· 实验研究 ·

安宫牛黄丸对肝性脑病大鼠 TNF-α/NF-κB 信号通路及神经功能的影响

刘敏环[1]，李　凯[1]，郑慧军[2]
1. 商丘市立医院 感染科，河南 商丘　476100
2. 河南省中医院，河南 郑州　410104

摘　要：目的　通过构建肝性脑病大鼠模型，探究安宫牛黄丸对肝性脑病大鼠肿瘤坏死因子 α/核因子 κB（TNF-α/NF-κB）信号通路及神经功能的影响。**方法**　将 60 只 SPF 级 SD 大鼠分为对照组，模型组，乳果糖组（0.2 mL/200 g 乳果糖）、安宫牛黄低剂量组（1.0 g/kg）、中剂量（2.0 g/kg）、高剂量（3.0 g/kg），每组 10 只。通过硫代乙酰胺（TAA）法构建肝性脑病模型（连续 3 d 对模型大鼠注射 300 mg/kg TAA 溶液），造模前 4 d 开始各组每天连续 ig 相应剂量乳果糖及安宫牛黄丸直至造模结束后 2 d；对照组注射等量生理盐水。水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力；ELISA 法检测大鼠血清生化指标及海马组织乙酰胆碱（Ach）、谷氨酸（Glu）含量；苏木精-伊红染色（HE）观察肝组织和脑组织病理学变化；实时荧光定量 PCR 检测各组样本中 TNF-α、NF-κB mRNA 的表达情况；Western blotting 检测通路相关蛋白表达情况。**结果**　与对照组相比，模型组寻台潜伏期、血氨、ALT、AST 水平、肝组织损伤、脑组织海马 CA1 区损伤程度、Glu 含量、TNF-α 和 NF-κB 的 mRNA 及蛋白表达水平显著增加，而穿台次数、神经学评分、Ach 含量显著降低（$P<0.05$）。与模型组相比，乳果糖组和安宫牛黄低、中、高剂量组大鼠寻台潜伏期、血氨、ALT、AST 水平、肝组织损伤、脑组织海马 CA1 区损伤程度、Glu 含量、TNF-α 和 NF-κB 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低，而穿台次数、神经学评分、Ach 含量显著增加（$P<0.05$），且安宫牛黄丸各组间存在一定剂量相关性。**结论**　安宫牛黄丸能抑制肝性脑病大鼠 TNF-α/NF-κB 信号通路，对大鼠神经功能具有保护作用。

关键词：安宫牛黄丸；肝性脑病；神经功能；肿瘤坏死因子 α/核因子 κB
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 5515(2021)11 - 2217 - 07
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.11.001

Effect of Angong Niuhuang Pill on TNF-α/NF-κB signal pathway and neurological function in rats with hepatic encephalopathy

LIU Min-huan[1], LI Kai[1], ZHENG Hui-jun[2]
1. Department of Infection, Shangqiu Municipal Hospital, Shangqiu 476100, China
2. Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 410104, China

Abstract: Objective　To explore the effects of Angong Niuhuang Pill on tumor necrosis factor-α/nuclear factor-κB (TNF-α/NF-κB) signal pathway and neurological function in rats with hepatic encephalopathy by constructing a HE rat model. **Methods**　Sixty SPF SD rats (10 rats in each group) were divided into control group, model group, lactulose group (0.2 mL/200 g lactulose), Angong Niuhuang low-dose group (1.0 g/kg), medium-dose group (2.0 g/kg), and high-dose group (3.0 g/kg). Hepatic encephalopathy model was established by thioacetamide (TAA) method (300 mg/kg TAA solution was injected into the model rats for 3 consecutive days). From 4 days before modeling, each treatment group was given a corresponding dose of lactulose and Angong Niuhuang Pill by gavage until 2 days after modeling; the control group was injected with the same amount of normal saline. Water maze test was used to test the ability of learning and memory, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum biochemical indexes and the contents of acetylcholine (ACh) and glutamic acid (Glu) in hippocampus, hematoxylin eosin staining (HE) was used to observe the pathological changes of liver and brain, real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the mRNA expressions of TNF-α and NF-κB, Western blot was used to detect the expression of pathway related proteins. **Results**　Compared with the control group, the latency of platform searching, levels of blood ammonia, ALT, AST, the injury degree of liver tissue, injury degree of hippocampal CA1area in brain tissue, the content of Glu, the mRNA and protein expression levels of TNF-α and NF-κB in the model group were

