

☆ XXXX ☆

不同时间点电针干预CIRI大鼠对铜死亡相关蛋白及铜稳态的影响

王宇飞, 孟 佳, 黄浏姣
(湖北中医药大学, 武汉 430061)

【摘 要】 目的:观察不同时间节点电针干预对急性脑卒中(IS)大鼠缺血再灌注损伤(CIRI)后缺血半暗带区铜死亡相关蛋白及 Cu^{2+} 含量的影响,探讨针刺抑制铜死亡改善CIRI大鼠神经功能的作用机制及不同施治时间对CIRI大鼠神经功能损伤的改善效果。**方法:**SD大鼠随机分为假手术组、模型组、0 h针刺组、24 h针刺组、48 h针刺组,每组12只。制作大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)模型。各电针组分别于造模完成再灌注24 h后0 h、24 h、48 h予以电针“百会”“风府”30 min。采用改良神经功能缺损评分(mNSS)评估神经功能缺损恢复情况,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测脑梗死体积,比色法检测缺血半暗带脑组织 Cu^{2+} 含量,实时荧光定量PCR和Western blot检测缺血半暗带脑组织铁氧还蛋白1(FDX1)、二氢硫辛酸转乙酰基酶(DLAT)、硫辛酸合成酶(LIAS)、溶质载体家族31成员1(SLC31A1)的mRNA及蛋白表达。**结果:**与假手术组相比,模型组mNSS评分,脑梗死体积,缺血半暗带脑组织 Cu^{2+} 含量,FDX1、LIAS mRNA及蛋白表达均显著升高($P<0.01$),DLAT、SLC31A1 mRNA及蛋白表达显著下降($P<0.01$)。与模型组相比,各针刺组mNSS评分,脑梗死体积, Cu^{2+} 含量,DLAT、SLC31A1 mRNA及蛋白表达降低($P<0.01$, $P<0.05$),FDX1和LIAS mRNA及蛋白表达升高($P<0.01$, $P<0.05$)。与24 h针刺组、48 h针刺组相比,0 h针刺组mNSS评分,脑梗死体积, Cu^{2+} 含量,DLAT和SLC31A1 mRNA及蛋白表达明显降低($P<0.01$, $P<0.05$),FDX1及LIAS mRNA及蛋白表达显著升高($P<0.01$, $P<0.05$)。24 h针刺组脑梗死体积, Cu^{2+} 含量,DLAT、SLC31A1、FDX1及LIAS mRNA表达优于48 h针刺组($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论:**电针干预CIRI可有效抑制铜死亡、减轻脑损伤,且早期电针介入对CIRI神经功能损伤改善效果更好。其机制可能与调节FDX1、DLAT、LIAS、SLC31A1表达,降低脑组织 Cu^{2+} 含量,从而抑制神经元铜死亡有关。

【关键词】 电针;脑缺血再灌注损伤;铁氧还蛋白1;铜死亡;早期介入

Effects of electroacupuncture intervention at different time points on cuproptosis-related proteins and copper homeostasis in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

Wang Yufei, Meng Jia, Huang Liujiao (Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effects of electroacupuncture (EA) intervention at different time points on cuproptosis-related proteins and Cu^{2+} levels in the ischemic penumbra of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) after acute ischemic stroke (IS), so as to explore the mechanism by which acupuncture inhibits cuproptosis to improve neurological function in CIRI rats, as well as the therapeutic efficacy of intervention administered at different time windows. **Methods** SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, 0 h acupuncture group, 24 h acupuncture group and 48 h acupuncture group, with 12 rats in each group. The middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model was established. Rats in each EA group received 30 min of EA at “Baihui” (GV20) and “Fengfu” (GV16) at 0 h, 24 h and 48 h after reperfusion, respectively. Modified neurological severity score (mNSS) was used to evaluate the recovery of neurological deficit. 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was adopted to detect cerebral infarct volume. Colorimetric assay was performed to measure Cu^{2+}

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260490

引用格式:王宇飞,孟佳,黄浏姣.不同时间点电针干预CIRI大鼠对铜死亡相关蛋白及铜稳态的影响[J].针刺研究,XXXX,XX(X): 1-10.

项目来源:湖北省自然科学基金中医药创新发展联合基金项目(No.2024AFD336)

通信作者:黄浏姣, E-mail:493131338@qq.com

content in brain tissues of the ischemic penumbra. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of ferredoxin 1 (FDX1), dihydrolipoamide S-acetyltransferase (DLAT), lipoic acid synthetase (LIAS), and solute carrier family 31 member 1 (SLC31A1) in the ischemic penumbra. **Results** Compared with the sham operation group, the model group exhibited significantly elevated mNSS score, cerebral infarct volume, Cu^{2+} content in ischemic penumbra tissues, as well as increased mRNA and protein expression of FDX1 and LIAS ($P < 0.01$); meanwhile, the mRNA and protein expression of DLAT and SLC31A1 were markedly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, all acupuncture groups presented reduced mNSS score, cerebral infarct volume, Cu^{2+} level, together with down-regulated mRNA and protein expression of DLAT and SLC31A1 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and up-regulated mRNA and protein expression of FDX1 and LIAS ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the 24 h acupuncture group and 48 h acupuncture group, the 0 h acupuncture group showed distinctly lower mNSS score, cerebral infarct volume, Cu^{2+} content, and weaker mRNA and protein expression of DLAT and SLC31A1 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), accompanied by remarkably higher mRNA and protein expression of FDX1 and LIAS ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The 24 h acupuncture group achieved better outcomes in cerebral infarct volume, Cu^{2+} content, and mRNA expression of DLAT, SLC31A1, FDX1 and LIAS relative to the 48 h acupuncture group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** EA intervention can effectively suppress cuproptosis and alleviate cerebral injury in CIRI rats, and early EA intervention exerts superior efficacy in ameliorating neurological impairment after CIRI. The underlying mechanism may involve regulating the expression of FDX1, DLAT, LIAS and SLC31A1, reducing brain Cu^{2+} concentration, and thereby inhibiting neuronal cuproptosis.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Ferredoxin 1; Cuproptosis; Early intervention

