

· 清热解毒法干预急性脑梗死的作用机制专题 ·

[编者按] 急性脑梗死是全球致死率和致残率最高的疾病之一,其发病机制复杂、治疗窗口有限,是当今导致神经功能障碍的重要原因,严重影响患者生活质量。中医药在急性脑梗死的防治中积累了数千年的丰富经验,在提高临床疗效、改善远期预后方面展现出独特优势。在历代医家对中风的病机认识中,“火热致中”理论占据着举足轻重的地位,多项临床研究亦表明,“火热证”在脑梗死急性期具有较高的发生率,并在病程早期处于主导地位,其动态演变规律为中医“火热致中”理论的现代病理基础提供了流行病学证据。从现代医学角度来看,脑梗死后机体可迅速启动炎症反应,炎症因子释放、免疫细胞激活及继发性脑损伤共同参与疾病进程。中医所言“火热”“热毒”等病理概念,与炎症反应在致病特点上具有一定的对应关系,二者在急性损伤及组织破坏方面存在内在联系。基于上述认识,清热解毒法逐渐成为中医药治疗急性脑梗死的重要策略,以黄连解毒汤、安宫牛黄丸及清开灵注射液为代表的方药正是“火热致中”理论指导下的典型应用,可以有效抑制脑梗死后炎症反应,减轻脑组织损伤。方中多味中药也具有明确的药理活性,如黄连具有抗炎、抗氧化作用,栀子可通过调节炎症因子减轻神经损伤,牛黄则在神经保护方面发挥重要作用,上述多成分、多靶点的协同作用,共同构成了清热解毒类中药在急性脑梗死中发挥脑保护效应的物质基础。北京中医药大学王庆国课题组长期从事清热解毒法治疗急性脑梗死的生物学机制研究工作,主持并出色地完成了精制清开灵注射液的成药性研究、精制清开灵注射剂的多靶点作用机制等多项国家级课题的工作。该专刊围绕河间学派清热解毒代表方黄连解毒汤展开,内容涵盖细胞实验、动物模型、组学分析及综述研究,重点关注炎症调控、神经血管单元保护及免疫微环境重塑等关键环节,系统构建了黄连解毒汤干预脑梗死的多层级作用框架,揭示了该方在脑梗死发生发展过程中的调节作用,为清热解毒法在脑血管疾病防治中的应用与发展提供了新思路。

## 黄连解毒汤及其主要活性成分抑制LPS所致 BV2小胶质细胞M1型极化的机制

张浩嘉<sup>1</sup>, 王凯<sup>1</sup>, 刘坤静<sup>1</sup>, 兰蕊<sup>1</sup>, 孙资金<sup>1</sup>, 王春雨<sup>1</sup>, 马文源<sup>1</sup>, 邵威<sup>1</sup>, 韩金华<sup>1</sup>,  
董利洋<sup>1</sup>, 李长香<sup>1</sup>, 王雪茜<sup>1</sup>, 崔友祥<sup>2\*</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. 河北省沧州中西医结合医院 河北省中西医结合神经康复重点实验室, 河北 沧州 061001)

[摘要] 目的:探讨黄连解毒汤及其主要活性成分(京尼平苷、黄芩苷、小檗碱)能否通过高迁移率族蛋白B1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路抑制脂多糖(LPS)干预下BV2细胞的炎症反应,同时深入研究在等含量比例条件下,3种单体、单体合方及黄连解毒汤复方之间的疗效差异。方法:将BV2小胶质细胞作为主要研究对象,细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测不同浓度二甲亚砜(DMSO)(0.8%、0.4%、0.2%、0.1%和0.05%)对细胞活力的影响,Incucyte监测不同质量浓度黄连解毒汤(200、100、50、25、12.5、6.25 mg·L<sup>-1</sup>)对细胞生长状态的影响,一氧化氮(NO)检测筛选黄连解毒汤最佳给药浓度,高效液相色谱(HPLC)仪检测分析黄连解毒汤中京尼平苷、黄芩苷和小檗碱的含量并依据含量占比设置组别,CCK-8法检测各组药物对细胞活力的影响,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组细胞上清液炎症因子[肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6和IL-10]的含量,流式细胞术测定各组药物对BV2细胞M1型极化的影响,蛋白免疫印迹法检测各组药物对BV2细胞HMGB1、TLR4及NF- $\kappa$ B相关蛋白表达水平的影响。结果:与空白组比较,0.2%及以下浓度的DMSO在48 h内对细胞活力没有影响,BV2细胞在200 mg·L<sup>-1</sup>浓度的黄连解毒汤干预下,24 h时生长状态达到平台期,同时在2 mg·L<sup>-1</sup> LPS的刺激下,该浓度的黄连解毒汤可以更好地减少NO的释放且预给药6 h较直接给药干预对于NO的抑制作用更强。HPLC结果显示,每1 mg黄连解毒汤冻干粉中含大约京尼平苷24  $\mu$ g、黄芩苷15  $\mu$ g和小檗碱30  $\mu$ g,依照含量比例设置后续实验组别:空白组、2 mg·L<sup>-1</sup> LPS组、200 mg·L<sup>-1</sup>黄连解毒汤组、单体合方组、4.8 mg·L<sup>-1</sup>京尼平苷组、3 mg·L<sup>-1</sup>黄芩苷组、

[收稿日期] 2025-10-29

[基金项目] 国家自然科学基金区域联合重点支持项目(U21A20400);河北省自然科学基金项目(H2024110042);河北省中西医结合神经康复重点实验室项目(SZX201318)

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

[通信作者] \* 崔友祥,副主任中医师,硕士生导师,从事中医药防治脑血管疾病研究,E-mail:heartwing1985@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研究,E-mail:fafengcheng1003@sina.com

6 mg·L<sup>-1</sup>小檗碱组。其中单体合方组为3种活性成分复合溶解而成。与空白组比较,LPS和黄连解毒汤及其活性成分组皆不影响细胞活力。与空白组比较,LPS组显著升高细胞上清液炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6和IL-10( $P<0.01$ ),黄连解毒汤及其活性成分均可下调细胞上清液促炎因子TNF-α、IL-1β、IL-6( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),同时上调抗炎因子IL-10( $P<0.01$ ),其中单体合方组抑炎能力最佳( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。与空白组比较,LPS组显著升高BV2细胞CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>亚群(M1型)的比例( $P<0.01$ ),黄连解毒汤及其活性成分均对BV2细胞的M1型极化有明显抑制作用( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),单体合方组同样效果最佳( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。与空白组比较,LPS组HMGB1、TLR4及NF-κB相关蛋白的表达明显上升( $P<0.01$ ),而用黄连解毒汤及其活性成分干预BV2细胞后,这些蛋白的表达明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),其中单体合方组调节该通路效果最明显( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论:黄连解毒汤及其主要活性成分(京尼平苷、黄芩苷和小檗碱)皆能够抑制LPS刺激下BV2细胞的炎症反应,且3种活性成分复合而成的单体合方抑炎效果最佳,其通过HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路,显著减轻LPS干预下BV2细胞的M1型极化。

**[关键词]** 黄连解毒汤; 高效液相色谱法(HPLC); BV2小胶质细胞; M1型极化; 高迁移率族蛋白B1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)/核转录因子-κB(NF-κB)信号通路

**[中图分类号]** R256;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)11-0044-12

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20260326

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20260122.1740.002>

**[网络出版日期]** 2026-01-23 10:49:49 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



## Mechanisms of Huanglian Jiedutang and Its Major Active Constituents in Inhibiting LPS-induced M1 Polarisation of BV2 Microglia

