脑心通胶囊“心脑同治”的免疫和炎症标志物研究

尚津锋[1]，焦家康[1]，路颖慧[1]，闫明雪[1]，王璟邑[1]，理扎·沙布尔江[1]，崔一然[2]，刘　欣[1*]

1. 北京中医药大学中药学院，北京　102488
2. 首都医科大学附属北京中医医院药学部，北京　100010

摘　要：目的　探讨脑心通胶囊“心脑同治”的免疫和炎症标志物。**方法**　采用结扎左前降支冠状动脉（left anterior descending coronary artery ligation，LAD）模型为心肌缺血模型，大脑中动脉阻塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型为脑缺血模型。雄性 SD 大鼠随机分为 8 组，包括用于心肌缺血研究的假手术组、LAD 模型组、脑心通（110 mg/kg）组和卡托普利（10.125 mg/kg）组，以及用于脑缺血研究的假手术组、MCAO 模型组、脑心通（220 mg/kg）组和银杏提取物（50 mg/kg）组，每组 15 只。药效学指标选择心电图、心肌酶谱、透射电镜等；生物信息学和蛋白质组学预测并筛选免疫炎症标志物；利用 qRT-PCR 和 Western blotting 验证关键备选标志物靶点的 mRNA 和蛋白相对表达量。**结果**　脑心通胶囊不仅降低 LAD 大鼠的心梗死率、心肌酶活性（$P<0.01$），改善心肌损伤，还能降低 LAD 大鼠的脑海马组织损伤和脑水肿（$P<0.05$）。对于 MCAO 大鼠，脑心通胶囊显著降低脑梗死率、神经功能评分和脑组织含水率（$P<0.05$、0.01），同时减轻心肌组织和细胞损伤，降低心肌酶活性（$P<0.01$）。根据生物信息学和蛋白质组学结果，Toll 受体信号通路的相关靶点是“心脑同治”的关键所在，有成为标志物的潜力。在心肌缺血和脑缺血 2 种状态下，α-干扰素（interferon-α，IFN-α）、Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4，TLR4）、TLR7、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）共 4 个靶点的 mRNA 和蛋白相对表达量显著变化（$P<0.05$、0.01），表明 LAD 大鼠和 MCAO 大鼠的海马中出现炎症因子风暴和免疫反应瀑布。**结论**　IFN-α、TLR4、TLR7、TNF-α 能够作为海马中“心脑互损”“心脑同治”的免疫和炎症标志物。

关键词：脑心通胶囊；海马；心脑同治；免疫和炎症；Toll 样受体相关蛋白；标志物

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)06 - 2013 - 14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.06.023

Immune and inflammation markers of simultaneous treatment of heart and brain in Naoxintong Capsules

SHANG Jinfeng[1], JIAO Jiakang[1], LU Yinghui[1], YAN Mingxue[1], WANG Jingyi[1], LIZHA Shabuerjiang[1], CUI Yiran[2], LIU Xin[1]

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China
2. Department of Pharmacy, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China

Abstract: Objective　To explore the immune and inflammatory markers of simultaneous treatment of heart and brain in Naoxintong Capsules (脑心通胶囊). **Methods**　The left anterior descending coronary artery ligation (LAD) model was used as the myocardial ischemia model, and the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was used as the cerebral ischemia model. SD male rats were divided into eight groups, including sham group, model group, Naoxintong (110 mg/kg) group and captopril (10.125 mg/kg) group used for myocardial ischemia research, as well as sham group, MCAO model group, Naoxintong (220 mg/kg) group and *Ginkgo biloba* extract (50 mg/kg) group used for cerebral ischemia research, with 15 rats in each group. Electrocardiogram, myocardial enzyme spectrum and transmission electron microscope were selected as pharmacodynamic indexes. Bioinformatics and proteomics were used to predict and screen immunoinflammatory markers. qRT-PCR and Western blotting were used to verify the mRNA and protein relative expression levels of key candidate marker targets. **Results**　Naoxintong Capsules not only decreased the heart infarction rate and myocardial enzyme

收稿日期：2023-11-11

基金项目：国家自然科学基金面上项目（81573726）；北京中医药大学基本科研业务费项目（重点攻关项目）（2020-JYB-ZDGG-039）

作者简介：尚津锋，硕士研究生，从事脑缺血作用特点及药物干预研究。E-mail: sjf01qtdd@163.com

***通信作者：**刘　欣，博士，教授，从事脑缺血作用特点及药物干预研究。Tel: (010)53912127　E-mail: liuxin1011@bucm.edu.cn

activity in LAD rats ($P < 0.01$), improved myocardial injury, and decreased cerebral hippocampus injury and cerebral edema in LAD rats ($P < 0.05$). In MCAO rats, Naoxintong Capsules significantly decreased cerebral infarction rate, neural function score and rate of water content in cerebral tissue ($P < 0.05$, 0.01), alleviated myocardial tissue and cell damage, and decreased myocardial enzyme activity ($P < 0.01$). According to the results of bioinformatics and proteomics, the related targets of Toll receptor signaling pathway were the core for the simultaneous treatment of heart and brain and had the potential to become markers. The mRNA and protein relative expression levels of interferon-α (*IFN-α*), Toll-like receptor 4 (*TLR4*), *TLR7* and tumor necrosis factor-α (*TNF-α*) were significantly changed under two conditions of myocardial ischemia and cerebral ischemia ($P < 0.05$, 0.01), indicating that inflammatory cytokine storms and immune response cascades occurred in the hippocampus of LAD and MCAO rats. **Conclusion** IFN-α, TLR4, TLR7 and TNF-α can be used as immune and inflammatory markers of heart-brain mutual damage and simultaneous treatment of heart and brain in hippocampus.

Key words: Naoxintong Capsules; hippocampus; simultaneous treatment of heart and brain; immune and inflammation; Toll-like receptor related proteins; marker

心脑血管疾病属于常见的慢性病范畴，多发于中、老年人群，近年来发病有年轻化的趋势，具有发病隐匿、病因复杂等特点，常造成心、脑、肾等多个靶器官的结构或功能损害，严重威胁人类健康[1-2]。目前，我国心血管疾病的年龄标准化患病率总体增加，缺血性心脏病和缺血性卒中的发病率也显著增加[3]。总之，心脑血管疾病的发病率与致死率均有明显的上升趋势。人是复杂的生物体，胚胎时期心和脑同时发育，因此在生理或病理状态下，各器官发育和损伤是相互关联的，心和脑之间尤为明显[4]。近年来，随着心脑研究不断深入，神经心脏病学兴起，研究心脏和大脑互相损伤成为热点话题[5]。临床和实验证据表明，脑损伤和心脏功能障碍之间存在因果关系。比如，脑梗死后心律失常不仅是急性期致死的主要原因，还是中后期预后不良的先兆，有效防止脑梗死后心律失常是改善预后的关键[6]。故在不同病理状态同一机体条件下研究脑、心同治，更接近疾病本质[7]。以此为基础，辨识和确认脑、心共同的失衡特定分子机制，是“心脑同治”的关键科学问题之一。

基于“心脑同治”理念，脑心轴（神经系统和心血管系统之间的双向串扰）的研究越来越多[8]。而主要负责学习和记忆的海马在调节神经系统和心血管系统之间的双向串扰中起着关键作用[9]。由于脑心轴的双向性，神经系统疾病导致海马神经元死亡，同时心血管疾病也伴随着海马损伤[10]。从大脑海马的角度，研究心脑相互作用机制具有重要意义。此外，先天免疫细胞与动脉粥样硬化的缺血性并发症密切相关，从先天免疫系统角度有助于研究缺血性脑卒中、心肌梗死等缺血性损伤[11-12]。因此，免疫和炎症是“心脑同治”的生物学基础之一，研究关键靶点作为免疫和炎症标志物，有助于深入阐明心脑血管疾病的发病机制。本研究结合前期研究基础，基于大鼠心肌缺血模型和脑缺血模型，验证脑心通胶囊“心脑同治”作用。同时，以海马为切入点，预测并验证大脑海马中“心脑互损”“心脑同治”的免疫和炎症标志物。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量（260±10）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2018-0001。动物于室温 22～25 ℃、相对湿度 50%～60%、12 h 明暗交替环境中适应性饲养 3 d。动物实验由北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会进行伦理审批（批准号 BUCM-4-2022032201-1048）。

1.2 药品与试剂

脑心通胶囊（批号 211258）购自陕西步长制药有限公司，水合氯醛（批号 K2125780）购自阿拉丁生化科技股份有限公司；卡托普利（批号 2109052）购自辅仁药业集团有限公司；银杏提取物（批号 6280219）购自德国威玛舒培博士药厂；2,3,5-三苯基氯化四氮唑（2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride，TTC）磷酸缓冲液（批号 01223Z031）、苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色试剂盒（批号 20220307）购自北京索莱宝科技有限公司；戊二醛固定液（批号 C13397109）购自上海麦克林生化科技有限公司；812 包埋剂（批号 90529-77-4）购自 SPI 公司；蛋白定量染液（批号 WC320333）购自北京华兴博创生物技术中心；二硫苏糖醇（批号 2923C501）、碘代乙酰胺（批号 0736C278）购自美国 Amresco 公司；胰蛋白酶（批号 0000490995）购自美国 Promega 公司；乙腈（批号 0000221770）购自美国 J. T. Baker 公司；甲酸（批号 BCBM11920）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；RNA 提取试剂盒（批

