

基于单细胞转录组探索黄连解毒汤调控小胶质细胞的代谢重编程抑制神经炎症损害

孙资金¹, 张浩嘉¹, 王凯¹, 宋粼静², 王传尊³, 王雯³, 吉静⁴, 王昭懿¹, 徐文秀⁵,
王庆国¹, 王雪茜^{1*}, 程发峰^{1*}

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 102446; 2. 北京中医药大学第一临床医学院, 北京 100700;
3. 沧州中西医结合医院, 河北 沧州 061001; 4. 安徽中医药大学中西医结合学院, 合肥 230038;
5. 康复大学生命科学与健康学院, 山东 青岛 266113)

[摘要] 目的: 该研究旨在通过单细胞转录组测序技术, 探讨脑缺血-再灌注损伤过程中的代谢重编程特征, 分析小胶质细胞群体的异质性, 并评估黄连解毒汤对代谢异常与神经炎症的干预作用。方法: 该研究采用大脑中动脉闭塞(MCAO)模型构建小鼠缺血性卒中。使用激光散斑成像监测局部脑血流量变化, 以Zea-Longa评分评估神经功能受损程度, 并通过苏木素-伊红(HE)与尼氏(Nissl)染色观察脑组织病理损伤情况。动物分为假手术组、模型组、黄连解毒汤组和银杏叶提取物组, 适应饲养1周后开始灌胃给药: 假手术组和模型组给予生理盐水, 黄连解毒汤组按 $1.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药, 银杏叶提取物组配制成 $2.16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液后按 $0.432\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药, $0.2\text{ mL}\cdot(10\text{ g})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 各组均连续5 d, 第6天末次给药后实施tMCAO建模。在分子层面, 将缺血半球组织进行单细胞RNA测序。利用非负矩阵分解(NMF)进行小胶质细胞亚群聚类, 并结合差异表达分析、代谢重编程评估及炎症因子相关性分析, 解析其在缺血-再灌注损伤中的功能特征。进行转录因子富集分析以识别关键调控节点。最后, 通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测相关mRNA表达变化, 验证单细胞测序。结果: 与假手术组比较, 模型组神经功能评分显著升高($P<0.01$), 血流量水平显著下降($P<0.01$), 皮质结构紊乱, 胞体空泡化水平增加, Nissl小体增加; 与模型组比较, 黄连解毒汤组与银杏叶提取物组神经功能评分显著降低($P<0.01$), 血流量水平显著升高($P<0.01$), 皮质结构紊乱减轻, 胞体空泡化水平减低, Nissl小体减少。单细胞分析表明, 小胶质细胞可分为5类亚群, 其中第3群和第5群小胶质细胞表现出显著促炎性表型, 且缺氧和NF- κ B信号通路显著激活, 为促炎亚群; 第1、2群小胶质细胞富集Wnt/ β -catenin和转化生长因子- β (TGF- β)信号通路, 表现出明显抑炎与修复性特征。促炎亚群中糖酵解相关基因, 如己糖激酶2(HK2)、PFKP、乳酸脱氢酶A(LDHA)上调。炎症分子的表达水平与糖酵解相关基因表达水平呈正相关, 而修复与抑炎分子的表达水平与糖酵解相关基因表达水平呈负相关, 提示小胶质细胞在缺血环境下依赖糖酵解途径获取能量。单细胞转录组发现, 黄连解毒汤能够有效降低促使代谢重编程的关键基因(如HK2、PFKP、LDHA)的表达, 显著减少伴随糖酵解重编程的小胶质细胞亚群比例, 抑制其向损伤表型转化, 从而降低炎症损伤。与假手术组比较, 模型组小鼠白细胞介素(IL)- 1β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、CCL2、CXCL2、CSF3 mRNA表达水平显著上调($P<0.01$), 且RGS5、PECAM1、VEGFB与NOS3等内皮与周细胞功能相关mRNA表达水平显著下调($P<0.01$); 与模型组比较, 黄连解毒汤组与银杏叶提取物组IL- 1β 、IL-6、TNF- α 、CCL2、CXCL2、CSF3 mRNA表达显著下调($P<0.01$), 且RGS5、PECAM1、VEGFB与NOS3等内皮与周细胞功能相关mRNA表达显著上调($P<0.01$)。结论: 黄连解毒汤能够通过调控小胶质细胞的代谢重编程状态, 调控其炎症水平, 从而发挥神经保护的作用, 抑制神经炎症损害。

[关键词] 单细胞转录组; 小胶质细胞; 代谢重编程; 黄连解毒汤; 神经炎症

[中图分类号] R256; R259; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)08-0064-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260127

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251216.1116.003>

[网络出版日期] 2025-12-16 16:42:32 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Regulatory Role of Huanglian Jiedutang in Microglial Metabolic Reprogramming to Suppress Neuroinflammatory Damage Based on Single-cell Transcriptomics

SUN Zijin¹, ZHANG Haojia¹, WANG Kai¹, SONG Linjing², WANG Chuazun³, WANG Wen³, JI Jing⁴,

[收稿日期] 2025-08-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(U21A20400)

[第一作者] 孙资金, 博士, 从事生物信息与系统生物学的心脑血管疾病与中医药防治研究, E-mail: 20210931013@bucm.edu.cn

[通信作者] * 王雪茜, 博士, 教授, 博士生导师, 从事经方药效机制及物质基础研究, E-mail: shirlyding@163.com;

