

山豆根激活小胶质细胞炎症诱导神经毒性的机制研究

周 宏¹, 陈 硕¹, 李博野², 杨晋宁¹, 韩温聪¹, 彭 博^{3*}, 胡 秦^{1*}

1. 北京工业大学 化学与生命科学学院, 北京 100124

2. 中国民用航空局民用航空医学中心, 北京 100123

3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘 要: **目的** 探讨高剂量的山豆根 *Sophorae tonkinensis* 提取物 (STE) 活化小胶质细胞, 诱导小鼠神经炎症的神经毒性机制。**方法** 采用山豆根提取物 (STE, 10、15 g·kg⁻¹) ig 给予小鼠, 处理 14 d 后, 分离小鼠中脑皮层, 采用 Label-free 蛋白质组学技术进行脑差异蛋白表达分析、基因本体 (GO) 富集分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。体外实验采用 STE 处理小鼠小胶质细胞 BV2 细胞, 采用流式细胞术检测细胞表面 CD80、CD86 和 CD206 表达, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测细胞上清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素 (IL)-6 释放, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 IL-4 基因表达。采用 qRT-PCR、Western blotting 和免疫荧光染色检测核因子- κ B (NF- κ B) p65 的基因表达、蛋白磷酸化和核易位。**结果** 对小鼠中脑皮层的蛋白质组学分析结果显示, 与对照组相比, 10 g·kg⁻¹ STE 诱导了 109 个差异表达蛋白, 15 g·kg⁻¹ STE 诱导了 52 个差异表达蛋白, 2 组共同表达的差异表达蛋白 20 个。GO 和 KEGG 分析结果显示 2 个剂量的 STE 均参与了化学突触信号传递、神经退行性疾病、神经内分泌信号通路和细胞因子调控、炎症调节、抗感染免疫等炎症免疫反应。体外细胞实验结果表明, 与对照组比较, 高质量浓度 STE (800 μ g·mL⁻¹) 显著上调 BV2 细胞表面 CD80、CD86 表达 ($P < 0.001$), 显著促进 TNF- α 、IL-6 的释放和 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 基因表达 ($P < 0.01$ 、0.001); 高质量浓度 STE 对 NF- κ B p65 蛋白的磷酸化和核易位有一定的促进作用, 但无显著性差异。**结论** 高剂量的 STE 可诱导神经炎症反应, 其机制与诱导小胶质细胞向 M1 炎症表型极化和炎症细胞因子释放有关。

关键词: 山豆根; 小胶质细胞; 神经炎症; 神经毒性; M1 炎症表型极化; 苦参碱

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)01-0100-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.01.010

Mechanism of activation of microglia inflammation induced neurotoxicity by *Sophorae tonkinensis*

ZHOU Hong¹, CHEN Shuo¹, LI Boye², YANG Jinning¹, HAN Yuncong¹, PENG Bo³, HU Qin¹

1. College of Chemistry and Life Science, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

2. Civil Aviation Medicine Center, Civil Aviation Administration of China, Beijing 100123, China

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To explore the neurotoxic mechanism of microglia activation and neuroinflammation in mice induced by high dose of *Sophorae tonkinensis* extract (STE). **Methods** Mice were ig administered with STE (10 and 15 g·kg⁻¹). After 14 days of treatment, the mesencephalic cortex of the mice was isolated. Label-free proteomics technology was used to analyze brain differential protein expression, GO functional enrichment and KEGG pathway analysis. *In vitro* experiments, mouse microglia BV2 cells were treated with STE. The expressions of CD80, CD86 and CD206 on the cell surface were detected by flow cytometry, and the release of TNF- α and IL-6 in the supernatant was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-4 gene expression. The gene expression, protein phosphorylation and nuclear translocation of NF- κ B p65 were detected by qRT-PCR, Western blotting and immunofluorescence staining. **Results**

收稿日期: 2024-07-30

基金项目: 新疆自治区重大科技专项 (2023A02010-3)

作者简介: 周 宏 (1997—), 硕士研究生。E-mail: zhouhong@emails.bjut.edu.cn

*通信作者: 彭 博, 研究员, 从事中药药理学和毒理学方面的研究工作。E-mail: bpeng@icmm.ac.cn

胡 秦, 副教授, 从事抗病毒药物研发及相关免疫机制研究。E-mail: hq07616@bjut.edu.cn

Proteomic analysis of mouse mesencephalic cortex showed that 109 differently expressed proteins were induced by 10 g·kg⁻¹ and 52 differently expressed proteins were induced by 15 g·kg⁻¹, and 20 different proteins were co-expressed by the two groups compared with the normal control group. The results of GO and KEGG analysis showed that two doses of extracts were involved in chemical synaptic signaling, neurodegenerative diseases, neuroendocrine signaling pathways and cytokine regulation, inflammation regulation, anti-infection immunity and other inflammatory immune responses. The results of *in vitro* cell experiment showed that high concentration of STE (800 μg·mL⁻¹) significantly up-regulated the expression of CD80 and CD86 on the surface of BV2 cells ($P < 0.001$), promoted the release of TNF- α and IL-6 and the gene expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β ($P < 0.01$ and 0.001). High dose extract of STE had a certain promoting effect on the phosphorylation and nuclear translocation of NF- κ B p65 protein, but there was no significant difference. **Conclusion** High dose of STE extract could induce neuroinflammatory response, the mechanism of which was related to inducing microglia to polarize to M1 inflammatory phenotype and inflammatory cytokine release.

