

基于 TNF- α /NF- κ B 信号通路联合网络药理学 探讨安宫牛黄丸对自发性脑出血大鼠 神经功能影响的作用机制

吴敬强¹ 范文俊¹ 曹勇² 谢磊² 杜康² 邵伦伟¹ 郑慧军²

¹河南中医药大学第二临床医学院,河南郑州 450000; ²河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院),
河南郑州 450000

通信作者:郑慧军, Email: zhenghuijunvip@163.com

【摘要】 目的 基于肿瘤坏死因子- α /核转录因子- κ B(TNF- α /NF- κ B)信号通路联合网络药理学探讨安宫牛黄丸对自发性脑出血大鼠神经功能影响的作用机制。**方法** 利用中药系统药理学数据库分析平台(TCMSP)、中药高通量实验和参考数据库(HERB)等获取安宫牛黄丸治疗脑出血的靶点,筛选关键靶点进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析与分子对接。然后,将大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、安宫牛黄丸组(以 270 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药)、西药组(腹腔注射 4 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹+呋塞米 1.8 mg·kg⁻¹·d⁻¹),给药剂量为人和动物按体表面积折算的等效剂量比值。通过自体心脏尾状核注射法复制脑出血模型。制模后,观察各组大鼠神经功能行为评分、脑组织含水量、脑组织病理学变化、血脑屏障通透性及脑组织中 NF- κ B p65、肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)、NF- κ B 抑制因子- α (I κ B α)、TNF- α 的蛋白表达水平。**结果** 共筛选出交集基因 216 个。GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析结果预测 TNF- α /NF- κ B 炎症信号通路是主要调控通路之一。动物实验结果显示,制模后 72 h,与模型组比较,安宫牛黄丸组神经功能评分、脑组织含水量、血脑屏障通透性指标伊文思蓝(EB)含量均明显降低[神经功能评分(分):1.62±0.62 比 2.23±0.58,脑含水量:(77.7±0.49)% 比 (79.9±0.04)%,EB 含量(μg/L):490.50±100.79 比 1 966.20±94.81,均 $P<0.05$];脑组织病理学观察显示:安宫牛黄丸能减轻血肿周围脑组织的病理损伤,修复血脑屏障,减轻脑水肿;蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测结果显示,安宫牛黄丸可抑制脑组织中 NF- κ B p65、TNFR1 和 TNF- α 的蛋白表达[NF- κ B p65 蛋白表达(NF- κ B p65/ β -actin):2.27±0.52 比 5.40±0.26, TNFR1 蛋白表达(TNFR1/ β -actin):1.49±0.33 比 2.52±0.04, TNF- α 蛋白表达(TNF- α / β -actin):1.40±0.13 比 2.29±0.18,均 $P<0.05$],促进 I κ B α 的蛋白表达(I κ B α / β -actin:0.78±0.02 比 0.32±0.00, $P<0.05$)。**结论** 安宫牛黄丸可能通过抑制 TNFR1 的表达,促进 I κ B α 的表达来调控 TNF- α /NF- κ B 信号通路,发挥神经保护的作用。

【关键词】 安宫牛黄丸; 脑出血; 网络药理学; 肿瘤坏死因子- α ; 核转录因子- κ B; 核转录因子- κ B 抑制因子- α ; 肿瘤坏死因子受体 1

基金项目:河南省中医药科研专项(2024ZY2090)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.03.008

Investigating the mechanism of action of Angong Niu Huang pill on neurological function in rats with spontaneous intracerebral hemorrhage based on TNF- α /NF- κ B signaling pathway

Wu Jingqiang¹, Fan Wenjun¹, Cao Yong², Xie Lei², Du Kang², Tai Lunwei¹, Zheng Huijun²

¹The Second Clinical Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan, China; ²Department of Neurosurgery, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine), Zhengzhou 450000, Henan, China

Corresponding author: Zheng Huijun, Email: zhenghuijunvip@163.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of Angong Niu Huang pill on the neurological function of rats with spontaneous intracerebral hemorrhage based on the tumor necrosis factor- α /nuclear factor- κ B (TNF- α /NF- κ B) signaling pathway combined with network pharmacology. **Methods** The targets for treatment of intracerebral hemorrhage with Angong Niu Huang pill were obtained using the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), High-Throughput Experiment and Reference-guided Database of Traditional Chinese Medicine (HERB). Key targets were screened for Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis and molecular docking. Then, rats were randomly divided into normal control group, model group, Angong Niu Huang pill group (administered by gavage at 270 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and the Western medicine group (intraperitoneal injection of 4 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹ + furosemide 1.8 mg·kg⁻¹·d⁻¹), the dosage administered was the equivalent dose ratio calculated based on the body surface area for humans and animals. The intracerebral hemorrhage model was replicated by the autologous heart blood caudate nucleus injection method. After modeling, the neurological function behavior scores, brain tissue water content, pathological changes of brain tissue, blood-brain