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

WANG Zhaoyi¹, XU Wenxiu⁵, WANG Qingguo¹, WANG Xueqian^{1*}, CHENG Fafeng^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102446, China; 2. First Clinical Medical School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 3. Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061001, China; 4. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 5. School of Life Sciences and Health, University of Rehabilitation, Qingdao 266113, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the characteristics of metabolic reprogramming during cerebral ischemia-reperfusion injury using single-cell transcriptome sequencing, analyze the heterogeneity of microglial populations, and evaluate the interventional effects of Huanglian Jiedutang on metabolic abnormalities and neuroinflammation. **Methods:** A transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) model was used to establish ischemic stroke in mice. Local cerebral blood flow changes were monitored by laser speckle imaging. Neurological impairment was evaluated using the Zea-Longa score, and histopathological damage in brain tissue was observed by HE and Nissl staining. Animals were divided into a sham group, model group, Huanglian Jiedutang group, and *Ginkgo biloba* extract (GBE) group. After 1 week of acclimatization, intragastric administration was initiated. The sham and model groups received normal saline, the Huanglian Jiedutang group was administered 1.82 g·kg⁻¹, and the GBE group was administered 0.432 g·kg⁻¹ after preparation as a 2.16 mg/mL solution. All groups were treated for 5 consecutive days (0.2 mL/10 g/day), and the tMCAO model was established on day 6 after the final administration. At the molecular level, single-cell RNA sequencing was performed on ischemic hemisphere tissue. Non-negative matrix factorization (NMF) was used to cluster microglial subpopulations, combined with differential expression analysis, metabolic reprogramming assessment, and inflammatory factor correlation analysis to elucidate their functional characteristics in ischemia-reperfusion injury. Transcription factor enrichment analysis was further conducted to identify key regulatory nodes. Finally, PCR was used to detect mRNA expression changes of relevant genes to validate the single-cell sequencing results. **Results:** Compared with the sham group, the model group showed increased neurological function scores ($P<0.01$), decreased blood flow levels ($P<0.01$), disordered cortical structure, increased cytoplasmic vacuolization, and increased Nissl bodies. Compared with the model group, the Huanglian Jiedutang and GBE groups showed decreased neurological function scores ($P<0.01$), increased blood flow levels ($P<0.01$), alleviated cortical structural disorder, reduced cytoplasmic vacuolization, and decreased Nissl bodies. Single-cell analysis showed that microglia could be divided into five subpopulations. Among them, clusters 3 and 5 exhibited significant pro-inflammatory phenotypes, with marked activation of hypoxia and NF- κ B signaling pathways, and were identified as pro-inflammatory subpopulations. Clusters 1 and 2 were enriched in Wnt/ β -catenin and transforming growth factor(TGF)- β signaling pathways and exhibited prominent anti-inflammatory and reparative characteristics. Meanwhile, glycolysis-related genes, such as HK2, PFKP, and LDHA, were significantly upregulated in the pro-inflammatory subpopulations. Correlation analysis showed that the expression levels of inflammatory molecules were positively correlated with glycolysis-related gene expression levels, whereas the expression levels of reparative and anti-inflammatory molecules were negatively correlated with glycolysis-related gene expression levels, indicating that microglia rely on the glycolytic pathway for energy acquisition under ischemic conditions. Further single-cell transcriptome analysis revealed that Huanglian Jiedutang effectively downregulated key genes driving metabolic reprogramming (such as HK2, PFKP, and LDHA), significantly reduced the proportion of microglial subpopulations accompanied by glycolytic reprogramming, and inhibited their transformation toward a damage phenotype, thereby reducing inflammatory injury. Meanwhile, compared with the sham group, the mRNA expression levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor(TNF)- α , CCL2, CXCL2, and CSF3 were significantly upregulated ($P<0.01$) in the model group, whereas the mRNA expression levels of endothelial- and pericyte-related functional genes, including RGS5, PECAM1, VEGFB, and NOS3, were significantly downregulated ($P<0.01$). In contrast, compared with the model group, the Huanglian Jiedutang and GBE groups showed significantly decreased mRNA expression levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL2, CXCL2, and CSF3 ($P<0.01$), and significantly increased mRNA expression levels of endothelial- and pericyte-related functional genes, including RGS5, PECAM1, VEGFB, and NOS3 ($P<0.01$). **Conclusion:** Huanglian Jiedutang exerts neuroprotective effects by regulating the metabolic reprogramming state of microglia and modulating their inflammatory levels, thereby inhibiting neuroinflammatory injury.

[Keywords] single-cell transcriptomics; microglia; metabolic reprogramming; Huanglian Jiedutang; neuroinflammation

在脑缺血发生后,小胶质细胞作为中枢神经系统的常驻免疫细胞,能够迅速感知局部的缺血性病理变化并被激活。激活后的小胶质细胞发生显著的代谢重编程,从线粒体主导的氧化磷酸化转向以

糖酵解为主的代谢模式,以适应促炎表型的快速能量需求,并促进炎症介质的合成与分泌^[1-2]。研究显示,阻断小胶质细胞的糖酵解过程可显著减轻脑组织的炎症反应和功能损害,表明小胶质细胞代谢途

径的调控具有重要的治疗潜力^[1]。进一步研究表明,小胶质细胞的代谢状态与其功能之间存在紧密联系:当其代谢朝向糖酵解倾斜时,细胞趋于M1型促炎表型;而通过促进氧化磷酸化活性,则有可能诱导其向M2型抗炎修复表型转化,从而减轻缺血后的神经损伤^[3]。黄连解毒汤是清热解毒代表方剂,其记载首次见于《肘后备急方》,由黄连、黄芩、黄柏、栀子组成,主治各种实热火毒及三焦热盛之证。现代研究表明,黄连解毒汤可对缺血性脑卒中、阿尔茨海默病等多种神经系统疾病有着治疗作用,具有神经保护、抗炎等多种作用^[4-7]。课题组前期研究发现,黄连解毒汤在动物脑缺血模型中能够有效减小脑缺血损伤面积,并显著抑制神经炎症反应,对改善卒中后神经功能具有一定保护作用。小胶质细胞作为中枢神经系统的主要固有免疫细胞,在脑缺血后的急性期激活并发生代谢重编程,其炎症表型和代谢状态变化被认为与神经炎症损伤的发生和发展密切相关^[8-10]。然而,目前尚不清楚黄连解毒汤是否能够通过调控小胶质细胞代谢重编程减轻脑内神经炎症水平。与既往仅关注下游炎症因子水平的研究不同,本研究的创新之处在于首次引入“免疫代谢”视角,试图从上游能量代谢模式(糖酵解/氧化磷酸化)转化的维度,深入解析黄连解毒汤“清热解毒”的现代生物学机制。同时,针对缺血后小胶质细胞群体的高度异质性,本研究利用单细胞测序技术克服了传统组织匀浆检测的“平均化”局限,旨在精准定位并解析药物特异性靶向的“高糖酵解-促炎”亚群。基于此,本研究拟采用单细胞转录组测序技术(scRNA-seq),深入剖析黄连解毒汤干预急性脑梗死后小胶质细胞的代谢及炎症相关表型的动态变化,系统阐明其抑制神经炎症损伤的分子机制。该研究有望为黄连解毒汤防治缺血性脑卒中提供基于代谢重塑的新理论依据,并发现中药干预脑卒中后神经炎症的潜在精准靶点。

1 材料

1.1 动物 本研究使用8周龄、雄性C57BL/6J小鼠,体质量21~25 g,购自北京斯贝福实验动物科技有限公司,合格证号110324251107390235。所有小鼠在北京中医药大学SPF级动物实验设施中饲养,实验环境温度保持在(25±1)°C,相对湿度为(55±10)%,并实施12 h光照/黑暗循环,确保无噪音干扰。

