

# 黄连解毒汤通过调节外泌体内趋化因子表达对MCAO小鼠 脑内中性粒细胞浸润的影响

张浩嘉<sup>1</sup>, 王凯<sup>1</sup>, 孙资金<sup>1</sup>, 王春雨<sup>1</sup>, 邵威<sup>1</sup>, 刘坤静<sup>1</sup>, 董利洋<sup>1</sup>, 陈丹<sup>2</sup>, 徐文秀<sup>3</sup>,  
王传尊<sup>4</sup>, 王雯<sup>4</sup>, 李长香<sup>1</sup>, 王雪茜<sup>1\*</sup>, 程发峰<sup>1\*</sup>, 王庆国<sup>1</sup>

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 102446; 2. 重庆中医药学院 中医学院, 重庆 402760;  
3. 康复大学 生命科学与健康学院, 山东 青岛 266113; 4. 沧州中西医结合医院, 河北 沧州 061019)

**[摘要]** 目的:探究黄连解毒汤能否通过调控外泌体内中性粒相关趋化因子的表达,从而抑制大脑中动脉闭塞(MCAO)小鼠脑内中性粒细胞的浸润,达到治疗效果。方法:将130只雄性SPF级C57BL/6J小鼠随机分为4组:假手术组、MCAO模型组、黄连解毒汤组(6 g·kg<sup>-1</sup>)和金纳多组(21.6 mg·kg<sup>-1</sup>),其中金纳多组为10只,剩余3组每组40只。黄连解毒汤组和金纳多组小鼠每天按0.15 mL·(10 g)<sup>-1</sup>的给药体积经口灌胃对应药物,连续7 d,假手术组和模型组通过同样途径给予等量生理盐水。7 d后对小鼠进行大脑中动脉闭塞手术,结扎小鼠右颈总动脉(CCA)的远端和近端,在两条结扎线之间做1个小切口,将带有圆头的硅橡胶涂层单丝插入腔内阻塞颈总动脉,单丝放置1 h以构建局灶性脑缺血模型。造模后24 h对小鼠进行检测,神经功能缺损评分(Longa评分)判断各组小鼠神经功能状态,2, 3, 5-三苯基四唑氯化物(TTC)染色检测各组小鼠的脑梗死体积,激光散斑成像观察各组小鼠的脑血流状态,苏木素-伊红(HE)染色和尼氏染色观察各组小鼠的脑组织病理变化,通过超速离心和分子大小排除从小鼠血浆及脑组织中分离外泌体,通过透射电镜(TEM)、粒径检测及蛋白免疫印迹法(Western blot)分析鉴定外泌体,对外泌体长链RNA进行文库构建和测序分析,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组小鼠血浆及脑组织外泌体内炎症及中性粒细胞相关趋化因子mRNA的表达,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组小鼠脑组织外泌体内炎症及中性粒细胞相关趋化因子蛋白的表达,免疫组化检测各组小鼠脑内中性粒细胞特异性蛋白-髓过氧化物酶(MPO)的表达量。结果:与假手术组比较,模型组小鼠神经功能评分显著降低( $P<0.01$ ),脑梗死显著( $P<0.01$ ),脑血流显著减少( $P<0.01$ ),脑内出现细胞坏死,尼氏小体数量显著减少( $P<0.01$ ),血浆及脑组织外泌体内IL-1 $\beta$ 、MPO、CXC趋化因子配体(CXCL)1、CXCL2、CXCL3、CXCL10、趋化因子(CCL)2和CCL3 mRNA的表达明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),脑组织外泌体内白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、MPO、CXCL2和CXCL10蛋白的表达明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),脑内MPO蛋白阳性率及平均光密度值显著上升( $P<0.01$ )。与模型组比较,黄连解毒汤组及金纳多组小鼠神经功能评分明显上升( $P<0.05$ ),脑梗死体积显著减少( $P<0.01$ ),脑血流量显著回升( $P<0.01$ ),脑内坏死细胞减少,尼氏小体数量显著增加( $P<0.01$ ),黄连解毒汤组小鼠血浆及脑组织外泌体内IL-1 $\beta$ 、MPO、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL10、CCL2和CCL3 mRNA的表达明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),脑组织外泌体内IL-1 $\beta$ 、MPO、CXCL2和CXCL10蛋白的表达明显减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),脑内MPO蛋白阳性率及平均光密度值显著下降( $P<0.01$ )。结论:黄连解毒汤可以有效调节MCAO小鼠血浆及脑组织外泌体内与中性粒细胞相关的趋化因子表达,从而减少脑内中性粒细胞的浸润,以此达到治疗效果。

**[关键词]** 黄连解毒汤; 缺血性脑卒中; 外泌体; 趋化因子; 中性粒细胞浸润

**[中图分类号]** R256;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)08-0042-12

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20260123

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251212.1034.002>

**[网络出版日期]** 2025-12-12 15:34:31 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



## Effects of Huanglian Jiedutang on Neutrophil Infiltration in Brain of MCAO Mice via Regulation of Chemokine Expression in Exosomes

ZHANG Haojia<sup>1</sup>, WANG Kai<sup>1</sup>, SUN Zijin<sup>1</sup>, WANG Chunyu<sup>1</sup>, SHAO Wei<sup>1</sup>, LIU Kunjing<sup>1</sup>,

**[收稿日期]** 2025-10-27

**[基金项目]** 国家自然科学基金区域联合重点支持项目(U21A20400)

**[第一作者]** 张浩嘉, 硕士, 从事经方对于脑血管疾病的防治的研究, E-mail: zhanghj61@163.com

**[通信作者]** \* 王雪茜, 教授, 博士生导师, 从事经方、验方的物质基础与效应机制的研究, E-mail: shirlyding@163.com;

\* 程发峰, 研究员, 博士生导师, 从事经方的现代研究与运用的研究, E-mail: fafengcheng1003@sina.com

DONG Liyang<sup>1</sup>, CHEN Dan<sup>2</sup>, XU Wenxiu<sup>3</sup>, WANG Chuanzun<sup>4</sup>, WANG Wen<sup>4</sup>, LI Changxiang<sup>1</sup>,  
WANG Xueqian<sup>1\*</sup>, CHENG Fafeng<sup>1\*</sup>, WANG Qingguo<sup>1</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102446, China; 2. College of TCM, Chongqing University of Chinese Medicine, Chongqing 402760, China; 3. College of Life Sciences and Health, Rehabilitation University, Qingdao 266113, China; 4. Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061019, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether Huanglian Jiedutang can inhibit neutrophil infiltration in the brains of middle cerebral artery occlusion (MCAO) mice by regulating the expression of neutrophil-related chemokines in exosomes, thereby achieving therapeutic effects. **Methods:** A total of 130 male specific pathogen-free (SPF) C57BL/6J mice were randomly divided into four groups: Sham-operated group, MCAO model group, Huanglian Jiedutang group (6 g·kg<sup>-1</sup>), and Ginaton group (21.6 mg·kg<sup>-1</sup>), with 10 mice in the Ginaton group and 40 mice in each of the remaining three groups. Mice in the Huanglian Jiedutang group and the Ginaton group were administered the corresponding drugs by oral gavage once daily at a volume of 0.15 mL·(10 g)<sup>-1</sup> for 7 consecutive days, while the sham-operated and model groups received an equal volume of saline via the same route. After 7 days, MCAO surgery was performed. The distal and proximal ends of the right common carotid artery (CCA) were ligated, a small incision was made between the two ligatures, and a silicone rubber-coated monofilament with a rounded tip was inserted into the lumen to occlude the CCA. The filament was left in place for 1 h to establish a focal cerebral ischemia model. At 24 h after modeling, mice were evaluated. Neurological function was assessed using the Longa score. Cerebral infarct volume was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Cerebral blood flow was observed by laser speckle imaging. Hematoxylin and eosin (HE) staining and Nissl staining were used to observe pathological changes in brain tissues. Exosomes were isolated from mouse plasma and brain tissues by ultracentrifugation and molecular size exclusion and identified by electron microscopy, particle size analysis, and protein blotting. Long-chain RNA libraries of exosomes were constructed and sequenced. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of inflammatory factors and neutrophil-related chemokines in exosomes from plasma and brain tissues of each group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the protein expression of inflammatory factors and neutrophil-related chemokines in exosomes from brain tissues of each group. Immunohistochemistry was used to detect the expression of the neutrophil-specific protein myeloperoxidase (MPO) in the brains of mice in each group. **Results:** Compared with the sham-operated group, the model group showed decreased neurological function scores ( $P<0.01$ ), obvious cerebral infarction ( $P<0.01$ ), reduced cerebral blood flow ( $P<0.01$ ), neuronal necrosis in the brain, and decreased numbers of Nissl bodies ( $P<0.01$ ). The mRNA expression levels of IL-1 $\beta$ , MPO, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL10, CCL2, and CCL3 in exosomes from plasma and brain tissues were significantly increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The protein expression levels of IL-1 $\beta$ , MPO, CXCL2, and CXCL10 in exosomes from brain tissues were increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and MPO-positive rates and mean optical density values in brain tissues were elevated ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the Huanglian Jiedutang group and the Ginaton group showed increased neurological function scores ( $P<0.05$ ), reduced cerebral infarct volume ( $P<0.01$ ), restored cerebral blood flow ( $P<0.01$ ), reduced necrotic cells in the brain, and increased numbers of Nissl bodies ( $P<0.01$ ). In the Huanglian Jiedutang group, the mRNA expression levels of IL-1 $\beta$ , MPO, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL10, CCL2, and CCL3 in exosomes from plasma and brain tissues were decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The protein expression levels of IL-1 $\beta$ , MPO, CXCL2, and CXCL10 in exosomes from brain tissues were reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and MPO-positive rates and mean optical density values in brain tissues were decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Huanglian Jiedutang can effectively regulate the expression of neutrophil-related chemokines in exosomes from plasma and brain tissues of MCAO mice, thereby reducing neutrophil infiltration in the brain and achieving therapeutic effects.

