

·实验研究·

本文引用:张 瑛,高晓峰,郭 纯,张宇星,周德生. 基于 PPAR $\gamma$  信号通路探讨安脑平冲方极化 M2 型小胶质细胞减轻脑出血后神经炎症的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(3): 405-412.

## 基于 PPAR $\gamma$ 信号通路探讨安脑平冲方极化 M2 型小胶质细胞减轻脑出血后神经炎症的作用机制

张 瑛<sup>1</sup>,高晓峰<sup>2</sup>,郭 纯<sup>3</sup>,张宇星<sup>1</sup>,周德生<sup>2\*</sup>

1.湖南中医药大学研究生院,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院脑病一科,湖南 长沙 410007;  
3.湖南中医药大学第一附属医院医学创新中心,湖南 长沙 410007

〔摘要〕目的 探讨安脑平冲方极化 M2 型小胶质细胞减轻脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)后神经炎症的作用机制。

方法 采用氯化血红素干预 BV2 细胞模拟体外 ICH 模型。第一部分实验分 3 组[对照组、模型组、安脑平冲方含药血清组(A-HYXQ 组)], 对照组为正常生长的 BV2 细胞, 模型组及 A-HYXQ 组采用氯化血红素干预 BV2 细胞,24 h 后模型组给予 10%空白血清干预,A-HYXQ 组给予 10% A-HYXQ 干预。采用免疫荧光和 Western blot 法检测 Ym-1、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)表达量。第二部分实验分为对照组、模型组、A-HYXQ 组、A-HYXQ+GW9662 组,对照组、模型组、A-HYXQ 组处理同第一部分实验,A-HYXQ+GW9662 组在给予 10% A-HYXQ 前 1 h 给予 10  $\mu$ mol/L 的 GW9662,采用免疫荧光、Western blot 和 qRT-PCR 法检测过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferators-activated receptors  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )、精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)和白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)的表达量;采用 Western blot、qRT-PCR 和 ELISA 法检测白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )。结果 第一部分:与对照组比较,模型组 Ym-1 和 IL-10 平均荧光强度和蛋白表达量明显下降( $P<0.05$ ),而 iNOS 和 IL-6 平均荧光强度和蛋白表达量明显上升( $P<0.05$ );与模型组相比,A-HYXQ 组 Ym-1 和 IL-10 平均荧光强度和蛋白表达量明显上升( $P<0.05$ ),而 iNOS 和 IL-6 平均荧光强度和蛋白表达量明显下降( $P<0.05$ )。第二部分:与对照组比较,模型组 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 和 IL-4 平均荧光强度、蛋白及 mRNA 表达量明显下降( $P<0.05$ ),而 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白和上清液表达量明显上升( $P<0.05$ );与模型组相比,A-HYXQ 组 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 和 IL-4 平均荧光强度、蛋白及 mRNA 表达量明显上升( $P<0.05$ ),而 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白和上清液表达量明显下降( $P<0.05$ );与 A-HYXQ 组相比,A-HYXQ+GW9662 组 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 和 IL-4 平均荧光强度、蛋白及 mRNA 表达量下降( $P<0.05$ ),而 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  蛋白和上清液表达量上升( $P<0.05$ )。结论 安脑平冲方可能通过激活 PPAR $\gamma$  信号通路极化 M2 型小胶质细胞,减轻氯化血红素干预 BV2 细胞的炎症反应。

〔关键词〕脑出血;神经炎症;小胶质细胞;过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ ;安脑平冲方

〔中图分类号〕R285.5 〔文献标志码〕A 〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.03.007

### Mechanism of Annao Pingchong Formula on polarization of M2 microglia in alleviating neuroinflammation after intracerebral hemorrhage based on PPAR $\gamma$ signaling pathway

ZHANG Ying<sup>1</sup>, GAO Xiaofeng<sup>2</sup>, GUO Chun<sup>3</sup>, ZHANG Yuxing<sup>1</sup>, ZHOU Desheng<sup>2\*</sup>

1. Graduate School of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Department of Encephalopathology (I), The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Center for Medical

〔收稿日期〕2022-07-07

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81874463);中医内科重大疾病防治研究与转化教育部重点实验室开放基金(ZYNK201609);湖南省科技厅科技创新平台与人才计划(2017SK4005);湖南省重点研发计划(2020SK2092)。

〔第一作者〕张 瑛,女,博士研究生,研究方向:中医药防治脑血管病。

〔通信作者〕\*周德生,男,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,E-mail:2478020529@qq.com。

