

# 基于RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路探讨黄芪虫藤饮抑制坏死性凋亡改善小鼠大脑中动脉闭塞/再灌注模型无复流现象的机制

朱新华<sup>1</sup>, 何孟豪<sup>2</sup>, 曾阳<sup>2</sup>, 傅馨莹<sup>3</sup>, 姚欣艳<sup>1</sup>, 刘侃<sup>1\*</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

3. 湖南中医药大学中西医结合学院, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的: 探析黄芪虫藤饮(HQCTY)对小鼠大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)模型脑组织无复流现象的改善作用及其潜在机制。方法: 采用改良线栓法建立C57BL/6小鼠MCAO/R模型, 设立假手术组, 模型组, HQCTY低(6.63 g·kg<sup>-1</sup>)、中(13.26 g·kg<sup>-1</sup>)、高剂量组(26.52 g·kg<sup>-1</sup>)及丁苯酞阳性组(78 mg·kg<sup>-1</sup>), 每组15只。每日灌胃1次, 连续灌胃给药7 d。通过改良神经功能缺损评分(mNSS)评估神经缺损症状, 血流激光散斑成像(LSCI)评估缺血再灌注无复流现象, 2,3,5-三苯基四氮唑氯化物(TTC)染色评估缺血梗死灶及脑水肿体积, 苏木素-伊红(HE)、尼氏、镀银和荧光素标记Jade B染色(FJB)染色共同检测神经组织病理结构变化及神经元损伤情况, 伊文思蓝染色及紧密连接蛋白-1(ZO-1)/闭锁蛋白-5(Claudin-5)免疫荧光评估血脑屏障(BBB)功能; 血小板内皮细胞黏附分子-1(CD31)/血管内皮生长因子(VEGF)免疫荧光评估血管新生及微循环灌注水平; 免疫荧光检测磷酸化(p)-受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RIPK)3/p-混合谱系激酶样蛋白(MLKL)并结合蛋白免疫印迹法(Western blot)检测RIPK1、RIPK3、MLKL及其磷酸化形式以评估坏死性凋亡信号通路; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-18(IL-18)水平。结果: 与模型组比较, HQCTY中、高剂量组给药3 d和7 d均能明显降低小鼠MCAO/R模型的mNSS评分( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。LSCI结果表明, 与模型组比较, HQCTY中、高剂量组小鼠MCAO/R模型再灌注后脑组织血流灌注不足显著改善( $P<0.01$ ), 缓解局灶无复流现象。TTC染色检测显示, 与模型组比较, HQCTY中、高剂量组小鼠MCAO/R模型无复流现象所致的脑缺血梗死灶及脑水肿体积明显减小( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。病理形态学结果表明, 与模型组比较, HQCTY高剂量组神经元排列趋于整齐, 细胞结构清晰( $P<0.01$ ), 尼氏小体数量显著增加( $P<0.01$ ), HQCTY中、高剂量组神经纤维排列致密且走向清晰( $P<0.01$ ), 神经元变性坏死显著减少( $P<0.01$ )。与模型组比较, HQCTY中、高剂量组MCAO/R小鼠无复流区域BBB通透性显著降低( $P<0.01$ ), 紧密连接蛋白Claudin-5和ZO-1表达显著增加( $P<0.01$ )。与模型组比较, HQCTY中、高剂量组MCAO/R小鼠无复流区域的微血管密度及VEGF表达水平明显提高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。免疫荧光及Western blot检测显示, 与模型组比较, HQCTY中、高剂量组小鼠MCAO/R模型无复流区域p-RIPK1、p-RIPK3及p-MLKL蛋白表达明显下调( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与模型组比较, HQCTY中、高剂量组小鼠MCAO/R模型无复流区域IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 及IL-18水平显著降低( $P<0.01$ )。结论: HQCTY可通过调控RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路, 抑制坏死性凋亡, 增加脑微循环灌注, 多靶点改善脑缺血再灌注无复流现象及神经损伤, 具有良好的神经保护潜力和应用前景。

**[关键词]** 脑缺血再灌注; 无复流现象; 黄芪虫藤饮; 血脑屏障; 坏死性凋亡

**[中图分类号]** R277; R285; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)15-0110-13

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20252240

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251118.1542.003>

**[网络出版日期]** 2025-11-18 17:19:33



## Mechanism of Huangqi Chongteng Yin Improving No-reflow Phenomenon in Middle Cerebral Artery Occlusion/Reperfusion Mouse Model by Inhibiting Necroptosis Based on RIPK1/RIPK3/MLKL Signaling Pathway

ZHU Xinhua<sup>1</sup>, HE Menghao<sup>2</sup>, ZENG Yang<sup>2</sup>, FU Xinying<sup>3</sup>, YAO Xinyan<sup>1</sup>, LIU Kan<sup>1\*</sup>

**[收稿日期]** 2025-08-31

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金项目(2024JJ9429); 湖南省中医药管理局科研项目(B2024071); 湖南省卫健委科研计划课题(W20243137); 湖南中医药大学校院联合基金重点项目(2024XYLH005)

**[第一作者]** 朱新华, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合防治神经系统疾病的研究, E-mail: 381199814@qq.com

**[通信作者]** \* 刘侃, 博士, 主治医师, 从事中西医结合防治神经系统疾病的研究, E-mail: liukan1988cs@163.com

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;  
2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. School of Integrated Chinese and  
Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** This paper aims to investigate the improving effects of Huangqi Chongteng Yin (HQCTY) against the no-reflow phenomenon in the middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) mouse model and to elucidate its potential mechanisms. **Methods:** A modified intraluminal filament method was used to establish the MCAO/R models in C57BL/6 mice. The models were assigned into a sham group, a model group, HQCTY groups with low dose ( $6.63 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), medium dose ( $13.26 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and high dose ( $26.52 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and a 3-*n*-butylphthalide positive group ( $78 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with 15 mice in each group. All drugs were administered once daily by intragastric gavage for seven consecutive days. Neurological deficits were assessed using the modified neurological severity score (mNSS). Laser speckle contrast imaging (LSCI) was used to evaluate the no-reflow phenomenon in ischemia-reperfusion. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was performed to measure the volume of ischemic infarct and cerebral edema. Hematoxylin-eosin (HE) staining, Nissl staining, silver staining, and Fluoro-Jade B (FJB) staining were used to observe histopathological changes and neuronal damage in the neural tissues. Evans blue staining together with immunofluorescent detection of tight junction proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and Claudin-5 was used to evaluate blood-brain barrier (BBB) function. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)/vascular endothelial growth factor (VEGF) immunofluorescent staining was performed to assess angiogenesis and microcirculatory perfusion. Immunofluorescence was performed to detect phosphorylated (p)-receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK)-3/p-mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL). Combined with Western blot, the immunofluorescent staining was used to detect RIPK1, RIPK3, MLKL, and their phosphorylated forms, evaluating the necroptotic signaling pathway. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-18 (IL-18). **Results:** Compared with the model group, HQCTY groups with medium and high doses exhibited significantly reduced mNSS scores of MCAO/R mouse model with intragastric administration for three and seven days ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). LSCI analysis shows that compared with the model group, HQCTY groups with medium and high doses exhibit markedly improved cerebral blood perfusion after reperfusion in the MCAO/R mouse model ( $P<0.01$ ), thereby alleviating the focal no-reflow phenomenon. TTC staining results reveal that compared with the model group, HQCTY groups with medium and high doses exhibit significantly reduced volume of cerebral ischemic infarct and cerebral edema ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) in the MCAO/R mouse model. Histopathological evaluation results show that compared with the model group, the HQCTY group with high dose exhibits ordered neuronal arrangement and intact cellular structure ( $P<0.01$ ) and significantly increased number of Nissl bodies ( $P<0.01$ ). HQCTY groups with medium and high doses exhibit compact arrangement and distinct orientation of nerve fibers ( $P<0.01$ ) and markedly reduced neuronal degeneration and necrosis ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, HQCTY groups with medium and high doses exhibited significantly reduced BBB permeability ( $P<0.01$ ) and increased Claudin-5 and ZO-1 expression ( $P<0.01$ ) in the no-reflow region of the MCAO/R mouse model. Compared with the model group, HQCTY groups with medium and high doses exhibited significantly increased microvessel density and upregulated VEGF expression in the no-reflow region of the MCAO/R mouse model ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Immunofluorescence and Western blot assays demonstrate that compared with the model group, HQCTY groups with medium and high doses exhibit significantly downregulated protein expression of p-RIPK1, p-RIPK3, and p-MLKL in the no-reflow region of the MCAO/R mouse model ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the model group, HQCTY groups with medium and high doses exhibited significantly downregulated levels of IL- $1\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-18 in the no-reflow region of the MCAO/R mouse model ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** HQCTY may regulate the RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway, inhibiting necroptosis, enhancing cerebral microcirculatory perfusion and acting on multiple targets to improve the no-reflow phenomenon and associated neuronal damage following cerebral ischemia-reperfusion. These findings indicate its promising neuroprotective potential and application prospects.

