# 脑络通颗粒激活 Nrf2/HO－1 通路抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡改善大鼠脑缺血再灌注损伤*

李亚军[1]，梅灯[1]，张燕[1]，王鹏[1]，李良勇[1]，杨文明[1,2,3]✉

1. 安徽中医药大学第一附属医院，安徽 合肥 230031；2. 合肥综合性国家科学中心大健康研究院－新安医学与中医药现代化研究所，安徽 合肥 230012；3. 新安医学教育部重点实验室，安徽 合肥 230012

**摘要**：目的：探讨脑络通颗粒调控核转录因子 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）通路与 NOD 样受体蛋白 3（NOD－like receptor protein 3，NLRP3）炎症小体介导的细胞焦亡改善大鼠脑缺血再灌注损伤的作用机制。方法：将 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为假手术组（sham 组）、模型组（MCAO/R 组）和脑络通颗粒组（NLT 组），每组 10 只。除 sham 组外，其余大鼠采用改良线栓法制备右侧大脑中动脉闭塞再灌注（middle cerebral artery occlusion/reperfusion，MCAO/R）模型，NLT 组于术后每日灌胃脑络通颗粒 20.2 g·kg$^{-1}$，sham 组和 MCAO/R 组灌胃等体积生理盐水，连续 7 d。采用 Longa 评分法评估大鼠神经功能缺损程度，TTC 染色测定脑梗死面积比例，HE 染色观察大脑皮层病理改变，TUNEL 法检测神经细胞凋亡率，ELISA 法检测血清丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）及白细胞介素－1β（interleukin－1β，IL－1β）、白细胞介素－18（interleukin－18，IL－18）水平，免疫荧光染色法检测脑组织活性氧（reactive oxygen species，ROS）阳性细胞率，RT－qPCR 与 Western blot 法检测脑组织 *Nrf2*、*HO－1*、*NQO1*、*NLRP3*、*Caspase－1* 及 *GSDMD－N* 基因和蛋白表达水平。结果：与 sham 组比较，MCAO/R 组大鼠神经功能评分升高，脑梗死面积比例增加（$P<0.05$），大脑皮层出现明显的核皱缩、坏死等病理改变，血清 MDA、IL－1β、IL－18 水平升高，SOD 水平降低（$P<0.05$），神经细胞凋亡率与 ROS 阳性细胞率升高（$P<0.05$），脑组织 *Nrf2*、*HO－1*、*NQO1* mRNA 和蛋白表达水平降低，*NLRP3*、*Caspase－1*、*GSDMD－N* mRNA 和蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与 MCAO/R 组比较，NLT 组大鼠上述指标均显著改善（$P<0.05$）。结论：脑络通颗粒可能通过激活 Nrf2/HO－1 通路，抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡，减轻氧化应激和炎症反应，从而改善脑缺血再灌注大鼠的神经功能损伤。

**关键词**：脑缺血再灌注损伤；脑络通颗粒；细胞焦亡；NLRP3；Nrf2/HO－1 通路；大鼠
**DOI**：10.16368/j.issn.1674－8999.2026.10.319
**中图分类号**：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2026)10－2092－08

# Naoluotong Granules Activating Nrf2/HO－1 Pathway to Inhibit NLRP3 Inflammasome－Mediated Pyroptosis and Improve Cerebral Ischemia－Reperfusion Injury in Rats

LI Yajun[1]，MEI Deng[1]，ZHANG Yan[1]，WANG Peng[1]，LI Liangyong[1]，YANG Wenming[1,2,3]

1. The First Affiliated Hospital to Anhui University of Chinese Medicine，Hefei Anhui China 230031；2. Institute of Health Research of

* **基金项目**：国家中医药传承创新中心项目｛发改办社会〔2022〕366 号｝；安徽中医药大学国家中医药管理局中医基础理论高水平重点学科开放课题项目（ZYJCLLYB－15）；安徽省中医药学会中医药科研项目（2024ZYYXH150）

**作者简介**：李亚军（1981－），男，安徽灵璧人，医学硕士，主任医师，硕士研究生导师，研究方向：中西医结合诊治脑血管疾病。
✉**通信作者**：杨文明，医学博士，主任医师，博士研究生导师，研究方向：中西医结合诊治神经内科疾病的基础与临床研究。E－mail：yangwm8810@126.com

Hefei Comprehensive National Science Center – Institute of Xinan Medicine and Modernization of Chinese Medicine, Hefei Anhui China 230012; 3. Key Laboratory of Xinan Medicine, Ministry of Education, Hefei Anhui China 230012