**[Keywords]** Huanglian Jiedutang; ischemic stroke; exosome; chemokine; neutrophil infiltration

缺血性脑卒中是全球最常见的脑血管疾病类型,具有发病率高、致残率高、死亡率高等特点,严重威胁人类健康与生命安全<sup>[1]</sup>。根据流行病学资料,缺血性脑卒中占所有脑卒中类型的62.4%~87.0%<sup>[2]</sup>,是目前导致神经系统功能障碍和长期致残的主要原因之一。尽管近年来在预防、诊断与治疗方面取得一定进展,但其30 d病死率仍达8%~12%,

1年死亡率接近20%<sup>[3]</sup>。缺血性脑卒中发病机制复杂,其引发的严重神经功能损害常造成运动、认知及语言等多方面障碍,不仅加重患者及家庭的负担,也给全球医疗系统带来巨大压力<sup>[4]</sup>。因此,深入探究其发病机制,开发更有效的干预手段,是目前研究的重点方向。近年来,外泌体作为细胞外囊泡的一种亚型,在中枢神经系统疾病研究中逐渐成为

热点<sup>[5]</sup>。外泌体是通过内体途径形成的直径为40~160 nm的囊泡结构<sup>[6]</sup>,广泛存在于各种体液中,可由多种细胞主动分泌释放<sup>[7]</sup>。其携带核酸、蛋白质、脂质及代谢产物等多种活性成分,是介导近距离与远距离细胞间通讯的重要媒介<sup>[8-9]</sup>。研究表明,脑组织发生急性缺血性损伤后,会释放大量的外泌体,参与免疫调节、细胞凋亡、神经修复等多种生物学过程<sup>[10]</sup>。外泌体不仅在缺血性脑卒中的病理发生与进展中发挥关键作用,还可能作为潜在的生物标志物或治疗靶点,为临床评估及个体化干预提供新方向。此外,在缺血性脑卒中早期,特异性外泌体表达显著上调,提示其在疾病早期识别及动态监测具有潜在价值<sup>[11-12]</sup>。鉴于外泌体在缺血性脑卒中发病机制中的作用日益明确,针对其携带的生物活性成分开展研究,有望为缺血性卒中病理机制解析及靶向药物研发提供新的理论基础。

近年来,多项研究表明,中药复方可能通过调控外泌体的分泌过程、靶向性特征及其内含活性成分的表达,在缺血性脑卒中的病理过程中发挥间接调节作用<sup>[13-14]</sup>。黄连解毒汤在中风相关研究中不断深入,其作用机制或许不限于传统意义上的清热解毒或炎症调控,亦可能涉及外泌体这一新型细胞间信号传递载体的调控。本课题组初步推测,黄连解毒汤可能通过调节外泌体内含活性成分的表达,参与脑缺血后组织损伤修复及神经功能重建等过程。本研究基于血浆与脑组织2类来源外泌体构建“外周-中枢”协同分析体系,使缺血性脑卒中过程中外泌体的变化得以系统呈现。同时,将研究重点聚焦于黄连解毒汤对外泌体内含活性成分的调控作用,揭示了中药复方可能通过外泌体介导的细胞间信息传递途径参与缺血性脑损伤过程的潜在方式,并进一步探讨“中药复方-外泌体-中性粒细胞浸润”之间的联系,强调外泌体作为中药干预缺血性脑卒中的关键介导环节,为相关作用机制研究和靶向干预策略提供了新的视角与理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 130只特定病原净化(SPF)级雄性C57BL/6J小鼠(体质量20~25 g,合格证号No.110011251106598645)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,在实验动物房饲养,环境条件为(24.0±1.0)℃恒温、45.0%~55.0%相对湿度,实行12 h光照/黑暗交替周期,食物与饮水自由摄取。

**1.2 伦理** 实验程序依据《实验动物管理条例》(中华人民共和国国务院批准)严格执行,并获得北京

中医药大学动物实验伦理委员会和《实验室动物护理和使用指南》的伦理批准,批号BUCM20250424-001。

**1.3 药物** 黄连解毒汤由4种中草药煎煮而成,黄连(批号220114004)、黄芩(批号221128007)、黄柏(批号220224001)和栀子(批号220907001)均购自仟草本草有限公司,药品由北京中医药大学中医学孔慧副研究员鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》所规定的质量标准。金纳多银杏叶提取物片(批号HJ20140768)购自德国威玛舒培博士药厂。

**1.4 试剂** 大脑中动脉闭塞(MCAO)线栓(北京西浓科技有限公司,批号为1620-A4);生理盐水(北京普博欣生物科技有限公司,批号PB30164);4%多聚甲醛固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1101);2% 2, 3, 5-三苯基四唑氯化物(TTC)染液(北京酷来搏科技有限公司,批号SL7140);三溴乙醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号T161626);醋酸双氧铀(美国Sigma公司,批号U113176);RNA抽提试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司,批号5202050);RNA反转录试剂盒、SYBR Green(湖南艾科瑞生物工程有限公司,批号分别为AG11706、AG11701);白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、中性粒细胞特异性蛋白-髓过氧化物酶(MPO)、CXC趋化因子配体(CXCL)2、CXCL10酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(江苏酶标生物科技有限公司,批号分别为MB-2776A、MB-3074A、MB-66345A、MB-6251A);肿瘤易感性101(TSG101)抗体、ALG-2相互作用蛋白X(Alix)抗体、热休克70 kDa蛋白(HSP70)抗体、MPO免疫组化抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab125011、ab186429、ab181606、ab208670,稀释比分别为1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:200);钙连蛋白(Calnexin)抗体(美国Proteintech公司,批号为10427-2-AP,1:1 000);羊抗兔免疫球蛋白(IgG)-辣根过氧化物酶(HRP)抗体(苏州新赛美生物科技有限公司,批号为P8002,稀释比1:10 000);苏木素-伊红(HE)染液(上海经科信息技术有限公司,批号71014460);尼氏染液(武汉博尔夫生物科技有限公司,批号B0013)。

**1.5 仪器** NIKON ECLIPSE CI型正置光学显微镜(日本尼康公司);InfiniteF50型酶标仪(瑞士TECAN公司);CP100NX型超速离心机、H-7650型透射电镜(TEM,日本Hitachi公司);N30E型纳米流式检测仪(中国福流生物科技有限公司);1645050

