

基于HMGB1/RAGE通路探究松萝酸对脑出血小鼠炎症损伤的影响及作用机制

吴俊晓¹, 李艳², 史博³, 陈红⁴, 胡成旺^{3*}

1. 南阳医学高等专科学校 康复医学系, 河南 南阳 473061

2. 南阳医学高等专科学校 张仲景国医研究院, 河南 南阳 473061

3. 南阳医学高等专科学校第一附属医院 神经外科, 河南 南阳 473007

4. 南阳医学高等专科学校第二附属医院 中医骨伤科, 河南 南阳 473132

摘要: 目的 基于高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1)/晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 通路探究松萝酸对脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 小鼠炎症损伤的影响。方法 将 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组、HMGB1 抑制剂丙酮酸乙酯 (40 mg/kg) 组及松萝酸低、高剂量 (20、30 mg/kg) 组和松萝酸 (30 mg/kg) + rHMGB1 (8 μg/kg) 组, 每组 18 只。采用颅内注射 0.5 μL 胶原酶构建 ICH 模型, 连续 3 d 给药后, 评价各组小鼠改良神经功能缺损评分 (modified neurological severity score, mNSS) 和左转率; 测定小鼠脑组织含水率; ELISA 检测脑组织白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1β 和 IL-18 水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察脑组织病理改变; 免疫荧光观察脑组织小胶质细胞活化情况; TUNEL 染色检测脑组织细胞凋亡; Western blotting 检测脑组织 HMGB1/RAGE 通路相关蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组小鼠纹状体组织损伤严重, mNSS、左侧大脑半球含水率、离子化钙结合适配分子 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1) 阳性细胞数、炎症因子水平、细胞凋亡率及 HMGB1、RAGE、磷酸化核因子-κB p65 (phosphorylated nuclear factor-κB p65, p-NF-κB p65)/NF-κB p65、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis-α, TNF-α) 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 左转率显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 松萝酸低、高剂量组和丙酮酸乙酯组纹状体组织损伤程度减轻, mNSS、左侧大脑半球含水率、Iba1 阳性细胞数、炎症因子水平、细胞凋亡率及 HMGB1/RAGE 通路相关蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 左转率显著升高 ($P < 0.05$); rHMGB1 显著逆转了松萝酸对 ICH 小鼠炎症损伤的抑制作用 ($P < 0.05$)。**结论** 松萝酸可能通过抑制 HMGB1/RAGE 通路减轻 ICH 小鼠炎症损伤。

关键词: 松萝酸; 高迁移率族蛋白 B1; 晚期糖基化终末产物受体; 脑出血; 炎症损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)13-5140-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.017

Effect and mechanism of usnic acid on inflammatory injury in mice with cerebral hemorrhage based on HMGB1/RAGE pathway

WU Junxiao¹, LI Yan², SHI Bo³, CHEN Hong⁴, HU Chengwang³

1. Department of Rehabilitation Medicine, Nanyang Medical College, Nanyang 473061, China

2. Zhang Zhongjing Chinese Medical Research Institute, Nanyang Medical College, Nanyang 473061, China

3. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473007, China

4. Department of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, The Second Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473132, China

Abstract: Objective To explore the effect of usnic acid on inflammatory injury in mice with intracerebral hemorrhage (ICH) based on high mobility group box 1 (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) pathway. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into sham group, model group, HMGB1 inhibitor ethyl pyruvate (40 mg/kg) group, usnic acid low-, high-dose (20, 30 mg/kg) groups and usnic acid (30 mg/kg) + rHMGB1 (8 μg/kg) group, with 18 mice in each group. The ICH model was

收稿日期: 2025-12-08

基金项目: 河南省科学技术厅科技攻关项目 (252102310266)

作者简介: 吴俊晓 (1973—), 女, 副教授, 研究方向为康复医学。Tel: (0377)63526359 E-mail: xch393@163.com

*通信作者: 胡成旺 (1969—), 男, 主任医师, 研究方向为神经外科。Tel: (0377)63328303

constructed by intracranial injection of 0.5 μ L collagenase. After continuous administration for 3 d, the modified neurological severity score (mNSS) and left turn rate of mice in each group were evaluated. The water rate of brain tissue in mice was determined. ELISA was used to measure the levels of interleukin-6 (IL-6), IL-1 β and IL-18 in brain tissue. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in brain tissue. Immunofluorescence was used to observe microglia activation in brain tissue. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis of brain tissue. Western blotting was used to detect the expressions of HMGB1/RAGE pathway related proteins in brain tissue. **Results** Compared with sham group, the striatum tissue of mice in model group was severely damaged, mNSS, left cerebral hemisphere water rate, ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) positive cells number, inflammatory factors levels, cell apoptosis rate, HMGB1, RAGE, phosphorylated nuclear factor- κ B p65 (p-NF- κ B p65)/NF- κ B p65 and TNF- α protein expression levels were significantly increased ($P < 0.05$), and the left turn rate was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the damage degree of striatum tissue in usnic acid low-, high-dose group and ethyl pyruvate group was alleviated ($P < 0.05$), mNSS, left cerebral hemisphere water rate, Iba1 positive cells number, inflammatory factors levels, cell apoptosis rate and HMGB1/RAGE pathway related proteins expression levels were significantly decreased ($P < 0.05$), and the left turn rate was significantly increased ($P < 0.05$). rHMGB1 significantly reversed the inhibitory effect of usnic acid on inflammatory injury in ICH mice ($P < 0.05$). **Conclusion** Usnic acid may alleviate inflammatory injury in ICH mice by inhibiting HMGB1/RAGE pathway.