1.2 伦理 本实验所有动物操作均获得北京中医

药大学动物伦理委员会的批准(批准号BUCM-2024011901-1036),并严格按照伦理准则执行。实验设计和实施严格遵循动物福利标准。

1.3 药物 称取黄连(批号220114004)150 g、黄芩(批号221128007)100 g、黄柏(批号220224001)100 g及栀子(220907001)150 g,饮片均购自北京仟草中药饮片有限公司,由北京中医药大学中医学院孔慧副研究员鉴定均为正品。将4味药材混合均匀后,分装入过滤袋中。将药材包置于5 000 mL水中,浸泡1 h,随后加热至沸腾。待水沸腾后,转小火保持持续沸腾,并趁热使用100目过滤袋过滤取液。随后,再加入水4 000 mL进行第2次煎煮,煎煮过程与第1次相同。将2次煎煮所得液体合并,进行浓缩处理,分装至适当容器中。使用真空冷冻干燥机对浓缩液进行冻干处理,得到冻干粉末。最后,称量冻干粉的质量,共得到148.2 g冻干粉,冻干粉提取率为29.64%,最终换算为生药量进行给药。银杏叶提取物[每片含银杏叶提取物40 mg(总黄酮醇苷9.6 mg、萜类内酯2.4 mg)]购自德国威玛舒培博士药厂,货号HJ20140768。

1.4 试剂 异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号R510-22-10);苏木素-伊红(HE)染液套装(北京索莱宝科技有限公司,批号G1100-500mL);尼氏(Nissl)染液(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0117);Alexa Fluor® 647 anti-mouse CD106、7-氨基放线菌素D(7-AAD)死活染料(美国Biolegend公司,货号分别为105712、420404);APC Rat Anti-Mouse CD304、Alexa Fluor® 647 Rat Anti-Mouse CD47(美国BD公司,货号分别为567461、563584);吖啶橙(AO)/碘化丙锭(PI)(上海睿钰生物科技有限公司,批号RE010213);Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM、Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit、Single Index Kit T Set A(美国10x Genomics公司,货号分别为1000268、1000120、1000215);iScript cDNA Synthesis Kit(美国Bio-Rad公司,批号1708891);2×Realab Green PCR Fast mixture通用型(北京兰博利德商贸有限公司,批号R0202-02);HiPure Total RNA Mini Kit(北京拜尔迪生物技术有限公司,批号R4111-02);autoMACS™ Rinsing Solution(德国美天旎生物技术有限公司,批号130-091-222-1)。

1.5 仪器 高速分选型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司);gentleMACS™ Octo Dissociator型全自动组织处理器(德国美天旎生物技术有限公司)

司);Fluorescence Cell Analyzer型荧光细胞分析仪(上海睿钰生物科技有限公司);FLPI2型激光散斑血流成像系统(英国 Moor Instruments Ltd 公司);C1000 Touch™ Thermal Cycler 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国伯乐生命科学公司);NIKON ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);ZS-FD 型小鼠脑立体定位仪(北京众实迪创科技有限公司)。

2 方法

2.1 小鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型构建 依据课题组前期的闭塞大脑中动脉/再灌注造模方法进行模型制备^[11],使用高浓度异氟烷(3%)进行深度麻醉,并以1.5%的维持剂量维持麻醉状态。麻醉稳定后,开始手术操作。暴露小鼠一侧的颈总动脉和颈外动脉,并用手术线分离。接着结扎颈外动脉,并小心分离颈内动脉。使用微血管夹进行血管夹闭,随后将线栓穿过血管Y字分叉处并插入颈内动脉,直到线栓到达大脑中动脉起点,固定线栓防止滑脱,完成大脑中动脉闭塞。闭塞60 min后,部分取出线栓实现再灌注,避免过多出血。手术结束后,将小鼠置于电热毯上以维持体温,提高术后存活率。造模后,以神经功能评分与激光散斑成像状态确认是否成模。

2.2 动物分组及给药 假手术处理的小鼠为假手术组,完成MCAO操作的小鼠分为3组:模型组、黄连解毒汤组和银杏叶提取物组。经过1周的适应期后,开始灌胃给药,最佳灌胃剂量采取先前课题组的研究结果^[11]。假手术组和模型组小鼠接受生理盐水,黄连解毒汤组给药剂量 $1.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,银杏叶提取物组将银杏叶提取物溶液配置至 $2.16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后进行给药,给药剂量 $0.432\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续5 d,接受 $0.2\text{ mL}\cdot(10\text{ g})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量。第6 d,最后1次给药后,在动物中诱导MCAO模型以模拟缺血性中风情况。

2.3 神经功能评分 采用Zea-Longa评分法对小鼠的神经功能进行评估。评分标准如下:无神经缺陷表现为0分;不能充分屈曲对侧前爪为1分;向麻痹侧旋转为2分;向麻痹侧倾斜为3分;无法自主行走或丧失意识为4分。通过统计各组小鼠的评分结果,分析其神经功能损伤的程度^[11]。

2.4 脑血流量测量 为测定脑部灌注情况,将小鼠以异氟烷麻醉后固定于立体定位仪上。经头部消毒后切开头皮,暴露以冠状缝为标志的颅骨区域。随后利用激光散斑成像系统获取脑表面血流信号,

从而获得脑血流变化的定量评估数据^[11]。

2.5 HE和Nissl染色 将小鼠的脑组织在4%多聚甲醛中固定过夜,然后包埋在石蜡中。石蜡包埋的切片用HE和Nissl溶液染色,以评估脑组织的结构和细胞变化^[11]。

2.6 单细胞测序 采血后,用autoMACS冲洗液灌注小鼠,以尽可能多地冲洗脑内血液。一旦流出液澄清,分离缺血半球。然后将组织转移到含有酶混合物的C管中,并使用gentleMACS™ Octo Dissociator全自动组织处理器进行解离。解离后,去除细胞碎片,裂解红细胞。使用CD47、CD106和CD304抗体进行流式细胞术孵育,然后进行阴性筛选以保留尽可能多的免疫细胞。最后,使用Fluorescence Cell Analyzer测定细胞计数和活力。采用Chromium Next GEM Single Cell 3' Kit生成单细胞水包油液滴,然后进行cDNA合成和文库构建,用于单细胞转录组学。对文库进行质量控制后,在Illumina NovaSeq 6000平台上以 $2\times 150\text{ bp}$ 的读长进行双端测序。

测序后,使用Cell Ranger软件(cellranger-7.1.0版;10x Genomics)处理来自Illumina平台的原始数据,将BCL文件转换为FASTQ文件。Cell Ranger计数命令可定量细胞和基因,使用内置的STAR比对器将原始读数与mm10参考基因组进行比对。根据比对结果获得高质量细胞的数量、基因计数、基因组比对率和唯一分子标识(UMI)矩阵等质量控制指标。

2.7 数据预处理 首先使用Scanpy对原始单细胞测序数据进行基础预处理。该阶段主要完成低质量细胞及低表达基因的剔除、数据标准化及高变基因的筛选。借助Python 3.12环境下的Scanpy(1.11.0),将各样本的读数矩阵整合为统一的AnnData对象,并移除分析中可能出现的双细胞(doublets)。随后依据UMI计数(nCounts_RNA)及基因检测量(nFeature_RNA)对细胞进行进一步质量控制。本研究采用的过滤标准包括:①基因需至少出现在3个细胞中;②单细胞检测到的基因数量 ≥ 200 ;③线粒体基因比例 $<10\%$;④核糖体基因占比 $<10\%$;⑤血红蛋白基因表达比例 $<0.05\%$ 。

