

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.01.001

文章编号: 1005-8982 (2025) 01-0001-08

脑卒中专题·论著

益气活血化浊解毒方调控KAT3B/STING轴介导的小胶质细胞极化对缺血性脑卒中大鼠神经功能的影响*

刘学飞¹, 武萌萌², 孙翔¹, 曹利红¹, 袁子薇¹

(河北省中医院 1.脑病二科, 2.脑病一科, 河北 石家庄 050011)

摘要: **目的** 探讨益气活血化浊解毒方调控KAT3B/STING轴介导的小胶质细胞极化对缺血性脑卒中大鼠神经功能的影响。**方法** 复制缺血性脑卒中大鼠模型。将复制成功的60只大鼠分为缺血性脑卒中组、益气活血化浊解毒方低剂量组(低剂量组)、益气活血化浊解毒方高剂量组(高剂量组)、益气活血化浊解毒方高剂量+2,5-己酮可可碱(DMXAA)组(高剂量+DMXAA组),每组15只。另取15只正常大鼠为Sham组。低剂量组大鼠灌胃0.2 mL 27.5 g/mL的益气活血化浊解毒方药液,高剂量组大鼠灌胃0.2 mL 55.0 g/mL的益气活血化浊解毒方药液,高剂量+DMXAA组大鼠灌胃0.2 mL 55.0 g/mL的益气活血化浊解毒方药液和25 mg/kg的DMXAA,Sham组和缺血性脑卒中组给予等体积生理盐水代替药物;除高剂量+DMXAA组外,其余组大鼠再给予等体积二甲亚砷溶液灌胃,1 d/次,连续4周。Zea-Longa评分和网屏试验评分评估大鼠神经功能和神经行为学;检测大鼠脑组织含水量;TTC染色法检测大鼠脑梗死面积;酶联免疫吸附试验检测大鼠血清LDH和NGF水平和缺血侧皮层组织TNF- α 、IL-6、IL-10水平;HE染色观察大鼠缺血侧皮层组织病理变化;Western blotting检测大鼠缺血侧皮层组织iNOS、Iba1、CD68、CD40、CD206、Arg-1、Cleaved caspase-3、KAT3B、STING蛋白表达。**结果** 缺血性脑卒中组大鼠Zea-Longa评分和网屏试验评分、脑组织含水量、脑梗死面积百分比均高于Sham组($P<0.05$),低剂量组和高剂量组大鼠Zea-Longa评分和网屏试验评分、脑组织含水量、脑梗死面积百分比均低于缺血性脑卒中组($P<0.05$),高剂量+DMXAA组大鼠Zea-Longa评分和网屏试验评分、脑组织含水量、脑梗死面积百分比均高于高剂量组($P<0.05$)。缺血性脑卒中组大鼠NGF和IL-10水平低于Sham组,LDH、TNF- α 和IL-6水平高于Sham组($P<0.05$);低剂量组和高剂量组大鼠NGF和IL-10水平高于缺血性脑卒中组,LDH、TNF- α 和IL-6水平低于缺血性脑卒中组($P<0.05$);高剂量+DMXAA组大鼠NGF和IL-10水平低于高剂量组,LDH、TNF- α 和IL-6高于高剂量组($P<0.05$)。与缺血性脑卒中组比较,低剂量组和高剂量组缺血侧皮层神经元形态有明显改善。缺血性脑卒中组大鼠缺血侧皮层组织中iNOS、Iba1、CD68和CD40蛋白相对表达量比Sham组高,CD206和Arg-1蛋白相对表达量比Sham组低($P<0.05$);低剂量组和高剂量组大鼠缺血侧皮层组织中iNOS、Iba1、CD68和CD40蛋白相对表达量比缺血性脑卒中组低,CD206和Arg-1蛋白相对表达量比缺血性脑卒中组高($P<0.05$);高剂量+DMXAA组大鼠缺血侧皮层组织中iNOS、Iba1、CD68和CD40蛋白相对表达量比高剂量组高,CD206和Arg-1蛋白相对表达量比高剂量组低($P<0.05$)。**结论** 益气活血化浊解毒方可调节缺血性脑卒中大鼠小胶质细胞极化,减轻神经炎症和神经损伤,改善神经功能,可能与抑制KAT3B/STING轴有关。

关键词: 缺血性脑卒中; 益气活血化浊解毒方; KAT3B/STING轴; 小胶质细胞极化; 神经功能

中图分类号: R743.3

文献标识码: A

Study on the effect of Yiqi Huoxue Huazhuo Jiedu decoction regulating microglial polarization via KAT3B/STING axis on

收稿日期: 2024-10-28

* 基金项目: 河北省中医药管理局2021年度中医药类科研指导性计划课题(No:2021069)