ZHANG Haojia<sup>1</sup>, WANG Kai<sup>1</sup>, LIU Kunjing<sup>1</sup>, LAN Xin<sup>1</sup>, SUN Zijin<sup>1</sup>, WANG Chunyu<sup>1</sup>, MA Wenyuan<sup>1</sup>,  
SHAO Wei<sup>1</sup>, HAN Jinhua<sup>1</sup>, DONG Liyang<sup>1</sup>, LI Changxiang<sup>1</sup>, WANG Xueqian<sup>1</sup>, CUI Youxiang<sup>2\*</sup>,  
CHENG Fafeng<sup>1\*</sup>, WANG Qingguo<sup>1</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102446, China; 2. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Neurological Rehabilitation, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Cangzhou 061001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether Huanglian Jiedutang (HLJD) and its major active constituents (geniposide, baicalin, and berberine) can inhibit the inflammatory response of BV2 cells under lipopolysaccharide (LPS) stimulation via the high-mobility group protein B1 (HMGB1)/Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor-κB (NF-κB) signaling pathway, and to explore differences in therapeutic efficacy among the three monomers, their combined formula, and HLJD under equal content ratios. **Methods:** BV2 microglial cells were used as the primary experimental model. Cell viability was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) method to examine the effects of different concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, and 0.05%) on cell viability. IncuCyte was employed to monitor the growth of cells under different concentrations of HLJD (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg·L<sup>-1</sup>). Nitric oxide (NO) assay was used to screen the optimal HLJD concentration. High-performance liquid chromatography (HPLC) determined the content of geniposide, baicalin, and berberine in HLJD, and experimental groups were subsequently established according to the relative proportions of these constituents. CCK-8 assay evaluated cell viability under different treatments. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measured levels of inflammatory factors (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10) in the supernatant. Flow cytometry assessed the effects of treatments on M1-type polarization of BV2 cells. Western blot determined the expression levels of HMGB1, TLR4, and NF-κB-related proteins. **Results:** Compared with the blank group, DMSO at concentrations ≤0.2% did not affect cell viability within 48 h. BV2 cell growth plateaued at 24 h after treatment with 200 mg·L<sup>-1</sup> HLJD. Under stimulation with 2 mg·L<sup>-1</sup> LPS, this concentration of HLJD effectively reduced NO release, and 6 h pre-treatment had a stronger inhibitory effect on NO than direct administration. HPLC results showed that 1 mg of HLJD freeze-dried powder contained approximately 24 μg of geniposide, 15 μg of baicalin, and 30 μg of berberine. Based on these ratios, experimental groups were blank, LPS (2 mg·L<sup>-1</sup>), HLJD (200 mg·L<sup>-1</sup>), monomer combination, geniposide (4.8 mg·L<sup>-1</sup>), baicalin (3 mg·L<sup>-1</sup>), and berberine (6 mg·L<sup>-1</sup>). The monomer combination group consisted of all three active constituents dissolved together. LPS and HLJD or its active constituents did not affect cell viability compared with the blank group. LPS significantly increased TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-10 in the supernatant ( $P<0.01$ ). HLJD and its active constituents significantly reduced pro-inflammatory factors TNF-α, IL-1β, and IL-6 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) while upregulating anti-inflammatory IL-10 ( $P<0.01$ ), with the

monomer combination showing the strongest effect ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the blank group, LPS significantly increased the proportion of CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (M1-type) BV2 cells ( $P<0.01$ ). HLJD and its constituents partially inhibited M1 polarization ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), with the monomer combination exhibiting the most pronounced effect ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the blank group, LPS upregulated HMGB1, TLR4, and NF- $\kappa$ B-related proteins ( $P<0.01$ ), whereas HLJD and its active constituents significantly reduced their expression ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), with the monomer combination having the strongest regulatory effect ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

**Conclusion:** HLJD and its major active constituents (geniposide, baicalin, berberine) can inhibit LPS-induced inflammatory responses in BV2 cells. The combination of the three active constituents demonstrates the most potent anti-inflammatory effect, significantly attenuating M1-type polarization of BV2 cells via the HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**[Keywords]** Huanglian Jiedutang; high-performance liquid chromatography (HPLC) detection; BV2 microglia cells; M1-type polarization; high-mobility group protein B1 (HMGB1)/Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway

神经炎症是中枢神经系统在遭受损伤或感染后触发的一类免疫反应<sup>[1-2]</sup>,常出现在认知障碍性疾病的早期阶段<sup>[3]</sup>。其机制高度复杂,涉及胶质细胞的异常激活、炎症介质的级联释放及活性氧的过度产生<sup>[4-5]</sup>。在阿尔茨海默病、帕金森病等多种神经退行性疾病中,这类免疫反应持续参与病程演进,并驱动神经损伤和功能退化<sup>[6]</sup>。小胶质细胞是神经炎症的主要介导者,在调控神经炎症、信号传递和中枢免疫反应中担任重要角色<sup>[7-8]</sup>。在正常情况下,他们以静息态均匀分布于脑组织,并通过持续监测局部环境来维持中枢神经系统的动态平衡<sup>[9]</sup>。然而,在病理状态下,小胶质细胞会迅速发生极化,释放大炎症介质和细胞毒性因子,导致神经元受损<sup>[10-11]</sup>。研究表明,其过量分泌的炎症因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),与中风、阿尔茨海默病和帕金森病等疾病的发生密切相关<sup>[12]</sup>。由此可见,调控小胶质细胞的异常活化,并降低其介导的炎症反应,可能为多种神经系统疾病的治疗和预防提供新的干预方向。近年来,黄连解毒汤的抗炎作用已得到广泛研究<sup>[13]</sup>,其在调控神经炎症,尤其是小胶质细胞介导的炎症反应方面愈发受到关注<sup>[14]</sup>。课题组前期研究表明,黄连解毒汤能够抑制小胶质细胞由静息状态向促炎表型转化,从而减轻神经炎症并保护神经功能。在众多活性成分中,京尼平苷、黄芩苷和小檗碱药理效应突出,不仅被公认为黄连解毒汤的代表性活性成分,也是其质量控制的核心指标<sup>[15-17]</sup>。既往研究提示,这些成分具有明确的抗炎和神经保护潜力<sup>[18-20]</sup>,且他们的联合使用可以增强整体的抗神经炎症效应<sup>[21-22]</sup>。基于此,本研究选取京尼平苷、黄芩苷和小檗碱为主要研究对象,通过高效液相色谱法(HPLC)定量分析他们在黄连解毒汤中的含量比例,依照含量比例设立京尼平苷组、黄芩苷组、小檗碱组和3种有效成分协同配伍而成的单体合方组,进而系统评估黄连解毒汤及上述主

要活性成分对脂多糖(LPS)诱导BV2小胶质细胞炎症反应的抑制作用及相关调控机制。本研究从“细胞表型-功能因子-信号通路”3个层面探究黄连解毒汤及其主要活性成分对神经炎症的调控作用,并在等含量比例控制的基础上,比较其3种核心成分及协同配伍后对高迁移率族蛋白B1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)炎症通路的调节特征,以期在传统中药复方的现代化拆解与优化提供新的研究思路。

## 1 材料

**1.1 细胞** 本研究使用的BV2细胞系来源于湖南丰晖生物科技有限公司(编号CL0056,传至第10代)。

**1.2 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(中国),药品由北京中医药大学中医学院孔慧副研究员鉴定符合2025年版《中华人民共和国药典》所规定的质量标准。

**1.3 试剂** 杜氏改良老鹰培养基(DMEM)、青霉素-链霉素混合液(美国Gibco公司,批号分别为C11995500BT、15140-122);胎牛血清(FBS,南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号为F103-01);胰蛋白酶(大连美仑生物技术有限公司,批号MA0233-1);LPS(美国Sigma公司,批号L4391);细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测液(巴西Biorigin公司,批号为BN15201);一氧化氮(NO)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号S0021S);京尼平苷对照品、黄芩苷对照品、小檗碱对照品(美国MCE公司,批号分别为HY-N0009、HY-N0197、HY-18258,纯度分别为99.89%、98.92%、99.69%);乙酸铵水(美国Konosience公司,批号为AB068647);乙腈(美国Thermo公司,批号L-25962);二甲基亚砜(DMSO)(北京兰博利德商贸