**[Keywords]** cerebral ischemia-reperfusion; no-reflow phenomenon; Huangqi Chongteng Yin; blood-brain barrier; necroptosis

缺血性脑卒中是全球范围内致残致死的主要原因之一,超早期血管再通以快速恢复脑组织血流再灌注是挽救濒死神经元、改善患者预后的关键治疗策略<sup>[1]</sup>。然而,在成功实现大血管再灌注的患者中,仍有50%以上脑缺血区域无法恢复有效微循环血流,即缺血再灌注无复流现象<sup>[2]</sup>。脑缺血再灌注无复流发生机制复杂,包括微血管痉挛、血管内皮

损伤、炎症反应、血脑屏障(BBB)损伤等多种病理过程,最终导致微血管通透性改变、毛细血管闭塞及脑组织水肿,从而阻碍有效的组织再灌注<sup>[3]</sup>,导致缺血核心区及半暗带组织仍无法获得实质性氧合血液供应,成为阻碍神经功能恢复、限制再灌注治疗获益并最终影响患者预后的关键瓶颈<sup>[4]</sup>。因此,寻找能够干预缺血再灌注无复流现象的治疗手段,

对于提升再灌注治疗整体疗效、改善脑卒中患者预后具有重要意义。

坏死性凋亡是一种具有程序调控特性的细胞死亡方式,尽管其在形态上类似于传统坏死,但发生依赖于特定的分子机制,主要由受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RIPK)1、RIPK3及混合谱系激酶样蛋白(MLKL)介导<sup>[5]</sup>,是导致缺血再灌注微循环障碍和BBB破坏的重要机制之一<sup>[6]</sup>。在缺血再灌注过程中,RIPK1与RIPK3相互作用形成“坏死小体”并相互磷酸化,进一步激活MLKL,促使MLKL磷酸化并转位至细胞膜,引发膜孔形成和通透性显著增加,最终导致细胞裂解,大量促炎因子及损伤相关分子模式(DAMPs)被释放,诱发强烈炎症反应,加重BBB破坏、诱发毛细血管堵塞与水肿,从而导致微循环灌注无法重建<sup>[7-8]</sup>。因此,坏死性凋亡是无复流现象发生的关键病理驱动因素,靶向调控RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路,有望为改善脑缺血再灌注无复流现象提供新策略。

黄芪虫藤饮(HQCTY)为国医大师熊继柏教授在长期临床实践中基于“气虚络瘀”病机所创制的经验方,具有益气活血、祛瘀通络之效。熊继柏教授强调“气为血之帅”,气虚则血失推动之力,血行不畅,瘀阻脑络,乃缺血再灌注无复流现象之根本病机,故以调补气机、活血通络为标本兼顾之策。既往研究证实,HQCTY可促进脑缺血灶周围区域的血管新生<sup>[9]</sup>,有效降低患者外周血中炎症因子水平,改善血液流变学特征,从而改善神经功能缺损<sup>[10]</sup>。然而,HQCTY通过抑制坏死性凋亡改善脑缺血再灌注无复流现象发挥神经保护作用有待进一步深入剖析。

为此,本研究拟通过构建小鼠大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)模型,采用脑血流监测、组织病理学观察、血管新生标志物检测、BBB结构与功能评估、坏死性凋亡通路分析及炎症因子表达水平等多维指标,系统探讨HQCTY对小鼠MCAO/R模型无复流现象的干预作用,进一步明确神经保护机制。本研究旨在从效应、作用和分子机制多个层面揭示HQCTY改善MCAO/R模型无复流现象的作用,为临床脑卒中血管再通后微循环灌注障碍的中医药干预提供理论依据和实验支持。

## 1 材料

**1.1 动物** 选用SPF级雄性C57BL/6J小鼠(体重22~25 g),购自湖南博瑞鑫生物科技有限公司,动物合格证号SCXK(粤)2022-0063。小鼠饲养于湖

南中医药大学第一附属医院医学创新实验中心,许可证号SYXK(湘)2020-0010,饲养环境维持室温22~24℃、相对湿度50%~60%,光照周期为12 h光照/12 h黑暗。小鼠于实验开始前适应性饲养1周。

**1.2 伦理** 动物实验方案已获湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号ZYFY20231110-170)。

**1.3 药物** HQCTY由黄芪40 g、鸡血藤10 g、海风藤10 g、络石藤10 g、僵蚕10 g、全蝎5 g、蜈蚣1条(约1 g)、地龙10 g、甘草6 g组成,所有中药均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,并经湖南中医药大学第一附属医院药剂科张裕民主任药师鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》标准。所有药材加10倍量水浸泡30 min,煎煮1 h;滤渣后,药渣加8倍量水再煎煮1 h。合并2次煎煮所得药液,使用旋转蒸发仪浓缩,制备HQCTY药物浸膏。HQCTY经2次煎煮合并药液、旋转蒸发浓缩得浸膏18.69 g,以生药质量计收率为18.32%,置于4℃冷藏保存备用。使用前,取适量HQCTY药物浸膏,以蒸馏水稀释至每1 mL含原生药1 g的质量浓度。按照《药理实验方法学》<sup>[11]</sup>人与动物体表面积换算法,70 kg成人日剂量生药为102 g,人与小鼠体表面积换算系数为9.1,则小鼠给药剂量为13.26 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。丁苯酞软胶囊购自石药集团恩必普药业有限公司,国药准字H20050299,成人1 d用量为0.6 g,则小鼠给药剂量为0.078 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。

**1.4 试剂** 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)、伊文思蓝染料(德国Merck公司,货号分别为T8877、E2129);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、尼氏染色液(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为C0105S、C0117);银染试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号G3260);紧密连接蛋白-1(ZO-1)抗体、血小板内皮细胞黏附分子1(CD31)抗体、磷酸化(p)-RIPK3抗体、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)、山羊抗小鼠IgG(英国Abcam公司,货号分别为ab221547、ab222783、ab205421、ab8226、ab205718、ab205719);闭锁蛋白-5(Claudin-5)抗体、p-MLKL抗体、血管内皮生长因子(VEGF)抗体(美国Thermo Fisher公司,货号分别为35-2500、MA5-32752、MA5-13182);RIPK1抗体、p-RIPK1抗体、RIPK3抗体、MLKL抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为17519-1-AP、66854-1-Ig、17563-1-AP、66675-1-Ig);Fluoro-Jade B(FJB)荧光染料(武

汉安捷凯生物医药科技有限公司,货号TR-150-FJB);Cy3-标记羊抗兔IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)-标记羊抗鼠IgG(北京博奥森生物技术有限公司,货号分别为bs-0295G-Cy3、bs-0296G-FITC);小鼠白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-18(IL-18)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号分别为E-EL-M0037、E-EL-M0044、E-EL-M3063、E-EL-M0730)。

**1.5 仪器** A4-162050型MCAO栓线(北京西浓科技有限公司);ML204型电子天平(瑞士METTLER TOLEDO有限公司);CM1950型冰冻切片机、TCS SP8型激光共聚焦显微镜、RM2016型石蜡切片机(德国Leica公司);IX73型荧光显微镜(日本Olympus公司);ELx800型酶标仪(美国BioTek公司);moor FLPI-2型激光多普勒血流仪(英国Moor Instruments公司);Mini-PROTEAN Tetra System型电泳仪及转膜系统(美国Bio-Rad公司);5200 Multi型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 构建小鼠脑MCAO/R模型** 采用改良线栓法构建MCAO/R模型<sup>[12]</sup>;C57BL/6J小鼠经阿佛丁<sup>[13]</sup>(20 mL·kg<sup>-1</sup>)麻醉后,颈部正中切开并钝性分离暴露右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。夹闭颈总动脉和颈内动脉近心端,结扎颈外动脉远心端并剪开小口插入栓线,从颈外动脉插入颈内动脉,沿颈内动脉缓慢推进至大脑中动脉起始部位至有阻力,松开动脉夹,固定线栓,阻断血流2 h后拔除线栓恢复灌注。术中保持体温恒定在(37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C。再灌注后2 h采用Zea-Longa神经功能评分法初步判断模型成功情况<sup>[14]</sup>,评分1~3分者纳入实验,0分或4分者剔除。

**2.2 分组及给药** 实验小鼠随机分为6组,分别为假手术组(Sham组)、模型组(Model组)、HQCTY低剂量组(HQCTY-L组)、HQCTY中剂量组(HQCTY-M组)、HQCTY高剂量组(HQCTY-H组)和阳性对照丁苯酞组(NBP组),每组15只。Sham组仅分离颈动脉不插线栓,灌胃等体积生理盐水;Model组构建MCAO/R模型后灌胃等体积生理盐水;HQCTY-L、HQCTY-M及HQCTY-H组在构建MCAO/R模型基础上分别给予HQCTY灌胃,剂量分别为6.63、13.26、26.52 g·kg<sup>-1</sup>;NBP组在构建MCAO/R模型基础上给予丁苯酞灌胃,剂量为78 mg·kg<sup>-1</sup>。各组均每日灌胃1次,连续给药7 d。

**2.3 改良神经功能缺损评分(mNSS)评价神经功能损伤** 在造模后给药第1、3、7天通过mNSS评估小鼠的神经功能障碍程度<sup>[15]</sup>。mNSS系统综合评定运动、感觉、平衡及反射功能,评分范围为0~18分,得分越高表示神经功能损伤越严重。评分标准包括前肢及后肢屈曲程度、对刺激的感觉反应、平衡能力及吞咽、眨眼、耳廓反射等基本反射,具体赋分依据行为缺失的程度进行判断。0分表示神经功能正常,1~6分为轻度功能缺损,7~12分为中度缺损,13分及以上为重度损伤。所有评分均由2名经培训的实验人员在盲法条件下独立完成,取平均值以确保评估结果的客观性与一致性。