缺血性脑卒中(IS)是由于血栓栓塞、脑部供血不足而引起脑组织损伤的一种疾病^[1]。2019年相关统计数据显示脑卒中已成为全球范围内第二大致死病因和第三大致残病因,其中IS占据绝大多数^[2]。尽早恢复血流灌注,挽救濒死的缺血半暗带是急性IS治疗的关键。然而,在缺血脑组织恢复血流灌注后,往往会诱发脑缺血再灌注损伤(CIRI),进一步加重IS患者的神经功能损伤。

铜死亡是区别于细胞凋亡、坏死的一种新型细胞死亡形式^[3],与IS的发展与预后息息相关,其主要机制是 Cu^{2+} 过载^[4],体内铜代谢紊乱或铜转运蛋白表达异常都可能导致游离 Cu^{2+} 蓄积^[5],激活蛋白质毒性应激,加剧脑组织损伤。铁氧还原蛋白1(FDX1)、二氢硫辛酸转乙酰基酶(DLAT)、硫辛酸合成酶(LIAS)是铜死亡的关键调节因子,一方面 Cu^{2+} 通过FDX1/LIAS介导的硫辛酸途径诱导硫辛酰化修饰的DLAT发生蛋白质寡聚化^[6],另一方面FDX1可以将 Cu^{2+} 还原成毒性较强的 Cu^+ ,抑制Fe-S簇蛋白的合成从而影响线粒体呼吸功能^[7]。此外,溶质载体家族31成员1(SLC31A1)负责编码铜转运蛋白1(CTR1)^[8],介导细胞外 Cu^{2+} 的摄取,是维持铜稳态的关键。

电针预处理能够减轻氧化应激和炎症反应,对CIRI大鼠神经功能起到一定的保护作用^[9],在临床上也取得了显著疗效^[10-11]。然而现有关于电针调控

铜死亡干预CIRI的研究报道较少,因此本研究以铜死亡为切入点,选取头部穴位“百会”“风府”进行针刺,观察不同时间段电针干预对FDX1等铜死亡关键蛋白的表达及对 Cu^{2+} 水平的影响,探讨电针干预CIRI铜死亡保护神经功能的作用机制,并对比不同施治时间下电针对CIRI铜死亡及神经功能的改善效果,为临床诊疗和研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠共60只,7~8周龄,体质量200~240 g,均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物生产许可证编号为:SCXK(湘)2021-0002。实验全程将大鼠饲养于湖北中医药大学SPF级动物实验室,环境温度调控在25℃上下,相对湿度保持在45%~65%范围内,通过为期1周的适应性喂养后再进行造模操作。本动物实验相关方案已获得湖北省疾病预防控制中心实验动物管理与使用伦理委员会审核批准(批准文号:202420112),实验操作均严格遵循相关实验动物伦理规范^[12]。

1.2 主要仪器与试剂

台式高速冷冻离心机(大龙兴创),酶标检测仪、酶标洗板机(杭州奥盛仪器),qPCR仪(美国ABI),凝胶成像仪(北京君意),电泳仪(北京六一仪

器厂),Image J图像分析软件(美国NIH),一次性无菌针灸针(0.30 mm×25 mm)、SDZ-II型电子针疗仪(苏州医药用品厂),高速组织研磨机(上海净信实业)。

TTC染色试剂(北京索莱宝),超敏ECL Plus发光试剂盒(上海碧云天),RIPA裂解液、磷酸化蛋白酶抑制剂、5×蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、BCA蛋白定量检测试剂盒(武汉科拜),动物组织/细胞总RNA提取试剂盒、qPCR酶、反转录酶(山东赛泰科仪器), β -actin、GPADH抗体、LIAS抗体(武汉三鹰),FDX1抗体、DLAT抗体、SLC31A1抗体(美国Affinity),HRP标记山羊抗兔、HRP标记兔抗山羊、HRP标记山羊抗大鼠二抗(美国KPL),无水乙醇(国药集团), Cu^{2+} 测定试剂盒(南京建成)

1.3 动物模型制备与分组

经过1周的适应性喂养后,将60只大鼠进行编号,用随机数字表法将大鼠随机分为5组,每组12只,分别为:假手术组、模型组、0 h针刺组、24 h针刺组、48 h针刺组(0 h、24 h、48 h均为造模完成后再灌注24 h开始计算);实验过程中若出现动物死亡或不符合纳入标准者,及时补足动物数量并重新进行造模。

48只造模大鼠采用改良Longa线栓法建立右侧大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)模型。大鼠术前禁食6~8 h,自由饮水。以2.5%三溴乙醇(10 mL/kg)腹腔注射麻醉,仰卧固定。颈部正中做一切口,分离右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。于颈总动脉近心端预置活结,结扎颈外动脉远心端,临时夹闭颈内动脉。在颈外动脉距分叉3~5 mm处剪一“V”形小口,将多聚-L-赖氨酸预处理的尼龙线栓经此切口插入颈总动脉,调整方向并经颈内动脉缓慢上行至大脑中动脉起始处(自颈总动脉分叉处约17 mm),实现血流阻断。缺血90 min后拔出线栓,结扎颈外动脉残端,松开颈总动脉活结,缝合皮肤并消毒。术中保温毯维持肛温37℃左右。术后每笼5只饲养,自由饮食。待大鼠再灌注时长达到24 h且生命体征趋于平稳后,依据ZeaLonga 5分制标准对48只大鼠进行初步神经功能缺损评分,筛选出首次评分处于1~3分区间的13只大鼠共43只,视为造模成功并纳入后续实验,其余5只大鼠不符合要求被剔除(2只造模过程中死亡,3只不符合造模标准),并立即补齐重新造模,直至实验所需的48只大鼠造模成功。ZeaLonga 5分制具体评分细则^[13]为:

无神经功能缺损症状计0分;对侧前爪伸展受阻计1分;边走路边向对侧转圈计2分;站立或行走时向对侧倾倒计3分;丧失自主行走能力且伴意识障碍计4分。其中1~3分视为造模成功。假手术组大鼠仅对颈内、颈外动脉进行分离操作,不置入线栓。