**Abstract**: Objective: To explore the mechanism by which Naoluotong Granules regulate the nuclear factor erythroid 2 – related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase – 1 (HO – 1) pathway and NOD – like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome – mediated pyroptosis to improve cerebral ischemia – reperfusion injury in rats. Methods: Thirty SPF – grade male SD rats were randomly divided into three groups: sham group (sham), model group (MCAO/R), and Naoluotong Granules group (NLT), with 10 rats per group. Except for the sham group, the rest of the rats underwent a modified intraluminal filament method to create a right middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model. The NLT group received 20.2 g · kg$^{-1}$ of Naoluotong Granules by oral gavage daily after surgery, while the sham and MCAO/R groups received an equal volume of saline for 7 days. Longa scoring was used to assess neurological deficits in rats; TTC staining was used to measure the proportion of cerebral infarct area; HE staining was used to observe pathological changes in the cerebral cortex; TUNEL assay was used to detect neuronal apoptosis rates; ELISA was used to measure serum malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), interleukin – 1β (IL – 1β), and interleukin – 18 (IL – 18) levels; immunofluorescence staining was used to detect the proportion of reactive oxygen species (ROS) – positive cells in brain tissue; RT – qPCR and Western blot were used to measure gene and protein expression levels of *Nrf2*, *HO – 1*, *NQO1*, *NLRP3*, *Caspase – 1*, and *GSDMD – N* in brain tissue. Results: Compared with the sham group, rats in the MCAO/R group showed increased neurological scores, a higher proportion of cerebral infarct area ($P < 0.05$), obvious pathological changes in the cerebral cortex such as nuclear shrinkage and necrosis, elevated serum levels of MDA, IL – 1β, and IL – 18, and decreased SOD levels ($P < 0.05$). The rates of neuronal apoptosis and ROS – positive cells were higher ($P < 0.05$). In the brain tissue, the mRNA and protein expression levels of *Nrf2*, *HO – 1*, and *NQO1* were decreased, while those of *NLRP3*, *Caspase – 1*, and *GSDMD – N* were increased ($P < 0.05$). Compared with the MCAO/R group, rats in the NLT group showed significant improvement in all the above indicators ($P < 0.05$). Conclusion: Naoluotong Granules may improve neurological damage in rats with cerebral ischemia – reperfusion by activating the Nrf2/HO – 1 pathway, inhibiting NLRP3 inflammasome – mediated pyroptosis, and reducing oxidative stress and inflammatory responses.

**Key words**: cerebral ischemia – reperfusion injury; Naoluotong Granule; pyroptosis; NLRP3; Nrf2/HO – 1 pathway; rat

中风是一种以脑缺血为主因的中枢神经系统急性疾病，全世界每年新增中风病例约 1 350 万例，其中病死率高达 40.7%[1-2]。目前，缺血后再通挽救缺血半暗带是中风最有效的治疗方法，但血流恢复后往往不可避免地发生进一步的脑组织结构和神经功能损伤，称为脑缺血再灌注（ischemia/reperfusion，I/R）损伤。再灌注后脑组织病理生理变化复杂，包括氧化应激、炎症反应及神经细胞焦亡等[3-5]。因此，寻找能够有效减轻 I/R 损伤的药物具有重要的临床意义。

核转录因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2 – related factor 2，Nrf2）是调控氧化应激的重要转录因子，增加皮质神经元 Nrf2 核表达可减轻氧 – 葡萄糖剥夺诱导的皮层神经元损伤[6]，同时激活 Nrf2 也可抑制氧化应激引起的经典焦亡途径[7-8]。研究表明，细胞焦亡在脑 I/R 损伤中发挥重要作用，是干预脑 I/R 损伤的新靶点[5]。本课题组前期研究证实，脑络通颗粒可拮抗脑组织炎症反应，改善脑梗死患者临床症状，减少脑组织损伤[9]；动物实验亦表明，脑络通颗粒可抑制 Toll 样受体 4（Toll – like receptor 4，TLR4）/核转录因子 – κB（nuclear factor – κB，NF – κB）炎症通路，减少大鼠脑梗死面积及活性氧（reactive oxygen species，ROS）表达，改善神经功能缺损[10]。但其对 I/R 损伤后神经细胞焦亡的调控机制尚未阐明。本研究通过构建大鼠大脑中动脉闭塞/再灌注（middle cerebral artery occlusion/reperfusion，MCAO/R）模型，从 Nrf2/血红素加氧酶 – 1（heme oxygenase – 1，HO – 1）通路调控 NOD 样受体蛋白 3（NOD – like receptor protein 3，NLRP3）炎症小体介导的细胞焦亡角度，探讨脑络通颗粒缓解脑 I/R 损伤的机制，以期为临床治疗提供新的实验依据。

## 1　材料

**1.1　实验动物**　SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只，7 ~ 8 周龄，体质量（200 ± 20）g，由河南斯克贝斯生物科技股份有限公司提供，动物生产许可证号：SCXK（豫）2020 – 0005。大鼠饲养于温度（26 ± 1）℃、相对湿度 60% 的清洁级动物实验室内，自由饮水和进食，正式实验前适应性饲养 7 d。本研究经安徽中医药大学科技伦理委员会审核批准，伦理批准号：AHUCM – rats – 2025092。

**1.2　药物与试剂**　脑络通颗粒(安徽中医药大学第一附属医院中药房,组成包括黄芪 20 g,当归 10 g,赤芍 10 g,川芎 6 g,葛根 15 g,石菖蒲 10 g,地龙 10 g,熟大黄 6 g);Nrf2 抗体(Abcam 公司,货号:ab92946);HO－1 抗体、NLRP3 抗体、GSDMD－N 抗体(Affinity 公司,货号:DF6391、DF7438、DF13758);NQO1 抗体、β－actin 抗体(Proteintech 公司,货号:67240－1－Ig、66009－1－Ig);二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:ZB－2301);TTC 染液(北京索莱宝科技有限公司,货号:G3005);丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A003－1－2、A001－3－2);白细胞介素－1β(interleukin－1β,IL－1β)、白细胞介素－18(interleukin－18,IL－18)ELISA 试剂盒(上海威奥生物科技有限公司,货号:ER20275M、ER20267M)。

**1.3　仪器**　DR－200Bc 型全波长酶标仪(无锡华卫德朗仪器有限公司);SH－523 型化学发光成像系统(杭州申花科技有限公司);Mini－Protean Tetra System 电泳系统(美国 Bio－Rad 公司);LightCycler 480 型实时荧光定量 PCR 仪(Roche 公司);T51491 型超微量分光光度计(Implen 公司);H1650－W 型常温离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);ECLIPSE E100 型显微镜(Nikon 公司)。