[通信作者] 袁子薇, E-mail: cx422197@163.com; Tel: 15931196227

neurological function in rats with ischemic stroke*

Liu Xue-fei¹, Wu Meng-meng², Sun Xiang¹, Cao Li-hong¹, Yuan Zi-wei¹

(1. The Second Department of Encephalopathy, 2. The First Department of Encephalopathy, Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Yiqi Huoxue Huazhuo Jiedu Decoction (YHHJD) on microglial polarization mediated by the KAT3B/STING axis and its impact on neurological function in rats with ischemic stroke (IS). **Methods** An ischemic stroke rat model was established. Sixty successfully modeled rats were divided into the ischemic stroke group (IS group), YHHJD low-dose group (Low-dose group), YHHJD high-dose group (High-dose group), and YHHJD high-dose + DMXAA group (High-dose + DMXAA group), with 15 rats in each group. Another 15 normal rats were included as the Sham group. Rats in the Low-dose group were intragastrically administered 0.2 mL of 27.5 g/mL YHHJD, those in the High-dose group were given 0.2 mL of 55.0 g/mL YHHJD, and the High-dose + DMXAA group received 0.2 mL of 55.0 g/mL YHHJD combined with 25 mg/kg DMXAA. Sham and IS groups received equivalent volumes of saline as controls. All groups except the High-dose + DMXAA group were additionally administered dimethyl sulfoxide intragastrically, once daily for four weeks. Neurological and behavioral assessments were performed using the Zea-Longa score and grid-walking test. Brain water content was measured, infarct size assessed via TTC staining, and serum LDH and NGF levels, as well as TNF- α , IL-6, and IL-10 levels in the ischemic cortex, were determined by ELISA. HE staining was used to observe cortical pathology. Western blotting was employed to detect protein expression levels of iNOS, Iba1, CD68, CD40, CD206, Arg-1, Cleaved caspase-3, KAT3B, and STING in the ischemic cortex. **Results** Zea-Longa scores, grid-walking scores, brain water content, and infarct size percentages were higher in the IS group than in the Sham group ($P < 0.05$). These indicators were significantly reduced in the Low-dose and High-dose groups compared to the IS group ($P < 0.05$) but increased in the High-dose + DMXAA group compared to the High-dose group ($P < 0.05$). NGF and IL-10 levels were lower in the IS group, while LDH, TNF- α , and IL-6 levels were higher compared to the Sham group ($P < 0.05$). NGF and IL-10 levels were higher, and LDH, TNF- α , and IL-6 levels were lower in the Low-dose and High-dose groups compared to the IS group ($P < 0.05$). In the High-dose + DMXAA group, NGF and IL-10 levels were lower, while LDH, TNF- α , and IL-6 levels were higher compared to the High-dose group ($P < 0.05$). Histological observations showed improved neuronal morphology in the ischemic cortex in the Low-dose and High-dose groups compared to the IS group. The expression of iNOS, Iba1, CD68, and CD40 was higher, while CD206 and Arg-1 levels were lower in the IS group than in the Sham group ($P < 0.05$). These trends were reversed in the Low-dose and High-dose groups ($P < 0.05$). The High-dose + DMXAA group showed higher iNOS, Iba1, CD68, and CD40 and lower CD206 and Arg-1 expression than the High-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** YHHJD decoction can modulate microglial polarization in IS rats, alleviate neuroinflammation and neuronal injury, and improve neurological function, potentially by inhibiting the KAT3B/STING axis.

Keywords: ischemic stroke; Yiqi Huoxue Huazhuo Jiedu decoction; KAT3B/STING axis; microglia polarization; neurological function

缺血性脑卒中是一种脑血管疾病,指正常的脑血流和能量供应被破坏,致使神经元缺血缺氧而死亡,引发神经功能障碍,甚至导致患者死亡^[1]。缺血性脑卒中多发于中老年,年龄每增加 10 岁发病风险增加一倍。我国逐渐进入老龄化社会,缺血性脑卒中发病率和病死率逐年升高,因此,其预防和治疗是当今医学工作者的研究重点^[2]。目前缺血性脑卒中的发病机制尚不明确,临床主要是静脉溶栓、手术取栓再辅以药物进行治疗,但风险较大,效果不尽人

意^[3]。探究缺血性脑卒中的病理机制和开发新的治疗药物具有重要意义。益气活血化浊解毒方具有益气活血、化浊解毒、抗氧化和抗炎等功效。研究显示,益气活血化浊解毒方可降低脑缺血再灌注大鼠脑梗死面积,减轻神经组织和结肠组织损伤和神经元损伤,改善神经功能^[4];可改善脑缺血再灌注大鼠神经血管单元,缩小脑梗死面积和降低神经组织损伤,改善神经功能^[5]。对缺血性脑卒中患者,益气活血化浊解毒方可降低神经损伤,改善神经功能,但其

具体作用机制仍不明确。基于此,本研究采用缺血性脑卒中大鼠模型探讨益气活血化浊解毒方改善缺血性脑卒中大鼠神经功能的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取80只SD雄性大鼠,体重180~200 g,购自河北医科大学实验动物公共服务平台。实验动物生产许可证号:SCXK(冀)2020-001。