收稿日期：2021-02-22
基金项目：河南省中医药科学研究专项课题（2019YZ2052）
作者简介：刘敏环（1965—），女，副主任护师，本科，从事肝性脑病临床工作。E-mail: shy52080@163.com

significantly increased, however, the times of crossing platform, neurological score and content of ACh were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with those in model group, the latency of platform searching, the levels of blood ammonia, ALT, AST, the injury degree of liver tissue, injury degree of hippocampal CA1 area in brain tissue, the content of Glu, the mRNA and protein expression levels of TNF-α and NF-κB in lactulose group, low-dose group, medium-dose group and high-dose group were significantly decreased, however, the times of crossing platform, neurological score and content of ACh were significantly increased ($P < 0.05$), there was a dose-dependent relationship between the Angong Niuhuang Pill groups. **Conclusion** Angong Niuhuang Pill can inhibit TNF-α/NF-κB signaling pathway in hepatic encephalopathy rats, and has protective effect on neurological function of rats.

Key words: Angong Niuhuang Pill; hepatic encephalopathy; neurological function; tumor necrosis factor α/nuclear factor-Kb

肝性脑病是一种严重急性或慢性肝功能不全的并发症，人格、意识、认知和运动功能改变是其主要特征，但其临床症状均为非特异性症状，诊断极为困难，而患者对治疗的反应可能是证明诊断的最佳方法，因此有必要大力寻找有效的治疗药物[1]。中医疗法历史悠久，安宫牛黄丸由牛黄、栀子、郁金、黄芩、麝香等 11 味中草药及矿物质组成，具有抗炎、抗氧化、排毒、抗惊厥及改善神经系统损伤的作用，已被用于中风[2]、急性脑出血[2-3]、肝性脑病[4]等疾病的治疗。研究发现，安宫牛黄丸联合醒脑注射液能够改善肝性脑病患者肝功能，且对提升患者认知功能及缩短苏醒时间具有良好的效果[5]。肿瘤坏死因子 α/核因子 κB（tumor necrosis factor α/nuclear factor-κB，TNF-α/NF-κB）属于一种炎症信号通路，其在肝性脑病发病过程中被过度激活，从而对神经系统造成严重的炎症损伤[6-7]。目前关于安宫牛黄丸在肝性脑病中的治疗作用多是与其他疗法联合施用进行临床观察，其在疾病中的治疗机制仍未清楚。因此，本研究对安宫牛黄丸在肝性脑病大鼠中对 TNF-α/NF-κB 信号通路及神经功能的影响进行了探究，以期为安宫牛黄丸在肝性脑病中治疗机制研究提供有价值的参考。

1 材料

1.1 实验动物

60 只 SPF 级 SD 大鼠购自南方医科大学，体质量 210～250 g，许可证号：SCXK（粤）2016-0041，全部实验大鼠适应性饲养 7 d，期间自由光照、自由饮水采食。本研究已经过动物伦理委员会批准，符合 3R 原则。

1.2 主要试剂

安宫牛黄丸（北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂，国药准字 Z11020076，规格：3 g/丸，批号 201605492）；乳果糖口服溶液[Abbott Biologicals B.V.（荷兰），批准文号：H20171057，规格：15 mL，批号：364536）；硫代乙酰胺（TAA），货号：C0128，购自上海宝曼生物科技有限公司；血氨试剂盒、丙氨酸氨基转移酶（ALT）试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）试剂盒、乙酰胆碱（Ach）ELISA 试剂盒，货号分别为 EY-R96761、EY-elisa-2633、EY-elisa-5385、EY-elisa-1839，购自上海一研生物科技有限公司；即用型荧光定量 PCR 试剂盒（货号：XY-TE-0731）购自上海烜雅生物科技有限公司；总 RNA 提取试剂盒（货号：AR1200-100T）购自上海吉至生化科技有限公司；QIAGEN 反转录试剂盒（货号：QIAGEN）购自上海科敏生物科技有限公司；BCA 蛋白检测试剂盒、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗抗体，货号分别为 K12862、WE0381-QAN，购自北京百奥莱博科技有限公司；兔抗鼠 β-actin（货号：4970）购自 Cell Signaling Technology；蛋白提取试剂盒、谷氨酸（glutamic acid，Glu）ELISA 试剂盒货号分别为 CD-13559-ML、CD-108953-ELISA，购自武汉纯度生物科技有限公司；RT2100C 全自动酶标仪购自德国 IFP 公司；Bio-Rad 伯乐荧光定量 PCR 仪 CFX Connect 购自南京贝登医疗股份有限公司；蛋白凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 分组与模型构建

将 60 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、乳果糖组（1 μL/g 乳果糖）[8]和安宫牛黄低剂量（1.0 g/kg）、中剂量（2.0 g/kg）、高剂量（3.0 g/kg）组[9]，每组 10 只。

