·实验研究·

清热开窍方激活 Nrf2/HO－1 信号通路抑制细胞焦亡治疗大鼠缺血性脑卒中*

刘嘉，刘云婷，鱼童，张紫涵，刘雪梅

北京中医药大学东方医院，北京 100078

摘要：目的：探讨清热开窍方对缺血性脑卒中（ischemic stroke，IS）大鼠的神经保护作用，并基于核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2－related factor 2，Nrf2）/血红素加氧酶－1（heme oxygenase－1，HO－1）信号通路探讨相关作用机制。方法：将 75 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组（Sham 组）、模型组（MCAO 组）、清热开窍方组（QRKQF 组，9.14 g·kg^{-1}）、清热开窍方＋Nrf2 抑制剂组（QRKQF＋ML385 组）、Nrf2 抑制剂组（ML385 组，30 mg·kg^{-1}），每组 15 只。除 Sham 组外，其余大鼠采用线栓法建立大脑中动脉栓塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型。采用 Garcia JH 法评价大鼠的神经功能；TTC 染色法检测脑缺血体积；干湿重法检测脑含水量；Western blot 法检测皮质 Nrf2、HO－1、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3（nucleotide－binding oligomerization domain－like receptor protein 3，NLRP3）、裂解的半胱天冬酶－1（cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase－1，c－Caspase－1）、消皮素 D－N（gasdermin D－N，GSDMD－N）蛋白表达水平；试剂盒检测皮质丙二醛（malondialdehyde，MDA）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）水平。结果：与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠 Garcia JH 评分降低、脑缺血体积与脑含水量增加（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠 Garcia JH 评分升高、脑缺血体积与脑含水量减少（$P<0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF＋ML385 组大鼠 Garcia JH 评分升高、脑缺血体积与脑含水量减少（$P<0.05$）。与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠皮质 Nrf2、HO－1 蛋白表达水平升高，NLRP3、c－Caspase－1、GSDMD－N 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF＋ML385 组大鼠皮质 Nrf2、HO－1 蛋白表达水平升高，NLRP3、c－Caspase－1、GSDMD－N 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠皮质 MDA 水平升高，GSH、SOD、CAT 水平降低（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠皮质 MDA 水平降低，GSH、SOD、CAT 水平升高（$P<0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF＋ML385 组大鼠皮质 MDA 水平降低，GSH、SOD、CAT 水平升高（$P<0.01$）。结论：清热开窍方通过抑制 IS 大鼠细胞焦亡发挥神经保护作用，这可能与激活 Nrf2/HO－1 信号通路有关。

关键词：缺血性脑卒中；清热开窍方；Nrf2/HO－1 信号通路；细胞焦亡；大鼠

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.09.313

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)09－1960－08

Qingre Kaiqiao Formula Activating Nrf2/HO－1 Signaling Pathway to Inhibit Pyroptosis in Treatment of Ischemic Stroke in Rats

LIU Jia，LIU Yunting，YU Tong，ZHANG Zihan，LIU Xuemei

Dongfang Hospital，Beijing University of Chinese Medicine，Beijing China 100078

Abstract：Objective：To investigate the neuroprotective effect of Qingre Kaiqiao Formula on ischemic stroke（IS）rats，and to explore the mechanism based on nuclear factor erythroid 2－related factor 2（Nrf2）/heme oxygenase－1（HO－1）signaling pathway. Methods：Seventy－five male SD rats were randomly divided into sham operation group（Sham group），model group（MCAO group），Qingre Kaiqiao Formula group（QRKQF group，9.14 g·kg^{-1}），Qingre Kaiqiao Formula Nrf2 inhibitor group（QRKQF ML385 group）plus

* **基金项目**：国家自然科学基金项目（81973788，82374405）

Nrf2 inhibitor group (ML385 group, 30 mg · kg^{-1}), with 15 rats in each group. Except for the Sham group, the other rats used the wire thrombosis method to establish a middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. Garcia JH method was used to evaluate the neurological function of rats. TTC staining was used to detect cerebral ischemic volume. Brain water content was detected by dry and wet gravimetric method; Cortical Nrf2, HO - 1, nucleotide - binding oligomerization domain - like receptor protein 3 (NLRP3), and cleaved cysteinyl aspartate specific were detected by Western blot proteinase - 1, c - caspase - 1), gasdermin D - N (GSDMD - N) protein expression levels; The kit detected the levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). Results: Compared with the Sham group, the Garcia JH score of the rats in the MCAO group decreased, and the cerebral ischemic volume and cerebral water content increased ($P<0.01$). Compared with the MCAO group, the Garcia JH score of the rats in the QRKQF group was increased, and the cerebral ischemic volume and cerebral water content were decreased ($P<0.01$). Compared with the ML385 group, the Garcia JH score, cerebral ischemia volume and cerebral water content of the rats in the QRKQF ML385 group were increased ($P<0.05$). Compared with the MCAO group, the expression levels of cortical Nrf2 and HO - 1 proteins in the QRKQF group were increased, and the expression levels of NLRP3, c - Caspase - 1 and GSDMD - N proteins decreased ($P<0.01$). Compared with the ML385 group, the expression levels of cortical Nrf2 and HO - 1 proteins in the QRKQF ML385 group were increased, and the expression levels of NLRP3, c - caspase - 1 and GSDMD - N proteins were decreased ($P<0.01$). Compared with the Sham group, the levels of cortical MDA in the MCAO group were increased, and the levels of GSH, SOD and CAT decreased ($P<0.01$). Compared with the MCAO group, the levels of cortical MDA in the QRKQF group decreased, and the levels of GSH, SOD and CAT increased ($P<0.01$). Compared with the ML385 group, the levels of cortical MDA in the QRKQF ML385 group were decreased, and the levels of GSH, SOD and CAT were increased ($P<0.01$). Conclusion: Qingre Kaiqiao Formula exerts a neuroprotective effect by inhibiting pyroptosis in IS rats, which may be related to the activation of Nrf2/HO - 1 signaling pathway.