## 2　方法

**2.1　分组、造模及给药**　将 30 只雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为假手术组(sham 组)、模型组(MCAO/R 组)和脑络通颗粒组(NLT 组),每组 10 只。除 sham 组外,其余大鼠采用改良线栓法制备右侧大脑中动脉闭塞再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion,MCAO/R)模型[11]。大鼠麻醉后,常规剃毛、消毒,逐层钝性分离颈前区皮肤和肌肉组织,暴露右侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉;结扎颈总动脉及颈外动脉近心端,于颈总动脉与颈内动脉分叉处剪一切口,将备好的线栓经切口沿颈内动脉送至大脑中动脉起始部,阻断血流 2 h 后拔出线栓再灌注 22 h。sham 组仅暴露右侧颈总动脉,不插线。造模成功后灌胃,NLT 组灌胃脑络通颗粒 20.2 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$[12],sham 组和 MCAO/R 组灌胃等体积生理盐水,连续 7 d。末次灌胃 2 h 后取材。

**2.2　神经功能评分**　参照 Zea Longa 评分标准[13]对各组大鼠进行神经功能评分,4 分:无自主活动伴意识障碍;3 分:站立或爬行时向对侧倾倒;2 分:爬行时向对侧旋转;1 分:提尾时对侧前肢内收屈曲;0 分:无神经损伤。

**2.3　TTC 染色检测大鼠脑组织梗死比例**　大鼠麻醉处死后取新鲜脑组织,置于－20 ℃冰箱冻存 30 min,取出后制备 2 mm 冠状切片共 5 片,置于 2% TTC 染液 37 ℃孵育 30 min,随后多聚甲醛溶液固定 6 h,拍照后采用 Image J 软件分析脑梗死面积比例,每组随机选取 3 只大鼠样本进行检测。

**2.4　HE 染色检测大鼠大脑皮层病理改变**　取大鼠新鲜脑组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,常规脱水、石蜡包埋,制备 4～5 μm 冠状切片。切片脱蜡后,苏木素和伊红染色,封片,光学显微镜下拍照观察。

**2.5　TUNEL 法检测大鼠神经细胞凋亡情况**　取包埋好的蜡块,制备 4～5 μm 冠状切片,烤片脱蜡,使用 TUNEL 染色试剂盒进行染色,封片,荧光显微镜下拍照观察,每组随机选取 3 只大鼠样本进行检测。

**2.6　免疫荧光染色法检测大鼠脑组织 ROS 阳性细胞率**　取大鼠新鲜脑组织,使用 OCT 包埋剂进行包埋,冰冻切片机制备脑组织冠状切片。采用荧光 ROS 染色试剂盒进行 ROS 染色,荧光显微镜下拍照观察,计算 ROS 阳性细胞率,每组随机选取 3 只大鼠样本进行检测。

**2.7　氧化应激与炎症因子水平检测**　称取 1 g 大鼠新鲜脑组织,加入 1 mL 预冷 PBS,使用冷冻研磨仪进行组织匀浆,离心取上清液,按照试剂盒说明书检测大鼠脑组织 SOD 与 MDA 含量。大鼠麻醉后采用真空采血管进行腹主动脉采血,300×$g$、1 500 $r \cdot min^{-1}$离心 5 min,分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 IL－1β、IL－18 水平,每组随机选取 3 只大鼠样本进行检测。

**2.8　Western blot 检测大鼠脑组织中 Nrf2、NQO1、HO－1、NLRP3、Caspase－1 和 GSDMD－N 蛋白表达水平**　取 100 mg 大鼠脑组织,加入裂解液提取蛋白并采用 BCA 法进行蛋白定量。取 50 μg 蛋白样本加入上样缓冲液后煮沸 8 min,采用湿法转膜(恒定电流 250 mA,70 min)至 PVDF 膜,室温封闭 1 h。随后加入一抗 Nrf2(1∶1 000)、NQO1(1∶5 000)、HO－1(1∶1 000)、NLRP3(1∶1 000)、Caspase－1(1∶1 000)、GSDMD－N(1∶1 000),4 ℃孵育过夜;次日以 TBST 洗膜,室温孵育二抗(1∶10 000)1 h;TBST 洗膜,化学发光、显影后拍

照，并使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值，每组随机选取 3 只大鼠样本进行检测。

**2.9　RT－qPCR 检测大鼠脑组织 *Nrf2*、*NQO1*、*HO－1*、*NLRP3*、*Caspase－1* 和 *GSDMD－N* mRNA 表达水平**　采用 RNA 提取试剂盒提取各组大鼠脑组织总 RNA，分光光度计检测总 RNA 浓度及纯度，样品合格（OD260/OD280＝1.7～2.0）后，逆转录得到 cDNA，置于－20 ℃保存备用。RT－qPCR 扩增条件为：95 ℃，30 s；95 ℃，5 s；60 ℃，34 s，40 个循环。引物序列见表 1，采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法分析目的基因的相对表达水平，每组随机选取 3 只大鼠样本进行检测。