barrier permeability, and protein expression levels of NF- κ B p65, tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1), inhibitor NF- κ B α (I κ B α) and TNF- α in brain tissue of each group were observed. **Results** A total of 216 intersection genes were selected. The results of GO enrichment analysis and KEGG pathway annotation analysis predicted that the TNF- α /NF- κ B inflammatory signaling pathway was one of the main regulatory pathways. The animal experiment results showed that at 72 hours after modeling, compared with the model group, the neurological function score, brain tissue water content, and blood-brain barrier permeability index Evans blue (EB) content of the Angong Niu Huang pill group were significantly decreased [neurological function score: 1.62 ± 0.62 vs. 2.23 ± 0.58 , brain water content: $(77.7 \pm 0.49)\%$ vs. $(79.9 \pm 0.04)\%$, EB content ($\mu\text{g/L}$): 490.50 ± 100.79 vs. $1\,966.20 \pm 94.81$, all $P < 0.05$]; the pathological observation of brain tissue showed that Angong Niu Huang pill could reduce the pathological damage of brain tissue around the hematoma, repair the blood-brain barrier, and alleviate brain edema; the Western blotting results showed that Angong Niu Huang pill could inhibit the protein expression of TNF- α , TNFR1, and NF- κ B p65 in brain tissue [NF- κ B p65 protein expression (NF- κ B p65/ β -actin): 2.27 ± 0.52 vs. 5.40 ± 0.26 ; TNFR1 protein expression (TNFR1/ β -actin): 1.49 ± 0.33 vs. 2.52 ± 0.04 , TNF- α protein expression (TNF- α / β -actin): 1.40 ± 0.13 vs. 2.29 ± 0.18 , all $P < 0.05$], promote the protein expression of I κ B- α (I κ B- α / β -actin): 0.78 ± 0.02 vs. 0.32 ± 0.00 , $P < 0.05$). **Conclusion** Angong Niu Huang pill may regulate the TNF- α /NF- κ B signaling pathway by inhibiting the expression of TNFR1 and promoting the expression of I κ B- α , exerting neuroprotective effects.

【Key words】 Angong Niu Huang pill; Intracerebral hemorrhage; Network pharmacology; Tumor necrosis factor- α ; Nuclear factor- κ B; Inhibitor nuclear factor- κ B α ; Tumor necrosis factor receptor 1

Fund program: Special Project of Traditional Chinese Medicine Scientific Research in Henan Province (2024ZY2090)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.03.008

脑出血是卒中最严重的形式之一,具有发病率和病死率及致残率高等特点,到目前为止,还没有明显、稳定、有针对性的防治方案,西医治疗急性脑出血主要采取外科手术等对症支持手段,但外科手术治疗风险大,并发症多,并不能显著提高患者的生活质量^[1-2]。多项研究显示,抑制炎症反应是治疗脑出血潜在的方向^[3-4]。安宫牛黄丸有清热解毒、镇惊开窍的作用。现有研究表明,安宫牛黄丸辅助治疗脑出血效果良好,可提高临床疗效,改善患者日常生活活动能力和神经功能缺损症状,减轻继发性损伤,降低氧化应激,且安全性较高^[5]。本研究借助网络药理学方法筛选出安宫牛黄丸治疗脑出血的有效成分、靶点蛋白、靶点基因、作用通路等,并通过动物与分子实验进行验证,旨在为临床应用安宫牛黄丸治疗脑出血提供理论依据。

1 网络药理学

1.1 安宫牛黄丸中药成分及简化分子线性输入规范 (simplified molecular input line entry system, SMILES) 的获取:通过中药系统药理学数据库分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)、中药高通量实验和参考数据库 (High-Throughput Experiment and Reference-guided Database of Traditional Chinese Medicine, HERB) 获取成份及 SMILES 号;再借助 SwissADME 在线平台进行活性成分的验证及筛选,以胃肠道吸收得分为“高 (high)”,类药性 (drug-likeness, DL) 至少通过 2 个“是”,设定口服生物利

用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, DL ≥ 0.18 , 血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 通透性 ≥ 0.3 进行筛选。将筛选出化合物的 Canonical SMILES 输入 SwissADME 预测靶点数据库中预测各化学成分的作用靶点,利用通用蛋白质资源 (Universal Protein Resource, UniProt) 数据库对预测出的靶点进行校正,剔除非人源基因。

1.2 脑出血疾病靶点的获取:以“intracerebral hemorrhage”“cerebral haemorrhage”为关键词,在基因卡片 (Gene Cards Database, GeneCards) 数据库、人类孟德尔遗传在线 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 数据库、药物银行 (DrugBank) 数据库中检索,再利用 UniProt 数据库进行标准化。

1.3 可视化网络图的获取:通过韦恩图绘制在线平台进行安宫牛黄丸治疗自发性脑出血的作用靶点交集整合;将交集靶点导入蛋白互作网络 (Protein-Protein Interaction, PPI) 分析数据库 (Search Tool for the Retrieval of Interaction Gene/Proteins, STRING) 选择“人类 (Homo sapiens)”隐藏游离靶点,将获得的 PPI 数据导入软件 Cytoscape 3.10.2 进行可视化分析,选择插件 Centiscape 2.2 中的“度中心性 (degree)”“接近中心性 (closeness)”“中介中心性 (betweenness)”筛选关键靶点,获取核心靶点;将安宫牛黄丸治疗自发性脑出血的核心靶点导入注释可视化和集成发现数据库 (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, DAVID)、基因本体论 (Gene Ontology, GO) 和京都基因与基因组

百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)进行富集分析。

1.4 分子对接:借助有机小分子生物活性数据库 PubChen 下载关键成分配体 3D 分子结构,再从结构生物信息学研究合作组织蛋白质数据库(Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank, RCSB PDB)中下载核心靶点蛋白质结构构建分子对接。

2 材料与方法

2.1 实验动物:选择 SPF 级 SD 成年雄性大鼠 60 只,体质量 250~300g,购自斯贝福(北京)生物技术科技有限公司,动物许可证编号:SCXK(京)2024-0001。大鼠适应环境恒温饲养 7 d(12 h 昼夜交替),饲养期间自由进食及饮水。动物饲养于河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)中心实验室动物中心。

2.2 研究分组及脑出血模型的构建:将大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、安宫牛黄丸组(以 $270 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃给药)和西药组(腹腔注射甘露醇 $4500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ + 呋塞米 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[6](参考《药理实验方法学》中人和动物按体表面积折算的等效剂量比值)。除正常对照组外,其余组通过自体心脏血尾状核注射法复制脑出血动物模型:腹腔注射 4% 戊巴比妥钠($8 \mu\text{L/g}$)进行麻醉,麻醉成功后,于前囟后方 1.5 mm、中线向右旁开 3.5 mm 定位,垂直于钻孔进针深 5.5 mm,匀速缓慢注射 $50 \mu\text{L}$ 自体心脏血,制模后 72 h 取材。

