实验研究

益气升清方调节HIF-1α/NLRP3信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元焦亡的影响

王月[1],权兴苗[1],王玉[2],宋春侠[1△],邵月[3],徐立伟[1]

摘要:目的 探究益气升清方调节缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元焦亡的影响。**方法** 将SD大鼠随机分为假手术组(S组),模型组(M组),益气升清方低、中、高剂量组(3.465、6.930、13.860 g/kg)及益气升清方高剂量+HIF-1α激活剂DMOG组(13.860 g/kg益气升清方+40 mg/kg DMOG),每组15只。采用线栓法构建脑卒中模型。造模成功后进行神经功能缺陷评估;TTC染色评估脑梗死体积;ELISA法检测血清白细胞介素(IL)-1β、IL-18水平;HE染色检测缺血皮质区病理变化;TUNEL染色检测神经元凋亡;Western blot检测焦亡及HIF-1α/NLRP3通路相关蛋白表达。**结果** 与S组比较,M组神经功能缺陷评分、梗死体积、IL-1β含量、IL-18含量、神经细胞凋亡率、胞膜穿孔蛋白D-N端(GSDMD-N)、胱天蛋白酶1(Caspase-1)、HIF-1α、NLRP3蛋白水平均上升($P<0.05$);与M组比较,低、中、高剂量益气升清方组神经功能缺陷评分、梗死体积、IL-1β含量、IL-18含量、神经细胞凋亡率、GSDMD-N、Caspase-1、HIF-1α、NLRP3蛋白水平均下调($P<0.05$);DMOG减弱了高剂量益气升清方对缺血性脑卒中大鼠神经元焦亡的改善作用。**结论** 益气升清方可能通过下调HIF-1α/NLRP3信号通路减轻缺血性脑卒中大鼠神经元焦亡。

关键词:卒中;缺氧诱导因子1,α亚基;NLR家族,热蛋白结构域包含蛋白3;神经元;细胞焦亡;益气升清方
中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **DOI:**10.11958/20231141

Influence of Yiqi Shengqing recipe on neuron pyroptosis in ischemic stroke rats by regulating HIF-1α/NLRP3 signal pathway

WANG Yue[1], QUAN Xingmiao[1], WANG Yu[2], SONG Chunxia[1△], SHAO Yue[3], XU Liwei[1]

1 Department of Traditional Chinese Medicine, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University Chengde 067000, China; 2 Department of Acupuncture and Massage, Chengde Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3 Department of Orthopedics and Traumatology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University

△Corresponding Author E-mail: scx-scx-001@163.com

Abstract: Objective To investigate the influence of Yiqi Shengqing recipe on neuronal pyroptosis in ischemic stroke

基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2022154)
作者单位:1承德医学院附属医院中医科(邮编067000);2承德市中医院针灸推拿科;3承德医学院附属医院骨伤科
作者简介:王月(1990),女,主治医师,主要从事中医学方面研究。E-mail:lucksong8@163.com
△通信作者 E-mail:scx-scx-001@163.com

(2):339-351. doi:10.2131/jts.39.339.
[9] 孙海宽,李三强,宋影,等.解整合素-金属蛋白酶9对急性酒精性肝损伤小鼠中肝细胞增殖的影响[J].中国临床药理学杂志,2018,34(22):2617-2619. SUN H K,LI S Q,SONG Y,et al. Effect of a disintegrin and metalloprotease 9 on the proliferation of hepatocytes of acute alcohol-induced liver injury in mice[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2018, 34 (22): 2617-2619. doi: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.22.010.
[10]蒋雨薇,宋海燕,李怡萍,等.水动力尾静脉注射介导Akt/β-catenin/Yap质粒转染建立小鼠肝癌模型[J].临床与实验病理学杂志,2020,36(10):1185-1190. JIANG Y W,SONG H Y,LI Y P, et al. Establishment of a mouse liver cancer model through hydrodynamic tail vein injection-mediated Akt/β -catenin/Yap plasmid transfection[J]. J Clin Exp Pathol, 2020, 36(10): 1185-1190. doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2020.10.011.
[11]王如萍,刘梦姣,田梦新,等.败酱草对小鼠急性酒精性肝损伤作用的研究[J].中医临床研究,2023,15(20):137-142. WANG R P,LIU M J,TIAN M X,et al. A study on the effect of patrinia on acute alcoholic liver injury in mice[J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2023, 15 (20): 137-142. doi: 10.3969/j. issn. 1674-7860.2023.20.027.
[12]DAS S G, ROMAGNOLI M, MINEVA N D, et al. miR-720 is a downstream target of an ADAM8-induced ERK signaling cascade that promotes the migratory and invasive phenotype of triple-negative breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res, 2016, 18(1): 40. doi:10.1186/s13058-016-0699-z.
[13]何楠. ADAM8通过激活EGFR/ERK通路上调MMP-2和MMP-9的表达促进胃癌细胞的侵袭转移[D].武汉:华中科技大学,2017. HE N. ADAM8 promotes gastric cancer cell invasiveness via EGFRERK signaling pathway to upregulate matrix metalloproteinases 2 and 9 expression [D]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology, 2017.
[14]YU X, SHI J, WANG X, et al. Propofol affects the growth and metastasis of pancreatic cancer via ADAM8[J]. Pharmacol Rep, 2020,72(2):418-426. doi:10.1007/s43440-019-00015-y.

