

# 清热解毒法通过保护内皮-周细胞并抑制巨噬细胞迁移 协同减轻缺血性中风损伤

孙资金<sup>1</sup>, 张浩嘉<sup>1</sup>, 王凯<sup>1</sup>, 王昭懿<sup>1</sup>, 宋粼静<sup>2</sup>, 徐文秀<sup>3</sup>, 吉静<sup>4</sup>, 李长香<sup>1</sup>, 王庆国<sup>1</sup>,  
王雪茜<sup>1\*</sup>, 程发峰<sup>1\*</sup>

(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. 康复大学生命科学与健康学院, 山东 青岛 266113;  
4. 安徽中医药大学中西医结合学院, 合肥 230038)

**[摘要]** 目的: 本研究旨在探讨清热解毒法代表方剂黄连解毒汤对缺血性脑卒中模型中免疫细胞迁移、血-脑屏障保护及细胞功能恢复的调节作用。方法: 采用大脑中动脉瞬时缺血-再灌注(tMCAO)建立小鼠缺血性中风模型, 并通过激光散斑成像和神经功能评分评估脑血流与神经功能。脑组织经苏木素-伊红(HE)与尼氏(Nissl)染色评价病理损伤。小鼠分为假手术组、模型组、黄连解毒汤组和银杏叶提取物组, 适应1周后开始灌胃: 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, 银杏叶提取物组按 $0.432\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药, 连续5 d, 第6天末次给药后进行tMCAO造模。对脑组织及外周免疫细胞进行单细胞RNA测序, 利用均匀流形逼近与投影(UMAP)和比值比(OR)指标分析细胞分布, 开展差异表达分析以评估黄连解毒汤对内皮细胞、周细胞和巨噬细胞的影响, 并结合细胞通讯分析工具(CellChat)和解偶联调控分析工具(decoupler)分析细胞通讯和转录因子调控。最终使用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)与酶联免疫吸附测定法(ELISA)验证相关mRNA和蛋白表达。结果: 与假手术组比较, 模型组表现出神经功能评分显著升高( $P<0.01$ )及血流量水平显著下降( $P<0.01$ ), 且呈现皮质结构紊乱、胞体空泡化程度加剧及尼氏小体数量增多; 与模型组比较, 黄连解毒汤组与银杏叶提取物组则显示出神经功能评分显著降低( $P<0.01$ )及血流量水平显著回升( $P<0.01$ ), 同时皮质结构紊乱得以改善, 胞体空泡化程度减轻, 尼氏小体数量亦有所减少。单细胞数据显示, 黄连解毒汤可保护内皮细胞与周细胞, 防止其数量减少, 同时可恢复内皮与周细胞中的功能基因[如血小板内皮细胞黏附分子1(PECAM1)、一氧化氮合酶3(NOS3)]表达, 并降低其趋化因子与黏附因子表达水平[如C-C趋化因子配体2(CCL2)、C-X-C趋化因子配体2(CXCL2)]; 对于巨噬细胞, 黄连解毒汤可减少其向中枢的趋化数目, 并可其趋化因子受体与炎症因子表达水平[如白细胞介素(IL)-6、C-C趋化因子受体2(CCR2)、C-X-C趋化因子受体2(CXCR2)]。同时, 细胞通讯发现黄连解毒汤通过上述作用, 降低周细胞与内皮细胞损害, 减少其对巨噬细胞的吸引, 降低周细胞-巨噬与内皮-巨噬之间的C-C趋化因子配体(CCL)、C-X-C趋化因子配体(CXCL)、粒细胞集落刺激因子3(CSF3)等趋化信号通路的配体-受体互作关系, 避免造成二次损害。与假手术组比较, 模型组小鼠IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、CCL2、CXCL2、CSF3分子的mRNA表达水平显著上调( $P<0.01$ ), 且G蛋白信号调节因子5(RGS5)、PECAM1、血管内皮生长因子B(VEGFB)与NOS3等内皮与周细胞功能相关mRNA表达水平显著下调( $P<0.01$ ); 而与模型组比较, 在黄连解毒汤组与银杏叶提取物组中, IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、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( $P<0.01$ )。与假手术组比较, 模型组小鼠IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 蛋白表达水平显著上调( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 黄连解毒汤与银杏叶提取物组的IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 蛋白表达水平显著下调( $P<0.01$ )。结论: 黄连解毒汤通过保护缺血性中风的内皮细胞与周细胞, 降低神经损害, 同时抑制其与巨噬细胞的互作, 减少对中枢内的二次损伤。

**[关键词]** 黄连解毒汤; 缺血性脑卒中; 单细胞转录组; 中枢-外周互作

**[中图分类号]** R256; R259; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)11-0056-12

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20260124

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251211.1747.003>

**[网络出版日期]** 2025-12-12 13:49:49 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



**[收稿日期]** 2025-09-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(U21A20400)

**[第一作者]** 孙资金, 博士, 从事生物信息学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

## Heat-clearing and Toxin-removing Method Reduces Ischemic Stroke Injury by Protecting Endothelial-pericyte and Inhibiting Macrophage Migration

SUN Zijin<sup>1</sup>, ZHANG Haojia<sup>1</sup>, WANG Kai<sup>1</sup>, WANG Zhaoyi<sup>1</sup>, SONG Linjing<sup>2</sup>, XU Wenxiu<sup>3</sup>, JI Jing<sup>4</sup>,  
LI Changxiang<sup>1</sup>, WANG Qingguo<sup>1</sup>, WANG Xueqian<sup>1\*</sup>, CHENG Fafeng<sup>1\*</sup>