型基础电泳仪电源、1658004型电泳槽(美国Bio-Rad公司);Mini TBC4型电转槽(中国凯元信瑞仪器有限公司);C6型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分析仪(中国新羿制造科技有限公司);FLPI2型激光散斑血流成像仪(英国Moor公司);Scientz-48L型冷冻型高通量组织研磨机(中国新芝生物科技股份有限公司);Tanon 5200型化学发光成像仪(中国天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 小鼠分组及给药** 药效实验部分将小鼠随机分为4组( $n=10$ ):假手术组、MCAO模型组、黄连解毒汤组( $6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,经课题组前期研究发现,该剂量的黄连解毒汤为最佳给药剂量<sup>[15]</sup>)和金纳多组( $21.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。黄连解毒汤组和金纳多组小鼠每天按 $0.15\text{ mL}\cdot(10\text{ g})^{-1}$ 的给药体积经口灌胃对应药物,连续7 d,假手术组和模型组通过同样途径给予等量生理盐水(金纳多是一种银杏叶提取物,主要用于脑部、周围血流循环障碍<sup>[16]</sup>,可作为阳性药判断MCAO造模是否成功<sup>[17]</sup>)。

外泌体测序及后续机制验证实验部分将小鼠随机分为3组( $n=30$ ):假手术组、MCAO模型组和黄连解毒汤组( $6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。黄连解毒汤组小鼠每天按 $0.15\text{ mL}\cdot(10\text{ g})^{-1}$ 的给药体积经口灌胃对应药物,连续7 d,假手术组和模型组通过同样途径给予等量生理盐水(本研究在药效学实验中设置金纳多阳性对照组,用以验证模型建立及整体疗效;后续机制研究阶段的实验组别为空白组、MCAO模型组和黄连解毒汤组,主要聚焦黄连解毒汤干预的机制探索,因此未再设置金纳多阳性对照组)。

**2.2 小鼠MCAO模型制备** 小鼠脑缺血模型通过MCAO法建立<sup>[18-19]</sup>。操作时,将小鼠仰卧固定于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温加热垫上,在颈部做纵形切口以显露右侧颈总动脉(CCA)。首先结扎颈外动脉(ECA),随后在CCA远端和近端各行结扎,并于两结扎点之间切开血管。将圆头硅胶涂层单丝插入血管腔内,经颈内动脉推进直至阻断大脑中动脉(MCA)起始部。单丝留置1 h诱导短暂性局灶性脑缺血,之后拔出单丝恢复血流以完成24 h再灌注。假手术组仅将单丝插入CCA而不进入MCA,随后立即拔出,同时保留CCA永久结扎。术后根据神经功能缺损评分及TTC染色判断造模是否成功<sup>[20]</sup>。

**2.3 黄连解毒汤冻干粉制备** 为保证实验样品的稳定性与可重复性,本研究采用冻干技术对黄连解毒汤进行处理。通过在低温和真空条件下除去水

分,可有效防止样品中活性成分的降解、氧化及变性,从而保持其生物活性与理化性质的稳定,确保每次给药浓度一致。

制备方法<sup>[21]</sup>:黄连解毒汤中的黄连、黄芩、黄柏和栀子按比例3:2:2:3称取,黄连150 g、黄芩100 g、黄柏100 g和栀子150 g,4味药材混合后放入锅中,加入10倍体积的水(5 000 mL),浸泡1 h。然后加热至沸腾,电磁炉设定功率为1 600 W,沸腾后调至800 W,继续煮沸1 h,关火后趁热使用100目过滤袋过滤。再加入8倍体积的水(4 000 mL),重复加热煎煮与过滤步骤。将2次得到的药液合并,进行加热浓缩至2 000 mL(浓缩液的药物浓度为 $0.25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )后分装入容器中,用锡箔纸密封,储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻。药液完全冻固后,在锡箔纸上打孔,将样品放入冻干机进行冻干处理。最终得到140 g黄连解毒汤冻干粉,收率为28%。

**2.4 TTC染色** 缺血再灌注24 h后,将小鼠脑组织整体取出并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻30 min。取出后放置于冰盒上,用病理刀自冠状面方向切取2 mm厚度的连续脑切片。脑片置入含TTC溶液的黑色暗盒中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中避光孵育20 min,为保证染色均匀,可在孵育过程中适时翻面。染色完成后,将脑片转移至6孔板中加入多聚甲醛固定12 h,以利于后续图像采集。固定结束后,使用相同型号的拍摄设备在统一光照条件下对每只小鼠的脑切片逐一拍照。染色结果中,正常脑组织呈现深红色,梗死区域则呈白色。使用Image J软件,调节颜色阈值(色度、饱和度和亮度)分别选定全脑和白色缺血区,计算和分析全脑面积及各缺血区面积之和。缺血区面积百分比=各切片白色缺血区面积之和/各切片脑片面积之和 $\times 100\%$ 。

**2.5 神经功能缺损评分(Longa评分)** Longa神经功能评分分为5个等级<sup>[22]</sup>:0分为无神经功能缺陷;1分为瘫痪侧(右侧)前爪不能完全伸展;2分为行走时向瘫痪侧转圈;3分为行走时向瘫痪侧倾倒;4分为不能自动行走,存在意识丧失现象。小鼠神经功能缺损程度与分值呈正相关。当评分为0或4分,或评分前发现小鼠死亡,则排除,不用于后续实验。双盲评分:由2名独立研究者进行Longa评分,对实验分组(MCAO模型组、黄连解毒汤组和金纳多组)完全不知情。每只小鼠皆在术后24 h被分别评估,取2位评分者打出分数的均值作为最终该小鼠神经功能评分。所有评分结果由第三方统计人员整理和分析,以保证数据处理的客观性。

**2.6 激光散斑对比成像** 将待检测小鼠以三溴乙醇麻醉后,俯卧位固定于脑立体定位仪上,剃除头顶毛发并切开头皮,充分暴露颅骨,尤其是与大脑区域对应的部位应完全显露。随后清理颅骨区域以避免毛发影响检测。利用激光散斑血流成像系统,将探测位置准确瞄准小鼠颅骨正中合适部位以评估脑血流。各组小鼠均采集1 min的大脑激光散斑血流图像,并在此期间分析监测大脑皮层血流变化及其影像学特征。使用 Moor FLPI V60 软件,打开待分析数据,用矩形边框圈出待检测脑血流区域,选定起始和结束时间,计算和分析框选区域脑血流数值。

**2.7 HE染色** 缺血再灌注24 h后采用HE染色对脑组织病理学改变进行评估。小鼠经三溴乙醇麻醉后,依次用生理盐水和4%多聚甲醛经心脏灌注以固定组织,随后将完整脑组织取出并继续浸入4%多聚甲醛溶液中固定。组织经常规脱水、石蜡包埋及切片后进行HE染色,染色完成的切片再用无水乙醇和二甲苯处理以达到透明效果,最后用中性树胶封片并在显微镜下观察并成像记录。

**2.8 尼氏染色** 尼氏染色是一种用于观察大脑和脊髓组织中神经元结构的组织学方法。参照HE染色的取脑、组织包埋及切片步骤,对造模前和缺血再灌注24 h时的小鼠脑组织实施尼氏染色。染色后在显微镜下对切片进行观察及影像采集。使用 Image J 软件进行背景扣除和阈值设置,以突出神经元胞体,统计每个视野神经元数量。

**2.9 血浆外泌体提取** 血浆解冻后用0.8  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,为减少样本损失,过滤后用注射器吸取磷酸盐缓冲液(PBS)250  $\mu\text{L}$  冲洗滤器,使滤液总体积约1 mL并于室温备用。将凝胶排阻柱自4  $^{\circ}\text{C}$ 取出,置于排阻架上,去掉上下孔塞后用0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS冲洗10 mL以平衡柱体。待上层液体流尽后,将预处理的血浆1 mL全部加入柱中。样品完全进入填料后,上筛板液体流尽且无下流液时,将2 mL收集管置于柱下,加入0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS洗脱并收集外泌体,每次1 mL,共收集2 mL。所得洗脱液倒入100 kDa超滤管,4 000 $\times\text{g}$ 离心2 min,浓缩至约200  $\mu\text{L}$ ,得到血浆外泌体。