*Innovation, The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China*

[**Abstract**] **Objective** To explore the mechanism of Annao Pingchong Formula on polarization of M2 microglia in alleviating neuroinflammation after intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** The ICH model in vitro was simulated by the intervention of hemin on BV2 cells. The first part of the experiment (Part I) was divided into three groups: control group, model group, and serum containing Annao Pingchong Formula group (A-HYXQ group). The control group was made up of BV2 cells with normal growth. The model group and A-HYXQ group were treated with hemin. Then after 24 h, the model group was treated with 10% blank serum, while the A-HYXQ group was treated with 10% A-HYXQ. Immunofluorescence and Western blot were used to detect the expression of Ym-1, interleukin-10 (IL-10), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and interleukin-6 (IL-6). The second part (Part II) of the experiment was divided into control group, model group, A-HYXQ group and A-HYXQ+GW9662 group. The treatment of the control, model and A-HYXQ groups was the same as that of Part I. The A-HYXQ+GW9662 group was given GW9662 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1 h before administration of 10% A-HYXQ. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ), arginase-1 (Arg-1) and interleukin-4 (IL-4) was detected by immunofluorescence, Western blot and qRT-PCR, while tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were detected by Western blot, qRT-PCR and ELISA. **Results** Part I: Compared with the control group, the average fluorescence intensity and protein expression of Ym-1 and IL-10 in the model group were reduced significantly ( $P<0.05$ ), while those of iNOS and IL-6 were significantly higher ( $P<0.05$ ); compared with the model group, the average fluorescence intensity and protein expression of Ym-1 and IL-10 in the A-HYXQ group were significantly higher ( $P<0.05$ ), while those of iNOS and IL-6 were reduced significantly ( $P<0.05$ ). Part II: Compared with the control group, the average fluorescence intensity, protein and mRNA expression of PPAR $\gamma$ , Arg-1 and IL-4 in the model group were significantly lower ( $P<0.05$ ), however, the protein expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and the supernatant expression were significantly higher ( $P<0.05$ ); compared with the model group, the average fluorescence intensity, protein and mRNA expression of PPAR $\gamma$ , Arg-1 and IL-4 in the A-HYXQ group were significantly higher ( $P<0.05$ ), while the protein expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and the supernatant expression were reduced significantly ( $P<0.05$ ); compared with the A-HYXQ group, the average fluorescence intensity, protein and mRNA expression of PPAR $\gamma$ , Arg-1 and IL-4 in the A-HYXQ+GW9662 group were reduced significantly ( $P<0.05$ ), while the protein expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and the supernatant expression were significantly higher ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Annao Pingchong Formula may activate PPAR $\gamma$  signaling pathway to polarize M2-microglia, thus reducing the inflammatory reaction of BV2 cells after hemin intervention.

[**Keywords**] intracerebral hemorrhage; neuroinflammation; microglia; peroxisome proliferators-activated receptors- $\gamma$ ; Annao Pingchong Formula

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)指非创伤性颅内血管破裂,导致血液在脑实质内聚集,具有高发病率、高死亡率、高致残率的特点,给社会和家庭造成沉重的负担<sup>[1-4]</sup>。ICH后的脑损伤是通过血肿对周围组织的直接压迫效应产生的原发性损伤和血肿及其代谢产物产生的继发性损伤,包括脑水肿、炎症和血液裂解产物产生的生化毒性<sup>[5]</sup>。近年来,随着微创技术及术后并发症管理技术的不断提高,ICH后的病死率有所下降,但是并未改善ICH患者的长期神经功能预后<sup>[6]</sup>。因此,需重视干预ICH后的继发性损伤。

神经炎症是ICH后继发性损伤的主要驱动环节<sup>[7]</sup>,其在ICH后数小时内即可发生,并可持续数周<sup>[8]</sup>。活化的小胶质细胞是细胞因子、趋化因子、前列腺素和其他免疫调节分子的主要来源,所以,活化的小胶质细胞可加重ICH后继发性损伤,并参与随后的脑修复过程<sup>[9]</sup>。根据小胶质细胞对神经炎症的作用效

应,可分为M1型小胶质细胞(促炎/细胞毒性机制)和M2型小胶质细胞(抗炎/神经保护机制)<sup>[10]</sup>。调节小胶质细胞表型能促进ICH后血肿和水肿的吸收,减轻继发性脑损伤,促进脑组织修复<sup>[11-12]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )属于核受体超家族,在抑制神经炎症、抗氧化、延缓神经退行性变过程中均发挥着重要作用<sup>[13-14]</sup>。近年来,有研究表明,在ICH后通过激活PPAR $\gamma$ 可极化M2型小胶质细胞、加速血肿吸收和改善神经功能预后<sup>[15]</sup>。

ICH属于中医学“中风”的范畴。肝肾亏虚为本,冲气不敛,冲气随肝气上逆是其主要病因病机之一,镇肝息风、平冲降逆是临床治疗ICH的基本思路<sup>[16]</sup>。“玄府”为人体津液化生、输布、代谢提供终极通道和至微结构<sup>[17]</sup>,在脑内分布丰富,与血脑屏障有着密切相关性<sup>[18]</sup>。因此,调节玄府功能为中医治疗ICH的新思路。安脑平冲方是湖南中医药大学第一附属医

院脑病一科周德生教授团队依据 ICH 病因病机及玄府理论创制的治疗中风的科室协议方,已在临床安全使用十余年。课题组前期临床研究发现,安脑平冲方可减轻脑出血患者的脑水肿,有利于患者的神经功能康复<sup>[19]</sup>;实验研究也证实,安脑平冲方可减少 ICH 大鼠血清白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin, IL-1 $\beta$ )表达量<sup>[20]</sup>,改善 ICH 大鼠神经功能缺损,抑制 ICH 后炎症反应,保护神经功能<sup>[21]</sup>。但是安脑平冲方在 ICH 后通过调节小胶质细胞表型减轻神经炎症的作用机制尚未被研究。因此,本研究将脑玄府理论与神经炎症相结合,旨在探讨安脑平冲方含药血清(A-HYXQ)调节炎症的内在机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

健康清洁级雄性大鼠 36 只,体质量 180~220 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。本次动物试验获得湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(伦理审批号:ZYFY20210427)。大鼠放置于清洁级实验动物房饲养,温度 20~25 °C,湿度 45%~55%。