2.3 伦理学:本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并由河南中医药大学第二附属医院动物伦理和福利委员会批准(审批号: PZ-HNSZYY-2024-003)。

2.4 检测指标及方法

2.4.1 大鼠神经功能评价:制模后待大鼠苏醒恢复自由活动,采用 Zea-longa 评分评价大鼠的神经功能^[7],评分 1~3 分为模型制备成功,入组进行后续实验。

2.4.2 脑组织含水量测定:制模后 72 h,每组随机取 6 只大鼠麻醉后断头取脑,完全去除脑干及小脑后称湿质量;再置于 80°C 电烘箱烘烤 72 h 后称干质量,然后计算脑组织含水量[脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量 $\times 100\%$]。

2.4.3 BBB 通透性测定:制模后 72 h,每组随机取 6 只大鼠,经尾静脉注射 2% 伊文思蓝(evans blue,

EB)溶液($10 \mu\text{L/g}$),4 h 后,麻醉状态下经心脏灌注 0.9% 氯化钠注射液后取脑匀浆以 12000 r/min (离心半径 10 cm)离心取上清液,在酶标仪 620 nm 波长处检测吸光度(absorbance, A)值,代入 EB 与 A 的标准曲线计算样本上清液中 EB 的含量。

2.4.4 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察脑组织病理学改变:以血肿中心横切取脑组织,近额侧部分于 4% 多甲醛水溶液中固定 48 h 后脱水、浸蜡、包埋、切片并进行染色,于光镜下观察脑组织病理学改变。

2.4.5 采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)测定脑组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、核转录因子- κB p65(nuclear factor- κB p65, NF- κB p65)、NF- κB 抑制因子 α (inhibitor NF- κB α , I κB α)、肿瘤坏死因子受体 1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)的蛋白表达水平:将 2.4.4 剩余脑组织血肿周围组织匀浆、裂解、离心后取上清液,用二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid, BCA)定量后,将蛋白质样品 4 g/L 泳道加样,电泳分离后转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h。将 PVDF 膜加入一抗稀释液 TNF- α (1:1 000)、NF- κB p65 (1:2 000)、I κB α (1:3 000)、TNFR1 (1:2 000), 4°C 孵育摇床过夜,加入二抗室温孵育 1.5 h 后显影曝光,保存结果并使用 Image Lab 分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白灰度值与内参照 β 肌动蛋白(β -actin)灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.5 统计学方法:使用 SPSS 23.0 统计软件进行数据统计和分析,数据均符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学结果

3.1.1 安宫牛黄丸中药成分及 SMILES 号获取:安宫牛黄丸中药成分获取的基因靶点分别为牛黄 160 个,水牛角 7 个,麝香 394 个,黄连 422 个,黄芩 345 个,栀子 200 个,郁金 346 个,冰片 174 个,而雄黄、珍珠和朱砂属于无机化合物,并无明确的靶点。将现有基因靶点汇总,删除重复项后通过 UniProt 数据库规范化得到 779 个预测靶点。

3.1.2 脑出血疾病靶点获取:通过 GeneCards 数据

库获取脑出血疾病靶点 1 445 个, OMIM 数据库获取 113 个, DrugBank 在线数据库中获取 15 个, 汇总并去重, 通过 UniProt 数据库规范化, 得到疾病靶点 1 540 个。将安宫牛黄丸靶点与疾病靶点通过韦恩平台进行交集整合, 获得交集基因 216 个。

3.1.3 核心靶点获取: 将交集基因导入 STRING 数据库, 隐藏游离靶点, 获得 PPI 网络图。将 PPI 数据导入 Cytoscape 3.10.2 中软件中进行可视化分析, 筛选前: 216 个节点, 用插件 Centiscape 2.2 选择 “degree” “closeness” “betweenness” 筛选关键靶点, 筛选后获得 41 个核心靶点基因, 即筛选后: 41 个节点, 723 条边, 得到核心靶点网络图 (图 1; 表 1)。

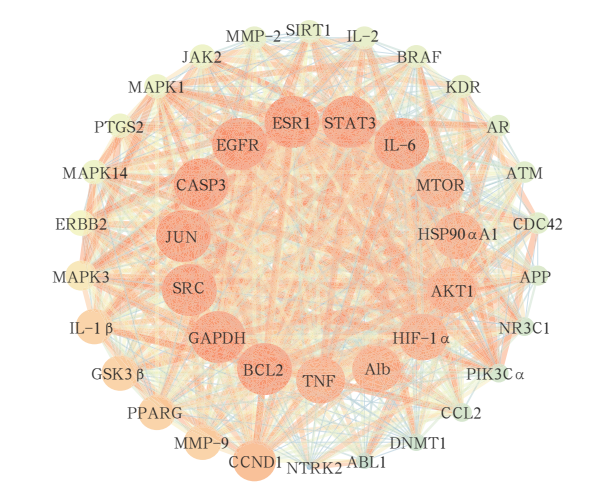


图 1 安宫牛黄丸治疗脑出血交集基因核心靶点网络图

3.1.4 GO 与 KEGG 富集分析: 将安宫牛黄丸治疗自发性脑出血的核心靶点导入 David 数据库进行 GO 富集分析 (图 2) 与 KEGG 通路分析 (图 3)。通过图 2 可知, 安宫牛黄丸治疗自发性脑出血主要涉及生物过程 (biological process, BP) 970 条、细胞组分 (cell component, CC) 117 条、分子功能 (molecular function, MF) 217 条; BP 主要为染色质重塑、信号转导、RNA 聚合酶 II 转录的正调控等; CC 主要为细胞膜、细胞质、包浆等; MF 主要为蛋白质结合、相同蛋白质结合、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合等。删除相关性不高的通路由图 3 所知, 安宫牛黄丸治疗脑出血主要通过调控磷酸肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、脂质与动脉粥样硬化、低氧诱导因子 -1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、TNF 信号通路等; 因此, 安宫牛黄丸治疗自发性脑出血是通过调控多成分 - 多靶点 - 多通路进行的, 其中 TNF- α / NF- κ B 炎症信号通路是主要调控通路之一。将药物活性成分、疾病对应的靶点及 TNF- α / NF- κ B 信号通路导入软件 Cytoscape 3.10.2 进行可视化分析, 构建安宫牛黄丸药物活性成分 - 脑出血 - TNF- α / NF- κ B 通路靶点网络图 (图 4)。