(2023-11-11收稿 2023-12-07修回)
(本文编辑 李志芸)

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

rats by regulating hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) signal pathway. **Methods** SD rats were randomly divided into the sham operation group (S group), the model group (M group), the low, medium and high dose (3.465, 6.930 and 13.860 g/kg) Yiqi Shengqing recipe groups, and high-dose Yiqi Shengqing recipe+HIF-1α activator DMOG (13.860 g/kg Yiqi Shengqing recipe+40 mg/kg DMOG) group, 15 animals in each group. The stroke model was constructed by thread plug method. After successful modeling, neural function defects were evaluated including TTC staining for evaluating the volume of cerebral infarction, ELISA for detecting the serum interleukin (IL)-1β and IL-18 levels, HE staining for detecting pathological changes of ischemic cortex, TUNEL staining for detecting neuronal apoptosis and Western blot assay for detecting the expression of pyroprotein and HIF-1α/NLRP3 pathway protein. **Results** Compared with the S group, the neurological deficit score, infarct volume, IL-1β, IL-18 contents, apoptosis rate of nerve cells, GasderminD-N (GSDMD-N), Caspase-1, HIF-1α and NLRP3 protein levels were increased in the M group ($P < 0.05$). Compared with the M group, the neurological defect score, infarct volume, IL-1β, IL-18 contents, neuronal apoptosis rate, GSDMD-N, Caspase-1, HIF-1α and NLRP3 protein levels were decreased in the low, medium and high dose Yiqi Shengqing recipe groups ($P < 0.05$). DMOG attenuated the improvement effect of high-dose Yiqi Shengqing recipe on neuronal death in ischemic stroke rats. **Conclusion** Yiqi Shengqing recipe may reduce the neuronal pyroptosis in ischemic stroke rats by down-regulating HIF-1α/NLRP3 signal pathway.

Key words: stroke; hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; NLR family, pyrin domain-containing 3 protein; neurons; pyroptosis; Yiqi Shengqing recipe

缺血性脑卒中是脑卒中的常见类型，有较高的发病率和病死率[1]。目前，治疗缺血性脑卒中的主要手段是使用溶栓药物来恢复供血[2]，但溶栓药物须在症状发生5 h以内给药，且约50%接受该治疗的患者出现脑缺血/再灌注损伤，严重影响患者预后[3]。因此，迫切需要新的和更可靠的治疗方法。炎症和细胞凋亡是缺血性脑损伤的关键因素[4]。缺氧诱导因子-1α（hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α）是调节细胞对缺氧反应的重要因子，在缺血性脑卒中大鼠脑组织呈高表达，抑制其表达可减轻神经元凋亡[5]。最近研究表明，HIF-1α可通过激活NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3，NLRP3）炎性小体诱导炎症反应，促进脑卒中后的神经元焦亡[6]。因此，靶向HIF-1α/NLRP3信号通路是治疗脑卒中的潜在靶点。中医认为，缺血性脑卒中应以补气、化痰、活血化瘀为主要治则[7]。益气升清方具有补气活血、化痰益气的功效，切合缺血性脑卒中的主要病机。研究显示，益气升清方联合针刺可改善脑卒中患者的吞咽和神经功能[8]。然而，益气升清方对缺血性脑卒中神经元焦亡的影响及机制尚不清楚。本研究旨在探讨该方对缺血性脑卒中的神经保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 95只8周龄SPF级雄性SD大鼠由广州锐格生物科技有限公司提供，体质量（220±20）g，生产许可证号：SCXK（粤）2021-0059。本研究已获得承德医学院附属医院动物伦理委员会的批准（批准文号CYFYLL2020242），实验严格遵守3R原则。

1.2 主要试剂 益气升清方由承德医学院附属医院提供（组成：黄芪15 g、炙甘草9 g、南沙参9 g、升麻9 g、葛根9 g等）；白细胞介素（IL）-1β、IL-18试剂盒购自上海酶研生物科技有限公司；2，3，5-氯化三苯基四氮唑（TTC）染液购自北京康瑞纳生物科技有限公司；兔源胱天蛋白酶1（Caspase-1）、NLRP3、HIF-1α、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）一抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗购自Cell Signaling Technology；胞膜穿孔蛋白D-N端（GSDMD-N）购自HuaBio。