号 017E211JA）购自南京诺唯赞生物科技有限公司；qRT-PCR 单链合成试剂盒（批号 Q10923）、染料法荧光定量预混试剂（批号 Q30716）购自北京全式金生物技术股份有限公司；蛋白预制胶（批号 2022C0GT202107）、快速封闭液（批号 20220916）购自苏州新赛美生物科技有限公司；聚偏二氟乙烯膜（批号 K5CA1684L）、快速电转液（批号 20230203）购自美国 Bio-Rad 公司；β-肌动蛋白（β-actin）抗体（批号 4970S-18/19）购自美国 CST 公司；Toll 样受体 2（toll-like receptor 2，TLR2）抗体（批号 1092471）、Toll 样受体 9（Toll-like receptor 9，TLR9）抗体（批号 5878610）、α-干扰素（interferon-α，IFN-α）抗体（批号 9591070）均购自 Affinity 公司；TLR4 抗体（批号 10005089）、TLR7 抗体（批号 00087567）均购自美国 Proteintech 公司；干扰素调节因子 3（interferon regulatory factor-3，IRF3）抗体（批号 BA12138785）、IRF7 抗体（批号 AI08126969）均购自北京博奥森生物技术有限公司；肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）抗体（批号 GR3359225-3）购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

MADLAB-4C/501H 型多功能生理信号采集记录仪（北京众实迪创科技发展有限公司）；XR220 Pluse 型全自动生化分析仪（新锐医疗设备有限公司）；HT7800/HT7700 型透射电镜（日本 Hitachi 公司）；SThermo Scientic Easy nLC 1000 system 型高效液相色谱系统、Orbitrap Fusion Lumos 型质谱系统（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪、powerpac basic041BR326356 型电泳仪电源、ChemiDoc MP imaging system 型化学发光成像系统（美国 Bio-Rad 公司）；TS-2000A 型脱色摇床（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）。

2 方法

2.1 心肌缺血和脑缺血模型的制备

2.1.1 心肌缺血模型的制备 采用结扎左前降支冠状动脉（left anterior descending coronary artery ligation，LAD）模型为心肌缺血模型。开胸暴露心脏，从左心耳下方入针，将左心耳和肺动脉圆锥的交界和心尖连线上作为缝扎的中点，缝扎的方向平行于左心耳的边缘。除假手术组外，其余各组大鼠均进行 LAD，结扎后可见下方大面积心肌表面颜色变为苍白，室壁运动明显减弱。假手术组只穿线不结扎，其余操作和模型组相同。

2.1.2 脑缺血模型的制备 采用大脑中动脉阻塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型为脑缺血模型。各组大鼠 ip 10%水合氯醛（350 mg/kg）麻醉，MCAO 模型组分离颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉，插入线栓，至标记进入颈内动脉与颈总动脉分叉处，术后保温。假手术组除不插线栓外，其余与模型组大鼠操作一致。

2.2 分组与给药

根据前期研究基础，筛选出 LAD 造模 14 d 是心损及脑的关键时间点，MCAO 造模 1 d 是脑损及心的关键时间点[13-14]。将 120 只大鼠随机分为 8 组，每组 15 只，包括研究心肌缺血的假手术组、LAD 模型组、脑心通（110 mg/kg）组和卡托普利（10.125 mg/kg）组，以及研究脑缺血的假手术组、MCAO 模型组、脑心通（220 mg/kg）组和银杏提取物（50 mg/kg）组。其中，用于心肌缺血研究的模型组、脑心通组和卡托普利组均进行心肌缺血造模，用于脑缺血的模型组、脑心通组和银杏提取物组进行脑缺血造模。脑心通和阳性药剂量由前期实验研究确定。所有动物每天 8: 00 和 20: 00 时各 ig 给药 1 次，持续最佳天数，最佳天数的第 2 天 7: 00 时 ig 给药 1 h 后造模，假手术组和模型组大鼠灌胃空白溶剂。

2.3 药效学指标

2.3.1 心电图检测 在进行整体实验前，检测所有实验动物的心脏功能，以保证所有实验动物的心脏功能在实验前均正常。将大鼠麻醉后，用多功能生理信号采集记录仪采集心电图。

2.3.2 心肌酶谱测定 麻醉大鼠，进行腹主动脉取血，3 000 r/min 离心 15 min，分离出血清，使用全自动生化分析仪检测血清中心肌酶天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）的活性。

2.3.3 神经功能评分评价神经功能 造模后应用盲法对大鼠进行神经功能评分。神经功能评分采用 Bederson 评分标准。0 分：无神经损伤症状；1 分：悬尾实验不能完全伸展对侧前爪；2 分：前肢抵抗对侧推力能力下降；3 分：向对侧转圈。

2.3.4 脑组织含水率测定 断头处死大鼠，迅速取脑，采用干-湿质量法测定脑含水率。将脑组织立即称定质量得湿质量；然后将铝箔包好的脑组织烘干 24 h，恢复到室温后称定质量得干质量，计算脑组织含水率。

脑组织含水率＝(湿质量－干质量)/湿质量

2.3.5 TTC 法测定梗死率 大鼠断头处死，取心脏做 2 mm 冠状切片，在 2% TTC 磷酸缓冲液中染色，置于 10%中性甲醛内固定后整齐排列，扫描正反面。利用 Image J 软件测量红、白区域的面积，计算心梗死率。

心梗死率＝心梗死组织体积/总心体积

大鼠断头处死，取全脑做 2 mm 冠状切片，在 2% TTC 磷酸缓冲液中染色，置于 4%多聚甲醛内固定后整齐排列，扫描脑片正反面。利用 Image J 软件测量红、白区域的面积，计算脑梗死率。

脑梗死率＝脑梗死组织体积/总脑体积

2.3.6 HE 染色观察病理变化 按照 HE 染色试剂盒说明书进行操作，取心肌组织和脑海马组织，经过脱蜡、染色、脱水、透明、固封等步骤进行 HE 染色，并用透射电镜观察病理改变。

2.3.7 透射电子显微镜观察线粒体变化 麻醉大鼠后，进行 0.9%氯化钠溶液灌注，灌注后取 1 mm^3 心室左下方心肌组织或大脑海马组织经固定、室温脱水、渗透包埋、聚合、超薄切片、染色，置于透射电镜下观察心肌细胞或海马神经元的线粒体形态。

2.4 生物信息学预测免疫炎症标志物

脑心通由黄芪、赤芍、丹参、当归、川芎、桃仁、红花、乳香、没药、鸡血藤、牛膝、桂枝、桑枝、地龙、全蝎、水蛭共 16 味中药组成。本草组鉴（HERB）数据库（http://herb.ac.cn/）是集高通量实验数据和参考文献于一体的天然药物数据库平台，包含 SymMap、TCMID 2.0、TCMSP 2.3 等多种数据库，提供中药材、中药有效成分、靶基因、疾病、高通量实验和参考挖掘数据等浏览、搜索、查看、下载等功能[15]。本研究运用 HERB 数据库检索脑心通所含中药的靶点，运用 Genecards 数据库（https://www.genecards.org/）[16]、TTD 数据库（https://db.idrblab.net/ttd/）[17]获取脑缺血和心肌缺血的靶点。利用 Venny 工具对脑心通、心肌缺血、脑缺血 3 个靶点集取交集，从而获取脑心通“心脑同治”靶点。运用 STRING 数据库[18]和 Cytoscape3.8.0 的 cytoHubba 插件[19]构建蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络并分析核心靶点，最终对核心靶点进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析。

2.5 蛋白质组学筛选差异表达蛋白

从各组心肌组织和脑组织中提取蛋白质并进行蛋白定量、酶切和脱盐。通过高效液相色谱系统进行梯度洗脱、蛋白质分析，组分冻干后以 20 μL 2%甲醇-0.1%甲酸复溶，离心，吸取上清采用夹心上样法按 10 μL 上样体积进行上样处理，Loading Pump 体积流量设置为 300 nL/min，上样 15 min；上样后按分离体积流量 600 nL/min 进行分流。液相分析条件：流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，B 为 80%乙腈-0.1%甲酸，加载泵体积流量设定为 300 nL/min。加载样品 15 min；分离体积流量设定为 600 nL/min，梯度洗脱：0～8 min，5%～10% B；8～58 min，10%～24% B；58～70 min，24%～32% B；70～71 min，32%～95% B；71～78 min，95% B。质谱分析条件：Nanospray Flex（NSI）离子源，离子喷雾电压为 2.0 kV，离子传输管温度为 320 ℃，质谱全扫描范围为 *m*/*z* 300～1 400；一级质谱分辨率设为 120 000，最大增益控制（automatic gain control target，AGC）为 5×10^5，最大注入时间为 50 ms；二级质谱分辨率设为 15 000，AGC 为 5×10^3，最大注入时间为 35 ms。以 $P<0.05$、差异倍数（fold change，FC）≥1.2 为标准，筛选心肌组织和脑组织中的差异表达蛋白。

2.6 qRT-PCR 检测 *IFN-α*、*IRF3*、*IRF7*、*TLR2*、*TLR4*、*TLR7*、*TLR9* 和 *TNF-α* 的 mRNA 表达