Key words: usnic acid; high mobility group box 1; receptor for advanced glycation end product; intracerebral hemorrhage; inflammatory injury

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 作为高致死和高致残的脑血管疾病, 一直备受关注^[1-2]。该病多发于中老年人群, 据统计, 全球每年新增的约 200 万脑血管病例中, ICH 占 10%~15%^[3]。ICH 包括原发性与继发性损伤, 原发性损伤指血肿对脑组织的物理压迫, 引发颅内高压和神经功能缺损^[4]; 继发性损伤是由红细胞裂解产物启动, 包括炎症级联激活、神经元凋亡、氧化应激诱发等, 共同导致神经功能持续恶化并成为患者预后的主要因素^[5]。目前多数研究致力于阐明 ICH 后继发性损伤的分子机制, 并以此为基础开发新的治疗手段。

松萝酸是松萝科松萝属植物松萝 *Usnea diffracta* Vain. 的天然产物, 具有抗肿瘤、神经保护和抗炎等作用^[6]。据报道, 松萝酸可改善全脑缺血后的记忆障碍并减少 CA1 区神经元凋亡, 该保护作用与其降低神经炎症和缓解脂质过氧化有关, 表明其对缺血性脑损伤及认识功能具有积极影响^[7]。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 是一种重要的促炎介质, 在多种炎症性疾病的发病机制中扮演重要角色, 其参与内毒素血症和感染性休克等进程^[8]。晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 可通过与多种配体相互作用, 在糖尿病血管并发症、心力衰竭等疾病进程中发挥重要调控作用^[9]。而松萝酸是否能够通过调控 HMGB1/RAGE 信号通路影响 ICH 小鼠的炎症损伤尚不清楚, 因此本研究旨在探究松萝酸缓

解 ICH 炎症损伤的作用及其内在机制。

1 材料

1.1 动物

126 只 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 20~25 g, 购自河南省实验动物中心, 许可证号 SCXK (豫) 2022-0001。动物于 12 h/12 h 明暗交替、温度 (22 \pm 1) $^{\circ}$ C、相对湿度 (55 \pm 5)% 的环境中饲养, 自由进食饮水, 适应性饲养 1 周后开展实验。本研究经南阳医学高等专科学校伦理审查委员会批准, 批准号为南阳医专伦理[2024]第 002 号。

1.2 药品与试剂

松萝酸(质量分数为 98.90%, 批号 HY-N0656)、HMGB1 抑制剂丙酮酸乙酯 (rHMGB1, 质量分数为 98.00%, 批号 HY-Y1362) 购自美国 MCE 公司; 重组蛋白 rHMGB1 (批号 ab255799)、Cy3 标记的二抗(批号 ab6939)、HRP 标记的兔二抗(批号 ab6721) 购自英国 Abcam 公司; 胶原酶(批号 C4-BIOC) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; TUNEL 凋亡试剂盒(批号 C1088) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、IL-18 ELISA 试剂盒(批号分别为 SEKM-0007、SEKM-0002、SEKM-0019) 购自北京索莱宝科技有限公司; 小胶质标记物离子化钙结合适配分子 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1) 抗体(批号 019-19741) 购自日本 Wako 公司; 兔源 HMGB1 抗体(批号 3935)、RAGE 抗体(批号 42544)、核因子-

κ B p65 (nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65) 抗体 (批号 8242)、p-NF- κ B p65 抗体 (批号 3033)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis- α , TNF- α) 抗体 (批号 11948)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 2118) 购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

BS224S 型电子天平 (德国赛多利斯公司); Multifuge 型高速离心机 (德国 Heraeus 公司); Multiskan FC 型酶标仪 (美国赛默飞公司); DMi1 型倒置显微镜、TCS SP8 型共聚焦显微镜 (德国徕卡公司); FoverPac Basic 型电泳仪、ChemiDoc XRS+ 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 ICH 小鼠模型的构建、分组与给药