有限公司,批号5879111241);TNF- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10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-2868A、MB-2776A、MB-2899A、MB-2912A);CD16/32封闭剂、CD11b-PEcy7抗体(质量浓度为0.2 g·L<sup>-1</sup>)(美国BD公司,批号分别为553141、552850);Zombie NIR抗体(1:100)、CD80-APC抗体(质量浓度为0.2 g·L<sup>-1</sup>)、CD86-BV421抗体(质量浓度为0.2 g·L<sup>-1</sup>)(美国Biolegend公司,批号分别为423105、104714、105032);牛血清白蛋白(BSA)(北京普利莱基因技术有限公司,批号P1621);羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)-辣根过氧化物酶(HRP)抗体(稀释比为1:10 000)、增强化学发光液(ECL)(苏州新赛美生物科技有限公司,批号分别为P8002、P10200);兔抗磷酸化(p)-p65、兔抗p-I $\kappa$ B激酶 $\alpha$ (IKK $\alpha$ )、兔抗p-核转录因子- $\kappa$ B抑制因子 $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为AP1294、AP0506、AP0707,稀释比分别为1:10 000、1:1 000、1:1 000);兔抗HMGB1、兔抗p65、兔抗IKK $\alpha$ 、兔抗I $\kappa$ B $\alpha$ 、鼠抗TLR4、鼠抗 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)(美国Proteintech公司,批号分别为10829-1-AP、80979-1-RR、84372-4-RR、10268-1-AP、66350-1-IG、66009-1-IG,稀释比分别为1:10 000、1:10 000、1:1 000、1:10 000、1:1 000、1:10 000)。

**1.4 仪器** NU-5820E型二氧化碳培养箱(美国NUAIRE公司);710402040型真空冷冻干燥机(美国Labconco公司);I3x型酶标仪(美国Molecular Devices公司);Agilent 1290型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);IncuCyte S3型长时程活细胞工作站(德国ESSEN公司);LSRFortessa SORP型流式细胞仪(美国BD公司);Sciencz-48L型冷冻型高通量组织研磨机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HT165R型高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,离心半径为8.6 cm);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(凯元信瑞仪器有限公司);Tanon 5200型化学发光成像仪(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 BV2细胞分组** 基于HPLC检测结果,每1 mg黄连解毒汤冻干粉中约含京尼平苷24  $\mu$ g、黄芩苷15  $\mu$ g和小檗碱30  $\mu$ g,将BV2细胞分成7组进行实验,分别为空白组、2 mg·L<sup>-1</sup> LPS组(经课题组前期研究发现,该浓度的LPS为BV2小胶质细胞的最佳

造模剂量<sup>[23]</sup>)、200 mg·L<sup>-1</sup>黄连解毒汤组、单体合方组、4.8 mg·L<sup>-1</sup>京尼平苷组、3 mg·L<sup>-1</sup>黄芩苷组和6 mg·L<sup>-1</sup>小檗碱组。其中单体合方组为3种活性成分复合溶解而成(每1 mL药物中含京尼平苷4.8  $\mu$ g、黄芩苷3  $\mu$ g和小檗碱6  $\mu$ g)。

**2.2 BV2细胞培养** BV2细胞在常规培养箱(37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>)中用完全培养基(含有10% FBS的DMEM)常规培养。将分化的BV2细胞在T75瓶里传代培养,用不同种类及不同浓度的药物预处理6 h,以确定其对BV2细胞的抗炎作用。接下来,用LPS刺激细胞24 h,随后根据不同指标进行对应的处理。

**2.3 黄连解毒汤冻干粉制备** 本研究旨在比较黄连解毒汤复方与其主要活性成分(京尼平苷、黄芩苷和小檗碱)在细胞水平上的作用差异及机制。为保证复方与单体实验条件的一致性,本研究均采用直接加药体系,因此黄连解毒汤以冻干粉形式给药。冻干粉经HPLC定量后可确保各活性成分剂量明确、重复性高,有利于控制实验变量。

制备方法<sup>[13]</sup>:依照黄连解毒汤处方比例(黄连-黄芩-黄柏-栀子3:2:2:3),分别称取黄连150 g、黄芩100 g、黄柏100 g及栀子150 g,混合后置于煎煮容器中,加入10倍药材总量的水(5 000 mL)浸泡1 h。加热至沸腾,电磁炉加热功率设为1 600 W,沸腾后调低至800 W维持,继续煎煮1 h后关火,趁热用100目滤袋过滤。随后按药材总量8倍体积水(4 000 mL)重复加热煎煮及过滤过程。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 kg·L<sup>-1</sup>)后分装入容器中,用锡箔纸封口,于-80  $^{\circ}$ C冰箱中冻存。待药液完全冻结后,于锡箔纸表面穿孔,将样品置于冻干机内进行冻干处理,直至干燥完成。最终得到140 g黄连解毒汤冻干粉,收率为28%。

**2.4 CCK-8细胞活力检测** 为评估药物的安全性,采用CCK-8法进行DMSO及各类药物的体外细胞增殖抑制分析。将BV2细胞以 $1 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于96孔板并培养24 h后,分别给予DMSO及不同药物种类、不同浓度处理,完全培养基处理的细胞作为载体对照。继续孵育24 h后,在每孔加入CCK-8检测液10  $\mu$ L并于37  $^{\circ}$ C孵育1~3 h,用酶标仪在450 nm波长处测量吸光度 $A$ ,计算和分析细胞存活率。细胞存活率=( $A_{\text{药物孔}} - A_{\text{溶剂孔}}$ )/( $A_{\text{空白孔}} - A_{\text{溶剂孔}}$ ) $\times 100\%$ 。

**2.5 Incucyte长时程活细胞工作站检测细胞生长状态** 将BV2细胞接种于96孔板中,在常规培养箱

(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)中用完全培养基培养。24 h后弃去原有培养基,加入含药培养基,将孔板置于 IncuCyte 长期活细胞工作站 (IncuCyte S3) 中,以监测不同浓度黄连解毒汤处理后对 BV2 细胞生长状态的影响。每隔 6 h 用 4 倍放大倍率捕获每个孔的图像,以观察细胞的动态增殖。

**2.6 Griess 法检测 NO 含量** Griess 法是检测细胞或组织及其培养上清液中 NO 含量的常用方法。将细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中经 LPS 刺激给药 24 h 后,利用 NO 检测试剂盒检测各组细胞培养上清液的 NO 水平。实验前取出 Griess Reagent I 和 II 恢复至室温,并用完全培养基将 1 mol·L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> 溶液稀释成 1、2、5、10、20、40、60、100 μmol·L<sup>-1</sup> 不同浓度标准品。收集各组细胞培养上清,置于已标记的无菌离心管中,4 °C、3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清至新的标记离心管。取新的 96 孔板,每孔分别加入 50 μL 对照品或样品,随后加入 Griess Reagent I 50 μL,再加入 Griess Reagent II 50 μL。加样完成后立即用多功能酶标仪于 540 nm 波长检测吸光度 *A*。

**2.7 HPLC 色谱检测** 采用 HPLC 法测定样品液中小檗碱、黄芩苷、京尼平苷的含量(黄连、黄柏中的主要成分均为小檗碱,黄芩中的主要成分为黄芩苷,栀子中的主要成分为京尼平苷)。精密称取小檗碱对照品 10 mg,黄芩苷对照品 10 mg,京尼平苷对照品 10 mg,加甲醇溶解并定容至 50 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,得混合对照品溶液。精密称取 50 mg 黄连解毒汤干粉于 10 mL 棕色量瓶中,加入 30% 甲醇于冰水浴超声溶解 10 min,定容至 50 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤即得黄连解毒汤全方供试品溶液。在 Agilent 1290 HPLC 仪器上进行。色谱柱 Shimadzu VP-ODS 柱;流速 1 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 30 °C。流动相由用乙酸滴定至 pH 3.0 的 10 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵水溶液(A)和乙腈(B)组成。采用的溶剂梯度为 0~4 min, 10% B; 4~15 min, 10%~26% B; 15~27 min, 26%~28% B; 27~35 min, 28%~70% B; 35~55 min, 70%~90% B; 55~60 min, 90% B。每次分析后,使用 8 min 的运行时间回到初始流动相的组成。进样量为 10 μL,并在 238 nm 处检测到<sup>[24]</sup>。

**2.8 采用 ELISA 试剂盒检测 BV2 细胞培养上清液中 IL-1β、IL-6、IL-10 和 TNF-α 的含量** 收集六孔板中的培养液,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 获取细胞上清,用试剂盒样品稀释液将上样量调整至 50 μL,加

入预包被特异性抗体的 ELISA 板孔中,于 37 °C 孵育 1 h。随后用洗涤缓冲液洗涤,加入 HRP 标记抗体溶液再孵育 1 h,重复洗涤,加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物,于 37 °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,得到回归方程。将样品 *A* 代入标准曲线方程,计算目标蛋白浓度。

