

研究论文

黄芪甲苷减轻大鼠脑缺血再灌注损伤并抑制NF- κ B磷酸化及NLRP3炎症小体活化

唐标, 唐文静, 唐映红, 邓常清*

湖南中医药大学医学院, 长沙 410028

摘要: 本文旨在探讨黄芪甲苷(astragaloside IV, AST-IV)在大鼠脑缺血再灌注损伤中的保护作用及其抗炎机制。采用改良线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞脑缺血再灌注模型, 以神经功能缺失评分和脑梗死体积综合评价AST-IV抗脑缺血再灌注损伤的作用, Western blot检测脑组织中NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、pro-IL-1 β 、IL-1 β 、pro-IL-18、IL-18、磷酸化NF- κ B和总NF- κ B蛋白表达水平。结果显示, 与模型组比较, AST-IV能降低大鼠神经功能缺失评分, 减少脑梗死体积, 降低脑组织中NLRP3、Caspase-1、pro-IL-1 β 、IL-1 β 、pro-IL-18和IL-18蛋白水平, 并抑制磷酸化NF- κ B蛋白表达。以上结果提示, AST-IV具有抗脑缺血再灌注损伤作用, 其机制可能与抑制NF- κ B蛋白磷酸化以及抑制NLRP3炎症小体活化有关。

关键词: 黄芪甲苷; 脑缺血再灌注; NF- κ B; NLRP3炎症小体; 炎症

中图分类号: R332; R363.2; R329.2

Astragaloside IV attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury and reduces activation of NLRP3 inflammasome and NF- κ B phosphorylation in rats following a transient middle cerebral artery occlusion

TANG Biao, TANG Wen-Jing, TANG Ying-Hong, DENG Chang-Qing*

Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410028, China

Abstract: The present study was aimed to investigate the protective effect and anti-inflammation mechanism of astragaloside IV (AST-IV) on cerebral ischemia and reperfusion injury. Following the establishment of cerebral ischemia and reperfusion model in rats by modified suture method, neurological deficit scores and cerebral infarct volume were used to evaluate the pharmacological effect of AST-IV against cerebral ischemia-reperfusion injury. Western blot was used to detect the expression levels of NLRP3, pro-Caspase-1, Caspase-1, pro-IL-1 β , IL-1 β , pro-IL-18, IL-18, phosphorylated and total nuclear factor kappa B (NF- κ B)/p65 protein in the brain tissue. The results showed that compared with model group, the intervention of AST-IV decreased the neurological deficit scores, reduced the cerebral infarct volume, decreased the levels of NLRP3, Caspase-1, pro-IL-1 β , IL-1 β , pro-IL-18 and IL-18, and inhibited the expression of phosphorylated NF- κ B in brain tissue. The results suggest that AST-IV has a protective effect against cerebral ischemia and reperfusion injury, and its mechanism is related to inhibiting the phosphorylation of NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation.

Key words: astragaloside IV; cerebral ischemia and reperfusion; NF- κ B; NLRP3 inflammasome; inflammation

目前治疗缺血性脑卒中的原则是及时恢复缺血区的血液灌注, 但是在某些情况下恢复血流反而会

加重损伤, 产生缺血再灌注损伤^[1,2]。因此缺血再灌注损伤的防治是缺血性脑卒中治疗研究的重点^[3]。

Received 2018-08-06 Accepted 2018-11-13

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81503385) and the Hunan Provincial Innovation Foundation for Postgraduate, China (No. CX2018B515).

*Corresponding author. Tel: +86-731-88458710; E-mail: dchangq@sohu.com

脑缺血再灌注损伤与线粒体能量代谢障碍、兴奋性氨基酸毒性、离子平衡失调、氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、血脑屏障破坏等因素有关, 炎症反应在其中扮演了重要的角色, 介导了脑缺血再灌注损伤的发生和发展过程^[4]。