(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. School of Life Sciences and Health, University of Rehabilitation, Qingdao 266113, China; 4. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the regulatory effects of Huanglian Jiedutang (HLJDT) on immune cell migration, blood-brain barrier protection, and cellular functional recovery in a model of ischemic stroke. **Methods:** A transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) model was established in mice to induce ischemic stroke. Cerebral blood flow and neurological function were evaluated using laser speckle imaging and neurological deficit scoring. Histopathological damage in brain tissues was assessed by hematoxylin-eosin (HE) and Nissl staining. Mice were divided into a sham group, a model group, an HLJDT group, and a *Ginkgo biloba* extract (GBE) group. After one week of acclimatization, intragastric administration was initiated. The sham and model groups received normal saline, the HLJDT group received HLJDT at 1.82 g·kg<sup>-1</sup>, and the GBE group received GBE at 0.432 g·kg<sup>-1</sup>. Administration was continued for 5 consecutive days, and the tMCAO model was established after the final dose on day 6. Single-cell RNA sequencing was performed on brain tissues and peripheral immune cells. UMAP and odds ratio (OR) indices were used to analyze cell distribution. Differential expression analysis was conducted to evaluate the effects of HLJDT on endothelial cells, pericytes, and macrophages, combined with CellChat and decoupler to analyze cell-cell communication and transcription factor regulation. Finally, PCR and ELISA were used to validate the mRNA and protein expression of relevant genes. **Results:** Compared with the sham group, the model group showed significantly increased neurological deficit scores ( $P<0.01$ ) and significantly decreased cerebral blood flow ( $P<0.01$ ), accompanied by cortical structural disorder, aggravated cytoplasmic vacuolization, and increased numbers of Nissl bodies. Compared with the model group, both the HLJDT and GBE groups exhibited significantly reduced neurological deficit scores ( $P<0.01$ ) and markedly improved cerebral blood flow ( $P<0.01$ ), along with amelioration of cortical structural disorder, alleviated cytoplasmic vacuolization, and reduced numbers of Nissl bodies. Single-cell analysis showed that HLJDT protected endothelial cells and pericytes by preventing their reduction, restored the expression of functional genes in these cells (*e.g.*, PECAM1 and NOS3), and downregulated the expression of chemokines and adhesion-related factors (*e.g.*, CCL2 and CXCL2). In macrophages, HLJDT reduced their recruitment to the central nervous system and downregulated the expression of chemokine receptors and inflammatory factors (*e.g.*, IL-6, CCR2, and CXCR2). Cell-cell communication analysis further indicated that HLJDT, through the above mechanisms, alleviated damage to pericytes and endothelial cells, reduced their recruitment of macrophages, and decreased ligand-receptor interactions in chemokine signaling pathways (including CCL, CXCL, and CSF3) between pericytes/endothelial cells and macrophages, thereby preventing secondary injury. Compared with the sham group, the model group showed significantly upregulated mRNA expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL2, CXCL2, and CSF3 ( $P<0.01$ ), while mRNA expression levels of endothelial- and pericyte function-related genes (RGS5, PECAM1, VEGFB, and NOS3) were significantly downregulated ( $P<0.01$ ). In contrast, compared with the model group, the HLJDT and GBE groups exhibited significantly decreased mRNA expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL2, CXCL2, and CSF3 ( $P<0.01$ ), and significantly increased expression of RGS5, PECAM1, VEGFB, and NOS3 ( $P<0.01$ ). At the protein level, compared with the sham group, the model group showed significantly increased expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  ( $P<0.01$ ), whereas these protein levels were significantly reduced in the HLJDT and GBE groups compared with the model group ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** HLJDT reduces neuronal damage in ischemic stroke by protecting endothelial cells and pericytes, while inhibiting their interaction with macrophages, thereby mitigating secondary injury in the central nervous system.

**[Keywords]** Huanglian Jiedutang; ischemic stroke; single-cell transcriptomics; central-peripheral interaction

急性脑梗死作为脑卒中的主要亚型, 占有脑卒中病例的约85%, 是当前全球最主要的死亡与致残原因之一<sup>[1]</sup>。在中国, 脑卒中的疾病负担尤为严峻。根据流行病学分析, 中国是全球卒中发病率最

高的国家之一, 年发病率约为343/100 000, 远高于世界平均水平<sup>[2-3]</sup>。急性脑梗死在中国卒中中占比高达75%~80%, 其死亡率与致残率显著, 已成为国家重点公共卫生关注疾病。近10年来, 中国的脑梗

死发病率出现年轻化趋势。来自多中心研究的数据显示,18岁以下人群的急性脑梗死发病率有显著上升趋势。另有研究指出,中国中老年人群中急性脑梗死的终生风险已接近25%<sup>[4]</sup>。在正常生理状态下,内皮细胞和周细胞共同构成血脑屏障,并在维持脑内环境稳态方面发挥核心作用。内皮细胞通过形成紧密连接,限制有害物质及免疫细胞进入脑组织;周细胞则调控毛细血管通透性、支持内皮细胞稳定性,并参与神经血管单元的信号整合和功能维护<sup>[5-6]</sup>。在急性脑梗死中,缺血及其引发的炎症反应会导致血脑屏障结构与功能受损。内皮细胞表达黏附分子和趋化因子增加,从而增强对外周免疫细胞(如单核/巨噬细胞、中性粒细胞和T细胞)的吸引和黏附能力<sup>[7-8]</sup>。这些免疫细胞穿越受损血脑屏障后进入脑实质,释放促炎因子和活性氧,引发神经元损伤和水肿,进一步扩大梗死区域并加剧神经功能缺失<sup>[9-10]</sup>。在急性脑梗死的急性期,固有免疫系统迅速被激活,其中巨噬细胞作为核心效应细胞,在介导继发性脑组织损伤方面发挥了至关重要的作用<sup>[11]</sup>。急性脑梗死发生后,大量坏死细胞释放出损伤相关分子模式(DAMPs),这些分子通过Toll样受体4(TLR4)等模式识别受体激活巨噬细胞,在炎性环境驱动下,巨噬细胞倾向于M1型表型极化,表现出强烈的促炎作用。这些M1型巨噬细胞大量释放促炎细胞因子[如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6]和一氧化氮合酶,并激活补体,促进神经炎症,诱导神经元凋亡和胶质细胞活化,从而扩大梗死灶体积<sup>[12]</sup>。已有研究表明,在急性脑梗死发生前,耗竭巨噬细胞可减少急性脑梗死带来的损伤<sup>[10]</sup>。唐朝孙思邈,首次提出了“中风内伤主热”的学说。孙思邈认为“凡初得风,四肢不收,心神昏愤,眼不识人,言不出口,凡中风多由热起,服药当顺慎酒”。由火热导致的脏腑功能失调是中风发病的根源,该理念的提出了火热致中的观点,为清热解毒法治疗急性脑梗死奠定了基础。至近现代,张允岭教授在王永炎院士“毒损脑络”<sup>[13-14]</sup>的基础上提出从火毒论治急性脑梗死的观点<sup>[15]</sup>,进一步说明了清热解毒法在急性脑梗死治疗中的重要作用。课题组前期对清热解毒的经典方剂黄连解毒汤进行了系统研究,发现其对急性脑梗死具有明确的治疗效果,包括减少脑卒中引起的缺血面积、恢复脑组织供血及降低脑细胞损伤程度<sup>[16-17]</sup>。此外,研究亦证实黄连解毒汤能够有效抑制急性脑梗死后神经炎症反应。既往研究多聚焦于单一细

胞类型(如神经元或小胶质细胞)的保护或整体炎症因子的抑制,鲜有研究从神经血管单元多细胞互作的系统视角,探讨中药复方如何干预“内皮-周细胞-巨噬细胞”这一关键通讯轴。特别是清热解毒法是否通过重塑血脑屏障组分(内皮与周细胞)的转录特征,进而阻断其对循环巨噬细胞的“病理性招募”,从而切断“毒损脑络”的级联反应,目前尚缺乏高分辨率的单细胞图谱证据。因此,本研究拟借助单细胞转录组测序技术,系统分析脑梗死病变区域各类细胞的功能及表型异质性,重点聚焦于黄连解毒汤对内皮细胞、周细胞与巨噬细胞间配体-受体通讯网络的调控,进而揭示其“保护屏障-抑制趋化”的协同作用机制。研究成果将为从多细胞生态重塑角度阐释中医药干预急性脑梗死提供新的理论依据与临床思路。

## 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,合格证号为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 $\pm$ 1)  $^{\circ}$ C,相对湿度为(55 $\pm$ 10)%,并实施12 h光照/黑暗循环,确保无噪声干扰。