**2.9 流式细胞术检测 BV2 细胞极化** BV2 细胞根据实验设计处理,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,加入胰蛋白酶 500 μL 进行消化,使其从六孔板中分离出来。将细胞悬液收集到离心管中,1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,然后弃去上清液,用 PBS 重悬细胞沉淀,细胞计数后每管转移一定量的细胞悬液(细胞数为 1×10<sup>6</sup> 个)至新的离心管中,600×g 离心 5 min,弃上清,用 PBS 重悬细胞沉淀,加入 CD16/32 封闭剂,4 °C 孵育 5 min。随后依次加入胞外染色流式抗体(Zombie NIR、CD11b、CD80、CD86),4 °C 避光孵育 40 min。孵育完成后每个离心管中加入 PBS,600×g 离心 5 min。弃上清,用 PBS 重悬细胞沉淀,过滤后上机进行流式检测。使用 FlowJo 软件对 BV2 细胞各亚群占比进行计算和分析。

**2.10 BV2 细胞蛋白提取** 将细胞以 3×10<sup>5</sup> 个/孔的密度接种于六孔板,造模并加药处理后,每孔用 PBS 清洗,加入预先配制的放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液 200 μL(RIPA-苯甲基磺酰氟(PMSF)-磷酸酶抑制剂-蛋白酶抑制剂 100:1:1:2)。轻轻晃动六孔板使裂解液与细胞充分接触,冰上裂解 10 min 后倾斜孔板,用细胞刮刀沿同一方向将细胞刮入裂解液中,转移至 1.5 mL 离心管中并继续裂解 20 min。随后用移液枪轻柔吹打裂解液以减少气泡,在 4 °C 下 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,收集上清液获得蛋白原液。

**2.11 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 BV2 细胞蛋白表达水平** 利用蛋白定量法(BCA)试剂盒测定蛋白原液浓度后,用 RIPA 及 Loading Buffer 缓冲液按比例配制成 4 g·L<sup>-1</sup> 等浓度的蛋白样本,其中按 4:1 加入 Loading Buffer。除膜蛋白样本外,其他样本置于金属浴 100 °C 加热 5 min,冷却至室温后于 -80 °C 保存;TLR4 膜蛋白样本则于 70 °C 加热 15 min,冷却后同样保存。正式实验前将样品置冰上解冻,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离等量蛋白(40 μg),并转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。用 5% 脱脂奶粉(非磷酸化指标)或 5% BSA(磷酸化指标)室温封闭 1.5 h,随后孵

育一抗(1:1 000)于4 °C过夜。12 h后用TBST室温洗膜,每次10 min,频率100 r·min<sup>-1</sup>。二抗加入10 mL于膜中,室温摇床孵育1 h(50 r·min<sup>-1</sup>),再用TBST重复洗膜3次。最后将等量ECL发光液A、B混合,均匀覆盖膜表面,使用全自动化学发光分析仪进行显影曝光。使用Image J软件对目标蛋白条带进行灰度值计算和分析后除以内参蛋白的灰度值,得到相对表达量。

**2.12 统计学分析** 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。三组及以上的比较,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 T2法近似检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对BV2小胶质细胞活力的影响** 与空白组比较,当DMSO浓度在0.4%及以上浓度时,细胞活力会在48 h内持续受影响( $P < 0.01$ )。当DMSO浓度在0.2%及以下浓度时,细胞活力在48 h内不受影响。基于上述结果,本研究药物溶解所用DMSO浓度为0.2%,在此浓度下,DMSO作为溶解介质不影响细胞活力。在该条件下,黄连解毒汤冻干粉的最大溶解度为200 mg·L<sup>-1</sup>,并以此作为最高浓度进行逐级倍比稀释,以设定浓度梯度。见表1。

表1 不同时间点DMSO对细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Effect of DMSO on cell viability at different time points( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	体积分数/%	细胞存活率/%			
		6 h	12 h	24 h	48 h
空白组		100.00±1.58	100.00±1.88	100.00±2.04	100.00±1.95
DMSO组	0.8	92.61±2.21 <sup>1)</sup>	91.59±2.86 <sup>2)</sup>	83.18±3.97 <sup>2)</sup>	75.12±4.05 <sup>2)</sup>
	0.4	94.38±2.53	93.42±4.65 <sup>2)</sup>	93.03±3.82 <sup>2)</sup>	89.76±3.12 <sup>2)</sup>
	0.2	96.90±2.42	97.28±2.71	97.10±2.62	95.75±3.56
	0.1	97.78±1.37	98.65±2.03	98.35±3.51	96.29±2.71
	0.05	98.56±1.15	98.97±3.89	99.25±2.68	98.23±2.27

注:与6 h空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与同时间空白组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$

**3.2 黄连解毒汤对BV2小胶质细胞增殖的影响** 在200~6.25 mg·L<sup>-1</sup>质量浓度下,BV2小胶质细胞均在24 h左右达到生长平台期。与空白组比较,药

物干预组的BV2小胶质细胞增殖能力普遍更优,其中200 mg·L<sup>-1</sup>黄连解毒汤组增殖效果最佳。见表2。

表2 黄连解毒汤对BV2细胞生长状态的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Huanglian Jiedutang on growth status of BV2 cells( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	细胞汇合度增长比例								
		0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
空白组		1.00±0.00	1.14±0.02	1.40±0.03	1.55±0.05	1.71±0.04	1.89±0.04	2.05±0.05	2.19±0.05	2.36±0.05
黄连解毒汤组	200	1.00±0.00	1.31±0.02	1.58±0.04	1.80±0.05	1.87±0.05	1.88±0.04	1.87±0.04	1.84±0.03	1.82±0.03
	100	1.00±0.00	1.27±0.02	1.50±0.05	1.73±0.06	1.83±0.06	1.84±0.05	1.83±0.04	1.82±0.05	1.80±0.05
	50	1.00±0.00	1.23±0.01	1.47±0.04	1.69±0.06	1.80±0.06	1.82±0.06	1.83±0.06	1.81±0.06	1.79±0.05
	25	1.00±0.00	1.22±0.02	1.44±0.06	1.64±0.07	1.74±0.08	1.75±0.09	1.76±0.08	1.75±0.07	1.74±0.07
	12.5	1.00±0.00	1.19±0.02	1.42±0.05	1.61±0.06	1.72±0.07	1.73±0.07	1.74±0.07	1.73±0.06	1.72±0.07
	6.25	1.00±0.00	1.17±0.01	1.41±0.05	1.59±0.07	1.70±0.08	1.72±0.08	1.70±0.06	1.70±0.07	1.69±0.06

**3.3 黄连解毒汤对LPS诱导下BV2小胶质细胞释放NO含量的影响** 与空白组比较,LPS组NO含量显著升高( $P < 0.01$ )。与LPS组比较,所有浓度黄连解毒汤干预组NO含量均显著下降( $P < 0.01$ )。与不

同浓度黄连解毒汤干预组比较,经预给药6 h处理后,各组别NO含量下降更显著( $P < 0.01$ ),其中200 mg·L<sup>-1</sup>黄连解毒汤组的给药效果最佳。见表3。

表3 黄连解毒汤对LPS诱导下BV2细胞释放NO的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Table 3 Effect of Huanglian Jiedutang on NO release from BV2 cells induced by LPS ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	NO含量(nmol/10 <sup>4</sup> cell)
空白组		0.29±0.03 <sup>1)</sup>
LPS组	2	21.16±0.76
黄连解毒汤组	200	6.14±0.06 <sup>1)</sup>
	100	8.14±0.25 <sup>1)</sup>
	50	10.10±0.39 <sup>1)</sup>
	25	10.63±0.13 <sup>1)</sup>
	12.5	10.79±0.58 <sup>1)</sup>
	6.25	11.11±0.56 <sup>1)</sup>
黄连解毒汤-预给药组	200	2.79±0.22 <sup>1,2)</sup>
	100	5.54±0.09 <sup>1,2)</sup>
	50	7.56±0.43 <sup>1,2)</sup>
	25	8.77±0.03 <sup>1,2)</sup>
	12.5	8.87±0.15 <sup>1,2)</sup>
	6.25	8.92±0.03 <sup>1,2)</sup>

注:与LPS组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与同剂量黄连解毒汤组比较<sup>2)</sup>P<0.01