Key words: ischemic stroke; Qingre Kaiqiao Formula; Nrf2/HO - 1 signaling pathway; pyroptosis; rat

卒中是我国成年人中致死和致残的主要原因之一，其中缺血性脑卒中占比超过 70%[1]。缺血性脑卒中是由于脑血管栓塞导致血流中断，进而引发局部脑组织缺血缺氧甚至坏死的病理过程。但恢复脑血流供应可能加剧缺血区域的神经缺陷和脑功能障碍，这一现象被称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)。再灌注过程中氧糖水平恢复导致大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生，触发氧化应激，激活炎症信号通路(如 NLRP3 信号通路)，从而放大炎症反应并加剧程序性细胞死亡。细胞焦亡是一种与炎症相关的程序性细胞死亡形式，已被证实参与 CIRI 并诱导神经元死亡[2]。

研究表明，多种神经保护剂通过抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡来缓解 CIRI[3-4]。在过量 ROS 等刺激下，NLRP3 炎症小体被激活并发生寡聚化，招募凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis - associated speck - like protein containing a caspase - recruitment domain, ASC)，激活 c - Caspase - 1，释放促炎细胞因子[5]。此外，激活的 c - Caspase - 1 切割 Gasdermin D(GSDMD)产生 N 端片段，诱发细胞焦亡，导致炎症因子释放，加剧炎症级联反应[6]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2 - related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶 - 1(heme oxygenase - 1, HO - 1)信号通路是改善 CIRI 中氧化应激反应的主要途径之一[7]。Nrf2 是调控细胞氧化还原稳态的关键转录因子，在抑制氧化应激、炎症反应和细胞焦亡等方面发挥重要作用[8]。在生理条件下，Nrf2 维持在低活性状态；当缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)发生时，Nrf2 作为转录因子进入细胞核，促进下游 HO - 1 等多种抗氧化酶表达，增强抗氧化作用，从而减轻脑组织损伤[9]。

清热开窍方由栀子、川芎、三七、胆南星、石菖蒲、生地黄、天麻、炙甘草组成，具有清热活血、化痰通络之功效。前期研究表明，清热开窍方可抑制 CIRI 大鼠的炎症反应，减少脑梗死体积，改善神经功能，但其具体作用机制尚未明确。基于此，本研究建立大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型模拟 CIRI，旨在探讨清热开窍方是否通过激活 Nrf2/HO - 1 信号通路，抑制氧化应激和细胞焦亡，从而发挥神经保护作用，为临床治疗提供科学依据。

1　材料

1.1　动物　SPF 级雄性 SD 大鼠 75 只，体质量 180 ~ 200 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SCXK(京)2021 - 0006。大鼠在北京中医药大学东方医院动物房标准环境下饲养，温度

24 ~ 26 ℃，湿度 55% ~ 65%，黑暗和光照各 12 h，自由饮水和进食。本实验已通过北京中医药大学东方医院动物伦理委员会批准，审批号：DFYY2025013003R。

1.2　药物与试剂　清热开窍方（栀子 15 g，川芎 10 g，三七 6 g，胆南星 10 g，石菖蒲 15 g，生地黄 15 g，天麻 10 g，炙甘草 6 g）由北京中医药大学东方医院提供。Nrf2 抑制剂 ML385（MedChemExpress 公司，货号：HY - 100523）；TTC 染色液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、5% BSA、山羊血清（北京索莱宝科技有限公司，货号：G3005、PC0020、S9020、SL038）；4% ~ 12% 蛋白预制胶、4 × loading buffer、NuPAGE™ MES SDS 电泳缓冲液、NuPAGE™转印缓冲液、ECL 发光试剂盒（ThermoFisher Scientific 公司，货号：NPO326BOX、89901、NP0001、NP0006 - 1、32106）；预染蛋白 Marker（Gene，货号：RPN800E）；RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂（北京普利莱基因技术有限公司，货号：R0020、P0100）；cOmplete™蛋白酶抑制剂 Cocktail（Roche，货号：04693116001）；Nrf2、HO - 1 抗体（Cell Signaling Technology 公司，货号：12721s、26416s）；NLRP3、Caspase - 1、GSDMD - N 抗体（Proteintech，货号：27458 - 1 - AP、31020 - 1 - AP、20770 - 1 - AP）；小鼠单克隆抗体 β - actin、羊抗小鼠 IgG - HRP、羊抗兔 IgG - HRP（Santa Cruz Biotechnology 公司，货号：sc - 47778、sc - 2005、sc - 2004）；Alexa Fluor™488 羊抗兔 IgG（Abcam 公司，货号：ab150077）；丙二醛（malondialdehyde，MDA）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号：A003 - 1 - 2、A006 - 1 - 1、A001 - 3 - 2、A007 - 1 - 1）。