Key word: *Sophorae tonkinensis*; microglia; neuroinflammation; neurotoxicity; polarize to M1 inflammatory phenotype; matrine

山豆根为豆科槐属植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎, 是一味传统常用中药材, 其苦、寒, 有毒, 具有清热解毒、利咽消肿之功效。近年来研究发现山豆根具有抗炎、抗肿瘤、保肝等作用, 临床常用于治疗咽喉肿痛、病毒性肝炎、肿瘤等疾病^[1]。但山豆根过量使用时会引起严重的不良反应, 如神经毒性、消化道反应、肝毒性等, 其中以神经毒性最为典型。山豆根的神经毒性主要表现为头痛、头晕、抽搐、意识模糊等中毒性脑病症状^[2], 可导致小脑齿状核病变、急性弥漫性小脑病变、双侧苍白球坏死和继发性全身性扭转痉挛等^[3]。山豆根富含 200 余种活性成分, 生物碱类、黄酮类和三萜类为主要化合物^[4]。目前研究认为, 生物碱是引起山豆根毒性的主要组分, 但其成分复杂, 毒理机制尚不明确, 临床解毒多以对症治疗为主^[5]。因此, 探究山豆根的神经毒性机制对其临床应用和预防不良反应发生具有重要意义。

神经炎症是由毒性代谢物、感染或创伤等因素刺激, 引起中枢神经系统免疫细胞如小胶质细胞、星形胶质细胞等活化所介导的炎症反应, 可导致神经元细胞损伤和神经功能障碍^[6]。有研究显示, 山豆根可引起中枢神经系统肿瘤坏死因子、Toll 样受体等信号通路改变, 提示山豆根可能诱导神经炎症的发生^[7]。因此, 本研究采用 Label-free 蛋白组学分析山豆根提取物 (*Sophora tonkinensis* extract, STE) 对小鼠脑蛋白表达的影响, 并探究 STE 对小鼠小胶质 BV2 细胞活化和细胞表型极化的诱导作用, 为深入解析山豆根的神经毒性提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

STE 粉末由贵州三力制药股份有限公司提供 (批号 20210409), 性状为棕色粉末, 每克药粉由

12.46 g 生药采用水提醇沉法制备, 储存于室温、密封、干燥处, 使用无菌水溶解, 苦参碱质量分数为 1.70%; 脂多糖 (LPS, 批号 L6529) 购自 Sigma 公司; 白细胞介素 (IL)-4 (批号 CK15)、cDNA 逆转录试剂盒 (批号 E047) 购自苏州近岸蛋白公司; CCK-8 细胞活性检测试剂盒 (批号 CK04) 购自同仁化学研究所; Trizol (批号 15596026CN) 购自 Thermo 公司; SYBR Green Supermix (批号 1725121) 购自 Bio-Rad 公司; 小鼠肿瘤坏死因子 (TNF)- α (批号 430904)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 431304)、小鼠 CD80 (批号 104705)、CD86 (批号 105027)、CD206 (批号 141705) 流式抗体购自 BioLegend 公司; 小鼠核因子- κ B (NF- κ B) p65 抗体 (批号 ab16502) 购自 Abcam 公司; 小鼠磷酸化 p65 抗体 (批号 3033) 购自 CST 公司; MagicOmics-MMB 微量/通用型蛋白质组试剂盒购自北京青莲百奥公司。

1.2 主要仪器

EnSpire® 多功能酶标仪 (Perkin Elmer 公司); ViiA 7 Real-time PCR 仪 (ABI 公司); FACSCalibur™ 流式细胞仪 (BD 公司); 5200Multi 化学发光成像仪 (天能公司); Q Exactive Plus 液质联用仪 (Thermo 公司); AX R 激光共聚焦显微镜 (尼康公司)。

1.3 实验动物及细胞

SPF 级 ICR (CD-1) 小鼠 9 只, 体质量 18~22 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0011, 动物饲养于自然采光、每 12 小时明暗交替、温度 21~23 °C、湿度 48%~68% 环境中, 动物实验经中国科学院中药研究所动物伦理委员会批准, 批准文号为 2021B198。小鼠小胶质细胞系 (BV2) 由中国中医科学院提供。

2 方法

2.1 动物分组及给药

实验设对照组[磷酸缓冲液(PBS)]和 STE 低、高剂量(10、15 g·kg⁻¹)组,《中国药典》2020 年版中山豆根的临床用量为 3~6 g, 10、15 g·kg⁻¹ 相当于临床剂量的 200、300 倍,即等效剂量的 20、30 倍。小鼠 ig 给药,连续给药 14 d 后处死,分离中脑皮层,保存于-80 ℃。

2.2 Label-free 定量质谱分析脑蛋白表达^[8]

取小鼠中脑组织称质量,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液匀浆。收集匀浆液,12 000×g 离心 20 min 后收集上清。采用 BCA 法检测蛋白浓度,使用蛋白质组学试剂盒对样品进行前处理。前处理后的冻干样品加入 0.1%三氟乙酸(TFA)复融,肽段采用 nano 高效液相色谱(HPLC)系统,串联 Thermo Orbitrap QE Plus 质谱仪进行分析,采用 C₁₈ 色谱柱(15 cm×75 μm)分离,体积流量为 0.3 μL·min⁻¹,流动相 A 为 0.1%甲酸,流动相 B 为 80%乙腈水(含 0.08%甲酸)。使用 Xcalibur3.0 软件收集数据。使用 PD2.4 软件分析, R Studio 进行主成分分析(PCA),并计算蛋白的表达差异。

2.3 蛋白质组学分析

以 $P < 0.05$ 和 $|\log_2 FC| \geq 1$ (FC 表示倍数变化, fold change) 为标准筛选差异表达蛋白。使用 Metascape 基因功能分析数据库(<https://www.metascape.org>)^[9]进行基因本体(GO)富集分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路分析。使用微生信平台 <https://www.bioinformatics.com.cn/> 进行可视化分析作图^[10]。

2.4 细胞培养

BV2 细胞采用含 10%血清、1%青-链霉素的 DMEM 培养基,于 5% CO₂、37 ℃ 恒温培养箱中培养,在细胞汇合度为 80% 时进行传代等操作。

2.5 CCK-8 细胞活性检测

将 BV2 细胞以每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,分别加入 0、50、100、200、400、600、800、1 000 μg·mL⁻¹ STE 溶液。培养 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,孵育 2 h,并设置不含细胞加入 CCK8 与培养基的空白组,酶标仪 450 nm 处检测吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.6 流式细胞术检测细胞表面 CD80、CD86 和 CD206 表达

