



电子、语音版

·论著·

天麻钩藤饮加减对脑出血小鼠的神经保护作用及其对高迁移率组蛋白B1/Toll样受体4信号通路的影响

刘泓¹, 解茂芝¹, 谭军², 伍大华², 陈博威³, 陶翠宁¹, 罗春玉¹, 袁春云²

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

2. 湖南省中西医结合医院(湖南省中医药研究院附属医院), 湖南长沙 410006

3. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

摘要:目的 探讨天麻钩藤饮加减在小鼠脑出血(ICH)急性期对神经炎症和细胞凋亡的影响及其与高迁移率组蛋白B1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)信号通路的关联。方法 32只雄性小鼠随机分为4组($n=8$):Sham组(假手术组)、ICH组(ICH模型组)、ITG组(ICH模型给予天麻钩藤饮干预)、ITG组(ICH模型给予天麻钩藤饮联合HMGB1靶点抑制剂甘草酸干预)。天麻钩藤饮质量由质谱分析控制,同时结果通过网络药理学进行靶点和通路分析。脑内注射胶原酶Ⅶ建立ICH小鼠模型。通过改良神经功能缺损评分、苏木精和伊红(HE)染色分析天麻钩藤饮对小鼠ICH后神经功能缺损和脑组织病理损伤的影响;通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素 1β (IL- 1β)水平;通过蛋白质印迹法(Western blotting)分析Bcl-2-Associated X的蛋白质(BAX)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、HMGB1、TLR4、髓样分化因子88(Myd88)、 β 干扰素TIR结构域衔接蛋白(TRIF)、核因子 κ B(NF- κ B)的表达水平。结果 与Sham组相比,ICH组的神经功能缺损和脑组织病理损伤加剧,炎症表达和细胞凋亡水平上升,HMGB1、TLR4、Myd88、TRIF、NF- κ B等通路相关蛋白表达升高;与ICH组相比,ITG组和ITG组的神经功能缺损和脑组织病理损伤得到缓解,炎症表达和细胞凋亡水平下降,HMGB1、TLR4、Myd88、TRIF、NF- κ B等通路相关蛋白表达在不同程度上降低。此外天麻钩藤饮通过质谱分析和网络药理学分析,得到509种化合物,其中75个成分通过类药性分析并通过靶点预测得到195个可能具备干预效果的分子靶点。基因本体论(GO)功能富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析则进一步验证了相关分子靶点与炎症、HMGB1/TLR4通路的相关性。结论 天麻钩藤饮加减治疗缓解了ICH小鼠的神经功能缺损和脑组织病理损伤,并降低了ICH后神经炎症表达和细胞凋亡水平,可能分子机制是抑制HMGB1/TLR4信号通路的表达。

关键词:脑出血;天麻钩藤饮;神经炎症;细胞凋亡;高迁移率族蛋白B1;Toll样受体4

中图分类号:R743

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2025.03.001

Neuroprotective effect of modified Tianma Gouteng Decoction on mice with intracerebral hemorrhage and its effect on the high-mobility group box 1/Toll-like receptor 4 signaling pathway

LIU Hong¹, XIE Maozhi¹, TAN Jun², WU Dahua², CHEN Bowei³, TAO Cuining¹, LUO Chunyu¹, YUAN Chunyun²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

2. Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine (The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine), Changsha, Hunan 410006, China

3. The first Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

基金项目:湖南省自然科学基金(2023JJ60321);湖南省教育厅科学研究项目(20A381)。

收稿日期:2024-11-18;修回日期:2025-05-09

作者简介:刘泓(1999—),男,硕士研究生在读,主要从事中西医结合防治老年疾病的研究。

通信作者:袁春云(1979—),女,主任医师,硕士,湖南省中西医结合医院老年病科主任,主要从事中西医结合防治老年疾病的研究。Email:68403685@qq.com。

Abstract: Objective To investigate the effect of modified Tianma Gouteng Decoction on neuroinflammation and cell apoptosis in mice in the acute stage of intracerebral hemorrhage (ICH) and its association with the high-mobility group box 1 (HMGB1)/Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway. **Methods** A total of 32 male mice were randomly divided into sham-operation group (Sham group), ICH model group (ICH group), IT group (ICH mice treated with Tianma Gouteng Decoction), and ITG group (ICH mice treated with Tianma Gouteng Decoction and the HMGB1 target inhibitor glycyrrhizic acid), with 8 mice in each group. Mass spectrometry was used for drug quality control, and network pharmacology was used to perform target and pathway analyses. Intracerebral injection of collagenase VII was performed to establish a mouse model of ICH. Neurological deficit score and HE staining were used to observe the effect of Tianma Gouteng Decoction on neurological deficit and brain histopathological injury in mice after ICH; ELISA was used to measure the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β); Western blotting was used to measure the expression levels of Bcl-2-associated X protein (BAX), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), HMGB1, TLR4, myeloid differentiation factor 88 (Myd88), TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β (TRIF), and nuclear factor-kappa B (NF- κ B). **Results** Compared with the Sham group, the ICH group had exacerbation of neurological deficit and brain histopathological injury and increases in the levels of inflammatory markers and cell apoptosis, as well as increases in the expression levels of the pathway-related proteins HMGB1, TLR4, Myd88, TRIF, and NF- κ B. Compared with the ICH group, the IT group and the ITG group had alleviation of neurological deficit and brain histopathological injury, reductions in the levels of inflammatory markers and cell apoptosis, and varying degrees of reductions in the expression levels of the pathway-related proteins HMGB1, TLR4, Myd88, TRIF, and NF- κ B. In addition, 509 compounds were obtained for Tianma Gouteng Decoction by mass spectrometry and network pharmacology, among which 75 were analyzed in terms of drug-likeness, and 195 molecular targets with a potential interventional effect were identified by target prediction. Gene ontology functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analysis further verified the association of related molecular targets with inflammation and the HMGB1/TLR4 pathway. **Conclusion** Modified Tianma Gouteng Decoction can alleviate neurological deficit and brain histopathological injury in mice with ICH and reduce the levels of neuroinflammatory markers and cell apoptosis after ICH, possibly by inhibiting the expression of the HMGB1/TLR4 signaling pathway.