1.4 干预方法

动物实验模型构建完毕后,将大鼠俯卧位放置在固定板上,四肢用松紧适宜的棉绳捆绑于操作台的固定点位,暴露头颈部,依据全国中医药行业高等教育“十四五”规划教材《实验针灸学》^[14]进行腧穴定位。具体定位及针刺操作如下:“百会”位于头顶正中最高点,两耳尖连线与头正中线的交点处,平刺0.3~0.5 cm,轻捻转至局部肌肉节律性轻微颤动为宜;“风府”位于项后正中、枕骨粗隆下缘,两侧项肌之间凹陷处,向下颌方向斜刺0.2~0.3 cm,轻捻转至局部肌肉节律性轻微颤动为宜。连接电针仪(“百会”接正极,“风府”接负极),疏密波,频率2 Hz/10 Hz,电流1.5 mA,刺激强度以大鼠四肢微微抖动、无明显应激反应为标准,留针时长30 min,留针结束后缓慢出针,并对针孔部位进行常规消毒。0 h针刺组、24 h针刺组、48 h针刺组分别于造模完成后再灌注24、48、72 h进行1次电针干预,假手术组与模型组大鼠同针刺组大鼠抓取固定,但均不给予干预处理。

1.5 观察指标与检测方法

改良神经功能缺损评分(mNSS)评估大鼠神经功能恢复情况:分别在造模后干预前及0 h针刺组、24 h针刺组、48 h针刺组相应干预结束后,对大鼠进行mNSS评分,分值范围为0~18分^[15],涉及运动功能、感觉功能、平衡协调功能、生理反射等方面的综合评价,分值越高代表大鼠神经功能缺损状况越严重。具体评分细则详见表1。

取材:在mNSS评分完成后,将大鼠经2.5%三溴乙醇腹腔注射麻醉后迅速断头取脑。每组随机选取3只大鼠,取全脑组织用于TTC染色;每组随机选取3只大鼠,取患侧缺血区半暗带组织用于络合比色法检测 Cu^{2+} 含量;每组剩余6只大鼠各取50 mg缺血半暗带组织置于冻存管并投入液氮速冻,转移至-80℃冰箱保存,用于后续基因与蛋白表达检测。

TTC染色检测脑梗死体积:干预完成后,各组随机选取3只大鼠,2.5%三溴乙醇腹腔注射麻醉后迅速断头取脑,0.9%氯化钠溶液冲洗去血,-20℃速冻20 min,切为2 mm间隔的全脑组织冠状切片,

表1 改良神经功能缺损评分表
Table 1 Evaluation scale for modified Neurological Severity Scores

测评项目	评分标准	分值/分
前肢伸展实验	双侧前肢伸展对称正常	0
	患侧前肢轻度屈曲内收	1
	患侧前肢明显蜷缩、无法伸展	2
铁丝网攀爬实验	攀爬有力、抓握正常、肢体协调	0
	攀爬费力、患侧发力减弱、偶有打滑	1
	无法攀爬、极易滑落	2
自主行走转圈实验	直线行走,无偏转、无转圈	0
	行走偏向患侧,轻微偏行	1
	持续向患侧原地转圈	2
平衡木行走状态	平稳走完全程,步态稳定	0
	行走摇晃、步态不稳、中途停顿	1
	无法行走、踏杆即倾倒	2
肢体肌张力与震颤	肌张力正常、无震颤	0
	肢体轻微震颤、肌张力异常	1
	明显震颤、肢体僵硬或瘫软	2
平衡木滞留能力	全程无跌落	0
	偶尔跌落,可自行再次攀爬	1
	无法滞留、快速跌落	2
本体感觉及触觉反射	双侧肢体刺激后回缩反应灵敏对称	0
	患侧感觉迟钝、回缩延迟	1
	患侧感觉消失、无回缩反应	2
耳廓反射	触碰耳廓,迅速甩头、耳动应答	0
	无任何反射反应	1
角膜反射	轻触角膜,立即闭眼应答	0
	无闭眼反射	1
惊吓反射	声光刺激后出现惊跳、躲避反应	0
	无惊吓反应	1
翻正反射	仰卧位可迅速自主翻正为俯卧位	0
	无法自主翻身复位	1
总计		0~18

浸于2%的TTC染液内,置于37℃恒温水浴箱内避光孵育20 min,每10 min翻面1次确保脑组织与染液均匀接触。染色完成后,使用4%多聚甲醛固定24 h,采用相机拍摄并保存图像;其中TTC染色呈红色区域为正常脑组织,白色区域则为梗死区域。采用ImageJ软件测算脑梗死体积百分比,脑梗死体积百分比(%)=各切片白色缺血区域面积之和÷

各冠状切片面积之和×100 %。

生化法(络合比色法)检测Cu²⁺含量:各随机选取3只大鼠,麻醉处死后,断头分离脑组织缺血区半暗带50 mg,使用超声破碎仪研磨组织,离心,取上清液待测。在96孔板中设置标准孔、测定孔和空白孔,分别加入铜标准品、样品及双蒸水各10 μL。每孔加入150 μL乙酸缓冲液+抗坏血酸试剂混合均

匀,在 37 ℃ 孵育 5 min 后测定吸光度 A_1 ; 再加入 50 μ L 3,5-二溴-PAESA 试剂二次混合,37 ℃ 孵育 5 min,再次测定吸光度 A_2 。以 $\Delta A = A_2 - A_1$ 计算净吸光度,再根据标准品浓度制作标准曲线,计算样品 Cu^{2+} 含量。

实时荧光定量 PCR 法检测脑组织中的 FDX1、DLAT、LIAS 及 SLC31A1 的 mRNA 表达:每组随机取 3 只大鼠各 50 mg 的缺血半暗带组织,采用 Trizol 法提取总 RNA,按照反转录试剂盒说明书要求将 RNA 反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增:在 95 ℃ 下预变性 150 s;94 ℃ 变性 25 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,共进行 40 个循环。结果以 GAPDH 为内参对照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算得出 FDX1、DLAT、LIAS 及 SLC31A1 的相对表达量。引物序列见表 2。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
FDX1	上游 TTTGGTGC GTGTGAGGGAAC	150
	下游 AGCCCAACCTTGACCTGTCT	
DLAT	上游 TCCGCATCAGAAGGTTCCATT	150
	下游 CTCTCAAACCCAACAGTG GCT	
LIAS	上游 TGCATAATGGACCAGACCTTCAA	122
	下游 CCATGGAGGTAGTCTTAGCCTTT	
SLC31A1	上游 GGGCTTACCCTGTGAAGACTTT	147
	下游 GTGGTGAGGTGGCATGGTAA	
GAPDH	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	123
	下游 TG TAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