将 BV2 细胞以每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板中,培养 24 h 后加入低、中、高质量浓度的 STE (200、400、800 μg·mL⁻¹),对照组不加药。药物处理 12 h 后,收集细胞,加入 TruStain FcXTM (anti-mouse CD16/32) 封闭抗体孵育 10 min 后,分别加入 anti-mouse CD86、CD80 和 CD206 流式抗体避光孵育 30 min。采用 Canto II 流式细胞仪检测,FlowJo v10 软件分析细胞表面的蛋白表达。

2.7 ELISA 检测炎性细胞因子释放

将 BV2 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 24 孔板中,培养 24 h 后加入低、中、高质量浓度的 STE (200、400、800 μg·mL⁻¹),对照组不加药,并设置 500 ng·mL⁻¹ LPS 组、20 ng·mL⁻¹ IL-4 组作为阳性药组。药物处理 48 h 后收集上清,采用 ELISA 试剂盒检测培养上清中 TNF-α 和 IL-6 水平。

2.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测炎症因子基因表达

将 BV2 细胞以每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板中,培养 24 h 后加药,组别设置同“2.7”项。药物处理 12 h 后,加入 Trizol 提取总 RNA 并逆转录合成 cDNA, SYBR Green 法检测 TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-4、p65 基因表达,通过计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量 mRNA 表达水平,引物由擎科生物公司合成(表 1)。

2.9 Western blotting 检测 NF-κB p65 蛋白的表达和活化

将 BV2 细胞以每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板中,培养 24 h 后加药,组别设置同“2.7”项。药物处理

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequence

引物	序列 (5'→3')
GADPH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
IL-1β	F: GCCACCTTTTGACAGTGATGAG
	R: GACAGCCCAGGTCAAAGGTT
IL-4	F: CTCACAGCAACGAAGAACACC
	R: CTGCAGCTCCATGAGAACACT
IL-6	F: GACAAAGCCAGAGTCCTTCAGA
	R: TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG
TNF-α	F: GATCGGTCCCCAAAGGGATG
	R: CCACTTGGTGGTTTGTGAGTG
p65	F: AGGCTTCTGGGCCTTATGTG
	R: TGCTTCTCTCGCCAGGAATAC

12 h 后, 采用含蛋白酶、磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白并 95 °C 加热变性。使用 BCA 法检测蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 法电泳分离蛋白, 并将蛋白湿转至 PDVF 膜。分别加入 p65 (1:1 000)、p-p65 (1:1 000)、GAPDH (1:100 000) 抗体于 4 °C 孵育过夜, HRP 标记二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h。ECL 化学发光法于凝胶成像仪成像, 使用 Image J 进行图像处理及灰度分析, 计算目的蛋白的相对表达量。

2.10 免疫荧光染色检测 NF- κ B p65 蛋白的核易位

将 BV2 细胞以每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后加药, 组别设置同“2.6”项。药物处理 12 h 后, 使用 4% 多聚甲醛固定细胞。加入含 0.3% triton X-100 通透液孵育 15 min, 加入羊血清封闭 30 min。加入 p65 (1:500) 抗体于 4 °C 孵育过夜, 使用 Dylight 488 标记二抗 (1:200) 孵育 1 h, 加入 DAPI 染液复染细胞核 10 min 后,

使用激光共聚焦显微镜观察细胞形态并采集图像。

2.11 统计分析

数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 9 软件单因素方差分析 (one-way ANOVA) 来进行组间比较。

3 结果

3.1 STE 对小鼠脑蛋白表达的影响

采用 2 个神经毒性剂量的 STE (10、15 g·kg⁻¹) 分别对小鼠 ig 给药 14 d, 分离小鼠中脑皮层, 采用 Label-free 法质谱定量检测小鼠脑组织蛋白表达, 并以 log₂FC 绝对值 > 1 且 $P < 0.05$ 筛选差异表达蛋白。结果显示 (图 1), 与对照组相比, 10 g·kg⁻¹ STE 诱导了 109 个差异表达蛋白, 其中表达上调蛋白 17 个, 表达下调蛋白 92 个。15 g·kg⁻¹ STE 诱导了 52 个差异表达蛋白, 其中表达上调蛋白 14 个, 表达下调蛋白 38 个。2 组表达差异蛋白进行交集分析, 发现 2 组共同表达的差异表达蛋白 20 个。

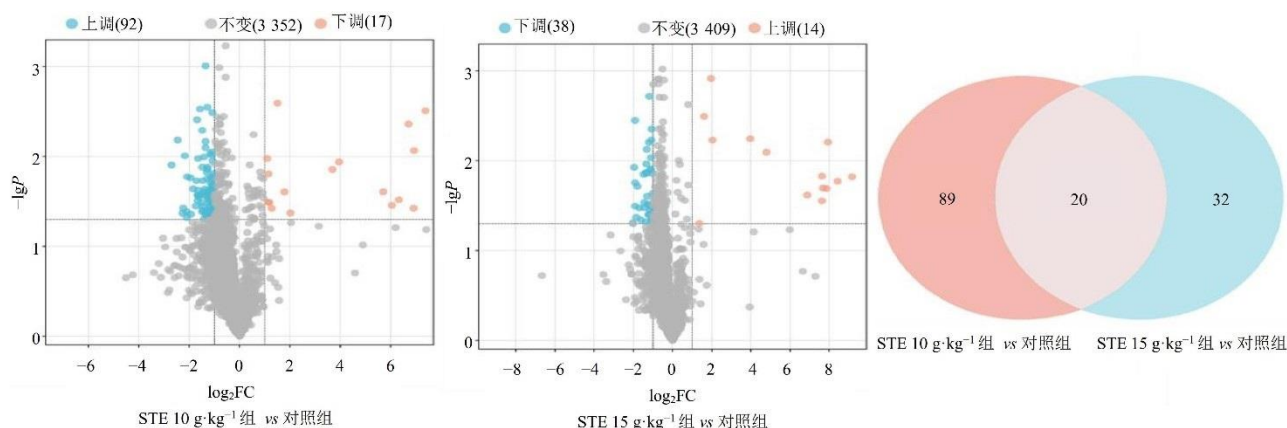


图 1 STE 对小鼠中脑组织蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of STE on expression of tissue protein in midbrain of mice

