·实验研究·

基于 NLRP3/ASC/Caspase－1 细胞焦亡通路探讨补肾启智方改善缺血性脑卒中大鼠认知功能的作用机制*

巩俐[1]，刘雪梅[2]，罗超琴[2]，王翎沣[2]，马承平[2]，张艺馨[2]，卢佳慧[2]，傅晨[2]

1. 北京中医药大学，北京 100029；2. 北京中医药大学东方医院，北京 100078

摘要：目的：探讨补肾启智方通过调控核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白 3（NOD－like receptor protein3，NLRP3）/凋亡相关斑点样蛋白（apoptosis－associated speck－like protein containing CARD，ASC）/半胱天冬酶－1（Caspase－1）信号通路，介导海马神经元焦亡，改善大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）大鼠认知障碍的作用机制。方法：将 40 只 Wistar 大鼠随机分为 sham 组、MCAO 组、补肾启智方组（BSQZ，14.4 g·kg^{-1}）、焦亡抑制剂组（Ac－YVAD－CMK，5 mg·kg^{-1}），每组 10 只。除 sham 组外，其余大鼠采用改良 Longa 线栓法建立 MCAO 模型。采用 Morris 水迷宫实验和新物体识别（novel object recognition，NOR）实验评估大鼠的学习与记忆功能；ELISA 法检测大鼠海马组织中白细胞介素－1β（interleukin－1β，IL－1β）和白细胞介素－18（interleukin－18，IL－18）含量；免疫荧光法检测大鼠海马组织中消皮素 D－N（gasdermin D－N，GSDMD－N）阳性细胞数目；Western blot 法检测大鼠海马组织中 GSDMD－N、NLRP3、ASC、活化半胱天冬酶－1（c－Caspase－1）表达水平。结果：与 sham 组比较，MCAO 组、BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠 Zea Longa 评分升高（$P<0.01$），Garcia JH 评分降低（$P<0.01$）。Morris 水迷宫实验显示，在定位航行实验的第 3、4、5 天，与 sham 组比较，MCAO 组大鼠的逃逸潜伏期延长（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠的逃逸潜伏期缩短（$P<0.05$）。与 sham 组比较，MCAO 组大鼠在目标象限的停留时间、穿越平台次数减少（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠在目标象限的停留时间、穿越平台次数增加（$P<0.05$）。NOR 实验显示，与 sham 组比较，MCAO 组大鼠的相对识别指数下降（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠的相对识别指数升高（$P<0.01$）。与 sham 组比较，MCAO 组大鼠海马组织中 IL－1β、IL－18 含量及 GSDMD－N 阳性细胞数目增加（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠海马组织中 IL－1β、IL－18 含量及 GSDMD－N 阳性细胞数目减少（$P<0.01$）。Western blot 结果显示，与 sham 组比较，MCAO 组大鼠海马组织中 GSDMD－N、NLRP3、ASC、c－Caspase－1 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠海马组织中 GSDMD－N、NLRP3、ASC、c－Caspase－1 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。结论：补肾启智方可能通过调控 NLRP3/ASC/Caspase－1 信号通路，抑制海马神经元焦亡，从而发挥改善 MCAO 大鼠认知功能的作用。

关键词：补肾启智方；缺血性脑卒中；NLRP3/ASC/Caspase－1 信号通路；细胞焦亡；卒中后认知障碍
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.03.101
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)03－0608－09

Action Mechanism of Bushen Qizhi Formula in Improving Cognitive Function in Ischemic Stroke Rats Based on NLRP3/ASC/Caspase－1 Pyroptosis Pathway

GONG Li[1]，LIU Xuemei[2]，LUO Chaoqin[2]，WANG Lingfeng[2]，MA Chengping[2]，ZHANG Yixin[2]，LU Jiahui[2]，FU Chen[2]

1. Beijing University of Chinese Medicine，Beijing China 100029；2. Dongfang Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine，Beijing China 100078

*基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（82104808）；2024 年度北京中医药大学研究生自主科研课题项目（ZJKT2024054）

