

血必净注射液对脂多糖诱导小胶质细胞炎症反应的抑制作用

阮倩倩¹, 张梦雅², 李萌萌¹, 刘颖¹, 谢玉文¹, 裴丽丽^{1*}

1. 南京医科大学 康达学院基础医学部, 江苏 连云港 222000

2. 北京五和博澳药业股份有限公司, 北京 102600

摘要: **目的** 研究血必净注射液(简称血必净)对脂多糖(LPS)诱导的BV2小胶质细胞炎症反应的抑制作用及机制。**方法** 不同体积分数(20、40、80、160 mL·L⁻¹)血必净培养BV2细胞7h, CCK-8法检测细胞活力;不同质量浓度(50、100、200 ng·mL⁻¹)LPS分别处理细胞不同时间(1.5、3.0、6.0、12.0、24.0 h), 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 的mRNA水平, Western blotting检测p-P65蛋白表达。探究血必净对LPS诱导BV2细胞炎症的影响, 将BV2细胞分为5组: 对照组、单给血必净(40 mL·L⁻¹)组、模型组和血必净20、40 mL·L⁻¹组, qRT-PCR法检测IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的mRNA水平, 酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定IL-6的分泌情况, Western blotting检测磷酸化核因子(NF)- κ B抑制因子 α (p-I κ B α)、p-P65蛋白表达, 流式细胞术检测细胞周期的变化。**结果** 与对照组比较, 20、40 mL·L⁻¹血必净对BV2细胞的存活率无影响, 但80、160 mL·L⁻¹血必净处理对BV2细胞的存活起到抑制作用($P < 0.05$ 、 0.01); 100 ng·mL⁻¹的LPS处理细胞6h使BV2细胞IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$), p-P65蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。与对照组比较, 模型组的IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$), IL-6分泌显著增加($P < 0.01$), P65和I κ B α 蛋白的磷酸化水平显著升高($P < 0.01$), G₀/G₁期明显延长($P < 0.01$); 与模型组比较, 血必净组的IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA表达水平显著降低($P < 0.01$), IL-6分泌显著减少($P < 0.01$), P65和I κ B α 蛋白的磷酸化水平显著降低($P < 0.01$), G₀~G₁期延长显著改善($P < 0.01$)。**结论** 血必净可能通过抑制炎症因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α 表达, 抑制NF- κ B通路, 恢复细胞原有周期规律, 从而发挥抑制LPS诱导的BV2小胶质细胞炎症的作用。

关键词: 血必净注射液; 脂多糖; 小胶质细胞; 神经系统; 炎症反应

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)10-2832-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.10.011

Study on inhibitory effect of Xuebijing Injection on LPS-induced microglial inflammatory response

RUAN Qianqian¹, ZHANG Mengya², LI Mengmeng¹, LIU Ying¹, XIE Yuwen¹, PEI Lili¹

1. Department of Basic Medicine, Kangda College, Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China

2. Beijing Wehand-Bio Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 102600, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect and mechanism of Xuebijing Injection (referred to as Xuebijing) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in BV2 microglial cells. **Methods** BV2 cells were cultured with different concentrations (20, 40, 80, 160 mL·L⁻¹) of Xuebijing for 7 h, and cell viability was detected by CCK-8 assay. BV2 cells were treated with different concentrations (50, 100, 200 ng·mL⁻¹) of LPS for different durations (1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 h), and the mRNA levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor (TNF)- α were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and the expression of p-P65 protein was detected by Western blotting. To explore the effect of Xuebijing on LPS-induced inflammation in BV2 cells, BV2 cells were divided into five groups: control group, Xuebijing alone (40 mL·L⁻¹) group, model group, and Xuebijing 20, 40 mL·L⁻¹ groups. The mRNA levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α were detected by qRT-PCR, the secretion of IL-6 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the expression of p-I κ B α and p-P65 proteins was detected by Western blotting, and

收稿日期: 2025-04-18

基金项目: 2024年南京医科大学科技发展基金项目(NMUB20240274); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(202413980026Y); 南京医科大学康达学院一流课程培育项目(KD2022YLKCHH001)

作者简介: 阮倩倩(1996—), 女, 硕士研究生, 助教, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。E-mail: 2580446639@qq.com

*通信作者: 裴丽丽(1987—), 女, 硕士研究生, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。E-mail: 754044082@qq.com