**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150 g、黄芩100 g、黄柏100 g及栀子150 g(北京仟草中药饮片有限公司,批号分别为220114004、221128007、220224001、220907001),饮片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,装入过滤袋中。将药材包置于5 L水中,浸泡1 h,随后加热至沸腾。待水沸腾后,转小火持续沸腾,并趁热使用100目过滤袋过滤取液。随后,再加入4 000 mL水进行第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** TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(酶标生物技术有限公司,货号分别为 MB-2868A、MB-2776A、MB-2899A);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司,货号 R510-22-10);4%多聚甲醛固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 G1101);小鼠线栓(北京西浓科技有限公司,批号 1620-50A4);苏木素-伊红(HE)染液套装(北京索莱宝科技有限公司,货号 G1100-500mL);尼氏(Nissl)染液(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号 C0117);Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 anti-mouse 血管细胞黏附分子-1(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 神经纤毛蛋白-1(CD304)、Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Rat Anti-Mouse 整合素相关蛋白(CD47)(美国 BD 公司,货号分别为 567461、563584);吖啶橙/碘化丙啶[AO/PI,艾力特生物科技(上海)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、10001201000215);iScript cDNA Synthesis Kit(美国 Bio-Rad 公司,货号 1708891);2 $\times$  Realab Green PCR Fast mixture 通用型(北京兰博利德商贸有限公司,货号 R0202-02);HiPure Total RNA Mini Kit(北京拜尔迪生物技术有限公司,货号 R4111-02);autoMACS<sup>™</sup> Rinsing Solution(德国美天旎公司,货号 130-091-222-1)。

**1.5 仪器** Varioskan 型多功能酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);FACSMelody 型高速分选流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司);gentleMACS<sup>™</sup> Octo Dissociator 型全自动组织处理器(德国美天旎生物技术有限公司);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);Chromium Controller(美国 10x Genomics 公司);C1000 Touch<sup>™</sup> Thermal Cycler 型荧光定量 PCR 仪(美国伯乐生命科学研究公司);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);gentleMACS<sup>™</sup> Octo Dissociator 全自动组织处理器(德国美天旎生物技术有限公司)。

## 2 方法

**2.1 小鼠缺血再灌注(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<sup>[16]</sup>,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。假手术组小鼠除了不进行大脑中动脉闭塞,其余步骤相同。手术结束后,将小鼠置于电热毯上以维持体温,提高手术后存活率<sup>[16]</sup>。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 2 组:模型组和黄连解毒汤组。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<sup>[16]</sup>。假手术组和模型组小鼠接受生理盐水,而黄连解毒汤组给予相当于冻干黄连解毒汤粉末标准每日剂量(基于 60 kg 成人)的剂量,银杏叶提取物组将银杏叶提取物溶液配置至 2.16 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>后进行给药,连续 5 d,每天接受 0.2 mL $\cdot$ (10 g)<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>的剂量。第 6 天,最后 1 次给药后,在动物中诱导短暂大脑中动脉闭塞 MCAO 模型以模拟缺血性中风情况。

**2.3 神经功能评分** 采用泽亚-隆加评分法(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<sup>[16]</sup>。

**2.4 脑血流量测量** 为了评估皮质血流,用异氟醚麻醉小鼠并放置在立体定位装置中。对头部消毒后,做一个头皮切口,露出冠状缝合线和 Lambda 之间的颅骨区域。然后采用激光散斑成像测量皮质区域的脑血流,提供有关血流变化的定量数据<sup>[16]</sup>。

**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 染色溶液染色,以评估脑组织的结构和细胞变化<sup>[16]</sup>。

**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,将小鼠斩首,并分离缺血半球。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,然后进行互补脱氧核糖核酸(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,在伊鲁米娜NovaSeq 6000测序(Illumina NovaSeq 6000)平台上以2×150 bp的读长进行双端测序。

测序完成后,利用10x Genomics提供的Cell Ranger软件(version 7.1.0)对来自Illumina平台的原始测序文件进行处理。首先将测序仪输出的碱基识别文件(BCL)格式文件转换为可用于下游分析的FASTQ文件。随后,使用Cell Ranger的count流程对数据进行基因与细层面的定量分析,其内置的超快速通用RNA测序比对器(STAR)比对器可将读段精确比对到小鼠mm10参考基因组。通过该流程可获得多个关键质量控制指标,包括有效细胞数、基因表达数量、基因组比对率及唯一分子标识符(UMI)计数矩阵,为后续的单细胞分析奠定基础。

**2.7 数据预处理** 在对单细胞转录组数据进行分析之前,本研究首先使用单细胞分析工具包(Scanpy)对原始数据进行了系统的预处理。此步骤涵盖低质量细胞与低表达基因的过滤、表达矩阵的标准化处理及高变基因的筛选。利用Python3.12环境中的Scanpy(版本1.11.0),将各个样本的原始读数整合为统一的注释数据对象(AnnData)对象,并对每个样本中可能出现的双细胞(doublets)进行剔除,以确保单细胞数据的纯度。

随后根据UMI计数(nCounts\_RNA)与基因检测数量(nFeature\_RNA)设置质量控制阈值,对细胞进行进一步筛选。本研究采用的质控条件包括(1)基因需至少在3个细胞中被检测到;(2)每个细胞的基因表达数≥200;(3)线粒体基因比例<10%;(4)核糖体基因占比<10%;(5)血红蛋白基因表达占比≤0.05%。这些标准可有效排除受损细胞、死亡细胞或技术误差导致的异常细胞。

质量控制完成后,利用总计数归一化方法(normalize\_total)和对数转换方法对数据进行归一化及对数转换,以减少测序深度差异造成的系统偏差。随后使用高变基因(highly\_variable\_genes)函数筛选高变基因,参数设置为n\_top\_genes=3 000,

flavor="seurat\_v3",用于提升后续降维与聚类分析的分辨率。在可视化方面,结合Scanpy提供的邻域图构建功能,用于展示细胞之间的整体分布模式和相互关系。

在此基础上,为更直观地呈现高维转录组数据的结构特征,本研究采用*t*分布随机邻域嵌入(*t*-SNE)方法进行非线性降维。*t*-SNE能够较好地保留相似细胞的局部邻域结构,将高维表达谱映射至二维空间,从而便于观察不同细胞群体之间的聚类趋势与潜在异质性。

**2.8 批次效应处理** 由于单细胞测序数据在制备与采集过程中容易受到实验批次差异的影响,为避免技术噪声干扰分析结果,本研究引入了深度学习框架构建的scVI(版本1.2.2.post2)模型对数据进行批次校正。该模型基于变分自编码器(VAE)原理,通过学习高维基因表达矩阵的潜在表示来捕获生物学信号,并同时滤除由不同实验批次带来的系统性偏差。通过整合样本来源(Sample)信息进行矫正,最终有效削弱了个体与批次间的非生物学差异,使得细胞亚群的识别与后续比较更加稳定、可信。

**2.9 OR分析** 为了表征组别-细胞类型的组别分布偏好,计算比值比(OR)用于指示偏好性(或者说倾向分布)。

**2.10 数据整合与多视角分析** 在完成初步的质控、归一化和批次效应校正后,为了更全面地整合多组样本、提取具有生物学意义的差异信息,本研究进一步采用了Seurat(5.2.1)平台进行高维数据的多模态整合分析。

研究中同时使用单细胞流程[Single Cell Pipeline(SCP)(0.5.6)]平台对处理后的数据进行交互式展示与可视化,该平台支持基于基因表达、细胞注释与样本分组的信息可视化,包括均匀流形逼近与投影(UMAP)分布图、标志物(marker)基因表达图、分群热图等模块。