Abstract: Objective: To investigate the effects of Bushen Qizhi Formula in mediating hippocampal neuron pyroptosis and ameliorating the mechanism of action of cognitive impairment in middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats by modulating nucleotide - binding oligomerization structural domain - like receptor protein 3 (NLRP3)/apoptosis - associated speck - like protein containing CARD (ASC)/cysteine aspartate protein (CARD)/Caspase - 1 signaling pathway. Methods: Forty Wistar rats were randomly divided into sham group, MCAO group, Bushen Qizhi Formula group (BSQZ, 14.4 g · kg^{-1}), and focal death inhibitor group (Ac - YVAD - CMK, 5 mg · kg^{-1}), with 10 rats in each group. Except for the sham group, the MCAO model was established in the remaining rats by using the modified Longa wire bolus method. The learning and memory functions of rats were assessed by Morris water maze experiment and novel object recognition (NOR) experiment; interleukin - 1β (IL - 1β) and interleukin - 18 (IL - 18) levels were detected in the hippocampal tissue of rats by ELISA. 18 (IL - 18) in rat hippocampal tissues; the number of gasdermin D - N (GSDMD - N) positive cells in rat hippocampal tissues was detected by immunofluorescence; and the expression levels of GSDMD - N, NLRP3, ASC, and activated cysteine protease - 1 (c - Caspase - 1) were detected in rat hippocampal tissues by Western blot. Results: Compared with the sham group, Zea Longa scores of rats in the MCAO group, BSQZ group, and Ac - YVAD - CMK group were elevated ($P<0.01$), and Garcia JH scores were decreased ($P<0.01$). The Morris water maze experiments showed that, on the 3rd, 4th, and 5th days of the localization and navigation experiments, compared with the sham group, the escape of rats in the MCAO group latency was prolonged ($P<0.01$); compared with the MCAO group, the escape latency of rats in the BSQZ group and Ac - YVAD - CMK group was shortened ($P<0.05$). Compared with the sham group, the residence time in the target quadrant and the number of traversing platforms of rats in the MCAO group decreased ($P<0.01$); compared with the MCAO group, the residence time in the target quadrant and the number of traversing platforms of rats in the BSQZ group and the Ac - YVAD - CMK group increased ($P<0.05$). The NOR experiment showed that, compared with the sham group, the relative recognition index decreased ($P<0.01$); compared with the MCAO group, the relative recognition index of rats in the BSQZ and Ac - YVAD - CMK groups increased ($P<0.01$). Compared with sham group, the content of IL - 1β, IL - 18 and the number of GSDMD - N positive cells in the hippocampal tissues of rats in MCAO group were increased ($P<0.01$); compared with MCAO group, the content of IL - 1β, IL - 18 and the number of GSDMD - N positive cells in the hippocampal tissues of rats in BSQZ group and Ac - YVAD - CMK group were decreased ($P<0.01$) Western blot results showed that the protein expression levels of GSDMD - N, NLRP3, ASC, and c - Caspase - 1 in the hippocampal tissues of rats in the MCAO group were elevated compared with those in the sham group ($P<0.01$); and GSDMD - N in the hippocampal tissues of rats in the BSQZ group and the Ac - YVAD - CMK group compared with those in the MCAO group, NLRP3, ASC, and c - Caspase - 1 protein expression levels were reduced ($P<0.05$). Conclusion: Bushen Qizhi Formula may inhibit hippocampal neuronal death by regulating the NLRP3/ASC/Caspase - 1 signaling pathway, thus exerting the effect of improving cognitive function in MCAO rats.

Key words: Bushen Qizhi Formula; post - stroke cognitive impairment; NLRP3/ASC/Caspase - 1 signaling pathway; pyroptosis; post - stroke cognitive impairment

卒中后认知障碍(post - stroke cognitive impairment, PSCI)的发病率为 24.0% ~53.4%,是缺血性脑卒中慢性期的主要并发症之一,亦是导致脑卒中后患者死亡的主要原因之一。PSCI 患者的学习、语言、记忆、执行力、视空间能力等认知功能损害,严重影响其生活质量,且残疾和死亡风险增加,也是加重卒中疾病负担的重要原因[1-2]。

炎症反应是卒中后细胞损伤和死亡的重要机制之一[3]。大量促炎细胞因子的释放可直接诱导神经元死亡,引发神经功能障碍[4]。越来越多的证据表明,促炎性程序性细胞死亡形式——细胞焦亡参与卒中后的病程发展[5]。核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白 3(NOD - like receptor protein3, NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis - associated speck - like protein containing CARD, ASC)与半胱天冬酶 - 1 前体(pro - Caspase - 1)的相互作用促进炎症小体形成。Caspase - 1 活化及 Gasdermin D(GSDMD)剪切裂解是细胞焦亡的经典途径,随后释放的炎症因子白细胞介素 - 1β(interleukin - 1β, IL - 1β)和白细胞介素 - 18(interleukin - 18, IL - 18)对神经元产生直接的毒性作用,从而加重脑损伤[5-6]。研究证实,抑制 NLRP3 炎症小体激活,可有效减少细胞焦亡,改善炎症反应,提高 MCAO 大鼠的认知能力[7-8]。因此,通过干预 NLRP3 介导的神经元焦亡,抑制炎症反应,促进神经功能恢复,改善认知功能,已成为治疗 PSCI 的有效策略。

补肾启智方由熟地黄、山茱萸、三七、栀子组成,具有补肾活血之效,是本课题组治疗 PSCI 的常用方剂,临床疗效显著。前期体内外实验研究表明,补肾启智方能有效改善 MCAO 大鼠的神经功能缺损及

认知功能障碍[9]，其机制可能与抑制 NLRP3 炎症小体，调控焦亡相关蛋白表达，进而发挥神经保护作用有关[10]。本研究通过建立 MCAO 大鼠模型，并给予焦亡抑制剂 Ac－YVAD－CMK，观察大鼠海马组织 NLRP3/ASC/Caspase－1 信号通路相关蛋白表达及 GSDMD－N、IL－1β、IL－18 水平，探讨补肾启智方调控细胞焦亡改善 MCAO 大鼠认知障碍的作用机制。

1　材料

1.1　动物　SPF 级 Wistar 雄性大鼠 40 只，8 周龄，体质量（215±15）g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，生产许可证号：SCXK（京）2021－0011，饲养于北京中医药大学东方医院实验中心 SPF 级动物房，温度（25±1）℃，湿度（55±5）%，光照（12 h）/黑暗（12 h）循环。本实验经北京中医药大学东方医院伦理委员会审批，伦理编号：DFYY20221123R。

1.2　药物与试剂　熟地黄、山茱萸、三七、栀子（北京人卫中药饮片有限公司，批号：21022108、21080210、20110103、20210719）；焦亡抑制剂 Ac－YVAD－CMK（Med Chem Express，货号：HY－16990）；大鼠 IL－1β ELISA 试剂盒、大鼠 IL－18 ELISA 试剂盒（欣博盛生物科技有限公司，货号：ERC007、ERC010）；兔单克隆抗体 ASC（Abcam，货号：ab307560）；兔多克隆抗体 NLRP3、兔多克隆抗体 GSDMD－N（Proteintech，货号：19771－1－AP、20770－1－AP）；兔单克隆抗体 c－Caspase－1（Cell Signaling Technology，货号：9661T）；β－tubulin 抗体（天津锐尔康生物科技有限公司，货号：REK0010）；羊抗鼠单克隆抗体 IgG－HRP、羊抗兔单克隆体 IgG－HRP（Santa Cruz，货号：SC－2004、SC－2005）；Alexa Flour 555 羊抗兔抗体 IgG（Molecular Probes，货号：A21429）；蛋白 marker（ThermoFisher Scientific，货号：26634）；RIPA 裂解液（带 PMSF）、ECL 发光液（普利莱，货号：C1055、P1020）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，货号：PC0020）。

