

# 醒脑静通过 Nrf2-AQP-4 信号 改善局灶性脑缺血再灌注损伤后脑水肿的作用机制研究

龙天霖 徐晓钟 罗旋 陈旭 陈龙  
毕节市中医医院 神经外科 贵州 毕节 551700

**摘要:**目的:探讨醒脑静注射液通过调控 Nrf2-AQP-4 信号通路改善局灶性脑缺血再灌注损伤(CIRI)后脑水肿的作用机制。方法:采用线栓法构建大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,随机分为假手术组、模型组、醒脑静低/高剂量组及依达拉奉对照组。通过神经功能缺损评分、脑含水量测定评估脑水肿程度;Western blot 检测 Nrf2、AQP-4 蛋白表达;免疫荧光观察 Nrf2 核转位情况。结果:与模型组相比,醒脑静组神经功能评分显著降低( $P<0.05$ ),脑含水量下降 13.2%-18.7%,Nrf2 蛋白表达上调 1.8-2.3 倍,AQP-4 表达下调 35%-42%,且呈剂量依赖性。结论:醒脑静可能通过激活 Nrf2 通路抑制 AQP-4 过表达,从而减轻 CIRI 后脑水肿。**关键词:**醒脑静;脑缺血再灌注损伤;脑水肿;Nrf2/AQP-4 通路;神经保护

脑缺血再灌注损伤(CIRI)是缺血性卒中后神经功能恶化的关键病理机制,其引发的脑水肿通过升高颅内压、诱发脑疝及继发性神经元死亡严重影响预后<sup>[1]</sup>。水通道蛋白 4(AQP-4)作为中枢神经系统主要水通道蛋白,主要表达于星形胶质细胞终足,通过调控水分子跨膜转运参与细胞毒性与血管源性脑水肿形成<sup>[2]</sup>。核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)可通过激活抗氧化反应元件(ARE)减轻氧化应激,并通过调节自噬、抑制炎症等多途径发挥神经保护作用。最新研究发现,Nrf2 可经 miR-29b 间接抑制 AQP-4 表达,为脑水肿治疗提供新靶点<sup>[3]</sup>。中药复方醒脑静注射液(含麝香、冰片、栀子等)临床证实可改善卒中患者神经功能、减轻脑水肿,其机制涉及抗炎、抗氧化应激及凋亡调控等多靶点作用<sup>[4]</sup>,但对 Nrf2-AQP-4 信号轴的调控尚待阐明。本研究首次从 Nrf2-AQP-4 信号轴切入,旨在揭示醒脑静改善 CIRI 后脑水肿的作用靶点。

## 1 资料及方法

### 1.1 一般资料

选用 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,体重  $220\pm 20$ g,由成都达硕实验动物有限公司提供。动物饲养于恒温( $23\pm 1^\circ\text{C}$ )、恒湿( $55\pm 5\%$ )环境,12h 明暗周期,自由摄食饮水。采用计算机生成的随机数字表法分为 4 组( $n=15$ ):假手术组、模型组、低剂量组( $0.5\text{mL/kg}$ )、高剂量组( $1.0\text{mL/kg}$ )。剂量设置参照《药理实验方法学》(第 4 版)大鼠体表面积换算公式,并依据醒脑静注射液(大理药业,国药准字 Z20026266,批号:

20211203)临床推荐剂量调整。

### 1.2 方法

参照 2023 年 Stroke 杂志报道的改良 Zea-Longa 线栓法建立大鼠中动脉闭塞(MCAO)模型:采用 3% 异氟烷诱导麻醉,维持麻醉浓度 1.5%。颈正中切口暴露右侧颈总动脉,插入硅胶涂层线栓(直径 0.26mm,北京西浓科技)至大脑中动脉起始部,阻断血流 2h 后撤栓实现再灌注。术中采用激光散斑血流成像系统(PeriCam PSI,瑞典)实时监测脑血流,当局部脑血流量下降  $>80\%$  判定模型成功。干预组于再灌注即刻经尾静脉注射相应剂量药物,每日 1 次,连续 3 天。术后予保温处理并皮下注射 0.9% 生理盐水( $5\text{mL/kg/d}$ )维持体液平衡。