结合Incucyte和NO检测结果,选定200 mg·L<sup>-1</sup>作为黄连解毒汤复方浓度进行后续实验,并且将后续给药方式和给药时长设定为预给药6 h后,药物联合LPS干预BV2细胞24 h。

**3.4 黄连解毒汤中主要活性成分京尼平苷、黄芩苷和小檗碱的含量** 采用高效液相色谱对黄连解毒汤干粉中京尼平苷、黄芩苷和小檗碱3种活性成分的含量进行分析鉴定。黄连解毒汤及其活性成分的HPLC结果见增强出版附加材料。

**3.4.1 线性关系检测** 取2.7方法下制备的京尼平苷、黄芩苷和小檗碱混合对照品溶液,三者最高浓度皆为200 mg·L<sup>-1</sup>,倍比稀释为8个不同浓度。以对照品浓度为横坐标,对照品峰面积为纵坐标进行线性回归分析。结果显示,3种活性成分在各自线性范围内的回归方程相关系数( $R^2$ )均>0.999。见表4。

**3.4.2 精密度检测** 取2.7方法下制备的黄连解毒

表4 3种活性成分的线性范围、回归方程及相关系数

Table 4 Linear range, regression equation and correlation coefficient of three active constituents

化合物	线性范围/mg·L <sup>-1</sup>	回归方程	$R^2$
京尼平苷	1.562 5~200	$Y=97.127X-30.425$	1.000 0
黄芩苷	1.562 5~200	$Y=66.27X+76.557$	1.000 0
小檗碱	1.562 5~200	$Y=225.98X-5 865.5$	0.999 2

汤全方供试品溶液,连续进样检测6次,并记录3种活性成分京尼平苷、黄芩苷和小檗碱色谱峰的峰面积,计算各成分峰面积的相对标准偏差(RSD)值分别为1.48%、0.99%、1.35%,均<2%,表明仪器精密度良好。

**3.4.3 稳定性检测** 取2.7方法下制备的黄连解毒汤全方供试品溶液,室温下分别于制备后0、4、8、12、18、24 h进样检测,并记录3种活性成分京尼平苷、黄芩苷和小檗碱色谱峰的峰面积,计算得到各成分峰面积的RSD值分别为0.39%、0.82%、0.44%,均<1%,表明黄连解毒汤全供试品溶液在24 h内稳定性良好。

**3.4.4 重复性检测** 按2.7方法平行制备6份黄连解毒汤全方供试品溶液,分别进样检测,并记录3种活性成分京尼平苷、黄芩苷和小檗碱色谱峰的峰面积,计算各成分峰面积的RSD值分别为1.09%、0.91%、1.32%,均<2%,表明该实验重复性良好。

**3.4.5 回收率检测** 取黄连解毒汤干粉,按冻干粉中京尼平苷、黄芩苷和小檗碱含量加入等量对照品,按2.7项下方法制备供试品溶液,平行6份进样检测,并记录3种活性成分京尼平苷、黄芩苷和小檗碱色谱峰的峰面积,分别计算各成分的回收率及RSD值。结果显示,3种活性成分回收率在95.45%~103.67%,RSD值分别为1.78%、1.85%、1.42%,均<2%,表明该方法准确度良好,可用于黄连解毒汤干粉中京尼平苷、黄芩苷和小檗碱含量的检测。见表5。

表5 3种活性成分的回收率及RSD (n=6)

Table 5 Recovery and relative standard deviation of three active constituents (n=6) %

化合物	回收率	平均回收率	RSD
京尼平苷	95.45~100.34	97.76±1.74	1.78
黄芩苷	98.34~103.67	101.05±1.86	1.85
小檗碱	97.44~101.23	99.11±1.41	1.42

HPLC结果表明,黄连解毒汤干粉中3种活性成分平均含量从大到小依次为小檗碱(30 mg·g<sup>-1</sup>),京尼平苷(24 mg·g<sup>-1</sup>)和黄芩苷(15 mg·g<sup>-1</sup>),即每1 mg黄连解毒汤干粉中含京尼平苷24 μg、黄芩苷15 μg和小檗碱30 μg。

**3.5 黄连解毒汤及其活性成分对细胞活力的影响**

基于HPLC检测结果,按含量比例设置后续实验组别为空白组、LPS组(2 mg·L<sup>-1</sup>)、黄连解毒汤组(200 mg·L<sup>-1</sup>)、单体合方组、京尼平苷组(4.8 mg·L<sup>-1</sup>)、黄芩苷组(3 mg·L<sup>-1</sup>)、小檗碱组(6 mg·L<sup>-1</sup>)。其中单

体合方组为3种活性成分复合溶解而成(每1 mL药物中含京尼平苷4.8 μg、黄芩苷3 μg和小檗碱6 μg)。CCK-8法检测结果显示,与空白组比较,各药物组细胞活力均明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),提示其对细胞无明显增殖抑制作用。药物干预后的各组细胞活性有所提高,该现象可能与黄连解毒汤中活性成分对线粒体功能及细胞代谢的调节作用有关。已有研究表明,京尼平苷、黄芩苷和小檗碱皆可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)或核转录因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)等经典代谢通路改善线粒体呼吸功能<sup>[25-27]</sup>,从而导致CCK-8检测中A升高。见表6。

**3.6 黄连解毒汤及其活性成分对LPS诱导下BV2小胶质细胞炎症因子表达的影响** 与空白组比较,LPS组BV2小胶质细胞TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10等炎症因子表达均显著升高( $P<0.01$ )。与LPS组比较,各组

表7 药物对LPS干预下BV2细胞上清液炎症因子的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	TNF-α	IL-1β	IL-6	IL-10
空白组		245.7±10.64 <sup>1)</sup>	32.95±2.58 <sup>1)</sup>	46.90±2.79 <sup>1)</sup>	9.82±0.66 <sup>1)</sup>
LPS组	2	381.3±13.32	54.53±3.56	87.35±4.35	12.01±0.34
黄连解毒汤组	200	301.4±15.16 <sup>1,2)</sup>	43.11±2.36 <sup>1,3)</sup>	73.04±6.12 <sup>1,2)</sup>	17.03±0.78 <sup>1,2)</sup>
单体合方组	4.8+3+6	270.6±13.49 <sup>1)</sup>	37.60±2.59 <sup>1)</sup>	64.07±3.02 <sup>1)</sup>	18.64±0.40 <sup>1)</sup>
京尼平苷组	4.8	308.4±9.92 <sup>1,3)</sup>	41.96±2.41 <sup>1,2)</sup>	77.50±4.09 <sup>1,3)</sup>	16.71±1.13 <sup>1,3)</sup>
黄芩苷组	3	287.9±19.32 <sup>1)</sup>	40.57±1.31 <sup>1)</sup>	76.40±3.12 <sup>1,3)</sup>	15.43±0.88 <sup>1,3)</sup>
小檗碱组	6	298.0±11.25 <sup>1,2)</sup>	39.44±1.22 <sup>1)</sup>	72.43±3.91 <sup>1,2)</sup>	16.85±0.97 <sup>1,3)</sup>

注:与LPS组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与单体合方组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ (表8同)

**3.7 黄连解毒汤及其活性成分对LPS诱导下BV2小胶质细胞的M1型极化反应的抑制作用** 通过对BV2细胞进行CD80和CD86双染色。标记CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>BV2细胞为M1型,CD80<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup>BV2细胞为未发生极化的M0型。流式细胞术检测显示,与空白组比较,LPS组M1型小胶质细胞比例显著上升( $P<0.01$ )。与LPS组比较,经过各组别药物干预,M1型小胶质细胞比例显著下降( $P<0.01$ ),且单体合方组抑制效果最好( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),与细胞上清液炎症因子检测结果一致。见表8。

**3.8 黄连解毒汤及其活性成分通过HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路调节LPS诱导下BV2小胶质细胞的炎症反应** 在神经炎症中,HMGB1/TLR4/NF-κB通路被认为是中枢神经系统免疫反应的核心通路之一<sup>[28]</sup>。研究表明,HMGB1通过与TLR4结合激活NF-κB,推动促炎因子的大量释放,进而加剧神经元损伤,形成恶性循环<sup>[29]</sup>。因此,调节这一通路可能是缓解神经炎症的潜在治疗策略。