炎症小体是炎症反应的核心部分。NLRP3 炎症小体作为炎症小体中研究最透彻的一种, 在神经系统炎症中发挥了重要作用, 并且介导了多种神经变性疾病的发生和发展^[5]。已有的研究揭示, 脑缺血再灌注可诱导 NLRP3 炎症小体在神经元^[6]、星形胶质细胞^[7]、小胶质细胞和血管内皮细胞中^[8]表达增加和活化, 其下游半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶 1 (Caspase-1)、白介素 1 β (IL-1 β) 和白介素 18 (IL-18) 水平升高, 并且 NLRP3 炎症小体的活化能通过炎症反应加重脑损伤^[8-11]。这些研究表明 NLRP3 炎症小体参与了脑缺血再灌注损伤的发生和发展, 是脑缺血干预的一个重要靶点。

黄芪是治疗心脑血管疾病的常用有效中药, 黄芪甲苷 (astragaloside IV, AST-IV) (C41H68O14, 分子量: 784) 是黄芪中具有心脑血管效应的主要药效成分。大量的研究揭示 AST-IV 在脑缺血再灌注中发挥保护作用, 其作用机制主要与抗氧化、抗炎和抗凋亡有关^[12-14], 但是 AST-IV 在脑缺血再灌注中的抗炎机制还不明确。此外, 也有研究报道, AST-IV 可以抑制 NLRP3 炎症小体的活化发挥抗炎作用^[15-17], 但是 NLRP3 炎症小体通路是否介导了 AST-IV 在脑缺血再灌注中的抗炎机制以及 AST-IV 对 NLRP3 炎症活化的调控机制目前还不明确。因此, 本研究旨在探讨 AST-IV 对脑缺血再灌注中 NLRP3 炎症小体活化的影响, 从 NLRP3 炎症小体通路揭示 AST-IV 抗脑缺血再灌注损伤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 (235 \pm 14) g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物合格证号为 SCXK (湘) 2013-0004。动物饲养于 SPF 级动物实验室, 12 h 光照和 12 h 黑暗交替, 环境温度维持在 (23 \pm 1) $^{\circ}$ C。实验前适应性饲养一周, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。整个动物实验方案获得湖南中医药大学伦理委员会的批准, 实验过程中对动物的处置符合 2006 年国家科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要试剂及仪器 AST-IV (纯度 \geq 98.05%, 成都曼斯特生物科技有限公司, MUST-14102910), 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) (Sigma, BCBP3272V), 水合氯醛 (梯希爱化成工业发展有限公司, 8MQ20-CC), Western 及 IP 细胞裂解液 (碧云天, P0013), 蛋白酶抑制剂 Cocktail (不含 EDTA, 100 \times DMSO 储液) (Bimake, B14002), 磷酸酶抑制剂 Cocktail (100 \times , Bimake, B15002), pro-Caspase-1 抗体、pro-IL-1 β 抗体、pro-IL-18 抗体 (Proteintech, 22915-1-AP, 16806-1-AP, 10663-1-AP), IL-1 β 抗体、IL-18 抗体 (Abcam, ab9787, ab191860), Caspase-1 抗体、NLRP3 抗体、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 抗体 (Novus Biologicals, NBP1-45433, NBP2-12446, NBP1-78977), NF- κ B p65 抗体、p-NF- κ B p65 抗体 (Cell Signaling Technology, 4764s, 3033s), β -actin 抗体 (Sigma, A2228), 山羊抗兔二抗 (Merck Millipore, AP132P), 山羊抗鼠二抗 (Merck Millipore, AP124P), 栓线 [北京西浓科技有限公司, 2636A2, 头端直径 (0.36 \pm 0.02) mm], 酶标仪 (ELX.800, BIO-TEK 仪器公司), SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜装置、凝胶成像系统 (BIO-RAD 公司)。

1.3 实验分组及给药 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 随机分为 4 组: 假手术组 (sham)、模型组 (model)、AST-IV 低剂量组和 AST-IV 高剂量组。AST-IV 药物剂量参照前期实验^[18], AST-IV 低剂量组采用 28 mg/kg, AST-IV 高剂量组为 56 mg/kg。灌胃给药 (10 mL/kg), 连续给药 3 次, 给药时间分别为造模前 36 h 和 12 h 以及造模后 12 h, 假手术组和模型组给予同等剂量的生理盐水。