根据预测和蛋白质组学结果，采用 qRT-PCR 检测关键靶点的 mRNA 表达量。利用 RNA 提取试剂盒提取大鼠海马组织总 RNA。参照单链合成试剂盒说明书合成第一链 cDNA，以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR，体系 20 μL，扩增条件为 94 ℃预变性 1 min，94 ℃变性 5 s，50～60 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 10 s，共 40 个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）为内参，按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *IFN-α*、*IRF3*、*IRF7*、*TLR2*、*TLR4*、*TLR7*、*TLR9*、*TNF-α* 的 mRNA 相对表达水平。引物序列见表 1。

2.7 Western blotting 检测 IFN-α、IRF3、IRF7、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9 和 TNF-α 蛋白表达

根据生物信息学预测和蛋白质组学研究，采用 Western blotting 对关键的免疫炎症相关蛋白进行验证。将大鼠的大脑海马匀浆，提取核蛋白，离心取上清液，检测蛋白质浓度，上样、电泳、电转、封闭后，用非标记一抗及 HRP 标记的二抗对其进行孵育、检测。以 β-actin 作为对照，用 Image J 软件计算 IFN-α、IRF3、IRF7、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9、TNF-α 蛋白的相对表达水平。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。采用单因素

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

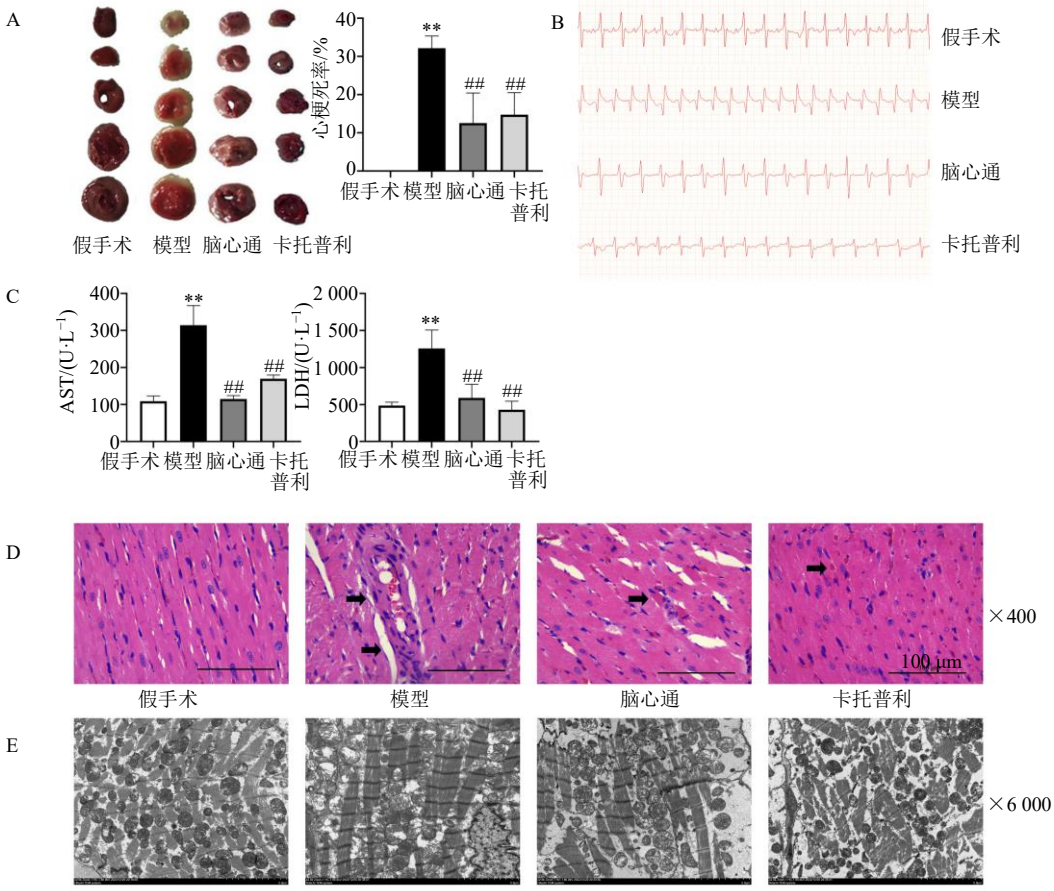
基因	引物序列 (5’-3’)
GAPDH	F: AAGATGGTGAAGGTCGGTGT
	R: GATCTCCTGGAAGATG
IFN-α	F: CAGATCCAGAAGGCTCAAGCTA
	R: GCTGCTGGAGGTCATTACAGA
IRF3	F: CTTACGACAGGACGCACAGATGG
	R: CAGGTTGACAGGTCTGGCTTATCC
IRF7	F: TCTGGATGAAGCTGATGCAC
	R: AGGGTCCCCTGAGTTGTCTT
TLR2	F: GCCCAGATGGCCACAGGACTCAAGA
	R: GTTCACACAGGCTCGCAAGTCACCA
TLR4	F: CGCTTTCAGCTTTGCCTTAA
	R: CTCCAGAAGATGTGCCTCCC
TLR7	F: TTACCAAGAAATTACGGCATC
	R: ACATTCACAGCCGCGTGTC
TLR9	F: GCTGTCCTATAACCTCATCGTC
	R: ACCCACATCAAGCACTCG
TNF-α	F: TGCCTCAGCCTCTTCTCATT
	R: CCCATTTGGGAACTTCTCCT

方差分析中最小显著性差异法进行多组比较。对于非正态数据采用非参数分析。图表使用 GraphPad Prism 8 软件生成，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 脑心通胶囊改善 LAD 大鼠的心脏和脑损伤

如图 1 所示，与假手术组比较，模型组大鼠的心梗死率及血清 AST、LDH 活性均显著升高（$P<0.01$），心电图出现明显的病理改变，说明 LAD 大鼠心脏出现损伤；与模型组比较，脑心通组和卡托普利组大鼠心梗死率和血清心肌酶活性均显著降低（$P<0.01$），且心肌组织损伤减少、线粒体损伤减轻。如图 2 所示，与假手术组比较，模型组大鼠的海马组织出现部分病理改变，神经元数量减少，线粒体体积增大，线粒体嵴数量减少，脑含水率升高（$P<0.05$）；与模型组比较，脑心通组和卡托普利组海马组织神经元的病理学改变减少，脑组织水肿减轻。



黑色箭头代表病理损伤区域；与假手术组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$，下图同。

Black arrows represent areas of pathological damage; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* sham group; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group, same as figures.

图 1 心肌缺血状态下各组大鼠的心梗死率 (A)、心电图 (B)、心肌酶谱 (C)、心肌组织 HE 染色 (D) 和超微结构 (E) ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Myocardial infarction rate (A), electrocardiogram (B), myocardial enzyme spectrum (C), HE staining (D) and ultra microstructure (E) in myocardium of rats in each group under myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

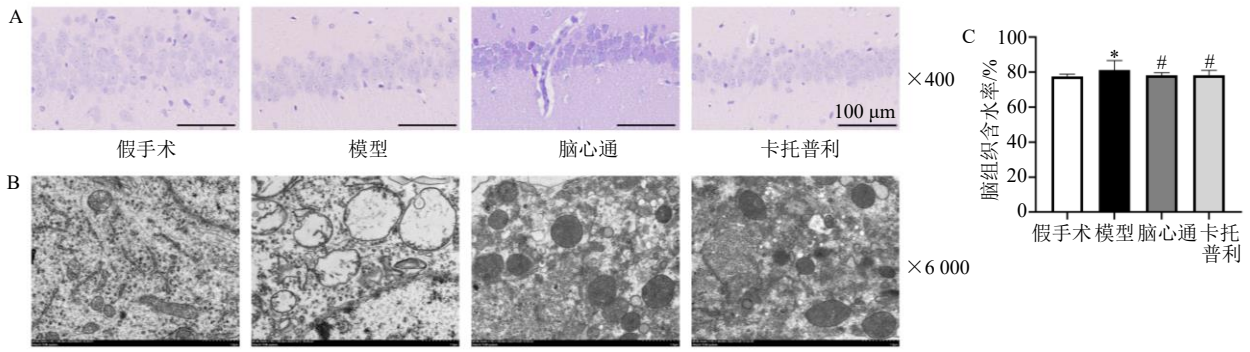


图 2　心肌缺血状态下各组大鼠的脑海马组织 HE 染色 (A)、超微结构 (B) 和脑组织含水率 (C) ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2　HE staining (A), ultra microstructure (B) of cerebral ehippocampus tissue and rate of water content in brain tissue (C) of rats in each group under myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.2　脑心通胶囊改善 MCAO 大鼠的脑和心脏损伤

如图 3 所示，与假手术组比较，模型组大鼠脑梗死率、神经功能评分、脑组织含水率均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，脑心通组大鼠脑梗死率、神经功能评分、脑组织含水率均显著降低（$P<0.05$、0.01），且海马 CA1 区病理损伤明显减少。与假手术组比较，模型组心电图紊乱，心肌细胞排列稀疏，细胞间隙变大，细胞胞体皱缩，心肌纤维紊乱；与模型组比较，各给药组大鼠的心电图紊乱情况减少、心肌组织损伤减轻。

