

本文引用: 余文运, 王 焱, 谢 丹, 祝圆圆, 毛修月, 罗 刚, 胡国恒. 龙琥醒脑颗粒对脑出血大鼠的影响及其作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(10): 1825–1830.

龙琥醒脑颗粒对脑出血大鼠的影响及其作用机制

余文运¹, 王 焱^{1,2}, 谢 丹^{1,2}, 祝圆圆¹, 毛修月¹, 罗 刚¹, 胡国恒^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第一中医临床学院, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨龙琥醒脑颗粒对脑出血(ICH)大鼠神经功能缺损与脑含水量的影响,并探讨其机制。**方法** 采用自体血注入法建立 ICH 大鼠模型。造模成功后采用随机数字表法将模型大鼠随机分为模型组、西药组、中药组、中西组,每组 20 只;另取 20 只为假手术组。假手术组、模型组灌胃+腹腔注射生理盐水;西药组腹腔注射 3.15 mL/kg 七叶皂苷钠;中药组灌胃 2.5 g/kg 龙琥醒脑颗粒溶液;中西组灌胃 2.5 g/kg 龙琥醒脑颗粒溶液+腹腔注射 3.15 mL/kg 七叶皂苷钠。每日 2 次,共干预 6 次。对大鼠进行改良神经功能缺损评分(m-NSS),称重法计算脑含水量,Western blot、RT-PCR 检测受损脑组织 PTEN 诱导的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(PINK1)、E3 泛素连接酶(Parkin)、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)蛋白及 mRNA 相对表达量。**结果** 与假手术组比较,模型组 m-NSS 评分升高($P<0.01$),各时间点(12、48、72 h)脑含水量升高($P<0.01$),PINK1、Parkin 蛋白和 mRNA 水平升高($P<0.05, P<0.01$),LC3- I、LC3- II 蛋白及 LC3 mRNA 表达降低($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,各用药组大鼠 m-NSS 评分均降低($P<0.05, P<0.01$),造模后 48、72 h 大鼠脑含水量降低($P<0.05, P<0.01$),PINK1、Parkin 蛋白及 mRNA 表达均降低($P<0.05, P<0.01$),LC3- I、LC3- II 蛋白和 LC3 mRNA 表达升高($P<0.05, P<0.01$);与西药组比较,中西组 m-NSS 评分降低($P<0.05$),72 h 时中药组、中西组脑含水量降低($P<0.05, P<0.01$),中药组、中西组 PINK1、Parkin 蛋白和 mRNA 表达降低($P<0.05, P<0.01$),中药组 LC3- II 和中西组 LC3- I、LC3- II 蛋白及两组 LC3 mRNA 表达均升高($P<0.05, P<0.01$);与中药组比较,中西组 m-NSS 评分降低($P<0.05$),在各时间点脑含水量均降低($P<0.05$),PINK1、Parkin 蛋白和 mRNA 表达降低($P<0.05, P<0.01$),LC3- I、LC3- II 蛋白及 LC3 mRNA 表达升高($P<0.05$)。**结论** 龙琥醒脑颗粒具有保护 ICH 大鼠脑组织的作用,可能与其抑制 PINK1、Parkin 表达有关。

[关键词] 脑出血;龙琥醒脑颗粒;线粒体自噬;脑出血后水肿;瘀水互结;PINK1/Parkin 通路;活血利水

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.10.004

Effects of Longhu Xingnao Granules on intracerebral hemorrhage in rats and its mechanism of action

YU Wenyun¹, WANG Yan^{1,2}, XIE Dan^{1,2}, ZHU Yuanyuan¹, MAO Xiuyue¹, LUO Gang¹, HU Guoheng^{1*}

1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. The First Clinical School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Longhu Xingnao Granules (LHXNG) on neurological deficits and brain water content in rats with intracerebral hemorrhage (ICH), and to explore its mechanism. **Methods** An ICH rat model was established using autologous blood injection. After successful modeling, the rats were randomly divided into four groups (a model group, a Western medicine group, a Chinese medicine group, and a combined therapy group) using a random number table, with 20 rats in each group; another 20 rats served as the sham-operated group. The sham-operated and model groups received