**2.4 激光散斑脑血流成像(LSCI)评价脑组织血流灌注及无复流程度** 采用LSCI检测小鼠大脑皮质血流变化。实验中小鼠麻醉后固定于恒温平台[维持体温(37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C],将头部毛发剃除并暴露颅骨区域,保持颅骨完整,避免损伤硬膜。使用激光散斑血流成像仪对大脑皮质血流进行成像,并通过moorFLPIReviewV50软件进行图像分析,评估血流灌注指数(Flux)并计算相对灌注百分比:无复流侧Flux/健侧Flux $\times$ 100%以反映血流恢复程度。

**2.5 TTC染色检测缺血梗死灶及脑水肿体积** 实验小鼠经麻醉后处死,迅速取脑并在-80 $^{\circ}$ C冰箱中速冻5 min,于冰上沿冠状面切成2 mm厚脑切片。置于1%TTC溶液中,于37 $^{\circ}$ C恒温箱中避光孵育30 min,期间间隔15 min对脑片翻面以保持染色均匀。染色完成后,切片用磷酸盐缓冲液(PBS)洗净,并置于4%多聚甲醛溶液中固定。染色结果中,正常组织呈红色,缺血梗死组织因缺乏线粒体脱氢酶活性而呈白色。使用Image J图像分析软件对缺血梗死体积进行定量分析,结果以缺血梗死体积占总脑体积的百分比表示。梗死体积按缺血侧半球体积的百分比计算:(右侧半球体积-右侧非梗死体积)/右侧半球体积 $\times$ 100%。脑水肿体积按缺血侧右半球体积的百分比计算,计算公式:(右半球体积-左半球体积)/右半球体积 $\times$ 100%。

**2.6 HE染色观察无复流区域脑组织病理损伤** 脑组织经4%多聚甲醛固定、梯度乙醇脱水及石蜡包埋,制备4 $\mu$ m冠状连续切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,苏木素染色5 min,盐酸乙醇分色、返蓝后伊红复染2 min,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后中性树胶封片。光学显微镜下重点观察无复流区域神经元形态结构、炎性细胞浸润及水肿情况。病理学评分采用0~4分分级标准<sup>[16]</sup>:0分,神经

元结构规整,胞体完整,无明显病理改变;1分,偶见神经元变性、胞体轻度萎缩或核固缩,伴轻度水肿;2分,神经元固缩及染色质浓缩明显,局灶结构模糊并伴中度水肿;3分,神经元广泛变性/坏死,核碎裂,组织结构显著紊乱,伴明显水肿及血管扩张;4分,神经元大片坏死,结构崩解,伴显著出血、水肿及炎性细胞浸润。

### 2.7 尼氏染色检测无复流区域神经元尼氏体变化

切片脱蜡水化后,置于0.1%甲苯胺蓝染液37℃避光孵育20 min,蒸馏水漂洗,分色至背景透亮、尼氏体清晰。经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后封片。光学显微镜下重点观察无复流区域神经元尼氏体形态变化,其中正常神经元尼氏体呈深蓝色斑块状,损伤神经元表现为尼氏体减少、溶解或胞体固缩。采用Image J软件计算尼氏小体数目。

### 2.8 镀银染色检测无复流区域神经纤维结构损伤

切片脱蜡水化后转入氨银溶液(硝酸银-28%氨水4:1)37℃暗处浸染15 min,经甲醛溶液还原3 min,再以0.1%氯化金调色、5%硫代硫酸钠定影,脱水透明后二甲苯树脂封片剂(DPX)封片。光学显微镜下重点观察无复流区域神经纤维结构,其中正常轴突呈连续黑色细丝,病变轴突可见膨大、断裂或回缩球形成。采用Image J软件计算银染面积比。

### 2.9 FJB染色检测无复流区域变性神经元

脑组织于4%多聚甲醛固定后,经蒸馏水冲洗后梯度乙醇脱水,再次以蒸馏水洗净。将切片置于0.06%高锰酸钾溶液中处理10 min,轻轻摇动以增强背景清晰度并提高染色特异性。处理后用蒸馏水冲洗2 min,转入0.000 4% FJB染液避光染色30 min。染色完成后用蒸馏水冲洗3次,每次1 min,烘干后经二甲苯透明,封片。使用FITC滤片组荧光显微镜观察,FJB阳性变性神经元呈绿色荧光信号,以用于评估脑组织中神经元损伤程度。采用Image J图像分析软件计算FJB染色阳性细胞数。

### 2.10 伊文思蓝染色检测血脑屏障通透性

将伊文思蓝粉末溶解于生理盐水中配制成2%无菌溶液,避光保存。小鼠麻醉状态下腹主动脉注射2%伊文思蓝溶液,剂量为4 mL·kg<sup>-1</sup>体质量,注射完毕后维持麻醉状态,使伊文思蓝在血液循环中自由渗透30 min,经左心室插管以PBS进行全身灌注,直至肝脏及右心房流出液呈无色透明,确保完全清除血管内残余伊文思蓝。快速取出全脑,置于PBS中漂洗3次,滤纸吸干表面液体后拍照。切片后使用Image J图像分析软件对渗出区域进行面积测量,计

算渗出体积占比。

### 2.11 免疫荧光染色检测ZO-1/Claudin-5、CD31/VEGF、p-MLKL/p-RIPK3的表达

取石蜡包埋脑组织切片,于二甲苯中脱蜡后经梯度乙醇脱水,PBS冲洗。将切片置于10 mmol·L<sup>-1</sup>柠檬酸钠缓冲液中,加热修复抗原10 min,冷却后PBS冲洗。随后室温封闭1 h,分别加入一抗4℃孵育过夜:兔抗ZO-1(1:200)与鼠抗Claudin-5(1:100)、兔抗CD31(1:50)与鼠抗VEGF(1:100)、兔抗p-MLKL(1:200)与鼠抗p-RIPK3(1:100)。次日PBS洗涤后,加入二抗(1:300),避光孵育1 h。PBS冲洗3次后滴加DAPI染液,室温避光孵育5 min,PBS洗净后封片。使用荧光显微镜拍摄图像,图像分析采用Image J软件进行半定量分析。

### 2.12 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测坏死性凋亡相关蛋白表达

取-80℃冰冻保存的脑组织,提取无复流现象区域皮质组织,按1:10比例加入预冷放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液,冰浴机械匀浆。裂解液于4℃、12 000×g离心15 min(离心半径10 cm,下同),收集上清。采用蛋白定量法测定蛋白浓度后,按照每孔20 μg蛋白量加载于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶中进行电泳分离,随后转膜至PVDF膜上,5%脱脂牛奶室温封闭1 h。分别加入一抗:RIPK1(1:4 000)、RIPK3(1:2 000)、MLKL(1:10 000)、p-RIPK1抗体(1:5 000)、p-RIPK3(1:3 000)、p-MLKL(1:4 000)和β-actin(1:5 000),4℃摇床孵育过夜。次日用TBST洗膜3次,每次10 min,加入HRP标记的二抗(1:8 000),室温孵育1 h。洗膜后使用增强化学发光法(ECL)发光液显色,并采用凝胶成像系统获取条带图像。蛋白条带灰度值采用Image J软件分析,计算各条带灰度值。

### 2.13 采用ELISA检测无复流侧皮质区域IL-1β、IL-6、TNF-α及IL-18表达水平

小鼠麻醉处死后迅速取脑,分离无复流侧皮质组织,PBS轻柔冲洗去除血液残留后称质量,加入预冷PBS匀浆,4℃下以12 000×g离心15 min,取上清备用。于预包被96孔板中加入标准品与样本,上机操作按试剂盒说明书进行,37℃孵育1 h后洗板5次,加显色液孵育15 min并终止反应,450 nm波长读取吸光度A。采用四参数逻辑回归拟合标准曲线,计算样本浓度。

### 2.14 统计学分析

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用SPSS 25.0软件进行。数据正态性经Shapiro-Wilk检验评估,方差齐性经Levene检验

证。符合正态分布且方差齐性的多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若存在显著差异则通过 Tukey's HSD 检验进行事后多重比较;当数据不符合正态分布或方差齐性时,采用 Kruskal-Wallis *H* 秩和检验,组间差异经 Dunn-Bonferroni 校正进行多重比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 HQCTY 改善小鼠 MCAO/R 模型神经功能缺损** mNSS 结果表明,与 Sham 组比较,Model 组给药第 1、3、7 天 mNSS 评分均显著升高( $P<0.01$ ),提示小鼠存在明显神经功能缺损。与 Model 组比较, HQCTY-M 组和 HQCTY-H 组在给药第 3、7 天评分明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),提示中、高剂量 HQCTY 具有明显改善神经功能的作用,其中 HQCTY-H 组改善幅度最为显著。与给药第 1 天比较, HQCTY-M 组、HQCTY-H 组及 NBP 组在给药第 3、7 天评分显著下降( $P<0.01$ ),具有明显时间依赖性,见表 1。综上所述, HQCTY 可有效改善小鼠 MCAO/R 模型的神经功能缺损,呈剂量及时间依赖效应,其中高剂量 HQCTY 表现出更优的神经保护作用。

