): 1465-1466.
- [7] 宋扬扬, 张新昌, 张加英, 等. 醒脑开窍针刺法对脑梗死患者 rt-PA 静脉溶栓安全性的影响: 随机对照试验 [J]. *中国针灸*, 2022, 42(9): 961-965.
Song Y Y, Zhang X C, Zhang J Y, et al. Effect of Xingnao Kaiqiao acupuncture on safety of rt-PA intravenous thrombolysis in patients with cerebral infarction: a randomized controlled trial (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2022, 42(9): 961-965.
- [8] 梁晨曦, 肖凌勇, 甘晶莹, 等. 针刺对脑梗死患者 rt-PA 静脉溶栓出血性转化及运动功能的影响: 前瞻性队列研究 [J]. *中国针灸*, 2023, 43(7): 733-738.
Liang C X, Xiao L Y, Gan J Y, et al. Effects of acupuncture on hemorrhagic transformation and motor function in stroke patients after intravenous thrombolysis with rt-PA: a prospective cohort study (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2023, 43(7): 733-738.
- [9] 赵艺, 宋扬扬, 常思琦, 等. 针刺抑制铜死亡延长脑梗死大鼠溶栓时间窗的实验研究 [J]. *针刺研究*, 2025, 50(7): 754-762.
Zhao Y, Song Y Y, Chang S Q, et al. Acupuncture inhibits cuproptosis to prolong the time window of thrombolysis by downregulating cerebral FDX1 and DLAT in rats with cerebral infarction (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(7): 754-762.
- [10] Zhang Z H, Lu T L, Li S S, et al. Acupuncture extended the thrombolysis window by suppressing blood-brain barrier disruption and regulating autophagy-apoptosis balance after ischemic stroke [J]. *Brain Sci*, 2024, 14(4): 399.
- [11] Chen A Q, Fang Z, Chen X L, et al. Microglia-derived TNF- α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 487.
- [12] 许博文, 曹璐畅, 李杰, 等. 基于网络药理学探讨程序性坏死的中医病机及用药规律 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(5): 904-911.
Xu B W, Cao L C, Li J, et al. Study on the pathogenesis and medication rules of procedural necrosis in Chinese medicine based on network pharmacology (in Chinese) [J]. *World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2021, 16(5): 904-911.
- [13] 李泽芳, 孟祥刚, 褚德旭, 等. 再析“醒脑开窍”理论创见 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(7): 3829-3831.
Li Z F, Meng X G, Chu D X, et al. Reanalysis of the theoretical creation of ‘Xingnao Kaiqiao’ (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2022, 37(7): 3829-3831.
- [14] 商祚祥, 何腾, 张震, 等. 基于“急救刺水沟”探析水沟穴在急性脑病中的临床应用与机制研究进展 [J]. *山东中医杂志*, 2025, 44(6): 704-710.
Shang Z X, He T, Zhang Z, et al. Clinical application and mechanism of Shuigou acupoint in acute encephalopathy based on “first aid stabbing of Shuigou acupoint” (in Chinese) [J]. *Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2025, 44(6): 704-710.
- [15] 邵田娱, 丁敏芮, 周秀, 等. 基于数据挖掘探究针刺督脉治疗急性缺血性中风的腧穴应用规律 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 1118-1121.
Shao T Y, Ding M R, Zhou X, et al. Analysis of acupoints rules in treating acute ischemic stroke with governor channel acupuncture based on data mining (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2021, 36(2): 1118-1121.
- [16] 《针刺研究》编辑部. 实验动物福利伦理审查清单 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(2): 220.
Editorial Board of Acupuncture Research. Check for ethical assessment of experimental animal welfare in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(2): 220.
- [17] Zhang L, Zhang R L, Jiang Q, et al. Focal embolic cerebral ischemia in the rat [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(4): 539-547.
- [18] Wang H L, Chen J W, Yang S H, et al. Multimodal optical imaging to investigate spatiotemporal changes in cerebrovascular function in AUDA treatment of acute ischemic stroke [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 655305.
- [19] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [20] 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.

- China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rats (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [21] Bieber M, Gronewold J, Scharf A C, et al. Validity and reliability of neurological scores in mice exposed to middle cerebral artery occlusion[J]. *Stroke*, 2019, 50(10): 2875-2882.
- [22] Choudhri T F, Hoh B L, Solomon R A, et al. Use of a spectrophotometric hemoglobin assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice[J]. *Stroke*, 1997, 28(11): 2296-2302.
- [23] Yang L M, Wen Y L, Yuan Z Y, et al. Hypoxia-mediated SUMOylation of FADD exacerbates endothelial cell injury via the RIPK1-RIPK3-MLKL signaling axis[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 121.
- [24] Deng X X, Li S S, Sun F Y. Necrostatin-1 prevents necroptosis in brains after ischemic stroke *via* inhibition of RIPK1-mediated RIPK3/MLKL signaling [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(4): 807-817.
- [25] 张彤, 张亚楠, 苑少杰, 等. 桔梗皂苷D对脑缺血再灌注大鼠内皮细胞屏障的保护作用及机制[J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(19): 4751-4758.
- Zhang T, Zhang Y N, Yuan S J, et al. Protective effect and mechanism of Platycodon grandiflorum saponin D on endothelial cell barrier in rats with cerebral ischemia-reperfusion (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2025, 45(19): 4751-4758.
- [26] 方邦江, 李志军, 李银平, 等. 中国急性缺血性脑卒中中西医急诊诊治专家共识[J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30(3): 193-197.
- Fang B J, Li Z J, Li Y P, et al. Expert consensus on emergency diagnosis and treatment of acute ischemic stroke in China (in Chinese) [J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2018, 30(3): 193-197.
- [27] 胡莹莹, 谢西梅. 醒脑开窍针法治疗中风后并发症的临床研究进展[J]. *中医学报*, 2023, 38(11): 2354-2358.
- Hu Y Y, Xie X M. Clinical research progress on treatment of poststroke complications with Xingnao Kaiqiao acupuncture (in Chinese) [J]. *China Journal of Chinese Medicine*, 2023, 38(11): 2354-2358.

收稿日期:2025-11-11 修回日期:2026-03-31