在质控之后完成数据归一化与对数化,以减少测序深度差异造成的偏倚;并通过highly_variable_genes筛选高变基因,相关参数设定为n_top_genes=3 000、flavor="seurat_v3"。可视化过程中,利用Scanpy的邻域图构建及绘图功能展示细胞间的整体结构及相似性。

采用 t 分布随机邻域嵌入 (t -SNE) 进行非线性降维。该算法通过保留局部邻域关系, 将高维表达谱映射到二维空间, 从而更直观地呈现各细胞群体之间的聚类分布特征。

2.8 批次效应处理 考虑到数据采集过程中不可避免的批次效应, 本研究采用了基于深度学习框架的 scVI(1.2.2.post2) 模型进行批次校正。scVI 通过变分自编码器 (VAE) 构建数据的隐变量表示, 有效消除了不同批次之间的技术噪声, 从而使得下游细胞亚群划分和比较分析更为可靠。基于 Sample 信息进行批次去除, 有效消除了个体之间的批次差异。

2.9 NMF 聚类分析 本研究在单细胞 RNA 测序数据分析中采用非负矩阵分解 (NMF) 进行降维与细胞聚类。NMF 是一种矩阵分解方法。在具体应用中, 原始表达矩阵的行为细胞, 列为基因, NMF 通过最小化重构误差获得非负的低维表示。分解得到的矩阵中的每一列代表 1 个细胞在低维特征空间中的投影, 可作为后续聚类分析的输入。相比主成分分析 (PCA) 等传统降维方法, NMF 通过非负约束更好地符合基因表达的生物学特性, 提升了特征的可解释性。在聚类分析阶段, 本研究将 NMF 降维后的细胞低维特征作为输入, 采用 K-means 等聚类算法进行细胞亚群的识别。每个亚群的特征基因可根据 NMF 分解所得的权重矩阵 W 进行提取。通过 NMF 降维与聚类, 能够有效揭示单细胞数据中的细胞异质性和潜在亚群结构。

2.10 均匀流形近似与投影 (UMAP) 降维分析 UMAP 是一种常用的降维技术, 在本研究中用于对单细胞 RNA 测序数据进行可视化分析。首先, 对小胶质细胞数据进行标准化预处理, 去除低质量细胞并对基因表达进行归一化处理。然后, 使用 PCA 进行初步降维, 提取主要变异信息, 并基于此进行 UMAP 降维, 最终将数据映射到二维或三维空间中进行可视化。通过 UMAP 分析, 能够直观展示不同小胶质细胞亚群在基因表达空间中的分布情况, 并通过 Louvain 聚类算法进一步识别不同细胞群体。UMAP 结果揭示了小胶质细胞在不同处理条件下的聚类模式, 并为后续的功能分析提供了清晰的视觉依据。

2.11 相关性分析 为了探究小胶质细胞代谢重编程与炎症反应之间的关系, 进行相关性分析。首先, 筛选出在不同实验组中差异表达的基因, 尤其是糖酵解相关基因和炎症因子。使用 Spearman 等级相关系数评估各基因之间的表达模式和活性。

通过计算基因对之间的相关性, 揭示了代谢通路与炎症反应之间的相互联系。此外, 使用 matplotlib (3.6.3) 绘制相关性热图, 直观展示不同基因之间的协同变化。

2.12 代谢分析 根据 scRNA-seq 数据应用 scMetabolism(0.2.1)^[12] 评估代谢物丰度。该工具包含预置的 85 条 KEGG 和 82 条 Reactome 代谢通路基因集, 支持多种评分算法 (如 VISION、AUCell、ssGSEA、GSVA) 该流程能够高效揭示单细胞水平下的代谢状态及其在生物学中的潜在作用。

2.13 decoupler 分析: 基于先验知识的信号通路与转录因子活性推断 为系统性地推断单细胞水平下的信号通路活性和转录因子调控状态, 本研究引入了基于先验网络知识的推断工具 decoupler (1.8.0)^[13]。该工具提供多种稳健的统计方法 (如多元线性模型 MLM), 可结合外部生物学知识网络, 对基因表达矩阵进行建模, 从而实现功能状态的量化评估。

本研究中, decoupler 被应用于以下层面的富集推断, PROGENy 通路富集: 基于扰动实验构建的 14 条经典信号通路, 如核转录因子- κ B (NF- κ B)、转化生长因子- β (TGF- β)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等及其响应基因集, 使用 PROGENy 模型对每个细胞的通路活性进行定量推断, 反映其潜在的功能状态或病理激活模式。

转录因子活性推断: 整合 CollecTRI (<https://github.com/saezlab/CollecTRI>) 数据库中超过 1 000 个转录因子与靶基因的调控网络, 推断各细胞中潜在活跃的转录因子, 为理解细胞命运决策、炎症调控及免疫耐受提供理论支撑。

2.14 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测脑组织 mRNA 表达水平 测定 6-磷酸果糖激酶 (PFKP)、乳酸脱氢酶 A (LDHA)、溶质载体家族 2 成员 1 (SLC2A1)、溶质载体家族 16 成员 3 (SCL16A3)、己糖激酶 2 (HK2)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 β -肌动蛋白 (β -actin) mRNA 表达水平, 并以 β -actin 作为内参。逆转录程序是 25 °C 加热 5 min 以启动反应, 46 °C 加热 20 min 以进行逆转录, 再进行 1 min 的 95 °C 加热以使逆转录终止。PCR 循环条件为: 95 °C 反应 10 min, 并进行 40 个扩增循环 (每个循环设置条件为 95 °C 反应 20 s, 60 °C 反应 20 s, 72 °C 反应 30 s), 于每轮循环后进行 C_t 值检测, 并在最后一轮结束后进行熔解曲线的构

建与绘制,再次读取 C_t 值,95 °C 反应 15 s 结束。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因的相对值。引物由湖南艾科瑞生物工程有限公司设计,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PFKP	上游 AGGAGGGCAAAGGAGTGTTT	109
	下游 TTGGCAGAAATCTTGGTTCC	
LDHA	上游 TGTCTCCAGCAAAGACTACTGT	155
	下游 GACTGTACTTGACAATGTTGGGA	
SLC2A1	上游 CCATGTATGTGGGAGAGGTGT	124
	下游 TTGCCCATGATGGAGTCTAAG	
SLC16A3	上游 TCACGGGTTTCTCCTACGC	167
	下游 GCCAAAGCGGTTACACAC	
HK2	上游 GATCGCCGGATTGGAACAGA	97
	下游 GGTCTAGCTGCTTAGCGTCC	
HIF-1 α	上游 ACTCATCCATGTGACCATGAG	153
	下游 TGA CTGATGTTTCATCGTCTCTC	
IL-1 β	上游 TGGCAACTGTTCTCTG	193
	下游 GGAAGCAGCCCTTCATCTTT	
IL-6	上游 CAAAGCCAGAGTCTTCAGAG	106
	下游 AGCATTGGAATGCGGTAG	
TNF- α	上游 TCTTCTCATTCTGCTTGTGG	109
	下游 ATGAGAGGGAGGCCATTTG	
β -actin	上游 CTATTGGCAACGAGCGGTTC	148
	下游 ACTGTGTTGGCATAGAGGTCTT	