1.3　主要仪器　R500 小动物麻醉机（深圳市瑞沃德生命科技有限公司）；电热恒温鼓风干燥箱、电热恒温水浴锅（上海一恒科技有限公司）；Mini Blot Module 转印模块（ThermoFisher Scientific 公司）；BOX Chemi XX9 型化学发光成像系统（Gene）；酶标仪（BioTek）；台式高速冷冻型离心机（Eppendorf）；CM1900 冷冻切片机（LEICA）；BX53F 荧光显微镜（OLYMPUS）。

2　方法

2.1　MCAO 模型制备　参考 Longa 法改良建立大鼠 MCAO 模型模拟 CIRI[10]。造模前大鼠禁食不禁水 12 h，采用 4% ~ 5% 异氟烷吸入诱导麻醉，再以 1% 异氟烷吸入维持麻醉。将大鼠仰卧位固定，颈部正中作切口，分离左侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉，结扎颈总动脉近心端和颈外动脉，暂时夹闭颈总动脉远心端，在颈总动脉靠近远心端位置剪一斜口，插入头端直径为 0.24 mm 的栓线，有阻力感时停止插入，此时插入深度为（1.8 ± 0.2）cm，造成大脑中动脉供血相关区域缺血，栓塞 1.5 h 后拔出栓线再灌注 24 h，术后注意大鼠肛温，正常饲养。大鼠术后 6 h 进行 Longa 评分，1 ~ 3 分视为造模成功。

2.2　分组及给药　将 75 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组（Sham 组）、模型组（MCAO 组）、清热开窍方组（QRKQF 组）、清热开窍方 + Nrf2 抑制剂组（QRKQF + ML385 组）、Nrf2 抑制剂组（ML385 组），每组 15 只。Sham 组仅将栓线插入 1 cm，其余大鼠采用“2.1”方法建立 MCAO 模型。QRKQF + ML385 组与 ML385 组大鼠在 MCAO 术前 1 h 腹腔注射 ML385 溶液（30 mg · kg^{-1}）；QRKQF 组与 QRKQF + ML385 组大鼠灌胃给予 QRKQF（9.14 g · kg^{-1}），术后 2 h 给药 1 次，间隔 10 h 给药 1 次；其余大鼠给予等体积蒸馏水灌胃，末次灌胃 2 h 后进行指标观察。每组随机取 8 只大鼠进行神经功能缺损评分；随机取 6 只大鼠脑组织用于 TTC 染色和脑含水量检测；随机取 3 只大鼠脑组织用于免疫荧光染色检测；随机取 3 只大鼠缺血侧皮质用于 Western blot 检测；随机取 3 只大鼠缺血侧皮质用于生化指标检测。

2.3　Garcia JH 评分法检测大鼠神经功能缺损程度　采用 Garcia JH 评分法对大鼠神经功能缺损程度进行评价，观察大鼠的自主运动，得分越低表示神经功能缺损越严重，3 分为最低分表示神经功能损伤最严重，18 分为最高分表示神经功能正常[11]。

2.4　TTC 染色法检测大鼠脑缺血体积　取大鼠脑组织自额极向后进行冠状切片，厚度 2 mm，共 5 片。将脑切片在 37 ℃下浸入 2% TTC 染液中，避光水浴孵育 30 min，取出后进行拍照，采用 Image J 软件进行分析，并计算大鼠脑缺血体积。

脑缺血体积 =（各脑切片缺血面积 × 切片厚度之和）/（各脑切片总面积 × 切片厚度之和）× 100%

2.5　干湿重法检测大鼠脑含水量　取出大鼠的完整大脑后快速称取湿质量，将其置于 110 ℃干燥箱中烘烤 24 h，取出称取干质量，并按照以下公式计算脑含水量。

脑含水量 =（湿质量 - 干质量）/湿质量 × 100%

2.6　Western blot 法检测大鼠缺血皮质 Nrf2、HO - 1、NLRP3、c - Caspase - 1、GSDMD - N 蛋白表达水平　采用 RIPA 裂解液提取大鼠缺血侧皮质总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，10% SDS - PAGE 电泳分离蛋白，PVDF 转膜，5% 脱脂牛奶封闭 1 h。随后加入兔单克隆抗体 Nrf2（1 ∶ 1 000）、兔单克隆抗体 HO - 1（1 ∶ 1 000）、兔多克隆抗体 NLRP3（1 ∶ 500）、兔多克隆抗体 Caspase - 1（1 ∶ 1 000）、兔多克隆抗体 GSDMD - N（1 ∶ 1 000）、小鼠单克隆抗体 β - actin（1 ∶ 1 000），4 ℃孵育过夜；加入羊抗兔 IgG - HRP、羊抗小鼠 IgG - HRP 二抗，稀释比例为 1 ∶ 2 000，室温孵育 1 h。最后，使用 ECL 试剂盒显影，将蛋白条带置于凝胶成像系统进行拍照，并采用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

2.7　免疫荧光法检测大鼠缺血皮质 GSDMD - N 蛋白表达情况　采用多聚甲醛灌注固定大鼠脑组织后，制备冰冻切片，厚度 30 μm。取大鼠缺血皮质冰冻切片，山羊血清和 5% BSA 溶液封闭 1.5 h；加入兔多克隆 GSDMD - N 抗体（1 ∶ 300），4 ℃孵育过夜；加入 Alexa Fluor™488 羊抗兔 IgG（1 ∶ 2 000）抗体进行孵育；含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂进行封片，荧光显微镜下拍照，Image J 软件进行分析。