the changes in cell cycle were detected by flow cytometry. **Results** Compared with the control group, 20 and 40 mL·L⁻¹ Xuebijing had no effect on the survival of BV2 cells, but 80 and 160 mL·L⁻¹ Xuebijing treatment inhibited the survival of BV2 cells ($P < 0.05$, 0.01). LPS treatment at 100 ng·mL⁻¹ for 6 h significantly increased the mRNA expression levels of *IL-6*, *IL-1 β* , and *TNF- α* in BV2 cells ($P < 0.01$), and significantly increased the expression of p-P65 protein ($P < 0.01$). Compared with the control group, the mRNA expression levels of *IL-6*, *IL-1 β* , and *TNF- α* in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), the secretion of IL-6 was significantly increased ($P < 0.01$), the phosphorylation levels of P65 and I κ B α proteins were significantly increased ($P < 0.01$), and the G₀/G₁ phase was significantly prolonged ($P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA expression levels of *IL-6*, *IL-1 β* , and *TNF- α* in the Xuebijing groups were significantly decreased ($P < 0.01$), the secretion of IL-6 was significantly reduced ($P < 0.01$), the phosphorylation levels of P65 and I κ B α proteins were significantly decreased ($P < 0.01$), and the prolongation of the G₀/G₁ phase was significantly improved ($P < 0.01$). **Conclusion** Xuebijing may inhibit LPS-induced inflammation of BV2 microglia by inhibiting the expression of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α , inhibiting the NF- κ B pathway, and restoring the original cycle regularity of cells.

Key words: Xuebijing Injection; lipopolysaccharide; microglial cell; nervous system; inflammation

神经炎症是多种神经系统疾病的重要影响因素,如缺血性卒中、创伤性脑损伤和各种神经退行性疾病等^[1]。小胶质细胞是神经炎症的主要介导者,在调控神经炎症、神经发育、信号传递和免疫反应中担任重要角色^[2]。关于小胶质细胞介导神经炎症的分子机制一直是该领域的研究热点。小胶质细胞被激活后可分化成 2 种类型,在促炎反应中发挥作用的为 M1 型,在抗炎反应中发挥作用的为 M2 型,不同活化类型之间可相互转化^[3]。此外,炎症对细胞周期也产生一定影响,细胞周期紊乱会产生一系列的疾病^[4]。

血必净注射液(简称血必净)是由红花、赤芍、丹参、当归、川芎 5 味中药共同配伍的经典方剂,具有行气活血、清热凉血、解毒止痛的功效^[5]。血必净现已被临床广泛使用,研究发现其具有抗炎、调节免疫及改善微循环等作用^[6]。BV-2 细胞来源于小鼠脑组织,是具有小胶质细胞特性的永生细胞系,本研究将血必净作用于发生炎症反应的 BV-2 细胞,旨在研究其对神经系统炎症反应的影响及机制,为将其开发为神经炎症的预防和治疗药物提供参考。

1 材料

1.1 实验细胞

BV-2 细胞购自尚恩生物技术有限公司,货号 SNL-155。BV-2 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中,每 1~2 天换液或传代 1 次。

1.2 药物与主要试剂

血必净,天津红日药业股份有限公司(国药准

字 Z20040033,产品批号 2303011,每支 10 mL); CCK-8 试剂盒,日本同仁化学研究所; Trizol,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应预混液 ChamQ TM SYBR qPCR Master Mix 和逆转录试剂盒 HiScript III RT SuperMix for qPCR,南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Laemmli 样品缓冲液,美国 Bio-Rad 公司; BCA 蛋白定量试剂盒,北京普利莱基因技术有限公司; DMEM 和脂多糖(LPS),美国 Sigma-Adrich 公司; 胎牛血清,中国 ExCell Bio 公司; 兔抗小鼠磷酸化核因子(NF)- κ B 抑制因子 α (p-I κ B α) 单克隆抗体(2859S)、兔抗小鼠 p-P65 单克隆抗体(3033S)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(7076S)和山羊抗兔 IgG 抗体(7074S),美国 Cell Signaling Technology 公司; 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(货号 C1052)、碘化丙啶染色液(货号 C1052),上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

MULTISKAN GO 细胞培养箱和酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Mini-protean 电泳仪、Mini-protean 电转仪和 CFX96 荧光 qPCR 仪,美国 Bio-Rad 公司; UV5 超微量分光光度计,美国 METTLER TOLEDO 公司; FACSCelesta 流式细胞仪,美国 BDBiosciences 公司。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞活力

按照 1.5×10^5 个·mL⁻¹、每孔 0.1 mL 将 BV2 细胞接种于 96 孔板 24 h 后,分为对照组、血必净(20、40、80、160 mL·L⁻¹) 组^[7],每组 3 个复孔。血必净组加入含不同体积分数血必净的细胞培养基处

理 7 h。另设置空白组，只加入细胞培养基。随后，往每个孔中加入 10 μL 的 CCK-8 试剂，继续置于培养箱中孵育 1 h。酶标仪检测 450 nm 处吸光度 (A) 值，计算各组细胞存活率。

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

2.2 qRT-PCR 检测 BV2 细胞肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)- 1β 、 IL -6 的 mRNA 水平

将 BV2 细胞按照 1.5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板中，每孔 2 mL，24 h 后进行如下处理：50、100、200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 分别处理 BV2 细胞 1.5、3.0、6.0、12.0、24.0 h。

将 BV2 细胞分为 5 组：对照组、单给血必净

($40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、模型组和血必净 20、 $40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 组，血必净组加入不同体积分数的血必净预处理细胞 1 h，之后再加入 $100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 同时处理 6 h；单给血必净组仅加入血必净处理 7 h；模型组仅加入 $100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 处理 6 h。

