

基于 RIP1/RIP3/MLKL 通路研究桑色素对缺血性脑卒中大鼠神经元坏死性凋亡的影响及作用机制

张超¹, 李瑞青², 张丹莉², 吕转², 马素娜³, 吴新⁴, 任彬彬^{2,4*}

1. 河南中医药大学中医学院(仲景学院), 河南 郑州 450046
2. 河南中医药大学第一附属医院 康复中心, 河南 郑州 450003
3. 河南中医药大学中医药科学院, 河南 郑州 450046
4. 河南中医药大学康复医学院, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 基于受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor interacting protein kinase 1, RIP1)/RIP3/混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 通路探讨桑色素对缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 大鼠神经元坏死性凋亡的影响。**方法** 采用改良 Zea-Longa 法建立 IS 大鼠模型, 将造模成功的大鼠随机分为模型组及桑色素低、高剂量 (15、30 mg/kg) 组和依达拉奉 (1.35 mL/kg) 组、桑色素 (30 mg/kg) + 重组蛋白 RIP1 (recombinant protein RIP1, rRIP1, 8 μg/kg) 组, 每组 10 只, 另取 10 只正常大鼠作为假手术组。给予药物干预 1 周后, 对大鼠进行神经功能损伤评分, 测定脑梗死面积比; 检测血清中炎症因子水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 和 Nissl 染色检测脑组织病理变化及神经元数目; 采用免疫组化法检测脑组织小胶质细胞数量; 采用免疫荧光法检测脑组织神经元核抗原 (neuronal nucleoprotein, NeuN) 表达; 采用 TUNEL 染色检测神经元细胞凋亡情况; 采用 qRT-PCR 检测脑组织 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*)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, *cleaved Caspase-3*) mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测脑组织 RIP1/RIP3/MLKL 通路相关蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 桑色素组神经功能损伤评分及血清中肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β) 水平和脑梗死面积百分比、脑组织小胶质细胞数、神经元细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), 血清中 IL-10 水平、神经元数和 NeuN 表达显著升高 ($P < 0.05$), 脑组织 *Bax* mRNA 表达、磷酸化 RIP1 (phosphorylated RIP1, p-RIP1)/RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.05$), *cleaved Caspase-3*、*Bcl-2* mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$)。rRIP1 可以显著逆转桑色素对 IS 大鼠的保护作用 ($P < 0.05$)。**结论** 桑色素通过抑制 RIP1/RIP3/MLKL 通路改善 IS 大鼠神经元坏死性凋亡。

关键词: 缺血性脑卒中; 桑色素; RIP1/RIP3/MLKL 信号通路; 神经元; 坏死性凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)16-5847-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.16.014

Effect and mechanism of morin on neuronal necrotic apoptosis in rats with ischemic stroke based on RIP1/RIP3/MLKL pathway

ZHANG Chao¹, LI Ruiqing², ZHANG Danli², LYU Zhuan², MA Suna³, WU Xin⁴, REN Binbin^{2,4}

1. College of Traditional Chinese Medicine (Zhongjing College), Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
2. Centre of Rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China
3. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
4. College of Rehabilitation, Medical Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To explore the effect of morin on neuronal necrotic apoptosis in rats with ischemic stroke (IS) based on receptor interacting protein kinase 1 (RIP1)/RIP3/mixed lineage kinase domain like protein (MLKL) pathway. **Methods** An improved Zea-

收稿日期: 2025-05-08

基金项目: 河南省中医药传承与创新人才工程(仲景工程)中医药拔尖人才培养项目(豫卫中医函[2021]15号); 河南省国家中医药传承创新中心科研专项(2023ZXZX1042); 河南省中医药科学研究专项课题(2023ZY3001)

作者简介: 张超(1977—), 男, 副教授, 研究方向为《内经》病机病证研究与临床疾病防治。

Tel: (0371)88817799 E-mail: wosio5955127@163.com

***通信作者:** 任彬彬(1975—), 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为中老年神经退行性疾病中医防治与康复。Tel: (0371)66211549

Longa method was used to establish an IS rat model. The successfully modeled rats were randomly divided into model group, morin low-, high-dose (15, 30 mg/kg) groups, edaravone (1.35 mL/kg) group and morin (30 mg/kg) + recombinant protein RIP1 (rRIP1, 8 μ g/kg) group, with 10 rats in each group. Additionally, 10 normal rats were selected as sham group. After one week of drug intervention, rats were evaluated for neurological damage and the infarct area ratio was measured; The levels of inflammatory factors in serum was detected; Hematoxylin-eosin (HE) and Nissl staining were used to detect pathological changes and neuronal numbers in brain tissue; Immunohistochemistry was used to detect the number of microglia in brain tissue; Immunofluorescence method was used to detect the expression of neuronal nuclear protein (NeuN) in brain tissue; TUNEL staining was used to detect neuronal cell apoptosis; qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of B-cell lymphoma 2 (*Bcl-2*), Bcl-2 associated X protein (*Bax*) and activated cysteine aspartate protease-3 (*cleaved Caspase-3*) in brain tissue; Western blotting was used to detect the expressions of RIP1/RIP3/MLKL pathway related proteins in brain tissue. **Results** Compared with model group, the neurological function damage score, levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) in serum, percentage of cerebral infarction area, number of microglia in brain tissue and neuronal apoptosis rate were significantly reduced of rats in morin group ($P < 0.05$), the level of IL-10 in serum, number of neurons and NeuN expression were significantly increased ($P < 0.05$), expression levels of *Bax* mRNA, phosphorylated RIP1(p-RIP1)/RIP1, RIP3 and MLKL proteins in brain tissue were significantly down-regulated ($P < 0.05$), and expressions of *cleaved Caspase-3* and *Bcl-2* mRNA were significantly up-regulated ($P < 0.05$). rRIP1 could significantly reverse the protective effect of morin on IS rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Morin improve neuronal necrotic apoptosis in IS rats by inhibiting RIP1/RIP3/MLKL pathway.