2.8　大鼠缺血皮质 MDA、GSH、SOD、CAT 水平检测　取大鼠缺血皮质周围区域组织进行匀浆，4 ℃离心 15 min，收集上清液，分别使用 MDA、GSH、SOD、CAT 试剂盒检测 MDA、GSH、SOD、CAT 水平。

2.9　统计学方法　采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析，符合或近似符合正态分布的计量数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析。若满足方差齐性，组间两两比较采用 *LSD* 检验；若方差不齐，采用 *Dunnett's T3* 检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　清热开窍方对大鼠神经功能损伤评分的影响　与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠 Garcia JH 评分降低（$P < 0.01$）；与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠 Garcia JH 评分升高（$P < 0.01$）；与 QRKQF 组比较，ML385 组大鼠 Garcia JH 评分降低（$P < 0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF + ML385 组大鼠 Garcia JH 评分升高（$P < 0.01$），见表 1。

3.2　清热开窍方对大鼠脑缺血体积的影响　与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠脑缺血体积增加（$P < 0.01$）；与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠脑缺血体积减少（$P < 0.01$）；与 QRKQF 组比较，ML385 组大鼠脑缺血体积增加（$P < 0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF + ML385 组大鼠脑缺血体积减少（$P < 0.05$），见图 1、表 2。

表 1　各组大鼠神经功能评分比较　（$\bar{x} \pm s$，分）

组别	n	Garcia JH 评分
Sham 组	8	18.00 ± 0.00
MCAO 组	8	8.13 ± 0.83 **
QRKQF 组	8	12.63 ± 1.19 ##
QRKQF + ML385 组	8	9.88 ± 0.83 △△
ML385 组	8	7.38 ± 0.74 &&

注：与 Sham 组比较，** $P < 0.01$；与 MCAO 组比较，## $P < 0.01$；与 QRKQF 组比较，&& $P < 0.01$；与 ML385 组比较，△△ $P < 0.01$。

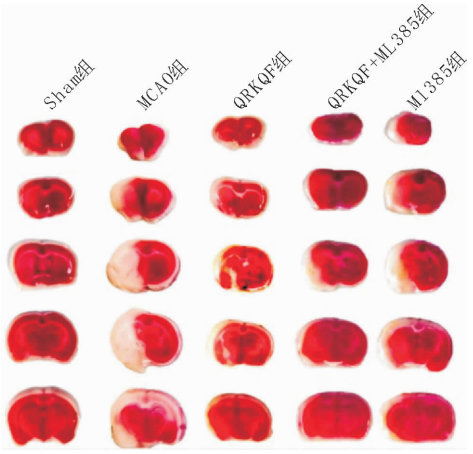


图 1　各组大鼠脑组织 TTC 染色图

表 2　各组大鼠脑缺血体积比较　（$\bar{x} \pm s$，%）

组别	n	脑缺血体积
Sham 组	6	0
MCAO 组	6	39.15 ± 4.18 **
QRKQF 组	6	27.48 ± 2.77 ##
QRKQF + ML385 组	6	31.59 ± 2.96 △
ML385 组	6	36.90 ± 3.67 &&

注：与 Sham 组比较，** $P < 0.01$；与 MCAO 组比较，## $P < 0.01$；与 QRKQF 组比较，&& $P < 0.01$；与 ML385 组比较，△ $P < 0.05$。

3.3　清热开窍方对大鼠脑含水量的影响　与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠脑含水量增加（$P < 0.01$）；与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠脑含水量减少（$P < 0.01$）；与 QRKQF 组比较，ML385 组大鼠脑含水量增加（$P < 0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF + ML385 组大鼠脑含水量减少（$P < 0.05$），见表 3。

3.4　清热开窍方对大鼠缺血皮质 Nrf2/HO－1 信号通路关键蛋白的影响　与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠皮质 Nrf2、HO－1 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠皮质 Nrf2、HO－1 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）；与 QRKQF 组比较，ML385 组大鼠皮质 Nrf2、HO－1 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF＋ML385 组大鼠皮质 Nrf2、HO－1 蛋白表达水平升高（$P<0.01$），见图 2、表 4。

表 3　各组大鼠脑含水量比较　（$\bar{x}\pm s$，%）

组别	n	脑含水量
Sham 组	6	76.92 ± 0.77
MCAO 组	6	80.64 ± 1.31**
QRKQF 组	6	77.46 ± 0.75##
QRKQF＋ML385 组	6	79.50 ± 1.11△
ML385 组	6	81.36 ± 0.91&&

注：与 Sham 组比较，** $P<0.01$；与 MCAO 组比较，## $P<0.01$；与 QRKQF 组比较，&& $P<0.01$；与 ML385 组比较，△ $P<0.05$。

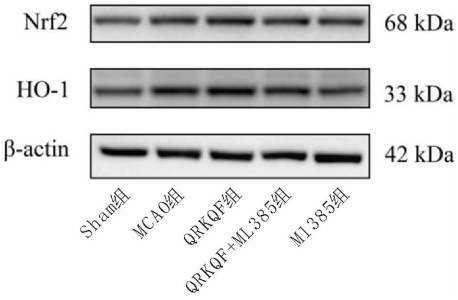


图 2　各组大鼠缺血皮质 Nrf2、HO－1 蛋白条带图

表 4　各组大鼠缺血皮质 Nrf2、HO－1 蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Nrf2	HO－1
Sham 组	3	1.05 ± 0.08	1.37 ± 0.06
MCAO 组	3	1.27 ± 0.06*	1.57 ± 0.06*
QRKQF 组	3	1.91 ± 0.11##	1.93 ± 0.07##
QRKQF＋ML385 组	3	0.73 ± 0.06△△	0.87 ± 0.09△△
ML385 组	3	0.41 ± 0.07&&	0.60 ± 0.05&&