注:FDX1 为铁氧还原蛋白 1,DLAT 为二氢硫辛酸转乙酰基酶,LIAS 为硫辛酸合成酶,SLC31A1 为溶质载体家族 31 成员 1。

Western blot 检测铜死亡标志蛋白 FDX1、DLAT、LIAS 及 SLC31A1 的表达:随机取每组 3 只大鼠缺血半暗带组织 50 mg,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,将样品置于冰上裂解 20~30 min,离心后收集上清液,采用 BCA 法对蛋白浓度进行定量检测,再依据测定结果加入相应的蛋白上样缓冲液并制备蛋白样品。取制备好的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(120 V,1 h);采用 300 mA 恒定电流转膜 30 min。使用封闭液封闭膜 30 min,用 TBST 缓冲液冲洗 1 次。分别加

入一抗 FDX1(1:1 000)、DLAT(1:1 000)、LIAS(1:1 000)、SLC31A1(1:1 000)及内参 GAPDH 抗体(1:10 000),置于 4 ℃ 条件下孵育 15 h。TBST 冲洗 3 次,每次 5 min,20~25 ℃ 条件下孵育二抗(1:5 000)30 min,再次用 TBST 冲洗 3 次,每次 10 min。ECL 化学发光显色完成后,蛋白表达水平的半定量分析采用 AlphaEase FC 软件。将目的蛋白条带的灰度值与内参 GAPDH 的灰度值的比值作为各目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学分析

实验数据由 SPSS26.0 统计学软件分析处理,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计数据之前先进行正态性检验与方差齐性检验。若数据符合正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析进行多组间比较,配对 t 检验用于组内前后介入比较,LSD 检验用于组间两两比较,以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠干预前与干预后神经功能缺损评分比较

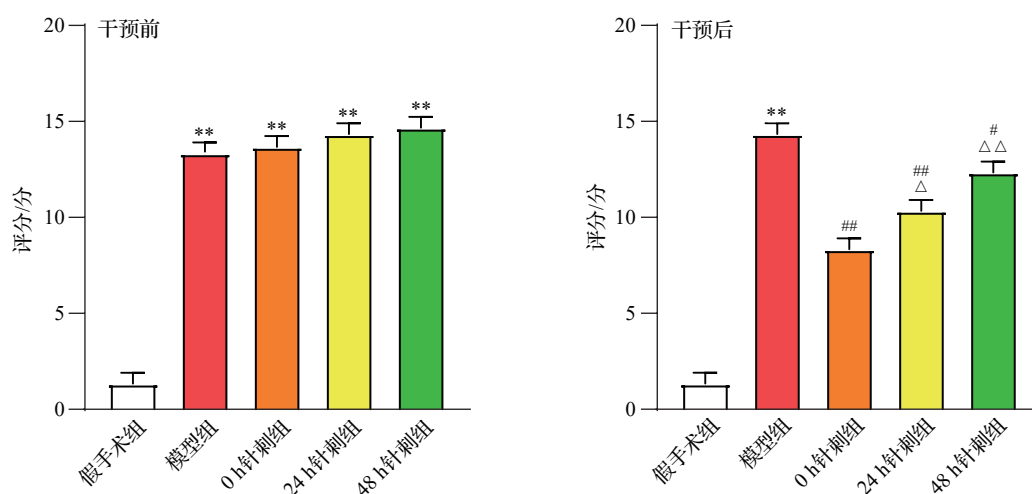
通过对大鼠运动、感觉、平衡协调、生理反射等方面综合评估得出的评分显示:干预前假手术组大鼠 mNSS 评分为 0,提示未出现神经功能缺损状况。与假手术组比较,模型组及 3 个针刺组大鼠 mNSS 评分显著升高($P < 0.01$),提示神经功能缺损程度明显加重。针刺介入后,与模型组比较,0 h 针刺组、24 h 针刺组、48 h 针刺组 mNSS 评分下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与 0 h 针刺组相比,24 h 针刺组 mNSS 评分升高($P < 0.05$),48 h 针刺组 mNSS 评分升高更明显($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 各组大鼠脑缺血梗死区域占比比较

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织梗死区域体积比明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,各针刺组干预后大鼠脑缺血梗死区域体积比均有所下降($P < 0.01$);与 0 h 针刺组相比,24 h 针刺组、48 h 针刺组大鼠脑缺血梗死区域体积比升高($P < 0.01$);与 24 h 针刺组相比,48 h 针刺组大鼠脑缺血梗死区域体积比升高($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 各组大鼠脑缺血半暗带组织 Cu^{2+} 含量比较

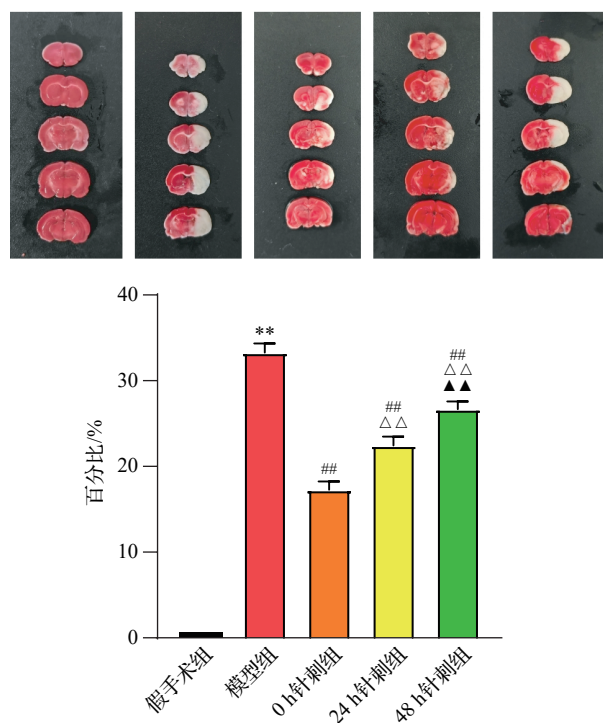
缺血半暗带区 Cu^{2+} 的稳态失衡是内源性释放与外源性流入共同作用导致神经元内铜局部累积的结果。与假手术组比较,脑缺血状态下模型组大鼠缺血半暗带内 Cu^{2+} 含量升高($P < 0.01$);与模型