### 1.2 BV2 细胞

小鼠小胶质细胞系 BV2 细胞由湖南中医药大学中西医结合实验室细胞中心提供。

### 1.3 药物

安脑平冲方组成:生龙骨(先煎)30 g,生牡蛎(先煎)30 g,川牛膝 15 g,白蒺藜 12 g,钩藤(后下)12 g,泽泻 12 g,牡丹皮 12 g,栀子 12 g,黄芩 12 g,白芍 12 g,生大黄(后下)9 g,甘草 6 g。购于湖南中医药大学第一附属医院门诊中药房。经两次提取过滤及水浴浓缩后熬制成含生药 4.5 g/mL 的溶液,无菌玻璃瓶分装,贮存于 4 °C 冰箱备用。PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662 购买于美国 MedChemExpress 公司(批号:HY-16578)。

### 1.4 主要试剂

一抗 Ym-1、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、白细胞介素-6(interleukin, IL-6)(英国 abcam 公司,批号:ab192029、ab178945、ab233706); $\beta$ -actin、PPAR $\gamma$ 、精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)、白细胞介素-4(interleukin, IL-4)、白细胞介素-10(interleukin, IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin, IL-1 $\beta$ )(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:20536-1-AP、16643-1-AP、16001-1-AP、17590-

1-AP、60269-1-Ig、17590-1-AP、16806-1-AP);超纯总 RNA 提取试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司,批号:5003050);IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号:J2923-B、J3056-B);CCK-8 试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,批号:BS350A);氯化血红素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:16009-13-5);BV2 专用细胞培养基(武汉普诺赛生物有限公司,批号:CM-0493)。

### 1.5 主要仪器

超灵敏多色荧光分析仪(美国 ProteinSimple 公司,型号:FluorChem R);荧光定量 PCR 仪器(德国艾本德仪器有限公司,型号:Realplex2);多功能酶标仪(雷杜生命科学股份有限公司,型号:Enspire);激光扫描共聚焦显微镜(美国蔡司公司,型号:LSM800)。

## 2 方法

### 2.1 含药血清制备

健康清洁级雄性大鼠适应性喂养 1 周后连续 3 d 予以安脑平冲方灌胃,每日 2 次。末次给药后 1 h 腹主动脉采血,收集血清,空白血清采用相同动物,不给药同法收集血清,0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,56 °C 水浴灭活 30 min,分装于-20 °C 冰箱保存。

### 2.2 细胞培养

经复苏后,BV2 细胞添加 BV2 细胞专用培养基,将其放置在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的湿润培养箱中。

### 2.3 细胞增殖测定

根据 CCK-8 试剂盒说明书,将细胞按照 5000 个/孔铺板至 96 孔板,处理完毕后,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8,放置在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的湿润培养箱中 2 h 后,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光值。

### 2.4 模型建立及分组

利用氯化血红素干预 BV2 小胶质细胞模拟 ICH 体外模型<sup>[22]</sup>。实验第一部分分为 3 组,分别为对照组、模型组、安脑平冲方含药血清组(A-HYXQ 组);第二部分分为 4 组,分别为对照组、模型组、A-HYXQ 组、A-HYXQ+GW9662 组。细胞铺板至 6 孔板或 24 孔板,造模方法为 60  $\mu$ mol/L 的氯化血红素干预 BV2 小胶质细胞 24 h。对照组为正常生长的 BV2 细胞,模型组造模 24 h 后给予 10% 空白血清,A-HYXQ 组造模 24 h 后给予 10% A-HYXQ,A-HYXQ+GW9662 组造模 24 h 后,在给 10% A-HYXQ 前 1 h 给予 10  $\mu$ mol/L 的 GW9662。

### 2.5 免疫荧光

细胞铺板至 6 孔板,经干预后,予以 4% 多聚甲

醛固定,5% Triton X-100 通透,经山羊血清封闭后,放置湿盒中 4 °C 孵育一抗 Ym-1(1:200)、IL-10(1:300)、iNOS(1:250)、IL-6(1:100)、PPAR $\gamma$ (1:300)、Arg-1(1:200)、IL-4(1:300)过夜。第 2 天避光孵育对应二抗 Alexa Fluor® 647(1:500)、山羊抗小鼠 IgG FITC(1:400)50 min,滴加 DAPI 复染细胞核后,在激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。每张图片选取 3 个视野,每个视野选取 5 个细胞测量相应抗体的平均荧光强度。

## 2.6 Western blot 法

将细胞铺至 6 孔板,干预后,提取总蛋白,测定蛋白浓度,配制 10%分离胶,上样后进行电泳、转膜,用 5%脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 清洗 3 次,分别加入一抗 Ym-1(1:5000)、IL-10(1:10 000)、iNOS(1:1000)、IL-6(1:1000)、PPAR $\gamma$ (1:3000)、Arg-1(1:1000)、IL-4(1:2000)、TNF- $\alpha$ (1:1500)、IL-1 $\beta$ (1:1000)、 $\beta$ -actin(1:8000),经 4 °C 冰箱孵育过夜,第 2 天加入相应二抗山羊抗小鼠 IgG HRP(1:10 000)、山羊抗兔 IgG HRP(1:10 000),室温摇床孵育 1 h,最后进行显色曝光,用 Image J 软件分析条带灰度值。

## 2.7 qRT-PCR 法

根据试剂盒说明书从 6 孔板中分离纯化总 RNA,合成 cDNA 后,使用荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> 法计算各组相应的 mRNA 表达水平。引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成,详见表 1。