注：与 Sham 组比较，* $P<0.05$；与 MCAO 组比较，## $P<0.01$；与 QRKQF 组比较，&& $P<0.01$；与 ML385 组比较，△△ $P<0.01$。

3.5　清热开窍方对大鼠缺血皮质细胞焦亡相关蛋白的影响　Western blot 显示，与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠皮质 NLRP3、c－Caspase－1、GSDMD－N 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠皮质 NLRP3、c－Caspase－1、GSDMD－N 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）；与 QRKQF 组比较，ML385 组大鼠皮质 NLRP3、c－Caspase－1、GSDMD－N 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF＋ML385 组大鼠皮质 NLRP3、c－Caspase－1、GSDMD－N 蛋白表达水平降低（$P<0.01$），见图 3、表 5。

免疫荧光显示，各组大鼠缺血皮质均有 GSDMD－N 蛋白表达。与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠皮质 GSDMD－N 阳性细胞数目增加（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠皮质 GSDMD－N 阳性细胞数目减少（$P<0.01$）；与 QRKQF 组比较，ML385 组大鼠皮质 GSDMD－N 阳性细胞数目增加（$P<0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF＋ML385 组大鼠皮质 GSDMD－N 阳性细胞数目减少（$P<0.01$），见图 4、表 6。

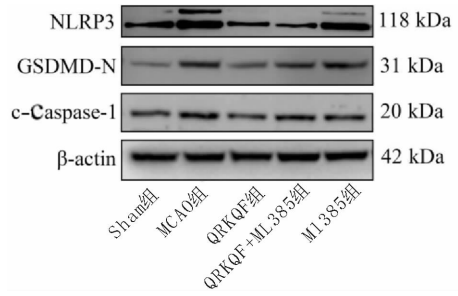


图 3　各组大鼠缺血皮质 NLRP3、c－Caspase－1、GSDMD－N 蛋白条带图

表 5　各组大鼠缺血皮质 NLRP3、c－Caspase－1、GSDMD－N 蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	NLRP3	c－Caspase－1	GSDMD－N
Sham 组	3	1.00	1.00	1.00
MCAO 组	3	2.80 ± 0.17**	1.62 ± 0.04**	1.86 ± 0.05**
QRKQF 组	3	1.91 ± 0.05##	1.17 ± 0.04##	1.31 ± 0.03##
QRKQF＋ML385 组	3	2.25 ± 0.11△△	1.29 ± 0.03△△	1.43 ± 0.04△△
ML385 组	3	2.73 ± 0.10&&	1.65 ± 0.08&&	1.83 ± 0.06&&

注：与 Sham 组比较，** $P<0.01$；与 MCAO 组比较，## $P<0.01$；与 QRKQF 组比较，&& $P<0.01$；与 ML385 组比较，△△ $P<0.01$。

表 6　各组大鼠缺血皮质 GSDMD－N 蛋白阳性细胞数目比较　（$\bar{x}\pm s$，个）

组别	n	GSDMD－N 阳性细胞数目
Sham 组	3	36.78 ± 11.05
MCAO 组	3	185.30 ± 10.10**
QRKQF 组	3	101.70 ± 17.53##
QRKQF＋ML385 组	3	136.10 ± 5.49△△
ML385 组	3	175.90 ± 7.04&&

注：与 Sham 组比较，** $P<0.01$；与 MCAO 组比较，## $P<0.01$；与 QRKQF 组比较，&& $P<0.01$；与 ML385 组比较，△△ $P<0.01$。