1.3 方法

1.3.1 造模及分组 采用随机数字表法抽取15只大鼠记为假手术组（S组），其余80只大鼠采用线栓法阻塞动脉90 min建立脑卒中模型。将大鼠麻醉后固定在操作台上，在颈正中做1.5 cm左右切口，分离并暴露右侧颈总动脉（CCA）、颈内动脉（ICA）及颈外动脉（ECA）。用尼龙线栓消毒后结扎CCA和ECA，动脉夹夹闭ICA，用注射器针头辅助线栓插入CCA，拔出针头后，继续推进线栓，松开动脉夹，使线栓于分叉处进入ICA 20 mm左右，线栓固定结扎后，逐层缝合消毒，90 min后将线栓拔出后用激光多普勒血流仪测量脑血流量，大脑中动脉闭塞（MCAO）期间血流量减少80%，再灌注后血流量恢复。S组不插入线栓，其余步骤与造模大鼠相同。造模过程中有3只大鼠死亡，2只造模失败，共75只造模成功。

将75只造模成功大鼠采用随机数字表法随机分为模型组（M组）、益气升清方低剂量（L-Med，3.465 g/kg，1/2临床剂量）、中剂量（M-Med，6.930 g/kg，临床剂量）和高剂量（H-Med，13.860 g/kg，2倍临床剂量）组[9]以及益气升清方高剂量+HIF-1α激活剂DMOG（H-Med+DMOG，灌胃13.860 g/kg益气升清方+腹腔注射40 mg/kg DMOG）组[10]，每组15只。造模成功第2天开始药物治疗，每日1次，L-Med、M-Med、H-Med组灌胃药物同时腹腔注射40 mg/kg生理盐水，连续给药8周。S组和M组给予等量生理盐水。

1.3.2 神经功能缺陷评估 药物治疗结束第2天，对大鼠进行神经功能缺陷评分来评估大鼠神经功能缺损程度。评分标准：行为正常记0分，左前肢无法完全伸展记1分，向左转圈

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

记2分，向左摔倒记3分，不能自发行走或失去知觉记4分。

1.3.3 样本采集 神经功能缺陷评估后将大鼠麻醉，通过腹主动脉采集血液3 mL，取血后将大鼠处死，5只大鼠的全脑用于脑梗死体积评估，5只大鼠的缺血侧皮质区用于HE染色和TUNEL染色，5只大鼠缺血侧皮质区用于Western blot检测。

1.3.4 酶联免疫吸附试验（ELISA）检测血清IL-1β、IL-18水平 将血液经离心机4 000 r/min离心10 min后分离血清，根据ELISA试剂盒说明书检测血清IL-1β、IL-18水平。

1.3.5 脑梗死体积评估 取大鼠全脑，用手术刀制作2 mm左右的冠状切片，用TTC染色20 min后，4%多聚甲醛固定24 h，红色区域为正常，白色区域为梗死部位。由图像分析软件Image J分析梗死体积（%）。梗死体积（%）=（梗死面积之和/切片面积之和）×100%。

1.3.6 HE染色观察缺血侧皮质区病理变化 将保存在4%多聚甲醛的缺血侧皮质区脱水、包埋后制成5 μm石蜡切片，脱蜡至水后，用苏木精和伊红染色，最后脱水、封片，显微镜下观察缺血侧皮质区病理变化。

1.3.7 TUNEL染色观察细胞凋亡情况 将石蜡切片脱蜡至水后与100 μL Equilibration Buffer混合，静置20 min，随后加入TUNEL反应混合液孵育1 h，PBS冲洗后用DAPI染色10 min，甘油封固后置于荧光显微镜下观察，阳性细胞为绿色，细胞核用DAPI染色。细胞凋亡率=阳性细胞数/总细胞数×100%。

1.3.8 Western blot检测焦亡蛋白以及HIF-1α/NLRP3通路蛋白表达 提取上述保存的大鼠缺血侧皮质区总蛋白，总蛋白经变性、定量、电泳、转PVDF膜，之后用5%BSA将膜封闭2 h，加入一抗GSDMD-N、Caspase-1、NLRP3、HIF-1α和GAPDH（均1∶1 000）抗体，4 ℃孵育过夜；加入二抗（1∶2 000）继续孵育4 h，加入显色剂显影后，Image Lab™软件分析目标蛋白的灰度值。