Key words: ischemic stroke; morin; RIP1/RIP3/MLKL pathway; neuron; necrotic apoptosis

缺血性卒中 (ischemic stroke, IS) 以脑动脉梗死为特征, 是全球残疾和死亡的主要原因之一, 迅速恢复脑血流以防止永久性损伤是其主要治疗措施, 常见方法是溶栓、介入治疗, 但时间狭窄是其限制因素^[1-2], 因此仍需探索新的治疗方案。坏死性凋亡是一种新型的程序性细胞死亡, 在 IS 过程中可被刺激激活, 促进 IS 发展^[3]。因此, 抑制 IS 过程中坏死性凋亡为治疗 IS 的潜在机制。桑色素是一种天然生物类黄酮, 毒性极低, 长期给药耐受性良好, 具有抗氧化、抗炎和神经保护等多种生物活性, 是治疗神经系统、心血管及代谢性疾病等领域的天然药物^[4]。研究表明, 桑色素对缺血性神经元损伤有治疗作用^[5], 但其机制有待进一步阐明。受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor interacting protein kinase 1, RIP1)/RIP3/混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 通路是坏死性凋亡的经典调节通路, 在 IS 过程中可被刺激激活, RIP1 与 RIP3 相互作用形成坏死体, 诱导 MLKL 的激活和易位, 导致细胞裂解^[6]。本研究通过建立 IS 大鼠模型, 探讨桑色素对 IS 大鼠坏死性凋亡的影响及潜在机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 200~220 g, 6 周龄, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2024-0001。动物饲养于河南中医药大学, 实验动物使用许可证号 SYXK (豫) 2021-

0015, 室内温度 22 $^{\circ}$ C、12 h 光照/12 h 黑暗循环, 大鼠自由进食饮水。本研究经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 IACUC-202505005)。

1.2 药品与试剂

桑色素 (批号 ST221616, 质量分数为 98.5%)、2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution, TTC) 染液 (批号 SLCM0523) 购自郑州点晴科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒 (批号 GB19301)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 试剂盒 (批号 GB20228)、重组蛋白 RIP1 (recombinant protein RIP1, rRIP1, 批号 GB056511) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; IL-10 试剂盒 (批号 202125020)、TUNEL 凋亡试剂盒 (批号 202206235) 购自河南天驰生物科技有限公司; 依达拉奉注射液 (批号 241001) 购自昆明积大制药股份有限公司; 神经核抗原 (neuronal nucleoprotein, NeuN) 抗体 (批号 177487)、磷酸化 RIP1 (phosphorylated RIP1, p-RIP1) 抗体 (批号 ab300618)、RIP1 抗体 (批号 ab42126)、RIP3 抗体 (批号 ab62344)、MLKL 抗体 (批号 ab243142)、离子钙结合衔接分子 1 蛋白 (ionized calcium binding adapter molecule 1 protein, Iba1) 抗体 (批号 ab178846)、 β -actin 抗体 (批号 ab8266)、山羊抗鼠 IgG 二抗 (批号 ab205719) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

EVOS M5000 型荧光显微镜、Multiskan FC 酶

标仪、ABI Prism 7500 型 qRT-PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SYD-K4080A 型切片机 (沈阳誉德电子仪器有限公司); BX51 型显微镜 (日本 Olympus 公司); DYCZ-24FN 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 IS 大鼠模型的制备、分组与给药

大鼠适应性喂养 7 d, 随机选取 10 只作为假手术组, 其余大鼠通过改良 Zea-Longa 法建立 IS 大鼠模型^[7]。大鼠麻醉后, 将其仰卧位放在恒温控制的加热垫上, 在颈部脱去毛发, 作 1 个中线切口, 分离并结扎左侧颈总动脉和颈外动脉, 通过颈外动脉将涂有硅胶的线栓轻轻插入颈内动脉, 有阻力时停止, 对伤口消毒, 缝合皮肤; 缺血 2 h 后, 将线轻轻抽出, 大鼠苏醒后, 自由进食饮水, 若 Longa 评分 ≥ 1 分, 则 IS 大鼠模型制备成功。假手术组仅分离动脉但无线插入, 其余步骤相同。将造模成功的大鼠随机分为模型组及桑色素低、高剂量 (15、30 mg/kg)^[8]组和依达拉奉 (1.35 mL/kg)^[9]组、桑色素 (30 mg/kg) + rRIP1 (8 μ g/kg)^[10]组, 每组 10 只。假手术组和模型组给予生理盐水, 1 次/d, 连续给药 1 周; 桑色素组 ip 桑色素, 1 次/d, 连续给药 1 周; 依达拉奉组尾 iv 依达拉奉注射液, 1 次/d, 连续给药 1 周; 桑色素 + rRIP1 组 ip 桑色素, 1 次/d, 连续给药 1 周, 同时尾 iv rRIP1, 隔日 1 次, 连续给药 1 周。

2.2 神经功能损伤评分

给药结束后, 采用改良的 Longa 评分标准^[11]对各组大鼠神经功能进行评估。

2.3 血清中炎症因子水平检测

对大鼠进行神经功能损伤评分后, 麻醉, 收集腹部主动脉血液, 离心后按照试剂盒说明书检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平。