1.3　仪器　Morris 水迷宫系统、新物体识别实验系统（北京众实迪创科技发展有限责任公司，型号：ZS－Morris、ZS－XWT－Ⅱ）；酶标仪（BioTek 公司，型号：Synergy H1 Hybrid）；化学发光成像系统（Gene，型号：BOX Chemi XX9）；冷冻切片机（Leica，型号：CM 1900－1－1）；倒置荧光相差显微镜（Olympus，型号：IX71）；电泳仪、小型印迹模块（ThermoFisher Scientific，型号：A25977、B1000）。

2　方法

2.1　药物制备　补肾启智方：熟地黄 30 g，山茱萸 15 g，三七 25 g，栀子 10 g。全方先加 10 倍水泡 1 h，煮 1 h，过滤药液后再加 8 倍水，煮 1 h，混合浓缩 2 次药液至质量浓度为 1.44 g·mL^{-1}，并将其储存在 4 ℃冰箱。根据人与大鼠体表面积折算的等效剂量比值换算，大鼠临床等效剂量为 14.4 g·kg^{-1}。本课题组前期研究表明，高剂量补肾启智方（14.4 g·kg^{-1}）具有明显的神经保护作用，并能显著提升 MCAO 大鼠的认知水平[11]，故本研究补肾启智方的给药剂量为 14.4 g·kg^{-1}。

焦亡抑制剂制备：根据 Ac－YVAD－CMK 说明书，取 10 mg Ac－YVAD－CMK 粉末，溶于 1 mL DMSO 溶液，制成 10 g·L^{-1} 的 DMSO 母液。取 1 mL DMSO 母液，加入 4 mL PEG400 溶液，混匀澄清后加入 500 μL Tween 80 溶液，混匀澄清后再加入 4.5 mL 生理盐水即可，现用现配。

2.2　模型制备　采用改良 Longa 线栓法暂时阻塞大鼠左侧大脑中动脉，建立大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型[12]。大鼠造模前禁食 12 h，不禁水；造模时先吸入 4%～5% 异氟烷气体 50 s，后面罩吸入 1% 异氟烷气体以维持麻醉。大鼠呈仰卧位固定，沿颈正中线切开，逐层分离左侧筋膜和肌肉，直至暴露颈总动脉、迷走神经、颈外动脉和颈内动脉，钝性分离颈总动脉和迷走神经后，在颈总动脉近心端和颈外动脉根部结扎，并在颈总动脉远心端临时夹闭，然后在颈总动脉夹闭处下方位置剪一斜口，并插入栓线（直径 0.24 mm），使栓线由颈总动脉进入颈内动脉，入颅后到达左侧大脑中动脉开口处，此时栓线前进有阻力感，即可停止插入，插入平均深度为（1.8±0.2）cm，栓塞 1.5 h 后轻柔缓慢拔出栓线，以实现缺血再灌注。大鼠 MCAO 术后进行 Zea Longa 评分与 Garcia JH 评分，若 Zea Longa 评分为 1～3 分且 Garcia JH 评分＜18 分则认为造模成功，评分标准见表 1、表 2。

表 1　Zea Longa 评分标准

表现	评分/分
大鼠活动完全正常	0
大鼠右侧前肢向胸前屈曲，不能完全伸展	1
大鼠行走时向右侧转圈	2
大鼠行走时向右侧倾倒	3
大鼠不能自发行走	4

表 2　Garcia JH 评分标准

表现	评分
自主运动	无自主运动(0 分),很少运动(1 分),运动并触及至少一侧笼壁(2 分),运动触及至少三侧笼壁(3 分)
前肢伸展运动	右侧前肢无伸展动作(0 分),右侧前肢轻微伸展(1 分),右侧前肢有伸展但不及左肢(2 分),两侧伸展对称(3 分)
体态对称性	右侧无运动(0 分),右侧轻微运动(1 分),右侧运动迟缓(2 分),双侧体态对称(3 分)
网屏实验	大鼠不能爬上(1 分),大鼠攀爬时右侧劣势(2 分),大鼠正常攀爬(3 分)
两侧身体触觉反射	右侧无反应(1 分),右侧反应不及左侧(2 分),左右两侧反应相同(3 分)
两侧胡须触觉反射	右侧无反应(1 分),右侧反应不及左侧(2 分),左右两侧反应相同(3 分)

2.3　分组及给药　将 40 只 Wistar 大鼠随机分为 sham 组、MCAO 组、补肾启智方组(BSQZ,14.4 g·kg^{-1})、焦亡抑制剂组(Ac－YVAD－CMK,5 mg·kg^{-1}),每组 10 只。除 sham 组外,其余大鼠按照“2.2”项方法造模。sham 组大鼠栓线插入深度为 1 cm,其余操作相同。BSQZ 组大鼠于 MCAO 术后每日灌胃给予补肾启智方 1 次,连续 3 周,其余各组大鼠灌胃给予等体积蒸馏水;Ac－YVAD－CMK 组大鼠于 MCAO 术后 1.5 h 腹腔注射 Ac－YVAD－CMK 1 次,之后每日相同时间给药 1 次,连续 1 周,其余各组大鼠腹腔注射等体积生理盐水;3 周后取材。