1.2 主要药液、试剂与仪器

益气活血化浊解毒方(黄芪20 g,川芎15 g,石菖蒲15 g,地龙12 g,丹参15 g,赤芍15 g,黄连6 g,郁金12 g,茯苓12 g,泽泻10 g)由本院中药房提供,全方通过煎煮、浓缩的方式将药物配制成浓度为27.5 g/mL低剂量和55.0 g/mL高剂量的药液。KAT3B-STING信号通路激活剂、2,5-己酮可可碱(DMXAA)购自美国MCE公司,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-10(Interleukin-10, IL-10)和白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)酶联免疫吸附试验试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,HE染色试剂盒和TTC染色试剂盒购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司,蛋白提取试剂盒和蛋白定量检测试剂盒购自北京柏奥易思生物科技有限公司, iNOS、Iba1、CD68、CD40、CD206、Arg-1、Cleaved caspase-3、KAT3B、STING、 β -actin一抗及二抗均购自英国Abcam公司。星耀-200B酶标仪购自南京炯创科技有限公司,XSP-2CA显微镜购自沈阳科瑞永兴化玻仪器有限公司,ALQ-2000病理切片机购自湖北安立信医疗实业有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 模型复制与分组 缺血性脑卒中模型大鼠复制参考文献[6]方法:65只大鼠用3%的戊巴比妥钠麻醉并固定,于大鼠颈部切开一口,暴露右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉,结扎颈总动脉和外动脉近心端,夹闭颈内动脉,将线栓插入颈总动脉延伸直至进入颈内动脉,然后结扎左侧大脑中动脉,缺血2 h,取出线栓恢复供血,缝合伤口并消毒;Zea-Longa法评分1~3分为模型复制成功。模型复制成功61只,去除最低分大鼠,将剩余大鼠按随

机数字表法分为缺血性脑卒中组、益气活血化浊解毒方低剂量组(低剂量组)、益气活血化浊解毒方高剂量组(高剂量组)、益气活血化浊解毒方高剂量+DMXAA组(高剂量+DMXAA组),每组15只。另取15只正常大鼠为Sham组,仅切口分离颈动脉。低剂量组大鼠灌胃0.2 mL 27.5 g/mL的益气活血化浊解毒方药液,高剂量组大鼠灌胃0.2 mL 55.0 g/mL的益气活血化浊解毒方药液^[7],高剂量+DMXAA组大鼠灌胃0.2 mL 55.0 g/mL的益气活血化浊解毒方药液和25.0 mg/kg的DMXAA(二甲基亚砷溶解)^[8],Sham组和缺血性脑卒中组给予等体积生理盐水灌胃;除高剂量+DMXAA组外,其余组大鼠再给予等体积二甲基亚砷溶液灌胃,1次/d,连续4周。

1.3.2 大鼠神经功能和神经行为学评估 治疗结束后采用Zea-Longa评分^[9]和网屏试验评分^[9]评估大鼠神经功能和神经行为学。Zea-Longa评分:神经功能正常为0分,前爪不能完全伸展为1分,行走时出现划圈现象为2分,行走时倾倒为3分,完全不能行走或昏迷为4分。网屏试验评分:大鼠前爪可抓住垂直网屏达5 s不滑落为0分;大鼠可抓住垂直网屏,滑落一段距离但不掉落为1分;大鼠抓住垂直网屏5 s内掉下来为2分;大鼠不能抓住网屏,网屏开始转动即掉落为3分。

1.3.3 大鼠脑组织含水量测定 各组随机选取5只大鼠,脱颈处死,取出完整大脑,清洗后吸干表面水分,称量记为大脑湿重;将大脑放入105℃烘箱中烘干至恒重,称量记为大脑干重;大脑含水量=(湿重-干重)/湿重 $\times$ 100%。

1.3.4 TTC染色法检测大鼠脑梗死面积 各组随机选取3只大鼠,脱颈处死,取出完整大脑,冷冻后冠状切片(厚度2 mm)。将切片浸入1% TTC溶液中,37℃避光孵育30 min,拍照。采用Image pro plus 6.0软件分析大鼠脑梗死面积。

1.3.5 酶联免疫吸附试验检测血清NGF、LDH水平和缺血侧皮层组织TNF- α 、IL-10和IL-6水平 将各组剩余7只大鼠麻醉后取腹主动脉血2 mL,以3 000 r/min离心10 min(离心半径10 cm),取上清液加入反应试管,然后加入NGF和LDH试剂盒的反应试剂、终止试剂和显色试剂,酶标仪检测450 nm处的吸光度值,计算NGF和LDH水平。处死各组剩余7只大鼠,称取大鼠缺血侧梗死灶周围皮层组织,低温研磨匀浆,3 500 r/min离心10 min,取上清液,加

入 TNF- α 、IL-10 和 IL-6 试剂盒的反应试剂、终止试剂和显色试剂,酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值,计算 TNF- α 、IL-10 和 IL-6 水平。

1.3.6 HE 染色观察大鼠缺血侧皮层组织形态 用 4% 多聚甲醛固定大鼠(剩余的 7 只大鼠脑组织)大脑组织,脱水,石蜡包埋后切取缺血侧梗死灶周围皮层组织切片,依次进行苏木精和伊红染色,透明封片后显微镜观察缺血侧皮层组织形态。

1.3.7 Western blotting 检测大鼠缺血侧皮层组织 Cleaved caspase-3、HMGB1、RAGE、NF- κ B、p-NF- κ B 蛋白表达 称取大鼠 50 mg 缺血侧梗死灶周围皮层组织,低温研磨匀浆后提取组织蛋白,并定量,将其热变性后电泳,转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入 iNOS、Iba1、CD68、CD40、CD206、Arg-1、Cleaved caspase-3、KAT3B、STING、 β -actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗涤,添加二抗,ECL 显影,Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.4 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 8.0.1 统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用方差分析,两两比较用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 益气活血化浊解毒方对大鼠神经功能和神经行为学的影响