2.4 脑梗死面积比测定

每组随机选取 3 只大鼠, 迅速取出全脑冷冻, 制备 2 mm 厚的连续冠状切片, 并将其浸入含 0.05% TTC 的 PBS 溶液中, 加入 4% 多聚甲醛, 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 采用 Image J 软件测量切片的红色正常面积及白色梗死面积, 以梗死面积百分比表示缺血性脑损伤面积。

2.5 苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 和 Nissl 染色检测脑组织病理变化及神经元数目

处死剩余大鼠后, 立即取部分脑组织至 4% 多

聚甲醛中, 石蜡包埋后, 切成 5 μ m 厚切片, 脱蜡后将切片浸入 Nissl 染液或进行 HE 染色, 封片后, 于显微镜下观察脑组织病理变化, 并统计完整的神经元数目。

2.6 免疫组化法检测脑组织小胶质细胞数量

取各组脑组织切片, 于 3% 过氧化氢中孵育 0.5 h 以阻断过氧化物酶活性, 用 3% 牛血清白蛋白于 37 $^{\circ}$ C 孵育; 加入 Iba1 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗涤切片, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育二抗。用二氨基联苯胺染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯澄清, 封固盖玻片, 于显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件统计 Iba1 阳性细胞数, 其中阳性细胞呈现棕黄色颗粒。

2.7 TUNEL 染色检测神经元细胞凋亡情况

取各组脑组织切片, 在二甲苯中脱蜡并在梯度乙醇中脱水, 加入 TUNEL 反应试剂、蛋白酶 K 孵育, 抗荧光猝灭剂封片, 通过荧光显微镜观察 TUNEL 阳性凋亡细胞, 凋亡细胞显示为绿色, 使用 Image J 软件进行定量分析。

2.8 免疫荧光法检测神经元 NeuN 表达

取各组脑组织切片, 脱蜡水化, 经抗原修复、透化及封闭后, 加入 NeuN 抗体孵育, 随后加入荧光二抗孵育, DAPI 复染, 封片后, 于倒置显微镜下观察并拍照。

2.9 qRT-PCR 检测凋亡相关基因表达

取各组脑组织, 按照试剂盒说明书提取脑组织中总 RNA 并逆转录为 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*) 正向引物 5'-GAACTGGGGGAGGATGTGG-3', 反向引物 5'-GCATGCTGGGGCCATATAGT-3'; *Bcl-2* 相关 X 蛋白 (*Bcl-2* associated X protein, *Bax*) 正向引物 5'-CTGGATCCAAGACCAGGGTG-3', 反向引物 5'-GTGAGGACTCCAGCCACAAA-3'; 活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, *cleaved Caspase-3*) 正向引物 5'-GAGCGATGAAGCAGACGACT-3', 反向引物 5'-GCTCCACCATACATCTCACC-3'; β -actin 正向引物 5'-CCTGCCTCTACTGGCGCTGC-3', 反向引物 5'-GCAGTGGGGACACGGAAGGC-3'。以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达量。

2.10 Western blotting 检测 RIP1/RIP3/MLKL 通路相关蛋白表达

取各组脑组织, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白, 加热使蛋白变性。蛋白样品经

10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后，分别加入 p-RIP1、RIP1、RIP3、MLKL 抗体，4 ℃ 孵育过夜；加入二抗，室温孵育 2 h，洗涤后，加入 ECL 化学发光试剂进行显影，采用 Image J 软件对条带的灰度值进行分析。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件分析数据，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析进行多组间比较，以 snk-q 检验进一步两两比较。

3 结果

3.1 桑色素对 IS 大鼠神经功能损伤评分的影响

如表 1 所示，与假手术组比较，模型组大鼠神经功能损伤评分显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，桑色素各剂量组和依达拉奉组大鼠神经功能损伤评分显著降低 ($P < 0.05$)；与桑色素低剂量组比较，桑色素高剂量组和依达拉奉组大鼠神经功能损伤评分显著降低 ($P < 0.05$)；与桑色素高剂量组比较，桑色素高剂量+rRIP1 组大鼠神经功能损伤评分显著升高 ($P < 0.05$)。表明桑色素可改善 IS 大鼠神经功能损伤。

3.2 桑色素对 IS 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 水平的影响

如表 2 所示，与假手术组比较，模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$)，IL-

表 1 桑色素对 IS 大鼠神经功能损伤评分的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of morin on neurofunctional injury score of IS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	神经功能损伤评分
假手术	—	0.00 ± 0.00
模型	—	2.25 ± 0.24 [#]
桑色素	15 mg·kg ⁻¹	1.52 ± 0.16 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	0.75 ± 0.09 ^{*△}
依达拉奉	1.35 mL·kg ⁻¹	0.69 ± 0.07 ^{*△}
桑色素+rRIP1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	1.49 ± 0.16 [■]

与假手术组比较：[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ；与桑色素低剂量组比较：[△] $P < 0.05$ ；与桑色素高剂量组比较：[■] $P < 0.05$ ，下表同。

[#] $P < 0.05$ vs sham group；^{*} $P < 0.05$ vs model group；[△] $P < 0.05$ vs morin low-dose group；[■] $P < 0.05$ vs morin high-dose group, same as below tables.