2.4　Morris 水迷宫实验检测大鼠的空间学习和记忆能力　造模后第 15 天进行 Morris 水迷宫实验,评估大鼠的空间学习和记忆能力。迷宫直径 220 cm,高度 60 cm,并均分成 4 个象限,内置直径 10 cm 的可移动平台(位于第Ⅱ象限),迷宫内加水至平台上 2 cm。Morris 水迷宫实验第 1 天为适应性学习阶段,将大鼠置于平台 15 s,轻推入池,记录逃避潜伏期,即大鼠寻找平台耗时;若 120 s 内未再次到达平台,则引导其至平台并停留 15 s。第 2—6 天为定位航行实验阶段,每只大鼠每日 2 次依次从第Ⅰ、第Ⅳ象限固定位置入池,探寻平台;若 120 s 内找到平台,则停留 30 s 后将大鼠移出;若未找到平台,则引导其至平台并停留 30 s,此阶段记录大鼠的逃避潜伏期。第 7 天为空间探索实验阶段,撤除平台,大鼠于第Ⅰ象限相同位置入池,记录 120 s 内的活动轨迹、速度、穿越平台位置的次数和在目标象限(第Ⅱ象限)的停留时间。

2.5　新物体识别实验(novel object recognition,NOR)检测大鼠的非空间认知记忆能力　取材当天所有大鼠在一个开口向上,长宽均为 44 cm 的黑色行为箱中进行 NOR 实验,以评估大鼠的非空间认知记忆能力。NOR 实验第一阶段为环境适应阶段:将大鼠放入行为箱中自由探索 5 min;第二阶段为熟悉训练阶段:在黑色行为箱中的两个对称位置,放两个完全相同的物体,从两物体的中点位置将大鼠轻轻放入,让其自由探索 10 min;第三阶段为新物体识别能力测试阶段:第二阶段完成 1 h 后,用不同形状的物体替换掉箱体中的 1 个物体,以同样的方法放入大鼠,让其自由探索 10 min。每个阶段每次放入 1 只大鼠,每只大鼠测试完毕后用 75% 酒精清扫箱体,直至所有大鼠完成测试。记录大鼠探索物体的时间,并计算相对识别指数。相对识别指数 = TN/(TN + TF)。注:TN:探索新物体的时间;TF:熟悉物体的时间。

2.6　ELISA 法检测大鼠海马组织中 IL－1β、IL－18 含量　取大鼠左侧新鲜海马组织,加入 1×PBS 溶液,制成 10% 组织匀浆液,4 ℃ 14 000 r·min^{-1}离心 10 min,取上清液。实验步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书执行,酶标仪读取波长 450 nm 下的光密度(optical density,OD)值,绘制标准品浓度－OD 值曲线,计算海马组织匀浆上清液中 IL－1β、IL－18 含量。

2.7　免疫荧光法观察 GSDMD－N 在大鼠海马组织中的表达情况　腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,经心脏依次灌流生理盐水和 4% 多聚甲醛溶液后,取完整脑组织于 4% 多聚甲醛溶液中浸泡固定 48 h,再于 30% 蔗糖溶液中先后脱水 2 次。使用 1×PBS 溶液冰冻包埋脑组织,并于冰冻条件下切片,厚度为 20 μm,烘干后保存于－20 ℃冰箱。取海马切片于湿片盒中,室温静置 10 min,1×PBS 溶液漂洗 3 次后,加入含 Triton X－100 的山羊血清封闭液室温封闭 1 h,漂洗后加入 GSDMD－N 抗体(1∶200)4 ℃过夜,漂洗后加入羊抗兔 IgG 抗体(1∶2 000)室温避光孵 1 h,漂洗后用含 DAPI 的抗荧光淬灭溶液封片,并于倒置荧光相差显微镜下观

察拍照，Image J 软件分析处理图片。

2.8　Western blot 法检测大鼠海马组织 GSDMD－N 蛋白表达水平　取大鼠左侧新鲜海马组织并切成小块，按照 1∶9 比例加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液并加入研磨珠，于研磨仪中 4 ℃研磨 1 min，重复研磨 4 次后 4 ℃ 14 000 r·min^{-1}离心 10 min 取上清液，BCA 法检测蛋白浓度，并将上清液保存于－80 ℃冰箱备用。取上清液并加入 RIPA 裂解液、还原剂、LDS sample Buffer(4×)，95 ℃加热 5 min。10% SDS－PAGE 凝胶电泳后将蛋白在冰浴条件下转至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉溶液室温摇床封闭 1 h。TBST 漂洗 3 次后，加入 GSDMD－N(1∶1 000)、NLRP3(1∶500)、ASC(1∶1 000)、c－Caspase－1(1∶1 000)、β－tubulin(1∶5 000)抗体 4 ℃孵育过夜，同样方法漂洗后加入羊抗兔单克隆体 IgG－HRP(1∶2 000)、羊抗鼠单克隆抗体 IgG－HRP(1∶2 000)室温摇床孵育 1 h，漂洗后加入 ECL 化学发光液。使用凝胶成像仪捕捉拍摄蛋白条带，Image J 软件分析蛋白条带灰度值，计算目的蛋白的相对表达量。实验重复 3 次取平均值。