**3.2 HQCTY 改善小鼠 MCAO/R 模型无复流现象并提升脑血流灌注** LSCI 结果显示,与 Sham 组比较,

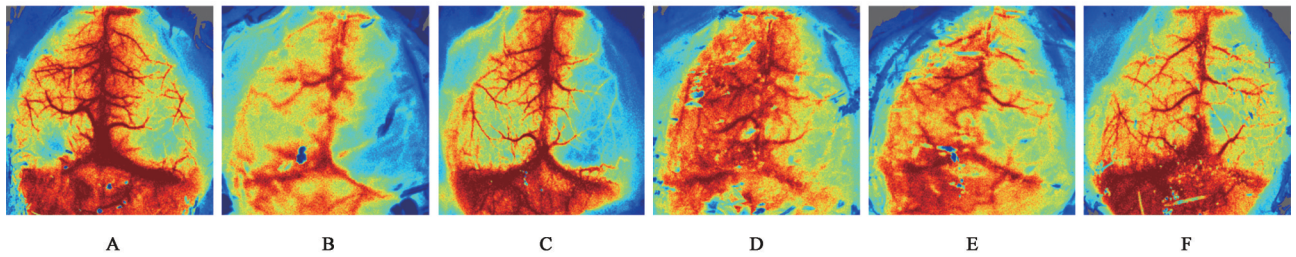
表 1 HQCTY 对各组 MCAO/R 小鼠不同时间点 mNSS 评分的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=15$ )

Table 1 Effect of HQCTY on mNSS scores at different time points in MCAO/R mice ( $\bar{x}\pm s, n=15$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	第 1 天	第 3 天	第 7 天
Sham 组		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Model 组		12.87±0.92 <sup>1)</sup>	12.67±0.82 <sup>1)</sup>	12.40±0.83 <sup>1,5,6)</sup>
HQCTY-L 组	6.63	12.60±0.91	11.60±1.06 <sup>4)</sup>	10.33±0.82 <sup>5,7)</sup>
HQCTY-M 组	13.26	12.73±0.88	11.06±1.03 <sup>2,5)</sup>	8.80±0.94 <sup>3,5,7)</sup>
HQCTY-H 组	26.52	12.67±0.82	10.07±0.88 <sup>3,5)</sup>	7.47±0.99 <sup>3,5,7)</sup>
NBP 组	0.078	12.80±0.94	9.33±0.82 <sup>3,5)</sup>	6.93±1.03 <sup>3,5,6)</sup>

注:与 Sham 组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与 Model 组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ ;与给药第 1 天时比较<sup>4)</sup> $P<0.05$ ,<sup>5)</sup> $P<0.01$ ;与给药第 3 天时比较<sup>6)</sup> $P<0.05$ ,<sup>7)</sup> $P<0.01$

Model 组脑皮质血流灌注显著降低( $P<0.01$ ),呈大面积低灌注蓝色区域,红黄色高灌注信号明显减少,提示再灌注后仍存在显著无复流现象。与 Model 组比较, HQCTY-M 组脑血流灌注显著增强( $P<0.01$ ),高灌注区域显著扩大; HQCTY-H 组脑血流灌注进一步显著提升( $P<0.01$ ),低灌注区域显著缩小( $P<0.01$ ),见图 1 和表 2。结果表明, HQCTY 可有效改善 MCAO/R 模型再灌注后局灶脑血流不足及无复流现象。



注: A. Sham 组; B. Model 组; C. HQCTY-L 组; D. HQCTY-M 组; E. HQCTY-H 组; F. NBP 组(图 2-图 11 同)

图 1 HQCTY 对小鼠 MCAO/R 模型无复流现象血流灌注障碍的影响 (LSCI)

Fig. 1 Effect of HQCTY on cerebral perfusion impairment caused by no-reflow phenomenon after MCAO/R model in mice (LSCI)

表 2 HQCTY 对小鼠 MCAO/R 模型无复流现象血流灌注障碍的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of HQCTY on cerebral perfusion impairment caused by no-reflow phenomenon after MCAO/R model in mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	与健侧脑血流灌注比/%
Sham 组		96.58±1.72
Model 组		57.75±4.84 <sup>1)</sup>
HQCTY-L 组	6.63	63.17±3.51
HQCTY-M 组	13.26	68.26±4.09 <sup>3)</sup>
HQCTY-H 组	26.52	78.10±3.73 <sup>3)</sup>
NBP 组	0.078	81.51±2.68 <sup>3)</sup>

注:与 Sham 组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与 Model 组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ (表 3-表 9 同)

**3.3 HQCTY 减轻小鼠 MCAO/R 模型无复流现象所致缺血梗死灶及脑水肿体积** TTC 染色结果显示,与 Sham 组比较, Model 组小鼠脑组织出现大面积白色梗死区域,缺血梗死灶体积显著增加( $P<0.01$ ),并伴明显脑组织水肿( $P<0.01$ ),提示无复流现象导致脑组织损伤显著加重。与 Model 组比较, HQCTY-M 组、HQCTY-H 组缺血梗死灶体积均显著减少( $P<0.01$ ),其中 HQCTY-H 组改善幅度最为显著,接近阳性药 NBP 组水平;同时, HQCTY-M 组、HQCTY-H 组脑组织水肿均明显减轻( $P<0.05, P<0.01$ ),见图 2 和表 3。表明 HQCTY 可有效减轻 MCAO/R 模型无复流现象所致脑缺血梗死及脑水肿损伤。

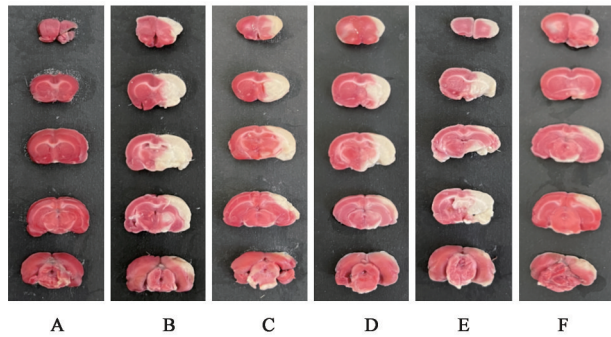


图2 HQCTY对小鼠MCAO/R无复流现象缺血梗死灶及脑水肿体积的影响

Fig. 2 Effect of HQCTY on ischemic infarct volume and brain edema in mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model

表3 HQCTY对小鼠MCAO/R模型无复流现象缺血梗死灶及脑水肿体积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of HQCTY on ischemic infarct volume and brain edema in mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	缺血梗死灶体积	脑水肿体积
Sham组		0.00±0.00	1.75±1.20
Model组		37.14±2.21 <sup>1)</sup>	23.70±1.41 <sup>1)</sup>
HQCTY-L组	6.63	34.51±1.61	22.46±1.59
HQCTY-M组	13.26	29.28±2.67 <sup>3)</sup>	20.71±1.13 <sup>2)</sup>
HQCTY-H组	26.52	23.39±1.28 <sup>3)</sup>	16.68±1.92 <sup>3)</sup>
NBP组	0.078	21.34±1.97 <sup>3)</sup>	15.04±1.07 <sup>3)</sup>

### 3.4 HQCTY改善小鼠MCAO/R模型无复流现象区域脑组织结构及神经元损伤 HE染色结果显

示,与Sham组比较,Model组小鼠无复流区域神经元出现明显核固缩、深染、胞体模糊及空泡样变,病理损伤显著加重( $P<0.01$ )。与Model组比较,HQCTY-H组病理损伤明显减轻,神经元排列趋于规整、胞体结构清晰,坏死及空泡样变显著减少( $P<0.01$ )。Nissl染色结果显示,与Sham组比较,Model组小鼠无复流区域神经元数量显著减少、尼氏小体显著减少或消失( $P<0.01$ ),提示神经元损伤显著加重。与Model组比较,HQCTY-H组神经元数量显著增加、细胞排列较整齐、尼氏小体密度显著提升( $P<0.01$ ),提示高剂量HQCTY对神经元具有明显保护作用。银染结果显示,与Sham组比较,Model组小鼠无复流区域神经纤维排列紊乱、密度显著降低,银染面积显著减少( $P<0.01$ ),提示神经纤维结构损伤加重。与Model组比较,HQCTY-M组、HQCTY-H组银染阳性神经纤维密度显著增加、走向趋于清晰、银染面积显著升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),提示HQCTY能明显改善无复流区域神经纤维损伤。FJB染色结果显示,与Sham组比较,Model组无复流区域可见大量FJB阳性细胞,绿色荧光信号显著增强( $P<0.01$ ),提示神经元变性坏死显著加重。与Model组比较,HQCTY-M、HQCTY-H组FJB阳性神经元数量均显著减少( $P<0.01$ ),提示HQCTY可显著减轻无复流区域神经元变性损伤。见图3-图6、表4。

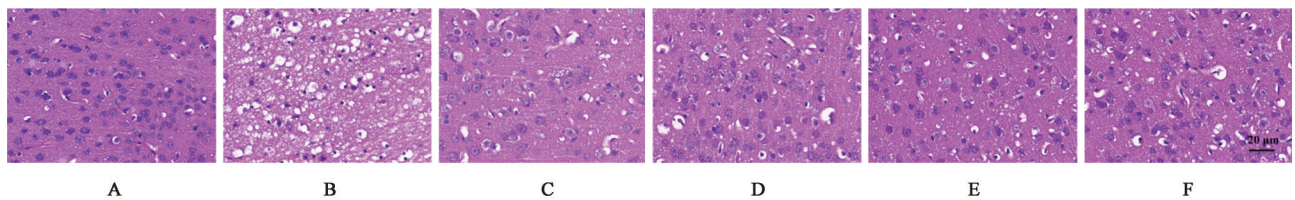


图3 HQCTY对小鼠MCAO/R模型无复流现象脑组织病理学变化的影响(HE,×400)

Fig. 3 Effect of HQCTY on histopathological changes in brain tissue of mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model (HE, ×400)