**2.10 脑组织外泌体提取** 使用冰冻切片机对小鼠脑组织进行切片后,将预先配制好的消化酶加入50 mL离心管中,并将装有组织切片的离心管置于37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育10~15 min,期间每隔5 min充分混匀1次以观察消化情况。孵育结束后,将组织消化

液置于冰上并用70  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤至新的15 mL离心管中,每管加入蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂(1:100)25  $\mu\text{L}$ 。随后按悬液差速离心程序处理:4  $^{\circ}\text{C}$ , 300 $\times\text{g}$ , 10 min; 2 000 $\times\text{g}$ , 10 min; 10 000 $\times\text{g}$ , 20 min,每步均将上清转移至新的离心管。所得上清通过0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤进入超速离心管,在4  $^{\circ}\text{C}$ , 150 000 $\times\text{g}$ 条件下超速离心2 h。弃去上清后,用0.4 mL+预冷PBS 0.4 mL(含蛋白酶及磷酸酶抑制剂)重悬沉淀,获得小囊泡。将经PBS 1 mL洗涤后的外泌体加入排阻柱中,当液面降至上筛板时继续加入PBS,并收集相应馏分至100 kDa超滤管,在4  $^{\circ}\text{C}$ , 4 000 $\times\text{g}$ 条件下离心1 min,超滤至适宜体积,得到脑组织外泌体。

**2.11 TEM下鉴定外泌体** 采用型号为H-7650的TEM观察外泌体形态。取外泌体溶液10  $\mu\text{L}$ 滴加于铜网上,室温孵育10 min后以无菌蒸馏水清洗,并用吸水纸去除多余液体。随后加入2%醋酸双氧铀10  $\mu\text{L}$ 于铜网上复染1 min,吸去浮液后在白炽灯下干燥2 min。最终将铜网置于TEM下,在80 kV电压下成像观察。

**2.12 外泌体的尺寸分布测量** 外泌体的尺寸分布是通过在EchoBiotech有限公司使用纳米流式细胞仪来测量的。将具有混合粒径(68、91、113、155 nm)的标准二氧化硅纳米颗粒装载到纳米流式细胞仪中,以生成标准曲线,随后再装载外泌体样品,根据标准曲线计算尺寸分布。

**2.13 蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定外泌体** 利用蛋白定量法(BCA)蛋白定量试剂盒对外泌体蛋白浓度进行检测,依据测定结果计算所需上样量(10~30  $\mu\text{g}$ )。按比例加入5 $\times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)缓冲液并充分混匀,于95  $^{\circ}\text{C}$ 水浴5 min使样品变性。变性后的样品进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离,电泳完成后将分离胶内的外泌体特征蛋白(阳性标志物Alix、TSG101、HSP70及阴性标志物Calnexin,“三阳一阴”)电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。膜经3%牛血清白蛋白(BSA)封闭后依次进行一抗(1:1 000)与二抗(1:10 000)孵育,孵育完成后进行显影曝光。使用Image J软件对目标蛋白条带进行灰度值计算和分析。

**2.14 外泌体RNA提取** 使用Exosome RNA Purification Kit RNA抽提试剂盒。向外泌体溶液100  $\mu\text{L}$ 中加入Buffer TL 700  $\mu\text{L}$ ,旋涡震荡混合均匀。加入Buffer EX 100  $\mu\text{L}$ ,盖上管盖,用力摇晃15 s混合均匀。4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离

心半径 10 cm,下同)。吸取上清转移到一个干净的 2 mL 离心管中,再加入 2 倍上清体积的无水乙醇,颠倒离心管数次以混合均匀。吸取混合液 700  $\mu\text{L}$  转移到核酸纯化柱中,12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 s。弃滤液,将核酸纯化柱置回到 2 mL 离心管中,将上述剩余的混合液转移到核酸纯化柱中,12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 s。弃滤液,将核酸纯化柱置回 2 mL 离心管中,加入 Buffer WA 700  $\mu\text{L}$ ,12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 s。弃滤液,将核酸纯化柱置回到 2 mL 离心管,加入 Buffer WBR 600  $\mu\text{L}$ ,12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 s。弃滤液,将核酸纯化柱置回到 2 mL 离心管中,14 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 1 min。弃 2 mL 离心管,将核酸纯化柱置于一个干净的 1.5 mL 离心管中,加入 RNase-free Water 35  $\mu\text{L}$ ,室温静置 1 min,12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 s 洗脱 RNA。弃纯化柱,得到外泌体 RNA。

**2.15 外泌体长链 RNA 文库构建及测序** 对于长链 RNA 文库,总 RNA 的 input 量为 0.25~10 ng,每个样本中加入 index 序列,通过 SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit 进行建库。文库质量经 Agilent Bioanalyzer 2100 和 Real-time PCR 评估。Index 标记的样本通过 TruSeq PECluster Kitv3-cBot-HS 在 acBot ClusterGeneration 系统中生成簇,然后在 Illumina HiSeq 平台进行双端测序。

**2.16 Real-time PCR 检测** Real-time PCR 相关的试剂和引物均来自湖南艾科瑞生物工程有限公司。使用 Evo M-mLV RT Premix for qPCR 将外泌体 RNA 反转录成 cDNA。反转录程序为 37  $^{\circ}\text{C}$ 、15 min;85  $^{\circ}\text{C}$ 、5 s;4  $^{\circ}\text{C}$  2 h。进行 PCR 反应,反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环。以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行相对定量分析,检测血浆外泌体及脑组织外泌体各样本目标基因 mRNA 相对表达量。使用的引物序列见表 1。

**2.17 酶联免疫吸附测定法(ELISA)** 使用试剂盒检测脑组织外泌体中 IL-1 $\beta$ 、CXCL2、CXCL10 及 MPO 的含量。将脑组织外泌体用 RIPA 缓冲液裂解,并用试剂盒样品稀释液将上样量调整至 50  $\mu\text{L}$ ,加入预包被特异性抗体的 ELISA 板孔中,于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。随后用洗涤缓冲液洗涤孔 5 次,加入 HRP 标记抗体溶液继续孵育 1 h,再次洗涤 5 次后加入 TMB 底物,37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 15 min。反应终止后,使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度  $A$ 。根据标准品浓度绘制  $A$ -浓度标准曲线,得到回归方

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CXCL1	上游 CCCAAACCGAAGTCATAGCC	148
	下游 CAGGTGCCATCAGAGCAGTC	
CXCL2	上游 GTCAAAAAGTTTGCCTTGACCCT	82
	下游 CAGTTAGCCTTGCCTTTGTTCAG	
CXCL3	上游 CCCAGACAGAAGTCATAGCC	192
	下游 CGTTGGGATGGATCGCTTTTC	
CXCL10	上游 CATCCTGCTGGGTCTGAGTG	111
	下游 AGCTTCCCTATGGCCCTCAT	
CCL2	上游 CCACTCACCTGCTGCTACTC	119
	下游 AGCTTGGTGACAAAACTACAGC	
CCL3	上游 CCATGACACTCTGCAACCAA	164
	下游 TCTCTTAGTCAGGAAAATGACACC	
IL-1 $\beta$	上游 TGGTGTGTGACGTTCCATT	174
	下游 TGTCGTTGCTTGGTTCTCCT	
MPO	上游 CCTCCATGCACACCCTCTT	153
	下游 GCAGGTAGTCCCGGTATGTG	
$\beta$ -actin	上游 CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC	171
	下游 ATGGAGCCACCGATCCACA	

注:CCL:趋化因子

程。将样品  $A$  代入标准曲线方程,计算目标蛋白浓度。

**2.18 免疫组化** 取各组小鼠脑组织固定、石蜡包埋并切片。依次将石蜡切片脱蜡,梯度乙醇脱水。随后将组织切片置于含柠檬酸抗原修复缓冲液(pH 6.0)修复盒中,于微波炉中火加热 8 min 至沸,停火保温 8 min,再以中低火加热 7 min,注意防止缓冲液过度蒸发及切片干裂。自然冷却后,将切片放入 PBS(pH 7.4)中于脱色摇床上洗涤。随后切片置于 3% 过氧化氢溶液中室温避光孵育 25 min,并再次 PBS 洗涤。甩干后用组化笔圈出组织区域,在圈内滴加 3% BSA 溶液封闭 30 min。弃去封闭液,滴加 MPO 特异性一抗(1:200)覆盖组织,于湿盒 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后甩干,滴加 HRP 标记二抗(1:500)覆盖组织,室温孵育 50 min,再次 PBS 洗涤。甩干后滴加新鲜 DAB 显色液,在显微镜下观察显色,阳性呈棕黄色,自来水冲洗终止反应。最后以苏木素复染约 3 min,流水漂洗,经分化液数秒分化后再漂洗并返蓝,流水冲洗完成染色。将切片梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。使用 Image J 软件将图片进行分通道处理,计算和分析平均光密度值和阳性率。