[收稿日期] 2025-04-08

[基金项目] 湖南省卫生健康委员会课题(D202304099020);湖南省中医药管理局课题(B2023023);长沙市自然科学基金项目(kq2208200);湖南中医药大学校院联合基金中医药传承创新专项(2024XYLH364)。

[通信作者] * 胡国恒,男,博士,主任医师,博士研究生导师,E-mail:hgh9198@126.com。

intragastric administration and intraperitoneal injection of normal saline. The Western medicine group received intraperitoneal injection of sodium aescinate (3.15 mL/kg), and the Chinese medicine group received intragastric administration of LHXNG solution (2.5 g/kg). The combined therapy group received both intragastric LHXNG solution (2.5 g/kg) and intraperitoneal injection of sodium aescinate (3.15 mL/kg). Treatments were administered twice daily, for a total of six interventions. Neurological deficits were evaluated using the modified neurological severity score (m-NSS). Brain water content was measured by the wet-dry weight method. The relative expression levels of PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), E3 ubiquitin ligase (Parkin), and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) at both protein and mRNA levels in the injured brain tissue were determined by Western blot and RT-PCR, respectively. **Results** Compared with the sham-operated group, the model group showed significantly increased m-NSS score ($P<0.01$), increased brain water content at all time points (12, 48, 72 h) ($P<0.01$), upregulated expression of PINK1 and Parkin at both protein and mRNA levels ($P<0.05$, $P<0.01$), and downregulated protein expression of LC3-I and LC3-II and mRNA expression of LC3 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, all treatment groups showed significantly decreased m-NSS scores ($P<0.05$, $P<0.01$), decreased brain water content at 48 and 72 h post-modeling ($P<0.05$, $P<0.01$), downregulated expression of PINK1 and Parkin at both protein and mRNA levels ($P<0.05$, $P<0.01$), and upregulated protein expression of LC3-I and LC3-II and mRNA expression of LC3 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the Western medicine group, the combined therapy group demonstrated significantly decreased m-NSS score ($P<0.05$); at 72 h, both the Chinese medicine group and the combined therapy group showed significantly decreased brain water content ($P<0.05$, $P<0.01$), and downregulated expression of PINK1 and Parkin at protein and mRNA levels ($P<0.05$, $P<0.01$). The Chinese medicine group showed upregulated protein expression of LC3-II, while the combined therapy group showed upregulated protein expression of both LC3-I and LC3-II; moreover, mRNA expression of LC3 was upregulated in both groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the Chinese medicine group, the combined therapy group exhibited lower m-NSS score ($P<0.05$), decreased brain water content at all time points ($P<0.05$), downregulated expression of PINK1 and Parkin at both protein and mRNA levels ($P<0.05$, $P<0.01$), and upregulated protein expression of LC3-I and LC3-II and mRNA expression of LC3 ($P<0.05$). **Conclusion** LHXNG exerts a protective effect on the brain tissue of rats with ICH, which may be related to its inhibition on PINK1 and Parkin expression.

[**Keywords**] intracerebral hemorrhage; Longhu Xingnao Granules; mitophagy; post-hemorrhagic cerebral edema; blood stasis and water retention; PINK1/Parkin pathway; circulating blood and draining water retention