## 2.8 ELISA 法

细胞铺板至 6 孔板,经干预后,收集上清液 1 mL,经高速冷冻离心机 4 °C,3000 r/min 离心 10 min(离心半径 15 cm),留取上清液至-80 °C 保存,按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

## 2.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 对数据进行统计学分析。数据符合正态性和方差齐性时,采用 One-Way ANOVA 检验比较各组间差异,不符合则采用秩和检验, $P < 0.05$  提示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 造模及给药条件

3.1.1 氯化血红素对 BV2 细胞存活率的影响 选取 30、60、90  $\mu\text{mol/L}$  氯化血红素干预 BV2 细胞,结果显示,与 0  $\mu\text{mol/L}$  比较,30、60、90  $\mu\text{mol/L}$  氯化血红素 BV2 细胞存活率均降低( $P < 0.05$ )。考虑 90  $\mu\text{mol/L}$  氯化血红素细胞存活率过低,因此,选择 60  $\mu\text{mol/L}$  作为后续处理细胞的氯化血红素浓度。详见图 1A。

3.1.2 A-HYXQ 对细胞存活率的影响 与对照组相比,模型组、A-HYXQ 组(5%、10%、15%)细胞存活率下降( $P < 0.05$ );与模型组相比,A-HYXQ 组(10%、15%)细胞存活率明显上升( $P < 0.05$ );10%与 15% A-HYXQ 组细胞存活率差异无统计学差异( $P > 0.05$ )。因此,选择 10%浓度作为细胞后续处理的 A-HYXQ 浓度。详见图 1B。

3.1.3 GW9662 对 BV2 细胞存活率的影响 选取 5、10、15  $\mu\text{mol/L}$  的 GW9662,在加入 10% A-HYXQ 前 1 h 干预 BV2 细胞。结果显示,与 0  $\mu\text{mol/L}$  相比,10、15  $\mu\text{mol/L}$  的 GW9662 可明显减少 BV2 细胞存活率( $P < 0.05$ );10  $\mu\text{mol/L}$  与 15  $\mu\text{mol/L}$  GW9662 细胞存活率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。因此,选择 10  $\mu\text{mol/L}$  作为细胞后续处理的 GW9662 浓度。详见图 1C。

### 3.2 各组 Ym-1 和 IL-10 平均荧光强度及蛋白表达量比较

与对照组相比,模型组 Ym-1 和 IL-10 的平均荧光强度及蛋白表达量均明显下降( $P < 0.05$ );与模型组相比,A-HYXQ 组的 Ym-1 和 IL-10 的平均荧光强度及蛋白量均显著上升( $P < 0.05$ )。详见图 2—3。

### 3.3 各组 IL-6 和 iNOS 平均荧光强度及蛋白表达量比较

与对照组相比,模型组的 IL-6 和 iNOS 平均荧光强度及蛋白量均明显上升( $P < 0.05$ );与模型组相比,A-HYXQ 组的 IL-6 和 iNOS 的平均荧光强度及蛋白量均显著下降( $P < 0.05$ )。详见图 4—5。

表 1 引物序列

基因	正向序列	反向序列	长度/bp
$\beta$ -actin	GGCTGTATTCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	154
PPAR $\gamma$	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGCTCCACAGAGCTGATT	103
Arg-1	CATATCTGCCAAGGACATCG	ATTCCCAGCTTGTCCACTTC	120
IL-4	CACCTTGCTGTCAACCTGTT	CCTGCAGATGAGCTCGTTCT	246
TNF- $\alpha$	CGCTGAGTCAATCTGC	GGCTGGGTAGAGAATGGA	110
IL-1 $\beta$	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG	116

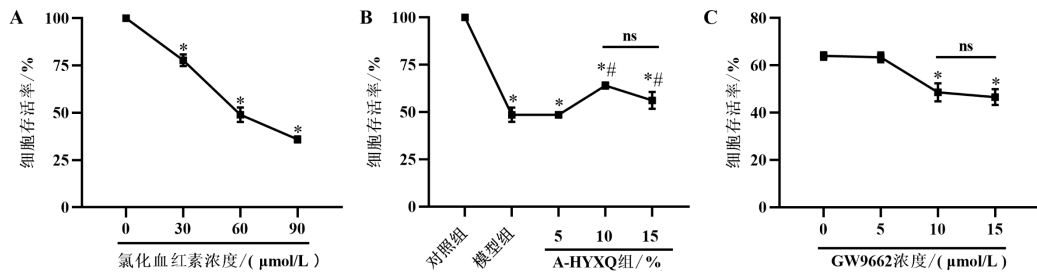


图1 建模及给药条件

注:A.氯化血红素对 BV2 细胞存活率的影响;与 0 μmol/L 比较,\* $P<0.05$ 。B. A-HYXQ 对 BV2 细胞存活率的影响;与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ 。C. GW9662 对 BV2 细胞存活率的影响;与 0 μmol/L 比较,\* $P<0.05$ 。