1.4 统计学方法 采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据分析，符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较行SNK-q检验；不符合正态分布时，组间比较使用Mann-Whitney U秩和检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺陷评分及脑梗死体积比较 与S组相比，M组神经功能缺陷评分及梗死体积均显著增加（$P<0.05$）；与M组相比，L-Med、M-Med、H-Med组神经功能缺陷评分及梗死体积显著减小（$P<0.05$），且H-Med组作用效果最佳；H-Med+DMOG组神经功能缺陷评分及梗死体积较H-Med组显著增加（$P<0.05$），见图1、表1。

2.2 各组大鼠血清IL-1β、IL-18水平比较 M组较S组IL-1β、IL-18含量均显著上升（$P<0.05$）；与M组相比，L-Med、M-Med、H-Med组IL-1β、IL-18含量均依次下降（$P<0.05$）；H-Med+DMOG组较H-Med组IL-1β、IL-18含量显著增加（$P<0.05$），见表2。

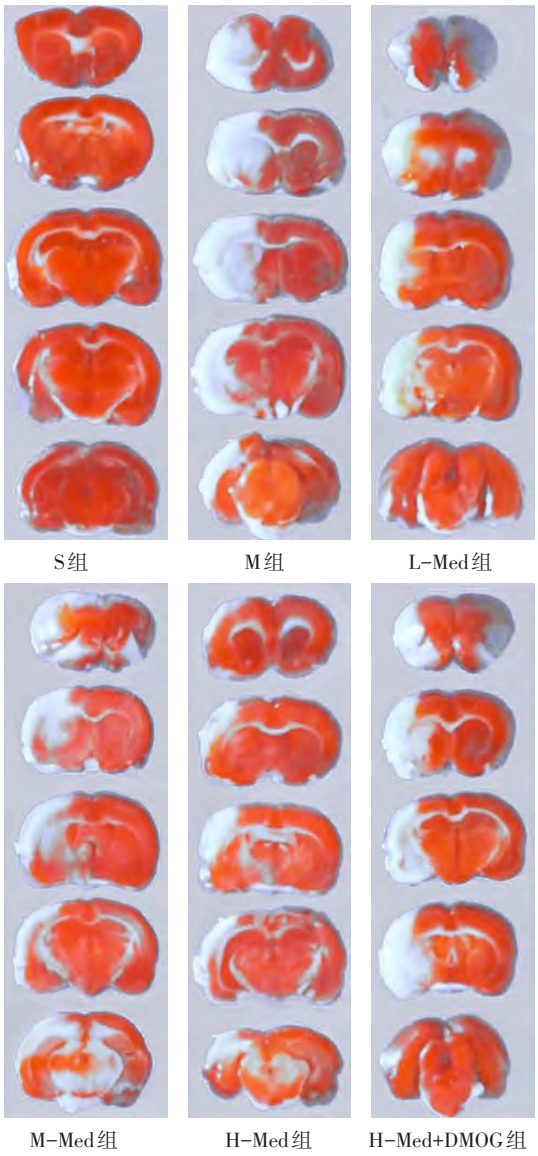


Fig. 1 TTC staining of brain tissue of rats in each group

图1 各组大鼠脑组织TTC染色图

Tab. 1 Comparison of neurological deficit score and infarct volume of rats between six groups

表1 各组大鼠神经功能缺陷评分及梗死体积比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	神经功能缺陷评分/分（n=15）	梗死体积/%（n=5）
S组	0.00±0.00	0.00±0.00
M组	2.93±0.26[a]	17.03±1.70[a]
L-Med组	2.13±0.35[b]	12.87±1.45[b]
M-Med组	1.20±0.41[bc]	8.97±0.83[bc]
H-Med组	0.47±0.52[bcd]	5.00±0.05[bcd]
H-Med+DMOG组	2.13±0.35[e]	13.21±1.43[e]
F	90.734**	67.926**

**$P<0.01$；[a]与S组比较，[b]与M组比较，[c]与L-Med组比较，[d]与M-Med组比较，[e]与H-Med组比较，$P<0.05$；表2—4同。

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Tab. 2 Comparison of serum IL-1β and IL-18 levels of rats between six groups

表2 各组大鼠血清IL-1β、IL-18水平比较

（n=15，ng/L，$\bar{x}\pm s$）

组别	IL-1β	IL-18
S组	12.34±1.34	22.22±2.88
M组	50.76±5.56[a]	57.43±5.95[a]
L-Med组	42.45±4.65[b]	46.31±4.62[b]
M-Med组	30.34±3.26[bc]	35.43±3.54[bc]
H-Med组	21.23±2.17[bcd]	24.00±3.13[bcd]
H-Med+DMOG组	43.64±4.15[e]	49.24±4.22[e]
F	225.615**	174.083**

2.3 各组大鼠大脑皮质区病理变化 HE染色结果显示，S组细胞结构正常，染色清晰，神经胶质细胞排列整齐，未见病理损伤现象；M组大鼠皮质神经元出现变形、坏死、肿胀现象，细胞排列杂乱无序；L-Med、M-Med、H-Med组均改善了以上现象，且H-Med组改善效果最好，与S组结构类似；H-Med+DMOG组与M组结构相似，见图2。