2.15 统计学方法 本研究中的所有数据均使用 R (4.4.1) 软件进行分析。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,多组间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。

表 3 黄连解毒汤对 MCAO 小鼠脑血流量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

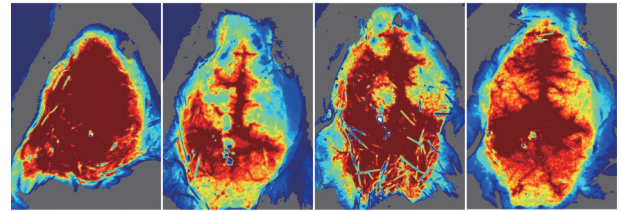
Table 3 Effect of Huanglian Jiedutang on cerebral blood flow in MCAO mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	健侧血流量/PU	患侧血流量/PU	患侧/健侧血流
假手术组		1 329.45±132.16	1 372.58±92.89	1.04±0.07
模型组		663.01±82.88 ¹⁾	482.50±60.74 ¹⁾	0.73±0.07 ¹⁾
黄连解毒汤组	1.82	1 105.83±185.12 ²⁾	927.52±154.85 ²⁾	0.85±0.12 ²⁾
银杏叶提取物组	0.432	1 278.22±146.74 ²⁾	1 175.70±81.14 ²⁾	0.92±0.06 ²⁾

3.2 黄连解毒汤对缺血性脑损伤的保护作用 与假手术组比较,模型组大脑皮质区域呈现出明显的病理学改变。这些改变主要包括皮质分层结构模糊不清、神经元间细胞间隙异常增宽,并伴随典型的缺血性神经元损伤特征。模型组神经元可见明显的

3 结果

3.1 黄连解毒汤对 MCAO 模型中脑组织缺血损伤的改善作用 与假手术组比较,模型组小鼠在缺血后表现出明显的神经功能障碍,神经功能评分显著升高 ($P<0.01$),且缺血侧脑区的实时血流量显著下降 ($P<0.01$),表明缺血损伤严重。而与模型组比较,黄连解毒汤组与银杏叶提取物组小鼠的神经功能评分显著降低 ($P<0.01$),缺血区域的血流灌注得到显著改善 ($P<0.01$),脑组织损伤的范围也有所缩小,表明黄连解毒汤在一定程度上能够缓解缺血引起的组织损伤,具有减轻脑缺血损害的潜在疗效。见图 1、表 2、表 3。



注:A.假手术组;B.模型组;C.黄连解毒汤组;D.银杏叶提取物组(图2和图3同)

图 1 黄连解毒汤对 MCAO 小鼠脑血流量的影响

Fig. 1 Effect of Huanglian Jiedutang on cerebral blood flow in MCAO mice

表 2 黄连解毒汤对 MCAO 小鼠神经功能评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Huanglian Jiedutang on neurological function score of MCAO mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Zea-Longa 评分/分
假手术组		0±0
模型组		2.50±0.56 ¹⁾
黄连解毒汤组	1.82	1.67±0.82 ²⁾
银杏叶提取物组	0.432	1.17±0.41 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表3、表4同)

胞体肿胀,伴随细胞质内空泡形成(空泡化);细胞核形态出现固缩性改变,体积缩小;同时,染色质分布异常,表现为向核膜边缘聚集(染色质边集)。在缺血损伤程度更为严重的皮质区域,观察到神经元广泛性坏死现象,并伴有组织结构的完全崩解,神经元排列紊

乱,组织完整性遭受破坏。与模型组相比,黄连解毒汤组与银杏叶提取物组则显示出明显的改善趋势。与模型组比较,黄连解毒汤和银杏叶提取物组皮质结构紊乱、细胞间隙增大、神经元胞体肿胀、核固缩、染色质边缘等上述多项缺血性损伤指标均得到不同程度的减轻或抑制。在严重损伤区域,组织坏死及结构崩解的程度亦有所缓解,提示黄连解毒汤具有部分对抗缺血诱导的神经组织病理损伤的作用。见图2。

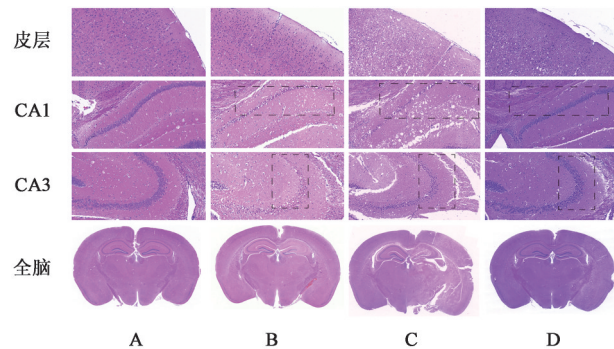


图2 黄连解毒汤对小鼠脑神经组织病理损伤的影响(HE,×200)
Fig. 2 Effect of Huanglian Jiedutang on injury of cranial nerves in MCAO mice (HE,×200)

与假手术组比较,模型组受影响脑区(尤其是缺血核心及周边区域)的神经元表现出显著的Nissl体改变。其特征为Nissl体着色显著变淡、分布稀疏乃至缺失(染色苍白),提示核糖体蛋白合成功能可能严重受损。同时,模型组神经元的胞体体积普遍缩小(即胞体萎缩),这也是神经元功能受损的典型形态学标志。此外,神经元树突结构完整性遭到破坏,表现为明显的树突断裂、碎裂或长度缩短,进一步证实了缺血性损伤造成的广泛性结构损伤。在缺血损伤的核心区域,Nissl染色揭示出更为严重的损伤特征:该区域普遍出现深蓝色Nissl染色物质的急剧减少甚至大面积缺失,提示该区域神经元已发生不可逆性坏死或遭受了极其严重的损伤,已基本丧失功能活性。与模型组比较,黄连解毒汤组与银杏叶提取物组可观察到前述多种损伤性变化的显著缓解。具体表现为神经元Nissl体染色强度有所恢复、胞体萎缩程度减轻、树突结构损伤趋于修复,以及在缺血半暗带区域尼氏物质的损失得到一定程度的遏制。说明黄连解毒汤干预对于改善模型组神经元因缺血造成的形态结构损伤和潜在的蛋白质合成功能抑制,具有积极的逆转和神经保护效应。见图3。