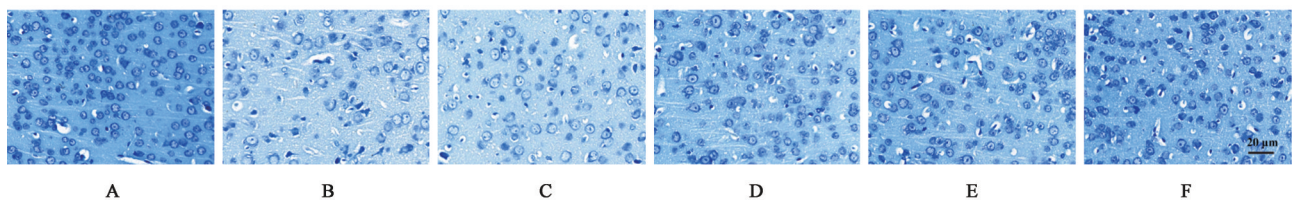


图4 HQCTY对小鼠MCAO/R模型无复流现象脑组织神经元的影响(尼氏,×400)

Fig. 4 Effect of HQCTY on neurons in brain tissue of mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model (Nissl, ×400)

### 3.5 HQCTY保护小鼠MCAO/R模型无复流现象血脑屏障结构与功能 伊文思蓝染色结果显示,与Sham组比较,Model组小鼠无复流区域蓝染显著增

强( $P<0.01$ ),提示BBB通透性显著增加。与Model组比较,HQCTY-M组和HQCTY-H组蓝染范围均显著缩小( $P<0.01$ ),提示HQCTY可有效减轻MCAO/R

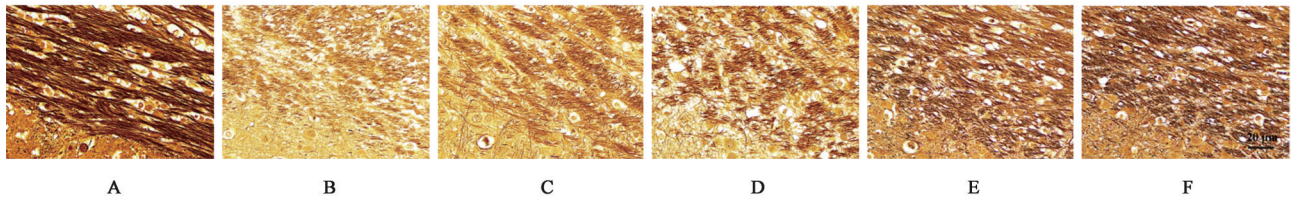


图5 HQCTY对小鼠MCAO/R模型无复流现象脑组织神经纤维结构的影响(镀银,×400)

Fig. 5 Effect of HQCTY on nerve fiber structure in brain tissue of mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model (Silver, ×400)

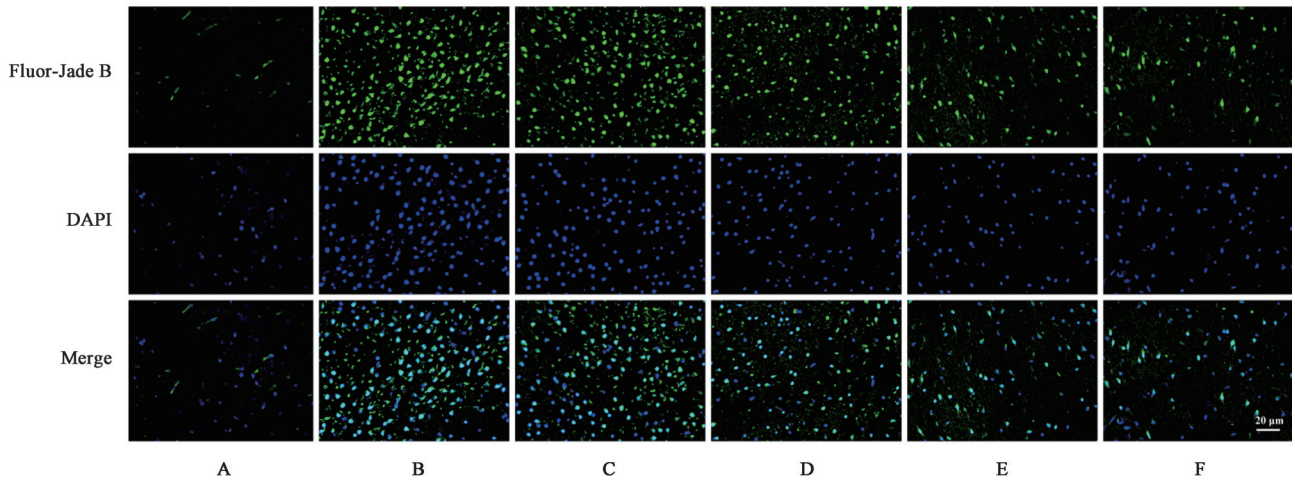


图6 HQCTY对小鼠MCAO/R模型无复流现象脑组织变性神经元的影响(FJB,×400)

Fig. 6 Effect of HQCTY on degenerative neurons in brain tissue of mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model (FJB, ×400)

表4 HQCTY对小鼠MCAO/R模型无复流现象脑组织病理学评分、尼氏小体数目、银染面积及FJB阳性细胞数的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of HQCTY on pathological scores, number of Nissl bodies, silver staining area and FJB-positive cells in brain tissue of mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	病理学评分/分	尼氏小体数量/个	银染面积比/%	FJB阳性细胞数/个
Sham组		0.00±0.00	65.60±6.58	34.05±3.09	5.80±2.59
Model组		3.60±0.55 <sup>1)</sup>	35.20±5.26 <sup>1)</sup>	4.57±1.71 <sup>1)</sup>	44.40±4.51 <sup>1)</sup>
HQCTY-L组	6.63	3.20±0.45	37.80±7.26	8.18±1.37	40.80±3.42
HQCTY-M组	13.26	2.60±0.55	44.00±5.24	11.20±1.86 <sup>3)</sup>	35.60±3.05 <sup>3)</sup>
HQCTY-H组	26.52	2.00±0.71 <sup>2)</sup>	49.40±2.89 <sup>3)</sup>	17.37±1.93 <sup>3)</sup>	26.20±2.17 <sup>3)</sup>
NBP组	0.078	1.60±0.55 <sup>3)</sup>	53.20±5.54 <sup>3)</sup>	25.65±2.23 <sup>3)</sup>	21.60±2.70 <sup>3)</sup>

R模型无复流区域BBB通透性增加。免疫荧光结果显示,与Sham组比较,Model组小鼠无复流区域Claudin-5与ZO-1表达显著减弱( $P<0.01$ ),提示BBB结构蛋白明显受损;与Model组比较,HQCTY-L组ZO-1荧光信号明显增强( $P<0.05$ ),

HQCTY-M组、HQCTY-H组Claudin-5及ZO-1荧光信号均显著增强,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),提示HQCTY可显著恢复无复流区域BBB紧密连接蛋白表达,从而改善BBB结构完整性。见图7、图8、表5。

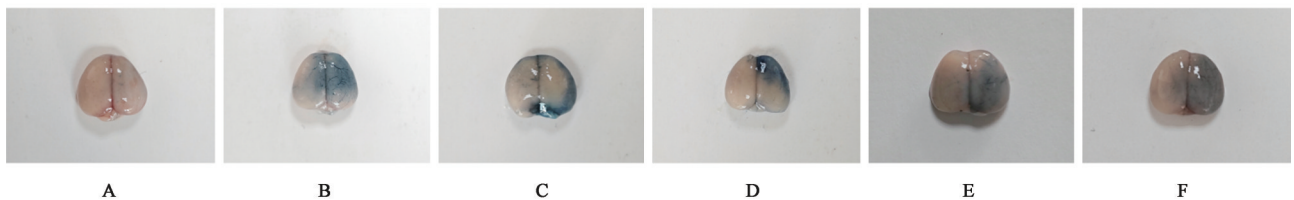


图7 HQCTY对小鼠MCAO/R模型无复流现象BBB通透性的影响

Fig. 7 Effect of HQCTY on BBB permeability in mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model

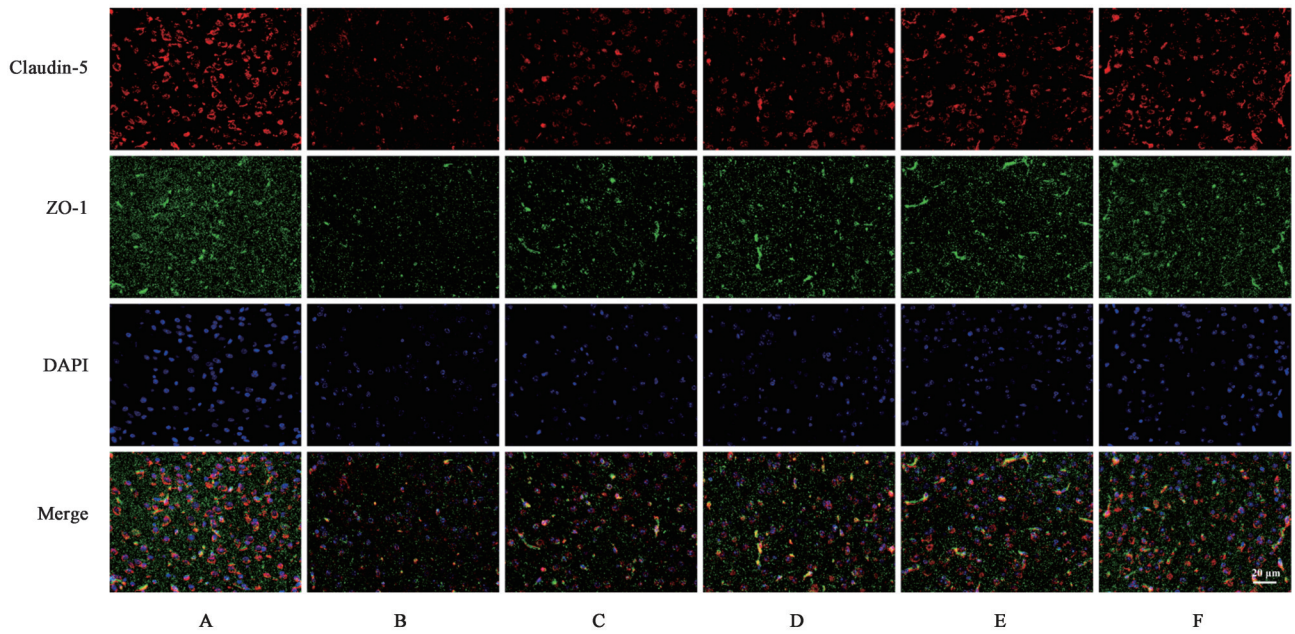


图8 HQCTY对MCAO/R模型无复流现象小鼠BBB结构蛋白的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 8 Effect of HQCTY on BBB structural proteins in mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model (IF, ×400)