Keywords: intracerebral hemorrhage; Tianma Gouteng Decoction; neuroinflammation; cell apoptosis; high-mobility group box 1; Toll-like receptor 4

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是脑卒发中的主要病理类型之一, 具有病死率和致残率高的特点, 同时其发病率还呈逐年增高趋势^[1-3]。ICH 后脑组织损伤情况影响着疾病的转归和预后, 其中神经炎症是 ICH 后继发性损伤的常见和主要机制之一^[4-6]。相关研究指出, 高迁移率组蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1)/Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 信号通路介导炎症反应, 影响细胞自噬、凋亡等过程, 与 ICH 后炎性损伤密切相关^[7]。因此, 早期干预 ICH 后神经炎症并调节相关通路表达对于降低病死率和减轻疾病后遗症至关重要。

天麻钩藤饮, 源自《中医内科杂病证治新义》一书, 其加减在临床中多应用于高血压、卒中、眩晕等疾病, 通常被认为其可以通过控制血压来预防 ICH 和减小初期血肿扩张等^[8]。既往研究指出, 天麻钩藤饮对 ICH 的治疗作用与抑制神经炎症相关, 如抑制 ICH 后核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的表达和核转位^[9-10]。然而, 天麻钩藤饮能否通过调节 HMGB1/TLR4 信号通路干预 ICH

后神经炎症的研究未见报道, 故本研究拟通过天麻钩藤饮干预 ICH 小鼠模型探索其对 ICH 后神经功能的保护作用和相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 C57BL/6 小鼠 32 只 (雄性, 8~10 周, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司)。饲养环境为无特定病原体 (SPF) 动物房, 饲养期间: 室温控制在 20~24 °C, 湿度 50%~70%, 12 h 光暗环境交替, 定时给予标准饲料与饮用水。喂养适应 1 周后进行实验。所有实验内容经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审核同意 (伦理审查受理号: SLBH-202212130002)。

1.2 实验药品

天麻钩藤饮处方的药材购自湖南省中西医结合医院 (湖南省中医药研究院附属医院) 中药房, 具体用药: 天麻 10 g, 钩藤 30 g^{后入}, 煅石决明 30 g^{先煎}, 炒栀子 6 g, 桑寄生 15 g, 首乌藤 10 g, 牛膝 6 g, 三七粉 6 g^{冲服}, 大黄 10 g。中药

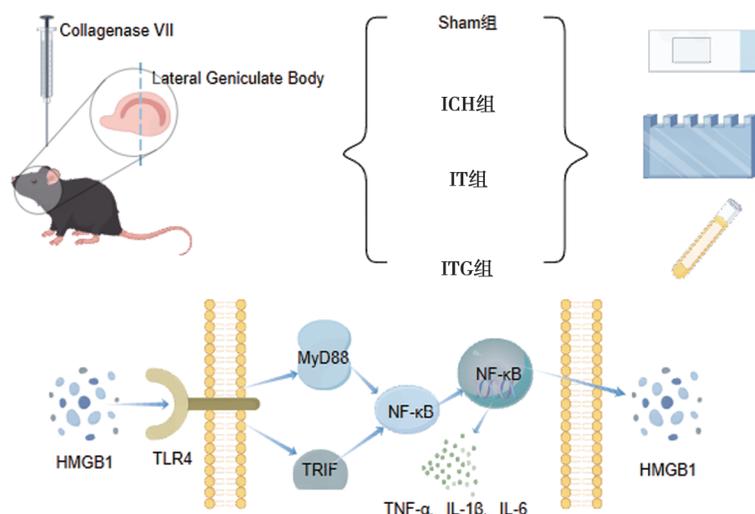


图1 实验流程图及通路机制图

材质量符合国家药典标准,按传统方法进行煎煮和浓缩,最终制备得到 1.33 mg/mL 的浓缩液。

Collagenase VII (biosharp, BS237-100 mg), 活性效价 $\geq 1\ 000$ u/mg, 浓度 0.3 u/ μ L; 甘草酸 (Glycyrrhizin) (MedChemExpress, HY-N0184), 浓度 10 mg/mL; 戊巴比妥钠 (Merck KGaA, P3761), 浓度 1%; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Abiowell, AWC0146a); 0.9% 氯化钠注射液。