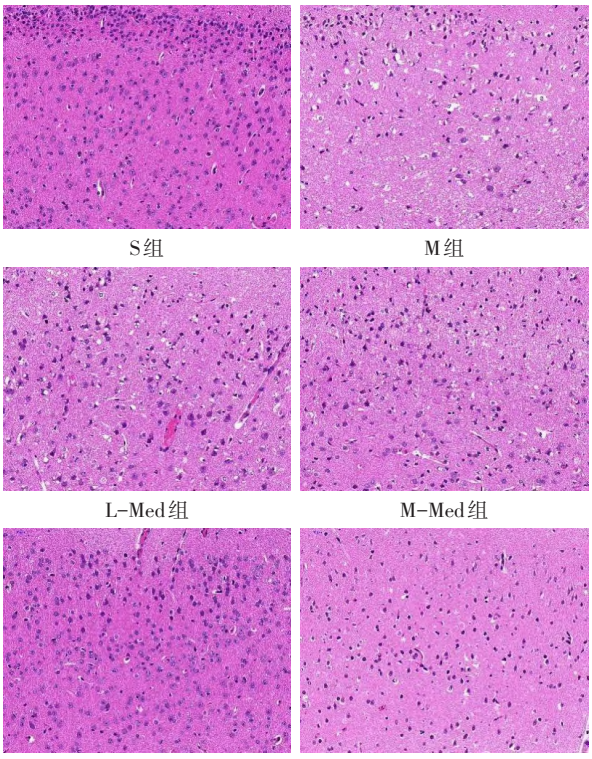


Fig. 2 Pathological changes of cerebral ischemic cortex in each group of rats (HE staining, ×200)

图2 各组大鼠脑组织缺血皮质区病理变化（HE染色，×200）

2.4 各组大鼠神经元凋亡情况比较 M组较S组神经细胞凋亡率（%）显著升高（31.32±3.21 *vs.* 4.76±0.34）；与M组相比，L-Med、M-Med、H-Med组（23.76±2.35、15.23±1.53、7.33±0.82）神经细胞凋亡率显著降低；H-Med+DMOG组（24.34±2.34）较H-Med组神经细胞凋亡率显著上升（n=5，F=134.423，P<0.01）。TUNEL染色结果见图3。

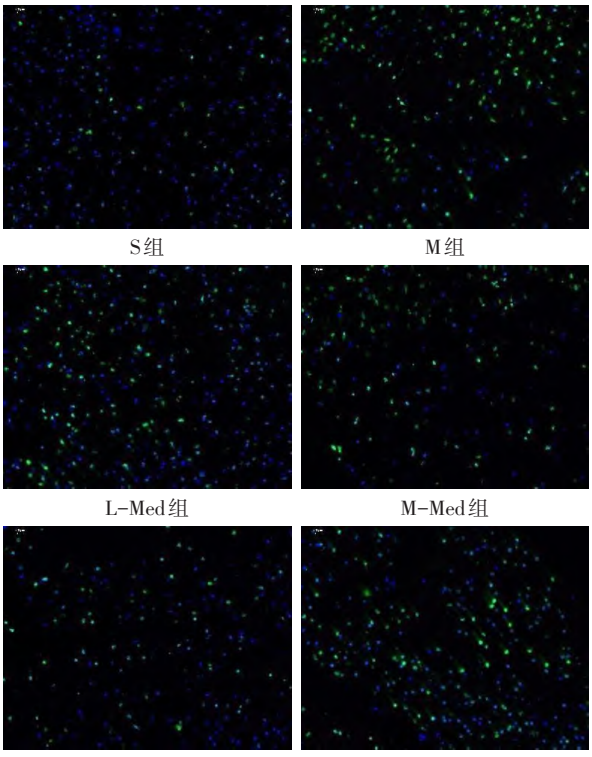
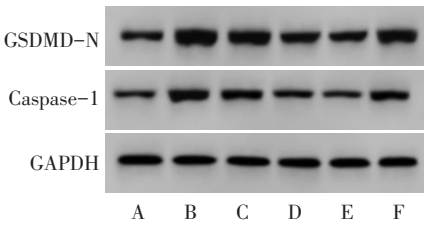


Fig. 3 Apoptosis of neurons in ischemic cortex of rats in each group (TUNEL staining, ×200)

图3 各组大鼠缺血皮质区神经细胞凋亡（TUNEL染色，×200）

2.5 各组大鼠脑组织焦亡相关蛋白表达比较 M组较S组GSDMD-N、Caspase-1蛋白水平均显著上调（P<0.05）；与M组相比，L-Med、M-Med、H-Med组GSDMD-N、Caspase-1蛋白水平均依次下调（P<0.05）；H-Med+DMOG组较H-Med组GSDMD-N、Caspase-1蛋白水平升高（P<0.05），见图4、表3。