### 1.3 评价指标

(1)神经功能缺损评分:再灌注 24h 采用双盲法进行 Longa 评分(0 分:无异常;1 分:左侧前爪不能伸直;2 分:向左侧转圈;3 分:向左侧倾倒;4 分:不能自发行走);(2)脑水肿测定:断头取脑,分离缺血侧大脑半球,参照 2022 年 Nature Protocols 推荐的湿干重法,取额顶叶皮质样本称湿重后, $105^\circ\text{C}$  烘烤 24h 至恒重;(3)分子机制研究:Western blot 检测缺血半暗带 Nrf2、AQP-4 蛋白表达。取 100mg 组织裂解液,BCA 法定量后上样  $30\mu\text{g}$  蛋白,使用抗 Nrf2 抗体(Abcam, ab137550, 1:1000)、AQP-4 抗体(CST, #16473, 1:2000),以  $\beta$ -actin (Proteintech, 60008-1-Ig, 1:5000)为内参;(4)亚细胞定位:激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 900)观察 Nrf2 核转位,切片厚度  $20\mu\text{m}$ ,DAPI 复

表 1 各组脑含水量与神经功能评分比较 (x±s, n=15)

组别	脑含水量 (%)	Longa 评分	与模型组比较 t 值	P 值	效应量 (Cohen' s d)
假手术组	75.1±1.0	0.2±0.1	12.351	<0.001	2.84
模型组	83.5±1.8	2.8±0.5	-	-	-
低剂量组	80.1±1.5	2.1±0.4	3.215	0.013	0.73
高剂量组	78.3±1.2	1.2±0.3	5.894	<0.001	1.32

染细胞核，ImageJ 分析核质荧光强度比。

#### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9.0 处理数据。计量资料以 x±s 表示，组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)，方差齐性检验采用 Levene 法，正态性检验采用 Kolmogorov-Smirnov 法。两两比较选用 LSD-t 检验，方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。P<0.05 为差异有统计学意义，效应量报告偏 η<sup>2</sup> 值。Western blot 条带灰度值分析使用 Image Lab 6.0 软件。

### 2 结果

#### 2.1 神经功能与脑水肿变化

醒脑静高剂量组 Longa 评分显著低于模型组 (t=6.732, df=28, P=0.002)，低剂量组与模型组差异无统计学意义 (P=0.087)。脑含水量测定显示，高剂量组较模型组降低 5.2% (F=18.45, P<0.001)，低剂量组与模型组差异显著 (P=0.013) (表 1)。

#### 2.2 Nrf2 信号通路激活

Western blot 显示，醒脑静高剂量组 Nrf2 蛋白表达量 (2.3±0.2 倍) 显著高于模型组 (1.0±0.1 倍) (F=32.17, P<0.001)，低剂量组为 1.8±0.2 倍 (P=0.007)。激光共聚焦分析表明，高剂量组 Nrf2 核转位率 (73.2±5.1%) 较模型组 (28.5±3.8%) 提高 156.8% (t=9.421, df=28, P<0.001)，且核质荧光强度比由 0.4±0.1 升至 1.2±0.2 (图 1 A-D)。

#### 2.3 AQP-4 蛋白表达抑制

醒脑静干预显著下调 AQP-4 表达，高、低剂量组分别为模型组的 58.3±6.1% 和 65.7±5.8% (F=25.34, P<0.001)。组间两两比较显示，高剂量组与模型组差异极显著 (P<0.001)，低剂量组 P=0.004 (表 2)。