3.1.5 分子对接 (图 5; 表 2): 将前 6 位核心靶点

表 1 安宫牛黄丸治疗脑出血交集基因的 PPI 41 个核心靶点			
英文缩写	中文全称	英文缩写	中文全称
APP	淀粉样前体蛋白	HIF-1 α	低氧诱导因子 1 α
PIK3C α	磷脂酰肌醇 4, 5- 二磷酸 3- 激酶催化亚基 α	GAPDH	3- 磷酸甘油醛脱氢酶
TNF	肿瘤坏死因子	MAPK3	丝裂素活化蛋白激酶 3
IL-6	白细胞介素 -6	PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ
JAK2	Janus 激酶 2	SIRT1	细胞衰老相关蛋白 1
MTOR	哺乳动物雷帕霉素靶标	CDC42	细胞分裂周期 42
BRAF	B 型快速反应蛋白激酶	CASP3	胱天蛋白酶 3
EGFR	表皮生长因子受体	PTGS2	前列腺素内过氧化物合酶 2
IL-1 β	白细胞介素 -1 β	CCND1	细胞周期蛋白 D1
AKT1	丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 1	MAPK1	丝裂素活化蛋白激酶 1
MMP-9	基质金属蛋白酶 9	CCL2	趋化因子 2
ATM	共济失调毛细血管扩张症突变蛋白	IL-2	白细胞介素 -2
ESR1	雌激素受体 1	SRC	肉瘤病毒蛋白 Src
BCL2	B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2	JUN	染色体基因
STAT3	信号转导和转录激活因子 3	AR	雄激素受体
Alb	白蛋白	ABL1	非受体酪氨酸激酶
KDR	激酶插入域受体	HSP90 α A1	热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1
NTRK2	神经营养受体酪氨酸激酶 2	MAPK14	丝裂素活化蛋白激酶 14
DNMT1	DNA 甲基转移酶 1	GSK3 β	糖原合酶激酶 3 β
MMP-2	基质金属蛋白酶 2	NR3C1	核受体亚家族 3C 组成员 1
ERBR2	人表皮生长因子受体 2		