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)指非外伤性脑实质内出血,是脑血管病中的危急重症,以局灶性神经功能缺损为特征^[1]。流行资料显示,ICH 死亡率高达 32%~50%,致残率高达 65%~72%^[2]。ICH 血肿属于中医学“离经之血”。“瘀血”是 ICH 的病理产物,血溢脉外,瘀阻脑窍,形成血肿,脑络不通,津液不行,聚而为水,水积于脑中而继发 ICH 后水肿^[3-4]。ICH 致死率、致残率高,给患者和家庭带来极大的精神和经济负担^[5-6]。目前,现代医学治疗 ICH 水肿的方案主要为去骨瓣减压术、钻孔血肿抽吸术等,费用相对较高,且存在创面感染等风险^[7-9]。本团队根据中医学理论及喻坚柏教授多年临床经验,以龙琥醒脑颗粒治疗出血性中风。此方由地龙、琥珀、桃仁、当归、川芎、黄芪、三七、赤芍、白芷和麝香 10 味中药组成^[10-11],在活血化瘀作用的同时兼顾益气通络^[12]。本实验通过制备经典的 ICH 大鼠模型,研究龙琥醒脑颗粒对 ICH 大鼠的影响及其机制,旨在为中医药论治 ICH 奠定基础,为中西医结合治疗 ICH 提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 100 只,体质量 220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证号:430727231103406467,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004,实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2020-0010。大鼠饲养于温度(20 ± 3)℃、湿度 $50\%\pm 3\%$ 、12 h 交替照明的环境中,自由饮水及进食,喂养标准饲料,适应 1 周后进行实验。本实验通过湖南中医药大学实验动物中心伦理审查:伦审科第(202404042)号。

1.2 主要仪器

大鼠平衡木装置(型号:SA112,江苏塞昂斯生物科技有限公司);脑立体定位仪(型号:69100,瑞沃德生物科技有限公司);电热鼓风干燥箱(型号:DHG-9030A,上海一恒科学仪器有限公司);荧光成像仪(型号:Odyssey,北京莱阔生物科技有限公司);台式冷冻离心机(型号:H1650R,湖南湘仪实验室仪

器开发有限公司); 荧光定量 RCP 仪 (型号: PIKO REAL96, 美国 Thermo 公司); 旋涡混合器 (型号: GL-88B, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 磁力搅拌器、精密 pH 计 (型号: JB-13、PHS-3C, 上海雷磁科技有限公司); -80 °C 冰箱 (型号: DW-HW438, 中国长虹菱菱股份有限公司); 生物样品均质仪 (型号: Bio-Prep-24, 杭州奥盛仪器有限公司)。

1.3 主要药物及试剂

龙琥醒脑颗粒 (规格: 5 g/袋, 湖南新汇制药股份有限公司); 七叶皂苷钠注射液 (国药准字: H20003239, 规格: 5 mg/支, 山东绿叶制药有限公司); 0.9% 氯化钠注射液 (国药准字: H43020454, 规格: 250 mL: 2.25 g, 湖南科伦制药有限公司); RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂混合物 (批号: R20250809A、PI0825-100T, 美国 Sigma 公司); PTEN 诱导的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1) 抗体 (批号: sc-514394, 美国 Santa Cruz 公司); Parkin RBR E3 泛素连接酶 (Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase, Parkin) 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 抗体 (批号: ab159949、ab48394, 英国 Abcam 公司)。

1.4 药物制备

取龙琥醒脑颗粒 10 g, 用 20 mL 无菌生理盐水溶解, 摇匀, 制成 0.5 g/mL 药液, 放至 4 °C 冰箱中保存备用。参照课题组以往经验, 采用体质量及体表面积折算公式进行等效剂量计算^[13], 龙琥醒脑颗粒每日大鼠灌胃剂量为 2.5 g/kg, 每日灌胃 2 次。

取七叶皂苷钠注射液 2 瓶, 用 25 mL 无菌生理盐水溶解, 摇匀, 制成 0.4 mg/mL 药液, 放至 4 °C 冰箱中保存备用。参照人和动物体质量及体表面积折算公式计算等效剂量^[13], 按照每日 2.52 mg/kg 的剂量腹腔注射, 每日 2 次。

1.5 动物造模

采用自体血注入法进行造模^[14-15]。使用戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后将大鼠固定于脑立体定位仪上, 沿头部正中中线切 1~1.5 cm 的切口, 分离颅外膜, 暴露颅骨面找到前囟, 定位左尾状核, 用脑立体定位仪适配钻在标记处开孔。将大鼠从脑立体定位仪上取下, 仰卧位固定于操作台上。对大鼠胸腹部进行消毒, 用左手示指将心脏稍向左推, 用右手示指指腹扪及心脏搏动最强烈的位点即为进针点, 心尖穿刺, 取自体动脉血 50~100 μ L, 移至 EP 管