将处理后的细胞用 Trizol 法提取细胞总 RNA，随后紫外分光光度计定量。取 1 μg 总 RNA，用逆转录试剂盒 HisScript III RT SuperMix for qPCR 进行 cDNA 合成反应，随后在荧光 qPCR 仪上进行反应。引物序列如表 1 所示，程序按照试剂盒提供的两步法进行：95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 共循环 40 次，实验重复 3 次。以 β -actin 为参照基因， $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
β -actin	GTGGGAATGGGTCAGAAGGA	CTTCTCCATGTCGTCCCAGT
TNF - α	TATGGCTCAGGGTCCAACCTC	CTCCCTTTGCAGAACTCAGG
IL - 1β	GGGCCTCAAAGGAAAGAATC	TACCAGTTGGGGAAGCTCTGC
IL -6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TCCACGATTCCCAGAGAAGC

2.3 ELISA 法检测细胞 IL-6 分泌水平

将 BV2 细胞分为 5 组：对照组、单给血必净 ($40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、模型组和血必净 20、 $40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 组，细胞接种及处理方式同“2.2”项。将处理后的细胞培养液收集起来，4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后收取上清至 EP 管中，根据试剂盒说明书检测 IL-6 浓度。

2.4 Western blotting 检测各组细胞 p-P65、p-IkBa 蛋白表达水平

将 BV2 细胞按照接种密度 1.5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 培养于 6 孔板中，每孔 2 mL，24 h 后进行如下处理：100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 分别处理 BV2 细胞 1.5、3.0、6.0、12.0、24.0 h。

将 BV2 细胞分为 5 组：对照组、单给血必净 ($40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、模型组和血必净 20、 $40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 组，细胞接种及处理方式同“2.2”项。

收取药物处理后的细胞，使用 Laemmli 样品缓冲液裂解后煮沸 10 min 使其变性；随后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取离心后的溶液上清，此即为全细胞裂解液，BCA 法蛋白定量。以上样量为 20 μg 进行 SDS-PAGE 电泳。采用 PVDF 膜湿转法转印蛋白，5%脱脂奶粉在室温封闭 1 h。TBST 洗涤 3 次，每次 10 min。加入抗 p-P65、p-IkBa、 β -

actin (一抗) (1 : 1 000 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h。继续 TBST 洗涤后，加入相应二抗 (1 : 2 000)，室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次后 ECL 显影。Image J 分析蛋白条带的灰度值。

2.5 流式细胞术检测细胞周期变化

将 BV2 细胞按照接种密度 2.0×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、每孔 2 mL 接种于 6 孔板，24 h 后分为 5 组：对照组、单给血必净 ($40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、模型组和血必净 20、 $40\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 组，细胞接种及处理方式同“2.2”项。(1) 收集 BV2 细胞培养液备用。胰酶消化细胞后，吹打贴壁细胞使其全部脱落，加到此前收集的细胞培养液中。1 000 $\times g$ 离心 3~5 min，吸除上清。加入 1 mL 冷的 PBS，重悬细胞，并转移至 1.5 mL 离心管。再次离心以沉淀细胞，吸除上清。(2) 细胞固定：往细胞中加入 1 mL 预冷的 70%乙醇，吹打混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h。再次离心沉淀细胞，吸除上清。加入 1 mL 预冷的 PBS，重悬细胞。继续离心沉淀细胞，吸除上清。(3) 配制碘化丙啶染色液：根据样品数量配制适量碘化丙啶染色液。(4) 染色：每管细胞样品中加入 0.5 mL 染色液，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 30 min。随后可以 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光存放。当日完成流式检测。(5) 流式检测和分析：用流式细胞仪在激发波

长 488 nm 处检测红色荧光，检测光散射情况。

2.6 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 8.0 分析，结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异采用单因素方差分析和 Dunnett *t* 检验。

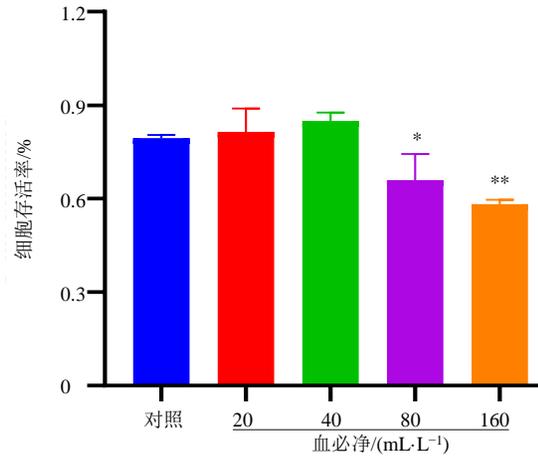
3 结果

3.1 不同浓度的血必净对 BV2 细胞存活率的影响

CCK-8 法检测不同体积分数的血必净处理 BV2 细胞后的存活率，结果如图 1 所示，与对照组相比，20、40 mL·L⁻¹ 的血必净处理均对 BV2 细胞的存活率无统计学意义上的影响，但 80、160 mL·L⁻¹ 的血必净却降低了细胞的存活率 ($P < 0.05, 0.01$)。结果提示，血必净体积分数过高反而会影响细胞的生长。因此，后续实验将血必净的体积分数定为 20、40 mL·L⁻¹。