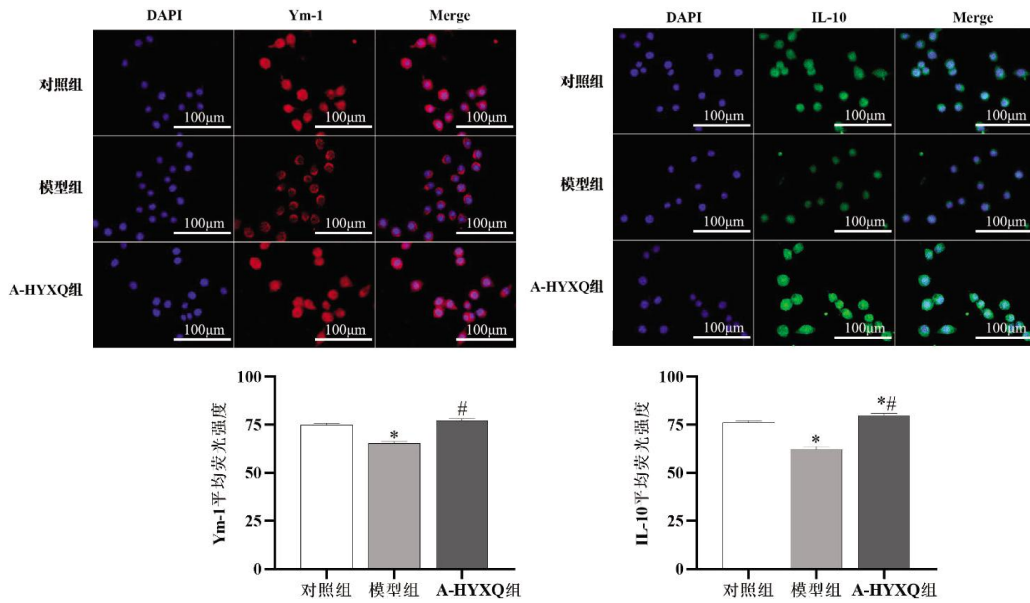


图2 各组 Ym-1 和 IL-10 的平均荧光强度

注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

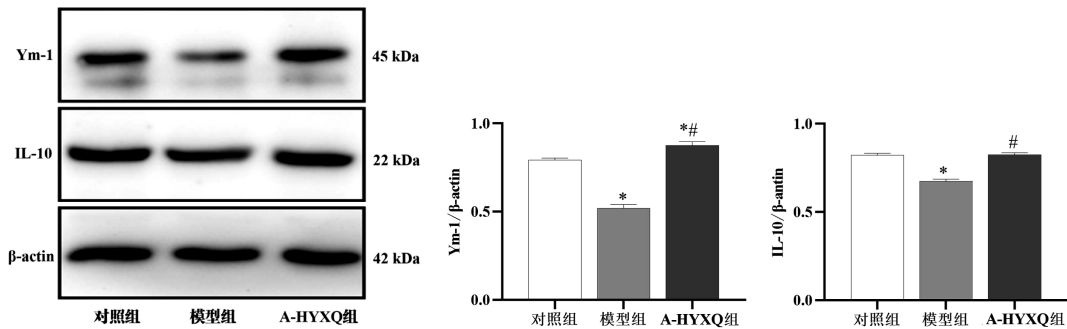


图3 各组 Ym-1 和 IL-10 蛋白表达量

注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

### 3.4 各组 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 和 IL-4 平均荧光强度、蛋白及 mRNA 表达量比较

与对照组相比,模型组 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 和 IL-4 的平均荧光强度、蛋白及 mRNA 表达量均明显下降 ( $P<0.05$ );与模型组相比,A-HYXQ 组 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 和 IL-4 的平均荧光强度、蛋白及 mRNA 表达量均显著上升 ( $P<0.05$ );与 A-HYXQ 组相比,A-HYXQ+GW9662 组 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 和 IL-4 平均荧光强度、蛋白及 mRNA 表达量下降 ( $P<0.05$ )。详见图 6—8。

### 3.5 各组 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 蛋白、mRNA、上清液含量比较

与对照组相比,模型组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白、mRNA、上清液含量均明显上升 ( $P<0.05$ );与模型组相比,A-HYXQ 组的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白、mRNA、上清液含量均明显下降 ( $P<0.05$ );与 A-HYXQ 组相比,A-HYXQ+GW9662 组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白、mRNA、上清液含量上升 ( $P<0.05$ )。详见图 9—11。