1.3 基于 UPLC-HRMS 的网络药理分析

1.3.1 天麻钩藤饮的测定

通过 UPLC-HRMS 分析确定天麻钩藤饮的成分。① 样本提取,药液用液氮研磨均匀后,称取约 100 mg 样本加入 1 mL 纯水溶液(含 L-2-氯苯丙氨酸 4 μ g/mL),涡旋振荡 1 min; -40 $^{\circ}$ C 冰箱中预冷 2 min 后研磨(60 Hz, 2 min),后冰水浴超声提取 60 min, -40 $^{\circ}$ C 下静置 30 min; 离心 10 min (12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C), 取全部上清液过 0.22 μ m 的水相滤膜,并 4 $^{\circ}$ C 下静置过夜,再次重复后装入内衬管的 LC-MS 进样小瓶预备分析。② 液相色谱-质谱条件,分析仪器为 ACQUITY UPLC I-Class plus 超高效液相串联 QE 高分辨质谱仪组成的液质联用系统。色谱条件: 色谱柱 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m); 柱温 45 $^{\circ}$ C; 流动相为 A-水(含 0.1% 甲酸), B-乙腈; 流速为 0.35 mL/min; 进样体积 5 μ L。PDA 扫描范围 210~400 nm。质谱条件: 加热电喷雾电离源 (heated electrospray ionization source, HESI); 样品质谱信号采集分别采用正负离子扫描模式。数据采集模式为 DDA。扫描方式为 Full MS/dd-MS2 (TOP 8)。

1.3.2 类药成分及靶点筛选

将 UPLC-HRMS 鉴定的天麻钩藤饮化学成分输入 TCMSp (<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>) [具体条件: 药物口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性

(drug-likeness, DL) ≥ 0.18] 和 SwissADME 平台 (<http://www.swissadme.ch>) [具体条件: 肠胃吸收 (GI absorption) 为 “High” 和 5 类药性预测 (Lipinski, Ghose, Veber, Egan, Muegge) 结果 ≥ 3 个 “Yes”], 两者均筛选通过后的化学成分采用 TCMSp 和 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>) (具体条件: 可能性 ≥ 0.1) 进行靶点预测后汇总。

1.3.3 疾病相关靶点筛选

利用 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>)、DRUGBANK 数据库 (<https://go.drugbank.com>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org>)、TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net>), 以 “intracerebral hemorrhage” 为关键词进行检索, 汇总去重后获得疾病相关靶点。

1.3.4 Hub 靶点筛选

取药物靶点和疾病靶点交集, 通过 STRING 11.5 (<https://cn.string-db.org>) 进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 导出数据后使用 Cytoscape 3.9.1 的 cytoHubba 插件筛选 Hub 靶点。

1.3.5 富集分析

运用欧易云平台 (<https://cloud.oebiotech.cn/task>), 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析及可视化。

1.4 ICH 模型的诱导

参考文献 [11] 采用胶原酶 VII 诱导 ICH 小鼠模型, 具体操作如下: 小鼠麻醉后, 取俯卧位固定于鼠脑立体定位仪上, 于前囟区域备皮、消毒, 纵向剪开该处皮肤, 暴露前囟及左侧颅骨, 仪器配平后定位左侧球状体 (前囟左侧 2.0 mm, 前囟后侧 0.5 mm, 深度 4 mm), 钻孔到达, 全自动微量注射泵在 5 min 内匀速输注 Collagenase VII 溶液 0.5 μ L,

留针 10 min 后缓慢匀速出针,出针时间 > 5 min,予骨蜡密封针孔,缝合皮肤并消毒。假手术组予等量的 0.9% 无胶原酶的无菌盐水。术后 24 h,待小鼠清醒后进行 Longa 评分法评价模型。实验流程图及通路机制图见图 1。

1.5 实验分组与干预方法

使用随机数表法分配小鼠(每组 8 只),分组如下: Sham 组(假手术组); ICH 组(ICH 模型组); IT 组(ICH 模型给予天麻钩藤饮干预); ITG 组(ICH 模型给予天麻钩藤饮联合 HMGB1 靶点抑制剂甘草酸干预)。干预方法如下: IT 组和 ITG 组按 16 g/(kg·d) 的剂量灌胃天麻钩藤饮药液,其余组灌胃等量盐水; ITG 组按 50 mg/(kg·d) 的剂量腹腔注射 Glycyrrhizin 溶液,其余组注射等量 DMSO 溶液。所有干预均在 ICH 模型制备 24 h 后进行,持续 7 d。天麻钩藤饮灌胃剂量由前期预实验确定。Glycyrrhizin 溶液配比及注射剂量则参考相关文献^[12-13]确定。

1.6 观察指标

1.6.1 神经功能检测

神经功能检测在评估造模成功后的第 7 天进行,2 名研究者独立地使用改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)进行^[14]。

1.6.2 组织学检测

小鼠脑组织常规脱水后,浸蜡,石蜡包埋,制备 4 μm 切片,烤片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,然后染色,脱蜡、水合,透明封片,光镜下观察神经细胞形态学变化。

1.6.3 蛋白质印迹法(Western blotting)蛋白定量分析

脑组织剪碎后放入裂解液中,研磨后离心(12 000 r/min, 4 °C, 10 min)取上清液,通过上样、电泳、转膜、膜封闭、抗体孵育加入一抗 ACTIN(GB15003)、Bcl-2-associated X 相关蛋白质(Bcl-2-associated X, BAX)(GB15690)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(GB154380)、HMGB1(GB11103)、TLR4(GB11519)、髓样分化因子 88(myeloid differentiation primary response protein 88, Myd88)(GB111554)、β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白(TIR domain-containing adapter protein inducing IFN-β, TRIF)(23288-1-AP)、NF-κB(GB11997),再加入 HRP-山羊抗兔(GB23303)、显色等步骤。使用 Image J 软件分析印迹强度,以 ACTIN 作为对照。试剂均来源于 Servicebio(中国武汉)或武汉三鹰。