透射电镜实验主要观察心肌组织的肌节、肌纤维、线粒体形状、线粒体嵴结构、基质密度等的变化情况。如图 4 所示，假手术组均未见异常，其肌节保持完整，肌纤维及线粒体均排列紧密，线粒体连续外膜明显。与假手术组比较，造模 1 d 后细胞内线粒体出现肿胀，形成不规则空泡，嵴歪曲、断

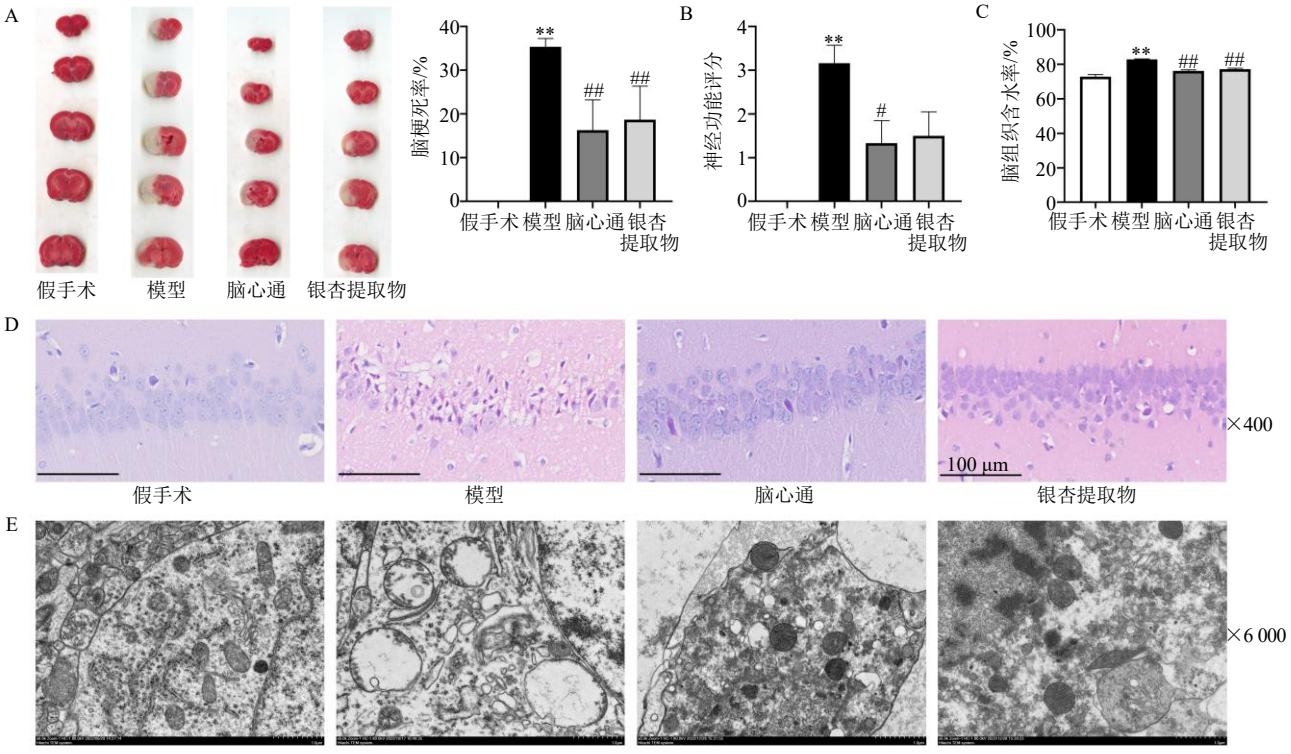


图 3　脑缺血状态下各组大鼠的脑梗死率 (A)、神经功能评分 (B)、脑组织含水率 (C)、脑组织 HE 染色 (D) 和超微结构 (E) ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3　Cerebral infarction rate (A), neural function score (B), rate of water content in brain tissue (C), HE staining (D) and ultra microstructure (E) in brain tissue of rats in each group under cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

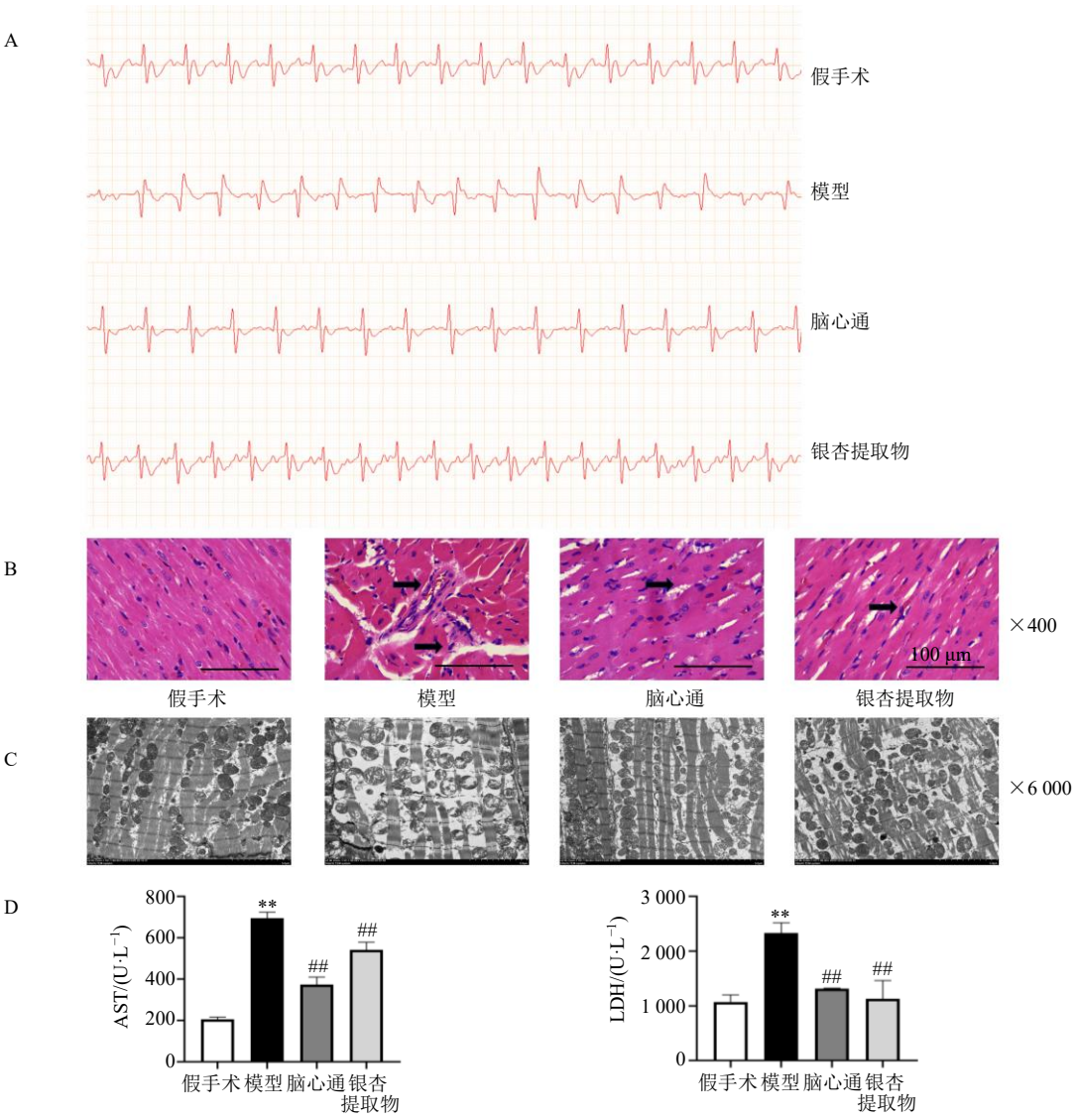


图 4　脑缺血状态下各组大鼠的心电图 (A)、心肌组织 HE 染色 (B)、超微结构 (C) 和心肌酶谱 (D) ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4　Electrocardiogram (A), HE staining (B), ultra microstructure (C) in myocardium and myocardial enzyme spectrum (D) of rats in each group under cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

裂，甚至溶解；与模型组比较，脑心通组线粒体肿胀、嵴歪曲、断裂现象减少，有所改善。心肌酶谱结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠血清中 AST、LDH 活性显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大鼠血清中 AST、LDH 活性显著降低（$P<0.01$）。

3.3　生物信息学预测“心脑同治”的免疫和炎症标志物

如图 5 所示，运用 HERB 数据库检索脑心通 16 味中药的靶点，得到黄芪 166 个靶点、赤芍 75 个靶点、丹参 173 个靶点、当归 39 个靶点、川芎 36 个靶点、桃仁 24 个靶点、红花 142 个靶点、乳香 58 个靶点、没药 204 个靶点、鸡血藤 91 个靶点、牛膝 89 个靶点、桂枝 519 个靶点、桑枝 75 个靶点、全蝎 7 个靶点、水蛭 18 个靶点、地龙 0 个靶点，去重得到脑心通 939 个靶点。Genecards 数据库得到心肌缺血 656 个靶点、脑缺血 771 个靶点，TTD 数据库得到心肌缺血 4 个靶点、脑缺血 4 个靶点，去重得到心肌缺血 657 个靶点、脑缺血 773 个靶点。脑心通、心肌缺血、脑缺血的 3 个靶点集合取交集，得到脑心通“心脑同治”的 122 个靶点，导入 STRING 数据库构建 PPI 网络，cytoHubba 插件计算度值最高的前 30 个靶点，进行 KEGG 富集分析，筛选 *P* 值最小的前 30 条通路。得到白细胞介素-17（interleukin-17，IL-17）信号通路、TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路、核因子-κB（nuclear factor-κB，