**2.19 统计学方法** 利用Graphpad Prism 9.2.0软件对本研究的实验数据进行统计,对各组实验数据进行正态性分布性检验和方差齐性检验后,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。3组及以上的比较,在满足正态分布条件下采用单因素方差分析(ANOVA)。若方差齐,两两比较用最小显著性差异法(LSD)检验;若方差不齐,两两比较用Tamhane's  $T_2$ 法近似检验。 $P < 0.05$ 表示有差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 黄连解毒汤对MCAO小鼠神经功能评分的影响** 通过Longa评分判断小鼠神经功能状态。与假手术组比较,MCAO模型组小鼠神经功能评分显著升高( $P < 0.01$ )。与MCAO模型组比较,黄连解毒汤组和金纳多组小鼠神经功能评分明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表2。

表2 黄连解毒汤对MCAO小鼠神经功能评分的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 2 Effect of Huanglian Jiedutang on neurological function scores in MCAO mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	神经功能评分/分
假手术组		0.00±0.00 <sup>2)</sup>
MCAO模型组		2.83±0.41
黄连解毒汤组	6	2.00±0.63 <sup>1)</sup>
金纳多组	0.021 6	1.67±0.52 <sup>2)</sup>

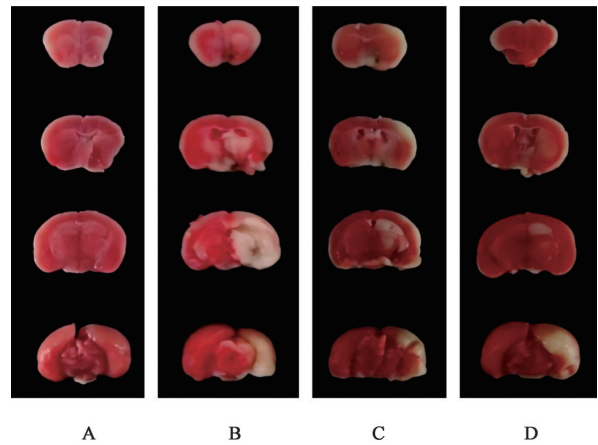
注:与MCAO模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表6和表8同)

**3.2 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑梗死面积的影响** TTC染色显示,与假手术组比较,MCAO模型组小鼠脑梗死面积显著增加( $P < 0.01$ )。与MCAO模型组比较,黄连解毒汤组和金纳多组脑梗死面积均显著减少( $P < 0.01$ )。见图1、表3。

**3.3 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑血流状态的影响** 激光散斑检测脑血流显示,假手术组小鼠大脑两侧脑血流无明显差异。与假手术组比较,MCAO模型小鼠在缺血再灌注24 h后,梗死侧脑血流量显著下降( $P < 0.01$ )。与MCAO模型组比较,黄连解毒汤组和金纳多组脑血流显著升高( $P < 0.01$ )。见图2、表4。

**3.4 黄连解毒汤对MCAO小鼠病理组织形态的影响**

**3.4.1 脑组织切片HE染色** 与假手术组比较,MCAO模型组小鼠脑区的细胞数量显著减少,细胞排列较为稀疏,细胞核明显固缩,染色较深,神经纤维出现紊乱。与MCAO模型组比较,黄连解毒汤组和金纳多组的小鼠脑区细胞数量有所恢复,细胞核



注:A.假手术组;B.MCAO模型组;C.黄连解毒汤组;D.金纳多组(图2-图4、图7同)

图1 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑梗死面积的影响  
Fig. 1 Effect of Huanglian Jiedutang on area of cerebral infarction in MCAO mice

表3 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑梗死面积的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 3 Effect of Huanglian Jiedutang on area of cerebral infarction in MCAO mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	脑梗死面积比/%
假手术组		0.00±0.00 <sup>1)</sup>
MCAO模型组		28.97±2.46
黄连解毒汤组	6	21.15±3.49 <sup>1)</sup>
金纳多组	0.021 6	20.05±2.92 <sup>1)</sup>

注:与MCAO模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ (表4、表5、表7、表9同)

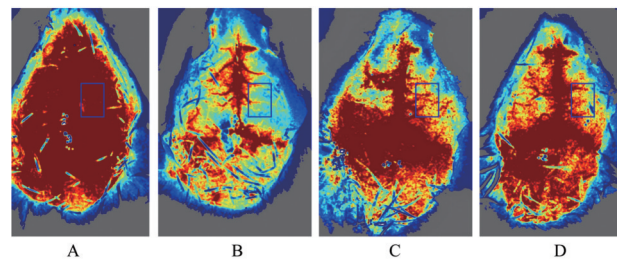


图2 激光散斑成像技术检测脑血流情况  
Fig. 2 Cerebral blood detection by laser scatter imaging

表4 黄连解毒汤对MCAO小鼠梗死侧脑血流的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 4 Effect of Huanglian Jiedutang on cerebral blood flow in infarcted side of MCAO mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	梗死测量ROI中的相对脑血流变化/PU
假手术组		1 314.4±90.69 <sup>1)</sup>
MCAO模型组		741.9±59.18
黄连解毒汤组	6	928.6±74.32 <sup>1)</sup>
金纳多组	0.021 6	1 021.1±88.33 <sup>1)</sup>

固缩程度减轻,坏死细胞的数量显著下降,细胞丢失得到显著改善,细胞轮廓清晰,形态与假手术组

更为接近。见图3。

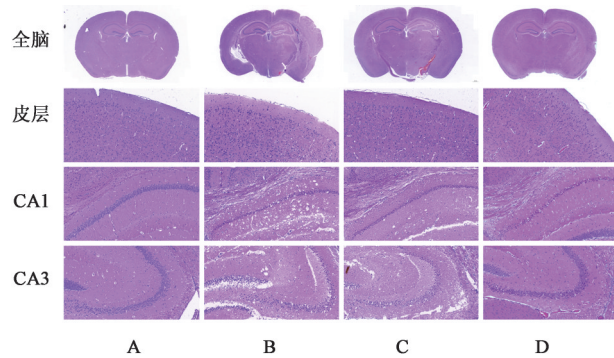


图3 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑组织病理形态的影响(HE, ×20, ×200)

Fig. 3 Effect of Huanglian Jiedutang on histopathological morphology of brain tissue in MCAO mice (HE, ×20, ×200)

**3.4.2 脑组织切片尼氏染色** 与假手术组比较, MCAO模型组小鼠大脑皮层和海马区的神经细胞发生变形,尼氏小体数量显著减少( $P<0.01$ ),细胞间质变得疏松,细胞轮廓不清晰。与MCAO模型组比较,黄连解毒汤组和金纳多组小鼠的脑内细胞状态有所改善,尼氏小体数量显著回升( $P<0.01$ ),细胞形态趋于正常,排列更加整齐。见图4、表5。

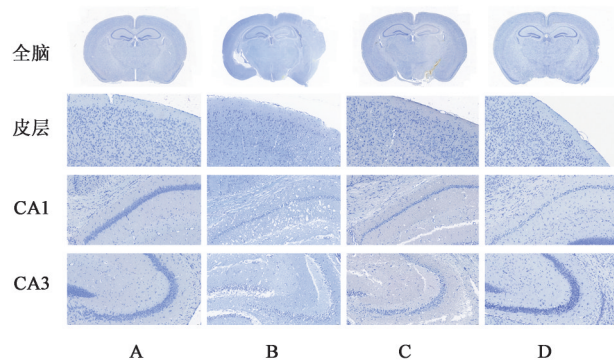


图4 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑组织病理形态的影响(尼氏, ×20, ×200)

Fig. 4 Effect of Huanglian Jiedutang on histopathological morphology of brain tissue in MCAO mice (Nissl, ×20, ×200)