**表 1　引物序列**

| 基因 | 上游引物（5′－3′） | 下游引物（5′－3′） |
|---|---|---|
| Rat－*Nrf2* | TGATTTAAGCAGCATACAGCAG | GTATTAAGACACTGTAACTCGGG |
| Rat－*NQO1* | GGGTGCCCGCCATTCTGAAA | CCCGGTGGTGATGGAAAGCA |
| Rat－*HO－1* | CTGCAGGCACTGCTGACAGA | TGTGAGGACCCATCGCAGGA |
| Rat－*NLRP3* | GAAACTCTGGTTGGTCAGC | AGAGAATGGTTGGAGCTCAG |
| Rat－*Caspase－1* | AAGATGATGGCATTAAGAAGGC | TCCAGGACACATTATCTGGTG |
| Rat－*GSDMD* | CGACTCTGGAGAACTGGTG | TGGGTTTCACTCAACCCAG |
| Rat－$\beta$－*actin* | CAACCTTCTTGCAGCTCCTC | GACCCATACCCACCATCACA |

**2.10　统计学方法**　采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析，数据均满足正态分布与方差齐性，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，组间两两比较采用 *LSD－t* 检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3　结果

**3.1　各组大鼠神经功能评分及脑梗死面积比例比较**　与 sham 组比较，MCAO/R 组大鼠神经功能评分与脑梗死面积比例升高（$P<0.05$）；与 MCAO/R 组比较，NLT 组大鼠神经功能评分与脑梗死面积比例降低（$P<0.05$），见表 2、图 1。

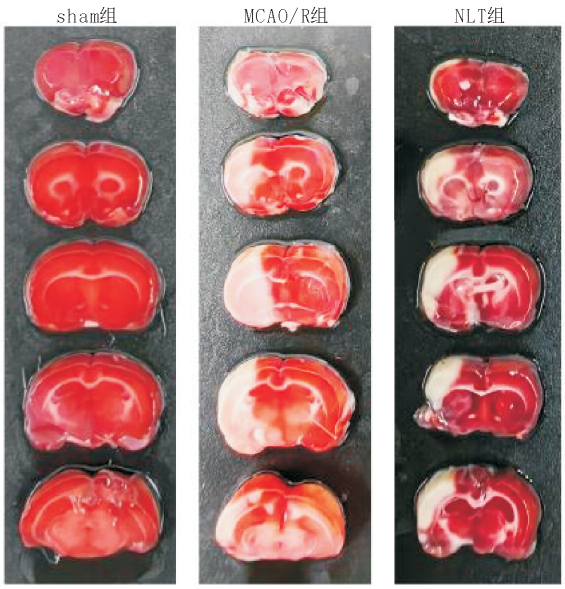



**图 1　各组大鼠脑组织 TTC 染色图**

**3.2　各组大鼠大脑皮层病理形态变化**　HE 染色显示，sham 组大鼠大脑皮层神经元结构圆润饱满，排列均匀；MCAO/R 组大鼠大脑皮层神经元出现大范围细胞核皱缩、坏死，排列不均匀，形态不规则（红色箭头标示）；NLT 组大鼠大脑皮层神经元病理改变较 MCAO/R 组明显改善，见图 2。

**表 2　各组大鼠神经功能评分及脑梗死面积比例比较**　（$\bar{x}\pm s$）

| 组别 | *n* | 神经功能评分/分 | 脑梗死面积比例/% |
|---|---|---|---|
| sham 组 | 3 | 0 | 0 |
| MCAO/R 组 | 3 | 2.750±0.250* | 23.620±0.722* |
| NLT 组 | 3 | 1.500±0.289# | 14.130±1.058# |

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

**3.3　各组大鼠大脑皮层神经细胞凋亡率比较**　免疫荧光染色显示，与 sham 组比较，MCAO/R 组大鼠大脑皮层神经细胞凋亡率显著升高（$P<0.05$）；与 MCAO/R 组比较，NLT 组大鼠大脑皮层神经细胞凋亡率显著降低（$P<0.05$），见图 3、表 3。

**表 3　各组大鼠大脑皮层神经细胞凋亡率比较**　（$\bar{x}\pm s$，%）

| 组别 | *n* | 细胞凋亡率 |
|---|---|---|
| sham 组 | 3 | 7.540±0.426 |
| MCAO/R 组 | 3 | 69.140±1.187* |
| NLT 组 | 3 | 27.160±0.890# |

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

**3.4　各组大鼠大脑皮层 ROS 表达情况比较**　免疫荧光染色显示，与 sham 组比较，MCAO/R 组大鼠大脑皮层 ROS 阳性细胞率显著升高（$P<0.05$）；与 MCAO/R 组比较，NLT 组大鼠大脑皮层 ROS 阳性细胞率显著降低（$P<0.05$），见图 4、表 4。