3.2 小鼠脑差异表达蛋白的功能富集分析

对 STE 组的差异表达蛋白进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析。GO 富集分析结果显示 (图 2), 10 g·kg⁻¹ STE 主要影响了化学突触信号转导和细胞增殖、损伤、自噬和炎症调控等生物学过程, 15 g·kg⁻¹ STE 主要影响了化学突触信号转导、突触可塑性和抗感染免疫等生物学过程, 2 个剂量的 STE 均参与了化学突触信号传递和细胞因子调控。KEGG 通路分析结果显示 (图 3), 10 g·kg⁻¹ STE 主要影响了多巴胺能突触、胆碱能突触、神经退行性疾病通路和抗感染免疫、炎症介质调控瞬时受体电

位 (TRP) 通道等炎症反应相关通路, 15 g·kg⁻¹ STE 主要影响了神经退行性疾病、神经内分泌通路及抗感染免疫、趋化因子相关信号通路。对 2 组 STE 组共同表达的差异表达蛋白进行 GO 功能富集 (图 4-A) 和 KEGG 通路 (图 4-B) 分析, 结果显示 STE 影响了化学突触传递和吞噬等生物学过程, 参与神经内分泌信号转导、氨基酸代谢、抗感染免疫和趋化因子信号等通路。结果提示, STE 除影响神经递质和神经内分泌, 还参与细胞因子调控、抗感染免疫、吞噬等免疫反应, 免疫通路的异常活化可能是其诱导神经毒性的作用机制之一。

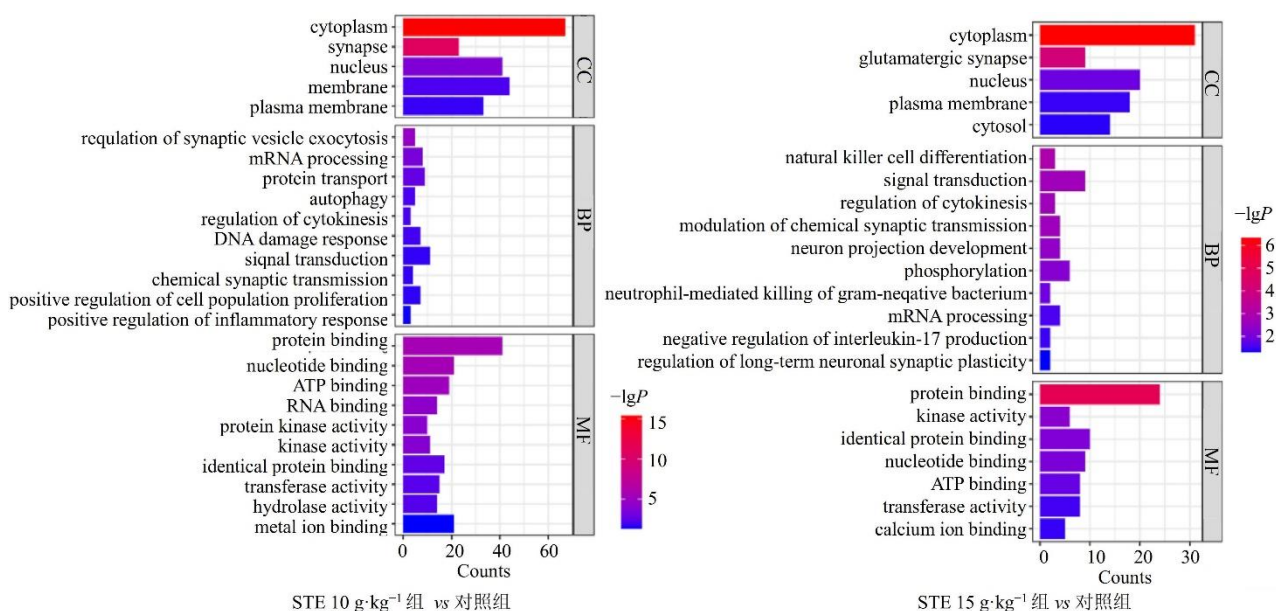


图 2 STE 10、15 g·kg⁻¹ 组差异表达蛋白 GO 功能富集分析

Fig. 2 GO enrichment analysis of differentially expressed protein after STE treatment at concentration of 10, and 15 g·kg⁻¹

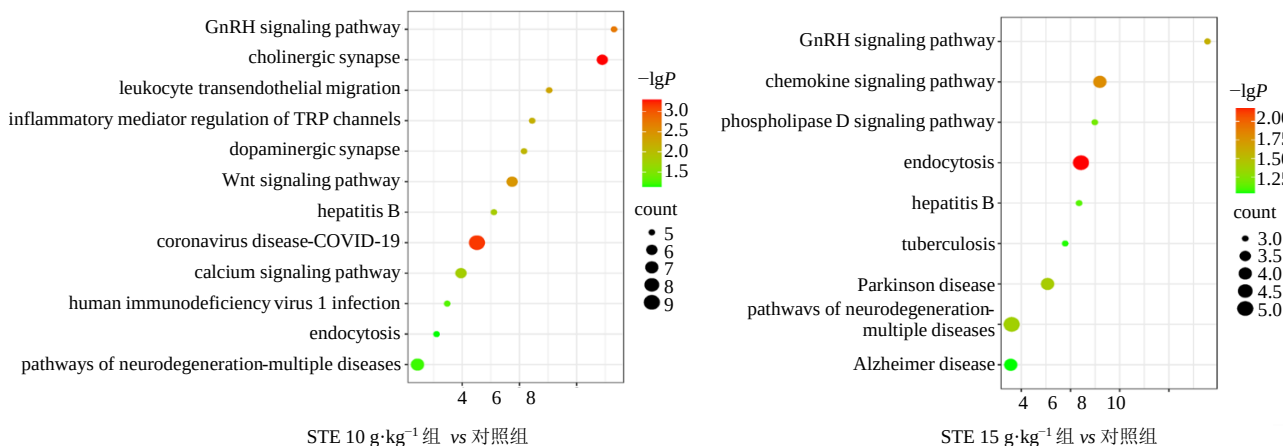


图 3 STE 10、15 g·kg⁻¹ 组差异表达蛋白 KEGG 通路富集分析

Fig. 3 KEGG pathway analysis of differentially expressed protein after STE treatment at concentration of 10, and 15 g·kg⁻¹