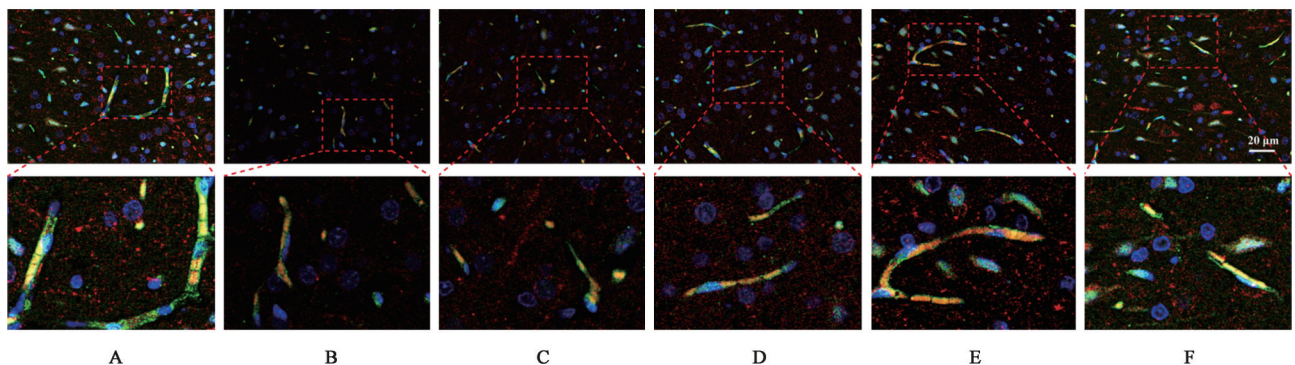
表5 HQCTY对小鼠脑组织伊文思蓝渗出体积占比及无复流侧脑组织Claudin-5、ZO-1平均荧光强度的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of HQCTY on percentage of Evans blue extravasation volume in brain tissue and average fluorescence intensity of Claudin-5 and ZO-1 in brain tissue no-reflow side of mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	伊文思蓝渗出体积比/%	Claudin-5平均荧光强度	ZO-1平均荧光强度
Sham组		0.00±0.00	45.67±2.83	42.95±2.91
Model组		32.80±1.63 <sup>1)</sup>	13.56±2.76 <sup>1)</sup>	12.13±2.07 <sup>1)</sup>
HQCTY-L组	6.63	29.93±1.23	16.84±2.52	17.03±1.65 <sup>2)</sup>
HQCTY-M组	13.26	25.68±2.09 <sup>3)</sup>	25.46±2.45 <sup>3)</sup>	20.79±2.57 <sup>3)</sup>
HQCTY-H组	26.52	21.02±2.30 <sup>3)</sup>	31.58±2.75 <sup>3)</sup>	28.06±1.45 <sup>3)</sup>
NBP组	0.078	17.87±1.65 <sup>3)</sup>	34.53±2.78 <sup>3)</sup>	31.78±2.09 <sup>3)</sup>

3.6 HQCTY促进小鼠MCAO/R模型无复流现象脑组织血管生成及微循环恢复 免疫荧光结果显示,与Sham组比较,Model组无复流区域微血管密度(MVD)及VEGF表达显著降低( $P<0.01$ ),提示血管新

生明显受损;与Model组比较,HQCTY-M组、HQCTY-H组无复流区域MVD和VEGF表达水平平均明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),见图9和表6,提示HQCTY可有效促进血管新生并改善局部微循环灌注。



注:CD31呈绿色;VEGF呈红色;细胞核以DAPI染成蓝色

图9 HQCTY对小鼠MCAO/R模型无复流现象脑组织血管生成及微循环的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 9 Effect of HQCTY on angiogenesis and microcirculation in brain tissue of mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model (IF, ×400)

表6 HQCTY对小鼠无复流区域MVD数量与VEGF平均荧光强度的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 6 Effect of HQCTY on MVD count and average fluorescence intensity of VEGF in no-reflow region of brain tissue of mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MVD数量/个	VEGF平均荧光强度
Sham组		29.40±2.70	55.98±4.06
Model组		12.00±2.24 <sup>1)</sup>	17.14±3.51 <sup>1)</sup>
HQCTY-L组	6.63	15.20±1.92	22.65±2.81
HQCTY-M组	13.26	17.60±2.07 <sup>2)</sup>	33.28±2.63 <sup>3)</sup>
HQCTY-H组	26.52	21.20±2.59 <sup>3)</sup>	40.63±3.57 <sup>3)</sup>
NBP组	0.078	23.80±2.39 <sup>3)</sup>	44.56±3.43 <sup>3)</sup>

3.7 HQCTY抑制小鼠MCAO/R模型无复流现象坏死性凋亡信号通路 免疫荧光双染结果显示,与Sham组比较,Model组无复流区域p-RIPK3及p-MLKL荧光信号显著增强( $P<0.01$ ),提示

MCAO/R模型无复流现象显著激活坏死性凋亡通路;与Model组比较,HQCTY-M组、HQCTY-H组p-RIPK3、p-MLKL荧光强度明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),见图10和表7,提示HQCTY抑制p-RIPK3/p-MLKL介导的坏死性凋亡通路活化,减轻无复流区域脑组织损伤。Western blot结果显示,各组RIPK1、RIPK3及MLKL总蛋白表达水平差异不明显。与Sham组比较,Model组p-RIPK1、p-RIPK3及p-MLKL相对表达量均显著升高( $P<0.01$ ),提示MCAO/R无复流现象显著激活RIPK1/RIPK3/MLKL介导的坏死性凋亡信号通路。与Model组比较,HQCTY-L组p-RIPK1表达明显降低( $P<0.05$ );HQCTY-M、HQCTY-H组p-RIPK1、p-RIPK3及p-MLKL表达水平均显著降低( $P<0.01$ ),见图11和表8,提示HQCTY可抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路激活,从而减轻坏死性凋亡损伤。

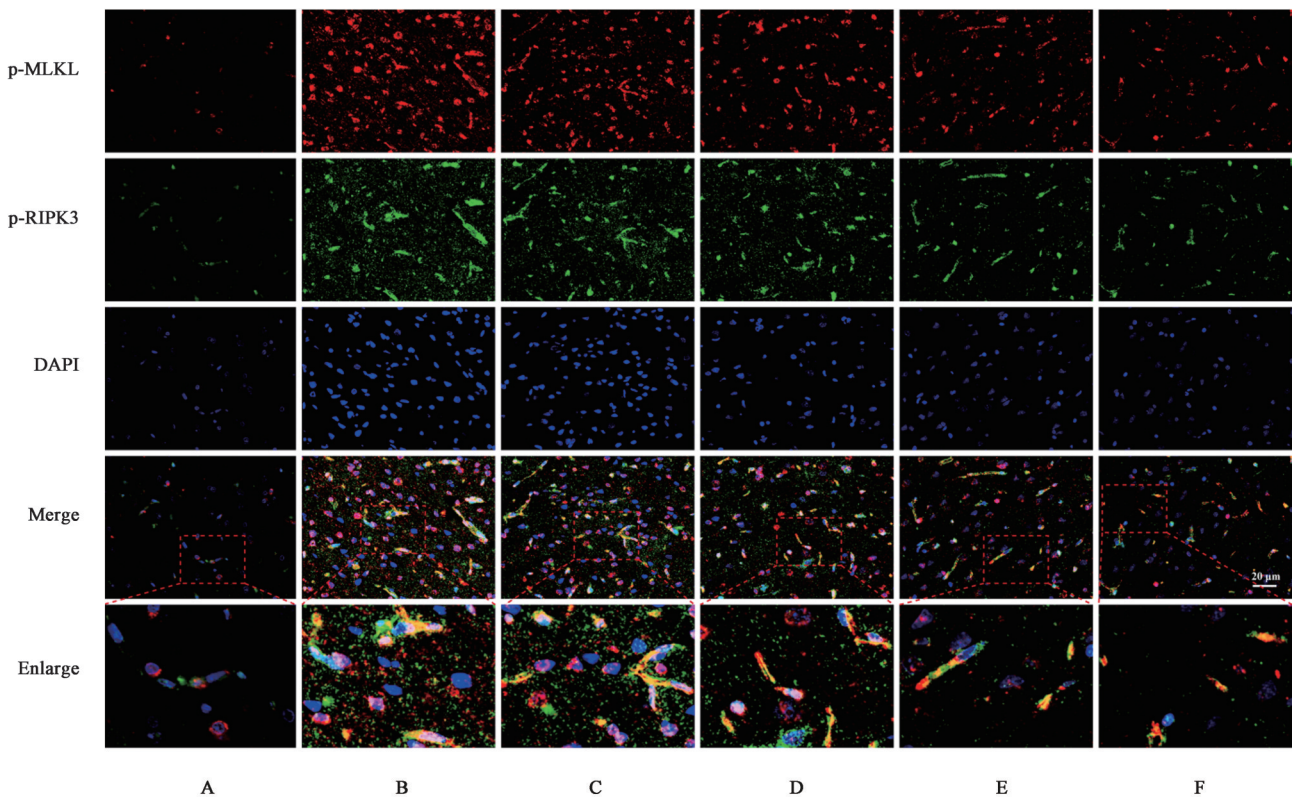


图10 HQCTY对MCAO/R模型无复流现象小鼠坏死性凋亡通路的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 10 Effect of HQCTY on necroptosis pathway in mice with no-reflow phenomenon after MCAO/R model (IF, ×400)