10 水平显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，桑色素各剂量组和依达拉奉组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$)，IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与桑色素低剂量组比较，桑色素高剂量组和依达拉奉组 TNF- α 、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$)，IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与桑色素高剂量组比较，桑色素高剂量+rRIP1 组 TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$)，IL-10 水平显著降低 ($P < 0.05$)。表明桑色素可抑制 IS 大鼠炎症反应。

表 2 桑色素对 IS 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of morin on levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in serum of IS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	43.52 ± 4.95	21.66 ± 2.84	92.64 ± 9.91
模型	—	134.62 ± 14.05 [#]	97.52 ± 10.54 [#]	21.34 ± 2.74 [#]
桑色素	15 mg·kg ⁻¹	92.37 ± 9.94 [*]	68.85 ± 7.15 [*]	43.51 ± 4.86 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	61.24 ± 6.83 ^{*△}	39.75 ± 4.51 ^{*△}	71.52 ± 7.71 ^{*△}
依达拉奉	1.35 mL·kg ⁻¹	59.67 ± 6.34 ^{*△}	34.52 ± 3.95 ^{*△}	72.53 ± 7.84 ^{*△}
桑色素+rRIP1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	91.85 ± 9.88 [■]	70.18 ± 7.85 [■]	44.42 ± 4.99 [■]

3.3 桑色素对 IS 大鼠脑梗死面积百分比的影响

如图 1 和表 3 所示，与假手术组比较，模型组大鼠脑梗死面积百分比显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，桑色素各剂量组和依达拉奉组大鼠脑梗死面积百分比显著降低 ($P < 0.05$)；与桑色素低剂量组比较，桑色素高剂量组和依达拉奉组大鼠脑梗死面积百分比显著降低 ($P < 0.05$)；与桑色素高剂量组比较，桑色素高剂量+rRIP1 组大鼠脑梗死面积百分比显著升高 ($P < 0.05$)。表明桑色素可减轻 IS 大鼠脑梗死。

3.4 桑色素对 IS 大鼠脑组织病理损伤及神经元数目的影响

如图 2 所示，假手术组大鼠脑组织无炎性浸润，神经细胞排列紧密；细胞无皱缩现象；模型组脑组织炎性细胞浸润明显，细胞核固缩，神经细胞排列杂乱无章；给予桑色素或依达拉奉注射液干预后，IS 大鼠脑组织病理损伤得到改善；桑色素+rRIP1 组脑组织病理损伤较桑色素高剂量组加重。

如图 3 和表 4 所示，与假手术组比较，模型组大鼠神经元数显著减少 ($P < 0.05$)；与模型组比较，

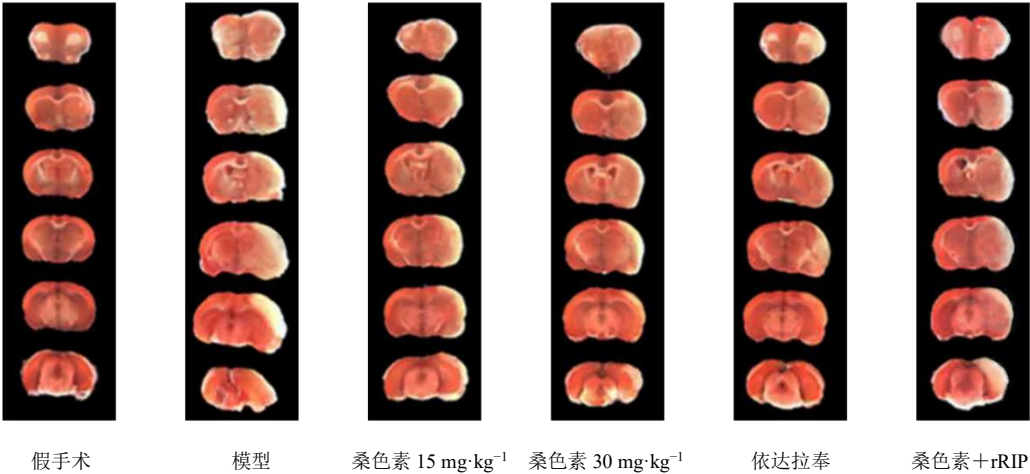


图 1 TCC 染色检测各组大鼠脑梗死情况
 Fig. 1 Cerebral infarction of rats in each group detected by TCC staining

表 3 桑色素对 IS 大鼠脑梗死面积百分比的影响
 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

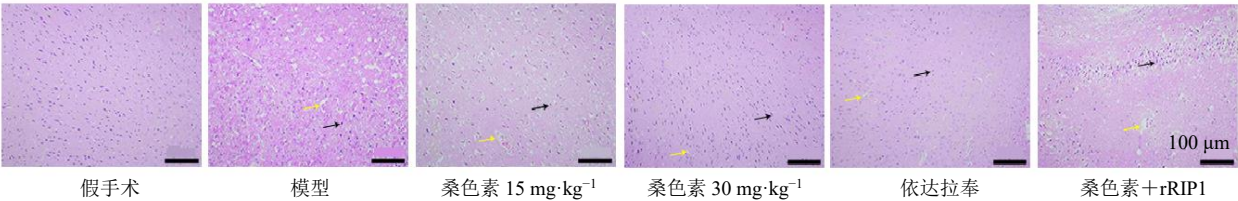
Table 3 Effect of morin on percentage of cerebral infarction area in IS rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	梗死面积百分比/%
假手术	—	0.00±0.00
模型	—	28.37±2.95 [#]
桑色素	15 mg·kg ⁻¹	16.77±1.75 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	8.82±0.93 ^{*△}
依达拉奉	1.35 mL·kg ⁻¹	8.34±0.88 ^{*△}
桑色素+rRIP1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	15.27±1.62 [■]

桑色素各剂量组和依达拉奉组大鼠神经元数显著增加 ($P<0.05$)；与桑色素低剂量组比较，桑色素高剂量组和依达拉奉组神经元数显著增加 ($P<0.05$)；与桑色素高剂量组比较，桑色素高剂量+rRIP1 组神经元数显著减少 ($P<0.05$)。表明桑色素可增加 IS 大鼠神经元数目。

3.5 桑色素对 IS 大鼠脑组织小胶质细胞数和 NeuN 表达的影响

如图 4、5 和表 5 所示，与假手术组比较，模



黑色箭头表示核固缩，黄色箭头表示炎性细胞浸润。
 Black arrow indicates nuclear condensation, yellow arrow indicates inflammatory cell infiltration.