2.9　统计学方法　使用 SPSS 26.0 软件统计分析数据，计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。若数据符合正态分布且方差齐，多组间比较选用单因素方差分析，两两比较选用 *LSD* 检验，若方差不齐则采用 *Tamhane's* T^2 检验。若数据不符合正态分布，则采用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　补肾启智方对大鼠神经功能评分的影响　除 sham 组外，其余大鼠的 Zea Longa 评分为 1～3 分且 Garcia JH 评分＜18 分，故认为 MCAO 模型复制成功。与 sham 组比较，MCAO 组、BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠 Zea Longa 评分升高($P<0.01$)，Garcia JH 评分降低($P<0.01$)。MCAO 组、BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠的 Zea Longa 评分与 Garcia JH 评分比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 3。

表 3　各组大鼠神经功能评分比较　($\bar{x}\pm s$，分)

组别	n	Zea Longa 评分	Garcia JH 评分
sham 组	10	0	18.00±0.00
MCAO 组	10	1.90±0.57**	10.30±1.95**
BSQZ 组	10	1.80±0.63**	10.40±1.65**
Ac－YVAD－CMK 组	10	1.80±0.42**	9.70±0.82**

注：与 sham 组比较，**$P<0.01$。

3.2　补肾启智方对大鼠空间学习与记忆能力的影响　Morris 水迷宫实验结果表明，在定位航行实验的第 3、4、5 天，与 sham 组比较，MCAO 组大鼠的逃逸潜伏期延长($P<0.01$)；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠的逃逸潜伏期缩短($P<0.05$)，见表 4。与 sham 组比较，MCAO 组大鼠在目标象限的停留时间、穿越平台次数减少($P<0.01$)；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠在目标象限的停留时间、穿越平台次数增加($P<0.05$)；各组大鼠的运动速度比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，见图 1、表 5。

表 4　各组大鼠定位航行实验阶段逃逸潜伏期比较　($\bar{x}\pm s$，s)

组别	n	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
sham 组	10	79.35±40.26	62.18±38.98	46.63±43.98	37.52±25.63	35.63±33.50
MCAO 组	10	103.11±14.37	96.36±19.75	94.04±22.75**	89.82±16.79**	87.51±11.00**
BSQZ 组	10	82.06±30.46	67.72±25.68	57.25±16.93#	46.80±21.98##	40.74±7.63##
Ac－YVAD－CMK 组	10	84.50±36.21	73.17±33.29	51.50±34.19#	49.41±41.09#	42.47±6.96##

注：与 sham 组比较，**$P<0.01$；与 MCAO 组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$。

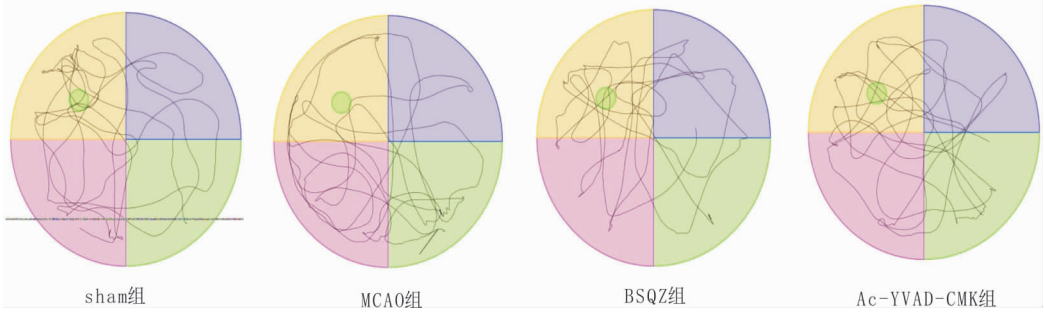


图 1　Morris 水迷宫实验第 7 天空间探索实验轨迹图

表 5　各组大鼠空间探索实验的目标象限停留时间、穿越平台次数、运动速度比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	目标象限停留时间(t/s)	穿越平台次数/次	运动速度(v/cm·s^{-1})
sham 组	10	40.08 ± 10.22	13.40 ± 3.53	24.78 ± 3.64
MCAO 组	10	18.03 ± 4.66**	5.40 ± 0.97**	21.49 ± 3.54
BSQZ 组	10	36.86 ± 5.17$^{\#\#}$	11.30 ± 2.36$^{\#}$	22.51 ± 3.15
Ac－YVAD－CMK 组	10	31.31 ± 8.01$^{\#\#}$	10.30 ± 1.95$^{\#}$	24.64 ± 4.88

注：与 sham 组比较，$**P<0.01$；与 MCAO 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$。

3.3　补肾启智方对大鼠非空间学习与记忆能力的影响　NOR 实验结果显示，与 sham 组比较，MCAO 组大鼠的相对识别指数下降($P<0.01$)；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠的相对识别指数升高($P<0.01$)，见表 6。

表 6　各组大鼠的相对识别指数比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	相对识别指数
Sham 组	10	0.81 ± 0.07
MCAO 组	10	0.19 ± 0.14**
BSQZ 组	10	0.48 ± 0.15$^{\#\#}$
Ac－YVAD－CMK 组	10	0.51 ± 0.13$^{\#\#}$

注：与 sham 组比较，$**P<0.01$；与 MCAO 组比较，$\#\#P<0.01$。

3.4　补肾启智方对大鼠海马组织 IL－1β、IL－18 含量的影响　与 sham 组比较，MCAO 组大鼠海马组织中 IL－1β、IL－18 含量升高($P<0.01$)；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠海马组织中 IL－1β、IL－18 含量降低($P<0.05$)，见表 7。

表 7　各组大鼠海马组织中 IL－1β、IL－18 含量比较　($\bar{x} \pm s$，ng·L^{-1})