安宫牛黄丸碾碎后生理盐水溶解，各给药组每天 9:00 时分别 ig 相应药物，1 次/d。对照组及模型组于相同时间点 ig 等量生理盐水，1 次/d，4 d 后进行模型构建，造模结束 2 d 后给药结束。

肝性脑病模型构建：模型大鼠以 300 mg/(kg·d) 剂量注射经生理盐水溶解的 TAA 溶液，并连续注射 3 d，若大鼠出现反应迟缓、嗜睡、昏迷、共济失调、自主活动时间减少现象之一即为造模成功[10]。对照组每天注射等量生理盐水。造模后观察其自主

活动情况及精神状态，在结束 24 h 后对大鼠进行神经性评分：耳廓反射，角膜反射，尾巴弯曲反射，逃避反应反射，扶正反射和共济失调来评估神经功能，无反射记 0 分，完整反射每项记 2 分[11]。

2.2　水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力

定位航行试验：于造模后药品注射 2 h 后进行为期 3 d 的训练，4 次/d。定位航行训练：在直径为 1.5 m 的黑色圆形水池（水温 19～22 ℃）中设置 1 个直径 10 cm 的平台隐匿于水下 2 cm 处，将水池用遮光布围起，并在水中添加黑色颜料混匀，水池上方悬挂摄像机；将水池均等分为 4 个象限，每个象限制作 1 个不同的标记用于大鼠辨别定位；让大鼠每天分别于 4 个象限弧度中间处头朝下入水，入水时即可开始跟踪，为时 120 s。时间结束或找到平台（所用时间为寻台潜伏期）即停止跟踪，使大鼠在平台休息 10 s 后再次进行试验（n＝10）。空间探索试验：定位航行试验结束后撤去平台，在相同入水点将大鼠放入水中，记录其 120 s 内游泳路径并统计穿越平台次数（穿台次数）（n＝10）。

2.3　大鼠血清生化指标检测

水迷宫实验结束 12 h 后通过腹主动脉取血 3 mL 以肝素钠抗凝，取部分样本于 0.5 h 内根据血氨检测试剂盒说明书在 450 nm 波长下检测并计算各组大鼠血氨水平（n＝10）。其余血液样本 4 000 r/min 经 10 min 离心取上清，根据 ALT、AST 检测试剂盒说明书检测各组大鼠 ALT、AST 水平。

2.4　大鼠肝组织和脑组织病理学观察

苏木精－伊红（HE）染色，取血后颈椎脱臼处死大鼠，取大鼠肝组织和脑组织经多聚甲醛 24 h 固定、石蜡包埋、切片（厚 4 μm）后进行苏木精伊红染色、冲洗、乙醇脱水、风干、封片，显微镜观察肝组织和脑组织海马 CA1 区病理学情况（n＝5）。

2.5　大鼠海马组织 Ach 和 Glu 含量

取大鼠的海马组织，将其置于研钵中研磨至匀浆，4 000 r/min 经 10 min 离心取上清根据试剂盒说明书在 450 nm 波长下检测并计算 Ach 和 Glu 含量。

2.6　实时荧光定量 PCR 检测脑样本中 TNF-α、NF-κB mRNA 表达情况

使用 RNA 提取试剂盒提取各组脑样本总 RNA 后反转录为 cDNA，以此为模板通过 qRT-PCR 检测 TNF-α、NF-κB 表达量；β-actin 作为内参对 TNF-α、NF-κB 进行标准化，$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析其表达水平（n＝5）。如表 1 所示为 Oligo 7 和 Primer 3.0 所设引物，由生工生物工程（上海）股份有限公司进行合成。

表 1　qRT-PCR 引物

Table 1　qRT-PCR primers

基因	上游引物(5′-3′)	下游引物(5′-3′)
β-actin	CCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT	TTGGCATAGAGGTCTTTACGG
TNF-α	GGCTGAGCCAGCGTGCCAACG	GCAGCCTTGTCCCTTGAAGAG
NF-κB	CACCATAAACACCAAATTTAA	TAATTATTTTTAATTTATTG

2.7　Western blotting 检测蛋白表达情况

取余下脑组织研磨后加入 RIPA 裂解液，用 BCA 蛋白试剂盒对各组组织总蛋白进行测定；SDS-PAGE 电泳分离蛋白、低温转膜，脱脂奶粉 1 h 封闭，兔抗鼠 β-actin、NF-κB p65、p-NF-κB p65、TNF-α 一抗孵育过夜（4 ℃）后二抗孵育 2 h，蛋白凝胶成像仪定量分析 NF-κB p65、p-NF-κB p65、TNF-α 蛋白含量（n＝5）。