3.3 细胞的身份识别及t-SNE特征分布 不同类型的细胞在二维空间中形成了清晰的聚类分布。

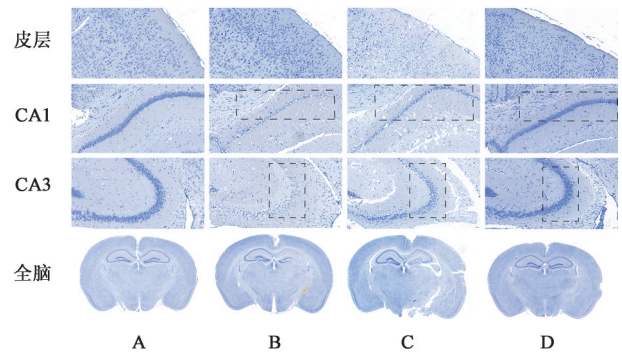


图3 黄连解毒汤对MCAO小鼠脑神经组织病理损伤的影响(Nissl,×200)
Fig. 3 Effect of Huanglian Jiedutang on injury of cranial nerves in MCAO mice (Nissl,×200)

为进一步确认各类细胞的身份,结合已知的细胞标志物进行了标定。星形胶质细胞标志物包括胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、水通道蛋白4(AQP4);B细胞标志物为分化簇19(CD19)、分化簇79a(CD79a);脉络丛上皮细胞标志物为转甲状腺素蛋白(TTR)、前列腺素D₂合成酶(PTGDS);内皮细胞标志物为血小板内皮细胞黏附分子1(PECAM1)、血管内皮钙黏蛋白5(CDH5);早期上皮祖细胞标志物为叉头框蛋白J1(FoxJ1);粒细胞标志物为S100钙结合蛋白A8(S100A8)、S100钙结合蛋白A9(S100A9)、集落刺激因子3受体(CSF3r);巨噬细胞标志物为CD14分子(CD14)、adhesion G蛋白偶联受体E1(ADGRE1);中性粒细胞标志物为微管蛋白β3链(TUBB3)、谷氨酸脱羧酶(GAD)1、GAD2;少突胶质细胞标志物为髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、髓鞘碱性蛋白(MBP);周细胞标志物为G蛋白信号调节因子5(RGS5);T细胞标志物为T细胞受体复合物的CD3δ亚基(CD3δ)、T细胞受体复合物的CD3ε亚基(CD3ε)、T细胞受体复合物的CD3γ亚基(CD3γ);小胶质细胞特异性标志物为跨膜蛋白119(Tmem119),基于此,成功地识别出具有典型表达特征的小胶质细胞群体。该群体在t-SNE降维图中形成了独立的聚类,并且与其他细胞类型明显区分,进一步验证了细胞身份识别的准确性。单细胞降维与细胞标志物见增强出版附加材料。

3.4 小胶质细胞亚群的聚类鉴定与表型差异分析 通过设定不同聚类数进行比较发现,当非负矩阵分解(NMF)设定为8个亚群时可获得最高的聚类稳定性,但其中3个亚群的细胞数量过少,这些亚群可能并不具备足够的生物学意义,且难以进行后续的分析与功能注释。因此,最终选取了细胞数

分布均衡且聚类稳定性良好的5个亚群,作为后续功能分析的研究对象。这5个亚群代表了在脑卒中发生与发展的背景下,小胶质细胞群体中具有显著表型差异的异质性群体。小胶质细胞亚群降维聚类结果见增强出版附加材料。

3.5 代谢重编程亚群与炎症分子表达的差异性分析 进一步分析,发现第3群和第5群小胶质细胞中 Hypoxia 通路和 NF- κ B 信号通路相关基因显著上调,提示这2个亚群具有显著的缺氧应激反应和炎症活化特征。Hypoxia 通路主要通过诱导 HIFs,尤其是 HIF-1 α 的表达,调节细胞在缺氧条件下的代谢适应性和炎症反应。在小胶质细胞中,HIF-1 α 不仅促进糖酵解酶如 HK2、LDHA 等的表达,提高能量代谢效率,还可通过激活下游炎症通路,加剧促炎因子的分泌。NF- κ B 信号通路则是经典的炎症激活通路之一,在受到炎症刺激时被迅速激活,促进 IL-1 β 、IL-6、TNF 等多种炎症因子的表达,形成正反馈放大效应。值得注意的是,HIF-1 α 与 NF- κ B 之间存在相互协同的关系,前者可通过稳定 NF- κ B 活性增强炎症反应,后者也可反向促进 HIF-1 α 的转录表达。与之相对,第1群和第2群则表现出 Wnt 和 TGF- β 信号通路基因的高度表达,表明这2个亚群可能参与炎症抑制和稳态维持的过程。Wnt 信号通路在小胶质细胞中通常与神经保护、免疫调节和组织修复相关,能够通过调节细胞增殖、分化和迁移来促进神经炎症的缓解。TGF- β 信号通路则通过激活下游 Smad 蛋白,调节抗炎基因表达,抑制 NF- κ B 介导的促炎信号,同时促进组织修复和免疫耐受的形成。进一步的相关性分析揭示,Hypoxia 通路活性与 NF- κ B 信号通路呈显著正相关,二者协同增强炎症反应;而 Wnt 通路的活性与 Hypoxia 信号呈明显负相关,提示其在代谢应激环境下具有抑炎作用。综合这些结果可以推断,第3群和第5群小胶质细胞表现出典型的促炎性表型,而第1群和第2群则呈现出显著的抑炎性表型。这进一步表明,不同亚群在炎症微环境中可能承担功能对立的免疫调节角色,其中 Hypoxia 与 NF- κ B 通路参与促炎反应放大,而 Wnt 与 TGF- β 通路则在维持免疫稳态和组织保护中发挥关键作用。小胶质细胞亚群差异基因分析与基因相关性分析见增强出版附加材料。

3.6 小胶质细胞亚群的代谢流特征与重编程状态识别 小胶质细胞在炎症活化过程中伴随着明显的代谢重编程现象。在促炎亚群(如第3群与第5群)中,糖酵解途径相关基因表达显著上调,包

括 HK2、PFKP、LDHA 等关键代谢酶,提示其能量代谢方式由有氧化磷酸化向糖酵解偏移。利用 scMetabolism 进一步分析发现,Glycolysis/Gluconeogenesis 代谢物水平处于上调状态,是该类促炎亚群的代谢特征之一。相比之下,处于抑炎状态的亚群(如第1群与第2群)未显示出糖酵解通路的显著激活,其代谢模式更接近于稳态型或恢复型细胞特征。此类亚群中,氧化磷酸化与细胞保护、修复相关基因表达显著上调,表明其在应对炎症损伤过程中可能发挥免疫调节和神经保护作用。这些结果从代谢层面支持了小胶质细胞亚群在炎症背景下表现出的功能分化趋势。小胶质细胞亚群差异基因与代谢物见增强出版附加材料。

