

疏血通注射液通过抑制泛凋亡改善大鼠脑缺血再灌注损伤

理扎·沙布尔江¹, 尚津锋¹, 文胤琰¹, 黄贵金凤¹, 张晓璐¹, 崔一然², 刘欣^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 首都医科大学附属北京中医医院 药学部, 北京 100010

摘要: **目的** 探讨疏血通注射液是否通过抑制泛凋亡减轻大鼠脑缺血再灌注损伤。**方法** 雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组及疏血通注射液高、中、低剂量 (1.08、0.54、0.27 mL/kg) 组和依达拉奉 (1.35 mL/kg) 组, 通过短暂性大脑中动脉闭塞制备脑缺血再灌注损伤大鼠模型, 术后 24 h 进行指标评定及取材。神经功能评分检测神经功能; 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution, TTC) 法检测脑梗死面积; 苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色和尼氏染色观察脑组织形态结构; 透射电镜观察神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞的超微结构; TUNEL 染色检测细胞凋亡率; 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色检测细胞坏死情况; 生化试剂盒检测血清和皮层丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性; ELISA 检测血清和皮层白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 含量; qRT-PCR 和 Western blotting 检测脑组织核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, *NLRP3*)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, *CASP1*)、消皮素 D (gasdermin D, *GSDMD*)、*CASP8*、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)、*Bcl-2* 相关 X 蛋白 (*Bcl-2* associated X protein, *Bax*)、受体相互作用丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (receptor interacting serine/threonine kinase 1, *RIPK1*)、*RIPK3*、混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, *MLKL*)、Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, *TLR2*)、*TLR4* 的 mRNA 和蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 疏血通注射液高剂量组大鼠神经功能评分和脑梗死率显著降低 ($P < 0.01$), 脑组织病理学改变减轻; 神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞体积减少, 细胞肿胀情况减轻, 细胞膜破裂减少, 细胞凋亡率和坏死率显著降低 ($P < 0.01$); 大鼠血清和皮层中 MDA、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.01$), GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$); 皮层中 *Bcl-2* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), *NLRP3*、*CASP1*、*GSDMD*、*CASP8*、*Bax*、*RIPK1*、*RIPK3*、*MLKL*、*TLR2*、*TLR4* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 疏血通注射液可能通过抑制泛凋亡, 减轻大鼠脑缺血再灌注损伤。

关键词: 脑缺血再灌注损伤; 疏血通注射液; 泛凋亡; 氧化应激; 炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)18-6238-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.013

Shuxuetong Injection alleviates cerebral ischemia reperfusion injury via inhibiting PANoptosis in rats

LIZHA Shabuerjiang¹, SHANG Jinfeng¹, WEN Yinlian¹, HUANG Guijinfeng¹, ZHANG Xiaolu¹, CUI Yiran², LIU Xin¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Department of Pharmacy, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China

Abstract: Objective To investigate whether Shuxuetong Injection (疏血通注射液) can alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting PANoptosis. **Methods** Male SD rats were randomly divided into sham group, model group, Shuxuetong Injection high-, medium-, low-dose (1.08, 0.54, 0.27 mL/kg) groups and edaravone (1.35 mL/kg) group. A rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury was prepared by transient middle cerebral artery occlusion, and indicators were evaluated and samples

收稿日期: 2024-05-11

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82003960)

作者简介: 理扎·沙布尔江, 硕士研究生, 从事脑缺血作用特点及药物干预研究。Tel: (010)53912127 E-mail: lizasha@163.com

*通信作者: 刘欣, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事脑缺血作用特点及药物干预研究。Tel: (010)53912127 E-mail: liuxin1011@bucm.edu.cn

were taken 24 h after surgery. Nerve function score was used to detect nerve function. The cerebral infarction area was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (TTC). The morphological structure of brain tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining. The ultrastructure of neurons, microglia and astrocytes were observed by transmission electron microscopy. TUNEL staining was used to detect apoptosis rate. Propidium iodide (PI) staining was used to detect cell necrosis. Content of malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in serum and cortex were detected by biochemical reagent kits. Contents of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and cortex were detected by ELISA. The mRNA and protein expressions of NOD-like receptor protein 3 (*NLRP3*), cystein-aspartate protease-1 (*CASP1*), gasdermin D (*GSDMD*), *CASP8*, B-cell lymphoma-2 (*Bcl-2*), Bcl-2 associated X protein (*Bax*), receptor interacting serine/threonine kinase 1 (*RIPK1*), *RIPK3*, mixed lineage kinase domain-like protein (*MLKL*), Toll-like receptor 2 (*TLR2*) and *TLR4* in brain tissue were detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results** Compared with model group, the neurological function score and cerebral infarction rate of rats in Shuxuetong Injection high-dose group were significantly decreased ($P < 0.01$), and pathological changes in brain tissue was reduced. The volume of neurons, microglia and astrocytes were decreased, the swelling of cells was decreased, the rupture of cell membranes was decreased, and the rates of apoptosis and necrosis were significantly decreased ($P < 0.01$). The levels of MDA, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum and cortex of rats were significantly reduced ($P < 0.01$), while the activity of GSH-Px was significantly increased ($P < 0.01$). The mRNA and protein expression levels of *Bcl-2* in cortex were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), while the mRNA and protein expression levels of *NLRP3*, *CASP1*, *GSDMD*, *CASP8*, *Bax*, *RIPK1*, *RIPK3*, *MLKL*, *TLR2*, *TLR4* were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Shuxuetong Injection may alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting PANoptosis.

Key words: cerebral ischemia reperfusion injury; Shuxuetong Injection; PANoptosis; oxidative stress; inflammation

脑卒中是全球第二大死亡原因和第三大致残原因，也是导致痴呆的主要原因^[1]。临床上采取静脉溶栓、机械取栓、促进侧支循环建立等治疗方式促进神经和血管新生。然而恢复血流灌注的同时也可能引起再灌注期的继发性损伤，这一系列过程统称为脑缺血再灌注损伤（cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI）^[2]。在 CIRI 中，焦亡、凋亡、坏死性凋亡 3 种细胞死亡方式同时出现、相互作用，与先天免疫反应及炎症反应密切相关^[3]。最近有研究发现了一种新发现的促炎程序性细胞死亡途径并命名为泛凋亡（PANoptosis），这种新形式的细胞死亡包括焦亡、凋亡和坏死性凋亡^[4]。而抑制焦亡等细胞死亡能够保护神经，改善 CIRI^[5]。

中医认为风、火、痰、瘀、气虚、阴虚是缺血性卒中的常见证候要素，血瘀证是缺血性卒中的核心病机，贯穿疾病始终^[6]。根据中药药性和功效的特点，疏血通注射液为破血逐瘀代表，选择水蛭和地龙 2 味虫类药物，有效针对血瘀、经脉不通的病机^[7]。根据现代临床和实验研究，疏血通注射液具有抗炎、促进溶栓、抑制脑部神经凋亡、保护血管内皮细胞、促血管再生增加脑供血等药理作用，能够有效对抗脑部缺血性疾病^[8]。因此，基于体内实验，本研究以泛凋亡为切入点，验证疏血通注射液是否通过抑制泛凋亡发挥对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只，7~8 周龄，体质量 220~240 g，购自北京斯贝福生物技术有限公司，实验动物许可证号 SYXK（京）2019-0008。所有动物饲养于北京中医药大学动物房，于温度 22~25℃、相对湿度 50%~60%、12 h 明暗交替环境中适应 3 d 后开始实验。动物实验经北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会批准（批准号 BUCM-2023060803-2157）。