从 126 只 C57BL/6 小鼠中随机选取 18 只作为假手术组, 其余 108 只小鼠通过颅内注射胶原酶构建 ICH 模型^[10], 具体操作如下: 小鼠经麻醉并固定于立体定位仪后, 以前囟为基准定位左侧纹状体 (前 1.0 mm、左 2.2 mm、深 2.7 mm), 注入 0.5 μ L 胶原酶 (0.25 μ L/min)。造模后 24 h, 改良神经功能缺陷评分 (modified neurological severity score, mNSS) ≥ 4 分且苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色结果显示血肿位于基底节区未破入脑室, 表明造模成功, 将符合标准的小鼠纳入实验^[11]。造模结果显示 10 只小鼠因早期死亡 (术后 24 h 内) 被剔除, 8 只因血肿破入脑室被剔除, 最终 90 只小鼠纳入统计分析, 模型成功率为 83.33%。将 90 只成功造模小鼠随机分为模型组、丙酮酸乙酯 (40 mg/kg)^[12]组及松萝酸低、高剂量 (20、30 mg/kg)^[7]组和松萝酸 (30 mg/kg) + rHMGB1 (8 μ g/kg)^[13]组, 每组 18 只。假手术组操作方法与注射位置同上, 但注射等量生理盐水。造模次日, 各给药组 ip 相应药物 (10 mL/kg), 假手术组和模型组 ip 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 3 d。

2.2 mNSS 与转角实验

2.2.1 mNSS 测定 于术后第 1~3 天, 每日给药后, 按照文献方法^[14]评估各组小鼠的感知、反射和运动能力。mNSS 分值越高, 表明神经损伤越严重。

2.2.2 转角实验 于术后第 1~3 天, 每日给药后分别评估小鼠肢体平衡和协调能力, 将小鼠置于 30° 夹角装置中引导其转身, 每次测试间隔 30 s, 重复 10 次, 统计小鼠向左转动的次数, 计算左转率。

左转率 = 左转次数 / 总次数

2.3 脑组织含水率测定

每组取 6 只小鼠麻醉并处死, 获取完整脑组织, 沿纵裂及中脑水平切取左、右大脑半球与小脑, 分别称量获得湿质量。70 °C 烘箱干燥 48 h 至恒定质量, 获得干质量, 计算脑组织含水率。

脑组织含水率 = (湿质量 - 干质量) / 湿质量

2.4 ELISA 检测脑组织 IL-6、IL-1 β 和 IL-18 水平

每组另选 6 只小鼠, 处死后取部分血肿周围纹状体, 加入预冷的 PBS 缓冲液, 制备成 10% 的组织匀浆, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、IL-1 β 和 IL-18 的水平。

2.5 HE 染色观察脑组织病理变化

每组取剩余 6 只小鼠, 处死后取部分血肿周围纹状体, 经多聚甲醛固定、石蜡包埋后切片 (5 μ m), 脱蜡水化后进行 HE 染色, 随后脱水透明并封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.6 TUNEL 染色检测脑组织细胞凋亡

取“2.5”项下脑组织石蜡切片, 切片经处理后与 TUNEL 反应液孵育, DAPI 复染后使用荧光显微镜观察。通过随机选取多个视野, 计数 TUNEL 阳性细胞与 DAPI 阳性细胞总数, 并计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率 = TUNEL 阳性数 / DAPI 总数

2.7 免疫荧光染色检测脑组织 Iba1 表达

取“2.5”项下脑组织石蜡切片, 切片经脱蜡、抗原修复及血清封闭后, 加入 IBA1 一抗, 于 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗后与 Cy3 标记的二抗于室温避光孵育 1 h, 经 DAPI 复染, 并在同一曝光参数下于荧光显微镜观察小胶质细胞活化情况, 采用 Image J 软件统计 Iba1 阳性细胞数。

2.8 Western blotting 检测脑组织 HMGB1/RAGE 通路相关蛋白表达

取部分血肿周围纹状体, 加入裂解液提取蛋白, 加入上样缓冲液后于 100 °C 加热 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后, 加入用 TBST 配制的一抗 (HMGB1、RAGE、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、TNF- α 、GAPDH), 4 °C 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育后, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 使用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 统计学分析

使用 SPSS 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表

示,多组间比较行单因素方差分析,事后两两比较行SNK-*q*检验。

3 结果

3.1 各组小鼠 mNSS 和左转率比较

如表 1 所示,与假手术组比较,模型组小鼠 mNSS 显著升高 ($P < 0.05$),左转率显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,松萝酸低、高剂量组和丙酮酸乙酯组 mNSS 显著降低 ($P < 0.05$),左转率显著升高 ($P < 0.05$);与松萝酸低剂量组比较,松萝酸高剂量组和丙酮酸乙酯组 mNSS 显著降低 ($P < 0.05$),左转率升高但无统计学差异;与松萝酸高剂量组比较,松萝酸+rHMGB1 组 mNSS 显著升高 ($P < 0.05$),左转率显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2 各组小鼠脑组织含水率比较

如表 2 所示,与假手术组比较,模型组小鼠左侧大脑半球含水率显著升高 ($P < 0.05$);与模型组

比较,松萝酸低、高剂量组和丙酮酸乙酯组左侧大脑半球含水率显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸低剂量组比较,松萝酸高剂量组和丙酮酸乙酯组左侧大脑半球含水率显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸高剂量组比较,松萝酸+rHMGB1 组左侧大脑半球含水率显著升高 ($P < 0.05$)。