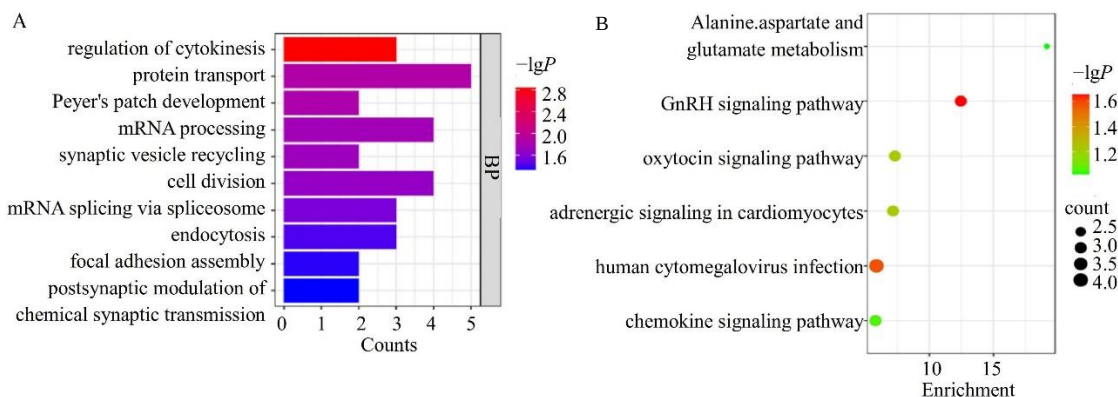


图 4 STE 组共同差异表达蛋白的 GO 功能富集 (A) 和 KEGG 通路分析 (B)

Fig. 4 GO enrichment (A) and KEGG pathway (B) analysis of shared differentially expressed protein in STE groups

3.3 STE 对 BV2 细胞活性和表型极化的影响

如图 5 所示,采用 CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测 STE 对 BV2 细胞活性的影响,显示 STE 在 50~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对 BV2 细胞无明显细胞毒性作用。采用流式细胞仪检测 BV2 细胞表面 CD80、

CD86 和 CD206 表达,与对照组比较,中、高质量浓度的 STE (400、800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 显著上调 CD80 和 CD86 表达 ($P<0.01$ 、 0.001),但对 CD206 表达无明显影响。结果提示,高质量浓度的 STE 诱导 BV2 细胞向 M1 促炎性表型的极化。

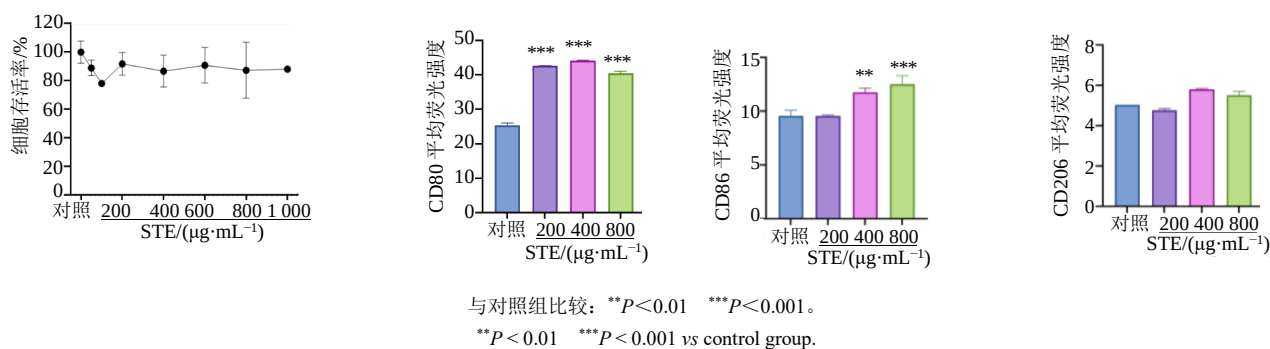


图 5 STE 对 BV2 细胞活性和表面分子 CD80、CD86、CD206 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of STE on cell viability and surface expression of CD80, CD86 and CD206 of BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 STE 对 BV2 细胞炎症因子表达的影响及机制

ELISA 实验结果显示 (图 6),与对照组相比,高质量浓度的 STE 显著促进 TNF- α 和 IL-6 的分泌 ($P<0.001$),低质量浓度的 STE 显著抑制 TNF- α 和 IL-6 的分泌 ($P<0.01$ 、 0.001)。qRT-PCR 检测结果 (图 7) 发现,中、高质量浓度的 STE 显著

促进了 IL-6、TNF- α 、和 IL-1 β 基因的表达 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),对 IL-4 基因表达作用不显著。结果提示,高浓度 STE 与低浓度 STE 对 BV2 细胞的炎症因子释放呈现相反的作用趋势,高浓度 STE 显著促进 TNF- α 、IL-6 等炎症细胞因子的表达和释放。

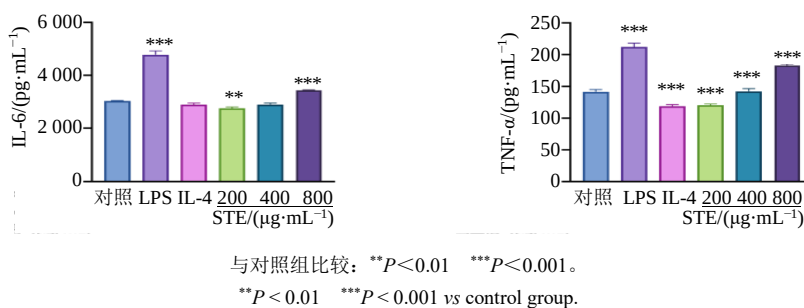


图 6 STE 对 BV2 细胞 IL-6 和 TNF- α 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effects of STE on release of IL-6 and TNF- α of BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