1.2 药品与试剂

疏血通注射液（批号 22112702）购自牡丹江友搏药业；氯化钠注射液（批号 2301132006）购自石家庄四药有限公司；依达拉奉注射液（批号 80-220801）购自先声药业有限公司；4%多聚甲醛通用型组织固定液（批号 22242687）购自 Biosharp 公司；2,3,5-三苯基氯化四氮唑（2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution, TTC）染液（批号 01223Z031）、苏木素-伊红（hematoxylin eosin, HE）染色试剂盒（批号 20230112）、尼氏染色试剂盒（批号 20230119）、大鼠白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）ELISA 试剂盒（批号 2401002）、大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒（批号 2401003）、大鼠肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）ELISA 试剂盒（批号 2401003）、鼠二抗（批号

20221213) 购自北京索莱宝科技有限公司; 电镜固定液 (批号 G1102) 购自 Servicebio 公司; 812 包埋剂 (批号 90529-77-4) 购自 SPI 公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 021023230413) 购自碧云天生物技术研究所; 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色试剂盒 (批号 20221020) 购自上海歌凡生物科技有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒 (批号 20230206)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 测定试剂盒 (批号 202301111) 购自南京建成生物工程研究所; qRT-PCR 引物购自上海生工生物工程有限公司; 染料法荧光定量预混试剂 (批号 Q30716)、单链合成试剂盒 (批号 Q11122) 购自北京全式金生物技术有限公司; RNA 提取试剂盒 (批号 017E2251GA) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 抗体 (批号 NBP2-12446SS1-4) 购自 Novus 公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, CASP1) 抗体 (批号 BB05302008)、受体相互作用丝氨酸/苏氨酸激酶 3 (receptor interacting serine/threonine kinase 3, RIPK3) 抗体 (批号 BB06177870) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 抗体 (批号 00115599)、CASP8 抗体 (批号 10011347)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 00118140)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 10005017)、混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 抗体 (批号 10027049)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 抗体 (批号 10005089)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 10028230)、兔二抗 (批号 20000486) 购自 Proteintech 公司; RIPK1 抗体 (批号 GR3455727-2) 购自 Abcam 公司; TLR2 抗体 (批号 10q2471) 购自 Affinity 公司。

1.3 仪器

ASP200S 型全自动脱水机、RM2235 型石蜡切片机、G1150 H 型加热石蜡包埋系统、DM3000 型显微镜、UC7 型超薄切片机、DM3000 型正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); Epoch2 型酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); Ultra 45° 钻石切片刀 (瑞士 Daitome 公司); HT7800/HT7700 型透射电子显微镜 (日本

Hitachi 公司); CFX96 Optics Module 型 qRT-PCR 仪、ChemiDoc MP imaging system 化学发光成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模

采用改良的 Longa 线栓法制备短暂性大脑中动脉闭塞 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 模型^[9]。大鼠禁食不禁水 12 h 后, ip 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) 麻醉, 仰卧位固定。沿大鼠颈部中线剪开, 钝性分离出颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。暂时夹闭颈外动脉, 将线栓由颈总动脉的剪口处插入到颈内动脉, 进而堵塞大脑中动脉。整个手术过程在 10 min 内完成, 过程中大鼠直肠温度保持在 (37.0±0.5) °C。堵塞 2 h 后, 拔出线栓, 恢复血流 22 h。除假手术组外, 其余大鼠均造模。缺血再灌注 24 h 后取大鼠患侧大脑皮层组织并检测各项指标。

2.2 分组与给药

对 72 只大鼠进行编号, 并随机分为假手术组、模型组及疏血通注射液高、中、低剂量 (1.08、0.54、0.27 mL/kg) 组和依达拉奉 (1.35 mL/kg) 组, 每组 12 只。本课题组前期研究已确定 1.35 mL/kg 为依达拉奉注射液的最佳给药剂量^[10]。于插入线栓 15 min 后通过尾 iv 给药, 假手术组和模型组注射等体积的生理盐水。设置阳性对照药依达拉奉组, 根据神经功能评分、脑梗死率、病理染色结果评价疏血通注射液对 tMCAO 大鼠的药效, 筛选出疏血通注射液治疗脑缺血再灌注损伤大鼠的最佳给药剂量, 后续仅选择假手术组、模型组和疏血通注射液高剂量组进行机制研究。

2.3 神经功能评分评价神经功能

采用 Longa 评分法, 于造模 24 h 后对各组大鼠的神经功能损伤程度进行评价。0 分: 正常, 无神经功能损伤; 1 分: 患侧前爪不能完全伸展, 轻度神经功能缺损; 2 分: 行走时大鼠向患侧转圈, 中度神经功能缺损; 3 分: 行走时大鼠身体向患侧倾倒, 重度神经功能缺损; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。评分范围为 0~4 分, 评分越高, 神经功能损伤越严重。

2.4 TTC 法测定脑梗死率

造模 24 h 后处死大鼠, 取全脑做 2 mm 冠状切片均匀切成 5 片, 将取得的脑切片放入 2% TTC 置于深色盒子染色, 置于 4% 多聚甲醛内固定后整齐

排列,扫描脑片正反面。红区为非梗死区,白区为梗死区,计算脑梗死率。

脑梗死率=梗死面积/脑总面积

2.5 HE 染色观察皮层缺血区病理改变

取材后用多聚甲醛迅速固定,脱钙脱水、石蜡包埋、切片铺片,石蜡切片烘烤、脱蜡和水化,按照步骤进行 HE 染色,脱水封片后于显微镜下观察皮层缺血区病理形态学改变。

2.6 尼氏染色观察皮层缺血区尼氏体数量

取材后用多聚甲醛迅速固定,脱钙脱水、石蜡包埋、切片铺片,石蜡切片烘烤、脱蜡和水化,按照步骤进行尼氏染色,脱水封片后于显微镜下观察皮层缺血区尼氏体数量。

2.7 透射电镜观察神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞的超微结构

取大鼠患侧皮层部位 1 mm³,经固定、室温脱水、渗透包埋、聚合、超薄切片、染色,于透射电子显微镜下观察皮层缺血区神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞整体形态和结构,采集图像。

2.8 TUNEL 染色检测皮层缺血区细胞凋亡率

造模 24 h 后取患侧皮层组织,用多聚甲醛迅速固定,石蜡包埋后,将石蜡切片脱蜡至水,进行 TUNEL 染色,脱水、透明、封片后于荧光显微镜下观察并拍照皮层缺血区。凋亡细胞被标记为绿色荧光(TUNEL),全部细胞核均被标记为蓝色荧光(DAPI)。采用 Image J 1.8 软件计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数

2.9 PI 染色检测皮层缺血区细胞坏死情况

取材后迅速用多聚甲醛迅速固定,石蜡包埋后,将石蜡切片脱蜡至水,进行 PI 染色,脱水、透明、封片后于荧光显微镜下观察并拍照皮层缺血区。坏

死细胞被标记为红色荧光,采用 Image J 1.8 软件计算荧光强度。

2.10 生化试剂盒检测血清和皮层 MDA 含量和 GSH-Px 活性

造模 24 h 后腹主动脉取血,静置 3 h 后,3 000 r/min 离心 15 min,离心半径为 10 cm,取上清液为血清。取皮层缺血区组织制备 10%生理盐水匀浆。按照试剂盒说明书检测各组大鼠血清和皮层 MDA 含量和 GSH-Px 活性。

2.11 ELISA 检测血清和皮层 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量

造模 24 h 后腹主动脉取血,室温血液自然凝固 30 min 后,4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min,离心半径为 10 cm,取上清液为血清。取皮层缺血区组织制备 10%生理盐水匀浆。按照试剂盒说明书检测各组大鼠血清和皮层 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量。