图 2 各组大鼠脑组织病理变化 (HE, ×100)
 Fig. 2 Pathological changes of brain tissue of rats in each group (HE, × 100)

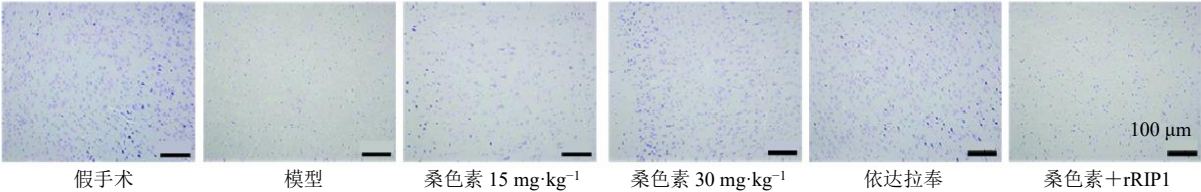


图 3 各组大鼠脑组织神经元数目 (尼氏染色, ×100)
 Fig. 3 Number of neurons in brain tissue of rats in each group (Nissl staining, × 100)

表 4 各组大鼠脑组织神经元数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Table 4 Comparison of number of neurons in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	神经元数
假手术	—	215.32 ± 22.35
模型	—	89.65 ± 9.06 [#]
桑色素	15 mg·kg ⁻¹	125.34 ± 12.64 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	189.62 ± 19.11 ^{*△}
依达拉奉	1.35 mL·kg ⁻¹	198.53 ± 20.06 ^{*△}
桑色素+rRIP1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	119.85 ± 12.34 [■]

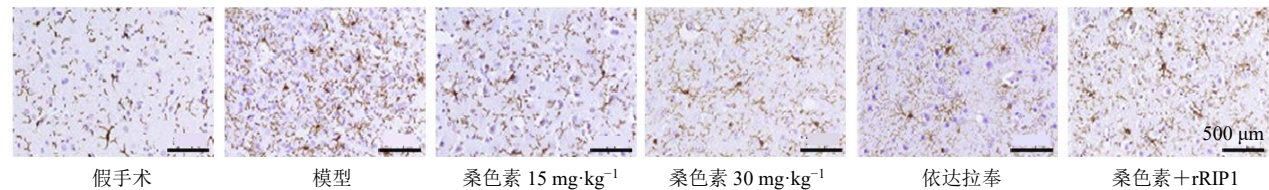


图 4 各组大鼠脑组织小胶质细胞数 (免疫组化, ×100)
Fig. 4 Number of microglia in brain tissue of rats in each group (immunohistochemistry, × 100)

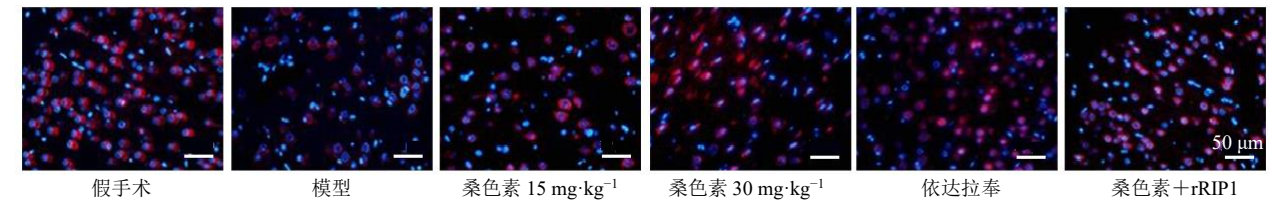


图 5 各组大鼠脑组织 NeuN 表达 (免疫荧光, ×100)
Fig. 5 Expression of NeuN in brain tissue of rats in each group (immunofluorescence, × 100)

表 5 各组大鼠脑组织小胶质细胞数及 NeuN 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Table 5 Comparison of microglia number and NeuN expression in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	Iba1 阳性细胞数	NeuN 表达量
假手术	—	35.26 ± 3.72	148.62 ± 15.04
模型	—	112.64 ± 11.35 [#]	55.32 ± 5.67 [#]
桑色素	15 mg·kg ⁻¹	86.64 ± 8.81 [*]	79.52 ± 8.19 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	52.06 ± 5.33 ^{*△}	118.64 ± 12.18 ^{*△}
依达拉奉	1.35 mL·kg ⁻¹	51.35 ± 5.23 ^{*△}	121.05 ± 12.35 ^{*△}
桑色素+rRIP1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	85.97 ± 8.66 [■]	80.53 ± 8.26 [■]

胶质细胞数显著增加 ($P < 0.05$), NeuN 表达显著降低 ($P < 0.05$)。表明桑色素可减少 IS 大鼠脑组织中小胶质细胞数, 增加 NeuN 表达。

3.6 桑色素对 IS 大鼠神经元细胞凋亡的影响

如图 6 和表 6 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠神经元细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 桑色素各剂量组和依达拉奉组大鼠神经元细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$); 与桑色素低剂量组比较, 桑色素高剂量组和依达拉奉组神经元细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$); 与桑色素高剂量组

型组大鼠脑组织小胶质细胞数显著增加 ($P < 0.05$), NeuN 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 桑色素各剂量组和依达拉奉组大鼠脑组织小胶质细胞数显著降低 ($P < 0.05$), NeuN 表达显著升高 ($P < 0.05$); 与桑色素低剂量组比较, 桑色素高剂量组和依达拉奉组脑组织小胶质细胞数显著降低 ($P < 0.05$), NeuN 表达显著升高 ($P < 0.05$); 与桑色素高剂量组比较, 桑色素高剂量+rRIP1 组脑组织小