1.5 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型制作 采用改良 Longa 法制作大鼠大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型^[19]。用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 切开大鼠颈前正中皮肤, 分离左侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA)、颈外动脉 (external carotid artery, ECA) 和颈内动脉 (internal carotid artery, ICA)。手术线结扎 ECA 的远端并于结扎点近侧用电凝笔凝断 ECA 及其分支, 并对 ICA 远侧部进行活结结扎, 动脉夹夹闭 ICA 远侧部与 CCA。在 ECA 残端剪一小口, 将线栓自 ECA 经 CCA 分叉部插入 ICA, 松开 ICA 上的动脉夹, 并将线栓插入 ICA 颅内段, 观察线栓走行方向以免进入翼腭动脉, 进线长度约距 CCA 分叉处约

为 (18 ± 2) mm。此时进线有轻微阻力，线栓正好插至颅内的大脑前动脉，活结扎住 ICA 内的线栓以防止出血和线栓的移动，缝合颈部皮肤。阻断血流 2 h 后，拔出线栓进行再灌注 24 h 后，进行后续实验。假手术组仅将 CCA、ECA、ICA 游离出来，不做插线处理。

1.6 神经功能缺失评分 大鼠再灌注 24 h 后，按 Longa 法对神经功能评分^[19]，0：无症状；1：提尾时损伤对侧前肢不能伸直；2：行走时向损伤对侧旋转；3：行走时向对侧倾斜；4：无自发活动或意识丧失。

1.7 脑梗死体积测定 每组 10 只大鼠，大鼠再灌注 24 h 后，断头取脑，置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冰冻 15 min 后，将大脑自额极均匀切成 5 片 2 mm 连续冠状切片。置于 2% TTC 磷酸盐缓冲液中， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱避光孵育 15 min，每 5 min 将脑片轻轻翻动 1 次。染色后，用 4% 多聚甲醛将脑片固定 24 h。非缺血区组织为玫瑰红色，梗死区组织为白色，拍照后，用 Image-Pro Plus 软件进行图像分析，计算每一脑片正常侧及缺血侧脑半球 TTC 染红（未缺血区）的面积，参照文献的方法，将两者相减得到校正后的缺血面积，以消除脑水肿对梗死体积的影响。然后将每一脑片的缺血面积乘以厚度（2 mm），再将各脑片数值相加，得到全脑梗死体积的近似值，最后除以正常侧脑半球体积，得到脑梗死体积百分比^[20]。

1.8 Western blot 检测 每组 5 只大鼠，再灌注 24 h 后，取大鼠脑梗死区边缘皮质 100 mg，加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液 1 mL 于冰上匀浆 30 min，提取组织总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，调各样品蛋白浓度一致。取 40 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离后，转移到硝酸纤维素膜上，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，用抗 NLRP3 (1:1 000)、ASC (1:500)、Caspase-1 (1:500)、IL-1 β (1:1 000)、IL-18 (1:1 000)、pro-Caspase-1 (1:500)、pro-IL-1 β (1:200)、pro-IL-18 (1:500)、p-NF- κB p65 (1:1 000)、NF- κB p65 (1:1 000) 和 β -actin (1:5 000) 一抗抗体 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，洗涤后加 HRP 标记的二抗 (1:10 000)，室温孵育 1 h，洗涤后 ECL 显色曝光，用 Quantity One 灰度分析软件进行图像定量分析，测定目的蛋白的相对光密度值 (IOD)，以 β -actin 为内参蛋白，计算目的蛋白 IOD 与内参蛋白 IOD 的比值，以此表示蛋白相对含量。

1.9 统计学分析 使用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析，所有数据为计量资料，以 mean \pm SD 表示。

多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较方差齐者用 LSD 法，方差不齐者用 Dunnett's T3 检验， $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AST-IV 对脑缺血再灌注损伤大鼠神经行为学的影响

图 1 显示假手术组大鼠神经功能行为正常，神经功能缺失评分 0 分。模型组大鼠有明显的神经功能缺失症状，出现对侧前爪不能伸直，或行走时向损伤对侧转圈，或行走时向损伤对侧倾斜，或无自发活动等神经功能障碍，神经功能缺失评分显著高于假手术组 ($P < 0.01$)。与模型组比较，AST-IV 低剂量组和高剂量组神经功能缺失评分显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 AST-IV 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑梗死体积的影响