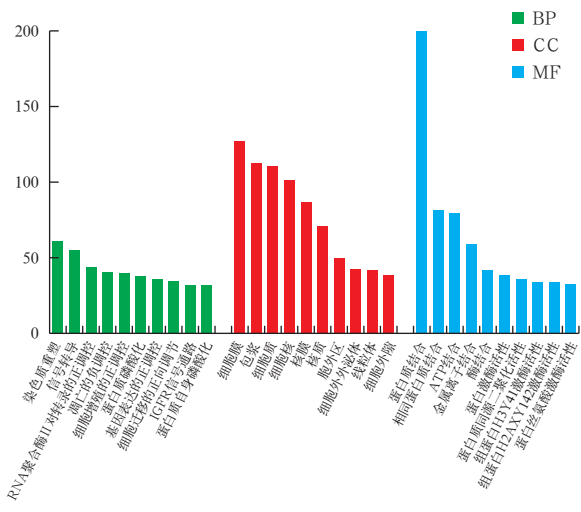


图2 安宫牛黄丸治疗脑出血核心靶点前10条通路GO富集分析

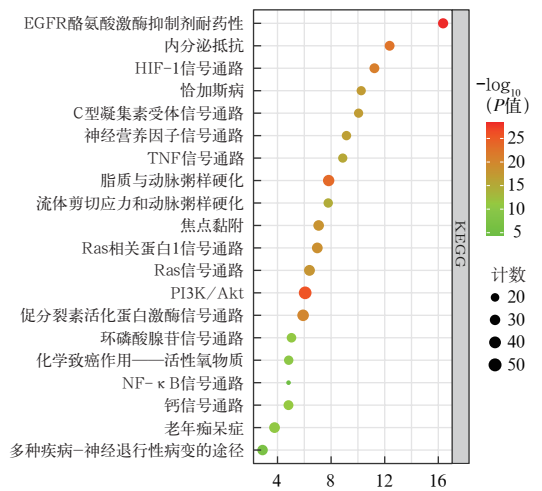
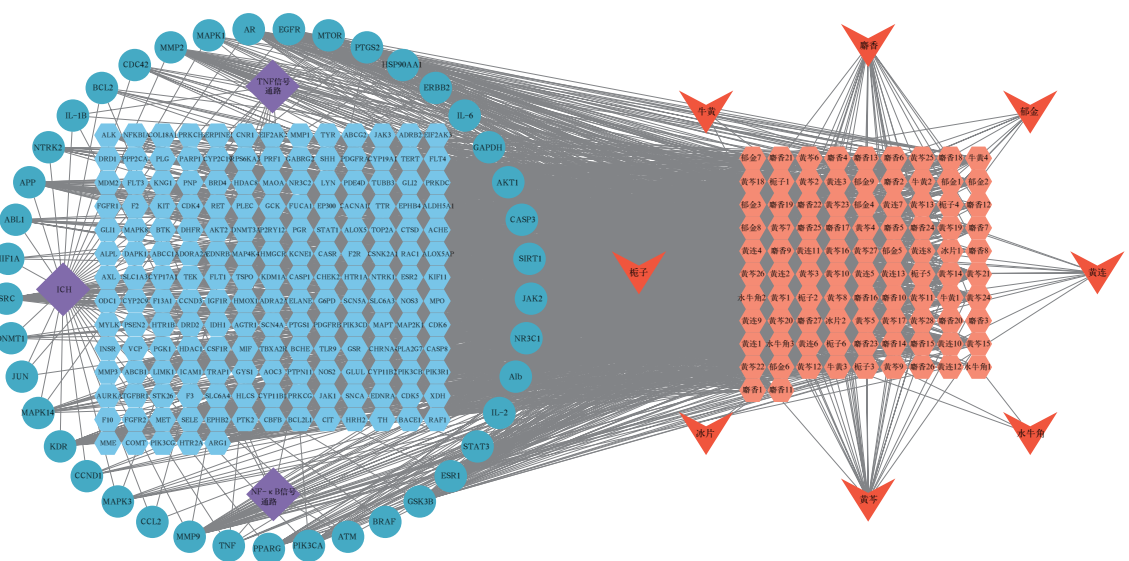
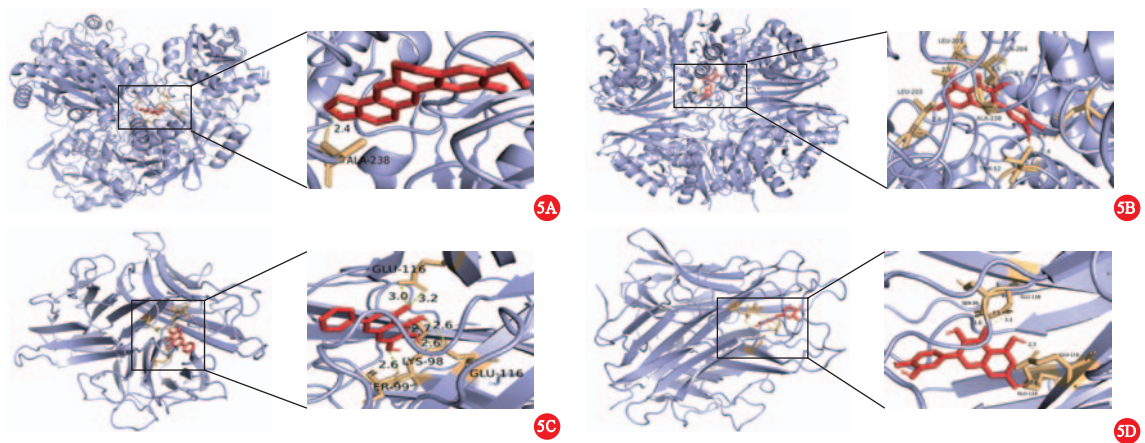


图3 安宫牛黄丸治疗脑出血核心靶点前20条通路KEGG富集分析



注：左侧靶点同PPI,右侧为中药成分

图4 安宫牛黄丸-脑出血-TNF-α/NF-κB通路靶点网络图



注：A为GAPDH与表小檗碱,B为GAPDH与槲皮素,C为TNF-α与黄芩素,D为TNF-α与槲皮素；ALA-238为丙氨酸-238, LEU-203为亮氨酸-203, GLN-204为谷氨酰胺-204, ASN-287为天冬酰胺-287, THR-52为苏氨酸-52, GLU-116为谷氨酸-116, LYS-98为赖氨酸-98, SER-99为色氨酸-99

图5 安宫牛黄丸的活性成分与核心靶点的分子对接

丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine kinase proteins 1, Akt1)、3 磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、白细胞介素 -6 (interleukin-6, IL-6)、TNF、EGFR、B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2 (B cell lymphoma-2, BCL2) 与对应的药物成分进行分子对接, 配体与受体结合所需要的结合能越低构象越稳定。所需结合能 ≤ -17.78 kJ/mol, 说明两者可以结合; ≤ -20.92 kJ/mol 说明结合良好; ≤ -19.29 kJ/mol 说明结合很强。其中 GAPDH 与表小檗碱、GAPDH 与槲皮素、TNF- α 与黄芩素、TNF- α 与槲皮素分子对接最稳定。

表 2 核心靶点与主要成分的结合能								
核心靶点	主要成分结合能 (kJ/mol)							
	表小檗碱	小檗碱	汉黄芩	黄芩素	麝香酮	槲皮素	山柰酚	
AKT1	-28.87	-30.12	-25.52	-28.45	-25.10	-26.36	-25.52	
GAPDH	-38.92	-32.22	-35.15	-35.56	-32.22	-36.40	-34.73	
IL-6	-30.96	-30.96	-26.78	-29.29	-25.10	-30.12	-28.45	
TNF	-27.61	-28.87	-32.64	-37.24	-31.38	-36.82	-35.98	
EGFR	-33.47	-31.38	-32.22	-32.22	-28.87	-33.05	-32.22	
BCL-2	-34.31	-33.47	-30.96	-33.89	-27.20	-33.05	-32.64	

3.2 各组大鼠神经功能评分比较 (表 3): 制模后 3 h, 与正常对照组比较, 模型组大鼠神经功能评分明显升高 ($P<0.05$), 说明制模成功; 制模后 72 h, 与模型组比较, 安宫牛黄丸组和西药组大鼠神经功能评分均明显降低 (均 $P<0.05$); 安宫牛黄丸组和西药组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.3 各组大鼠脑组织含水量比较 (表 4): 制模后 72 h, 与正常对照组比较, 模型组脑组织含水量明显增多 ($P<0.05$); 与模型组比较, 安宫牛黄丸组和西药组大鼠脑组织含水量明显减少 (均 $P<0.05$); 安宫牛黄丸组和西药组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠神经功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	动物数 (只)	神经功能评分 (分)	
		制模后 3 h	制模后 72 h
正常对照组	15	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	15	2.23 $\pm$ 0.58 ^a	2.23 $\pm$ 0.58 ^a
安宫牛黄丸组	15	2.23 $\pm$ 0.70 ^a	1.62 $\pm$ 0.62 ^b
西药组	15	2.15 $\pm$ 0.66 ^a	1.30 $\pm$ 0.46 ^b