3.2 LPS 处理 BV2 细胞对 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达的影响

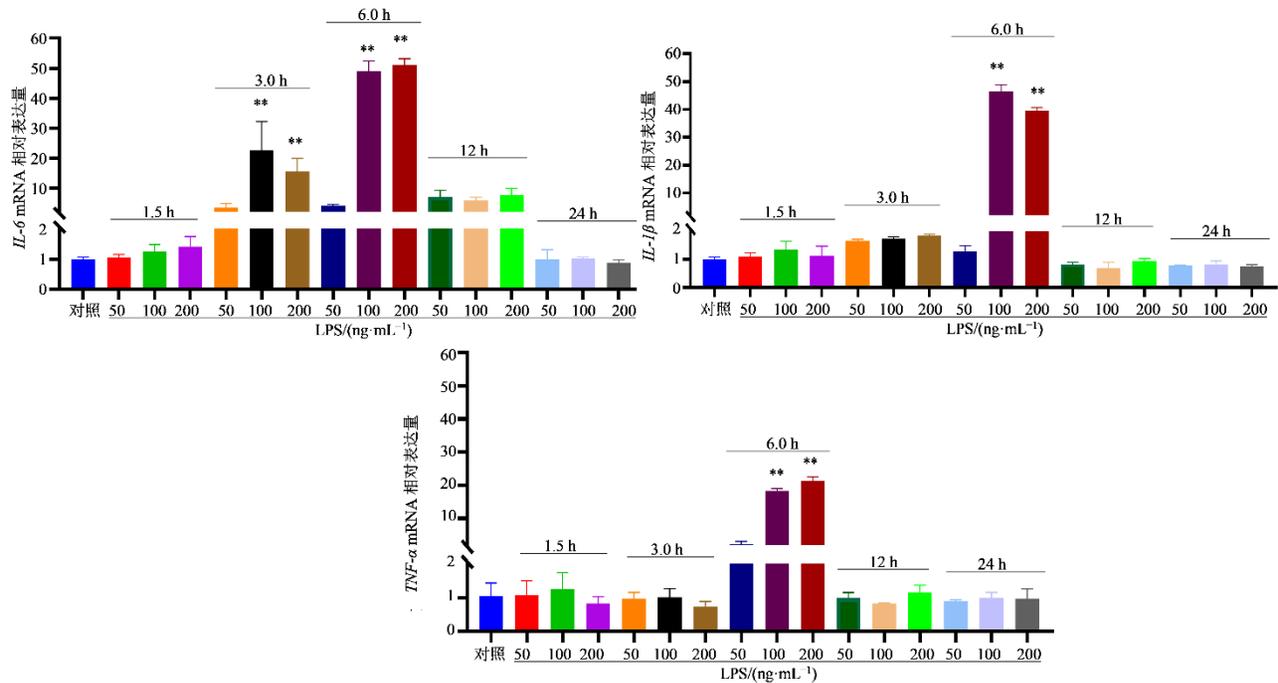
结果如图 2，与对照组相比，50 ng·mL⁻¹ 的



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 1 各组细胞存活率的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Changes in cell viability between groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group.

图 2 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Relative mRNA expression levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α ($\bar{x} \pm s, n=3$)

LPS 处理细胞不同时间后炎症因子均无明显变化；100 ng·mL⁻¹ 的 LPS 处理细胞 3 h 后 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平均有所上升，但仅 IL-6 具有统计学意义 ($P < 0.01$)；100 ng·mL⁻¹ 的 LPS 处理细胞 6 h 后 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 均具有统计学意

义的表达增加 ($P < 0.01$)；200 ng·mL⁻¹ 的 LPS 处理细胞后炎症因子的表达与 100 ng·mL⁻¹ 的 LPS 处理后类似。综合分析上述结果，采用 100 ng·mL⁻¹ 的 LPS 处理细胞 6 h 使 BV2 细胞炎症因子 mRNA 表达水平上升。

3.3 LPS 诱导 BV2 细胞不同时间对 p-P65 蛋白表达的影响

结果与图 2 相符, 如图 3 所示, 与对照组相比, 3 h 组 p-P65 蛋白有所增多, 但无统计学意义; 6 h

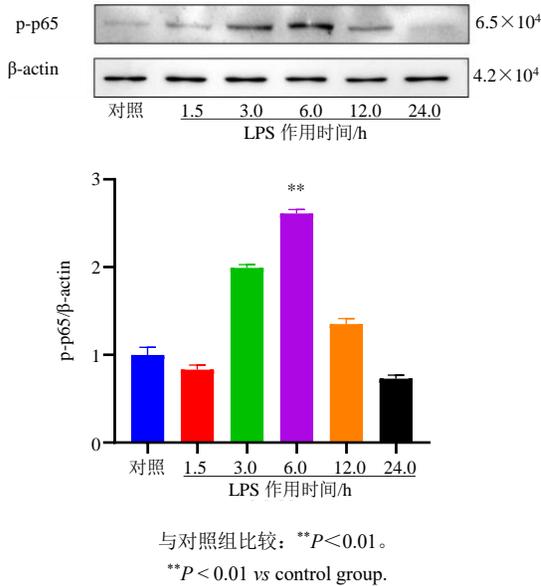


图 3 p-P65 蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Changes in p-P65 protein expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)