图 2 显示假手术组脑组织 TTC 染色示均匀红色，未见有苍白梗死区。模型组出现较大范围的苍白梗死区，梗死体积显著高于假手术组 ($P < 0.01$)。与模型组比较，AST-IV 低剂量组和高剂量组脑梗死体积显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 AST-IV 低剂量组比较，AST-IV 高剂量组脑梗死体积显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 AST-IV 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 NF- κB 蛋白表达的影响

如图 3 所示，与假手术组比较，模型组 p-NF- κB p65 和总 NF- κB p65 蛋白的表达以及 p-NF- κB p65/NF- κB p65 比值显著上调 ($P < 0.01$)。与模型组比较，AST-IV 低剂量组和高剂量组总 NF- κB p65 蛋白表达无显著变化，而 p-NF- κB p65 蛋白表达以及 p-NF- κB

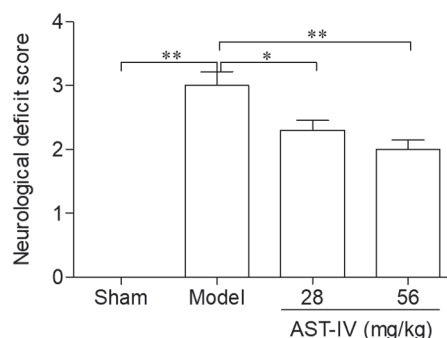


图 1. 各组神经功能缺失评分的比较

Fig. 1. Comparison of neurological deficit scores among each group. Values are means \pm SD, $n = 10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

p65/NF-κB p65 比值显著降低 ($P < 0.01$)。

2.4 AST-IV对脑缺血再灌注大鼠脑组织中NLRP3炎症小体通路相关蛋白表达的影响

如图4所示,与假手术组比较,模型组 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1、Caspase-1、pro-IL-1β、IL-1β、pro-IL-18 和 IL-18 水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P <$

0.01)。AST-IV 干预后,与模型组比较,AST-IV 低剂量组和高剂量组 NLRP3、Caspase-1、Pro-IL-1β、IL-1β、Pro-IL-18 和 IL-18 水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 ASC 和 pro-Caspase-1 水平无明显变化 ($P > 0.05$)。与 AST-IV 低剂量组比较,AST-IV 高剂量组 Caspase-1 水平显著降低 ($P < 0.05$)

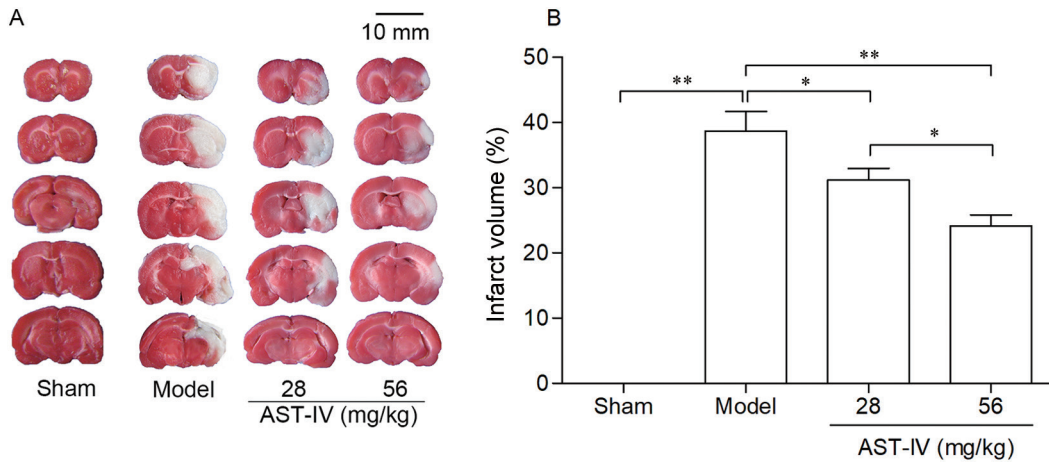


图 2. 各组脑梗死体积比较

Fig. 2. Comparison of infarct volume among each group. Representative TTC staining images (A) and statistical analysis (B) of cerebral infarct volume among groups. Scale bar, 10 mm. Values are means \pm SD, $n = 10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