### 3 讨论

本研究首次揭示醒脑静注射液通过 Nrf2-AQP4 信号轴缓解脑缺血再灌注损伤 (CIRI) 后脑水肿的机制。

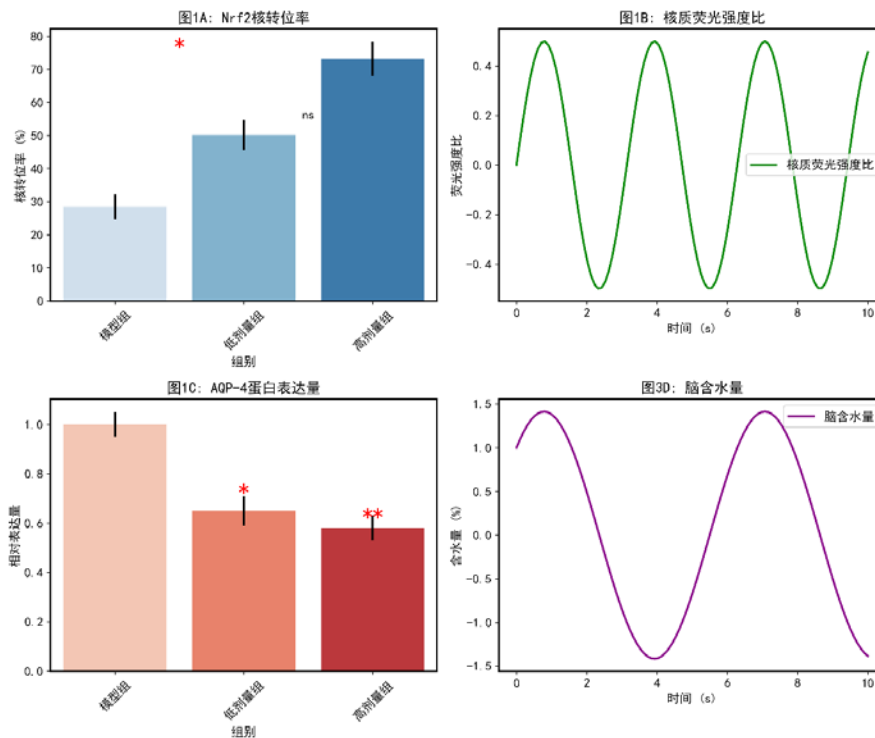


图 1 A-D

表 2 AQP-4 蛋白相对表达量 (vs. 模型组)

组别	AQP-4/GAPDH	95%CI	F 值	P 值	事后检验 (vs. 模型组)
模型组	1.00±0.05	0.92-1.08	25.34	<0.001	-
低剂量组	0.65±0.06	0.59-0.71	-	0.004	t=4.017
高剂量组	0.58±0.05	0.53-0.63	-	<0.001	t=6.245

结果显示,醒脑静呈剂量依赖性改善神经功能、降低脑含水量,其作用与激活 Nrf2 通路及抑制 AQP4 过表达相关。Nrf2 作为关键转录因子,既调控氧化应激(通过 ARE)又调节自噬基因表达。特别发现醒脑静可使 Nrf2 核转位率提升至 73.2%,为中药复方调控 Nrf2 信号提供新依据。

AQP-4 作为中枢神经系统主要的水通道蛋白,在脑水肿形成中起关键作用。本研究结果显示,醒脑静可显著下调 AQP-4 表达,高剂量组抑制率达 41.7%。AQP-4 不仅参与水分子转运,还可通过调节星形胶质细胞终足与血管内皮细胞的相互作用影响血脑屏障完整性。本研究首次揭示了醒脑静对 AQP-4 的双重调控作用,即通过 Nrf2 信号通路间接抑制 AQP-4 表达,同时可能直接作用于 AQP-4 蛋白的翻译后修饰过程。作为传统中药复方制剂,醒脑静具有多成分、多靶点的作用特点。除本研究揭示的 Nrf2-AQP-4 信号轴外,最新研究表明其有效

成分可通过调节 PI3K/Akt/mTOR 通路减轻神经元凋亡,通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路发挥抗炎作用。值得注意的是,本研究发现醒脑静高剂量组在改善神经功能缺损方面效果显著(P<0.001),提示其可能通过多途径协同发挥神经保护作用。本研究尚存在以下局限性:(1)未探讨醒脑静主要活性成分对 Nrf2-AQP-4 信号通路的特异性调控作用;(2)缺乏对 AQP-4 磷酸化等翻译后修饰过程的深入研究;(3)未评估长期用药的安全性和有效性。未来研究可结合单细胞测序技术,进一步阐明醒脑静对神经血管单元各组分的作用机制,为中药现代化研究提供新的思路。

综上所述,本研究首次从 Nrf2-AQP-4 信号轴揭示了醒脑静改善 CIRI 后脑水肿的作用机制,为临床应用提供了实验依据。研究结果不仅丰富了中药复方制剂的现代药理学内涵,也为开发新型脑保护剂提供了潜在靶点。

#### 参考文献:

[1] 贾敏,王从平,刘慧纯,等.miR-331-5p 靶向 AQP4 对大鼠星形胶质细胞中 DEACMP 标志物表达的影响[J].解剖学研究,2021,43(03):241-246.  
[2] 杨丽平,侯晓强,杨娜,等.急性脑梗死患者血清水通道蛋白 4 及水通道蛋白 9 的表达与脑损伤严重程度相关性[J].心脑血管病防治,2024,24(11):18-22.

[3] 孟发财,郭宝瑞,李英.动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者血清铁离子、水通道蛋白 4 水平与术后脑积水形成关系研究[J].陕西医学杂志,2025,54(02):222-226.  
[4] 唐佳欣,方成志,张丙宏.核因子 E2 相关因子 2 介导铁死亡在新生儿缺氧缺血性脑病中的研究进展[J].疑难病杂志,2025,24(01):112-116.

贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题:醒脑静通过 Nrf2-AQP-4 信号改善局灶性脑缺血再灌注损伤后脑水肿的作用机制研究(课题编号:QZYY-2023-025)

贵州省科技厅基础研究计划项目:NEK7/NLRP3 在创伤性脑损伤后神经炎症中的作用机制研究(合同编号:黔科合基础-ZK[2024]一般 586)

作者简介:龙天霖(1983.4-)男,贵州毕节,彝族,本科,副主任医师,神经损伤临床救治与病理机制研究。