注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

表 4 各组大鼠术后 72 h 脑组织含水量和 BBB 通透性比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	动物数 (只)	脑组织含水量 (%)	EB 含量 (μ g/L)
正常对照组	6	77.1 $\pm$ 0.02	132.40 $\pm$ 16.16
模型组	6	79.9 $\pm$ 0.04 ^a	1 966.20 $\pm$ 94.81 ^a
安宫牛黄丸组	6	77.7 $\pm$ 0.49 ^b	490.50 $\pm$ 100.79 ^b
西药组	6	78.0 $\pm$ 0.73 ^b	570.00 $\pm$ 98.66 ^b

注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

3.4 各组大鼠 BBB 通透性比较 (表 4): 制模后 72 h, 与正常对照组比较, 模型组大鼠脑组织内透过 BBB 的 EB 含量明显增多 ($P<0.05$), 说明脑出血破坏 BBB; 与模型组比较, 安宫牛黄丸组和西药组 EB 含量均较明显减少 (均 $P<0.05$), 说明两组药物治疗均能改善脑出血对 BBB 的破坏; 安宫牛黄丸组和西药组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.5 各组血肿周围脑组织病理学变化比较 (图 6): 光镜下显示: 正常对照组脑组织结构完整, 细胞形态饱满, 层次分明, 排列整齐有序, 细胞核染色质均匀分布, 核膜清晰, 细胞质丰富, 无坏死, 无明显炎症细胞浸润; 模型组细胞排列杂乱无序, 大量炎症细胞浸润, 部分细胞核固缩、裂解, 细胞质可见异常颗粒, 细胞间隙水中明显; 安宫牛黄丸组和西药组炎症细胞浸润减少, 细胞排列相对有序, 细胞间隙水肿减轻, 异常细胞减少。

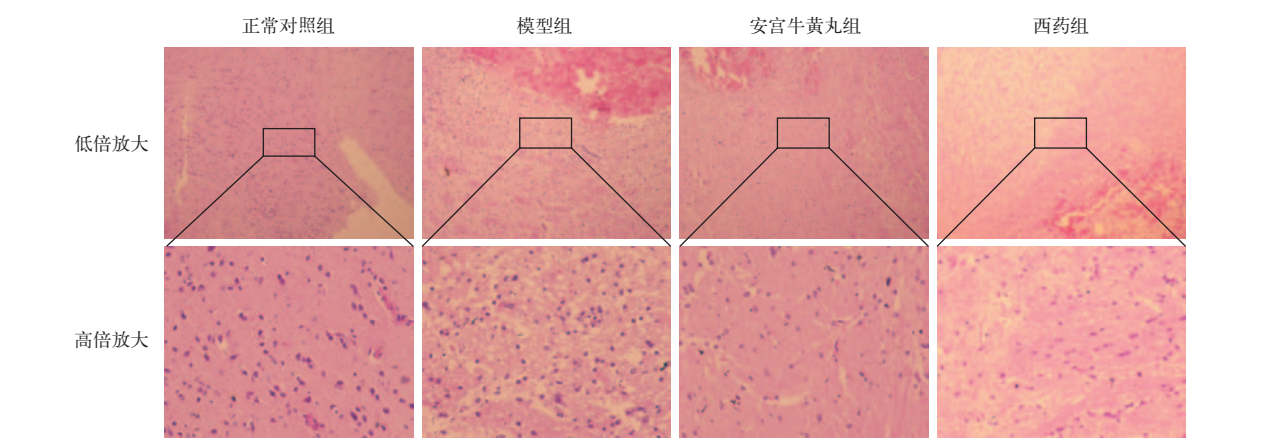


图 6 各组大鼠血肿周围脑组织病理学结果 HE 染色

3.6 各组大鼠脑组织 NF- κ B p65、TNFR1、I κ B α 、TNF- α 的蛋白表达水平比较(表 5; 图 7): 制模后 72 h, 与正常对照组比较, 模型组 NF- κ B p65、TNFR1、TNF- α 的蛋白表达水平均明显增多, I κ B α 的蛋白表达水平明显减少(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 安宫牛黄丸组和西药组 NF- κ B p65、TNFR1、TNF- α 的蛋白表达水平均明显减少, I κ B α 的蛋白表达水平明显增多(均 $P < 0.05$); 安宫牛黄丸组与西药组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 5 各组大鼠血肿周围脑组织中 NF- κ B p65、TNFR1、I κ B α 、TNF- α 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	NF- κ B p65 蛋白表达 (NF- κ B p65/ β -actin)	TNFR1 蛋白表达 (TNFR1/ β -actin)
正常对照组	3	1.00 $\pm$ 0.29	1.00 $\pm$ 0.05
模型组	3	5.40 $\pm$ 0.26 ^a	2.52 $\pm$ 0.04 ^a
安宫牛黄丸组	3	2.27 $\pm$ 0.52 ^b	1.49 $\pm$ 0.33 ^b
西药组	3	3.46 $\pm$ 1.01 ^b	1.64 $\pm$ 0.425 ^b

组别	动物数 (只)	I κ B α 蛋白表达 (I κ B α / β -actin)	TNF- α 蛋白表达 (TNF- α / β -actin)
正常对照组	3	1.00 $\pm$ 0.17	1.23 $\pm$ 0.42
模型组	3	0.32 $\pm$ 0.00 ^a	2.29 $\pm$ 0.18 ^a
安宫牛黄丸组	3	0.78 $\pm$ 0.02 ^b	1.40 $\pm$ 0.13 ^b
西药组	3	0.88 $\pm$ 0.07 ^b	1.75 $\pm$ 0.18 ^b