比较, 桑色素高剂量+rRIP1 组神经元细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。表明桑色素可抑制 IS 大鼠脑组织中神经元凋亡。

3.7 桑色素对 IS 大鼠脑组织 *Bax*、*Bcl-2* 及 *cleaved Caspase-3* mRNA 表达的影响

如表 7 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中 *Bax* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), *Bcl-2*、*cleaved Caspase-3* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 桑色素各剂量组和依达拉奉组大鼠脑组织中 *Bax* mRNA 表达水平显著降低

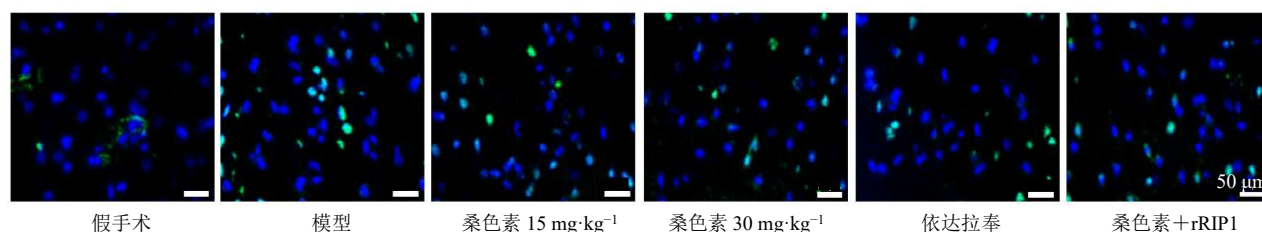


图 6 各组大鼠脑组织神经元细胞凋亡情况 (TUNEL 染色, $\times 200$)

Fig. 6 Apoptosis of neuronal cells in brain tissue of rats in each group (TUNEL staining, $\times 200$)

表 6 各组大鼠脑组织神经元细胞凋亡率比较

($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 6 Comparison of neuronal apoptosis rate in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	细胞凋亡率/%
假手术	—	4.53 ± 0.48
模型	—	$25.74 \pm 2.71^{\#}$
桑色素	$15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$15.73 \pm 1.61^*$
	$30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$9.52 \pm 0.11^{*\Delta}$
依达拉奉	$1.35 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	$9.43 \pm 0.98^{*\Delta}$
桑色素+rRIP1	$30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 8 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$14.53 \pm 1.51^{\blacksquare}$

($P < 0.05$), *Bcl-2*、*cleaved Caspase-3* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与桑色素低剂量组比较, 桑色素高剂量组和依达拉奉组 *Bax* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), *Bcl-2*、*cleaved Caspase-3* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与桑色素高剂量组比较, 桑色素高剂量+rRIP1 组 *Bax* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), *Bcl-2*、*cleaved Caspase-3* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。表明桑色素可抑制 IS 大鼠脑组织中细胞凋亡。

表 7 各组大鼠脑组织 *Bax*、*Bcl-2* 及 *cleaved Caspase-3* mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 7 Comparison of *Bax*, *Bcl-2* and *cleaved Caspase-3* mRNA expressions in brain tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	mRNA 相对表达量		
		<i>Bax</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>cleaved Caspase-3</i>
假手术	—	1.06 ± 0.11	0.98 ± 0.10	1.08 ± 0.11
模型	—	$2.56 \pm 0.27^{\#}$	$0.25 \pm 0.03^{\#}$	$0.15 \pm 0.03^{\#}$
桑色素	$15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$1.85 \pm 0.19^*$	$0.51 \pm 0.06^*$	$0.42 \pm 0.06^*$
	$30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$1.16 \pm 0.13^{*\Delta}$	$0.78 \pm 0.08^{*\Delta}$	$0.75 \pm 0.09^{*\Delta}$
依达拉奉	$1.35 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	$1.11 \pm 0.12^{*\Delta}$	$0.82 \pm 0.09^{*\Delta}$	$0.79 \pm 0.09^{*\Delta}$
桑色素+rRIP1	$30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 8 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$1.79 \pm 0.18^{\blacksquare}$	$0.49 \pm 0.05^{\blacksquare}$	$0.48 \pm 0.06^{\blacksquare}$

3.8 桑色素对 IS 大鼠脑组织 p-RIP1、RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达的影响

如图 7 和表 8 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中 p-RIP1/RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 桑色素各剂量组和依达拉奉组脑组织中 p-RIP1/RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与桑色素低剂量组比较, 桑色素高剂量组和依达拉奉组 p-RIP1/RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与桑色素高剂量组比较, 桑色素高剂量+rRIP1 组 p-RIP1/RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。表明桑色素可抑制 IS 大鼠脑组织中 p-RIP1/RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达。

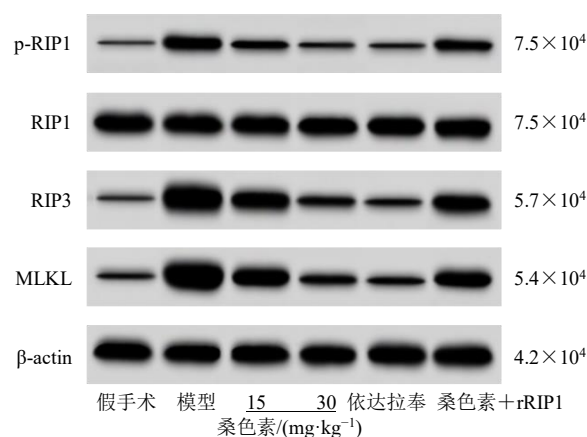


图 7 各组大鼠脑组织 p-RIP1、RIP1、RIP3 和 MLKL 蛋白表达

Fig. 7 Protein expressions of p-RIP1, RIP1, RIP3 and MLKL in brain tissues of rats in each group