2.12 qRT-PCR 检测皮层相关靶点 mRNA 表达

根据文献研究,焦亡相关靶点(NLRP3、CASP1、GSDMD)及凋亡相关靶点(CASP8、Bax、Bcl-2)和坏死性凋亡相关靶点(RIPK1、RIPK3、MLKL、TLR2、TLR4)均需检测 mRNA 和蛋白相对表达量^[1]。根据 RNA 提取试剂盒说明提取皮层缺血区组织总 RNA,测定浓度和纯度,以 A₂₆₀/A₂₈₀ 数值在 1.8~2.0。参照说明书合成第一链 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 分析,体系 20 μ L,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,94 $^{\circ}$ C 变性 5 s,50~60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,按 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 NLRP3、CASP1、GSDMD、CASP8、Bax、Bcl-2、RIPK1、RIPK3、MLKL、TLR2、TLR4 的 mRNA 相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	正向序列 (5'-3')	反向序列 (5'-3')	长度/bp
NLRP3	TGATGAGTGTTGCTGCAAG	GGATCGGAACACAGCCTTTC	117
CASP1	GTTTTGCCCTTTAGAAATAGCC	ACTCTCCGAGAAAGATGTTG	101
GSDMD	GCAACTTCCAAGTCTCCGATG	CCACCAGAAATTTCCCTTGTC	88
CASP8	ATAACTTCCAGAAAGCGGTG	TTTCACAGTAGCCATCCCC	128
Bax	CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC	ATCCTCTGCAGCTCCATGTT	76
Bcl-2	ATGCCTTTGTGGAAGTATATGGC	GGTATGCACCCAGAGTGATGC	93
RIPK1	TAGTTCTCGTGTTCAGATTGGA	TTTATCAGTCAGGCTAGTGG	139
RIPK3	CTCTCCTCTGTCGCCTGCTA	GGACAGGCCAAAGTCTGCTA	115
MLKL	ACTGAGCACGATTTATAGAGGA	GAGCCTCACTATTCCAACAC	97
TLR2	GCCCAGATGGCCACAGGACTCAAGA	GTTACACAGGCTCGCAAGTCACCA	94
TLR4	CGCTTTCAGCTTTGCCTTAA	CTCCAGAAGATGTGCCTCCC	108
GAPDH	AAGATGGTGAAGGTCGGTGT	GATCTCTGGAAGATG	73

2.13 Western blotting 检测皮层相关靶点蛋白表达

取材后, 将大鼠皮层缺血区组织用蛋白提取试剂提取蛋白, 离心取上清液, 测定蛋白质浓度, 上样、电泳、转膜、封闭、洗膜后, 用非标记一抗及二抗对其进行孵育, 加入增强型化学高敏发光液, 采用化学发光成像仪检测。以 GAPDH 为内参, 用 Image Lab 软件计算 NLRP3、CASP1、GSDMD-N、CASP8、Bax、Bcl-2、RIPK1、RIPK3、MLKL、TLR2、TLR4 的蛋白相对表达量。

2.14 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。若组间数据符合正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析进行多组间数据比较, 事后多重比较采用最小显著性差异法 LSD-*t* 检验。若不符合正态分布或方差不齐 (如神经功能评分资料), 采用非参数检验。

3 结果

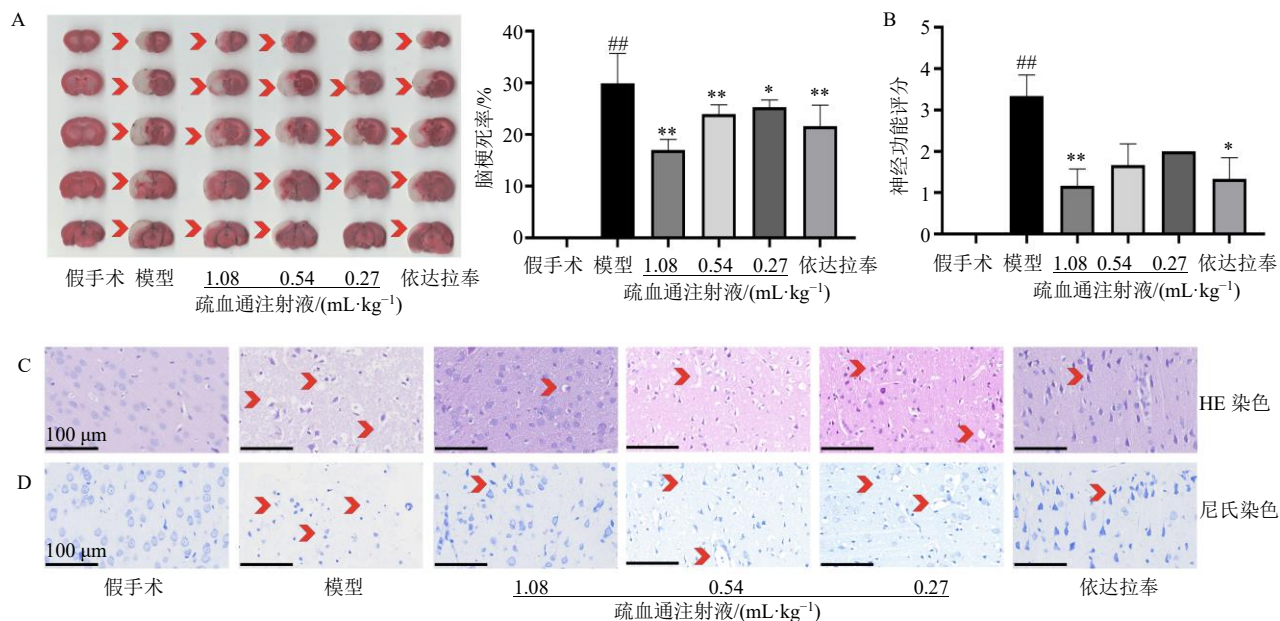
3.1 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠脑梗死率、神经功能评分和皮层缺血区病理变化的影响

如图 1-A、B 所示, 假手术组大鼠的脑梗死率为 0, 神经功能评分为 0 分, 无脑损伤和神经功能障碍; 与假手术组比较, 模型组大鼠的脑梗死率显

著升高 ($P < 0.01$), 神经功能评分显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠的脑梗死率均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 疏血通注射液高剂量组和依达拉奉组神经功能评分显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 1-C 所示, 假手术组大鼠皮层神经细胞的形态结构正常, 尼氏体数量很多, 神经元丰富。模型组大鼠皮层神经元出现细胞核固缩、空泡样改变等病理变化, 尼氏体数量减少, 神经元数量减少。与模型组比较, 疏血通注射液给药组和依达拉奉组皮层正常神经细胞增多, 细胞损伤程度较低, 尼氏体数量增多, 神经元病理损伤现象减少。根据脑梗死率、神经功能评分和皮层缺血区组织染色, 疏血通注射液高剂量组药效最好, 1.08 mL/kg 为疏血通注射液的最佳给药剂量, 因此后续机制验证均以此剂量为依据开展。

3.2 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠皮层中神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞的影响

如图 2 所示, 假手术组大鼠神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞结构清晰, 神经元细胞核呈圆形或椭圆形, 染色质均匀分布, 可见明显的核仁, 胞质内线粒体、粗面内质网结构清晰, 核糖体丰富; 小胶质细胞体积正常, 无肿胀现象, 溶酶体数量少;



红色箭头表示病理损伤部位; 与假手术组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$, 下同。

Red arrow indicates location of pathological injury; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ vs sham group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠脑梗死率 (A)、神经功能评分 (B) 和皮层缺血区病理变化 (C, D, $\times 400$) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of Shuixuetong Injection on cerebral infarction rate (A), neurological deficit score (B) and pathological changes in cortical ischemic zone (C, D, $\times 400$) of tMCAO rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