为获得更好的可视化效果,本研究联合应用Seurat与SCP平台进行数据整合与可视化分析。

**2.11 功能富集分析** 为了系统性地解析各细胞亚群中差异表达基因(DEGs)所涉及的生物学功能与信号通路,本研究进一步采用了R语言中的功能富集分析工具clusterProfiler(4.14.4)包<sup>[18]</sup>进行注释与富集分析。该工具能够自动调用多个主流生物数据库与基因集[如基因本体论(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、特征基因集(HallMarker)等],对上调或下调的基因集合进行功能聚类与可

视化。具体而言,研究采用 clusterProfiler 对每一细胞亚群的差异表达基因集进行 GO 与 KEGG 富集分析,GO 数据库涵盖三大类别:生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组成(CC)。KEGG 数据库则提供了更偏向于系统生物学的通路信息,包括信号转导、疾病通路、药物作用机制、代谢路径等。通过这些富集分析结果,研究不仅能够识别出每个细胞亚群独特的功能偏向,还可进一步揭示调控其状态转换或病理过程的核心通路。例如,某一亚群的上调基因显著富集于 GO: inflammatory response 和 KEGG: cytokine-cytokine receptor interaction 通路,可能提示其在炎症微环境中具有活化或调节作用。

**2.12 细胞通讯分析** CellChat 软件包用于从 scRNA-seq 数据中定量推断和分析细胞相互作用。

**2.13 转录因子分析** 为系统性地推断单细胞水平下的转录因子调控状态,本研究引入了基于先验网络知识的推断工具 decoupler(1.8.0)<sup>[19]</sup>,并整合转录调控相互作用集合(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。该工具采用多元线性模型(MLM)等统计方法,结合外部生物学知识网络对基因表达矩阵进行建模分析。

**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 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 血小板内皮细胞黏附分子 1(PECAM1),一氧化氮合酶 3(NOS3),C-C 趋化因子配体 2(CCL2),C-X-C 趋化因子配体 2(CXCL2),粒细胞集落刺激因子 3(CSF3),血管内皮生长因子 B(VEGFB),G 蛋白信号调节因子 5(RGS5), $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)的 mRNA 表达水平,并以  $\beta$ -actin 作为内参。引物序列见表 1。逆转录程序是 25  $^{\circ}$ C 加热 5 min 以启动反应,46  $^{\circ}$ C 加热 20 min 以进行逆转录,再进行 1 min 的 95  $^{\circ}$ C 加热以使逆转录终止。PCR 循环条件为 95  $^{\circ}$ C 反应 10 min,并进行 40 个扩增循环(每个循环设置条件为 95  $^{\circ}$ C 反应 20 s,60  $^{\circ}$ C 反应 20 s,72  $^{\circ}$ C 反应 30 s),于每轮循环后进行循环阈值( $C_t$ )值的检测,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  $C_t$  值后,95  $^{\circ}$ 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。

**2.15 ELISA** 采用 ELISA 试剂盒检测缺血侧脑组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 和 TNF- $\alpha$  的含量。收集六孔板中的培养液,3 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min(离心半径 12 cm)获取细胞上清,用试剂盒样品稀释液将上样

表 1 引物序列

Table 1 Primer Sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IL-1 $\beta$	上游 TGGCAACTGTTCTG	193
	下游 GGAAGCAGCCCTTCATCTTT	
IL-6	上游 CAAAGCCAGAGTCTTCAGAG	106
	下游 AGCATTGGAATTGGGGTAG	
TNF- $\alpha$	上游 TCTTCTCATTCTGCTTGTGG	109
	下游 ATGAGAGGGAGGCCATTTG	
PECAM1	上游 TTCAGCGAGATCCTGAGGGTC	204
	下游 CGCTTGGGTGTCATTCACGAC	
NOS3	上游 GAGATCACTGAGCTCTGTATCCAAC	498
	下游 CTCATTTCCAGGTGCTTCATGAAG	
CCL2	上游 CAGCAGGTGTCCAAAGAAG	111
	下游 TTCCGATCCAGGTTTTTAAT	
CXCL2	上游 CAAGGGTTGACTTCAAGAATCC	90
	下游 CCTTGAGAGTGGCTATGACTTC	
CSF3	上游 CAGGCTCTATCGGGTATTT	166
	下游 GGAAGGCAGAAGTGAAGG	
VEGFB	上游 GCCAGACAGGGTTGCCATAC	108
	下游 GGAGTGGGATGGATGATGTCAG	
RGS5	上游 GCTTCTAAACAGGATTCATTTCAATC	242
	下游 GAGGCATCTGAGTGAGTGTGTAAC	
$\beta$ -actin	上游 CTATTGGCAACGAGCGGTTTC	148
	下游 ACTGTGTTGGCATAGAGGTCTT	

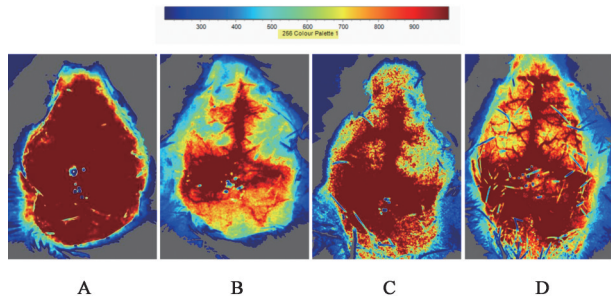
量调整至 50  $\mu$ L,加入预包被特异性抗体的 ELISA 板孔中,于 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。随后用洗涤缓冲液洗涤 5 次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体溶液再孵育 1 h,重复洗涤 5 次后加入 TMB 底物,于 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。反应终止后,在 450 nm 波长下用酶标仪测定吸光度  $A$ 。

**2.16 统计学分析** 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)。

### 3 结果

**3.1 黄连解毒汤对 MCAO 模型中脑组织缺血损伤的保护作用** 本研究通过神经功能评分和激光散斑成像技术对模型进行综合分析。结果显示,与假手术组比较,模型组小鼠在缺血后出现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( $P < 0.01$ ),提示缺血损伤较为严重。与模型组比较,黄连解毒汤组与银

杏仁提取物组的神经功能评分显著低于模型组,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),缺血区域的血流灌注显著改善( $P<0.01$ ),脑组织损伤范围有所缩小,表明黄连解毒汤能够在一定程度上缓解缺血引起的组织损伤,具有减轻脑缺血损害的潜力。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、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

**3.2 黄连解毒汤对缺血性脑损伤的保护作用** HE染色显示,与假手术组比较,模型组表现出皮质层不清晰、细胞间隙扩大和神经元细胞典型缺血损伤

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 <sup>-1</sup>	健侧血流量/PU	患侧血流量/PU	患侧/健侧血流/%
假手术组		1 349.76±142.03	1 388.83±71.41	1.04±0.09
模型组		670.10±52.59 <sup>1)</sup>	492.87±36.66 <sup>1)</sup>	0.71±0.05 <sup>1)</sup>
黄连解毒汤组	1.82	1 104.70±197.76 <sup>2)</sup>	909.85±143.47 <sup>2)</sup>	0.84±0.12 <sup>2)</sup>
银杏叶提取物组	0.432	1 314.79±155.75 <sup>2)</sup>	1 287.73±96.95 <sup>2)</sup>	0.98±0.08 <sup>2)</sup>