3.3 各组小鼠脑组织 IL-6、IL-1 β 和 IL-18 水平

如表 3 所示,与假手术组比较,模型组小鼠脑组织 IL-6、IL-1 β 和 IL-18 水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,松萝酸低、高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织 IL-6、IL-1 β 和 IL-18 水平显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸低剂量组比较,松萝酸高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织 IL-6、IL-1 β 和 IL-18 水平显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸高剂量组比较,松萝酸+rHMGB1 组小鼠脑组织 IL-6、IL-1 β 和 IL-18 水平显著升高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠 mNSS 和左转率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Table 1 Comparison of mNSS and left-turn rate of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

组别	剂量	mNSS/分			左转率/%		
		第1天	第2天	第3天	第1天	第2天	第3天
假手术	—	0.65 ± 0.07	0.57 ± 0.06	0.50 ± 0.05	36.21 ± 3.62	32.76 ± 2.86	34.74 ± 3.73
模型	—	10.45 ± 1.24 [#]	13.25 ± 1.68 [#]	12.03 ± 1.54 [#]	18.12 ± 2.31 [#]	14.28 ± 2.65 [#]	16.43 ± 2.71 [#]
松萝酸	20 mg·kg ⁻¹	6.23 ± 0.82 [*]	9.61 ± 1.31 [*]	8.96 ± 0.43 [*]	24.34 ± 1.52 [*]	21.82 ± 1.27 [*]	22.31 ± 1.33 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	5.91 ± 0.46 ^{*■}	7.34 ± 0.57 ^{*■}	5.45 ± 0.31 ^{*■}	26.56 ± 1.21 [*]	24.01 ± 1.83 [*]	24.62 ± 1.65 [*]
丙酮酸乙酯	40 mg·kg ⁻¹	5.78 ± 0.59 ^{*■}	7.14 ± 0.62 ^{*■}	5.05 ± 0.22 ^{*■}	27.83 ± 2.01 [*]	25.24 ± 1.68 [*]	25.82 ± 1.71 [*]
松萝酸+rHMGB1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	9.83 ± 1.02 [▲]	12.67 ± 1.21 [▲]	10.44 ± 0.73 [▲]	19.26 ± 1.42 [▲]	16.46 ± 1.74 [▲]	17.84 ± 2.01 [▲]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与松萝酸低剂量组比较: [■] $P < 0.05$; 与松萝酸高剂量组比较: [▲] $P < 0.05$, 下表同。

[#] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [■] $P < 0.05$ vs usnic acid low-dose group; [▲] $P < 0.05$ vs usnic acid high-dose group, same as below tables.

表 2 各组小鼠脑组织含水量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of brain tissue water rate of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	脑组织含水率/%		
		左侧大脑半球	右侧大脑半球	小脑
假手术	—	75.69 ± 0.69	75.21 ± 0.47	75.52 ± 0.57
模型	—	82.95 ± 1.10 [#]	76.51 ± 0.49	75.81 ± 0.65
松萝酸	20 mg·kg ⁻¹	78.74 ± 1.19 [*]	75.69 ± 0.63	76.23 ± 0.71
	30 mg·kg ⁻¹	76.43 ± 0.68 ^{*■}	76.24 ± 0.52	75.35 ± 0.57
丙酮酸乙酯	40 mg·kg ⁻¹	76.16 ± 1.52 ^{*■}	75.78 ± 0.61	76.42 ± 0.53
松萝酸+rHMGB1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	80.61 ± 0.69 [▲]	76.02 ± 0.42	75.74 ± 0.43

表 3 各组小鼠脑组织 IL-6、IL-1 β 和 IL-18 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison of IL-6, IL-1 β and IL-18 levels in brain of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	IL-6/(ng·L ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	IL-18/(ng·L ⁻¹)
假手术	—	22.88 ± 2.79	34.02 ± 4.23	6.67 ± 0.40
模型	—	96.74 ± 4.01 [#]	147.53 ± 8.85 [#]	45.49 ± 3.09 [#]
松萝酸	20 mg·kg ⁻¹	63.71 ± 3.24 [*]	130.88 ± 4.60 [*]	33.32 ± 2.98 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	46.37 ± 4.31 ^{*■}	104.72 ± 4.21 ^{*■}	20.85 ± 1.60 ^{*■}
丙酮酸乙酯	40 mg·kg ⁻¹	45.96 ± 3.06 ^{*■}	102.77 ± 4.36 ^{*■}	19.50 ± 1.82 ^{*■}
松萝酸+rHMGB1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	93.68 ± 4.46 [▲]	140.46 ± 3.30 [▲]	42.43 ± 2.24 [▲]