注:mNSS为改良神经功能缺损评分。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$,# $P<0.05$;与0 h针刺组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

图1 各组大鼠干预前后mNSS评分比较($\bar{x}\pm s$,12只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of mNSS scores before and after intervention of rats in the 5 groups($\bar{x}\pm s$,12只鼠/组)



注:TTC为2,3,5-氯化三苯基四氮唑。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与0 h针刺组比较,△△ $P<0.01$;与24 h针刺组比较,▲▲ $P<0.01$ 。

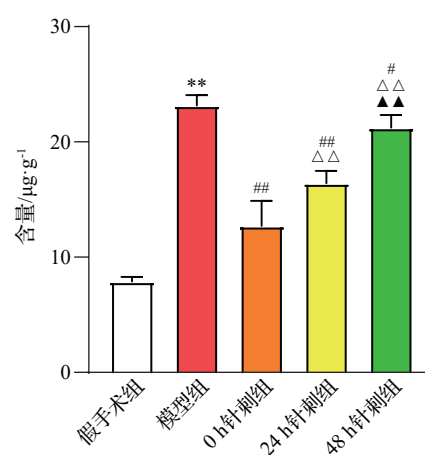
图2 各组大鼠脑缺血梗死区域体积比比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)
Fig. 2 Comparison of the relative cerebral infarct volume of rats in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rats/group)

组比较,针刺组大鼠缺血半暗带组织内 Cu^{2+} 含量降低($P<0.01$, $P<0.05$)。与0 h针刺组比较,24 h针刺组大鼠缺血半暗带组织内 Cu^{2+} 含量升高($P<0.01$),48 h针刺组半暗带组织内 Cu^{2+} 含量升高($P<$

0.01);与24 h针刺组比较,48 h针刺组缺血半暗带内 Cu^{2+} 含量升高($P<0.01$)。见图3。

2.4 各组大鼠缺血半暗带FDX1、DLAT、LIAS及SLC31A1 mRNA表达比较

与假手术组比较,模型组大鼠缺血半暗带中FDX1、LIAS mRNA相对表达量明显下降($P<0.01$),DLAT、SLC31A1的mRNA相对表达量明显上升($P<0.01$);与模型组相比,FDX1、LIAS在各针刺组大鼠缺血半暗带中mRNA相对表达量上升($P<0.01$),DLAT、SLC31A1的mRNA相对表达



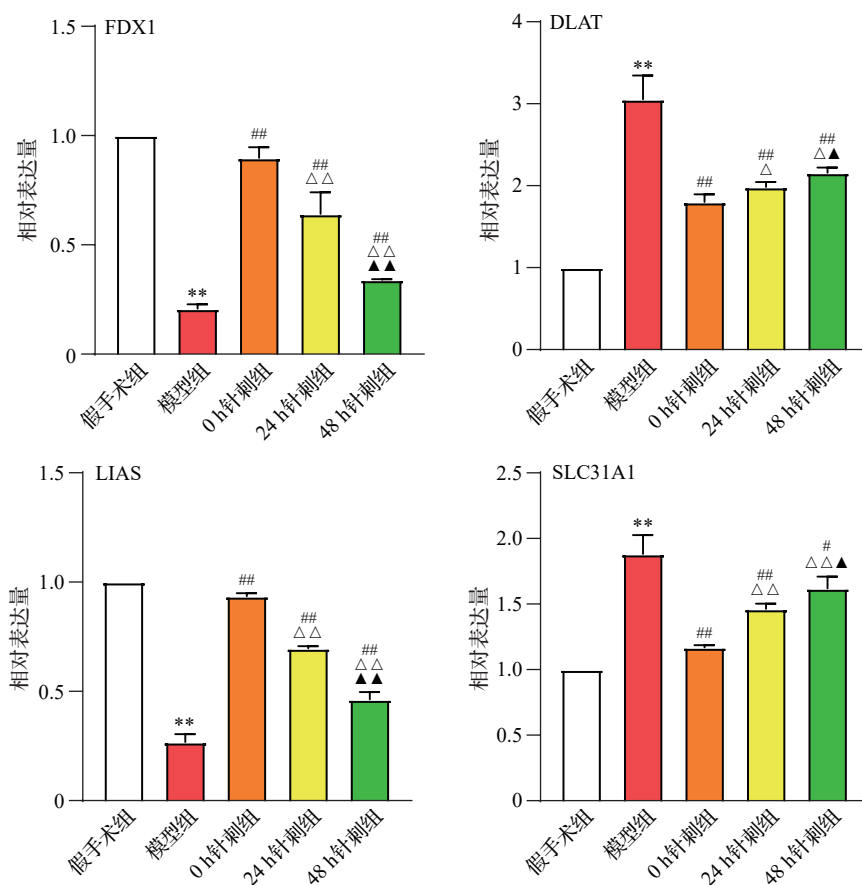
注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与0 h针刺组比较,△△ $P<0.01$;与24 h针刺组比较,▲▲ $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠脑缺血半暗带组织 Cu^{2+} 含量比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of Cu^{2+} concentration in ischemic penumbra tissue of rats in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rats/group)

量下降($P<0.01$, $P<0.05$);与0 h针刺组相比,24 h针刺组、48 h针刺组 FDX1、LIAS 的 mRNA 相对表达量下降($P<0.01$),DLAT、SLC31A1 的 mRNA 相对表达量升高($P<0.01$, $P<0.05$);与24 h针刺组

相比,48 h针刺组 FDX1、LIAS 的 mRNA 相对表达量下降($P<0.01$),DLAT、SLC31A1 的 mRNA 相对表达量升高($P<0.05$)。见图4。



注:FDX1为铁氧还原蛋白1,DLAT为二氢硫辛酸转乙酰基酶,LIAS为硫辛酸合成酶,SLC31A1为溶质载体家族31成员1。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,# $P<0.01$;与0 h针刺组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与24 h针刺组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠脑缺血半暗带组织 FDX1、DLAT、LIAS 及 SLC31A1 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