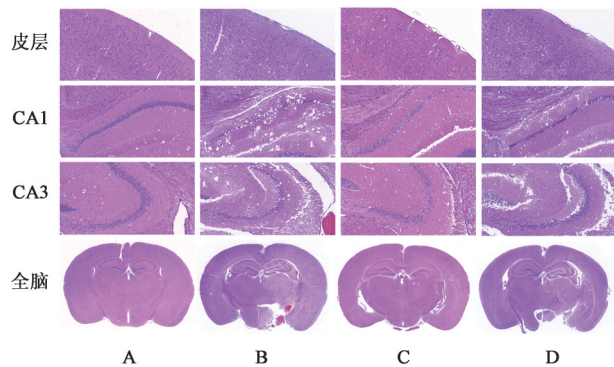


图2 黄连解毒汤对小鼠脑组织病理形态的影响(HE,×200)

Fig. 2 Effect of Huanglian Jiedutang on pathomorphology of mouse brain tissue (HE,×200)

**3.3 细胞身份识别与偏好性分析:黄连解毒汤对中枢和外周巨噬细胞及内皮细胞的保护作用** 通过单细胞RNA测序(scRNA-seq)技术,对脑和外周内

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 <sup>-1</sup>	Zea-Longa评分/分
假手术组		0.00±0.00
模型组		2.83±0.41 <sup>1)</sup>
黄连解毒汤组	1.82	2.00±0.63 <sup>2)</sup>
银杏叶提取物组	0.432	1.50±0.55 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表3-表5同)

的迹象,包括细胞体肿胀(细胞质空泡化)、核收缩和染色质边缘化。在受影响更严重的区域,观察到广泛的坏死和完全的结构解体;与模型组比较,黄连解毒汤组与银杏叶提取物组的损伤得到一定程度的逆转。见图2。Nissl染色显示,与假手术组比较,模型组许多神经元表现出苍白的Nissl小体,细胞体大小减小,细胞功能受损。此外,神经元树突出现碎片化或缩短,表明结构损伤。在缺血核心中,观察到典型的深蓝色尼氏染色的大量损失,表明神经元细胞坏死或严重损伤;而在将使用黄连解毒汤或银杏叶提取物进行治疗的组别与模型组比较时,这些变化得到一定程度的逆转。见图3。

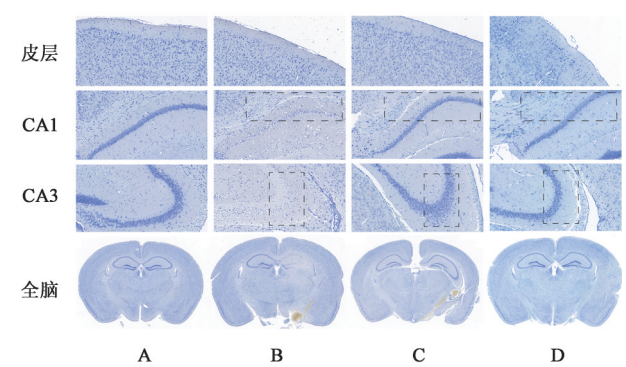


图3 黄连解毒汤对小鼠脑组织神经元的影响(Nissl,×200)

Fig. 3 Effect of Huanglian Jiedutang on neuronal morphology of mouse brain tissue (Nissl,×200)

细胞进行识别,成功识别出包括巨噬细胞、小胶、T细胞、内皮细胞及周细胞在内的多种主要细胞类型。随后,采用UMAP进行降维可视化,展示不同

细胞群体在样本中的聚类特征与空间分布差异。结果显示,缺血模型组中存在明显的外周巨噬细胞向脑组织迁移现象,提示中枢-外周免疫轴的活跃状态。见增强出版附加材料。

为进一步探究不同细胞类型在各实验组中的分布偏好性,采用OR指标进行量化分析。分析结果表明,在缺血模型组中,脑内组织中显著富集了来源于外周的巨噬细胞亚群,表明外周免疫细胞在缺血应激状态下向脑内异常聚集。而在接受黄连解毒汤的药物干预后,该偏好性分布趋势被明显抑制,外周巨噬细胞的迁移程度下降,说明黄连解毒汤对外周免疫细胞浸润具有一定的抑制作用。与此同时,黄连解毒汤组中内皮细胞和周细胞的比例相较模型组呈现明显回升,提示在药物干预下内皮-周细胞结构得以一定程度保护,表明黄连解毒汤可能通过维持血-脑屏障结构和功能稳定性,从而发挥其神经保护作用。细胞降维与细胞偏好分布见增强出版附加材料。

**3.4 内皮/周细胞差异基因分析及趋化因子释放水平变化:黄连解毒汤的保护效果** 差异表达分析显示,在模型组中,内皮细胞与周细胞中特征基因如PECAM1、内皮糖蛋白(Eng)、NOS3、血小板衍生生长因子B(PDGFB)、VEGFB等表达显著下降,而在黄连解毒汤组中上述基因表达水平得到明显恢复。此外,趋化因子如CCL2、CXCL2、CXCL10、CSF3等及其下游趋化分子Vcam1、Icam1、selp在模型组显著上调,黄连解毒汤组则显著下调。提示黄连解毒汤在促进内皮-周细胞功能恢复的同时,还可减少其炎性激活状态,从而减少对免疫细胞的趋化能力。差异表达分析结果显示,在模型组中,内皮细胞和周细胞的特征性功能基因(包括PECAM1、Eng、NOS3、PDGFB、VEGFB等)表达水平显著下调。这些基因广泛参与血管内皮的结构维持、血流调节、血-脑屏障功能稳定及血管周细胞的支持作用,其表达下降提示在缺血应激下,内皮-周细胞功能受到严重损害。而在接受干预后,以上关键基因的表达水平在内皮与周细胞中明显回升,表明黄连解毒汤具有良好的细胞保护与修复效应,有助于恢复血管结构的完整性和功能稳态。进一步分析发现,模型组中趋化因子表达显著增强,尤其是CCL2、CXCL2、CXCL10、CSF3等炎性趋化因子在内皮-周细胞中高表达,提示其处于高度激活状态,可能在病理条件下促进外周免疫细胞向脑内迁移。同时,这些趋化因子的下游黏附分子,包括VCAM1、ICAM1、SELP

也在模型组中显著上调,增强了炎性细胞与内皮之间的黏附能力,进一步推动炎症细胞渗透入脑组织,加剧炎症反应。相较之下,在黄连解毒汤组中,上述趋化因子及其黏附分子表达水平普遍下调,显示出明显的炎症抑制趋势。这一现象提示,黄连解毒汤不仅通过提升内皮-周细胞功能基因的表达促进血管保护作用,还可显著抑制炎症因子和黏附分子的异常激活,从而降低其对外周免疫细胞的吸引力,减少免疫细胞对脑组织的渗透与激活,具有多层次的抗炎和组织保护效果。黄连解毒汤对MCAO小鼠内皮/周细胞功能,趋化因子及黏附分子mRNA影响见增强出版附加材料。