1.6.4 血清检测

小鼠眼球取血(全血静置 15 min, 4 °C, 3 000 r/min 离心 5 min,取上层血清后-80 °C 保存),根据制造商的说明,用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清标本中的肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素 6(Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 1β(Interleukin-1β, IL-1β)水平。使用酶标仪检测样品,通过构建标准曲线测定细胞因子浓度。试剂盒均来源于赛默飞生物。

1.7 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9.5 进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 天麻钩藤饮的定性和定量分析

天麻钩藤饮共鉴定出 509 种化合物,进一步通过分析中药成分的含量和化学分类下的含量,可知成分含量较多的是 Ginsenoside Rg1、Parishin C、Genipin-1-O-gentiobioside 等,类别多为糖及糖苷类、萜类、黄酮类等。见图 2、3。

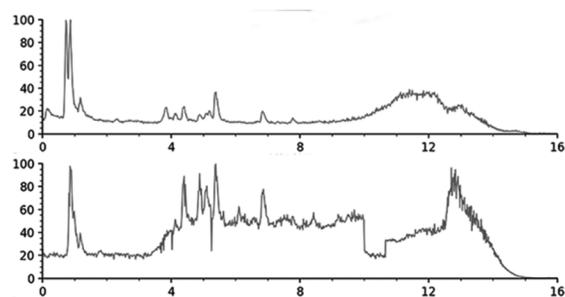


图2 天麻钩藤饮正/负离子模式下的总离子流

2.2 成分靶点筛选

研究通过类药性分析共获得 75 个具有良好成药性的化学成分,对应药物靶点 778 个,与 2 130 个疾病靶点相比有 195 个靶点重合。

交集靶点进一步通过 STRING 11.5 和 Cytoscape 3.9.1 分析可得天麻钩藤饮治疗 ICH 的 Hub 靶点。见表 1(排名前 30)。

表1 天麻钩藤饮治疗 ICH 的 Hub 靶点及关联度

序号	靶点	度值	序号	靶点	度值
1	AKT1	132	16	EGFR	106
2	HIF1A	101	17	SRC	111
3	STAT3	106	18	STAT1	66
4	TNF	124	19	MMP2	81
5	BCL2	102	20	RELA	51
6	MMP9	99	21	MAPK3	91
7	CASP3	102	22	JAK2	63
8	PTGS2	92	23	CCND1	72
9	IL1B	114	24	MAPK8	50
10	JUN	96	25	HMOX1	50
11	ICAM1	80	26	MAPK1	62
12	PPARG	84	27	VCAM1	73
13	IL2	75	28	CXCR4	77
14	TLR4	73	29	APP	76
15	ESR1	85	30	ERBB2	82

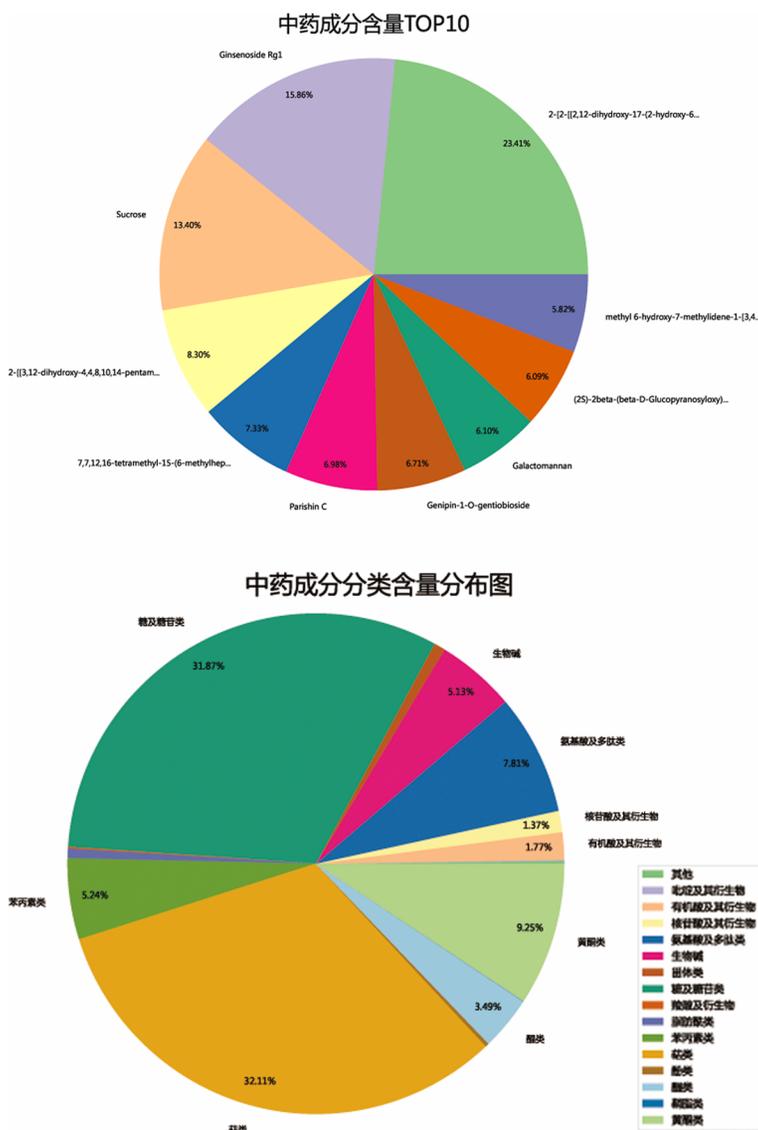


图3 成分含量(前10位)及分类含量分布图

2.3 GO功能富集和KEGG通路富集

将195个交集靶点导入欧易云平台(<https://cloud.oebiotech.cn/task>),进行GO功能富集分析及KEGG通路富集分析。结果显示,天麻钩藤饮干预ICH与对异生物刺激的反应、对磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositide 3-kinases, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号转导的正向调节、炎症反应、对脂多糖的反应、对缺氧的反应等生物过程相关,与细胞质核周区、树突、神经元细胞体等细胞成分相关,与内肽酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、整合素结合、丝氨酸型内肽酶活性等分子功能相关,同时还可能影响PI3K/Akt、缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor, HIF-1)、高级糖基化终末产物-受体(advanced glycation end products-receptor for AGE, AGE-RAGE)等多个信号通路。见图4、5。