各组大鼠的 Zea-Longa 评分和网屏试验评分比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);缺血性脑卒中组大鼠 Zea-Longa 评分和网屏试验评分高于 Sham 组($P < 0.05$);低剂量组和高剂量组大鼠 Zea-Longa 评分和网屏试验评分低于缺血性脑卒中组($P < 0.05$);高剂量+DMXAA 组大鼠 Zea-Longa 评分和网屏试验评分高于高剂量组($P < 0.05$),见表 1。

2.2 益气活血化浊解毒方对大鼠脑组织含水量的影响

Sham 组、缺血性脑卒中组、低剂量组、高剂量组和高剂量+DMXAA 组大鼠脑组织含水量分别为(74.52 ± 1.28)%、(85.61 ± 1.93)%、(81.75 ± 1.74)%、(78.26 ± 1.32)%、(82.94 ± 1.81)%,经方差分析,差异有统计学意义($F = 34.649$, $P = 0.000$);进一步两两比较,缺血性脑卒中组大鼠脑组织含水量高于 Sham 组

表 1 各组大鼠 Zea-Longa 评分和网屏试验评分比较
($n = 15$, 分, $\bar{x} \pm s$)

组别	Zea-Longa 评分	网屏试验评分
Sham 组	0.00 $\pm$ 0.00	0.33 $\pm$ 0.05
缺血性脑卒中组	2.73 $\pm$ 0.32 ^①	2.40 $\pm$ 0.29 ^①
低剂量组	2.06 $\pm$ 0.24 ^②	1.67 $\pm$ 0.21 ^②
高剂量组	1.27 $\pm$ 0.15 ^{②③}	0.93 $\pm$ 0.14 ^{②③}
高剂量+DMXAA 组	2.40 $\pm$ 0.29 ^④	2.00 $\pm$ 0.23 ^④
F 值	330.551	266.855
P 值	0.000	0.000

注:①与 Sham 组比较, $P < 0.05$;②与缺血性脑卒中组比较, $P < 0.05$;③与低剂量组比较, $P < 0.05$;④与高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

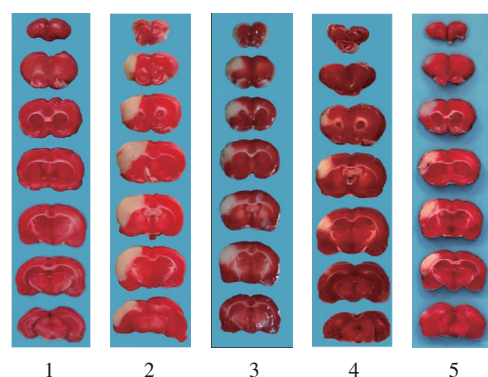
($P < 0.05$),低剂量组和高剂量组大鼠脑组织含水量低于缺血性脑卒中组($P < 0.05$),高剂量+DMXAA 组大鼠脑组织含水量高于高剂量组($P < 0.05$)。

2.3 益气活血化浊解毒方对大鼠脑梗死面积的影响

Sham 组、缺血性脑卒中组、低剂量组、高剂量组和高剂量+DMXAA 组大鼠脑梗死面积百分比分别为(0.00 ± 0.00)%、(20.78 ± 3.96)%、(13.63 ± 3.27)%、(6.42 ± 2.18)%、(12.34 ± 2.62)%,经方差分析,差异有统计学意义($F = 24.249$, $P = 0.000$);进一步两两比较,缺血性脑卒中组大鼠脑梗死面积百分比高于 Sham 组($P < 0.05$),低剂量组和高剂量组大鼠脑梗死面积百分比低于缺血性脑卒中组($P < 0.05$),高剂量+DMXAA 组大鼠脑梗死面积百分比高于高剂量组($P < 0.05$)。见图 1。

2.4 各组大鼠 NGF、LDH、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平比较

各组大鼠 NGF、LDH、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水



1: Sham 组; 2: 缺血性脑卒中组; 3: 低剂量组; 4: 高剂量组; 5: 高剂量+DMXAA 组。

图 1 各组大鼠脑梗死面积比较 (TTC 染色 $\times 2$)

平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较,缺血性脑卒中组大鼠 NGF 和 IL-10 水平低于 Sham 组,LDH、TNF- α 和 IL-6 水平高于 Sham 组($P < 0.05$);低剂量组和高剂量组大鼠 NGF 和 IL-10 水平高于缺血性脑卒中组,

LDH、TNF- α 和 IL-6 水平低于缺血性脑卒中组($P < 0.05$);高剂量+DMXAA 组大鼠 NGF 和 IL-10 水平低于高剂量组,LDH、TNF- α 和 IL-6 高于高剂量组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 NGF、LDH、TNF- α 、IL-6 和 IL-10 比较 ($n=7, \bar{x} \pm s$)