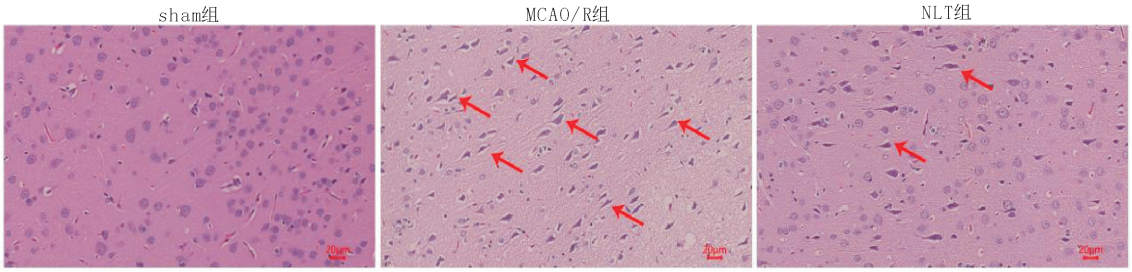



**图 2　各组大鼠大脑皮层病理 HE 染色图(400 ×)**

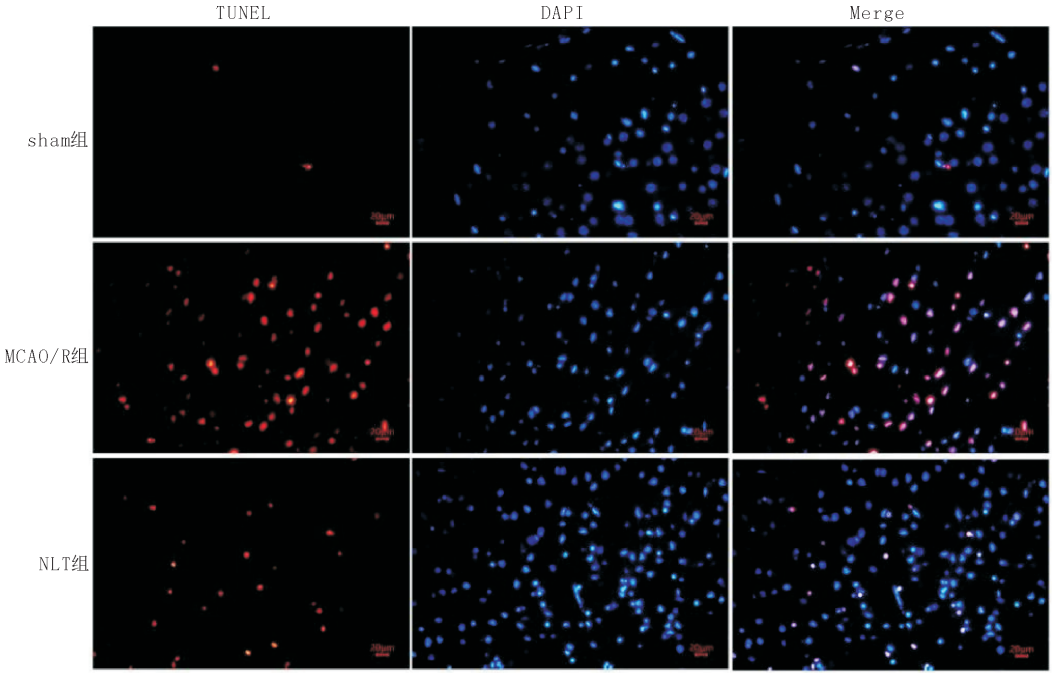



**图 3　各组大鼠大脑皮层神经细胞 TUNEL 染色图(400 ×)**

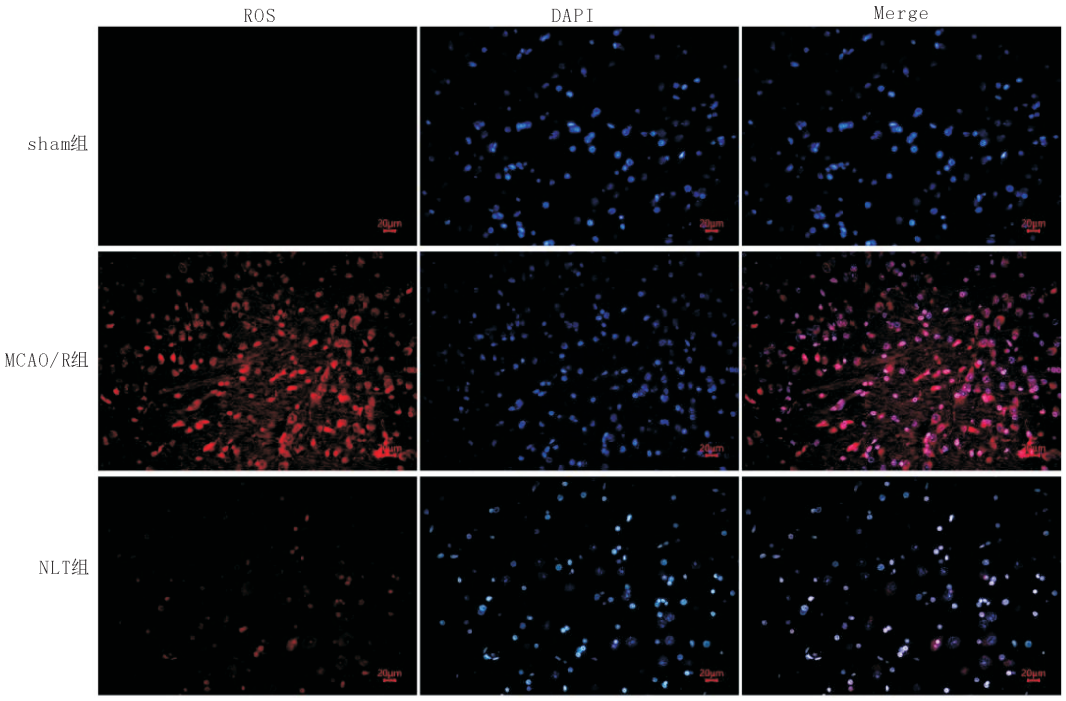



**图 4　各组大鼠大脑皮层 ROS 免疫荧光染色图(400 ×)**

**表 4　各组大鼠大脑皮层 ROS 阳性细胞率比较**　（$\bar{x} \pm s$，%）

| 组别 | $n$ | ROS 阳性细胞率 |
|---|---|---|
| sham 组 | 3 | 5.417 ± 0.427 |
| MCAO/R 组 | 3 | 83.770 ± 2.493* |
| NLT 组 | 3 | 40.940 ± 1.356# |