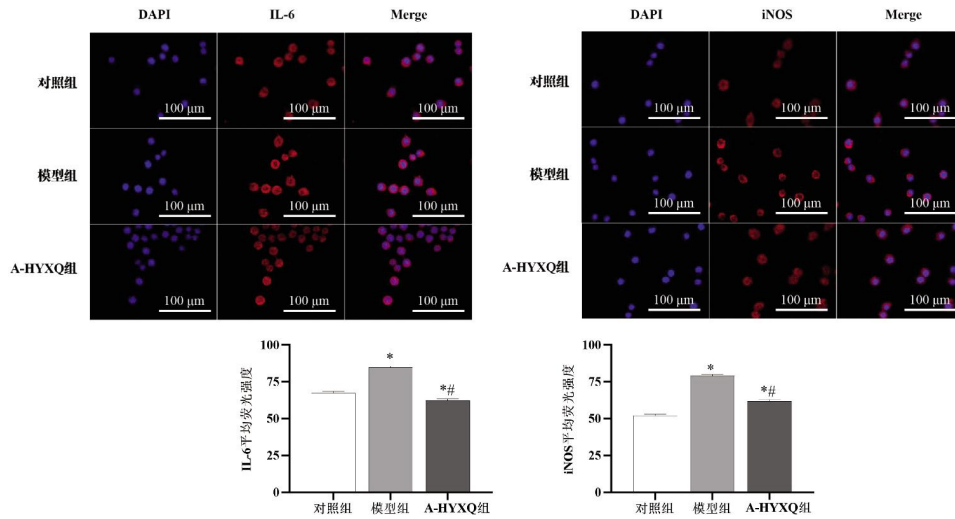


图 4 各组 IL-6 和 iNOS 平均荧光强度

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

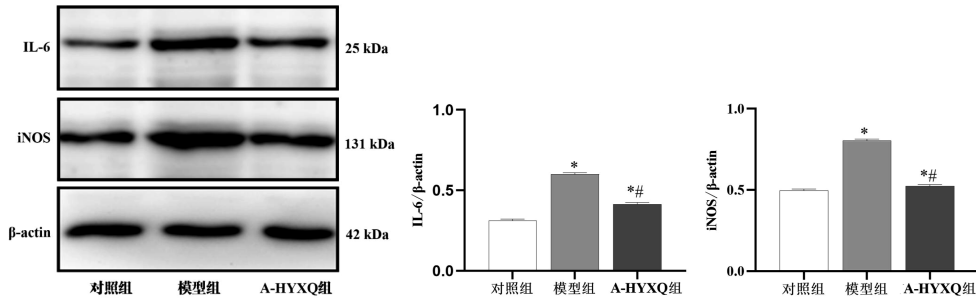


图 5 各组 IL-6 和 iNOS 蛋白表达量

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

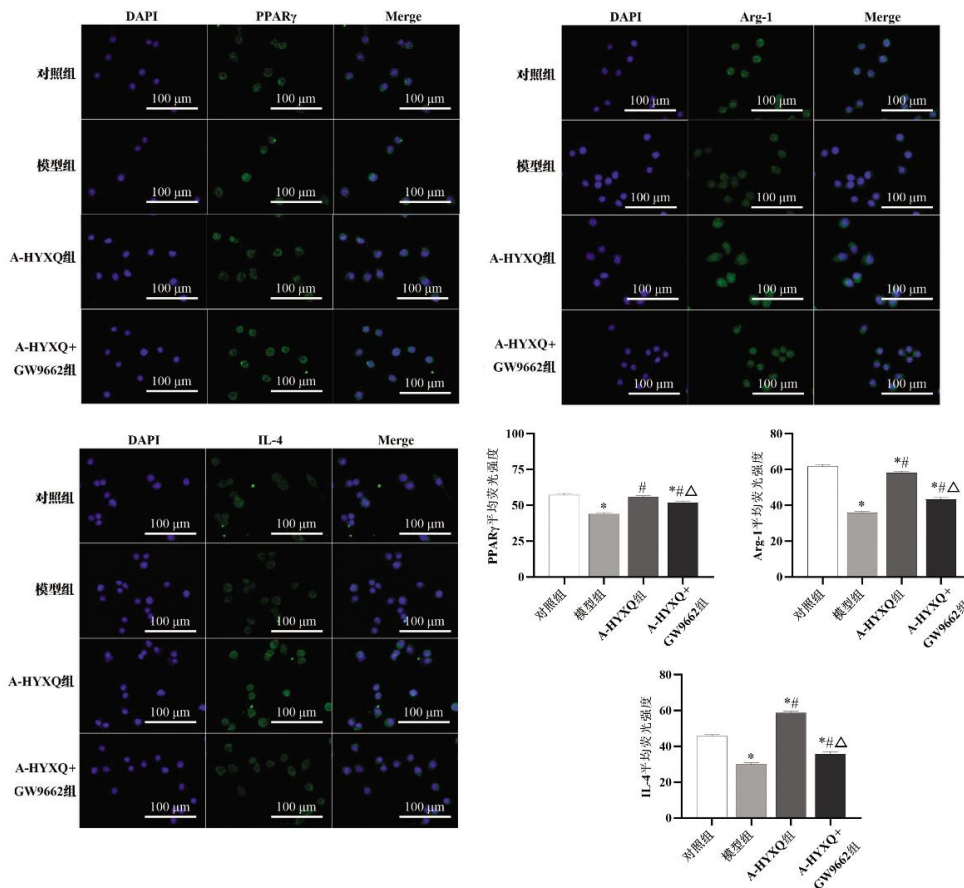


图 6 各组 PPARγ、Arg-1 和 IL-4 平均荧光强度

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ ;与 A-HYXQ 组相比,Δ $P < 0.05$ 。