内。注射泵抽吸 50 μ L 血液, 从颅骨面开始, 进针 6 mm, 50 μ L 血液匀速注射 5 min, 留针 10 min 后待退针 2 mm, 再次留针 4 min 后退针移出, 拔针后待无血液自针道反流, 骨蜡封闭。假手术组步骤同上, 不注血。麻醉苏醒后以改良神经功能缺损评分 (modified neurological severity score, m-NSS)^[15] 评价其行为能力, 总分为 18 分, 评分 ≥ 7 分视为造模成功。

1.6 分组及给药

造模成功后采用随机数字表法将模型大鼠随机分为模型组、西药组、中药组、中西组, 每组 20 只; 另取 20 只为假手术组。假手术组和模型组灌胃等体积生理盐水、腹腔注射等体积生理盐水; 中西组灌胃 2.5 g/kg 龙琥醒脑颗粒溶液、腹腔注射 3.15 mL/kg 七叶皂苷钠注射液; 西药组: 灌胃 5 mL/kg 蒸馏水、腹腔注射 3.15 mL/kg 七叶皂苷钠注射液; 中药组: 灌胃 2.5 g/kg 龙琥醒脑颗粒溶液、腹腔注射 3.15 mL/kg 生理盐水。各组从手术清醒后开始进行干预, 每 12 小时灌胃 1 次, 各组均灌胃、腹腔注射 72 h。

1.7 指标检测方法

1.7.1 大鼠神经功能缺损情况 造模给药后采用 m-NSS 评分法^[15] 进行评分, 总分为 18 分, 分值越高代表大鼠神经功能缺损越严重。

1.7.2 大鼠脑含水量检测 采用干湿重法进行脑含水量检测。造模 12、48、72 h 后取材。大鼠处死后立刻取脑, 取出血侧脑组织, 将脑组织称湿质量后立即放入 100 °C 恒温电烤箱内 6~72 h (其中 6 h 脑质量变化不超过 0.02 mg 视为脑组织达到恒重), 称取其干质量。脑含水量 = (湿质量 - 干质量) / 湿质量 $\times$ 100%。

1.7.3 Western blot 检测 PINK1、Parkin、LC3 蛋白表达量 用蛋白提取试剂盒裂解组织、细胞, 提取细胞样品总蛋白, BCA 法测蛋白含量, 按照浓度 10% 配胶, 加载蛋白样品 20 μ g。电泳、转膜、封闭 5% TBST 脱脂奶粉 1 h 后, 孵育一抗 (PINK1 稀释比例为 1:500, Parkin 稀释比例为 1:1 000, LC3 稀释比例为 1:1 000), 加入孵育盒 4 °C 过夜。第二天室温放置 20 min, TBST 洗涤 3 次 $\times$ 5 min, 远红外荧光二抗 (稀释比例为 1:10 000) 室温孵育 1 h, 洗涤 TBST 4 次 $\times$ 5 min。远红外成像系统扫描膜, 采集目的蛋白条带。使用 ImageJ 软件分析条带灰度值, 以目的蛋白/内参蛋白 (β -actin) 灰度比值表示蛋白相对表达量。