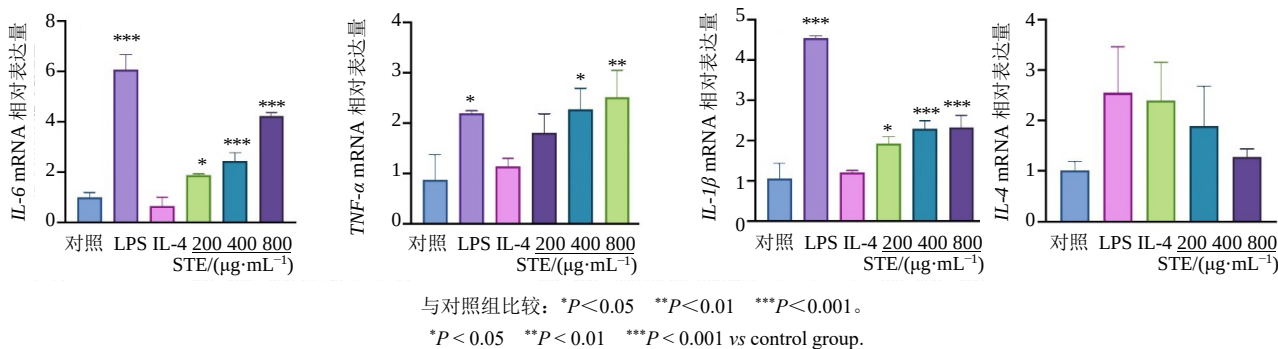


图 7 STE 对 BV2 细胞 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-4 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effects of STE on gene expression of IL-6, TNF- α , IL-1 β , and IL-4 of BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

为探究 STE 对 BV2 细胞炎症反应通路的影响, 采用 qRT-PCR (图 8-A)、Western blotting (图 8-B) 和免疫荧光染色 (图 8-C) 检测 STE 对 NF- κ B 通路 p65 基因表达、磷酸化和核易位的影响。结果显示,

与对照组相比, 高质量浓度 STE 对 p65 蛋白的磷酸化和核易位有一定的促进作用, 但无显著性差异, 提示 NF- κ B 经典活化通路不是高浓度 STE 促炎作用的主要机制。

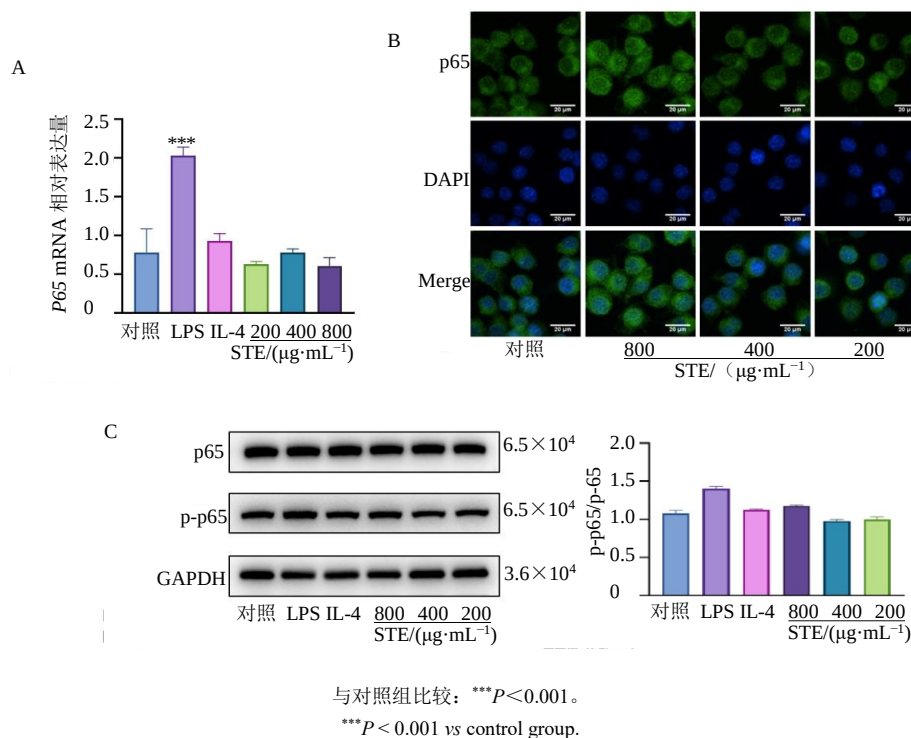


图 8 STE 对 BV2 细胞 p65 基因表达 (A)、核易位 (B) 和蛋白磷酸化 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effects of STE on gene expression (A), nuclear translocation (B) and protein phosphorylation (C) of NF- κ B p65 of BV2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

山豆根于临床上主要用于治疗咽喉肿痛、咽干,《中国药典》2020 年版推荐山豆根每日用量为 3~6 g^[11]。临床过量使用山豆根,即一般用药量在 10 g 以上时,会出现头晕头痛,肢体震颤、昏迷、意识模糊等症状,可能导致小脑、脑干、基底节区、脑叶发生病变^[2, 12],儿童服用山豆根 60 g 后出现死亡现象^[13]。研究发现山豆根对神经系统造成的损伤主要集中在基底神经节和小脑区域,可导致纹状体、海马及中脑处神经元细胞数量减少^[14],大脑基底神经节坏死和小脑白质脱髓鞘等^[15]。目前研究认为苦参碱类生物碱是其主要毒性成分,包括苦参碱、槐定碱、槐果碱等^[16]。苦参碱类生物碱的神经毒性可能与抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性有关^[17],AChE 的抑制导致神经-肌肉突触处乙酰胆碱增多,最终导致活动减少和麻痹^[18]。还有研究显示苦参碱损害小鼠的平衡协调能力^[19],诱导神经细胞退