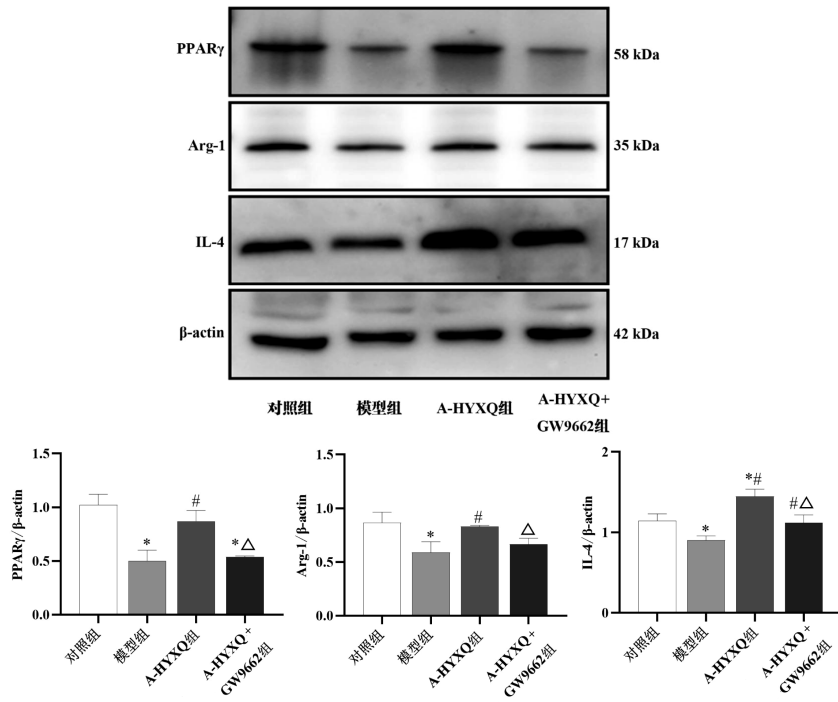


图7 各组 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 及 IL-4 蛋白表达量

注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ;与 A-HYXQ 组相比, $\Delta P<0.05$ 。

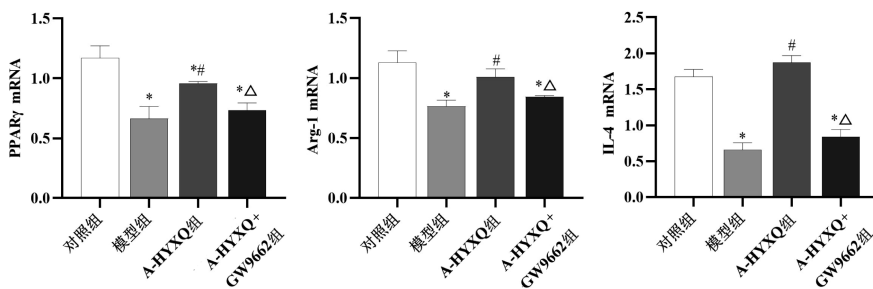


图8 各组 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 和 IL-4 mRNA 表达量

注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ;与 A-HYXQ 组相比, $\Delta P<0.05$ 。

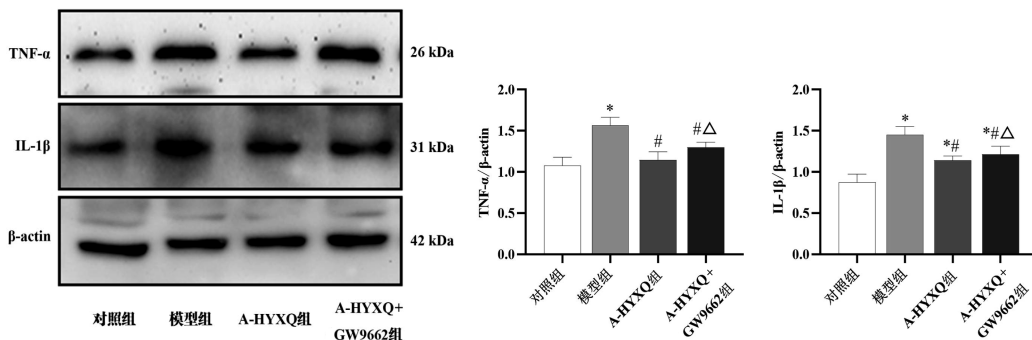


图9 各组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白表达量

注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ;与 A-HYXQ 组相比, $\Delta P<0.05$ 。

#### 4 讨论

ICH 后血肿周围继发性神经炎症是导致 ICH 神经功能预后欠佳的主要原因之一,减轻 ICH 后神经炎症反应可以改善 ICH 患者的功能预后<sup>[7]</sup>。ICH 归属于中医学“中风”范畴,根据冲脉及玄府理论创制的安脑平冲方具有潜摄冲脉、通调气血的功效。

小胶质细胞是大脑损伤后最先被激活的胶质细胞,其有 M1 和 M2 两种表型<sup>[12]</sup>。本研究发现,A-HYXQ 可增加经氯化血红素损伤 BV2 细胞的 Ym-1 和 IL-10 表达,调节小胶质细胞表型、减少炎症因子 iNOS 和 IL-6 表达。PPAR $\gamma$  属于核受体超家族,在 ICH 后可通过激活 PPAR $\gamma$  信号通路调节小胶质细胞表型、加速血肿清除、减少神经炎症<sup>[23]</sup>。为证实 A-HYXQ



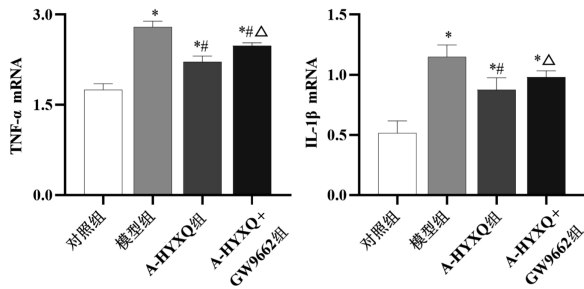


图 10 各组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达量

注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,\*\* $P<0.05$ ;与 A-HYXQ 组相比,Δ $P<0.05$ 。