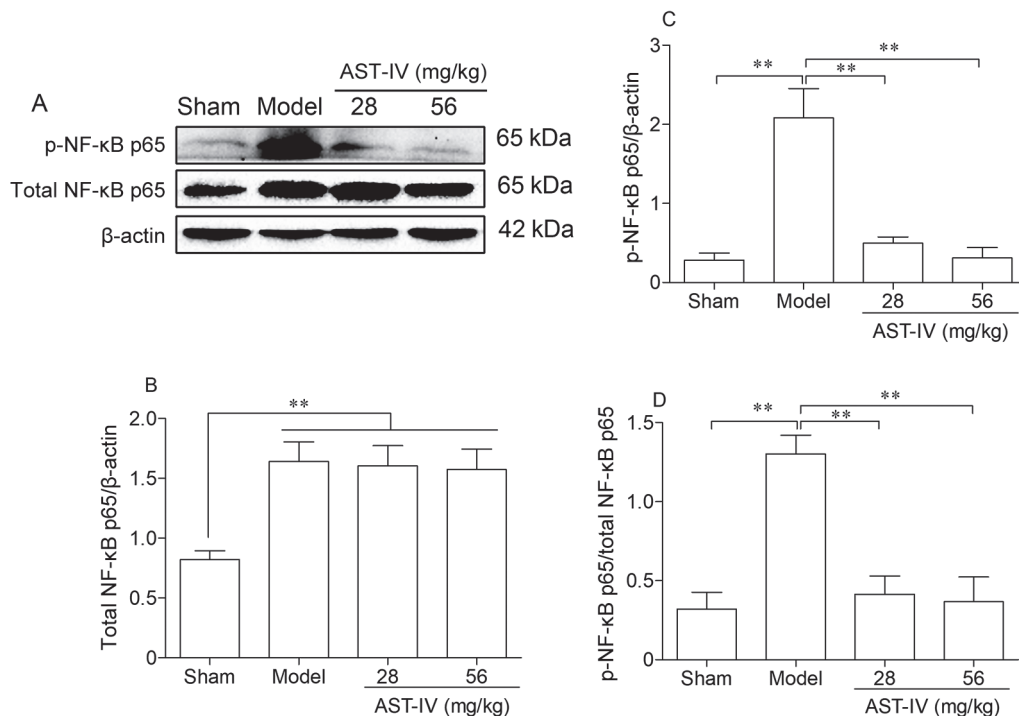


图 3. 脑组织中p-NF-κB p65和总NF-κB p65蛋白的表达

Fig. 3. Expressions of p-NF-κB p65 and total NF-κB p65 in brain tissues examined by Western blot. A: Image of representative blots. B: Total NF-κB p65 expression. C: p-NF-κB p65 expression. D: Ratio of p-NF-κB p65/total NF-κB p65. Values are means \pm SD, $n = 5$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