**3.5 巨噬细胞趋化因子受体及杀伤分子水平变化:黄连解毒汤对外周巨噬细胞向脑内聚集的抑制作用** 在模型组中,脑内巨噬细胞(包括小胶质细胞和浸润性巨噬细胞)中炎症相关基因如IL-6、TNF- $\alpha$ 、基质金属蛋白酶-8(MMP-8)等表达显著上调。这些基因主要参与炎症因子的分泌、细胞因子级联反应及组织基质降解,反映出脑组织内巨噬细胞处于高激活、高炎症状态。其中,IL-6与TNF- $\alpha$ 为经典促炎因子,MMP8可促进细胞外基质降解并破坏血-脑屏障。与此同时,外周巨噬细胞中也表现出一系列与趋化迁移、黏附穿透及炎症活化相关的基因显著上调,包括分化簇14(CD14)、整合素 $\beta$ 2(Itgb2)、整合素 $\alpha$ M(ITGAM)、选择素P配体糖蛋白1(SELPLG)、C-C趋化因子受体(CCR)1、CCR2、CXCR2、CXCR3、粒细胞集落刺激因子3受体(CSF3R)、IL-1 $\beta$ 、诱导型一氧化氮合酶(NOS2)、S100钙结合蛋白A8(S100A8)、S100钙结合蛋白A9(S100A9)等。上述基因可系统性地反映外周巨噬细胞从识别炎症信号(如CD14)、趋化应答(如CCR2、CXCR2)、黏附滚动(如ITGAM、SELPLG)到渗透进入脑实质并激活效应功能(如NOS2、IL-1 $\beta$ 、S100A8/A9)的一整套病理过程。这一结果明确揭示了在缺血状态下,外周巨噬细胞被大规模动员,并通过趋化-黏附-浸润-激活的多步骤级联机制参与中枢炎症反应。值得注意的是,在接受黄连解毒汤治疗后,上述脑内和外周巨噬细胞中高表达的炎症与迁移相关基因的表达水平均出现显著下降。这一结果提示,黄连解毒汤能够有效抑制外周免疫细胞的动员、迁移与活化过程,阻断其跨越血-脑屏障进入中枢神经系统的病理进程,从而减轻脑组织中巨噬细胞介导的炎症反应与继发性组织损伤,体现其在中风干预中的多靶点免疫调节效应。黄连

解毒汤对MCAO小鼠炎症相关基因的影响见增强出版附加材料。

**3.6 细胞通讯分析:明确细胞间互作关键点** 为进一步探究不同处理条件下细胞间通讯网络的变化,采用CellChat工具对各实验组单细胞数据进行细胞通讯信号建模分析。结果显示,在缺血模型组中,多个与趋化和免疫细胞募集相关的信号通路显著增强,尤其是CSF3、CXCL及CCL通路的活性在细胞间通讯网络中表现突出。这些信号轴主要介导髓系细胞、T细胞和巨噬细胞的动员、定向迁移与活化,提示在缺血状态下,免疫细胞间存在高度协同的炎性通讯网络,从而加剧外周免疫细胞向中枢组织的异常浸润。相较之下,黄连解毒汤组中上述趋化相关信号通路的活性显著减弱,CSF3、CXCL、CCL等通路的配体-受体相互作用频率及强度均明显下降,反映出细胞间炎症性通讯链的中断或抑制。这一变化提示,黄连解毒汤可能通过干预关键的趋化信号通路,削弱外周免疫细胞与脑内细胞之间的相互激活,进而抑制巨噬细胞向脑内的迁移与聚集,为其发挥抗炎和神经保护作用提供了潜在机制依据。黄连解毒汤对MCAO小鼠中巨噬细胞通讯强度的影响见增强出版附加材料。

**3.7 细胞互作关系对与转录因子/上游分析:揭示关键变化节点** 进一步通过转录因子调控网络分析发现,缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )为缺血模型组中多个炎性及代谢相关基因表达的主要上游调控因子,其活性在模型组增强,而在黄连解毒汤组显著减弱。提示其在调节细胞代谢稳态、缓解缺血应激方面可能发挥重要作用。综上所述,黄连解毒汤通过干预转录调控网络,重塑细胞代谢与炎症应答状态,从而实现中枢-外周互作机制的协调干预。在进一步对CSF3、CXCL、CCL三大关键趋化信号通路进行深入解析后,发现各通路中均存在特定的配体-受体互作对,在缺血模型组中具有较高的活跃度,提示其在促进免疫细胞趋化、渗透及炎症级联放大过程中发挥重要作用。具体而言,在CCL通路中,活跃的互作对包括CCL6-CCR2、CCL3-CCR5、CCL4-CCR5及CCL3-CCR1。这些轴线均为经典的单核细胞/巨噬细胞迁移路径,尤其是CCL6-CCR2被认为是外周巨噬细胞向脑内迁移的重要驱动机制。CCL3/CCL4-CCR5轴则常见于炎症放大反应,与活化状态下的髓系细胞强相关。

在CXCL通路中,主要的活跃路径为CXCL2-CXCR2,该通路与中性粒细胞和部分巨噬细胞的急

性迁移密切相关,常参与炎症初期的快速反应。

在CSF3通路中,则以CSF3-CSF3r互作为主,是调控髓系细胞动员、生长和迁移的关键轴线,也与炎症环境中中性粒细胞和单核细胞的募集密切相关。

为探究这些通路激活背后的上游调控机制,进一步应用decoupler工具进行转录因子调控网络分析,结果发现,在缺血模型组中,转录因子HIF-1 $\alpha$ 活性显著增强。HIF-1 $\alpha$ 不仅调控细胞对缺氧环境的应答,还与多种炎症因子(如IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ )和糖酵解代谢基因[如己糖激酶2(HK2)、乳酸脱氢酶A(LDHA)、血小板型磷酸果糖激酶(PFKP)]的表达密切相关。其活性增强说明细胞处于应激性代谢重编程状态,同时伴随炎症级联反应的放大。许多研究表明,HIF-1 $\alpha$ 与趋化密切相关<sup>[20-22]</sup>。因此,HIF-1 $\alpha$ 可能在细胞损伤、免疫细胞迁移及炎症反应中起着至关重要的作用。特别是在缺血模型中,HIF-1 $\alpha$ 通过促进炎症因子的释放和细胞迁移,进一步加剧了免疫细胞的趋化、渗透和炎症放大过程,导致血-脑屏障的破坏和组织损伤的加剧。相对而言,在黄连解毒汤组中,HIF-1 $\alpha$ 的活性显著下降,提示其在减轻缺血应激、抑制过度代谢活化、缓解炎症损伤等方面可能发挥核心作用。

综上所述,本研究结果表明,黄连解毒汤通过干预CCL、CXCL、CSF3等关键细胞通讯通路及其配体-受体互作关系,结合对HIF-1 $\alpha$ 为代表的转录调控网络的重塑作用,在分子、细胞与系统层面协调调节中枢-外周互作过程,从而达到抗炎、保护血-脑屏障、减轻组织损伤的综合干预效果。进一步通过转录因子调控网络分析发现,HIF-1 $\alpha$ 为缺血模型组中多个炎性及代谢相关基因表达的主要上游调控因子,其活性在模型组增强,而在黄连解毒汤组显著减弱。提示其在调节细胞代谢稳态、缓解缺血应激方面可能发挥重要作用。综上所述,黄连解毒汤通过干预转录调控网络,重塑细胞代谢与炎症应答状态,从而实现中枢-外周互作机制的协调干预。黄连解毒汤对MCAO小鼠HIF-1 $\alpha$ 活性与CCL、CXCL、CSF3细胞间通讯的影响见增强出版附加材料。