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

**3.5　各组大鼠血清 MDA、SOD 水平比较**　ELISA 显示，与 sham 组比较，MCAO/R 组大鼠血清 MDA 水平显著升高，SOD 水平显著降低（$P$ < 0.05）；与 MCAO/R 组比较，NLT 组大鼠血清 MDA 水平显著降低，SOD 水平显著升高（$P$ < 0.05），见表 5。

**表 5　各组大鼠血清 MDA、SOD 水平比较**　（$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | $n$ | MDA/μmol · g$^{-1}$ | SOD/U · g$^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| sham 组 | 3 | 3.740 ± 0.029 | 10.360 ± 0.338 |
| MCAO/R 组 | 3 | 9.571 ± 0.049* | 2.896 ± 0.054* |
| NLT 组 | 3 | 5.765 ± 0.037# | 4.910 ± 0.110# |

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

**3.6　各组大鼠血清 IL－1β、IL－18 水平比较**　ELISA 显示，与 sham 组比较，MCAO/R 组大鼠血清 IL－1β、IL－18 水平显著升高（$P$ < 0.05）；与 MCAO/R 组比较，NLT 组大鼠血清 IL－1β、IL－18 水平显著降低（$P$ < 0.05），见表 6。

**表 6　各组大鼠血清 IL－1β、IL－18 水平比较**　（$\bar{x} \pm s$，ng · L$^{-1}$）

| 组别 | $n$ | IL－1β | IL－18 |
|---|---|---|---|
| sham 组 | 3 | 212.800 ± 2.679 | 180.900 ± 2.572 |
| MCAO/R 组 | 3 | 992.200 ± 4.465* | 744.400 ± 1.748* |
| NLT 组 | 3 | 455.900 ± 3.397# | 327.400 ± 3.423# |

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

**3.7　各组大鼠脑组织 Nrf2、NQO1、HO－1、NLRP3、Caspase－1 和 GSDMD－N 蛋白表达水平比较**　Western blot 显示，与 sham 组比较，MCAO/R 组大鼠脑组织 Nrf2、NQO1、HO－1、NLRP3、Caspase－1 和 GSDMD－N 蛋白表达水平显著升高（$P$ < 0.05）；与 MCAO/R 组比较，NLT 组大鼠脑组织 Nrf2、NQO1、HO－1 蛋白表达水平显著升高（$P$ < 0.05），NLRP3、Caspase－1 和 GSDMD－N 蛋白表达水平显著降低（$P$ < 0.05），见图 5、表 7。

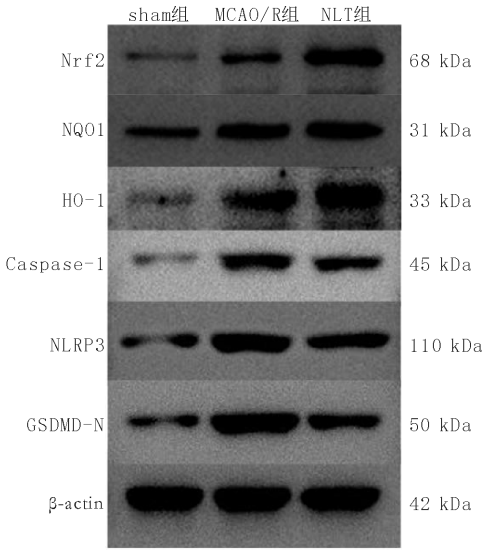



**图 5　各组大鼠脑组织 Nrf2、NQO1、HO－1、NLRP3、Caspase－1 和 GSDMD－N 蛋白电泳图**

**3.8　各组大鼠脑组织 *Nrf2*、*NQO1*、*HO－1*、*NLRP3*、*Caspase－1*、*GSDMD－N* mRNA 表达水平比较**　RT－qPCR 显示，与 sham 组比较，MCAO/R 组大鼠脑组织 *Nrf2*、*NQO1*、*HO－1*、*NLRP3*、*Caspase－1*、*GSDMD－N* mRNA 表达水平显著升高（$P$ < 0.05）；与 MCAO/R 组比较，NLT 组大鼠脑组织 *Nrf2*、*NQO1*、*HO－1* mRNA 表达水平显著升高（$P$ < 0.05），*NLRP3*、*Caspase－1* 和 *GSDMD－N* mRNA 表达水平显著降低（$P$ < 0.05），见表 8。

**表 7　各组大鼠脑组织 Nrf2、NQO1、HO－1、NLRP3、Caspase－1 和 GSDMD－N 蛋白表达水平比较**　（$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | $n$ | Nrf2/β－actin | NQO1/β－actin | HO－1/β－actin | Caspase－1/β－actin | NLRP3/β－actin | GSDMD－N/β－actin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| sham 组 | 3 | 0.078 ± 0.004 | 0.118 ± 0.004 | 0.077 ± 0.003 | 0.255 ± 0.001 | 0.323 ± 0.001 | 0.508 ± 0.006 |
| MCAO/R 组 | 3 | 0.148 ± 0.003* | 0.185 ± 0.004* | 0.187 ± 0.004* | 0.724 ± 0.003* | 0.591 ± 0.002* | 1.033 ± 0.003* |
| NLT 组 | 3 | 0.265 ± 0.004# | 0.290 ± 0.005# | 0.332 ± 0.005# | 0.615 ± 0.002# | 0.520 ± 0.001# | 0.660 ± 0.003# |