3.4 各组小鼠脑组织 HE 染色结果

如图 1 所示,假手术组小鼠纹状体周边仅见微量出血,组织水肿不明显;与假手术组比较,模型组呈现严重损伤,表现为细胞间隙增宽、血管周血肿及炎症浸润;与模型组比较,松萝酸低、高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸低剂量组比较,松萝酸高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸高剂量组比较,松萝酸+rHMGB1 组小鼠脑组织细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。

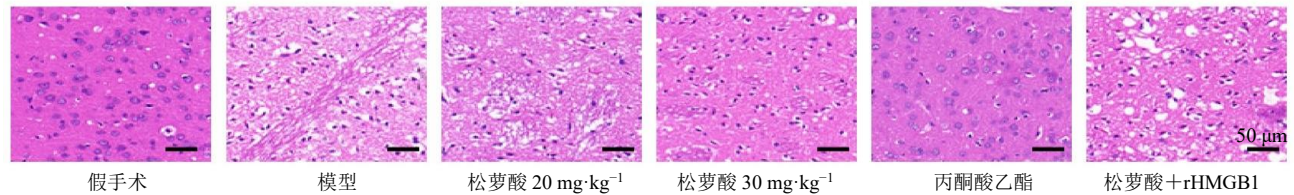


图 1 各组小鼠脑组织 HE 染色结果 (×200)

Fig. 1 HE staining results of brain of mice in each group (× 200)

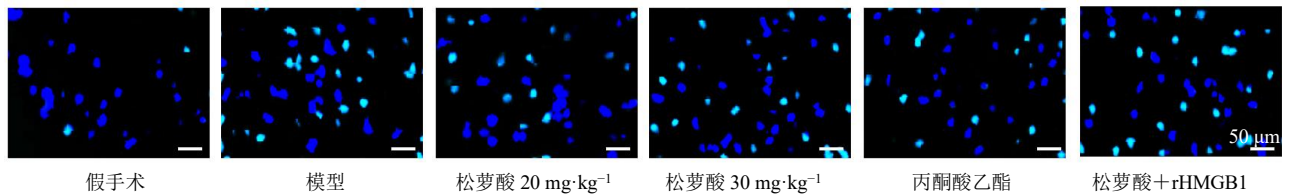


图 2 各组小鼠脑组织 TUNEL 染色结果 (×200)

Fig. 2 TUNEL staining results of brain of mice in each group (× 200)

表 4 各组小鼠脑组织细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison of cells apoptosis in brain of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	细胞凋亡率/%
假手术	—	5.43 ± 0.61
模型	—	35.53 ± 2.65 [#]
松萝酸	20 mg·kg ⁻¹	21.65 ± 1.91 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	18.13 ± 1.50 ^{*■}
丙酮酸乙酯	40 mg·kg ⁻¹	17.57 ± 1.85 ^{*■}
松萝酸+rHMGB1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	30.90 ± 1.76 [▲]

3.6 各组小鼠脑组织 Iba1 表达

如图 3 和表 5 所示,与假手术组比较,模型组小鼠脑组织 Iba1 阳性细胞数显著升高 ($P < 0.05$);

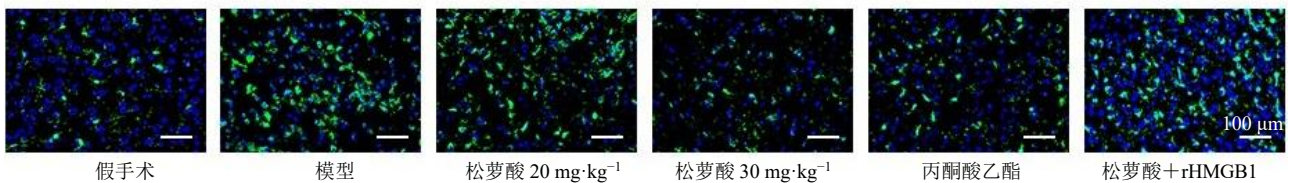


图 3 各组小鼠脑组织 Iba1 表达的免疫荧光染色结果 (×100)

Fig. 3 Immunofluorescence staining results of Iba1 expression of brain of mice in each group (× 100)

3.5 各组小鼠脑组织细胞凋亡比较

与假手术组比较,模型组小鼠脑组织细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,松萝酸低、高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸低剂量组比较,松萝酸高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸高剂量组比较,松萝酸+rHMGB1 组小鼠脑组织细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。

与模型组比较,松萝酸低、高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织 Iba1 阳性细胞数显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸低剂量组比较,松萝酸高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织 Iba1 阳性细胞数显著降低 ($P < 0.05$);与松萝酸高剂量组比较,松萝酸+rHMGB1 组小鼠脑组织 Iba1 阳性细胞数显著升高 ($P < 0.05$)。

3.7 各组小鼠脑组织 HMGB1/RAGE 通路相关蛋白表达水平

如图 4 和表 6 所示,与假手术组比较,模型组小鼠脑组织 HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65/NF-κB p65、TNF-α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与