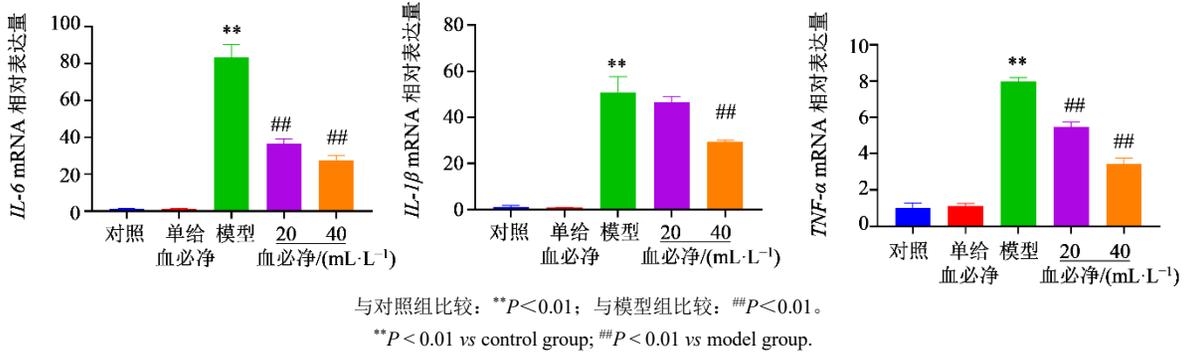


图 4 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Relative mRNA expression levels of IL-6, IL-1β, and TNF-α ($\bar{x} \pm s, n=3$)

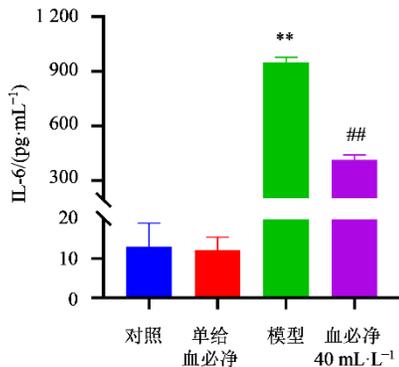


图 5 IL-6 的分泌水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 5 Secretion levels of IL-6 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 p-P65 蛋白表达显著增多 ($P < 0.01$)。相对于 6 h 组, 12 h 和 24 h 组的蛋白水平反而下降, 与对照组无统计学差异, 这可能是由于 LPS 引起的炎症是一个急性反应。综合以上结果以及图 2, 最终采用 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 处理细胞 6 h 的炎症细胞模型。

3.4 血必净对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 表达的影响

结果如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组的 IL-6、IL-1β 和 TNF-α mRNA 表达水平显著增高 ($P < 0.01$); 相对于模型组, 血必净 $20 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 组中 IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达均被抑制 ($P < 0.01$), 血必净 $40 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 组中 IL-6、IL-1β、TNF-α 的 mRNA 表达均被抑制 ($P < 0.01$)。后续实验采用血必净 $40 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 体积分数进行。

3.5 血必净对 LPS 诱导 BV2 细胞分泌炎症因子 IL-6 的影响

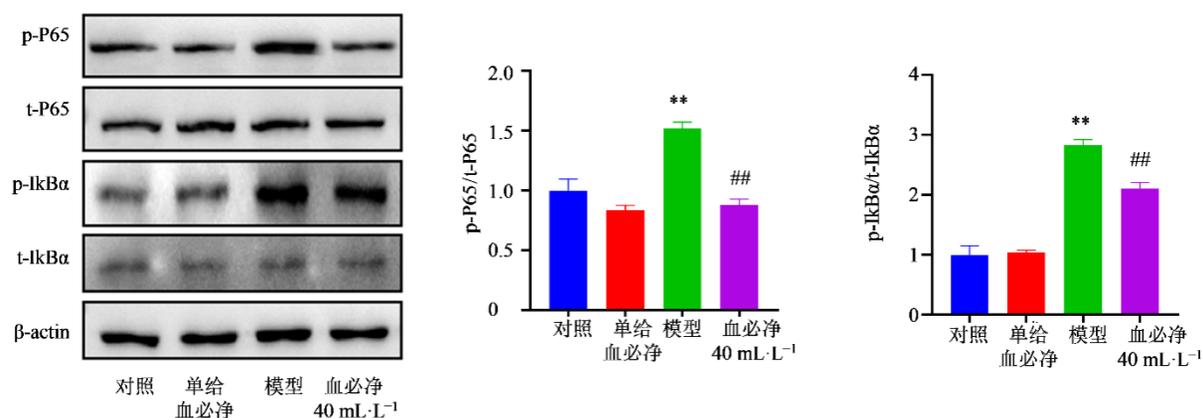
结果如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组细胞分泌 IL-6 显著升高 ($P < 0.01$); 而血必净组与模型组相比, 显著降低 IL-6 分泌水平 ($P < 0.01$)。