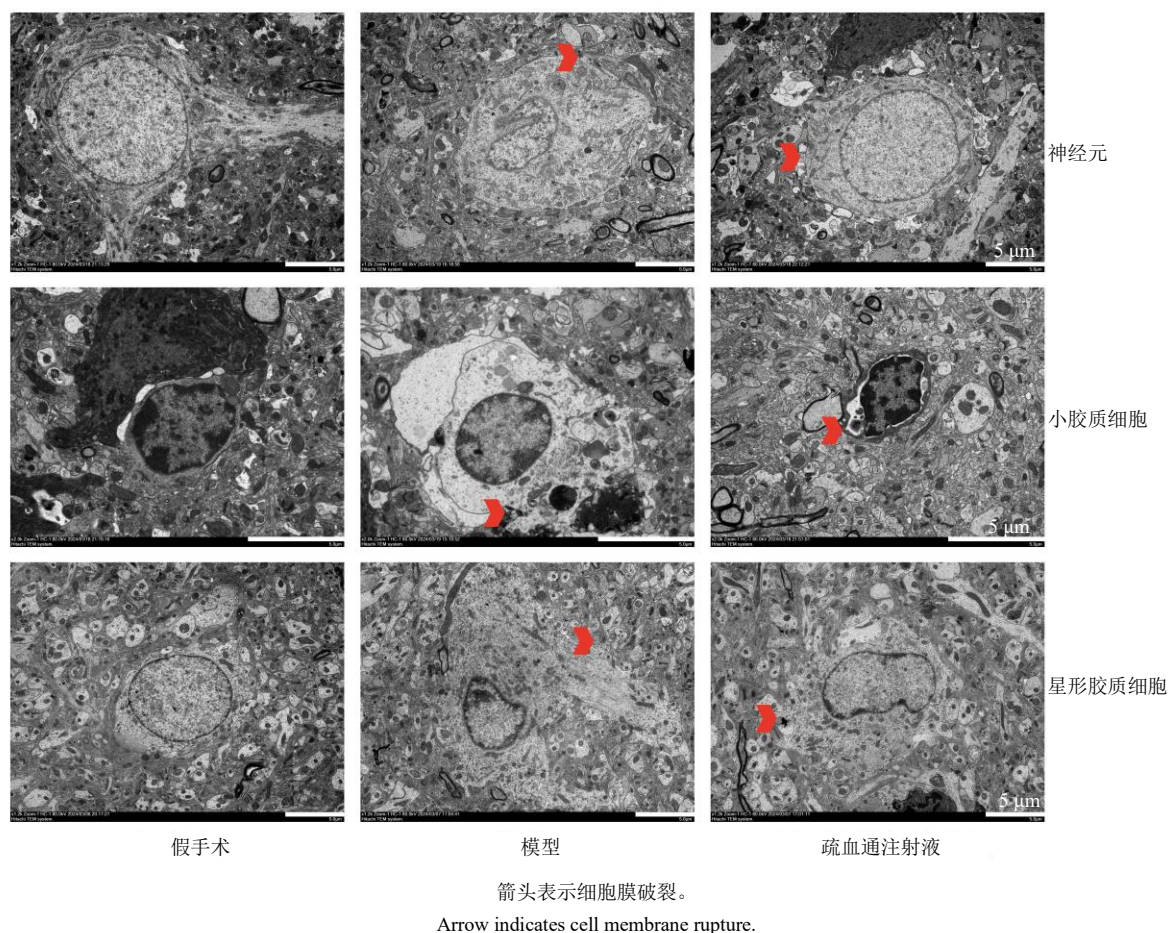


图 2 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠皮层中神经元 ($\times 1\,200$)、小胶质细胞 ($\times 2\,000$) 和星形胶质细胞 ($\times 1\,200$) 的影响
Fig. 2 Effect of Shuxuetong Injection on neurons ($\times 1\,200$), microglia ($\times 2\,000$) and astrocytes ($\times 1\,200$) in cortex of tMCAO rats

星形胶质细胞体积正常, 无明显病理损伤。模型组神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞整体肿胀, 细胞膜明显破裂, 细胞核形状不规则, 染色质凝聚成块, 核周间隙明显增厚, 线粒体空泡化。其中, 小胶质细胞溶酶体数量增加, 且出现聚集现象, 小胶质细胞和星形胶质细胞肿胀更为明显, 且细胞膜明显破裂, 内容物流出, 说明发生炎症反应。与模型组相比, 疏血通注射液高剂量组大鼠的神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞体积减少, 细胞肿胀情况减轻, 细胞膜破裂减少。

3.3 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠皮层细胞凋亡和坏死情况的影响

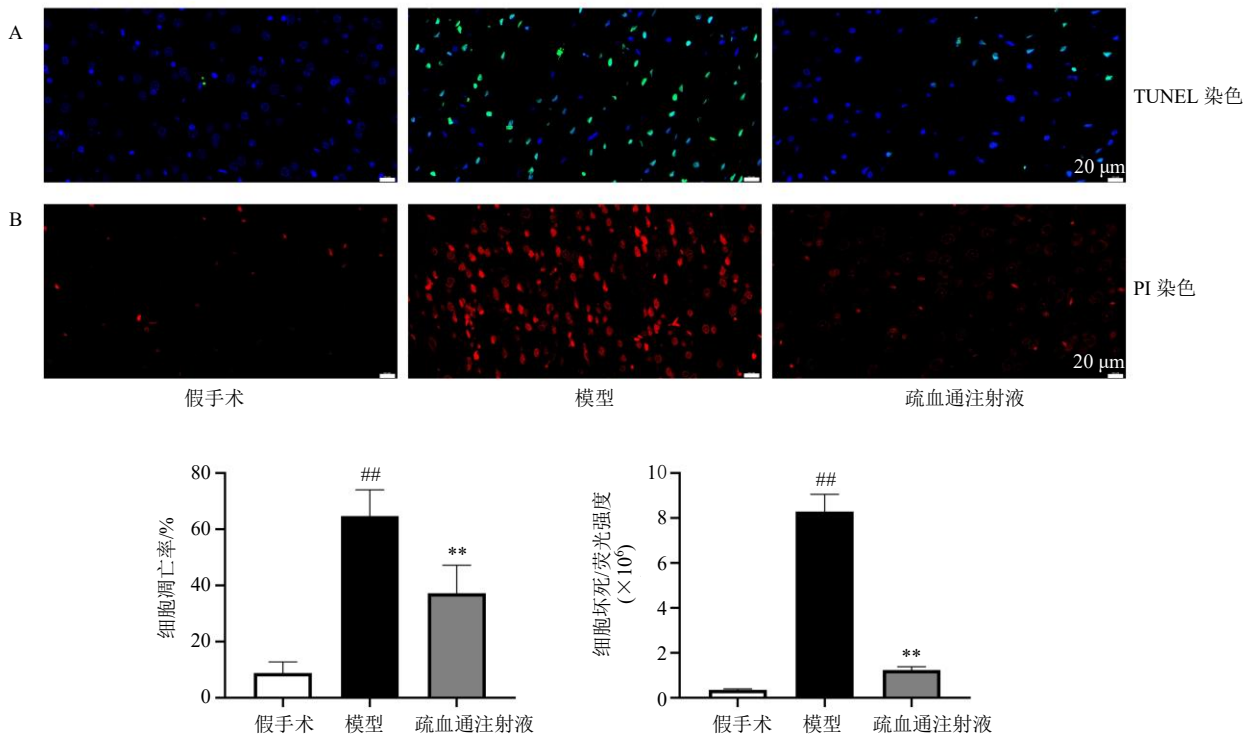
如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠大脑皮层部位的细胞凋亡率和坏死率显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 疏血通注射液高剂量组大鼠大脑皮层部位的细胞凋亡率和坏死率显著降低 ($P < 0.01$)。表明疏血通注射液能够通过减少细胞凋亡和坏死性凋亡改善 tMCAO 大鼠损伤。

3.4 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠血清和皮层氧化应激指标和炎症因子含量的影响

焦亡与炎症反应关系密切, 坏死性凋亡与氧化应激存在联系, 故检测氧化应激指标和炎症因子含量^[12]。如图 4 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清和皮层中 MDA、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.01$), GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 与模型组比较, 疏血通注射液高剂量组大鼠血清和皮层中 MDA、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.01$), GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$)。表明疏血通注射液能够通过降低 MDA、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量, 提高 GSH-Px 活性从而改善大鼠脑缺血再灌注损伤。

3.5 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠皮层泛凋亡相关靶点 mRNA 表达的影响

如图 5 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠皮层组织 NLRP3、CASP1、GSDMD、CASP8、Bax、RIPK1、RIPK3、MLKL、TLR2、TLR4 mRNA 表达



蓝色荧光代表细胞核, 绿色荧光代表凋亡细胞, 红色荧光代表坏死细胞。

Blue fluorescence represents nucleus, green fluorescence represents apoptotic cells, and red fluorescence represents necrotic cells.