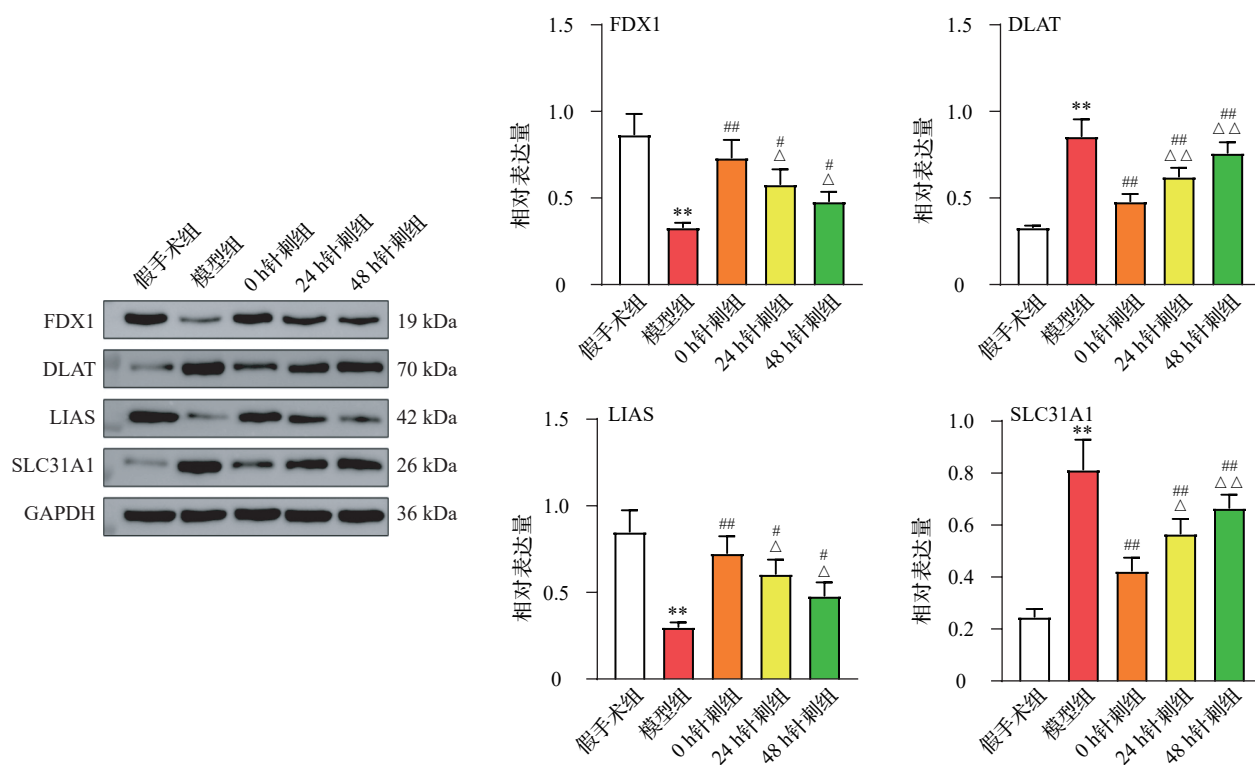
Fig. 4 Comparison of FDX1, DLAT, LIAS and SLC31A1 mRNA expressions in ischemic penumbra of rats in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rats/group)

2.5 各组大鼠缺血半暗带 FDX1、DLAT、LIAS 及 SLC31A 蛋白表达比较

与假手术组比较,模型组大鼠缺血半暗带组织中 FDX1、LIAS 蛋白表达量降低($P<0.01$),DLAT、SLC31A1 的蛋白表达量升高($P<0.01$);与模型组比较,各针刺组大鼠缺血半暗带组织中 FDX1、LIAS 的蛋白表达量升高($P<0.01$, $P<0.05$),DLAT、SLC31A1 的蛋白表达量降低($P<0.01$);与0 h针刺组比较,24 h针刺组、48 h针刺组 FDX1、LIAS 的蛋白表达量降低($P<0.05$),DLAT、SLC31A1 的蛋白表达量升高($P<0.01$, $P<0.05$)。见图5。

3 讨论

急性 IS 发生后,由于梗死区神经元缺血缺氧,脑组织会出现不可逆的损伤。但是得益于大脑侧支循环的代偿作用,梗死周边区域,也就是缺血半暗带附近仍可获得部分血流供应,一定程度上延缓神经元死亡^[16]。因此,尽早开通闭塞血管,挽救缺血半暗带神经元,是临床上急性脑梗死治疗及预后的关键。IS 通常归入中医“中风”的范畴,中风多由气机失调、脑部血脉阻塞及元神功能失常所致^[17]。论及缺血性中风的治法,张道宗教授提出“病变在脑,首取督脉,针刺调神”理论^[18],督脉为阳脉之海,总督一身阳气,且循行入络脑,是贯通周身与脑窍的重



注: FDX1为铁氧还原蛋白1, DLAT为二氢硫辛酸转乙酰基酶, LIAS为硫辛酸合成酶, SLC31A1为溶质载体家族31成员1。与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与0 h针刺组比较, Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$ 。

图5 各组大鼠脑缺血半暗带组织FDX1、DLAT、LIAS及SLC31A1蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of FDX1, DLAT, LIAS and SLC31A1 protein expressions in ischemic penumbra of rats in the 5 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

要经脉^[19],也是气血精微上输濡养脑髓的关键通路。针刺治疗可以激发督脉经气,疏通脑脉改善脑部气血灌注^[20]。基于此,本研究选用“百会”“风府”进行电针干预,百会为督脉与诸阳之会,风府为督脉与阳维之会,二穴配伍共奏温阳通督、醒脑益髓之功^[21]。

细胞内 Cu^{2+} 过度蓄积是铜死亡的关键诱因^[22]。当 Cu^{2+} 稳态失衡,过量的 Cu^{2+} 与脂酰化蛋白结合,诱导脂酰化蛋白聚集、铁硫簇蛋白丢失^[23-24],从而导致蛋白质毒性应激,激活炎症反应,最终导致细胞死亡^[25]。本研究显示,模型组大鼠缺血半暗带内 Cu^{2+} 水平显著升高,而各针刺组缺血半暗带 Cu^{2+} 水平较模型组均有所下降,且随着针刺干预时间越晚, Cu^{2+} 水平呈缓慢上升趋势。研究结果说明电针干预可以调控缺血性脑卒中大鼠再灌注损伤后体内的 Cu^{2+} 稳态,且早期电针干预可显著增强其调节作用。