表6 药物对细胞活力的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	细胞存活率/%
空白组		100.00±1.96
LPS组	2	126.70±6.87 <sup>2)</sup>
黄连解毒汤组	200	113.70±3.04 <sup>2)</sup>
单体合方组	4.8+3+6	118.90±4.29 <sup>2)</sup>
京尼平苷组	4.8	111.50±5.16 <sup>2)</sup>
黄芩苷组	3	109.30±4.05 <sup>1)</sup>
小檗碱组	6	112.80±5.28 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$

别药物干预下BV2小胶质细胞上清液中的促炎因子TNF-α、IL-1β和IL-6表达水平显著下降( $P<0.01$ ),抑炎因子IL-10表达显著升高( $P<0.01$ ),且单体合方组整体抑炎效果最强( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表7。

表8 药物对LPS干预下BV2细胞极化反应的影响( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> /%
空白组		12.10±1.37 <sup>1)</sup>
LPS组	2	70.03±0.78
黄连解毒汤组	200	62.50±1.11 <sup>1,2)</sup>
单体合方组	4.8+3+6	58.55±1.45 <sup>1)</sup>
京尼平苷组	4.8	63.39±1.96 <sup>1,3)</sup>
黄芩苷组	3	64.48±0.50 <sup>1,3)</sup>
小檗碱组	6	61.63±2.44 <sup>1)</sup>

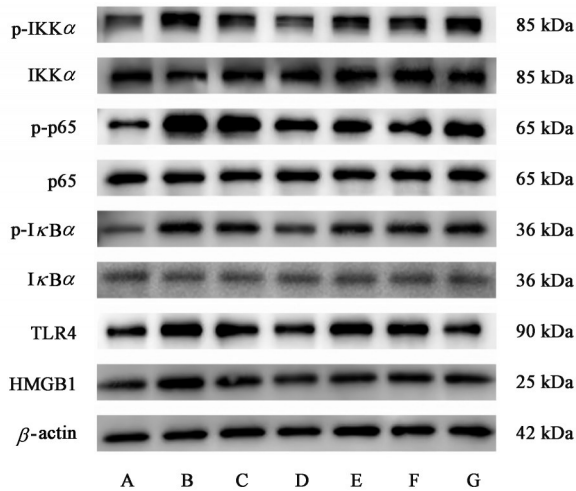
Western blot结果显示,与空白组比较,LPS组HMGB1、TLR4、p-IκBα/IκBα、p-IKKα/IKKα、p-p65/p65蛋白表达显著升高( $P<0.01$ )。与LPS组比较,给药组HMGB1、TLR4、p-IκBα/IκBα、p-IKKα/IKKα、p-p65/p65蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),其中单体合方组调节该通路效果最明显( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表9、图1。

表 9 药物对 HMGB1、TLR4 及 NF- $\kappa$ B 相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 9 Effect of drugs on expressions of HMGB1, TLR4 and NF- $\kappa$ B-related proteins ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	HMGB1/ $\beta$ -actin	TLR4/ $\beta$ -actin	p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$	p-p65/p65	p-IKK $\alpha$ /IKK $\alpha$
空白组		1.00 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	1.00 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	1.00 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	1.00 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	1.00 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>
LPS 组	2	1.45 $\pm$ 0.03	1.67 $\pm$ 0.11	2.17 $\pm$ 0.13	2.86 $\pm$ 0.17	1.97 $\pm$ 0.12
黄连解毒汤组	200	1.27 $\pm$ 0.07 <sup>2,4)</sup>	1.46 $\pm$ 0.10 <sup>1,4)</sup>	1.66 $\pm$ 0.12 <sup>2,4)</sup>	2.53 $\pm$ 0.14 <sup>1,4)</sup>	1.36 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
单体合方组	4.8+3+6	1.10 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	1.19 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	1.34 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	1.52 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	1.16 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>
京尼平苷组	4.8	1.26 $\pm$ 0.06 <sup>2,3)</sup>	1.60 $\pm$ 0.10 <sup>4)</sup>	1.51 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	1.56 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	1.41 $\pm$ 0.08 <sup>2,3)</sup>
黄芩苷组	3	1.28 $\pm$ 0.07 <sup>2,4)</sup>	1.56 $\pm$ 0.08 <sup>4)</sup>	1.74 $\pm$ 0.05 <sup>2,4)</sup>	1.83 $\pm$ 0.11 <sup>2,3)</sup>	1.42 $\pm$ 0.06 <sup>2,4)</sup>
小檗碱组	6	1.17 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	1.23 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	1.83 $\pm$ 0.16 <sup>2,4)</sup>	1.85 $\pm$ 0.20 <sup>2,3)</sup>	1.54 $\pm$ 0.14 <sup>2,4)</sup>

注:与 LPS 组比较<sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01;与单体合方组比较<sup>3)</sup>P<0.05, <sup>4)</sup>P<0.01



注:A.空白组;B.LPS组;C.黄连解毒汤组;D.单体合方组;E.京尼平苷组;F.黄芩苷组;G.小檗碱组

图 1 各组细胞 HMGB1、TLR4 及 NF- $\kappa$ B 相关蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of HMGB1, TLR4 and NF- $\kappa$ B-related proteins in various groups of cells

#### 4 讨论

神经炎症是脑缺血、阿尔茨海默病、帕金森病等中枢神经系统疾病的重要病理机制之一<sup>[6,30]</sup>。其特点是小胶质细胞的过度激活,进而引发大量促炎因子、趋化因子和活性氧的释放,最终加剧神经组织的损伤<sup>[31-32]</sup>。近年来,大量研究表明中医药在改善神经炎症、抑制小胶质细胞极化方面具有重要潜力<sup>[33-35]</sup>,已成为神经炎症领域的研究热点之一。黄连解毒汤作为经典的清热解毒方剂,具有显著的抗菌、抗炎、抗氧化应激等多重生物学效应<sup>[24]</sup>,大量临床案例已证实黄连解毒汤在神经系统疾病中的改善作用<sup>[36-37]</sup>。

黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏和栀子等多味药材组成,其主要成分包括环烯醚萜类化合物(如京尼平苷、山脂苷)、类黄酮(如黄芩苷、黄芩素)和生物碱类(如小檗碱、棕榈碱、黄连碱)<sup>[38]</sup>,其中,京尼平苷、黄芩苷和小檗碱被广泛认为是其三大主要活性成分<sup>[16]</sup>。多项研究表明,这三者均可通过抑制

小胶质细胞的过度活化,调控其介导的神经炎症反应。京尼平苷对暴露于缺氧再灌注 BV2 小胶质细胞具有显著的保护作用<sup>[39]</sup>,其通过激活自噬、抑制 NLRP3 炎性小体等途径,下调炎性细胞因子的表达,减轻小胶质细胞介导的炎症反应<sup>[40]</sup>。黄芩苷则有着良好的抗氧化特性,并且能够下调促炎因子的表达,促进小胶质细胞向 M2 表型极化<sup>[41]</sup>。进一步的实验表明,黄芩苷可能通过与小胶质细胞上的髓系细胞触发受体 2(TREM2)受体相互作用,从而发挥其抗炎和神经保护作用<sup>[42]</sup>。此外,小檗碱被证实可在原代及 BV2 小胶质细胞中抑制  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ )等刺激诱导的炎症因子表达,改善小胶质细胞极化状态,从而缓解神经炎症<sup>[43]</sup>。

HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 炎症通路在多种神经退行性疾病中发挥重要作用<sup>[44-45]</sup>。HMGB1 作为一种典型的促炎介质和损伤相关分子模式,被认为是驱动和放大神经炎症反应的关键分子之一<sup>[46-47]</sup>。研究表明, HMGB1 在多种中枢神经系统损伤与疾病中持续上调,其异常释放与预后不良及神经炎症程度密切相关<sup>[48]</sup>。HMGB1 分泌到细胞外后可作用于小胶质细胞,促使其向 M1 型促炎表型极化,增强炎性因子产生并加剧细胞损伤<sup>[49]</sup>。TLR4 是 HMGB1 的主要下游受体之一<sup>[50-51]</sup>,能够感知内源性危险信号并启动炎症信号通路<sup>[52-53]</sup>。其激活后通过 NF- $\kappa$ B 通路上调多种炎症介质的水平<sup>[54]</sup>。NF- $\kappa$ B 在静止状态下与其抑制蛋白 I $\kappa$ B 结合,保持失活状态<sup>[55]</sup>。受到刺激后, I $\kappa$ B 被磷酸化并降解,释放 NF- $\kappa$ B 进入细胞核,启动与炎症、免疫反应及程序性细胞死亡等相关基因的转录,从而放大神经炎症反应,加剧细胞损伤<sup>[56-57]</sup>。因此,针对 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的治疗策略,有望通过抑制该通路介导的小胶质细胞 M1 型极化及其引发的神经炎症级联反应,从而改善中枢神经系统的炎症微环境。