A—F依次为S组、M组、L-Med组、M-Med组、H-Med组、H-Med+DMOG组。

Fig. 4 Expression of GSDMD-N and Caspase-1 protein in ischemic cortex by Western blot assay

图4 Western blot检测缺血皮质区GSDMD-N、Caspase-1蛋白表达情况

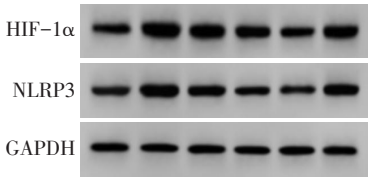
2.6 各组大鼠脑组织HIF-1α/NLRP3通路相关蛋白表达比较 M组较S组HIF-1α、NLRP3蛋白水平均显著升高（P<0.05）；与M组相比，L-Med、M-Med、H-Med组HIF-1α、NLRP3蛋白水平均依次下降

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Tab. 3 Comparison of GSDMD-N and Caspase-1 expression levels in brain tissue of rats between six groups
表3 各组大鼠脑组织GSDMD-N、Caspase-1表达水平比较 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	GSDMD-N/GAPDH	Caspase-1/GAPDH
S组	0.53±0.05	0.93±0.06
M组	1.35±0.16[a]	2.65±0.28[a]
L-Med组	1.13±0.13[b]	2.19±0.24[b]
M-Med组	0.91±0.10[bc]	1.73±0.21[bc]
H-Med组	0.68±0.06[bcd]	1.21±0.13[bcd]
H-Med+DMOG组	1.15±0.12[e]	2.25±0.22[e]
F	39.689**	52.596**

($P<0.05$)；H-Med+DMOG组较H-Med组蛋白水平升高($P<0.05$)，见图5、表4。



A—F依次为S组、M组、L-Med组、M-Med组、H-Med组、H-Med+DMOG组。

Fig. 5 Expression of HIF-1α and NLRP3 protein in ischemic cortex by Western blot assay

图5 Western blot检测缺血皮质区HIF-1α、NLRP3蛋白表达情况

Tab. 4 Comparison of HIF-1α and NLRP3 expression levels in brain tissue of rats between six groups
表4 各组大鼠脑组织HIF-1α、NLRP3表达水平比较 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	HIF-1α/GAPDH	NLRP3/GAPDH
S组	1.13±0.13	1.03±0.11
M组	2.44±0.29[a]	2.34±0.24[a]
L-Med组	2.03±0.23[b]	1.95±0.21[b]
M-Med组	1.62±0.16[bc]	1.47±0.15[bc]
H-Med组	1.21±0.12[bcd]	1.05±0.11[bcd]
H-Med+DMOG组	2.11±0.22[e]	2.15±0.24[e]
F	34.092**	46.356**

3 讨论

3.1 益气升清方减轻缺血性脑卒中大鼠的神经损伤 缺血性脑卒中是一种严重威胁患者生命的脑血管疾病，中药复方制剂具有不良反应少、作用靶点多的特点，在缺血性脑卒中的治疗中可发挥积极作用，如补阳还五汤[11]、苏合香丸[12]。益气升清方以“补气诸药之最”—黄芪为君药；南沙参，化痰益气为臣药；升麻，助君药升举清阳；葛根，益气生津；升麻与葛根共为佐使；炙甘草，补中益气。现代药理学研究显示，黄芪可通过抗炎、抗凋亡作用改善缺血性脑卒中[13]。升麻的主要活性成分升麻素苷和葛根的活性成分葛根素可通过抑制炎症反应减轻脑卒中大鼠神经损伤[14-15]。本研究结果显示，益气升清方可降低模型大鼠神经功能缺陷评分及脑梗死体积，改善脑组织病理损伤，提示该方可能对缺血性脑卒中具有保护作用。

3.2 益气升清方抑制缺血性脑卒中大鼠神经细胞焦亡 炎症是缺血性脑卒中必不可少的病理过程之一，NLRP3炎性小体介导的细胞焦亡是缺血性卒中炎症反应的重要环节[16]。细胞焦亡作为一种新型细胞死亡方式，主要表现为细胞膜破裂，内容物释放激活炎症级联反应，依赖Caspase-1是细胞焦亡的经典途径。研究发现上调NLRP3可以激活Caspase-1，而脑缺血后Caspase-1、NLRP3均高表达，下调Caspase-1、NLRP3可改善脑缺血损伤[17]。NLRP3除了激活Caspase-1外还可以使促炎细胞因子IL-1β和IL-18释放以及焦亡诱导蛋白GSDMD裂解和分泌[18]。本研究结果显示，模型大鼠血清炎性因子IL-1β、IL-18含量，脑组织神经细胞凋亡率和Caspase-1、GSDMD-N蛋白水平均升高，表明模型大鼠神经元出现焦亡；而给予益气升清方治疗后，模型大鼠血清炎性因子水平、神经元凋亡率、焦亡相关蛋白Caspase-1、GSDMD-N水平均降低，提示益气升清方可能通过降低炎症反应、减轻细胞焦亡进而缓解缺血性脑卒中。