2.4 各组神经功能结果

各组mNSS比较,差异有统计学意义($F=80.300, P=0.000$)。与Sham组相比,ICH组mNSS评分升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与ICH组相比,IT组和ITG组mNSS评分降低,但仍高于Sham组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.5 各组病理损伤情况

与Sham组相比,ICH组脑组织结构紊乱,伴间质水肿、核固缩、炎性浸润、细胞水肿及坏死等病理改变;与ICH组相比,IT组和ITG组小鼠脑组织炎性浸润、细胞水肿及坏死等现象减轻。见图6。

2.6 各组炎症指标情况

各组TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平对比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与Sham组相比,ICH组小鼠的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6表达水平升高($P<0.05$)。而与ICH组相比,

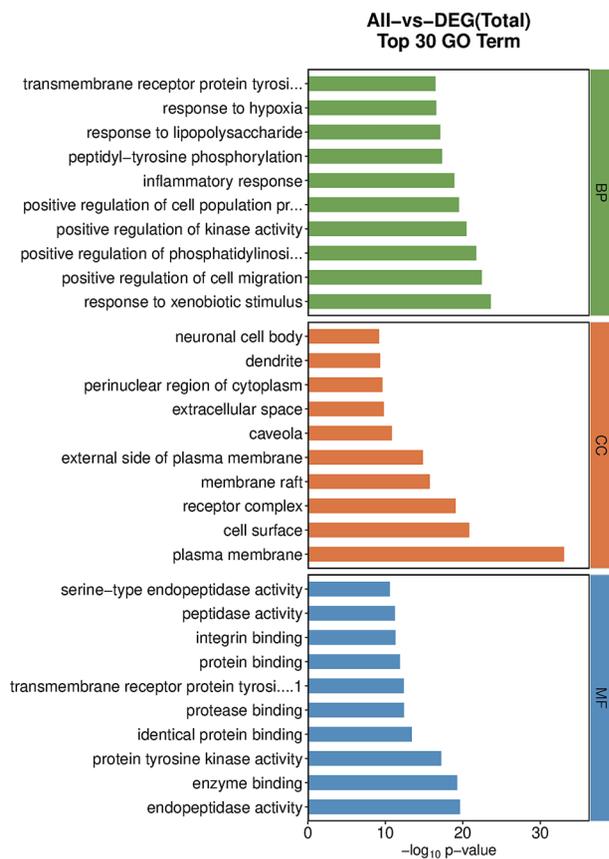


图4 GO功能富集分析

表2 各组小鼠mNSS比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	mNSS/分
Sham组	3.3±0.9
ICH组	12.4±1.7 ^①
IT组	6.8±0.7 ^{①②}
ITG组	6.0±1.3 ^{①②}
F值	80.300
P值	0.000