鉴于上述背景,本研究通过HPLC精确定量黄连解毒汤中京尼平苷、黄芩苷和小檗碱的含量,比较黄连解毒汤及上述主要活性成分对LPS刺激下BV2小胶质细胞炎症反应的抑制作用及相关调控机制。实验结果表明,由京尼平苷、黄芩苷和小檗碱组成的单体合方在炎症抑制方面的效能优于黄连解毒汤复方及三者任意单体,表明这3种成分之间存在明显的协同作用。从分子机制角度来看,联合用药对HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B经典炎症信号通路具有显著的调节作用,这一结果进一步说明,配伍优化后形成的单体合方可能在信号通路干预层面有着更高的协同性和靶向性。

而单体合方组疗效优于其余组别的原因,可能部分归因于原始黄连解毒汤复方中存在某些低效或潜在拮抗成分<sup>[58]</sup>,这些成分可能通过不同的生物学途径产生较弱的抗炎效果,或与主要活性成分竞争同一受体<sup>[59]</sup>,从而影响药物的整体疗效。此外,某些成分可能通过促进代谢或排泄,降低其他有效成分的生物利用度<sup>[60]</sup>,进一步削弱了复方的整体效应。与此相比,单体合方通过精确的成分配比,能够有效避免这些成分的影响,增强整体的治疗效果。在调节HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B这一经典炎症通路上,已有研究证实,京尼平苷能够显著抑制TLR4及NF- $\kappa$ B p65的磷酸化与核转位,从而降低下游炎症相关基因的转录活性<sup>[61]</sup>。黄芩苷通过上调miR-181b表达,负向调控HMGB1水平,并进一步抑制TLR4信号传导,从而减少NF- $\kappa$ B的活化<sup>[62]</sup>。小檗碱主要作用于上游环节,通过抑制HMGB1的核质转移及胞外释放,削弱损伤信号的初始输入并阻断炎症放大起点<sup>[63]</sup>。三者可能在“源头信号控制-受体级联阻断-效应输出抑制”3个层面形成层级互补的协同作用,系统性地干扰HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路的正反馈环路,从而共同下调多种炎症因子的表达,缓解氧化应激及神经元凋亡,最终实现整体抗炎效应的增强。

本研究系统评价了黄连解毒汤及其主要活性成分对HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路的调控作用,然而,对于该通路的上游触发机制及下游转录调控过程尚缺乏更为深入的探讨。例如, HMGB1的胞内转位与胞外释放过程、NF- $\kappa$ B核转位后的靶基因转录谱变化,以及其他潜在参与神经炎症调控的相关信号通路,均未在本研究中系统分析。此外,各单体成分在更复杂的体内环境中是否存在代谢互作及药效增强效应亦有待进一步研究。

综上所述,黄连解毒汤及其主要活性成分(京尼平苷、黄芩苷和小檗碱)皆能够抑制LPS刺激下BV2细胞的炎症反应,且3种活性成分复合而成的单体合方抑炎效果最佳,其通过HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路,显著减轻LPS干预下BV2细胞的M1型极化。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] MÜLLER L, DI B S, MÜLLER V. The dual nature of neuroinflammation in networked brain [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1659947.
- [2] HUI B, YAO X, ZHANG L, et al. Dexamethasone sodium phosphate attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in microglia BV2 cells [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393(9): 1761-1768.
- [3] SILVA D F, EMPADINHAS N, CARDOSO S M, et al. Neurodegenerative microbially-shaped diseases: Oxidative stress meets neuroinflammation [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(11): 2141.
- [4] MÜLLER L, DI BENEDETTO S. Neuroimmune crosstalk in chronic neuroinflammation: Microglial interactions and immune modulation [J]. *Front Cell Neurosci*, 2025, 19: 1575022. doi:10.3389/fncel.2025.1575022.
- [5] CAI Y, XU J, CHENG Q. Proto-oncogene tyrosine-protein kinase SRC (Src) inhibition in microglia relieves neuroinflammation in neuropathic pain mouse models [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 11390-11398.
- [6] ALSBROOK D L, DI NAPOLI M, BHATIA K, et al. Neuroinflammation in acute ischemic and hemorrhagic stroke [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2023, 23(8): 407-431.
- [7] SWARTS E A, BRENNAN F H. Evolving insights on the role of microglia in neuroinflammation, plasticity, and regeneration of the injured spinal cord [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1621789.
- [8] FELDMAN R A. Microglia orchestrate neuroinflammation [J]. *Elife*, 2022, 11: e81890.
- [9] FANG J, SHE J, LIN F, et al. RRx-001 exerts neuroprotection against LPS-induced microglia activation and neuroinflammation through disturbing the TLR4 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 889383.
- [10] SUBHRAMANYAM C S, WANG C, HU Q, et al. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 94: 112-120.
- [11] DONG J, XU O, WANG J, et al. Luteolin ameliorates inflammation and Th1/Th2 imbalance via regulating the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in allergic rhinitis rats [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43(3): 319-327.
- [12] ZHU Q, TANG T, LIU H, et al. Pterostilbene attenuates cocultured BV-2 microglial inflammation-mediated SH-SY5Y neuronal oxidative injury via SIRT-1 signalling [J]. *Oxid Med*