**3.8 损伤、趋化因子与内皮、周细胞功能相关mRNA的PCR验证** 与假手术组比较,模型组小鼠IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CCL2、CXCL2、CSF3分子的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 ( $P < 0.01$ ); 而与模型组相比, 在黄连解毒汤组与银杏叶提取物组中, IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、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 小鼠损伤、趋化因子与内皮、周细胞功能相关 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Huanglian Jiedutang on mRNA related to injury, chemokines, and endothelial and pericyte function in MCAO mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PECAM1/ $\beta$ -actin	NOS3/ $\beta$ -actin	VEGFB/ $\beta$ -actin	RGS5/ $\beta$ -actin	CCL2/ $\beta$ -actin
假手术组		0.97±0.15	1.06±0.27	1.03±0.07	1.07±0.10	1.02±0.18
模型组		0.50±0.07 <sup>1)</sup>	0.43±0.13 <sup>1)</sup>	0.64±0.05 <sup>1)</sup>	0.43±0.07 <sup>1)</sup>	11.00±1.57 <sup>1)</sup>
黄连解毒汤组	1.82	0.85±0.11 <sup>2)</sup>	0.85±0.12 <sup>2)</sup>	0.88±0.17 <sup>2)</sup>	0.67±0.16 <sup>2)</sup>	6.64±0.29 <sup>2)</sup>
银杏叶提取物组	0.432	0.91±0.12 <sup>2)</sup>	0.89±0.14 <sup>2)</sup>	0.92±0.12 <sup>2)</sup>	0.90±0.05 <sup>2)</sup>	4.11±1.89 <sup>2)</sup>
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CXCL2/ $\beta$ -actin	CSF3/ $\beta$ -actin	IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actin	IL-6/ $\beta$ -actin	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin
假手术组		0.96±0.20	1.01±0.15	1.04±0.14	1.02±0.11	1.03±0.20
模型组		11.19±2.00 <sup>1)</sup>	13.04±1.96 <sup>1)</sup>	13.03±2.96 <sup>1)</sup>	11.30±2.99 <sup>1)</sup>	9.73±3.77 <sup>1)</sup>
黄连解毒汤组	1.82	6.42±1.92 <sup>2)</sup>	7.40±1.47 <sup>2)</sup>	8.62±0.99 <sup>2)</sup>	5.22±1.15 <sup>2)</sup>	3.02±0.67 <sup>2)</sup>
银杏叶提取物组	0.432	5.64±0.85 <sup>2)</sup>	6.12±1.95 <sup>2)</sup>	5.74±2.20 <sup>2)</sup>	4.19±1.68 <sup>2)</sup>	2.28±1.09 <sup>2)</sup>

3.9 炎症因子的 ELISA 验证 通过 ELISA 测定脑组织炎症因子蛋白的表达。结果显示, 与假手术组比较, 模型组小鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平

显著上调 ( $P < 0.01$ ); 而与模型组比较, 黄连解毒汤与银杏叶提取物组的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平显著下调 ( $P < 0.01$ )。见表 5。

表 5 黄连解毒汤对 MCAO 小鼠炎症因子蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of Huanglian Jiedutang on protein levels of inflammatory factors in MCAO mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-6	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	ng·L <sup>-1</sup>
假手术组		16.58±1.94	16.97±1.43	14.62±1.56	
模型组		689.53±160.10 <sup>1)</sup>	21.29±0.76 <sup>1)</sup>	30.72±2.10 <sup>1)</sup>	
黄连解毒汤组	1.82	134.32±25.46 <sup>2)</sup>	16.91±1.61 <sup>2)</sup>	17.65±1.10 <sup>2)</sup>	
银杏叶提取物组	0.432	110.53±25.43 <sup>2)</sup>	15.52±1.39 <sup>2)</sup>	16.56±0.67 <sup>2)</sup>	

#### 4 讨论

在缺血性脑卒中发生后, 神经血管单元中的神经元、内皮细胞和周细胞同时遭受严重的缺血缺氧损伤, 导致血脑屏障(BBB)的结构和功能完整性显著破坏。具体而言, 脑微血管内皮细胞在缺氧缺糖的环境下, 紧密连接蛋白[如闭合蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白-5(Claudin-5)]表达水平下降, 紧密连接结构发生解体, 直接导致 BBB 通透性明显增加。此外, 内皮细胞的损伤还伴随内皮屏障功能丧失, 使得外周有害物质得以进入脑实质, 加重局部损伤反应<sup>[23]</sup>。

与此同时, 周细胞在缺血缺氧的刺激下也迅速收缩、出现凋亡或脱离微血管基底膜, 丧失对内皮细胞的结构和功能支持作用, 加剧了内皮损伤的严重程度。此外, 周细胞受损过程中会释放 MMPs, 尤其是 MMP-2 和 MMP-9, 这些酶可进一步降解基底

膜与细胞外基质成分, 从而促进血脑屏障的结构性失稳, 恶化脑组织的微环境, 进一步放大病理损伤效应<sup>[24]</sup>。

值得注意的是, 血脑屏障的破坏及神经血管单元的损伤会导致一系列趋化因子(如 CCL2、CXCL1、CXCL2)的显著释放。这些趋化因子通过与相应的受体结合, 形成趋化梯度, 有效地吸引外周单核细胞和巨噬细胞进入脑组织, 体现了明显的中枢-外周免疫相互作用。这些外周免疫细胞穿过受损的血脑屏障进入脑实质后, 迅速向促炎型(M1型)极化, 释放大量炎症因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)及活性氧、一氧化氮等自由基, 进一步加剧局部的炎症反应和氧化应激状态, 造成神经元的二次损伤。同时, 进入脑实质的巨噬细胞还能激活小胶质细胞, 使其进一步释放炎症介质, 形成恶性循环的炎症级联反应, 显著扩大脑组织损害范围。因

此,如何有效保护周细胞和内皮细胞,维持血脑屏障结构与功能的稳定性,同时降低外周巨噬细胞的趋化浸润,成为缺血性脑卒中治疗中的重要目标<sup>[25-27]</sup>。

本实验结果中,与既往研究一致,缺血性脑卒中模型组相较于假手术组,脑组织中周细胞与内皮细胞的数量明显减少,巨噬细胞数量显著增加,这证实了卒中引发的内皮细胞与周细胞损伤和外周巨噬细胞浸润的现象。然而,在给予黄连解毒汤治疗后,观察到这一趋势发生明显逆转,相较于模型组,黄连解毒汤组的周细胞和内皮细胞数量上调,巨噬细胞数量显著下调,外周血中巨噬细胞的比例亦出现降低趋势。这表明黄连解毒汤不仅能有效保护周细胞与内皮细胞免于损伤,还能减少外周巨噬细胞的趋化浸润,且进一步降低巨噬细胞的整体激活状态,明显减少卒中后的过度免疫炎症反应。