变和小胶质细胞活化^[20]。除生物碱外,山豆根还包含黄酮、三萜、多糖等多种成分,有研究发现山豆根中黄酮类成分也可能具有神经毒性作用,可导致斑马鱼行为异常,躯干弯曲^[21]。因此,山豆根成分复杂,毒性成分和毒理机制尚未阐明。本研究采用小鼠脑蛋白质组学分析和小鼠小胶质细胞 BV2 实验探讨了山豆根诱导神经炎症作用及机制,为解析山豆根的神经毒理机制提供实验依据。

目前关于山豆根对小鼠和大鼠神经毒性剂量的研究相对较少。研究表明山豆根大于 3 g 时出现神经毒性,可导致小鼠出现震颤幅度增大等症状^[22-23],导致 SD 大鼠出现全身肌张力障碍,大脑纹状体神经元显著减少等症状^[24]。本实验在预试验中采用小鼠 ig STE,采用单次或多次给药 14 d 评价山豆根的急性毒性和亚急性毒性,以震颤、小鼠爬杆、自主活动等指标评价了山豆根的神经毒性,采用神经毒性剂量的 STE 对小鼠进行给药后发现小鼠中

脑皮层蛋白中多个蛋白表达发生显著性变化。GO 功能富集和 KEGG 通路分析结果显示,STE 显著的参与多种化学性突触信号传递过程,并影响了突触可塑性,该发现与以往文献研究结果一致^[25]。此外,结果还发现 STE 还参与了多个细胞自噬、凋亡和损伤修复通路。有研究显示苦参碱可诱导 PC12 细胞活性氧过量积累和线粒体膜电位降低,活化活性氧介导的线粒体凋亡途径^[26],该结果证实 STE 可诱导神经元细胞的损伤和死亡。更为重要的是,实验结果发现 2 个剂量的 STE 均显著影响了一系列细胞因子调节、趋化因子调节、炎症调节和抗感染免疫等炎症免疫反应,表明高剂量的山豆根可能通过调控中枢神经系统的神经炎症反应,诱导神经元损伤,导致神经毒性的副反应。

小胶质细胞是诱导脑神经炎症的主要细胞。作为中枢神经系统的先天免疫细胞,稳态的小胶质细胞在维持神经内环境稳定、突触修剪和免疫监视中发挥重要作用^[27]。研究显示,感染、毒性刺激、应激压力等可活化小胶质细胞,激活 NLRP3 炎症小体^[28-29]、TLR4/PI3K/AKT^[30]等多条信号通路,并诱导其向 M1 表型极化^[31]。小胶质细胞向 M1 型极化会诱导大量促炎细胞因子的产生,如 IL、TNF、趋化因子、活性氧分子等^[31]。大量炎性因子的释放可导致神经元细胞损伤、凋亡和神经功能障碍,引起神经毒性^[32]。本研究发现高浓度的 STE 促进小胶质细胞向 M1 型表型的极化,诱导炎性因子如 TNF- α 、IL-6 等表达和分泌增加,与低浓度 STE 的作用趋势相反。以往研究发现山豆根具有良好的抗炎作用^[3],因此结果提示山豆根的过量使用可能使其由抗炎作用转变为促炎作用,对小胶质细胞的诱导活化作用可能是其神经毒性的机制之一。此外,有研究显示山豆根多糖提取物可通过 NF- κ B 和 NOD 样受体信号通路调节机体的炎症反应^[33],本研究对 NF- κ B p65 的活化检测发现高质量浓度 STE 的促炎作用并不完全依赖 NF- κ B 经典活化通路,提示还有其他炎症信号通路的参与。

本研究发现高质量浓度的 STE 可诱导神经炎症反应,可能是其神经毒性的机制之一。STE 诱导神经炎症与其活化小胶质细胞诱导其 M1 型分化,促使促炎细胞因子表达分泌有关。本研究为解析 STE 的神经毒理作用提供了实验依据,其诱导炎症的通路机制还有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王莉萍,张泽安. 山豆根的毒性病理学研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(6): 80-82.
Wang L P, Zhang Z A. Research progress on toxicologic pathology of *Radix et Rhizoma Sophorae tonkinensis* [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2015, 29(6): 80-82.
- [2] 杨雪,夏东胜,高建超,等. 578 例山豆根不良反应文献分析 [J]. 中国药物警戒, 2017, 14(4): 235-241.
Yang X, Xia D S, Gao J C, et al. Literature analysis of 578 cases of adverse drug reactions induced by *Sophora tonkinensis* gagnep [J]. Chin J Pharmacovigil, 2017, 14(4): 235-241.
- [3] 李曦,高健美,龚其海. 山豆根药理作用及毒性研究进展 [J]. 世界中医药, 2022, 17(5): 743-747, 752.
Li X, Gao J M, Gong Q H. Advances in pharmacological effects and toxicity of *Subprostrate Sophorais* [J]. World Chin Med, 2022, 17(5): 743-747, 752.
- [4] 周思雨,陈金鹏,刘志东,等. 山豆根的化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1510-1521.
Zhou S Y, Chen J P, Liu Z D, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(5): 1510-1521.
- [5] 王兴远,张维明. 群体性急性山豆根中毒的救治体会(附 56 例报告) [J]. 华西医学, 2009, 24(8): 2036-2038.
Wang X Y, Zhang W M. An experience of cure of A cluster of acute *Subprostrate Sophora* root toxication(reports of 56 cases) [J]. West China Med J, 2009, 24(8): 2036-2038.
- [6] Zhang W F, Xiao D, Mao Q W, et al. Role of neuroinflammation in neurodegeneration development [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 267.
- [7] 刘畅,俸婷婷,刘雄伟,等. 基于网络药理学的山豆根神经毒性机制探讨 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(8): 1165-1173.
Liu C, Feng T T, Liu X W, et al. Study on mechanism of nerve toxicity of *Sophora tonkinensis* Gagnep. based on network pharmacology [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(8): 1165-1173.
- [8] Scheltema R A, Hauschild J P, Lange O, et al. The Q Exactive HF, a Benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field Orbitrap analyzer [J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(12): 3698-3708.