组别	NGF/(pg/mL)	LDH/(u/mL)	TNF- α /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
Sham 组	519.7 $\pm$ 65.32	2.3 $\pm$ 0.41	57.3 $\pm$ 7.62	41.7 $\pm$ 5.73	108.4 $\pm$ 13.17
缺血性脑卒中组	184.4 $\pm$ 21.68 ^①	9.6 $\pm$ 1.37 ^①	246.6 $\pm$ 35.84 ^①	157.9 $\pm$ 20.61 ^①	23.6 $\pm$ 3.14 ^①
低剂量组	273.5 $\pm$ 33.59 ^②	6.8 $\pm$ 0.95 ^②	181.6 $\pm$ 24.56 ^②	116.5 $\pm$ 15.27 ^②	52.7 $\pm$ 6.38 ^②
高剂量组	392.8 $\pm$ 47.16 ^{②③}	4.1 $\pm$ 0.68 ^{②③}	98.5 $\pm$ 13.47 ^{②③}	72.4 $\pm$ 9.45 ^{②③}	86.5 $\pm$ 10.76 ^{②③}
高剂量+DMXAA 组	238.9 $\pm$ 26.75 ^④	8.3 $\pm$ 1.16 ^④	202.8 $\pm$ 29.31 ^④	128.5 $\pm$ 16.56 ^④	39.3 $\pm$ 5.63 ^④
F 值	71.841	68.275	70.593	70.873	113.754
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:①与 Sham 组比较, $P < 0.05$;②与缺血性脑卒中组比较, $P < 0.05$;③与低剂量组比较, $P < 0.05$;④与高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 益气活血化浊解毒方对大鼠缺血侧皮层组织形态变化的影响

Sham 组大鼠假手术侧皮层神经元形态完整;缺血性脑卒中组大鼠模型侧皮层组织有典型脑梗死特征:神经元密度低,核深染,脑组织间质伊红

着色浅,有大量细胞空穴等大面积梗死相关组织水肿特征;低剂量组和高剂量组大鼠缺血侧皮层神经元损伤程度明显降低;高剂量+DMXAA 组大鼠与高剂量组相比,缺血侧皮层神经元损伤程度加重。见图 2。

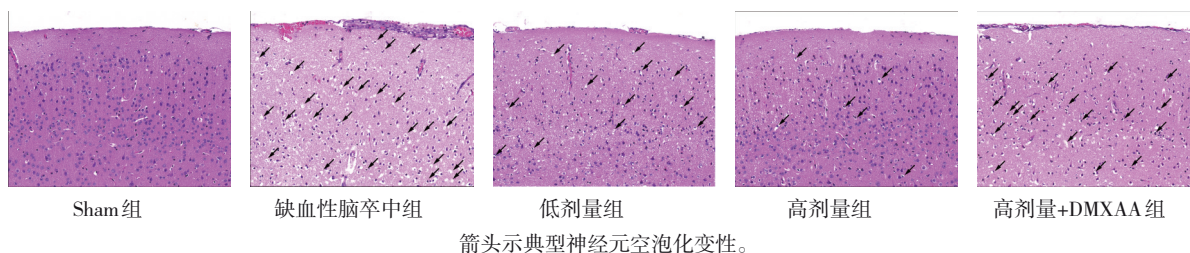


图 2 各组大鼠缺血侧皮层组织形态 (HE 染色 $\times 200$)

2.6 各组大鼠缺血侧皮层组织 iNOS、Iba1、CD68、CD40、CD206 和 Arg-1 蛋白相对表达量比较

各组大鼠 iNOS、Iba1、CD68、CD40、CD206 和 Arg-1 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);缺血性脑卒中组大鼠缺血侧皮层组织中 iNOS、Iba1、CD68 和 CD40 蛋白相对表达量比 Sham 组高($P < 0.05$),CD206 和 Arg-1 蛋白相对表达量比 Sham 组低($P < 0.05$);低剂量组和高剂量组大鼠缺血侧皮层组织中 iNOS、Iba1、CD68 和 CD40 蛋白相对表达量比缺血性脑卒中组低($P < 0.05$),CD206 和 Arg-1 蛋白相对表达量比缺血性脑卒中组高($P < 0.05$);高剂量+DMXAA 组大鼠缺血侧皮层组织中 iNOS、Iba1、CD68 和 CD40 蛋

白相对表达量比高剂量组高($P < 0.05$),CD206 和 Arg-1 蛋白相对表达量比高剂量组低($P < 0.05$)。见表 3 和图 3。

2.7 各组大鼠缺血侧皮层组织 Cleaved caspase-3、KAT3B 和 STING 蛋白相对表达量比较

各组大鼠缺血侧皮层组织 Cleaved caspase-3、KAT3B 和 STING 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较,缺血性脑卒中组大鼠缺血侧皮层组织 Cleaved caspase-3、KAT3B 和 STING 蛋白相对表达量比 Sham 组高($P < 0.05$);低剂量组和高剂量组大鼠缺血侧皮层组织 Cleaved caspase-3、KAT3B 和 STING 蛋白相对表达量比缺血性脑卒中组低($P < 0.05$);

表 3 各组大鼠缺血侧皮层组织中 Iba1、iNOS、CD68、CD40、CD206 和 Arg-1 蛋白相对表达量比较 (n=7, $\bar{x} \pm s$)