组别	n	IL－1β	IL－18
sham 组	7	34.10 ± 5.33	17.76 ± 4.19
MCAO 组	7	80.52 ± 19.28**	41.00 ± 9.42**
BSQZ 组	7	58.83 ± 14.52$^{\#}$	26.85 ± 11.30$^{\#}$
Ac－YVAD－CMK 组	7	50.92 ± 12.36$^{\#\#}$	25.55 ± 4.92$^{\#\#}$

注：与 sham 组比较，$**P<0.01$；与 MCAO 组比较，$\#P<0.05$，$\#\#P<0.01$。

3.5　补肾启智方对大鼠海马组织中 GSDMD－N 蛋白表达的影响　免疫荧光结果显示，各组大鼠海马组织均有 GSDMD－N 阳性表达。与 sham 组比较，MCAO 组大鼠海马组织中 GSDMD－N 阳性细胞数目增加($P<0.01$)；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠海马组织中 GSDMD－N 阳性细胞数目减少($P<0.01$)，见图 2、表 8。

Western blot 结果显示，与 sham 组比较，MCAO 组大鼠海马组织中 GSDMD－N 蛋白表达水平升高($P<0.01$)；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠海马组织中 GSDMD－N 蛋白表达水平降低($P<0.01$)，见图 3、表 8。

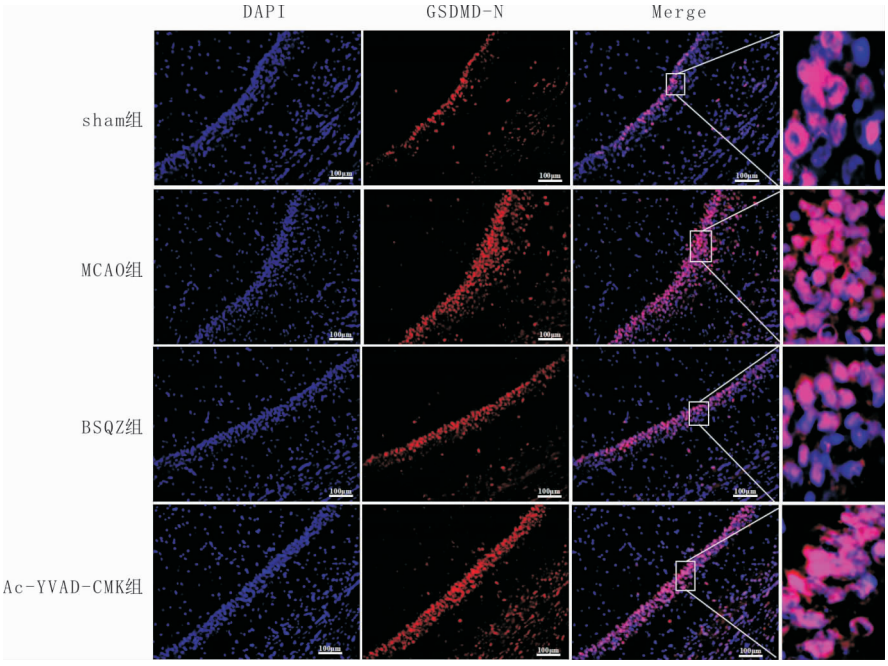


图 2　各组大鼠海马组织 GSDMD－N 免疫荧光染色图(×20)

3.6　补肾启智方对大鼠海马组织 NLRP3/ASC/Caspase－1 通路的影响　Western blot 结果显示，与 sham 组比较，MCAO 组大鼠海马组织中 NLRP3、ASC、c－Caspase－1 蛋白表达水平升高($P<0.01$)；与 MCAO 组比较，BSQZ 组、Ac－YVAD－CMK 组大鼠海马组织中 NLRP3、ASC、c－Caspase－1 蛋白表

达水平降低($P<0.05$),见图 4、表 9。

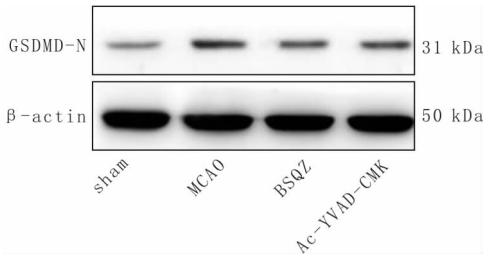


图 3　各组大鼠海马组织 GSDMD－N 蛋白条带图

表 8　各组大鼠海马组织 GSDMD－N 阳性细胞数目与蛋白表达水平比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	GSDMD－N 阳性细胞数目	GSDMD－N 蛋白表达水平
sham 组	3	45.67±2.08	1.00
MCAO 组	3	191.30±2.52**	1.81±0.09**
BSQZ 组	3	103.70±3.22##	1.49±0.05##
Ac－YVAD－CMK 组	3	95.00±3.00##	1.54±0.06##

注:与 sham 组比较,**$P<0.01$;与 MCAO 组比较,##$P<0.01$。

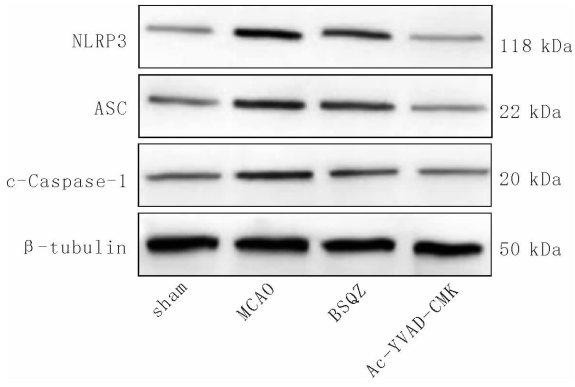


图 4　各组大鼠海马组织 NLRP3、ASC、c－Caspase－1 蛋白条带图

表 9　各组大鼠海马组织 NLRP3、ASC、c－Caspase－1 蛋白相对表达水平比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NLRP3	ASC	c－Caspase－1
sham 组	3	1.00	1.00	1.00
MCAO 组	3	2.79±0.28**	1.75±0.25**	1.58±0.08**
BSQZ 组	3	2.26±0.16#	1.37±0.11#	1.32±0.05#
Ac－YVAD－CMK 组	3	1.08±0.15##	0.85±0.12##	1.02±0.13##