1.7.4 RT-PCR 检测 PINK1、Parkin、LC3 mRNA 相对表达量 使用 Trizol 法提取组织总 RNA。实验前,

配制 0.1% DEPC 水;在 1 L 三蒸水中加入 1 mL 的 DEPC,充分混匀后静置过夜,随后于 121 °C 高压湿热灭菌 20 min 备用。所用塑料耗材和玻璃器械均需预先浸泡于 0.1% DEPC 水中过夜,第 2 天 121 °C 灭菌 60 min 后烘干备用,以避免 RNase 污染。取适量组织样本,加入 1 mL Trizol 试剂,充分匀浆裂解后,加入三氯甲烷,剧烈振荡后室温静置。初次离心,取上层液相,移出。原液加异丙醇混匀,室温静置,再次离心,去上清,加乙醇洗涤沉淀;3 次离心,去上清液,空气干燥后加入无菌无酶水溶解沉淀;以紫外分光光度计测定浓度、吸光度值,并计算其浓度、纯度。以组织总 mRNA 为模板,逆转录 cDNA,反应体系按试剂盒说明书配制。SYBR 法进行 RT-PCR 实验。运用 primer5 软件设计引物、实时定量 PCR、定量 PCR 扩增。详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	序列(5'-3')	长度/bp
PINK1	正向:GTGTCTGACCCACTGGACAC	193
	反向:CTGCTCCCTTTGAGACGACA	
Parkin	正向:TGGGCTGTGGGTTTCGTTT	103
	反向:CGGTATGCCTGAGAAGTCG	
LC3	正向:AACACAGCCACCTCTCGACCT	125
	反向:ACACAACCCACACACGGCAG	

1.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”描述,各组数据如符合正态性和方差齐性检验,则进行单因素方差分析,组间多重比较用 *LSD* 检验;不满足正态分布或方差齐性检验时,采用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 m-NSS 评分比较

与假手术组比较,模型组 m-NSS 评分升高($P<0.01$)。与模型组比较,西药组、中药组、中西组 m-NSS 评分均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与西药组及中药组比较,中西组 m-NSS 评分降低($P<0.05$)。详见表 2。

2.2 各组大鼠脑含水量比较

与假手术组比较,模型组大鼠造模后各时间点脑含水量升高($P<0.01$)。与模型组比较,西药组、中

表 2 各组大鼠 m-NSS 评分比较($\bar{x}\pm s$,分)Table 2 Comparison of m-NSS scores among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, points)

组别	<i>n</i>	m-NSS 评分
假手术组	14	0.00±0.00
模型组	17	7.31±0.79**
西药组	16	6.31±1.20** [#]
中药组	16	4.44±0.89** ^{##}
中西组	16	3.76±1.44** ^{###} Δ

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与西药组比较,[#] $P<0.05$;与中药组比较,^Δ $P<0.05$ 。

药组、中西组造模后 12 h 脑含水量下降尚不明显($P>0.05$),但在造模后 48、72 h,西药组、中药组、中西组大鼠脑含水量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与西药组比较,中药组、中西组造模后 12、48 h 脑含水量下降尚不明显($P>0.05$),而在 72 h 时明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与中药组比较,中西组在造模后 12、48、72 h 脑含水量均降低($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠脑含水量比较($\bar{x}\pm s$,%)Table 3 Comparison of brain water content among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, %)

组别	<i>n</i>	造模后 12 h	造模后 48 h	造模后 72 h
假手术组	14	74.73±1.16	76.07±1.53	75.63±2.62
模型组	17	79.53±1.07**	85.61±1.79**	87.62±1.90**
西药组	16	78.38±1.79*	83.18±1.85 [#]	85.42±1.74 [#]
中药组	16	79.31±0.97*	82.57±0.87 ^{##}	83.42±1.52 ^{###}
中西组	16	77.27±1.09* Δ	81.26±2.01 ^{###} Δ	82.45±1.47 ^{###} Δ Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与西药组比较,[#] $P<0.05$,^Δ $P<0.05$;与中药组比较,^Δ $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠 PINK1、Parkin、LC3 蛋白相对表达量比较

与假手术组比较,模型组 PINK1、Parkin 蛋白相对表达量升高($P<0.05$),LC3-I、LC3-II 蛋白相对表达量降低($P<0.05$)。与模型组比较,西药组、中药组、中西组 PINK1、Parkin 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$, $P<0.01$),LC3-I、LC3-II 蛋白相对表达量均升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与西药组比较,中药组、中西组 PINK1、Parkin 蛋白相对表达量降低($P<0.05$),中药组 LC3-II 及中西组 LC3-I、LC3-II 蛋白相对表达量均升高($P<0.05$)。与中药组比较,中西组 PINK1、Parkin 蛋白相对表达量降低($P<0.05$),LC3-I、LC3-II 蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。详见表 4、图 1。