注:①与Sham组对比, $P < 0.05$; ②与ICH组对比, $P < 0.05$ 。

IT组和ITG组的相关炎症因子表达降低($P < 0.05$)。见表3。

2.7 各组神经细胞凋亡情况

三组间BAX($F=150.300, P=0.000$)、Bcl-2($F=14.010,$

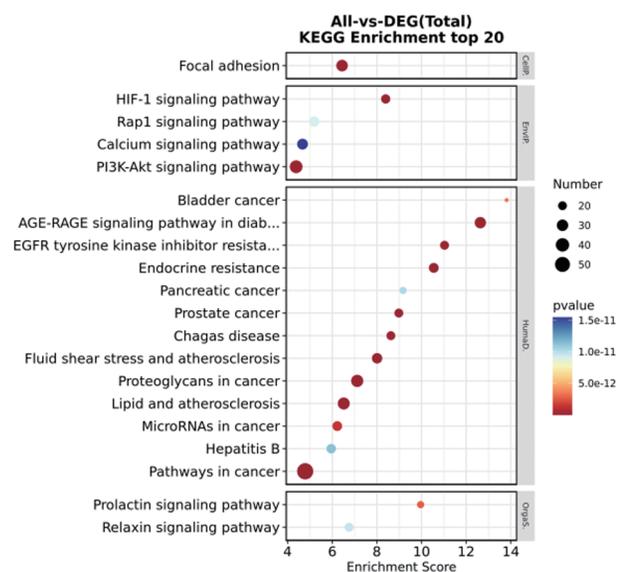


图5 KEGG通路富集分析

表3 各组小鼠炎症指标水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

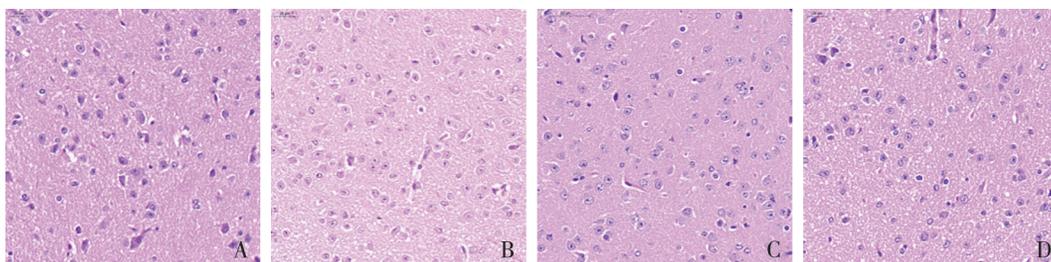
组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Sham组	31.5±4.7	27.5±3.8	58.5±13.7
ICH组	240.2±52.9 ^①	89.7±7.2 ^①	289.2±142.1 ^①
IT组	44.5±7.8 ^②	68.5±9.8 ^{①②}	104.8±47.1 ^②
ITG组	79.6±11.7 ^{①②}	48.0±21.2 ^{①②}	94.4±21.9 ^②
F值	98.600	37.400	14.900
P值	0.000	0.000	0.000

注:①与Sham组对比, $P < 0.05$; ②与ICH组对比, $P < 0.05$ 。

$P < 0.002$)及其比值($F=47.230, P < 0.000$)存在差异。与Sham组相比,ICH组BAX/Bcl-2比值增加($P < 0.05$)。而与ICH组相比,IT组和ITG组BAX/Bcl-2比值降低($P < 0.05$)。见图7。

2.8 各组HMGB1/TLR4通路蛋白表达

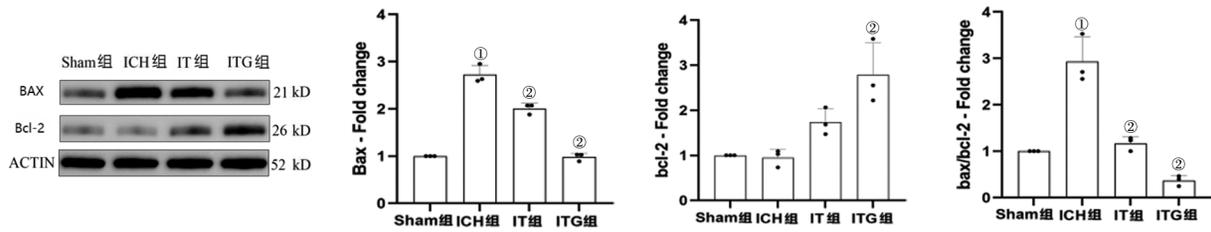
三组间HMGB1($F=18.040, P=0.000$)、TLR4($F=79.760, P=0.000$)、Myd88($F=35.030, P=0.000$)、TRIF($F=49.850, P=0.000$)、NF- κ B($F=79.760, P=0.000$)表达存在差异。与Sham组相比,ICH组HMGB1、TLR4、Myd88、TRIF、NF- κ B蛋白表达升高($P < 0.05$)。而与ICH组相比,IT组的HMGB1、TLR4、Myd88、NF- κ B蛋白表达下降,ITG组的



A: Sham组; B: ICH组; C: IT组; D: ITG组。

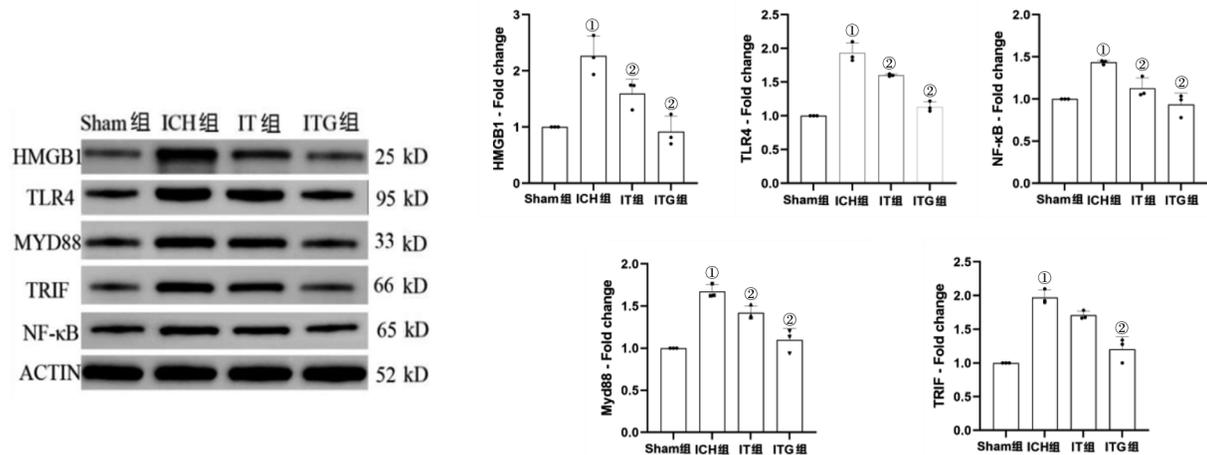
图6 各组小鼠脑组织HE染色图($\times 40$)