2.8　统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述，两组间比较进行 t 检验，多组间采用单因素方差分析，用 SPSS 23.0 统计学软件进行分析。

3　结果

3.1　安宫牛黄丸对大鼠行为学的影响

定位航行训练第 1～3 天及空间探索试验检测结果如表 2 所示，与对照组相比，模型组寻台潜伏期显著增加，而穿台次数显著降低（P＜0.05）；与模型组相比，乳果糖组和安宫牛黄丸低、中、高剂量组大鼠寻台潜伏期显著降低，而穿台次数显著增加（P＜0.05），安宫牛黄丸各组存在剂量相关性。

3.2　大鼠神经学评分

对照组大鼠精神状况正常，动作敏捷；模型组大鼠明显食欲不振、动作迟缓、出现脱毛、嗜睡、昏迷现象；乳果糖组和安宫牛黄丸低、中、高剂量组大鼠食欲逐渐增加，脱毛、嗜睡、昏迷现象减轻。如表 3 所示，与对照组相比，模型组大鼠神经学评分显著降低（P＜0.05）；与模型组相比，乳果糖组和安宫牛黄丸低、中和高剂量组大鼠神经学评分均显著增加（P＜0.05），存在安宫牛黄丸剂量相关性。

3.3　安宫牛黄丸对各组大鼠血清生化指标的影响

如表 4 所示，与对照组相比，模型组大鼠血清中血氨、ALT 和 AST 水平显著增加（P＜0.05）；

表 2 安宫牛黄丸对大鼠行为学的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 2 Effects of Angong Niuhuang Pills on the behavior of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	第 1 天寻台潜伏期/s	第 2 天寻台潜伏期/s	第 3 天寻台潜伏期/s	穿台次数/次
对照	—	28.23±1.94	25.62±2.17	21.35±2.16	10.23±1.12
模型	—	59.56±4.53*	56.12±4.75*	52.33±6.13*	3.22±0.41*
乳果糖	1 μL·g^{-1}	36.43±3.70$^{\#}$	33.42±3.49$^{\#}$	29.66±4.13$^{\#}$	9.10±1.26$^{\#}$
安宫牛黄丸	1.0	52.22±5.74$^{\#}$	49.79±4.58$^{\#}$	45.61±4.55$^{\#}$	5.01±0.15$^{\#}$
	2.0	42.48±4.12$^{\#\triangle}$	39.40±3.11$^{\#\triangle}$	36.12±3.51$^{\#\triangle}$	6.53±1.42$^{\#\triangle}$
	3.0	35.32±2.47$^{\#\triangle\blacktriangle}$	32.19±2.16$^{\#\triangle\blacktriangle}$	29.93±2.68$^{\#\triangle\blacktriangle}$	8.49±2.10$^{\#\triangle\blacktriangle}$

与对照组比较：$^{*}P$＜0.05；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05；与低剂量组比较：$^{\triangle}P$＜0.05；与中剂量组比较：$^{\blacktriangle}P$＜0.05

$^{*}P < 0.05$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group; $^{\triangle}P < 0.05$ *vs* low-dose group; $^{\blacktriangle}P < 0.05$ *vs* middle-dose group

表 3 安宫牛黄丸对大鼠神经学评分的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 3 Effect of Angong Niuhuang Pills on the neurological score of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	神经学评分
对照	—	11.12±0.24
模型	—	3.61±0.43*
乳果糖	1 μL·g^{-1}	10.92±1.20$^{\#}$
安宫牛黄丸	1.0	4.68±0.34$^{\#}$
	2.0	6.12±0.67$^{\#\triangle}$
	3.0	8.11±0.59$^{\#\triangle\blacktriangle}$

与对照组比较：$^{*}P$＜0.05；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05；与低剂量组比较：$^{\triangle}P$＜0.05；与中剂量组比较：$^{\blacktriangle}P$＜0.05

$^{*}P < 0.05$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group; $^{\triangle}P < 0.05$ *vs* low-dose group; $^{\blacktriangle}P < 0.05$ *vs* middle-dose group

与模型组相比，乳果糖组和安宫牛黄丸低、中、高剂量组血清中血氨、ALT 和 AST 水平均显著降低（P＜0.05），存在安宫牛黄丸剂量相关性。

3.4 肝组织病理学检测

如图 1 所示，在对照组大鼠肝脏组织中肝小叶结构清晰、结构正常，未见炎性细胞浸润、细胞坏死等现象；模型组肝脏组织出现组织增生、肝小叶结构模糊、细胞排列紊乱、变性坏死、炎性细胞浸润严重等现象；与模型组相比，乳果糖组和安宫牛黄丸低、中、高剂量组大鼠肝细胞变性坏死、炎性细胞浸润、组织增生程度均得到不同程度的改善。