表5 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑组织尼氏小体的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

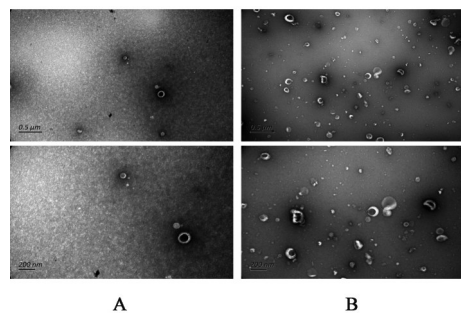
Table 5 Effect of Huanglian Jiedutang on brain tissues of MCAO mice with Nissl bodies ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	尼氏小体阳性率/%
假手术组		7.88±0.33 <sup>1)</sup>
MCAO模型组		0.62±0.13
黄连解毒汤组	6	1.66±0.18 <sup>1)</sup>
金纳多组	0.021 6	2.74±0.22 <sup>1)</sup>

**3.5 黄连解毒汤对MCAO小鼠外泌体中趋化因子表达谱的影响**

**3.5.1 血浆外泌体及脑组织外泌体的鉴定** 采用

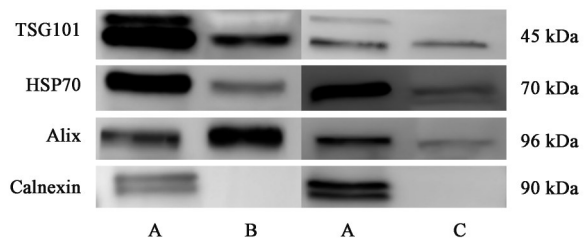
TEM对提取得到的外泌体进行形态学观察,结果显示,血浆外泌体与脑组织外泌体在视野中分布均匀,颗粒未见明显聚集,皆呈典型的双层脂质膜囊泡结构,表现为“杯状”外观(图5),符合外泌体的典型超微结构特征。外泌体的粒径主要分布于30~150 nm, NanoFCM分析表明,血浆外泌体的尺寸平均值为73.75 nm;脑组织外泌体的尺寸平均值为72.75 nm,且都呈单峰分布(见增强出版附加材料),符合外泌体特征。在蛋白层面,选用TSG101、Alix、HSP70和Calnexin作为检测指标。其中,TSG101与Alix为内体分选复合体(ESCRT)相关蛋白,TSG101是ESCRT-I的主要表达蛋白,促进膜内陷的形成;Alix是ESCRT辅助蛋白的主要表达蛋白,参与连接ESCRT各复合体,协助膜修复与外泌体释放。HSP70为热休克蛋白,参与外泌体的膜融合及蛋白装载过程。而Calnexin为细胞内膜蛋白,常作为阴性标志,用于排除细胞碎片或内质网污染。采用此“三阳一阴”的经典鉴别组合,可有效验证外泌体的纯度与特异性。Western blot结果显示,血浆外泌体与脑组织外泌体中TSG101、Alix和HSP70呈阳性表达,而Calnexin为阴性(图6),进一步证实了血浆外泌体及脑组织外泌体已实现有效分离。



注:A.血浆外泌体;B.脑组织外泌体

图5 血浆及脑组织外泌体形态(TEM, 500 nm, 200 nm)

Fig. 5 Plasma and brain tissue exosomes morphology (TEM, 500 nm, 200nm)



注:A.空白组;B.血浆外泌体;C.脑组织外泌体

图6 血浆及脑组织外泌体TSG101、HSP70、Alix及Calnexin的蛋白电泳

Fig. 6 Electrophoresis of plasma and brain tissue exosomes TSG101, HSP70, Alix and Calnexin proteins

**3.5.2 黄连解毒汤对MCAO小鼠血浆及脑组织外泌体中趋化因子表达谱的影响** 与假手术组比较, MCAO模型组小鼠外泌体中趋化因子的表达显著升高。与MCAO模型组比较, 黄连解毒汤给药后外泌体内趋化因子的表达显著减少。血浆及脑组织外泌体长链RNA测序见增强出版附加材料。

**3.5.3 黄连解毒汤对MCAO小鼠血浆及脑组织外泌体炎症及趋化因子表达的影响** 与假手术组比较, MCAO模型组小鼠相关炎症因子mRNA表达均明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ), 黄连解毒汤给药后, 血浆及脑组织外泌体中这些炎症及趋化因子mRNA表达均呈现明显下降( $P<0.05, P<0.01$ )。见表6、表7。

表6 黄连解毒汤对MCAO小鼠血浆外泌体内相关炎症因子mRNA表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 6 Effect of Huanglian Jiedutang on mRNA expression of inflammatory factors associated with plasma exosomes in MCAO mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	MPO	CCL2	CCL3	CXCL1	CXCL2	CXCL3	CXCL10
假手术组		1.00±0.23 <sup>1)</sup>	1.00±0.35 <sup>2)</sup>	1.00±0.12 <sup>2)</sup>	1.00±0.11 <sup>2)</sup>	1.00±0.59 <sup>2)</sup>	1.00±0.02 <sup>2)</sup>	1.00±0.15 <sup>2)</sup>	1.00±0.18 <sup>2)</sup>
MCAO模型组		2.27±0.61	9.23±2.87	5.95±1.23	2.01±0.25	2.81±0.69	10.70±1.45	2.44±0.35	4.27±0.58
黄连解毒汤组	6	0.93±0.22 <sup>2)</sup>	5.05±0.39 <sup>1)</sup>	3.61±1.40 <sup>1)</sup>	1.28±0.09 <sup>2)</sup>	1.64±0.64 <sup>1)</sup>	3.56±0.79 <sup>2)</sup>	0.98±0.35 <sup>2)</sup>	0.88±0.09 <sup>2)</sup>

表7 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑组织外泌体内相关炎症因子mRNA表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 7 Effect of Huanglian Jiedutang on mRNA expression of inflammatory factors associated with brain tissue exosomes in MCAO mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	MPO	CCL2	CCL3	CXCL1	CXCL2	CXCL3	CXCL10
假手术组		1.00±0.25 <sup>1)</sup>	1.00±0.38 <sup>1)</sup>	1.00±0.32 <sup>1)</sup>	1.00±0.15 <sup>1)</sup>	1.00±0.15 <sup>1)</sup>	1.00±0.08 <sup>1)</sup>	1.00±0.18 <sup>1)</sup>	1.00±0.20 <sup>1)</sup>
MCAO模型组		3.28±0.24	2.18±0.48	2.06±0.37	5.86±1.23	8.48±0.77	6.82±1.55	1.84±0.18	3.13±0.34
黄连解毒汤组	6	1.26±0.30 <sup>1)</sup>	0.95±0.20 <sup>3)</sup>	1.31±0.32 <sup>1)</sup>	1.82±0.74 <sup>1)</sup>	3.75±0.89 <sup>1)</sup>	3.61±1.14 <sup>1)</sup>	0.98±0.15 <sup>1)</sup>	1.69±0.27 <sup>1)</sup>

**3.5.4 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑组织外泌体炎症及趋化因子表达的影响** 大脑作为缺血性脑卒中发生后的主要损伤区域, 与假手术组比较, MCAO模型组小鼠脑组织外泌体内相关炎症及趋

化因子表达明显升高, 差异具有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ )。与MCAO模型组比较, 黄连解毒汤组则明显减轻了这些因子的表达( $P<0.05, P<0.01$ )。见表8。

表8 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑组织外泌体内相关炎症因子蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 8 Effect of Huanglian Jiedutang on protein expression of inflammatory factors associated with brain tissue exosomes in MCAO mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	MPO	CXCL2	CXCL10
假手术组		69.72±2.34 <sup>2)</sup>	160.4±13.74 <sup>1)</sup>	554.8±34.64 <sup>2)</sup>	119.3±10.30 <sup>2)</sup>
MCAO模型组		76.49±2.76	182.0±13.95	700.4±63.82	145.5±5.15
黄连解毒汤组	6	71.33±4.53 <sup>1)</sup>	153.0±9.69 <sup>2)</sup>	595.6±24.31 <sup>2)</sup>	123.7±6.96 <sup>2)</sup>