注: 正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

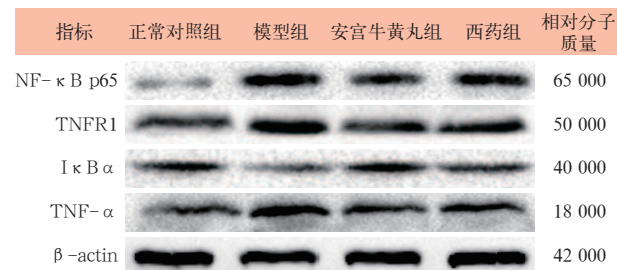


图 7 各组血肿周围脑组织中 NF- κ B p65、TNFR1、I κ B α 、TNF- α 的蛋白表达水平

4 讨论

随着人们生活水平的提高、社会竞争压力的增大和人口老龄化的加剧, 脑出血的发病率也有升高趋势^[8]。目前, 手术清除血肿减压是急性脑出血最主要的治疗方式, 然而, 目前尚无有效的治疗方案可明显改善患者预后。在《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018》安宫牛黄丸已被列为Ⅲ级推荐^[9], 由此可见, 安宫牛黄丸在脑卒中治疗中的效果已得到肯定。刘芬芬等^[5]通过 Meta 分析得出宫牛黄丸辅助治疗脑出血有较好的疗效, 可提高疗效, 改善患者日常生活。

安宫牛黄丸素有“温病三宝”之首的美誉, 在急危重症抢救方面疗效显著, 源自清代吴鞠通所著

《温病条辨》, 由牛黄、水牛角浓缩粉、麝香或人工麝香、珍珠、朱砂、雄黄、黄连、黄芩、栀子、郁金、冰片 11 味中药组成^[10]。其中, 牛黄、水牛角、麝香、雄黄、黄连、黄芩、郁金的主要成分均有抗炎作用^[11-16]; 朱砂有抗焦虑、镇静、抗氧化应激、改善脑损伤等作用^[17]; 雄黄有解热、抗炎、抗溃疡、抗惊厥的功效^[18]; 栀子对焦虑、抑郁、失眠和精神障碍均有益^[19]; 冰片不仅有抗炎、抗氧化等活性, 还可促进药物通过 BBB^[20], 而珍珠生物医学应用中的分子基础至今尚未完全阐明^[21]。本研究筛选出交集基因 216 个。GO 和 KEGG 富集分析结果显示, 安宫牛黄丸可能通过多基因、多靶点网络调控脑出血相关通路, 其中 TNF- α /NF- κ B 炎症信号是主要的调控通路之一。有证据表明, NF- κ B 在脑出血后 15 min 就被激活, 从而激活诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、TNF- α 、白细胞介素和环氧合酶-2 炎症细胞因子^[22]。

TNF- α 作为一种参与免疫、细胞凋亡的炎症因子, 以可溶性和跨膜形式存在, 跨膜型 TNF- α (transmembrane TNF- α , tmTNF- α) 需要经过 TNF- α -转换酶(TNF- α -converting enzyme, TACE) 处理、释放、加工后激活 TNFR1 和 TNFR2。TNFR1 在人体所有组织中表达, 是 TNF- α 的关键信号受体, TNF- α 与 TNFR1 连接后, TNFR1 相关死亡结构域蛋白(TNFR1-associated death domain protein, TRADD) 与 TNFR1 的细胞质死亡结构域(death domain, DD) 结合, 激活磷酸化依赖性 I κ B 激酶(I κ B kinase, I κ K) 复合物, 将 NF- κ B 从 I κ B α 中释放出来^[23]。TNFR2 作用通常有限, 被认为是由 tmTNF- α 激活的, 与 TNFR1 不同, TNFR2 缺乏 DD, 通过 NF- κ B、丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和下游激活的 Akt 起作用^[24]。因此, TNFR1 对于诱导细胞毒性和促炎 TNF- α 反应至关重要。

NF- κ B 作为转录因子家族中的一员, 通过经典和非经典途径发挥不同的激活作用机制。磷酸化依赖性 I κ Ks 的激活是经典 NF- κ B 激活的关键步骤, 抑制性 I κ B 蛋白(I κ B α 、I κ B β 和 I κ B γ) 被磷酸化并通过蛋白酶体进行泛素化依赖的降解, 释放 NF- κ B 并转位到细胞核并激活^[25], NF- κ B 被激活后, 导致 TNF- α 等炎症细胞因子的产生和释放, 释放的细胞因子可正反馈重新激活 NF- κ B, 导致炎症损伤进一步加重。NF- κ B 非经典通路的激活主要依赖

于 I κ B α , 而不是 I κ B β 和 I κ B γ ^[26]。因此, 无论是经典途径还是非经典途径, I κ B α 都可能参与其中。此外, NF- κ B 作为 Rel 家族的一种同源 (异源) 二聚体, 包括 5 个结构同源物: NF- κ B1 (p50)、NF- κ B2 (p52)、RelA (p65)、RelB 和 c-Rel, 其中, p65/p50 二聚体是众所周知的炎症反应诱导剂, 并在小胶质细胞中展现出较为完整的功能, 故检测 NF- κ B p65 可反映 NF- κ B 的表达水平^[27]。

本研究动物实验表明, 安宫牛黄丸可减轻大鼠脑出血后脑水肿, 改善 BBB 的破坏, 减少脑组织周围炎症细胞浸润; Western blotting 结果显示, 大鼠脑出血 72 h 后, 脑组织中炎症 TNF- α /NF- κ B 通路两端 TNF- α 、NF- κ B p65 的蛋白表达及通路内关键性蛋白 TNFR1 表达水平均增多, 抑制性蛋白 I κ B α 的蛋白表达减少; 安宫牛黄丸治疗 72 h 后, I κ B α 的蛋白表达增多, NF- κ B p65、TNFR1、TNF- α 的蛋白表达减少。以上结果相互佐证, 进一步说明安宫牛黄丸可能抑制关键性蛋白 TNFR1 的表达, 阻止 TNF- α 的活化, 促进抑制性蛋白 I κ B α 表达, 阻止 NF- κ B 的激活, 减少血肿周围脑组织内 TNF- α 的产生和释放, 减轻血肿对 BBB 的破坏, 实现对脑神经的保护作用。