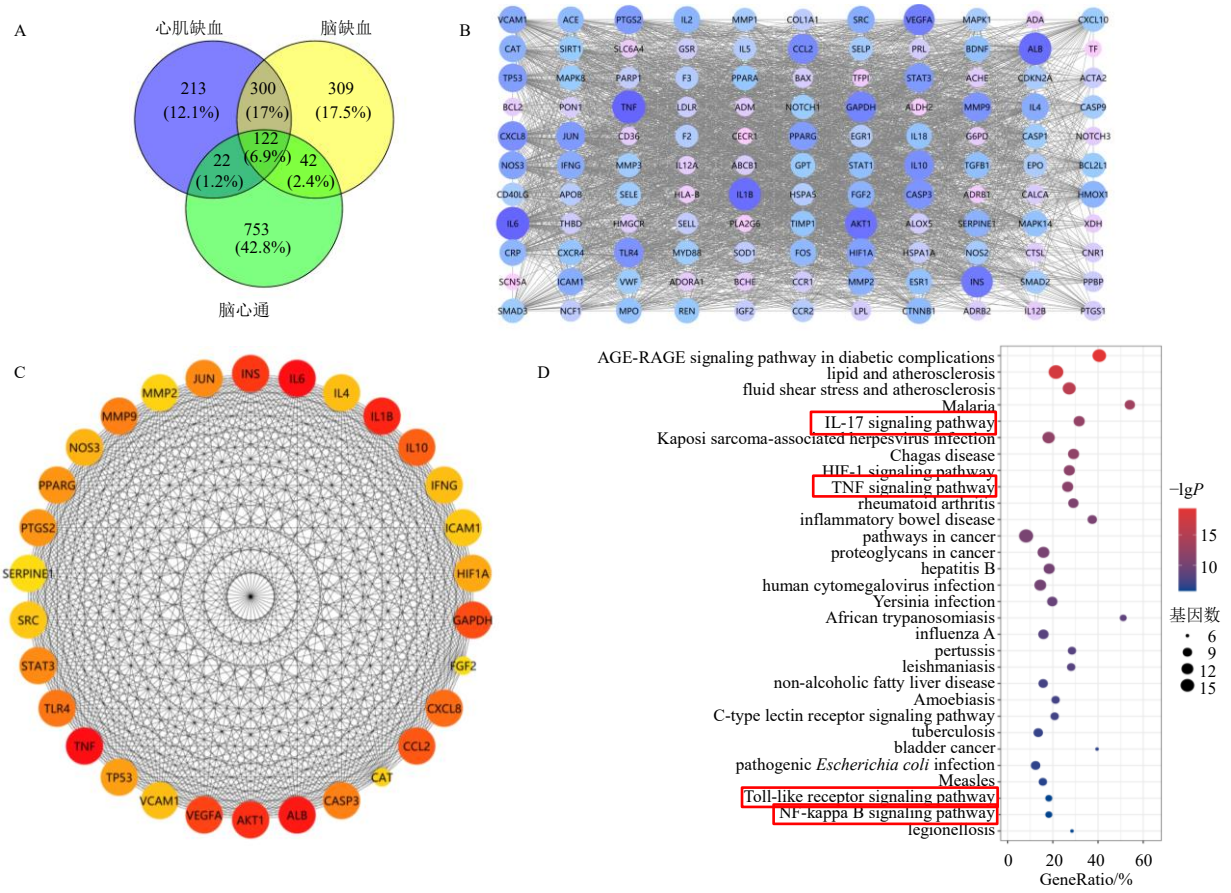


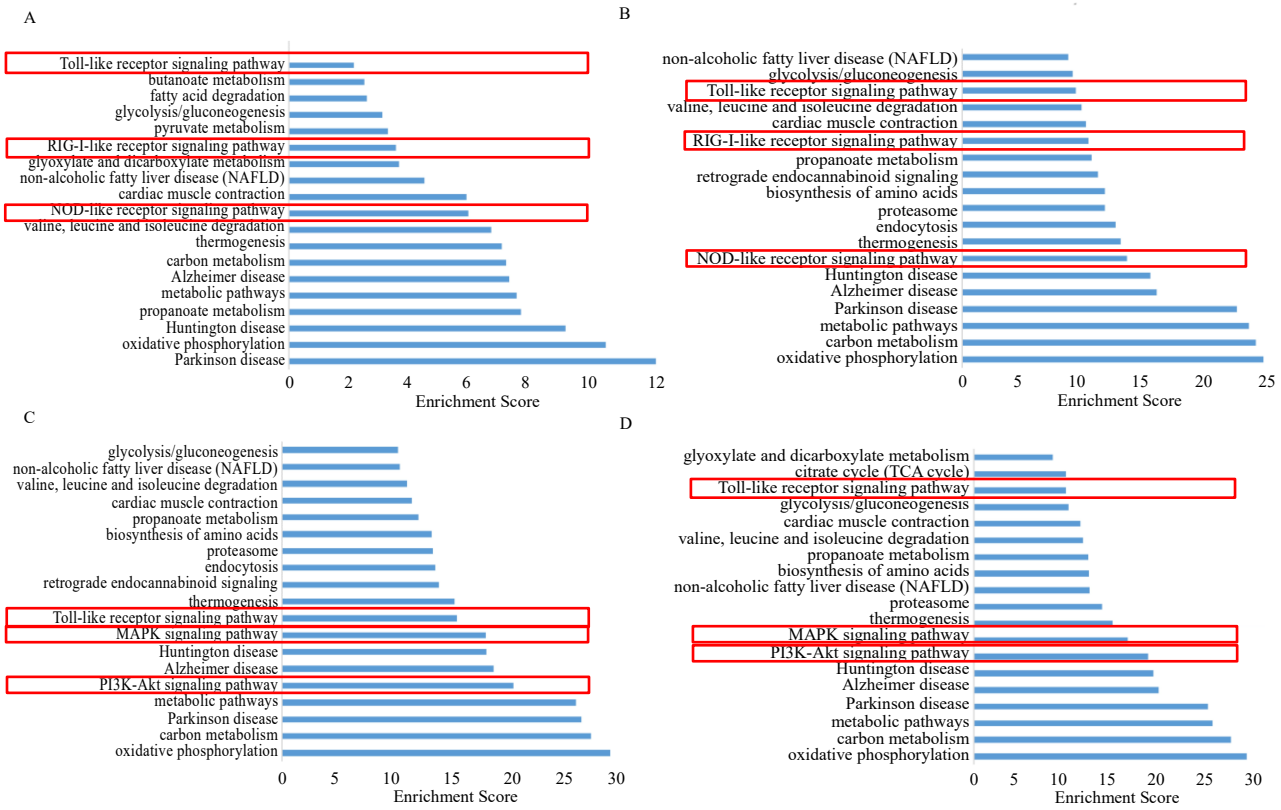
图 5　脑心通胶囊“心脑同治”生物信息学分析的韦恩图（A）、PPI 网络（B）、核心靶点网络（C）和 KEGG 富集分析气泡图（D）

Fig. 5　Venn diagram (A), PPI network (B), core target network (C) and KEGG enrichment bubble diagram (D) of “simultaneous treatment of heart and brain” bioinformatics analysis of Naoxintong Capsules

NF-κB）信号通路 4 条免疫炎症相关通路，结合前期蛋白质组学研究，不论是脑缺血状态，还是心肌缺血状态，Toll 样受体相关蛋白在大脑和心脏中发挥重要作用，因此，选择 Toll 受体信号通路上的相关蛋白作为大脑海马中“心脑同治”的蛋白标志物。

3.4　蛋白质组学筛选脑心通胶囊“心脑同治”的免疫和炎症标志物

通过蛋白质组学研究脑心通组和模型组之间的差异表达蛋白，并对差异表达蛋白进行 KEGG 富集分析，选择富集分数最高的前 20 个通路进行分析，结果见图 6。基于 14 d LAD 模型，在心肌组织中共检测到 1 625 种蛋白质，脑心通组与模型组相比，共有 116 个差异表达蛋白；在脑组织中检测到 2 966 种蛋白质，脑心通组与模型组相比，共有 138 个差异表达蛋白。在心肌缺血状态下，脑心通胶囊干预心肌组织和脑组织共有的信号通路为 NOD 样受体信号通路、视黄酸诱导基因蛋白-I（retinoic acid inducible gene-I，RIG-I）样受体信号途径和 Toll 样受体信号通路。基于 1 d MCAO 模型，在脑组织中共检测到 2 952 种蛋白质，脑心通组与模型组相比，共有 134 个差异表达蛋白；在心肌组织中检测到 1 745 种蛋白质，脑心通组与模型组相比，共有 217 个差异表达蛋白。在脑缺血状态下，丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路和 Toll 样受体信号通路是脑心通胶囊干预脑组织和心肌组织的常见信号通路。因此，脑心通胶囊干预心肌缺血和脑缺血大鼠的心肌组织和脑组织共有通路是 Toll 样受体信号通路。Toll 样受体信号通路的关键靶点可以作为脑心通胶囊“心脑同治”的免疫和炎症标志物。结合前期研究基础，生物信息学预测以及蛋白质组学筛选，IFN-α、IRF3、IRF7、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9 和 TNF-α 为 Toll 样受体信号通路的关键靶点，具有成为“心脑同治”免疫和炎症标志物的潜力。



A-脑心通组与 LAD 模型组心肌组织的通路富集条形图；B-脑心通组与 LAD 模型组脑组织的通路富集条形图；C-脑心通组与 MCAO 模型组脑组织的通路富集条形图；D-脑心通组与 MCAO 模型组心肌组织的通路富集条形图。

A-pathway enrichment bar chart of myocardial tissue in Naoxintong group and LAD model group; B-pathway enrichment bar chart of cerebral tissue of Naoxintong group and LAD model group; C-pathway enrichment bar graph of cerebral tissue of Naoxintong group and MCAO model group; D-pathway enrichment bar chart of myocardial tissue in Naoxintong group and MCAO model group.