3.7 代谢-炎症关联性分析与关键转录因子识别 多种参与糖酵解通路的核心代谢基因——包括 SLC2A1、HK2、PFKP、LDHA 及 SLC16A3 等,在促炎性小胶质细胞亚群中表达水平显著升高。这些代谢基因与经典炎症因子 IL-1 β 、IL-1 α 、IL-6、TNF 的表达呈显著正相关关系,提示糖酵解活性的增强与炎症反应的激活高度耦联,代谢重编程可能在驱动小胶质细胞促炎表型中发挥关键作用。见增强出版附加材料。

为进一步揭示其上游调控机制,进行了各亚群的转录因子富集分析,识别出多种可能调控糖酵解与炎症网络的关键转录因子。结果显示,在促炎性亚群(第3群与第5群)中,HIF-1 α 与 NF- κ B 表达相对较高。具体来看,HIF-1 α 作为细胞对缺氧反应的主调节因子,在炎性亚群中处于高活化状态,直接调控 HK2、LDHA 等糖酵解相关基因的表达,从而增强细胞对能量与氧应激的适应能力。与此同时,NF- κ B 信号通路被显著激活,进一步促进炎症因子如 IL-1 β 与 TNF- α 的转录表达,形成代谢——炎症双向正反馈机制。这些结果共同表明,HIF-1 α 与 NF- κ B 在小胶质细胞代谢重编程与炎症放大的过程中发挥中心调控作用,可能构成黄连解毒汤干预的关键靶点轴线。基因相关性分析与转录因子识别见增强出版附加材料。

3.8 代谢重编程与炎症损伤相关 mRNA 的 PCR 验证 与假手术组比较,模型组小鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、C-C 趋化因子配体 2(CCL2)、C-X-C 趋化因子配体 2(CXCL2)、集落刺激因子 3(CSF3)分子的 mRNA 表达水平显著上调($P < 0.01$),且 RGS5、PECAM1、血管内皮生长因子 B(VEGFB)与一氧化氮合酶 3(NOS3)等内皮与周细胞功能相关

mRNA 表达水平显著下调 ($P<0.01$); 而与模型组比较, 黄连解毒汤组与银杏叶提取物组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL2、CXCL2、CSF3 分子的 mRNA

表达水平显著下调 ($P<0.01$), 且 RGS5、PECAM1、VEGFB 与 NOS3 等内皮与周细胞功能相关 mRNA 表达水平亦显著上调 ($P<0.01$)。见表 4。

表 4 黄连解毒汤对 MCAO 小鼠代谢重编程与炎症损伤相关 mRNA 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Huanglian Jiedutang on metabolic reprogramming and inflammatory injury-related mRNAs in MCAO mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-6	TNF	PFKP	LDHA	SLC2A1	SLC16A3	HK2	HIF-1 α
假手术组		0.99±0.13	1.01±0.11	1.01±0.16	1.01±0.15	1.06±0.18	1.06±0.18	1.15±0.33	1.18±0.30	1.17±0.27
模型组		13.07±2.52 ¹⁾	11.40±3.01 ¹⁾	9.30±3.64 ¹⁾	6.76±3.68 ¹⁾	7.94±2.85 ¹⁾	9.73±1.70 ¹⁾	7.61±1.14 ¹⁾	5.53±1.46 ¹⁾	4.10±2.08 ¹⁾
黄连解毒汤组	1.82	8.22±0.92 ²⁾	4.73±1.26 ²⁾	2.87±0.41 ²⁾	2.41±0.36 ²⁾	2.63±0.12 ²⁾	4.68±2.70 ²⁾	3.91±0.64 ²⁾	3.74±0.35 ²⁾	3.59±0.68 ²⁾
银杏叶提取物组	0.432	5.61±1.85 ²⁾	4.43±1.23 ²⁾	2.41±1.34 ²⁾	2.43±0.80 ²⁾	2.58±0.67 ²⁾	2.99±0.32 ²⁾	3.61±0.47 ²⁾	3.66±0.83 ²⁾	3.56±1.29 ²⁾

4 讨论

本研究的创新点在于应用 scRNA-seq, 在细胞水平上揭示了脑缺血/再灌注损伤(I/R)过程中小胶质细胞的异质性及其代谢重编程特征。与传统检测方法比较, scRNA-seq 能够精准捕捉细胞亚群的动态变化, 从而更清晰地刻画病理过程。结果显示, I/R 损伤后小胶质细胞分化为促炎和代谢重编程表型, 并伴随糖酵解基因的显著上调。

I/R 是脑卒中等脑血管疾病中的重要病理环节。在缺血阶段, 脑组织由于血流中断, 氧气和葡萄糖供应骤减, 导致能量代谢障碍和细胞损伤。尽管再灌注恢复了氧气和营养物质供应, 却伴随大量活性氧(ROS)的产生, 诱发氧化应激、炎症反应、线粒体损伤和细胞凋亡等级联反应, 最终造成神经元不可逆的损伤和功能障碍^[14]。近年来, 越来越多研究发现, I/R 不仅导致细胞结构损伤, 还引发细胞能量代谢方式的显著“重编程”。即使在氧气供应恢复后, 神经元及脑内胶质细胞依旧倾向于通过有氧糖酵解而非氧化磷酸化产生能量。这种代谢模式即所谓的 Warburg 效应, 其最初见于肿瘤细胞, 在有氧环境下仍倾向于高强度糖酵解代谢^[15-16]。在再灌注的早期阶段, 由于线粒体功能受损, 细胞无法有效利用恢复的氧气, 因此主要通过增强糖酵解途径获取能量。虽然这种加速的糖酵解能够迅速生成 ATP, 但其效率较低, 乳酸积累增加, 细胞酸中毒风险升高。此外, 糖酵解相关代谢中间产物还能够调控细胞的凋亡通路、炎症反应和抗氧化防御机制, 从而进一步影响神经元的损伤与修复^[17]。最新研究指出, 脑内早期的免疫失衡与糖酵解重编程密切相关^[18]。抑制糖酵解重编程能够有效减少炎症反应并缓解脑缺血损伤^[19]。急性脑梗死发生后, 小胶质细胞快速响应缺氧条件, 表现出明显的糖酵解重编