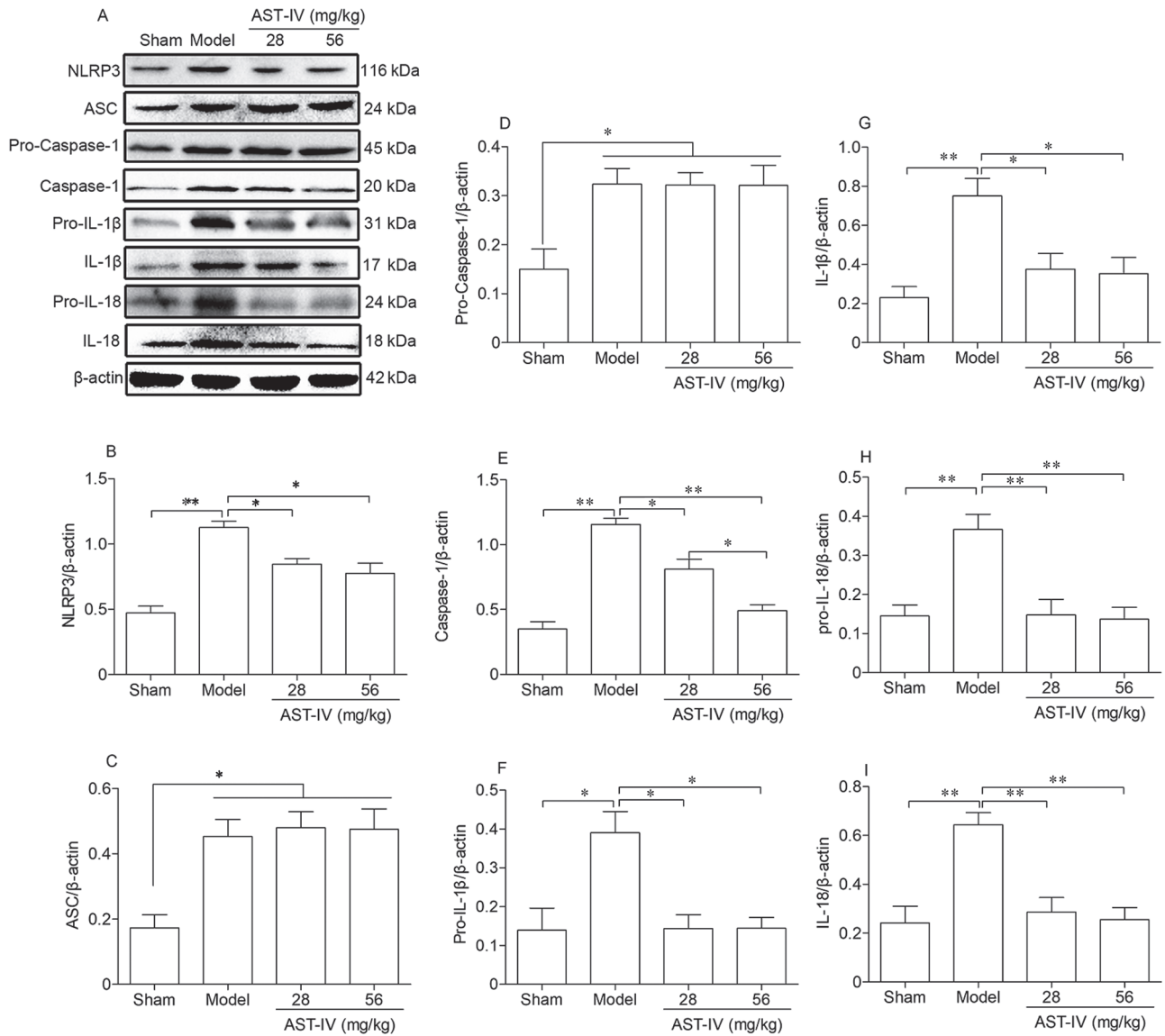


图 4 脑组织中NLRP3炎症小体通路相关蛋白表达

Fig. 4. Expressions of NLRP3 inflammasome-related proteins detected by Western blot. *A*: Image of representative blots. *B*: NLRP3 expression. *C*: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) expression. *D*: Pro-Caspase-1 expression. *E*: Caspase-1 expression. *F*: Pro-IL-1 β . *G*: IL-1 β expression. *H*: Pro-IL-18 expression. *I*: IL-18 expression. Values are means \pm SD, $n = 5$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

本研究结果显示, AST-IV 能改善大鼠脑缺血再灌注后神经功能缺失症状, 并且剂量依赖性地减少脑梗死体积。已有实验证实, AST-IV 能改善神经功能损伤, 减少脑梗死体积以及改善血脑屏障的通透性, 对脑缺血再灌注损伤具有减轻作用^[12]。本研究结果与该研究结果一致, 表明 AST-IV 具有抗脑缺血再灌注损伤作用。

目前认为, 抑制炎症因子的表达从而发挥抗炎

作用是 AST-IV 在脑缺血再灌注损伤中发挥保护作用的重要机制^[12]。大量的研究已经揭示 NLRP3 炎症小体介导了脑缺血再灌注损伤, 在脑缺血再灌注的炎症反应中发挥了重要作用。NLRP3 炎症小体能够在脑缺血再灌注中被活化, 过度活化的 NLRP3 炎症小体可使无活性的 pro-Caspase-1 转化为有活性的 Caspase-1。Caspase-1 可剪切 Pro-IL-1 β 和 Pro-IL-18, 形成有活性的 IL-1 β 和 IL-18, 二者促进炎症因子的释放, 引起病理性炎症反应^[10]。