图 6　脑心通胶囊治疗 LAD 和 MCAO 大鼠的蛋白质组学结果（*n* = 3）

Fig. 6　Proteomic results of Naoxintong Capsules in treatment of LAD and MCAO rats (*n* = 3)

3.5　qRT-PCR 检测海马中 Toll 样受体相关靶点的 mRNA 表达水平

对 IFN-α、IRF3、IRF7、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9 和 TNF-α 共 8 个关键免疫和炎症靶点进行 qRT-PCR 分析。如表 2 所示，与假手术组比较，模型组大鼠海马 *IFN-α*、*IRF3*、*IRF7*、*TLR2*、*TLR4*、*TLR7*、*TLR9* 和 *TNF-α* 的 mRNA 表达水平显著升高（$P<0.05$、0.01）；与模型组比较，脑心通组上述靶点的 mRNA 表达量显著降低（$P<0.05$、0.01）。结果表明，脑心通胶囊显著降低 LAD 大鼠和 MCAO 大鼠的海马中 *IFN-α*、*IRF3*、*IRF7*、*TLR2*、*TLR4*、*TLR7*、*TLR9* 和 *TNF-α* 的 mRNA 表达水平。

表 2　心肌缺血和脑缺血大鼠的海马中 Toll 样受体相关靶点的 mRNA 表达水平（$\bar{x} \pm s$，*n* = 3）

Table 2　mRNA expression levels of Toll-like receptor related targets in hippocampus of rats with myocardial ischemia and cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

状态	组别	剂量/(mg·kg^{-1})	mRNA 相对表达量							
			IFN-α	*IRF3*	*IRF7*	*TLR2*	*TLR4*	*TLR7*	*TLR9*	*TNF-α*
心肌缺血	假手术	—	1.00±0.10	1.00±0.06	1.00±0.03	1.00±0.04	1.02±0.24	1.00±0.08	1.00±0.09	1.00±0.04
	模型	—	36.12±8.85**	19.59±0.96**	9.17±0.48**	5.14±1.16**	6.36±0.52**	7.52±2.15**	13.29±0.63**	18.58±1.23**
	脑心通	110	20.31±0.98$^{\#\#}$	6.38±0.29$^{\#\#}$	2.47±0.26$^{\#\#}$	3.58±0.43$^{\#}$	2.83±0.22$^{\#\#}$	3.02±0.26$^{\#\#}$	2.76±0.26$^{\#\#}$	1.00±0.13$^{\#\#}$
脑缺血	假手术	—	1.01±0.19	1.00±0.05	1.01±0.13	1.01±0.18	1.04±0.39	1.04±0.37	1.13±0.66	1.02±0.24
	模型	—	7.60±0.94**	1.79±0.58*	3.83±1.06**	3.16±0.49**	3.43±0.62**	3.03±1.21*	3.81±1.35*	4.40±0.04**
	脑心通	220	1.40±1.91$^{\#\#}$	0.60±0.17$^{\#\#}$	1.76±0.91$^{\#}$	1.73±0.11$^{\#\#}$	1.63±0.23$^{\#\#}$	1.42±0.11$^{\#}$	0.88±0.51$^{\#\#}$	3.05±0.71$^{\#\#}$

与假手术组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$。

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$ *vs* sham group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group.

3.6　Western blotting 检测海马中 Toll 样受体相关靶点的蛋白表达水平

基于生物信息学和前期研究，对 8 个关键免疫蛋白进行 Western blotting 分析。如图 7 所示，在心肌缺血状态下，与假手术组比较，模型组大鼠海马组织中 IFN-α、IRF3、IRF7、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9、TNF-α 蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，脑心通组 IFN-α、IRF3、IRF7、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9、TNF-α 蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$、0.01）。说明在心肌缺血状态下，脑心通胶囊显著回调大脑海马中 IFN-α、IRF3、IRF7、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9、TNF-α 共 8 个蛋白的表达。

如图 8 所示，在脑缺血状态下，与假手术组比

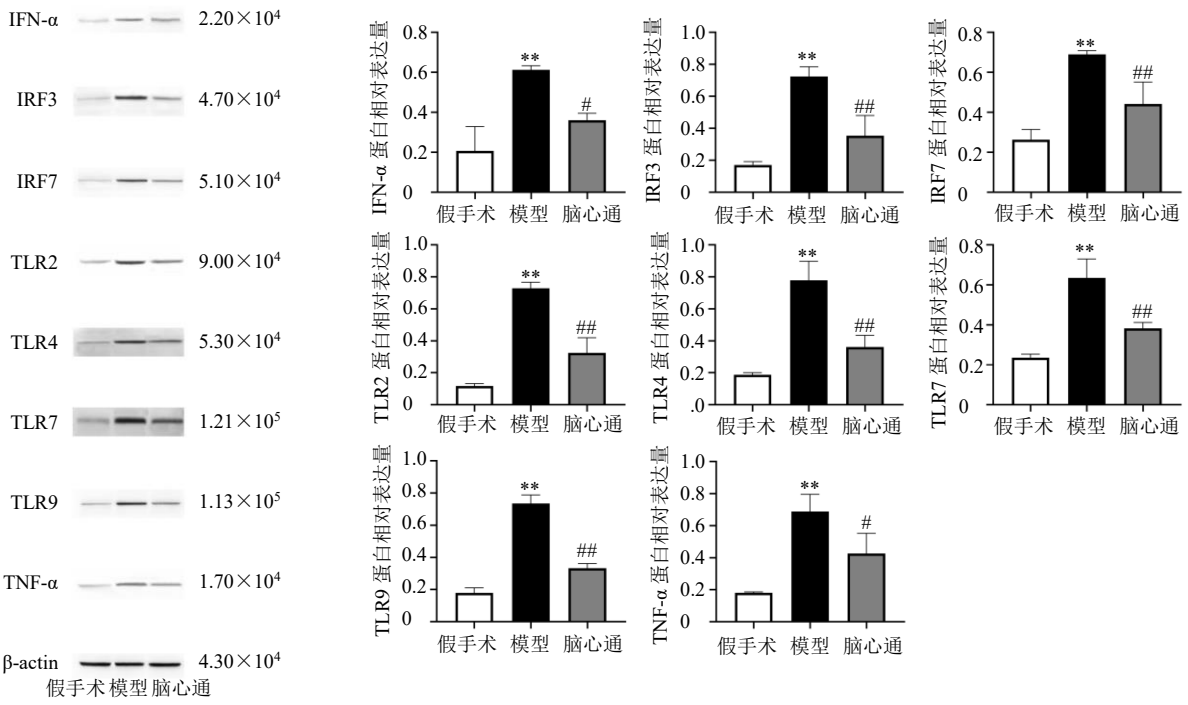


图 7　心肌缺血大鼠海马的 Toll 样受体相关蛋白表达量（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 7　Toll-like receptor-associated protein expression levels in hippocampus of rats with myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