表5 各组小鼠脑组织 Iba1 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 5 Comparison of Iba1 expression of brain of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	Iba1阳性细胞数/ (个·mm ⁻²)
假手术	—	31.32 ± 4.73
模型	—	49.78 ± 5.34 [#]
松萝酸	20 mg·kg ⁻¹	40.23 ± 4.55 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	33.76 ± 4.21 ^{*■}
丙酮酸乙酯	40 mg·kg ⁻¹	34.21 ± 3.75 ^{*■}
松萝酸+rHMGB1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	45.67 ± 3.42 [▲]

模型组比较, 松萝酸低、高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织 HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65/NF-κB p65、TNF-α 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与松萝酸低剂量组比较, 松萝酸高剂量组和丙酮酸乙酯组小鼠脑组织 HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65/NF-κB p65、TNF-α 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与松萝酸高剂量组比较, 松萝酸+rHMGB1 组小鼠脑组织 HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65/NF-κB p65、TNF-α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

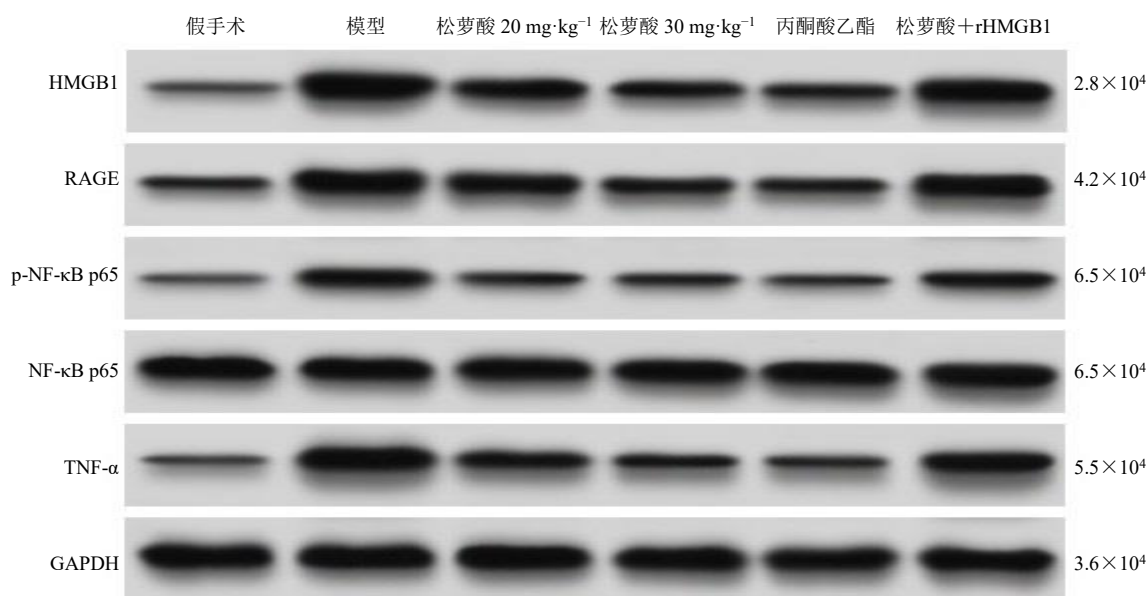


图4 各组小鼠脑组织 HMGB1/RAGE 通路相关蛋白表达

Fig. 4 HMGB1/RAGE pathway related protein expressions in brain of mice in each group

表6 各组小鼠脑组织 HMGB1/RAGE 通路相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Comparison of HMGB1/RAGE pathway related protein expression levels in brain of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	HMGB1/GAPDH	RAGE/GAPDH	p-NF-κB p65/NF-κB p65	TNF-α/GAPDH
假手术	—	0.24 ± 0.03	0.37 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.25 ± 0.02
模型	—	1.29 ± 0.07 [#]	1.17 ± 0.08 [#]	0.85 ± 0.08 [#]	1.13 ± 0.11 [#]
松萝酸	20 mg·kg ⁻¹	0.81 ± 0.06 [*]	0.92 ± 0.06 [*]	0.63 ± 0.07 [*]	0.84 ± 0.08 [*]
	30 mg·kg ⁻¹	0.58 ± 0.04 ^{*■}	0.67 ± 0.05 ^{*■}	0.42 ± 0.05 ^{*■}	0.62 ± 0.06 ^{*■}
丙酮酸乙酯	40 mg·kg ⁻¹	0.49 ± 0.04 ^{*■}	0.56 ± 0.05 ^{*■}	0.37 ± 0.04 ^{*■}	0.54 ± 0.05 ^{*■}
松萝酸+rHMGB1	30 mg·kg ⁻¹ +8 μg·kg ⁻¹	1.08 ± 0.06 [▲]	1.01 ± 0.04 [▲]	0.71 ± 0.07 [▲]	0.98 ± 0.09 [▲]