3.5 脑组织病理学变化

对照组大鼠脑组织海马 CA1 区神经元排列整齐、结构正常完整、细胞核饱满，无坏死现象；模型组神经元坏死现象严重、结构不完整、排列紊乱、细胞核固缩、胞质减少；与模型组相比，乳果糖组和安宫牛黄丸低、中、高剂量组细胞坏死、排列紊乱、细胞核固缩现象减轻，结构逐渐完整，见图 2。

3.6 安宫牛黄丸对大脑海马 Ach、Glu 含量的影响

与对照组相比，模型组大鼠脑海马中 Ach 含量显著降低，Glu 含量显著增加（P＜0.05）；与模型组相比，乳果糖组和安宫牛黄丸低、中、高剂量组 Ach 含量显著增加，而 Glu 含量显著降低（P＜0.05），存在安宫牛黄丸剂量相关性，见表 5。

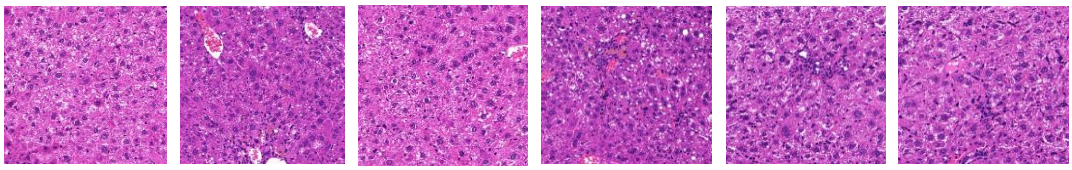
表 4 安宫牛黄丸对各组大鼠生化指标的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 4 Effects of Angong Niuhuang Pills on the biochemical indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	血氨/(mmol·L^{-1})	ALT/(U·L^{-1})	AST/(U·L^{-1})
对照	—	40.12±6.49	50.37±7.12	160.74±10.66
模型	—	174.33±30.67*	416.28±60.15*	812.36±179.35*
乳果糖	1 μL·g^{-1}	58.17±5.44$^{\#}$	156.49±26.75$^{\#}$	391.23±50.98$^{\#}$
安宫牛黄丸	1.0	151.84±10.39$^{\#}$	307.42±31.01$^{\#}$	627.12±35.46$^{\#}$
	2.0	119.57±8.18$^{\#\triangle}$	211.44±11.75$^{\#\triangle}$	403.57±49.75$^{\#\triangle}$
	3.0	68.51±4.56$^{\#\triangle\blacktriangle}$	124.39±10.12$^{\#\triangle\blacktriangle}$	256.33±36.01$^{\#\triangle\blacktriangle}$

与对照组比较：$^{*}P$＜0.05；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05；与低剂量组比较：$^{\triangle}P$＜0.05；与中剂量组比较：$^{\blacktriangle}P$＜0.05

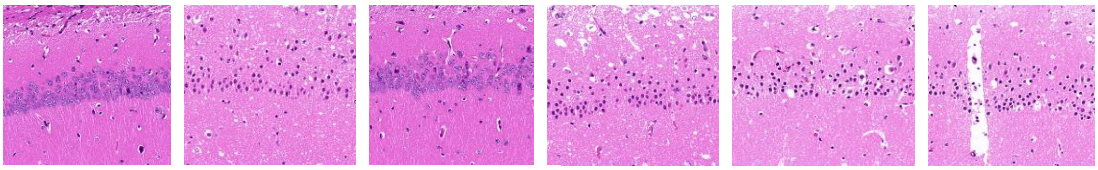
$^{*}P < 0.05$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group; $^{\triangle}P < 0.05$ *vs* low-dose group; $^{\blacktriangle}P < 0.05$ *vs* middle-dose group



对照　模型　乳果糖 1 μL·g^{-1}　1.0 g·kg^{-1}　2.0 g·kg^{-1}　3.0 g·kg^{-1}
安宫牛黄丸

图 1　大鼠肝脏病理学改变（HE，×200）

Fig. 1　Pathological changes of rat liver (HE, ×200)



对照　模型　乳果糖 1 μL·g^{-1}　1.0 g·kg^{-1}　2.0 g·kg^{-1}　3.0 g·kg^{-1}
安宫牛黄丸

图 2　大鼠脑组织病理学变化（HE，×200）

Fig. 2　Pathological changes of rat brain tissue (HE, ×200)