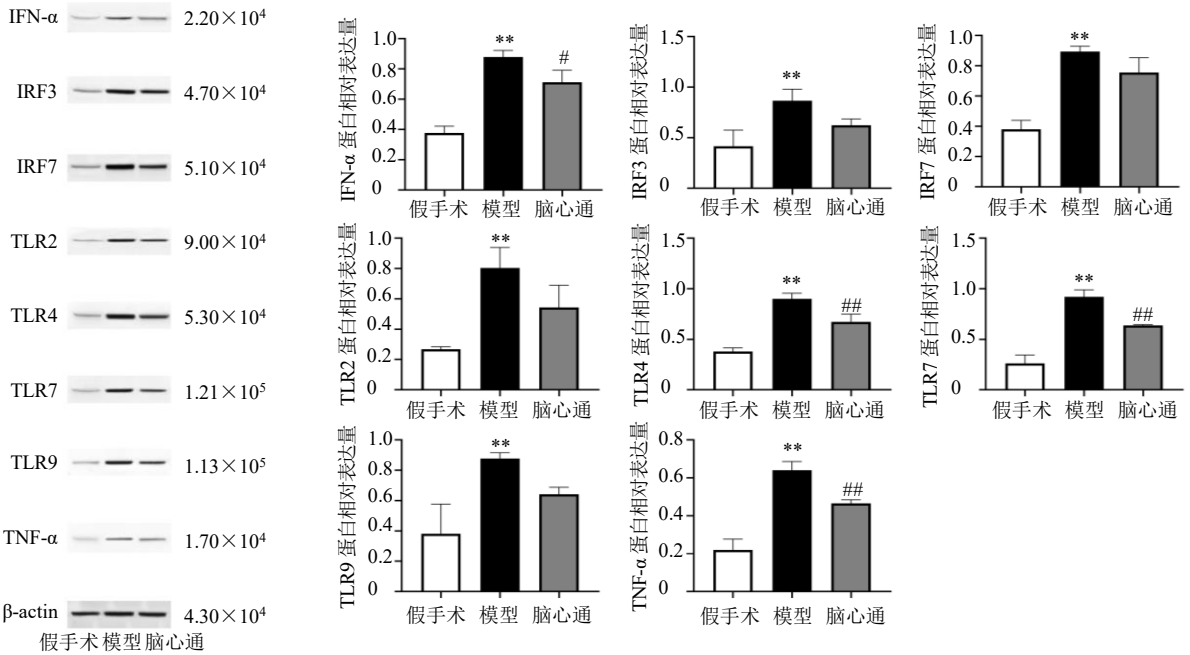


图 8　脑缺血大鼠海马的 Toll 样受体相关蛋白表达量（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 8　Toll-like receptor-associated protein expression levels in hippocampus of rats with cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

较，模型组大鼠海马组织中 IFN-α、IRF3、IRF7、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9、TNF-α 蛋白表达水平均显著增加（$P<0.01$）；与模型组比较，脑心通组 IFN-α、TLR4、TLR7、TNF-α 蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$、0.01）。说明在脑缺血状态下，脑心通胶囊显著回调大脑海马中 IFN-α、TLR4、TLR7、TNF-α 共 4 个蛋白的表达。

在心肌缺血和脑缺血 2 种状态下，IFN-α、TLR4、TLR7、TNF-α 共 4 个靶点的 mRNA 和蛋白相对表达量显著变化，表明大脑海马中出现炎症因子风暴和免疫反应瀑布，因此，大脑海马中 IFN-α、TLR4、TLR7、TNF-α 能够作为“心脑互损”“心脑同治”的免疫和炎症标志物。

4 讨论

随着时间推移，全球居民心脑血管疾病的发病率不断升高，心脑血管疾病成为影响健康和生命的危险因素，加重了全球疾病负担[20]。临床上，压力会影响心脏病患者预后，说明心血管疾病中具备脑心联系[21]。急性缺血性卒中患者会发生心脑串扰，涉及的肠道菌群失调和炎症反应等机制已得到初步验证[22]。依托大鼠的 LAD 和 MCAO 模型，本研究进行多时间点的“心脑互损”研究。心肌缺血损伤导致心电图、心肌梗死体积的显著变化，同时脑组织发生病理变化，含水率增加，证明心损及脑。脑缺血损伤导致脑梗死体积、神经功能评分、含水率显著提高，同时心肌组织发生病理变化，心肌酶谱数据发生变化，证实脑损及心。目前，大多数药理学研究均为单模型、单时间点研究，但临床心脑疾病大多随时间变化。本课题组前期研究显示，在体内，心肌缺血 14 d 和脑缺血 1 d 被认为是心脑相互损伤的临界时间点。LAD 模型大鼠脑损伤的时间点相对较晚，相比之下，MCAO 大鼠损伤心脏的时间更短。这表明“心脑互损”的严重程度受时间影响。

在心脑血管系统疾病中，炎症和免疫不可或缺。本研究显示，心肌缺血大鼠的大脑出现水肿，同时 MCAO 大鼠的脑水肿率增加，其心肌组织也出现病理改变，表明 LAD 和 MCAO 大鼠产生免疫和炎症反应。免疫炎症反应参与动脉粥样硬化、冠心病等多种心血管疾病，其中，心肌缺血可能涉及或平行于先天免疫反应的信号传导[23-24]。急性心肌梗死引发局部炎症组织反应和神经炎症，决定患者预后。免疫激活可能使心脏和大脑功能障碍相互关联，为“心脑同治”提供生物信号基础[25]。中枢神经系统和免疫系统之间的交流位于神经免疫轴的核心。缺血性脑损伤会带来神经炎症，导致细胞死亡、心脏损伤。免疫介质是促炎的信号来源，促进多种炎症细胞类型在受感染区域内的渗透。心肌梗塞、感染性心内膜炎都是心源性卒中的危险因素[26]。临床上，较高水平的炎症标志物与缺血性卒中后较差预后相关[27]。上述证据表明，心肌缺血和缺血性脑卒中伴有炎症浸润和免疫激活。此外，心脏和脾脏介导的免疫反应的炎症细胞浸润可能导致脑缺血诱导的急性和慢性心脏功能障碍和病理性心脏重塑[28]，进一步说明免疫反应介导脑出血后脑心相互作用。上述研究表明，免疫和炎症在心脑血管相互损伤的机制中起着关键作用。

针对心脑血管疾病的防治，“心脑同治”、心-脑轴等理念被提出。在“心脑同治”理念指导下，脑心通应运而生。脑心通方中重用黄芪，补中益气、利水消肿，为君药。丹参归心经，活血祛瘀，治疗瘀血诸症；当归活血补血，破恶血而养新血；川芎为血中气药，活血行气止痛，除卒急肿痛；桃仁、红花活血止痛，除卒暴击血；赤芍苦寒，清热凉血、散瘀止痛，破凝滞之血、活血化瘀，共为臣药。君臣相配，行气行血，解卒中之气滞血瘀。醋乳香、醋没药行气活血、破血止痛；鸡血藤舒筋活络；桂枝温通经脉、助阳化气；虫类药地龙、全蝎、水蛭功活血化瘀、通经活络，佐助活血化瘀通络止痛。牛膝、桑枝为佐使药，引药入经，前者引药下行，后者偏走于上。诸药合用，对症治疗，上利头目、中温脾阳、下行血海，活血不留瘀、祛瘀不伤正。现代药理学研究显示，脑心通含有阿魏酸、丹酚酸 B 等多种抗炎抗氧化药效成分，对心脏[29]、大脑有多重保护作用，与脑心通减轻神经炎症、细胞凋亡等作用相关[30-31]。药效学结果显示，不论是心肌缺血状态，还是脑缺血状态，脑心通胶囊均有效改善心肌缺血和脑缺血状态下的“心脑互损”情况，验证了脑心通保护心脏、大脑，改善“心脑互损”的药效。脑心通胶囊能减少模型大鼠心、脑水肿和炎症细胞浸润，说明脑心通胶囊具有抗炎作用，与以往研究一致。另外，还发现在 LAD 和 MCAO 模型中，脑心通最佳给药剂量不同。疾病的发生、发展和机制不同，药物剂量受疾病的影响也不同。药物在不同疾病的治疗中达到最佳效果的剂量是不同的。而且药物的剂量也会受到时间影响。LAD 和 MCAO 模型时间不相同，也是影响给药剂量的因素

之一。所以，脑心通胶囊在心肌缺血和脑缺血的病理条件下使用剂量受到疾病和时间 2 个因素的影响。剂量虽不一致，但药理学指标显示，在心肌缺血和脑缺血状态下脑心通胶囊均达到“心脑同治”的效果。在不同的疾病状态下选择脑心通胶囊的最佳剂量，保证在心肌缺血或脑缺血下“心脑同治”效果最好。

为探索“心脑互损”“心脑同治”中免疫炎症相关机制，本研究进行生物信息学研究筛选出 IL-17 信号通路、TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路、NF-κB 信号通路。结合蛋白质组学结果，Toll 样受体信号通路是脑心通胶囊改善 LAD 和 MCAO 模型大鼠心脏和海马损伤的关键通路。Toll 样受体信号通路位于免疫和炎症反应机制的上游。IFN-α、IRF3、IRF7、TLR2、TLR4、TLR7、TLR9 和 TNF-α 是 Toll 样受体信号通路的核心节点。因此，Toll 样受体信号通路和 Toll 样受体相关靶点被选为免疫和炎症研究的重点。作为参与宿主抵抗外界致病微生物入侵机体的第一道防线，Toll 样受体在非感染性疾病中与体内相应的内源性配体结合可触发免疫炎症反应，以其在检测和防御微生物病原体的先天免疫中的作用[32]。研究显示，动脉粥样硬化会激活 Toll 样受体，引发强烈的炎症反应[33]。坏死细胞释放的危险信号会激活先天免疫通路并引发强烈的炎症反应，对心肌梗死后心脏修复至关重要[34]。调节 TLR4 介导的炎症反应在脑缺血再灌注损伤中表现出潜在的神经保护作用[35]。