**3.6 黄连解毒汤对中性粒细胞脑内浸润及继发性脑损伤的影响** 中性粒细胞为本研究分离外泌体的受体细胞之一。利用特异性MPO抗体标记脑内中性粒细胞及免疫组化检测, 研究发现, 与假手术组比较, MCAO模型组小鼠脑区出现大量浸润的中性粒细胞( $P<0.01$ )。与MCAO模型组比较, 黄连解毒汤组小鼠脑区中性粒细胞浸润现象显著较少( $P<0.01$ )。见图7、表9。

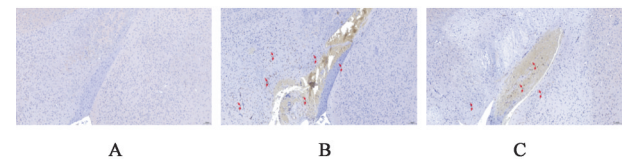


图7 黄连解毒汤对脑区MPO蛋白表达的影响(免疫组化,  $\times 100$ )  
Fig. 7 Effect of Huanglian Jiedutang on MPO protein expression in brain regions (IHC,  $\times 100$ )

#### 4 讨论

缺血性脑卒中在中医上属“中风”范畴, 其防治理论历史悠久并逐步形成系统化体系。王永炎院

士创新性地提出“毒损脑络”学说, 认为毒邪侵袭可致脑络受损, 络脉破裂或拘挛瘀闭, 气血运行失衡, 脑失所养, 进而出现神昏、偏瘫等症状<sup>[23]</sup>。近年来, 中医将中风后的病理损害多归于热毒、火毒等范

表9 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑内中性粒细胞浸润的影响  
( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 9 Effect of Huanglian Jiedutang on neutrophil infiltration in brain of MCAO mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	平均光密度值(×1 000)	阳性率/%
假手术组		0.25±0.26 <sup>1)</sup>	0.06±0.07 <sup>1)</sup>
MCAO模型组		3.76±0.94	1.07±0.23
黄连解毒汤组	6	1.14±0.43 <sup>1)</sup>	0.37±0.20 <sup>1)</sup>

畴<sup>[24]</sup>,并提出“热瘀互结,结而为毒,毒损脑络”的病机假说<sup>[25]</sup>,认为中风难以康复的根源在于络脉阻滞导致营卫失调与卫气滞留,进一步生成火毒,加重脑络损伤。由此,治疗应以祛毒通络、调和营卫之气为核心,以促进脑功能恢复<sup>[26]</sup>。

在缺血性脑卒中的急性期,大量外周免疫细胞迁入脑组织及脑膜,触发并放大神经免疫反应,从而加重缺血性损伤<sup>[27]</sup>。其中,中性粒细胞是最早进入缺血脑区的外周细胞,在中风后1~3 d即可穿越受损的血脑屏障进入脑实质,促使血脑屏障进一步破坏<sup>[28]</sup>。浸润后的中性粒细胞不仅释放活性氧(ROS)<sup>[29]</sup>、炎症介质和基质金属蛋白酶(MMPs)<sup>[30]</sup>,加剧局部炎症反应与屏障结构损伤,还可形成中性粒细胞胞外陷阱(NETs)<sup>[31]</sup>。NETs的网状结构可促进血小板聚集、与脑内皮细胞黏附,并为血栓形成提供支架,从而引发微血管的闭塞,加速中风进展<sup>[32-34]</sup>。从中医此类“无复流”的病机角度来看,中性粒细胞在中风后向脑组织的迁移及在脑血管内的阻塞,均可视为“毒”对脑络的侵袭与破坏。因此,抑制中风后中性粒细胞对脑内的浸润,可能成为缺血性脑卒中的重要治疗策略。

清热解毒法是中医治疗中风的重要手段,其旨在通过清热泻火与解毒祛邪,减少毒素对脑络及神经系统的损伤<sup>[35-36]</sup>。黄连解毒汤作为其中的代表方剂,在临床研究中已显示出对缺血性脑卒中患者的显著疗效<sup>[37-38]</sup>。基于“解毒通络”理论,该方剂能够抑制炎症反应,阻断中性粒细胞向缺血脑区的迁移,从而实现清热解毒与保护脑络的双重作用。课题组的前期实验结果证实,黄连解毒汤干预可明显减少脑内中性粒细胞数量,提示其可能通过调控中性粒细胞浸润进而改善缺血性脑卒中的预后。

近年来,尽管多种神经保护剂在急性缺血性脑卒中中显示出潜在疗效,但药物毒性及血脑屏障通透性不足等因素,仍严重限制其临床应用<sup>[39]</sup>。在此背景下,外泌体因其微小结构、低免疫原性、易获取及能够跨越血脑屏障等特性而受到关注<sup>[40]</sup>。作为

一种由细胞分泌而来的小型囊泡,其可携带蛋白质、脂质、DNA片段及多种核酸<sup>[41-42]</sup>,并且通过多种途径与靶细胞相互作用,介导分子递送与信号调控<sup>[43]</sup>。黄连解毒汤能否通过调控外泌体所携带的关键活性分子,从而影响中性粒细胞浸润,改善缺血性脑卒中的结局,是亟需阐明的重要科学问题。深入探索这一机制,不仅有助于揭示中医药干预中风的现代生物学基础,也为开发兼具中医特色与现代精准治疗理念的新型干预策略提供了潜在方向。

在此背景下,本研究首先探讨了黄连解毒汤对缺血性脑卒中的改善作用。结果显示,与假手术组相比,模型组小鼠的脑梗死面积显著增大,大脑患侧血流量明显下降,脑组织中出现大量细胞坏死。与模型组比较,给予黄连解毒汤治疗后,小鼠脑梗死面积减小,患侧血量得到明显改善,脑内尼氏小体数量增加,提示黄连解毒汤可以有效改善缺血性脑卒中。在此基础上,为进一步明确黄连解毒汤是否通过调控外泌体这一新型细胞间信号传递途径来改善脑卒中,本研究对小鼠血浆及脑组织外泌体进行了长链RNA测序,以期解析黄连解毒汤的具体作用机制。结果显示,与假手术组比较,模型组小鼠外泌体中与中性粒细胞相关的趋化因子表达显著上调。与模型组比较,黄连解毒汤干预可明显下调这些趋化因子的表达。免疫组化结果进一步证实,模型组小鼠脑组织内存在大量中性粒细胞浸润,而黄连解毒汤治疗能够显著减轻这一病理现象。

目前尚难确定黄连解毒汤调节外泌体mRNA的具体路径,可能的机制包括通过调控母体细胞内miRNA的表达从而间接调节其靶mRNA的表达水平;通过影响RBPs的表达或活性,参与mRNA的筛选与装载过程;或通过干预ESCRT复合体等关键通路,从源头上影响外泌体生成及其内容物特征。上述假设有待在后续研究中通过细胞标记追踪技术、功能性组学方法及机制性实验进一步验证。

综上所述,本研究结果表明,黄连解毒汤可以有效调节MCAO小鼠血浆及脑组织外泌体内与中性粒细胞相关的趋化因子表达,从而减少脑内中性粒细胞的浸润,以此达到治疗效果。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] CANDELARIO-JALIL E, DIJKHUIZEN R M, MAGNUS T. Neuroinflammation, stroke, blood-brain barrier dysfunction,