表 5　安宫牛黄丸对大脑神经递质的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Table 5　Effects of Angong Niuhuang Pills on neurotransmitters in the brain ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	Ach/(μg·mg^{-1})	Glu/(μmol·g^{-1})
对照	—	18.90±4.12	30.94±5.75
模型	—	6.15±1.10*	45.82±5.10*
乳果糖	1 μL·g^{-1}	16.49±3.42$^{\#}$	32.40±6.05$^{\#}$
安宫牛黄丸	1.0	8.10±1.30$^{\#}$	42.13±3.91$^{\#}$
	2.0	11.51±2.17$^{\#\triangle}$	38.47±2.35$^{\#\triangle}$
	3.0	13.42±2.52$^{\#\triangle\blacktriangle}$	34.30±3.10$^{\#\triangle\blacktriangle}$

与对照组比较：$^{*}P<0.05$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$；与低剂量组比较：$^{\triangle}P<0.05$；与中剂量组比较：$^{\blacktriangle}P<0.05$

$^{*}P<0.05$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$ *vs* model group; $^{\triangle}P<0.05$ *vs* low-dose group; $^{\blacktriangle}P<0.05$ *vs* middle-dose group

3.7　安宫牛黄丸对脑组织中 TNF-α/NF-κB 通路相关 mRNA 及蛋白表达的影响

如表 6 所示，与对照组相比，模型组大鼠脑组织中 TNF-α mRNA、NF-κB mRNA、TNF-α 蛋白、p-NF-κB p65/NF-κB p65 表达水平显著增加（$P<0.05$）；与模型组相比，乳果糖组和安宫牛黄丸低、中、高剂量组的 TNF-α mRNA、NF-κB mRNA、TNF-α 蛋白、p-NF-κB p65/NF-κB p65 水平均显著降低（$P<0.05$），存在安宫牛黄丸剂量相关性，见图 3。

4　讨论

肝性脑病是由急性或慢性严重肝病引起的认知、运动和精神疾病，其分为 3 大主要类型，分别为由急性肝功能衰竭、门体系统旁路/分流和肝硬化引起，而肝炎引发的肝硬化是其高发原因[12]。肝性

表 6　安宫牛黄丸对 TNF-α/NF-κB 通路相关 mRNA 及蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Table 6　The effect of Angong Niuhuang Pills on TNF-α/NF-κB pathway related mRNA and protein expression ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	mRNA 表达水平		蛋白表达水平	
		TNF-α	NF-κB	TNF-α	p-NF-κB p65/NF-κB p65
对照	—	1.01±0.11	0.99±0.12	0.59±0.10	0.61±0.09
模型	—	1.94±0.25*	2.08±0.25*	1.68±0.23*	1.72±0.26*
乳果糖	1 μL·g^{-1}	1.10±0.12$^{\#}$	1.27±0.21$^{\#}$	0.64±0.10$^{\#}$	0.68±0.12$^{\#}$
安宫牛黄丸	1.0	1.67±0.29$^{\#}$	1.87±0.19$^{\#}$	1.41±0.21$^{\#}$	1.40±0.22$^{\#}$
	2.0	1.42±0.18$^{\#\triangle}$	1.60±0.21$^{\#\triangle}$	1.03±0.15$^{\#\triangle}$	1.18±0.19$^{\#\triangle}$
	3.0	1.21±0.16$^{\#\triangle\blacktriangle}$	1.39±0.20$^{\#\triangle\blacktriangle}$	0.71±0.11$^{\#\triangle\blacktriangle}$	0.74±0.17$^{\#\triangle\blacktriangle}$

与对照组比较：$^{*}P<0.05$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$；与低剂量组比较：$^{\triangle}P<0.05$；与中剂量组比较：$^{\blacktriangle}P<0.05$

$^{*}P<0.05$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$ *vs* model group; $^{\triangle}P<0.05$ *vs* low-dose group; $^{\blacktriangle}P<0.05$ *vs* middle-dose group

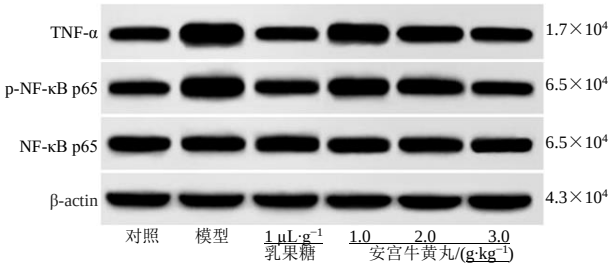


图 3 安宫牛黄丸对 TNF-α/NF-κB 通路蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Angong Niuhuang Pills on the expression of TNF-α/NF-κB pathway related proteins