3.8 HQCTY减轻小鼠MCAO/R模型无复流现象区域脑组织炎症反应 ELISA结果显示,与Sham组比较,Model组无复流区域IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 及IL-18水平均显著升高( $P<0.01$ ),提示MCAO/R无复流现象伴随明显炎症反应。与Model组比较,HQCTY-M组、HQCTY-H组IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 及

IL-18水平均显著降低( $P<0.01$ ),见表9。提示HQCTY可抑制脑缺血再灌注后无复流区域的炎症因子表达,缓解炎症反应。

#### 4 讨论

重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)静脉溶栓和血管内机械取栓作为缺血性卒中患者超急性期

表 7 HQCTY 对小鼠无复流区域 p-MLKL 与 p-RIPK3 平均荧光强度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 7 Effect of HQCTY on average fluorescence intensity of p-MLKL and p-RIPK3 in no-reflow region of mice ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-MLKL 平均 荧光强度	p-RIPK3 平均 荧光强度
Sham 组		4.92±1.40	4.33±1.13
Model 组		37.44±3.27 <sup>1)</sup>	34.57±2.54 <sup>1)</sup>
HQCTY-L 组	6.63	34.96±1.75	31.99±2.13
HQCTY-M 组	13.26	32.12±2.91 <sup>2)</sup>	27.90±1.95 <sup>3)</sup>
HQCTY-H 组	26.52	23.31±1.42 <sup>3)</sup>	19.95±2.03 <sup>3)</sup>
NBP 组	0.078	20.45±2.60 <sup>3)</sup>	18.35±1.22 <sup>3)</sup>

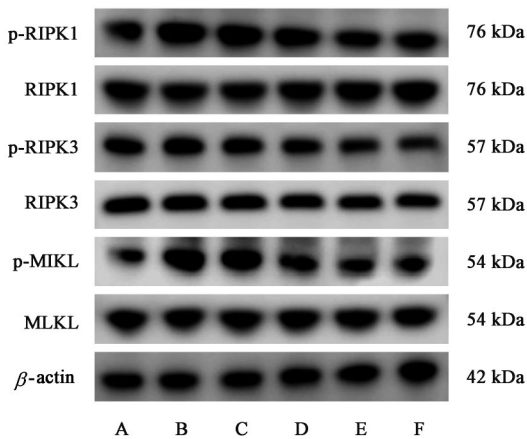


图 11 MCAO/R 模型小鼠无复流现象区域 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路蛋白表达电泳

Fig. 11 Electrophoresis of RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway proteins expression in no-reflow regions of brain tissue in MCAO/R mice

表 9 HQCTY 对小鼠无复流区脑组织中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-18 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 9 Effect of HQCTY on expression levels of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-18 in no-reflow brain region of mice ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-18
Sham 组		48.06±11.28	52.81±6.79	140.37±18.52	83.62±17.14
Model 组		151.71±14.14 <sup>1)</sup>	131.01±11.01 <sup>1)</sup>	274.51±19.41 <sup>1)</sup>	251.58±18.02 <sup>1)</sup>
HQCTY-L 组	6.63	138.12±15.94	115.49±9.66	245.74±11.78	223.83±20.33
HQCTY-M 组	13.26	106.09±13.17 <sup>3)</sup>	97.32±6.48 <sup>3)</sup>	212.65±13.42 <sup>3)</sup>	188.85±17.75 <sup>3)</sup>
HQCTY-H 组	26.52	78.71±13.37 <sup>3)</sup>	81.77±7.72 <sup>3)</sup>	179.01±14.85 <sup>3)</sup>	147.36±15.68 <sup>3)</sup>
NBP 组	0.078	73.36±10.93 <sup>3)</sup>	74.23±6.51 <sup>3)</sup>	172.64±12.60 <sup>3)</sup>	138.78±11.52 <sup>3)</sup>

缺血再灌注后无复流现象属于中医缺血性中风疾病范畴,气虚络瘀为其根本病机。《灵枢·脉度第十七》提出:“经脉为里,支而横者为络”,强调络脉分布细密,血流缓慢,主司输布气血、濡养组织<sup>[23]</sup>。络脉“易瘀易阻”的病理特性与无复流阶段的微循环灌注障碍高度吻合。历代医家均重视“气为血之帅”,南宋杨士瀛《仁斋直指方》明示“血脉之

表 8 HQCTY 对小鼠无复流区域 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路蛋白及磷酸化相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of HQCTY on relative expression levels of RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway proteins and phosphorylation in no-reflow region of mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	p-RIPK1 /RIPK1	p-RIPK3 /RIPK3	p-MLKL /MLKL
Sham 组		0.33±0.02	0.38±0.02	0.21±0.03
Model 组		0.76±0.02 <sup>1)</sup>	0.84±0.02 <sup>1)</sup>	0.69±0.02 <sup>1)</sup>
HQCTY-L 组	6.63	0.71±0.02 <sup>2)</sup>	0.80±0.02	0.66±0.02
HQCTY-M 组	13.26	0.67±0.03 <sup>3)</sup>	0.71±0.02 <sup>3)</sup>	0.58±0.01 <sup>3)</sup>
HQCTY-H 组	26.52	0.63±0.02 <sup>3)</sup>	0.60±0.01 <sup>3)</sup>	0.50±0.01 <sup>3)</sup>
NBP 组	0.078	0.57±0.01 <sup>3)</sup>	0.54±0.03 <sup>3)</sup>	0.45±0.02 <sup>3)</sup>

的核心治疗策略,在改善患者预后方面取得显著成效。随着血管再通技术的进步和治疗窗口的延长,接受再通治疗的患者日益增多,而再灌注后无复流现象亦愈发常见<sup>[17-18]</sup>。无复流现象本质为再灌注后毛细血管层面灌注失败,涉及微循环阻塞、血脑屏障破坏及炎症放大等多重病理过程,从而使再灌注后脑组织损伤呈持续恶化趋势<sup>[19]</sup>。研究表明,坏死性凋亡作为一种受程序调控的炎性细胞死亡方式,在无复流形成过程中发挥关键推动作用<sup>[20]</sup>。与典型凋亡不同,坏死性凋亡不仅引起更剧烈的细胞膜破裂与通透性改变,还通过释放大量促炎因子,进一步激化局部炎症反应与血脑屏障损伤,形成微循环障碍的恶性正反馈环路<sup>[21-22]</sup>。

所以流行者,气也”,明代张介宾亦指出“气虚血滞,无力流通而然”,提示气虚推动无力、血滞络瘀是无复流发生的关键病机。现代临床常用的 rt-PA 溶栓药,药性峻猛,类比中医破血逐瘀之品,具苦泄、辛散之性,虽能破除瘀血,但其“泄”“散”之性亦易耗伤气机。临床研究进一步证实,脑梗死患者溶栓后实证减轻而气虚证渐显,提示再灌注过程本身可能

诱发或加重“气虚络瘀”状态<sup>[24-25]</sup>。基于此,国医大师熊继柏教授创立HQCTY,立意于益气活血,祛瘀通络,方中黄芪重用为君,取其大补元气之功,气足则血行有力,旨在从根源上解决“气虚推动无力”之关键病机,为全方提供动力之源;鸡血藤、海风藤、络石藤三藤合用既能助君药黄芪行血,又能养血以防祛瘀伤正,兼能舒利肢体及脑窍络脉之瘀滞;佐以全蝎、蜈蚣、地龙、僵蚕虫类药物,以其走窜、力擅搜剔之性,深入细小络脉破逐顽固瘀血,非草木之品所能及。全方补而不滞,通而不伤,搜剔瘀邪,临床治疗缺血性中风疗效颇佳。

本研究显示,HQCTY可在脑缺血再灌注后无复流阶段发挥多维度脑保护效应。功能学上,HQCTY可显著降低mNSS评分,并提升无复流区域局部脑血流灌注水平,提示HQCTY能够改善再灌注后微循环动力学障碍,从而促进神经功能恢复。病理形态学结果进一步证实,HQCTY可明显减少梗死体积、减轻脑水肿,增加尼氏小体数量,并改善神经元排列紊乱、轴突断裂及变性神经元增多等组织损伤特征,说明HQCTY不仅减轻实质性损伤程度,还具有保持神经元结构完整性的能力。Claudin-5与ZO-1作为维持BBB选择性通透性和结构稳定的关键紧密连接蛋白,其表达降低是脑缺血再灌注后BBB损伤的重要机制。本研究发现,HQCTY可显著增强Claudin-5及ZO-1表达,并降低伊文思蓝外渗水平,提示HQCTY通过维持BBB结构与屏障功能改善局部血管微环境。同时,HQCTY可显著上调CD31/VEGF表达并增加MVD数量,表明HQCTY不仅保护原有血管结构,还可促进血管新生,从而实现由损伤抑制向灌注修复的双向干预,促进无复流区域局部血供恢复。