因此本研究从 NLRP3 炎症小体通路探讨了 AST-IV 在脑缺血再灌注中的抗炎机制。已有研究表明在脑缺血再灌注中 NLRP3 炎症小体各组成蛋白 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1 以及 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 表达增加, NLRP3 炎症小体活化的产物 Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 水平升高^[6], 本文结果与以往研究结果一致, 这表明脑缺血再灌注能诱导 NLRP3 炎症小体活化。AST-IV 干预后, 脑组织中 NLRP3、Caspase-1、pro-IL-1 β 、IL-1 β 、pro-IL-18 和 IL-18 水平显著降低, 这提示 AST-IV 能抑制脑缺血再灌注中的 NLRP3 炎症小体的活化。此外也有研究报道, AST-IV 可以通过抑制 NLRP3 炎症小体的活化抑制炎症反应, 从而减轻内皮功能紊乱^[17], 以及减轻神经炎症而发挥抗抑郁作用^[16], 并且 AST-IV 可以抑制双侧颈总动脉阻塞的全脑缺血小鼠 NLRP3 炎症小体的活化, 减轻炎症从而改善认知障碍^[15]。这些结果提示调控 NLRP3 炎症小体的活化可能是 AST-IV 发挥抗炎作用的重要机制。

NLRP3 炎症小体的活化需要启动和激活双重信号的调控, NF- κ B 介导了启动过程, 当 NF- κ B 活化后, 上调 NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 前体的表达, 这可以为 NLRP3 的活化提供物质基础并且降低 NLRP3 的活化阈值^[21]。近期有研究表明, 脑缺血再灌注导致 NF- κ B 磷酸化水平升高, NLRP3、pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 表达增加, NLRP3 炎症小体活化, 而抑制 NF- κ B 磷酸化能降低 NLRP3、pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 水平进而抑制 NLRP3 炎症小体的活化^[22]。这表明 NF- κ B 是调控脑缺血再灌注中 NLRP3 炎症小体活化的重要途径。因此本研究从 NF- κ B 视角研究 AST-IV 调控脑缺血再灌注中 NLRP3 炎症小体活化的机制。结果显示, 脑缺血再灌注后, 模型组 p-NF- κ B p65 和总 NF- κ B p65 蛋白的表达以及 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 比值显著上调, 表明脑缺血再灌注后总 NF- κ B 水平以及 NF- κ B 磷酸化水平增加, NF- κ B 被激活。而 AST-IV 干预后, p-NF- κ B p65 水平及 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 比值明显降低, 这表明 AST-IV 能降低 NF- κ B 磷酸化水平, 抑制 NF- κ B 活化。此外, AST-IV 能降低 NF- κ B 下游 NLRP3、pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 水平, 并且抑制 NLRP3 炎症小体活化。这些研究结果提示通过抑制 NF- κ B 的磷酸化进而抑制 NLRP3 炎症小体活化可能是 AST-IV 在脑缺血再灌注损伤中的抗炎机制。本研究明确了 AST-IV 能减轻大鼠脑缺血再灌注损伤, 其机制可能与其