程特征。缺氧诱导因子 HIF-1 α 在小胶质细胞中被激活, 促进 HK2、PFKP、LDHA 等关键糖酵解基因的上调, 进而增强糖酵解活性, 促进乳酸等代谢产物堆积^[20]。高表达的 HK2 可导致乙酰辅酶 A 积累, 进一步促进组蛋白乙酰化和炎症因子 IL-1 β 的转录表达^[21]。此外, 乳酸持续堆积又反过来刺激小胶质细胞朝神经损伤表型转化, 导致 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 等炎症因子释放, 加重神经损伤^[12]。银杏叶提取物含有黄酮类、萜内酯等多种活性成分。大量实验研究表明, 其通过多环节、多靶点作用改善脑供血、减轻神经损伤, 并凭借抗炎、抗氧化效应有效保护神经元功能。其机制涉及拮抗血小板活化因子、改善缺血缺氧所致能量代谢紊乱, 并可调控多条信号通路发挥神经保护作用, 因此作为阳性药具有充分依据。

本研究结果显示, 黄连解毒汤在抗炎反应的抑制和能量代谢的改善方面表现出更为突出的效果, 提示其可能通过多靶点综合调控来促进神经功能恢复。然而, 本研究未对其抗凝血和抗栓作用进行验证, 且相关文献亦较为缺乏, 因此在该方面尚不能与银杏叶提取物直接比较, 甚至可能低于阳性药水平。黄连解毒汤在抗炎与能量代谢调控方面展现了独特优势, 但其在抗凝与抗栓等机制上的作用仍需进一步研究, 以全面评估其与银杏叶提取物的差异与互补性。单细胞转录组数据明确显示, 黄连解毒汤能够有效降低促使代谢重编程的 HK2、PFKP、LDHA 等关键基因的表达, 显著减少伴随糖酵解重编程的小胶质细胞亚群比例, 抑制其向损伤表型转化, 从而降低炎症损伤。同时, 黄连解毒汤还促进小胶质细胞向具有神经保护、修复和抗炎特征的表型转化, 有效恢复异常的能量代谢状态。此外, 通过单细胞分析进一步发现, 黄连解毒汤治疗

不仅抑制了炎症相关通路,还显著调控了线粒体功能相关基因的表达,促进了神经元功能恢复与再生,从而显著提高了脑组织的修复能力。

综上,本研究通过单细胞转录组测序技术揭示I/R过程中代谢重编程的细胞水平动态变化,明确阐明黄连解毒汤调控神经炎症损伤和代谢异常的细胞分子机制。不仅拓展对脑缺血病理生理过程的理解,也为中医药防治脑卒中提供理论基础与实验依据,进一步丰富脑缺血治疗策略的多样性和精准性。本研究亦存在一定局限性,需要在后续工作中加以改进和完善。首先,本实验尚不能反映不同性别、年龄及慢性期乃至远期神经功能恢复阶段的动态过程,结果外推至临床仍需谨慎。其次,虽然本研究基于scRNA-seq从单细胞水平系统描绘了小胶质细胞代谢重编程与炎症表型的图谱,但主要为相关性分析与富集分析,缺乏针对关键通路及转录因子(如HIF-1 α 、NF- κ B等)的小胶质细胞特异性基因操作或药理学干预实验,因而尚不能完全证明其在黄连解毒汤作用中的因果关系。未来可结合条件性敲除动物、体外小胶质细胞培养、多组学联合分析及成分拆方/增减方实验,进一步验证关键靶点,明确有效物质基础,并拓展至临床样本,以提升研究结论的可靠性和转化价值。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] ZHANG G, ZHAO A, ZHANG X, et al. Glycolytic reprogramming in microglia: A potential therapeutic target for ischemic stroke[J]. *Cell Signal*, 2024, 124: 111466.

[2] LYU J, JIAO Y, ZHAO X, et al. Examining the impact of microglia on ischemic stroke with an emphasis on the metabolism of immune cells[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2025, 31(2): e70229.

[3] YANG S, QIN C, CHEN M, et al. TREM2-IGF1 mediated glucometabolic enhancement underlies microglial neuroprotective properties during ischemic stroke[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(10): e2305614.

[4] QI Y Y, HENG X, YAO Z Y, et al. Involvement of Huanglian Jiedu decoction on microglia with abnormal sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 931-950.

[5] SHANG J, LI Q, JIANG T, et al. Systems pharmacology, proteomics and *in vivo* studies identification of mechanisms of cerebral ischemia injury amelioration by Huanglian Jiedu decoction[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115244.

[6] YU C C, LIU L B, CHEN S Y, et al. Ancient Chinese herbal recipe Huanglian Jie Du decoction for ischemic stroke: An overview of current evidence[J]. *Aging Dis*, 2022, 13(6): 1733-1744.

[7] ZHENG R, SHI S, ZHANG Q, et al. Molecular mechanisms of Huanglian Jiedu decoction in treating Alzheimer's disease by regulating microbiome via network pharmacology and molecular docking analysis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1140945.

[8] PLANAS A M. Role of microglia in stroke[J]. *Glia*, 2024, 72(6): 1016-1053.

[9] XU S, LU J, SHAO A, et al. Glial cells: Role of the immune response in ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 294.

[10] YANG K, BAO T, ZENG J, et al. Research progress on pyroptosis-mediated immune-inflammatory response in ischemic stroke and the role of natural plant components as regulator of pyroptosis: A review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 113999.

[11] 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.

[12] WU Y, YANG S, MA J, et al. Spatiotemporal immune landscape of colorectal cancer liver metastasis at single-cell level[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 134-153.

[13] BADIA-I-MOMPEL P, VÉLEZ SANTIAGO J, BRAUNGER J, et al. Decouple R: Ensemble of computational methods to infer biological activities from omics data[J]. *Bioinform Adv*, 2022, 2(1): vba016.

[14] LIN L, WANG X, YU Z. Ischemia-reperfusion injury in the brain: Mechanisms and potential therapeutic strategies[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 5(4): 213.

[15] ANDRYSZKIEWICZ W, GAŚSIOROWSKA J, KÜBLER M, et al. Glucose metabolism and tumor microenvironment: Mechanistic insights and therapeutic implications[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(5): 1879.

[16] BÜTTNER F, CORDES C, GERLACH F, et al. Genomic response of the rat brain to global ischemia and reperfusion[J]. *Brain Res*, 2009, 1252: 1-14.

[17] KEELAN J, BATES T E, CLARK J B. Heightened resistance of the neonatal brain to ischemia-reperfusion involves a lack of mitochondrial damage in the nerve terminal[J]. *Brain Res*, 1999, 821(1): 124-133.

[18] VAN DEN BOSSCHE J, O'NEILL L A, MENON D. Macrophage immunometabolism: Where are we (going)? [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(6): 395-406.

[19] XIA X, CHEN W, ZHOU T, et al. TEPP-46 inhibits glycolysis to promote M2 polarization of microglia after ischemic stroke[J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 149: 114148.

[20] NEWSHOLME P, CURI R, GORDON S, et al. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages[J]. *Biochem J*, 1986, 239(1): 121-125.

[21] CHEN J, LI G, SUN D, et al. Research progress of hexokinase 2 in inflammatory-related diseases and its inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 264: 115986.

[责任编辑 张丰丰]