图 3 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠皮层细胞凋亡 (A) 和坏死 (B) 情况的影响 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Shuxuetong Injection on apoptosis (A) and necrosis (B) in cortex of tMCAO rats (×400; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

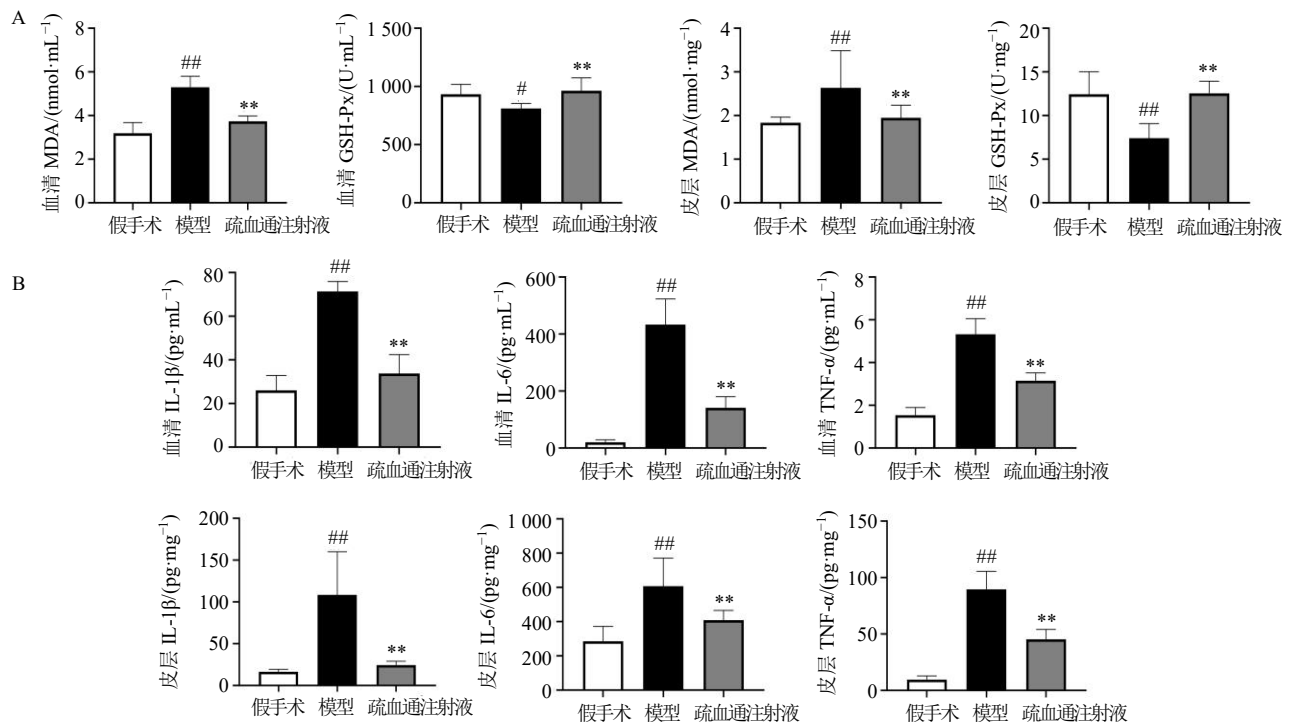


图 4 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠血清和皮层氧化应激指标 (A) 和炎症因子 (B) 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of Shuxuetong Injection on contents of oxidative stress indicators (A) and inflammatory factors (B) in serum and cortex of tMCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

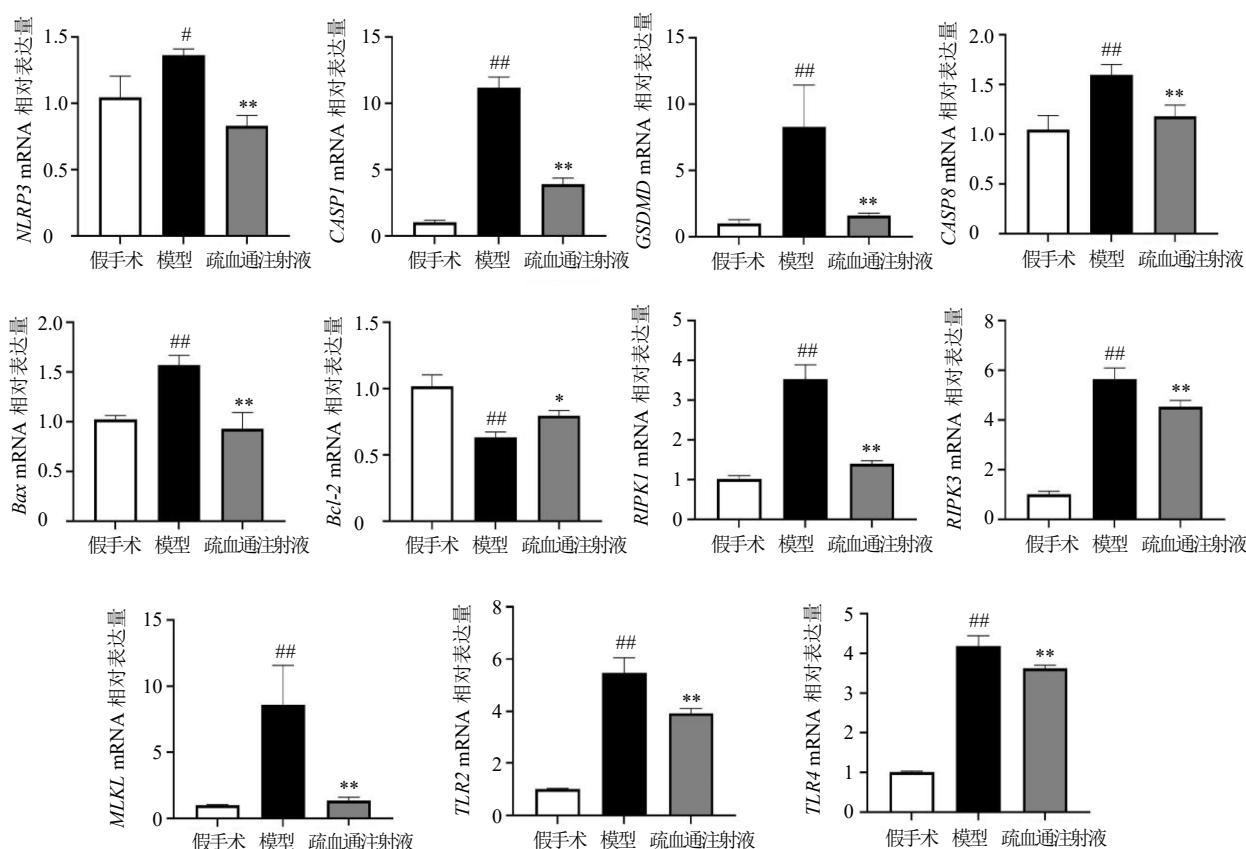


图 5 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠皮层泛凋亡相关靶点 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Shuxuetong Injection on mRNA expressions of PANoptosis-associated targets in cortex of tMCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), *Bcl-2* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 疏血通注射液高剂量组 *NLRP3*、*CASP1*、*GSDMD*、*CASP8*、*Bax*、*RIPK1*、*RIPK3*、*MLKL*、*TLR2*、*TLR4* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), *Bcl-2* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.6 疏血通注射液对 tMCAO 大鼠皮层泛凋亡相关靶点蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠皮层组织 *Bcl-2* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), *NLRP3*、*CASP1*、*GSDMD-N*、*CASP8*、*Bax*、*RIPK1*、*RIPK3*、*MLKL*、*TLR2*、*TLR4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 疏血通注射液高剂量组大鼠皮层组织 *Bcl-2* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), *NLRP3*、*CASP1*、*GSDMD-N*、*CASP8*、*Bax*、*RIPK1*、*RIPK3*、*MLKL*、*TLR2*、*TLR4* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