在分子水平的分析中,进一步发现模型组的细胞功能和形态相关基因表达显著下调,如周细胞中的RGS5、肌球蛋白重链9(MYH9),内皮细胞中的PECAM、血管内皮生长因子受体1(FLT1);同时,趋化因子(如CXCL2)和黏附因子(如Icam1)的表达显著升高。这些变化说明卒中条件下内皮和周细胞不仅在形态学上受到损伤,其功能也出现显著异常,且趋化信号的增强与外周免疫细胞的募集密切相关。黄连解毒汤治疗则显著逆转了这些变化,抑制了趋化信号的释放,提示其可能通过保护细胞结构与功能而发挥神经保护作用。

此外,转录因子活性分析结果表明,HIF-1 $\alpha$ 在模型组中明显升高,而在假手术组和黄连解毒汤组中则维持较低水平。已有研究证明,HIF-1 $\alpha$ 是一种重要的低氧敏感转录因子,缺氧条件下会被快速激活,促进趋化因子和黏附分子的转录,从而促进炎症细胞的浸润和黏附,加剧炎症反应和组织损伤。因此,黄连解毒汤可能通过抑制HIF-1 $\alpha$ 的活性,从而减少趋化因子与粘附因子的表达,进一步阻断炎症细胞向脑内浸润,显著减轻缺血性卒中后的继发性损伤。

综上所述,保护神经血管单元完整性和降低外周巨噬细胞浸润是改善缺血性脑卒中预后的关键途径。黄连解毒汤可能通过保护内皮细胞和周细胞,减少HIF-1 $\alpha$ 介导的炎症趋化机制,从而发挥治疗作用。这些结果进一步丰富了对缺血性卒中病理机制的理解,为临床治疗提供了有价值的科学依

据。本研究在机制验证方面仍存在不足。尽管单细胞转录组揭示了多条关键通路及细胞互作的变化,但缺乏基因编辑手段来直接检验关键基因的因果作用;同时,对信号通路核心蛋白的检测仍不够系统,导致部分机制推断尚缺乏转录-蛋白双层证据的支撑。未来需结合基因编辑模型、多指标蛋白学验证及功能性阻断实验,从多个层面构建更完整的机制证据链,以进一步明确黄连解毒汤在急性脑梗死中的精准作用靶点与调控路径。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] SUN Y, ZHONG Q, HOU Y, et al. Effect of DU meridian acupuncture and temporal three-needle on vascular protection mechanisms in patients with acute cerebral infarction: A randomized controlled evaluator-blinded clinical trial [J]. *Front Neurol*, 2025, 16: 1528340.
- [2] WANG W, JIANG B, SUN H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: Results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults [J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-771.
- [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] CHENG F, CHENG P, XIE S, et al. Epidemiological trends and age-period-cohort effects on ischemic stroke burden across the BRICS-plus from 1992 to 2021 [J]. *BMC Public Health*, 2025, 25(1): 137.
- [5] YANG S, JIN H, ZHU Y, et al. Diverse functions and mechanisms of pericytes in ischemic stroke [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15(6): 892-905.
- [6] ELALI A, THÉRIAULT P, RIVEST S. The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 6453-6474.
- [7] AMANTEA D, TASSORELLI C, PETRELLI F, et al. Understanding the multifaceted role of inflammatory mediators in ischemic stroke [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(18): 2098-2117.
- [8] CANDELARIO-JALIL E, DIJKHUIZEN R M, MAGNUS T. Neuroinflammation, stroke, blood-brain barrier dysfunction, and imaging modalities [J]. *Stroke*, 2022, 53(5): 1473-1486.
- [9] LI Y J, SHI S X, LIU Q, et al. Targeted role for sphingosine-1-phosphate receptor 1 in cerebrovascular integrity and inflammation during acute ischemic stroke [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 735: 135160.
- [10] PEDRAGOSA J, SALAS-PERDOMO A, GALLIZIOLI M, et al. CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2018,

- 6(1):76.
- [11] IADECOLA C, BUCKWALTER M S, ANRATHER J. Immune responses to stroke: Mechanisms, modulation, and therapeutic potential[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(6): 2777-2788.
- [12] ALAWIEH A, LANGLEY E F, TOMLINSON S. Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(441): eaa06459.
- [13] 张锦,张允岭,郭蓉娟,等. 从“毒损脑络”到“毒损络脉”的理论探讨[J]. *北京中医药*, 2013, 32(7): 483-486.
- ZHANG J, ZHANG Y L, GUO R J, et al. The hypothesis of the injury of brain collaterals by toxins and its theoretical and practical significance[J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2013, 32(7): 483-486.
- [14] 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.
- [15] 王凤丽,郭蓉娟,陈志刚,等. 急性脑梗死从火毒论治的理论基础与实践依据[J]. *北京中医药*, 2015, 34(10): 797-800.
- WANG F L, GUO R J, CHEN Z G, et al. Theoretical basis and practical evidence of treating acute cerebral infarction from the perspective of fire toxin[J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2015, 34(10): 797-800.
- [16] 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.
- [17] GU Y, SUN Z, LI T, et al. Huanglian Jiedutang treats ischemic stroke by regulating pyroptosis: Insights from multi-omics and drug-target relationship analysis [J]. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(6): 775.
- [18] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *Omics J Integr Biol*, 2012, 16(5): 284-287.
- [19] BADIA-I-MOMPEL P, VÉLEZ SANTIAGO J, BRAUNGER J, et al. decoupleR: Ensemble of computational methods to infer biological activities from omics data [J]. *Bioinforma Adv*, 2022, 2(1): vbac016.
- [20] YANG K, ZHANG W, ZHONG L, et al. Long non-coding RNA HIF1A-As2 and MYC form a double-positive feedback loop to promote cell proliferation and metastasis in KRAS-driven non-small cell lung cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(6): 1533-1549.
- [21] ZHANG Y, BIAN Y, WANG Y, et al. HIF-1 $\alpha$  is necessary for activation and tumour-promotion effect of cancer-associated fibroblasts in lung cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(12): 5457-5469.
- [22] WANG X, BREA L, LU X, et al. FOXA1 inhibits hypoxia programs through transcriptional repression of HIF1A [J]. *Oncogene*, 2022, 41(37): 4259-4270.
- [23] SATO Y, FALCONE JUENGERT J, TOMINAGA T, et al. Remodeling of the neurovascular unit following cerebral ischemia and hemorrhage[J]. *Cells*, 2022, 11(18): 2823.
- [24] LÉNÁRT N, CSERÉP C, CSÁSZÁR E, et al. Microglia-neuron-vascular interactions in ischemia [J]. *Glia*, 2024, 72(5): 833-856.
- [25] WANG Y, YIN Q, YANG D, et al. LCPI knockdown in monocyte-derived macrophages: Mitigating ischemic brain injury and shaping immune cell signaling and metabolism[J]. *Theranostics*, 2024, 14(1): 159-175.
- [26] HAN B, ZHOU S, ZHANG Y, et al. Integrating spatial and single-cell transcriptomics to characterize the molecular and cellular architecture of the ischemic mouse brain [J]. *Sci Transl Med*, 2024, 16(733): eadg1323.
- [27] GARCIA BONILLA L, SHAHANOOR Z, SCIORTINO R, et al. Analysis of brain and blood single-cell transcriptomics in acute and subacute phases after experimental stroke [J]. *Nat Immunol*, 2024, 25(2): 357-370.

[责任编辑 张丰丰]