海马体位于大脑丘脑和内侧颞叶之间，主要负责短时记忆的存储、转换和定向等功能，与学习和记忆密切相关[36]。海马不仅在神经系统中尤为重要，与心脏的关系也很密切。海马体和基底神经节是心脏骤停复苏后缺血性病理的前哨[37]。同时，海马 CA1 区神经元在脑缺血和再灌注损伤后容易死亡[38]。抑制 microRNA-155 能够缓解短暂性全身缺血后的神经功能障碍以及海马中神经炎症和氧化应激损伤[39]。也有研究证明腹侧海马结构异常与心衰大鼠的抑郁症状有关[40]。心脏骤停和心肺复苏会损害海马体，海马体是下丘脑-垂体-肾上腺轴的重要组成部分，而该轴活动的改变会影响免疫功能[41]。心肌梗死引起的海马损伤也有报道。心肌梗死诱导的焦虑样行为与大鼠海马的表观遗传学变化有关[42]。系统评价显示，心力衰竭患者以及认知障碍或抑郁模型动物的海马和额叶出现异常[43]。这些研究显示，在心肌缺血和脑缺血中，海马发生病理改变，改善海马炎症有助于疾病治疗。

本研究首次运用全息医学思维，以海马为关键部位，观测“心脑互损”的药理变化。Western blotting 结果显示，与假手术组比较，大脑海马中 IFN-α、TLR4、TLR7、TNF-α 表达量显著增加，表明“心脑互损”状态下大脑海马中发生炎症和免疫反应。脑心通胶囊干预后，海马中这 4 个靶点表达量显著下降。由此说明，IFN-α、TLR4、TLR7、TNF-α 能够作为海马中“心脑互损”“心脑同治”的免疫和炎症标志物。本研究通过体内实验验证心损及脑、脑损及心的病理变化，以及脑心通胶囊具有“心脑同治”的药理作用，表明 Toll 样受体相关蛋白是“心脑互损”“心脑同治”的关键免疫蛋白，为“心脑同治”的深入研究提供依据和思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.

[2] 彭仁聪, 林日琦, 潘华生, 等. 对心脑血管疾病高风险人群进行干预的最新进展 [J]. 中外医疗, 2023, 42(20): 190-193.

[3] Zhang Y, Lin C J, Liu M, *et al*. Burden and trend of cardiovascular diseases among people under 20 years in China, Western Pacific region, and the world: An analysis of the global burden of disease study in 2019 [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1067072.

[4] Garrett L, Trümbach D, Spielmann N, *et al*. A rationale for considering heart/brain axis control in neuropsychiatric disease [J]. *Mamm Genome*, 2023, 34(2): 331-350.

[5] Sposato L A, Gurol M E. Advances in neurocardiology: Focus on atrial fibrillation [J]. *Stroke*, 2021, 52(11): 3696-3699.

[6] 金震, 王祖禄, 梁明, 等. 经导管消融治疗心肌梗死后室性心律失常的单中心长期随访结果 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2023, 44(10): 1164-1170.

[7] 齐大河, 马桦, 丁萌萌, 等. 基于脑心同治理论探究生脉注射液治疗脑缺血再灌注损伤机制 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(6): 28-37.

[8] Higashikuni Y, Liu W H, Numata G, *et al*. NLRP3 inflammasome activation through heart-brain interaction initiates cardiac inflammation and hypertrophy during pressure overload [J]. *Circulation*, 2023, 147(4): 338-355.

[9] Agrimi J, Spalletti C, Baroni C, *et al*. Obese mice exposed to psychosocial stress display cardiac and hippocampal dysfunction associated with local brain-derived

neurotrophic factor depletion [J]. *EBio Med*, 2019, 47: 384-401.

[10] Templin C, Hänggi J, Klein C, *et al*. Altered limbic and autonomic processing supports brain-heart axis in Takotsubo syndrome [J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(15): 1183-1187.

[11] Li N, Yang F, Zhao Z L, *et al*. Efficacy and safety of Naoxintong capsule for acute ischemic stroke: A protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine*, 2021, 100(34): e27120.

[12] 郑力榕, 包阿如汗, 张瑞芬, 等. 心肌缺血再灌注损伤机制及药物治疗研究进展 [J]. 中国临床研究, 2023, 36(10): 1580-1584.

[13] 李倩楠, 尚津锋, 姜婷月, 等. 基于 Toll 样受体信号通路探讨脑心通胶囊“脑心同治”的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(15): 4110-4118.

[14] 谢丽荣, 李倩楠, 姜婷月, 等. 基于心肌缺血状态的脑心通方对于心、脑组织 Toll 样受体相关通路蛋白的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(4): 1901-1906.

[15] Fang S S, Dong L, Liu L, *et al*. HERB: A high-throughput experiment- and reference-guided database of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1197-D1206.

[16] Safran M, Dalah I, Alexander J, *et al*. GeneCards Version 3: The human gene integrator [J]. *Database*, 2010, 2010: baq020.

[17] Zhou Y, Zhang Y T, Zhao D H, *et al*. TTD: Therapeutic Target Database describing target druggability information [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(1):1465-1477.

[18] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, *et al*. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.

[19] Chin C H, Chen S H, Wu H H, *et al*. cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8(Suppl 4): S11.

[20] Tapeinos C, Gao H, Bauleth-Ramos T, *et al*. Progress in stimuli-responsive biomaterials for treating cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *Small*, 2022, 18(36): e2200291.

[21] Vaccarino V, Shah A J, Mehta P K, *et al*. Brain-heart connections in stress and cardiovascular disease: Implications for the cardiac patient [J]. *Atherosclerosis*, 2021, 328: 74-82.

[22] Battaglini D, Robba C, Lopes da Silva A, *et al*. Brain-heart interaction after acute ischemic stroke [J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 163.

[23] Pedersen L R, Olsen R H, Anholm C, *et al*. Effects of 1year of exercise training versus combined exercise training and weight loss on body composition, low-grade inflammation and lipids in overweight patients with coronary artery disease: A randomized trial [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 127.

[24] Glinton K E, Ma W S, Lantz C, *et al*. Macrophage-produced VEGFC is induced by efferocytosis to ameliorate cardiac injury and inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(9): e140685.

[25] Thackeray J T, Hupe H C, Wang Y, *et al*. Myocardial inflammation predicts remodeling and neuroinflammation after myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(3): 263-275.

[26] Maida C D, Norrito R L, Daidone M, *et al*. Neuroinflammatory mechanisms in ischemic stroke: Focus on cardioembolic stroke, background, and therapeutic approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6454.

[27] 戴婧. 炎症标志物与急性大血管闭塞性缺血性卒中患者血管内治疗预后的相关性 [D]. 苏州: 苏州大学, 2022.

[28] Li W, Li L L, Li W K, *et al*. Spleen associated immune-response mediates brain-heart interaction after intracerebral hemorrhage [J]. *Exp Neurol*, 2020, 327: 113209.

[29] 邱新成, 张铮, 靳志涛, 等. 脑心通胶囊联合替格瑞洛治疗冠心病心绞痛的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(5): 1137-1141.

[30] Li Q J, Zuo Z, Pan Y Z, *et al*. Salvianolic acid B alleviates myocardial ischemia injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation via SIRT1-AMPK-PGC-1α signaling pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, 22(9): 842-857.

[31] 王海燕, 周惠芬, 何昱, 等. 脑心通胶囊对缺糖缺氧损伤脑微血管内皮细胞的保护作用及其机制 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3318-3325.

[32] Duan T H, Du Y, Xing C S, *et al*. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 812774.

[33] Shafeghat M, Kazemian S, Aminorroaya A, *et al*. Toll-like receptor 7 regulates cardiovascular diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109390.

[34] Prabhu S D, Frangogiannis N G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: From inflammation to fibrosis [J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 91-112.

[35] Liu L, Xu T C, Zhao Z A, *et al*. Toll-like receptor 4 signaling in neurons mediates cerebral ischemia/

reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(2): 864-874.

[36] Knierim J J. The hippocampus [J]. *Curr Biol*, 2015, 25(23): R1116-R1121.

[37] Haglund M, Lindberg E, Englund E. Hippocampus and basal Ganglia as potential sentinel sites for ischemic pathology after resuscitated cardiac arrest [J]. *Resuscitation*, 2019, 139: 230-233.

[38] Dehqanizadeh B, Mohammadi Z F, Kalani A H T, *et al*. Effect of early exercise on inflammatory parameters and apoptosis in CA1 area of the hippocampus following cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2022, 182: 102-110.

[39] Sun L C, Ji S Q, Xing J H. Inhibition of microRNA-155 alleviates neurological dysfunction following transient global ischemia and contribution of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(40): 4310-4317.

[40] Suzuki H, Sumiyoshi A, Matsumoto Y, *et al*. Structural abnormality of the hippocampus associated with depressive symptoms in heart failure rats [J]. *Neuroimage*, 2015, 105: 84-92.

[41] Yang M, Luo Y, Hao X Z, *et al*. Effects of high temperature and high humidity stress on the negative feedback regulation of hippocampus on HPA axis in rats [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2021, 42(5): 312-320.

[42] Zhou Y, Tian Q Y, Zheng C F, *et al*. Myocardial infarction-induced anxiety-like behavior is associated with epigenetic alterations in the hippocampus of rat [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 164: 172-183.

[43] Lu Z, Teng Y, Wang L, *et al*. Abnormalities of hippocampus and frontal lobes in heart failure patients and animal models with cognitive impairment or depression: A systematic review [J]. *PLoS One*, 2022, 17(12): e0278398.

[责任编辑　李亚楠]