抑制 NF- κ B 磷酸化以及 NLRP3 炎症小体活化有关。

参考文献

- 1 Manning NW, Campbell BC, Oxley TJ, Chapot R. Acute ischemic stroke: time, penumbra, and reperfusion. *Stroke* 2014; 45(2): 640–644.
- 2 Petrovic-Djergovic D, Goonewardena SN, Pinsky DJ. Inflammatory disequilibrium in stroke. *Circ Res* 2016; 119(1): 142–158.
- 3 Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein RA. Acute stroke intervention: a systematic review. *JAMA* 2015; 313(14): 1451–1462.
- 4 Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem* 2018; 46(4): 1650–1667.
- 5 Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17(8): 588–606.
- 6 Fann DY, Lee SY, Manzanero S, Tang SC, Gelderblom M, Chunduri P, Bernreuther C, Glatzel M, Cheng YL, Thundiyil J, Widiapradja A, Lok KZ, Foo SL, Wang YC, Li YI, Drummond GR, Basta M, Magnus T, Jo DG, Mattson MP, Sobey CG, Arumugam TV. Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke. *Cell Death Dis* 2013; 4: e790.
- 7 Qiu J, Wang M, Zhang J, Cai Q, Lu D, Li Y, Dong Y, Zhao T, Chen H. The neuroprotection of Sinomenine against ischemic stroke in mice by suppressing NLRP3 inflammasome via AMPK signaling. *Int Immunopharmacol* 2016; 40: 492–500.
- 8 Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y, Shi W, Li F, Xin T, Pang Q, Yi F. NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34(4): 660–667.
- 9 Hong P, Li FX, Gu RN, Fang YY, Lai LY, Wang YW, Tao T, Xu SY, You ZJ, Zhang HF. Inhibition of NLRP3 inflammasome ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in diabetic mice. *Neural Plast* 2018; 2018: 9163521.
- 10 Ismael S, Zhao L, Nasoohi S, Ishrat T. Inhibition of the NLRP3-inflammasome as a potential approach for neuroprotection after stroke. *Sci Rep* 2018; 8(1): 5971.
- 11 Tang B (唐标), Deng CQ. Pyroptosis and stroke. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2018; 70(1): 93–98 (in Chinese with English abstract).
- 12 Wang HL, Zhou QH, Xu MB, Zhou XL, Zheng GQ. Astragaloside IV for experimental focal cerebral ischemia: preclinical evidence and possible mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 8424326.
- 13 Luo Y, Qin Z, Hong Z, Zhang X, Ding D, Fu JH, Zhang WD,

- Chen J. Astragaloside IV protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia. *Neurosci Lett* 2004; 363(3): 218–223.
- 14 Li M, Ma RN, Li LH, Qu YZ, Gao GD. Astragaloside IV reduces cerebral edema post-ischemia/reperfusion correlating the suppression of MMP-9 and AQP4. *Eur J Pharmacol* 2013; 715(1–3): 189–195.
- 15 Li M, Li H, Fang F, Deng X, Ma S. Astragaloside IV attenuates cognitive impairments induced by transient cerebral ischemia and reperfusion in mice via anti-inflammatory mechanisms. *Neurosci Lett* 2017; 639: 114–119.
- 16 Song MT, Ruan J, Zhang RY, Deng J, Ma ZQ, Ma SP. Astragaloside IV ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behaviors in mice via the PPARgamma/NF-kappaB/NLRP3 inflammasome axis. *Acta Pharmacol Sin* 2018; 39(10): 1559–1570.
- 17 Zhao Y, Li Q, Zhao W, Li J, Sun Y, Liu K, Liu B, Zhang N. Astragaloside IV and cycloastragenol are equally effective in inhibition of endoplasmic reticulum stress-associated TX-NIP/NLRP3 inflammasome activation in the endothelium. *J Ethnopharmacol* 2015; 169: 210–218.
- 18 Li JX (李静娴), Yang XQ, Tang B, Liu XD, Tang YH, Deng CQ, Huang XP. Effect of astragaloside combined with Panax notoginseng saponins on cerebral ischemia-reperfusion injury and study of pharmacokinetics in rats. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2017; 42(19): 3786–3794 (in Chinese with English abstract).
- 19 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20(1): 84–91.
- 20 Zhang X, Yan H, Yuan Y, Gao J, Shen Z, Cheng Y, Shen Y, Wang RR, Wang X, Hu WW, Wang G, Chen Z. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy* 2013; 9(9): 1321–1333.
- 21 Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol* 2015; 6: 262.
- 22 Fann DY, Lim YA, Cheng YL, Lok KZ, Chunduri P, Baik SH, Drummond GR, Dheen ST, Sobey CG, Jo DG, Chen CL, Arumugam TV. Evidence that NF-kappaB and MAPK signaling promotes NLRP inflammasome activation in neurons following ischemic stroke. *Mol Neurobiol* 2018; 55(2): 1082–1096.