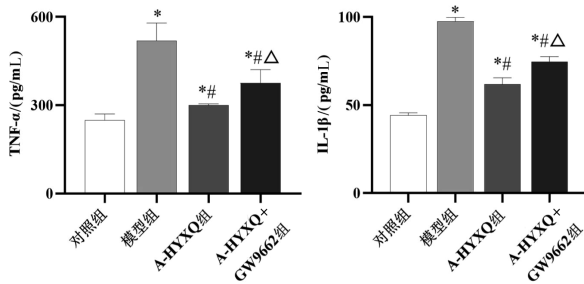


图 11 各组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  上清液表达量

注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,\*\* $P<0.05$ ;与 A-HYXQ 组相比,Δ $P<0.05$ 。

可从多途径、多靶点极化 M2 小胶质细胞,本研究选用其他 M1 及 M2 型小胶质标志物。研究结果证实,A-HYXQ 可增加 PPAR $\gamma$ 、Arg-1 和 IL-10 表达,同时减少 IL-6 和 iNOS 表达,调节小胶质细胞表型,使其向 M2 型小胶质细胞转变,而且 PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662 可部分消除 A-HYXQ 的保护效应。因此,安脑平冲方可调控小胶质细胞表型的变化,调节玄府开阖,保持血脑屏障的完整性,减少 ICH 后炎症物质的产生及渗入,发挥神经保护作用。

综上所述,本研究证实安脑平冲方可从多靶点极化 M2 型小胶质细胞,调节小胶质细胞表型,减轻神经炎症;并发现其保护效应可能是通过激活 PPAR $\gamma$  信号通路,促进小胶质细胞向 M2 型转化而实现。

## 参考文献

- [1] PINHO J, COSTA A S, ARAÚJO J M, et al. Intracerebral hemorrhage outcome: A comprehensive update[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2019, 398: 54-66.
- [2] WU S, WU B, LIU M, et al. Stroke in China: Advances and challenges in epidemiology, prevention, and management[J]. The Lancet Neurology, 2019, 18(4): 394-405.
- [3] VAN ASCH C J, LUITSE M J, RINKEL G J, et al. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: A systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet Neurology, 2010, 9(2): 167-176.
- [4] 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.
- [5] WILKINSON D A, PANDEY A S, THOMPSON B G, et al. Injury mechanisms in acute intracerebral hemorrhage[J]. Neuropharmacology, 2018, 134(Pt B): 240-248.
- [6] CAMPBELL B, KHATRI P. Stroke[J]. The Lancet, 2020, 396(10244): 129-142.
- [7] XUE M, YONG V W. Neuroinflammation in intracerebral haemorrhage: Immunotherapies with potential for translation[J]. The Lancet Neurology, 2020, 19(12): 1023-1032.
- [8] BAI Q, XUE M Z, YONG V W. Microglia and macrophage phenotypes in intracerebral haemorrhage injury: Therapeutic opportunities[J]. Brain, 2020, 143(5): 1297-1314.
- [9] WANG J, DORÉ S. Inflammation after intracerebral hemorrhage[J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2007, 27(5): 894-908.
- [10] TSCHOE C, BUSHNELL C D, DUNCAN P W, et al. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage and potential therapeutic targets[J]. Journal of Stroke, 2020, 22(1): 29-46.
- [11] WANG J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage[J]. Progress in Neurobiology, 2010, 92(4): 463-477.
- [12] ZHANG Z, ZHANG Z, LU H, et al. Microglial polarization and inflammatory mediators after intracerebral hemorrhage[J]. Molecular Neurobiology, 2017, 54(3): 1874-1886.
- [13] SCHNEGG C I, ROBBINS M E. Neuroprotective mechanisms of PPAR $\delta$ : Modulation of oxidative stress and inflammatory processes[J]. PPAR Research, 2011, 2011: 373560.
- [14] SKERRETT R, MALM T, LANDRETH G. Nuclear receptors in neurodegenerative diseases[J]. Neurobiology of Disease, 2014, 72: 104-116.
- [15] ZHUANG J F, PENG Y C, GU C, et al. Wogonin accelerates hematoma clearance and improves neurological outcome via the PPAR- $\gamma$  pathway after intracerebral hemorrhage[J]. Translational Stroke Research, 2021, 12(4): 660-675.
- [16] 周德生,胡华,杨洋,等.冲脉理论与脑出血冲气上逆病机特征之探讨[J].辽宁中医杂志,2013,40(11):2184-2186.
- [17] 须冰,黄芳,褚湘农.玄府理论及其临床应用探讨[J].上海中医药杂志,2015,49(9):7-9.
- [18] 董丽,李波,白雪,等.脑之玄府与血脑屏障的相关性[J].中医杂志,2013,54(22):1969-1971.
- [19] 龙运军,吴兵兵,周德生,等.安脑平冲片治疗基底核区脑出血 36 例临床疗效观察[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(6): 798-800.
- [20] XU J, CHEN Z Q, YU F, et al. IL-4/STAT6 signaling facilitates innate hematoma resolution and neurological recovery after hemorrhagic stroke in mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(51): 32679-32690.
- [21] 左玲敏.从 P2X7R/NLRP3 通路探讨安脑平冲方对脑出血后炎症反应的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2020.
- [22] 周德生,李煦昀,陈瑶,等.安脑平冲片联合甘露醇注射液对大鼠脑出血后血肿周围 MMP-9 及 TIMP-1 表达的影响[J].中国中医急症,2013,22(7):1113-1116.
- [23] XU C R, CHEN H J, ZHOU S J, et al. Pharmacological activation of RXR- $\alpha$  promotes hematoma absorption via a PPAR- $\gamma$ -dependent pathway after intracerebral hemorrhage[J]. Neuroscience Bulletin, 2021, 37(10): 1412-1426.