组别	iNOS	Iba1	CD68	CD40	CD206	Arg-1
Sham 组	0.32 ± 0.05	0.38 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.97 ± 0.12	0.82 ± 0.10
缺血性脑卒中组	1.08 ± 0.12 ^①	1.46 ± 0.17 ^①	0.86 ± 0.11 ^①	0.91 ± 0.12 ^①	0.26 ± 0.04 ^①	0.19 ± 0.03 ^①
低剂量组	0.83 ± 0.10 ^②	1.13 ± 0.14 ^②	0.65 ± 0.08 ^②	0.69 ± 0.08 ^②	0.49 ± 0.07 ^②	0.43 ± 0.06 ^②
高剂量组	0.54 ± 0.07 ^{②③}	0.71 ± 0.09 ^{②③}	0.43 ± 0.06 ^{②③}	0.47 ± 0.06 ^{②③}	0.73 ± 0.09 ^{②③}	0.62 ± 0.08 ^{②③}
高剂量+DMXAA 组	0.92 ± 0.11 ^④	1.25 ± 0.14 ^④	0.74 ± 0.09 ^④	0.78 ± 0.10 ^④	0.41 ± 0.06 ^④	0.35 ± 0.05 ^④
F 值	74.241	84.334	65.518	69.471	84.193	89.250
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与 Sham 组比较, P < 0.05; ②与缺血性脑卒中组比较, P < 0.05; ③与低剂量组比较, P < 0.05; ④与高剂量组比较, P < 0.05。

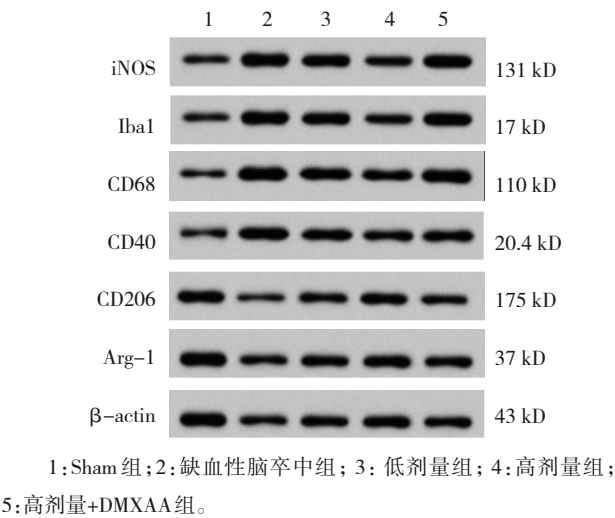


图 3 各组大鼠缺血侧皮层组织 iNOS、Iba1、CD68、CD40、CD206 和 Arg-1 蛋白表达

高剂量+ DMXAA 组大鼠缺血侧皮层组织 Cleaved caspase-3、KAT3B 和 STING 蛋白相对表达量比高剂量组高 (P < 0.05)。见表 4 和图 4。

表 4 各组大鼠缺血侧皮层组织中 Cleaved caspase-3、KAT3B 和 STING 蛋白相对表达量比较 (n=7, $\bar{x} \pm s$)

组别	Cleaved caspase-3	KAT3B	STING
Sham 组	0.18 ± 0.03	0.27 ± 0.04	0.23 ± 0.03
缺血性脑卒中组	0.76 ± 0.10 ^①	0.93 ± 0.12 ^①	0.85 ± 0.11 ^①
低剂量组	0.59 ± 0.07 ^②	0.71 ± 0.09 ^②	0.67 ± 0.09 ^②
高剂量组	0.40 ± 0.06 ^{②③}	0.52 ± 0.07 ^{②③}	0.43 ± 0.06 ^{②③}
高剂量+ DMXAA 组	0.67 ± 0.09 ^④	0.79 ± 0.10 ^④	0.72 ± 0.09 ^④
F 值	68.409	58.944	93.598
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与 Sham 组比较, P < 0.05; ②与缺血性脑卒中组比较, P < 0.05; ③与低剂量组比较, P < 0.05; ④与高剂量组比较, P < 0.05。