注:与 sham 组比较,**$P<0.01$;与 MCAO 组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$。

4　讨论

中医根据 PSCI 认知损害的临床表现,将其归属于“痴呆”“多忘”“脑髓消”等疾病范畴,认为其病位在脑,与肾、肝、脾、心密切相关,病机以肾虚髓亏为本,风火痰瘀夹杂为标。中医药治疗 PSCI 多以补肾填精为基本大法,同时兼以活血、化浊[13－14]。补肾启智方根据六味地黄丸加减化裁而来,由熟地黄、山茱萸、三七、栀子组成,具有补肾活血之效,是本团队治疗 PSCI 的经验方。熟地黄、山茱萸补肝肾、益精髓、固护精气,大补肾精之不足;三七养血活血、散瘀通脉以化浊;栀子寒凉泻热,清泻瘀血经久所化之火。全方共奏补肾填精、活血散瘀之功,使脑髓充、气血通、精神养而神志清。本研究结果显示,MCAO 术后大鼠的空间与非空间学习记忆能力明显下降,经补肾启智方干预后明显改善,由此可见补肾启智方能有效缓解 MCAO 大鼠的认知障碍。

海马在记忆、航巡与认知中起关键作用[15],脑缺血及随后的再灌注过程极易导致包括海马在内的皮层下区域损伤[16]。研究发现,MCAO 可直接影响小鼠海马的解剖结构,导致其继发性萎缩,从而引发长期的认知功能障碍,以及空间学习和记忆功能损伤[17]。多项研究表明,通过减轻脑缺血后损伤,促进海马神经元恢复,可有效缓解 MCAO 大鼠的认知障碍[17－20]。因此,本研究通过观察 MCAO 大鼠海马组织中相关蛋白的表达情况,探讨补肾启智方改善 MCAO 大鼠认知功能的作用机制。

炎症在缺血性脑卒中中发挥重要作用,其可引起继发性脑损伤和功能障碍。NLRP3 炎症小体是介导炎症反应的关键介质[21]。前期研究表明,通过抑制 MCAO 大鼠脑组织中 NLRP3 炎症小体表达,可有效降低 IL－1β、IL－18 等炎症细胞因子水平,从而减轻脑损伤,促进神经功能恢复[22]。另有研究发现,通过抑制小鼠 MCAO 后 NLRP3 激活和促炎细胞因子 IL－1β 释放,可显著减少梗死面积,改善神经和认知功能[19]。本研究与上述研究结果一致,表明补肾启智方能通过抑制 NLRP3 炎症小体激活,减轻炎症反应,进而发挥神经保护作用,改善 MCAO 大鼠认知障碍。

细胞焦亡作为一种与炎症相关的细胞死亡形式,是参与卒中后脑损伤的重要病理机制[5],其经典激活途径依赖于 Caspase－1 的介导。在经典焦亡途径中,NLRP3 寡聚化 ASC 募集大量的 pro－Caspase－1 形成 NLRP3 炎症小体[23],这一过程使 pro－Caspase－1 剪切活化,活化的 Caspase－1 不仅将 GSDMD 切割成 GSDMD－N 和 GSDMD－C,还促进 pro－IL－18 和 pro－IL－1β 活化成炎症因子 IL－18 和 IL－1β。切割后的 GSDMD－N 与细胞质膜结合形成孔洞,导致细胞肿胀和渗透性坏死,诱导

细胞焦亡，伴随着大量细胞内容物和促炎介质释放，包括 IL－18、IL－1β 等，进而形成过度的炎症级联反应[24－25]。动物实验表明，细胞焦亡会加重脑缺血引起的脑损伤[26]，而下调 NLRP3/ASC/Caspase－1 通路，能减少 MCAO 大鼠神经元焦亡，改善神经功能，提高认知能力[18,27]。另有研究表明，神经元焦亡高度依赖于 Caspase－1 介导的经典途径，靶向抑制 Caspase－1 可有效减少神经元焦亡[28]。Ac－YVAD－CMK 是一种选择性 Caspase－1 抑制剂，具有神经保护作用，可有效抑制细胞焦亡和 IL－18、IL－1β 活化，显著增加 MCAO 小鼠的海马体积，改善认知功能[17]。本研究发现，MCAO 大鼠海马组织中 IL－18、IL－1β 含量及 NLRP3、ASC、c－Caspase－1 蛋白表达水平升高，且 GSDMD－N 阳性细胞数及蛋白表达水平均增加，这提示脑卒中后 Caspase－1 介导的焦亡通路被激活；给予焦亡抑制剂或补肾启智方干预后，各项指标显著逆转。由此可见，补肾启智方与焦亡抑制剂有类似的作用，均可通过调控 NLRP3/ASC/Caspase－1 通路，抑制海马神经元焦亡，改善海马炎症损伤，提高 MCAO 大鼠认知能力。

综上所述，补肾启智方可能通过调控 NLRP3/ASC/Caspase－1 信号通路，抑制海马神经元焦亡和炎症反应，从而发挥改善 MCAO 大鼠认知功能的作用。

参考文献：

[1]ROST N S，BRODTMANN A，PASE M P，et al. Post－stroke cognitive impairment and dementia[J]. Circ Res，2022，130(8)：1252－1271.