缺血性脑卒中发病机制较为复杂, 目前研究多

认为与血液内成分改变、血流动力学改变及血管病变有关; 缺血性脑梗死具有高度的时间相关性, 治疗方式主要以溶栓治疗、脑神经元保护、抗凝、抗血小板聚集和降纤治疗等对症治疗为主, 其高发病率、高致残率、高死亡率一直是临床治疗当中不可忽视的重点难点^[13]。既往研究表明, CIRI 涉及氧化应激、炎症反应等机制, 伴随坏死、凋亡、焦亡等多种细胞死亡形式^[14]。在 CIRI 中, 焦亡、凋亡、坏死性凋亡 3 种细胞死亡方式同时出现、相互作用, 与先天免疫反应及炎症反应密切相关^[15-17]。基于一系列研究, Zheng 等^[18]报告一种新发现的促炎程序性细胞死亡途径称为泛凋亡, 由最近发现的名为 PAN 凋亡小体的细胞质多聚体蛋白复合物控制。而这种新形式的细胞死亡包括焦亡、细胞凋亡和坏死性凋亡。现有研究表明, 泛凋亡导致自身炎症、神经炎症和代谢炎症, 在全身引起广泛的影响^[19]。目前, 泛凋亡的研究主要集中在细菌或病毒感染以及肿瘤等领域, 在缺血性卒中中研究较少。不过, 根据现有的药理学实验证据, 许多中枢神经系统疾病

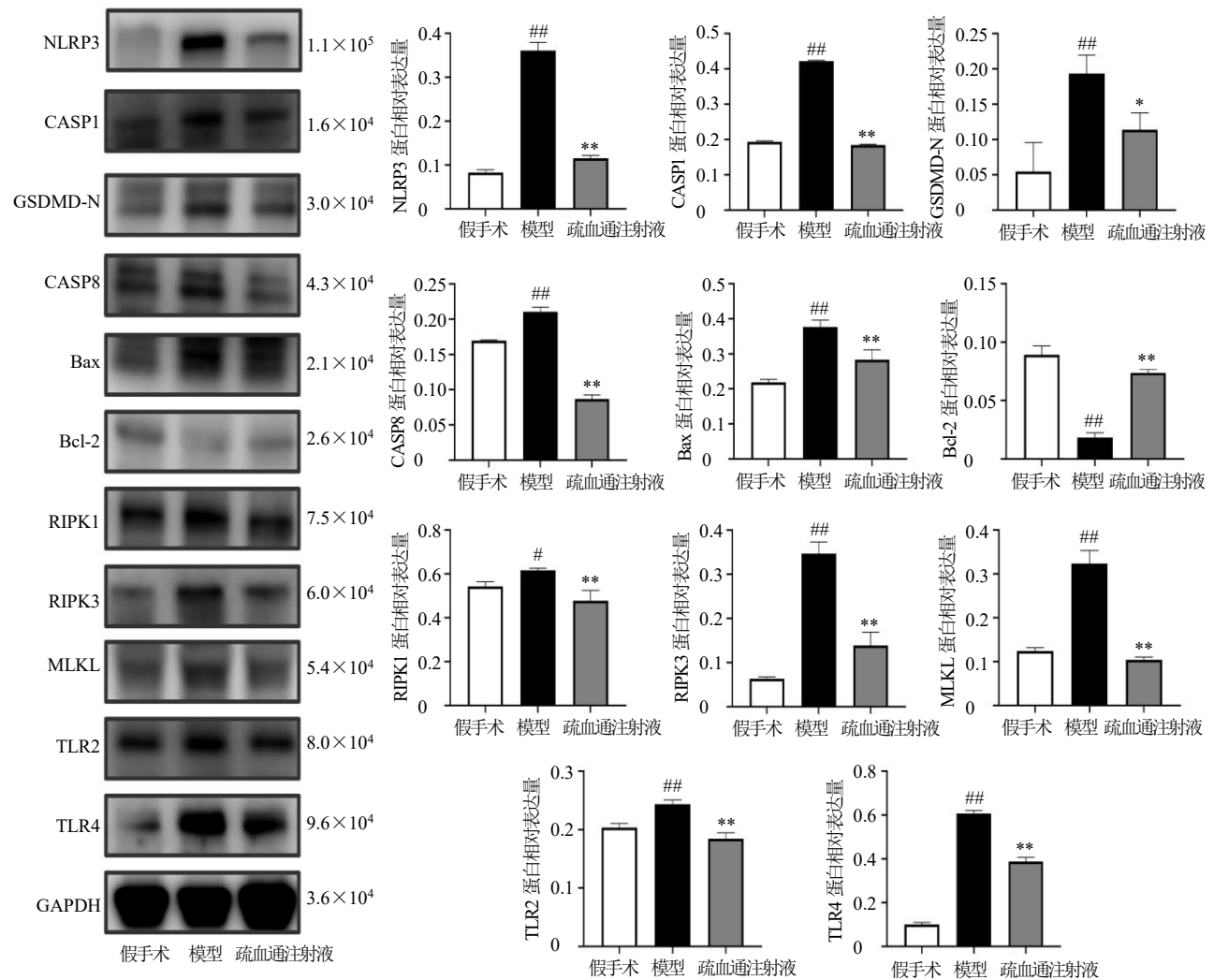


图 6 疏血通注射液对脑缺血大鼠皮层泛凋亡相关靶点蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Shuxuetong Injection on protein expressions of PANoptosis-associated targets in cortex of tMCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

涉及神经细胞的死亡，这些细胞死亡以及与炎症反应与 PANoptosis 研究中的表型和机制相似，说明脑缺血等神经性疾病可能存在泛凋亡^[12]。

中医理论中，卒中后风、火、痰、瘀夹杂，瘀血及痰浊内阻脑络，气血运行不畅，蕴结壅积，日久酿生浊毒，败坏脑髓形体，损伤脑络^[20]。疏血通注射液主要成分为水蛭和地龙 2 味虫类中药。现代药理学研究表明，水蛭的主要活性成分为水蛭素，属强效的特异性凝血酶抑制剂，具有抑制凝血酶的作用；地龙的主要活性成分为蚓激酶，具有纤溶活性，能够抑制血管损伤部位的血液凝固，阻止附壁血栓的形成，还能够改善脑部血液循环，增加脑部血液供应，成为破血逐瘀代表方，有效针对血瘀、经脉不通的病机。根据现代临床和实验研究，疏血