坏死性凋亡是再灌注后无复流恶化的重要炎性细胞死亡形式,其由RIPK1、RIPK3及MLKL介导的坏死小体活化是关键节点。本研究结果显示,HQCTY能够显著下调无复流侧皮质区p-RIPK1、p-RIPK3及p-MLKL表达,同时伴随IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 及IL-18水平明显降低,提示HQCTY既可阻断坏死小体驱动的炎性细胞死亡过程,又可减轻继发炎症放大效应。RIPK3作为坏死性凋亡信号通路的核心激酶,磷酸化其底物MLKL,导致MLKL发生构象变化、寡聚化并转位到细胞膜上形成孔洞或破坏膜完整性,最终引发炎性细胞死亡<sup>[26]</sup>。已有研究证实RIPK3与脑缺血性损伤密切相关,缺血性中风体内和体外实验RIPK3敲低能显著抑制神经元

死亡<sup>[27]</sup>。同时,炎症反应亦是脑缺血再灌注损伤的重要机制,其可通过促进细胞因子级联释放、加剧血脑屏障破坏与微循环障碍等途径进一步放大组织损伤<sup>[28]</sup>。本研究表明HQCTY可同时抑制RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路与炎症因子表达,从坏死性凋亡与炎症双维度改善无复流导致的脑组织损伤,发挥神经保护作用。此外,黄芪中的黄芪皂苷IV已被证实能增强小鼠大脑中动脉闭塞后MVD,以及梗死周围皮层微血管周围的星形胶质细胞和周细胞的覆盖,促进缺血小鼠的脑血流恢复和血管生成,进一步为其复方的药效提供理论与实验依据<sup>[29]</sup>。然而,本研究在机制层面仍存在一定局限性,坏死性凋亡与其他炎性程序性细胞死亡形式之间是否存在相互耦联调控,以及其上游关键调控节点仍未完全明确。未来研究需进一步深入解析其上游调控网络及关键靶点。

综上所述,HQCTY通过改善脑微循环灌注、恢复局部脑血流,增强血脑屏障完整性并促进血管新生,靶向抑制RIPK1/RIPK3/MLKL介导的坏死性凋亡通路减轻神经炎症,改善脑缺血再灌注后无复流现象及神经损伤。该复方通过重建微循环与提供神经保护的双重作用,为突破再灌注治疗瓶颈提供了新的干预思路,也为再灌注后中药联合干预策略的临床转化提供了实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] NGUYEN T N, ABDALKADER M, FISCHER U, et al. Endovascular management of acute stroke[J]. *Lancet*, 2024, 404(10459):1265-1278.
- [2] SUN F, ZHOU J, CHEN X, et al. No-reflow after recanalization in ischemic stroke: From pathomechanisms to therapeutic strategies[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2024, 44(6):857-880.
- [3] JIA M, JIN F, LI S, et al. No-reflow after stroke reperfusion therapy: An emerging phenomenon to be explored[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(2):e14631.
- [4] ZHANG Y, JIANG M, GAO Y, et al. "No-reflow" phenomenon in acute ischemic stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2024, 44(1):19-37.
- [5] MAO R, ZONG N, HU Y, et al. Neuronal death mechanisms and therapeutic strategy in ischemic stroke[J]. *Neurosci Bull*, 2022, 38(10):1229-1247.
- [6] CHEN A Q, FANG Z, CHEN X L, et al. Microglia-derived TNF- $\alpha$  mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7):487.

- [ 7 ] REN K, PEI J, GUO Y, et al. Regulated necrosis pathways: A potential target for ischemic stroke[J]. Burns Trauma, 2023, doi:10.1093/burnst/tkad016.
- [ 8 ] WANG Q, YANG F, DUO K, et al. The role of necroptosis in cerebral ischemic stroke[J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(7): 3882-3898.
- [ 9 ] HE H X, GAO X F, SHE Y, et al. Experimental study on the effect of *Astragalus* and vine decoction on the expression of vascular endothelial growth factor and receptor mRNA in peripheral tissues of ischemic stroke rats[J]. J Clin Exp Med, 2018, 17(22):2367-2370.
- [ 10 ] 贺海霞, 余颜, 刘芳, 等. 黄芪虫藤饮对气虚血瘀型缺血性脑卒中患者有效性及安全性研究[J]. 中国中医急症, 2019, 28(1):63-66.
- HE H X, SHE Y, LIU F, et al. Study on the efficacy and safety of Huangqi Chongteng decoction on ischemic stroke patients with qi deficiency and blood stasis[J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2019, 28(1):63-66.
- [ 11 ] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002:203.
- XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Pharmacological Experimental Methodology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:203.
- [ 12 ] YAO Y, HU S, ZHANG C, et al. Ginsenoside Rd attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by exerting an anti-pyrototic effect via the miR-139-5p/FoxO1/Keap1/Nrf2 axis[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 105:108582.
- [ 13 ] CHEN J, ZHANG X, LIU X, et al. Ginsenoside Rg<sub>1</sub> promotes cerebral angiogenesis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in ischemic mice[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 856: 172418.
- [ 14 ] 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.
- [ 15 ] ZHOU H, YAN L, HUANG H, et al. Tat-NTS peptide protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury via ANXA1 SUMOylation in microglia[J]. Theranostics, 2023, 13(15):5561-5583.
- [ 16 ] 杨仁义, 颜思阳, 周德生, 等. 基于“TF-miRNA”反馈环探讨活血荣络方对脑梗死大鼠的保护作用及机制[J]. 中成药, 2021, 43(6):1429-1437.
- YANG R Y, YAN S Y, ZHOU D E, et al. TF-miRNA feedback loops-based study on Huoxue Rongluo Recipe's protective effect and working mechanism on cerebral infarction rats[J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(6): 1429-1437.
- [ 17 ] NIE X, LENG X, MIAO Z, et al. Clinically ineffective reperfusion after endovascular therapy in acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2023, 54(3):873-881.
- [ 18 ] NG F C, CHURILLOV L, YASSI N, et al. Prevalence and significance of impaired microvascular tissue reperfusion despite macrovascular angiographic reperfusion (no-reflow [J]. Neurology, 2022, 98(8):e790-e801.
- [ 19 ] RIVET S, CHURILLOV L, YASSI N, et al. Persistent tissue-level hypoperfusion (no-reflow) negates the clinical benefit of successful thrombectomy[J]. Stroke, 2025, 56(6):1451-1459.
- [ 20 ] LI Y, ZOU C, CHEN C, et al. Myeloid-derived MIF drives RIPK1-mediated cerebromicrovascular endothelial cell death to exacerbate ischemic brain injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120(5):e2219091120.
- [ 21 ] ZHANG X, LI H, ZHAO Y, et al. Neuronal injury after ischemic stroke: Mechanisms of crosstalk involving necroptosis[J]. Mol Neurosci, 2025, 75(1):15.
- [ 22 ] DU B, DENG Z, CHEN K, et al. Iron promotes both ferroptosis and necroptosis in the early stage of reperfusion in ischemic stroke[J]. Genes Dis, 2024, 11(6):101262.
- [ 23 ] 辛铭正, 曹晓岚, 孙灵芝. 基于络病理论探讨分水岭脑梗死的病理机制及中医药治疗进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(3):128-131.
- XIN M Z, CAO X L, SUN L Z. Discussion on the pathological mechanism of cerebral watershed infarction and treatment progress of traditional Chinese medicine based on the theory of collateral disease [J]. Pract J Card Cereb Pneuvasc Dis, 2021, 29(3):128-131.
- [ 24 ] 吴婧, 张志辰, 李中浩, 等. 急性脑梗死患者静脉溶栓后中医证候要素演变[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(1):74-78.
- WU J, ZHANG Z C, LI Z H, et al. Evolution of TCM pattern elements after intravenous thrombolysis in patients with acute cerebral infarction[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2020, 43(1):74-78.
- [ 25 ] HU J, XU R Q, LV X L, et al. A study on the prognostic factors and TCM syndromes of intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke patients[J]. Clin J Chin Med, 2025, 17(14):91-100.
- [ 26 ] ZHANG Y Y, LIU W N, LI Y Q, et al. Ligustroflavone reduces necroptosis in rat brain after ischemic stroke through targeting RIPK1/RIPK3/MLKL pathway [J]. N-S Arch Pharmacol, 2019, 392(9):1085-1095.
- [ 27 ] LI L, SONG J J, ZHANG M X, et al. Oridonin ameliorates caspase-9-mediated brain neuronal apoptosis in mouse with ischemic stroke by inhibiting RIPK3-mediated mitophagy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(4):726-740.
- [ 28 ] 曾媛媛, 朱其凤, 张永全. 缺血性脑卒中与相关信号通路的关系及中医药调控的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(20):252-263.
- ZENG Y Y, ZHU Q F, ZHANG Y Q. Relationship between ischemic stroke and related signaling pathways and regulation of traditional Chinese medicine: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(20):252-263.
- [ 29 ] SHI G, CHEN J, ZHANG C, et al. Astragaloside IV promotes cerebral angiogenesis and neurological recovery after focal ischemic stroke in mice via activating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Heliyon, 2023, 9(12):e22800.

[责任编辑 孙丛丛]