HMGB1、TLR4、Myd88、TRIF、NF- κ B蛋白表达降低($P < 0.05$)。见图8。



①与Sham组对比, $P < 0.05$; ②与ICH组对比, $P < 0.05$ 。

图7 各组小鼠脑组织BAX和Bcl-2蛋白表达



①与Sham组对比, $P < 0.05$; ②与ICH组对比, $P < 0.05$ 。

图8 各组小鼠脑组织通路蛋白表达

3 讨论

神经炎症是ICH后继发性脑损伤的关键机制。ICH初期血液渗入脑实质中形成水肿,使得常驻免疫细胞(如小胶质细胞和星形胶质细胞等)募集并激活,释放炎症因子和趋化因子,引发外周免疫细胞的浸润,同时炎症环境的形成会产生一系列包含凝血酶、活性氧、基质金属蛋白酶等在内的有害物质,进一步诱导神经细胞死亡和加重脑组织损伤,最终加重神经功能缺损症状^[5,15-19]。

该项研究中,天麻钩藤饮降低了ICH后的mNSS,并改善了脑组织病理中炎性浸润、细胞肿胀及死亡等现象,表明其在改善小鼠ICH症状中的作用。同时,研究通过检测观察到细胞凋亡率BAX/Bcl-2比值和M1型小胶质细胞相关促炎因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的降低,表明天麻钩藤饮对ICH小鼠的神经功能保护作用可能与抗炎和抗凋亡作用相关。

TLR4是Toll样受体(TLR)成员之一,与免疫和炎症反应密切相关,在ICH早期即可识别与损伤相关的分子模式并介导宿主对损伤的炎症反应^[20]。TLR4经由Myd88和TRIF路径发出信号,激活下游NF- κ B等信号通路的功能表达,最终上调TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎因子

表达以放大神经炎症,其中血液诱发的促炎反应通常被更多地认为是Myd88路径依赖性的^[20-21]。此外,HMGB1是由巨噬细胞、单核细胞和免疫细胞分泌的核蛋白,在ICH后神经炎症早期被释放,一方面HMGB1与TLR4/髓样分化蛋白(myeloid differentiation protein, MD2)直接结合以介导巨噬细胞激活和细胞因子释放,另一方面HMGB1又受到NF- κ B的调控而进一步放大TLR4信号,因此HMGB1被认为是ICH后治疗的绝佳靶点^[21-24]。

该项研究中,研究通过Western blotting验证了天麻钩藤饮能够降低ICH后的HMGB1、TLR4、Myd88、NF- κ B等通路蛋白表达,表明了天麻钩藤饮对ICH小鼠脑组织的抗炎和抗凋亡作用可能与HMGB1/TLR4信号通路相关,且可能依赖于Myd88路径。此外,研究进一步在中药干预基础上联合HMGB1活性抑制剂甘草酸,验证了天麻钩藤饮对于HMGB1的表达抑制作用^[25]。

中药处方通常以多味药物组合以实现多部位、多靶点的疾病综合治疗效果。研究通过质谱分析鉴定出509种化合物,其中部分主要成分已被现代药理学证明对于ICH有治疗作用,如:Ginsenoside Rg1被指出可以抑制ICH后细胞凋亡,促进细胞存活与增殖^[26];Parishin C被指

出可以抑制小胶质细胞激活,同时改善脑组织损伤后的氧化应激和炎症反应^[27-28]; Genipin-1-O-gentiobioside 被验证可以改善神经元凋亡^[29];等。

此外,通过网络药理学对天麻钩藤饮药物成分靶点和ICH疾病靶点进行预测,发现了75个具有良好成药性的化学成分和195个可能具备干预效果的分子靶点,其中TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-1 β 等靶点出现在Hub靶点之中。将195个可能具备干预效果的分子靶点进行功能和通路富集分析,发现功能上与神经细胞密切相关,涉及ICH后的炎症表达、血肿形成、组织缺氧、细胞存活、迁移和修复等过程,而通路富集分析结果也与研究通路密切相关,如:HMGB1与AGE-RAGE信号相互影响,在ICH疾病中AGE/RAGE信号通过上调HMGB1/TLR4/NF- κ B诱导炎症因子的释放和中性粒细胞浸润,而HMGB1也可通过上调RAGE促进小胶质细胞M1型极化来加重脑组织损伤^[30-31]。这进一步验证了天麻钩藤饮干预ICH的过程与炎症相关通路密切相关。

综上,研究验证了天麻钩藤饮能够通过降低脑组织炎症表达和抑制神经细胞凋亡来减轻ICH模型小鼠的神经功能缺损和脑组织损伤情况,其潜在机制可能与HMGB1/TLR4信号通路相关,为未来研究中药干预ICH的作用机制提供了一定的参考。但是,研究仍存在许多不足和问题有待进一步讨论,如:研究样本量较少;仅观测ICH急性期的药物干预作用;治疗作用依赖于何种活性物质;等。因此,未来仍需进一步完善实验设计和验证特定化学成分的功效及作用机制。