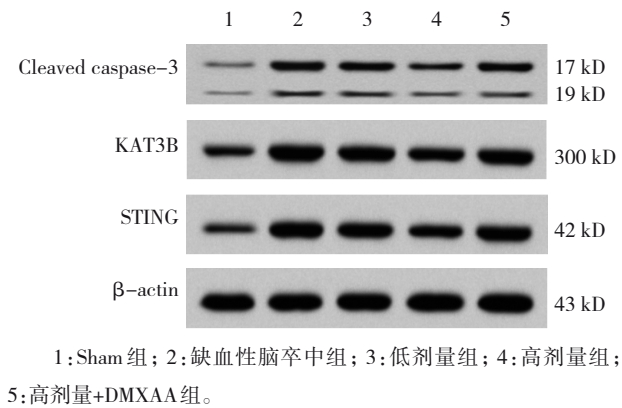


图 4 各组大鼠缺血侧皮层组织 Cleaved caspase-3、KAT3B 和 STING 蛋白表达

3 讨论

缺血性脑卒中是指由于血管狭窄或阻塞导致血流中断或血流减少,进而引起脑组织突然缺氧缺血,导致缺血核心区神经元发生不可逆转死亡,出现梗死区域,继而引发一系列级联反应,如炎症反应、神经元死亡,进而引发神经功能障碍^[10]。缺血性脑卒中发病突然,具有较高的致残率和病死率,严重威胁人民生命健康安全^[11]。目前缺血性脑卒中发病机制尚不明确,临床主要用溶栓、抗凝剂和血管扩张类药物,但有较大副作用,且效果有限^[12]。中医将缺血性脑卒中归为“中风病”范畴。血行无力,瘀血停滞,血脉不通,化生痰湿,痰湿蓄积日久化而为浊,浊瘀相兼,郁腐成毒,浊毒内生是缺血性脑卒中的主要病理因素。益气活血化浊解毒方具有益气健脾,化瘀通络的功效,方中黄芪可益气补虚,川芎可活血祛瘀通络,石菖蒲辟秽化浊,三药共为君。赤芍、丹参凉血活血,地龙通行经络,黄连清热解毒,郁金活血开窍,茯苓健脾利湿,泽泻泄热渗湿^[13]。研究显示益气活血化浊解毒方可降低脑缺血再灌注大鼠氧化应激、神

经损伤、脑梗死面积和神经元凋亡,改善神经功能^[7,14]。

缺血性脑卒中发生时脑组织区域细胞因缺血缺氧导致神经元大量死亡,还可造成血脑屏障破坏,导致脑水肿,损伤神经元,导致神经功能障碍;Cleaved caspase-3为凋亡蛋白,可促进凋亡相关蛋白表达,促进细胞凋亡^[15]。本研究结果显示,与Sham组相比,缺血性脑卒中组大鼠脑组织含水量、Cleaved caspase-3蛋白表达和脑梗死面积百分比显著升高,缺血性脑卒中造成脑水肿和神经元大量死亡。益气活血化浊解毒方治疗后可降低脑水肿、Cleaved caspase-3蛋白表达和脑梗死面积百分比,减少神经损伤。小胶质细胞是中枢神经系统的主要免疫细胞,参与神经炎症的发生、发展过程,在缺血性脑卒中后的病理发展中具有重要调控作用。缺血性脑卒中发生时可激活小胶质细胞活化和迁移,募集小胶质细胞到缺血区域,激活的小胶质细胞可极化为M₁和M₂两种表型。M₁细胞可促进TNF- α 和IL-6等炎症细胞因子产生,加重炎症细胞浸润,促进神经元损伤;M₂细胞可产生IL-10等抗炎因子,抑制炎症反应,缓解神经功能损伤;Iba1为小胶质细胞激活极化的标志蛋白;iNOS、CD68和CD40为M₁型小胶质细胞标志蛋白;Arg-1和CD206为M₂小胶质细胞标志蛋白^[8,16]。研究显示,抑制小胶质细胞M₁型极化,促进M₂型小胶质细胞极化可降低缺血性脑卒中大鼠脑梗死面积,减少神经元损伤,改善神经功能^[17]。本研究结果显示,与缺血性脑卒中组比较,益气活血化浊解毒方治疗后可降低TNF- α 和IL-6水平、iNOS、Iba1、CD68和CD40蛋白表达水平,提高IL-10水平、CD206和Arg-1蛋白表达水平,抑制小胶质细胞向M₁细胞极化,促进小胶质细胞向M₂细胞极化,减轻炎症损伤。LDH可调节细胞代谢,当细胞膜结构被破坏或细胞死亡时,LDH会被释放进入血液,是细胞损伤的指标物。NGF是一种神经细胞生长调节因子,可调节神经元发育和分化,可促进缺血性脑卒中神经功能恢复^[18]。本研究结果显示,与缺血性脑卒中组相比,益气活血化浊解毒方治疗后可降低LDH活性,提高NGF水平,降低神经元损伤,促进神经元损伤修复。进一步观察缺血侧皮层神经元形态和检测神经功能发现,益气活血化浊解毒方可改善缺血性脑卒中大鼠神经元形态,降低神经功能评分。提示益气活血化浊解毒方可促进

缺血性脑卒中大鼠小胶质细胞向M₂型极化,减轻缺血性脑卒中大鼠炎症、脑梗死和神经损伤,改善神经功能。

KAT3B是一种乙酰基转移酶,可催化多种组蛋白及非组蛋白发生乙酰化,研究显示,在缺血性脑卒中大鼠模型中,KAT3B过表达可促进小胶质细胞向M₁极化,促进炎症发生^[19]。有研究显示在缺血性脑卒中大鼠模型中,KAT3B过表达可靶向STING,并提高STING表达促进小胶质细胞向M₁极化^[20]。研究显示,STING还可通过激活NF- κ B来促进炎症反应和免疫失衡,诱导炎症因子产生^[21]。本研究结果显示,Sham组相比,缺血性脑卒中组大鼠KAT3B和STING蛋白表达水平升高,益气活血化浊解毒方治疗后可降低KAT3B和STING蛋白表达水平,抑制KAT3B/STING轴。为进一步探究益气活血化浊解毒方的作用靶点,本研究在益气活血化浊解毒方治疗的同时用KAT3B/STING激活剂DMXAA进行干预,结果显示,DMXAA可降低益气活血化浊解毒方对缺血性脑卒中大鼠神经功能的改善作用。提示益气活血化浊解毒方可能通过抑制KAT3B/STING轴来促进缺血性脑卒中大鼠神经功能恢复。