4 讨论

ICH 后继发性损伤的核心病理特征包括炎症反应、细胞毒性和氧化应激等, 进而引发患者出现不可逆的神经功能障碍和后遗症, 造成医疗负担。虽然凝血酶抑制剂、铁螯合剂和他汀类药物能够通过减轻脑水肿与炎症反应改善预后^[15], 但这些疗法尚未在临床上广泛应用, 仍需深入探索新药物治疗

ICH^[16]。松萝酸是从松萝中提取的次生代谢物, 具有抗炎、抗氧化等活性^[17]。松萝酸能够通过血脑屏障进入中枢系统, 提示其可能具有神经保护潜力^[6]。据报道, 松萝酸对映体可有效提升阿尔茨海默病模型小鼠的认知行为表现和学习记忆能力, 其机制可能与抑制髓过氧化物酶活性、降低脂质氢过氧化物含量以及减少海马区 IL-1β 水平有关, 从而减轻神

经炎症并改善认知功能缺损^[18]。以上研究表明松萝酸在脑损伤过程中可能发挥保护作用。本研究采用颅内注射胶原酶构建 ICH 模型,模型组表现出显著的神经功能缺损(mNSS 评分升高);转角实验显示,假手术组左转率约 35%,可能与单侧手术操作本身引起的局部不适或短暂行为抑制有关,而模型组的左转率降低,且与假手术组存在统计学差异,明确提示了 ICH 损伤对神经功能造成的特异性影响;组织病理学显示,模型组脑水肿加重,HE 染色可见典型出血灶,TUNEL 染色提示血肿周边细胞凋亡显著,且小胶质细胞活化区域与损伤核心区高度重合;分子水平上,血肿周围组织中 IL-1 β 、IL-6、IL-18 水平及 HMGB1/RAGE 通路相关蛋白表达均显著上调,证实了 ICH 模型的可靠性,为后续机制研究奠定基础。本研究结果显示,低、高剂量松萝酸干预后,小鼠 mNSS 评分减少、左转率升高,表明松萝酸对小鼠神经功能有一定的保护作用。通过比较各组小鼠脑组织含水率发现,松萝酸低、高剂量组较模型组左侧大脑半球含水率明显降低,表明松萝酸能够减轻小鼠脑水肿。ICH 后的炎症反应通过激活小胶质细胞和外周巨噬细胞浸润,显著增强神经炎症级联反应,成为继发性脑损伤的重要机制^[19]。大脑内部的炎性微环境是破坏稳态、导致神经元凋亡缺失并加剧神经功能缺损的关键因素^[20]。因此,抑制炎症与细胞凋亡,是改善 ICH 预后、减轻继发性神经损伤的干预要害^[21]。本研究结果显示,松萝酸低、高剂量组 Iba1 阳性细胞数及 IL-6、IL-1 β 、IL-18 水平和 TUNEL 阳性率显著降低,提示松萝酸能够抑制炎症反应并减轻 ICH 后细胞凋亡,发挥其脑保护作用。

HMGB1 在细胞损伤或感染导致坏死时被大量释放,其促炎效应主要由 RAGE 受体结合所介导^[22]。研究表明,通过抑制 HMGB1/RAGE/NF- κ B 信号通路可以减轻脓毒症引起的炎症和器官损伤^[23]。Fan 等^[24]研究表明, HMGB1/RAGE 信号轴能够驱动巨噬细胞及小胶质细胞介导的炎症反应,阻断该通路可对神经损伤产生神经保护效应。李井华等^[25]发现右美托咪定能够通过抑制 HMGB1/RAGE 轴发挥抗炎作用,减少细胞凋亡,对创伤性 ICH 大鼠具有神经保护作用。本研究结果显示,松萝酸干预后脑组织 HMGB1、RAGE、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、TNF- α 蛋白表达水平显著降低,提示松萝酸能够抑制 HMGB1/RAGE 信号通路。进一步将松萝酸和

HMGB1/RAGE 通路激活剂重组蛋白 rHMGB1 联用,结果显示,松萝酸+rHMGB1 组 mNSS 评分、左侧大脑半球含水率、Iba1 阳性细胞数、炎症因子水平、TUNEL 阳性率及 HMGB1、RAGE、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、TNF- α 蛋白表达水平显著升高,左转率显著降低,提示松萝酸可能通过调控 HMGB1/RAGE 轴减轻 ICH 小鼠炎症损伤。本研究同时使用 HMGB1 抑制剂丙酮酸乙酯抑制 HMGB1 释放,结果显示,丙酮酸乙酯组在各项指标上与松萝酸高剂量组相似,进一步验证了本研究结论。