本研究结果可以为安宫牛黄丸更好地应用于临床提供理论依据, 为脑出血的治疗提供新的方向, 但安宫牛黄丸作为复方制剂, 有效成份多样, 治疗脑出血可能是通过多通路、多靶点来实现的, 需进一步通过实验挖掘其潜在的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 罗流, 卢云. 超早期运用活血化癥法治疗急性脑出血的研究进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2022, 29 (6): 755-757. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2022.06.026.
- [2] 白丽丽, 冯庆国, 滕洪云, 等. 超早期肠内营养支持对中青年脑出血术后患者预后的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2024, 36 (9): 985-988. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240326-00283.
- [3] Wan YF, Holste KG, Hua Y, et al. Brain edema formation and therapy after intracerebral hemorrhage [J]. Neurobiol Dis, 2023, 176: 105948. DOI: 10.1016/j.nbd.2022.105948.
- [4] Ren HL, Han RR, Chen XM, et al. Potential therapeutic targets for intracerebral hemorrhage-associated inflammation: an update [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40 (9): 1752-1768. DOI: 10.1177/0271678X20923551.
- [5] 刘芬芬, 周亚博, 路永坤, 等. 安宫牛黄丸辅助治疗脑出血有效性与安全性的系统评价 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (20): 5428-5435. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20210316.501.
- [6] 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, 后插 1-后插 2 页. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2019.12.003.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84-91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- [8] Xue LY, Gaowa S, Wang W, et al. Ventilator-associated pneumonia in patients with cerebral hemorrhage: impact on mortality and microbiological characterization [J]. Med Clin (Barc), 2020, 154 (10): 400-405. DOI: 10.1016/j.medcli.2020.01.003.
- [9] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51 (9): 666-682. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2018.09.004.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [11] Rahaman MM, Rakib A, Mitra S, et al. The genus curcuma and inflammation: overview of the pharmacological perspectives [J]. Plants (Basel), 2020, 10 (1): 63. DOI: 10.3390/plants10010063.
- [12] Xu K, Deng BW, Jia TT, et al. A review of the bovis calculus's intervention mechanism and clinical application in ischemic stroke [J]. Front Pharmacol, 2025, 15: 1510779. DOI: 10.3389/fphar.2024.1510779.
- [13] Wu WX, Tang JY, Bao WL, et al. Thiols-rich peptide from water buffalo horn keratin alleviates oxidative stress and inflammation through co-regulating Nrf2/Hmox-1 and NF- κ B signaling pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 223: 131-143. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.07.023.
- [14] Liu K, Xie L, Deng M, et al. Zoology, chemical composition, pharmacology, quality control and future perspective of Musk (Moschus): a review [J]. Chin Med, 2021, 16 (1): 46. DOI: 10.1186/s13020-021-00457-8.
- [15] Meng GB, Li PY, Du XM, et al. Berberine alleviates ulcerative colitis by inhibiting inflammation through targeting IRGM1 [J]. Phytomedicine, 2024, 133: 155909. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155909.
- [16] Liao HF, Ye J, Gao LL, et al. The main bioactive compounds of scutellaria baicalensis georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: a comprehensive review [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110917. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110917.
- [17] 周昕睿, 王旗, 杨晓达. 朱砂的药理及毒理机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (22): 2843-2847. DOI: 10.3321/j.issn:1001-5302.2009.22.002.
- [18] Wu JZ, Shao YB, Liu JL, et al. The medicinal use of realgar (As₂S₃) and its recent development as an anticancer agent [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135 (3): 595-602. DOI: 10.1016/j.jep.2011.03.071.
- [19] Liu D, Wang QF, Li Y, et al. Fructus gardeniae ameliorates anxiety-like behaviors induced by sleep deprivation via regulating hippocampal metabolomics and gut microbiota [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1167312. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1167312.
- [20] Liu SY, Long Y, Yu S, et al. Borneol in cardio-cerebrovascular diseases: pharmacological actions, mechanisms, and therapeutics [J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105627. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105627.
- [21] Luo W, Chen Y, Chen C, et al. The proteomics of the freshwater pearl powder: insights from biomineralization to biomedical application [J]. J Proteomics, 2022, 265: 104665. DOI: 10.1016/j.jprot.2022.104665.
- [22] Zhao XR, Zhang YJ, Strong R, et al. Distinct patterns of intracerebral hemorrhage-induced alterations in NF- κ B subunit, iNOS, and COX-2 expression [J]. J Neurochem, 2007, 101 (3): 652-663. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04414.x.
- [23] Udawatte DJ, Rothman AL. Viral suppression of RIPK1-mediated signaling [J]. mBio, 2021, 12 (4): e0172321. DOI: 10.1128/mBio.01723-21.
- [24] Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (5): 2719. DOI: 10.3390/ijms22052719.
- [25] Howell JA, Bidwell GL 3rd. Targeting the NF- κ B pathway for therapy of ischemic stroke [J]. Ther Deliv, 2020, 11 (2): 113-123. DOI: 10.4155/tde-2019-0075.
- [26] Wang YJ, Wang L, Wen X, et al. NF- κ B signaling in skin aging [J]. Mech Ageing Dev, 2019, 184: 111160. DOI: 10.1016/j.mad.2019.111160.
- [27] Rojo AI, McBean G, Cindric M, et al. Redox control of microglial function: molecular mechanisms and functional significance [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21 (12): 1766-801. DOI: 10.1089/ars.2013.5745.

(收稿日期: 2025-04-11)

(责任编辑: 邸美仙)