[2]CHI X S，FAN X M，FU G J，et al. Research trends and hotspots of post－stroke cognitive impairment：a bibliometric analysis[J]. Front Pharmacol，2023，14：1184830.

[3]RADAK D，KATSIKI N，RESANOVIC I，et al. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke[J]. Curr Vasc Pharmacol，2017，15(2)：115－122.

[4]TUO Q Z，ZHANG S T，LEI P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications[J]. Med Res Rev，2022，42(1)：259－305.

[5]LONG J P，SUN Y，LIU S S，et al. Targeting pyroptosis as a preventive and therapeutic approach for stroke[J]. Cell Death Discov，2023，9(1)：155.

[6]YANG K L，BAO T T，ZENG J S，et al. Research progress on pyroptosis－mediated immune－inflammatory response in ischemic stroke and the role of natural plant components as regulator of pyroptosis：a review[J]. Biomed Pharmacother，2023，157：113999.

[7]GE Y Y，YANG J X，CHEN J Y，et al. Absence in CX3CR1 receptor signaling promotes post－ischemic stroke cognitive function recovery through suppressed microglial pyroptosis in mice[J]. CNS Neurosci Ther，2024，30(2)：e14551.

[8]LIU J Y，ZHENG J，XU Y，et al. Enriched environment attenuates pyroptosis to improve functional recovery after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Front Aging Neurosci，2021，13：717644.

[9]吴艺帆，傅晨，罗超琴，等. 补肾启智方调控 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路对缺血性脑卒中大鼠认知功能的影响[J]. 北京中医药大学学报，2022，45(7)：654－662.

[10]傅晨，巩俐，王翎沣，等. 基于 miR－335/ROCK2 轴探讨补肾启智方对 OGD/R 损伤 HT22 细胞焦亡与应激颗粒的影响[J]. 中医学报，2024，39(8)：1583－1590.

[11]FU C，WU Y F，LIU S J，et al. Rehmannioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis via activating PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia[J]. J Ethnopharmacol，2022，289：115021.

[12]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.

[13]靳洁，黄世敬. 中药复方治疗脑卒中后认知障碍的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2023，21(19)：3558－3562.

[14]申伟，曾子修，金香兰，等. 中药治疗卒中后认知障碍疗效和安全性的系统评价[J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26(11)：185－193.

[15]LISMAN J，BUZSAKI G，EICHENBAUM H，et al. Viewpoints：how the hippocampus contributes to memory，navigation and cognition[J]. Nat Neurosci，2017，20(11)：1434－1447.

[16]SADEGHZADEH J，HOSSEINI L，MOBED A，et al. The impact of cerebral ischemia on antioxidant enzymes activity and neuronal damage in the hippocampus[J]. Cell Mol Neurobiol，2023，43(8)：3915－3928.

[17]KIM H，SEO J S，LEE S Y，et al. AIM2 inflammasome contributes to brain injury and chronic post－stroke cognitive impairment in mice[J]. Brain Behav Immun，2020，87：765－776.

[18]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.

[19]ZHANG F,DENG Y T,WANG H D,et al. Gut microbiota - mediated ursodeoxycholic acids regulate the inflammation of microglia through TGR5 signaling after MCAO[J]. Brain Behav Immun,2024,115:667 - 679.

[20]LI Z X,WANG H Y,XIAO G X,et al. Recovery of post - stroke cognitive and motor deficiencies by Shuxuening injection via regulating hippocampal BDNF - mediated Neurotrophin/Trk Signaling[J]. Biomed Pharmacother,2021,141:111828.

[21]GUO Z L,YU S H,CHEN X,et al. NLRP3 is involved in ischemia/reperfusion injury[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets,2016,15(6):699 - 712.

[22]FU C,ZHANG X Y,ZENG Z X,et al. Neuroprotective effects of Qingnao dripping pills against cerebral ischemia via inhibiting NLRP3 inflammasome signaling pathway:in vivo and in vitro[J]. Front Pharmacol,2020,11:65.

[23]于燕艳,刘娟,杨越,等. 针刺调控 NLRP3 炎症小体减轻脑缺血再灌注损伤的研究进展[J/OL]. 中医学报,1 - 6[2025 - 01 - 15]. http://kns. cnki. net/kcms/detail/41.1411. R. 20240729. 1529. 044. html.

[24]王泽乾,段彦哲,吴艺舸,等. NLRP3 炎性小体介导的细胞焦亡在缺血性脑卒中病理过程中的作用研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2024,40(7):648 - 654.

[25]WANG K,SUN Q,ZHONG X,et al. Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis[J]. Cell,2020,180(5):941 - 955.

[26]LI X,YAO M H,LI L L,et al. Aloe - emodin alleviates cerebral ischemia - reperfusion injury by regulating microglial polarization and pyroptosis through inhibition of NLRP3 inflammasome activation[J]. Phytomedicine,2024,129:155578.

[27]程静,杨一涵,刘燕平,等. 规律性有氧运动对大脑中动脉栓塞大鼠 NLRP3/Caspase - 1/GSDMD 轴及学习记忆功能的影响[J]. 中国康复医学杂志,2024,39(9):1241 - 1249.

[28]SEKERDAG E,SOLAROGLU I,GURSOY - OZDEMIR Y. Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options[J]. Curr Neuropharmacol,2018,16(9):1396 - 1415.

收稿日期:2024 - 01 - 18

作者简介:巩俐(2000 -),女,山东枣庄人,硕士研究生,研究方向:中医药防治脑病机制研究。

通信作者:傅晨(1986 -),女,湖北孝感人,医学博士,副主任医师,研究方向:中医药防治脑病机制研究。E - mail:fuchen2003@163. com

编辑:刘凯歌