3.6 血必净对 LPS 诱导的 BV2 细胞 p-P65 和 p-IκBα 蛋白表达的影响

采用 Western blotting 检测蛋白 p-P65 和 p-IκBα 的表达, 图 6 结果显示, 与对照组相比, 模型组的 P65 和 IκBα 蛋白的磷酸化水平显著增高 ($P < 0.01$); 而血必净组与模型组相比, P65 和 IκBα 蛋白的磷酸化水平被抑制 ($P < 0.01$)。

3.7 血必净对 LPS 诱导 BV2 细胞周期的影响

流式细胞术图纵坐标为细胞计数, 横坐标为 PI 荧光强度。通过 PI 强度划定细胞各周期, 即可统计各周期的细胞数。假设 G₀/G₁ 期细胞的荧光强度为 1, 那么含有双份基因组 DNA 的 G₂/M 期细胞的荧



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 6 p-P65 和 p-IkBa 蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Changes in protein expression of p-P65 and p-IkBa ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

光强度的理论值为 2, 正在进行 DNA 复制的 S 期细胞的荧光强度为 1~2。凋亡细胞由于细胞核发生浓缩以及发生 DNA 片段化导致部分基因组 DNA 片段在染色过程中丢失, 因此凋亡细胞碘化丙啶染色后呈现明显的弱染, 即荧光强度小于 1。因此, 通过图 7 的流式细胞图可知各周期的细胞数以及各周期细胞占比, 结果显示, 与对照组相比, 模型组存在 G₁/S 期细胞周期阻滞, 表现为 G₀/G₁ 期明显延长 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 血必净高浓度组 G₀~G₁ 期延长有所改善 ($P < 0.01$), 血必净高浓度组可以解除 LPS 引起的细胞周期阻滞, 从而改善 LPS 引起的细胞炎症。

4 讨论

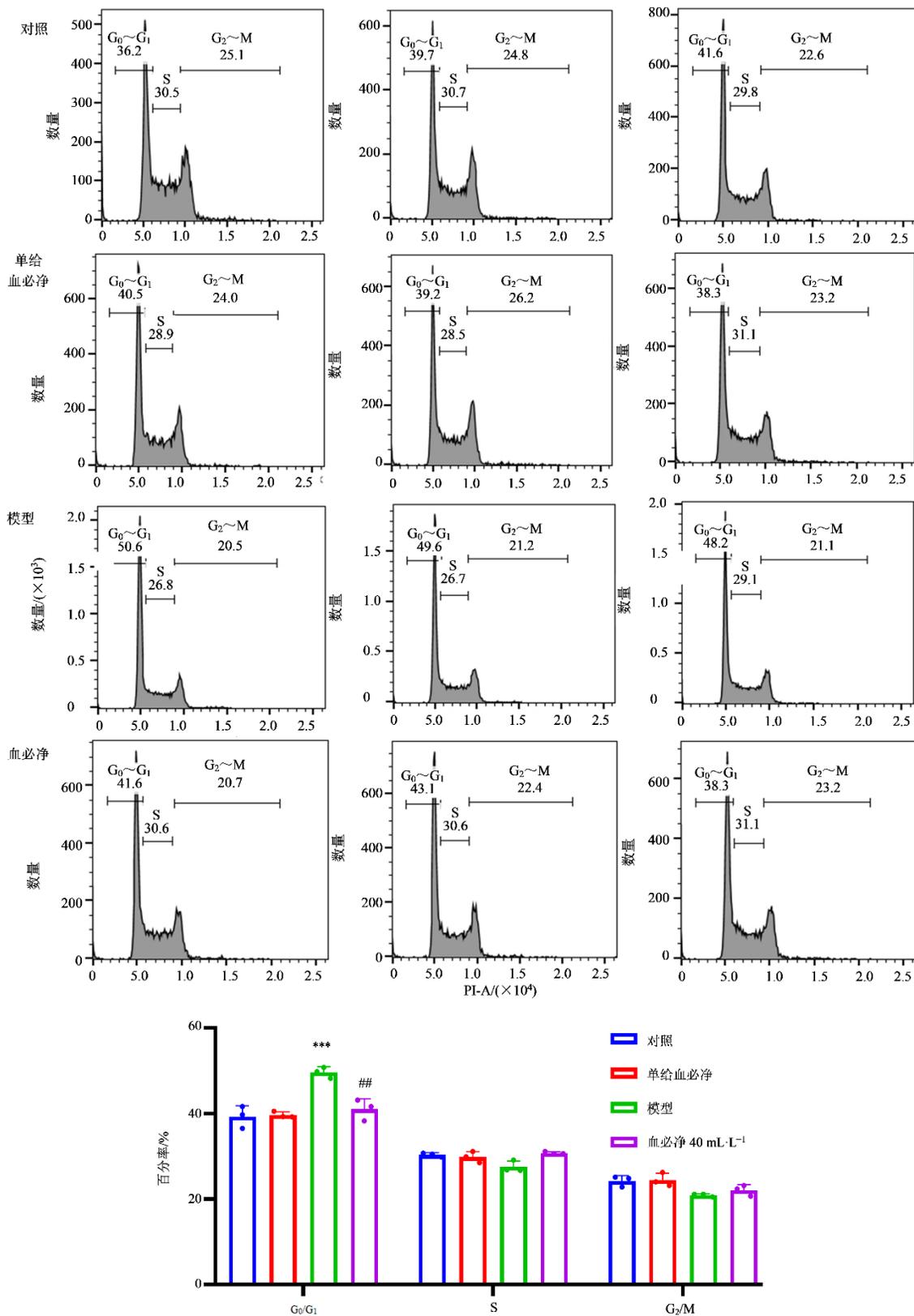
血必净由我国中西医结合急救医学创始人王今达教授从血府逐瘀汤化裁, 由红花、赤芍、川芎、丹参和当归等 5 味中药组成^[7], 于 2004 年在中国获批用于治疗脓毒症^[8-9]。目前已有文献报道, 血必净可以提升心肺复苏后大鼠的神经功能并可以提高生存率^[10], 其作用与 S-亚硝基谷胱甘肽还原酶的下调和 S-亚硝基谷胱甘肽的上调有关^[11]; 另有文献指出, 血必净可对急性胰腺炎起到治疗作用^[12]; 此外, 血必净可以对抗重症肺炎^[13], 联合抗生素可治疗肝硬化自发性细菌性腹膜炎^[14], 可减轻肾损伤^[15]。