表 8 各组大鼠脑组织 p-RIP1/RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 8 Comparison of protein expressions of p-RIP1/RIP1, RIP3 and MLKL in brain tissues of rats in each group

($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	p-RIP1/RIP1	RIP3/ β -actin	MLKL/ β -actin
假手术	—	0.15 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.05
模型	—	0.78 $\pm$ 0.08 [#]	1.25 $\pm$ 0.13 [#]	1.67 $\pm$ 0.18 [#]
桑色素	15 mg·kg ⁻¹	0.49 $\pm$ 0.06 [*]	0.87 $\pm$ 0.09 [*]	0.91 $\pm$ 0.10 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	0.25 $\pm$ 0.03 ^{*Δ}	0.59 $\pm$ 0.07 ^{*Δ}	0.61 $\pm$ 0.07 ^{*Δ}
依达拉奉	1.35 mL·kg ⁻¹	0.22 $\pm$ 0.03 ^{*Δ}	0.52 $\pm$ 0.06 ^{*Δ}	0.55 $\pm$ 0.06 ^{*Δ}
桑色素+rRIP1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μ g·kg ⁻¹	0.51 $\pm$ 0.06 [■]	0.82 $\pm$ 0.09 [■]	0.89 $\pm$ 0.09 [■]

4 讨论

IS 发生过程中,脑缺血可导致细胞凋亡,引发神经损伤,严重威胁人们的健康^[12]。虽然目前关于 IS 的研究较多,但其分子机制和治疗方法仍有待广泛探索。神经元凋亡被广泛认为是 IS 病理过程中的关键因素,在病理条件下,加速细胞凋亡可导致神经退行性疾病或缺血性损伤^[13]。细胞凋亡的发生和发展受多种基因的调控,cleaved Caspase-3 为凋亡蛋白,可激活凋亡程序,Bcl-2 及其家族成员是通过内源性途径进行细胞凋亡所必需的蛋白,Bcl-2 与 Bax 共同修饰线粒体膜电位和通透性,在脑缺血期间,抗凋亡蛋白 Bcl-2 被抑制,促凋亡蛋白 Bax 被激活并转移到线粒体,导致线粒体膜通透性增加,从而释放激活半胱氨酸蛋白酶家族蛋白表达^[12,14]。本研究通过建立 IS 大鼠模型,结果显示模型组大鼠神经功能损伤评分、脑梗死面积百分比、神经元细胞凋亡率均显著增加,完整的神经元细胞数量减少,提示神经元凋亡参与 IS 过程。qRT-PCR 检测结果显示,IS 大鼠脑组织中 Bcl-2 mRNA 表达下调,cleaved Caspase-3、Bax mRNA 表达上调,进一步证实 IS 过程涉及神经元凋亡。小胶质细胞是中枢神经系统的一类重要细胞,在神经系统的发育、学习与记忆以及衰老中发挥关键作用,其活化会导致促炎细胞因子的释放,进一步加重神经元死亡,而 Iba-1 是小胶质细胞的特异性标志物^[15],NeuN 是成熟神经元的公认标志物^[16]。免疫组化结果显示,模型组大鼠脑组织小胶质细胞数明显增加,NeuN 表达降低。IS 损伤的原因与小胶质细胞诱导的神经炎症息息相关,IS 后,被过度激活小胶质细胞会释放高水平的炎性细胞因子(如 TNF- α 、IL-1 β),抑制抗炎因子水平(如 IL-10),加重炎症反应进而导致脑损伤^[17]。神经炎症的机制研究需结合多维度样本(脑、血、脑脊液),当脑组织发生炎症(如脑卒中、神经退行性疾病)时,血脑屏障通透性增加,脑组

织中的炎症因子可通过受损的血脑屏障进入外周血,血清中神经炎症因子的检测对研究 IS 具有重要意义^[18],本研究结果同样发现 IS 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平升高,IL-10 水平降低,提示神经炎症参与 IS 发展。中药及其天然药用化合物因其低毒、多靶点、疗效准确的特点而受到关注,并被广泛用于疾病预防和治疗^[19]。桑色素是一种类黄酮,存在于许多可食用水果中,多项研究显示桑色素在神经病理学中发挥神经保护作用^[20],推测其可能在 IS 中发挥作用。结果显示,桑色素明显抑制了 IS 大鼠神经元凋亡及小胶质细胞活化,减轻神经炎症,改善神经功能,减轻大鼠脑损伤,表明桑色素在 IS 治疗中发挥神经保护作用。

神经元死亡是一个复杂的病理过程,涉及多种细胞死亡机制,其中坏死性凋亡作为一种程序性坏死形式,在 IS 神经元死亡中扮演关键角色。RIP1/RIP3/MLKL 通路被认为是坏死性凋亡的典型信号通路,当细胞受到能量代谢紊乱、细胞膜损伤等刺激时,细胞死亡受体会激活 RIP1 激酶,与 RIP3 相互作用,形成“坏死体”,随后可激活 MLKL,MLKL 转位以诱导坏死性凋亡^[21-22]。本研究结果显示,IS 大鼠脑组织中 p-RIP1/RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达上调,证明神经元凋亡中的坏死性凋亡参与 IS 发展。坏死性凋亡在脑部疾病起着重要作用,而 RIP1/RIP3/MLKL 通路的抑制可在疾病中发挥保护作用^[23]。本研究显示给予桑色素干预后,抑制了 p-RIP1/RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达,抑制了细胞坏死性凋亡发展,脑损伤得到改善,推测桑色素在 IS 中的神经保护作用通过抑制 RIP1/RIP3/MLKL 通路介导的神经元坏死性凋亡实现。为验证桑色素在 IS 中的作用机制是否与 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路有关,采用加入 rRIP1 作为回补实验,结果显示,rRIP1 可激活 RIP1/RIP3/MLKL 通路,其加入逆转了桑色素对 IS 大鼠的神经保护作用,证实桑色素通过抑制