3.3 益气升清方通过抑制HIF-1α/NLRP3信号轴改善缺血性脑卒中 HIF-1α对缺氧环境中细胞的重要性已被证实，HIF-1α通过调控超过100个基因的转录，参与复杂的脑损伤过程，如细胞死亡和炎症反应[19]。研究显示，抑制HIF-1α信号通路可能会逆转缺血性脑损伤的有害影响[20]；且HIF-1α可通过抑制NLRP3炎性小体复合物减轻炎症反应，从而缓解卒中后的神经细胞焦亡[6]。在本研究中，模型大鼠脑组织中HIF-1α、NLRP3蛋白水平均升高；而给予益气升清方干预后，两种蛋白水平降低，因此推测益气升清方对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用可能与调控HIF-1α/NLRP3信号轴有关。为了进一步证实此推测，本研究在益气升清方干预的基础上使用HIF-1α激活剂DMOG来激活HIF-1α/NLRP3信号轴，结果发现DMOG减弱了益气升清方对脑卒中大鼠的保护作用，提示该方可通过抑制HIF-1α/NLRP3信号轴改善缺血性脑卒中。

综上所述，益气升清方缓解缺血性脑卒中大鼠神经损伤的作用机制可能与抑制HIF-1α/NLRP3通路、改善神经炎症和焦亡有关。本研究为益气升清方作为抗缺血性脑卒中药物提供了实验证据，将有

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

助于指导其临床应用。但由于益气升清方的药物组成复杂，仍需进一步明确其抗缺血性脑卒中的主要活性成分与分子机制。此外，本研究为基础研究，下一步将进行临床研究对该方的疗效加以验证。

参考文献

[1] 樊泽新，刘广志. 缺血性卒中免疫学研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志，2022，22(1)：46-53. FAN Z X，LIU G Z. Advances in immunology of ischemic stroke [J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg，2022，22 (1)：46-53. doi：10.3969/j. issn. 1672-6731.2022.01.007.

[2] GONCALVES A，SU E J，MUTHUSAMY A，et al. Thrombolytic tPA-induced hemorrhagic transformation of ischemic stroke is mediated by PKCβ phosphorylation of occludin [J]. Blood，2022，140(4)：388-400. doi：10.1182/blood.2021014958.

[3] QIU L，FU F，ZHANG W，et al. Prevalence，risk factors，and clinical outcomes of remote intracerebral hemorrhage after intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke：a systematic review and meta-analysis [J]. J Neurol，2023，270(2)：651-661. doi：10.1007/s00415-022-11414-2.

[4] WU X，WEI J，YI Y，et al. Epimedium aqueous extract ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting ROS/NLRP3-mediated pyroptosis [J]. Antioxidants (Basel)，2023，12(5)：999. doi：10.3390/antiox12050999.

[5] ABDEL-LATIF R G，RIFAAI R A，AMIN E F. Empagliflozin alleviates neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury through HIF-1α/VEGF signaling pathway [J]. Arch Pharm Res，2020，43(5)：514-525. doi：10.1007/s12272-020-01237-y.

[6] JIANG Q，GENG X，WARREN J，et al. Hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) mediates NLRP3 inflammasome-dependent-pyroptotic and apoptotic cell death following ischemic stroke [J]. Neuroscience，2020，448：126-139. doi：10.1016/j.neuroscience.2020.09.036.

[7] 熊艳萍. 加味化痰通络汤结合针刺辅治脑卒中风痰瘀阻证疗效观察[J]. 实用中医药杂志，2022，38(11)：1906-1907. XIONG Y P. Observation on the curative effect of Supplemented Huatan Tongluo Decoction combined with acupuncture in the treatment of wind-phlegm-stasis syndrome of cerebral apoplexy [J]. Journal of Practical Chinese Medicine，2022，38(11)：1906-1907.

[8] 胡建芳，余志辉，陈朝俊，等. 针刺治疗联合益气升清方对卒中后吞咽障碍患者预后的影响[J]. 中国实用医药，2014，9(21)：167-168. HU J F，YU Z H，CHEN C J，et al. Effect of acupuncture treatment combined with Yiqi Shengqing Prescription on prognosis of patients with dysphagia after stroke [J]. China Prac Med，2014，9(21)：167-168. doi：10.14163/j.cnki.11-5547/r.2014.21.009.