铜死亡的关键特征是蛋白脂酰化修饰异常及铁硫簇蛋白丢失^[26-27],最终影响线粒体代谢通路。FDX1、LIAS、DLAT是介导该过程的关键蛋白。

脑组织缺血缺氧后,缺血半暗带中线粒体内 Cu^{2+} 异常蓄积,FDX1主要存在于线粒体中,可将 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+} ,而游离的 Cu^{+} 可直接破坏FDX1的铁硫簇结构^[6],导致其构象异常并被泛素化降解。同时该蛋白也是 Cu^{2+} 直接作用靶点,能够介导 Cu^{2+} 在线粒体内的积累^[28]。LIAS是参与线粒体蛋白脂酰化修饰的关键合成酶,与FDX1一样含有铁硫簇成分^[29],FDX1为LIAS合成硫辛酸提供必需的还原当量,当FDX1表达水平下调以及游离 Cu^{+} 增多,LIAS铁硫簇结构稳定性与活性下降,与FDX1同步降解,影响硫辛酸的合成,从而介导三羧酸循环(TCA)中酶脂酰化修饰^[30],激活线粒体蛋白毒性应激。因脂酰化修饰紊乱而残留的DLAT是LIAS介导脂酰化修饰的核心靶蛋白^[31],可与 Cu^{+} 特异性结合,引发异常寡聚化^[32],形成蛋白毒性产物,加重毒性应激反应,推动铜死亡进程。本研究中模型组FDX1、LIAS的mRNA及蛋白表达量下降,而DLAT的mRNA及总蛋白表达量上调,验证铜死亡参与CIRI;而针刺后各组FDX1、LIAS的mRNA及蛋白表达量均上调,说明针刺一定程度上可以干预细胞铜死亡进

程,保护脑组织,而DLAT的mRNA及总蛋白表达量均下降,说明针刺可以下调DLAT的异常表达,维持DLAT总蛋白水平,进行可能通过改善其脂酰化稳态,减少相关蛋白异常寡聚,降低线粒体毒性应激。并且0 h针刺组对于FDX1、LIAS、DLAT的调控作用优于其余时间点针刺组,说明电针早期介入更有利于抑制铜死亡发生,减轻脑损伤风险。此外,SLC31A1是一种高亲和力的铜转运蛋白,通过控制 Cu^{2+} 跨膜内流,同时调控FDX1、LIAS、DLAT介导的蛋白质脂酰化过程来决定细胞铜的超载程度,是铜死亡的关键启动因子^[33]。研究结果显示各针刺组SLC31A1的mRNA及蛋白表达均下降,说明针刺还可能通过调控SLC31A1干预铜死亡。

本研究主要从分子生物学层面出发,验证了CIRI早期针刺介入可以有效调控FDX1、LIAS等关键蛋白的表达水平,维持机体 Cu^{2+} 稳态,进而抑制铜死亡进程,实现缩小脑梗死病灶体积、缓解脑组织损伤程度、发挥神经功能保护作用的效果;尽早针刺介入可能挽救部分缺血半暗带神经元,阻止其向梗死灶转化。研究结果为临床急性IS的诊疗提供了全新作用靶点与思路,也为针刺疗法应用于急性IS临床治疗提供了可靠的实验依据。与此同时,本研究仅围绕铜死亡相关标志性蛋白表达开展检测分析,未从形态学维度深入探究线粒体形态结构与功能改变,因此后续研究中需进一步观察线粒体形态结构、呼吸速率及膜电位变化,系统深入阐明铜死亡在线粒体呼吸功能调控中的作用,以及针刺通过调控铜死亡相关蛋白改善CIRI神经功能的具体分子机制。此外,本研究仅检测DLAT总蛋白表达,未检测脂酰化修饰型DLAT。LIAS通过调控DLAT的脂酰化修饰水平激活蛋白质毒性应激,而非单纯调控DLAT总蛋白丰度,后续研究可采用脂酰化特异性抗体检测脂酰化DLAT,进一步明确电针对脂酰化修饰的调控作用。

利益冲突 所有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] 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.
- [3] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins[J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-1261.
- [4] Zhou J J, Chen L, Li J H, et al. Single-cell multiomics decoding of TCIRG1-mediated cuproptosis circuitry rewiring immune-metabolic landscape in ischemic stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2026, 17(1): 25.
- [5] Wang J, Lv C M, Wei X Y, et al. Molecular mechanisms and therapeutic strategies for ferroptosis and cuproptosis in ischemic stroke[J]. *Brain Behav Immun Health*, 2024, 40: 100837.
- [6] Dreishpoon M B, Bick N R, Petrova B, et al. FDX1 regulates cellular protein lipoylation through direct binding to LIAS[J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(9): 105046.
- [7] Parsanathan R. Copper's dual role: unravelling the link between copper homeostasis, cuproptosis, and cardiovascular diseases[J]. *Hypertens Res*, 2024, 47(5): 1440-1442.
- [8] Das A, Ash D, Fouda A Y, et al. Cysteine oxidation of copper transporter CTR1 drives VEGFR2 signalling and angiogenesis[J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 35-50.
- [9] 尚晓玉, 王海荣, 高莹. 针刺干预脑缺血再灌注损伤的氧化应激机制[J]. *针灸临床杂志*, 2024, 40(11): 97-102.
Shang X Y, Wang H R, Gao Y. Mechanism of oxidative stress in CIRI by acupuncture intervention (in Chinese)[J]. *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 2024, 40(11): 97-102.
- [10] 徐孜鸷, 蒋阳, 张丹, 等. 通督调神针刺对缺血性脑卒中患者神经及运动功能的影响[J/OL]. *中华中医药学刊*, 1-8 [2026-07-17]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20260506.1735.004>.
Xu Ziyi, Jiang Yang, Zhang Dan, et al. Effects of Tongdu Tiaoshen acupuncture on neurological and motor functions in patients with ischemic stroke[J/OL]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 1-8 [2026-07-17]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20260506.1735.004>.
- [11] 翟阳, 高阳, 黎芳, 等. 朱瑾针灸兴奋法对缺血性脑卒中恢复期患者肢体功能及血清氧化应激指标、血管生成因子的影响[J]. *中国针灸*, 2026, 46(6): 861-867.
Zhai Y, Gao Y, Li F, et al. Effects of ZHU Lian's excitation-type acupuncture manipulation on limb function and serum oxidative stress indexes, angiogenic factors in patients with ischemic stroke during the recovery period (in Chinese)[J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2026, 46(6): 861-867.
- [12] 《针刺研究》编辑部. 《针刺研究》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. Review list of welfare ethics of experimental animals in *Acupuncture Research* (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(2): 220.
- [13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] 余曙光, 徐斌. 实验针灸学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社