RIP1/RIP3/MLKL 通路介导的神经元坏死性凋亡保护 IS 大鼠脑损伤。

综上, 桑色素能够改善 IS 大鼠神经功能, 减轻脑损伤, 其机制可能与抑制 RIP1/RIP3/MLKL 通路介导的神经元坏死性凋亡有关。后续将通过加入坏死性凋亡抑制剂, 并检测脑组织炎症指标, 进一步完善研究结果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突
参考文献

- [1] Wang Y, Yuan H L, Shen D, *et al.* Artemisinin attenuated ischemic stroke induced pyroptosis by inhibiting ROS/TXNIP/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 116894.
- [2] Zhang S S, Liu M, Liu D N, *et al.* Network pharmacology analysis and experimental validation of kaempferol in the treatment of ischemic stroke by inhibiting apoptosis and regulating neuroinflammation involving neutrophils [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12694.
- [3] Zhou Y B, Cai Z T, Zhai Y J, *et al.* Necroptosis inhibitors: Mechanisms of action and therapeutic potential [J]. *Apoptosis*, 2024, 29(1/2): 22-44.
- [4] Shao Y, Chen Y F, Lan X, *et al.* Morin regulates M1/M2 microglial polarization via NF- κ B p65 to alleviate vincristine-induced neuropathic pain [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 3143-3156.
- [5] Mata V C, Goldberg J. Morin and isoquercitrin protect against ischemic neuronal injury by modulating signaling pathways and stimulating mitochondrial biogenesis [J]. *Nutr Neurosci*, 2023, 26(9): 796-806.
- [6] Hu Y H, Lei H T, Zhang S, *et al.* *Panax notoginseng* saponins protect brain microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/resupply-induced necroptosis via suppression of RIP1-RIP3-MLKL signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(11): 3261-3271.
- [7] Li Z W, Tang H, Chen X X, *et al.* Urolithin B attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating Nrf2-regulated anti-oxidation in rats [J]. *Neuroscience*, 2024, 538: 46-58.
- [8] Khamchai S, Chumboatong W, Hata J, *et al.* Morin attenuated cerebral ischemia/reperfusion injury through promoting angiogenesis mediated by angiopoietin-1-Tie-2 axis and Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(1): 14-25.
- [9] Shang J F, Huang G, Wang B H, *et al.* Shuxuetong injection inhibits pyroptosis in acute ischemic stroke via CD44/NLRP3/GSDMD signal [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 345: 119618.
- [10] 李海莎, 彭慧如, 罗辉, 等. 梓醇调节 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路对急性心肌梗死大鼠坏死性凋亡的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(14): 2063-2067.
- [11] 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.
- [12] Zheng Z, Hou F, He G D, *et al.* Carvedilol reduces the neuronal apoptosis after ischemic stroke by modulating activator of transcription 3 expression *in vitro* [J]. *Dev Neurosci*, 2023, 45(2): 94-104.
- [13] Liu Y F, Zhang T Y, Zou X, *et al.* Penumbratargeted CircOGDH siRNA-loaded nanoparticles alleviate neuronal apoptosis in focal brain ischaemia [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2024, 9(2): 134-144.
- [14] 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.
- [15] Shui X Y, Chen J S, Fu Z Y, *et al.* Microglia in ischemic stroke: Pathogenesis insights and therapeutic challenges [J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 3335-3352.
- [16] 吴晓丹, 傅纪婷, 刘惜墨, 等. 加味四物汤激活 Nrf2/xCT/GPX4 通路改善缺血性脑卒中大鼠神经元损伤 [J]. *解剖科学进展*, 2025, 31(2): 209-212.
- [17] 邓敏, 禹红, 周祥, 等. 穿心莲内酯调节 Nrg-1/ErbB4 信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元凋亡的影响 [J]. *中国药房*, 2024, 35(21): 2634-2639.
- [18] 理扎·沙布尔江, 尚津锋, 文胤琰, 等. 疏通灌注液通过抑制泛凋亡改善大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. *中草药*, 2024, 55(18): 6238-6249.
- [19] Yuan Y, Sheng P, Ma B, *et al.* Elucidation of the mechanism of Yiqi Tongluo Granule against cerebral ischemia/reperfusion injury based on a combined strategy of network pharmacology, multi-omics and molecular biology [J]. *Phytomedicine*, 2023, 118: 154934.
- [20] Martínez-Coria H, Serrano-García N, López-Valdés H E, *et al.* Morin improves learning and memory in healthy adult mice [J]. *Brain Behav*, 2024, 14(2): e3444.
- [21] Mitroshina E V, Saviuk M, Vedunova M V. Necroptosis in CNS diseases: Focus on astrocytes [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 14: 1016053.
- [22] Wu X Q, Nagy L E, Gautheron J. Mediators of necroptosis: From cell death to metabolic regulation [J]. *EMBO Mol Med*, 2024, 16(2): 219-237.
- [23] Qiu Y M, Cheng L, Xiong Y Y, *et al.* Advances in the study of necroptosis in vascular dementia: Focus on blood-brain barrier and neuroinflammation [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2025, 31(2): e70224.

[责任编辑 李亚楠]