小胶质细胞约占人体总细胞的 10%, 是中枢神经系统中含量最高的单核吞噬细胞^[16]。在发育过程中, 小胶质细胞通过调节突触传递的强度和塑造神经元突触来塑造神经回路^[17]。小胶质细胞作为大脑的巨噬细胞, 与其他组织中的巨噬细胞不同, 具有

独特的稳态表型和对中枢神经系统微环境的严格调节作用。它们负责消除可能对中枢神经系统有害的微生物、死细胞、冗余突触、蛋白质聚集体和其他颗粒^[18]。此外, 小胶质细胞是促炎细胞因子的主要来源, 因此是神经炎症的关键介质, 可以介导或者调节细胞炎症反应^[19]。小胶质细胞功能改变会影响大脑发育, 还与神经退行性病变有关^[20]。因此, 抑制小胶质细胞炎症反应对防治神经系统疾病具有重要意义。

IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 是 p-P65/P50 蛋白的下游靶基因, p-P65/P50 蛋白复合体转移入核可激活这些基因转录表达。LPS 是目前常用的炎症反应激活剂, 其与细胞膜上的 TLR4 结合后激活胞浆中的 IkB 激酶 (IKK) 复合体^[21]。IKK 复合体分别磷酸化激活下游 IkB α 和 P65/P50 蛋白, p-IkBa 经蛋白酶体通路降解后对 P65/P50 蛋白复合体的抑制效应被阻断^[22], 从而 P65/P50 蛋白复合体可以转移入核激活靶基因的表达。因此, 本研究对 LPS 诱导后的 p-P65 和 p-IkBa 蛋白进行了检测, 结果证明血必净预处理会抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞表达 p-P65 和 p-IkBa; 且 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的转录表达和分泌也均被抑制。因此, 本研究表明血必净抑制炎症反应涉及到 NF- κ B 通路, 关于其他可能的机制需进一步探索。

细胞周期由 5 个不同的阶段组成: G₀ (细胞休息阶段)、G₁ (细胞生长阶段)、S (DNA 合成) 阶段、G₂ (有丝分裂准备阶段) 和 M (有丝分裂阶段)^[23]。细胞周期的正常运转是维持人体稳态的



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 7 细胞周期变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Cell cycle changes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

重要前提条件。然而,许多炎症疾病表现出不正常的细胞周期调控。例如,白血病等恶性肿瘤常因为癌细胞细胞周期调控紊乱而引起^[24]。已有研究表明,炎症反应可导致细胞周期停滞和增殖慢化^[25]。因此,观察药物对炎症反应引起的细胞周期的影响具有重要意义。本研究发现 LPS 会使 BV2 细胞的细胞周期被抑制,而血必净可以显著减弱这种抑制作用。但后续仍需进一步探究血必净影响细胞周期的具体机制,比如检测细胞周期相关的 Cyclin D1、CDK4、p21、p53 蛋白,以观察涉及到的作用靶点和相关通路。