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

**表 8　各组大鼠脑组织 *Nrf2*、*NQO1*、*HO－1*、*NLRP3*、*Caspase－1*、*GSDMD－N* mRNA 表达水平比较**　（$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | $n$ | *Nrf2* mRNA | *NQO1* mRNA | *HO－1* mRNA | *Caspase－1* mRNA | *NLRP3* mRNA | *GSDMD－N* mRNA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| sham 组 | 3 | 1.030 ± 0.020 | 0.960 ± 0.023 | 1.050 ± 0.037 | 1.080 ± 0.023 | 0.980 ± 0.017 | 1.050 ± 0.020 |
| MCAO/R 组 | 3 | 2.150 ± 0.073* | 1.970 ± 0.023* | 2.230 ± 0.020* | 2.240 ± 0.050* | 2.550 ± 0.057* | 2.310 ± 0.073* |
| NLT 组 | 3 | 3.260 ± 0.120# | 2.850 ± 0.063# | 3.040 ± 0.047# | 1.780 ± 0.020# | 1.590 ± 0.047# | 1.700 ± 0.050# |

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

## 4　讨论

大脑是人体的重要器官，虽然其质量仅占成人体质量的 2%，但耗能却占人体总耗能的 20%，因此缺血、缺氧极易引起脑组织结构损伤和功能丧失[14]。时间窗内急性脑梗死的临床治疗多采用静脉溶栓或血管内介入手术以恢复血供，但血流恢复的同时常不可避免地引起脑 I/R 损伤[15-16]。缺血再灌注时，ROS 大量堆积，可引发一系列氧化应激反应，导致脑组织结构损伤和神经功能障碍[17-18]。因此，开发能够有效降低氧化应激反应的药物对改善脑 I/R 损伤具有重要意义。脑络通颗粒为安徽中医药大学第一附属医院脑病中心杨文明教授经验方，由黄芪、当归、赤芍、川芎、葛根、石菖蒲、地龙、熟大黄等药物组成，具有补气活血、通络开窍之功[12]。本研究发现，MCAO/R 大鼠经脑络通颗粒干预后神经功能评分及脑组织梗死面积比例均显著降低，提示脑络通颗粒对脑 I/R 损伤具有良好的治疗作用。

细胞焦亡是一种由 GSDMD 介导的程序性细胞死亡形式，其特征为细胞膜破裂、细胞内容物释放及强烈的炎症反应[19]。细胞焦亡具有 Caspase 依赖性，伴有细胞核皱缩及 DNA 损伤等特征，在脑血管疾病的发生发展中发挥重要作用[20-21]。在 NLRP3 炎症小体介导的经典焦亡途径中，病原体相关模式分子被模式识别受体识别后组装成 NLRP3 炎症小体，募集 Caspase－1 进行自我剪接，激活的 Caspase－1 裂解 GSDMD 形成 GSDMD 氮端和碳端，与细胞膜上的磷脂蛋白结合形成孔道，释放 IL－1β、IL－18 等促炎细胞因子，诱导细胞焦亡[19,22]。Wang 等[23]研究发现，抑制 NLRP3 炎症小体活化可减轻细胞焦亡及神经炎症反应，发挥脑保护作用。张怡等[24]研究表明，黄芪甲苷可调控 Caspase－1 表达，抑制神经元焦亡，缓解脑缺血再灌注神经损伤。本研究显示，脑络通颗粒可显著降低 *NLRP3*、*Caspase－1* 及 *GSDMD－N* mRNA 与蛋白表达水平及血清 IL－1β、IL－18 水平，提示脑络通颗粒可能通过抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡减轻脑 I/R 神经功能损伤。

在生理状态下，Nrf2 通过与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1（Kelch－like ECH－associated protein 1，Keap1）物理相互作用而分离。在氧化应激或 Nrf2 刺激因素作用下，Nrf2 与 Keap1 分离并被磷酸化，以启动细胞核中包括 HO－1 在内的第 2 阶段解毒酶的转录[25]。多种慢性疾病及脑卒中、创伤性脑损伤等急性脑损伤的发生发展均与 Nrf2 激活不足密切相关[26-27]。Fu 等[28]研究发现，调节 Nrf2/NF－κB 信号通路可减轻细胞炎症和氧化应激；Chen 等[29]亦证实，通过 Nrf2 途径可缓解 OGD/R 诱导的神经元氧化应激和神经炎症，且 Nrf2 抑制剂 ML385 可逆转该过程。本研究显示，脑络通颗粒可上调 *Nrf2*、*HO－1*、*NQO1* mRNA 与蛋白表达水平，降低 MDA 与 ROS 水平，促进 SOD 表达，提示脑络通颗粒可能通过激活 Nrf2/HO－1 通路减轻氧化应激反应，进而发挥对脑 I/R 损伤的保护作用。

综上所述，脑络通颗粒可能通过激活 Nrf2/HO－1 通路，抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡，减轻氧化应激和炎症反应，从而改善脑缺血再灌注大鼠的神经功能损伤。

## 参考文献：

[1] Donnan G A, Fisher M, MacLeod M, et al. Stroke[J]. Lancet, 2008, 371(9624): 1612－1623.

[2] Lindsay M P, Norrving B, Sacco R L, et al. World stroke organization (WSO): global stroke fact sheet 2019[J]. Int J Stroke, 2019, 14(8): 806－817.

[3] Giebel B, Hermann D M. Identification of the right cell sources for the production of therapeutically active extracellular vesicles in ischemic stroke[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(9): 188.

[4] Shahreyar M, Bob－Manuel T, Khouzam R N, et al. Trends, predictors and outcomes of ischemic stroke and intracranial hemorrhage in patients with a left ventricular assist device[J]. Ann Transl Med, 2018, 6(1): 5.