参 考 文 献

- [1] GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(10): 795-820.
- [2] RUFF IM, DE HAVENON A, BERGMAN DL, et al. 2024 AHA/ASA performance and quality measures for spontaneous intracerebral hemorrhage: a report from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2024, 55(7): e199-e230.
- [3] 崔洪玉, 赵德喜, 王若男, 等. 中医治疗脑出血的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(2): 81-83.
- [4] MAGID-BERNSTEIN J, GIRARD R, POLSTER S, et al. Cerebral hemorrhage: pathophysiology, treatment, and future directions[J]. *Circ Res*, 2022, 130(8): 1204-1229.
- [5] TSCHOE C, BUSHNELL CD, DUNCAN PW, et al. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets[J]. *J Stroke*, 2020, 22(1): 29-46.
- [6] CHEN SP, PENG JH, SHERCHAN P, et al. TREM2 activation attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis via PI3K/Akt pathway after intracerebral hemorrhage in mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 168.
- [7] 黄红丽, 陈建, 王化强, 等. 急性脑梗死患者血浆高迁移率族蛋白B1/Toll样受体4变化及其与脑梗死体积、神经功能缺损及预后的关系[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2022, 49(2): 15-19.
- [8] 段建平, 张杰, 王旭, 等. 天麻钩藤饮治疗神经系统疾病研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(11): 255-264.
- [9] 袁春云, 袁思斯, 伍大华, 等. 天麻钩藤饮加减通过抑制NF- κ B表达和核转位缓解高血压性脑出血肝阳化风证大鼠神经损伤的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(12): 2829-2832.
- [10] 袁春云, 袁思斯, 伍大华, 等. 天麻钩藤饮加减对高血压性脑出血肝阳化风证大鼠神经保护作用的研究[J]. *湖南中医杂志*, 2019, 35(2): 127-130.
- [11] LIU MJ, ZHAO XC, GONG HS, et al. Dexmedetomidine prevents hemorrhagic brain injury by reducing damage induced by ferroptosis in mice[J]. *Neurosci Lett*, 2022, 788: 136842.
- [12] XUE JM, SUAREZ JS, MINAAI M, et al. HMGB1 as a therapeutic target in disease[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(5): 3406-3419.
- [13] THAKUR V, SADANANDAN J, CHATTOPADHYAY M. High-mobility group box 1 protein signaling in painful diabetic neuropathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 881.
- [14] LI JC, LI JL, GUO EK, et al. Pink1 deficiency enhances neurological deficits and inflammatory responses after intracerebral hemorrhage in mice[J]. *Neurotherapeutics*, 2024, 21(2): e00317.
- [15] ALSBROOK DL, DI NAPOLI M, BHATIA K, et al. Neuroinflammation in acute ischemic and hemorrhagic stroke[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2023, 23(8): 407-431.
- [16] JONES OA, MOHAMED S, HINZ R, et al. Neuroinflammation and blood-brain barrier breakdown in acute, clinical intracerebral hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2025, 45(2): 233-243.
- [17] ZHANG WQ, WU QY, HAO SL, et al. The hallmark and crosstalk of immune cells after intracerebral hemorrhage: Immunotherapy perspectives[J]. *Front Neurosci*, 2023, 16: 1117999.
- [18] 李智勇, 陈政纲, 彭俊. G蛋白偶联受体30在大鼠蛛网膜下腔出血后对神经炎症和血脑屏障破坏的影响[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2024, 51(2): 29-34.
- [19] ZHANG Y, KHAN S, LIU Y, et al. Modes of brain cell death following intracerebral hemorrhage[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 799753.
- [20] KARIMY JK, REEVES BC, KAHLE KT. Targeting TLR4-dependent inflammation in post-hemorrhagic brain injury[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(6): 525-533.
- [21] XU J, FIROUZ SM, FARROKHIAN M, et al. Potential anti-inflammatory effect of anti-HMGB1 in animal models of ICH by downregulating the TLR4 signaling pathway and regulating the inflammatory cytokines along with increasing HO1 and NRF2[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 915: 174694.

- [22] 张列, 苗树船, 杨中鑫, 等. HMGB1下调的作用:通过抑制神经元细胞自噬和凋亡减轻大鼠脑出血后的神经元损伤[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(7): 1050-1056.
- [23] GUO C, ZHOU XQ, WANG X, et al. Annao Pingchong decoction alleviate the neurological impairment by attenuating neuroinflammation and apoptosis in intracerebral hemorrhage rats[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 310: 116298.
- [24] 张春玲, 梁超, 王宝爱, 等. 大黄素通过调控HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路对老年脑出血模型大鼠炎症因子的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(24): 2994-2998.
- [25] MACHIDA A, BANSHOYA K, MIYAMARU A, et al. A glycyrrhizin derivative with a more potent inhibitory activity against High-Mobility group box 1 efficiently discovered by chemical synthesis inspired by the bioconversion products of an endophytic fungus isolated from licorice[J]. J Med Chem, 2024, 67(18): 16328-16337.
- [26] LI X, HUANG X, TANG YL, et al. Assessing the pharmacological and therapeutic efficacy of traditional Chinese medicine Liangxue Tongyu prescription for intracerebral hemorrhagic stroke in neurological disease models[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1169.
- [27] JIANG N, YAO CH, ZHANG YW, et al. Antidepressant effects of Parishin C in chronic social defeat stress-induced depressive mice[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 325: 117891.
- [28] WANG T, CHEN HB, XIA SY, et al. Ameliorative effect of Parishin C against cerebral Ischemia-Induced brain tissue injury by reducing oxidative stress and inflammatory responses in rat model[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2021, 17: 1811-1823.
- [29] XIA CB, JIANG Y, ZHAO Y, et al. Genipin 1-O- β -D-gentiobioside ameliorates CUMS-induced prefrontal cortex neuron neuronal apoptosis by modulating HIPK2 SUMOylation[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 141: 112985.
- [30] LIU NN, LIU CD, YANG YJ, et al. Xiao-Xu-Ming decoction prevented hemorrhagic transformation induced by acute hyperglycemia through inhibiting AGE-RAGE-mediated neuroinflammation[J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105650.
- [31] SUN YY, ZHU X, ZHU KY, et al. High-mobility group box 1 contributes to hypoxic-ischemic brain damage by facilitating imbalance of microglial polarization through RAGE-PI3K/Akt pathway in neonatal rats[J]. Int J Med Sci, 2022, 19(14): 2093-2103.

责任编辑:王荣兵