综上,松萝酸可能通过调控 HMGB1/RAGE 信号通路来减轻 ICH 小鼠的炎症损伤,为开发新的 ICH 治疗药物提供一定的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sandset E C, Wang X, Carcel C, *et al.* Sex differences in treatment, radiological features and outcome after intracerebral haemorrhage: Pooled analysis of intensive blood pressure reduction in acute cerebral haemorrhage trials 1 and 2 [J]. *Eur Stroke J*, 2020, 5(4): 345-350.
- [2] Zhou Z R, Zhao Y H, Sun R, *et al.* Effects of Xingnaojing on serum high-sensitivity C-reactive protein and neuron-specific enolase in patients with acute cerebral hemorrhage: A protocol of systematic review and Meta-analysis [J]. *Medicine*, 2020, 99(45): e21379.
- [3] 向开诚, 罗义华. 亚低温疗法辅助立体定向血肿穿刺置管引流术对老年脑出血患者术后颅内压和神经功能的保护作用 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2018, 18(12): 869-875.
- [4] Gross B A, Jankowitz B T, Friedlander R M. Cerebral intraparenchymal hemorrhage: A review [J]. *JAMA*, 2019, 321(13): 1295-1303.
- [5] Powers W J. Stroke: Intracranial volumes and pressures following cerebral hemorrhage [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2022, 31(9): 106637.
- [6] Studzińska-Sroka E, Majchrzak-Celińska A, Zalewski P, *et al.* Lichen-derived compounds and extracts as biologically active substances with anticancer and neuroprotective properties [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(12): 1293.
- [7] Erfani S, Valadbeigi T, Aboutaleb N, *et al.* Usnic acid improves memory impairment after cerebral ischemia/reperfusion injuries by anti-neuroinflammatory, anti-oxidant, and anti-apoptotic properties [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(9): 1225-1231.
- [8] 蔡婉扬, 蒋骏航, 钱峰. HMGB1 研究进展 [J]. *上海医药*, 2019, 40(3): 60-63.

- [9] Teissier T, Boulanger É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflamming [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(3): 279-301.
- [10] 郑建新, 王爽, 凌会敏, 等. 依达拉奉联合黄体酮对衰老脑出血小鼠模型神经功能恢复效果及其机制研究 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2020, 22(6): 639-643.
- [11] 罗瑞琦, 严美茹, 王思媛, 等. 英夫利西单抗对脑出血模型小鼠的改善作用及机制研究 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2022, 29(6): 488-494.
- [12] Li Y F, Li X H, Qu Y, *et al.* Role of HMGB1 translocation to neuronal nucleus in rat model with septic brain injury [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 645: 90-96.
- [13] Zhai Y Y, Zhu Y L, Liu J Y, *et al.* Dexmedetomidine post-conditioning alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting high mobility group protein B1 group (HMGB1)/Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e918617.
- [14] Liu Y Y, Xue X, Zhang H T, *et al.* Neuronal-targeted TFEB rescues dysfunction of the autophagy-lysosomal pathway and alleviates ischemic injury in permanent cerebral ischemia [J]. *Autophagy*, 2019, 15(3): 493-509.
- [15] Al-Kawaz M N, Hanley D F, Ziai W. Advances in therapeutic approaches for spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(4): 1757-1767.
- [16] Ren H L, Han R R, Chen X M, *et al.* Potential therapeutic targets for intracerebral hemorrhage-associated inflammation: An update [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(9): 1752-1768.
- [17] 于大永, 郭秀磊, 高鸿雁, 等. 松萝酸对 3 种肿瘤细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *天津师范大学学报: 自然科学版*, 2020, 40(4): 39-43.
- [18] Cazarin C A, Dalmagro A P, Gonçalves A E, *et al.* Usnic acid enantiomers restore cognitive deficits and neurochemical alterations induced by A β ₁₋₄₂ in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 397: 112945.
- [19] Magid-Bernstein J, Girard R, Polster S, *et al.* Cerebral hemorrhage: Pathophysiology, treatment, and future directions [J]. *Circ Res*, 2022, 130(8): 1204-1229.
- [20] Chen S P, Peng J H, Sherchan P, *et al.* TREM2 activation attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis via PI3K/Akt pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 168.
- [21] Wang Z, Zhou F, Dou Y, *et al.* Melatonin alleviates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats via suppressing apoptosis, inflammation, oxidative stress, DNA damage, and mitochondria injury [J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(1): 74-91.
- [22] 徐长青, 刘宗梅, 张倩, 等. 红芪多糖通过抑制 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路介导的炎症反应缓解糖尿病肾病 [J]. *中草药*, 2025, 56(21): 7795-7805.
- [23] He J B, Qin W B, Jiang S S, *et al.* Oxymatrine attenuates sepsis-induced inflammation and organ injury via inhibition of HMGB1/RAGE/NF- κ B signaling pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2024, 85(4): e22219.
- [24] Fan H, Tang H B, Chen Z, *et al.* Inhibiting HMGB1-RAGE axis prevents pro-inflammatory macrophages/microglia polarization and affords neuroprotection after spinal cord injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 295.
- [25] 李井华, 王晓艳. 右美托咪定调节 HMGB1/RAGE/NF- κ B 信号通路对创伤性脑出血大鼠的神经保护作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2025, 45(13): 3257-3261.

[责任编辑 李亚楠]