本研究证明血必净可以使 LPS 诱导的小胶质细胞炎症反应被抑制,改善因炎症反应引起的细胞周期紊乱现象,为探索血必净未来更多应用可能提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172.
- [2] Feldman RA. Microglia orchestrate neuroinflammation [J]. *ELife*, 2022, 11: e81890.
- [3] Wang C, Zong S, Cui X, et al. The effects of microglia-associated neuroinflammation on Alzheimer's disease [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1117172.
- [4] Budakoti M, Panwar A, Molpa D, et al. Micro-RNA: The darkhorse of cancer [J]. *Cell Signal*. 2021, 83: 109995.
- [5] 丁伟超, 陈娟, 叶英, 等. 血必净注射液治疗脓毒症相关急性呼吸窘迫综合征肺热血瘀证患者的临床疗效 [J]. *中草药*, 2024, 55(19): 6645-6654.
Ding W C, Chen J, Ye Y, et al. Clinical efficacy of Xuebijing Injection in treatment of sepsis-associated acute respiratory distress syndrome patients with lung heat and blood stasis syndrome [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(19): 6645-6654.
- [6] Kang X, Lu X, Bi C, et al. Xuebijing Injection protects sepsis induced myocardial injury by mediating TLR4/NF- κ B/IKK α and JAK2/STAT3 signaling pathways [J]. *Aging (Albany NY)*. 2023, 15(16): 8501-8517.
- [7] 陆莎莎, 王璐瑶, 张新宇, 等. 血必净注射液抑制肺泡巨噬细胞焦亡改善脓毒症诱导的小鼠急性肺损伤 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2023, 30(4): 418-423.
Lu S S, Wang L Y, Zhang X Y, et al. Xuebijing Injection alleviates sepsis-induced acute lung injury via inhibiting the pyroptosis of alveolar macrophage [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care*, 2023, 30(4): 418-423.
- [8] Teng Y, Sun F, Zhang W, et al. Research Progress on the mechanism of Xuebijing Injection in the treatment of acute pancreatitis [J]. *Chin J Int Tradit West Med Int Crit Care*, 2015, 22(6): 663-665.
- [9] Li C Y, Wang P, Zhang L, et al. Efficacy and safety of Xuebijing Injection (a Chinese patent) for sepsis: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 512-521.
- [10] Liao X L, Rello J. Efficacy of Xuebijing Injection for sepsis (EXIT-SEP): Lost in translation [J]. *Anaesth Crit Care Pain Med*, 2023, 42(4): 101257.
- [11] 刘八一, 谢昌联. 血必净注射液治疗心脏骤停心肺复苏后多器官功能障碍综合征临床观察 [J]. *中国中医急症*, 2016, 25(6): 1180-1182.
Liu B Y, Xie C L. Clinical research of Xuebijing on multiple organ dysfunction after cardiopulmonary resuscitation in cardiac arrest [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2016, 25(6): 1180-1182.
- [12] 黄德庆, 高玉广, 张元侃, 等. 血必净注射液对心脏骤停/心肺复苏后大鼠神经功能及生存情况的影响机制 [J]. *中国药房*, 2024, 35(6): 653-658.
Huang D Q, Gao Y G, Zhang Y K, et al. Mechanism of the effect of Xuebijing Injection on neurological function and survival of rats after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation [J]. *China Pharm*, 2024, 35(6): 653-658.
- [13] Chen H X, Bai Z H, Li H Y, et al. Efficacy of Xuebijing Injection for acute pancreatitis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6621368.
- [14] Zhang M, Zheng R, Liu W J, et al. Xuebijing Injection, a Chinese patent medicine, against severe pneumonia: Current research progress and future perspectives [J]. *J Integr Med*, 2023, 21(5): 413-422.
- [15] Han D, Wang R, Yu Y, et al. Xuebijing Injection combined with antibiotics for the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis: A Meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 2989846.
- [16] Liu J, Wang Z, Lin J, et al. Xuebijing injection in septic rats mitigates kidney injury, reduces cortical microcirculatory disorders, and suppresses activation of local inflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276: 114199.
- [17] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration [J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35: 441-468.

- [18] Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, et al. Microglia heterogeneity in the single-cell era [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(5): 1271-1281
- [19] Nayak D, Roth T L, McGavern D B. Microglia development and function [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 367-402.
- [20] Jia X, Gao Z, Hu H. Microglia in depression: Current perspectives [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(6): 911-925.
- [21] Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in TLR4 gene [J]. *Science*, 1998, 282: 2085-2088.
- [22] Gilmore T D. The Rel/NF- κ B/I κ B signal transduction pathway and cancer [J]. *Cancer Treat Res*, 2003, 115: 241-265.
- [23] Wang Z. Cell cycle progression and synchronization: An overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2579: 3-23.
- [24] Jamasbi E, Hamelian M, Hossain M A, et al. The cell cycle, cancer development and therapy [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(11): 10875-10883.
- [25] Chen C J, Chen J, Wang Y, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide inhibits HSC activation and liver fibrosis via targeting inflammation, apoptosis, cell cycle, and ECM-receptor interaction mediated by TGF- β /Smad signaling [J]. *Phytomedicine*, 2023, 110: 154626.

[责任编辑 兰新新]