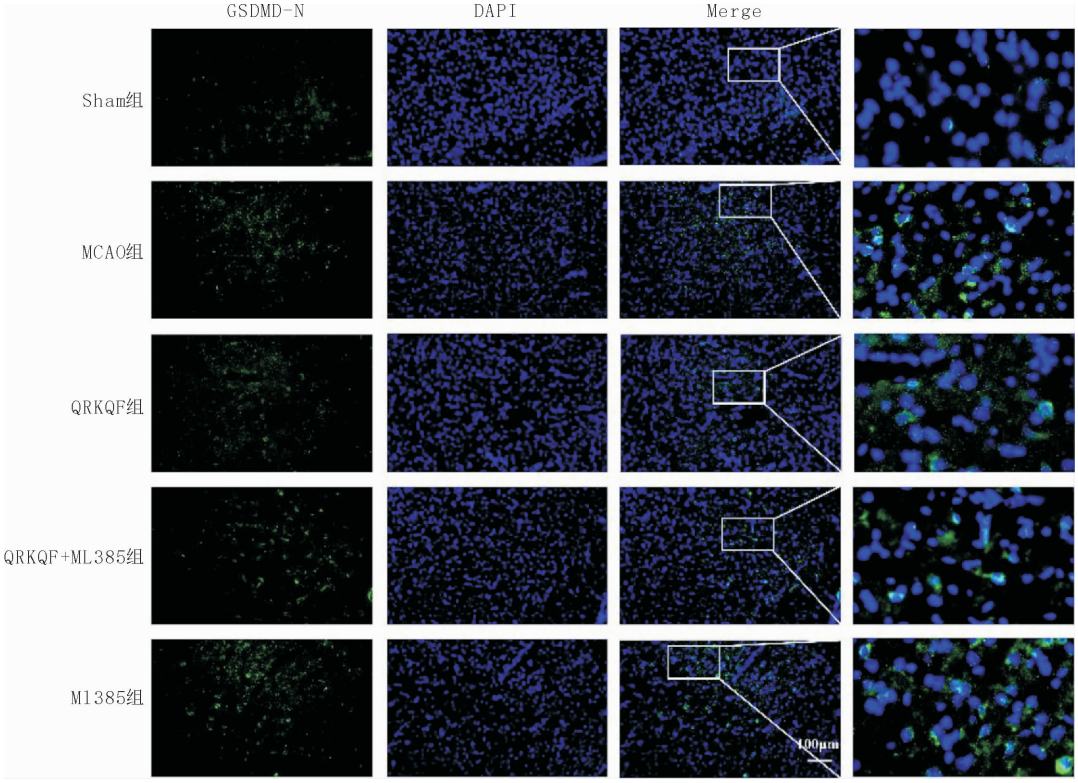


图 4　各组大鼠缺血皮质 GSDMD－N 蛋白免疫荧光染色图

3.6　清热开窍方对大鼠缺血皮质 MDA、GSH、SOD、CAT 水平的影响　与 Sham 组比较，MCAO 组大鼠皮质 MDA 水平升高，GSH、SOD、CAT 水平降低（$P<0.01$）；与 MCAO 组比较，QRKQF 组大鼠皮质 MDA 水平降低，GSH、SOD、CAT 水平升高（$P<0.01$）；与 QRKQF 组比较，ML385 组大鼠皮质 MDA 水平升高，GSH、SOD、CAT 水平降低（$P<0.01$）；与 ML385 组比较，QRKQF + ML385 组大鼠皮质 MDA 水平降低，GSH、SOD、CAT 水平升高（$P<0.01$），见表 7。

表 7　各组大鼠缺血皮质 MDA、GSH、SOD、CAT 水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	MDA/μmol·g^{-1}	GSH(c/μmol·L^{-1})	SOD/U·mg^{-1}	CAT/μmol·g^{-1}
Sham 组	3	37.67±2.69	52.81±0.33	82.75±5.17	174.70±19.31
MCAO 组	3	71.05±6.56**	35.90±2.48**	44.07±1.19**	73.69±6.89**
QRKQF 组	3	46.36±2.87$^{\#\#}$	49.57±0.65$^{\#\#}$	68.48±2.76$^{\#\#}$	154.30±21.20$^{\#\#}$
QRKQF＋ML385 组	3	55.13±1.76$^{\triangle\triangle}$	46.06±2.00$^{\triangle\triangle}$	60.29±5.17$^{\triangle\triangle}$	134.50±13.70$^{\triangle\triangle}$
ML385 组	3	73.57±6.30$^{\&\&}$	36.75±2.90$^{\&\&}$	41.85±1.58$^{\&\&}$	74.86±6.54$^{\&\&}$

注：与 Sham 组比较，$^{**}P<0.01$；与 MCAO 组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与 QRKQF 组比较，$^{\&\&}P<0.01$；与 ML385 组比较，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

4　讨论

IS 具有高发病率、高复发率及高病死率的特征，对我国居民健康构成严重威胁。及时恢复缺血脑组织的血流灌注、改善缺血缺氧状态、减轻实质性损伤是 IS 的核心治疗策略。目前临床主要采用溶栓、抗凝和抗血小板等治疗手段，但溶栓治疗的时间窗狭窄，抗凝与抗血小板药物存在增加出血风险等问题，从而限制了临床疗效并影响预后[12]。因此，深入探究 IS 的发病机制，减轻 CIRI，寻求安全有效的治疗方案仍是当前临床研究亟须解决的重要问题。岐黄学者张允岭教授拟定的清热开窍方在临床上已取得良好疗效，方中栀子、川芎共为君药，意在清热泻火、活血通络；三七活血散瘀，胆南星清热化痰，石菖蒲豁痰开窍醒神，共为臣药；天麻熄风通络，生地黄清热凉血、养阴生津，为佐药，配以炙甘草调和诸药。八药相合，共奏清热活血、化痰通络之效。本团队前期研究证实，清热开窍方可有效抑制 CIRI 诱导的炎症反应，减少脑梗死体积，发挥神经保护作用。然而，清热开窍方发挥疗效的具体分子机制尚