综上所述,益气活血化浊解毒方可能通过抑制KAT3B/STING轴来促进缺血性脑卒中大鼠小胶质细胞M₂极化,减轻炎症和神经损伤,改善神经功能。缺血性脑卒中发病机制复杂,后续还需进一步探究益气活血化浊解毒方在缺血性脑卒中大鼠体内的作用靶点。

参考文献:

- [1] BINDER N F, EL AMKI M, GLÜCK C, et al. Leptomeningeal collaterals regulate reperfusion in ischemic stroke and rescue the brain from futile recanalization[J]. *Neuron*, 2024, 112(9): 1456-1472.e6.
- [2] LI Y Y, CHEN J L, QUAN X P, et al. Extracellular vesicles maintain blood-brain barrier integrity by the suppression of caveolin-1/CD147/VEGFR2/MMP pathway after ischemic stroke[J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 1451-1467.
- [3] LU W Z, WEN J Y. Crosstalk among glial cells in the blood-brain barrier injury after ischemic stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(9): 6161-6174.
- [4] 孙亚萍, 霍瑞卿, 赵敏茵, 等. 益气活血化浊解毒方调节脂多糖和TLR4/MyD88/MAPK信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤研究[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(12): 5997-6002.
- [5] 谢占维, 孙玲玲, 石瑞, 等. 益气活血化浊解毒方对脑缺血再灌

- 注损伤大鼠脑组织 VEGF、Notch1、Dll4 表达的影响[J]. 环球中医药, 2023, 16(8): 1494-1501.
- [6] 赵卓琳, 吴蛟, 马英, 等. 丹酚 A 调控 CD147-MMPs 通路对大鼠缺血性脑卒中后神经的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(21): 5281-5285.
- [7] 孙亚萍, 石瑞, 孙玲玲, 等. 基于脑肠轴探讨益气活血化浊解毒方对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(8): 1709-1717.
- [8] 林晓燕, 方丽鑫, 黄丽霞, 等. 扁蒴藤素调节 cGAS/STING 信号通路对缺血性脑卒中大鼠认知功能和神经炎症的影响[J]. 河北医学, 2023, 29(11): 1761-1767.
- [9] 何阳, 于璐, 赵珊珊. 电针结合康复训练对脑缺血小鼠的运动功能改善作用和分子机制研究[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(3): 341-344.
- [10] BALA F, BETZNER W, BELAND B, et al. Reperfusion therapies for ischemic stroke in dementia and cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Stroke, 2024, 19(8): 867-875.
- [11] SONG J W, ZAIDI S A A, HE L G, et al. Integrative analysis of machine learning and molecule docking simulations for ischemic stroke diagnosis and therapy[J]. Molecules, 2023, 28(23): 7704.
- [12] LI Y, WU C, YANG R, et al. Application and development of cell membrane functionalized biomimetic nanoparticles in the treatment of acute ischemic stroke[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(15): 8539.
- [13] 孙玲玲, 谢占维, 孙亚萍, 等. 益气活血化浊解毒方对脑缺血再灌注损伤大鼠 BCL-2、Bax 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 四川中医, 2023, 41(8): 70-75.
- [14] 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.
- [15] YANG B, ZHANG L Y, CHEN Y, et al. Melatonin alleviates intestinal injury, neuroinflammation and cognitive dysfunction caused by intestinal ischemia/reperfusion[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 85: 106596.
- [16] YU Z N, SU G J, ZHANG L M, et al. Icaritin inhibits neuroinflammation in a rat cerebral ischemia model by regulating microglial polarization through the GPER-ERK-NF- κ B signaling pathway[J]. Mol Med, 2022, 28(1): 142.
- [17] ZHANG L P, LIU Y L, WANG S R, et al. Vagus nerve stimulation mediates microglia M1/2 polarization via inhibition of TLR4 pathway after ischemic stroke[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 577: 71-79.
- [18] WANG H K, CHEN J S, HSU C Y, et al. A novel NGF receptor agonist B355252 ameliorates neuronal loss and inflammatory responses in a rat model of cerebral ischemia[J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 2363-2376.
- [19] CAO W, FENG Z Z, ZHU D Y, et al. The role of PGK1 in promoting ischemia/reperfusion injury-induced microglial M1 polarization and inflammation by regulating glycolysis[J]. Neuromolecular Med, 2023, 25(2): 301-311.
- [20] LI Y M, LI J C, YU Q, et al. METTL14 regulates microglia/macrophage polarization and NLRP3 inflammasome activation after ischemic stroke by the KAT3B-STING axis[J]. Neurobiol Dis, 2023, 185: 106253.
- [21] DING R, LI H Y, LIU Y Q, et al. Activating cGAS-STING axis contributes to neuroinflammation in CVST mouse model and induces inflammasome activation and microglia pyroptosis[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 137.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 刘学飞, 武萌萌, 孙翔, 等. 益气活血化浊解毒方调控 KAT3B/STING 轴介导的小胶质细胞极化对缺血性脑卒中大鼠神经功能的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2025, 35(1): 1-8.

Cite this article as: LIU X F, WU M M, SUN X, et al. Study on the effect of Yiqi Huoxue Huazhuo Jiedu decoction regulating microglial polarization via KAT3B/STING axis on neurological function in rats with ischemic stroke[J]. China Journal of Modern Medicine, 2025, 35(1): 1-8.