脑病的临床症状变化极大，能够从精神状态的细微障碍扩展到昏迷，其原因是由炎症、氧化应激、神经毒素、血脑屏障受损、脑能量代谢损伤等多种病理生理机制的相结合造成的，并且其非特异性临床症状致使诊断极为困难，而患者对治疗的反应已被证明可能是证明诊断的最佳方法，因此寻找有效的治疗药物并了解其治疗机制十分必要[13]。

安宫牛黄丸是已被广泛使用的急救药物，其由牛黄、朱砂、雄黄、水牛角、麝香、珍珠、冰片等 11 种草药和矿物质组成，其出自吴鞠通所创的《温病条辨》[5]。珍珠解毒、安神，牛黄、郁金活和栀子镇惊、清心、护肝、利胆；水牛角、黄芩和黄连解毒、清热，麝香开窍、散於，冰片醒神、明目，朱砂镇静安神，雄黄祛湿解毒，11 种成分联合使用可达到清热、解毒、镇静的功效，是神志昏迷、热毒攻心、抗炎、保肝的有效药物[14]。安宫牛黄丸中朱砂和雄黄对急性缺血性中风和脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用[15]。肝脏是机体内存在的最大解毒器官，当其代谢异常时可损伤机体内毒素清除能力，继而血氨、神经递质等含量发生变化，并通过血脑屏障累积后进入大脑，影响脑部神经状况[12]。本研究发现，安宫牛黄丸能有效降低肝性脑病大鼠寻台潜伏期、而使穿台次数显著增加。结果表明安宫牛黄丸能有效改善大鼠的学习记忆能力。氨基酸代谢紊乱导致的氨中毒是肝性脑病发病的主要原因之一，肝性脑病患者血清中血氨水平急剧增加[4]。研究发现，安宫牛黄丸能够有效改善肝性脑病患者血氨及 AST、ALT 等肝功能水平，对肝性脑病具有良好的治疗效果[16]。本研究发现，安宫牛黄丸能有效降低 HE 大鼠血氨、ALT、AST 水平和肝组织损伤程度，这表明其可有效改善大鼠肝功能及肝损伤。Ach 作为中枢神经系统中极其重要的神经递质可通过特异性的作用于各类胆碱受体，参与记忆脑区神经之间的信息传递，而 Glu 作为大脑中分布最广的主要兴奋性递质，在维持神经系统正常生理功能中具有重要作用[17]。肝性脑病可导致大鼠脑组织和神经损伤，而安宫牛黄丸能有效降低肝性脑病大鼠脑组织海马 CA1 区损伤程度及 Glu 含量，而使神经学评分和 Ach 含量显著增加，这表明安宫牛黄丸对肝性脑病大鼠脑损伤及神经功能具有有效治疗作用。

脑部损伤不仅是肝性脑病的结果，还是其促成因素：脑受损时星型胶质细胞首先释放 TNF-α，进而释放谷氨酸激活小胶质细胞，而小胶质细胞则又会促进 TNF-α、IL-1β 等炎性因子的释放，从而进一步导致神经元损伤，脑损伤加重[12]。有研究发现，肝性脑病与促炎因子有关，这说明除氨中毒外，炎性细胞因子也能促进肝性脑病的发生和严重程度加重，因此可将其定为疾病优先治疗的靶标[18]。NF-κB 是 1 个参与先天和适应性免疫应答的转录因子，可诱导 TNF-α 等多种促炎因子的表达[19]。神经系统中的小胶质细胞和星形胶质细胞是 TNF-α 的主要来源，研究表明在中风、脑出血、肝性脑病等病理情况下的大鼠海马神经元中也可诱导其表达[19-20]。HE 会显著增加脑组织中 TNF-α 和 NF-κB 水平[21]。有报道称安宫牛黄能通过降低脑出血患者血清中 NF-κB 和 TNF-α 水平从而改善患者认知和神经功能，并且极具安全性，患者预后良好[22-23]。本研究发现安宫牛黄丸能显著降低大鼠脑组织中 TNF-α 和 NF-κB 的 mRNA 及蛋白表达水平，该结果表明对安宫牛黄丸大鼠神经功能具有保护作用可能与 TNF-α/NF-κB 信号通路有关。

综上所述，安宫牛黄丸能抑制肝性脑病大鼠 TNF-α/NF-κB 信号通路，对大鼠神经功能具有保护作用。本研究对安宫牛黄丸在肝性脑病中治疗机制的研究具有重要参考价值，但其是否在该疾病中还具有其他保护机制还需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Weissenborn K. Hepatic encephalopathy: definition, clinical grading and diagnostic principles [J]. *Drugs*, 2019, 79(Suppl 1): 5-9.