未完全阐明,本研究旨在系统挖掘其潜在调控靶点及信号通路。

研究证实,Nrf2/HO－1 信号通路通过诱导抗氧化酶(如 HO－1)清除过量 ROS,减轻氧化应激损伤,进而抑制细胞因子风暴和细胞焦亡,发挥神经保护作用[13]。Nrf2 在调节氧化应激、炎症反应和细胞焦亡过程中起着至关重要的作用[14]。在生理条件下,Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Kelch－like ECH－associated protein 1,Keap1)在细胞质中结合而降解失活。当脑组织发生缺血缺氧损伤时,Nrf2 活化并游离至细胞核,与抗氧化反应元件结合,上调 HO－1 等的表达。HO－1 是 Nrf2 转录调控的关键下游基因,二者协同作用,发挥抑制氧化应激、炎症反应和细胞焦亡的保护效应[15－16]。研究显示,给予 CIRI 小鼠 Nrf2 激活剂可显著减少脑梗死体积,改善神经功能[17]。在 MCAO 模型中上调 Nrf2、HO－1 的表达,能够减轻大鼠 CIRI 及神经功能缺损程度[18]。本研究证实,清热开窍方可上调大鼠缺血侧脑组织中 Nrf2、HO－1 蛋白表达,改善 IS 大鼠神经功能损伤程度,减少脑缺血体积及脑含水量,从而发挥神经保护作用。而在清热开窍方基础上加入 Nrf2 抑制剂 ML385 后,Nrf2、HO－1 的表达被抑制,且 ML385 逆转了清热开窍方对 CIRI 大鼠的治疗作用,表明清热开窍方可能通过调节 Nrf2/HO－1 信号通路,减轻 CIRI 大鼠神经损伤。

氧化应激是 IS 发生发展的关键病理基础之一。Nrf2/HO－1 信号通路的激活能够诱导抗氧化应激反应[19]。当机体遭受脑缺血缺氧等刺激时,组织内 ROS 生成与清除的动态平衡被打破,过量蓄积的 ROS 可引发氧化应激损伤[20]。氧化应激损伤的程度可通过 MDA、GSH、SOD、CAT 等指标进行评估,MDA 水平与氧化损伤程度呈正相关,而 SOD、GSH、CAT 水平与氧化损伤程度呈负相关。研究表明,抑制氧化应激相关通路可显著减少 MCAO 小鼠脑梗死体积并减轻神经功能缺损[21]。石瑞等[22]研究发现,在氧化应激状态下,MCAO 大鼠 Nrf2/HO－1 信号通路被抑制,SOD 活性明显降低,MDA 含量明显增加。杨文君等[23]研究显示,MCAO 小鼠脑组织中 MDA 和 ROS 水平升高,而 Nrf2、HO－1 和 SOD 水平下降,表明发生了氧化应激反应。本研究发现,清热开窍方可降低大鼠脑组织 MDA 水平,提高 GSH、SOD 及 CAT 水平,同时激活 Nrf2/HO－1 信号通路,与先前研究结果一致。

细胞焦亡是程序性细胞死亡的一种炎症形式,GSDMD 是执行细胞焦亡的关键蛋白[24]。NLRP3/Caspase－1/GSDMD 信号通路作为细胞焦亡的经典调控轴,在脑缺血的病理进程中发挥关键介导作用。Nrf2 激活与细胞焦亡信号通路密切相关,其可通过阻断 ROS 依赖的 NLRP3 炎症小体组装,抑制 Caspase－1 活化及其介导的 GSDMD 切割,减少炎症因子的成熟与释放,减轻炎症反应,最终抑制细胞焦亡[25]。在缺血 1 h 再灌注 24 h 的 MCAO 小鼠模型中,采用 Nrf2 抑制剂 ML385 处理后,可通过抑制 AKT/Nrf2/HO－1 信号通路,诱发 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡[26]。研究显示,CIRI 大鼠脑组织中 *Nrf2*、*HO－1* mRNA 表达水平降低,NLRP3、Caspase－1、GSDMD 蛋白表达水平升高。Nrf2 激动剂干预可降低脑组织 ROS 水平,抑制 NLRP3、Caspase－1 表达,减轻 CIRI 大鼠氧化应激与炎症反应,进而抑制神经元焦亡并改善脑神经元损伤[27]。以上结果提示,Nrf2 可能通过调控 NLRP3/Caspase－1/GSDMD 焦亡信号轴参与 CIRI 的病理进程,其抗氧化应激和抑制细胞焦亡的双重作用有望成为脑缺血治疗的潜在靶点。这与本研究结果一致,即 CIRI 大鼠脑组织中 NLRP3、Caspase－1、GSDMD－N 等焦亡关键蛋白表达上调;清热开窍方干预后,上述蛋白的表达水平明显下调,且 ML385 干预可逆转清热开窍方的神经保护作用。

综上所述,清热开窍方可能通过激活 Nrf2/HO－1 信号通路,调控氧化应激与炎症反应,抑制细胞焦亡,从而发挥神经保护作用。本研究为 IS 的病理机制研究提供新视角,同时为中西医结合防治神经系统疾病提供新靶点与基础依据。

参考文献:

[1] Report on Stroke Center in China Writing Group.《中国卒中中心报告 2022》概要[J]. 中国脑血管病杂志,2024,21(8):565－576.

[2] DUAN W L,WANG X J,MA Y P,et al. Therapeutic strategies targeting the NLRP3－mediated inflammatory response and pyroptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury (Review)[J]. Mol Med Rep,2024,29(3):46.

[3] JI Z J,SHI Y,LI X,et al. Neuroprotective effect of Taohong Siwu decoction on cerebral ischemia/reperfusion injury via mitophagy－NLRP3 inflammasome pathway[J]. Front Pharmacol,2022,13:910217.