表 4 各组大鼠 PINK1、Parkin、LC3 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Comparison of relative protein expression levels of PINK1, Parkin, and LC3 among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PINK1	Parkin	LC3- I	LC3- II
假手术组	14	0.95±0.05	0.99±0.01	0.38±0.07	1.13±0.11
模型组	17	1.48±0.13*	1.46±0.04*	0.28±0.05*	0.37±0.01*
西药组	16	0.70±0.09 [#]	0.57±0.06 [#]	0.40±0.06 [#]	1.33±0.16 [#]
中药组	16	0.55±0.03 ^{##}	0.52±0.29 ^{##}	0.53±0.01 [#]	1.46±0.04 ^{##}
中西组	16	0.21±0.1 ^{###}	0.31±0.21 ^{###}	0.62±0.03 ^{###}	1.51±0.04 ^{###}

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与西药组比较,^Δ $P<0.05$;与中药组比较,^Δ $P<0.05$ 。

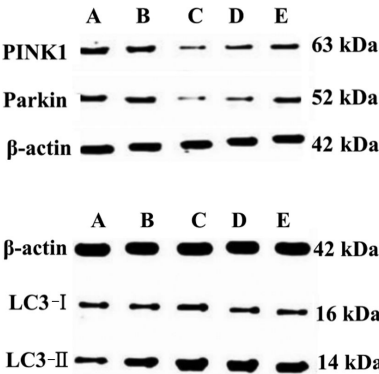


图 1 各组大鼠 PINK1、Parkin、LC3 蛋白表达条带图

Fig.1 Band diagram of PINK1, Parkin, and LC3 protein expression in different groups of rats

注:A.假手术组;B.模型组;C.西药组;D.中药组;E.中西组。

2.4 各组大鼠 PINK1、Parkin、LC3 mRNA 相对表达量比较

与假手术组比较,模型组 PINK1、Parkin mRNA 相对表达量升高($P<0.01$),LC3 mRNA 相对表达量降低($P<0.01$)。与模型组比较,西药组、中药组、中西组 PINK1、Parkin mRNA 相对表达量降低($P<0.01$),LC3 mRNA 相对表达量升高($P<0.01$)。与西药组比较,中药组、中西组 PINK1、Parkin mRNA 相对表达量降低($P<0.05$, $P<0.01$),LC3 mRNA 相对表达量升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与中药组比较,中西组 PINK1、Parkin 相对表达量降低($P<0.01$),LC3 mRNA 相对表达量升高($P<0.05$)。详见表 5。

3 讨论

ICH 发病机制复杂,是一种严重的脑血管疾病。诸多研究表明,ICH 后脑组织的水肿及恢复程度与神经功能及预后密切相关,神经功能缺损与继发性脑水肿的病理进程相互交织,传统治疗手段难以兼

表 5 各组大鼠 PINK1、Parkin、LC3 mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of relative mRNA expression levels of PINK1, Parkin, and LC3 among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PINK1	Parkin	LC3
假手术组	14	0.59±0.11	0.53±0.22	3.00±0.12
模型组	17	1.21±0.06**	1.83±0.24**	1.74±0.23**
西药组	16	0.55±0.07 ^{##}	0.57±0.08 ^{##}	3.76±1.33 ^{##}
中药组	16	0.49±0.10 ^{###}	0.50±0.01 ^{###}	4.20±0.32 ^{###}
中西组	16	0.25±0.04 ^{###}	0.27±0.05 ^{###}	5.97±1.09 ^{###}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与西药组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$;与中药组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

顾二者^[15-17]。本研究发现,龙琥醒脑颗粒在改善 ICH 大鼠神经功能评分的同时,显著抑制脑水肿进展,其核心机制可能与靶向调控 PINK1/Parkin-LC3 轴介导的线粒体自噬密切相关。