[5] Barrington J, Lemarchand E, Allan S M. A brain in flame; do inflammasomes and pyroptosis influence stroke pathology?[J]. Brain Pathol, 2017, 27(2): 205－212.

[6] Liu X S, Bai X L, Wang Z X, et al. Nrf2 mediates the neuroprotective effect of isoflurane preconditioning in cortical neuron injury induced by oxygen－glucose deprivation[J]. Hum Exp Toxicol, 2021, 40(7): 1163－1172.

[7] Hu Q, Zhang T, Yi L, et al. Dihydromyricetin inhibits NLRP3 inflammasome－dependent pyroptosis by activating the Nrf2 signaling pathway in vascular endothelial cells[J]. BioFactors, 2018, 44(2): 123－136.

[8] Lin Y Q, Luo T Y, Weng A L, et al. Gallic acid alleviates gouty arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis through enhancing Nrf2 signaling[J]. Front Immunol, 2020, 11: 580593.

[9]李亚军,李良勇,吴云虎,等. 脑络通颗粒治疗气虚血瘀型急性脑梗死的临床疗效及对炎性因子 CRP、TNF－α、IL－1β 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2023,21(16):3058－3061.

[10]李亚军,李良勇,吴云虎,等. 基于 TLR4/NF－κB 信号通路探讨脑络通颗粒对急性脑梗死模型大鼠的影响[J]. 中医学报,2023,38(2):360－366.

[11]Liu J R,Jensen－Kondering U R,Zhou J J,et al. Transient filament occlusion of the middle cerebral artery in rats:does the reperfusion method matter 24 hours after perfusion? [J]. BMC Neurosci,2012,13:154.

[12]马莉,董园振,李良勇. 脑络通颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠凋亡及 PRMT5、p53 的影响[J]. 中医药临床杂志,2024,36(1):124－129.

[13]Li C L,Chi J J,Dai H Y,et al. Salidroside attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by regulating TSC2－induced autophagy[J]. Exp Brain Res,2023,241(1):113－125.

[14]Magistretti P J,Allaman I. Lactate in the brain:from metabolic end－product to signalling molecule[J]. Nat Rev Neurosci,2018,19(4):235－249.

[15]Haines B A,Mehta S L,Pratt S M,et al. Deletion of mitochondrial uncoupling protein－2 increases ischemic brain damage after transient focal ischemia by altering gene expression patterns and enhancing inflammatory cytokines [J]. J Cereb Blood Flow Metab,2010,30(11):1825－1833.

[16]Liu W Y,Miao Y Q,Zhang L,et al. miR－211 protects cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting cell apoptosis[J]. Bioengineered,2020,11(1):189－200.

[17]Orellana－Urzúa S,Rojas I,Líbano L,et al. Pathophysiology of ischemic stroke:role of oxidative stress[J]. Curr Pharm Des,2020,26(34):4246－4260.

[18]Monteiro A M,Couteiro R P,Silva D F D,et al. Remote ischemic conditioning improves rat brain antioxidant defense in a time－dependent mechanism[J]. Acta Cir Bras,2021,36(7):e360707.

[19]曾恒,仇丽雅,黄青青. 布托啡诺调节 PKA/CREB 信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元焦亡的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,2024,32(1):17－23.

[20]Bergsbaken T,Fink S L,Cookson B T. Pyroptosis:host cell death and inflammation[J]. Nat Rev Microbiol,2009,7(2):99－109.

[21]Kesavardhana S,Subbarao Malireddi R K S,Kanneganti T D. Caspases in cell death,inflammation,and pyroptosis [J]. Annu Rev Immunol,2020,38:567－595.

[22]Kelley N,Jeltema D,Duan Y H,et al. The NLRP3 inflammasome:an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. Int J Mol Sci,2019,20(13):3328.

[23]Wang M M,Liu Z Q,Hu S S,et al. Taohong Siwu decoction ameliorates ischemic stroke injury via suppressing pyroptosis[J]. Front Pharmacol,2020,11:590453.

[24]张怡,侯仙明,张拴成,等. 黄芪甲苷通过调控 Caspase－1 介导的经典焦亡途径抑制细胞焦亡缓解脑缺血/再灌注损伤的研究[J]. 中国免疫学杂志,2024,40(2):325－329.

[25]Tavakkoli A,Iranshahi M,Hasheminezhad S H,et al. The neuroprotective activities of natural products through the Nrf2 upregulation[J]. Phytother Res,2019,33(9):2256－2273.

[26]Sandberg M,Patil J,D′Angelo B,et al. NRF2－regulation in brain health and disease:implication of cerebral inflammation[J]. Neuropharmacology,2014,79:298－306.

[27]Yan N,Xu Z P,Qu C H,et al. Dimethyl fumarate improves cognitive deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats by alleviating inflammation,oxidative stress,and ferroptosis via NRF2/ARE/NF－κB signal pathway[J]. Int Immunopharmacol,2021,98:107844.

[28]Fu Y,Jia J P. Isoliquiritigenin confers neuroprotection and alleviates amyloid－β42－induced neuroinflammation in microglia by regulating the Nrf2/NF－κB signaling[J]. Front Neurosci,2021,15:638772.

[29]Chen Y H,He W,Wei H,et al. Srs11－92,a ferrostatin－1 analog,improves oxidative stress and neuroinflammation via Nrf2 signal following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. CNS Neurosci Ther,2023,29(6):1667－1677.

**收稿日期**:2026－05－27
**编辑**:刘凯歌