- [9] Zhou Y Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523.
- [10] Tang D D, Chen M J, Huang X H, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing [J]. PLoS One, 2023, 18(11): e0294236.
- [11] 段媛媛. 山豆根化学成分分析及苦参碱致肝损伤作用机制研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2023.
Duan Y Y. Analysis of chemical constituents of *Sophora Tonkinensis* and study on the mechanism of matrine-induced liver injury [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2023.
- [12] 朱建建, 张显军, 马霄. 山豆根中毒性脑病头颅影像特征 [J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2024, 22(2): 45-48.
Zhu J J, Zhang X J, Ma X. Cranial imaging characteristics of toxic encephalopathy caused by *Sophora Tonkinensis* gagnep. [J]. Chin J CT MRI, 2024, 22(2): 45-48.
- [13] 贾庚辽. 服山豆根引起肺水肿导致死亡一例报告 [J]. 河南中医, 1987, 7(5): 32.
Jia G L. A case report of pulmonary edema and death caused by taking *Sophora Tonkinensis* [J]. Henan Tradit Chin Med, 1987, 7(5): 32.
- [14] 董伟, 常鹏飞, 左焕琼. 山豆根对大鼠神经行为的影响 [J]. 中华神经医学杂志, 2010, 9(10): 1027-1032.
Dong W, Chang P F, Zuo H C. Effects of *Sophora tonkinensis* Gagnep. on neurobehavioral function in rats [J]. Chin J Neuromed, 2010, 9(10): 1027-1032.
- [15] 刘甜甜, 张彦丽, 马丽娜, 等. 山豆根不合理使用致中枢神经毒性的研究进展 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22(9): 1149-1152.
Liu T T, Zhang Y L, Ma L N, et al. Progress of neurotoxicity induced by irrational use of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2022, 22(9): 1149-1152.
- [16] 田雪松. 山豆根中生物碱的毒性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 230-234.
Tian X S. Research progress on toxicity of alkaloids in *Sophorae tonkinensis Radix et Rhizoma* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(6): 230-234.
- [17] Lu Z G, Li M H, Wang J S, et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae [J]. Reprod Toxicol, 2014, 47: 33-41.
- [18] Behra M, Cousin X, Bertrand C, et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo [J]. Nat Neurosci, 2002, 5(2): 111-118.
- [19] 梁培, 袁堂娟, 谷丽丽, 等. 苦参及苦参碱对小鼠肝脏和神经行为学的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(12): 1444-1448.
- [20] 王晓燕, 梁磊, 常建兰, 等. 苦参碱对小鼠的毒性研究 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(9): 2154-2155.
Wang X Y, Liang L, Chang J L, et al. Toxicity of matrine in Kunming mice [J]. J South Med Univ, 2010, 30(9): 2154-2155.
- [21] Yuan W L, Huang Z R, Xiao S J, et al. Systematic analysis of chemical profiles of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* in vitro and in vivo using UPLC-Q-TOF-MSE [J]. Biomed Chromatogr, 2022, 36(6): e5357.
- [22] 谷建俐. 山豆根毒效规律及靶器官毒性机制研究 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2010.
Gu J L. Study on toxic effect law and target organ toxicity mechanism of *Sophora Tonkinensis* [D]. Luzhou: Luzhou Medical College, 2010.
- [23] 赵青. 山豆根安全性评价和降脂活性的研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
Zhao Q. Study on safety evaluation and lipid-lowering activity of *Sophora Tonkinensis* [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [24] 常鹏飞, 董伟, 左焕琼. 山豆根中毒致全身肌张力障碍的临床和实验证据: 新的肌张力障碍模型 [J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2010, 23(5): 278-283.
Chang P F, Dong W, Zuo H C. Experimental and clinical evidence of dystonia caused by toxicosis of *Radix sophorae tonkinensis*: A new model of dystonia [J]. Chin J Stereotact Funct Neurosurg, 2010, 23(5): 278-283.
- [25] 张帅男, 李红美, 李煦照. 山豆根对小鼠大脑毒性作用的组学和生物信息学研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(3): 343-349.
Zhang S N, Li H M, Li X Z. Omics and bioinformatics studies of the brain toxicity of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* in mice [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2023, 40(3): 343-349.
- [26] 沈芳, 梁培, 陆红. 苦参碱对 PC12 细胞的毒性及线粒体损伤机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(9): 873-879.
Shen F, Liang P, Lu H. Cytotoxicity and mitochondrial injury mechanism of matrine on PC12 cells [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2017, 31(9): 873-879.
- [27] Salter M W, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease [J]. Nat Med, 2017, 23(9): 1018-1027.
- [28] Cheng J J, Zhang R, Xu Z R, et al. Early glycolytic

- reprogramming controls microglial inflammatory activation [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 129.
- [29] Yu H Y, Chang Q, Sun T, et al. Metabolic reprogramming and polarization of microglia in Parkinson's disease: Role of inflammasome and iron [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 90: 102032.
- [30] Chu E, Mychasiuk R, Hibbs M L, et al. Dysregulated phosphoinositide 3-kinase signaling in microglia: Shaping chronic neuroinflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 276.
- [31] Leng F D, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172.
- [32] Tylutka A, Walas Ł, Zembron-Lacny A. Level of IL-6, TNF, and IL-1 β and age-related diseases: A systematic review and meta-analysis [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1330386.
- [33] 柏晶晶, 周家芳, 贾妮娜, 等. 山豆根多糖对小鼠脾淋巴细胞炎性反应的调控机制 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2024, 43(8): 1379-1388.
- Bai J J, Zhou J F, Jia N N, et al. Regulatory mechanism of Sophora subprostrate polysaccharide on inflammatory response of murine spleen lymphocytes [J]. *Genom Appl Biol*, 2024, 43(8): 1379-1388.

[责任编辑 兰新新]