[9] 江丹，汪何，姚楠，等. 基于TGF-β1/p38MAPK通路探讨益气升清方对糖尿病大鼠肾组织的影响[J]. 世界中医药，2020，15(16)：2381-2386. JIANG D，WANG H，YAO N，et al. The effects of Yiqi Shengqing fomula on TGF-β1/p38MAPK signaling pathway in renal tissue of diabetes rats [J]. World Chinese Medicine，2019，15(16)：2381-2386. doi：10.3969/j.issn.1673-7202.2020.16.006.

[10] 张佩，贺建东，韩冲芳，等. HIF-1α/EphrinA1信号通路在糖尿病因素削弱七氟醚心肌保护中的作用机制[J]. 山西医科大学学报，2021，52(8)：995-1000. ZHANG P，HE J D，HAN C F，et al. The mechanism of HIF-1α/EphrinA1 signaling pathway in diabetic impaired myocardial protection of sevoflurane [J]. J Shanxi Med Univ，2021，52 (8)：995-1000. doi：10.13753/j. issn. 1007-6611.2021.08.010.

[11] CHEN X，YANG T，LUO Y，et al. Methodological and reporting quality evaluation of Buyang Huanwu decoction for experimental cerebral ischemia-reperfusion injury：a systematic review [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，2023，396(5)：831-849. doi：10.1007/s00210-022-02362-9.

[12] 单萍，姚汉云，王莉，等. 基于网络药理学和分子对接的苏合香丸治疗缺血性卒中的机制探究[J]. 药物评价研究，2022，45(7)：1294-1311. SHAN P，YAO H Y，WANG L，et al. Mechanism of Suhexiang pill in treatment of ischemic stroke based on network pharmacology and molecular docking [J]. Drug Evaluation Research，2022，45 (7)：1294-1311. doi：10.7501/j. issn. 1674-6376.2022.07.011.

[13] WANG L，LIU C，WANG L，et al. Astragaloside IV mitigates cerebral ischaemia-reperfusion injury via inhibition of P62/Keap1/Nrf2 pathway-mediated ferroptosis [J]. Eur J Pharmacol，2023，944：175516. doi：10.1016/j.ejphar.2023.175516.

[14] 付劭静，周延华，卑红喆，等. 升麻素苷对脑缺血/再灌注大鼠脑损伤的保护作用及其机制研究[J]. 中国临床神经科学，2021，29(6)：617-624. FU S J，ZHOU Y H，BEI H Z，et al. Protective effect and mechanism of Cimicifugoside from brain injury in rats undergoing cerebral ischemia reperfusion [J]. Chin J Clin Neurosci，2021，29(6)：617-624.

[15] 伍忠根，刘培文，刘晖，等. 葛根素对大鼠脑缺血-再灌注损伤的影响[J]. 江苏医药，2021，47(2)：109-113. WU Z G，LIU P W，LIU H，et al. Effects of puerarin on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Jiangsu Med J，2021，47 (2)：109-113. doi：10.19460/j.cnki.0253-3685.2021.02.001.

[16] 薛丽，韩红，张力. 桑黄素通过抑制TXNIP/NLRP3/Caspase-1信号通路对脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡的影响[J]. 天津医药，2023，51(5)：487-491. XUE L，HAN H，ZHANG L. Effects of Morin on neuronal apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion rats by inhibiting TXNIP/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway [J]. Tianjin Med J，2023，51(5)：487-491. doi：10.11958/20221258.

[17] CAI L，YAO Z Y，YANG L，et al. Mechanism of electroacupuncture against cerebral ischemia-reperfusion injury：reducing inflammatory response and cell pyroptosis by inhibiting NLRP3 and Caspase-1 [J]. Front Mol Neurosci，2022，15：822088. doi：10.3389/fnmol.2022.822088.

[18] COLL R C，SCHRODER K，PELEGRÍN P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases [J]. Trends Pharmacol Sci，2022，43(8)：653-668. doi：10.1016/j.tips.2022.04.003.

[19] TSAO C C，BAUMANN J，HUANG S F，et al. Pericyte hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) drives blood-brain barrier disruption and impacts acute ischemic stroke outcome [J]. Angiogenesis，2021，24(4)：823-842. doi：10.1007/s10456-021-09796-4.

[20] CHEN S F，PAN M X，TANG J C，et al. Arginine is neuroprotective through suppressing HIF-1α/LDHA-mediated inflammatory response after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Mol Brain，2020，13(1)：63. doi：10.1186/s13041-020-00601-9.

（2023-08-01收稿　2023-10-30修回）
（本文编辑　李鹏）

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net