[4] XIA P P,MARJAN M,LIU Z Y,et al. Chrysophanol post-conditioning attenuated cerebral ischemia－reperfusion injury induced NLRP3－related pyroptosis in a TRAF6－de-

pendent manner[J]. Exp Neurol,2022,357:114197.
[5]ABDERRAZAK A,SYROVETS T,COUCHIE D,et al. NLRP3 inflammasome:from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases[J]. Redox Biol,2015,4:296 - 307.
[6]VAN OPDENBOSCH N,LAMKANFI M. Caspases in cell death,inflammation,and disease[J]. Immunity,2019,50(6):1352 - 1364.
[7]高原,于文慧,张美君,等. Nrf2/HO - 1 信号通路与缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志,2020,26(4):776 - 778.
[8]XU X J,ZHANG L,YE X C,et al. Nrf2/ARE pathway inhibits ROS - induced NLRP3 inflammasome activation in BV2 cells after cerebral ischemia reperfusion[J]. Inflamm Res,2018,67(1):57 - 65.
[9]LIU X T,LIN X,ZHANG S Y,et al. Lycopene ameliorates oxidative stress in the aging chicken ovary via activation of Nrf2/HO - 1 pathway[J]. Aging (Albany NY),2018,10(8):2016 - 2036.
[10]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.
[11]GARCIA J H,WAGNER S,LIU K F,et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. Stroke,1995,26(4):627 - 634.
[12]李光硕,赵性泉.《中国急性缺血性卒中诊治指南 2023》解读[J]. 中国卒中杂志,2024,19(8):956 - 961.
[13]QIAO J L,MA H Z,CHEN M R,et al. Vitamin D alleviates neuronal injury in cerebral ischemia - reperfusion via enhancing the Nrf2/HO - 1 antioxidant pathway to counteract NLRP3 - mediated pyroptosis[J]. J Neuropathol Exp Neurol,2023,82(8):722 - 733.
[14]NISHIKAWA S,INOUE Y,HORI Y,et al. Anti - inflammatory activity of kurarinone involves induction of HO - 1 via the KEAP1/Nrf2 pathway[J]. Antioxidants (Basel),2020,9(9):842.
[15]WANG L,ZHANG X,XIONG X X,et al. Nrf2 regulates oxidative stress and its role in cerebral ischemic stroke[J]. Antioxidants (Basel),2022,11(12):2377.
[16]CUI H Y,ZHANG X J,YANG Y,et al. Rosmarinic acid elicits neuroprotection in ischemic stroke via Nrf2 and heme oxygenase 1 signaling[J]. Neural Regen Res,2018,13(12):2119 - 2128.
[17]TAKAGI T,KITASHOJI A,IWAWAKI T,et al. Temporal activation of Nrf2 in the penumbra and Nrf2 activator - mediated neuroprotection in ischemia - reperfusion injury[J]. Free Radic Biol Med,2014,72:124 - 133.
[18]左龙,祝美珍,胡嘉婧,等. 清通化瘀汤对大鼠脑缺血再灌注损伤 Nrf2、HO - 1 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2024,44(22):5525 - 5531.
[19]赵宇琦,王琪,许军峰. 基于 Nrf2 信号通路探讨中药治疗缺血性脑卒中[J/OL]. 中医学报,1 - 17[2025 - 09 - 01]. https://link.cnki.net/urlid/41.1411.R.20240914.0836.008.
[20]ZHAO H P,HAN Z P,JI X M,et al. Epigenetic regulation of oxidative stress in ischemic stroke[J]. Aging Dis,2016,7(3):295 - 306.
[21]DU J,YIN G B,HU Y D,et al. Coicis Semen protects against focal cerebral ischemia - reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and promoting angiogenesis via the TGFβ/ALK1/Smad1/5 signaling pathway[J]. Aging (Albany NY),2020,13(1):877 - 893.
[22]石瑞,孙亚萍,谢占维,等. 基于 Nrf2/HO - 1 通路探讨益气活血化浊解毒方改善大鼠脑缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 河北中医药学报,2023,38(1):3 - 8,23.
[23]杨文君,董盛,陈雨菡,等. 黄芪 - 丹参对脑缺血/再灌注损伤小鼠氧化应激的影响[J]. 中医学报,2024,39(5):1045 - 1052.
[24]ORNING P,LIEN E,FITZGERALD K A. Gasdermins and their role in immunity and inflammation[J]. J Exp Med,2019,216(11):2453 - 2465.
[25]XIAO L,DAI Z W,TANG W J,et al. Astragaloside IV alleviates cerebral ischemia - reperfusion injury through NLRP3 inflammasome - mediated pyroptosis inhibition via activating Nrf2[J]. Oxid Med Cell Longev,2021,2021:9925561.
[26]WEI X Y,ZHANG T Q,MA C,et al. TRIM27 ameliorates ischemic stroke by regulating NLRP3 inflammasome - mediated pyroptosis via the Akt/Nrf2/HO - 1 signaling[J]. Exp Neurol,2024,371:114599.
[27]朱超霞,李志营,吕晓飞,等. 基于 Nrf2/NLRP3/Caspase - 1 信号通路探讨毛兰素对脑缺血再灌注大鼠神经元焦亡的影响[J]. 中国临床神经科学,2025,33(2):128 - 135.

收稿日期:2025 - 04 - 15
作者简介:刘嘉(2000 -),女,山东青岛人,硕士研究生,研究方向:中医药防治脑病。
通信作者:刘雪梅(1979 -),女,山东烟台人,医学博士,研究员,博士研究生导师,研究方向:中医药防治脑病。E - mail:liuxuemeitcm@163.com

编辑:刘凯歌