- 社, 2021: 269.
- Yu S G, Xu B. Experimental acupuncture (in Chinese) [M]. 3rd edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2021: 269.
- [15] Chen J L, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [16] 党超, 卢洁, 宋海庆, 等. 急性脑梗死缺血半暗带临床评估和治疗中国专家共识[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2021, 47(6): 324-335.
- Dang C, Lu J, Song H Q, et al. China expert consensus on clinical evaluation and treatment of ischemic penumbra in acute cerebral infarction (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases*, 2021, 47(6): 324-335.
- [17] 刘悦, 陆彦青, 唐强, 等. 中风(脑卒中)中医康复指南[J]. *中医康复*, 2026, 3(1): 1-10.
- Liu Y, Lu Y Q, Tang Q, et al. Guidelines for traditional Chinese medicine rehabilitation of stroke (cerebrovascular accident) (in Chinese) [J]. *Traditional Chinese Medicine Rehabilitation*, 2026, 3(1): 1-10.
- [18] 程红亮, 胡培佳, 王涛, 等. 张道宗的通督调神针刺法治疗脑病经验[J]. *中国临床保健杂志*, 2015, 18(4): 426-428.
- Cheng H L, Hu P J, Wang T, et al. Zhang Daozong's experience in treating encephalopathy by Tongdu TiaoShen acupuncture (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Clinical Healthcare*, 2015, 18(4): 426-428.
- [19] 仲思潼, 崔杨, 孙忠人, 等. 针灸督脉为主治疗缺血性脑卒中的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2026, 41(2): 539-544.
- Zhong S T, Cui Y, Sun Z R, et al. Research progress of acupuncture and moxibustion on Dumai as the primary approach in the treatment of ischemic stroke (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2026, 41(2): 539-544.
- [20] 王卉, 付颖, 陈明达, 等. 基于“病变于脑, 首取督脉”探讨通督调神针刺联合重复经颅磁刺激对卒中后偏瘫患者康复效果及神经功能的影响[J/OL]. *中华中医药学刊*, 1-8[2026-04-10]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250711.0948.014>.
- Wang H, Fu Y, Chen M D, et al. Discussion on rehabilitation efficacy and neurological function of Tongdu Tiaoshen acupuncture combined with repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with post-stroke hemiplegia based on the theory “Brain lesions should be treated primarily by Governor Vessel” [J/OL]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*: 1-8[2026-04-10]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250711.0948.014>.
- [21] 苏伟, 秦黎虹. “通督调神”针法治疗脑卒中后遗症的研究进展[J]. *广西中医药大学学报*, 2024, 27(4): 66-69.
- Su W, Qin L H. Research progress on the treatment of stroke sequelae with Tongdu Tiaoshen acupuncture technique (in Chinese) [J]. *Journal of Guangxi University of Chinese Medicine*, 2024, 27(4): 66-69.
- [22] Yang L F, Yang P P, Lip G Y H, et al. Copper homeostasis and cuproptosis in cardiovascular disease therapeutics [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44(9): 573-585.
- [23] Zou Y R, Wu S K, Xu X L, et al. Cope with copper: From molecular mechanisms of cuproptosis to copper-related kidney diseases[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 133: 112075.
- [24] Tao F, Lin M X, Meng X, et al. Copper homeostasis and cuproptosis: implications for neurodegenerative diseases [J]. *Front Aging Neurosci*, 2025, 17: 1688554.
- [25] Wang H Y, Yang Y W, Du J. Cuproptosis: the mechanisms of copper-induced cell death and its implication in colorectal cancer [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2025, 398(11): 14737-14749.
- [26] Li P P, Gao Y Y, Liu W. Cuproptosis in stroke: Molecular mechanisms and therapeutic targeting of copper-mediated cell death [J]. *Brain Res Bull*, 2025, 232: 111614.
- [27] 李芊, 肖露波, 罗小精, 等. 针刺“大椎”“百会”“水沟”对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带铜死亡的影响[J]. *针刺研究*, 2025, 50(12): 1396-1403.
- Li Q, Xiao L B, Luo X J, et al. Effect of acupuncture on cuproptosis in the ischemic penumbra of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(12): 1396-1403.
- [28] Guo Q D, Ma M N, Yu H, et al. Dexmedetomidine enables copper homeostasis in cerebral ischemia/reperfusion *via* ferredoxin 1 [J]. *Ann Med*, 2023, 55: 2209735.
- [29] Saudino G, Ciofi-Baffoni S, Banci L. Protein-interaction affinity gradient drives [4Fe - 4S] cluster insertion in human lipoyl synthase [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144(13): 5713-5717.
- [30] Zhao Y, Song Y Y, Chang S Q, et al. Acupuncture inhibits cuproptosis to prolong the time window of thrombolysis by down-regulating cerebral FDX1 and DLAT in rats with cerebral infarction [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(7): 754-762.
- [31] Liu W Q, Lin W R, Yan L, et al. Copper homeostasis and cuproptosis in cancer immunity and therapy [J]. *Immunol Rev*, 2024, 321(1): 211-227.
- [32] 孙梦月, 王圣澎, 樊程程, 等. 基于CTR1/FDX1通路探讨眼针对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞铜死亡的影响[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(13): 2573-2579.
- Sun M Y, Wang S P, Fan C C, et al. Investigating the effect of eye acupuncture on neurocyte cuproptosis in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury based on the CTR1/FDX1 pathway (in Chinese) [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2025, 36(13): 2573-2579.
- [33] Qiu Z M, Liu Q C, Wang L, et al. The copper transporter, SLC31A1, transcriptionally activated by ELF3, imbalances copper homeostasis to exacerbate cisplatin-induced acute kidney injury through mitochondrial dysfunction [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 393: 110943.

收稿日期:2026-04-25 修回日期:2026-06-18