[2] Tsoi B, Chen X M, Gao C, *et al*. Neuroprotective effects and hepatorenal toxicity of angong Niuhuang wan against ischemia-reperfusion brain injury in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 593.

[3] 朱晓宇, 郭胜亚, 徐懿乔, 等. 安宫牛黄丸防治脑血管疾病作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(8): 1067-1072.

[4] 李文科, 陈文炎, 廖楠君, 等. 安宫牛黄丸治疗肝硬化肝性脑病(2～4 期)的临床疗效观察 [J]. 基层医学论坛, 2019, 23(7): 937-939.

[5] 范铭兴, 张曾娣, 缪红军. 安宫牛黄丸联合醒脑静注射液治疗肝性脑病临床观察 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(2): 237-240.

[6] Khalil H M A, Eliwa H A, El-Shiekh R A, *et al*. Ashwagandha (Withania somnifera) root extract attenuates hepatic and cognitive deficits in thioacetamide-induced rat model of hepatic encephalopathy via induction of Nrf2/HO-1 and mitigation of NF-κB/MAPK signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 277: 114141.

[7] Vairappan B, Sundhar M, Srinivas B H. Resveratrol restores neuronal tight junction proteins through correction of ammonia and inflammation in CCl4-induced cirrhotic mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(7): 4718-4729.

[8] 李晓娟, 朱　云, 王立福, 等. 桃核承气汤对大鼠肝性脑病模型干预治疗的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(10): 14-18.

[9] 李继中, 江　艳, 曾　艳, 等. 安宫牛黄丸对大鼠急性脑缺血再灌注 MMP9、AQP4 表达的影响 [J]. 遵义医学院学报, 2019, 42(4): 412-415.

[10] 黄楠楠, 胡　鹏, 吴增光, 等. 6, 7-二乙酰黄芩素对大鼠急性肝性脑病的防治作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(10): 1957-1963.

[11] Kafa I M, Bakirci S, Uysal M, *et al*. Alterations in the brain electrical activity in a rat model of *Sepsis*-associated encephalopathy [J]. *Brain Res*, 2010, 1354: 217-226.

[12] Butterworth R F. Hepatic encephalopathy in cirrhosis: pathology and pathophysiology [J]. *Drugs*, 2019, 79(Suppl 1): 17-21.

[13] Hadjihambi A, Arias N, Sheikh M, *et al*. Hepatic encephalopathy: a critical current review [J]. *Hepatol Int*, 2018, 12(suppl 1): 135-147.

[14] 李惠芳, 恽晓平. 安宫牛黄丸结合针刺治疗急性脑卒中昏迷 43 例 [J]. 河南中医, 2017, 37(8): 1376-1378.

[15] Tsoi B, Wang S L, Gao C, *et al*. Realgar and cinnabar are essential components contributing to neuroprotection of Angong Niuhuang Wan with no hepatorenal toxicity in transient ischemic brain injury [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 377: 114613.

[16] 黄泽颖. 安宫牛黄丸治疗肝性脑病的临床疗效观察 [J]. 健康前沿, 2018, 27(6): 182.

[17] 周　黎, 刘　玲, 潘　微, 等. 加味涤痰汤对血管性轻度认知功能障碍大鼠海马神经递质及神经营养因子影响的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(4): 195-197.

[18] Manzhalii E, Virchenko O, Falalyeyeva T, *et al*. Hepatic encephalopathy aggravated by systemic inflammation [J]. *Dig Dis*, 2019, 37(6): 509-517.

[19] Balzano T, Arenas Y M, Dadsetan S, *et al*. Sustained hyperammonemia induces TNF-a IN Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF-κB pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 70.

[20] Yang S, Kuang G, Zhang L K, *et al*. Mangiferin attenuates LPS/D-GalN-induced acute liver injury by promoting HO-1 in kupffer cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 285.

[21] Vairappan B, Sundhar M, Srinivas B H. Resveratrol restores neuronal tight junction proteins through correction of ammonia and inflammation in CCl4-induced cirrhotic mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(7): 4718-4729.

[22] 黄志刚, 胥林波, 李　密. 安宫牛黄丸对重症脑出血认知功能、NF-κB 水平影响分析 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 2036-2038.

[23] 杨荣刚. 微创颅内血肿清除术与安宫牛黄丸联合治疗高血压脑干出血的疗效 [J]. 中国合理用药探索, 2019, 16(12): 72-74.

[责任编辑　高　源]