通注射液具有抗炎、促进溶栓、抑制脑部神经凋亡、保护血管内皮细胞、促血管再生增加脑供血等药理作用，能够有效对抗脑部缺血性疾病^[8,21]。本研究利用大鼠 tMCAO 模型，以 24 h 为时间节点，利用 TTC 染色、神经功能评分、HE 染色和尼氏染色，观察疏血通注射液对脑缺血再灌注损伤的改善作用。本研究结果显示，疏血通注射液可以显著降低大鼠脑梗死率，提高神经功能评分，降低细胞损伤程度和减少神经元病理损伤。根据药效结果，高剂量的疏血通注射液效果更明显，可能与高剂量的水蛭、地龙破血逐瘀能力更强有关。

CIRI 中各种细胞死亡方式之间存在相互作用，共同促进疾病的发生和发展。细胞凋亡和坏死性凋亡是 CIRI 常见的细胞死亡方式，细胞凋亡不涉及

炎症反应,会出现细胞收缩、核膜破裂、凋亡小体形成等细胞凋亡特征,而坏死性凋亡被认为是一种引发炎症的细胞死亡。会表现细胞膜破裂,细胞体积变大,无凋亡小体出现等特征^[22]。在 CIRI 初期,优先发生血管损伤,内皮细胞中会迅速激活坏死性凋亡,而神经元也会表现出坏死性凋亡的早期激活,坏死性凋亡的激活会促进细胞凋亡的发生^[23]。此外,细胞凋亡可在 CASP 抑制下转变为坏死性凋亡^[24]。多项研究表明,抑制凋亡和坏死性凋亡可以在 CIRI 后实现神经保护作用,如减少脑梗死体积和改善运动功能^[25]。因此,抑制焦亡、凋亡、坏死性凋亡是治疗 CIRI 的重要方法。本研究通过透射电镜观察神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞的超微结构发现,疏血通注射液给药后大鼠的神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞体积减少,细胞肿胀情况减轻,细胞膜破裂减少,表明疏血通注射液减少 CIRI 大鼠炎症因子风暴。

细胞焦亡涉及由 CASP1 介导的经典信号通路和由 CASP4、CASP5、CASP11 介导的非经典信号通路^[26]。活化的 CASP1 还可以裂解 IL-1 β 和 IL-18 前体,促进 IL-1 β 和 IL-18 的释放,介导细胞焦亡^[27]。非经典的焦亡炎症小体通路也称为非 CASP1 依赖性细胞死亡,主要由 CASP4、CASP5、CASP11 介导。CASP4、CASP5、CASP11 激活后,GSDMD 的裂解引起细胞焦亡,或 Pannexin-1 通道在刺激下打开,三磷酸腺苷的释放导致离子失衡,然后启动细胞焦亡过程^[28]。本研究通过生化试剂盒检测血清 MDA 含量和 GSH-Px 活性,ELISA 检测血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量,结果显示疏血通注射液组大鼠血清的 MDA、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著降低,GSH-Px 活性显著升高。由此说明,疏血通注射液通过降低 MDA、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量、提高抗氧化酶活性从而改善大鼠脑缺血再灌注损伤。并通过 qRT-PCR、Western blotting 检测 NLRP3、CASP1、GSDMD 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果显示疏血通注射液组大鼠皮层组织 NLRP3、CASP1、GSDMD 的 mRNA 表达和 NLRP3、CASP1、GSDMD-N 的蛋白表达水平显著降低,提示疏血通注射液能够通过抑制以上靶点表达发挥抗炎、抗焦亡的药理作用。

细胞凋亡有内源性细胞凋亡、外源性细胞凋亡和内质网应激 3 种方式。内源性细胞凋亡途径也称为线粒体凋亡途径。刺激后,线粒体的外膜被渗透,

从而促进细胞色素 C 的释放。细胞色素 C 激活 CASP9,然后激活 CASP3、CASP6、CASP7,导致细胞凋亡。线粒体细胞凋亡的起始还受 Bcl-2 家族蛋白的调节。外源性细胞凋亡途径主要由受体和配体的相互作用介导,以传递细胞凋亡信号。受体通过其 Fas 结合蛋白与通过死亡结构域关联的新型死亡结构域或肿瘤坏死因子受体 1 与 CASP8 结合,然后激活 CASP8,进一步激活 CASP3、CASP6、CASP7 诱导细胞凋亡^[29]。CASP8 引发的外源途径会活化细胞凋亡的关键介质 CASP3,从而影响凋亡内源途径^[30]。研究显示,GSDMD 透化线粒体膜,释放细胞色素 C 并激活细胞凋亡体^[31]。在细胞色素 C 的释放过程中,促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 相互对抗,调节凋亡^[32]。本研究通过 TUNEL 染色检测细胞凋亡率,qRT-PCR、Western blotting 检测 CASP8、Bax、Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达情况,结果显示疏血通注射液组大鼠细胞凋亡率显著降低,皮层组织 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达量显著增高,CASP8、Bax 的 mRNA 和蛋白表达量显著降低。提示疏血通注射液通过调控 CASP8、Bax、Bcl-2 发挥抗细胞凋亡的药理作用。

坏死性凋亡受 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 调节。RIPK1 和 RIPK3 结合形成坏死体的复合物,可以诱导 RIPK3 自动磷酸化。然后 RIPK3 磷酸化 MLKL 蛋白,诱导 MLKL 低聚物的形成和易位到细胞膜,导致破裂并最终破坏细胞^[33-34]。同时,坏死性凋亡还受到 TLR 家族的调控^[34]。本研究通过 PI 染色检测细胞坏死情况,发现疏血通注射液可以减少细胞坏死。分子生物学结果显示疏血通注射液通过抑制 RIPK1、RIPK3、MLKL、TLR2、TLR4 发挥抗细胞坏死性凋亡的药理作用。根据以往研究和本研究结果发现,脑缺血再灌注损伤诱发氧化应激和炎症反应,在这一过程中促进活性氧和免疫分泌因子的过量增加,进而促进神经元发生焦亡、凋亡和坏死性凋亡^[3]。这 3 种细胞死亡方式互相影响,导致泛凋亡出现。从分子机制上看,泛凋亡涉及焦亡、凋亡和坏死性凋亡 3 种细胞死亡通路,这 3 条通路同时发生且相互调控,NLRP3、CASP1、CASP8、RIPK1、RIPK3、MLKL、TLR2 等皆为调控靶点。根据结果,推测 CASP1、CASP8 等蛋白可能为泛凋亡小体的组成部分之一,有待深入研究。疏血通注射液通过抑制泛凋亡改善脑缺血再灌注损伤的作用机制见图 7。