- and imaging modalities[J]. *Stroke*, 2022, 53(5):1473-1486.
- [ 2 ] MARTIN S S, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. 2024 Heart disease and stroke statistics: A report of US and global data from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2024, 149(8):e347-e913.
- [ 3 ] 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.
- [ 4 ] MENDELSON S J, PRABHAKARAN S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: A review [J]. *JAMA*, 2021, 325(11):1088-1098.
- [ 5 ] VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4):213-228.
- [ 6 ] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478):eaau6977.
- [ 7 ] HERRMANN I K, WOOD M J A, FUHRMANN G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform [J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16(7):748-759.
- [ 8 ] KEERTHIKUMAR S, CHISANGA D, ARIYARATNE D, et al. ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(4):688-692.
- [ 9 ] PATHAN M, FONSEKA P, CHITTI S V, et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D516-D519.
- [ 10 ] CHEN C, ZHOU Y, SHENG L, et al. Glycolytic enzyme HK2 phosphorylates nSMase1 to promote astrocytic exosomes biogenesis contributing to acute ischemic stroke injury [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(39):e01894.
- [ 11 ] MIRZAEI H, MOMENI F, SAADATPOUR L, et al. MicroRNA: Relevance to stroke diagnosis, prognosis, and therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2):856-865.
- [ 12 ] JAFARZADEH-ESFEHANI R, SOUDYAB M, PARIZADEH S M, et al. Circulating exosomes and their role in stroke [J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(1):89-95.
- [ 13 ] 要莹莹, 樊飞燕, 李少康, 等. 芪芍左归复方干预骨髓间充质干细胞分泌体对缺血性脑卒中大鼠血脑屏障通透性的影响及抗衰老作用 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(18):5016-5024.  
YAO Y Y, FAN F Y, LI S K, et al. Effects of Qixiong Zuogui compound prescription on blood-brain barrier permeability of rats with ischemic stroke by interfering in exosomes of bone marrow stem cells and its anti-aging effects [J]. *China J Chin Mater Med*, 2024, 49(18):5016-5024.
- [ 14 ] WANG M, YANG Y, GUO Y, et al. Xiaoxuming decoction cutting formula reduces LPS-stimulated inflammation in BV-2 cells by regulating miR-9-5p in microglia exosomes [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1183612.
- [ 15 ] WANG K, SUN Z, SHAO Q, et al. Modulation of double-negative T cells by Huang-Lian-Jie-Du decoction attenuates neuroinflammation in ischemic stroke: Insights from single-cell transcriptomics [J]. *Front Immunol*, 2025, 16:1537277.
- [ 16 ] 王乐乐, 张伟杰, 王建军, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液的药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2024, 55(6):837-844.  
WANG L L, QIANG W J, WANG J J, et al. Research progress of pharmacological actions and clinical applications of diterpene ginkgolides meglumine injection [J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(6):837-844.
- [ 17 ] LI X, HUANG L, LIU G, et al. Ginkgo diterpene lactones inhibit cerebral ischemia/reperfusion induced inflammatory response in astrocytes via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249:112365.
- [ 18 ] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [ 19 ] GÜZEL A, RÖLZ R, NIKKHAH G, et al. A microsurgical procedure for middle cerebral artery occlusion by intraluminal monofilament insertion technique in the rat: A special emphasis on the methodology [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2014, 6:6.
- [ 20 ] 康赉赉, 唐东宁, 张健, 等. 电凝法制作 C57/BL6J 小鼠局灶性脑缺血模型的评价 [J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(1):100-107.  
KANG Y Y, TANG D N, ZHANG J, et al. Validation of a C57/BL6J mouse model of focal cerebral ischemia established by electrocoagulation of the middle cerebral artery [J]. *J South Med Univ*, 2024, 44(1):100-107.
- [ 21 ] CHEN C, LI C, LAN X, et al. Huang-Lian-Jie-Du decoction inhibits CD4<sup>+</sup> T cell infiltration into CNS in MCAO rats by regulating BBB [J]. *Phytomedicine*, 2025, 141:156607.
- [ 22 ] LI Y, TAN L, YANG C, et al. Distinctions between the Koizumi and Zea Longa methods for middle cerebral artery occlusion (MCAO) model: A systematic review and Meta-analysis of rodent data [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):10247.
- [ 23 ] 李澎涛, 王永炎, 黄启福. “毒损脑络”病机假说的形成及其理论与实践意义 [J]. *北京中医药大学学报*, 2001, 24(1):1-6, 16.  
LI P T, WANG Y Y, HUANG Q F. The hypothesis of the injury of brain collaterals by toxins and its theoretical and practical significance [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2001, 24(1):1-6, 16.
- [ 24 ] 田雨沐, 潘菊华. 基于“热毒理论”探讨“血热”“热毒”病机在中风急性期的演变规律 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(8):108-112.  
TIAN Y M, PAN J H. Exploration of the evolution of the pathogenesis of "blood heat" and "heat toxin" in the acute stage of stroke based on the "Heat-Toxin theory" [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2023, 25(8):108-112.
- [ 25 ] 康利高阁, 孔令博, 高颖. 基于毒邪和玄府理论探析急性缺血性中风早期神经功能恶化的中医病机 [J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44(7):625-630.

- KANG L G G, KONG L B, GAO Y. TCM pathogenesis of early neurological deterioration in acute ischemic stroke based on the theory of "Toxin" and "Xuanfu" [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2021, 44(7): 625-630.
- [26] 田桤, 张向宇, 牛博真, 等. 基于“毒损脑络”理论中医脑病病因病机和辨证施治的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(8): 1308-1310.
- TIAN K, ZHANG X Y, NIU B Z, et al. Research review on etiology, pathogenesis and syndrome differentiation of traditional chinese medicine encephalopathy based on "Toxin damaging brain collaterals" theory [J]. *Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis*, 2021, 19(8): 1308-1310.
- [27] IADECOLA C, BUCKWALTER M S, ANATHER J. Immune responses to stroke: Mechanisms, modulation, and therapeutic potential [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(6): 2777-2788.
- [28] ZHAO Z, PAN Z, ZHANG S, et al. Neutrophil extracellular traps: A novel target for the treatment of stroke [J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 241: 108328.
- [29] TANG C, WANG C, ZHANG Y, et al. Recognition, intervention, and monitoring of neutrophils in acute ischemic stroke [J]. *Nano Lett*, 2019, 19(7): 4470-4477.
- [30] CAI W, LIU S, HU M, et al. Functional dynamics of neutrophils after ischemic stroke [J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(1): 108-121.
- [31] LI C, XING Y, ZHANG Y, et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate ischemic brain damage [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(1): 643-656.
- [32] LARIDAN E, DENORME F, DESENDER L, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi [J]. *Ann Neurol*, 2017, 82(2): 223-232.
- [33] DENORME F, PORTIER I, RUSTAD J L, et al. Neutrophil extracellular traps regulate ischemic stroke brain injury [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(10): e154225.
- [34] WIGERBLAD G, KAPLAN M J. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(5): 274-288.
- [35] 陈霞. 论清热化痰解毒通络法治缺血性中风之要义 [J]. *光明中医*, 2025, 40(4): 773-775.
- CHEN X. Essential principles of the method of heat-clearing, resolving stasis, detoxifying, and unblocking channels in the treatment of ischemic stroke [J]. *Guangming J Chin Med*, 2025, 40(4): 773-775.
- [36] 宋颖民, 郭甜甜, 王冰. 清热解毒法治疗中风病急性期的相关探讨 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2017, 15(2): 130-131.
- SONG Y M, GUO T T, WANG B. Discussion on heat-clearing and detoxifying method in the treatment of acute phase stroke disease [J]. *Chin Med Mod Dist Educ*, 2017, 15(2): 130-131.
- [37] 陈桂霞. 黄连解毒汤加味治疗缺血性中风30例疗效分析 [J]. *中医临床研究*, 2015, 7(36): 49-50.
- CHEN G X. Effect analysis of Huanglian Jiedu decoction in treating ischemic stroke [J]. *Clin J Chin Med*, 2015, 7(36): 49-50.
- [38] 李鹏, 张小雪. 黄连解毒汤治疗缺血性中风50例 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2015, 13(18): 55-56.
- LI P, ZHANG X X. Huanglian Jiedu decoction in the treatment of ischemic stroke for 50 cases [J]. *Chin Med Mod Dist Edu*, 2015, 13(18): 55-56.
- [39] PAUL S, CANDELARIO-JALIL E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies [J]. *Exp Neurol*, 2021, 335: 113518.
- [40] YANG J, LI Y, JIANG S, et al. Engineered brain-targeting exosome for reprogramming immunosuppressive microenvironment of glioblastoma [J]. *Exploration*, 2025, 5(2): 20240039.
- [41] VAN BALKOM B W M, EISELE A S, PEGTEL D M, et al. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 26760.
- [42] LASDA E, PARKER R. Circular RNAs Co-precipitate with extracellular vesicles: A possible mechanism for circRNA clearance [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148407.
- [43] DING X, ZOU G, MA N, et al. Knowledge mapping of exosomes in ischemic stroke: A bibliometric analysis [J]. *Front Neurol*, 2025, 16: 1595379.

[责任编辑 张丰丰]