本研究观察了龙琥醒脑颗粒对 ICH 大鼠脑组织含水量的影响,结果发现,模型组大鼠脑含水量在造模后 72 h 达到峰值,而中药组大鼠脑含水量显著下降,中西组进一步下降。结合已有研究深入分析,龙琥醒脑颗粒中地龙的活性成分可直接激活纤溶酶原,可能通过抑制血肿周围凝血酶受体信号,减少炎性介质白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子 α 的释放^[18-19],从而阻断“瘀血致水”的恶性循环;而琥珀中的琥珀酸通过上调水通道蛋白 4 的膜定位,加速水肿液经星形胶质细胞脚突排出^[20]。本研究通过揭示活血利水功效的作用机制,证实了该复方配伍方案的科学性,也为中药复方配伍的机制研究提供了实验依据。

线粒体自噬的精细调控是龙琥醒脑颗粒发挥神经保护作用的关键。ICH 后,线粒体损伤触发自噬以清除碎片,但过度激活可能导致神经元能量供应障碍,反而造成损伤^[21-22]。本研究发现,模型组 LC3- I、LC3- II 蛋白表达降低,PINK1、Parkin 表达显著增高,提示自噬受阻与线粒体碎片堆积之间存在关联。经龙琥醒脑颗粒干预后,LC3- I、LC3- II 升高,同时 PINK1 和 Parkin mRNA 表达下调。这一结果提示,龙琥醒脑颗粒可能通过双重机制重塑自噬平衡:一方面通过抑制 PINK1/Parkin 通路的过度激活来防止线粒体的异常清除;另一方面,又通过增强 LC3- II 向溶酶体的募集来增强自噬小体的成熟效率^[23]。这种双向调控模式充分展现了中药复方通过多靶点

协同干预实现稳态调节的独特优势。

本研究还验证了七叶皂苷钠与龙琥醒脑颗粒的协同治疗效应。实验结果显示,七叶皂苷钠可快速降低脑含水量,并对神经功能具有一定的改善作用。中西组通过“西药靶向控水肿-中药多途径促修复”的协同机制,使神经功能恢复,并显著升高 LC3-II 和 LC3-I 表达。已有研究表明,七叶皂苷钠通过抑制核因子- κ B 通路减少血脑屏障破坏^[24],而龙琥醒脑颗粒通过激活核因子 E₂ 相关因子 2 通路增强抗氧化能力,二者协同形成“抗炎-抗氧化”双重屏障^[25]。本研究结果提示,七叶皂苷钠与龙琥醒脑颗粒联合应用可通过协同抑制 PINK1/Parkin 通路,在实现 ICH 脑水肿持续控制的同时促进神经功能恢复,为中西医结合治疗 ICH 提供了实验证据。

综上所述,本研究从“瘀水互结”理论切入,首次揭示龙琥醒脑颗粒通过“抑制 PINK1/Parkin-增强 LC3 自噬成熟”的双重机制重塑线粒体稳态,并证实与七叶皂苷钠联用的协同增效效应。这一发现为龙琥醒脑颗粒的临床应用提供了证据,为 ICH 的精准治疗奠定了实验基础。然而,本研究龙琥醒脑颗粒调控 PINK1/Parkin 通路的具体活性成分尚未明确,需通过分子对接和基因沉默技术筛选关键靶点。此外,ICH 后自噬的动态变化具有时空异质性,未来可结合活体双光子成像技术,实时观测龙琥醒脑颗粒对神经元与胶质细胞线粒体自噬的差异调控。