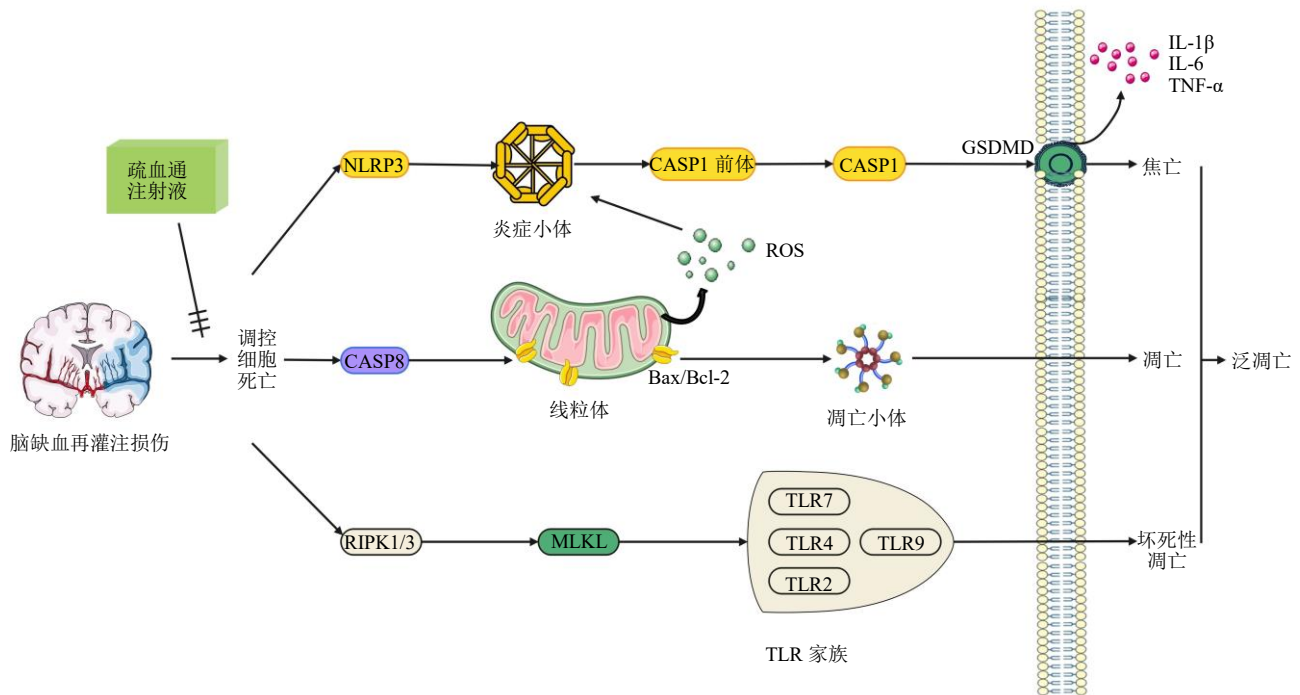


图 7 疏血通注射液通过抑制泛凋亡改善脑缺血再灌注损伤

Fig. 7 Shuxuetong Injection improves cerebral ischemia reperfusion injury by inhibiting PANoptosis

综上,本研究基于大鼠脑缺血再灌注损伤模型,选择脑梗死率、组织染色、氧化产物和炎症因子水平、神经元及小胶质细胞和星形胶质细胞的超微结构、mRNA 和蛋白表达量等多种关键指标,发现疏血通注射液可能通过上调 Bcl-2,下调 NLRP3、CASP1、GSDMD、CASP8、Bax、RIPK1、RIPK3、MLKL、TLR2、TLR4 表达,抑制泛凋亡,从而发挥改善 tMCAO 大鼠模型损伤的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Feigin V L, Owolabi M O, World Stroke Organization-Lancet Neurology Commission Stroke Collaboration Group. Pragmatic solutions to reduce the global burden of stroke: A World Stroke Organization-Lancet Neurology Commission [J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(12): 1160-1206.
- [2] Singh N, Almekhlafi M A, Bala, *et al*. Effect of time to thrombolysis on clinical outcomes in patients with acute ischemic stroke treated with tenecteplase compared to alteplase: Analysis from the AcT randomized controlled trial [J]. *Stroke*, 2023, 54(11): 2766-2775.
- [3] Chen Y H, Li Y, Guo L M, *et al*. Bibliometric analysis of the inflammasome and pyroptosis in brain [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 626502.
- [4] Samir P, Malireddi R K S, Kanneganti T D. The PANoptosome: A deadly protein complex driving pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 238.
- [5] 于潇, 王贵阳, 侯宇东, 等. 中药抗脑缺血再灌注损伤的作用及其机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(5): 1471-1484.
- [6] 李晶姬, 张娟娟, 安莹, 等. 中风病中医指南与共识的质量评价研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(8): 30-36.
- [7] 张梦琳. 疏血通注射液联合阿托伐他汀对脑梗死的治疗价值 [J]. *实用中西医结合临床*, 2024, 24(3): 89-92.
- [8] 孙塑伦, 高颖, 孙建宁, 等. 疏血通注射液治疗缺血性脑血管病临床应用专家共识 [J]. *中医杂志*, 2018, 59(2): 175-180.
- [9] 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.
- [10] Liu X, Wang Q, Cui Y R, *et al*. In-depth transcriptomic and proteomic analyses of the hippocampus and cortex in a rat model after cerebral ischemic injury and repair by Shuxuetong (SXT) Injection [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112362.
- [11] 王怡茹, 王远, 曹玲霞, 等. 细胞泛凋亡的分子组成及作用机制 [J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(4): 882-891.
- [12] Yan W T, Yang Y D, Hu X M, *et al*. Do pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) exist in cerebral

- ischemia? Evidence from cell and rodent studies [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(8): 1761-1768.
- [13] Owolabi M O, Thrift A G, Mahal A, *et al.* Primary stroke prevention worldwide: Translating evidence into action [J]. *Lancet Public Health*, 2022, 7(1): e74-e85.
- [14] Zhang Q, Jia M, Wang Y F, *et al.* Cell death mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(12): 3525-3542.
- [15] 赵文举, 付海鑫, 应春苗, 等. 中药调控铁死亡抑制脑缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(8): 2812-2819.
- [16] 李雅楠, 李思博, 白月, 等. 芒柄花素磺酸钠调控线粒体凋亡通路改善脑缺血再灌注损伤的研究 [J]. 中草药, 2024, 55(11): 3759-3767.
- [17] 史可心, 宋征宇, 刘传芬, 等. 松萝酸调节 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路对脑梗死大鼠神经元坏死性凋亡的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(12): 1678-1684.
- [18] Zheng M, Kanneganti T D. The regulation of the ZBP1-NLRP3 inflammasome and its implications in pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) [J]. *Immunol Rev*, 2020, 297(1): 26-38.
- [19] Karki R, Lee S, Mall R, *et al.* ZBP1-dependent inflammatory cell death, PANoptosis, and cytokine storm disrupt IFN therapeutic efficacy during coronavirus infection [J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(74): eabo6294.
- [20] 罗智慧, 胡玉英, 徐水婷. 中风后失眠的中医治疗研究进展 [J/OL]. 实用中医内科杂志, (2024-03-08) [2024-05-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1187.R.20240306.1033.002.html>.
- [21] 窦维华, 陈燕, 杨俊威, 等. 虫类药治疗缺血性脑卒中临床研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(10): 142-144.
- [22] Bertheloot D, Latz E, Franklin B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1106-1121.
- [23] Naito M G, Xu D C, Amin P, *et al.* Sequential activation of necroptosis and apoptosis cooperates to mediate vascular and neural pathology in stroke [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(9): 4959-4970.
- [24] Wallach D, Kang T B, Dillon C P, *et al.* Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules [J]. *Science*, 2016, 352(6281): aaf2154.
- [25] 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.
- [26] Li L S, Jiang M X, Qi L, *et al.* Pyroptosis, a new bridge to tumor immunity [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(10): 3979-3994.
- [27] Tsuchiya K. Inflammasome-associated cell death: Pyroptosis, apoptosis, and physiological implications [J]. *Microbiol Immunol*, 2020, 64(4): 252-269.
- [28] Shi J J, Zhao Y, Wang Y P, *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS [J]. *Nature*, 2014, 514(7521): 187-192.
- [29] Cavalcante G C, Schaan A P, Cabral G F, *et al.* A cell's fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17): 4133.
- [30] D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: Not only cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(7): 1104-1114.
- [31] Rogers C, Erkes D A, Nardone A, *et al.* Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1689.
- [32] Bai H L, Kang C M, Sun Z Q, *et al.* TTDA inhibited apoptosis by regulating the p53-Bax/Bcl2 axis in glioma [J]. *Exp Neurol*, 2020, 331: 113380.
- [33] Shi C X, Cao P, Wang Y K, *et al.* PANoptosis: A cell death characterized by pyroptosis, apoptosis, and necroptosis [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 1523-1532.
- [34] Liao S, Apaijai N, Chattipakorn N, *et al.* The possible roles of necroptosis during cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injury [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 695: 108629.

[责任编辑 李亚楠]