- Cell Longev, 2020, 2020: 3986348.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 武玉洁, 齐炼文, 张蕾. 黄连解毒汤活性成分与药理作用研究进展[J]. *药学进展*, 2025, 49(8): 648-657.
- WU Y J, QI L W, ZHANG L. Research progress of active ingredients and pharmacological action of Huang-Lian Jie-Du decoction[J]. *Prog Pharm Sci*, 2025, 49(8): 648-657.
- [17] 江思琪, 商培钊, 刘震远, 等. 黄连解毒汤药理活性研究进展及质量标志物预测分析[J]. *中国现代中药*, 2025, 27(5): 980-989.
- JIANG S Q, SHANG P Z, LIU Z Y, et al. Research progress on pharmacological activity of Huanglian Jiedu decoction and quality marker prediction and analysis[J]. *Mod Chin Med*, 2025, 27(5): 980-989.
- [18] NAZIR M M, ASHRAF A, NAZIR M M, et al. Anti-arthritic and immunomodulatory effects of geniposide: A systematic review and Meta-analysis of preclinical studies [J]. *Inflammopharmacology*, 2025, 33(8): 4499-4518.
- [19] LI Y F, ZHANG Y F, HUANG C, et al. Baicalin improves neurological outcomes in mice with ischemic stroke by inhibiting astrocyte activation and neuroinflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 149: 114186.
- [20] ZHOU P, CHAO Q, LI C, et al. Microglia-targeting nanosystems that cooperatively deliver Chinese herbal ingredients alleviate behavioral and cognitive deficits in Alzheimer's disease model mice [J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 313.
- [21] WU J, WANG B, LI M, et al. Network pharmacology identification of mechanisms of cerebral ischemia injury amelioration by baicalin and geniposide[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859: 172484.
- [22] LI H, WANG Y, WANG B, et al. Baicalin and geniposide inhibit polarization and inflammatory injury of OGD/R-treated microglia by suppressing the 5-LOX/LTB4 pathway [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(7): 1844-1858.
- [23] DONG L, ZHANG H, WANG K, et al. Carbon dots extracted from the plant *Gardenia jasminoides* ameliorates ischemia-reperfusion injury [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2025, 18(6): 870.
- [24] ZHANG Q, FU X, WANG J, et al. Treatment effects of ischemic stroke by berberine, baicalin, and jasminoidin from Huang-Lian-Jie-Du-decoction (HLJDD) explored by an integrated metabolomics approach [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 9848594.
- [25] LIU L, WU Q, CHEN Y, et al. Updated pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of natural product geniposide [J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3319.
- [26] KUWAR O K, KALIA N. Anti-inflammatory and antioxidant effects of baicalein: Targeting Nrf2, and NFκB in neurodegenerative disease[J]. *Inflammopharmacology*, 2025, 33(3): 1303-1310.
- [27] UM J H, LEE K M, KIM Y Y, et al. Berberine induces mitophagy through adenosine monophosphate-activated protein kinase and ameliorates mitochondrial dysfunction in PINK1 knockout mouse embryonic fibroblasts[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 219.
- [28] KUMAR V, KUMAR P. Pathophysiological role of high mobility group box-1 signaling in neurodegenerative diseases [J]. *Inflammopharmacology*, 2025, 33(2): 703-727.
- [29] LIAO Y, YANG L, DING Y, et al. 11-keto-β-boswellic acid and Z-guggulsterone suppress HMGB1/TLR4 pathway activity and modulate microglial polarization to remodel perineuronal nets after nerve injury [J]. *J Adv Res*, 2025: S2090-1232(25)00867-7.
- [30] SHI F-D, YONG V W. Neuroinflammation across neurological diseases [J]. *Science*, 2025, 388(6753): eadx0043.
- [31] XU S, LIU P, JIA J, et al. Microglial NLRC5 drives lysosomal dysfunction to disrupt autophagic flux and promote post-stroke neuroinflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2025, 22(1): 253.
- [32] PLANAS A M. Role of microglia in stroke[J]. *Glia*, 2024, 72(6): 1016-1053.
- [33] ZHANG L, YANG J, YANG Y, et al. Bioactive compounds in Chinese herbal medicine: Anti-inflammatory mechanisms targeting neurological disorders [J]. *Front Nutr*, 2025, 12: 1646438.
- [34] YU L, DONG Y, LI M, et al. Targeting microglia polarization with Chinese herb-derived natural compounds for neuroprotection in ischemic stroke[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2025, 13: 1580479.
- [35] YANG F, GAO W, WANG J, et al. Progress of Chinese medicine in regulating microglial polarization against Alzheimer's disease[J]. *Am J Chin Med*, 2024, 52(8): 2255-2275.
- [36] 王文杰, 陈赛贞, 徐红燕, 等. 黄连解毒汤抗脑缺血研究进展及展望[J]. *江西中医药*, 2018, 49(11): 70-74.
- WANG W J, CHEN S Z, XU H Y, et al. Progress and prospect of the study on the anti-ischemic effect of Huanglian Jiedu decoction [J]. *Jiangxi J Tradit Chin Med*, 2018, 49(11): 70-74.
- [37] 王革生, 张允岭, 张志辰, 等. 黄连解毒汤对急性脑出血与脑梗塞火毒证的效应差异及相关机制[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(11): 3178-3181.
- WANG G S, ZHANG Y L, ZHANG Z C, et al. Effect

- difference of Huanglian Jiedu decoction on heat-toxicity syndrome of acute cerebral hemorrhage and acute cerebral infarction and the mechanism [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2013, 28(11): 3178-3181.
- [38] 宋建芳. 黄连解毒汤化学成分研究及其治疗老年痴呆有效成分的筛选[D]. 北京: 中国中医科学院, 2010.
- SONG J F. Study on the chemical constituents of Huanglian Jiedu decoction and screening of its active ingredients in the treatment of Alzheimer's disease [J]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2010.
- [39] WU J, MAO S, WU X, et al. Jasminoidin reduces ischemic stroke injury by regulating microglia polarization via PASK-EEF1A1 axis [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2024, 103(1): e14354.
- [40] WANG X, YU J Y, SUN Y, et al. Baicalin protects LPS-induced blood-brain barrier damage and activates Nrf2-mediated antioxidant stress pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107725.
- [41] WANG H, MA J, LI X, et al. FDA compound library screening baicalin upregulates TREM2 for the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 969: 176427.
- [42] LUO D, YU B, SUN S, et al. Effects of adjuvant berberine therapy on acute ischemic stroke: A Meta-analysis [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(9): 3820-3838.
- [43] JIA L, LIU J, SONG Z, et al. Berberine suppresses amyloid-beta-induced inflammatory response in microglia by inhibiting nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signalling pathways [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(10): 1510-1521.
- [44] MAO X, JING X, LIU S, et al. Sanggenol L inhibits the HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway to prevent cerebral ischemia-reperfusion damage [J]. *J Mol Histol*, 2025, 56(4): 199.
- [45] SHARMA V, SHARMA P, SINGH T G. Mechanistic insights on TLR-4 mediated inflammatory pathway in neurodegenerative diseases [J]. *Pharmacol Rep*, 2024, 76(4): 679-692.
- [46] MAO D, ZHENG Y, XU F, et al. HMGB1 in nervous system diseases: A common biomarker and potential therapeutic target [J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 1029891.
- [47] PAUDEL Y N, ANGELOPOULOU E, PIPERI C, et al. HMGB1-mediated neuroinflammatory responses in brain injuries: Potential mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4609.
- [48] MO J, HU J, CHENG X. The role of high mobility group box 1 in neuroinflammatory related diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114541.
- [49] GAO T, CHEN Z, CHEN H, et al. Inhibition of HMGB1 mediates neuroprotection of traumatic brain injury by modulating the microglia/macrophage polarization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(1): 430-436.
- [50] SINGH G B, ZHANG Y, BOINI K M, et al. High mobility group box 1 mediates TMAO-induced endothelial dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3570.
- [51] WANG F, LU Z, HAWKES M, et al. Fas (CD95) induces rapid, TLR4/IRAK4-dependent release of pro-inflammatory HMGB1 from macrophages [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2010, 7: 30.
- [52] DURÁN-LAFORET V, PEÑA-MARTÍNEZ C, GARCÍA-CULEBRAS A, et al. Role of TLR4 in neutrophil dynamics and functions: Contribution to stroke pathophysiology [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 757872.
- [53] LIN C H, CHEN H Y, WEI K C. Role of HMGB1/TLR4 axis in ischemia/reperfusion-impaired extracellular glutamate clearance in primary astrocytes [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2585.
- [54] ZHU L, CARRETERO O A, XU J, et al. Activation of angiotensin II type 2 receptor suppresses TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 via NF- $\kappa$ B: Possible role of ACE2 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309(5): H827-H834.
- [55] STANCOVSKI I, BALTIMORE D. NF-kappaB activation: The I kappaB kinase revealed? [J]. *Cell*, 1997, 91(3): 299-302.
- [56] KONG L, MA Y, WANG Z, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor 1 by YC-1 attenuates tissue plasminogen activator induced hemorrhagic transformation by suppressing HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B mediated neutrophil infiltration in thromboembolic stroke rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 94: 107507.
- [57] LUO L, LIU M, FAN Y, et al. Intermittent theta-burst stimulation improves motor function by inhibiting neuronal pyroptosis and regulating microglial polarization via TLR4/NF $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway in cerebral ischemic mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 141.
- [58] CHAACHOUAY N. Synergy, additive effects, and antagonism of drugs with plant bioactive compounds [J]. *Drugs and Drug Candidates*, 2025, 4(1): 4.
- [59] DUAN X, FAN X, JIANG H, et al. Herb-drug interactions in oncology: Pharmacodynamic/pharmacokinetic mechanisms and risk prediction [J]. *Chin Med*, 2025, 20(1): 107.
- [60] LI M, WANG Y, CHEN Y, et al. A comprehensive review on pharmacokinetic mechanism of herb-herb/drug interactions in Chinese herbal formula [J]. *Pharmacol Ther*, 2024, 264: 108728.
- [61] HUANG X F, LI J J, TAO Y G, et al. Geniposide attenuates A $\beta$ 25-35-induced neurotoxicity via the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in HT22 cells [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(34): 18926-18937.
- [62] YAN G, CHEN L, WANG H, et al. Baicalin inhibits LPS-induced inflammation in RAW264. 7 cells through miR-181b/HMGB1/TRL4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(9): 10127-10141.
- [63] ZHU J R, LU H D, GUO C, et al. Berberine attenuates ischemia-reperfusion injury through inhibiting HMGB1 release and NF- $\kappa$ B nuclear translocation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(11): 1706-1715.

[责任编辑 张丰丰]