参考文献

- [1] MAGID-BERNSTEIN J, GIRARD R, POLSTER S, et al. Cerebral hemorrhage: Pathophysiology, treatment, and future directions[J]. *Circulation Research*, 2022, 130(8): 1204-1229.
- [2] 崔杰, 司志华, 曹端华. 脑出血患者及大鼠炎性损伤中血红素加氧酶 1 相关 Micro-RNAs 筛查及其在动物模型中的作用机制[J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(5): 1218-1224.
- [3] 王新志, 高颖, 周红霞, 等. 活血化瘀法治疗脑出血临床应用专家共识[J]. *中华中医药学刊*, 2025, 25(2): 11-14.
- [4] 穆小奋, 贾妮. 脑出血发病病机及中医治疗进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(1): 103-106.
- [5] 张亚楠, 张永灿. 脑出血患者家属参与治疗共享决策满意度现状及影响因素分析[J]. *广州医药*, 2024, 55(5): 535-540, 552.
- [6] 占艳雪, 黄云云. 脑出血术后患者的心理弹性现状及影响因素[J]. *医疗装备*, 2023, 36(18): 139-141.
- [7] 薛方方, 潘金凤, 叶玉勤. 老年脑出血术后轻度认知功能障碍现状调查及转归[J]. *中国临床研究*, 2022, 35(11): 1614-1618.
- [8] 孙宇, 王经发, 王海伟, 等. 脑出血去骨瓣减压术后减压窗下积液的发生现状及其危险因素分析[J]. *中外医疗*, 2021, 40(32): 75-78.
- [9] 龙春男, 贺权威, 胡波, 等. 脑出血药物治疗的研究进展: 现状与展望[J]. *卒中与神经疾病*, 2021, 28(4): 459-463.
- [10] 曾劲松, 喻坚柏, 罗刚, 等. 龙琥醒脑颗粒治疗中轻型颅脑损伤后认知障碍的疗效及对血清炎症因子和 5-羟色胺的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(4): 658-661.
- [11] 曾劲松, 罗刚, 张占伟, 等. 龙琥醒脑颗粒治疗重型颅脑损伤的疗效及对血清 TNF- α 、IL-6 的影响[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(2): 245-248.
- [12] 张占伟, 廖亮英, 杨惠, 等. 龙琥醒脑颗粒对脑缺血再灌注模型大鼠受损脑细胞线粒体动力学的影响[J]. *中草药*, 2022, 53(15): 4755-4763.
- [13] 王瑾茜, 胡国恒, 蔺晓源, 等. 益气活血方对气虚血瘀型冠心病模型大鼠的影响研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(5): 9-14.
- [14] 桑宇航. 脑出血动物模型研究进展[J]. *山东畜牧兽医*, 2024, 45(5): 95-97.
- [15] 郑嘉荣, 邓剑玲. 实验动物脑出血模型的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(5): 960-964.
- [16] 刘柘君, 唐田, 谭天阳, 等. 缺血性脑卒中模型研究进展[J]. *中国药物警戒*, 2024, 21(12): 1393-1397, 1404.
- [17] 李俊明, 王乃冰. 经侧裂-岛叶入路显微手术治疗基底节区高血压脑出血的效果及对神经功能、血管活性因子的影响[J]. *临床医学研究与实践*, 2024, 9(34): 71-74.
- [18] 张子文, 王凯, 王亭皓, 等. 短链脂肪酸通过抑制颅脑创伤后小胶质细胞促炎作用减轻脑损伤[J]. *空军军医大学学报*, 2025, 25(2): 14-16.
- [19] 陈月阳, 诸靖, 王诗波, 等. miR-675 通过靶向 HIF-1 α 调控线粒体自噬在脑出血大鼠中神经保护作用[J]. *生物医学工程与临床*, 2025, 25(2): 21-24.
- [20] 钟晓琴, 王宇, 胡达峰, 等. 中风醒脑液对胶原酶诱导脑出血模型小鼠的线粒体自噬机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(3): 584-588.
- [21] 简丹, 郑淑月, 翟瑄, 等. 线粒体动力相关蛋白 Drp1 在小鼠脑出血后炎症反应中的作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(12): 2465-2469, 2476.
- [22] 张柏雯, 邹伟. 线粒体自噬在脑出血中的神经保护机制研究概述[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(5): 854-861.
- [23] 杨鑫勇. 基于线粒体自噬途径探索壮骨饮对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2022.
- [24] 陆超明, 虞大为, 徐东升, 等. 微小 RNA-146a 保护脑出血大鼠神经的调控机制[J]. *实用临床医药杂志*, 2024, 28(13): 30-35.